บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อุปกรณ์การทดลอง

เครื่องอังไอน้ำ (Steam bath)

เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) ของ EYELA Japan

เครื่องดูดอากาศ (Suction Pump) ของ EYELA Japan A-35

เครื่องมือวัดความถ่วงจำเพาะ

เครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหย (Cleveneaur apparatus)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Laboratory centrifuge)

เครื่องเขย่า (Vortex) รุ่น Vortex-Genie No. 2 Scientific Industries Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องชั่ง Mettler รุ่น AT 200

Gas Chromatography รุ่น GC-8000 ของบริษัท Fisons Instruments จำกัด ประเทศสหราชอาณาจักร

Mass spectrometer รุ่น MD-800 ของบริษัท Fisons Instruments จำกัด ประเทศสหราชอาณาจักร

Column DB-WAX fused silica capillary, Polyethylene Glycol ยาว 20 เมตร, เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร

แผ่นยาเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ของบริษัทBecton Dickinson and Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา

แผ่นยามาตรฐาน เพนนิซิลิน 10 ยูนิต ของบริษัท Becton Dickinson and Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา

แผ่นยามาตรฐานเททราซัยคลิน 30 ไมโครกรัม ของบริษัทBecton Dickinson and Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา

แผ่นยามาตรฐาน แวนโคมัยซิน 30 ไมโครกรัม ของบริษัทBecton Dickinson and Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. สารเคมี

ตัวทำละลาย(Solvent) ที่ใช้เป็นชนิด Commercial Grade ได้แก่ เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม และเมธานอล ตัวทำละลายเหล่านี้ต้องนำไปกลั่นก่อนใช้ทุกครั้ง สำหรับตัวทำละลายผสมใช้ส่วนผสมเป็นปริมาตรต่อปริมาตร

ตัวดูดซับ (Absorbent) ได้แก่

- ซิลิกาเจล 60 G Art 7734 (0.063-0.200) ของบริษัท E.MERCK Darmstadt สำหรับ คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)
- ซิลิกาเจล 60 GF_{254} Art 7731 ของบริษัท E.MERCK Darmstadt สำหรับ คอลัมน์โครมาโทกราฟี แบบรวดเร็ว (Quick Column Chromatography)

Tween 80

น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืช

3. เทคนิคต่างๆที่ใช้ในงานวิจัย

3.1 การสกัดสาร (Maceration) เป็นวิธีสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น โถ ทิ้งไว้ 7 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆรินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (Marc) ให้มากที่สุด รวบรวมสารสกัดที่ได้จากการสกัดซ้ำหลายๆครั้ง นำไปกรองโดยใช้กระดาษกรอง

3.2 การสกัดน้ำมันหอมระเหย (Extraction of volatile oil) เป็นวิธีการกลั่นน้ำมันหอมระเหยโดยต้มสมุนไพรซึ่งหั่นละเอียดรวมกับน้ำ เมื่อน้ำและน้ำมันหอมระเหยรวมตัวกันและขึ้นไปถึงคอนเดนเซอร์ (Condenser) จะกลั่นตัวกลับลงมาจากนั้นนำของเหลวที่ได้แยกน้ำมันหอมระเหยออกจากชั้นน้ำ

3.3 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) ใช้คอลัมน์แก้วขนาดพอเหมาะกับปริมาณสารที่จะแยก อัตราส่วนของตัวดูดซับ (Absorbent) ต่อสารที่ต้องการจะแยกประมาณ 30 - 40 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก ในที่นี้บรรจุคอลัมน์โดยวิธีเปียก (Wet Packing) โดยผสมซิลิกาเจลกับตัวทำละลายให้เข้ากันดีก่อนแล้วจึงค่อยๆเทของผสมนี้ลงในคอลัมน์ซึ่งมีสำลีอุดที่ปลายคอลัมน์ และมีตัวทำละลายอยู่ประมาณครึ่งคอลัมน์ ขณะที่เทซิลิกาลงในคอลัมน์ควรเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้าๆ พร้อมกับเคาะคอลัมน์เบาๆเพื่อให้ซิลิกาเจลลงไปในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอทำเช่นนี้จนกระทั่งบรรจุซิลิกาเจลหมดแล้วค่อยเติมสิ่งสกัดจากพืชที่ผสมกับ

ซิลิกาเจลจนแห้งแล้ว ลงไปพร้อมทั้งปล่อยให้ระดับของสารละลายลดลงเกือบแห้ง เติมซิลิกาเจลลงในคอลัมน์อีก 1 ถึง 2 เซนติเมตร เพื่อคลุมสารที่จะแยกแล้วคลุมส่วนบนของซิลิกาเจลอีกครั้งด้วยกระดาษกรองเพื่อรักษาผิวหน้าของซิลิกาเจลให้เรียบ จากนั้นใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมชะคอลัมน์ ในระหว่างทำการทดลองต้องระวังไม่ให้ตัวทำละลายแห้งไปจากผิวหน้าของซิลิกาเจล

3.4 คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว(Quick Column Chromatography) ใช้ sintered glass funnel ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร เป็นคอลัมน์ในการบรรจุคอลัมน์ทำได้โดยนำ sintered glass funnel มาต่อเข้ากับขวด suction ซึ่งต่ออยู่กับเครื่องปั๊มน้ำเปิดเครื่องปั๊มน้ำแล้วบรรจุซิลิกาเจลชนิด 60 GF_{254} Art 7731 ซึ่งเป็นตัวดูดซับลงใน sintered glass funnel ระหว่างการบรรจุต้องกดให้แน่นและเกลี่ยผิวหน้าให้เรียบจนได้ความสูงประมาณ 4 เซนติเมตร จากนั้นเทตัวทำละลายลงบนผิวหน้าของซิลิกาเจลเพื่อให้ตัวทำละลายไหลผ่าน ซึ่งจะทำให้ซิลิกาเจลอัดตัวแน่นสม่ำเสมอ จากนั้นนำสารสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากัน แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ เกลี่ยผิวหน้าให้เรียบชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่างๆที่เหมาะสม

3.5 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer Chromatography , TLC) ตัดแผ่น TLC ให้มีขนาดและความยาวพอเหมาะใช้หลอดคะปิลาลีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 0.5 มิลลิเมตร แต้มสารละลายที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น TLC ให้จุดเริ่มต้นห่างจากขอบด้านล่าง และด้านข้างของแผ่นประมาณ 1 เซนติเมตร โดยแต่ละจุดห่างกันไม่น้อยกว่า 1.5 เซนติเมตร ด้านบนของแผ่นขีด solvent front ให้ห่างจากจุดเริ่มต้นประมาณ 10 เซนติเมตร หลังจากจุดที่แต้มสารแห้งสนิทแล้วนำไป develop โดยวางแผ่น TLC ในขวดแก้วที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายที่เหมาะสม ปิดฝาขวดแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึงขีด solvent front นำแผ่น TLC ออกมาและปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง

การตรวจสอบตำแหน่งสารทำได้ 2 วิธี

1. นำแผ่น TLC หลังจากการ develop แล้ว ส่องผ่านแสง UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรจะเห็นตำแหน่งสารเป็นจุดสีม่วง หาค่า R_f
2. นำแผ่น TLC หลังจากการ develop แล้ว ใส่ลงในขวดแก้วที่อิ่มตัวด้วยไอไอโอดีน ปล่อยทิ้งไว้จะเห็นตำแหน่งสารเป็นจุดสีน้ำตาล หาค่า R_f

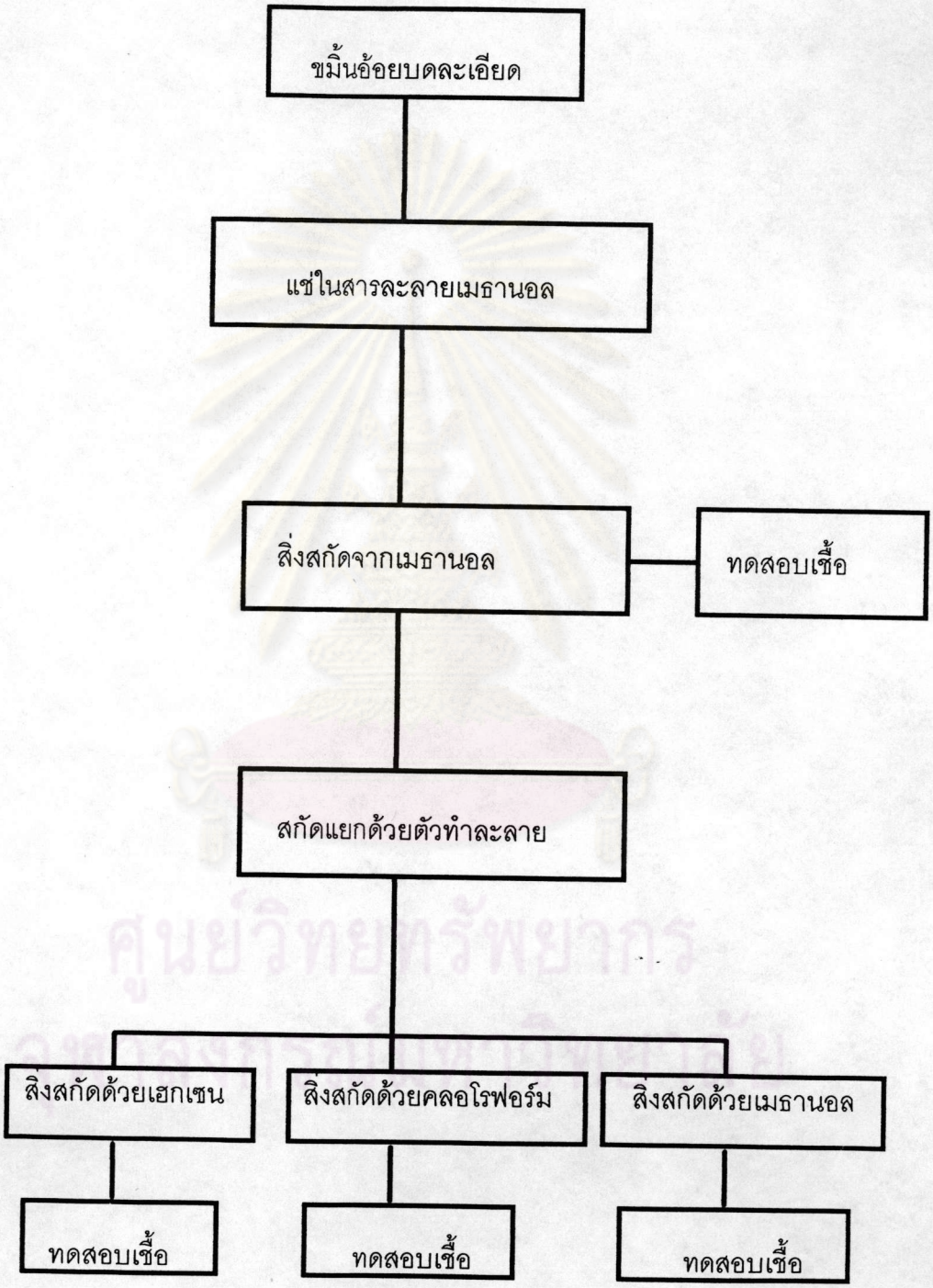
4. การแยกน้ำมันหอมระเหยจากพืช

โดยการกลั่นด้วยน้ำ (water distillation) นำส่วนของพืชที่จะแยกน้ำมันหอมระเหยบดให้ละเอียดนำไปต้มกับน้ำ ไอน้ำจะพาน้ำมันหอมระเหยไปยังคอนเดนเซอร์แล้วกลั่นตัวเป็นของเหลวนำไปสกัดแยกน้ำมันหอมระเหยออกโดยใช้แมกนีเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัส เก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

