บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างเมล็ดลำไย

เมล็ดลำไยพันธุ์อีดอนำมาจาก ล้งลำไย ต้นเขาแหลม หมู่บ้านเขาแหลม ตำบลทับช้าง อำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี

3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

1. *Escherichia coli* ATCC 25922
2. *Bacillus subtilis* TISTR 1248
3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
4. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
5. *Klebsiella pneumoniae* TISTR 1867

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบในครั้งนี้ ได้รับมาจากห้องปฏิบัติการทางชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.3 เครื่องมือ

1. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) ยี่ห้อ Buchi รุ่น R - 124
2. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อ Hiraymma รุ่น HA - 30MII
3. เครื่องอบความร้อนแห้ง (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น 600
4. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ Issco รุ่น BV 124
5. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Jenway
6. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Microscope) ยี่ห้อ Nikon รุ่น ECLIPSE E200
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettle รุ่น NS 1602S
8. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Precisa รุ่น XT 220A
9. เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) ยี่ห้อ Vortex Genie - 2 รุ่น G-560E
10. เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ mettle รุ่น S20 - K
11. ออโต้ปิเปต (Auto pipette) ขนาด 20 - 200 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Biohit รุ่น 12574630
12. ออโต้ปิเปต (Auto pipette) ขนาด 100 - 1000 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Biohit รุ่น 12572173
13. เครื่องบดไฟฟ้า

14. โถดูดความชื้น (Desiccator)

3.4 วัสดุและอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
2. หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 13 x 100 และ 16 x 150 มิลลิเมตร
3. ปิเปต (Pipette) ขนาด 5 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร
4. ไมโครปิเปตทิป (Micropipeptte tip) ขนาด 20 - 200 และ 100 - 1000 ไมโครลิตร
5. แท่งแก้ว (Glass stirring rod)
6. ตะแกรงตั้งหลอดทดลอง (Rack)
7. ปากคีบ (Forcep)
8. กระบอกตวง (Cylinder)
9. กรวยกรอง (Funnel)
10. ขวดดูแรน (Laboratory bottle)
11. ขวดรูปชมพู (Erlenmeyer flask) ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
12. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
13. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
14. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol)
15. สไลด์ (Slide) และกระจกปิดสไลด์ (Cover glass)
16. Paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
17. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
18. ขวดแก้วปากกว้าง (Wide mouth glass jar)
19. ขวดฝาเกลียว (Screw top caps)
20. พาราฟิล์ม (Paraffin film)
21. ช้อนตักสาร (Spatula)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ (สูตรแสดงดังภาคผนวก ก)

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

3.6 สารเคมี (ส่วนประกอบและวิธีการเตรียมแสดงดังภาคผนวก ข)

1. เอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Ethanol)
2. ชุดย้อมแกรม
3. สารเทียบความขุ่นมาตรฐาน McFaland Number 0.5
4. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO)
5. ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน (Gentamicin) ยี่ห้อ Aenta
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
7. น้ำยาล้างจานสูตรมาตรฐาน

3.7 วิธีดำเนินการวิจัย

3.7.1 การสกัดสารจากเมล็ดลำไยด้วยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration) (อัฐญาพร ชัยชมภู, 2555)

นำเมล็ดลำไยสดที่ไม่เป็นโรคมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 50 - 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ทำการบดเมล็ดลำไยให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า จากนั้นนำผงลำไยมาสกัดสารออกฤทธิ์โดยใช้อัตราส่วนของผงเมล็ดลำไย (กรัม) ต่อตัวทำละลาย (มิลลิลิตร) เท่ากับ 1 : 4 โดยงานวิจัยนี้ใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย นำผงเมล็ดลำไยห่อด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปแช่ตัวทำละลายในภาชนะทึบแสงที่มีฝาปิด ทำการสกัดสารออกฤทธิ์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยทำการเขย่าระหว่างทำการสกัดเป็นระยะ เมื่อครบเวลานำสารละลายที่สกัดด้วยเอทานอล มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman no. 1) จนไม่มีตะกอน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส นำสารสกัดหยาบที่ได้มาคำนวณหาผลผลิตร้อยละ (Percentage yield) จากสูตร

$$\text{ผลผลิตร้อยละ} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดเข้มข้น (เมื่อทำให้แห้งเป็นผง)} \times 100}{\text{น้ำหนักสมุนไพรที่ใช้}}$$

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.7.2 การเตรียมสารสกัดเพื่อใช้ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (อัฐญาพร ชัยชมภู, 2555)

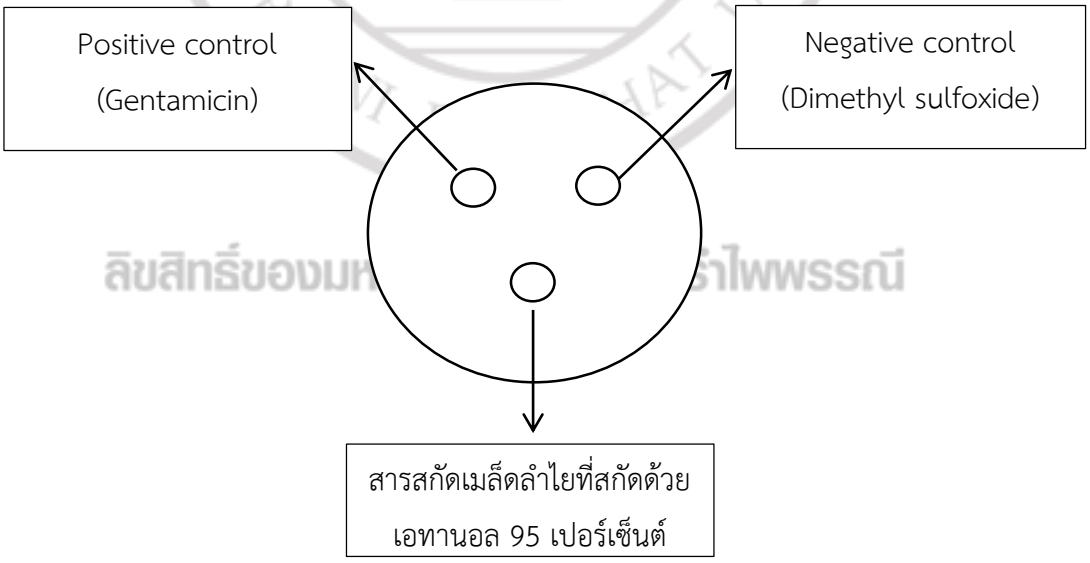
นำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 3.7.1 หนัก 0.5 กรัม ใส่ลงในขวดสีชาที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.7.3 การเตรียมตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* TISTR 1248, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 และ *K. pneumoniae* TISTR 1867 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนี (Colony) ของเชื้อที่เพาะเลี้ยงใน NA มาเลี้ยงในอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียทดสอบมาเจือจางให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard Number 0.5 จะได้เชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml

3.7.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion (พิกุล อินต๊ะปาน, 2556)

นำไม้พันสำลี (Cotton swab) ปลอดเชื้อจุ่มลงในหลอดเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นแล้ว จากนั้นนำมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 3 – 5 นาที นำดิสก์ (Disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เติมสารสกัดที่ได้เตรียมไว้ในข้อ 3.7.2 ลงไปปริมาตร 20 ไมโครลิตร รอให้แห้งประมาณ 5 - 10 นาที โดยนำมาวางบนผิวหน้าอาหาร MHA ที่ทำการเกลี่ยเชื้อไว้แล้ว ควบคุมการทดลองโดย DMSO และยาปฏิชีวนะ gentamicin ซึ่งใช้เป็น negative control และ positive control ตามลำดับ จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสการยับยั้ง (Inhibition zone หรือ Clear zone) ตำแหน่งการวาง disc แสดงดังภาพ 3.1



ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาพที่ 3.1 ตำแหน่งการวางดิสก์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

3.7.5 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี broth dilution technique (อัฐยาพร ชัยชมภู, 2555)

ทำการเจือจางสารสกัดและยาปฏิชีวนะ gentamicin แบบสองเท่าลำดับส่วน (Two-fold serial dilution) ในอาหาร MHB ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการเติมแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดที่ทำการปรับความขุ่นให้มีค่าเท่ากับ McFarland Number 0.5 ลงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดหรือยาปฏิชีวนะ gentamicin อัตราส่วน 1 : 1 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการตรวจสอบความขุ่นของเชื้อทดสอบโดยการเปรียบเทียบความขุ่นของแบคทีเรียในหลอดทดลองกับหลอดควบคุม ทั้งนี้การเติมสารสกัด และสารทดสอบต่าง ๆ ในแต่ละหลอดทดลองแสดงดังตาราง 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารที่เติมในหลอดทดลองในการหาค่า MIC

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

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เติม, แต่ละหลอดทดสอบปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร

↷ หมายถึง ดูดออกใส่หลอดต่อไป

3.7.6 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ (Minimal bactericidal concentration, MBC) โดยวิธีการ Streak plate

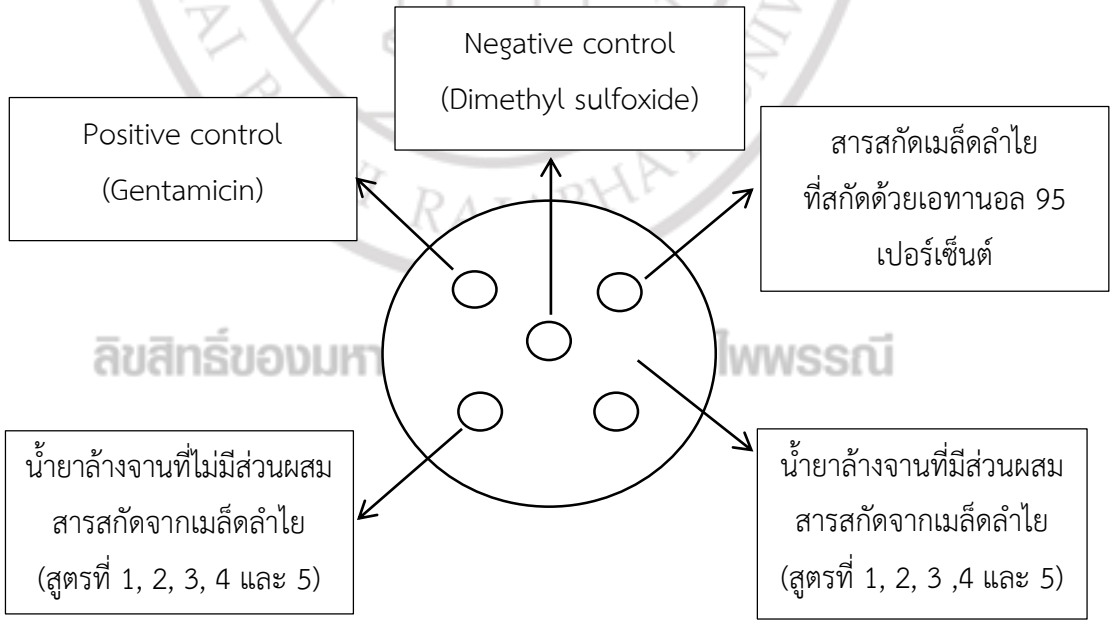
จากค่า MIC สามารถนำมาหาค่า MBC ได้ โดยการนำหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำสุด จากข้อ 3.7.5 ที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียมาขีด (Streak) ลงบนอาหาร MHA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยการสังเกตจานเพาะเชื้อที่ไม่พบการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ

3.7.7 การเตรียมผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดลำไย

นำสารสกัดจากเมล็ดลำไยผสมกับน้ำยาล้างจานสูตร 1 - 5 ซึ่งประกอบด้วย sodium lauryl ether sulfate (SLES), linear alkylbenzene sulfonate (LAS), sodium chloride (NaCl), preservatives, sodium lauryl sulfate (SLS) และน้ำกลั่นไร้เชื้อปริมาตรต่าง ๆ (ภาคผนวก ข) เพื่อสร้างผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า MIC ของสารสกัด

3.7.8 การทดสอบความสามารถของน้ำยาล้างจานที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดลำไยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion

นำไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มลงในหลอดเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นแล้ว นำมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร MHA ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 3 – 5 นาที จากนั้นเติมสารสกัดที่ได้เตรียมไว้ในข้อ 3.7.2 น้ำยาล้างจานที่ไม่ได้ผสมสารสกัดจากเมล็ดลำไย (สูตรที่ 1, 2, 3, 4 และ 5) และน้ำยาล้างจานที่ผสมสารสกัดจากเมล็ดลำไย (สูตรที่ 1, 2, 3, 4 และ 5) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในดิกส์ ที่ปราศจากเชื้อ และทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 - 10 นาที จากนั้นนำมาวางไว้บนผิวหน้าอาหาร MHA ที่ได้ทำการเกลี่ยเชื้อไว้แล้ว ซึ่งควบคุมการทดลองโดยใช้ DMSO และยาปฏิชีวนะ gentamicin นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสการยับยั้ง ตำแหน่งการวางดิสก์ของน้ำยาล้างจานแต่ละสูตรแสดงดังภาพ 3.2



ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาพที่ 3.2 ตำแหน่งการวางดิสก์ของน้ำยาล้างจานแต่ละสูตร

3.7.9 การทดสอบความพึงพอใจในการใช้ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดลำไย

คัดเลือกอาสาสมัครจำนวนไม่น้อยกว่า 10 คน มาประเมินความพึงพอใจที่มีต่อผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดลำไย ทำการประเมินความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ โดยพิจารณาจาก รูปลักษณ์ภายนอกและความน่าใช้ของผลิตภัณฑ์ ความเป็นเนื้อเดียวกัน ความพึงพอใจในสี ความพึงพอใจในกลิ่น ความพึงพอใจในการมีฟอง ความพึงพอใจในความหนืด และความชอบโดยรวม ซึ่งคะแนนระดับ 1 หมายถึง ควรปรับปรุง คะแนนระดับ 2 หมายถึง น้อย คะแนนระดับ 3 หมายถึง พอใช้ คะแนนระดับ 4 หมายถึง ดี และคะแนนระดับ 5 หมายถึง ดีมาก ซึ่งจะนำค่าที่ได้จากการทดสอบความพึงพอใจในการใช้ผลิตภัณฑ์ไปวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยทางสถิติต่อไป

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี