บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1) เครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator), R-124, Buchi, Switzerland
2) เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์ (Analytical Balance), MS 204, Mettler Toledo, Switzerland
3) เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (Microplate Reader), SPECTRO star Nano, BMG Labtech, Germany
4) เครื่องผสมสาร (Vortex), VTX-3000 L, Laboratory & Medical Supplies, Japan
5) เครื่องดูดจ่ายสารละลายแบบทางเดียว (Single Channel Pipette), Pipetman G P100G, Gilson, USA
6) เครื่องดูดจ่ายสารละลายแบบหลายทาง (Multi Channel Pipette), Pipetman L P8X200L, Gilson, USA
7) เตาอบลมร้อน (Hot Air Oven), DLE500, Memmert, Germany
8) เครื่องปั่น (Blender), MX-337N, Matsushita Electronic Industrial, Malaysia
9) เครื่องให้ความร้อน (Hot plate), Kendo Electric, Thailand
10) ขวดโหลแก้ว (Glass jar) ขนาด 2.5 ลิตร
11) ถุงผ้าฝ้าย (Cotton bag)
12) ขวดบรรจุสาร (Laboratory Bottle)
13) ขวดระเหย (Evaporating Flask)
14) หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube)
15) ไมโครเวลเพลต (Microwellplate)
16) ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette Tip)
17) จานเพาะเชื้อจุลินทรีย์ (Petri dish)

3.1.2 สารเคมี

1) เมทานอล (Methanol, CH_3OH), MW 32.04 g/mol, Commercial, Zen Point, Thailand
2) ดีพีพีเอช (DPPH, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, $C_{18}H_{12}N_5O_6$), AR, Assay 85.0 %, MW 394.32 g /mol, Sigma Aldrich, USA

3) เอบีทีเอส (ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt, $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$), HPLC, Assay 98%, MW 514.62 g /mol, Sigma Aldrich, USA

4) โทรลอกซ์ (Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, $C_{14}H_8O_2$), Assay 97.0 %, MW 250.29 g /mol, Sigma Aldrich, USA

5) วิตามินซี (L-ascorbic acid, $C_6H_8O_6$), AR, Assay 99.0 %, MW 176.13 g /mol, Chem Supply, Australia

6) โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium Persulphate, $K_2S_2O_8$), AR, Assay 99.0 %, MW 270.32 g /mol, Ajax Finechem, Australia

7) กรดแกลลิก (Gallic acid monohydrate, $C_7H_6O_5•H_2O$), AR, Assay 98.0 %, MW 188.13 g/mol, Sigma Aldrich, USA

8) สารโฟลิน-ซิโอแคลตู (Folin–Ciocalteu reagent), Assay 99.9 %, Lobachemie, India

9) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate, Na_2CO_3), AR, Assay 99.8 %, MW 105.99 g/mol, Ajex Finechem, Australia

10) เควอร์ซิทิน (Quercetin, $C_{15}H_{10}O_7$), AR, Assay 95.0 %, MW 302.24 g/mol, Sigma Aldrich, USA

11) โซเดียมไนไตรต์ (Sodium nitrite, $NaNO_2$), AR, Assay 98.0 %, MW 69.0 g/mol, RCI Labscan, Thailand

12) อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride, $AlCl_3•6H_2O$), AR, Assay 99.0 %, MW 241.45 g/mol, Lobachemie, India

13) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH), AR, Assay 99.0 %, MW 40.0 g/mol, RCI Labscan, Thailand

14) คลอโรฟอร์ม (Chloroform, $CHCl_3$), AR, Assay 99.8 %, MW 119.38 g/mol, RCI Labscan, Thailand

15) กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4), AR, Assay 98.0 %, MW 98.08 g/mol, RCI Labscan, Thailand

16) กรดแกลเซียลแอซีติก (Glacial acetic acid, CH_3COOH), AR, Assay 99.7 %, MW 60.05 g/mol, RCI Labscan, Thailand

17) เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride, $FeCl_3$), Assay 98.0 %, MW 162.21 g/mol, Ajax Finechem, Australia

18) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl), ACS, Assay 37.0 %, MW 36.50 g/mol, Emsure, Australia

19) แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide, NH_4OH), AR/ACS, Assay 30.0 %, MW 35.05 g/mol, Lobachemie, India

