บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

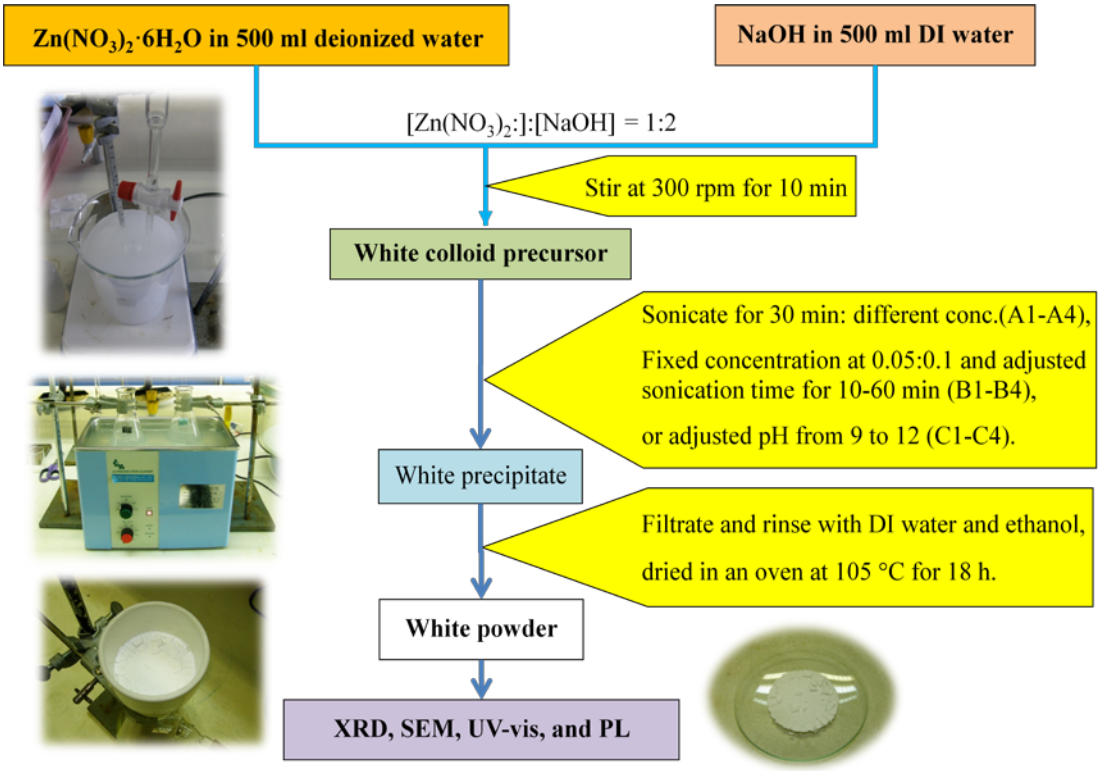
โครงการวิจัยนี้แบ่งการดำเนินศึกษาวิจัยเป็นสองส่วนหลักๆ คือ 1) การสังเคราะห์สังกะสีออกไซด์ และ 2) การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ สมบัติทางแสง และสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสังกะสีออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ โดยมีรายละเอียดวิธีการทดลองดังนี้

3.1 วิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนสังกะสีออกไซด์

วิธีดำเนินการสังเคราะห์ ZnO ได้แบ่งการทดลองเป็น 4 ส่วน สำหรับการศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพต่อลักษณะสัณฐานของอนุภาค ZnO โดยมีวิธีดังต่อไปนี้

3.1.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้น (effect of reagent concentration)

สำหรับตัวอย่างชุดแรก (ชุด A) ละลายซิงก์ไนเตรตเฮกซะไฮเดรต ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ที่บรรจุในบีกเกอร์ขนาด 1000 ml เพื่อเตรียมสารละลายซิงก์ไนเตรตที่มีปริมาตร 500 mL ($[Zn^{2+}]$ = 0.01 mol/L) โดยใช้เครื่อง magnetic stirrer คนสารละลายด้วยอัตราเร็วรอบเท่ากับ 300 rpm จนกระทั่งสารละลายจนหมด แล้วเทโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.02 M ($[OH^-]$ =0.02 mol/L) ลงไปในสารละลายอย่างช้าๆ ด้วยปริมาตรเท่ากัน โดยคิดเป็นอัตราส่วนความเข้มข้น $[Zn^{2+}]$:$[OH^-]$ = 1:2 (0.01:0.02, 0.05:0.10, 0.1:0.2, และ 0.2:0.4 M; ตัวอย่าง A1-A4) คนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10 นาที แล้วใช้คลื่นอัลตราซาวด์แผ่เข้าไปในสารละลายผสม (sonochemical reaction) ต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที ภายใต้บรรยากาศแวดล้อมของห้องทดลอง จะสังเกตเห็นผลผลิตสีขาวปรากฏแขวนลอยอยู่ในสารละลาย หลังจากนั้นพักไว้ให้ตกตะกอน แล้วจึงนำไปกรองพร้อมกับล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน และล้างด้วยเอทานอลบริสุทธิ์หลายครั้ง ขั้นตอนสุดท้ายนำตะกอนที่กรองได้ไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง การจัดเตรียมอุปกรณ์สำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนสังกะสีออกไซด์และขั้นตอนการสังเคราะห์สารตัวอย่างสรุปเป็นแผนภาพดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 การจัดเตรียมอุปกรณ์สำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนสังกะสีออกไซด์และแผนภาพขั้นตอนการทดลองสังเคราะห์ ZnO ด้วยเงื่อนไขของความเข้มข้นของสารตั้งต้น เวลาสังเคราะห์ และค่า pH

3.1.2 การศึกษาผลของช่วงเวลาที่ให้คลื่นเสียงแก่สารละลาย (effect of irradiation time)

ตัวอย่างชุดที่ 2 มีขั้นการสังเคราะห์เช่นเดียวกับชุดแรก แต่เปลี่ยนเวลาที่ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ตั้งแต่ 10 20 30 จนถึง 60 นาที (ตัวอย่าง B1-B4) โดยควบคุมความเข้มข้นของสารละลายที่อัตราส่วนคงที่เท่ากับ 0.05:0.1 M

3.1.3 การศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสของสารละลาย (effect of pH)

การเตรียมตัวอย่างชุดที่ 3 มีขั้นตอนเช่นเดียวกับชุดที่ 2 แต่ใช้คลื่นเสียงแผ่ในสารละลายเป็นเวลา 30 นาที หลังจากปรับค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายให้มีค่า pH = 9 10 11 และ 12 แล้ว ด้วยการหยด 1M NaOH ลงไปอย่างช้าๆ (~50 ml/min) พร้อมทั้งคนสารละลายไปในเวลาเดียวกัน (ตัวอย่าง C1-C4)

3.2 การวิเคราะห์คุณลักษณะเฉพาะและสมบัติของ ZnO

การวิเคราะห์คุณลักษณะเฉพาะและสมบัติของ ZnO แบ่งออกเป็น 4 วิธี ดังนี้

3.2.1 ศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology)

วิเคราะห์ลักษณะรูปร่างและขนาดอนุภาคของสารตัวอย่าง โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

รูปที่ 3.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

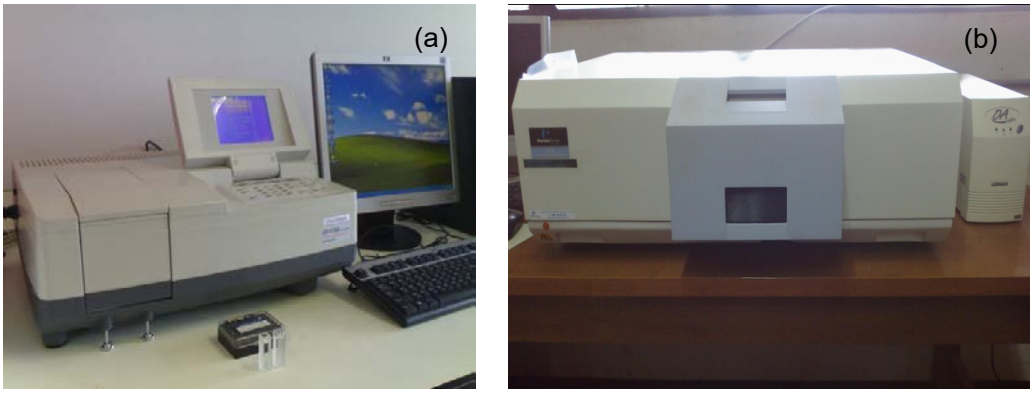
3.2.2 ศึกษาความเป็นผลึกและโครงสร้างเฟส (crystallinity and phase structure)

วิเคราะห์โครงสร้างเฟสของสารขนาดผลึกจากการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ ด้วยเทคนิค X-ray diffraction spectroscopy (XRD)

รูปที่ 3.3 เครื่อง X-ray diffractometer (Philips X' Pert MPD)

3.2.3 ศึกษาสมบัติทางแสง (optical properties)

วิเคราะห์สเปกตรัมการดูดกลืนแสง (UV-vis) และการเรืองแสงหรือโฟโตลูมิเนสเซนส์ (PL) ของสารที่อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่อง UV-vis spectrometer และ luminescence spectrometer ตามลำดับ



รูปที่ 3.4 เครื่องมือวิเคราะห์สมบัติทางแสง (a) UV-vis spectrometer (Shimadzu, UV-2450) และ (b) luminescence spectrometer (LS/55, PerkinElmer)

3.2.4 วิธีดำเนินการศึกษาสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial properties)

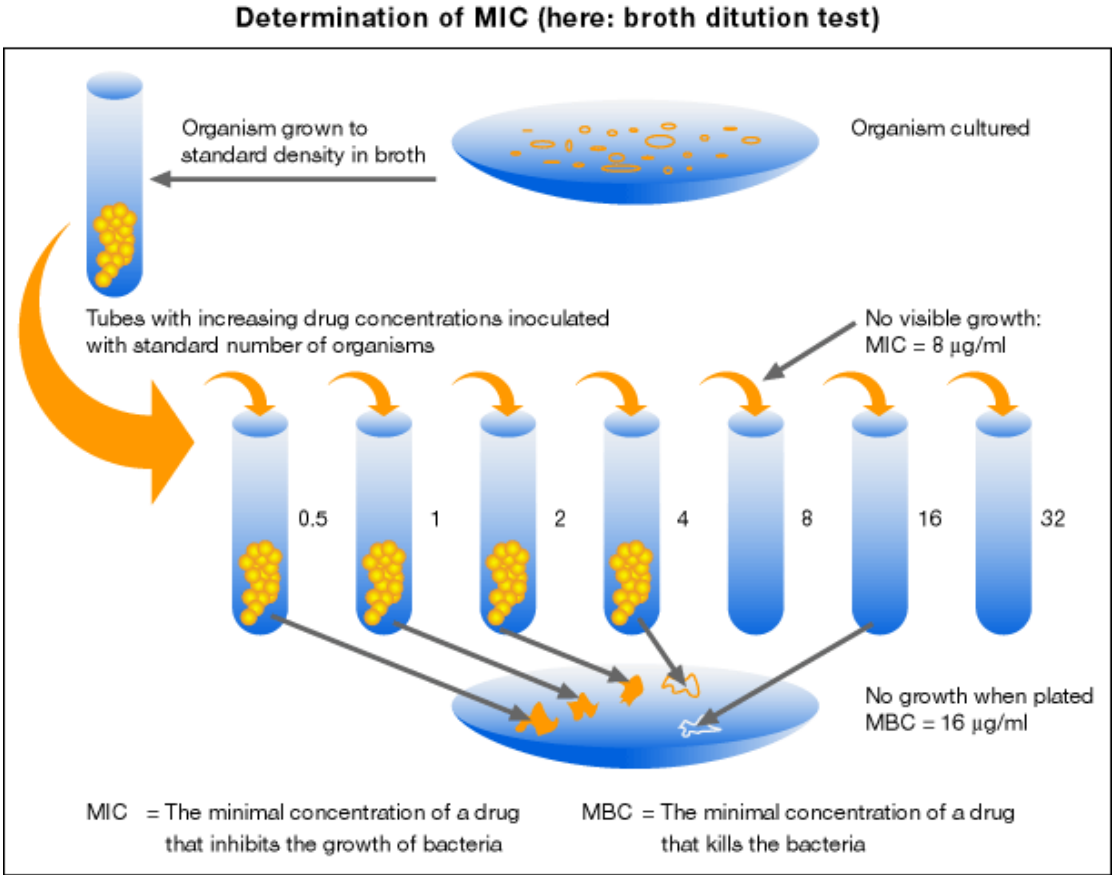
สำหรับการทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดำเนินการโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimal Inhibitory Concentration : MIC) จะทำการทดสอบใน 96 well microplate และโดยวิธี disc diffusion ซึ่งทำการทดสอบกับแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Psuedomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* และ *Enterococcus faecalis* โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมสารละลายนาโนสังกะสีออกไซด์ สำหรับการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibitory Concentration: MIC)

