2. วิธีการวิจัย

วัสดุ

1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ศึกษา ได้แก่

1.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่

1.1.1 Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) 5 สายพันธุ์

(1) STEC RIMD 05091078 O157: H7

(2) STEC RIMD 05091083 O157: H7

(3) STEC RIMD 05091055 O26: H11

(4) STEC RIMD 05091056 O111: NM

(5) STEC RIMD 05091556 O22

เชื้อหมายเลขตั้งแต่ (1) ถึง (4) เป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นในการระบาดเมื่อปี ค.ศ. 1997 เชื้อหมายเลข (5) เป็นเชื้อที่แยกได้จากวัว โดยเชื้อทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จาก Research Institute of Microbial Diseases, Osaka University, Japan **(ตารางที่ 1)**

ตารางที่ 1 สายพันธุ์ enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7

สายพันธุ์แบคทีเรีย	serotype	verocytotoxin	origin	other features*
RIMD 05091055	O26: H11	VT 1	human	espP, hlyA, eaeA
RIMD 05091056	O111: NM	VT 1	human	espP, hlyA, eaeA
RIMD 05091078	O157: H7	VT 1 and VT 2	human	No examined
RIMD 05091083	O157: H7	VT 2	human	No examined
RIMD 05091556	O22	VT 2	bovine	(eaeA-)

*identified by PCR amplification

1.1.2 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

1.1.3 *Salmonella london* DMST 7110

1.1.4 *Shigella boydii* DMST 7124

1.2 เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. ยาต้านจุลินทรีย์

2.1 แผ่นยาปฏิชีวนะ

2.1.1 amikacin 30 μg (Difco)

2.1.2 ampicillin 10 μg (BBL)

2.1.3 chloramphenicol 30 μg (BBL)

2.1.4 gentamicin 10 μg (BBL)

2.1.5 kanamycin 30 μg (BBL)

2.1.6 norfloxacin 10 μg (BBL)

2.1.7 tetracycline 30 μg (BBL)

3. สารสกัดสมุนไพรจากเปลือกผลทับทิม โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ chloroform, ethanol และน้ำ

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 Mueller-Hinton agar (MHA) (Difco)

4.2 Mueller-Hinton broth (MHB) (Difco)

4.3 nutrient agar (NA) (Difco)

4.4 tryptic soy broth (TSB) (Difco)

5. สารเคมี

5.1 acetic anhydride

5.2 ammonium sulfate (Sigma)

5.3 bromine

5.4 chloroform (Lab Scan)

5.5 dimethylsulfoxide (Sigma)

5.6 ethanol (Lab Scan)

5.7 ethyl acetate (Lab Scan)

5.8 ferric chloride

5.9 gelatin solution

5.10 hydrochloric acid

5.11 *n*-butanol

5.12 *n*-hexane

5.13 petroleum ether

5.14 phosphate buffer

5.15 sodium chloride (Sigma)

5.16 sulfuric acid (Sigma)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. autoclave
2. beaker
3. cotton swab
4. desiccator
5. duran bottle
6. eppendorf tube
7. filter paper disc ขนาด 6 mm (Schleicher & Schuell)
8. filter paper Whatman No. 4
9. flask
10. forceps
11. freeze-dryer
12. hot air oven
13. hot plate
14. incubator

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

15. laminar air flow carbinet
16. light microscope
17. loop
18. magnesium ribbon
19. micropipette ขนาด 1-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl
20. micropipette tip
21. microtiter plate flat bottom 96 wells
22. microtiter plate U bottom 96 wells
23. microtiter plate V bottom 96 wells
24. millipore filter membrane ขนาด 0.45 µm
25. petri dish ขนาด 6 cm, 9 cm
26. refrigerator
27. rotary evaporator
28. separatory funnel
29. syringe
30. test tube
31. U.V. carbinet
32. vernier caliper
33. vial
34. vortex mixer
35. water bath

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การสกัดสารสกัดหยาบ (crude extract) จากสมุนไพรทับทิม

นำเปลือกผลทับทิมจากร้านขายยา (1 กิโลกรัม) มาล้าง สับเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C จนแห้ง บดให้ละเอียด จากนั้นนำมา สกัดด้วย chloroform โดยการแช่เป็นเวลา 5 วัน แล้วกรองเอาส่วนสกัดออก แช่กากเดิมด้วย chloroform ซ้ำอีก

2 ครั้ง จากนั้นแช่ต่อด้วย ethanol 95% 3 ครั้งและสุดท้ายแช่ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ไประเหยให้แห้งภายใต้เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน ชั่งน้ำหนักและเก็บสารที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (% yield ที่ได้เมื่อสกัดเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol 95%, chloroform และน้ำกลั่น เท่ากับ 12, 8, 4 ตามลำดับ)

2. การแยกสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (fraction) ของสารสกัดหยาบโดยวิธี solvent-solvent extraction (ดัดแปลงตามวิธีของ Machado *et al.*, 2003)

นำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol มาละลายในน้ำ รินส่วนใสใส่ในกรวยแยกสารขนาด 250 มล. ใส่ตัวทำละลายลงไป โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate และ *n*-butanol ตามลำดับ เขย่าให้ตัวทำละลายและสารสกัดเข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ไขเอาส่วนที่ต้องการไประเหยให้แห้งแล้วนำส่วนต่าง ๆ มาทำ Thin layer chromatography เพื่อเปรียบเทียบ

3. การทดสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช (phytochemical screening test) โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี

(ดัดแปลงตามวิธีของวีณา, 2534 และ คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2542)

โดยทดสอบสารต่อไปนี้

3.1 flavonoids (Shinoda test)

3.1.1 นำสารสกัดมา 20 ml ระเหยให้แห้งบน water bath จากนั้นทำให้เย็น ล้างไขมันและสีของสารสกัด โดยละลายสารสกัดด้วย petroleum ether หลาย ๆ ครั้ง รินออก จนกระทั่ง petroleum ether ไม่มีสี (รวมสารละลายในชั้น petroleum ether ระเหยให้แห้ง เก็บไว้ตรวจสอบ sterols และ triterpenes)

3.1.2 สกัดกากจากข้อ 3.1.1 ที่ล้างไขมันและสีออกไปแล้ว ด้วย 50% ethanol 10 ml กรอง แบ่งเป็น 2 ส่วน เป็นชุดควบคุม 1 ส่วน ชุดทดสอบ 1 ส่วน ทดสอบสารกลุ่ม flavonoids โดยการนำส่วนสกัด มาเติม magnesium ribbon ชิ้น เล็ก ๆ ลงไป 2 ถึง 3 ชิ้น ขนาดยาว 2 ถึง 3 mm แล้วหยด hydrochloric acid เข้มข้นลงไป 3

ถึง 4 หยด ดูสีที่เกิดขึ้นภายใน 1 ถึง 2 นาที ผล positive จะให้สีแดง ส้ม เลือดหมูถึงม่วง เขียวหรือน้ำเงิน

3.2 sterols และ triterpenes

3.2.1 ใช้สารสกัดในชั้น petroleum ether ในข้อ 3.1.1 มาละลายใน chloroform 15 ml แบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยใช้เป็นชุดควบคุม 1 ส่วน

3.2.2 Liebermann-Burchard test

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

3.3 tannins และ phenolic compounds

นำสารสกัด 100 ml มาระเหยให้แห้ง เติมน้ำกลั่นร้อน 25 ml ลงไปละลายทิ้งให้เย็น กรอง จากนั้นนำส่วนละลายมาเติม 10% sodium chloride 3 ถึง 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 ถึง 3 หยด สังเกตสีที่ได้ ผล positive จะได้สีเขียวดำหรือน้ำเงินดำ

หลอดที่ 4 เติมสารละลายอิ่มตัวของ bromine ในน้ำ 2 ถึง 3 หยด สังเกตการเกิดตะกอน ผล positive จะได้ตะกอนเบามีสีขาวอมเหลือง

การประเมินผล

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

2. ถ้าได้สีเขียวดำ เมื่อเติม 1% ferric chloride และให้ตะกอนเบามีสีขาวอมเหลืองกับสารละลายอิ่มตัวของ bromine ในน้ำ แสดงว่ามี tannins ชนิด catechol

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

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

3.4 Screening for alkaloids

นำส่วนสกัดมา 25 ml ระเหยให้แห้ง นำสารสกัดที่ได้มาละลายใน 5% hydrochloric acid 20 ml กรองเอาสารละลายมาแบ่งเป็น 5 หลอด แล้วทดสอบดังนี้

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 จะได้ตะกอนสีขาวถึงครีม

หลอดที่ 5 เติม Dragendorff's reagent ผล positive จะได้ตะกอนสีส้ม

3.5 Screening for anthraquinones (Borntrager's test)

3.5.1 นำส่วนสกัดมา 20 ml ระเหยให้แห้ง เติม 10% sulfuric acid 10 ml ต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายออกมาทิ้งไว้ให้เย็น

