

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1. วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1. การเตรียมตัวอย่างพืช

นำชะครามทั้งส่วนที่เป็นสีแดงและสีเขียวที่เก็บจากพื้นที่บางขุนเทียน และผักแพวที่ซื้อจากตลาดท้องถิ่นมา ล้างทำความสะอาด แล้วหั่นเป็นชิ้น ขนาดประมาณ 1 ซม. แบ่งเป็นชนิดสด และชนิดแห้ง โดยชนิดสดซึ่ง หลังจากล้างทำความสะอาดแล้ว นำไปหั่นและบดละเอียดด้วย blender ส่วนชนิดแห้งนำส่วนของพืชแต่ละ ชนิด ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 40°C นาน 24 ชั่วโมง บดที่แห้งแล้วด้วย blender นำตัวอย่างพืชทั้งชนิดสด และชนิดแห้งที่บดแล้วไปทดสอบต่อไป

3.1.2. สารเคมี

- 80% ethanol เตรียมโดยใส่ ethanol (C_2H_5OH) (analytical grade) จาก Sigma Chemicals (NJ, USA) 800 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 1,000 mL เติมน้ำกลั่น เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันและ ปรับปริมาตรเป็น 1,000 mL
- 10% Folin-Ciocalteu phenol reagent เตรียมโดยใส่ Folin-Ciocalteu phenol reagent (analytical grade) จาก BHD CO., Ltd (England) ปริมาตร 50 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 500 mL เติมน้ำกลั่นเขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 500 mL
- 0.12 N HCl เตรียมโดยใส่ hydrochloric acid (HCl) (analytical grade) จาก Sigma Chemicals (NJ, USA) 4.98 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 500 mL เติมน้ำกลั่น เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันและ ปรับปริมาตรเป็น 500 mL
- 7.5% sodium carbonate เตรียมโดยชั่ง sodium carbonate (Na_2CO_3) (analytical grade) จาก BHD CO., Ltd (England) 37.50 g แล้วละลายใน 0.12 N HCl ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 500 mL และปรับปริมาตรด้วย 0.12 N HCl เป็น 500 mL เก็บในขวดสีชา
- สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก เตรียมได้จากละลาย gallic acid ($C_7H_6O_5$) จาก Fluka CO., Ltd (German) จำนวน 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005 และ 0.006 g แล้วละลายในน้ำกลั่น ใส่ลงใน

volumetric flask ขนาด 100 mL และปรับปริมาตรเป็น 100 mL จะได้ working solution ความเข้มข้น 0.001, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 mg/mL

3.2. วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1. การสกัดสารสกัดจากชะครามและผักแพว

เปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดจากชะครามและผักแพว เพื่อให้ได้ปริมาณ yield สูงและมีคุณภาพในการนำไปใช้เป็นสาร biopreservative

3.2.1.1. การสกัดสารสกัดจากชะครามและผักแพว โดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (hydrodistillation)

นำตัวอย่างพืชชะครามและผักแพวที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 มาสกัดโดยใช้ตัวอย่างสดชนิดละ 1000 g และตัวอย่างแห้งชนิดละ 500 g ใส่ลงใน flask สำหรับกลั่นขนาด 10 L สำหรับใส่ตัวอย่าง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 L ลงไปให้ท่วมตัวอย่างพืช ประกอบชุดกลั่นให้สมบูรณ์และตั้งอุณหภูมิให้น้ำเดือด ตั้งกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยไอน้ำพาสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากตัวอย่างพืชออกมา ไอของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยผ่าน condenser และถูกควบแน่นตกลงมาจนได้สารสกัดน้ำมันหอมระเหยออกมา เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4°C นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพ

3.2.1.2. การสกัดสารสกัดจากชะครามและผักแพว โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)

นำตัวอย่างพืชชะครามและผักแพวที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 มาสกัดโดยใช้ตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง ใส่ลงใน flask ขนาด 1 ลิตรสำหรับใส่ตัวอย่าง แล้วใส่ตัวทำละลาย 99% ethanol, petroleum ether และ acetone ด้วยอัตราส่วน 1:2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แช่ทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงกรองเอาสารสกัดออกจากกากของตัวอย่างพืช โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 ได้สารละลายที่สกัด แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง vacuum rotary evaporatory รุ่น BUCHI Rotavator R-200 จาก Büchi Labortechnik AG (Switzerland) นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปล้างเพื่อเอา wax ออกด้วย ethanol และแช่สารละลายที่อุณหภูมิ -5°C ถึง -10°C จนเกิดตะกอน wax และกรองเอา wax ออก แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออก เก็บสารสกัดที่ได้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4°C นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพ

3.2.1.3. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพ ได้แก่

- การวัดปริมาณของสารสกัดที่สกัดได้

นำสารสกัดที่ได้มาชั่งน้ำหนัก และคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{yield (\% w/w dry basis)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัด (g)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช (g)}} \times 100$$

- การวัดค่าการหักเหคลื่นแสง (Refractive index RI)

