

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ดอกกุหลาบ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ดอกกุหลาบมอญแดงประเสริฐ ดอกกุหลาบไกลกังวล และ ดอกกุหลาบปิชอบอังกฤษ จากอำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่

3.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis* และ *Escherichia coli* จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

- 1) Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ข)
- 2) Mueller-Hinton agar (MHA) (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, India)

3.4 อุปกรณ์และสารเคมี

3.4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1) เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator), R-124, Buchi, Switzerland
- 2) เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (Microplate reader), Spectro star-nano Multiskan Go, Bmg labtech, Germany
- 3) เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance), AG204, Mettler Toledo, Switzerland
- 4) ขวดสีชา (Amber glass bottle)
- 5) อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium Foil)
- 6) ผ้าขาวบาง (Straining cloth/Filter cloth)
- 7) ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
- 8) พลาสติกแรป (Wrap)
- 9) ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 1,000 mL
- 10) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 2,000 mL
- 11) กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 1,000 mL
- 12) กรวยกรอง (Funnel)
- 13) แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
- 14) ขวดก้นกลม (Round Bottom Flask) ขนาด 250 mL และ ขนาด 1,000 mL

3.4.2 สารเคมี

- 1) เมทานอล (Methanol, CH_3OH), AR, Assay 99.9%, Density 0.79 g/cm^3 , MW 32.05 g/mol, RCI Labscan, Thailand
- 2) เอทานอล (Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), Commercial, Assay 95%, MW 46.07 g/mol, Thailand
- 3) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH), AR, Assay 99%, Density 2.1 g/cm^3 , MW 40 g/mol, RCI Labscan, Thailand
- 4) วิตามินซี (Vitamin C, L-Ascorbic acid, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), AR, Assay 99%, MW 176.13 g/mol, Chem-Supply, Australia
- 5) เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride, FeCl_3), AR, Assay 99%, MW 162.21 g/mol, Ajax Finechem, Australia
- 6) ดีพีพีเอช (DPPH, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$), AR, Assay 85%, MW 394.32 g/mol, Sigma-aldrich, India
- 7) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3), AR, Assay 99.8%, MW 105.99 g/mol, Ajax Finechem, Australia
- 8) อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride, AlCl_3), AR, Assay 99%, MW 241.45 g/mol, LoBa chemie, India
- 9) เควอซีติน (Quercetin, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$), AR, Assay 95%, MW 302.24 g/mol, Sigma-aldrich, India
- 10) กรดแกลลิก (Gallic acid monohydrate, $\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}$), AR, Assay 98%, MW 107.12 g/mol, Fluka, Germany
- 11) โซเดียมไนไตรต์ (Sodium nitrite, NaNO_2), AR, Assay 98%, MW 69 g/mol, Merck, Germany
- 12) โทรลอคซ์ (Trolox, $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$), AR, Assay 97%, MW 250.29 g/mol, Sigma-aldrich, India
- 13) น้ำปราศจากไอออน (DI Water, Deionized Water)
- 14) ฟอลิน ซีโอแคลตู (Folin-Ciocalteu's Phenol reagent, $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ และ $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{W}_2\text{O}_5 \cdot 5\text{Mo}_2\text{O}_5 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), Analytical, Merck, Germany