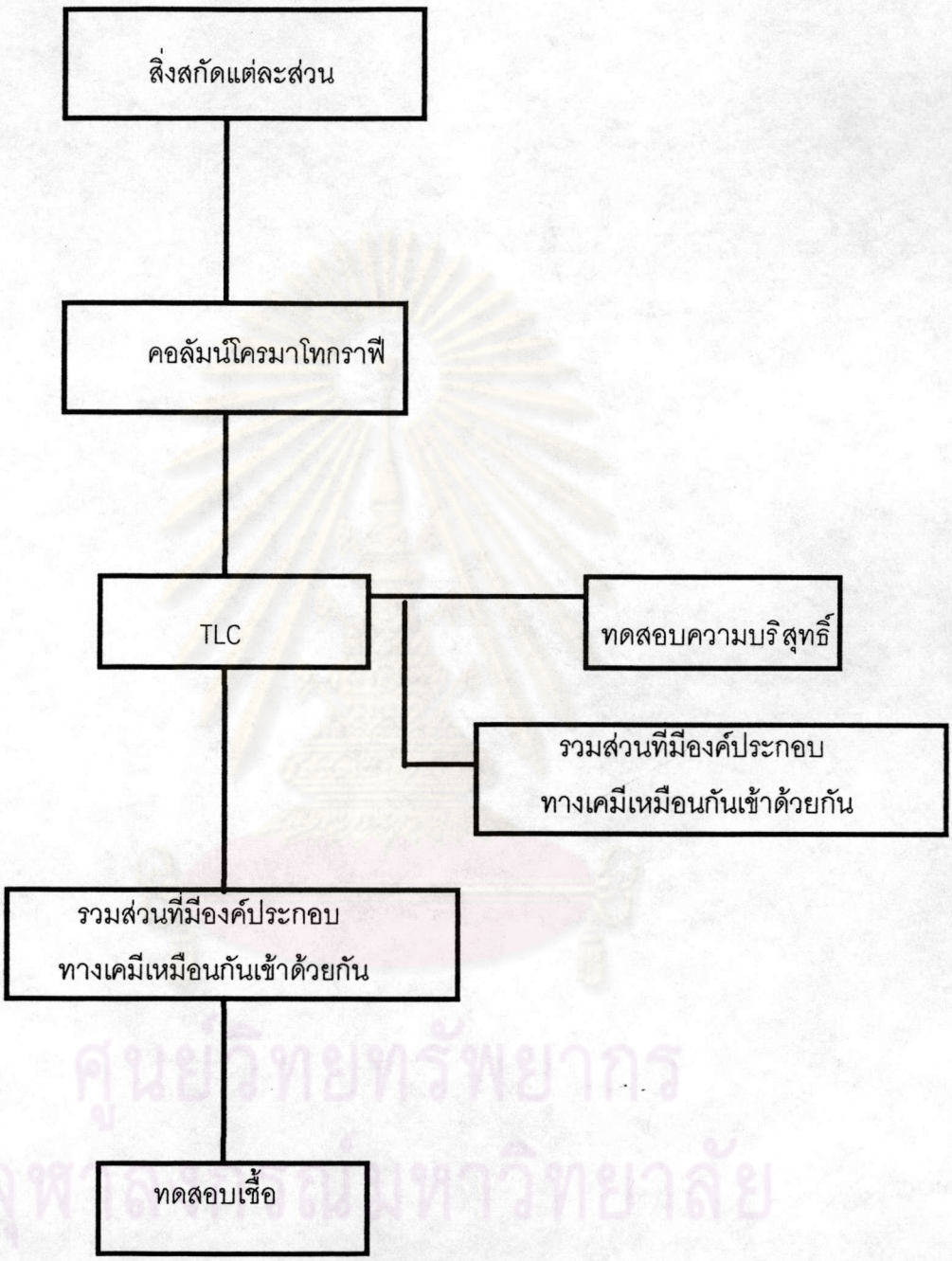
5. การสกัดสารจากขมิ้นอ้อย

5.1 การเตรียมสิ่งสกัดเมธานอล นำขมิ้นอ้อยที่บดละเอียดแล้ว ประมาณ 3 กิโลกรัม แช่ในเมธานอลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ถึง 5 วัน จะได้สารละลายสีเหลืองเข้มแกมแดง นำไปกรองโดยใช้กรวยแก้ว นำสารละลายส่วนที่ได้นี้ระเหยเมธานอลออกโดยใช้เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน จากนั้นนำเมธานอลที่กลั่นได้นำกลับไปแช่ขมิ้นอ้อยซ้ำอีก ทำเช่นนี้หลายๆครั้งจนกว่าจะไม่มีสารสกัดออกมาอีก สังเกตุได้จากเมธานอลที่ได้จากการแช่ขมิ้นจะไม่มีสีหรือมีสีเหลืองจาง เก็บรวบรวมสารที่ระเหยเมธานอลออก สารที่สกัดได้จะมีลักษณะเหนียวหนืดสีน้ำตาลเข้มหนักประมาณ 250.70 กรัม

5.2 การแยกสิ่งสกัดเมธานอลด้วยเฮกเซนและคลอโรฟอร์ม นำสิ่งสกัดเมธานอลจากข้อ5.1 ทั้งหมดมาสกัดต่อด้วยเฮกเซนโดยเติมเฮกเซนลงไปสกัดครั้งละประมาณ 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร อุ่นบนเครื่องอังไอน้ำ (Steam bath) กวนให้เข้ากัน นำส่วนของสารละลายที่ได้ไประเหยเฮกเซนออกด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน แล้วนำเฮกเซนที่ได้ไปทำการสกัดซ้ำ ทำเช่นนี้จนได้สารละลายที่ไม่มีสี หรือสีจางลงมากจึงหยุดสกัด เก็บรวบรวมสารที่ได้จากการระเหยเฮกเซนออกไปเรียกว่า**สิ่งสกัดด้วยเฮกเซน** (Crude hexane exctract) จากนั้นจึงเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นคลอโรฟอร์มโดยใช้คลอโรฟอร์มสกัดสารจากสิ่งสกัดเมธานอลที่เหลือโดยวิธีเดียวกันและเก็บรวบรวมสารที่ได้เรียกว่า **สิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม** (Crude chloroform extract) จะได้สิ่งสกัดด้วยเฮกเซนมีลักษณะเหนียวหนืดสีเขียวอมดำ หนักประมาณ 63.97 กรัม ส่วนสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม มีลักษณะเหนียวหนืดสีน้ำตาลหนักประมาณ 126.44 กรัม ส่วนที่เหลือจากการใช้เฮกเซนกับคลอโรฟอร์มสกัดเรียกว่า **สิ่งสกัดด้วยเมธานอล** (Crude methanol extract) มีลักษณะเหนียวหนืดสีน้ำตาลหนักประมาณ 30.45 กรัม ซึ่งสามารถเขียนรูปแสดงการแยกสิ่งสกัดโดยใช้ตัวทำละลายต่างๆดังนี้



รูปที่ 6 แสดงการแยกสิ่งสกัดโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ



รูปที่ 7 แสดงขั้นตอนการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17272877

6. <u>การแยกสารสกัด</u>

6.1 การแยกสารจากสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน ทำการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยนำสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน จากข้อ 5.2 หนักประมาณ 40 กรัม แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย เรียงตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปหามากดังนี้

100 % เฮกเซน
10 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน
20 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน
50 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน
60 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน
70 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน
80 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน
90 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน
100 % คลอโรฟอร์ม
2 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม
5 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม
10 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม
15 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม
20 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม
30 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม
50 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม
100 % เมธานอล

เก็บสิ่งที่ชะได้ครั้งละประมาณ 400 ลูกบาศก์เซนติเมตร ระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน นำส่วนที่เหลือเก็บไว้ในขวดรูปกรวยขนาด 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร รวบรวมส่วนที่ให้ผลเหมือนกัน โดยใช้เทคนิค TLC ตรวจสอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.2 การแยกสารจากสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว โดยนำสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มหนักประมาณ 25 กรัม แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปหามากดังนี้

100% เฮกเซน

10 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน

30 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน

50 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน

60 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน

70 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน

80 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน

90 % คลอโรฟอร์ม - เฮกเซน

100% คลอโรฟอร์ม

2 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

5 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

10 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

25 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

50 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

100% เมธานอล

เก็บสิ่งที่ชะได้ครั้งละประมาณ 30 - 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 6.1

6.3 การแยกสารจากสิ่งสกัดด้วยเมธานอล ทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว โดยนำสิ่งสกัดด้วยเมธานอลหนักประมาณ 20 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปมากดังนี้

100% คลอโรฟอร์ม

2 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

5 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

10 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

15 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

20 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

25 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

30 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

40 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

50 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

60 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

70 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

80 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

90 % เมธานอล - คลอโรฟอร์ม

100% เมธานอล

เก็บสิ่งที่ชะได้ ครั้งละประมาณ 30-50 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บรวบรวมส่วนที่ให้ผลเหมือนกัน เข้าด้วยกันโดยใช้เทคนิค TLC เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัด

ชนิดของแบคทีเรีย	*Staphylococcus aureus*
	Propionibacterium acnes
อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย	Brain heart infusion broth
	Brain heart infusion agar
	NYG broth (ประกอบด้วย 0.8 % nutrient broth , 0.5 % yeast extract , 0.1 % glucose)
	Nutrient agar (NA)
	Nutrient broth (NB)

การทดสอบทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ของน้ำมันหอมระเหย

เตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้นประมาณ 100 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร หยดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรลงบน steriled disc เป่าให้แห้ง เตรียม Control disc โดยหยดตัวทำละลายเพียงอย่างเดียวแล้วเป่าให้แห้งและทำแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐานด้วย ในที่นี้ ใช้ 3 ชนิดคือเททราซัยคลิน 30 ไมโครกรัม แวนโคมัยซิน 30 ไมโครกรัม เพนนิซิลลิน 10 ยูนิต streak เชื้อ *Staphylococcus aureus*

(ซึ่ง subculture ก่อนทดลอง 24 ชั่วโมง) และเชื้อ *Propionibacterium acnes* (ซึ่ง subculture ซึ่งก่อนทดลอง 48 ชั่วโมง) บนอาหารวุ้นให้สม่ำเสมอจนเต็มพื้นผิว หลังจากนั้น ใช้ forcep จุ่มแอลกอฮอล์เผาไฟฆ่าเชื้อ คีบ sample disc , control disc และ standard antibiotic disc ซึ่งเป็นแผ่นยาควบคุมมาตรฐานวางบนผิวอาหารวุ้นที่ streak เชื้อแล้วให้มีระยะห่างพอประมาณ จากนั้น incubate เชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *Propionibacterium acnes* นำไปวางใน anaerobic jar (ที่ใส่เทียนไขจุดไฟ) แล้วปิดฝา anaerobic jar รอจนเทียนไขดับ จะเกิดสภาพ anaerobic condition แล้วนำไปไว้ในตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตผลโดยดูบริเวณใสรอบแผ่นยา แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

(Minimal Inhibitory Concentration , MIC)

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ *Staphylococcus aureus*

อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย Nutrient broth (NB)

วิธีทดลอง

เขี่ยเชื้อ 1 ลูป (loop) ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (Nutrient broth) 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำมันหอมระเหยที่ทราบปริมาณแน่นอนลงใน 20 % Tween 80 และทำ 2-fold dilution ด้วย 20 % Tween 80 หลังจากทำ 2-fold dilution แล้ว ให้นำสารละลายในแต่ละหลอด 0.3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่มี Nutrient broth อยู่ 3 มิลลิลิตร จนครบทุกหลอด ปิเปตเชื้อที่มีจำนวน 10^5 - 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร โดย เทียบความขุ่นกับ Mc Farland No. 0.5 Standard ที่ผ่านการบ่มเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมง ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดแล้วนำไปบ่มเชื้อที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการ เซนตริฟิว (Centrifuge) ดูปริมาณตะกอน โดยหลอดแรกที่เป็นสารละลายใสไม่มีตะกอนจะบันทึกความเข้มข้นเป็นค่า MIC

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ *Propionibacterium acnes*

อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย NYG broth

(ประกอบด้วย 0.8 % nutrient broth ,

0.5 % yeast extract , 0.1 % glucose)

วิธีทดลองเขี่ยเชื้อ 1 ลูป (loop) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Nutrient broth) ปริมาณ 30 มิลลิลิตร ปิดผิวหน้าด้วยพาราฟิน (Parafin) ฆ่าเชื้อแล้วให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตรบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำมันหอมระเหยที่ทราบปริมาณแน่นอนใส่ลงใน 20 % Tween 80 และทำ 2-fold dilution ด้วย 20 % Tween 80 หลังจากทำ 2-fold dilution ให้นำสารละลายในแต่ละหลอด 0.3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่มี Nutrient broth อยู่ 3 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจนครบทุกหลอด ปิเปตเชื้อที่มีจำนวน 10^5 - 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร โดย เทียบความขุ่นกับ Mc Farland No. 0.5 Standard ที่ผ่านการบ่มเชื้อแล้ว 48 ชั่วโมง ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด ปิดผิวหน้าด้วยพาราฟิน (Parafin) ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มเชื้อที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการเซนตริฟิว (Centrifuge) ดูปริมาณตะกอน โดย หลอดแรกที่เป็นสารละลายใสไม่มีตะกอนจะบันทึกค่าความเข้มข้นเป็น MIC

หลอดควบคุม
1. อาหารเลี้ยงเชื้อ
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ + แบคทีเรีย
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ + แบคทีเรีย + 1 % Tween 80

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC)

ยาปฏิชีวนะมาตรฐาน เททราซัยคลิน 30 ไมโครกรัม
แวนโคมัยซิน 30 ไมโครกรัม
เพนนิซิลลิน 10 ยูนิต

วิธีทดลอง

เขี่ยเชื้อ 1 ลูป (loop) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (48 ชั่วโมงสำหรับ เชื้อ *Propionibacterium acnes*) นำแผ่นยามาตรฐานใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นที่ต้องการแช่แผ่นยาในอาหารเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง เจือจางยาในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold dilution) หลังจากทำ 2-fold dilution แล้วนำสารละลายในแต่ละหลอด 0.3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ 3 มิลลิลิตร จนครบทุกหลอด แล้วปิเปตเชื้อที่มีแบคทีเรียจำนวน 10^5 - 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร โดยเทียบความขุ่นกับ Mc Farland No. 0.5 Standard ที่ผ่านการบ่มมาแล้ว 24 ชั่วโมง ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละ

หลอด แล้วนำไปบ่มเชื้อที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดย การ เซนตริฟิว (Centrifuge) ดูปริมาณตะกอน

หลอดควบคุม
1. อาหารเลี้ยงเชื้อ
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ + แบคทีเรีย
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ + แบคทีเรีย + 1 % Tween 80

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย โดยวิธี แกสโครมาโทกราฟี / แมสสเปกโทรเมตรี สภาวะของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นดังนี้

- คอลัมน์ : J&W DB-WAX capillary , Polyethylene glycol ยาว 20 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิมล์ 0.25 ไมโครเมตร
- อุณหภูมิอินเจกเตอร์ : 270 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิทรานสเฟอร์ลายน์ : 240 องศาเซลเซียส
- อินเจกชันโหมด : Split 1 : 30
- แกสตัวพา : ฮีเลียม 1.6 มิลลิลิตร / นาที
- โปรแกรมอุณหภูมิ :

อุณหภูมิเริ่มต้น : 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 4 นาที
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ : 3 องศาเซลเซียส / นาที
อุณหภูมิสุดท้าย : 200 องศาเซลเซียส
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 2 : 10 องศาเซลเซียส / นาที
อุณหภูมิสุดท้าย 2 : 240 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 5 นาที

นำข้อมูลแมสสเปกตรัม ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Library ที่จัดทำโดย NIST Database เพื่อจะได้ทราบว่าแต่ละพีกในโครมาโทรแกรม แสดงถึงสารชนิดใดบ้าง