

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

พริกชี้หนูพันธุ์พื้นเมือง ผลสดสีแดง จากโครงการฟาร์มตัวอย่างตามพระราชดำริอำเภอปานาเระ จังหวัดปัตตานี

3.2 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา แผนกวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ 5 สายพันธุ์ ดังนี้

- 3.2.1 *Sarcina* sp.
- 3.2.2 *Bacillus subtilis*
- 3.2.3 *Escherichia coli*
- 3.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*
- 3.2.5 *Staphylococcus aureus*

3.3 อุปกรณ์และสารเคมีในการวิจัย

3.3.1 อุปกรณ์

- 1) โหลแก้ว
- 2) อุปกรณ์เพาะเลี้ยงเชื้อ
- 3) ชุด Quick Column Chromatography
- 4) บีกเกอร์ ขนาด 150, 250, 1000 mL
- 5) กระบอกตวง ขนาด 10 mL, 50 mL, 100 mL
- 6) ขวดกั้นกลม ขนาด 100 mL, 250 mL, 2000 mL
- 7) แผ่นกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm

3.3.2 สารเคมี

ตารางที่ 3.1 สารเคมีในการวิจัย

สารเคมี	Grade	บริษัทที่ผลิต
1. Hexane	Commercial grade	ห้างหุ้นส่วนพี.เอส.ชาชน์ เคมีคอล จำกัด
2. Dichloromethane	Commercial grade A.R. grade	ห้างหุ้นส่วนพี.เอส.ชาชน์ เคมีคอล จำกัด และ LAB-SCAN
3. Methanol	Commercial grade A.R. grade	ห้างหุ้นส่วนพี.เอส.ชาชน์ เคมีคอล จำกัด และ MERCK Germany
4. Ethyl acetate	A.R. grade	LAB-SCAN,Thailand
5. Silica gel 60 GF ₂₅₄	-	MERCK, Germany
6. Dimethyl sulfoxide	A.R. grade	MERCK, Germany
7. สารปฏิชีวนะมาตรฐาน		
- Tetracycline 30 µg		
- Ciprofloxacin 30 µg	-	OXILD , England
- Penicillin G 10 units		
8. Muller Hinton agar	-	Difco , USA
9. Nutrient agar	-	OXILD , England

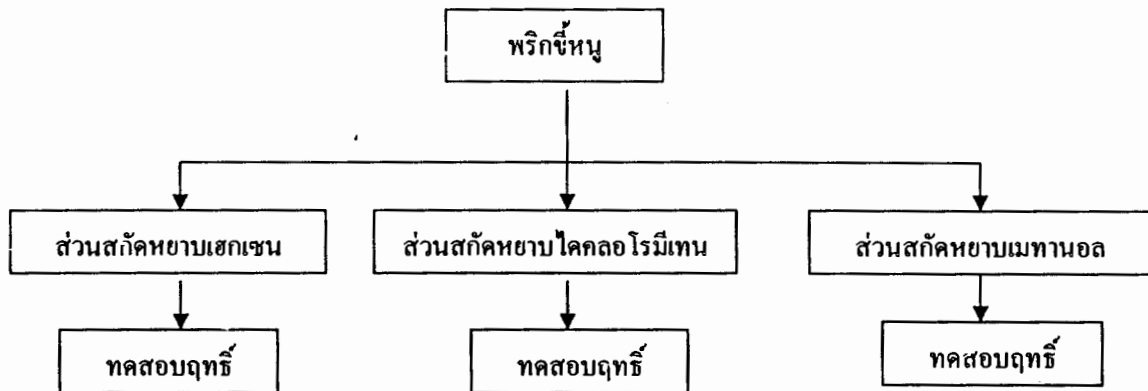
3.3.3 เครื่องมือ

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ	รุ่น	บริษัทที่ผลิต
1. Autoclave	-	-
2. Incubator	-	-
3. Vacuum rotary evaporator	R-200, B-490 และ VV2000, WB2000	BUCHI และ Heidolph
4. Pump	BB-6000 aquarium air pump	Big Boy
5. ตู้อบ	Isotemp Oven	Fisher Scientific
6. ตู้เย็น	Medical Freezer	sanyo
7. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	TR-6101	Denver Instrument
8. UV lamp	CM-26	Spectronics

3.4 วิธีการศึกษา

ขั้นตอนการสกัดสารจากพริกชี้หนูสดสีแดงโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ดังรูปที่ 3.1

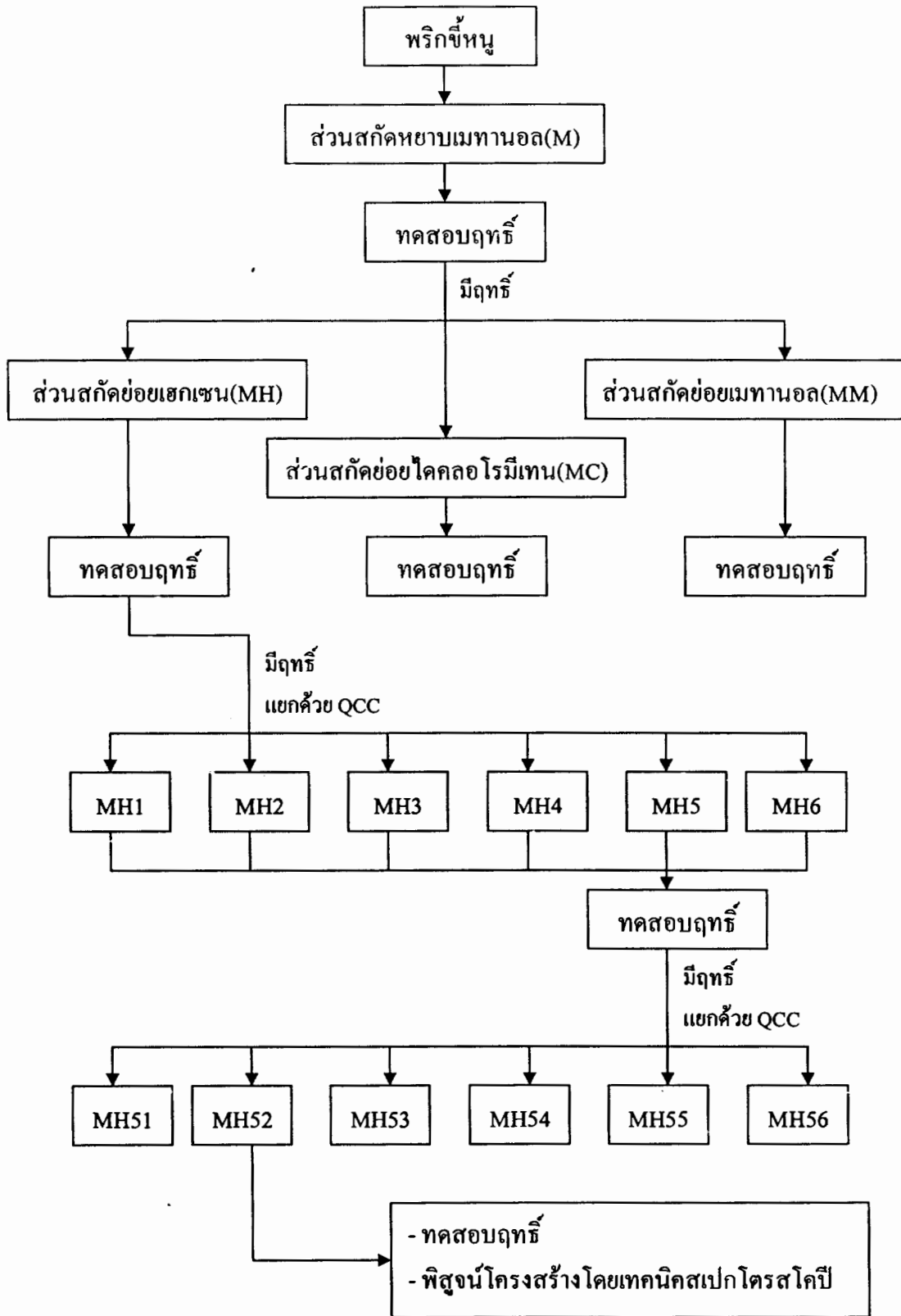


รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

3.4.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

1. ล้างพริกชี้หนูสด ผึ่งให้แห้ง
2. ชั่งน้ำหนัก 300 กรัม ผูกกันรวมเป็นช่อๆ บรรจุลงในแต่ละขวดโหล
3. เติมตัวทำละลาย hexane, dichloromethane และ methanol ในแต่ละโหล ค้างทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราว
4. กรองสารสกัดแต่ละส่วน ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยลดความดัน (Vacuum rotary evaporation)
5. เก็บสารใส่ขวดชั่งน้ำหนักสารที่สกัดได้
6. เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

ขั้นตอนการดำเนินการแยกสารออกฤทธิ์จากพริกขี้หนูปฏิบัติดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการแยกสารที่ออกฤทธิ์จากพริกขี้หนู

3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค disc diffusion

1. เตรียมส่วนสกัดหยาบของพริก ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 mg/mL โดยใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นคอนโทรล
2. เจือจาง suspension แต่ละเชื้อให้มีปริมาณเชื้อ 10^5 CFU/mL
3. ใช้ก้านสำลีที่นิ่งแล้วจุ่ม suspension ป้ายบนผิวหน้าอาหารในแนวระนาบ 3 แนว ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร
4. วางทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อรอผิวหน้าอาหารแห้ง
5. ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ลงไฟ ทิ้งให้เย็น คีบแผ่นกระดาษกรองขนาด 6.0 mm ที่จุ่มสารสกัดวางบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
6. บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

การตรวจผล

สังเกตการณ์เกิด Clear zone เป็นบริเวณที่เชื้อไม่มีการเจริญรอบๆ แผ่นกระดาษกรอง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Clear zone เพื่อดูประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด

3.4.3 การทดสอบแบบแผนความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

1. เตรียม suspension แต่ละเชื้อให้มีปริมาณเชื้อ 10^5 CFU/mL
2. ใช้ก้านสำลีที่นิ่งมาเชื้อแล้วจุ่ม suspension ป้ายบนผิวหน้าอาหารในแนวระนาบ 3 ระนาบ ให้ทั่วผิวหน้าอาหารวางทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อรอผิวหน้าอาหารแห้ง
3. ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ลงไฟ ทิ้งให้เย็น คีบแผ่นยาปฏิชีวนะ Tetracycline Ciprofloxacin และ Penicillin G วางบนผิวหน้าอาหาร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
4. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผล

วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Clear zone เนื่องจากสารปฏิชีวนะแต่ละชนิด

3.4.4 การแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ พบว่าส่วนสกัดหยาบเมทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จึงนำส่วนสกัดหยาบเมทานอลมาสกัดด้วยเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเมทานอล ตามลำดับ ได้ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยไคคลอโรมีเทน และส่วนสกัดย่อยเมทานอล นำส่วนสกัดย่อยต่างๆทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ส่วนสกัดย่อยที่ออกฤทธิ์ก็นำมาแยกโดยเทคนิค Quick Column Chromatography (QCC) ดังต่อไปนี้

1. ต่อบุค Quick Column Chromatography ค่อยๆอัดซิลิกาให้แน่นผิวหน้าเรียบเสมอกันเมื่อแน่นแล้ววางกระดาษกรองบนผิวหน้า
2. ชะด้วยตัวทำละลายเฮกเซนให้ชั้นซิลิกาแน่นมากขึ้น

3. นำสารตัวอย่างที่ละลายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน โดยใช้ส่วนสกัดผสมซลิคาเจล ในอัตราส่วน 5:1 ระบายเอาตัวทำละลายออกจนสารสกัดมีลักษณะเป็นผง เติมลงบนซลิคาเจล ปรับผิวหน้าให้เสมอกันแล้วปิดผิวหน้าด้วยกระดาษกรอง
4. เติมตัวทำละลาย hexane และเพิ่มขั้วด้วยตัวทำละลาย dichromethane ในอัตราส่วนต่างๆ
 - ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ใช้ระบบตัวทำละลายดังนี้ 100%เฮกเซน, 25%ไคคลอโรมีเทนในเฮกเซน, 50%ไคคลอโรมีเทนในเฮกเซน และ 100%ไคคลอโรมีเทน
 - ส่วนสกัดย่อยไคคลอโรมีเทน ในระบบตัวทำละลายดังนี้ 100%เฮกเซน, 50% ไคคลอโรมีเทนในเฮกเซน และ 100%ไคคลอโรมีเทน
5. รongรับสารแต่ละส่วน ทดสอบด้วย TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน

3.4.5 พิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบในพริกขี้หนูโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ โดยส่วนสกัดหยาบเมทานอล และนำมาแยกคอกด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเมทานอล ได้ส่วนสกัดย่อยต่างๆ และนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และนำส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์มาแยกด้วย QCC และนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเมื่อได้สารที่บริสุทธิ์จึงนำมาพิสูจน์โครงสร้างต่อไปด้วยเครื่องมือ UV, FT-IR ถ้าไม่สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ต้องทดสอบองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดย่อยเบื้องต้น โดยวิธีทดสอบกลุ่มสาร Terpenoids และ Flavonoids

สารกลุ่ม Terpenoids

1. ทดสอบวิธี Vanillin test

ถ้าเกิดสีม่วงแสดงว่ามีสารในกลุ่ม terpenoids เป็นองค์ประกอบ

2. ทดสอบวิธี Godin test

ถ้าเกิดสีม่วงแสดงว่ามีสารในกลุ่ม terpenoids เป็นองค์ประกอบ

3. ทดสอบวิธี Liebermann-Burchard test

ถ้าเกิดสีน้ำตาลแสดงว่ามีสารในกลุ่ม terpenoids เป็นองค์ประกอบ

4. ทดสอบวิธี Salkowski test

ถ้าเกิดสีน้ำตาลแสดงว่ามีสารในกลุ่ม terpenoids เป็นองค์ประกอบ

สารกลุ่ม Flavonoids

1. ทดสอบวิธี DPPH solution

ถ้าเกิดสีเหลืองแสดงว่ามีสารในกลุ่ม flavonoids เป็นองค์ประกอบ

2. ทดสอบวิธี Ferric chloride solution

ถ้าเกิดสีม่วงแสดงว่ามีสารในกลุ่ม flavonoids เป็นองค์ประกอบ