3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

3.5.1 การเตรียมสารสกัดกุหลาบตัวอย่าง

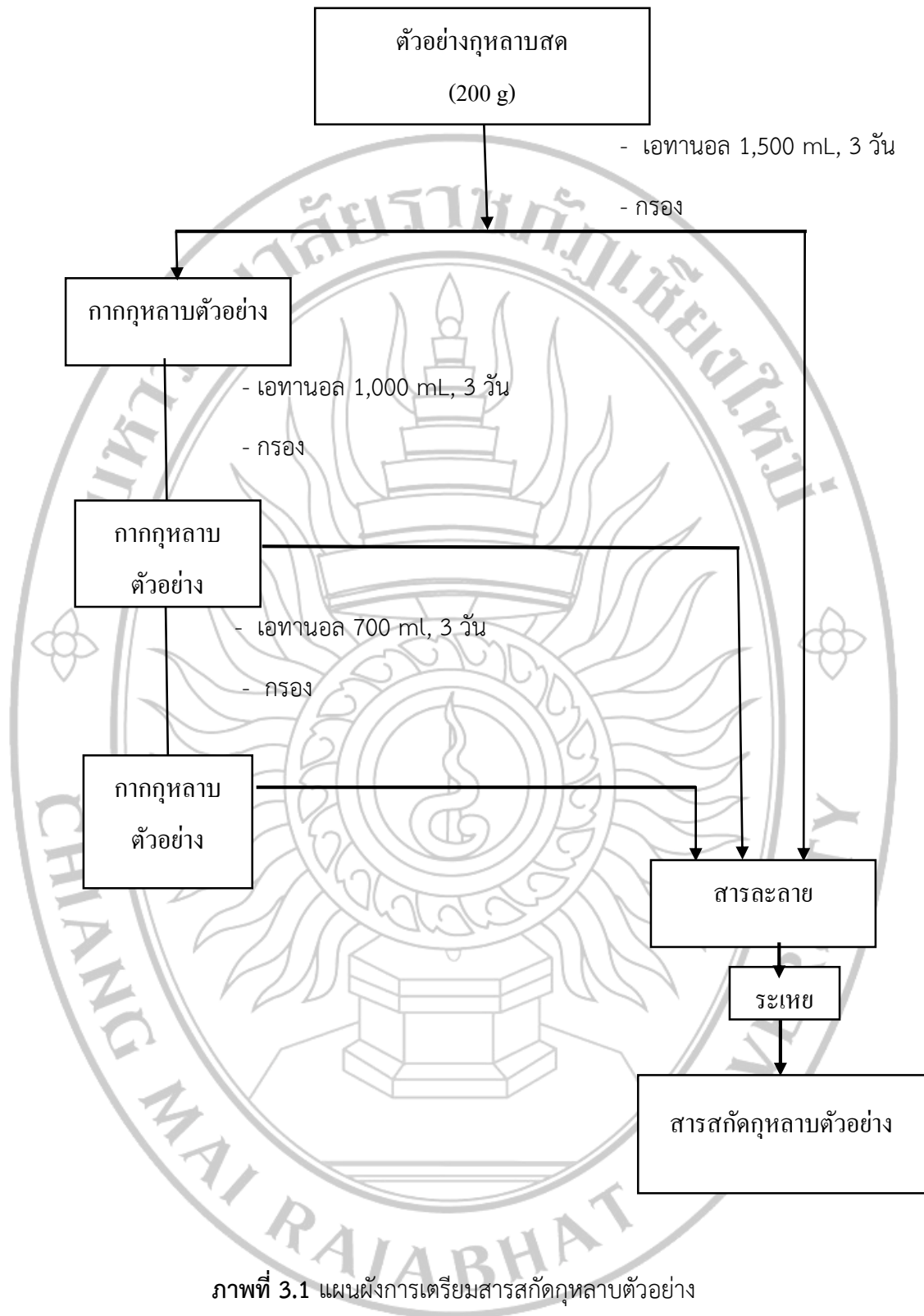
- 1) นำตัวอย่างดอกกุหลาบสด 200 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอทานอล 1,500 มิลลิลิตรในการหมักครั้งแรก โดยให้เอทานอลท่วมพืชตัวอย่าง ปิดปากขวดรูปชมพู่แล้วห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องที่มีมืด 3 วัน
- 2) กรองด้วยผ้าขาวบางได้สารละลายกุหลาบตัวอย่าง เก็บในขวดสีชาเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C

3) นำกากที่เหลือจากการกรอง มาใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำ 1,000 มิลลิลิตร หมักทิ้งไว้ 3 วัน กรองด้วยผ้าขาวบางได้สารละลายกุหลาบตัวอย่างเก็บในขวดสีชาที่ได้ในข้อที่ 2

4) นำกากที่เหลือจากการกรอง มาใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำ 700 มิลลิลิตร หมักทิ้งไว้ 3 วัน กรองด้วยผ้าขาวบางได้สารละลายกุหลาบตัวอย่างเก็บในขวดสีชาที่ได้ในข้อที่ 2

5) นำสารละลายที่ได้จากการสกัดกุหลาบตัวอย่างมาระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดแห้งตัวอย่าง เพื่อจะนำไปวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิด





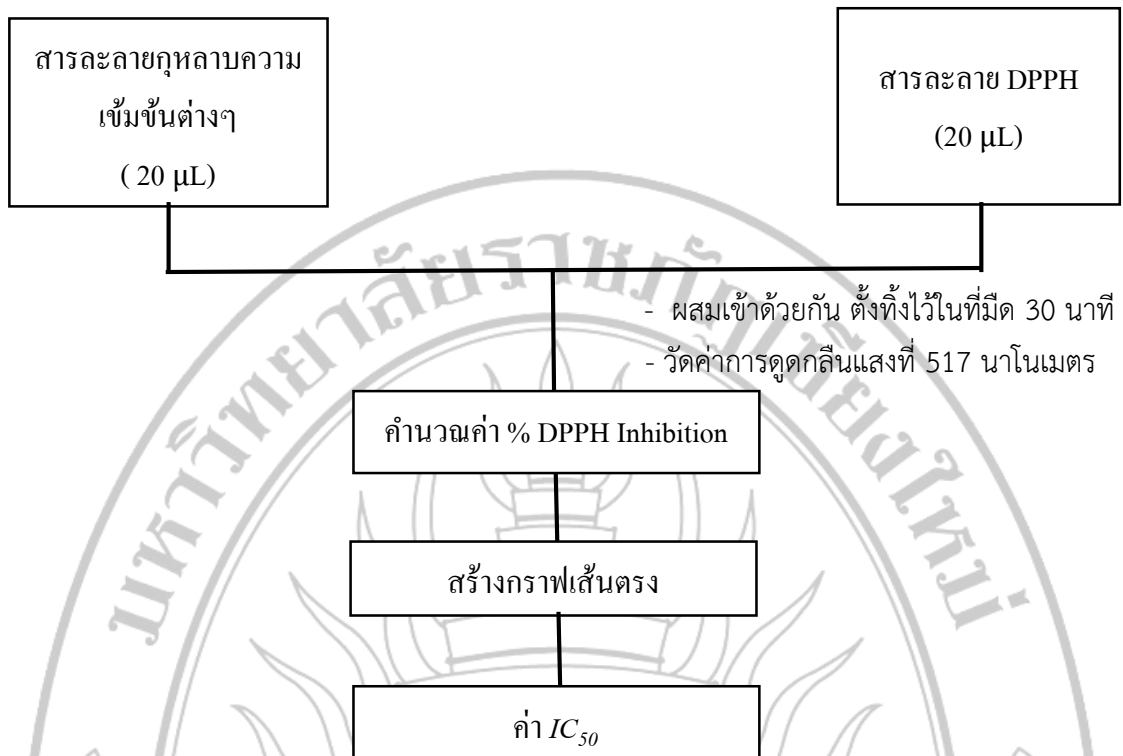
3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยการหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50})

1) เตรียมสารละลายวิตามินซี โทรลอกซ์ และสารสกัดกุหลาบตัวอย่างที่มีความเข้มข้นระหว่าง 1-10 mg/mL (การเตรียมสารละลายดังภาคผนวก ก.2 ข้อ 2) และ 3) ตามลำดับ) ในเมทานอล ปริมาตร 1 mL

2) นำสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 1) ปริมาตร 20 μ L ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ในเมทานอล เข้มข้น 0.2 mM ปริมาตร 180 μ L

3) เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปในที่มืด 30 นาทีจนถึงสภาวะคงที่นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

4) คำนวณหาค่า % DPPH Inhibition และนำมาสร้างกราฟเส้นตรงระหว่าง %DPPH Inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างเพื่อหา IC_{50}



ภาพที่ 3.2 แผนผังการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยการหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ได้ 50% (IC_{50})

3.5.3 การปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) โดยวิธีฟอลินซีโอแคลตู (Folin-Ciocalteu Colorimetry)

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 1-10 mg/mL (การเตรียมสารละลายดังภาคผนวก ก.3 ข้อ 1)) ปริมาตร 25 mL

2) นำสารละลายที่เตรียมได้ ปริมาตร 20 μ L เติมสารละลาย 10% v/v Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 μ L และสารละลาย 2.5% w/v Sodium carbonate ปริมาตร 80 μ L

3) เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปในที่มืด 30 นาที ถึงภาวะคงที่นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm

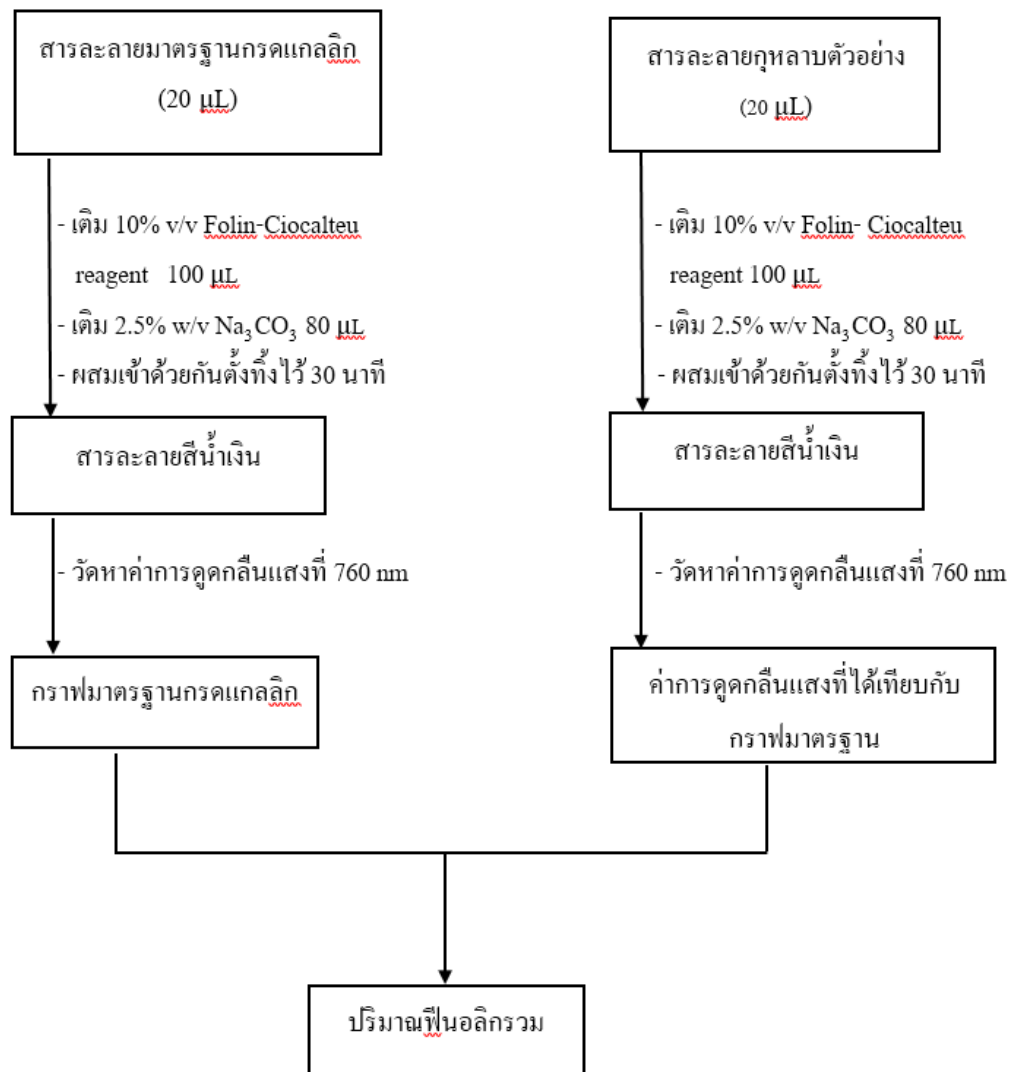
4) ทำการทดลองซ้ำ ข้อ 2) - 3) อีก 2 ครั้ง

5) เตรียมสารละลายสารสกัดทุกหลอดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1-10 mg/mL ปริมาตร 1 mL ในน้ำปราศจากไอออน

6) ทำการทดลองซ้ำข้อ 2) - 4)

7) สร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับความเข้มข้น

8) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ได้ในข้อ 7) แล้วนำไปคำนวณหา Total phenolic content



ภาพที่ 3.3 แผนผังการทดลองหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) โดยวิธีฟอลินซีโอแคลตู (Folin-Ciocalteu Colorimetry)

3.5.4 การปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoids content) โดยวิธีอะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride colorimetric assay)

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน (Quercetin) ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 1-10 mg/ml (การเตรียมสารละลายดังภาคผนวก ก.4 ข้อ 1)) ปริมาตร 25 mL

2) นำสารละลายที่เตรียมได้ ปริมาตร 20 µL เติม 15% w/v โซเดียมไนไตรต์ (NaNO₂) ปริมาตร 6 µL เติม 10% w/v อะลูมิเนียมไทรคลอไรด์ (AlCl₃) 0.3 M ปริมาตร 6 µL

3) เมื่อปฏิกิริยาดำเนินในที่มืด 60 นาที ถึงภาวะคงที่เติมสารละลาย 4% w/v โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาตร 80 μL และน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 88 μL เมื่อปฏิกิริยาดำเนินในที่มืด 15 นาที ถึงภาวะคงที่ นำค่าไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm

4) ทำการทดลองซ้ำ ข้อ 2) – 3) อีก 2 ครั้ง

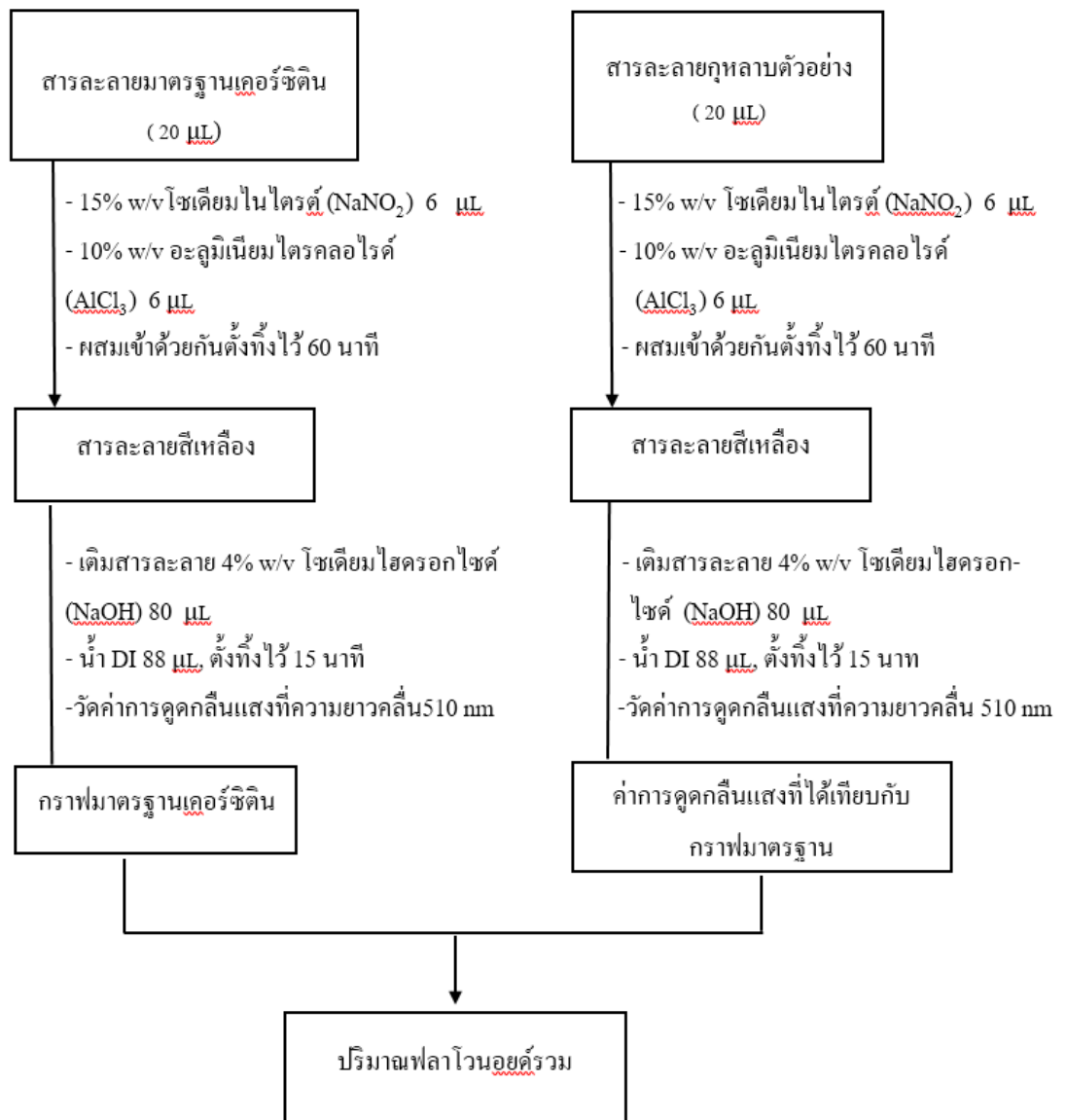
5) เตรียมสารสกัดทุกลบตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1-20 mg/mL ปริมาตร 1 mL ในเมทานอล

6) ทำการทดลองซ้ำข้อ 2) - 4)

7) สร้างกราฟมาตรฐานเคอร์ซิน ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับความเข้มข้น

8) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานเคอร์ซินที่ได้ในข้อ 7) แล้วนำไปคำนวณหา Total flavonoids content





ภาพที่ 3.4 แผนผังการทดลองหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoids content) โดยวิธีอะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride colorimetric assay)

3.5.5 การเจือจางสารสกัดหยาบเพื่อการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

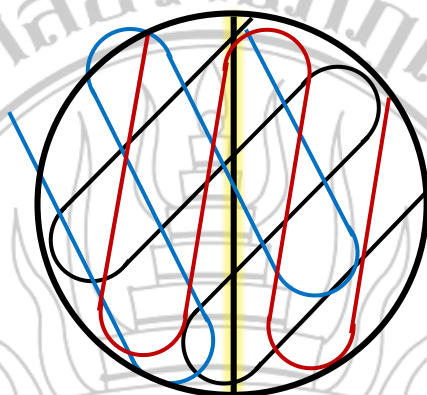
- 1) เตรียมสารสกัดหยาบจากดอกกุหลาบสายพันธุ์ 3 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 10% DMSO (Dimethyl Sulfoxide) เป็นตัวทำละลาย
- 2) ทำการเจือจางสารสกัดหยาบลดทอนทีละ 2 เท่า (Two fold serial dilution) จนได้ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น คือ 40, 20, 10, 5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.5.6 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

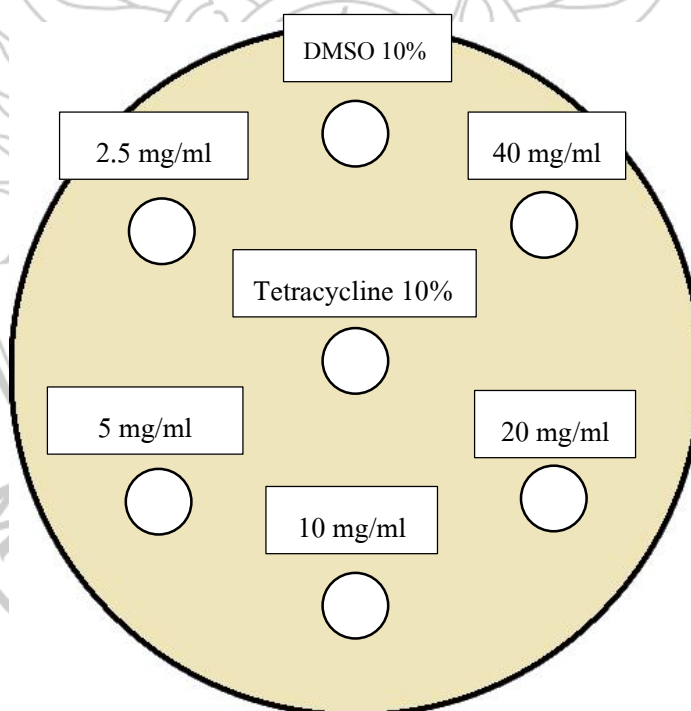
- 1) เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Proteus mirabilis* โดยการ streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
- 2) ทำการถ่ายโคลนเชื้อแบคทีเรียลงใน 0.85% Sodium chloride
- 3) เทียบความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียด้วย Mc Farland No. 0.5 (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/ml)

3.5.7 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากดอกกุหลาบด้วยวิธี Agar well diffusion method

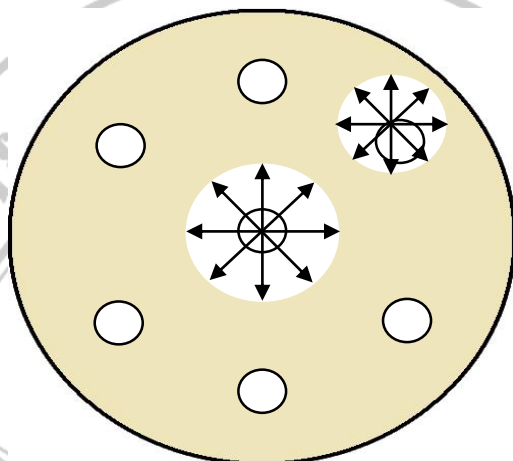
- 1) ทำการ swab plate โดยใช้ไม้สำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในเชื้อแบคทีเรียที่ได้ทำการเตรียมไว้ในข้อ 3.5.6 และบิดสำลากับผนังหลอดทดลองให้หมด ๆ จากนั้นนำมาเกลี่ยบนเพลทของอาหาร Mueller-Hinton จำนวน 3 ระบาย (ภาพที่ 3.5) รอให้เชื้อแห้งติดผิวหน้าอาหาร โดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที
- 2) ใช้ปลายของหลอดหยดสารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะลงในอาหาร Mueller-Hinton ที่ผ่านการ Swab plate ทำการเจาะเป็นจำนวน 7 หลุม (วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมได้ประมาณ 0.6 เซนติเมตร)
- 3) ใช้ไมโครปิเปตหยดสารสกัดหยาบที่เจือจางไว้แล้วทั้งหมด 5 ความเข้มข้น หยดลงในหลุมที่เจาะไว้ในข้อ 2) ปริมาณหลุมละ 20 ไมโครลิตร ใช้ยาเตตราไซคลีน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) และใช้ DMSO 10% เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ (ภาพที่ 3.6)
- 5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
- 6) วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) 4 ด้าน จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (ภาพที่ 3.7)



ภาพที่ 3.5 วิธีการ Swab เชื้อแบคทีเรีย



ภาพที่ 3.6 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion method



ภาพที่ 3.7 การหาเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

3.5.8 วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Inhibition zone) มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบ One-way ANOVA โดยทดสอบความแตกต่างพหุคูณด้วยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05