

บทที่ 2

การดำเนินการวิจัย

ก. พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มี 3 ชนิด ได้แก่

1. ข่า
2. ขมิ้นชัน
3. ไพล

โดยเก็บพืชสมุนไพรทั้งสามจากบริเวณพื้นที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ โดยเลือกเก็บเหง้า (rhizome) ของพืชสมุนไพรทั้งสามที่มีอายุไม่อ่อนหรือแก่เกินไป (โดยเฉลี่ยอายุประมาณ 1 ปี) นำต้นสมุนไพรทั้งสามที่เก็บเหง้ามาตรวจสอบเอกลักษณ์ให้แน่ใจว่าเป็นสมุนไพรที่ต้องการ ได้แก่ ข่าหยาบ ขมิ้นชัน และไพล ถ่ายรูปทุกส่วนไว้เป็นหลักฐาน

ข. เครื่องมือ

1. Autoclave (Hiclave HVE-50, Harayama manufacturing Co., Ltd., Japan)
2. Laminar hood / hood with lamp and UV-lamp
3. GC-MS (Hewlett-Packard model 6890 (GC) / HP 5973 MS)
4. Refractometer (ATAGO รุ่น 3T จากบริษัท Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan)
5. Hot air oven (Thelco. Model 27 GCA. Co., Ltd., USA.)
6. Incubator (National Appliance Co., Model 332, USA.)
7. Water bath (Mettler, GMBH Co., Ltd., Germany)
8. Balance (Sartorius Model BP110, AG Gottingen Co. Ltd., Germany)
9. Surface Tensiometer (FACE-CBVP-A3, Japan)
10. pH meter (Hanna pH 211 microprocessor, USA)
11. Micropipete (Eppendorf)

12. Microplate Reader Spectrophotometer (Model 680 Reader, Bio-Rad Laboratories Ltd.)
13. Plate Tensiometer (Automatic Surface Tensiometer รุ่น CBVP-A3 บริษัท Kyowa Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan)
14. Vortex Mixer
15. Ultrasonicator
16. Steam distillation apparatus
17. Multiple-Point Stirrer
18. High Speed Centrifuge
19. Refrigerator
20. Deep freezer
21. เครื่องบดสมุนไพร
22. ขวดแก้วใส่อาหารเลี้ยงเชื้อขนาดต่าง ๆ (100, 250, 500, 1000 มิลลิตร)
23. เครื่องดูด-ปล่อยสารละลาย (Dispensette)
24. จานเพาะเชื้อ
25. ตะเกียงแอลกอฮอล์ / ตะเกียงบุนเซน
26. ที่วางหลอดทดลอง
27. หลอดทดลองที่มีฝาปิด
28. ห่วงเขี่ยเชื้อ / เข็มเขี่ยเชื้อ
29. วัสดุที่จำเป็นอื่น ๆ เช่น beakers, volumetric flasks, erlenmayer flasks, cylinders, magnetic bars, filter membrane, aluminum foil, stirring rods เป็นต้น

ค. วัสดุเคมีภัณฑ์

1. Methanol (AR) Lab Scan Analytical Sciences *
2. Ethanol (AR) Lab Scan Analytical Sciences
3. Hexane (AR) Lab Scan Analytical Sciences
4. Isopropyl myristate
5. DMSO (Merck)

6. Mineral oil (บริษัทวิทยาศาสตร์ จำกัด)
7. Polyethylene glycol 400 (บริษัทวิทยาศาสตร์ จำกัด)
8. Propylene glycol (บริษัทวิทยาศาสตร์ จำกัด)

ง. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mueller Hinton Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England)
2. Tryptic Soy Broth (Bacto-Difco Lab Co., Ltd, USA.)

จ. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบส่วนใหญ่เป็นเชื้อก่อโรคในสุกร ได้แก่

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25223
2. *Salmonella enteritidis* ATCC 13076
3. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
4. *Listeria monocytogenes* DMST1730
5. *Escherichia coli* ATCC 25222
6. *Escherichia coli* (Field strain 1)
7. *Escherichia coli* (Field strain 2)
8. *Escherichia coli* (Field strain 3)
9. *Escherichia coli* (Field strain 4)
10. *Escherichia coli* (Field strain 5)
11. *Escherichia coli* (Field strain 6)
12. *Escherichia coli* (Field strain 7)
13. *Escherichia coli* (Field strain 8)
14. *Corynebacterium spp.*
15. *Pasteurella multocida*
16. *Shigella sonii* DMST 561
17. *Salmonella spp.* (Field strain 1)

18. *Salmonella* spp. (Field strain 2)
19. *Salmonella* spp. (Field strain 3)

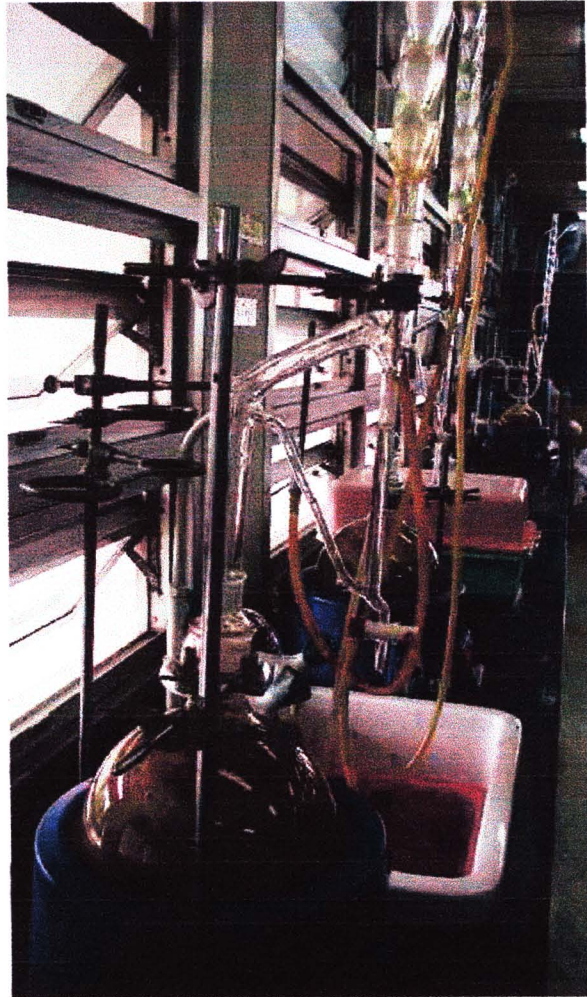
ข. วิจัย

การเก็บสมุนไพรตัวอย่าง

ทำการเก็บพืชสมุนไพรในวงศ์ Zingiberaceae ที่สนใจจำนวน 3 ชนิด จากอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ เซ่น ข่า ขมิ้น และ ไพล ทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืชเหล่านั้น และถ่ายรูปไว้เป็นหลักฐาน

การสกัดน้ำมันหอมระเหย

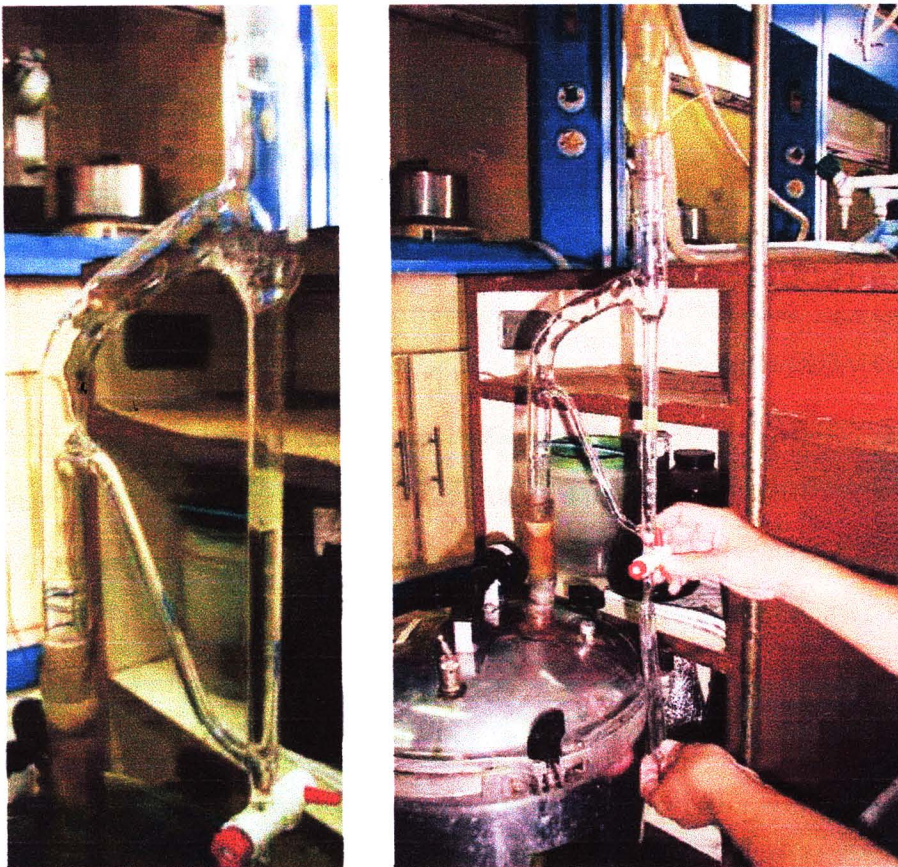
ทำการทดลองโดยเลือกเก็บเหง้าสด (fresh rhizome) ของพืชแต่ละชนิดที่ไม่อ่อนหรือแก่เกินไป (อายุประมาณ 1 ปี) นำมาล้างน้ำสะอาด แล้วผึ่งให้แห้ง ชั่งเหง้าสดเหล่านั้นเพื่อให้ทราบน้ำหนักเหง้าสดที่แน่นอน แล้วนำมาบดผสมกับน้ำกลั่นแล้วทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี hydrodistillation ใช้เครื่องกลั่นขนาด 1 ลิตร และ 10 ลิตร เพื่อทำการกลั่นครั้งละปริมาณน้อยและมากต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2-1 และ รูปที่ 2-2 ตามลำดับ ทำการจดบันทึกปริมาณน้ำมันหอมระเหยภายหลังจากทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง รองรับปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ด้วย Cleventure สำหรับน้ำมันชนิดเบากว่าน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 2-3 จะได้จำนวนน้ำมันหอมระเหยตามชนิดของพืชสมุนไพรที่ศึกษา ค่าปริมาตรที่ได้นำมาคำนวณหา % yield



รูปที่ 2-1 แสดงการกลั่นน้ำมันหอมระเหยในปริมาณน้อย



รูปที่ 2-2 แสดงการกลั่นน้ำมันหอมระเหยในปริมาณมาก



รูปที่ 2-3 แสดงการเก็บน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้

การศึกษาลักษณะภายนอกของน้ำมันหอมระเหย

การศึกษาในขั้นตอนนี้ทำโดยสังเกตลักษณะภายนอกของน้ำมันหอมระเหย ด้วยประสาทสัมผัส ได้แก่ลักษณะทั่วไป สี และกลิ่น

การศึกษาสมบัติการละลายของสารสกัด

ในการศึกษาสมบัติการละลายของน้ำมันหอมระเหย จะใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ ที่นิยมใช้ทางเภสัชกรรมมาทำการศึกษา การทดลองทำโดยชั่งน้ำมันหอมระเหยให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นค่อย ๆ เติมตัวทำละลายทีละน้อย แต่ครั้งที่เติมตัวทำละลายให้ทำการผสมให้เข้ากันโดยเครื่องคนผสม หากใช้ตัวทำละลายน้อยจะผสมใน test tube โดยใช้เครื่อง Vortex mixer หากต้องใช้ปริมาณตัวทำละลายมากจะผสมใน beaker และใช้เครื่อง Multipoint stirrer ดังแสดงในรูปที่ 2-4 ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ จนกระทั่งน้ำมันหอมระเหยละลายหมด โดยสังเกตด้วยตาเปล่า บันทึกปริมาณน้อยที่สุดของตัวทำละลายที่ทำให้น้ำมันหอมระเหย จำนวนดังกล่าวละลายหมด

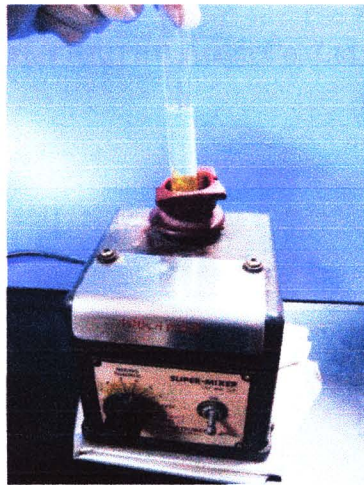
ค่าการละลายที่วัดได้ จะบอกเป็นค่าส่วนของตัวทำละลายที่น้อยที่สุดเพื่อใช้ละลายน้ำมันหอมระเหยจำนวน 1 ส่วน ดังนั้นหากตัวทำละลายใดมีค่าตัวเลขที่แสดงส่วนที่ต้องใช้น้อย แสดงว่าตัวทำละลายนั้นสามารถละลายน้ำมันหอมระเหย ได้ดี ในทางกลับกันหากตัวทำละลายใดมีค่าตัวเลขที่แสดงส่วนที่ต้องใช้มาก แสดงว่าตัวทำละลายนั้นสามารถละลายน้ำมันหอมระเหย ได้ไม่ดี

การศึกษาหาความหนาแน่นของน้ำมันหอมระเหย

การหาความหนาแน่นของน้ำมันหอมระเหยในขั้นตอนนี้ ทำดังต่อไปนี้

1. ควบน้ำมันหอมระเหยด้วย Micropipette ที่ทราบปริมาตรแน่นอน (ml)
2. นำของเหลวที่วัดได้ไปหาน้ำหนัก (g)
3. นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความหนาแน่น โดยใช้สูตร $D = M/V$ เมื่อ D หมายถึงความหนาแน่น M หมายถึงน้ำหนัก และ V หมายถึงปริมาตรของน้ำมัน
4. ทำการทดลองข้อ 1-3 ซ้ำอีก 2 ครั้ง
5. นำผลการทดลองทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ย

(A)



(B)



รูปที่ 2-4 แสดงการทดสอบสมบัติการละลายของน้ำมันหอมระเหย

(A) = โดยใช้ Vortex

(B) = โดยใช้ Multi-stirrer

*

การศึกษาหาค่า Refractive index ของน้ำมันหอมระเหย

ในขั้นตอนนี้ทำการศึกษาหา Refractive index ของน้ำมันหอมระเหยโดยใช้เครื่อง Refractometer (ATAGO รุ่น 3T จากบริษัท Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan) ดังแสดงในรูปที่ 2-5 และรูปที่ 2-6



รูปที่ 2-5 แสดงลักษณะภายนอกของเครื่อง Refractometer



รูปที่ 2-6 แสดงลักษณะการใช้งานโดยเครื่อง Refractometer

การศึกษาหาค่า Surface tension ของน้ำมันหอมระเหย

ในขั้นตอนนี้ทำการศึกษาหา Surface tension ของน้ำมันหอมระเหยโดยใช้เครื่อง Plate Tensiometer (Automatic Surface Tensiometer รุ่น CBVP-A3 บริษัท Kyowa Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan) ดังแสดงในรูปที่ 2-7 และรูปที่ 2-8 ตามลำดับ สำหรับการหาค่า Surface tension ได้ใช้สารมาตรฐานอื่น ๆ เปรียบเทียบด้วย



รูปที่ 2-7 แสดงลักษณะภายนอกของเครื่อง Plate Tensiometer



รูปที่ 2-8 แสดงลักษณะภายในของเครื่อง Plate Tensiometer

การศึกษาองค์ประกอบหรือสารสำคัญที่มีในน้ำมันหอมระเหย

การศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรทั้งสามชนิดเพื่อการควบคุมคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยใช้เครื่อง GC-MS ชนิด Agilent 6890 gas chromatography คู่กับ electron impact (EI, 70 eV) โดยมี HP 5973 mass selective detector และต่อเข้ากับ silica capillary column (HP-5MS) ของ (Hewlett Packard® ประเทศสหรัฐอเมริกา) ขนาด 30.0 เมตร × 250 ไมครอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางด้านในเท่ากับ 0.25 ไมครอน สภาพที่ใช้ในการศึกษาคือใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาในอัตราเร็วประมาณ 1.0 มิลลิตร/นาที่ มี injector temperature เท่ากับ 260 องศาเซลเซียส ให้มี oven temperature เท่ากับ 100 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาที่ ไปถึง 188 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มเป็นอัตรา 20 องศาเซลเซียส/นาที่ ไปถึง 280 องศาเซลเซียส และมี detector temperature เท่ากับ: 280 องศาเซลเซียส ผลการทดลองประเมินโดยใช้โปรแกรมจากเครื่อง GC-MS ซึ่งคำนวณจากการเปรียบเทียบกับ mass spectra database (WILEY&NIST) และ spectroscopic data

การศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในสุกรของน้ำมันหอมระเหย

การทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียในการวิจัยครั้งนี้เป็นการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสุกร ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อในการวิจัยครั้งนี้ มีทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว ซึ่งมีรายละเอียดการเตรียมน้ำดังต่อไปนี้

การเตรียมอาหารแข็ง (ก)

1. ชั่งผง Tryptic Soy Broth (TSB) และผง Agar ปริมาณ 30 กรัม และ 15 กรัม ตามลำดับ นำมาผสมกันแล้วผสมกับน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

2. คนผสมหรือเขย่าขวดเบาๆ ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายให้หมดแล้วนำไปทำการไ้เชื้อ โดยเครื่อง autoclave นานประมาณ 15-18 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
3. หลังจาก autoclave เสร็จ ให้นำมาพักไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อค่อย ๆ ลดอุณหภูมิ แต่ยังไม่ให้เย็นแข็งตัว ระวังอย่าให้น้ำใน อ่าง ควบคุมอุณหภูมิท่วมขวดที่เตรียมอาหาร
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมอยู่ ลงในงานเปล่าเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ
5. ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว ซึ่งมีลักษณะเหมือนวุ้นที่แข็งตัว แล้วคว่ำงานเลี้ยงเชื้อนั้นไว้ เพื่อป้องกันไอน้ำจากความร้อนหยดลงบนวุ้น
6. ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

* อาหารเลี้ยงเชื้อที่เทลงในงานเลี้ยงเชื้อ จะใช้ปริมาตรประมาณ 10-15 มิลลิตร ต่อ 1 งานเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารแข็ง (ข)

1. ชั่งผง Tryptic Soy Broth (TSB) และผง Agar ปริมาณ 30 กรัม และ 7 กรัม ตามลำดับ นำมาผสมกันแล้วผสมกับน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร
2. คนผสมหรือเขย่าขวดเบาๆ ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายให้หมดแล้วนำไปทำการไ้เชื้อ โดยเครื่อง autoclave นานประมาณ 15-18 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
3. หลังจาก autoclave เสร็จ ให้นำมาพักไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อค่อย ๆ ลดอุณหภูมิ แต่ยังไม่ให้เย็นแข็งตัว ระวังอย่าให้น้ำใน อ่าง ควบคุมอุณหภูมิท่วมขวดที่เตรียมอาหาร
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เย็นแล้วแต่ยังไม่แข็งตัว ไปใช้ในการศึกษาต่อไป

การเตรียมอาหารแข็ง (ค)

1. ชั่งผง Agar ปริมาณ 20 กรัม นำมาผสมกับน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร
2. คนผสมหรือเขย่าขวดเบาๆ ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายให้หมดแล้วนำไปทำการไ้เชื้อ โดยเครื่อง autoclave นานประมาณ 15-18 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์

3. หลังจาก autoclave เสร็จให้นำมาพักไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อค่อยๆ ลดอุณหภูมิ แต่ยังไม่ให้วันแข็งตัว ระวังอย่าให้น้ำใน อ่าง ควบคุมอุณหภูมิท่วมขวดที่เตรียมอาหาร
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เย็นแล้วแต่ยังหลอมอยู่ ไปใช้ในการศึกษาต่อไป

การเตรียมอาหารเหลว

1. ชั่งผง Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาณ 30 กรัม นำมาผสมกับน้ำกลั่น ให้ได้ ปริมาตร 1 ลิตร
2. เขย่าขวดเบาๆ ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายให้หมดและละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. คูดสารละลายอาหารเหลวที่เตรียมได้โดยใช้ปิเปตใส่ในหลอดทดลอง ในปริมาณไม่เกิน 3/4 ของหลอดทดลอง (อาจใช้เครื่องดูด-ปล่อยสารละลาย (Dispensor) เพื่อให้ อาหารเหลวในแต่ละหลอดมีปริมาตรเท่ากัน)
4. ปิดฝาหลอดทดลองทุกหลอดแล้วนำไปทำการไ้เชื้อโดยเครื่อง autoclave นาน ประมาณ 15-18 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์
5. หลังจาก autoclave เสร็จ นำมาพักไว้ให้เย็น เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การเก็บ stock culture ของเชื้อแบคทีเรีย

1. เตรียมสารละลาย 40% กลีเซอรอลในน้ำ แล้วทำการไ้เชื้อด้วยเครื่อง autoclave แล้ว ทำให้เย็นลงเพื่อเตรียมรับเชื้อที่ต้องการเก็บ
2. คูดเชื้อที่ต้องการเก็บ (ซึ่งอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลาย 40% กลีเซอรอลในน้ำ ที่ปราศจากเชื้อแล้ว
3. ผสมเบาๆ ให้เข้ากันดี. แล้วนำไปเก็บที่ตู้เย็น อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมโคลนเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย

1. นำเชื้อที่เก็บไว้ในสารละลายกลีเซอรอล ออกจากตู้เก็บเชื้อ ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2 นาที หรือจนเริ่มกลายเป็นของเหลว

2. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Loop) ที่ปราศจากเชื้อ จุ่มในสารละลายเชื้อข้อ 1 แล้ว streak ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ก) ที่แข็งตัวแล้ว ที่บรรจุอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียเพื่อการทดสอบ

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Mc. Farland no. 0.5 โดยการผสมสารละลาย 1% H_2SO_4 ปริมาตร 9.95 มิลลิลิตร ด้วย 1% BaCl_2 ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm บันทึกค่าความขุ่นที่ได้ไว้เป็นมาตรฐาน
2. เขี่ยโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้และอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง จะเป็นเซลล์ที่อยู่ในช่วงที่สามารถเจริญหรือแบ่งเซลล์ต่อไปได้ดี นำมาแขวนตะกอน (suspend) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปวัดค่าความขุ่น ทำการเจือจางสารผสมต่อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ จนได้ค่าความขุ่นเทียบเท่ากับความขุ่นของสารละลาย Mc. Farland no. 0.5 ซึ่งเชื้อที่เตรียมได้นี้ถือว่ามีความเข้มข้นของเชื้อ ประมาณ 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร (CFU/ml) ซึ่งจะได้นำไปใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Well diffusion

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อ (ค) ที่เตรียมไว้แล้วเทลงในจานเปล่าเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ แล้วรอจนอาหารแข็งตัว
2. ปิเปิดสารละลายเชื้อแบคทีเรียเพื่อการทดสอบ ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข) ที่เย็นลงแต่ยังเป็นของเหลวอยู่ โดยให้มีปริมาณของสารละลายเชื้อในอาหารเท่ากับ 1% เขย่าขวดให้เชื้อกระจายทั่วๆ จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้แล้วจาก ข้อ 1 ที่แข็งตัวแล้ว
3. ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว (เป็นวัน) แล้วเจาะหลุมตามขนาดที่ต้องการ (เจาะเฉพาะชั้นบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข))

4. เติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงในหลุมที่เจาะไว้ ในปริมาณที่ต้องการทดสอบ
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วดูลักษณะของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone หรือ clear zone) ถ้าตัวอย่างที่ศึกษามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจะเกิดบริเวณใสรอบหลุมนั้น ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเพื่อประเมินฤทธิ์ความสามารถในการยับยั้งเชื้อของตัวอย่าง

การหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC)

การทดลองหา MIC จะคล้ายกับการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทั่วไป แต่มีความแตกต่างคือต้องเตรียมสารที่ใช้ทดสอบชนิดเดียวกันให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน จากมากไปน้อยเรียงกัน และเวลาของการบ่มเพาะเชื้อใช้เวลาเพียง 16-18 ชั่วโมง การหาค่า MIC สามารถกระทำได้โดยใช้วิธี Agar well diffusion และ Broth dilution method ดังรายละเอียดต่อไปนี้

การทดสอบโดยใช้วิธี Agar well diffusion

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อ (ค) ที่เตรียมไว้แล้วเทลงในจานเปลา์เลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ แล้วร่อนอาหารแข็งตัว
2. ปิเปตสารละลายเชื้อแบคทีเรียเพื่อการทดสอบ ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข) ที่เย็นลงแต่ยังเป็นของเหลวอยู่ โดยให้มีปริมาณของสารละลายเชื้อในอาหารเท่ากับ 1% v/v เขย่าขวดให้เชื้อกระจายทั่วๆ จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้แล้วจาก ข้อ 1 ที่แข็งตัวแล้ว
6. ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว (เป็นวัน) แล้วเจาะหลุมตามขนาดที่ต้องการ (เจาะเฉพาะชั้นบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข))
7. เติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงในหลุมที่เจาะไว้ ในปริมาณที่ต้องการทดสอบ
8. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วดูลักษณะของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone หรือ clear zone) ถ้าตัวอย่างที่ศึกษามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจะเกิดบริเวณใสรอบหลุมนั้น ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณ

ใส่เพื่อประเมินฤทธิ์ความสามารถในการยับยั้งเชื้อของตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยังคงให้การยับยั้งเชื้อ เรียกว่า MIC

การทดสอบโดยใช้ Broth dilution method

การทดสอบโดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ละเอียดวิธีหนึ่ง ซึ่งผลที่ได้จากการทดสอบวิธีนี้จะทำให้ทราบทั้งความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อ (Minimum inhibitory concentration) หรือ MIC และความเข้มข้นในการฆ่าเชื้อ (Minimum bacteriocidal concentration) หรือ MBC ของสารทดสอบนั้นๆ กับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้คือ การเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีสารทดสอบในปริมาณต่างๆ กัน ผสมอยู่ด้วย และสังเกตการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารทดสอบ โดยเปรียบเทียบความขุ่นกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารทดสอบ โดยวิธี broth dilution method นี้สามารถทำได้ทั้ง macro broth dilution technique และ micro broth dilution technique ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

การทดลองเพื่อหาค่า MIC

1. ทำการเจือจางสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ เพื่อให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ที่แน่นอน เรียงจากมากไปน้อย
2. ปิเปิดสารละลายตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในหลอดทดลอง ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน
3. ปิเปิดสารละลายเชื้อแบคทีเรียเพื่อการทดสอบ ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2 ผสมให้เข้ากันดี ในการทดลองนี้ต้องมีหลอดควบคุมเพื่อใช้เปรียบเทียบความขุ่น หลอดควบคุมบวก (positive control) หมายถึงหลอดที่มีเพียงอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อแบคทีเรีย และหลอดควบคุมลบ (negative control) หมายถึงหลอดที่มีเพียงอาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ
4. นำหลอดทดลองแต่ละหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 16-18 ชั่วโมง

5. ตรวจวัดความขุ่นของสารละลายในหลอดทดลองแต่ละหลอด ที่ 600 นาโนเมตร โดยเทียบกับหลอดควบคุม ถ้าสารละลายในหลอดใดมีความขุ่นเทียบได้เช่นเดียวกับหลอดควบคุมบวก แสดงว่าตัวอย่างหรือความเข้มข้นของตัวอย่างในหลอดนั้นไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย แต่ถ้าหลอดใดมีลักษณะใสเช่นเดียวกับหลอดควบคุมลบ แสดงว่าตัวอย่างหรือความเข้มข้นของตัวอย่างในหลอดนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

การทดลองเพื่อหาค่า MBC

จากการทดลองหาค่า MIC จากอาหารเหลวดังกล่าวข้างต้น สามารถนำมาหาค่า MBC ต่อได้ โดยการนำหลอดที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอด ไป streak plate หรือ spread plate บนจานอาหารแข็ง (ก) จากนั้นนำไปบ่มต่อที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน นาน 16-18 ชั่วโมง อีกครั้ง แล้วนำมาสังเกตผล ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้ก็จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ก็จะพบการเจริญของเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษา Killing kinetic

วิธีนี้จะใช้ความเข้มข้นที่เป็น MBC ของสารทดสอบ มาทำการทดลอง และการทดลองจะใช้วิธี Broth dilution method โดยหลังจากที่ ปิเปตเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารทดสอบผสมอยู่แล้ว จะทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เหลืออยู่ในเวลาหรือหาช่วงเวลาต่าง ๆ เพื่อดูอัตราเร็วในการฆ่าเชื้อของสารทดสอบ วิธีทำโดยละเอียดคือหลังจากที่เชื้อผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวอย่างแล้ว เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลากันตามความเหมาะสม ทั้งนี้ช่วงเวลาที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับตัวอย่างและเชื้อที่ศึกษา อาจมีหน่วยเป็นนาทีหรือชั่วโมงซึ่งทราบได้จากการทดลองเท่านั้น แล้วนำมา spread plate บนอาหารแข็ง (ก) หลังจากนั้นนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมานับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่สามารถเจริญได้ในจานอาหาร โดยตัวอย่างที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ ยิ่งเวลาผ่านไปนานจำนวนเชื้อจะยิ่งน้อยลง จนกระทั่งเวลาที่ไม่มีเชื้อเจริญ จะถือว่าเวลานั้นเป็นเวลาสมบูรณ์ที่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อนั้นได้ ในการ

ทดลองนี้ positive control จะใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin โดย Time killing curve จะถูกพล็อตระหว่าง log ของ cfu/ml กับเวลา

หมายเหตุ ในการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ต้องคำนึงถึงเทคนิคปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) ตลอดเวลา Aseptic technique คือ เทคนิคปราศจากเชื้อ เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกปนเปื้อนลงในเชื้อจุลินทรีย์ที่กำลังทดลองอยู่ และป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทดลองอยู่ออกมาปนเปื้อนสิ่งแวดล้อม

การศึกษาความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหย

โดยการเก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ในสถานะแรงที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ได้แก่ ที่อุณหภูมิเย็น (ประมาณ 10 องศาเซลเซียส) ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิร้อน (ประมาณ 45 องศาเซลเซียส) โดยพิจารณาจากลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงและประเมินประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