บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

ผู้วิจัยได้แบ่งตามหัวข้อที่ศึกษาดังนี้

1. การศึกษาด้านพฤกษเคมี
2. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ
   2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์
   2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
   2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาด้านพฤกษเคมี

1. ตัวอย่างพืช

   เก็บตัวอย่างพืช ได้แก่ ผักแพว (ทั้งต้น) เพกา (ผล) ย่านาง (ใบ) ผักเม็ก (ใบ) ยอ (ใบ) ผักหวานบ้าน (ใบ) กระถิน (ผล) ผักชี (ส่วนเหนือดิน) ผักปลัง (ส่วนเหนือดิน) และ ชะพลู (ใบ) จาก อ.เมือง จ. มหาสารคาม

2. ตัวทำละลาย

Chloroform, AR	(Merck, Germany)
Dichloromethane, AR	(Merck, Germany)
Methanol, AR	(Merck, Germany)
95 % Ethanol, commercial grade	(The Excise Department, Ministry of Finance, Thailand)
Butanol, AR	(Merck, Germany)
Hexane, AR	(Merck, Germany)
Ethyl acetate, AR	(Merck, Germany)
Water, distilled	

2 % Ferric chloride in ethanol for phenolic compound detection

4. วัสดุทาง Chromatography

Silica gel 60 F254, pre-coated บนแผ่น TLC aluminium sheets ขนาด 20 x 20 cm, layer thickness 0.25 cm, Merck, Germany

Silica gel 60 สำหรับ column chromatography, 63-200 μm, Merck, Germany for the separation of less polar substances with phenolic character

5. เครื่องมือที่ใช้ในการหาสูตรโครงสร้างของสาร

FT-IR spectrophotometer

NMR spectrophotometer

Mass spectrometer

6. อุปกรณ์อื่น ๆ

ชุดสกัด Soxhlet apparatus

Rotary evaporator

Hot air oven

การทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์

1. สารเคมี

Bacto agar	(Merck, Germany)
Oxoid nutrient broth No.2	(Oxoid Ltd., England)
1-aminopyrene	(Aldrich, U.S.A.)
D-Biotin	(Sigma Chemical company, U.S.A)
Ammonium sulfamate	(Sigma Chemical company, U.S.A)
Citric acid monohydrate	(Merck, Germany)
Glucose	(Sigma Chemical company, U.S.A)
L-Histidine	(Sigma Chemical company, U.S.A)
Magnesium sulfate	(Merck, Germany)
Potassium phosphate	(Merck, Germany)
Sodium ammonium phosphate	(Fluka, Switzerland)
Sodium azide	(Fluka, Switzerland)
Sodium nitrite	(BDH Chemical Ltd., England)
Sodium chloride	(Merck, Germany)

2. เครื่องมือ

Autocave

Hotair oven

Hot plate

Incubater

Shaking water bath

Water bath

UV-visible spectrophotometer

3. เชื้อสำหรับทดสอบ

Salmonella typhimurium TA 100 (National Cancer Institute, Ministy of Public Health, Thailand)

Salmonella typhimurium TA 98 (National Cancer Institute, Ministy of Public Health, Thailand)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ แบคทีเรีย

1. เชื้อที่ใช้ทดสอบ

ใช้เชื้อมาตรฐานจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ได้แก่

S.aureus ATTC 25923 *E.coli* ATTC 25922 *Ps. aeruginosa* ATCC 27853

2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ

Mueller-Hinton agar (Fluka)

Mueller-Hinton broth (Fluka)

3. วัสดุอุปกรณ์อื่น

Paper disk (6mm in diameter , Schleicher & Schuell)

Incubator

Laminar air flow

Autoclave

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1. ตัวทำละลาย

Methanol, AR

2. สารเคมี

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) (Fluka)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาด้านพฤกษเคมี