เตรียมสารละลายตัวอย่าง (stock solution) โดยการละลายอนุภาคนาโนสังกะสีออกไซด์ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 3 M ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 8,192 µg/ml โดยค่อยๆ เติม NaOH อย่างช้าๆ จนถึงปริมาตรที่อนุภาคนาโนสังกะสีออกไซด์ละลายอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ (ใช้ปริมาตรของ NaOH น้อยที่สุดที่ทำให้อนุภาคนาโนสังกะสีออกไซด์ละลาย)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายสังกะสีออกไซด์ โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ (MIC) ตามมาตรฐานของ CLSI (CLSI, 2006a : M2) โดยความเข้มข้นของสารละลายสังกะสีออกไซด์ที่ใช้สำหรับทดสอบ จะทำการเจือจางตามลำดับขั้น (two fold diultion) เริ่มต้นจาก 1-2,048 µg/ml ขั้นตอนการทดสอบมีรายละเอียดดังนี้ เตรียมแบคทีเรียที่ใช้สำหรับทดสอบ ได้แก่ *Escheriachia. coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginasa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) และ *Salmonella* Typhimurium (isolated strain) โดยใช้แบคทีเรียอายุประมาณ 18-20 ชั่วโมง นำมาปรับความขุ่นในน้ำเกลือ 0.85% ด้วยเครื่อง densitometer (BioSan: England) ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ซึ่งจะมีแบคทีเรียปริมาณ $1x10^8$ ถึง

$2x10^8$ CFU/ml จากนั้นเจือจางแบคทีเรียด้วย Mueller Hinton Broth (MHB) (Himedia: India) ในอัตราส่วน 1:100 โดยปริมาตรของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 50 µl เมื่อรวมกับปริมาตรของอาหารและสารละลายสังกะสีออกไซด์แล้วจะมีปริมาตรรวมเท่ากับ 200 µl/well จะทำให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบอยู่ที่ประมาณ $5x10^4$ CFU/well หลังจากนั้นนำไป incubate อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง จึงนำมาอ่านผลการทดสอบ



รูปที่ 3.5 การศึกษาปริมาณสารละลายความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ป้องกันไม่ให้เกิดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลองโดยวิธี MIC

(ที่มา: http://animalhealth.bayer.com/ah/5236.0.html)

2) การเตรียมสารละลายนาโนสังกะสีออกไซด์สำหรับการทดสอบหาความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion

เตรียมสารละลายนาโนสังกะสีออกไซด์ให้ได้ความเข้มข้น 40 mg/ml โดยละลายแขวนลอยอนุภาคนาโนสังกะสีออกไซด์ในน้ำ sterile deionized water (DDW) เขย่าสารแขวนลอยแรงๆ โดยใช้ vortex mixer เป็นเวลา 5 นาที่ หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยนาโนสังกะสีออกไซด์ไปแช่ใน ultrasonic bath แล้ว sonicate เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาเก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C ทิ้งไว้ 1 คืนก่อนนำมาทดสอบ

เตรียมแบคทีเรียที่ใช้สำหรับทดสอบ ได้แก่ *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *Ps. aeruginasa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 700603) และ *S.* Typhimurium (isolate strain) โดยใช้แบคทีเรียอายุประมาณ 18-20 ชั่วโมง นำมาปรับความขุ่นในน้ำเกลือ 0.85% ด้วยเครื่อง densitometer (BioSan: England) ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ซึ่งจะมีแบคทีเรียปริมาณ $1x10^8$ ถึง $2x10^8$ CFU/ml ใช้ sterile cotton swab จุ่มเชื้อที่ได้ปรับความขุ่นแล้ว นำไป streak ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Agar (MHA) จากนั้นใช้แผ่น disc ที่หยดด้วยสารแขนลอยของอนุภาคนาโนสังกะสีออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 800 µg/disc วางลงบนอาหาร MHA ที่ได้ streak เชื้อแบคทีเรียจนเต็มหน้าอาหารแล้ว นำจานอาหารเพาะเชื้อไปบ่มเพาะที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาอ่านผลการทดสอบโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น