บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ รากไทรย้อย รากราชพฤกษ์ และรากมะขามเทศ ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ทั่วประเทศประมาณชนิดละ 15 แหล่ง ตามเงื่อนไขของ Thai Herbal Pharmacopoeia นำมาตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ (Authentication) ของพืชสมุนไพร หรือเครื่องยา เปรียบเทียบ เพื่อยืนยันชนิดของตัวอย่างจากตัวอย่างพันธุ์ไม้อ้างอิง (Herbarium) จากสำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และ พันธุ์พืช ร่วมกับการยืนยันชนิดของต้นไม้โดยผู้เชี่ยวชาญ

การเตรียมสารสกัด

นำตัวอย่างพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด และที่ปรุงเป็นตำรับที่ (รวมทั้งสิ้น 4 ตัวอย่าง)ใช้ศึกษามาบดเป็นผง แล้วนำมาหมักด้วยแอลกอฮอล์ (Ethanol 95 %) ให้ท่วม ปิดภาชนะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราว หลังจากนั้นกรองแยกส่วนของเหลวที่ได้ด้วย เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) แล้วระเหยให้แห้งอีกครั้งด้วยชามระเหย (Evaporating dish) บนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ต่อจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ชั่งน้ำหนักคำนวณเป็นร้อยละสุทธิ พร้อมทั้งบันทึกลักษณะสิ่งสกัดที่ได้ (21)

ข้อกำหนดมาตรฐานทางเภสัชเวทของสมุนไพรไทย (22-26)

ข้อกำหนดทางเภสัชเวทของสมุนไพรไทย (Pharmacognostic Specification of Thai Crude Drugs) เป็นการศึกษาเอกลักษณ์ทางเภสัชเวทเบื้องต้นในการจัดทำตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia; THP) เพื่อเป็นแนวทางใช้เป็นมาตรฐาน ดังรายละเอียดต่อไปนี้

เอกลักษณ์ทางเภสัชเวท

ตรวจสอบลักษณะทางมหทรรศน์ (Macroscopic examination) โดยศึกษาลักษณะภายนอกของสมุนไพร รูปร่าง สี กลิ่น รส ขนาด บันทึกผล พร้อมทั้งภาพวาดลายเส้น

ตรวจสอบลักษณะทางจุลทรรศน์ (Microscopic examination) โดยนำสมุนไพรได้จากการคัดแยกสิ่งปลอมปนมาบดให้ละเอียด ร่อนด้วยตะแกรง 250 ไมครอน สำหรับผงยา และสำหรับชิ้นเนื้อเยื่อ นำชิ้นตัวอย่างสมุนไพรที่ยังไม่ผ่านการบดมาตัดตามแนวขวาง (cross section) และ/หรือตามแนวยาว (longitudinal section) จากนั้นเตรียมตัวอย่างด้วยน้ำยาที่เหมาะสมบนสไลด์ นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายของ 4x, 10x และ 40x เปรียบเทียบขนาดกับ 0.01

มม. ไมโครเมตร บันทึกภาพลักษณะสัญฐานวิทยาของเนื้อเยื้อ พร้องทั้งวาดภาพลายเส้นลักษณะที่สังเกตุได้

เอกลักษณ์ทางเคมี

การตรวจสอบเอกลักษณ์ขององค์ประกอบทางเคมี เป็นการตรวจสอบเอกลักษณ์ขององค์ประกอบทางเคมี ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจง โดยศึกษาลักษณะโครมาโตแกรมขององค์ประกอบทางเคมี ตลอดจนตำแหน่งและสีของแต่ละจุดหรือแถบที่ปรากฏจะช่วยยืนยันเอกลักษณ์ของตัวอย่างที่สงสัย โดยนำผงยาสมุนไพร ตัวอย่างละ 1 กรัม หมัก (maceration) ด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองและระเหยให้แห้ง ละลายสารที่ได้จากที่ระเหยด้วยเมธานอล 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี ด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง (Thin-layer Chromatographic identification : TLC) โดยการดูดสารละลาย 5 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นอะลูมิเนียมที่ฉาบด้วยซิลิกาเจลขนาด 20 x 20 เซนติเมตร (TLC silica gel 60 F_{254}) ที่ใช้เป็นวัฏภาคคงที่ นำไปวางในถังทำโครมาโท กราฟีที่เตรียมไว้โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่จำเพาะ จากนั้นนำแผ่นโครมาโตแกรมชนิดผิวบางออกจากถัง ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติ แสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และฉีดพ่นด้วยน้ำยาทดสอบจำเพาะ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำมาอบที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที สังเกตสีที่ภายใต้แสงธรรมชาติ หลังจากนั้นตรวจสอบตำแหน่งและสีของแถบสาร

เอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์

ปริมาณสารปนเปื้อน (Foreign matter)

เป็นการหาปริมาณสารปลอมปนที่มิได้มากจากพืชที่เป็นแหล่งกำเนิด อาจจะเป็นการปลอมปนด้วยสมุนไพรชนิดอื่นๆ ที่ด้อยคุณภาพกว่าหรือเป็นอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งของสัตว์ เช่น ขา หรือปีกแมลง และในบางครั้งเป็นสารอื่นๆ เช่น ก้อนหิน หรือก้อนกรวด โดยการนำตัวอย่างพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ชนิดละจำนวน 12 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 กรัม นำมาหาปริมาณสิ่งแปลกปลอม โดยนำมาเกลี่ยบนถาดแล้วคัดแยกสิ่งแปลกปลอม จากนั้นนำสิ่งแปลกปลอมที่ได้มาชั่งน้ำหนัก และคำนวณหาน้ำหนักร้อยละของสิ่งแปลกปลอมในตัวอย่าง

ปริมาณน้ำหนักที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง (Loss on drying)

เป็นการทดสอบเพื่อหาปริมาณความชื้นและสารระเหยอื่นๆที่ระเหยได้ ณ อุณหภูมิที่ระบุโดยอุณหภูมิที่ใช้ส่วนใหญ่เท่ากับ 100 – 105 องศาเซลเซียส โดยการนำผงสมุนไพรตัวอย่างละ 5 กรัม ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน (น้ำหนักที่ชั่งอย่างละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง) บรรจุในขวดชั่ง (weighing bottle) ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักคงที่ คือ น้ำหนักที่ได้จากการชั่งน้ำหนักติดต่อกัน 2 ครั้ง มีค่าต่างกันไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม โดยการชั่งครั้งที่สองเพื่อหาความต่างของน้ำหนักจะกระทำภายหลังจากการอบหรือเผาที่ใช้เวลาเพิ่มขึ้นอีก 1 ชั่วโมง)

ปริมาณเถ้า (Total ash)

เป็นการหาปริมาณเถ้าที่ได้จากเผาตัวยาที่อุณหภูมิสูง (500-600 องศาเซลเซียส) โดยการชั่งผงยาสมุนไพร ตัวอย่างละ 3 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาในเตาเผาความร้อนสูง ที่อุณหภูมิ 500-600 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง จนได้เถ้าสีขาว ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น จนได้น้ำหนักคงที่ และนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเถ้ารวมจากน้ำหนักของผงสมุนไพรที่ใช้

ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Total acid-insoluble ash)

เป็นการหาปริมาณเถ้าที่ได้จากต้ม total ash กับกรดเกลือชนิดเจือจาง จากนั้นกรองเอาตะกอนที่เหลือนำไปเผาจนได้น้ำหนักที่คงที่ โดยนำเถ้ารวมมาเติมกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 2 โมล่าร์ จำนวน 25 มิลลิลิตร ลงในถ้วยกระเบื้องที่มีเถ้ารวม ปิดด้วยฝากระจกนาฬิกา แล้วนำไปต้มประมาณ 5 นาที กรองด้วยกระดาษกรองชนิดที่ปราศจากเถ้า ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจนกว่าน้ำล้างตะกอนเปลี่ยนจากกรดเป็นกลาง จากนั้นนำกระดาษกรองใส่ในถ้วยกระเบื้องใบเดิมแล้วทำให้แห้งบนเตาไฟฟ้า และนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 500-600 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น จนได้น้ำหนักคงที่ และนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดจากผงสมุนไพรที่ใช้

ปริมาณสิ่งสกัด (Extractives)

เป็นการหาปริมาณสิ่งสกัดที่ได้จากสมุนไพร เมื่อใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน การเลือกใช้ตัวทำละลายจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารสำคัญและส่วนประกอบอื่นๆ ในตัวยาว่าละลายได้มาน้อยเพียงใด โดยการศึกษาในครั้งนี้ ใช้เอทานอล และน้ำเป็นตัวทำละลาย

ปริมาณสิ่งสกัดด้วยเอทนอล (Ethanol soluble extractive)

หมักผงสมุนไพรตัวอย่างละ 5 กรัม ด้วย เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท เขย่าบ่อยๆ ใน 6 ชั่วโมงแรก และตั้งทิ้งไว้อีก 18 ชั่วโมง จากนั้นกรองและนำสารละลายที่กรองได้มาจำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในบิกเกอร์ขนาดเล็กที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำไประเหยบนอ่างอังไอน้ำจนแห้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น จนได้น้ำหนักคงที่ และนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณสารที่ได้จากผงสมุนไพรที่ใช้

ปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำ (Water soluble extractive)

วิธีทำเช่นเดียวกับการสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 แต่เปลี่ยนใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำ

ปริมาณน้ำ (Water content)

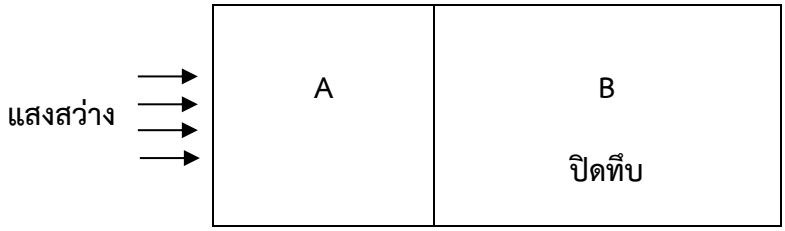
เป็นการทดสอบเฉพาะการหาปริมาณน้ำหรือความชื่นเท่านั้น ด้วยการกลั่นสมุนไพรกับโทลูอีน โดยใช้ azeotropic apparatus ซึ่งน้ำในตัวยาจะถูกกลั่นออกมาพร้อมกับตัวทำละลายที่ใช้ ในการกลั่นโทลูอีนจะเป็นตัวดึงน้ำพร้อมกับน้ำมันหอมระเหยออกมา โดยชั่งผงยาสมุนไพร ตัวอย่างละ 50 กรัม เติมด้วยโทลูอีนที่ทำให้อิ่มตัวด้วยน้ำ 200 มิลลิลิตร และกลั่นโดยใช้ azeotropic apparatus ทันทีที่น้ำถูกกลั่นออกมาอย่างสมบูรณ์ ล้างภายในท่อคอนเดนเซอร์ด้วยโทลูอีน และกลั่นต่อเนื่องเป็นเวลามากกว่า 5 นาที หลังจากที่กลั่นได้ของเหลวใน receiving tube จากนั้นหยุดให้ความร้อน ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำชั้นน้ำและโทลูอีนแยกออกจากกัน และนำชั้นน้ำไปวัดปริมาตร คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณน้ำที่ได้จากผงสมุนไพรที่ใช้

การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพ

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (27,28)

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธี การทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเล (Brine shrimp lethality assay) เป็นการศึกษาความเป็นพิษเบื้องต้น มีกระบวนการดังต่อไปนี้

การเตรียมน้ำทะเลเทียม (Artificial sea water) โดยชั่งเกลือทะเลเทียม 38 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร คนด้วยแท่งแก้วให้ละลายแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำมาเติมลงในกล่องพลาสติกแล้วโรยไข่ (cyst) ลงทางด้าน B ปิดด้วย อะลูมิเนียมฟรอยด์ คลุมด้วยผ้าขาวบาง ให้แสงสว่างด้าน A โดยใช้โคมไฟ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ไว้นาน 36-48 ชั่วโมง และให้อากาศด้วย air pump



การทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเล ทำการทดสอบโดยนับ จำนวน Brine shrimp ที่แข็งแรงประมาณ 10-15 ตัว ใส่ลงในหลอดทดลอง ที่มีน้ำทะเลเทียม 5 มล. เตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้น 1,000, 100 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายด้วยเมทานอล แล้วดูดสารลงกระดาษกรองทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองที่มีไรทะเลเตรียมไว้ โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 5 ครั้ง ปิดฝาหลอดทดลอง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ตรวจนับผลตัวไรที่ตายเมื่อครบเวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง นำผลที่ได้คำนวณหาค่าอัตราการตายด้วยสูตร อัตราการตาย (% mortality) = จำนวนตัวไรที่ตาย/จำนวนตัวไรที่ทดลอง x 100 นำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่า LC_{50} ด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ การวิเคราะห์หาสมการเชิงเส้น และการทำนายค่าการประมาณเชิงเส้น โดยค่าความเป็นพิษของสารสกัดแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้

1. สารสกัดที่มีฤทธิ์ในระดับสูง (High activity) จะมีค่า LC50 < 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารสกัดที่มีฤทธิ์ในระดับปานกลาง (Medium activity) จะมีค่า LC50 < 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. สารสกัดที่มีฤทธิ์ในระดับต่ำ (Low activity) จะมีค่า LC50 < 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในส่วนของแหล่งกกำเนิดและกลไกการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระเกิดจากปัจจัยทั้งภายนอกและภายในร่างกายส่งผลเสียหายต่อองค์ประกอบของเซลล์และนำไปสู่การเกิดโรคหลายชนิด เพื่อหาสารที่สามารถลดความรุนแรงของอนุมูลอิสระ การศึกษาในครั้งดำเนินการศึกษาด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลสารอิสระของสารสกัด โดยวิธี Free radical scavenging assay (DPPH assay) (29)

DPPH หรือ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl เป็นสารอนุมูลอิสระ (free radical) สามารถรับ electron หรือ hydrogen radical ได้ ซึ่งเมื่อ DPPH อยู่ในรูปสารละลายใน absolute ethanol จะมีสีม่วง และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ antioxidant จะทำให้มีสีจางลง โดยใช้ Ascobic acid เป็นสารมาตรฐานที่ให้ผลบวกในการ ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้ ค่าที่ได้จากการทดสอบจะแสดงเป็นค่า IC_{50} โดยต้องมีค่าต่ำกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงจะถือว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในสารละลาย absolute ethanol ทดสอบโดยเตรียมสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นดังต่อไปนี้

สารสกัดจากรากไทรย้อย ที่ความเข้มข้น 110, 210, 310, 410, 510 และ 610 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดจากรากคูน ที่ความเข้มข้น 70, 170, 270, 370, 470 และ 570 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดจากรากมะขามเทศ ที่ความเข้มข้น 60, 160, 260, 360, 460 และ 560 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดจากตำรับยาตรีธารทิพย์ ที่ความเข้มข้น 60, 160, 260, 360, 460 และ 560 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Ascobic acid ที่ความเข้มข้น 220, 270, 320, 370, 420 และ 470 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลาย DPPH อย่างละ 100 มิลลิลิตรลงใน 96-well microplate ตามลำดับ ปิดกันแสงด้วย foil ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วย 96-well microplate readers วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (triplicate) นำไปคำนวณ % inhibition ดังสมการ

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [(\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}})/ \text{Absorbance}_{\text{control}}] \times 100$$

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพ (30,31)

การเตรียมจุลชีพ (Preparation of microorganism)

การเตรียมจุลชีพที่ใช้ในการศึกษา มีทั้งชนิดที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค แบ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (Gram positive bacteria) ชนิดแกรมลบ (Gram negative bacteria) และรา (Fungi) ดังแสดงในตาราง โดยจุลชีพที่ต้องการทดสอบ จะถูกเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar) และชนิดเหลว (broth) Mueller Hinton agar (MHA) และ Mueller Hinton broth (MHB) สำหรับแบคทีเรีย Sabouraud Dextrose agar (SDA) และ Sabouraud Dextrose broth (SDB) สำหรับรา จุลชีพจะถูกบ่มที่ 37 องศา ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ 24-48 ชั่วโมง สำหรับรา

การเตรียมสารละลายจุลชีพมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ โดยการนำ 4-5 โคโลนี ของจุลชีพที่บ่มครบตามกำหนดระยะเวลา มาเจือจางด้วยน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (0.85% of normal saline) แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นด้วย spectrophotometer ที่ 625 nm ปรับค่าความขุ่นที่ได้ให้อยู่ในช่วง 0.08-0.10 ซึ่งค่าที่ได้จะเทียบเคียงกับการวัดที่ 0.5 Mc Farland standards จำนวนจุลชีพโดยประมาณที่ได้จะมีค่าเท่ากับ 1×10^8 CFU/ml

ตารางที่ 1 จุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ

จุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ	
Gram positive bacteria (Non-spore forming bacteria)	*Staphylococcus aureus* ATCC6538P[1] *Micrococcus luteus* ATCC9341[2]
Gram positive bacteria (Spore forming bacteria)	*Bacillus subtilis* ATCC6633[1] *Basillus cereus* ATCC11778[2]
Gram negative bacteria (Non-spore forming bacteria)	*Escherichia coli* ATCC25922[1] *Enterobacter aerogenes* ATCC13048[2]

	Pseudomonas aeruginosa ATCC9027[1] *Salmonella typhi* (Isolates)[3] *Salmonella typhimurium* ATCC13311[3] *Shigella spp* (Isolates)[3]
Fungi	*Candida albicans* ATCC10230[1] *Saccharomyces cerevisiae* ATCC9763[1]

ที่มา : [1]ภาควิชาภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2]ภาควิชาภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
[3]ภาควิชาภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ

วิธี Agar diffusion

Agar diffusion เป็นวิธีที่ใช้ในการหาค่าขอบเขตการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ (zone of inhibition) ในครั้งนี้ ผู้ศึกษาได้เลือกใช้เทคนิค Agar well diffusion โดยการนำสารละลายจุลชีพมาตรฐาน 100 µl ผสมกับ sterile seed agar แล้วนำไปเทลงบน sterile base agar ทิ้งไว้ให้แข็งตัว หลังจากนั้นเจาะ seeded agar ให้เป็นหลุม ด้วย Cork borer ขนาด 6 mm นำสารสกัดตัวอย่างและตัวควบคุมละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) โดยความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างอยู่ที่ 200 mg/ml สารควบคุมบวก (ยาปฏิชีวนะ) ที่ 2 mg/ml และใช้ DMSO เป็นตัวควบคุมลบ จำนวน 20 µl หยดลงไปในหลุม แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศา ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ 24-48 ชั่วโมง สำหรับรา

เมื่อครบกำหนดเวลานำมาหาค่าขอบเขตการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ ด้วยการวัดความกว้างของขอบเขตการยับยั้ง (mm) หากสารที่ใช้ศึกษาใดแสดงผลขอบเขตการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ แสดงว่าสารดังกล่าว มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ การทดสอบทำซ้ำ 3 ครั้ง ค่าที่ได้นำไปคำนวนและรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงมาตรฐาน (Means ± SD)

วิธี Broth microdilution

Broth microdilution เป็นวิธีที่ใช้ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโต (minimum inhibitory concentration, MIC) และหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration, MBC) หรือความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญเติบโตของรา (minimum fungicidal concentration, MFC) โดยการนำสารละลายจุลชีพมาตรฐานมา 10 µl เติมลงในอาหารเหลวที่เหมาะสมกับจุลชีพ ผสมให้เข้ากันแล้วใส่ใน 96-well plate หลุมละ 50 µl เติมสารสกัดและสารควบคุมบวกที่แสดงผลขอบเขตการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ ละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) และเจือจางด้วยอาหารเหลว หลุมละ 50 µl ค่าความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้อยู่ในช่วง 3.9-2000 µg /ml ด้วยการลดความเข้มข้นลงทุก

ครึ่งหนึ่ง (Two-fold dilution) ตัวควบคุมบวก (Positive controls) ค่าความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้อยู่ในช่วง 0.039-20 µg/ml และตัวควบคุมลบ (Negative control) หลังจากนั้นจุลชีพบ่มที่ 37 องศา ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ 24-48 ชั่วโมง สำหรับรา

เมื่อได้กำหนดตามเวลาและอุณหภูมิที่ควบคุม นำมาอ่านผลการทดลองด้วยการสังเกตหลุมสุดท้ายที่ไม่มีจุลชีพเจริญเติบโตหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมไม่ขุ่น ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดและสารควบคุมบวกตัวสุดท้ายที่ไม่มีจุลชีพเจริญเติบโต คือ ค่า MIC ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญเติบโตนั้นสามารถ นำมาหาค่า MBC หรือ MFC ได้ โดยนำหลุมที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลุมไป spread plate บนอาหารแข็ง แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศา ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ 24-48 ชั่วโมง สำหรับรา ถ้าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดและสารควบคุมบวกที่สามารถฆ่าเชื้อได้ จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ค่า MBC หรือ MFC และบันทึกผลการทดลอง โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง