บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ

1. แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

1.1. เชื้อ *Escherichia coli* ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่

1.1.1. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) 6 สายพันธุ์ คือ

(1) STEC RIMD0509952 O157 :H7

(2) STEC RIMD05091078 O157 :H7

(3) STEC RIMD05091083 O157 :H7

(4) STEC RIMD05091055 O26 :H11

(5) STEC RIMD05091056 O111 :NM

(6) STEC RIMD05091556 O22

เชื้อหมายเลขตั้งแต่ (1)–(5) เป็นเชื้อที่แยกได้จากคนญี่ปุ่น ในการระบาดปี ค.ศ. 1997 เชื้อหมายเลข (6) เป็นเชื้อที่แยกได้จากวัว ซึ่งเชื้อทั้งหมดนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก Research Institute of Microbial Diseases, Osaka University

1.1.2 Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) 1 isolate แยกได้จากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงโรงพยาบาลหาดใหญ่

1.2 เชื้อแบคทีเรียทีนำมาทดสอบเปรียบเทียบ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้รับอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. ยาต้านจุลินทรีย์

2.1 แผ่นยามาตรฐาน

2.1.1 Amikacin 30 µg (Difco)

2.1.2 Ampicillin 10 µg (BBL)

2.1.3 Cephalothin 30 µg (Difco)

2.1.4 Chloramphenicol 30 µg (BBL)

2.1.5 Gentamicin 10 µg (BBL)

2.1.6 Kanamycin 10 µg (BBL)

2.1.7 Norfloxacin 10 µg (BBL)

2.1.8 Tetracycline 30 µg (BBL)

2.2 ยาปฏิชีวนะ

2.2.1 Ampicillin

2.2.2 Ciprofloxacin

2.2.3 Gentamicin

2.2.4 Polymyxin B

3. สารสกัดสมุนไพรที่ใช้ทดสอบจากพืช 38 ชนิด ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ น้ำกลั่นและเอทานอล (ethanol 95%) โดยมีสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำ 18 สารสกัด และสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่สกัดด้วยเอทานอล 56 สารสกัด ส่วนสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากกระชาย คนทีสอ พญาสัตบรรณ ฟ้าทะลายโจร และเสนียด ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ถนอมจิต สุภาวิตา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สมุนไพร 38 ชนิดที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอล

ลำดับ	สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	
			น้ำ	เอทานอล
1.	กระชาย	*Boesenbergia pandurata Schltr.*	X	/
2.	กระท้อน	*Sandoricum nervosum Car.*	/	/
3.	ขมิ้นชัน	*Curcuma longa Linn.*	X	/
4.	ขมิ้นอ้อย	*Curcuma zedoaria*	X	/
5.	ขลู่	*Pluchea indica Less.*	X	/
6.	ขี้อ้าย	*Walsura robusta Roxb.*	/	/
7.	คนทีสอ	*Vitex trifolia Linn.*	X	/
8.	จันทน์แดง	*Dracaena loureiri Gagnep.*	X	/
9.	ชะพลู	*Piper sarmentosum Roxb.*	X	/
10.	ชา	*Camellia sinensis (L.) O.Kuntze*	X	/
11.	ชุมเห็ดเทศ (ชุมเห็ดใหญ่)	*Cassia alata Linn.*	/	/
12.	ดีปลี	*Piper retrofractum*	X	/
13.	เถาวัลย์เปรียง	*Derris scandens Roxb.Benth.*	/	/
14.	ทับทิม	*Punica granatum Linn.*	/	/
15.	เทียนบ้าน	*Impatiens balsamina Linn.*	X	/
16.	นนทรี	*Peltophorum pterocarpum (DC.) Back. ex Heyne*	/	/
17.	น้ำนมราชสีห์เล็ก	*Euphorbia thymifolia Linn.*	X	/
18.	เนระพูสี	*Dryopteris syrmatica O.Kze.*	/	/
19.	บัวบก	*Centella asiatica Urb.*	X	/
20.	เบญกานี	*Quercus infectoria Olivier*	/	/
21.	ผักชี	*Coriandrum sativum Linn.*	/	/
22.	ฝรั่ง	*Psidium guajava*	/	/
23.	พญาสัตบรรณ	*Alstonia scholaris Linn.R.br.*	/	/
24.	พริกไทยล่อน	*Piper nigrum Linn.*	X	/
25.	พลู	*Piper betle*	X	/
26.	พิลังกาสา	*Ardisia colorata Roxb.*	/	/
27.	ฟ้าทะลายโจร	*Andrographis paniculata Wall.ExNees*	X	/
28.	มะขาม	*Tamarindus indica Linn.*	/	/
29.	มะระ	*Momordica charantia Linn.*	/	/
30.	มังคุด	*Garcinia mangostana Linn.*	X	/

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ	สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	
			น้ำ	เอทานอล
31.	โมกมัน	*Wrighia tomentosa*	X	/
32.	โมกหลวง	*Holarrhena antidysenterica Wall.*	/	/
33.	ราชดัด	*Brucea javanica Merr.*	/	/
34.	สมอไทย	*Terminalia chebula Retz.*	/	/
35.	สีเสียดเทศ	*Uncaria gambir Hunter Roxb.*	/	/
36.	สีเสียดเหนือ	*Acacia catechu Willd.*	/	/
37.	เสนียด	*Adhatoda vasica*	x	/
38.	หนาด	*Blumea balsamifera DC.*	x	/

/ = สกัด x = ไม่ได้สกัด

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 Nutrient agar (NA) (Difco)

4.2 Mueller-Hinton agar (MHA) (Difco)

4.3 Mueller-Hinton broth (MHB) (Difco)

4.4 Tryptic soy broth (TSB) (Difco)

4.5 Sorbitol-MacConkey agar (SMAC) (Merck)

5. สารเคมี

5.1 Ammonium sulfate (Sigma)

5.2 Barium sufate McFarland no. 0.5

5.3 Chloroform (Merk)

5.4 Dimethylsulfoxide (Sigma)

5.5 Ethyl acetate (Lab Scan)

5.6 *E. coli* O157 antiserum (Denka Seiken Co., Tokyo)

5.6 70% Ethyl alcohol

5.7 95% Ethyl alcohol

5.8 Kieselgel 60 GF_{254} (Merk)

5.9 Potassium dihydrogen phosphate (Sigma)

5.10 Reversed-passive latex agglutination test kit (*E. coli* Verotoxin detection kit; Denka Seiken Co., Tokyo)

5.11 Sodium chloride (Sigma)

5.12 Sodium hydroxide (Sigma)

อุปกรณ์

1. Autoclave
2. Balance
3. Beaker
4. Cotton swab
5. Cylinder
6. Duran bottle
7. Eppendorf tube
8. Filter paper disc ขนาด 6 mm. (Schleicher & Schuell)
9. Flask
10. Forceps
11. Hot air oven
12. Hot plate stirrer
13. Incubator
14. Laminar air flow cabinet
15. Light microscope
16. Loop
17. Micropipette ขนาด 1-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl
18. Micropipette tip
19. Microtiter plate flat bottom 96 wells

20. Microtiter plate U bottom 96 wells
21. Millipore filter membrane ขนาด 0.45 µm
22. Multichannel micropipette ขนาด 3-50 µl
23. Needle
24. Pasteur pipette
25. Petri dish ขนาด 6 cm, 9 cm
26. Pipette pump
27. Refrigerator
28. Serological pipette
29. Spatula
30. Test tube
31. Vernier caliper
32. Vial
33. Vortex mixer
34. Water bath

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

1.1 การสกัดสารหยาบ

เก็บรวบรวมสมุนไพรที่มีสรรพคุณแก้ท้องร่วง ท้องเสีย บิดหรือมีรายงานฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมด 38 ชนิดจากอำเภอเมืองและอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา นำสมุนไพร มาตัดหรือหั่นให้เป็นท่อนเล็กๆ ถ้าเป็นพืชสดต้องนำมาล้างให้สะอาดก่อน แล้วอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50°C ประมาณ 2-7 วัน บดให้ละเอียดและชั่งน้ำหนักก่อนทำการสกัด นำมาสกัดด้วยน้ำกลั่นและ 95% ethyl alcohol แยกส่วนกันในอัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:2 เขย่าเบาๆ ทิ้งไว้ 7 วัน ส่วนที่สกัดด้วยน้ำกลั่นให้ต้มจนเหลือน้ำประมาณ 1 ใน 3 แล้วนำมากรองเอาส่วนที่เป็นกากออก นำส่วนสกัดทั้ง 2 ชนิดไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้ waterbath ที่อุณหภูมิ 60°C นำสารสกัด

ที่ได้ไปชั่งน้ำหนักและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ซึ่งสามารถคำนวณหาร้อยละของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากพืชสมุนไพร ตามสูตร

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักของสมุนไพรที่ได้จากการสกัด}}{\text{น้ำหนักของสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด}} \times 100$$

1.2 การสกัดสารบริสุทธิ์ โดยวิธี Preparative Thin-Layer Chromatography (Preparative TLC) (Stahl, 1967)

นำสมุนไพรที่ให้ค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 mg/ml และมีฤทธิ์ต้าน *E. coli* ทุกสายพันธุ์ คือ เบญกานี มาสกัดสารสกัดแยกส่วนโดยเตรียม plastic sheet ที่เคลือบด้วย Kieselgel 60 GF_{254} ให้มีความหนา 0.65 mm เป็นตัว absorbent ละลายสารสกัดหยาบสมุนไพรแล้วหยดลงบน plastic sheet นำไปใช้ใน solvent system โดยใช้อัตราส่วนของ chloroform : ethyl acetate เท่ากับ 1:2 เพื่อให้สารที่อยู่ในสมุนไพรเคลื่อนที่ออกจากกัน ณ ระยะต่างๆ นำ plastic sheet ไปส่องดูด้วยแสง UV แล้วขูด gel ที่มีสีตามจุดต่าง ๆ ที่ต้องการมาแช่ในเอทานอล เพื่อกรองเอา gel ออกจากสารละลาย จากนั้นนำสารละลายไประเหยให้แห้ง ก็จะได้สารที่ต้องการเพื่อใช้ทดสอบต่อไป ซึ่งสารนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ถนอมจิต สุภาวิตา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์โดยวิธีวางแผ่นยามาตรฐาน (Lorian, 1996)

2.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเขี่ยเชื้อมา 3–5 โคโลนีเพาะเลี้ยงใน MHB ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3–5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard (มีเชื้อประมาณ 1.5 x 10^8 CFU/ml) โดยใช้ NaCl 0.85% ไร้เชื้อ

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ใช้ cotton swab ไร้เชื้อจุ่มเชื้อจากข้อ 2.1 มาป้ายให้ทั่ววุ้นอาหาร MHA โดยป้ายเชื้อ 3 แนว ทำมุม 60° วางแผ่นยามาตรฐาน โดยแต่ละแผ่นวางห่างกันประมาณ 15–20 mm และห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 mm โดยวางแผ่นยา amikacin, ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, gentamicin, kanamycin, norfloxacin และ tetracycline นำจานเพาะเชื้อที่วางแผ่นยามาตรฐานแล้วไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง

2.3 การอ่านผล

สังเกตการเกิดวงใสรอบแผ่นยา (inhibition zone) และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วย vernier caliper นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐาน (Lorian, 1996) ในภาคผนวก

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดโดยวิธี Disc Diffusion (ดัดแปลงวิธีจาก Lorian, 1996)

3.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเขี่ยเชื้อมา 3–5 โคโลนีเพาะเลี้ยงใน MHB ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3–5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard (มีเชื้อประมาณ 1.5 x 10^8 CFU/ml) โดยใช้ NaCl 0.85% ไร้เชื้อ

3.2 การเตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

ละลายสารสกัด โดยที่สารสกัดด้วยน้ำก็ละลายด้วยน้ำ สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ละลายใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 250 mg/ml โดยชั่งสารสกัด 0.25 g ใส่ในขวดไร้เชื้อแล้วเติม DMSO 1 ml ตรวจเช็ค sterility โดยนำสารสกัดไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ้าสารสกัดมีเชื้อปนเปื้อนให้นำไปกรองโดยใช้ filter membrane ขนาด 0.45 µm ที่ทนต่อ DMSO จากนั้นเตรียมแผ่นสารสกัดสมุนไพรโดยหยดสารสกัด 20 µl ลงบนแผ่น disc ไร้เชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ที่วางบนตะแกรงดังนี้

ก. แบบแห้ง: หลังหยดสารสกัดแล้วนำไปผึ่งในตู้ถ่ายเชื้อจนแผ่น disc แห้งประมาณ 24 ชั่วโมง จึงนำไปทดสอบ

ข. แบบเปียก: หลังหยดสารสกัดแล้วให้นำไปทดสอบทันที

สำหรับ control disc จะใช้ตัวทำละลาย คือ น้ำ และ DMSO แทนสารสกัด

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ใช้ cotton swab ไร้เชื้อจุ่มเชื้อจากข้อ 3.1 มาป้ายให้ทั่วจุ้นอาหาร MHA โดยป้ายเชื้อ 3 แนว ทำมุม 60° วาง disc ที่ชุบสารสกัดทั้งแบบเปียกและแบบแห้ง และ control disc โดยแต่ละแผ่นวางห่างกันประมาณ 15–20 mm และห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 mm แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง โดยสารสกัดแต่ละชนิดจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4 การอ่านผล

สังเกตการเกิดวงใสและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วย vernier caliper

4. การทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) โดยวิธี Agar Dilution (Lorian, 1991)

4.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเขี่ยเชื้อมา 3–5 โคโลนีเพาะเลี้ยงใน MHB ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3–5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard (มีเชื้อประมาณ 1.5 x 10^8 CFU/ml) โดยใช้ NaCl 0.85% ไร้เชื้อ

4.2 การเตรียมสารสกัด

ละลายสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion ให้มีความเข้มข้น 250 mg/ml จากนั้นเจือจางสารสกัดแบบลำดับสอง (serial 2–fold dilution) ด้วยตัวทำละลาย คือ DMSO ให้ได้สารสกัดชนิดละ 12 ความเข้มข้น ให้มี

ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการทดสอบ (0.122-250 mg/ml) ดังตารางที่ 2

4.3 ยาต้านจุลินทรีย์

ละลายยา ampicillin, ciprofloxacin และ gentamicin ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ แล้วเจือจางยาแบบลำดับสองในน้ำกลั่นไร้เชื้อให้ได้ยาชนิดละ 12 ความเข้มข้น โดยยา gentamicin มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.781–400 µg/ml ส่วนความเข้มข้นของยา ampicillin และ ciprofloxacin อยู่ระหว่าง 0.013–256 และ 0.015–32 µg/ml ตามลำดับ เพื่อใช้เป็น positive control

4.4 การทดสอบหาค่า MIC

ผสมสารสกัดหรือยาต้านจุลินทรีย์แต่ละความเข้มข้นกับอาหาร MHA หลอมเหลวปริมาตร 6 ml ในอัตราส่วน 1:100 สำหรับยาต้านจุลินทรีย์ โดยผสมยาต้านจุลินทรีย์ 60 µl และในอัตราส่วน 1:10 สำหรับสารสกัดสมุนไพร โดยผสมสารสกัด 600 µl เทอาหารที่ได้ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 cm เขย่าส่วนผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันแล้วทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง ทำความเข้มข้นละ 3 จาน จากนั้นวาง filter membrane ขนาด 0.45 µm บนผิวหน้าอาหารแล้วหยดเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมในข้อ 4.1 หลังจากเจือจางต่ออีก 10 เท่าด้วย NaCl 0.85% ไร้เชื้อ เชื้อละ 1 µl (มีเชื้อประมาณ 10^4 CFU/spot) ลงบนแผ่นกรองและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง โดย control จะใช้ตัวทำละลาย คือ DMSO แทนสารสกัด การอ่านผลบันทึกระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MIC

4.5 การทดสอบเพื่อหาค่า MBC

นำ filter membrane ที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้มาวางเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร MHA ใหม่แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง การอ่านผลบันทึกระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MBC

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการเจือจางสารสกัดสมุนไพรเพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี Agar Dilution

สาร	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
250 mg/ml (ml)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
DMSO (ml)	0	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
ความเข้มข้น (mg/ml)	250	125	65.20	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95	0.97	0.49	0.24	0.12
สารสกัด (ml)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
melted MHA (ml)	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.05	0.02	0.01

ทิ้ง 0.6 ml

หมายเหตุ สำหรับยาต้านจุลินทรีย์ผสมใน melted MHA ในอัตราส่วน 1:100 โดยดูดสารละลายยา 0.06 ml ใส่ใน melted MHA 5.94 ml

5. การวิเคราะห์ระดับของ Verocytotoxin (VT) โดยวิธี Reversed-Passive Latex Agglutination (RPLA) Assay (ดัดแปลงวิธีจาก Yoh *et al.*, 1999)

5.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ EHEC O157:H7 RIMD 0509952 บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเขี่ยเชื้อมา 2–3 โคโลนี นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 100 rpm

5.2 การเตรียมสารสกัด

เลือกสารสกัดสมุนไพรชนิดที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากการทดสอบโดยวิธี agar dilution ที่มีค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 mg/ml มาเตรียมให้ได้ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10 MIC, MIC และ 1/10 MIC เพื่อใช้ในการทดสอบ

5.3 การสกัด VT (Yoh *et al.*, 1999)

ดูดเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1 ปริมาตร 10 µl ใส่ในอาหาร TSB ใหม่ทั้งในหลอดที่มีและไม่มีสารสกัดสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1000 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าที่ 100 rpm เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 x g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยก supernatant และ cell pellet โดยดูดแยกเอาส่วน supernatant เก็บไว้เพื่อทดสอบหา VT 2 จากนั้น treat ส่วนของ cell pellet ด้วย polymyxin B (5,000 U/ml) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 5000 x g เป็นเวลา 5 นาที ดูดแยกเอาส่วน supernatant (periplasmic) ออกมาเพื่อทดสอบหา VT 1

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

นำ VT 1 และ VT 2 ที่ได้จากข้อ 5.3 มาเจือจางแบบลำดับสองด้วย diluent ให้ได้ 8 ความเข้มข้นบน microtiter plate แบบ V bottom ให้แต่ละหลุมมีปริมาตร 20 µl จากนั้นหยด sensitized VT 1 และ sensitized VT 2 ปริมาตร 20 µl ลงไปผสมให้เข้ากัน เขย่าเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยใช้ control latex เป็น control จึงอ่านค่า VT titer จากการเกิด agglutination โดยทุกการทดลองทำ 2 ซ้ำ

5.5 การอ่านผล

การอ่านค่า VT titer จะอ่านจากระดับความเข้มข้นที่ทำให้เกิด agglutination

6. การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อ Cell Surface Hydrophobicity โดยวิธีSalt Aggregation Test (SAT) (ดัดแปลงวิธีจาก Türi *et al.*, 1997)

6.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเขี่ยเชื้อมา 5–10 โคโลนีใส่ใน 0.04 M phosphate buffer แล้วปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 5 McFarland standard (มีเชื้อประมาณ 1.5×10^9 CFU/ml) โดยใช้ phosphate buffer

6.2 การเตรียมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต

เตรียมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 3.0 M โดยใช้ 0.04 M phosphate buffer pH 6.8 เป็นตัวทำละลาย (ดูภาคผนวก)

6.3 การทดสอบหาค่า SAT titer ของเชื้อ

ดูดเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1 ปริมาตร 50 µl ผสมกับสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันปริมาตร 50 µl ใส่ในหลุมของ microtiter plate แบบ flat bottom ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงครึ่งหนึ่ง โดยเหลือความเข้มข้น 0.05, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.5 M ตามลำดับ ใช้ 0.04 M phosphate buffer เป็น control เขย่า microtiter plate เบา ๆ เป็นเวลาประมาณ 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จึงอ่านผลการเกิด aggregation ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ว่ามีการเกาะกลุ่มกันหรือไม่ โดยใช้กำลังขยาย 40 เท่า อ่านผลเป็น positive หรือ negative แล้วแปลผลออกมาเป็น SAT titer โดยทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ

6.4 การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ

ดูดเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 6.1 แต่ละเชื้อแบ่งลงใน eppendorf ไร้เชื้อปริมาตร 336 µl ผสมกับสารสกัดแต่ละชนิดปริมาตร 14 µl จากนั้นนำไปเขย่าเพื่อให้สารสกัดกับเชื้อผสมเข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ซึ่งสารสกัดแต่ละชนิด

ที่ใช้จะใช้ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ MIC และ 1/2 MIC โดยนำเฉพาะสารสกัดสมุนไพรที่ให้ค่า MIC มาทดสอบ

ดูดเชื้อที่ผสมกับสารสกัดไว้แล้วปริมาตร 50 µl มาผสมกับสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันปริมาตร 50 µl ใส่ใน microtiter plate แบบ flat bottom จะทำให้ความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงครึ่งหนึ่ง โดยเหลือความเข้มข้น 0.05, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.5 M ตามลำดับ ซึ่งจะใช้ 0.04 M phosphate buffer เป็น control เขย่า plate เบา ๆ เป็นเวลาประมาณ 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จึงอ่านผลที่เกิด aggregation ด้วยกล้องจุลทรรศน์ว่ามีการเกาะกลุ่มกันหรือไม่ โดยใช้กำลังขยาย 40 เท่า อ่านผลเป็น positive หรือ negative แล้วแปลผลออกมาเป็น SAT titer โดยทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ

6.5 การแปลผล

SAT positive คือ มีการเกาะกลุ่มอย่างชัดเจน

SAT negative คือ ไม่มีการเกาะกลุ่มหรือมีการเกาะกลุ่มน้อยมาก

SAT titer คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทำให้เชื้อเกิดการเกาะกลุ่มอย่างชัดเจน ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อตาม SAT titer ได้ดังนี้

- autoaggregation strain คือ เชื้อที่เกิด aggregation ในหลุมที่มีแต่ 0.04 M phosphate buffer pH 6.8

- high aggregative strain คือ เชื้อที่เกิด aggregation ที่ SAT titer 0.05 และ 0.25

- low aggregative strain คือ เชื้อที่เกิด aggregation ที่ SAT titer 0.5, 0.75 และ 1.5

- nonaggregative strain คือ เชื้อที่ไม่เกิด aggregation ที่สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตมีความเข้มข้น 1.5 M