บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. เชื้อราชนิดเส้นใย

1.1 ราน้ำจำนวน 15 isolates ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างของฟองในน้ำ (foam) จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา (Sakayaroj, 2000) แสดงในตารางที่ 2

1.2 เส้นใยราจากเห็ด Basidiomycetes และ Ascomycetes จำนวน 9 isolates ซึ่งแยกได้จากป่าบาลา จังหวัดนราธิวาส (เสาวลักษณ์ และคณะ, 2545) แสดงในตารางที่ 2

ตาราง 2 เชื้อราน้ำและเห็ดที่นำมาศึกษา

ราน้ำ	เห็ด
Beltrania rhombica	เห็ดหูหนู (*Auricularia* sp. BL 22)
Codinaea sp.	เห็ดรังนก (*Cyathus striatus*)
Helicomyces sp.	เห็ดขอนขาว (*Lentinus* sp. BL 23)
Pestalotia sp.	*Pycnoporus sanguineus*
Sporochisma sp.	เห็ดแคลง (*Schizophyllum commune*)
Varicosporium macrosporum	เห็ดโคน (*Termitomyces cylindricus*)
Volutella sp. 5 isolates : V06, V02, V3B1, B009, T013	*Xylaria allantoidea*
ราน้ำที่ยังไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้จำนวน 4 isolates : T002/4, T024, T027, J12	*Xylaria* sp. 2 isolates (sp 2 & BL 25)

เชื้อราที่นำมาทดสอบเก็บเป็น stock culture โดยเพาะเลี้ยงบน PDA และเก็บภายใต้ mineral oil ที่ปราศจากเชื้อ

2. จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ

1. แบคทีเรีย

1.1 แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [a]
- Methicillin resistant *S. aureus* SK1 (MRSA) [c]

1.2 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่

- *Escherichia coli* ATCC 25922 [a]
- *Pseudomonas aeruginosa* [c]

2. เชื้อรา ได้แก่

2.1 Filamentous fungi ได้แก่

- *Trichophyton rubrum* [b]
- *Microsporum gypseum* [b]
- *Penicillium marneffei* [b]

2.2 ยีสต์ ได้แก่

- *Candida albicans* PSU [c]
- *C. albicans* SH [b]
- *Cryptococcus neoformans* PSU [c]

หมายเหตุ a: ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, b: ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, c: ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

- Mueller Hinton agar (MHA, Difco)
- Sabouraud dextrose agar (SDA, Merck)
- Sabouraud dextrose broth (SDB, Merck)
- Potato dextrose agar (PDA, Difco)
- Potato dextrose broth (PDB : วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก)
- Agar granulated (BBL)
- RPMI 1640 (Difco)
- Oatmeal cereal agar (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก)

4. **สารเคมี**

- dichloromethane (LAB-SCAN)
- ethyl acetate (LAB-SCAN)
- methanol (LAB-SCAN)
- dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)
- sodium chloride (Merck)
- 3-[N-morpholino]Propanesulfonic acid (MOPS, Sigma : M-1254)
- glucose (Fluka)
- **ไนโตรเจนเหลว** (liquid nitrogen)

5. **ยาต้านจุลินทรีย์**

- **แผ่นยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน**
  - vancomycin, erythromycin (Difco)
  - oxacillin, amikacin, gentamicin, cephalothin (Oxoid)
  - ampicillin, tetracycline, netilmicin, chloramphenicol (BBL)
- ยาต้านแบคทีเรีย
  - gentamicin (Lek)
  - penicillin G (Sigma)
  - tetracycline (Sigma)
  - vancomycin (Abbott)
- ยาต้านเชื้อรา
  - amphotericin B (Bristrol – Myer)
  - miconazole (Sigma)

อุปกรณ์

- **ตู้บ่มเชื้อ** (incubator, Genlab)
- **ตู้ปลอดเชื้อ** (laminar air flow carbinet, Microflow)
- **ตู้อบไอร้อน** (hot air oven, Venticell)
- **หม้อนึ่งความดัน** (autoclave, Tomy)

- เครื่องระเหยแบบหมุนพร้อมลดความดัน (rotary evaporator, Buchi)
- vacuum pump (Fisher scientific)
- sonicator (Branson)
- stereozoom microscope (Olympus)
- เครื่องนับเซลล์ (hemacytometer, Boeco)
- เตาแม่เหล็ก (stirring heating plate)
- เครื่องชั่ง (balance, Diethelm)
- vortex mixer (Scientific)
- vernier caliper
- micropipette (Socorex)
- แผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Schleicher & Schuell)
- แผ่นกรองที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร (Millipore)
- แผ่นกรองที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร และทน DMSO (Millex-HV)
- TLC (Thin layer chromatography, Merck)
- water bath
- eppendorf tube
- loop
- เครื่องบด
- สำลีป้ายเชื้อ
- เข็มเขี่ยเชื้อรา
- ปากคีบ

เครื่องแก้ว

- จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6, 9 และ 15 เซนติเมตร
- หลอดทดลอง
- สไลด์
- บีกเกอร์
- กระบอกตวง
- ขวดชมพู่
- ขวดดูแรน (Schott)

- ขวดก้นกลม
- กรวย
- กรวยแยก
- pasteur pipette
- glass bead

วิธีการ

1. **การสกัดสาร**

1.1 การเลี้ยงเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อราน้ำและเห็ดในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร PDB ที่มีปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วนำไปกรองแยกส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) และส่วนมวลชีวภาพ (biomass) ออกจากกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปสกัด

1.2 การสกัดสารจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่แช่แข็งไว้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ละลาย แล้วสกัดด้วยเอธิลอะซิเตท (EtOAc) 3 ครั้ง โดยใช้กรวยแยก ปริมาตรของเอธิลอะซิเตทที่ใช้แต่ละครั้งมีปริมาณเป็น 1/3 ของปริมาตรตัวอย่าง จากนั้นนำส่วนสกัดเอธิลอะซิเตทไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนพร้อมลดความดัน (rotary evaporator) ชั่งน้ำหนักส่วนสกัดหยาบที่ได้และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.3 การสกัดสารจากส่วนมวลชีวภาพ

นำส่วนมวลชีวภาพมาทำให้เซลล์แตก โดยการแช่ในไนโตรเจนเหลวแล้วบดด้วยครกหรือทำให้เซลล์แตกโดยการ sonicate ด้วยเครื่อง sonicator จากนั้นนำไปกรองแยกเซลล์ออกจากส่วนน้ำ สกัดส่วนน้ำด้วยไดคลอโรมีเธน (CH_2Cl_2) และเอธิลอะซิเตท ตามลำดับ โดยใช้ตัวทำละลายปริมาณ 1/3 ของปริมาตรน้ำตัวอย่าง สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดละ 3 ครั้ง โดยใช้กรวยแยกเช่นเดียวกับการสกัดสารจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ สำหรับการสกัดสารจากส่วนเซลล์ สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ ไดคลอโรมีเธน เอธิลอะซิเตท และเมธานอล (MeOH) ตามลำดับ โดยนำเซลล์แช่ในตัวทำละลายนานครั้งละ 15 นาที แล้วจึงกรองแยกส่วนตัวทำละลายออกมา ทำเช่นนี้ 3 ครั้งต่อตัวทำละลายแต่ละชนิด จากนั้นนำสารละลายชนิดต่างๆ ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนพร้อมลดความดัน ชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิธีการสกัดสารสรุปไว้ในภาพประกอบ 14

1.4 การตรวจสอบลักษณะโครมาโทแกรมบนโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC, Thin Layer Chromatography)

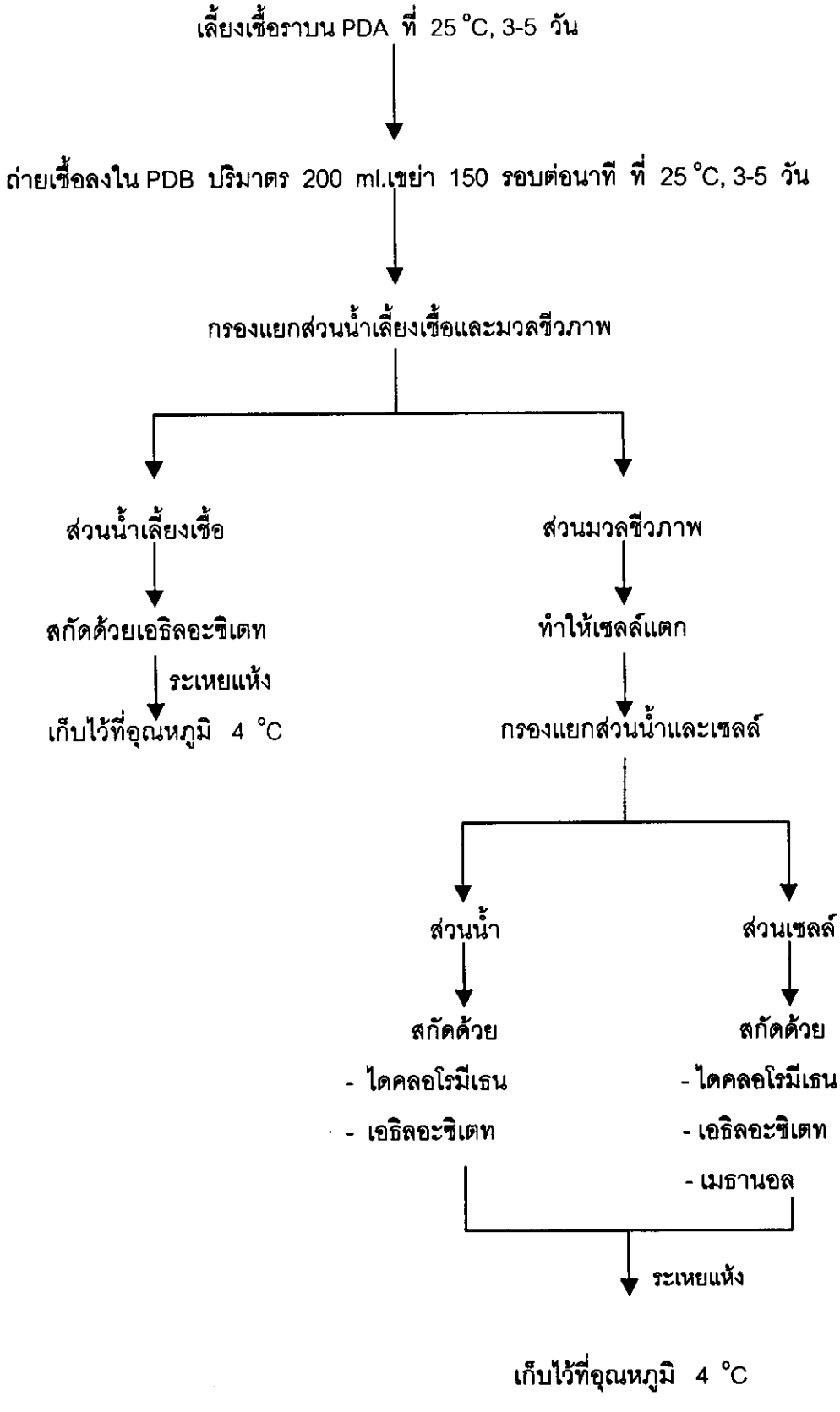
นำสารสกัดจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อและจากส่วนมวลชีวภาพมาตรวจสอบลักษณะโครมาโทแกรมบนโครมาโทกราฟีแผ่นบาง โดยใช้ตัวเคลื่อนที่ที่มีความเป็นขั้วต่างๆกัน ที่เหมาะสม

