บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo รุ่น AG203-S
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo รุ่น AG245
3. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี รุ่น Agilent 7890A
4. เมมเบรน 0.45 ไมครอน ชนิด PTFE (Sartorious, Germany)
5. เครื่องระเหยสุญญากาศ บริษัท Buchi รุ่น R-124
6. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25, 50,100, 500 มิลลิลิตร
7. ขวดรีเอเจนต์สีชา ขนาด 500 มิลลิลิตร และ 1 ลิตร
8. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 500 มิลลิลิตร
9. กระบอกตวง ขนาด 10 มิลลิลิตร
10. อลูมิเนียมฟอยล์
11. แท่งแก้วคนสาร
12. ถาดอะลูมิเนียม
13. โถดูดความชื้น
14. กระดาษกรอง
15. ไมโครปิเปต
16. ช้อนตักสาร
17. มีด

สารเคมี

1. Dimethyl Sulfoxide	Analytical grade
2. Dichloromethane	Analytical grade
3. Ethylacetate	Analytical grade
4. Methanol	Analytical grade
5. Hexane	Analytical grade

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารละลายเร่วหอม

1. การเตรียมสารละลายเร่วหอม ความเข้มข้น 36,920 mg/L ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายสารสกัดหยาบเร่วหอม 0.1846 กรัม ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร (Stock Solution)

ต้องการใช้สารละลายเร่วหอมปริมาตร 10 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายเร่วหอม ความเข้มข้น 36,920 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารเร่วหอม 36,920 mg

สารละลาย 10 µL → มีเนื้อสารเร่วหอม $= \frac{36,920 \times 10 \times 10^{-6}}{1} = 0.369$ mg/disc

2. การเตรียมสารละลายเร่วหอม ความเข้มข้น 3,692 mg/L ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเร่วหอมจาก Stock Solution ความเข้มข้น 36,920 mg/L มา 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

ต้องการใช้สารละลายเร่วหอมปริมาตร 10 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายเร่วหอม ความเข้มข้น 3,692 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารเร่วหอม 3,692 mg

สารละลาย 10 µL → มีเนื้อสารเร่วหอม $= \frac{3,692 \times 10 \times 10^{-6}}{1} = 0.037$ mg/disc

3. การเตรียมสารละลายเร่วหอม ความเข้มข้น 7,384 mg/L ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเร่วหอมจาก Stock Solution ความเข้มข้น 36,920 mg/L มา 0.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

ต้องการใช้สารละลายเร่วหอมปริมาตร 10 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายเร่วหอม ความเข้มข้น 7,384 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารเร่วหอม 7,384 mg

สารละลาย 10 µL → มีเนื้อสารเร่วหอม $= \frac{7,384 \times 10 \times 10^{-6}}{1} = 0.074$ mg/disc

4. การเตรียมสารละลายเร่วหอม ความเข้มข้น 11,076 mg/L ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเร่วหอมจาก Stock Solution ความเข้มข้น 36,920 mg/L มา 0.3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ต้องการใช้สารละลายเร่วหอมปริมาตร 10 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายเร่วหอม ความเข้มข้น 11,076 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารเร่วหอม 11,076 mg

สารละลาย 10 µL → มีเนื้อสารเร่วหอม = $\frac{11,076 \times 10 \times 10^{-6}}{1}$ = 0.111 mg/disc

5. การเตรียมสารละลายเร่วหอม ความเข้มข้น 14,768 mg/L ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเร่วหอมจาก Stock Solution ความเข้มข้น 36,920 mg/L มา 0.4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

ต้องการใช้สารละลายเร่วหอมปริมาตร 10 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายเร่วหอม ความเข้มข้น 14,768 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารเร่วหอม 14,768 mg

สารละลาย 10 µL → มีเนื้อสารเร่วหอม = $\frac{14,768 \times 10 \times 10^{-6}}{1}$ = 0.148 mg/disc

6. การเตรียมสารละลายเร่วหอม ความเข้มข้น 18,460 mg/L ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเร่วหอมจาก Stock Solution ความเข้มข้น 36,920 mg/L มา 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

ต้องการใช้สารละลายเร่วหอมปริมาตร 10 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายเร่วหอม ความเข้มข้น 18,460 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารเร่วหอม 18,460 mg

สารละลาย 10 µL → มีเนื้อสารเร่วหอม = $\frac{18,460 \times 10 \times 10^{-6}}{1}$ = 0.185 mg/disc

ต้องการใช้สารละลายเร่วหอมปริมาตร 100 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายเร่วหอม ความเข้มข้น 18,460 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารเร่วหอม 18,460 mg

สารละลาย 100 µL → มีเนื้อสารเร่วหอม = $\frac{18,460 \times 100 \times 10^{-6}}{1}$ = 1.846 mg/disc

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเตรียมสารละลายกระวาน

1. การเตรียมสารละลายกระวาน ความเข้มข้น 36,560 mg/L ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายสารสกัดหยาบกระวาน 0.1828 กรัม ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร (Stock Solution)

ต้องการใช้สารละลายกระวานปริมาตร 10 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายกระวาน ความเข้มข้น 36,560 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารกระวาน 36,560 mg

สารละลาย 10 µL → มีเนื้อสารกระวาน = $\frac{36{,}560 \times 10 \times 10^{-6}}{1}$ = 0.366 mg/disc

2. การเตรียมสารละลายกระวาน ความเข้มข้น 3,656 mg/L ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเร่วหอมจาก Stock Solution ความเข้มข้น 36,560 mg/L มา 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

ต้องการใช้สารละลายกระวานปริมาตร 10 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายกระวาน ความเข้มข้น 3,656 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารกระวาน 3,656 mg

สารละลาย 10 µL → มีเนื้อสารกระวาน = $\frac{3{,}656 \times 10 \times 10^{-6}}{1}$ = 0.037 mg/disc

3. การเตรียมสารละลายกระวาน ความเข้มข้น 7,312 mg/L ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเร่วหอมจาก Stock Solution ความเข้มข้น 36,560 mg/L มา 0.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

ต้องการใช้สารละลายกระวานปริมาตร 10 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายกระวาน ความเข้มข้น 7,312 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารกระวาน 7,312 mg

สารละลาย 10 µL → มีเนื้อสารกระวาน = $\frac{7{,}312 \times 10 \times 10^{-6}}{1}$ = 0.073 mg/disc

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. การเตรียมสารละลายกระวาน ความเข้มข้น 10,968 mg/L ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเร่วหอมจาก Stock Solution ความเข้มข้น 36,560 mg/L มา 0.3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

ต้องการใช้สารละลายกระวานปริมาตร 10 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายกระวาน ความเข้มข้น 10,968 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารกระวาน 10,968 mg

สารละลาย 10 µL → มีเนื้อสารกระวาน $= \frac{10{,}968 \times 10 \times 10^{-6}}{1} = 0.120$ mg/disc

5. การเตรียมสารละลายกระวาน ความเข้มข้น 14,624 mg/L ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเร่วหอมจาก Stock Solution ความเข้มข้น 36,560 mg/L มา 0.4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

ต้องการใช้สารละลายกระวานปริมาตร 10 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายกระวาน ความเข้มข้น 14,624 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารกระวาน 14,624 mg

สารละลาย 10 µL → มีเนื้อสารกระวาน $= \frac{14{,}624 \times 10 \times 10^{-6}}{1} = 0.146$ mg/disc

6. การเตรียมสารละลายกระวาน ความเข้มข้น 18,280 mg/L ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเร่วหอมจากStock solution ความเข้มข้น 36,560 mg/L มา 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตรต้องการใช้สารละลายกระวานปริมาตร 10 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายกระวาน ความเข้มข้น 18,280 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารกระวาน 18,280 mg

สารละลาย 10 µL → มีเนื้อสารกระวาน $= \frac{18{,}280 \times 10 \times 10^{-6}}{1} = 0.183$ mg/disc

ต้องการใช้สารละลายกระวานปริมาตร 100 µL (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายกระวาน ความเข้มข้น 18,280 mg/L

สารลาย 1 L → มีเนื้อสารกระวาน 18,280 mg

สารละลาย 100 µL → มีเนื้อสารกระวาน $= \frac{18{,}280 \times 100 \times 10^{-6}}{1} = 1.828$ mg/disc

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ขั้นตอนการดำเนินงาน

การเก็บตัวอย่างเหง้าเร่วหอม และเมล็ดกระวาน

ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างเหง้าเร่วหอมสด และเมล็ดกระวานแห้ง จากสถานีวนเกษตรตราด สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่อยู่ 37/1 หมู่ 8 ตำบลท่ากุ่ม อำเภอเมือง จังหวัดตราด ในวันที่ 25 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2555

การสกัดสารจากเหง้าเร่วหอมและเมล็ดกระวาน และการนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบ

เหง้าเร่วหอม

1. นำเหง้าเร่วหอมสดมาล้างน้ำให้สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง และนำมาชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ให้มีน้ำหนักจำนวน 2 กิโลกรัม ทำการหั่นเป็นแผ่นบางขนาดเล็ก แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายเมทานอลเป็นเวลา 5 วัน

2. นำเหง้าเร่วหอมที่แช่ในตัวทำละลายเมทานอล มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศตามลำดับ จะได้สารสกัดหยาบ

3. นำสารสกัดหยาบมาทำการแยกชั้นด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซิเตต นำสารชั้นเอทิลแอซิเตต ที่อยู่ด้านบนไปใช้

4. นำสารสกัดหยาบมาทำการแยกชั้นด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน นำสารชั้นไดคลอโรมีเทน ที่อยู่ด้านล่างไปใช้

5. นำสารระหว่างเอทิลแอซิเตต และไดคลอโรมีเทน มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศตามลำดับได้สารสกัดหยาบของเหง้าเร่วหอมที่มีความมีขั้วระดับปานกลาง

6. นำสารสกัดหยาบที่ได้มาชั่งโดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

7. นำสารสกัดหยาบที่ได้แบ่งเป็น 2 ส่วน ใส่ไว้ในขวดรีเอเจนต์สีชา แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}$C เพื่อรอการวิเคราะห์

8. นำสารสกัดหยาบส่วนที่ 1 มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

9. นำสารสกัดหยาบส่วนที่ 2 มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัยการสกัดสารจากเหง้าเร่วหอม

เมล็ดกระวาน

1. นำเมล็ดกระวานแห้งมาชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง จำนวน 1 กิโลกรัม ทุบเมล็ดกระวานแห้งให้แตกออกแล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เป็นเวลา 5 วัน

2. นำเมล็ดกระวานที่แช่ในตัวทำละลายเฮกเซน มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศตามลำดับ จะได้สารสกัดหยาบ

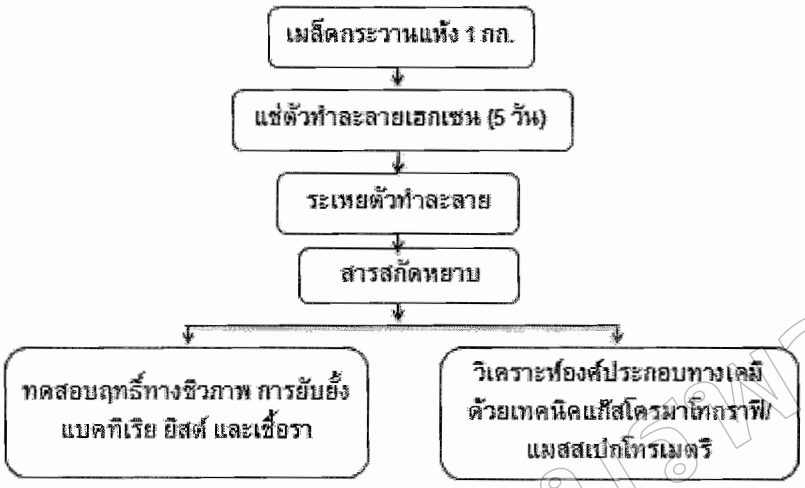
3. นำสารสกัดหยาบที่ได้มาชั่งโดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4. นำสารสกัดหยาบที่ได้แบ่งเป็น 2 ส่วน ใส่ไว้ในขวดรีเอเจนต์สีชา แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}$C เพื่อรอการวิเคราะห์

5. นำสารสกัดหยาบส่วนที่ 1 นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

6. นำสารสกัดหยาบส่วนที่ 2 นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3-2 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัยการสกัดสารจากเมล็ดกระวาน

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี

1. การเลือกสภาวะของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สารสกัดจากเหง้าเร่วหอมและเมล็ดกระวานด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี รุ่น Agilent 7890A Gas Chromatography with Mass Selective Detector รุ่น 5975C

Column : DB-5MS (5 %-Phenyl)-methylpolysiloxane close to USP Phase G27, 30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm, J&W 122-5532

Carrier : Helium

Oven : 60 °C for 3 min, then 10 °C/min to 280 °C for 15 min

Injection : Split, Split Ratio 50 : 1, Split flow 25 ml/min, 280 °C

Detector : MSD, 280 °C transfer line full scan at m/z 30-650

MS Source : 230 °C maximum 250 °C

MS Quad : 150 °C maximum 200 °C

ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา

1. การเตรียมสารสกัด

สารสกัดจากเหง้าเร่วหอมและเมล็ดกระวาน นำมาทำการละลายโดยใช้ Dimethyl Sulfoxide (Riedel-de Haen, Germany) เป็นตัวทำละลาย และกรองสารสกัดจากเหง้าเร่วหอม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

และเมล็ดกระวานให้ปราศจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยเมมเบรน 0.45 ไมครอน ชนิด PTFE (Sartorious, Germany)

2. การเตรียมจุลินทรีย์สำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง โดยวิธี Agar Disc Diffusion (จุลินทรีย์ทั้งหมด นำมาจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา) โดยมีรายละเอียดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ดังนี้

แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus*

แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* และ *Salmonella typhimurium*

ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans*

เชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger*

สำหรับแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth (Oxoid, England) หรือ Tryptic Soy Agar (Oxoid, England) ที่อุณหภูมิ 37 °C ส่วนยีสต์และเชื้อราเลี้ยงในอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (Difco TM, USA) หรือ Sabouraud Dextrose Broth (Difco TM, USA) ที่อุณหภูมิ 30 °C

นอกจากนี้จุลินทรีย์สำหรับทดสอบได้มาจากการเตรียมจุลินทรีย์แขวนลอย (Microbial Suspension) จากจุลินทรีย์ที่กำลังเจริญอยู่ใน Log Phase ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ Mac Farland Standard No. 0.5 หลังจากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อป้ายแบคทีเรียแขวนลอยลงบนจานอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (Oxoid, England) ยีสต์ และเชื้อราแขวนลอย ให้ป้ายลงบนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งของจุลินทรีย์ โดยวิธี Agar Disc Diffusion หยดสารสกัดที่ผ่านการกรองเพื่อให้ปลอดเชื้อ 10 ไมโครลิตรลงบนแผ่นกระดาษกรองวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่วางอยู่บนจานอาหารแข็งที่ป้ายจุลินทรีย์แขวนลอยไว้เรียบร้อย โดยแบคทีเรียแกรมบวกใช้ Ampicillin, Streptomycin เป็น Positive Control แบคทีเรียแกรมลบใช้ Cefotaxime, Streptomycin เป็น Positive Control หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม คืออุณหภูมิ 37 °C ใช้เวลา 24 ชั่วโมง และสำหรับยีสต์และเชื้อราใช้ Cycloheximide, Nystatin, Fluconazole เป็น Positive Control หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม คือ 30 °C 24-48 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ให้พิจารณาที่เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (Inhibition Zone) ซึ่งจะปรากฏเป็นวงใสไม่มีโคโลนีของจุลินทรีย์เจริญ แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง โดยจุดศูนย์กลางคือจุดศูนย์กลางของกระดาษกรอง

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University