วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสารสกัด

เก็บเปลือกรากของต้นส่องฟ้าดงมาอบให้แห้งในตู้อบที่ 50°C นาน 3 ชั่วโมง บดเป็นผงด้วยเครื่องบดซึ่งได้น้ำหนัก 2.8 กิโลกรัม แล้ว Reflux ด้วย Hexane 20 ลิตรเป็นเวลา 17 ชั่วโมง จากนั้นก็นำมากรองและทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ทำการเพาะแยกเชื้อจากหูสุนัขที่เกิดหูอักเสบจำนวน 68 ตัวอย่าง เชื้อที่แยกพบได้แก่ *Klebseilla* spp. จำนวน 4 ตัวอย่าง *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 20 ตัวอย่าง *S. aureus* จำนวน 21 ตัวอย่าง *E. coli* จำนวน 4 ตัวอย่าง *Proteus mirabilis* จำนวน 7 ตัวอย่าง *Pseudomonas* spp.จำนวน 6 ตัวอย่าง β -Haemolytic Streptococcus จำนวน 2 ตัวอย่าง α - Haemolytoc Streptococcus จำนวน 1 ตัวอย่าง *Staphylococcus* spp. จำนวน 1 ตัวอย่างและ *Enterobacter* spp. จำนวน 2 ตัวอย่าง ส่วน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อมาตรฐานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยนำเชื้อที่แยกได้จากช่องหูสุนัขมาเพาะเชื้อใน Blood agar 24 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีของเชื้อมา 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน Mueller Hinton Broth (HIMEDIA , India) ประมาณ 2-6 ชั่วโมง จากนั้นก็เตรียมเชื้อให้ได้ความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland แล้วเจือจางด้วยน้ำเกลือ 1 : 100 จะได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ

การทดลองทำตามมาตรฐานของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000) และวิธีของเจษฎาและคณะ (2546) วิธีเตรียมโดยละลายสารสกัดส่องฟ้าดง 1 กรัม ด้วย absolute ethanol 3 มิลลิลิตรและกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman ®, Ahlstrom , USA) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้เติมในหลุมแรกของไมโครเพลทแล้วเจือจางให้ความเข้มข้นลดลง 2 เท่าตามลำดับด้วย Mueller Hinton Broth จนถึงหลุมที่ 10 โดยมีหลุมที่ 11 เป็นหลุมควบคุมผลบวกและหลุมที่ 12 เป็นหลุมควบคุมผลลบ

สำหรับยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน (Sigma®, Aldrich, USA) เจือจางที่ความเข้มข้น 5 และ 100 ไมโครลิตรจนถึงหลุมที่ 10 ส่วนหลุมที่ 11 และ 12 เป็นหลุมควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ

เติมเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ในแต่ละหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ตั้งแต่หลุมที่ 1 ถึงหลุมที่ 11 จากนั้นนำไปอบที่ 37°C 18-24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อจากระดับความขุ่น โดยหลุมที่ใสจะไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ความเข้มข้นของสารสกัดในหลุมแรกที่ใสจะถูกบันทึก

เป็นค่า MIC และนำไปเพาะเชื้อใน Standard Plate Count Agar 24 ชั่วโมงและ blood agar สำหรับใช้เพาะเชื้อ *Streptococcus* spp. อบที่ตู้ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล

บันทึกผลโดยให้ระดับความขุ่น โดย 3+ หมายถึงขุ่น และ 3- หมายถึง ใส เป็นหลุมควบคุมส่วนการอ่านผลการยับยั้งเชื้อโดยพิจารณาค่า MIC จากไมโครเพลท และผลการยับยั้งเชื้อจากการเพาะเลี้ยงใน Standard Plate Count Agar โดยยึดเกณฑ์ที่เชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิน 5 โคโลนี

เป็นค่า MIC

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

การทดลองนี้ตัวอย่างทดสอบทั้งหมด 68 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 5 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้จากการบันทึกผลเป็นระดับของความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อ แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (MIC ±SD) และทดสอบความแตกต่างของเชื้อแต่ละกลุ่ม และความสัมพันธ์ของความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ยับยั้งเชื้อในแต่ละเชื้อทางสถิติ โดยใช้ ANOVA, Duncan และ Pearson Chi's Square ในการวิเคราะห์