การทดสอบความไวของสารสกัดจากจุลินทรีย์และสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดย ห้องปฏิบัติการ แผนกวิจัยและพัฒนา บริษัทโปรไบโอติกแอนด์เฮอร์บัล

การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารสกัด ราเอนโดไฟต์

ด้วยวิธี Disc Diffusion Method

Dried Plate เป็นเวลา 15 นาที สำหรับ เตรียม Plate ทดสอบความไว

↓

ปรับความขุ่นด้วย sterile saline ให้เท่ากับ 0.5 McFarland Standard No.0.5

(เทียบกับแผ่นกระดาษสีขาว ซึ่งมีแถบดำที่ได้มาตรฐาน)

↓

ใช้ Sterile Swab จุ่มลงใน Tube ที่ปรับความขุ่นแล้วบิด Swab กับข้างหลอดให้หมาดๆ

ป้ายบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

(โดยลากเส้นผ่านกึ่งกลางอาหารเลี้ยงเชื้อในแนวตั้งจากล่างขึ้นบนให้ทั่วผิวหน้า

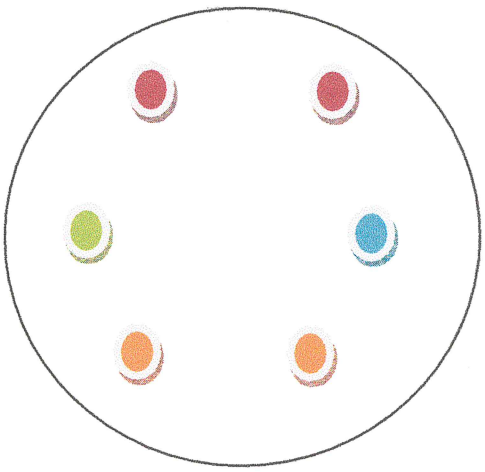
หมุนจานเพาะเชื้อทำมุม 60 องศาป้าย 2 ระนาบ

วาง plate ไว้ 3-5 นาทีเพื่อให้ความชื้นถูกดูดซึมเข้าไปในเนื้ออาหาร)

↓

นำ Disc สารสกัดและ Negative Control มาวางในจานเพาะเชื้อ โดยห่างจากขอบ

จานเพาะเชื้อ 1 เซนติเมตร (ดังตำแหน่งด้านล่าง)



สารสกัดอินทรีย์ .....สารสกัดน้ำ

Positive control Negative control

↓

นำไปIncubate ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

นำออกมาอ่านผลการทดสอบ โดยวัดขอบส่วนใส Zone เป็นมิลลิเมตร (ในการวัดขนาด Zone ให้ใช้กระดาษสีดำเป็น Background)

การเตรียมการทดสอบ

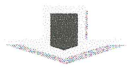
1. การเตรียมแบคทีเรีย/ยีสต์ที่ใช้ทดสอบ

1.1 **แบคทีเรีย/ยีสต์**

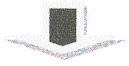
1. *Staphylococcus aureus* ATCC (อาหาร NA,PCA)
2. *Escherichia coli* ATCC (อาหาร NA,PCA)
3. เชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC (อาหาร PDA)

1.2 **การเตรียมแบคทีเรีย**

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในหลอดทดลองด้วยอาหาร NB/PDB



บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ปรับความขุ่นด้วย 0.85 % NSS ให้เท่ากับ 0.5 McFarland Standard (เทียบกับแผ่นกระดาษสีขาว ซึ่งมีแถบดำที่ได้มาตรฐาน)

1.3 **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

- การทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งโดยวิธี Agar diffusion โดยใช้อาหาร Plate count agar (PCA)

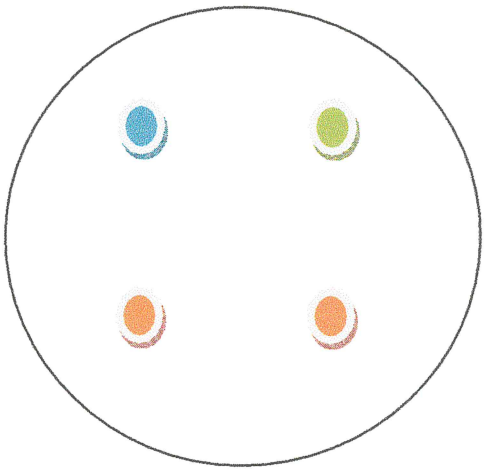
1.4 **การเตรียม Disc สำหรับทดสอบความไว**

ใช้ Disc ขนาด 6 มิลลิเมตร

หยดสารสกัด ปริมาตร 10ไมโครลิตร

ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1 ชั่วโมง

1.4 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย/ยีสต์



สารสกัดอินทรีย์ สารสกัดอินทรีย์

Positive control (ยาปฏิชีวนะ) Negative control (ตัวทำละลาย)

1.5 การเตรียมสารสกัดเชื้อราเอนโดไฟต์เพื่อทดสอบ

- เตรียมสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ละลายใน DMSO
- เตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะ ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

1.6 การเตรียมสารสกัดเชื้อราเอนโดไฟต์

การเตรียมสารสกัดเชื้อราเอนโดไฟต์

↓

นำเชื้อราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหาร Potato dextrose Agar **อย่างน้อย 20 วัน**

↓

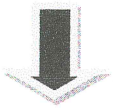
ทำให้ เซลล์เป็นเนื้อเดียวกันโดย 20% methanol

↓

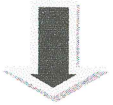
Cell Homogenic **จะถูกสกัด** 4 **ครั้งในปริมาตรที่เท่ากัน ด้วย** DCM

↓

สารละลายจะถูก evaporator ได้ Organic residue



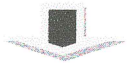
กรองส่วนของ Rotentate



Supernatant จะถูก freeze dry ได้ water extraction

1.1 **การเตรียมแบคทีเรีย**

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในหลอดทดลองด้วยอาหาร NB/PDB



บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ปรับความขุ่นด้วย 0.85 % NSS ให้เท่ากับ 0.5 McFarland Standard (เทียบกับแผ่นกระดาษสีขาว ซึ่งมีแถบดำที่ได้มาตรฐาน)

อุปกรณ์ที่เตรียม	**1.NB 5 มล.**	**จำนวน 20 หลอด**
	2. 0.85 % NSS	**จำนวน 500 มล.**

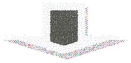
1.2 **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

- การทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งโดยวิธี Agar diffusion โดยใช้อาหาร Plate count agar (PCA) หรือ NA

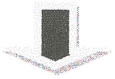
อุปกรณ์ที่เตรียม	1. NA	จำนวน 20 เพลท
	2. อบPlate เล็ก	จำนวน 4 กล่อง

1.3 **การเตรียม Disc สำหรับทดสอบความไว**

ใช้ Disc ขนาด 6 มิลลิเมตร



หยดสารสกัด ปริมาตร 10ไมโครลิตร



ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1 ชั่วโมง

อุปกรณ์ที่เตรียม	1. tip ขนาด 10 ul	จำนวน 1 กล่อง

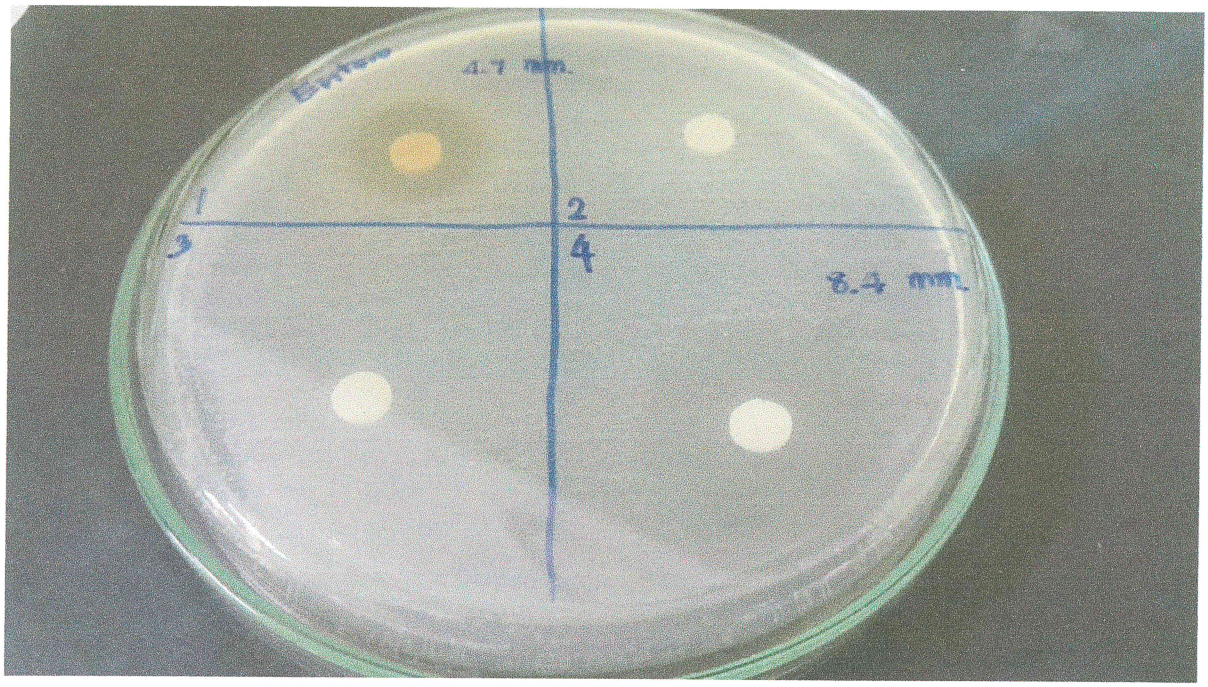
1.4 ขั้นตอนการทดสอบ

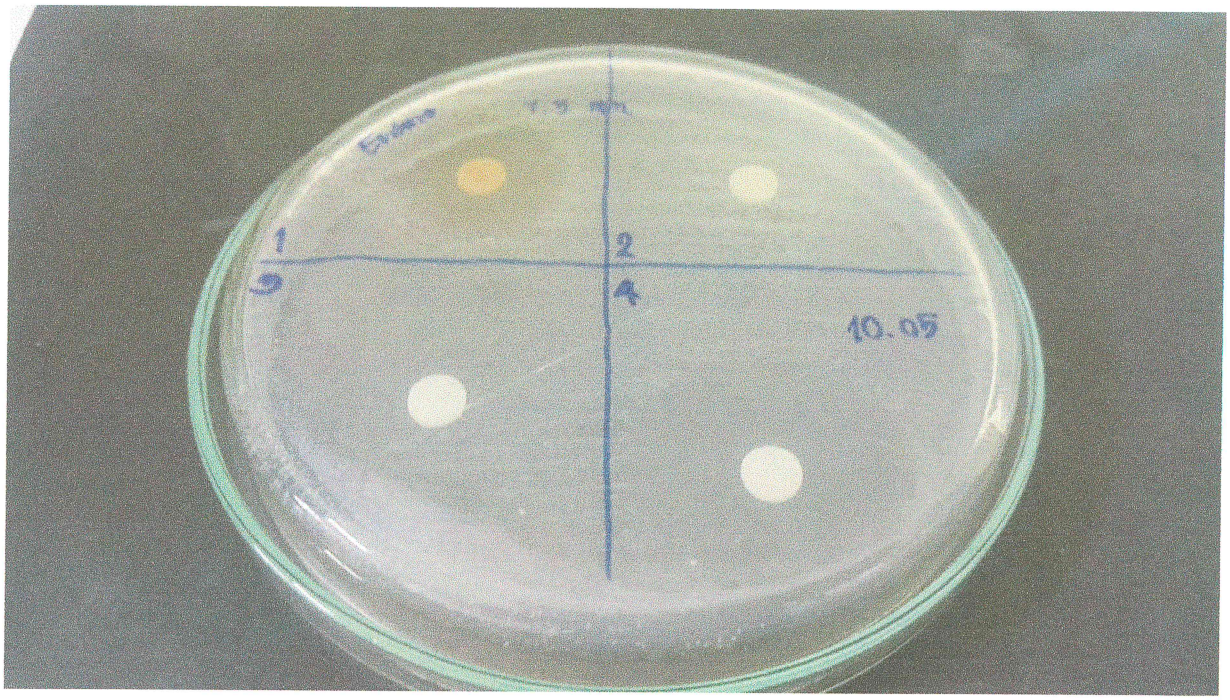
- Cotton Swab

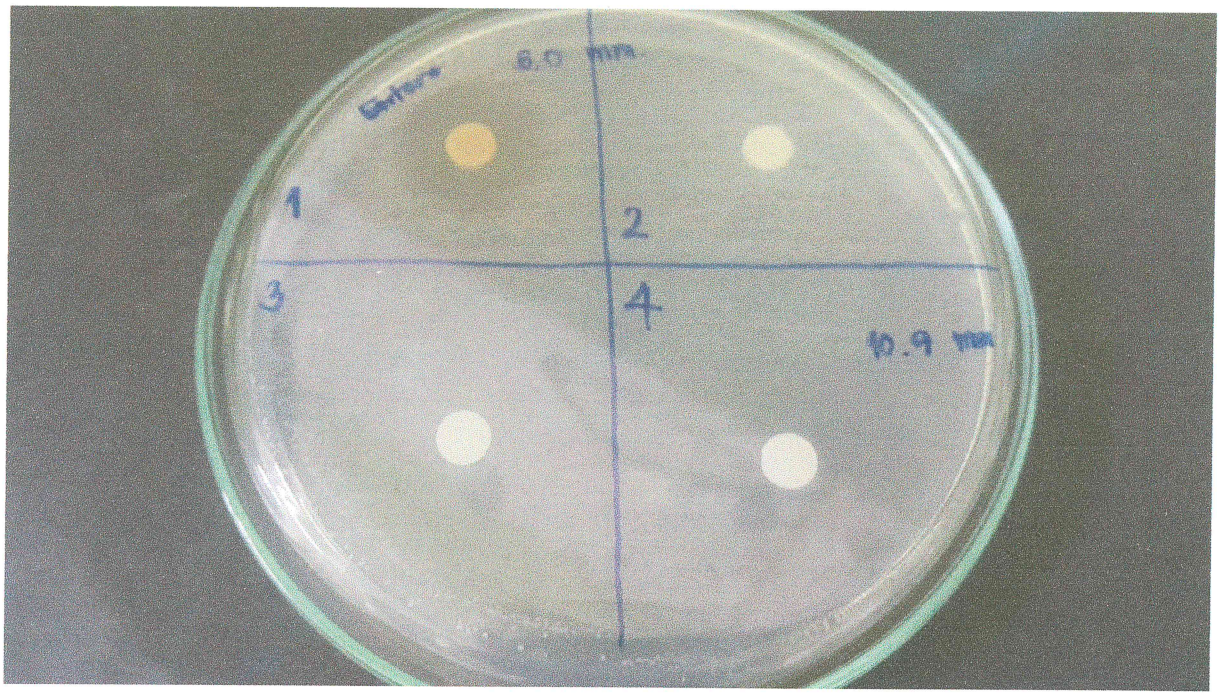
ผลการทดสอบความไว
ของสารสกัดจากจุลินทรีย์และสมุนไพร
ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

ผลการทดสอบเชื้อราขาว (เห็ด) (*Formitopsis sp.*) กับเชื้อ *Enterococcus faecalis*

(แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม)

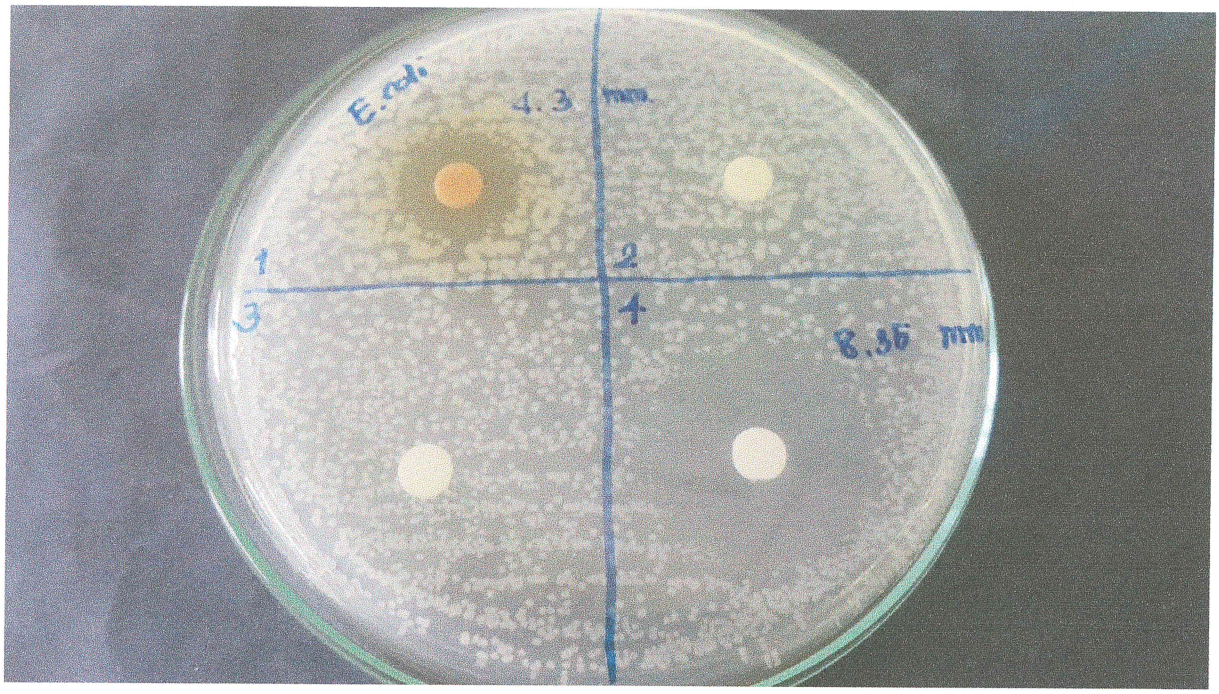


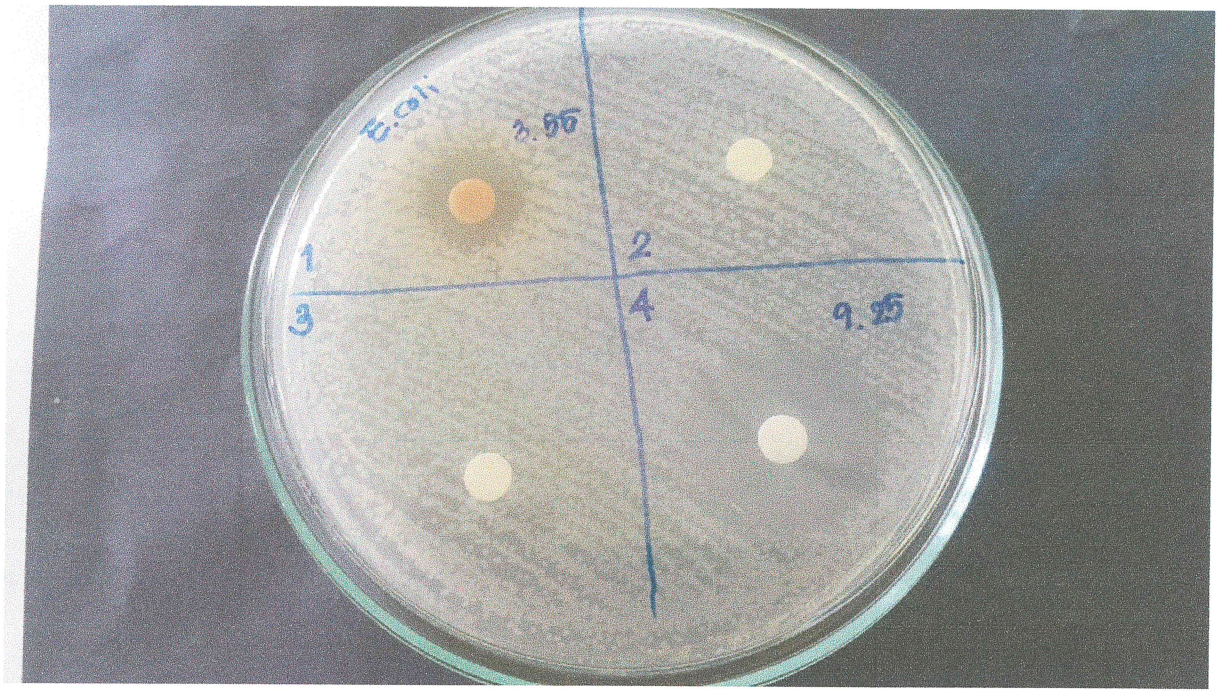


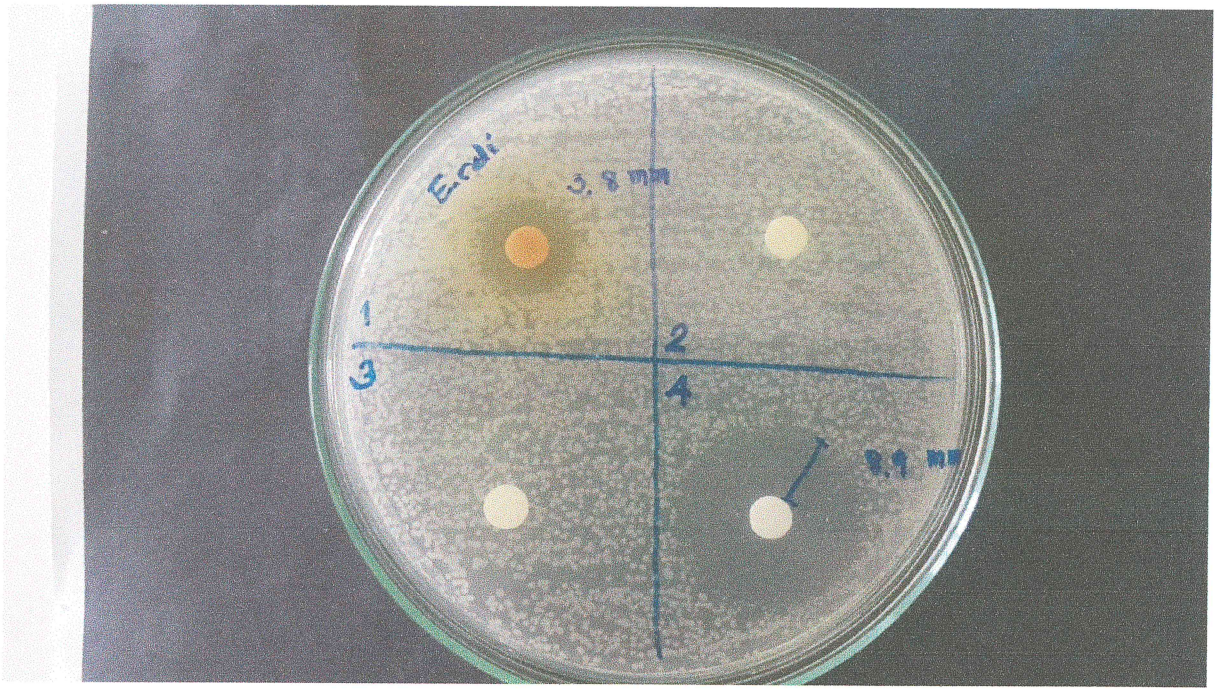


ผลการทดสอบเชื้อราขาว (เห็ด) (*Formitopsis sp.*) กับเชื้อ *Escherichai coli*

(แบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง)

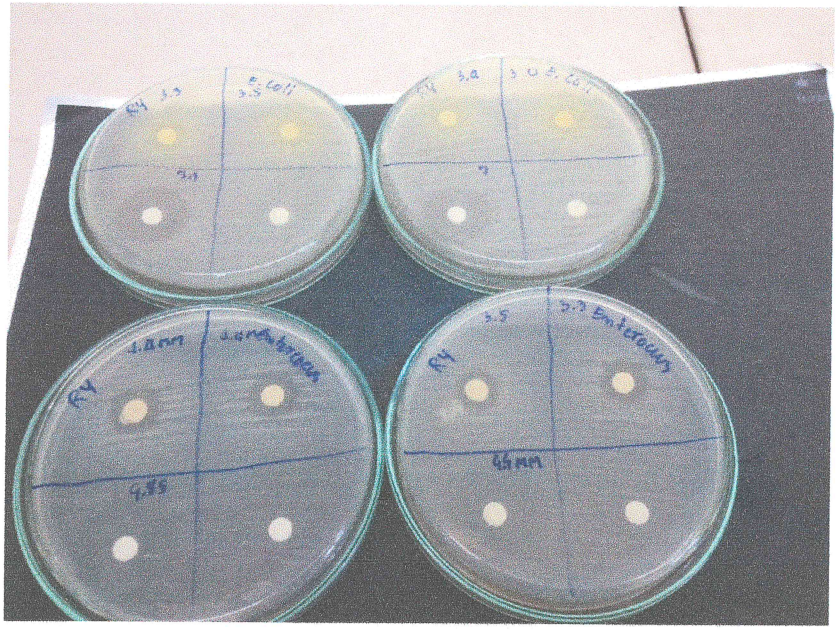



E.coli
3.55
1
2
3
4
9.25

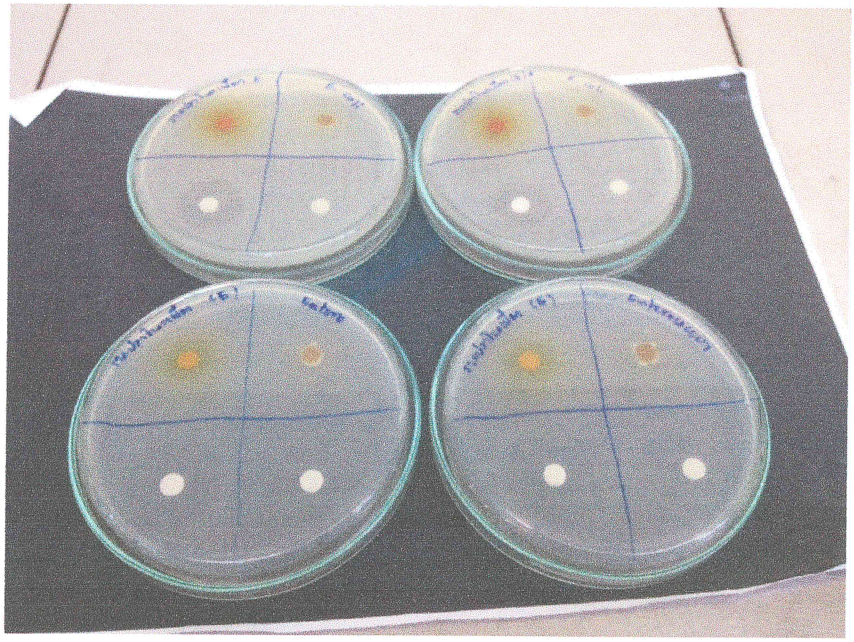

E.coli
3.8 mm
1
2
3
4
8.1 mm

ผลการศึกษาความไวของเชื้อราใน Plate

ผลการทดสอบยีสต์แดง



ผลการทดสอบรากปลาไหลเผือก



ผลการทดสอบราขาว (***Formitopsis sp.)***