บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือในการวิจัย

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

1) หัวเชื้อคีเฟอร์

Kefir DA 500 I, Kefir DC 500 I, Kefir DG 500 I, Kefir DT 500 I, Kefir BT 1, เชื้อคีเฟอร์ 4 ชนิด คือ Kefir DA 500 I, Kefir DC 500 I, Kefir DG 500 I, Kefir DT 500 I ได้จาก Danisco Biolacta ประเทศโปแลนด์ และ Kefir BT 1 ได้จาก อุบลราชธานี ประเทศไทย

2) เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่

Staphylococcus aureus (Gram positive)

Bacillus subtilis (Gram positive)

Escherichia coli (Gram negative)

Pseudomonas fluoresens (Gram negative)

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 4 ชนิดได้จากห้องเก็บเชื้อภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสาคาม

3.1.2 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือในการวิจัย

1) pH meter (Mettler Toledo, Seven Multi, Switzerland)

2) Centrifuge (Sorvall ®Instrument RC5C, Thailand)

3) Autoclave (Lab tech) (Worldwide Trade Thai Co., LTD, Thailand)

4) Vortex mixer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, USA)

5) Balance (Double beam balance-NEXUS, Germany)

6) Laminar air flow (Telstar Industial, Bio Ultra, Lab Focus Co., LTD, Thailand)

7) Hot air oven (Memmert, Germany)

8) Water bath (Memmert, Germany)

9) ชุดกรอง และกระดาษกรอง (Agela Tecnologies) (Nylon-0.45 µm)

10) Paper disc 6 mm. (Whatman, England)

11) Micropipette (Biohit, France

12) UV- Vis spectrophotometer (Beckman Coulter, DU 720®, UAS)

13) Co_2 Incubator (Contherm, MITRE 400 Series, Australia)

3.1.3. สารเคมี (Chemical reagents) และอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture media)

1) MRS agar และ MRS broth (de Man-Rogosa-Sharpe)

2) Nutrient agar และ Nutrient broth

3) Sodium hydroxide (NaOH) (LAB-SCAN Analytical Sciences, Thailand)
4) Hydrochloric acid (HCl) (Analar Normapur, UK)
5) Ethanol ความเข้มข้น 70%, 90%
6) ammonium sulphate
7) Bromophenol blue sodium salt (USB, US)
8) Glycerol (87%) (Amersham Biosciences, Sweden)
9) Iodoacetamide, IAA (Amersham Biosciences, England)
10) IPG buffer pH 3-10 NL (Amersham Biosciences, Sweden)
11) TEMED
12) Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Tris (USB, USA)
13) Sodium dodecyl sulfate, SDS (USB, USA)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของหัวเชื้อคีเฟอร์

3.2.1.1 การเตรียมหัวเชื้อคีเฟอร์

เลี้ยงคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ในอาหารเหลว MRS 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพไร้อากาศ โดยเลี้ยงใน anaerobic jar เพื่อเป็นการทำให้เชื้อ active จากนั้นนำเชื้อคีเฟอร์ที่พร้อมใช้งาน ถ่ายโอนไปเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ใหม่ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.2.1.2. การเตรียมแบคทีเรียก่อโรค

เตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบ คือ *Staphylococcus aureus* (Gram +), *Bacillus subtilis* (Gram +), *Escherichia coli* (Gram -), *Pseudomonas fluoresens* (Gram -) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งทำการเตรียมแบคทีเรียให้อยู่ในรูปของ cell suspensions โดยเตรียมได้จากการนำโคโลนีเดี่ยวหลาย ๆ โคโลนี ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน เติมลงใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร แล้วปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standards ทำให้ได้ความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ ~1×10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Scott Sutton, 2006)

3.2.1.3 การเตรียมสารมาตรฐาน

การเตรียมความเข้มข้นของแบคทีเรียจะใช้วิธีจากห้องปฏิบัติการ McFarland standards หรือทำการทดลองที่มีการกำหนดให้เชื้อเริ่มต้นมีค่าตามต้องการ

Standard McFarland No.0.5 เตรียมจาก 1.0 เปอร์เซ็นต์ $Bacl_2.2H_2O$ จำนวน 0.05 มิลลิลิตร ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ H_2SO_4 จำนวน 9.95 มิลลิลิตร ผสมแล้วเก็บในหลอดจุกเกลียว เก็บได้นาน 6 เดือน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร

ตาราง 3.1 การเตรียม McFarland’s Standards (Quelab Labotatotiex Inc, 2005)

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
A_{625} nm.	0.08-0.1	0.16-0.2	0.32-0.4	0.48-0.6	0.64-0.8

3.2.1.4 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในห้องปฏิบัติการ

1) การเตรียม Discs ทดสอบ โดยใช้วิธี Swab-paper-disc

วิธี Swab-paper-disc (ใช้หลักการแพร่กระจายของสารปฏิชีวนะจากแผ่นกระดาษกรองหรือแผ่นยา (discs) ไปรอบ ๆ อาหารเลี้ยงเชื้อ) ทำได้โดยเตรียมแผ่น discs ซึ่งชุบ discs ในสารปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน (Ampicilin) และ เพนนิซิลลิน (Penicillin) ในความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แปรผันเป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้อิ่มตัว

2) การทดสอบ

ดูด Suspensions ของเชื้อก่อโรค 100 ไมโครลิตร (~1 x 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ที่เตรียมในข้อ 3.2.1.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) โดยใช้เทคนิค swab วาง disc ยาปฏิชีวนะและ disc ที่ปลอดเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อแล้วใช้ไมโครปิเปต (micropipette) ดูดหัวเชื้อคีเฟอร์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.1.1 ลงบนแผ่น disc ที่ปลอดเชื้อแล้วบ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กำหนดให้ใช้เวลา 24 ชั่วโมง ในการบ่มเชื้อซึ่งเป็นเวลาที่พอเหมาะสำหรับการแพร่กระจายของสารปฏิชีวนะไปรอบ ๆ อาหารวุ้น รวมทั้งมีปฏิกิริยาขัดขวางการเจริญของเชื้อทดสอบ เรียกว่า standardization of incubation time ตรวจสอบผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญรอบ ๆ แผ่น disc เรียกว่า อินฮีบิทชันโซน (inhibition zone) (งามนิจ นนทโส, 2550)

3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินที่แยกจากหัวเชื้อคีเฟอร์

3.2.2.1 การเตรียมสารสกัด (Cell free supernatant)

เลี้ยงคีเฟอร์ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ในอาหารเหลว MRS 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพไร้อากาศ โดยเลี้ยงใน anaerobic jar เพื่อเป็นการทำให้เชื้อ active จากนั้นนำเชื้อคีเฟอร์ที่พร้อมใช้งาน ถ่ายโอนไปเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ใหม่ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยวัดความเข้มข้นของเชื้อหรือค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่ 1.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพไร้อากาศ ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสมาปรับ pH ให้ได้ 6.5 ด้วย 5 M HCl หรือ 5 M NaOH จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคต่อไป สำหรับในการทดลองนี้ทำการเลี้ยงคีเฟอร์ในอาหารเหลว MRS ในสภาวะที่ไม่มีอากาศทั้งนี้เพื่อให้เชื้อคีเฟอร์ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ หรือผลิตได้น้อยมากจนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ และการปรับ pH ให้ได้ 6.5 เพื่อลดผลการยับยั้งอันจะเกิดจากกรดอินทรีย์ที่เชื้อผลิตขึ้น เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคต่อไป

3.2.2.2 ความสามารถในการทนต่อความร้อน

นำ Cell free supernatant ของเชื้อคีเฟอร์ที่ทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซินไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 และ 30 นาที และทำได้โดยการตั้งเครื่อง water bath ให้ได้อุณหภูมิที่ต้องการ จากนั้นนำหลอดตัวอย่างสองหลอดใส่บนเครื่อง โดยหลอดที่ 1 จุ่มด้วย เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer) เพื่อเป็นเครื่องมือควบคุมอุณหภูมิที่แสดงว่า Cell free supernatant มีอุณหภูมิตามต้องการ จากนั้นนำหลอดที่ 2 ออกจากเครื่อง Water bath ไปทำการทดสอบกับเชื้อก่อโรค โดยวิธี Swab paper disc และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใช้เครื่องหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียโรคตามข้อ 3.2.1.2 โดยชุดควบคุมคือ Cell free supernatant ที่ไม่ผ่านการทดสอบกับความร้อน

