บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

หน่อกระวานที่ใช้ในการวิจัยนี้นำมาจากอำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี

3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

3.2.1 *Bacillus subtilis* TISTR 1248

3.2.2 *Escherichia coli* ATCC 25922

3.2.3 *Klebsiella pneumoniae* TISTR 1867

3.2.4 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.2.5 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการชีววิทยา ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี

3.3 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave)
2. เครื่องอบความร้อนแห้ง (Hot air oven)
3. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow)
4. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
5. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)
6. เตาไฟฟ้า (Hotplate)
7. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)
8. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
9. กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
10. เครื่องปั่นไฟฟ้า
11. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
12. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 13 × 100 และ 16 × 150 มิลลิลิตร
13. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Rack)
14. พาราฟิล์ม (Para film)
15. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Auto pipettes)
16. ปิเปตทิป (Pipette Tip)
17. ขวดรูปชมพู่ (Flask)
18. ปิเปตต์ (Pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

19. กรวยกรอง (Funnel)
20. กระดาษกรอง เบอร์ 1 Whatman Number 1
21. แผ่นสไลด์ กล้องจุลทรรศน์ (Microscope slides)
22. แผ่นปิดสไลด์ (Cover slide)
23. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
24. ไม้พันสำลี (Cotton swabs)
25. ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
26. บีกเกอร์ (Beaker)
27. Paper disc
28. โถดูดความชื้น (Desiccator)
29. ขวดแก้วปากกว้าง
30. ผ้าขาวบาง
31. ขวดสีชา

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar (NA)
2. Mueller Hinton Broth (MHB)
3. Mueller Hinton Agar (MHA)

3.3.3 สารเคมี

1. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide ; DMSO)
2. เอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Ethanol)
3. เฮกเซน (Hexane)

3.3.4 ยาปฏิชีวนะ

Gentamicin 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ ยี่ห้อ Acme genta

3.4 วิธีการดำเนินการ

3.4.1 การเตรียมพืชสมุนไพร

เก็บและรวบรวมหน่อกระวานจาก อำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี ที่มีอายุระหว่าง 1 - 2 ปี มาล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปตากแดดจนแห้ง และนำมาอบแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าก่อนทำการศึกษาในขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.4.2 การสกัดสารจากหน่อกระวานด้วยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration) (ดัดแปลงมาจากวิธีของ ณรงค์ศักดิ์ สารใจ (2553)

นำผงกระวานที่ได้จากข้อ 3.4.1 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 500 กรัม ห่อด้วยผ้าขาวปราศจากเชื้อใส่ลงในภาชนะทึบแสงที่มีฝาปิด จากนั้นนำไปสกัดสารออกฤทธิ์โดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักแห้งต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 : 4 โดยแบ่งตัวทำละลายออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เฮกเซนและเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้ง 2 ตัวทำละลายนี้จะทำการสกัดโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา

72 ชั่วโมง และเขย่าระหว่างทำการสกัดเป็นระยะ หลังจากนั้นกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman Number 1 แล้วนำไปสกัดซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้ตัวทำละลายปริมาตรเท่าเดิม และนำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้ว ไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง Rotary evaporator จนได้สารสกัดหยาบ (crude extract) นำมาคำนวณหาผลผลิต (% yield) จากสูตร

$$\text{ผลผลิต (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัด (เมื่อแห้งเป็นผง)} \times 100}{\text{น้ำหนักสมุนไพรที่ใช้}}$$

จากนั้นนำสารสกัดหยาบเก็บในขวดสีชาที่ปราศจากเชื้อ นำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) ที่อุณหภูมิห้อง

3.4.3 การเตรียมสารสกัดเพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ชั่งสารสกัดหยาบจากข้อ 3.4.2 จำนวน 0.5 กรัม ละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.4.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 , *B. subtilis* TISTR 1248, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *K. pneumoniae* TISTR 1867 ที่ใช้ในการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเขี่ยโคโลนีเชื้อที่เลี้ยงใน NA มาเลี้ยงในอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นของแบคทีเรียให้มีค่าเทียบเท่ากับ McFarland standard Number 0.5 ซึ่งมีปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^{8} CFU/ml เพื่อเป็นการควบคุมปริมาณเชื้อให้เท่ากันทุกครั้งที่ทดสอบ

3.4.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ดัดแปลงมาจาก พิกุล อินต๊ะปาน (2556)

ใช้ไม้พันสำลี (Cotton swab) ปลอดเชื้อจุ่มลงในหลอดเพาะเชื้อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.4 นำไปเกลี่ยให้ทั่วบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) จากนั้นนำ Paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ปราศจากเชื้อเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO หรือยาปฏิชีวนะ Gentamicin (ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์) ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม แล้วผึ่งให้แห้งในภาชะปลอดเชื้อ แล้วนำไปวางบนผิวหน้าอาหารที่ทำการเกลี่ยเชื้อไว้แล้ว จากนั้นนำจานอาหารไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบันทึกผลการทดลองโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสการยับยั้งและเลือกสารสกัดที่ให้ผลบวกนำไปทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ต่อไป

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.4.6 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ดัดแปลงมาจาก อัฐญาพร ชัยชมภู (2555)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบลงในอาหาร MHB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard Number 0.5 และเจือจางด้วยอาหาร MHB ให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 2×10^5 CFU/ml แล้วทำการเจือจางสารสกัดและยาปฏิชีวนะ Gentamicin แบบสองเท่าลำดับส่วน (Two-fold serial dilution) ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อ/มิลลิลิตร และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเติมสารต่างๆ ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารที่เติมในหลอดทดลองในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

สาร	ปริมาณที่เติม (มิลลิลิตร) ในหลอดทดลองที่									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
สารสกัดจากหน่อกระวาน	0.5	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-
อาหาร MHB	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เติม, แต่ละหลอดทดสอบปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร

↷ หมายถึง ดูดออกใส่หลอดต่อไป

↗ หมายถึง ดูดทิ้งไป

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูความขุ่นของเชื้อทดสอบในหลอดทดลองด้วยตาเปล่า เทียบกับหลอดควบคุม (หลอดที่ 9 และ 10)

3.4.7 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ดัดแปลงมาจาก อัฐญาพร ชัยชมภู (2555)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

นำหลอดทดลองที่ไม่เห็นการเจริญของเชื้อทดสอบมาขีดลากลงบนอาหาร MHA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการอ่านผลการทดสอบโดยดูการเจริญของเชื้อ โดยความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ 99.5 เปอร์เซ็นต์ คือค่า MBC

3.4.8 การเตรียมผลิตภัณฑ์สเปรย์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดกระวาน

นำสารสกัดจากกระวานที่มีฤทธิ์ดีมาเตรียมในรูปสเปรย์จนได้เนื้อสัมผัสที่ต้องการและมีลักษณะทางกายภาพที่น่าใช้จำนวน 5 สูตร โดยองค์ประกอบของสเปรย์ประกอบด้วย Methyl

paraben, Propylene glycol, Triethanolamine, 70% Ethanol น้ำกลั่นไร้เชื้อที่ปริมาตรแตกต่างกัน (ภาคผนวก ข) และสารสกัดกระวาน โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า MIC

3.4.9 การทดสอบต้นแบบผลิตภัณฑ์สเปรย์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบผลิตภัณฑ์สเปรย์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากกระวานด้วยวิธี Agar well plate diffusion โดยการถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร MHB จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับปริมาณของเชื้อโดยให้ความขุ่นของแบคทีเรีย มีค่าเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มลงในหลอดเพาะเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด จากนั้นนำไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA นำจุกค็อก (Cork borer) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะลงบนอาหารวุ้น หลังจากนั้นบรรจุผลิตภัณฑ์สเปรย์ต้านเชื้อแบคทีเรีย DMSO และยาปฏิชีวนะ gentamicin ลงไปในหลุมๆ ละ 20 ไมโครลิตร นำจานอาหารทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการบันทึกผลการทดลองโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสในการยับยั้งเชื้อ

3.4.10 การทดสอบความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์สเปรย์กระวาน (ดัดแปลงจากอัฐญาพร ชัยชมภู, 2555)

ทำการสำรวจความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์ไม่น้อยกว่า 10 คน โดยไม่ระบุจำนวนเพศ ซึ่งมีอายุระหว่าง 15 - 60 ปี โดยใช้แบบสอบถามให้คะแนน ซึ่งแบ่งออกเป็นระดับ 1 หมายถึง น้อยที่สุด 2 หมายถึง น้อย 3 หมายถึง ปานกลาง 4 หมายถึง มาก 5 หมายถึง มากที่สุด โดยประเมินจากลักษณะภายนอก ความพึงพอใจในด้าน สี กลิ่น ความหนืด และการแยกชั้น

3.4.11 การทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังของผลิตภัณฑ์สเปรย์กระวาน (ดัดแปลงจากอัฐญาพร ชัยชมภู, 2555)

คัดเลือกอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรงจำนวนไม่น้อยกว่า 10 คน มาทำการตรวจสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังด้วยผลิตภัณฑ์สเปรย์กระวาน โดยทำความสะอาดบริเวณต้นแขนด้านในด้วยสำลีชุบน้ำกลั่นไร้เชื้อและเอทานอล 70% และทำการแบ่งบริเวณทดสอบเป็น 2 ช่อง ขนาดช่องละ 1 x 1 เซนติเมตร โดยบริเวณที่ 1 ทดสอบการทาด้วยน้ำกลั่น และบริเวณที่ 2 ทำการทาผลิตภัณฑ์สเปรย์กระวาน จากนั้นปิดบริเวณทดสอบด้วยผ้าพันแผลเป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดึงผ้าพันแผลออก และรอประมาณ 15 นาที จึงอ่านผลจากตรงกลางของบริเวณที่ปิดผ้าพันแผล โดยให้คะแนนตามหลักเกณฑ์ดังนี้

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

0	:	ไม่เกิดอาการแพ้
+	:	แดงเล็กน้อย
++	:	แดงมากแต่บริเวณผิวยังเรียบเนียน
+++	:	แดงและมีตุ่มเกิดขึ้น ผิวไม่เรียบ
++++	:	แดงเป็นตุ่ม มีการบวมของเลือด และมีการเกาะกลุ่มของตุ่ม และอาจแตกเป็นน้ำใสไหลออกมา