บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. ชนิดของแบคทีเรีย ใช้เชื้อดังต่อไปนี้

1.1 *Shigella* spp. สายพันธุ์ที่ใช้อ้างอิง มีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. dysenteriae, S. flexneri* 2a และ *S. sonnei* ได้จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สงขลา จ. สงขลา ส่วน *S. sonnei* ATCC 11000 ได้จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์

1.2 *Shigella* spp. ที่แยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ในช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2541 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2542 โดยที่เชื้อทั้งหมดได้รับการเพาะแยก และวินิจฉัยขั้นต้นโดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และได้รับการวินิจฉัยยืนยันอีกครั้งที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

2. พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่ศึกษามีทั้งหมด 22 วงศ์ 29 ชนิด โดยเก็บจากสวนสมุนไพร ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์, พื้นที่บริเวณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ ซื้อจากร้านขายยาสมุนไพร ในอำเภอหาดใหญ่ จ. สงขลา ได้แก่ ต้นผักโขมจีน, เปลือกต้นทุ้งฟ้า, เปลือกต้นพญาสัตบรรณ, ใบเทียนบ้าน, ใบตีนเป็ดฝรั่ง, ใบคำแสด, เปลือกต้นงิ้ว, แก่นฝาง, ผลสมอดีงู, ใบหนาดใหญ่, ใบหญ้าละออง, ใบคว่ำตายหงายเป็น, เปลือกต้นพะยอม, ต้นน้ำนมราชสีห์, ต้นลูกใต้ใบ, ต้นสังวาลย์พระอินทร์, ใบฝ้ายแดง, เปลือกต้นสะเดาอินเดีย, เปลือกต้นสะเดาบ้าน, ใบมะกล่ำตาช้าง, แก่นแกแล, เปลือกต้นข่อย, ผลแก่พิลังกาสา, ใบหว้า, ดอกตูมกานพลู, เถาวัลย์เปรียง, รากเจตมูลเพลิงแดง, เหง้ากระชาย และ เหง้าไพล (ตารางที่ 2)

6	คำแสด	*Bixa orellana* Linn.	Bixaceae	ใบ
7	งิ้ว	*Bombax ceiba* Linn.	Bombacaceae	เปลือกต้น
8	ฝาง	*Caesalpinia sappan* Linn.	Caesalpiniaceae	แก่น
9	สมอดีงู	*Terminalia citrina* Roxb. ex Flem.	Combretaceae	ผล
10	หนาดใหญ่	*Blumea balsamifera* (Linn.) DC.	Compositae	ใบ
11	หญ้าละออง	*Vernonia cinerea* (Linn.) Less.	Compositae	ใบ
12	คว่ำตายหงายเป็น	*Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers.	Crassulaceae	ใบ
13	พะยอม	*Shorea roxburghii* G. Don	Dipterocarpaceae	เปลือกต้น
14	น้ำนมราชสีห์	*Euphorbia hirta* Linn.	Euphorbiaceae	ทั้งต้น
15	ลูกใต้ใบ	*Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn.	Euphorbiaceae	ทั้งต้น
16	สังวาลย์พระอินทร์	*Cassytha filiformis* Linn.	Lauraceae	ทั้งต้น
17	ฝ้ายแดง	*Gossypium arboreum* Linn.	Malvaceae	ใบ
18	สะเดาอินเดีย	*Azadirachta indica* A. Juss.	Meliaceae	เปลือกต้น
19	สะเดาบ้าน	*Azadirachta indica* A.Juss. var.*siamensis* Valeton	Meliaceae	เปลือกต้น
20	มะกล่ำตาช้าง	*Adenanthera pavonina* Linn.	Mimosaceae	ใบ
21	แกแล	*Maclura cochinchinensis* Corner	Moraceae	แก่น
22	ข่อย	*Streblus asper* Lour.	Moraceae	เปลือกต้น
23	พิลังกาสา	*Ardisia colorata* Roxb.	Myrsinaceae	ผล
24	หว้า	*Eugenia cumini* Druce	Myrtaceae	ใบ
25	กานพลู	*Eugenia caryophyllus* Bullock & Harrison	Myrtaceae	ดอกตูม
26	เถาวัลย์เปรียง	*Derris scandens* (Roxb.) Benth.	Papilionaceae	เถา
27	เจตมูลเพลิงแดง	*Plumbago indica* Linn.	Plumbaginaceae	ราก
28	กระชาย	*Boesenbergia pandurata* Schltr.	Zingiberaceae	เหง้า
29	ไพล	*Zingiber cassumunar* Roxb.	Zingiberaceae	เหง้า

3. วัสดุ

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต
MacConkey agar (MCA)	Difco
Motility Medium	Difco
Mueller Hinton Agar (MHA)	Difco
Mueller Hinton Broth (MHB)	Difco
Nutrient Agar (NA)	Difco
Phenol Red Mannitol Broth	Difco
Salmonella-Shigella (SS) Agar	Difco
Triple Sugar Iron (TSI) Agar	Difco
Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar	Difco
3.2 ยาต้านจุลินทรีย์	บริษัทผู้ผลิต
ampicillin (AM 10 μg /disc)	Difco

gentamicin (GM 10 μg /disc)	Difco
nalidixic acid (NA 30 μg /disc)	Difco
norfloxacin (NOR 10 μg /disc)	Difco
trimethoprim - sulfamethoxazole (TMP-SMZ 25 μg /disc)	Difco

3.3 แผ่นยา ortho-nitrophenyl-beta-galactopyranoside (ONPG) Oxoid

3.4. สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
acetic anhydride	Merck
ammonium hydroxide	Merck
benzene	Merck
chloroform	Merck
cupper sulfate	Merck
dimethylsulfoxide (DMSO)	Merck
ethanol	Merck
ethyl acetate	Merck
ferric chloride	Merck
glacial acetic acid	J.T.Baker
hydrochloric acid	Riedel
n-hexane	Merck
methanol	Merck
petroleum ether	J.T.Baker
silica gel No.Art. 7734 Kieselgel 60	Merck
sodium carbonate	Merck
sodium chloride	BDH
sodium hydroxide	J.T.Baker
sulfuric acid	J.T.Baker
TLC Silica gel 60 GF_{254}	Merck

สีย้อมกรัมประกอบด้วย crystal violet, gram iodine, 95 % alcohol และ safranin

4. เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1 กระดาษ กรอง, Whatman No. 4

4.2 กระดาษกรอง ขนาดรู 0.45 μm, Sartorius

4.3 กระดาษลิตมัส, Whatman

4.4 กระบอกฉีดยา

4.5 กล้องจุลทรรศน์, Olympus

4.6 โกร่ง

4.7 เครื่องแก้วสำหรับทดลองทางจุลชีววิทยา

4.8 เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer), Scientific Industries

4.9 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง, Avery Berkel

4.10 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง, Sartorius

4.11 เครื่องบดสมุนไพร

4.12 เครื่องเป่าลมร้อน, National

4.13 เครื่องระเหยแห้งแบบแช่แข็ง (Freez-dryer), FTS system, Inc.

4.14 เครื่องระเหยแห้งแบบหมุนพร้อมลดความดัน, Eyela, Rikakikai Co.,Ltd.

4.15 ชุดกรองเชื้อ, Millipore Cooperation, U.S.A.

4.16 เดสซิเคเตอร์

4.17 ตู้แช่แข็ง, Sanyo

4.18 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator), Heraeus

4.19 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow), Issco International Scientific Co., Ltd.

4.20 ตู้เย็น, Sanyo

4.21 ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven), บริษัทธเนศพัฒนาจำกัด

4.22 เตาแม่เหล็ก (Stirring hot plate), Thermolyne Cooperation

4.23 ถ้วยกระเบื้องสีขาว

4.24 ปากคีบปลายแหลม

4.25 ผ้าขาวบาง

4.26 แผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm, Schleicher & Schuell

4.27 ไมโครปิเปต ขนาด 1-10 μl, 10-100 μl และ 100-1000 μl, Eppendorf

4.28 ไม้พาย

4.29 สำลี

4.30 หม้อเคลือบ

4.31 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave), Tomy Seico Co., Ltd.

4.32 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath), Eyela Rikakikai Co., Ltd.

4.33 Multipoints inoculator

4.34 Pipette tip ขนาด 1-10 μl, 10-100 μl และ 100-1000 μl, Euro Lab

4.35 Glass separator

4.36 TLC tank

4.37 U.V. carbinet

4.38 Vernier caliper

วิธีการทดลอง

1. การจำแนกเชื้อ *Shigella* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

นำเชื้อ *Shigella* spp. ที่แยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วยที่มารักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ในช่วงเดือน มีนาคม พ.ศ. 2541 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2542 ซึ่งเชื้อทั้งหมดได้รับการเพาะแยก และ วินิจฉัยขั้นต้นโดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient agar นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ^{O}C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ streak ลงบนอาหาร MacConkey agar (MCA), Salmonella-shigella agar (SS) และ Xylose lysine deoxycholate agar (XLD) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ^{O}C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีบนอาหาร MCA และ SS ที่มีลักษณะใสไม่มีสี (nonferment lactose) และโคโลนีสีแดงหรือชมพูอ่อนบนอาหาร XLD นำไปเพาะเลี้ยงต่อ ในอาหาร Triple sugar iron (TSI) agar และ Motility medium บ่มที่อุณหภูมิ 35 ^{O}C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่ให้ผล TSI ดังนี้ alkaline slant /acid butt ไม่สร้าง

gas และ ไม่สร้าง H_2S และ ไม่เคลื่อนที่ ใน Motility medium นำไปทดสอบเพื่อแยก species โดยใช้ปฏิกิริยาชีวเคมี โดยทดสอบการ ferment น้ำตาล Mannitol และ ONPG (Otho-nitrophenyl-beta-d-galactopyranoside) โดยวิธีของ Oxoid

ส่วนการตรวจสอบทาง serology โดยการตรวจหา serogroup ทำโดยเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนสไลด์ ที่มีหยดน้ำเกลือหยดอยู่ ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ loop ป้ายวนไปวนมาประมาณ 30 วินาที เพื่อผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ถ้าส่วนผสมระหว่างเชื้อกับน้ำเกลือเข้ากันดีมีความขุ่นและไหลไปพร้อมกันแล้ว จึงค่อย ๆ หยด antiserum ลงไป 1 loop เต็ม ผสมให้เข้ากันดีโดยใช้ loop และสังเกตการเกิดการจับกันเป็นก้อน หรือเกิด agglutination ภายในเวลา 30-60 วินาที (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการทดสอบแต่นำผลจากที่ได้รับการยืนยันจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มาเป็นข้อมูลแทน

2. การทดสอบความไว ของ *Shigella* ต่อยาต้านจุลินทรีย์ โดยวิธี disc diffusion

ทดสอบตามวิธีมาตรฐานของ NCCLS (1993)

2.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Shigella* spp. บนอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) ที่อุณหภูมิ 35 ^{O}C เป็น เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop แตะเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว จำนวน 3-5 โคโลนี นำมาใส่ในหลอดทดลองซึ่งมีอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) ปริมาตร 4 ml นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35 ^{O}C เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อที่กำลังเจริญในระยะ log phase จากนั้นปรับปริมาณเชื้อด้วย 0.85 % NaCl ไร้เชื้อ ให้ได้เชื้อ เท่ากับ 1.5 X 10^{8} CFU/ml โดยเทียบความขุ่นกับ McFarland standard No. 0.5

2.2 วิธีการทดสอบ

ใช้ไม้พันสำลีไร้เชื้อ จุ่มเชื้อ *Shigella* spp. จาก ข้อ 2.1 มาพอหมาด ๆ แล้ว streak ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA โดย streak ในแนว 3 ระนาบ โดยหมุนจานเพาะเชื้อในแนว 60 องศา เพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอกัน วางทิ้งไว้ 3- 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง หลังจากนั้นใช้ forcep ลนไฟปล่อยให้เย็น คีบแผ่นยามาตรฐาน ได้แก่ ampicillin, gentamicin,

nalidixic acid, norfloxacin และ TMP-SMZ วางบนผิวหน้าอาหาร MHA โดยแต่ละแผ่นวางห่างกัน ประมาณ 15-20 mm และห่างจากขอบจานอาหารเพาะเชื้อ ประมาณ 15 mm นำจานเพาะเชื้อ ที่วางแผ่นยาแล้วไปบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ^{O}C ประมาณ 16-18 ชั่วโมง

2.3 การอ่านผล

สังเกตวงใสรอบแผ่นยา (clear zone) และ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส ด้วย Vernier caliper นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐาน (Lorian, 1996) ซึ่งจะแสดงผลออกมา 3 ลักษณะ

Susceptible (S)	เชื้อมีความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์
Intermediate (I)	เชื้อมีความไวปานกลางต่อยาที่ทดสอบ
Resistant (R)	เชื้อดื้อยาที่ใช้ทดสอบ

3. การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

นำพืชสมุนไพรที่เก็บได้คัดส่วนที่ใช้แล้วนำมาล้าง ซั่ง สับเป็นชิ้น เล็ก ๆ อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 ^{O}C จนแห้ง บดให้ละเอียดและชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำผงแห้งมาแบ่งเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 นำมาสกัดด้วย alcohol โดยการแช่เป็นเวลา 7 วัน แล้วกรองเอาส่วนสกัดไประเหยให้แห้ง ภายใต้ความดัน นำกากมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ระเหยแห้งแล้วรวบรวมสารสกัดแห้งทั้งหมดมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นเก็บสารสกัดแห้งที่อุณหภูมิ -29 ^{O}C

ส่วนที่ 2 นำมาต้มกับน้ำกลั่น ในหม้อเคลือบจนเดือด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองสารละลายผ่านผ้าขาวบาง สำลี และกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 4 ตามลำดับ นำสารละลายใสที่ได้มาเคี่ยวโดยใช้ไฟอ่อน ๆ ด้วยอุณหภูมิประมาณ 50 ^{O}C จนกระทั่งได้สารสกัดเข้มข้น นำสารสกัดที่ได้นี้มาทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบแช่แข็ง เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -29 ^{O}C

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Shigella* spp. ของสารสกัดพืชสมุนไพร โดยวิธี disc diffusion

ดัดแปลงจาก วิธี ของ NCCLS (1993)

4.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

ทำการเตรียมเชื้อเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.1

4.2 วิธีการเตรียมสารสกัดเพื่อใช้ทดสอบ

ละลายสารสกัดที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้น 100 mg/ml โดยที่ในสารสกัดด้วย alcohol จะละลายด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำ จะละลายด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองไร้เชื้อ ขนาดรู 0.45 μm หลังจากนั้น ดูดสารสกัดมา 10 μl หยดลงบนแผ่น disc ไร้เชื้อ ที่วางบนแผ่นตะแกรงดังนี้

แผ่นเปียก หลังหยดสารสกัดแล้วนำไปทดสอบทันที

แผ่นแห้ง หลังหยดสารสกัดแล้วนำไปผึ่งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 40 ^{O}C จนแผ่น disc แห้งจึงนำไปทดสอบ

แผ่นชุดควบคุม ใช้ตัวทำละลาย คือ DMSO และน้ำกลั่นไร้เชื้อ แทนสารสกัด

4.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Shigella* spp.

ใช้ไม้พันสำลีไร้เชื้อ จุ่มเชื้อ *Shigella* จากข้อ 4.1 มาพอหมาด ๆ แล้ว streak ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA โดย streak เป็น แนว 3 ระนาบ โดยหมุนจานเพาะเชื้อ ในแนว 60 องศา วางทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ใช้ forcep ลนไฟทิ้งให้เย็น คีบแผ่น disc ที่ชุบสารสกัด และ แผ่น disc ที่เป็นชุดควบคุม วางบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35 ^{O}C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการทดสอบสารสกัดละ 2 ซ้ำ

4.4 การอ่านผล

สังเกตการเกิดวงใส และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วย Vernier caliper

5. การทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อ *Shigella* spp. โดยวิธี agar dilution

โดยทดสอบตามวิธีของ NCCLS (1993) โดยประยุกต์ใช้ multipoints inoculator ขนาด 0.001-0.003 ml/spot ในการหยดเชื้อ

5.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อ *Shigella* บนอาหาร MHA ที่ อุณหภูมิ 35 ^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยเชื้อมา 4-5 โคโลนี ใส่ในอาหาร MHB ปริมาตร 4 ml นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 35 ^{O}C เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วย 0.85 % NaCl ไร้เชื้อ ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 จากนั้นเจือจางต่อด้วยอัตราส่วน 1 : 20 ด้วย 0.85 % NaCl ไร้เชื้อ เพื่อให้มี ปริมาณเชื้อ เท่ากับ 5 X 10^{6} CFU/ml

5.2 วิธีการเตรียมสารสกัด

เตรียม stock solution ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย alcohol โดยละลายด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้น 400 mg/ml ส่วนสารที่สกัดด้วยน้ำ เตรียม stock solution ให้มีความเข้มข้น 40 mg/ml ด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ จากนั้น เจือจาง stock solution แบบลำดับสอง (Serial 2-fold dilution) ในน้ำกลั่นไร้เชื้อให้ได้ 7 ความเข้มข้น โดยที่ในสารสกัดหยาบด้วย alcohol จะมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 400-6.25 mg/ml ส่วนสารสกัดหยาบด้วยน้ำ จะมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 40-0.625 mg/ml

เตรียม stock solution ของสารที่แยกเป็น fraction โดยละลายด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้น 100 mg/ml จากนั้นเจือจางสารสกัดแบบลำดับสอง (Serial 2-fold dilution) ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ ให้ได้ 7 ความเข้มข้น ซึ่งอยู่ระหว่าง 100-1.56 mg/ml

5.3 วิธีการทดสอบ

ดูดสารสกัดหยาบด้วย alcohol และ สารจาก fraction ความเข้มข้นละ 200 μl ผสมให้เข้ากับอาหาร MHA หลอมเหลว 19.8 ml ส่วนสารสกัดหยาบด้วยน้ำ ดูดมาความเข้มข้นละ 2 ml ผสมให้เข้ากับอาหาร MHA หลอมเหลว 18 ml เทอาหารที่ได้ลงในจานเพาะเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm จานละ 20 ml ดังนั้นความเข้มข้นที่ทดสอบของสารสกัดหยาบด้วย alcohol และ น้ำอยู่ในช่วง 4.0-0.0625 mg/ml ส่วนสารที่แยกเป็น fraction อยู่ในช่วง 1.0-0.0156 mg/ml ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัวทำความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ จากนั้นดูดเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1 มา 300 μl ใส่ในหลุมของ multipoints inoculator จากนั้นใช้ multipoints inoculator แตะเชื้อขึ้นมานำไปแตะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นชุดควบคุมและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดผสมอยู่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยที่ชุดควบคุมจะใช้ตัวทำละลาย คือ DMSO และน้ำกลั่นไร้เชื้อแทนสารสกัด โดยที่ความเข้มข้นของ เชื้อที่ทดสอบประมาณ $1x10^{4}$ CFU/spot บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.4 การอ่านผล

สังเกตและบันทึกระดับความเข้มข้นต่ำสุด ของสารสกัดที่ไม่มีเชื้อขึ้นเลย หรือมีจำนวนน้อยมากประมาณ 1-3 โคโลนี หรือขึ้นแบบจาง ๆ เห็นไม่ชัดเป็นค่า MIC

6. การแยก fraction ของสารสกัดหยาบโดยวิธี Quick column chromatography

นำสารสกัดหยาบที่ให้ค่า MIC ต่ำสุด ต่อเชื้อ *Shigella* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ มาทำการแยกสารสกัดออกเป็นส่วน ๆ โดยวิธี Quick column chromatography โดยใช้ Silica gel 60 (No. 7734) particle size 0.040-0.063 mm เป็น stationary phase ส่วน mobile phase จะเริ่มใช้ตัวทำละลาย ที่มีความมีขั้วต่ำก่อน และเพิ่มความมีขั้วขึ้นไป ตามลำดับดังนี้ n-hexane, n-hexane-ethyl acetate, ethyl acetate, ethyl acetate-methanol, methanol, methanol-น้ำกลั่น จากนั้นนำแต่ละ fraction ไป spot ลงบนแผ่น Thin layer chromatography รวม fraction ที่ให้ผลโครมาโทแกรมเหมือนกัน นำมาระเหยให้แห้ง เก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 ^{O}C

7. การทดสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช (Phytochemical Screening Test) โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี

(ดัดแปลงตามวิธีของวีณา จิรัจฉริยากูล, 2534 และ สงขลานครินทร์, มหาวิทยาลัย, คณะเภสัชศาสตร์, 2542)

7.1 Screening for alkaloids

นำส่วนสกัดมา 25 ml ระเหยให้แห้ง นำสารสกัดที่ได้มาละลายใน 5% hydrochloric acid 20 ml กรองเอาสารละลายมาแบ่งเป็น 5 หลอดแล้วทดสอบดังนี้

หลอดที่ 1 ใช้เป็นชุดควบคุม

หลอดที่ 2 เติม Wagner's reagent ผล positive จะได้ตะกอนสีน้ำตาล

หลอดที่ 3 เติม Marme's reagent ผล positive จะได้ตะกอนสีขาว

หลอดที่ 4 เติม Mayer's reagent ผล positive จะได้ตะกอนสีขาว-ครีม

หลอดที่ 3 เติม Dragendorff's reagent ผล positive จะได้ตะกอนสีส้ม

7.2 Screening for flavonoids (Shinoda test)

7.2.1 นำส่วนสกัดมา 20 ml ระเหยให้แห้งบน water bath จากนั้นทำให้เย็น ทำการล้างไขมัน และ สี ของส่วนสกัด โดยละลายสารสกัดด้วย petroleum ether หลาย ๆ ครั้ง รินออก จนกระทั่ง petroleum ether ไม่มีสี (รวมสารละลายในชั้น petroleum ether ระเหยแห้งเก็บไว้ตรวจสอบ sterols และ triterpenes)

7.2.2 สกัดกากจากข้อ 7.2.1 ที่ล้างไขมันและสีออกไปแล้ว ด้วย 50 % ethanol 10 ml กรอง แบ่งเป็น 2 ส่วนเป็นชุดควบคุม 1 ส่วน ชุดทดสอบ 1 ส่วน ทดสอบสารกลุ่ม

flavonoids โดยการนำส่วนสกัด มาเติม magnesium ribbon ชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 2-3 ชิ้น ขนาดยาว 2-3 mm แล้วหยด hydrochloric acid เข้มข้นลงไป 3-4 หยด ดูสีที่เกิดขึ้นภายใน 1-2 นาที ผล positive จะให้สีแดง ส้ม เลือดหมู-ม่วง เขียว หรือ น้ำเงิน

7.3 Screening for anthraquinones (Borntrager's test)

7.3.1 นำส่วนสกัดมา 20 ml ระเหยให้แห้ง เติม 10% sulfuric acid 10ml ต้มให้เดือด เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายออกมาทิ้งไว้ให้เย็น

7.3.2 นำสารละลายที่ได้มาสกัดกับ benzene 5 ml โดยเขย่าเบาๆ แยกชั้น benzene ออกมา

7.3.3 นำสารละลายในชั้น benzene มาเติม 10% sodium hydroxide 1 ml เขย่าแล้วปล่อยให้แยกชั้น สังเกตสีที่เกิดขึ้นในชั้นด่าง ผล positive ในชั้นด่างจะมีสีชมพูถึงแดง

7.4 Screening for sterols และ triterpenes

7.4.1 ใช้สารสกัดในชั้น petroleum ether ในข้อ 7.2.1 มาละลายใน chloroform 15 ml แบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยใช้เป็นชุดควบคุม 1 ส่วน

7.4.2 Liebermann-Burchard test

นำส่วนที่ 1 มาระเหยแห้งเติม acetic anhydride 3 หยดในถ้วยกระเบื้อง คนให้ละลายเข้ากัน เติม sulfuric acid เข้มข้นจำนวน 3 หยด สังเกตสีทันที (เทียบกับสีเดิม) ถ้ามีกลุ่มสาร ที่มีสูตรโครงสร้างเป็น sterols จะให้สีน้ำเงินถึงสีเขียว แต่ถ้ามีกลุ่มสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น triterpenes จะให้สีแดงชมพูถึงสีม่วงแดง

7.5 Screening for saponin glycosides

นำส่วนสกัดมา 30 ml ระเหยให้แห้ง เติมน้ำร้อน 20 ml คนให้เข้ากัน อุ่นบน water bath 1-2 นาที กรองนำสารละลายมาทดสอบ

7.5.1 การทดสอบการเกิดฟอง (Froth test)

นำส่วนสกัด 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำ 5 ml ปิดจุกหลอด แล้วเขย่าโดยแรงเป็นเวลาประมาณ 30 วินาที สังเกตลักษณะของฟองที่เกิดขึ้นและเวลาที่ฟองยังคงอยู่ ถ้ามี saponin glycosides จะเกิดฟองที่คงตัวอยู่นานกว่า 30 นาที และฟองมีลักษณะคล้ายรังผึ้ง

7.5.2 Liebermann-Burchard test

นำส่วนสกัดมา 3 ml ใส่ในถ้วยกระเบื้อง ระเหยบนอ่างน้ำร้อนให้แห้ง ทำให้เย็น เติม petroleum ether เพื่อละลายสีที่ติดมาออก แล้วเอาคราบที่เหลือ (residue) มาละลายใน chloroform นำมากรองแบ่งเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 เป็นชุดควบคุม

ส่วนที่ 2 เติม acetic anhydride 3 หยด ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม sulfuric acid เข้มข้น 3 หยดสังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้ามีอะไกลโคนที่มีสูตรโครงสร้างเป็น steroid saponin จะให้สีน้ำเงินถึงสีเขียวถ้า aglycone เป็น triterpenoid saponin จะให้สีแดง ชมพูถึงสีม่วงแดง

7.6 Screening for cardiac glycosides

ประกอบด้วย 3 การทดสอบ เพื่อตรวจหา unsaturated lactone ring, steroidal nucleus และ deoxy sugar

7.6.1 การตรวจสอบ unsaturated lactone ring ทดสอบโดยใช้ Kedde 's reagent โดยแบ่งส่วนสกัดมา 2-3 หยด ใส่ในถ้วยกระเบื้อง เติม Kedde 's reagent 1-2 หยด ผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลาย 5 % ของ potassium hydroxide ใน alcohol 1-2 หยด ผล positive จะเกิดสีม่วงแดง ทันที เมื่อทิ้งไว้สักครู่ สีจะซีดหายไป และ ทดสอบ โดยใช้ Raymond 's reagent โดยแบ่งส่วนสกัดมา 2-3 หยด ใส่ในถ้วยกระเบื้อง เติม Raymond 's reagent 1-2 หยด และเติมสารละลาย 5 % ของ potassium hydroxide ใน alcohol 1-2 หยด ผล positive จะเกิดสีม่วงน้ำเงิน ทันที เมื่อทิ้งไว้สักครู่ สีจะซีดหายไป

7.6.2 การตรวจสอบ steroidal nucleus โดยการทำ Liebermann-Burchard test ทดสอบโดยการแบ่งส่วนสกัดมา 3 ml ระเหยให้แห้ง ทำการทดสอบเหมือนการทดสอบสารกลุ่ม saponin สังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้ามี aglycone ซึ่งมีสูตรโครงสร้างเป็น steroid จะให้สีน้ำเงินถึงสีเขียว

7.6.3 การตรวจสอบ deoxy sugar โดยการทำ Keller-Kiliani test โดยการแบ่งส่วนสกัดที่ต้องการทดสอบมา 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติม glacial acetic acid เข้มข้น 1 ml และสารละลาย 10 % ferric chloride 1-2 หยด ผสมให้เข้ากัน เอียงหลอดทดลอง ค่อย ๆ ริน sulfuric acid เข้มข้นปริมาตร 1 ml ลงไปตามผนังด้านในของหลอดทดลอง ให้เกิดการแยกชั้น สังเกตสีตรงรอยต่อ ผล positive ตรงรอยต่อของสารละลายจะได้วงแหวนสีน้ำตาลแดง

7.7 Screening for tannins และ phenolic compounds

นำส่วนสกัด 100 ml มาระเหยให้แห้ง เติมน้ำกลั่นร้อน 25 ml ลงไปละลายทิ้งให้เย็น กรอง จากนั้นนำส่วนสารละลายมาเติม 10 % sodium chloride 3-4 หยด ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นให้กรองออก (เป็น non-tannin components) แบ่งสารละลายเป็น 4 หลอด

หลอดที่ 1 เป็นชุดควบคุม

หลอดที่ 2 เติม 1 % gelatin solution สังเกตการเกิดตะกอน ผล positive จะได้ตะกอนสีขาวขุ่น

หลอดที่ 3 เติม 1% ferric chloride 2-3 หยด สังเกตสีที่ได้ ผล positive จะได้สีเขียวดำ หรือ น้ำเงินดำ

หลอดที่ 4 เติมน้ำยาอิ่มตัวของ bromine ในน้ำ 2-3 หยด สังเกตการเกิดตะกอน ผล positive จะได้ตะกอนเบามีสีขาวอมเหลือง

การประเมินผล

1. ถ้าไม่เกิดสีกับ 1% ferric chloride แสดงว่าไม่มี tannins และ phenolic compounds

2. ถ้าได้สีเขียวดำ เมื่อเติม 1% ferric chloride และ ให้ตะกอนตะกอนเบามีสีขาวอมเหลืองกับน้ำยาอิ่มตัวของ bromine ในน้ำ แสดง ว่ามี tannins ชนิด catechol

3. ถ้าได้สีน้ำเงินดำ เมื่อเติม 1 % ferric chloride และไม่ให้ตะกอนกับ น้ำยาอิ่มตัวของ bromine ในน้ำ แสดงว่ามี tannins ชนิด pyrogallol

4. ถ้าไม่เกิดตะกอนกับ 1% gelatin solution แต่เกิดสีกับ 1% ferric chloride แสดงว่าไม่มี tannins แต่มี phenolic compounds

7.8 Screening for lactone glycosides (coumarin glycosides)

7.8.1 นำสารสกัดมาประมาณ 0.5 g ใส่หลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นเล็กน้อยเพื่อให้ชื้น

7.8.2 ปิดหลอดทดลองด้วยจุกคอร์ก ซึ่งมีที่แขวนกระดาษกรองชุบสารละลาย 10% sodium hydroxide ไว้พอหมาด ๆ แขวนอยู่

7.8.3 นำหลอดทดลองมาแช่ในอ่างน้ำเดือด ประมาณ 15 นาที

7.8.4 เปิดจุกคอร์ก นำแถบกระดาษกรองที่แขวนไว้มาวางบนกระจกนาฬิกา นำไปวางภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 366 nm สังเกตสีบนแถบกระดาษกรองถ้ามี coumarins ชนิดที่ระเหยได้ ผลที่ได้จะเห็นแถบกระดาษกรองเรืองแสงสีเขียวอมเหลือง หรือสีฟ้า (ถ้าเรืองแสงสีฟ้า จะเกิดขึ้นทันทีที่วางในแสงอัลตราไวโอเลต)

7.9 Screening for iridoid glycosides

7.9.1 นำสารสกัดมา 0.5 g ใส่ในหลอดทดลอง เติม 2% sulfuric acid ลงไปให้ท่วม

7.9.2 เขย่า รินสารละลาย มา 1 ml เติม Iridoid's reagent ปริมาตร 1 ml นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 1 นาที ผล positive จะเกิดสีเขียวถึงน้ำเงินหรือมีตะกอนดำเกิดขึ้น