การสกัดสาร

ได้ทำการสกัดพืชผักพื้นบ้านทั้ง 10 ชนิด ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม โดยมีขั้นตอนดังนี้

ผงยาจากพืชผักพื้นบ้านที่ได้จากการบด นำมาสกัดต่อเนื่องด้วยวิธี หมักกับ 95 % ethanol (maceration method) เป็นเวลา 7 วัน กรอง นำส่วนสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายให้แห้งด้วย rotary evaporator นำสารสกัดที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพร (Phytochemical screening)

ทำการทดสอบหาชนิดของสารกลุ่มต่างๆ โดยการประยุกต์ตามวิธีของ G.E. Trease, W.C Evans. (1978) ดังนี้ : นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบหากลุ่มสารสำคัญ ได้แก่ แอลคาลอยด์ แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ และ ซาโปนิน

1. Alkaloids สารสกัดหยาบ 0.5 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 5% 20 มล. อุ่น 15 นาที กรอง ทดสอบกับ Dragendorff's test, Mayer's test, Wagner's test และ Kruat's test

2. Tannin สารสกัดหยาบ 0.5 กรัม ละลายในน้ำ 20 มล. อุ่น 15 นาที กรอง ถ้าขุ่นหยด 10% NaCl 4-5 หยด นำมาทดสอบกับ gelatin solution, gelatin salt solution, 1% $FeCl_3$, Bromide water, Vanillin, และ Lime water

3. Triterpenoids และ steroids สารสกัดหยาบ 0.5 กรัม ละลายด้วย $CHCl_3$ 2 มล. นำมาทดสอบด้วยวิธี Lieberman Burchard test โดยหยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้น ค่อยๆหยด H_2SO_4 เข้มข้น 1หยด ลงในหลอดทดลอง สังเกตวงแหวนที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

4. Flavonoids สารสกัดหยาบ 0.5 กรัม ละลายใน petroleum ether 4 มล. กรองเอา residue นำมาทดสอบ Cyadinin test โดยนำลวด แมกนีเซียม มาใส่ในหลอดทดลอง 3-4 ชิ้น แล้วค่อยๆหยด HCl เข้มข้น 3 หยด สังเกตสีของฟองที่เกิดขึ้น

5. Antraquinones สารสกัดหยาบ 0.5 กรัม ละลายใน 0.5 M potassium hydroxide solution 10 มล. แล้วเติม 3% Hydrogen peroxide 1มล. ต้นบนหม้ออังไอน้ำ 10 นาที กรอง ทิ้งให้เย็น หยดกรด acetic จนเป็นกรด สกัดด้วย benzene 10 มล. นำมาทดสอบกับ Modified Borntrager test โดยนำชั้นของ C6H6 ไปหยด NH3T.S. ตั้งทิ้งไว้

6. Cardiac glycoside สารสกัดหยาบ 0.5 กรัม ละลายใน 10% Lead acetate 10 มล. อุ่น15 นาที ทิ้งให้เย็น กรอง สกัดด้วย $CHCl_3$ 5 มล. นำมาทดสอบด้วยวิธี Lieberman Burchard test โดยหยด Acetic anhydride 3

หยด จากนั้น ค่อยๆหยดกรด sulfuric เข้มข้น 1หยด ลงในหลอดทดลอง สังเกตวงแหวนที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

7.Saponin สารสกัดหยาบ 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มล.เขย่า 20 วินาที สังเกตฟองที่เกิดขึ้น จากนั้นนำกระดาษกรองขนาดเท่าเหรียญบาท มาชุบสารละลาย 3 ครั้งทิ้งให้แห้ง วางบน blood agar ทดสอบการแตกตัวของเม็ดเลือด

2. การทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์

2.1 การเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ

นำเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA 100 (ตรวจสอบการกลายพันธุ์แบบ base-pair substitution) และ TA 98 (ตรวจสอบการกลายพันธุ์แบบ frame-shift) มาเลี้ยงในอาหาร oxiod nutrient broth (12 มิลลิลิตร) แล้วบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด เจือจางเชื้อลง 8 เท่า ด้วย 0.9% sodium chloride (NaCl) เพื่อวัดค่า OD อ่านค่าที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร จะได้ประมาณ 0.3-0.4

2.2 การเตรียม nitrosated products

1. เตรียม nitrosated products โดย เตรียมหลอดทดลอง 2 หลอดสำหรับ TA 100 และ TA 98 โดยการเติม 0.2 นอร์มอลลิตี HCl 740 ไมโครลิตร, 1-aminopyrine 10 ไมโครลิตร และ 2 โมล/1000 มิลลิลิตร $NaNO_3$ 250 ไมโครลิตร ตามลำดับ สำหรับ TA 98 และ 0.2 นอร์มอลลิตี HCl 710 ไมโครลิตร, 1-AP 40 ไมโครลิตร และ 2 โมล/1000 มิลลิลิตร $NaNO_3$ 250 ไมโครลิตร ตามลำดับสำหรับ TA 100

2. นำสารที่เตรียมได้ทั้ง 2 หลอดไป บ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ,4 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่า เมื่อครบกำหนด หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็งนาน 1 นาที

3. เติม 2 โมล/1000 มิลลิลิตร Ammonium sulfamate 250 ไมโครลิตร ลงในทั้งสองหลอดและแช่ในน้ำแข็งอีก 10 นาที

2.3. ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์

1. นำหลอดทดลองหลอดใหม่เติม nitrosated products 100 ไมโครลิตรและ Na_3PO_4-KCL buffer 500 ไมโครลิตรและเติมสารสกัดจากสมุนไพร 100 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้น 3.5, 7.5, 15 และ 30 มิลลิกรัม ตามลำดับ และเชื้อ *S. typhimurium* TA 100 หรือ TA 98 100 ไมโครลิตร บ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ,20 นาที พร้อมทั้งเขย่า

2. เมื่อครบกำหนด เติม Top agar ที่เติม Histidine + biotin แล้ว 2 มิลลิลิตร

3. จากนั้นนำเทบน pate อาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ,48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนับจำนวนเชื้อที่มีการเจริญโดยเปรียบเทียบกับ control โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์จากสูตร

$$\% \text{ modification} = \frac{(A-B) \times 100}{(A-C)}$$

เมื่อ A หมายถึงค่า revertants colonies ของ positive control

B หมายถึงค่า revertants colonies ของ สารสกัดสมุนไพร

C หมายถึงค่า revertants colonies ของ negative control

Ames test

สารก่อกลายพันธุ์

1 - Aminopyrene + HCL+ $NaNO_2$

↓

บ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ,4 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าจากนั้น บ่มในอ่างเย็น 1 นาที

↓

Ammonium sulfamate

↓

แช่ในน้ำแข็งอีก 10 นาที (Nitrosated products)

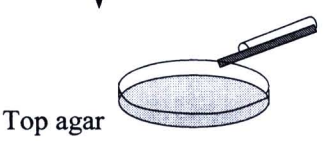
↓

Nitrosated products + Na_3PO_4- KCL buffer + Tester strains (TA98, TA100)

↓

บ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ,20 นาที พร้อมทั้งเขย่า

↓



Top agar

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ,48 ชั่วโมงจากนั้นจึงนับจำนวน His^+ revertant colonies

สารสกัดสมุนไพร

สารสกัดสมุนไพร + HCL+ Dimethyl sulfoxide (DMSO)

↓

บ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส , 4 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าจากนั้น แช่ในน้ำแข็ง 1 นาที

↓

Na_3PO_4- KCL buffer + Tester strains (TA98, TA100)

↓

บ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ,20 นาที พร้อมทั้งเขย่า

↓

Top agar

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ,48 ชั่วโมง จากนั้นจึงนับจำนวน His^+ revertant colonies

ภาพประกอบ 8 แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ (Ames test)

3. การแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

การแยกสารสำคัญจากสารสกัดสมุนไพร โดยใช้เทคนิค column chromatography ซึ่งใช้ stationary phase ชนิดต่างๆ ได้แก่, Silica gel Si-60.

เนื่องจากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของย่านาง ระดับ " มาก" ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระดับดีมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ ascorbic acid พบว่า จึงสนใจที่จะศึกษาสารสำคัญจากใบย่านาง เนื่องจาก ใบย่านางมีคนศึกษาสารสำคัญน้อย ที่พบในรายงานส่วนใหญ่จะศึกษาในราก ประกอบกับผักพื้นบ้านนี้เป็นผักที่นิยมรับประทานกับแกงหน่อไม้ทั้งในประเทศไทย ประเทศลาว รวมทั้งมีผู้ใช้น้ำคั้นมาดื่มเพื่อป้องกันและรักษามะเร็ง จึงสนใจที่จะศึกษาสารสำคัญ ตามขั้นตอนดังนี้

3.1 การแยกสารสารประกอบ A และ B

นำสารสกัดชั้น methanol ของใบย่านาง (10 g) มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ stationary phase คือ siliga gel และใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ n-Hexanes : Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol (Gradient) เก็บ fractions ใส่ในหลอดทดลอง ได้ทั้งหมด 310 หลอด นำแต่ละหลอดไปตรวจสอบด้วย TLC แต่ละหลอดที่มีลักษณะ finger print ที่เหมือนกัน นำมารวมกัน พบหลอดที่สนใจคือ

หลอดที่ 149 – 164 นำไประเหยลดความดันด้วย rotary evaporator และนำไปตกผลึกใน MeOH พบว่าได้สารที่มีผลึกสีเหลืองอ่อน (สาร A)

หลอดที่ 26 – 39 ไประเหยลดความดันด้วย rotary evaporator และนำไปตกผลึกใน EtOAc พบว่าได้ผลึกสีขาว (สาร B)

3.2 การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้

3.2.1 ตรวจสอบด้วยเทคนิคทาง Spectroscopy

1. Infrared spectra

นำสารที่แยกได้ไปตรวจสอบ หมู่ functional ด้วยเครื่อง FT-IR spectrophotometer ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

2. Nuclear magnetic resonance spectra

นำสารที่แยกได้ไปหา NMR spectra ด้วยเครื่อง Bruker DRX 500 (500MHz) ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3. Mass spectra

นำสารที่แยกได้ไปหา The EI-MS spectra ที่ National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand Science Park.

3.2.2 ทดสอบด้วยคุณบัติทางกายภาพ และเคมี

นำผลึกสารที่แยกได้ไปหาจุดหลอมเหลว ตรวจสอบด้วย ปฏิกิริยาสี และ ตรวจสอบโดย TLC ด้วยการตรวจสอบภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ได้ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามโดยมีขั้นตอนการทดลอง มีรายละเอียดและขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารสกัดสมุนไพร ให้มีความเข้มข้น 5 ความเข้มข้น (15 – 500 ppm) ด้วย Methanol ในหลอดทดลอง
2. เตรียม DPPH ความเข้มข้น 60 ppm ด้วย Methanol
3. นำสารสกัดในข้อ 1 จำนวน 750 µL และ DPPH จำนวน 750 µL
4. ทิ้งไว้ที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 516-518 nm วัดค่า absorbance ทุกหลอด รวมทั้ง control (มีเฉพาะ DPPH) แล้วหาค่า % radical scavenging จากสูตร

$$\frac{Actr - Asample}{Actr} \times 100$$

เมื่อ Actr หมายถึงค่า absorbance ของ control, Asample เป็นค่า absorbance ของสารสกัดสมุนไพร