3.2..2.3 ความสามารถในการทนต่อ pH ที่ต่างกัน

นำ Cell free supernatant ของเชื้อคีเฟอร์ที่ทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน นำมาปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) 5 โมลาร์ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 5 โมลาร์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นปรับ pH ของ cell free supernatant ให้ได้เท่ากับ 6.5 จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคตามข้อ 3.2.1.2 โดยชุดควบคุมคือ Cell free supernatant ที่ไม่ปรับ pH 6.5

3.2.2.4 การหาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการสร้างแบคเทอริโอซินของหัวเชื้อคีเฟอร์

การหากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin activity) ที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซินของหัวเชื้อคีเฟอร์ โดยเลี้ยงหัวเชื้อคีเฟอร์ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 300 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไรอากาศ เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10 ,12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 ตามลำดับโดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มิลลิลิตร แบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำไปวัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ส่วนที่สองนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วปรับ pH ให้ได้ 6.5 ด้วย 5 M HCl หรือ 5 M NaOH จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำมาเจือจางด้วยอาหารเหลว MRS ในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:16, และ 1:32 ตามลำดับ ต่อจากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณค่า bacteriocin activity ในหน่วย AU/มิลลิลิตร Arbitrary unit (AU) คือ หน่วยของค่าระดับความเจือจางต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้

3.2.3 การทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ และการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารแบคเทอริโอซินที่แยกได้

3.2.3.1 การทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์

การทำให้แบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากคีเฟอร์ โดยการนำส่วนใสปราศจากเซลล์ไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว (ammonium sulphate) ความเข้มข้น 30-70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปทำไดอะไลซีส (dialysis) ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (sodium phosphate buffer) บัฟเฟอร์ pH 6.5 ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนบัฟเฟอร์ และทิ้งไว้อีก 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ โดยใช้คอลัมน์ Sepphadex gel G-50 หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ แล้วนำโปรตีนที่ได้โหลดลงในคอลัมน์ เก็บ fraction ละ 5 มิลลิลิตร และเลือก fraction ที่มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน ไปหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินโดยใช้เทคนิค Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

3.2.3.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินโดย Sodiume Dodecyl Sulphate Polyacrylamide gel (SDS-PAG)

นำ Faction ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ใช้ขนาดของ maker อยู่ระหว่าง 1.0 ถึง 21.2 kDa

1) การเตรียมเจลสำหรับทำ SDS

ปิเปต Acrylamide solution ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร/ปริมาตร ที่เตรียมไว้ (30 เปอร์เซ็นต์ acryl amide, 70 เปอร์เซ็นต์ Bisacrylamide 4X Tris-Clolide /SDS, pH 8.8, และ ผสมในน้ำ 50 มิลลิลิตร) ใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง จนกระทั่งระดับของสารละลายอยู่ต่ำกว่าขอบกระจกด้านบนประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร (ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ) จากนั้นปิดผิวหน้าเจลทันทีด้วยน้ำ deionized แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนเทน้ำออกเพื่อนำเจลไป ใช้ทำ SDS-PAGE หรือเก็บเจลไว้ใช้ภายหลังโดยปิดผิวหน้าเจลด้วย gel storage solution แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

2) การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานโดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ 1 ส่วนซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl 0.2 โมลาร์ pH 6.8, EDTA 8 มิลลิโมลาร์, กลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์, SDS 4 เปอร์เซ็นต์ และ bromophenol blue 0.4 เปอร์เซ็นต์

3) การ Equilibrate IPG strip ก่อนทำ SDS-PAGE

เตรียมหลอด ขนาด 15 มิลลิลิตร 2 หลอด โดยหลอดที่ 1 มี 0.05 กรัม Dichlorodiphenyltrichloroethane (DTT) และหลอดที่ 2 มี 1.25 กรัม Indole acetic acid (IAA) จากนั้นเติม SDS equilibration buffer 5 มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลอด เพื่อละลายสารที่อยู่ในหลอด นำ Immobiline Dry Strip gels (IPG strip) ที่ผ่านการทำ IEF แล้ว มาใส่ในหลอดที่ 1 โดยหันด้านพลาสติกแนบกับข้างหลอดด้านใน แล้วนำไปวาง บนเครื่องโยก เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้าย IPG strip มาใส่ในหลอดที่ 2 แล้วนำไป วางบนเครื่องโยกเป็นเวลา 15 นาที

4) การนำ strip ใส่เครื่อง miniVE และทำ SDS-PAGE

แช่ IPG strip ที่ได้จาก 3 ใน 1X SDS electrophoresis running buffer เป็นเวลา 5-10 วินาที เพื่อล้าง glycerol ที่เป็นองค์ประกอบใน SDS equilibration buffer ออก แล้ววาง strip ลงบนเจลที่เตรียมไว้ โดยให้ด้านพลาสติกแนบกับกระจกด้านนอก (rectangular plate) และให้ด้านบวกอยู่ซ้าย (ต้องอ่านตัวเลขบน IPG strip ได้) เตรียม protein marker โดยปิเปต protein marker ปริมาตร 0.75 ไมโครลิต ลงบนกระดาษกรอง (ขนาด 3 x 5 มิลลิเมตร) แล้วทิ้งไว้จนแห้ง จากนั้นวางกระดาษกรองลงตรงช่องว่างด้านขวาของ IPG strip แล้วปิดผิวหน้า IPG strip ด้วย agarose sealing solution ปลดล็อก sealing plate ของ module ให้อยู่ในระดับล่างสุดก่อนนำมาใส่ใน electrophoresis chamber เติม 1X SDS electrophoresis running buffer ในช่องว่างของ module ให้ท่วมขอบบนของกระจกด้านใน (notched plate) แล้วเติม buffer ชนิดเดียวกันลงใน chamber ให้อยู่เหนือขีดที่บอกระดับต่ำสุด กำจัดฟองอากาศที่อยู่ขอบกระจกทั้งด้านบนและล่าง ตรวจขั้วกระแสไฟของ module ว่าแห้งสนิทก่อนก่อนปิดฝา ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) แล้วตั้งโปรแกรมการทำ SDS-PAGE ดังนี้

ขั้นที่ 1: Current 10 mA/gel 0:15 ชั่วโมง

ขั้นที่ 2: Current 20 mA/gel 1:30 ชั่วโมง

Max 600 โวลล์ และ 100 วัตต์

กดปุ่ม Run เพื่อเริ่มการทำ SDS-PAGE ในขั้นตอนแรก เมื่อเสร็จสิ้นตามเวลาที่กำหนด ให้กดปุ่ม Stop ตามด้วย Set เพื่อเปลี่ยนโปรแกรมเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 ซึ่งในขั้นตอนนี้ให้สังเกตแถบของ bromophenol blue (tracking dye) หากเคลื่อนลงมาห่างจากขอบเจล ด้านล่าง 1.5-2 เซนติเมตร ให้กดปุ่ม หยุด (Stop) เพื่อหยุดการทำงานของเครื่อง จากนั้นตัดเจลใส่ในกล่องพลาสติกใสสำหรับย้อมสี แล้วทับด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 ทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นเท Coomassie Brilliant Blue R-250 ออก และเททับเจลด้วยสารละลาย เมธานอล/น้ำกลั่น/กรดอะซิติก (40%:50%:10% v/v/v) ลงไปแทนที่ทิ้งไว้ 30 นาที สังเกตแถบโปรตีนที่เกิดขึ้น

5) การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) จากนั้นเททับบนแผ่นเจลที่ที่มีแถบโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านการย้อมสี บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณการยับยั้ง.

3.3 แผนการทดลอง

การวิเคราะห์การทดสอบคุณสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซิน ได้แก่ กิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดที่ผลิตโดยหัวเชื้อคีเฟอร์ ผลของความร้อนที่มีต่อแบคเทอริโอซิน ผลของพีเอชที่มีต่อแบคเทอริโอซิน วางแผนการทดลองแบบ Complementary Randomized Design (CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.4.1 สถิติเชิงพรรณนา

สรุปข้อมูลจากการศึกษาเพื่อแสดงลักษณะของกลุ่มตัวอย่าง ได้แก่

$\bar{X}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ย (Mean)

SD หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

3.4.2 สถิติเชิงวิเคราะห์

วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ ด้วยวิธี Duncan New Multiple Range Test ทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value ≤ 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์