3.5.2 นำสารละลายที่ได้มาสกัดกับ benzene 5 ml โดยเขย่าเบา ๆ แยกชั้น benzene ออกมา

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

3.6 Screening for lactone glycosides (coumarin glycosides)

3.6.1 นำสารสกัดประมาณ 0.5 g ใส่หลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นเล็กน้อยเพื่อให้ชื้น

3.6.2 ปิดหลอดทดลองด้วยจุกคอร์ก ซึ่งมีที่แขวนกระดาษกรองชุบสารละลาย 10% sodium hydroxide ไว้พอหมาด ๆ แขวนอยู่

3.6.3 นำหลอดทดลองมาแช่ในอ่างน้ำเดือด ประมาณ 15 นาที

3.6.4 เปิดจุกคอร์ก นำแถบกระดาษกรองที่แขวนไว้มาวางบนกระจกนาฬิกา นำ

ไปวางภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 366 nm สังเกตสีบนแถบกระดาษกรอง ถ้ามี coumarins ชนิดที่ระเหยได้ ผลที่ได้จะเห็นแถบกระดาษกรองเรืองแสงสีเขียวอมเหลืองหรือสีฟ้า (ถ้าเรืองแสงสีฟ้า จะเกิดขึ้นทันทีที่วางในแสงอัลตราไวโอเลต)

3.7 Screening for iridoid glycosides

3.7.1 นำสารสกัดมา 0.5 g ใส่ในหลอดทดลอง เติม 2% sulfuric acid ลงไปให้ท่วม

3.7.2 เขย่า รินสารละลายมา 1 ml เติม Iridoid's reagent ปริมาตร 1 ml นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 1 นาที ผล positive จะเกิดสีเขียวถึงน้ำเงินหรือมีตะกอนดำเกิดขึ้น

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion

4.1 การเตรียม inoculum

นำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบมาเพาะเลี้ยงบน NA ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เลือกเขี่ยเชื้อมา 4 ถึง 5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3 ถึง 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 โดยใช้น้ำเกลือไร้เชื้อ แล้วใช้ sterile cotton swab จุ่มเชื้อนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA 3 แนวทำมุม 60 °

4.2 การทดสอบกับแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (NCCLS, 2000)

ใช้ forceps คีบแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐาน [amikacin (30 μg), ampicillin (10 μg), chloramphenicol (30 μg), gentamicin (10 μg), kanamycin (30 μg), norfloxacin (10 μg) และ tetracycline (30 μg)] วางบนวุ้นอาหารในข้อ 1 ให้แผ่นยาห่างกัน 15 ถึง 20 mm และห่างจากขอบจานอาหาร 15 mm บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 2 ซ้ำ

อ่านผล โดยใช้ vernier caliper วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone แล้วนำไปเทียบกับตารางมาตรฐานเพื่อแปลผลว่า ไว (susceptible) หรือดื้อยา (resistant)

4.3 การเตรียมสารสกัดแบบแผ่นแห้ง

นำ sterile paper disc (6 mm) วางบนตะแกรงลวดที่ sterile ใน plate sterile ดูดสารสกัดที่มีความเข้มข้น 250 mg/ml ปริมาตร 10 μl หยดลงกลางแผ่น disc จะได้ปริมาณสารสกัด 2.5 mg/disc ทิ้งไว้ให้แห้ง

4.4 การเตรียมสารสกัดแบบแผ่นเปียก

ทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารสกัดแบบแผ่นแห้ง แต่วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อทันที

4.5 การทดสอบกับสารสกัด

ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 และ 2 แต่ใช้สารสกัดแทน

5. การทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดต่อ pathogenic Gram-negative rod โดยวิธี agar dilution

(ดัดแปลงตามวิธีของ Lorian, 1996)

วิธีที่ 1 (ทดสอบกับ Crude extract)

1. วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบมาเพาะเลี้ยงบน NA ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เลือกเขี่ยเชื้อมา 4 ถึง 5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3 ถึง 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland No. 0.5 โดยใช้น้ำเกลือไร้เชื้อแล้วเจือจางต่อด้วยน้ำเกลือไร้เชื้อ 0.85% ในอัตราส่วน 1: 10

2. การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดสมุนไพรให้มีความเข้มข้น 250 mg/ml เจือจางสารสกัดสมุนไพรแบบลำดับ 2 (serial 2-fold dilution) ด้วยตัวทำละลาย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นชนิดละ 12 ความเข้มข้นให้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการทดสอบ (0.12 ถึง 250 mg/ml)

