

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากบัวที่นิยมปลูกเป็นการค้าดำเนินการดังนี้

1. กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาเป็นส่วนต่างๆของบัวที่นิยมปลูกเป็นการค้า 3 ชนิด ได้แก่ บัวหลวง บัวสาย และบัวเผื่อน ที่เก็บจากท้องที่กรุงเทพฯและจังหวัดใกล้เคียงดังนี้

บัวหลวง : พันธุ์บัวหลวงขาว (บุญทริก) และบัวหลวงชมพู(ปทุม) เก็บจาก ตำบลคลอง 5 อำเภอกลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ตำบลช้างใหญ่ อำเภอบางไทร จังหวัดพระนครศรีอยุธยา และตำบลโผงเผง อำเภอป่าโมก จังหวัดอ่างทอง

บัวสาย : พันธุ์สัตตบรรณ(บัวสายสีแดง) เก็บจากตำบลคลอง 5 อำเภอกลองหลวง ตำบลคลองใหญ่ อำเภอองครักษ์ จังหวัดปทุมธานี และ อำเภอป่าโมก จังหวัดอ่างทอง

บัวผัน (คละพันธุ์) เก็บจาก อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม ตำบลคลองใหญ่ อำเภอองครักษ์ และ ตำบลคลอง 5 อำเภอกลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากบัวที่นิยมปลูกเป็นการค้าทำในส่วนใบของบัวทั้งสามชนิด ดังกล่าวข้างต้น

2. สถานที่ดำเนินการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากบัวที่นิยมปลูกเป็นการค้า ดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการ โปรแกรมวิชาเคมีและโปรแกรมชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม

3. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องระเหยด้วยไอน้ำ

เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 และ 4 ตำแหน่ง

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ

ตู้เย็นเชื้อ

เครื่องอังไอน้ำ

เครื่องปั่น

paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm

ตะเกียงแอลกอฮอล์

บีกเกอร์

ขวดรูปชมพู่

ขวดวัดปริมาตร

ชามระเหย

ปิเปต

หลอดทดลอง

จานเพาะเชื้อ

เข็มฉีดยา

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

Potato dextrose agar (PDA)

Nutrient agar (NA)

NaCl

Ethanol 95 %

Hexane

Dichloromethane

น้ำกลั่น

Agar

5. วิธีดำเนินการวิจัย

5.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวง บัวสาย และบัวผัน

การสกัดโดยใช้ตัวสกัด 3 ชนิด คือ Ethanol 95 % , Dichloromethane และ Hexane ซึ่งมีคุณสมบัติความมีขั้วแตกต่างกัน ตามขั้นตอน ดังนี้

- 1) ล้างใบบัวให้สะอาด หั่นเป็นเล็กๆ นำไปอบให้แห้งโดยใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
- 2) ปั่นตัวอย่างที่แห้งแล้วให้ละเอียดด้วย blender
- 3) นำตัวอย่างประมาณ 1,000 กรัม ใส่ลงในโถสำหรับหมักเติมตัวสกัดลงไปให้ท่วมตัวอย่างหมักตัวอย่างไว้ 15 วัน

4) นำตัวอย่างที่หมักครบ 15 วัน กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกกากของใบบัว จากนั้นกรองซ้ำอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

5) นำสารสกัดที่ได้ไประเหยเพื่อไล่ตัวสกัดโดยใช้เครื่องระเหยด้วยระบบสุญญากาศ

6) สารสกัดที่ได้จากขั้นตอนนี้เรียกว่าสารสกัดหยาบ และนำสารสกัดหยาบนี้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในขั้นตอนต่อไป

5.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวง บัวสาย และบัวผัน โดยวิธี disc diffusion

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจาก ใบบัวหลวง บัวสาย และบัวผัน โดยวิธี disc diffusion ดำเนินการตามลำดับ ดังนี้

- 1) เตรียมสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากตัวสกัดทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100 % โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย หยดสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ลงบน paper disc ขนาด 6 มิลลิเมตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
- 2) เตรียม Inoculum เชื้อราไว้ทดสอบ เป็นเวลา 10 วัน ในหลอดทดลอง
- 3) ปรับความขุ่นของเชื้อราให้เท่ากับ 0.5 Mc Farland standard โดยนำกลั่นที่หนึ่งมาเชื้อแล้ว
- 4) นำเชื้อที่เตรียมได้ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
- 5) เกลี่ยให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยแท่งแก้วอ (ทิ้งไว้ให้แห้ง)
- 6) นำ paper disc ที่เตรียมไว้ วางบนอาหาร PDA โดยมีชุดควบคุมเป็น Paper disc ที่หยด เฉพาะเอทานอล
- 7) เพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน
- 8) สังเกต Inhibition zone ที่เกิดขึ้นและถ้าสารสกัดใดเกิดเป็น Inhibition zone จะนำไปหา MIC ตามหัวข้อ 5.4 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากใบบัวหลวง บัวสายและบัวผันแสดงใน ภาพที่ 3.2

5.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวง บัวสาย และบัวผัน โดยวิธี disc diffusion

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบ บัวหลวง บัวสาย และบัวผัน โดยวิธี disc diffusion ดำเนินการตามลำดับ ดังนี้

1) เตรียมสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากตัวสกัดทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 % โดยใช้ เอทานอลเป็นตัวทำละลาย หยดสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ลงบน paper disc ขนาด 6 มิลลิเมตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

2) เตรียม Inoculum เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ โดยใช้รูปเชื้อเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด 2-3 โคโลนี ใส่ ในหลอดบรรจุอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิตร

3) นำไปบ่มที่ตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4) ปรับเทียบความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 Mc Farland standard ด้วย Sterile normal saline solution ความเข้มข้น 0.85%

5) ใช้ไม้พันสำลีที่นิ่งมาเช็ดแล้วชุบเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 4 swab เชื้อให้ทั่วผิวน้ำอาหาร NA และทิ้งผิวน้ำอาหารให้แห้ง ประมาณ 3-5 นาที

6) นำ paper disc ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 วางบนอาหาร NA โดยมี ชุดควบคุมเป็น paper disc ที่ หยดเฉพาะเอทานอล

7) เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

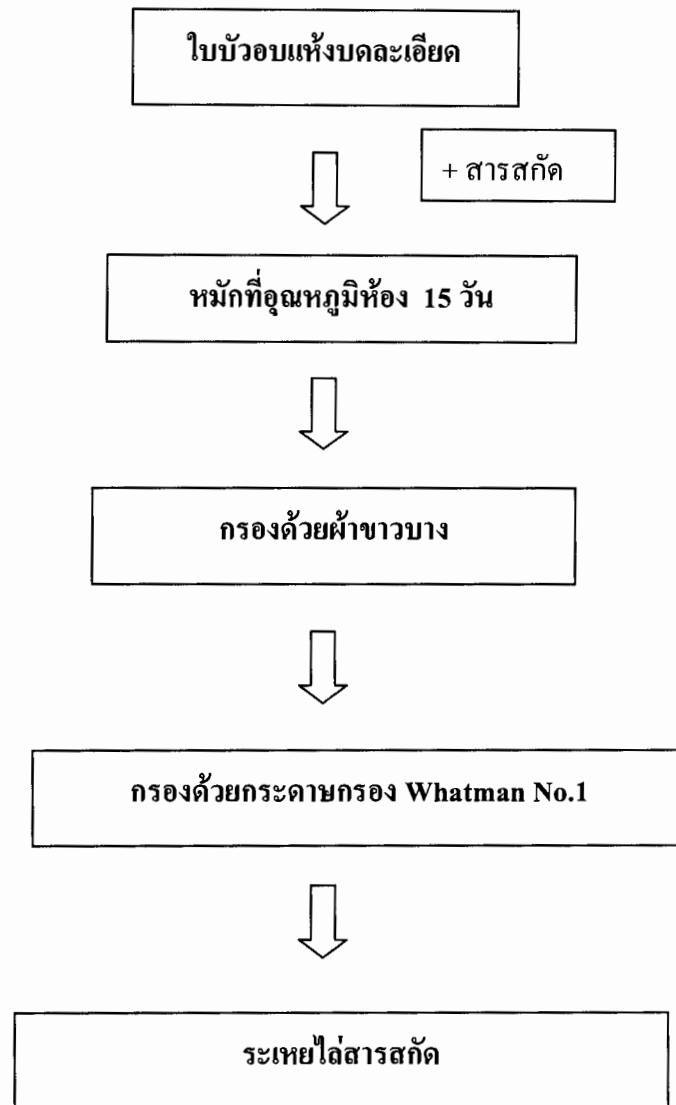
8) สังเกต Inhibition zone ที่เกิดขึ้นและถ้าสารสกัดใดเกิด Inhibition zone จะนำไปหา MIC ตามหัวข้อ 5.4 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบบัวหลวง บัวสายและบัวผันแสดงใน ภาพที่ 3.3

5.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibition Concentration , MIC)

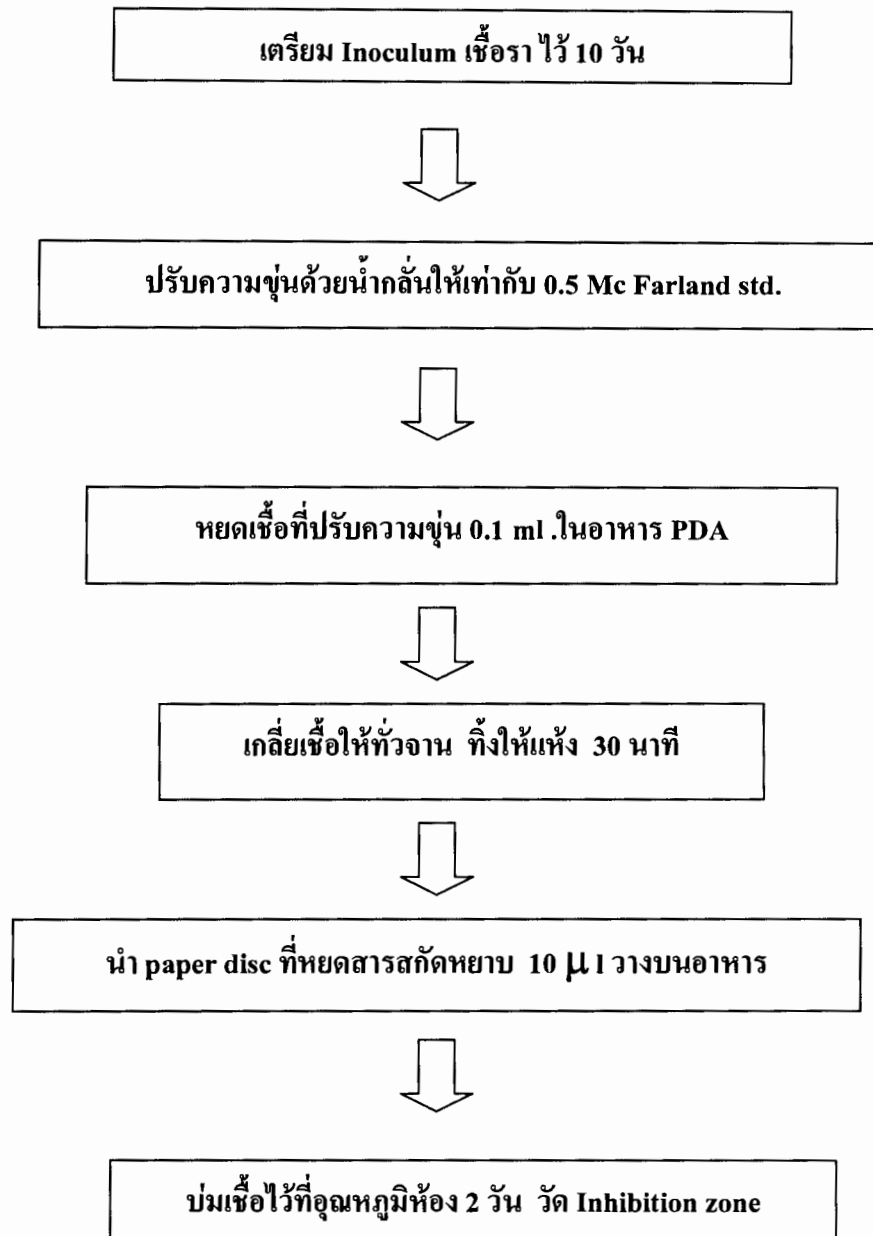
1) เตรียมสารสกัดหยาบจากใบบัวที่ทดสอบแล้วว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวได้ โดยนำสารสกัดหยาบมาเตรียมให้มีความเข้มข้น เป็น 50 % , 25 % , 12.5% , 6.25 % , 3.125 % และ 1.5625 % (หรือ 500 , 250 , 125 , 62.5 , 31.125 และ 15.625 mg/ml) โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย หยดสารสกัดแต่ละความเข้มข้นลงบน paper disc ขนาด 6 มิลลิเมตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

2) ทำเช่นเดียวกับการหาฤทธิ์ต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย

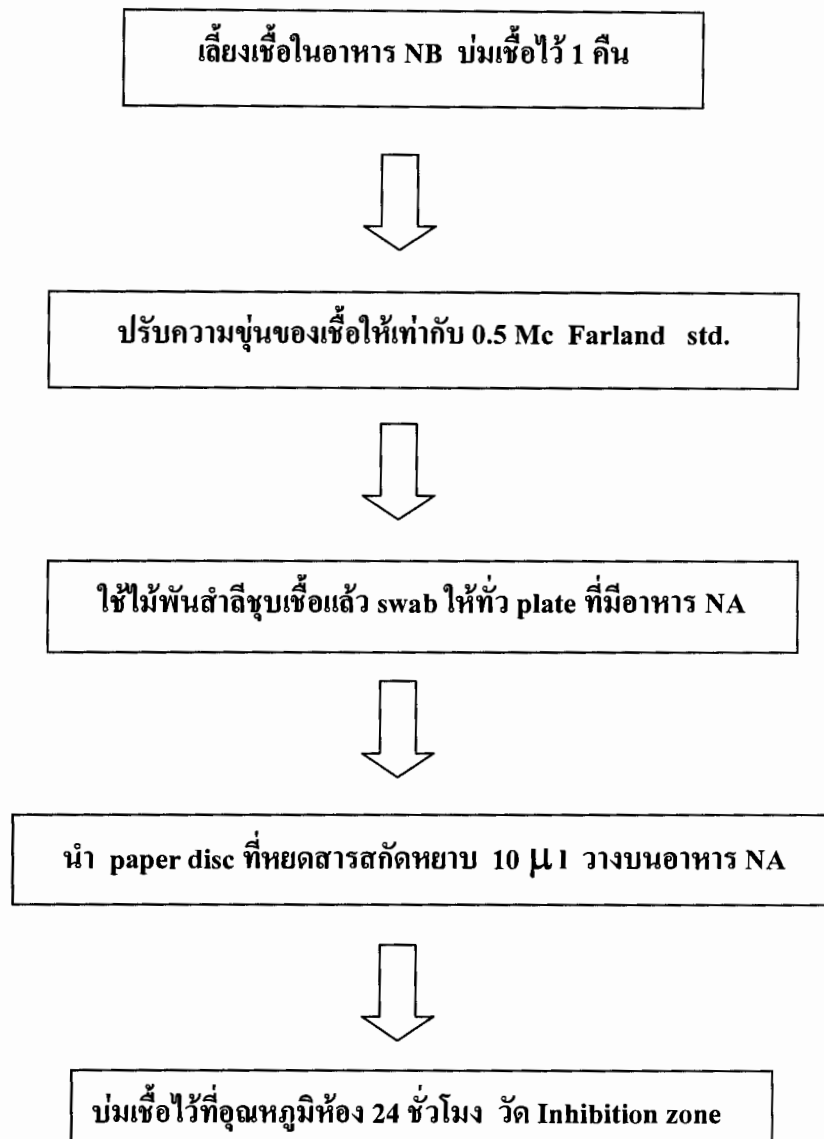
3) ตรวจและบันทึกผลโดยบันทึกความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เกิดวงใสเป็นค่า MIC



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบจากใบบัว



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา



ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย