บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. ตู้อบ
2. เครื่องบดไฟฟ้า (Blender)
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
5. 96 well plate
6. Appendoft
7. Sterile Plastic pipette
8. Milipore filter
9. Filter Disc
10. ชุดกรองสาร
11. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน
12. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

3.1.2 สารเคมี

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
2. ethanol
3. Methanol
4. Hexane
5. Ethylacetate
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2 พืชสมุนไพร และจุลชีพ

3.2.1 มะเดื่อ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : Ficus hispida Linn. f.

ชื่อวงศ์ : MORACEAE

3.2.2 จุลชีพที่ใช้ในการวิจัย

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
2. *Streptococcus mutans* ATCC 27175
3. *Vibrio cholerae*
4. *Vibrio paraheamolyticus*

ชนิดของจุลินทรีย์	ลักษณะโดยทั่วไป	การก่อโรค
1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923	แบคทีเรียทรงกลม เรียงตัวเป็นลักษณะคล้ายพวงองุ่น แกรมบวก	เป็นสาเหตุของโรคฝี หนอง กุ้งยิง การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด กลุ่มอาการผิวหนังกำพร้าหลุดลอกหรือRitt's disease และโรคอาหารเป็นพิษ
2. Streptococcus mutans ATCC 27175	แบคทีเรียทรงกลม แกรมบวก	เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในช่องปากทำให้เกิดโรคฟันผุ
3. *Vibrio cholerae*	แบคทีเรียรูปท่อนโค้งงอ แกรมลบ	ทำให้เกิดโรคอหิวาห์ตกโรค เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้ในลำไส้เล็ก และสร้างสารพิษที่เรียกว่าcholera toxin บนเยื่อบุเซลล์ของผนังลำไส้ทำให้เกิดการขับเกลือแร่ โพแทสเซียม โซเดียมคลอไรด์ ไบคาร์บอเนต และน้ำออกจาก เซลล์สู่โพรงลำไส้ ทำให้ผู้ป่วยคลื่นไส้อาเจียนอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง
4. Vibrio paraheamolyticus	แบคทีเรียรูปท่อนโค้งงอ แกรมลบ	ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ กระเพาะอาหาร-ลำไส้อักเสบเชื้อนี้มักปนเปื้อนไปกับอาหารทะเล พวก กุ้ง ปู ปลา หอย จะเพิ่มจำนวนเป็นเท่าตัวทุกๆ 10 ถึง 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะทวีจำนวนขึ้นในลำไส้ ทำให้มีอาการท้องร่วงรุนแรง มีอุจจาระเหลวเป็นน้ำมีกลิ่นเหม็นเหมือน กุ้งเน่า มักมีอาการปวดเกร็งที่ท้อง ครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยมีอาการอาเจียนร่วมด้วย มีระยะฟักตัวค่อนข้างสั้น คืออาจเกิดอาการในประมาณ 15-24 ชั่วโมงหลังจากรับประทานอาหาร

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

1. ทำการสำรวจอนุกรมวิธานของพืชสมุนไพรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือ มะเดื่อและรับรองพืชสมุนไพรตัวอย่างโดยผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์(Voucher Specimens)

2. นำส่วนใบของมะเดื่อ มาทำความสะอาด หั่นให้เล็กแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 °C

3. นำส่วนใบของมะเดื่อที่แห้งแล้ว ไปบดให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดไฟฟ้า (Blender) และนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การสกัดสารพืชสมุนไพร

การสกัดสารที่มีองค์ประกอบสำคัญจากมะเดื่อใช้เทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction โดยการหมัก(Maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังมีขั้วสูงคือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ ดังนี้

1. ส่วนใบของมะเดื่อ ที่บดละเอียดมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน 0.5 Kg แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายคือเฮกเซน ในภาชนะปิด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

2. นำของผสมมากรองแยกสารสกัดและกากออกจากกัน โดยส่วนที่เป็นสารสกัดนำไประเหยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 $^{\circ}$C จะได้สารสกัดหยาบ(Crude extract) ของชั้นเฮกเซน ชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ทดสอบในขั้นต่อไป

3. ส่วนที่เป็นกากนำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้นคือเอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ และทำการสกัดสารโดยใช้วิธีเดียวกันกับตัวทำละลายเฮกเซน

3.3.3 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

นำสารสกัดหยาบที่สกัดได้ไปทดสอบหากลุ่มสารสำคัญ ดังนี้.

1. Alkaloids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 5% HCl 20 ml อุ่น 15 นาที กรอง ทดสอบกับ Dragendorff's test, Marme's test, Mayer's test, Wanger's test, และ Kruat's test สังเกตสีและตะกอนที่เกิดขึ้น

2. Tannins และ phenolic compounds สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายในน้ำ 20 ml อุ่น 15 นาที กรอง ถ้าขุ่นหยด 4-5 หยด 10% NaCl กรอง นำมาทดสอบกับ gelatin solution, gelatin salt solution, 1% $FeCl_3$, Br_2 water, Vanilin, 40% Formalin / HCl, และ Lime water

3. Triterpenes และ Steroids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายด้วย $CHCl_3$ 1-2 ml นำมาทดสอบวิธี Liebermann Burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc. H_2SO_4 1 หยด ลงในหลอดทดลอง สังเกตวงแหวนที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

4. Flavonoids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน Petoleum ether 4 ml กรอง แล้วเอา residue ละลายใน 80 % ethanol 8 ml นำมาทดสอบ Cyadinin test โดยนำลวด Mg มาใส่ ในหลอดทดลอง 3-4 ชิ้น แล้วค่อยหยด conc. HCl 3 หยด สังเกตฟองที่เกิด ทิ้งไว้ให้ละลายจนหมด จากนั้น เติมน้ำ 1 ml และ Octyl alcohol 1 ml สังเกตสีในชั้นของ Octyl alcohol

5. Antraquinones สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 0.5 M KOH 10 ml แล้วเติม 3% H_2O_2 1ml ต้มบนหม้ออังไอน้ำ 10 นาที กรอง ทิ้งให้เย็น หยด CH_3COOH จนเป็นกรด สกัด ด้วย C_6H_6 10 ml นำมาทดสอบ Modified Borntragers test โดยนำชั้นของ C_6H_6 ไปหยด NH_3 T.S. ตั้งทิ้งไว้

6. Cardiac glycosides สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 10% Lead acetate 10 ml อุ่น 15 นาที ทิ้งให้เย็น กรอง สกัดด้วย $CHCl_3$ 5ml 3 ครั้ง นำมาทดสอบวิธี Liebermann burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc. H_2SO_4 1-2 หยด ลงใน หลอดทดลอง สังเกตสีที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพสำหรับโดยการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราในที่นี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauerและคณะ(1966) (อ้างจาก นันทนา อรุณฤกษ์) มีวิธีการทดสอบดังนี้นำแบคทีเรียชนิดต่างๆที่เก็บไว้บน Trypticase Soy Agar เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion Broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำจุลินทรีย์ที่บ่มเพาะได้มาปรับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับความขุ่นของ McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งเทียบเท่ากับจำนวนแบคทีเรีย 10^5-10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วจึงนำแบคทีเรียที่เตรียมได้ไปเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar อยู่ โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่ว 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียชนิดต่างๆ บนหน้าวุ้น หลังจากนั้นนำแผ่นดิสต์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งละลายด้วย DMSO(Dimethyl sulfoxide) (เจือจางลง 2 เท่า ตามลำดับ) วางบนผิววุ้นที่มีจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ บ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย แต่ถ้าเป็นราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Agar และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง แล้วแต่ชนิดของรา

3.3.5 การแยกสารให้บริสุทธิ์

การแยกสารให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคทาง column chromatography โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ โดยชะด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยค่อยๆเพิ่มขั้วของตัวทำละลายและเก็บ fraction เมื่อระเหยตัวทำละลายออกแล้วตรวจสารที่ได้ด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) และการตกผลึกจนได้สารบริสุทธิ์

3.3.5.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วยวิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี

ทำการแยกสารโดยวิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ดังนี้

1. นำสารสกัดที่ให้ผลดีที่สุดใส่ในขวดเล็ก และละลายด้วยตัวทำละลายชนิดเดิม

2. เตรียมแผ่น TLC ให้มีขนาดพอเหมาะประมาณ 25 เซนติเมตร แล้วจุด (spot) สารสกัดที่ละลายแล้วในขั้นตอนที่ 1 ลงบนแผน TLC โดยใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) จุดสารสกัดที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น TLC 2 จุด โดยให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC ประมาณ 0.5 เซนติเมตร และแต่ละจุดห่างกันพอประมาณ ด้านบนของแผ่น TLC ขีดระดับตัวทำละลาย (solvent front) ไว้

3. เตรียม TLC tank โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมใส่ในขวดแก้ว นั้นนำกระดาษกรองมาใส่ลงในขวดแก้วโดยให้กระดาษกรองทาบผิวด้านในขวดแก้ว แล้วเตรียมแผ่นกระจกปิดไว้เพื่อให้ ขวดแก้วอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

4. นำแผ่น TLC ที่จุดสารสกัด แล้วไปจุ่มลงในขวดแก้วที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายซึ่งเตรียมไว้ ปิดฝาขวดแก้วปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงระดับตัวทำละลาย (solvent front) ที่กำหนดไว้ นำแผ่น TLC ออกจากขวดแก้ว ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง

5. นำแผ่น TLC ไปทดสอบการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลต(UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

6. นำแผ่น TLC ไปย้อมด้วย developing solvent แล้วนำไปอุ่นบนเตาไฟฟ้า (hot plate) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงสี

7. เตรียมตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.3.5.2 การแยกสารสกัดโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

เตรียมคอลัมน์แก้วโดยใช้ขาตั้ง (stand) และตัวจับ (clamp) จับคอลัมน์ให้ตั้งฉากกับพื้น อุดปลายคอลัมน์ด้วยสำลีสะอาดจำนวนเล็กน้อย ใช้แท่งแก้วดันสำลีให้อยู่ปลายด้านล่าง บรรจุตัวทำละลายเฮกเซนลงไปประมาณครึ่งคอลัมน์เปิดก๊อกปิดเปิด (stopcock) ด้านล่างคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้าๆ เพื่อไล่ฟองอากาศและป้องกันสำลีย้อย นำซิลิกาเจล ผสมกับตัวทำละลายเฮกเซนให้เข้ากัน เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศในคอลัมน์ แล้วนำไปบรรจุในคอลัมน์ ค่อยๆ บรรจุซิลิกาเจล ลงไปให้ติดต่อ และสม่ำเสมอกันพร้อมทั้งเปิดที่ก๊อกปิดเปิดด้านล่างคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลผ่านอย่างช้าๆ และค่อยๆ ปรับผิวหน้าให้เรียบโดยการเคาะคอลัมน์เบาๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลเรียงตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ เมื่อบรรจุซิลิกาเจลเสร็จแล้วก็ปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเหลือประมาณ 5 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าซิลิกาเจลจึงปิดที่ก๊อกปิดเปิดด้านล่างของคอลัมน์ นำสารสกัดหยาบมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากันจนร่วน และบรรจุลงในคอลัมน์ช้าๆ โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปรับผิวหน้าให้เรียบ ฉีดล้างด้านในคอลัมน์ให้สะอาดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนในปริมาณเล็กน้อย จากนั้นปล่อยให้ระดับของสารละลายลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของซิลิกาเจลและจึงชะลอคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย โดยเรียงความมีขั้วน้อยไปหาขั้นมาก ได้แก่ สารเฮกเซน 100 เปอร์เซ็นต์ สารผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน 5 10 20 30 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ สารผสมระหว่างเฮกเซนกับเอธิลอะซิเตรต 10 20 30 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ และเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมตัวทำละลายแต่ละชนิดครั้งละ 200 มิลลิลิตรลงไป ทาการเก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาครั้งละ 20 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ถูกชะออกมาแต่ละชั้นมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือกันหรือไม่ โดยใช้วิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) จากนั้นจึงทำการรวมสารที่เหมือนกันในแต่ละชั้น (fraction) เข้าด้วยกันและนำไปทำการระเหยก่อนนำไปทำการทดสอบต่อไป

3.3.6 การวิเคราะห์โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมี

การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ อัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (Ultraviolet and Visible Spectroscopy) อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี(Infrared Spectroscopy : IR) แมสสเปกโทรเมตรี (Mass Spectrometry:MS) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy : NMR)

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าร้อยละ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.5 ระยะเวลาการทดลอง

1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร