

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### แหล่งที่มาของข้อมูลและวิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

##### 1. สัตว์ทดลอง

ใช้แม่โคนมของแผนกโคนม ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แบ่งโคออกเป็น 4 กลุ่มโดยกลุ่มที่ 1 และ 2 เป็นโคที่ให้ผลการตรวจ California Mastitis Test (Schalm et al., 1971) เป็นลบ กลุ่มที่ 3 และ 4 เป็นโคที่ให้ผลการตรวจ CMT เป็นบวก

##### 2. การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

สุ่มซื้อลูกยอที่มีลักษณะครึ่งดิบครึ่งสุก ในเขตพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา นำลูกยอดังกล่าวจำนวน 2 กิโลกรัม มาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ  $0.5 \times 2 \times 0.5$  เซนติเมตร ก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องอบตัวอย่าง (Hot air oven) ตั้งค่าอุณหภูมิไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 วัน เมื่อครบกำหนดให้นำลูกยอที่ได้ออกจากตู้อบ โดยสังเกตว่าลูกยอที่แห้งจะมีลักษณะเป็นสีดำและแข็ง นำลูกยอที่แห้งสนิทดีแล้วมาทำการชั่งน้ำหนักอีกครั้ง ปรากฏว่าลูกยอเหลือน้ำหนักประมาณ 800 กรัม จากนั้นนำลูกยออบแห้งมาบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบดฟิช ชั่งผงลูกยอประมาณ 10 กรัม ใส่ใน Thimber ขนาด  $25 \times 100$  mm ในการสกัดหนึ่งครั้งจะสามารถใส่ผงลูกยอแห้งได้ 40 กรัม หรือ 4 Thimber ดังนั้นลูกยอ 800 กรัม สามารถเข้าเครื่องสกัด (Soxhlet extraction) ได้ 15 ครั้ง จากนั้นทำการกลั่นลำดับส่วน (Soxhlet extraction) ด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % ปริมาตร 140 มิลลิลิตร ต่อ 1 Thimber ต้องใช้สารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % ปริมาตร 9 ลิตร ในการสกัดสารสกัดยอ 800 กรัม วางโปรแกรมให้เครื่อง Soxhlet extrator รุ่น B811 ทำการกลั่นจำนวน 4 รอบ โดยใช้อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดลูกยอประมาณ 120 มิลลิลิตรต่อ 1 Thimber ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ดังนั้นจะได้ปริมาตรทั้งหมดหลังการสกัดในขั้นตอนนี้ ประมาณ 8 ลิตร ลักษณะสารสกัดลูกยอที่ได้มีสีน้ำตาลอ่อนลักษณะเป็นน้ำ นำสารสกัดลูกยอทั้งหมด นี้ไปกรองเอาตะกอนฝุ่นออกด้วยกระดาษกรอง (whatman No.1) จากนั้นนำสารสกัดลูกยอไปลดปริมาตรแอลกอฮอล์และเพิ่มความเข้มข้น ด้วยเครื่องกลั่นแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในขั้นตอนนี้ 3 วัน หลังจากขั้นตอนนี้จะได้สารสกัดที่ปริมาตร 320 มิลลิลิตร (จากผงยอแห้ง 800 กรัม) สารสกัดที่ได้มีลักษณะขุ่นขึ้นเป็นน้ำมัน สีน้ำตาลเข้ม จากนั้นนำสารสกัดนี้ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เพื่อลดปริมาณน้ำในสารสกัดก่อนนำเข้าเครื่องทำสารแห้ง (Freeze Dryer) ใช้เวลาในการทำให้สารสกัดแห้งประมาณ 45

วัน หลังจากนำเข้าเครื่องทำสารแห้งจะได้สารสกัดลูกขยประมาณ 50 กรัม มีลักษณะหนืดคล้ายน้ำมัน นำสารสกัดไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดลองในสัตว์ทดลองต่อไป

### 3. การจัดการทดลอง

แบ่งโคออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ประกอบด้วย

กลุ่มที่ 1 โคนมไม่ปนโรเคเด้านมอ๊กเสบ+PBS

กลุ่มที่ 2 โคนมไม่ปนโรเคเด้านมอ๊กเสบ+สารสกัดลูกขย 25%

กลุ่มที่ 3 โคนมปนโรเคเด้านมอ๊กเสบบนไม่แสดงอาการ+สารสกัดลูกขย 25%

กลุ่มที่ 4 โคนมปนโรเคเด้านมอ๊กเสบบนไม่แสดงอาการ+PBS

### 4. การทดสอบผล

เตรียมสารสกัดที่ได้ในรูปของน้ำยาสดเค้ด้า (25%) โดยละลายสารสกัดในสารละลาย phosphate buffer saline ที่ปลอดเชื้อ (5 cc) จากนั้นทำการกรองผ่านกระดาษกรอง (pore size 0.45  $\mu\text{m}$ ) จากนั้นให้ยาเข้าเด้านมแก่กลุ่มที่ 2 และ 3 วันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 7 วัน ส่วนกลุ่มที่ 1 และ 4 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมนั้นให้เฉพาะ phosphate buffer saline เข้าเด้านมวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 7 วัน และเก็บตัวอย่างน้ำนมเพื่อทำการตรวจต่อไป (วันที่ 0,1,2,3,4,5,6,7,15 และ30) เพื่อตรวจหาค่าโซมาติกเซลล์และองค์ประกอบของน้ำนมโดยใช้เครื่อง FOSS SCC 5000 BASIC และ FOSS Milko 6000, Denmark ตามลำดับ

### 5. ระยะเวลาในการทดลอง

มกราคม 2550 ถึง กันยายน 2554

### 6. สถานที่ดำเนินการทดลอง

ฟาร์มมหาวิทยาลัย และอาคารปฏิบัติการเครื่องมือ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สหกรณ์โคนมมวกเหล็ก และศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ของข้อมูลที่ได้ หากผลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองโดยใช้ Duncan's new multiple-range test