3. การทดสอบหาค่า MIC

นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับ MHA หลอมเหลวปริมาตร 6 ml ในอัตราส่วน 1: 10 เทอาหารที่ได้ลงในจานเพาะเชื้อ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 cm) ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง นำแผ่นกรอง membrane filter (0.45 μm) มาวางบนผิวหน้าอาหารแล้วหยดเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 μl ลงบนแผ่นกรองและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง control ใช้ ตัวทำละลายคือ DMSO แทนสารสกัด ส่วน positive control ใช้ยา norfloxacin และ gentamicin ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การอ่านผล

อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้

4. การทดสอบหาค่า MBC

นำแผ่นกรอง membrane filter ที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ในการทดลองหาค่า MIC มาวางเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร MHA ใหม่ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

การอ่านผล

อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้

วิธีที่ 2 (ทดสอบกับ Fraction)

1. วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

ทำเช่นเดียวกับวิธีที่ 1

2. วิธีการทดสอบเพื่อหาค่า MIC

นำสารสกัดมาเตรียมความเข้มข้นของสารสกัด 12 ความเข้มข้น โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย จากนั้นผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 1 ส่วนกับ MHA ที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 45 ถึง 50°C 9 ส่วนให้เข้ากันใน eppendorf ดูดขึ้นลง 10 ถึง 15 ครั้ง ให้เป็นเนื้อเดียวกัน หยดอาหารลงในหลุมของ sterile microtiter plate หลุมละ 200 μl หากมีฟองก๊าซเกิดขึ้นให้นำ loop ลนไฟแตะฟองอากาศเบา ๆ ทิ้งไว้ให้

อาหารแข็ง จากนั้นหยดเชื้อที่เตรียมไว้ลงไปหลุมละ 1 μl (ประมาณ 10^4 CFU) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

การอ่านผล

อ่านค่า MIC เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ คือ ไม่มีเชื้อบนผิวหน้าอาหาร ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยใช้อาหาร MHA ที่มี DMSO เป็นชุดควบคุม

3. วิธีการทดสอบเพื่อหาค่า MBC

นำสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้มาทดสอบในอาหารเหลวใน microtiter plate โดยใช้ loop จุ่มหลุมที่ใส ซึ่งมีความเข้มข้นเดียวกับการหาค่า MIC นำมา streak บน MHA บนผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

การอ่านผล

อ่านค่า MBC เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ คือ ไม่มีเชื้อบนผิวหน้าวุ้นอาหาร

6. การทดสอบ salt aggregation test (SAT) ระหว่างเชื้อกับ $(NH_4)_2SO_4$ (ดัดแปลงวิธีจาก Turi *et al.*, 1997)

1. เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA หรือ MHA เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35°C
2. นำเชื้อมาทำ suspension กับ 0.04 M Pp buffer pH 6.8 ให้ได้ 5 McFarland
3. ดูด $(NH_4)_2SO_4$ แต่ละความเข้มข้น (0.1 M, 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M และ 3.0 M) ลงใน microtiter plate flat/U bottom หลุมละ 100 μl โดยในแต่ละความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ทำ 3 ซ้ำ
4. ดูดเชื้อที่ทำ suspension แล้วในข้อ 2 ปริมาตร 100 μl ใส่ลงในแต่ละหลุมที่มี 100 μl ของสารละลาย $(NH_4)_2SO_4$ อยู่ ส่วนชุดควบคุมใช้ Pp buffer แทน ซึ่งจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.04 M
5. เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที
6. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 30 นาที อ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

และแปลผล โดยอ่านจากค่า titer คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ทำให้เชื้อเกิดการเกาะกลุ่ม

การแปลผล

SAT Positive มีการเกาะกลุ่มชัดเจน

1. High aggregative คือ เชื้อที่เกิด aggregation กับ 0.04 M Pp buffer pH 6.8 และ/หรือ เชื้อที่มี SAT titer 0.05 และ 0.25 M

2. Low aggregative คือเชื้อที่มีค่า SAT titer อยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 1.5 M

3. Nonaggregative คือเชื้อที่ไม่เกิด aggregation ที่ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1.5 M หรือมากกว่า

SAT Negative ไม่มีการเกาะกลุ่มหรือมีการเกาะกลุ่มกันน้อยมาก

7. การทดสอบ salt aggregation test (SAT) ระหว่างเชื้อกับสารสกัดสมุนไพร

1. เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA หรือ MHA เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35°C

2. นำเชื้อมาทำ suspension กับ 0.04 M Pp buffer pH 6.8 ให้ได้ 10 McFarland

3. ดูด $(NH_4)_2SO_4$ แต่ละความเข้มข้น (0.1M, 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M และ 3.0 M) ลงใน microtiter plate flat/U bottom หลุมละ 100 µl โดยในแต่ละความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ทำ 3 ซ้ำ

4. ดูดเชื้อที่ทำ suspension แล้วในข้อ 2 นำมา 9 ส่วน ผสมกับสารสกัดสมุนไพร 1 ส่วน ทิ้งไว้ 15 นาที

5. ดูดเชื้อที่ทำ suspension กับสารสกัดในข้อ 4 ปริมาตร 100 µl ใส่ลงในแต่ละหลุมที่มี 100 µl ของสารละลาย $(NH_4)_2SO_4$ ส่วนชุดควบคุมใช้ DMSO แทนสารสกัด

6. เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที

7. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และแปลผลโดยอ่านจากค่า titer คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ทำให้เชื้อเกิดการเกาะกลุ่ม

การแปลผล เช่นเดียวกับข้อ 6

8. การวิเคราะห์ระดับของ verocytotoxin (VT) โดยวิธี reversed passive latex agglutination (RPLA) assay (ดัดแปลงวิธีจาก Yoh *et al.*, 1999)

8.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* O157: H7 บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อมา 2 ถึง 3 โคโลนี นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 100 rpm

8.2 การเตรียมสารสกัด

นำสารสกัดสมุนไพรมาเตรียมให้ได้ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10 MIC, MIC และ 1/10 MIC เพื่อใช้ในการทดสอบ

8.3 การสกัด VT (Yoh *et al.*, 1999)

ดูดเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 8.1 ปริมาตร 10 µl ใส่ในอาหาร TSB ใหม่ทั้งในหลอดที่มีและไม่มีสารสกัดสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1000 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าที่ 100 rpm เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000xg เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอาส่วนบน (supernatant) และส่วนตะกอน (cell pellet) เก็บส่วนบนไว้เพื่อทดสอบหา titer ของ VT2 จากนั้นนำส่วนตะกอนมาเติม polymyxin B (5,000 IU/ml) เขย่า 100 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 5000xg เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอา VT1 ออกจากส่วนตะกอน ดูดแยกเอาส่วนบนออกมาเพื่อทดสอบหา VT1

8.4 การทดสอบหา VT titer ด้วย RPLA Test Kit (Denka Seiken Co., Tokyo)

นำ VT1 และ VT2 ที่ได้จากข้อ 8.3 มาเจือจางแบบลำดับสองด้วย diluent ให้ได้ 8 ความเข้มข้นบน microtiter plate แบบ V bottom ให้แต่ละหลุมมีปริมาตร 20 µl จากนั้นหยด sensitized VT1 และ sensitized VT2 ปริมาตร 20 µl ลงไปผสมให้เข้ากัน เขย่าเบา ๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยใช้ control latex เป็น control จึงอ่านค่า VT titer จากการเกิด agglutination โดยทุกการทดลองทำ 2 ซ้ำ

การอ่านผล

การอ่านค่า VT titer จะอ่านจากระดับความเข้มข้นที่ทำให้เกิด agglutination

9. การวิเคราะห์หาสารสำคัญของ ethyl acetate fraction จากเปลือกผลทับทิมโดยใช้ liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) (ดัดแปลงวิธีจาก Gil *et al.*, 2000) ส่งไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เครื่องมือทดสอบ : Liquid Chromatograph – Mass spectrometer LCT, Micromass

เทคนิคการทดสอบ : LC-MS (ES^+)

สภาวะการทดสอบ : Column : Allure C18, 3.2 X 150 mm, 5 μm

Flow rate : 0.8 ml/min, Temperature : 25 ^{o}C

Mobile phase : เติม 2.5% กรดอะซิติกในน้ำและเมทานอล

A : น้ำ

B : 88% น้ำ + 12% เมทานอล

C : 20% น้ำ + 80% เมทานอล

D : เมทานอล

Gradient : 0 นาที 100% A

5 นาที 100% A

10 นาที 100% B

13 นาที 100% B

35 นาที 50% B + 50% C

40 นาที 100% C

42 นาที 100% D