บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. Paper blank disc, Whatman, England
2. Filter paper No.1, Whatman, England
3. 96 well plates flat bottom with lid, Corning Incorporated, USA
4. Autoclave, Sanyo Labo Autoclave, Japan
5. Hot air oven, memmert, Germany
6. Laminar air flow, Bosstech
7. Incubator, memmert, Germany
8. Spectrophotometer Spectronic 20 Genesys, Thermo Spectronic, USA
9. Micropipette, Gilson, France
10. Vortex mixer 2-Genic, Sciencetific Industries, USA
11. Multichannel micropipette, Rainin, USA
12. Petridish, Greiner Bio-One Ltd., Thailand
13. Rotary evaporator, Buchi, Switzerland
14. Microcentrifuge tube, Bio Advance Co.,Ltd., Thailand
15. Tip ขนาด 200 μl, Bio Advance Co.,Ltd., Thailand
16. TLC Aluminium Sheets 20X20 cm SI 60 F254, Merck, Germany
17. Multichannel micropipette 20-200 µl, Select BioProduct, USA
18. Microtube rack 80 well, Bio Advance Co.,Ltd., Thailand
19. Disposable Micropipette Intramark, BRAND GMBH + CO KG, Germany
20. เครื่องชั่ง รุ่น AG 204 Mettler Toledo, Switzerland
21. pH meter Cyberscan 2000, Eutech Cybermetics, Singapore
22. Shaker innova 2100, New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA

23. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20°ซ บริษัท Sanyo Electric, Japan

24. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70°ซ บริษัท Forma Scientific, USA

เคมีภัณฑ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Ethyl Acetate, Jakraval Application Co.,Ltd., Thailand
2. Ethanol, Jakraval Application Co.,Ltd., Thailand
3. Methanol, Jakraval Application Co.,Ltd., Thailand
4. Dichloromethane, Jakraval Application Co.,Ltd., Thailand
5. Dimethyl sulfoxide (DMSO), Redel-de Haen, Germany
6. Agar, Pronadisa, Spain
7. Brain Heart Infusion Broth, Bacton-Dickinson and company, USA
8. Bacto Tryptic Soy Broth, Bacton-Dickinson and company, USA
9. วุ้นผง, B.B.I. Co.,Ltd., Thailand
10. 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, BDH Laboratory Suppliers (U) Ltd., England

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย (The American Type Culture Collection, USA)

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
2. *Salmonella typhimurium* ATCC 19113
3. *Bacillus cereus* ATCC 11778
4. *Escherichia coli* ATCC 25922
5. *Listeria monocytogenes* ATCC 19115
6. *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สกัดสารจากเปลือกต้นพยอมโดยใช้ตัวทำละลายต่างๆ

3.1.1 ซื้อเปลือกพยอมมาจากจังหวัดสมุทรสาคร

3.1.2 นำเปลือกพยอมมาแช่ตัวทำละลายต่างๆดังนี้ เอททิล อะซีเตท เอทานอล เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน เปลือกไม้ (g) : ตัวทำละลาย (ml) = 1:10 แช่ทิ้งไว้นานประมาณ 24 ชั่วโมง ทำการแยกส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนเปลือกไม้ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนของเหลวไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (Wathman No.1) เพื่อแยกเปลือกไม้ออก

3.1.3 จากนั้นนำสารสกัดมาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง evaporator ได้เป็น crude extract เก็บ crude extract ของแต่ละส่วนที่ได้ไว้ในขวดปลอดเชื้อสีชา และนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

3.2 ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

3.2.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , *Salmonella typhimurium* ATCC 19113, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 และ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802

3.2.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

- การเก็บเชื้อบนอาหารแข็ง เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็งเอียง BHI หรือในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง BHI บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้ และถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

- การเก็บ stock เชื้อ เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารแข็ง BHI บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเขี่ยโคโลนีผสมกับ 30% กลีเซอรอล บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็งที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 6 เดือน หรือเก็บที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 1 ปี

3.2.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อนนำมาทดสอบ

- นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บไว้มา streak ลงบนอาหารแข็ง TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว TSB บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่อง

Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนได้เชื้อที่มีความขุ่น optical density, OD. เท่ากับ 0.2 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อประมาณ 10^7 CFU/ml

3.2.4 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบสาร

- นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.3 ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในอาหาร TSA (วุ้น 1.0%) ปริมาตร 9 ml ซึ่งหลอมและทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45 °ซ ผสมเชื้อและอาหารให้เข้ากันดี แล้วเททับบนอาหาร TSA (วุ้น 1.5%) ที่มีปริมาตร 15 ml ซึ่งเทเตรียมไว้ในจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) และแข็งตัวแล้ว (base layer)

3.2.5 การทดสอบ Antimicrobial activity โดยวิธี disc diffusion method ตามวิธีของ Hayes and Markovic (2002)

- ละลายสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.1.3 ในสารละลาย DMSO (Dimethyl sulfoxide) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 mg/ml

- นำ disc ขนาด 6 mm ปลอดเชื้อวางลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ จากนั้นหยดสารสกัดที่ละลายแล้วปริมาตร 10 µl ลงบน disc จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 5 mg/disc จากนั้นนำ disc ที่มีสารสกัดไปวางบนผิวหน้าอาหารที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.4 โดยใช้สารละลาย DMSO 10 µl เป็นตัวควบคุม ทุกตัวอย่างสารสกัดทำ 3 ซ้ำ แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดขนาดบริเวณใสซึ่งแสดงบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อและรายงานผลเป็น มิลลิเมตรของเส้นผ่านศูนย์กลาง จากนั้นเลือกชนิดของตัวทำละลายที่สกัดสารแล้วให้บริเวณใสกว้างที่สุดในการยับยั้งเชื้อแต่ละชนิดไปหาค่า MIC และ MBC

3.3 หาค่า MIC (minimal inhibition concentration) โดยใช้วิธี broth dilution method และค่า MBC (minimal bactericidal concentration) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Sahin et al. (2003)

3.3.1 หาค่า MIC (minimal inhibition concentration) โดยใช้วิธี broth dilution method

- ละลายสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.1.3 จำนวน 50 mg ในสารละลายเอทานอล 70% ปริมาตร 100 µl จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 900 µl จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 mg/ml

- หาค่า MIC โดยเติมอาหารเหลว TSB ช่องละ 50 µl จากนั้นเติมสารละลายสารสกัดพยอมที่เตรียมได้ก่อนหน้านี้ลงในช่องแรกและช่องที่ 2 ของแต่ละแถว จากนั้นทำการเจือจาง

แบบ serial dilution โดยการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อจากแถวที่ 2 ลงในช่องถัดไป ปริมาตร 50 µl และเจือจางต่อไปเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงช่องสุดท้าย จากนั้นเติมอาหารเหลว TSB ช่องละ 40 µl และเติมสารแขวนลอยเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.3 โดยแต่ละความเจือจางทำ 3 ซ้ำ จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดพยอมในแต่ละช่องเป็นอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 และ 1:256 ของสารละลายสารสกัดพยอมเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 50 mg/ml จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาตรวจสอบการเจริญของเชื้อและหาค่า MIC โดยช่องที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อจะนำมาคำนวณหาค่า MIC ในหน่วยของ mg/ml

3.3.2 หาค่า MBC (minimal bactericidal concentration)

- หยดสารละลาย Tatrasolium ความเข้มข้น 0.1% ลงในช่องทุกช่องเพื่อหาค่า MBC โดยช่องที่ Tatrasolium ไม่เปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่าไม่มีการเจริญของเชื้อ พร้อมทั้งยืนยันผลค่า MBC โดยการถ่ายเชื้อจากช่องที่มีความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่ช่องที่มีค่าเท่ากับค่า MIC ไปจนถึงช่องที่มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดมากกว่าค่า MIC ทุกช่องลงบนอาหารแข็ง TSA ปริมาตร 10 µl โดยวิธี drop plate และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบการเจริญของเชื้อและหาค่า MBC โดยหยดเชื้อจากช่องที่มีความเข้มข้นของสารน้อยที่สุดและไม่มีการเจริญของเชื้อจะนำมาคำนวณหาค่า MBC เปรียบเทียบกับค่าที่อ่านได้จากการหยดสารละลาย 0.1% Tatrasolium และรายงานผลค่า MBC ในหน่วยของ mg/ml

3.4 การแยกสารสกัดเพื่อหาสารออกฤทธิ์ที่ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อ

- นำตัวอย่างสารสกัดที่ให้ค่า MIC และ MBC ที่น้อยที่สุดมาแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธี column chromatography ใช้เฟสคงที่เป็น silica gel และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลาย dichloromethane : methanol ในอัตราส่วนต่างๆ โดยใช้อัตราการชะสารออกจากคอลัมน์ 5 มล. ต่อนาที จากนั้นเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์เป็น fraction และนำมาแยกบน Thin layer chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย dichloromethane : methanol ในอัตราส่วน 4:1 และรวมส่วนที่มีลักษณะการแยกของสารแบบเดียวกัน แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง evaporator

- นำสารสกัดที่ได้ไป หาค่า MIC และค่า MBC ตามวิธีในข้อ 3.3 เพื่อคัดเลือกสารที่มีค่า MIC และค่า MBC ต่ำที่สุดมาแยกสารต่อ โดยวิธี gradient column chromatography

- การทำ gradient column chromatography ใช้วิธีเดียวกันแต่เปลี่ยนตัวชะหรือเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลาย dichloromethane : methanol โดยเพิ่มปริมาณ methanol ขึ้นทีละ 5% จาก 95:5 จนถึง 0:100