

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1.1 Mueller-Hinton Agar(MHA) (Becton Dickinson and Company, USA)
- 1.2 Mueller-Hinton Broth (MHB) (Becton Dickinson and Company, USA)
- 1.3 Nutrient Agar (NA)(Merck, Germany)
- 1.4 Nutrient Broth(NB)(Merck, Germany)

2. เครื่องมือ

- 2.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (EHRET รุ่น BK4266) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- 2.2 เครื่องระเหยตัวทำละลาย (Rotary Evaporator)
- 2.3 I amina flow (Astec รุ่น HLF 1200E, England)
- 2.4 เครื่องชั่งอย่างละเอียดชนิด 5 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น RP3100S)
- 2.5 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)(Tommy, USA)
- 2.6 ตู้อบ (Oven)
- 2.7 กระจาดกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Pall Corporation, USA)
- 2.8 กระจาดกรอง Whatman เบอร์ 4 (Whatman, England)

3. สารเคมี

- 3.1 100 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล
- 3.2 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล
- 3.3 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl
- 3.4 Standard McFarland No. 0.5
- 3.5 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Fisher Chemicals, England)
- 3.6 น้ำกลั่น

4. ยาปฏิชีวนะ

- 4.1 Ampicillin Powder (T.P. Drug Laboratories, Thailand)
- 4.2 Tetracyclin Powder (Sigma-Aldrich, Germany)

วิธีดำเนินการวิจัย

แบคทีเรียทดสอบ

ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลชลบุรี และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ดังนี้ แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *A. baumannii* คีอียาและไม่คีอียา, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* คีอียาและไม่คีอียา และ *S. marcescens* แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ MRSA

ตัวอย่างพืชและการเตรียมตัวอย่างส่วนสกัดจากพืช

นำผลและใบเพกาสดที่เก็บจากจังหวัดเลย จำนวน 2 กิโลกรัม มาอบให้แห้งด้วยเครื่อง Hot Air Oven ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมงนำไปปดจากนั้นนำผลและใบเพกาบดละเอียดจำนวน 500 กรัมผสมกับเมทานอล:น้ำ ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตร 1,200 มิลลิลิตร (สัดส่วน 2.5:1) ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำส่วนสกัดจากเพกากรองด้วยผ้าขาวบาง และนำส่วนสกัดเมทานอลจากเพกาไประเหยตัวทำละลายด้วย Rotary Vacuum Evaporator จะได้ส่วนสกัดที่มีลักษณะหนืด จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์ Yield ตามสูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ Yield} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดภายหลังแยกตัวทำละลายออก} \times 100}{\text{น้ำหนักของเพกาแห้ง}}$$

เก็บส่วนสกัดที่ได้ (Curde Extract) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบครั้งต่อไป

1. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1.1 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (Kim et al., 2003)

1.1.1 ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับกรดแกลลิก (Gallic acid) หรือส่วนสกัดจากเพกา ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

1.1.2 เติม Folin-Ciocalteu 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที

1.1.3 เติม 7 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 500 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 400 ไมโครลิตร เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 90 นาที

1.1.4 ปิเปตสารละลายลงในไมโครเพลท ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน

1.1.5 คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในรูป มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัดจากเพกา โดยคำนวณจากสมการของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

1.2 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Kim et al., 2003)

1.2.1 ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมกับเคอร์เซติน

(Quercetin) หรือส่วนสกัดจากเพกา ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

1.2.2 เติม 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) ปริมาตร 30

ไมโครลิตร จากนั้นเติม 10 เปอร์เซ็นต์ อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ (AlCl_3) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วทำการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 440 ไมโครลิตร เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน

1.2.3 ปิเปตสารละลายลงในไมโครเพลท ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้สารละลายเคอร์เซติน (Quercetin) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน

1.2.4 คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในรูป มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัดจากเพกา โดยคำนวณจากสมการของกราฟมาตรฐานเคอร์เซติน

2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของส่วนสกัดจากผลและใบเพกาที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration) โดยวิธี Agar Diffusion Susceptibility Test (CLSI, 2006)

2.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

2.1.1 เพาะเลี้ยงเชื้อ *A. baumannii* คีดัวและไม่คีดัว *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* คีดัวและไม่คีดัว *S. marcescens*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ MRSA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.1.2 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 4-5 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง

2.1.3 นำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) โดยปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่า McFarland No. 0.5 ด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl

2.2 การเตรียมสารละลายเพกาและยาปฏิชีวนะ (Stock Solution)

2.2.1 เตรียมส่วนสกัดเพกา โดยนำมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการที่ใช้ในการทดลอง โดยการศึกษาครั้งนี้ศึกษาที่ความเข้มข้น 8 ระดับ คือ 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.2 ชั่งส่วนสกัดเพกาที่เตรียมไว้ จำนวน 0.8 กรัม ใส่ใน conical tube ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติม Dimethyl Sulfoxide 100 เปอร์เซ็นต์ (DMSO) 10 มิลลิลิตร นำมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ได้เป็นสารละลายเพกาความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางเพกา 80 มิลลิเมตร ให้เป็นส่วนสกัดเพกาที่ระดับความเข้มข้น 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.2.3 เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ใน Microcentrifuge Tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 7 หลอด (ความเข้มข้น 0.625-80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วดูดส่วนสกัดเพกา 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microcentrifuge Tube ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้เป็นความเข้มข้นระดับที่ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำส่วนสกัดสมุนไพรที่ได้มาเจือจางลงเรื่อย ๆ โดยวิธีดังกล่าวข้างต้นจนครบ 7 หลอด จะได้ส่วนสกัดเพกาที่ระดับความเข้มข้น 0.625-80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.4 สำหรับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินจะต้องเจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 0.625-80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.3 ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของส่วนสกัดเมทานอลจากผลและใบเพกา

2.3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ใส่ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 19 มิลลิลิตร ปิดปากหลอด แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที)

2.3.2 นำเชื้อ *A.baumannii* คีอียาและไม่คีอียา *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* คีอียาและไม่คีอียา *S. marcescens*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ MRSA ที่เทียบความขุ่นแล้วชนิดละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MHA 19 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง และแบคทีเรียเจริญเติบโต นานประมาณ 4 ชั่วโมง

2.3.3 เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแบคทีเรียด้วยที่เจาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร นำส่วนสกัดเพกาที่ความเข้มข้น 0.625-80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รวมถึงสารควบคุม ได้แก่ DMSO เมทานอล และน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ หยดลงในหลุมที่เจาะไว้ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.3.4 ทำการทดสอบเทียบกับยาปฏิชีวนะด้วยวิธีเดียวกัน แต่เปลี่ยนจากส่วนสกัดเพกาเป็นยาเตตราซัยคลิน และแอมพิซิลลินที่ระดับความเข้มข้น 0.625-80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับแล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้ง (Inhibition Zone) เป็นเซนติเมตร ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง บันทึกผลการทดลอง

3. การหาความเข้มข้นต่ำสุดของส่วนสกัดจากผลและใบเพการ่วมกับยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

3.1 เตรียมเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการหาความเข้มข้นต่ำสุดของส่วนสกัดจากเพกาจากนั้นเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยที่เจาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร และนำน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและ DMSO หยอดลงในหลุมที่เจาะไว้เป็นตัวควบคุม

3.2 นำสารละลายยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยอดลงในหลุมที่เจาะไว้หลุมละ 20 ไมโครลิตรจำนวน 8 หลุม

3.3 นำสารละลายสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้น 0.625-80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 20 ไมโครลิตร หยอดลงซ้ำในหลุมที่ใส่ยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 8 หลุม ตามลำดับ

3.4 ทำเช่นเดียวกันในจานที่มีหลุมที่หยอดยาปฏิชีวนะ 0.625-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5 นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (Inhibition Zone) ซึ่งเป็นหลุมที่วัดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 0.6 เซนติเมตรและทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งบันทึกผลการทดลองและหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วนำมาหาค่า MIC

การหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI (Chung et al., 2011) คือค่าที่ใช้บอกประสิทธิภาพร่วมเมื่อใช้ยาสมุนไพรร่วมกับยาปฏิชีวนะแล้ว ยาทั้งสองชนิดออกฤทธิ์อย่างไร เช่น เสริมฤทธิ์กัน หรือต้านฤทธิ์กัน เป็นต้น ซึ่งดูจากค่า FICI ระหว่างค่า FIC ของยาปฏิชีวนะ กับค่า FIC ของส่วนสกัดจากผลและใบเพกาโดยคำนวณได้ดังนี้

1. FIC ของยาปฏิชีวนะ = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว

2. FIC ของส่วนสกัดจากผลและใบเพกา = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน /ค่า MIC ของส่วนสกัดจากผลและใบเพกาเพียงอย่างเดียว

3. FICI = FIC ของยาปฏิชีวนะ + FIC ของส่วนสกัดจากผลและใบเพกา

ตารางที่ 3-1 การแปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FIC

ค่า FICI	การแปลผล
≤ 0.5	เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic)
$0.5 \leq 1$	เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partially Synergistic)
1	มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (Additive)
$1 \leq 4$	ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent)
> 4	ต้านฤทธิ์กัน (Antagonistic)

4. การศึกษาผลของส่วนสกัดจากผลและใบเพกาสมยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบต่อหน่วยเวลา (Time-Kill Curve Assay)

4.1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.2 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 4-5 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง

4.3 นำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) โดยปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่า McFarland No. 0.5 ด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl

4.4 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เทลงในหลอดทดลองขนาดกลางใช้ข้อโตะเปิดดูดเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เทียบความขุ่นแล้วในข้อ 3.3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหาร MHB ดังกล่าว จากนั้นใช้ข้อโตะเปิดดูดสารละลายส่วนสกัดจากเพกาความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายแอมพิซิลินและเตตราซัยคลิน ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร MHB จากนั้นเขย่าส่วนผสมให้เข้ากันด้วย Vortex สำหรับชุดควบคุม (Control) ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และส่วนสกัดจากเพกาไม่ผสมยาปฏิชีวนะ

4.5 บ่มหลอดทดลอง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 และ 48 ตามลำดับ ใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl เจือจางตัวอย่างด้วยวิธีเจือจางเป็นลำดับ (Serial Dilution) แล้ว Spread Plate บนอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.6 นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและค่า $\log_{10}$ จำนวนเซลล์ (CFU/ml)

4.7 หาค่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญ (The effectiveness antibacterial activity; EAA) (Sedlarik, Galya, Sedlarikova, Valasck, & saha, 2010) และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและค่า $\log_{10}$ จำนวนเซลล์ (CFU/ml) คำนวณจากสูตรดังนี้คือ

$$EAA (\%) = \frac{N_0 - N_E}{N_0} \times 100$$

N_0 คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/mL) ของกลุ่มควบคุม

N_E คือจำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/mL) ของกลุ่มทดลอง

6. การทดสอบทางสถิติ

นำผลการทดลองไปหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และยืนยันผลการทดลองด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบ Random Completely Block Design (RCBD) เปรียบเทียบความแปรปรวน และวิธีของ Duncan โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ย