บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

3.1 .1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหย (Clevenneaur apparatus)
เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง model L220 ของบริษัท Scientific Industries,Inc จำกัดประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง Satorius Analytic ของบริษัท Scientific Promotion จำกัด
เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) model SS - 325 ของบริษัท Tomy Seiko จำกัด ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH Meter) model 240 ของบริษัท P. Intertrade Equipment จำกัด
ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina Flow) model H-12 ของบริษัท International Scientific Supply จำกัด
ตู้อบ (Oven) model Contherm series five ของบริษัท แลปโฟกัส จำกัด
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) model Spectronic 21 ของบริษัท Bauch & Lomb จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
กล้องจุลทรรศน์

3.1.2 เคมีภัณฑ์

ตัวทำละลาย ได้แก่ เมธานอล
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
คีโตโคนาโซล (ketoconazole) ของบริษัทสีลมการแพทย์ จำกัด

โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส ของบริษัท E.Merck จำกัด ประเทศเยอรมัน

3.1.3 เชื้อราทดสอบ

M. furfur 3 Isolates จากห้องปฏิบัติการเชื้อรา สถาบันโรคผิวหนัง กรุงเทพฯ และ 1 Isolate จากหน่วยราวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.4 น้ำมันหอมระเหย

สกัดจากพืชดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 พืชที่นำมาสกัดสกัดน้ำมันหอมระเหย

พืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่นำมาใช้
กระชาย	*Boesenbergia rotunda* Linn.	เหง้าสด
กะเพรา	*Ocimum sanctum* Linn .	ใบสด
ขมิ้นชัน	*Curcuma longa* Linn .	เหง้าสด
ข่า	*Languas galanga* Sw.	เหง้าสด
ขิง	*Zingiber offcinale* Roscoe	เหง้าสด
ขี้เหล็กเทศ	*Cassia occidentalis* Linn.	ใบสด
คื่นฉ่าย	*Apium graveolens* Linn .	ใบสด
จอก	*Pistia stratiotes* Linn.	ใบสด
ชุมเห็ดเทศ	*Cassesia alata* Linn.	ใบสด
ตะไคร้	*Cymbopogon citratus* Stapf.	ใบสด
ทองพันชั่ง	*Rhinacanthus nasuthus* Kutz.	ใบสด
น้อยหน่า	*Annona squamosa* Linn.	ใบสด
บัวบก	*Centella asiatica* Urban	ใบสด
ผักชีฝรั่ง	*Peterosselinum hortense* Hoffm.	ใบสด
ผักเสี้ยน	*Cleome gynandra* Linn.	ใบสด
พลู	*Piper beter* Linn .	ใบสด
พิกุล	*Mimusops elengi* Linn.	ใบสด
มะกรูด	*Citrus hystrix* DC.	ใบสด
แมงลัก	*Ocimum americanum* Linn.	ใบสด
โหระพา	*Ocimum basilicum* Linn.	ใบสด
อบเชยเทศ	*Cinnamomum verum* J.S. Presl.	ใบสด

3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหย

นำสมุนไพรมากลั่นด้วยน้ำ ซึ่งเป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยใช้น้ำต้มกับพืช อุณหภูมิที่ใช้กลั่นประมาณ 100 องศาเซลเซียส เวลา 5-7ชั่วโมง ทำการแยกน้ำมันหอมระเหย ที่กลั่นจากพืชสมุนไพร และทำให้ปราศจากน้ำ โดยใช้โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสดูดน้ำออก นำน้ำมันหอมระเหยไปชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ในที่มืดโดยเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบกับเชื้อเกลื้อนต่อไป

3.2.2 การเตรียมเชื้อ

การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพนั้น อายุของจุลชีพควรอยู่ในระหว่างที่จุลชีพกำลังมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว (Log Phase) หลังจากที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ดังนั้นจึงทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. furfur* หากราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อหลังจากที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Saboraud Dextrose Broth โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างๆเพื่อศึกษาหาระยะ Log Phase ของเชื้อและเนื่องจากเชื้อนี้เป็น Lipophilic yeast การเจริญต้องการไขมัน ในการเพาะเลี้ยงจึงต้องศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมของไขมันที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันมะกอก ดังนี้ 0 % , 0.5 % , 1 % , 2 % เพื่อที่จะหาความเข้มข้นของน้ำมันมะกอกที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อเกลื้อนของน้ำมันหอมระเหย

นำน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ไปทดสอบกับเชื้อเกลื้อน 4 Isolates โดยใช้วิธี Disc Diffusion Technique (Lennette, E.H.,Spaulding,E.H.,and Truant ,J.P, 1985) ตรวจสอบบริเวณยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) ของเชื้อเกลื้อน รอบแผ่น Disc ที่มีน้ำมันหอมระเหยอยู่

Disc Diffusion method (พนิดา ชัยเนตร และมาลัย วรจิตร,2525) เป็น Semiquantitative method ที่ใช้ทดสอบความไวของจุลชีพ (Susceptible) คือการทดสอบโดยการให้สารต้านจุลชีพซึมเข้าในเนื้อวุ้นแล้วดูการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ สารต้านจุลชีพอาจอยู่ในรูปของ disc คือใช้กระดาษกรองชุบสารต้านจุลชีพซึ่งนิยมใช้รูปกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. สารต้านจุลชีพจะซึมเข้าวุ้นแผ่เป็นรัศมีโดยรอบ โดยมีปริมาณลดลงเป็นสัดส่วนกับระยะห่างจากจุดเริ่มต้น จุลชีพถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยปริมาณของสารต้านจุลชีพที่บริเวณใดก็จะไม่มีจุลชีพขึ้นตั้งแต่บริเวณนั้นเกิดเป็นวงว่างเรียก Zone of inhibition

เตรียมน้ำมันหอมระเหยที่มีปริมาณแน่นอน ใส่ในหลอดทดลองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที) เจือจางด้วยเมธานอล โดยให้มีความเข้มข้นตามต้องการ หยดลงบนแผ่น Disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 10 ไมโครลิตร เก็บไว้ในตู้ควันเพื่อระเหยเมธานอลออกเพื่อนำไปทดสอบต่อไป

นำเชื้อ *M. furfur* ที่เลี้ยงใน Sabouraud Dextrose Broth (1% Olive oil)เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร spread ด้วยแท่งแก้วงอบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Nitrogen Base (YNB) Agar ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นจึง spread Olive oil ให้ทั่วผิวหน้าของวุ้น แล้ววาง Disc ที่เตรียมไว้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

บันทึกผลการทดลองโดยวัดขอบเขตการยับยั้ง (Clear zone) ที่เกิดรอบๆ Disc โดยใช้ไม้บรรทัดอ่านสองครั้งในแต่ละDisc โดยอ่านด้านแคบที่สุดและด้านกว้างที่สุด เฉลี่ยหาเส้นผ่าศูนย์กลางของ Clear zone

3.2.4 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibition Concentration, MIC)

ทำการหาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibition Concentration, MIC) ของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อเกลื้อนโดยวิธีAgar dilution test (Pankajalakshmi, V.V., and Taralakshmi, V.V. ,1994)

Dilution method (พนิดา ชัยเนตร และมาลัย วรจิตร,2525) มีหลักการคือ การเจือจางสารต้านจุลชีพเป็นปริมาณจากมากไปน้อย เพื่อดูปริมาณที่แท้จริงหรือใกล้เคียงที่สุดของสารต้านจุลชีพที่ต้องใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ การเจือจางอาจทำใน agar หรือ broth การใช้วิธี Agar dilution มีข้อดีคือ สามารถเห็นโคโลนีของจุลชีพทำให้บอกได้ว่ามีการปนเปื้อนจุลชีพอื่นเกิดขึ้นหรือไม่

Agar dilution method เป็นการหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Minimum Inhibition Concentration, MIC) (Chee – Leok et al, 1994 เตรียมน้ำมันหอมระเหยใส่ในหลอดทดลองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเจือจางด้วยเมธานอลโดยให้มีความเข้มข้นตามต้องการ นำน้ำมันหอมระเหยแต่ละความเข้มข้นหยดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อบแล้ว (อบที่อุณหภูมิ 180 เซลเซียส เป็น เวลา 3 ชั่วโมง) จากนั้น เทอาหารเลี้ยงเชื้อ YNB Agar อุ่นๆ อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ทับสารที่หยดลงไปแล้ว ทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อเย็น นำเชื้อ *M. furfur* ที่ เลี้ยงใน Sabouraud Dextrose Broth(1%Olive oil) เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มา spread ด้วยแท่งแก้วงอบนจานอาหาร จากนั้นจากนั้นจึง spread Olive oil ให้ทั่วผิวหน้าของวุ้น นำไปอบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดผลโดยดูเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อใดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อราจะเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งความเจริญของเชื้อราได้ และบันทึกผล