20) น้ำยาทดสอบเมเยอร์ (Mayer's reagent)

- เมอร์คิวริก (II) คลอไรด์ (Mercuric (II) chloride, $HgCl_2$), AR, Assay 99.5 %, MW 271.50 g/mol, RFCL Limited, India
- โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide, KI), ACS, Assay 99 %, MW 166.00 g/mol, Ajax Finechem, Australia

21) โลหะแมกนีเซียม (Magnesium, Mg)

22) อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ Nutrient agar (NA) และ Nutrient broth (NB)

3.1.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

1) *Bacillus cereus*
2) *Staphylococcus aureus*
3) *Escherichia coli*
4) *Enterobacter aerogenes*

3.1.4 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างใบของพืชสมุนไพรทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ หงอนไก่อู (*Barleria strigosa*) และฮ่อสะพายควาย (*Arnicratea grahamii*) ทำการเก็บตัวอย่างพืชจากป่าชุมชนบ้านหัวทุ่ง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียวดาว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ เลือกใบที่สมบูรณ์ไม่มีโรคพืชและแมลงศัตรูพืช

3.2 การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี สารต้านอนุมูลอิสระและประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดของสารสกัดสมุนไพร

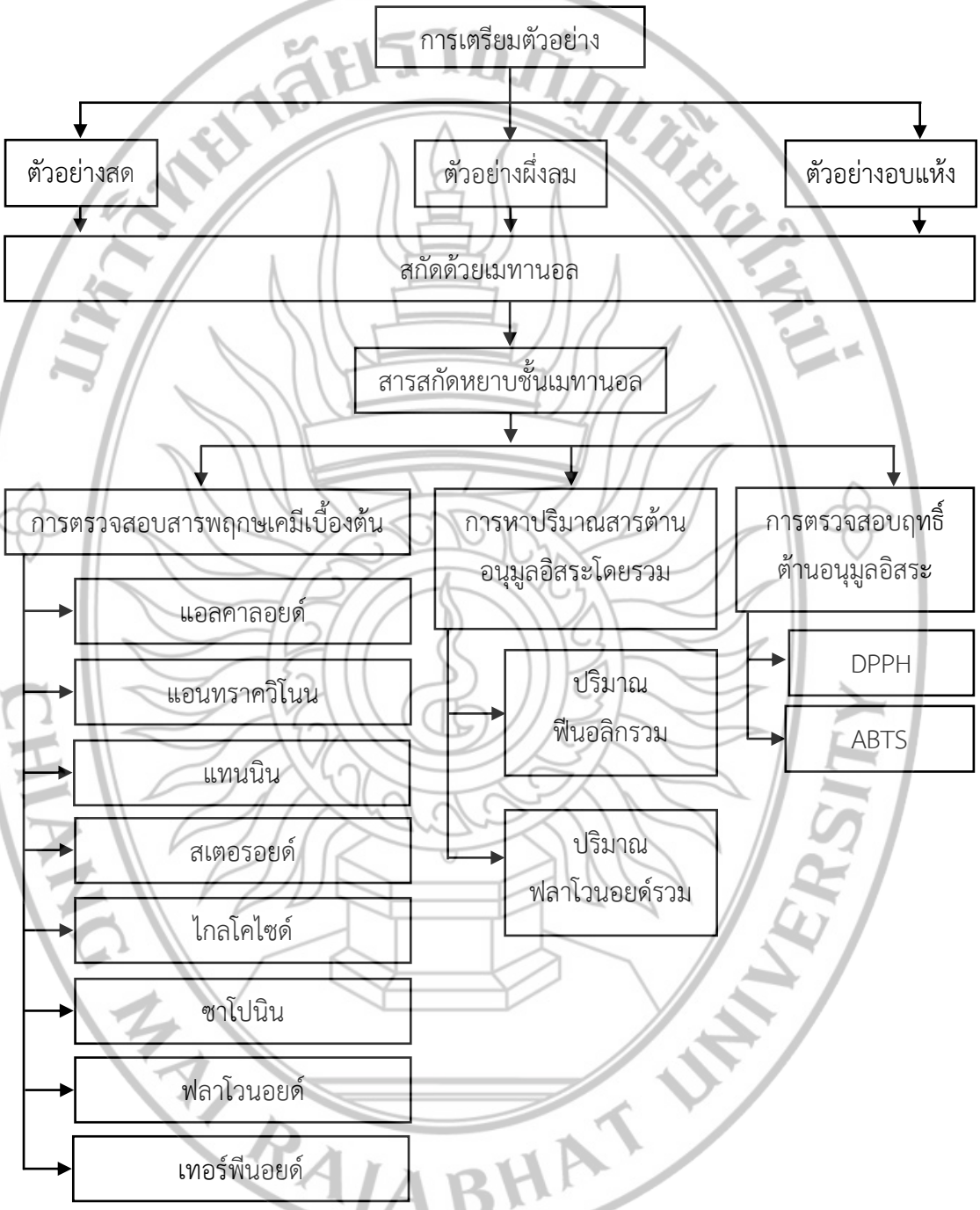
3.2.1 การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพรตัวอย่าง

นำใบสมุนไพรตัวอย่าง ล้างให้สะอาดสะเด็ดน้ำให้แห้งจากนั้นแบ่งเป็น 3 ส่วน

- ส่วนที่1 ใบสด ให้นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายทันที
- ส่วนที่ 2 นำไปตากในที่ร่มที่มีอากาศถ่ายเทสะดวกจนแห้ง (2วัน)
- ส่วนที่ 3 นำไปตากในที่ร่มที่มีอากาศถ่ายเทสะดวกจนแห้ง แล้วนำไปอบแห้งอีกครั้งด้วยเตาอบลมร้อนที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

จากนั้นนำตัวอย่างสมุนไพรแต่ละส่วนไปบดให้ละเอียดแล้วนำมาทำการสกัดด้วยเมทานอล 3 ครั้ง ครั้งละ 1 สัปดาห์ โดยใช้อัตราส่วนของตัวอย่าง 1 กรัมต่อเมทานอล 5 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Vacuum evaporator) คำนวณร้อยละสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักพืชแห้ง (% yield) หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปหาปริมาณองค์ประกอบทางพฤกษเคมี สาร

ต้านอนุมูลอิสระ ตามขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 3.1 และประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิด



รูป 3.1 แผนผังขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

1) การตรวจสอบแอลคาลอยด์ (Alkaloids)

การตรวจสอบแอลคาลอยด์ เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Andriani Y. *et al.* (2015) โดยเตรียมน้ำยาทดสอบเมเยอร์ (Mayer's reagent) โดยชั่งสารเมอร์คิวริก (II) คลอไรด์ (HgCl) 1.36 กรัมและสารโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 5.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นชั่งสารสกัดตัวอย่าง 0.2 กรัม ลงในหลอดทดลอง ละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง (1 % v/v HCl) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่า แล้วหยดน้ำยาทดสอบเมเยอร์ (Mayer's reagent) จำนวน 2-3 หยด เขย่า ถ้าปรากฏตะกอนสีขาวแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

2) การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthaquinones)

การตรวจสอบแอนทราควิโนน เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Ayoola G.A. *et al.* (2008) โดยชั่งสารสกัดตัวอย่าง 0.2 กรัม ลงในหลอดทดลอง ละลายด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง (10 % v/v H_2SO_4) ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นโดยเครื่องให้ความร้อน (Hot plate) 5-10 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ปิเปตสารผสมใส่หลอดทดลอง ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารละลายแอมโมเนียเจือจาง (10% v/v NH_3) จำนวน 2-3 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

3) การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

การตรวจสอบแทนนิน เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Samejo M.Q. *et al.* (2013) โดยชั่งสารสกัดตัวอย่าง 0.5 กรัม ลงในหลอดทดลอง ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำไปอุ่นโดยเครื่องให้ความร้อน (Hot plate) 5-10 นาที จากนั้นหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เจือจาง (0.1% w/v $FeCl_3$) จำนวน 2-3 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

4) การตรวจสอบสเตอรอยด์ (Steroids)

การตรวจสอบสเตอรอยด์ เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Gowri S.S. *et al.* (2010) โดยชั่งสารสกัดตัวอย่าง 0.1 กรัม ลงในหลอดทดลอง ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก จากนั้นหยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ให้ไหลลงข้างๆ หลอดจำนวน 5 หยด ถ้าปรากฏสีน้ำตาลแดงที่ตรงกลางระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบสเตอรอยด์

5) การตรวจสอบไกลโคไซด์ (Glycosides)

การตรวจสอบไกลโคไซด์ เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Samejo M.Q. *et al.* (2013) โดยชั่งสารสกัดตัวอย่าง 0.2 กรัม ลงในหลอดทดลอง ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก เติมกรดแกลเชียลแอซีติก (Glacial acetic acid, CH_3COOH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร หยดสารละลายเฟอริกคลอไรด์เจือจาง (0.1% w/v $FeCl_3$) จำนวน 2-3 หยด จากนั้นหยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) จำนวน 2-3 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสีเขียวเข้มหรือสีน้ำเงินแสดงว่าพบไกลโคไซด์

6) การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

การตรวจสอบซาโปนิน เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Andriani *Y. et al.* (2015) โดยชั่งสารสกัดตัวอย่าง 0.2 กรัม ลงในหลอดทดลอง ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรุนแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบซาโปนิน

7) การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

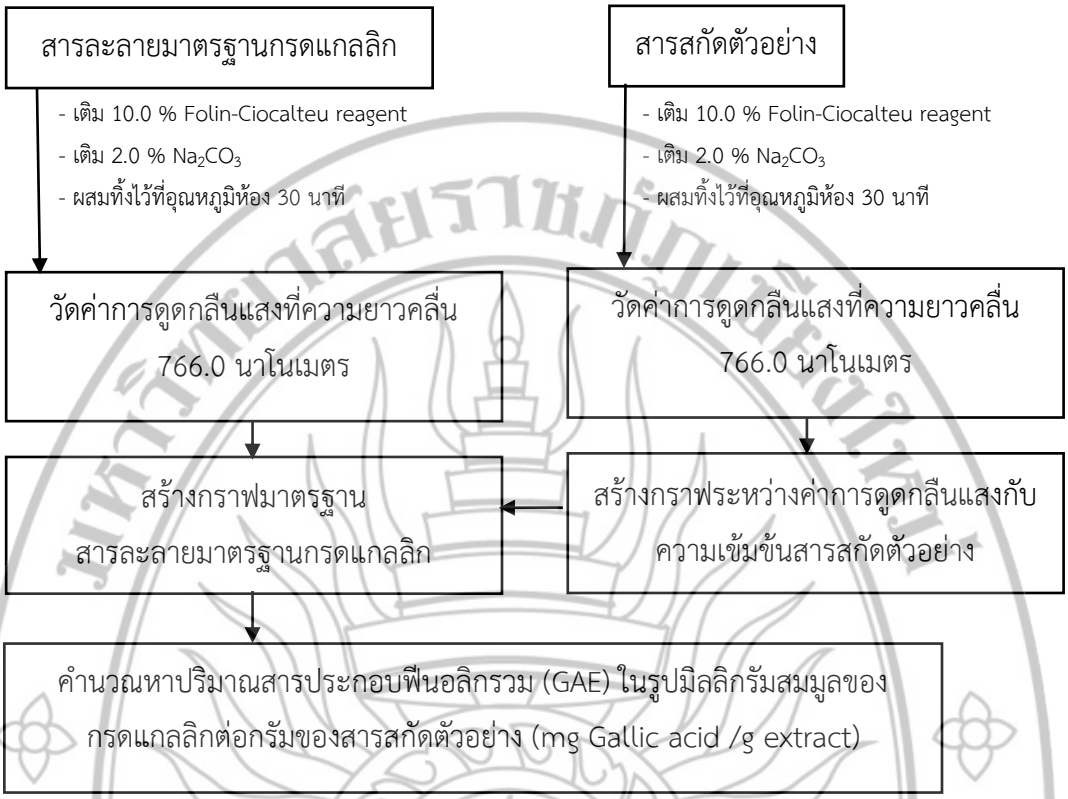
การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Gowri S.S. *et al.* (2010) โดยชั่งสารสกัดตัวอย่าง 0.2 กรัม ลงในหลอดทดลอง ละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตรเขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง (1% v/v HCl) จำนวน 5-10 หยด เติมโลหะแมกนีเซียม จำนวน 2-3 ชิ้น เขย่า จากนั้นนำไปอุ่นโดยเครื่องให้ความร้อน (Hot plate) 10-15 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงหรือสีแดงชมพูแสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

8) การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)

การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Gowri S.S. *et al.* (2010) โดยชั่งสารสกัดตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลอง ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏสีน้ำตาลแดงแสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์

3.2.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และคณะ (2013) โดยสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้นระหว่าง 0.01-0.12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10.0% (v/v) ปริมาตร 100.0 ไมโครลิตร และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 2.0% (w/v) ปริมาตร 80.0 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 766.0 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (Microplate Reader) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid equivalent : GAE) ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Gallic acid /g extract) ดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูป 3.2 แผนภาพแสดงการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

3.2.4 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric method เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Naheed Z. *et al.* (2017) โดยสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานเควอร์ซิติน (Quercetin) ความเข้มข้นระหว่าง 2.0-16.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้น 0.5 mol/L ปริมาตร 6.0 ไมโครลิตร เติมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้น 0.3 mol/L ปริมาตร 6.0 ไมโครลิตร และเติมเมทานอล ความเข้มข้น 30.0 % (v/v) ปริมาตร 136 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1.0 mol/L ปริมาตร 40.0 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 506 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (Microplate Reader) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานเควอร์ซิติน (Quercetin equivalent : QE) ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของเควอร์ซิติน ต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Quercetin /g extract) ดังแสดงในรูปที่ 3.3

รูป 3.3 แผนภาพแสดงการหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

3.2.5 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1) การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีดีพีพีเอช (DPPH Method)

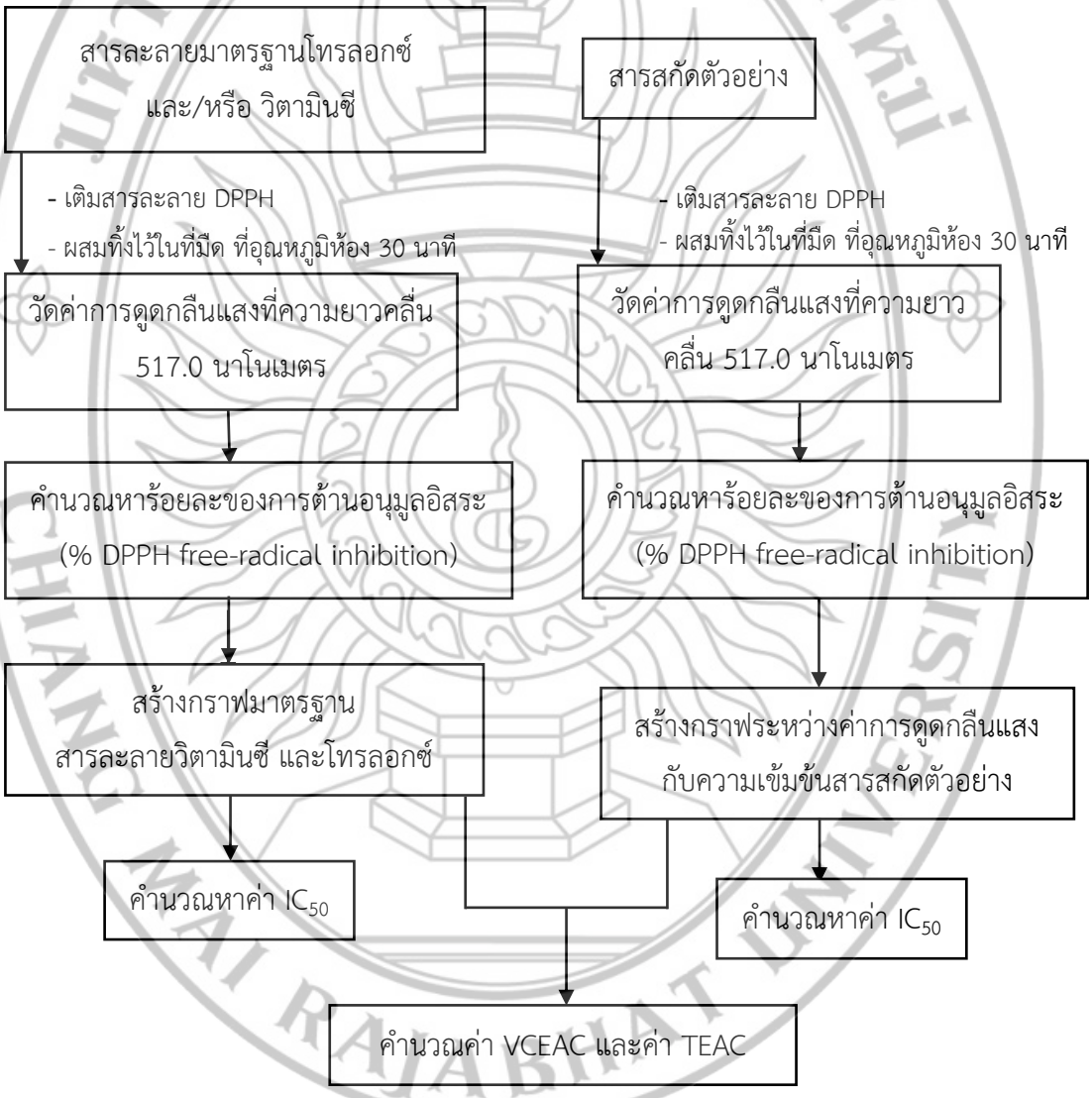
การตรวจสอบฤทธิ์การต้านต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH ดัดแปลงมาจากวิธีของสุริสา ศรีสุวรรณ์ และคณะ (2557) โดยใช้ โทรลอกซ์ (Trolox) และวิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน เตรียมในเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย (2,2-Diphenyl-1-pykril-hydrazyl : DPPH) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร นำสารผสมที่ได้เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517.0 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free-radical inhibition) ดังสมการที่ (3.1) จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานวิตามินซี และกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์ และหาความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน นำไปคำนวณหา (Vitamin C equivalent antioxidant capacity : VCEAC) ในรูปมิลลิกรัมของวิตามินซี ต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Vitamin C /g extract) และนำไปคำนวณหาค่า (Trolox equivalent antioxidant

capacity : TEAC) ในรูปมิลลิกรัมของโทรลอกซ์ต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Trolox /g extract) ดังแสดงในรูปที่ 3.4

$$\% \text{ DPPH free-radical inhibition} = \left[\frac{A_{control}-A_{sample}}{A_{control}}\right] \times 100 \quad \ldots (3.1)$$

เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารตัวอย่าง

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารตัวอย่าง



รูป 3.4 แผนภาพแสดงการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีดีพีพีเอช (DPPH Method)

2) การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีเอบีทีเอส (ABTS Method)

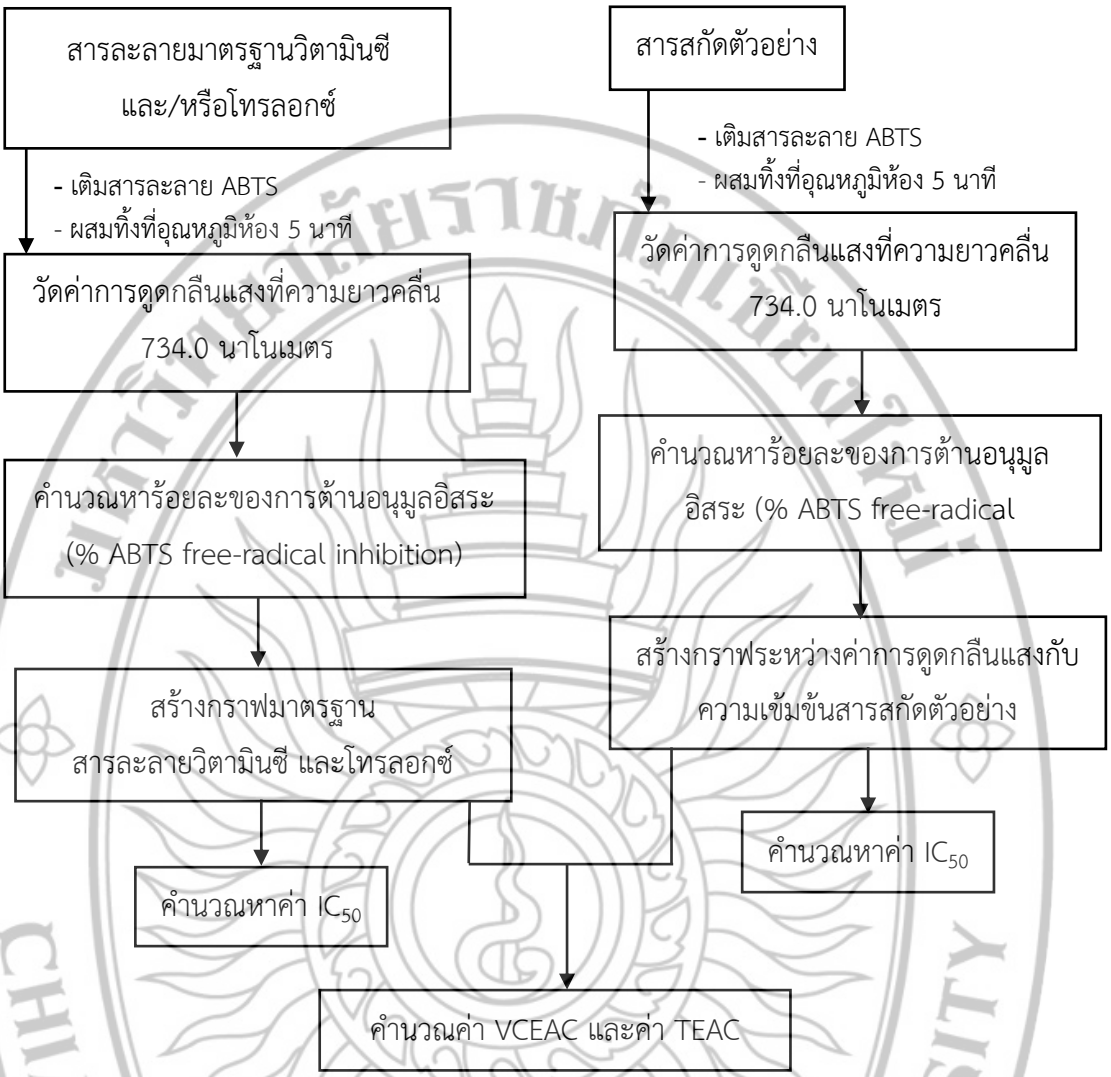
การตรวจสอบฤทธิ์การต้านต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงมาจากวิธีของสุริสา ศรีสุวรรณ์ และคณะ (2557) โดยใช้ วิตามินซี (Ascorbic acid) และโทรลอกซ์ (Trolox) เป็นสารมาตรฐานเตรียมในเมทานอล การเตรียมสารอนุมูลอิสระ(2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt : ABTS) โดยการผสมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7.0 มิลลิโมลาร์ กับ สารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายผสมที่เตรียมได้ 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 734.0 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% ABTS free-radical inhibition) ดังสมการที่ (3.2) จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานวิตามินซี และกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์ และหาความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน นำไปคำนวณหา (Vitamin C equivalent antioxidant capacity : VCEAC) ในรูปมิลลิกรัมของวิตามินซีต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Vitamin C /g Extract) และนำไปคำนวณหาค่า (Trolox equivalent antioxidant capacity : TEAC) ในรูปมิลลิกรัมของโทรลอกซ์ต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Trolox /g extract) ดังแสดงในรูปที่ 3.5

$$\% \text{ ABTS free-radical inhibition} = \left[\frac{A_{control} - (A_{sample} - A_{sample_0})}{A_{control}}\right] \times 100 \quad \ldots (3.2)$$

เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสม ที่ไม่มีสารตัวอย่าง

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสม ที่มีสารตัวอย่าง

A_{sample_0} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสาร ABTS ที่ไม่มีสารตัวอย่าง



รูป 3.5 แผนภาพแสดงการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีเอบีทีเอส (ABTS Method)

3.2.6. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพร

1) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* โดยการ streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ถ่ายโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชม. แล้วนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้ได้ประมาณ 0.80-1.00 (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/ml)

2) การเจือจางสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

เตรียมสารสกัดสมุนไพร ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ทำการเจือจางสารสกัดลดลงให้ได้ 5 ความเข้มข้น คือ 10, 5, 2.5, 1.0, 0.5 และ 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

3) การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพร ด้วย วิธี Agar well method

นำไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จุ่มลงในเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ จากนั้นเกลี่ยให้ทั่วจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ NA อยู่ ใช้ cork borer เจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.6 mm ใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดในข้อ 2) ที่เจือจางไว้ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุมอาหารโดยใช้เมทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone)

4) วิธีวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรมสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบ One-way ANOVA โดยทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น95%