5. พล็อตกราฟ ระหว่าง ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร กับ % radical scavenging แล้วหาค่า EC_{50} หรือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถทำลาย DPPH ไปครึ่งหนึ่ง

ทำการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด รวมทั้ง Vitamin C (ascorbic acid) ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน

แต่ละชนิดของสารสกัดสมุนไพร ทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี disk diffusion method

ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดโดยวิธี disk diffusion method โดยดัดแปลงจากวิธีของ The National Committee for Clinical Laboratory Standards หรือ NCCLS ที่ห้องปฏิบัติการ จุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม โดยเตรียมตามขั้นตอน ดังนี้

5.1 การเตรียมสารสกัดและ disk ชุบสมุนไพร

1. ส่วนสกัดสมุนไพรที่ระเหย ตัวทำละลายออกให้หมด จะได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) จาก crude extract ละลายด้วย ตัวทำละลายเดิม เตรียมให้มีความเข้มข้น 250 mg / ml เป็น stock solution

2. ไปเปต stock solution ลงบน disk เปล่าปริมาณ 40 µl จะได้ disk มีความเข้นข้นของ crude extract ที่ 10 mg/ml แล้วนำไปผึ่งให้แห้งใน incubator

5.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อการทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ที่ใช้ทดสอบ ต้องเป็นเชื้อที่เพาะได้ใหม่ (18-24 ชั่วโมง) เตรียมเชื้อใน Mueller-Hinton broth นำไป incubated ที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 3 h ปรับเชื้อให้มีขุ่นเท่ากับ Mc Farland standard No. 0.5 (ประมาณ 1 x10^{8} cfu/ml)

5.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารวุ้นที่ใช้คือ Mueller-Hinton Agar เตรียมอาหารโดยละลายอาหาร 38 g ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave) ที่ 121 ^{o}C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนึ่ง ทำให้เย็นประมาณ 45 – 50 ^{o}C เทลงจานเพาะเชื้อ จานละ 25 ml ทิ้งไว้จนเย็นใน Larminar air flow

5.4 การทดสอบ

1. ป้ายเชื้อที่ปรับความขุ่นไว้จากข้อ 1.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ โดยป้ายแบบสามทิศทาง

2 นำ diks ยาสมุนไพรที่เตรียมไว้จากข้อ 1.1.2 มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อม disk ยามาตรฐาน ampicillin 10 µg/disk

3 นำจานอาหารเพาะเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4 สังเกตุโซนใสรอบ diks ที่เกิดขึ้นแล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสดังกล่าวในหน่วยมิลลิเมตร

6. การหาค่า MICs ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยวิธี broth dilution techniques

การหาค่า MICs ของสารสกัด โดยวิธี broth dilution techniques โดยดัดแปลงจากวิธีของ Barry AL (1976) ซึ่งทำการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

6.1 การเตรียมสารสกัดที่แยกได้เพื่อการทดสอบ

นำส่วนสกัดทั้งสามส่วนมาเตรียมเป็น stock solution ให้มีความเข้มข้น 64 mg/ml ในน้ำ (กรณีที่ส่วนสกัดไม่ละลายในน้ำ ให้ละลายใน dimethylsulfoxide (DMSO) ก่อน แล้วค่อยเติมน้ำ ทั้งนี้จะต้องมีความเข้มข้นท้ายสุดจะมี DMSO ไม่เกิน 10%)

6.2 การเตรียมเชื้อที่จะทดสอบ

ใช้เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้จากเชื้อที่เพาะได้ใหม่ (18-24 ชั่วโมง) เตรียมเชื้อใน Mueller-Hinton broth นำไป incubated ที่ 37 °C for 3 h ปรับเชื้อให้มีขุ่นเท่ากับ Mc Farland standard No. 0.5 (ประมาณ 1 x10^8 cfu/ml) แล้ว dilute ให้เชื้อมีความเข้มข้นประมาณ 5 x10^6 cfu/ml

6.3 การทดสอบ

ทำตามวิธีของ Barry AL และสรุปสารที่จะต้องเติมตามตาราง 1

6.3.1 การทดสอบสารแต่ละตัว เตรียมหลอดทดลองที่ sterile ชุดละ 14 หลอด

6.3.2 ไปเปต 0.5 ml ของ Mueller Hinton broth (MHB) ลงในทุกหลอด

6.3.3 ไปเปตสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ที่จะทดสอบจาก stock solution ที่เตรียมไว้จากข้อ 1.1 ไปยังหลอดที่ 1 แล้วผสมให้เข้ากัน

6.3.4 ไปเปต 0.5 ml ของของผสมจากหลอดที่ 1 ไปยังหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน แล้วไปเปต 0.5 ml ของของผสมจากหลอดที่ 2 ไปยังหลอดที่ 3

6.3.5 ทำเหมือนข้อ 1.3.4 ไปทุกๆ หลอด จนถึงหลอดที่ 12 แล้วไปเปตของผสมจากหลอดที่ 12 ทิ้งไป 0.5 ml

6.3.6 ไปเปตเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 1.2 ลงไปทุกหลอดยกเว้นหลอดที่ 14

6.3.7 นำหลอดทดลองทุกหลอดไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 h

6.3.8 หาค่า MIC ได้จากความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารที่ใช้ทดสอบที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (ของผสมจะใส)

ตาราง 1 ปริมาตรของสารสกัดที่จะทดสอบ อาหารเลี้ยงเชื้อและปริมาณเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

Tube No.	The test Solution (ml)	MHB (ml)	MHB from previous tube (ml)	Inoculumn (ml)	Final conc. Of the test solution (mg/ml)
1	0.5	0.5	0.0	0.5	16
2	0.0	0.5	0.5	0.5	8
3	0.0	0.5	0.5	0.5	4
4	0.0	0.5	0.5	0.5	2
5	0.0	0.5	0.5	0.5	1
6	0.0	0.5	0.5	0.5	0.5
7	0.0	0.5	0.5	0.5	0.25
8	0.0	0.5	0.5	0.5	0.13
9	0.0	0.5	0.5	0.5	0.06
10	0.0	0.5	0.5	0.5	0.03
11	0.0	0.5	0.5	0.5	0.02
12	0.0	0.5	0.5	0.5	0.01
13	0.0	0.5	0.0	0.5	Positive control
14	0.0	0.5	0.0	0.0	Negative control

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

สำหรับข้อมูล ได้มีการวิเคราะห์ข้อมูล ดังนี้

1. ข้อมูลจากการทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์

1.1 นำข้อมูลที่ได้ (% inhibition) มาหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. ข้อมูลจากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.2 นำข้อมูลที่ได้จากข้อไปทดสอบสมมุติฐานโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way analysis of variance) ตามสูตร

$$F = \frac{MS_{Tr}}{MS_E}$$

เมื่อ F แทน ค่าสถิติที่ใช้พิจารณาใน F-distribution

MS_{Tr} แทน ค่ากำลังสองเฉลี่ยของสิ่งทดลอง

MS_E แทน ค่ากำลังสองเฉลี่ยของความคลาดเคลื่อน

2.3 เมื่อผลการทดสอบสมมุติฐานมีนัยสำคัญทางสถิติจึงได้เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธีของ Duncan 's new multiple range test โดยใช้สูตรดังนี้ (เมื่อมีจำนวนซ้ำที่เท่ากัน)

$$SSR_p = r_p \sqrt{\frac{MS_E}{n}}$$

เมื่อ SSR_p แทน Shortest significant range

r_p แทน Least significant studentized range

MS_E แทน ค่ากำลังสองเฉลี่ยของความคลาดเคลื่อน

n แทน จำนวนตัวอย่างในกลุ่มทดลอง

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disk diffusion method

3.1 นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน