บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

สมุนไพรที่ใช้ในการสกัด

1.) กระชาย (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr.)

2.) กระเทียม (*Allium sativum* Linn)

3.) กล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum* Linn.)

4.) กะเพรา (*Ocimum tenuiflorum* Linn.)

5.) ข่า (*Alpinia galanga* (Linn.) Sw.

6.) ขิง (*Zingiber officnale* Rosc.)

7.) ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* Linn.)

8.) เบญกานี (*Quercus infectoria* Oli)

9.) บัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban)

10.) ฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.)

11.) มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.)

12.) สีเสียดเทศ (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb)

สมุนไพรจากข้อ 1-6, 9 และ 11 ซื้อในรูปสมุนไพรสดจากตลาดสดอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

สมุนไพรจากข้อ 8 และ 12 ซื้อในรูปสมุนไพรแห้งจากร้านไทรบุรีสมุนไพร อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

สมุนไพรจากข้อ 7 และ 10 เก็บตัวอย่างสมุนไพรสดจากอำเภอรือเสาะ จังหวัดนราธิวาส

วัตถุดิบ

- กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จากสุขุมฟาร์ม หมู่ที่ 5 ต. สะกอม อ. จะนะ จ. สงขลา อายุประมาณ 4 เดือน ขนาด 60-70 ตัวต่อกิโลกรัม เก็บตัวอย่างกุ้งโดยการแช่น้ำแข็ง

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

3.1 *Listeria monocytogenes*

3.2 *Salmonella typhi*

3.3 *Staphylococcus aureus*

3.4 *Vibrio parahaemolyticus*

เชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.1-3.3 เป็นเชื้อที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ผลิตผลเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.4 เป็นเชื้อที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อาหารเลี้ยงเชื้อ (รายละเอียดในภาคผนวก ก)

4.1 Nutrient agar (NA) (บริษัท Difco)

4.2 Trypticase Soy Broth (TSB) (บริษัท Difco)

4.3 Baird-Parker' s Medium (BP) (บริษัท Merck)

4.4 Thiosulfate–Citrate–Bile Salts–Sucrose (TCBS) Agar (บริษัท Merck)

สารเคมี

5.1 Ethanol (บริษัท Merck)

5.2 ยาต้านจุลชีพ : Chloramphenical (บริษัท Difco)

5.3 Hydrochloric acid

5.4 Sodium chloride

5.5 Sodium hydroxide

5.6 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB) โดยวิธี Conway (Hasegawa, 1987) ได้แก่

- Bromocresol green
- Methyl red
- Ethanol
- Boric acid
- Potassium carbonate
- Trichloroacitic acid

อุปกรณ์

- แผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร (บริษัท Macherey-Nagel)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 210 s บริษัท Sartorius AG GöTTINGEN
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น HF - 1200 บริษัท A & D Company, Ltd
- เครื่องตีผสม (Stomacher machine) รุ่น 400 บริษัท Seward Ltd
- เครื่องเขย่าหลอดทดลอง รุ่น GFL บริษัท Gesellschaft fur Labortechnik mbH
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น 1297 บริษัท LAB-Line Instruments, Inc
- ตู้อบลมศร้อน (Hot air oven) รุ่น MOV. 212 บริษัท Sanyo Electric Co., Ltd
- ตู้อบ (Universal oven) รุ่น UM 200-800 บริษัท Memmert GmbH CO.KG
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W350 บริษัท Memmert GmbH CO.KG
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS - 325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd
- เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) รุ่น SB-651 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd
- เครื่อง Freeze dryer รุ่น Maxi Dry Lyo บริษัท Heto Ltd
- เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000 บริษัท Technical Cooperation
- เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง รุ่น 420A บริษัท Orion Research, Inc
- เครื่อง Incubator - shaker รุ่น M.3525-1 บริษัท LAB-Line Instruments, Inc
- ตู้ปลอดเชื้อลมเป่า (Laminar air flow) รุ่น 527044 บริษัท Hotpack
- ตู้เก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รุ่น S-616 D
- ห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- ห้องบ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณด่างที่ระเหยได้ (TVB)
- อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์จุลินทรีย์
- อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ความชื้น

วิธีการ

1. การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

1.1 การสกัดด้วยเอธานอล (ดัดแปลงจากนงค์เยาว์ ภู่เจนจบ, 2542 ; Chulasiri *et al*., 1995)

นำส่วนของพืชสมุนไพรมาล้างทำความสะอาด แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบอากาศร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาบดแห้งจนละเอียด และชั่งน้ำหนักแห้ง เก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก นำไปปิดผนึก

นำตัวอย่างสมุนไพรที่บดละเอียดแล้ว 100 กรัม มาทำการสกัดโดยใช้การแช่ใน 95 เปอร์เซ็นต์เอธานอล 1,000 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ และทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบตามเวลาแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองแยกตะกอนออก แล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำแห้งโดยการระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ได้สารสกัดในรูปสารสกัดหยาบ (crude extract) แห้ง ชั่งน้ำหนัก และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็น ซึ่งสามารถคำนวณหาปริมาณร้อยละของสารสกัดหยาบที่สกัดได้ต่อน้ำหนักสมุนไพรอบแห้ง

1.2 การสกัดด้วยน้ำ (ดัดแปลงจาก Gome and Gaylarde, 1998 ; Gnan and Demello, 1999)

นำส่วนของพืชสมุนไพรสดมาล้างทำความสะอาด แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใช้พืชสมุนไพรน้ำหนัก 50 กรัม แล้วนำไปปั่นด้วยน้ำ 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองแยกตะกอนออก สำหรับสมุนไพรที่เป็นส่วนของใบให้นำใบไปอบแห้งด้วยเครื่องอบอากาศร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาบดแห้งจนละเอียดและชั่งน้ำหนักแห้ง ใช้พืชสมุนไพร100 กรัม และนำไปต้มกับน้ำ 1,000มิลลิลิตร อุณหภูมิประมาณ 70-80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองแยกตะกอนออก

นำสารละลายที่ได้ไปทำแห้งโดยการ Freeze drying จะได้สารสกัดในรูปสารสกัดหยาบ (crude extract) แห้ง ชั่งน้ำหนักและเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นซึ่งสามารถคำนวณหาร้อยละของสารสกัดหยาบที่สกัดได้ต่อน้ำหนักสมุนไพรสด และต่อน้ำหนักสมุนไพรอบแห้งสำหรับส่วนที่เป็นใบ

สำหรับการหาความชื้นของสารสกัดพืชสมุนไพรทั้งที่สกัดโดยเอธานอลและน้ำ ใช้วิธีนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักแห้ง (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 1999)

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดโดยวิธี Disc Diffusion Method (ดัดแปลงจาก Lorian, 1980)

2.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลือกเขี่ยเชื้อมา 2-3 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และนำมาเตรียมให้มีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^5 CFU/ml

2.2 การเตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

ทำการละลายสารสกัดหยาบ โดยสารสกัดเอธานอลละลายด้วยเอธานอล และสารสกัดน้ำละลายด้วยน้ำ จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำสารสกัดที่เตรียมไว้ไปหยดลงบนแผ่น disc 30 ไมโครลิตร ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น disc ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

หมายเหตุ
- ใช้ Aseptic technique ทุกขั้นตอนของการทำการทดลอง
- Negative control : ใช้ antibiotic disc ชุบด้วยตัวทำละลาย (เอธานอล/ น้ำ)
- Positive control : ใช้ antibiotic disc ชุบด้วยยาต้านจุลชีพ (Chloramphenical)

2.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ผสมอาหาร TSA ที่มีอุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส กับเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตรและเขย่าผสมให้เข้ากันดีในจานเพาะเชื้อ ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็ง ใช้ปากคีบคีบ sterile antibiotic disc ขนาด 9 มิลลิเมตร ที่มีสารสกัดพืชสมุนไพรอยู่ 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น วางลงบนจานอาหารวุ้น โดยให้มีระยะห่างระหว่าง disc ไม่น้อยกว่า 22 มิลลิเมตร และห่างจากขอบของจานอาหารวุ้นไม่น้อยกว่า 14 มิลลิเมตร และปิดฝาจานอาหารวุ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

3. การหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) โดยวิธี Agar dilution (ดัดแปลงวิธีจาก Lorian, 1980)

3.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบซึ่งได้แก่ *Listeria monocytogenes, Salmonella typhi, Staphylococcus aureus* และ *Vibrio parahaemolyticus* ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1

3.2 วิธีการเตรียมสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ละลายสารสกัดในตัวทำละลายให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารสกัดแบบลำดับสอง (serial 2-fold dilution) ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ ให้ได้สารสกัดชนิดละ 8 ความเข้มข้น (100-0.781 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

3.3 วิธีการทดสอบเพื่อหาค่า MIC

ผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรกับอาหาร TSA ที่หลอมเหลว ปริมาตร 18 มิลลิลิตร เทอาหารที่ได้ลงในจานเพาะเชื้อ ทำให้ได้สารสกัดสมุนไพรมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10-0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง หยดเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 เชื้อละ 10 ไมโครลิตร ลงบนวุ้นอาหาร โดยหยดให้ได้ประมาณ 5 หยด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ชุดควบคุม จะใช้ตัวทำละลายแทนสารสกัด การอ่านผลคือบันทึกระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดพืชสมุนไพรที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MIC (ดัดแปลงจาก Lorian, 1980)

4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพร

4.1 ผลปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นต่อการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัด (ดัดแปลงวิธีจาก Stonsaovapak *et al*., 2000 ; Sağdiç, 2003)

ผลของความเข้มข้นของสารสกัดต่อการยับยั้งแบคทีเรีย จะใช้วิธี broth dilution method (Sağdiç, 2003) โดยการนำ TSB (9 มิลลิลิตร) ที่ปราศจากเชื้อแล้ว และเติมสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ลงไปใน TSB ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นเป็น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่จะใช้ทดสอบที่ความเข้มข้น 10^3, 10^5 และ 10^7 CFU/ml ลงไป 1 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และศึกษาการอยู่รอดของจุลินทรีย์ โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36 และ 48 ชุดควบคุมมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกัน แต่เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไปแทน

การหาปริมาณแบคทีเรียทำได้โดยการนับจำนวนโคโลนี โดยใช้วิธี serial dilution method ใน TSA TCBS และ BP

4.2 ผลของพีเอชต่อการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัด (ดัดแปลงวิธีจาก Stonsaovapak *et al*., 2000 ; Sağdiç, 2003)

ผลของพีเอชต่อการยับยั้งแบคทีเรีย จะใช้วิธี broth dilution method โดยการนำ TSB (9 มิลลิลิตร) ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับพีเอชให้ได้ 4.5, 6.5, 7.5 และ 8.5 ด้วย NaOH หรือ HCl ความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร และเติมสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ลงไปปริมาณ 1 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นเป็น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่จะใช้ทดสอบที่ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml ลงไป 1 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และศึกษาการอยู่รอดของจุลินทรีย์โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36 และ 48 ทำการทดลองชุดควบคุมโดยมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกัน แต่ใช้สารสกัดสมุนไพรที่ไม่มีการปรับพีเอช

การหาปริมาณแบคทีเรียทำได้โดยการนับจำนวนโคโลนี โดยใช้วิธี serial dilution method ใน TSA TCBS และ BP

4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัด (ดัดแปลงวิธีจาก Stonsaovapak *et al*., 2000 ; Sağdiç, 2003)

ผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งแบคทีเรีย จะใช้วิธี broth dilution method โดยการนำ TSB (9 มิลลิลิตร) ที่ปราศจากเชื้อแล้ว และเติมสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 80, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ลงไปปริมาณ 1 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นเป็น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่จะใช้ทดสอบที่ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml ลงไป 1 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และศึกษาการอยู่รอดของจุลินทรีย์โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36 และ 48 ทำการทดลองชุดควบคุมโดยมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกัน แต่ใช้สารสกัดสมุนไพรที่ไม่มีการนำไปให้ความร้อน

การหาปริมาณแบคทีเรียทำได้โดยการนับจำนวนโคโลนี โดยใช้วิธี serial dilution method ใน TSA TCBS และ BP

5. การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดในกุ้งกุลาดำแช่เย็น (ดัดแปลงวิธีจาก Hao *et al*., 1998 ; Careaga *et al*., 2002)

5.1 การเตรียมตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

นำกุ้งแต่ละตัวมาเด็ดหัวออก และล้างทำความสะอาด ตั้งทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ ในระหว่างการทดลองเก็บตัวอย่างกุ้งในน้ำแข็ง

5.2 การเตรียมสารสกัดเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัด

คัดเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้แบบกว้าง ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดด้วยเอธานอลของเบญกานี นำสารสกัดมาเตรียมให้มีความเข้มข้น 5 เท่า ของค่า MIC ของสารสกัดนั้นๆ โดยละลายสารสกัดด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอธานอลในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรสารสกัดที่จะเตรียม เมื่อสารสกัดละลายจนหมดแล้วเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ

5.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดในกุ้งกุลาดำ

นำตัวอย่างกุ้งกุลาดำไปจุ่มเชื้อแบคทีเรียที่จะใช้ทดสอบซึ่งได้แก่ *S. aureus* หรือ *V. parahaemolyticus* โดยปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีความเข้มข้น 10^5 CFU/ml/ กรัมตัวอย่างกุ้ง เป็นเวลา 15 นาที ใช้แท่งแก้วที่ปลอดเชื้อคนเป็นระยะๆ ยกขึ้นมาตั้งทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำในตู้ปลอดเชื้อลมเป่าเป็นเวลา 15 นาที หรือจนกว่าจะสะเด็ดน้ำออกได้มากที่สุด จากนั้นนำตัวอย่างไปแช่ในสารสกัดที่เตรียมไว้ข้างต้นเป็นเวลาประมาณ 15 นาที โดยให้สารสกัดพืชสมุนไพรมีความเข้มข้น 5 เท่าของค่า MIC/10 กรัมกุ้ง ใช้แท่งแก้วที่ปลอดเชื้อคนเป็นระยะๆ ยกขึ้นมาตั้งทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำในตู้ปลอดเชื้อลมเป่าเป็นเวลา 15 นาที หรือจนกว่าจะสะเด็ดน้ำออกได้มากที่สุด แล้วนำตัวอย่างใส่ในถุง Polyethylene และปิดให้สนิท นำถุงที่บรรจุตัวอย่างกุ้งกุลาดำทั้งหมดไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนับจำนวนจุลินทรีย์หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน สำหรับชุดควบคุมมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกัน แต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด

การหาปริมาณแบคทีเรียทำได้โดยการนับจำนวนโคโลนี โดยใช้วิธี serial dilution method ใน TSA TCBS และ BP