บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

หน่อกะลา จากตำบลเกาะเกร็ด อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง บริษัท METTLER TOLEDO รุ่น AG245
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท METTLER TOLEDO รุ่น AG203-S
3. เครื่องระเหยสุญญากาศ บริษัท BUCHI รุ่น R-124
4. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี รุ่น GC 7890/MS 5975
5. มีด
6. ถาดอะลูมิเนียม
7. อลูมิเนียมฟอยด์
8. ขวดรีเอเจนต์ขนาด 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร และ 1 ลิตร
9. แท่งแก้วคนสาร
10. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร
11. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25, 50,100, 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร
12. กระดาษกรอง
13. กระบอกตวง ขนาด 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร
14. ช้อนตักสาร
15. ไมโครปิเปตต์
16. โถดูดความชื้น
17. ขวดก้นกลม ขนาด 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารเคมี

1. methanol Analytical grade

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลอง

1. นำส่วนของลำต้นของหน่อกะลา ที่ได้จากตำบลเกาะเกร็ด อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี มาปอกเปลือกนอกที่มีสีเขียวเข้มออกจนเหลือแต่ส่วนอ่อนด้านใน นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง จำนวน 1.9 กิโลกรัม แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายเมทานอลเป็นเวลา 5 วัน

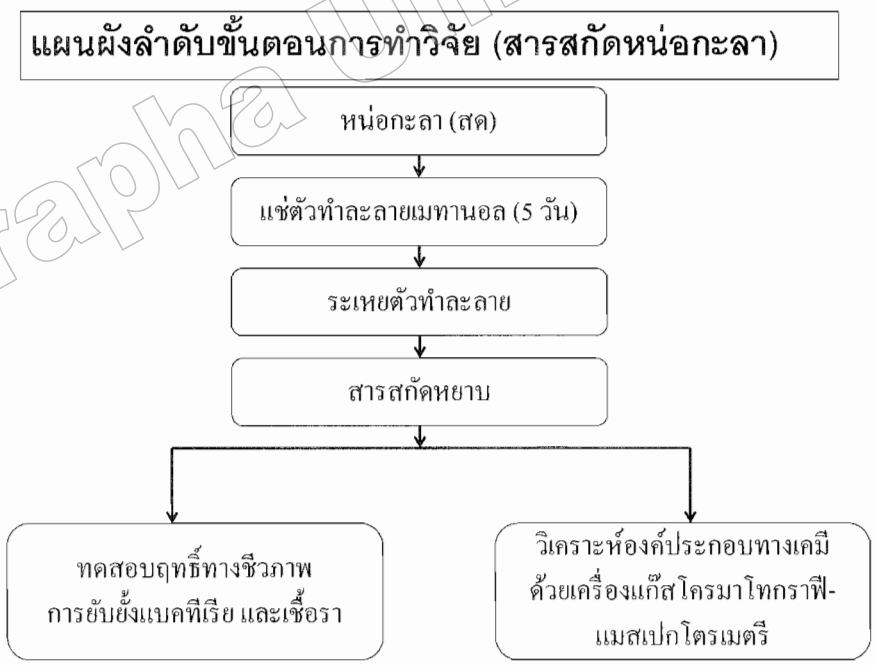
2. นำหน่อกะลาที่แช่ในตัวทำละลายเมทานอลจากข้อ 1 มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จนได้สารสกัดหยาบ

3. นำสารสกัดหยาบที่ได้มาชั่ง โดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4. นำสารสกัดหยาบที่ได้แบ่งเป็น 3 ส่วน ใส่ไว้ในขวดรีเอเจนต์สีชา แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการวิเคราะห์

5. นำสารสกัดหยาบ ส่วนที่ 1 นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา

6. นำสารสกัดหยาบ ส่วนที่ 2 นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสเปกโทรเมตรี



ภาพที่ 3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัยการสกัดสารจากหน่อกะลา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี

1. การเลือกสภาวะของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สารสกัดหยาบเมทานอลจากหน่อกะลาด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/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 minute

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

การเตรียมสารละลายหน่อกะลา

สารสกัดหยาบเมทานอลจากหน่อกะลา นำมาทำการละลายโดยใช้ Dimethyl Sulfoxide (Riedel-de Haen, Germany) เป็นตัวทำละลาย และกรองสารสกัดหยาบเมทานอลจากหน่อกะลาให้ปราศจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยเมมเบรน 0.45 ไมครอน ชนิด PTFE (Sartorious, Germany) โดย

1. การเตรียมสารละลายหน่อกะลา ความเข้มข้น 16,160 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายสารสกัดหยาบหน่อกะลา 0.0808 กรัม ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร (Stock Solution)

ต้องการใช้สารละลายหน่อกะลาปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายหน่อกะลา ความเข้มข้น 16,160 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลาย 1 ลิตร ⟶ มีเนื้อสารหน่อกะลา 16,160 มิลลิกรัม

สารละลาย 10 ไมโครลิตร ⟶ มีเนื้อสารหน่อกะลา $= \frac{16{,}160 \times 10 \times 10^{-6}}{1} = 0.162$ มิลลิกรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การเตรียมสารละลายหน่อกะลา ความเข้มข้น 1,616 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายหน่อกะลาจาก Stock Solution ความเข้มข้น 16,160 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

ต้องการใช้สารละลายหน่อกะลาปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายหน่อกะลา ความเข้มข้น 1,616 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลาย 1 ลิตร → มีเนื้อสารหน่อกะลา 1,616 มิลลิกรัม

สารละลาย 10 ไมโครลิตร → มีเนื้อสารหน่อกะลา $= \frac{1,616 \times 10 \times 10^{-6}}{1} = 0.016$ มิลลิกรัม

3. การเตรียมสารละลายหน่อกะลา ความเข้มข้น 3,232 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายหน่อกะลาจาก Stock Solution ความเข้มข้น 16,160 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

ต้องการใช้สารละลายหน่อกะลาปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายหน่อกะลา ความเข้มข้น 3,232 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลาย 1 ลิตร→ มีเนื้อสารหน่อกะลา 3,232 มิลลิกรัม

สารละลาย 10 ไมโครลิตร → มีเนื้อสารหน่อกะลา $= \frac{3,232 \times 10 \times 10^{-6}}{1} = 0.032$ มิลลิกรัม

4. การเตรียมสารละลายหน่อกะลา ความเข้มข้น 4,848 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายหน่อกะลาจาก Stock Solution ความเข้มข้น 16,160 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

ต้องการใช้สารละลายหน่อกะลาปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายหน่อกะลา ความเข้มข้น 4,848 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลาย 1 ลิตร → มีเนื้อสารหน่อกะลา 4,848 มิลลิกรัม

สารละลาย 10 ไมโครลิตร → มีเนื้อสารหน่อกะลา $= \frac{4,848 \times 10 \times 10^{-6}}{1} = 0.048$ มิลลิกรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. การเตรียมสารละลายหน่อกะลา ความเข้มข้น 6,464 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายหน่อกะลาจาก Stock Solution ความเข้มข้น 16,160 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

ต้องการใช้สารละลายหน่อกะลาปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายหน่อกะลา ความเข้มข้น 6,464 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลาย 1 ลิตร→ มีเนื้อสารหน่อกะลา 6,464 มิลลิกรัม

สารละลาย 10 ไมโครลิตร → มีเนื้อสารหน่อกะลา = $\frac{6{,}464 \times 10 \times 10^{-6}}{1}$ = 0.064 มิลลิกรัม

6. การเตรียมสารละลายหน่อกะลา ความเข้มข้น 8,080 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายหน่อกะลาจาก Stock Solution ความเข้มข้น 16,160 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร

ต้องการใช้สารละลายหน่อกะลาปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายหน่อกะลา ความเข้มข้น 8,080 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลาย 1 ลิตร→ มีเนื้อสารหน่อกะลา 8,080 มิลลิกรัม

สารละลาย 10 ไมโครลิตร → มีเนื้อสารหน่อกะลา = $\frac{8{,}080 \times 10 \times 10^{-6}}{1}$ = 0.080 มิลลิกรัม

ต้องการใช้สารละลายหน่อกะลาปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ต่อจานเพาะเชื้อ) จากสารละลายหน่อกะลา ความเข้มข้น 8,080 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลาย 1 ลิตร → มีเนื้อสารหน่อกะลา 8,080 mg

สารละลาย 100 ไมโครลิตร → มีเนื้อสารหน่อกะลา = $\frac{8{,}080 \times 100 \times 10^{-6}}{1}$ = 0.808 มิลลิกรัม

การเตรียมจุลินทรีย์

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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

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 ส่วนยีสต์และเชื้อรา เลี้ยงในอาหาร 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 แบคทีเรียแกรมลบ ใช้ Cefotaxime, Streptomycin เป็น Positive Control หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 37°C ใช้เวลา 24 ชั่วโมง และสำหรับยีสต์และเชื้อราใช้ Cycloheximide, Nystatin, Fluconazole เป็น Positive Control หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม คือ 30 °C 24-48 ชั่วโมง

วิธีการประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ให้พิจารณาที่เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (Inhibition Zone) ซึ่งจะปรากฏเป็นวงใสไม่มีโคโลนีของจุลินทรีย์เจริญ แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง โดยจุดศูนย์กลางคือจุดศูนย์กลางของกระดาษกรอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University