# บทที่ 3

# วิธีดำเนินงานวิจัย

**3.1 วัสดุและอุปกรณ์**

การทำวิจัยในครั้งนี้มีวัสดุที่ต้องใช้ประกอบด้วย พืชสมุนไพร เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ เครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ และวิธีการดำเนินงาน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

3.1.1 พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่นำมาสกัดในงานวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ กระเทียม ข่า และขมิ้น

3.1.2 เชื้อที่ใช้ทดสอบ ได้แก่

3.1.2.1 *Staphylococcus aureus* (DMST 8840)

3.1.2.2 *Bacillus cereus* (ATCC 035)

3.1.2.3 *Escherichia coli* (ATCC 0074)

3.1.2.4 *Salmonella* Typhi (TISTR 2519)

เชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ตัวนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ จังหวัดบุรีรัมย์

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้ในงานวิจัยมีดังนี้

3.1.3.1 Nutrient agar (NA)

3.1.3.2 Mueller Hinton agar (MHA)

3.1.3.3 Mueller Hinton broth (MHB)

3.1.4 สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยมีดังนี้

3.1.4.1 เอทานอลร้อยละ 99.9 (v/v)

3.1.4.2 น้ำกลั่น

3.1.4.3 เมทานอลร้อยละ 99.9 (v/v)

3.1.4.4 ขวดรูปชมพู่

3.1.4.5 ห่วงเขี่ยเชื้อ

3.1.4.6 ขวดสำหรับเก็บสารสกัด

3.1.4.7 ไมโครปิเปตต์ทิป

3.1.4.8 จานเพาะเชื้อ

3.1.4.9 ผ้าขาวบาง

3.1.4.10 แท่งแก้ว

3.1.4.11 หลอดทดลอง

3.1.4.12 บีกเกอร์

3.1.4.13 เข็มเขี่ยเชื้อ

3.1.4.14 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.4.15 ปากคีบ

3.1.4.16 ฟอยล์

3.1.4.17 เยื่อกรองรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3.1.4.18 ไซริงค์ฉีดยา

3.1.4.19 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

3.1.4.20 สำลีพันไม้

3.1.4.21 จุกสำลี

3.1.4.22 หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก

3.1.4.23 ยาปฏิชีวนะ Tetracycline ความเข้มข้น 250 mg/L

3.1.5 เครื่องมือ

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัยมีดังนี้

3.1.5.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

3.1.5.2 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.1.5.3 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

3.1.5.4 เครื่องชั่งอย่างละเอียด (Analytical Balance)

3.1.5.5 เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator)

3.1.5.6 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)

3.1.5.7 แท่งเจาะวุ้น (Cork borer)

3.1.5.8 ตู้เย็น (Refrigerator)

3.1.5.9 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaker Incubator)

3.1.5.10 เครื่องปั่น (Grinder)

3.1.5.11 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)

3.1.5.12 เครื่องกรอง (Suction pump)

**3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย**

**3.2.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากกระเทียม**

งานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดกระเทียมสด โดยใช้อุณหภูมิ และตัวทำละลายในการสกัดที่แตกต่างกัน โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด คือ 30 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงมาจาก สุญาณี มงคลตรีรัตน์ และคณะ, 2556) และตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ เมทานอล ร้อยละ 99.9 (v/v) และเอทานอลร้อยละ 99.9 (v/v)

**3.2.1.1 การสกัดโดยใช้เมทานอลร้อยละ 99.9 (v/v) และใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส**

นำส่วนกลีบกระเทียมสดมาคัดเลือกกลีบที่สมบูรณ์ นำกลีบกระเทียมมาล้างให้สะอาด สับกระเทียมให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และบดให้ละเอียด นำผงกระเทียม 40 กรัมมาแช่ในเอทานอลร้อยละ 99.9 ปริมาตร 120 มิลลิลิตร โดยแช่ในขวดรูปชมพู่ (ซึ่งมีอัตราส่วน 1:3) ใช้กระดาษฟอยล์ปิดคลุมบริเวณปากขวดรูปชมพู่ นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วันละ 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน และนำมากรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวไปกรองตะกอนออกด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 นำไประเหยตัวทำละลายออกให้มากที่สุดด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จากนั้นเก็บสารสกัดหยาบที่ได้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบครั้งต่อไป

**3.2.1.2 การสกัดโดยใช้เอทานอลร้อยละ 99.9 (v/v) และใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส**

นำส่วนกลีบกระเทียมสดมาคัดเลือกกลีบที่สมบูรณ์ นำกลีบกระเทียมมาล้างให้สะอาด สับกระเทียมให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และบดให้ละเอียด นำผงกระเทียม 40 กรัมมาแช่ในเมทานอลร้อยละ 99.9 ปริมาตร 120 มิลลิลิตร โดยแช่ในขวดรูปชมพู่ (ซึ่งมีอัตราส่วน 1:3) ใช้กระดาษฟอยล์ปิดคลุมบริเวณปากขวดรูปชมพู่ นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วันละ 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน และนำมากรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวไปกรองตะกอนออกด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 นำไประเหยตัวทำละลายออกให้มากที่สุดด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน

ภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จากนั้นเก็บสารสกัดหยาบที่ได้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบครั้งต่อไป

**3.2.1.3 การสกัดโดยใช้เมทานอลร้อยละ 99.9 (v/v) และใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส**

นำส่วนกลีบกระเทียมสดมาคัดเลือกกลีบที่สมบูรณ์ นำกลีบกระเทียมมาล้างให้สะอาด สับกระเทียมให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และบดให้ละเอียด นำผงกระเทียม 40 กรัมมาแช่ในเมทานอลร้อยละ 99.9 ปริมาตร 120 มิลลิลิตร โดยแช่ในขวดรูปชมพู่ (ซึ่งมีอัตราส่วน 1:3) ใช้กระดาษฟอยล์ปิดคลุมบริเวณปากขวดรูปชมพู่ นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส วันละ 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน และนำมากรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวไปกรองตะกอนออกด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 นำไประเหยตัวทำละลายออกให้มากที่สุดด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จากนั้นเก็บสารสกัดหยาบที่ได้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบครั้งต่อไป

**3.2.1.4 การสกัดโดยใช้เอทานอลร้อยละ 99.9 (v/v) และใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส**

นำส่วนกลีบกระเทียมสดมาคัดเลือกกลีบที่สมบูรณ์ นำกลีบกระเทียมมาล้างให้สะอาด สับกระเทียมให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และบดให้ละเอียด นำผงกระเทียม 40 กรัมมาแช่ในเมทานอลร้อยละ 99.9 ปริมาตร 120 มิลลิลิตร โดยแช่ในขวดรูปชมพู่ (ซึ่งมีอัตราส่วน 1:3) ใช้กระดาษฟอยล์ปิดคลุมบริเวณปากขวดรูปชมพู่ นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส วันละ 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน และนำมากรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวไปกรองตะกอนออกด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 นำไประเหยตัวทำละลายออกให้มากที่สุดด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จากนั้นเก็บสารสกัดหยาบที่ได้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบครั้งต่อไป

**3.2.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากข่า**

**3.2.2.1 สารสกัดโดยใช้ เอทานอลร้อยละ 99.9 และเมทานอลร้อยละ 99.9 เป็นตัวทำละลาย**

1. นำเหง้าข่ามาล้างทำความสะอาด แล้วนำมาหั่นให้มีขนาดเล็ก
2. นำเหง้าข่าที่หั่นแล้ว ไปอบจนแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักข่า เป็นระยะจนน้ำหนักแห้งคงที่

3. ชั่งข่าใส่ในขวด Duran Bottle หรือFlask แล้วเติมตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ99.9 (w/v) ในอัตราส่วนระหว่างข่ากับตัวทำละลาย 1:10 หรือเติม เมทานอลร้อยละ 99.9 (w/v) ในอัตราส่วนระหว่างข่ากับตัวทำละลาย 1:15

4. นำข่าในแช่ขวด Duran Bottle ไปแช่ใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปโซนิเคตความถี่ 50/60 เฮิร์ต ร่วมกับความร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับการนำข่าที่แช่ใน Flask วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเช้า-เย็น จนครบ 7 วัน

5. นำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น และกรองต่อด้วย Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำสารสกัดไประเหยออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบจากข่า และเก็บสารสกัดไว้ในขวดสีชาห่อฟอยด์ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

**3.2.3 การเตรียมสารสกัดหยาบจากขมิ้นชัน ทำการสกัด 2 วิธี**

**3.2.3.1 สกัดด้วยเครื่อง soxhlet extraction โดยใช้ตัวทำละลายต่อขมิ้นชันในอัตราส่วน 1:7**

1. นำผงขมิ้นชันมาสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 และเมทานอลร้อยละ 95

2. ทำการสกัดต่อเนื่องด้วยวิธี soxhlet extraction จากนั้นนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 – 50 °C จนได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเหนียวหนืดคล้ายน้ำผึ้ง

3. สารสกัดหยาบที่ได้ไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**3.2.3.2 การสกัดโดยการแช่โดยใช้ตัวทำละลายต่อขมิ้นชันในอัตราส่วน 1:7**

1. ขมิ้นชันอบแห้งปริมาตรทั้งหมด 130 กรัม แบ่งบรรจุลงในภาชนะ 2 ส่วน ในปริมาตร 65 กรัม

2. เติมตัวทำละลายเอทานอลร้อย 95 และเมทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 455 มิลลิลิตร สกัดในอัตราส่วนตัวทำละลายต่อขมิ้นชัน 1:7

3. หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน โดยเขย่าเช้าและเย็น

4. จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกกากสมุนไพรออกจากตัวทำละลาย

5. นำสารสกัดไปละเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) สารสกัดหยาบที่ได้ไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สำหรับการคำนวณร้อยละของสารสกัดจากกระเทียม ทำได้โดยคิดเป็นค่าร้อยละของผลผลิต (Percent yield) ดังสมการ (ดัดแปลงมาจาก วรยุทธ ยอดบุญ, 2555)

$$\text{ร้อยละของผลผลิต (\%)} = \frac{\left[\text{น้ำหนักแห้งของผลผลิตที่สกัดได้จากสมุนไพร (กรัม)}\right]}{\left[\text{น้ำหนักแห้งของสมุนไพรตั้งต้น (กรัม)}\right]} \times \mathbf{100}$$

### 3.2.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น

ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ Cross streak plate บน Nutrient agar นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเพาะเชื้อโดยวิธีการ Agar slant culture บน Nutrient agar slant นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดประมาณ 1-2 ลูป ใส่ในอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำไปเจือจางให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland standard ($1 \times 10^8$ CFU/ml) และวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร (ดัดแปลงมาจาก Janta and Thaharn, 2018)

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากหัวกระเทียมด้วยวิธี Agar well diffusion (ดัดแปลงมาจาก กัญญา แปลงโฉม และ พรพิมล กาญจนวาศ, 2558)

#### 3.2.4.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

เตรียมสารสกัดหยาบที่ใช้ทดสอบที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 560 mg/g โดยทำการชั่งสารสกัดหยาบ 0.5 กรัม นำสารสกัดหยาบมาละลายในตัวทำละลาย (มวลของตัวทำละลาย เท่ากับ 0.393 กรัม) ได้แก่ เอทานอลร้อยละ 99.9 (v/v) และเมทานอลร้อยละ 99.9 (v/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเยื่อกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร

#### 3.2.4.2 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบแบ่งเป็น แบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* (DMST 8840) และ *B. cereus* (ATCC 035) และแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *E. coli* (ATCC 0074) และ *S.* Typhi (TISTR 2519) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

### 3.2.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

นำหลอดทดลองที่บรรจุเชื้อแบคทีเรียที่มีความขุ่นของเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งมีความเข้มข้นของแบคทีเรียประมาณ $1 \times 10^8$ CFU/ml มาทำการ swab โดยใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงใน

เชื้อที่เตรียมไว้ บิดพอหมาด ๆ ข้างหลอดทดลอง นำมาเกลี่ยบนอาหาร Mueller Hinton agar โดยการป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารทั้ง 3 ด้าน และทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งไม่เกิน 30 นาที จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรด้วย แท่งเจาะวุ้น แล้วเติมสารสกัดหยาบความเข้มข้น 560 mg/g ลงในหลุม หลุมละ 20 ไมโครลิตร ทำการทดลองแต่ละตัวอย่างจำนวนซ้ำ 4 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดขนาดบริเวณวงใสที่เกิดขึ้นรอบหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Inhibition zone) รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิเมตร

ทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง โดยเปลี่ยนจากสารสกัดจากกระเทียมเป็นตัวควบคุม ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ อาหาร Mueller Hinton broth (MHB), เอทานอลร้อยละ 99.9 : Negative control, เมทานอลร้อยละ 99.9 : Negative control, ยาปฏิชีวนะ Tetracycline ความเข้มข้น 250 mg/L : Positive control สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ทำการทดลองแต่ละตัวอย่างจำนวนซ้ำ 4 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการดูบริเวณวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear zone) รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิเมตร