บทที่2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. <u>อุปกรณ์การทดลอง</u>

เครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหย (Cleveneaur apparatus)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Laboratory centrifuge)

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

เครื่องชั่ง Mettely รุ่น AT 200

Gas Chromatography รุ่น GC - 8000 ของบริษัท Fisons Instruments จำกัด ประเทศสหราชอาณาจักร

Mass spectrometer รุ่น MD - 800 ของบริษัท Fisons Instruments จำกัด ประเทศสหราชอาณาจักร

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

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

Pump Model 510 ของบริษัท Water Assciates จำกัด

UV Visible Detector Model 112 UV/VIS ของบริษัท Gilson จำกัด

Column fused Li Chrosorb Si ยาว 10 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 125 x 8.0 มม.

แผ่นยาเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ของบริษัท Becton Dickinson and CO. ประเทศสหรัฐอเมริกา

แผ่นยามาตรฐานเพนนิซิลลิน 10 ยูนิต ของบริษัท Becton Dickinson and CO. ประเทศสหรัฐอเมริกา

แผ่นยามาตรฐานเททราซัยคลิน 30 ไมโครกรัม ของบริษัท Becton Dickinson and CO. ประเทศสหรัฐอเมริกา

แผ่นยามาตรฐาน แวนโคมัยซิน 30 ไมโครกรัม ของบริษัท Becton Dickinson and CO. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. <u>สารเคมี</u>

เมธานอล ชนิด AR grade ของบริษัท J. T. Baker Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

ไดคลอโรมีเทน ชนิด AR grade ของบริษัท J.T. Baker Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เฮกเซน ชนิด AR grade ของบริษัท J. T. Baker Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เจอรานิออล ของบริษัท Fluka ประเทศสหรัฐอเมริกา

3 - แครีน ของบริษัท Fluka ประเทศสหรัฐอเมริกา

ลินาลูล ของบริษัท Fluka ประเทศสหรัฐอเมริกา

ลิมูนีน ของบริษัท Fluka ประเทศสหรัฐอเมริกา

ยูคาลิปตัส ของบริษัท Fluka ประเทศสหรัฐอเมริกา

Tween 80

น้ำมันหอมระเหยจากพืช 23 ชนิด

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืช

โดยกรรมวิธีการกลั่นแบบการกลั่นด้วยน้ำ (Water distillation) นำส่วนของพืชที่สนใจ เช่น เหง้า ใบ เปลือก จากพืช 23 ชนิด ที่จะทำการกลั่นมาล้างให้สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง และหั่นเป็นชิ้นเล็กแล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักของพืชเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหย จากนั้นนำไปบรรจุในภาชนะที่จะใช้กลั่น เติมน้ำลงไปพอประมาณจึงทำการกลั่นจนกระทั่งเห็นว่าปริมาตรของน้ำมันหอมระเหยไม่เพิ่มขึ้นหลังจากนั้นทิ้งไว้จนเห็นว่าชั้นของน้ำ และน้ำมันหอมระเหยแยกจากกันอย่างชัดเจน จึงทำการเก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ในภาชนะทึบแสง ที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส

2. เตรียมสายพันธุ์แบคทีเรียที่นำมาทดสอบ ประกอบด้วยเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ ดังนี้

- *Staphylococcus aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม ซึ่งก่อให้เกิดโรคติดเชื้อทางผิวหนัง

- *Streptococcus pyogenes* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม ซึ่งก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในทางเดินหายใจ

- *Bacillus subtilis* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง ซึ่งก่อให้เกิดโรคติดเชื้อทางผิวหนัง

- *Escherichia coli* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ซึ่งก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร

- *Salmonella typhi* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ซึ่งก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร

- *Pseudomonas aeruginosa* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียรูปแท่ง ซึ่งก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ

แบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยโดย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

<u>การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย (agar diffusion test)</u>

เตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้นประมาณ 100 ไมโครลิตร / มิลลิลิตร หยดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรลงบน steriled disc เพียงอย่างเดียว เป่าให้แห้งและทำแผ่นยามาตรฐานด้วย ในที่นี้ใช้ 3 ชนิดคือ เททราซัยคลิน 30 ไมโครกรัม แวนโคมัยซิน 30 ไมโครกรัม และเพนนิซิลลิน 10 ยูนิต นำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งให้ทั่ว ในลักษณะ 3 ทิศทาง แต่ละทางวางมุม 60 องศา หลังจากนั้นใช้ forcep จุ่มแอลกอฮอล์เผาไฟฆ่าเชื้อ และคีบ sample disc , control disc และ standard antibiotic disc ซึ่งเป็นแผ่นยามาตรฐานวางลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ให้มีระยะห่างพอควร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสังเกตผลโดยดูบริเวณใสรอบแผ่นยา แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้ง (inhibition zone)

<u>การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimum Inhibition Concentration , MIC)</u>

เขี่ยเชื้อ 1 ลูป (loop) ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient broth) 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำมันหอมระเหยที่ทราบปริมาณแน่นอนใส่ลงใน 10% Tween 80 ทำการเจือจางน้ำมันหอมระเหยในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำสารละลายจำนวน 0.02 มิลลิลิตรในแต่ละหลอด ใส่ลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient broth) อยู่จำนวน 3 มิลลิลิตรจนครบทุกหลอด ปิเปตเชื้อที่มีจำนวน 10^5- 10^6 เซลล์ / มิลลิลิตร โดยเทียบความขุ่นกับ Mc Farland No. 0.5 Standard ที่ผ่านการบ่มเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมง ปริมาณ 0.01 มิลลิลิตรในแต่ละหลอด แล้วนำไปบ่มเชื้อที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกค่า MIC คือความเข้มข้นต่ำสุดที่แบคทีเรียไม่เจริญโดยดูด้วยตาเปล่า (อาหารเลี้ยงเชื้อใส)

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

การหาค่าความเข้มข้นยาต้านจุลชีพมาตรฐานต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

การหาค่า MIC ของยาต้านจุลชีพมาตรฐานโดยใช้วิธี disc elution เขี่ยเชื้อ 1 ลูป (loop) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง นำแผ่นยามาตรฐานใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นที่ต้องการ แช่แผ่นยาในอาหารเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมงเจือจางยาในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) ปิเปตแบคทีเรียจำนวน 10^5-10^6 เซลล์/มิลลิลิตร โดยเทียบความขุ่นกับ Mc Farland No. 0.5 Standard ลงไปในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.01 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่แบคทีเรียไม่เจริญ (อาหารเลี้ยงเชื้อใส)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าทำลายแบคทีเรีย

(Minimum Bactericidal Concentration , MBC)

นำหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดรวมทั้งหลอดที่เชื้อไม่เจริญทุกหลอด เมื่อดูด้วยตาเปล่าจากการทดลองนำค่า MIC มาหาค่า MBC โดยปิเปตออกมาจำนวน 1 มิลลิลิตรในแต่ละหลอด แล้วเทลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และทำการ spread plate หลังจากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่แบคทีเรียไม่เจริญ โดยดูจากจานเพาะเชื้อที่เชื้อไม่เจริญคือค่า MBC

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย โดยวิธี แกสโครมาโทกราฟี / แมสสเปกโทรเมตรี สภาวะของเครื่องมือที่ใช้เป็นดังนี้

- คอลัมน์ : J&W DB-WAX capillary , Polyethylene glycol ยาว 20 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 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

อัตราเพิ่มอุณหภูมิ : 3 องศาเซลเซียส / นาที

อุณหภูมิสุดท้าย : 200 องศาเซลเซียส

อัตราเพิ่มอุณหภูมิ 2 : 10 องศาเซลเซียส / นาที

อุณหภูมิสุดท้าย 2 : 240 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 5 นาที

นำข้อมูลแมสสเปกตรัมที่ได้ มาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Library ที่จัดทำโดย NIST Database เพื่อจะได้ทราบว่าแต่ละพีกในโครมาโทรแกรม แสดงถึงสารชนิดใดบ้าง

5. การแยกส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี HPLC

นำน้ำมันหอมระเหยจากกระชาย และ เทพธาโร inject เข้าเครื่อง HPLC ปริมาณ 100 ไมโครลิตร จำนวน 10 ครั้ง จากนั้นเก็บสารละลายในแต่ละ peak ไปทดสอบกับแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์

6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารประกอบในน้ำมันหอมระเหย

<u>การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารประกอบในน้ำมันหอมระเหย</u>

นำสารตัวอย่างที่เป็นสารประกอบในน้ำมันหอมระเหย ที่ความเข้มข้นประมาณ 100 ไมโครลิตร / มิลลิลิตร หยดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรลงบน steriled disc เป่าให้แห้ง เตรียม control disc ซึ่งใช้เมธานอลโดยหยดลงบน steriled disc เพียงอย่างเดียว เป่าให้แห้ง นำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งให้ทั่ว ในลักษณะ 3 ทิศทางแต่ละทางวางมุม 60 องศา หลังจากนั้นใช้ forcep จุ่มแอลกอฮอล์เผาไฟฆ่าเชื้อ และ คีบ sample disc , control disc และ standard antibiotic disc ซึ่งเป็นแผ่นยามาตรฐาน วางลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งให้มีระยะห่างพอควร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสังเกตผลโดยดูบริเวณใสรอบแผ่นยาแล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้ง (inhibition zone)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimum Inhibition Concentration , MIC)

เขี่ยเชื้อ 1 ลูป (loop) ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient broth) 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งสารประกอบตัวอย่างที่ทราบปริมาณแน่นอนใส่ลงใน 10% Tween 80 ทำการเจือจางในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า(2-fold serial dilution) เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำสารละลายจำนวน 0.02 มิลลิลิตรในแต่ละหลอด ใส่ลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (nutrient broth) อยู่จำนวน 3 มิลลิลิตรจนครบทุกหลอด ปิเปตเชื้อที่มีจำนวน 10^5-10^6 เซลล์/มิลลิลิตร โดยเทียบความขุ่นกับ Mc Farland No. 0.5 Standard ที่ผ่านการบ่มเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมง ปริมาณ 0.01 มิลลิลิตรในแต่ละหลอด แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกค่า MIC คือความเข้มข้นต่ำสุดที่แบคทีเรียไม่เจริญ โดยดูด้วยตาเปล่า (อาหารเลี้ยงเชื้อใส)

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

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าทำลายแบคทีเรียของสารประกอบในน้ำมันหอมระเหย (Minimum Bactericidal Concentration , MBC)

นำหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดรวมทั้งหลอดที่เชื้อไม่เจริญทุกหลอด เมื่อดูด้วยตาเปล่าจากการทดลองนำค่า MIC มาหาค่า MBC โดยปิเปตออกมาจำนวน 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด แล้วเทลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และทำการ spread plate หลังจากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่แบคทีเรียไม่เจริญ โดยดูจากจานเพาะเชื้อที่เชื้อไม่เจริญจานแรกคือค่า MBC