และทำให้สารแยกกันอย่างชัดเจน พบว่าตัวเคลื่อนที่ที่ให้การแยกของสารชัดเจน ได้แก่ 100% EtOAc และ 60% EtOAc/Petrol คำนวณหาค่า Rf จากสูตร

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

สารสกัดที่เห็นการแยกของสารบนโครมาโทกราฟีแผ่นบางชัดเจน จะนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อไป

ภาพประกอบ 14 วิธีการสกัดสาร



2. **การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์ โดยวิธีวางแผ่นยามาตรฐาน** (Lorian, 1996)

2.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร MHA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และเลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สำหรับ *C. albicans* และเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 31-32 องศาเซลเซียส) สำหรับ *C. neoformans* เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยเชื้อแบคทีเรียมา 2 หรือ 3 โคโลนี ใส่ใน 0.85% NaCl ไร้เชื้อ และปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard สำหรับเชื้อยีสต์ เขี่ยเชื้อใส่ใน SDB แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 2 McFarland standard

2.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ใช้สำลีสำหรับป้ายเชื้อ (cotton swab) ไร้เชื้อ จุ่มแบคทีเรียและยีสต์จากข้อ 2.1 แล้วบิดข้างหลอดทดลองพอหมาดๆ นำมาป้ายให้ทั่วรุ้นอาหาร MHA สำหรับแบคทีเรีย, RPMI glucose agar (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก) สำหรับ *C. albicans* และ SDA สำหรับ *C. neoformans* โดยป้าย 3 แนว ทำมุม 60 องศา จากนั้นวางแผ่นยามาตรฐาน โดยแต่ละแผ่นวางห่างกัน 15-20 มิลลิเมตร และห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิเมตร

- *S. aureus* ATCC 25923 และ MRSA SK1 วางแผ่นยา amikacin, ampicillin, erythromycin, oxacillin และ vancomycin
- *E. coli* ATCC 25922 วางแผ่นยา ampicillin, amikacin, gentamicin, tetracycline และ cephalothin
- *P. aeruginosa* วางแผ่นยา amikacin, gentamicin, tetracycline, chloramphenicol และ netilmicin
- *C. albicans* และ *C. neoformans* วางแผ่นยา amphotericin B (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก)

นำจานเพาะเชื้อที่วางแผ่นยาแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย, บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 31-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 32-36 ชั่วโมง สำหรับ *C. neoformans*

2.3 การอ่านผล

สังเกตการเกิดวงใสรอบแผ่นยา (clear zone) และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วยเวอร์เนีย คาลิเปอร์ สำหรับยาต้านแบคทีเรียนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐาน (Lorian, 1996) ซึ่งจะแสดงผลออกมา 3 ลักษณะดังนี้

- susceptible (S) : เชื้อมีความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้
- intermediate susceptible (I) : เชื้อให้ผลการทดสอบไวปานกลาง
- resistant (R) : เชื้อดื้อยาที่ใช้ทดสอบ

สำหรับยา Amphotericin B (Krajewska-Kutak *et al.*, 1999)

ถ้าขนาดวงใส	$\geq$ 16 มิลลิเมตร	แปลผลว่าไวต่อยา
ถ้าขนาดวงใสอยู่ในช่วง	12-16 มิลลิเมตร	แปลผลว่าไวต่อยาปานกลาง
ถ้าขนาดวงใส	$\leq$ 12 มิลลิเมตร	แปลผลว่าดื้อยา

3. **การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัด โดยวิธี** disc diffusion **(ดัดแปลงจาก** Lorian, 1996)

3.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

ทำการเตรียมเชื้อเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.1

3.2 วิธีการเตรียมสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ละลายสารสกัดใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปทดสอบ sterility โดยนำสารสกัดไป streak บนอาหาร NA บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ้าสารสกัดมีเชื้อปนเปื้อนนำไปกรองโดยใช้แผ่นกรองที่ทนต่อ DMSO (รูมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร) หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ละลายอยู่ใน DMSO ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น disc ไร้เชื้อที่วางบนแผ่นตะแกรง จะได้ปริมาณความเข้มข้นของ สารสกัดเป็น 100 ไมโครกรัมต่อ disc หลังหยดสารสกัดให้นำไปทดสอบทันที

3.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.2 สำหรับชุดควบคุมใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ DMSO และทดสอบสารสกัดละ 2 ซ้ำ

3.4 การอ่านผล

สังเกตการเกิดวงใส และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วยเวอร์เนีย คาลิเปอร์

4. **การทดสอบหาค่า** minimum inhibitory concentration (MIC) **โดยวิธี** agar microdilution **(ดัดแปลงวิธีจาก** Lorian,1996)

4.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับวิธีที่ใช้ในข้อ 2.1 แต่หลังจากปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard แล้ว ให้เจือจางด้วย 0.85% NaCl ไร้เชื้อ ในอัตราส่วน 1:10 สำหรับเชื้อยีสต์ปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 2 McFarland standard (จากการนับด้วย hemacytometer พบว่ามีเซลล์ประมาณ 10^7 CFUต่อมิลลิลิตร)

4.2 วิธีการเตรียมยาที่ใช้ทดสอบ

ละลายยา gentamicin, vancomycin, tetracycline และ amphotericin B ในน้ำกลั่นไร้เชื้อให้ได้ความเข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับยา penicillin G ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 16,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางยา gentamicin, vancomycin และ tetracycline แบบลำดับสองในน้ำกลั่นไร้เชื้อจำนวน 10 ความเข้มข้น ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1,600-3.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางยา amphotericin B แบบลำดับสองในน้ำกลั่นไร้เชื้อให้ได้ความเข้มข้น 800-1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางยา penicillin G แบบลำดับสองในน้ำกลั่นไร้เชื้อให้ได้ความเข้มข้น 200-0.39 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

4.3 วิธีการเตรียมสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ละลายสารสกัดใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางสารสกัดแบบลำดับสองใน DMSO โดยเตรียมสาร 11 ความเข้มข้น ซึ่งมีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในวุ้น (Final concentration) 50 เท่า ดังนั้นเมื่อผสมสารสกัดลงไปในวุ้นในอัตราส่วน 1:50 จะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดอยู่ในช่วง 500-0.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4 วิธีการทดสอบเพื่อหาค่า MIC

ผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้นกับ melted agar (MHA สำหรับแบคทีเรีย, RPMI glucose agar สำหรับเชื้อ *C. albicans* และ SDA สำหรับเชื้อ *C. neoformans*) ที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1: 50 ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการดูดอาหารขึ้นลง แล้วหยอดอาหารลงในหลุมของ 96 หลุม microtiter plate ชนิดก้นแบน จากนั้นหยอดเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 ลงไปหลุมละ 1 ไมโครลิตร (มีเชื้อประมาณ10^4 CFU ต่อหลุม) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย, 24 ชั่วโมง สำหรับ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (31-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ*C. neoformans* ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมจะทดสอบในหลุมที่ 12 โดยใช้อาหาร MHA

สำหรับแบคทีเรีย, RPMI glucose agar กับเชื้อ *C. albicans* และ SDA กับเชื้อ *C. neoformans* ผสมกับ DMSO ในอัตราส่วน 1:50

ในการทดสอบกับยาปฏิชีวนะจะทำการทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน โดยทำการทดสอบดังนี้

- *S. aureus* ATCC 25923 กับยา penicillin G ที่ระดับความเข้มข้น 4-0.008 ยูนิตต่อมิลลิลิตร
- MRSA SK1 กับยา vancomycin ที่ระดับความเข้มข้น 32-0.063 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- *E. coli* ATCC 25922 กับยา gentamicin ที่ระดับความเข้มข้น 32-0.063 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- *P. aeruginosa* กับยา tetracycline ที่ระดับความเข้มข้น 32-0.063 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับเชื้อยีสต์ทดสอบกับยา amphotericin B ที่ระดับเข้มข้น 16-0.003 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.5 การอ่านผล

ความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่สามารถขึ้นได้เป็นค่า MIC

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดเส้นใยของสารสกัดโดยวิธี disc diffusion

5.1 วิธีการเตรียมเชื้อราที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยง *M. gypsuem* เป็นเวลา 4 วัน, เลี้ยง *P. marneffei* เป็นเวลา 5 วัน และเลี้ยง *T. rubrum* เป็นเวลา 6 วัน

5.2 วิธีการเตรียมสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

เตรียมเช่นเดียวกับวิธีทำในข้อ 3.2

5.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

นำแผ่น disc ที่ชุบสารสกัดความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อ disc วางห่างจากปลายเส้นใย (บริเวณขอบโคโลนี) 0.5 เซนติเมตร วางแผ่น disc 4 แผ่นต่อเชื้อรา 1 plate โดยใช้แผ่น disc ที่ชุบ DMSO เป็นชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สำหรับ *M. gypseum* ส่วน *P. marneffei* และ *T. rubrum* เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ทำสารสกัดละ 2 ซ้ำ

5.4 การอ่านผล

สังเกตการยับยั้งเชื้อ โดยเชื้อจะไม่สามารถเจริญเติบโตชิดขอบแผ่น disc

6. **การทดสอบหาค่า** minimum inhibitory concentration (MIC) **ของสารสกัดต่อเชื้อราชนิดเส้นใย โดยวิธี** broth microdilution **(ดัดแปลงตามวิธีจาก** NCCLS, 1997)

6.1 วิธีเตรียม Conidial suspension (Jessup, *et al.* 2000)

เลี้ยง *M. gypseum* และ *T. rubrum* บนอาหาร Oatmeal cereal agar ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ใส่ glass bead ลงไปประมาณ 15-20 เม็ด เกลี่ยไปมาเพื่อให้โคนิเดียหลุดออกมา แล้วเติม 0.85% NaCl ไร้เชื้อลงไป ดูดโคนิเดียที่แขวนลอยอยู่ใน 0.85% NaCl ใส่ในหลอดทดลอง นำไปนับจำนวนโคนิเดียด้วย hemacytometer (microconidia สำหรับ *T. rubrum* และ macroconidia สำหรับ *M. gypeum*) แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ $4x10^3$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ด้วย RPMI1640 -glucose medium (pH 7.0 บัฟเฟอร์ด้วย MOPS; วิธีการเตรียมแสดงใน ภาคผนวก)

6.2 วิธีเตรียมยาที่ใช้ทดสอบ

ละลายยา miconazole ใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 3,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางยาใน RPMI 1640 (pH 7.0 บัฟเฟอร์ด้วย MOPS) ให้ได้ความเข้มข้น 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางยาแบบลำดับสองใน RPMI 1640-glucose medium (pH 7.0 บัฟเฟอร์ด้วย MOPS) จำนวน 10 ความเข้มข้น โดยมีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นสุดท้ายของยาในอาหาร 2 เท่า (ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 32-0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

6.3 วิธีการเตรียมสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ละลายสารสกัดใน DMSO แล้วเจือจางสารสกัดแบบลำดับสองใน RPMI 1640-glucose medium (pH 7.0 บัฟเฟอร์ด้วย MOPS) ให้ได้สารสกัดชนิดละ 10 ความเข้มข้น (1,024-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งมีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในอาหาร 2 เท่า (ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 512-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

6.4 วิธีการทดสอบเพื่อหาค่า MIC

ผสมยาหรือสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:1) ในหลุม microtiter plate ไร้เชื้อ สำหรับหลุมที่ 11 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว เพื่อตรวจสภาวะไร้เชื้อ และหลุมที่ 12 ใส่เชื้อเพียงอย่างเดียวเพื่อเป็น growth control นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลองความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

