บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยเริ่มด้วยการเก็บใบสดของพืช 3 ชนิด คือ แปรงล้างขวด เสม็ดขาว และฝรั่งขี้นก ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ MYRTACEAE มากลั่นให้ได้น้ำมันระเหย เพื่อจะนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี และทดสอบฤทธิ์ด้านจุลชีพ ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

1. ตัวอย่างพืชและแหล่งที่มา

1.1 แปรงล้างขวด (*Callistemon lanceolatus* DC.) เก็บจากบริเวณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ วิทยาเขตบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ

1.2 เสม็ดขาว (*Melaleuca leucadendron* Linn. var. *minor* Duthie) เก็บจากพื้นที่ใกล้ชายทะเล จังหวัดสงขลา

1.3 ฝรั่งขี้นก (*Psidium guajava* Linn.) เก็บจากพื้นที่อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ

ได้นำตัวอย่างพืชทั้ง 3 ชนิด มาตรวจสอบความถูกต้องของชนิดพันธุ์กับตัวอย่างมาตรฐาน (herbarium specimen) ของแผนกพฤกษศาสตร์ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ลักษณะของพืชทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 1, 2 และ 3

2. ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์

2.1 เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Bacillus subtilis ATCC 6633

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY

2.2 เชื้อรามาตรฐานที่ใช้ ได้แก่

Candida albicans ATCC 10231

Trichophyton mentagrophytes. แยกจากผู้ป่วย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องกลั่นน้ำมันระเหย (Clevenger Apparatus)
- เครื่องวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี แก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี (Gas chromatography-Mass spectrometry Varian Saturn III)

วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การกลั่นน้ำมันระเหย

เก็บใบสดของพืชแต่ละชนิด โดยเลือกใบที่โตเต็มที่แล้ว ไม่แก่หรืออ่อนเกินไป (ใบเพสลาด) หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งมาประมาณ 100 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในขวดก้นกลมของชุดกลั่น Clevenger Apparatus (รูปเครื่องมือดังแสดงในภาพที่ 4) เติมน้ำให้ท่วมตัวอย่างพืช แล้วกลั่นแยกน้ำมันระเหยโดยใช้เวลาในการกลั่นประมาณ 2-3 ชั่วโมง หรือจนน้ำมันออกมาหมด ทิ้งไว้ให้เย็น บันทึกปริมาตรน้ำมันที่ได้ เพื่อคำนวณหาปริมาณร้อยละของผลิตผลที่ได้ หลังจากนั้นเก็บรวบรวมน้ำมันเพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีและทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อจุลชีพต่อไป

ส่วนที่ 2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันระเหย

นำน้ำมันระเหยมาทำให้เจือจางเป็น 1 : 100 ด้วยเมธานอลก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี ด้วยเงื่อนไขดังนี้

เงื่อนไขของเครื่องมือ **(GC-MS Condition)**

Instrument model	Varian Saturn III.
Column	fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.) coated with DB-5 (95 % dimethyl 5 % diphenylpolysiloxane) (J&W), film thickness 0.25 μm.

บันทึกสเปคตรัมที่ได้ แล้วนำมาเปรียบเทียบกับ terpene library program (Adam. 1995)

2.1 ต้นแปรงล้างขวด

Column programming	60°–60° C 1 minute, 60°–210° rate 3.0° C/min.
Injector temperature	180° C
Detector temperature	220° C
Carrier gas	Helium: flow rate 1.0 ml/min.
Split ratio	100:1
Accelerating voltage	1700 volts
Sample size	0.4 μL
Solvent	methanol (HPLC grade)

2.2 ต้นแสม็ดขาว

Column programming	60°–60° C 1 minute, 60°–210° rate 3.1° C/min.
Injector temperature	200° C
Detector temperature	230° C
Carrier gas	Helium: flow rate 1.0 ml/min.
Split ratio	100:1
Accelerating voltage	1700 volts
Sample size	0.5 μL
Solvent	methanol (HPLC grade)

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

2.3 ต้นฝรั่งขี้นก

Column programming	60°–60° C 1 minute, 60°–220° rate 3.0° C/min.
Injector temperature	200° C
Detector temperature	230° C
Carrier gas	Helium: flow rate 1.0 ml/min.
Split ratio	100:1
Accelerating voltage	1700 volts
Sample size	0.3 µL
Solvent	methanol (HPLC grade)

ส่วนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ด้านจุลชีพของน้ำมันระเหย

3.1 การทดสอบเบื้องต้น: ใช้วิธี Agar diffusion method (Barry 1991)

3.1.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำมันระเหย

นำน้ำมันระเหยที่กลั่นได้จากพืชแต่ละชนิดคือ

- แปรงล้างขวด
- เสม็ดขาว
- ฝรั่งขี้นก

นำมาทำเป็นสารละลาย 10 เปอร์เซนต์ ด้วย 0.1 เปอร์เซนต์ Tween 80 เพื่อให้น้ำมันสามารถสัมผัสกับเชื้อได้ดีขึ้น ทำให้สารละลายปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูผ่านขนาด 0.45 ไมครอน

3.1.2 การเตรียมตัวอย่างเชื้อทดสอบ

สำหรับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด นำมาเลี้ยงบนจานอาหาร trypticase soy agar (TSA) ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แยกโคโลนีเดี่ยวๆ 4 โคโลนี มาเลี้ยงใน trypticase soy broth (TSB) 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 2-3 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 เท่าของสารละลายมาตรฐาน McFarland No.1 ด้วย TSB ที่ปราศจากเชื้อ ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 colony forming unit (CFU) ในหนึ่งมิลลิลิตร

สำหรับเชื้อ *Candida albicans* นำมาเลี้ยงบน Sabouraud Dextrose Agar (SDA) slant บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำมาแขวนลอยในสารละลาย normal saline ที่ปราศจากเชื้อ ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 เท่าของสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 1

สำหรับเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes* นำมาเลี้ยงบน SDA slant ที่ 30 องศาเซลเซียส 4 วัน ล้างสปอร์ ด้วย 0.05 เปอร์เซนต์ Tween 80 ที่ปราศจากเชื้อ ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 เท่าของสารละลายมาตรฐาน McFarland No.1 ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU ในหนึ่งมิลลิลิตร

การเตรียมจานเพาะเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบ ทำโดยละลายวุ้นอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) 25 มิลลิลิตร เทลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 9 เซนติเมตร เมื่อวุ้นแข็งตัวแล้ว นำไปอบให้แห้งที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ใช้ปลายไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ จุ่มลงในสารละลายของเชื้อแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ข้างต้น กำจัดส่วนเกินโดยซับแล้วหมุนหลายๆ ครั้งกับผนังด้านในหลอดเหนือระดับสารละลาย แล้วนำมาลากให้ทั่วบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ทำซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้ง ต่างตำแหน่งทำมุมกัน 60 องศา จากนั้นให้เจาะหลุมสำหรับใส่ตัวอย่างน้ำมันระเหย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จำนวน 4 หลุม

การเตรียมจานเพาะเชื้อรา ทำเช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรีย แต่เปลี่ยนวุ้นอาหารเป็น SDA แทน

3.1.3 วิธีการทดสอบ

หยอดตัวอย่างน้ำมันระเหย (ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์) ปริมาณ 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมที่เจาะไว้ ทำ 3 หลุมในแต่ละชนิดของน้ำมัน พร้อมทั้งคอนโทรล 1 หลุม (ใช้ 0.1 เปอร์เซนต์ Tween 80) หลังจากวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำชุดของแบคทีเรียไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ส่วนชุดของเชื้อรานำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 48-72 ชั่วโมง

อ่านผลการทดลองที่ได้ โดยวัดขนาดของวงใส (clear zone) บันทึกผลโดยใช้เครื่องหมายบวก (+) หรือลบ (-) ดังนี้

- ไม่แสดงฤทธิ์การต้านจุลชีพ
+ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส = 10-19 มม. (แสดงฤทธิ์น้อยมาก)
++ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส = 20-25 มม.
+++ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส = 26-30 มม.
++++ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส = >30 มม.

ผลการทดลองของน้ำมันระเหยจากใบแปรงล้างขวด ใบเสม็ดขาว และใบฝรั่งขี้นก ต่อเชื้อจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 4, 5 และ 6 ตามลำดับ

ตัวอย่างน้ำมันระเหยที่ทำให้เกิดวงใส ให้นำไปหาค่าต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ต่อไป (ภาพแสดงฤทธิ์การฆ่าเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 5-14)

3.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ : Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ใช้วิธี broth microdilution method (Barry 1991; Woods and Washington, 1995; Espinel-Ingroff and Pfaller, 1995; C.M. Mann and J.L. Markham 1998). ดังมีรายละเอียดโดยย่อดังนี้

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างเชื้อวิเคราะห์

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ใช้ให้ทำเช่นเดียวกันกับวิธีการทดสอบเบื้องต้น (3.1.2) แล้วนำมาทำให้เป็นสารละลาย 1: 100 ด้วยสารละลายที่ปราศจากเชื้อ MHB สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และด้วย SDB สำหรับเชื้อรา จะได้ปริมาณเชื้อประมาณ 10^6 CFU ในหนึ่งมิลลิลิตร

3.2.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำมันระเหยสำหรับวิเคราะห์

เตรียมสารละลาย 10.00 เปอร์เซนต์ ของน้ำมันระเหย ด้วย 0.5 เปอร์เซนต์ Tween 80 กรองให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นเตรียมสารละลายตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 5.00 - 0.04 เปอร์เซนต์ (ใช้วิธี two fold dilution)ด้วยสารละลายปราศจากเชื้อ ของวุ้น 0.15 เปอร์เซนต์ น้ำหนัก/ปริมาตร ใน MHB สำหรับเชื้อแบคทีเรีย หรือ SDB สำหรับเชื้อรา เพื่อให้น้ำมันระเหยคงสภาพการผสมกับสารละลายที่นำมาใช้เจือจาง

3.2.3 วิธี การวิเคราะห์

หยอดตัวอย่างน้ำมันระเหยแต่ละความเข้มข้น ปริมาณ 50 ไมโครลิตร และเชื้อที่เตรียมไว้อีก 50 ไมโครลิตรลงใน 96-well sterile U-bottom microtiter plates แต่ละหลุม (แถว A) ทำเช่นเดียวกันนี้ซ้ำอีกครั้ง (แถว B) (ดังแสดงในไดอะแกรมหน้า 13) สำหรับหลุมที่เป็น positive

คอนโทรล ให้ใช้สารละลายของเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาณ 100 ไมโครลิตรอย่างเดียว และหลุมที่เป็น negative คอนโทรล ให้ใช้สารละลายปราศจากเชื้อ ของวุ้น 0.15 เปอร์เซนต์ น้ำหนัก/ปริมาตร ใน MHB หรือ SDB ปริมาณ 100 ไมโครลิตรอย่างเดียว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย และ 30 องศาเซลเซียส 48-72 ชั่วโมง สำหรับเชื้อรา ความเข้มข้นต่ำสุดของตัวอย่างน้ำมันระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อคือค่า MIC

อ่านผลการทดลองที่ได้ โดยวัดความขุ่น (turbidity) บันทึกผลโดยใช้เครื่องหมาย บวก (+) หรือลบ (-) ดังนี้

- สารละลายใส (สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพได้)
+ สารละลายขุ่น (เชื้อจุลชีพยังสามารถเจริญเติบโตได้)

ตัวอย่างการอ่านผลการทดสอบ ของค่า MIC

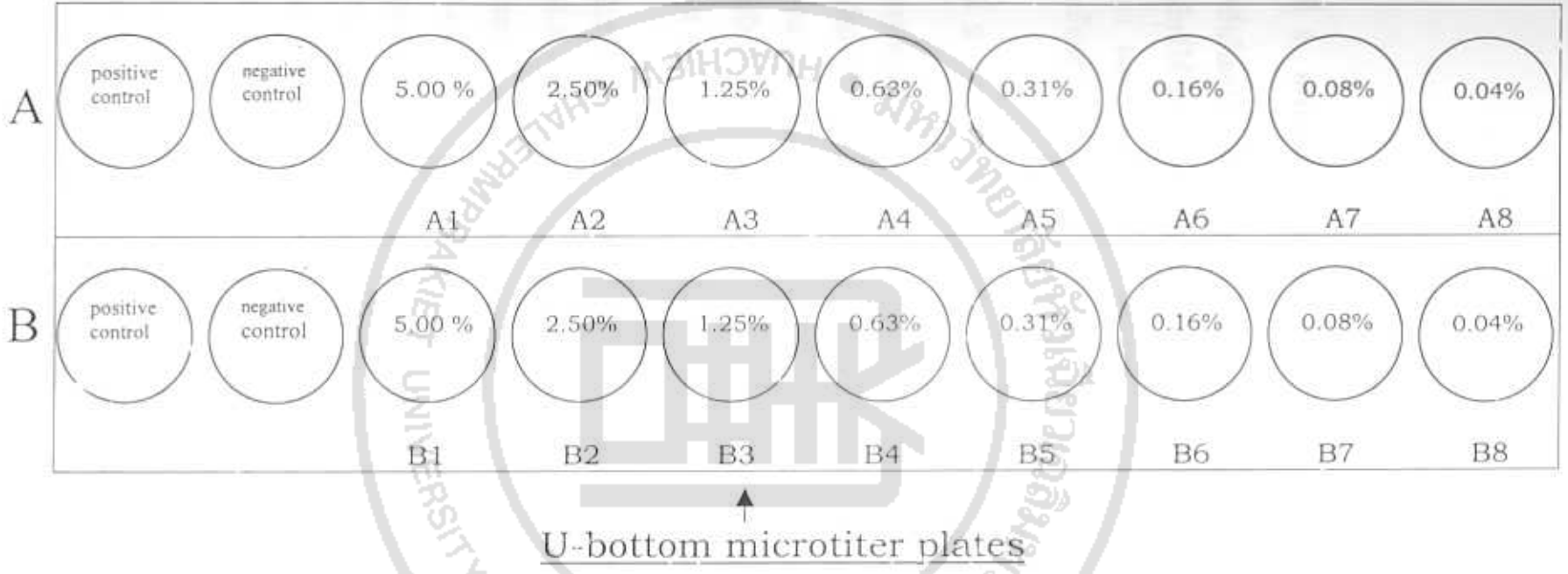
ทดสอบน้ำมันระเหยจากใบหปรงล้างขวดกับเชื้อ ***Staphylococcus aureus***

ความเข้มข้นของน้ำมันระเหย(v/v)	positive control	negative control	5.00%	2.50%	1.25%	0.63% *	0.31%	0.16%	0.08%	0.04%
แถว A	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
แถว B	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+

* 0.63% คือความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้

ตัวอย่างประกอบวิธีการทดสอบการหาค่า MIC

ทดสอบน้ำมันระเหยจากใบแปรงล้างขวดกับเชื้อ *Staphylococcus aureus*



Positive control : สารละลายของเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาณ 100 µL

Negative control : สารละลายปราศจากเชื้อ ของวุ้น 0.15 % w/v ใน MHB หรือ SDB ปริมาณ 100 µL

A1-A8 : ตัวอย่างน้ำมันระเหยแต่ละความเข้มข้น ปริมาณ 50 µL + สารละลายของเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาณ 50 µL

แถว B : คือการทำซ้ำกับแถว A (duplicate)