6.5 การอ่านผล

ค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 80% เมื่อเปรียบเทียบกับ growth control ซึ่งอ่านผลโดยสังเกตความขุ่นด้วยกล้องสเตอริโอซูม

7. **การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุม**

ทำการทดสอบตามวิธีของ Picman และคณะ (1990)

7.1 วิธีเตรียมสไลด์หลุม

วางกระดาษกรองบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ ใช้ปากคีบจุ่ม 95% ethanol ลนไฟ ทิ้งไว้ให้เย็น คีบสไลด์หลุมที่ปราศจากเชื้อวางบนกระดาษกรอง โดยวางสไลด์ 4 แผ่นต่อจานเพาะเชื้อ จากนั้นหยดน้ำกลั่นไร้เชื้อลงบนแผ่นกระดาษให้ชุ่ม

7.2 วิธีการเตรียมอาหารผสมยามาตรฐาน

7.2.1 ละลายยา miconazole ในสาร DMSO ให้มีความเข้มข้น 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางยาในน้ำกลั่นไร้เชื้อแบบลำดับสอง จำนวน 10 ความเข้มข้น (3.2 - 0.063 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

7.2.2 ใช้ไมโครปิเปตดูดยาความเข้มข้นละ 10 ไมโครลิตร ผสมกับอาหาร SDA หลอมเหลวอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 990 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:100) ดูดผสมให้เข้ากัน แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดมา 100 ไมโครลิต หยดลงในสไลด์แต่ละหลุม เกลี่ยให้อาหารกระจายเต็มหลุม ปล่อยให้วุ้นแข็งตัว จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของยาเป็น 32-0.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 8 หลุม

7.3 วิธีการเตรียมอาหารผสมสารสกัด

ละลายสารสกัดแต่ละชนิดใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารสกัดในน้ำกลั่นไร้เชื้อแบบลำดับสอง จำนวน 10 ความเข้มข้น (50-0.098 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นทำเช่นเดียวกับข้อ 7.2.2 ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 500-0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7.4 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อ *P. marneffei* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วใช้ pasteur pipette ไร้เชื้อเจาะเชื้อบริเวณขอบโคโลนี (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.25 มิลลิเมตร)

7.5 วิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสไลด์หลุม

ใช้เข็มเขี่ยชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราที่เตรียมไว้ (ข้อ 7.4) ไปวางที่จุดกึ่งกลางของวุ้นในแต่ละหลุม ให้ด้านที่มีเส้นใยสัมผัสกับวุ้น นำจานทดสอบทั้งหมดใส่ถุงพลาสติก นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

7.6 การอ่านผล

ตรวจผลทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา

ด้วยไมโครมิเตอร์ที่เทียบค่าแล้ว ภายใต้กล้องสเตอริโอซูม โดยในแต่ละหลุมจะวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี 2 ค่าที่ตั้งฉากกัน และหาค่าเฉลี่ย นำค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของชุดทดสอบแต่ละความเข้มข้นไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เพื่อหาค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายราจากสูตร (Gamliel *et al.*, 1989)

ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา = $100 - (r^2 / R^2 \times 100)$

r = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราจากชุดทดสอบ

R = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราจากชุดควบคุม

และหาค่า EC_{50} (50% Effective Concentration) คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของสายราได้ร้อยละ 50 ซึ่งหาได้จากการทดสอบตามข้อ 7.1–7.5 โดยพิจารณาเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของสายราในช่วงร้อยละ 20-80 และนำค่าที่ได้มาเขียนเส้นกราฟตรงระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่แกน X และค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายราที่แกน Y และคำนวณหาค่า EC_{50} จากสมการ linear regression, $Y = a + bX$ เมื่อแทนค่า $Y = 50$