วัดค่าการหักเหคลื่นแสงของสารสกัดจากพืชด้วยเครื่อง hand-held refractometer หยดสารสกัดโดยเตรียมความเข้มข้นที่ 2000 ppm ประมาณ 1-2 หยด หยดลงแผ่นปริซึมของตัวเครื่อง อ่านสเกลผ่านช่องมองสังเกตเห็นแถบมืดแถบสว่าง ปรับโฟกัสให้เห็นเส้นสเกลชัดเจนที่สุด บันทึกอุณหภูมิและค่า refractive index ที่วิเคราะห์ได้

- การวัดค่า optical rotation

เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติการเบี่ยงเบนแสงโพลาไรซ์ คือ เครื่อง polarimeter โดยนำสารสกัดมาบรรจุลงใน polarimeter tube (ระวังไม่ให้มีฟองอากาศ) หาดำแหน่ง end point อ่านค่าการเบี่ยงเบนแสง ซึ่งค่าการเบี่ยงเบนไปทางซ้ายหรือทางขวาเป็นองศา (°) แสงที่ถูกเบี่ยงเบนไปทางซ้าย มีเครื่องหมายเป็นลบ (-) เรียกว่า รูปลิว (levo forms เขียนย่อเป็น l-) แสงที่ถูกเบี่ยงเบนไปทางขวา มีเครื่องหมายเป็นบวก (+) เรียกว่า รูปลิว (dextro forms เขียนย่อเป็น d-)

- การวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วย gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS)

นำสารสกัดจากพืชที่ได้มาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) เตรียมสารตัวอย่างสารสกัดของชะครามและผักแพว ที่ความเข้มข้น 1000 ppm ใน ethanol หลังจากนั้นฉีดตัวอย่างปริมาตร 1 µL โดยใช้ splitless mode, column type: DB-5MS (30 m length x 0.25 mm ID x 0.25 µm film thickness), carrier gas: helium, pressure: 3 psi, oven temperature: flow rate 0.57 mL/min, inlet temperature: 230°C, detector temperature: 250°C ตั้งอุณหภูมิ oven เริ่มต้น 70°C then rate at 10°C/min to 140°C, and then rate at 5°C/min to 240°C ซึ่งใช้ internal standard ในการหาปริมาณของสาร ส่วน spectrum ของสารนำไปเปรียบเทียบกับ Wiley275 and NIST library โดยต้องมี % quality match มากกว่า 85% เพื่อหาชนิดของสารสำคัญในสารสกัด ส่วนค่า RI คำนวณเทียบกับสารมาตรฐาน n-alkanes standards (C10 - C20).

3.2.1.4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเพื่อประเมินคุณสมบัติการเป็นสาร antibacterial ของชะครามและผักแพว ได้แก่

- Disc diffusion assay

ทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสาร antibacterial ของสารสกัดชะครามและผักแพวโดยใช้วิธี disc diffusion โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์คือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. และ *Bacillus cereus* ปริมาตร 50 μL ที่มี 1×10^6 CFU/mL ของแบคทีเรียจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยเปรียบเทียบกับ MacFarland no. 0.5 ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งค่า OD ควรอยู่ในช่วง 0.008-0.1 จากนั้นนำเชื้อทั้งหมดมา spread โดย sterile glass spreader ลงบน Muller-Hinton Agar (MHA) medium นำแผ่น filter paper (Whatman No.1) ขนาด 6 mm ที่ผ่านการ sterile มาทำให้อิ่มตัวด้วย 100 $\mu\text{L/mL}$ สารสกัดที่ละลายด้วย dimehtylsulfoxide (DMSO) ที่ผ่านการ sterile หลังจากนั้นนำไปใส่ใน inoculated plate บ่มที่อุณหภูมิ $37 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลาง inhibition zone ที่เกิดรอบ filter paper disk ของสารสกัดทุกความเข้มข้น เปรียบเทียบกับตัวควบคุม คือ DMSO ใช้เป็น negative control และ streptomycin (5mg/mL) ใช้เป็น positive control

- Minimum Inhibitors Concentration (MIC)

ทดสอบหาค่า minimum inhibition concentration (MIC) สำหรับแบคทีเรียโดยถูกวัดเป็นความไวต่อสารสกัดใน disc diffusion assay นำสารสกัดมาละลายใน DMSO โดยความเข้มข้นแรกมีความเข้มข้นสูงสุด (50 $\mu\text{L/mL}$) และปรับความเข้มข้นลดลงเป็น 25 $\mu\text{L/mL}$, 12.5 $\mu\text{L/mL}$ และ 6.25 $\mu\text{L/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแต่ละชนิดที่เกิด inhibition zone คือ MIC level โดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุม คือ DMSO ใช้เป็น negative control และ streptomycin (5mg/mL) ใช้เป็น positive control

3.2.1.5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเพื่อประเมินคุณสมบัติการเป็นสาร antioxidant ของชะครามและผักแพว ได้แก่

- วิธีการวิเคราะห์การเป็นสาร antioxidant ด้วย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเพื่อประเมินคุณสมบัติการเป็นสาร antioxidant ของชะครามและผักแพว โดยใช้วิธี DPPH ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Devi และคณะ (2008) นำสารสกัดของพืชแต่ละชนิดโดยเตรียม

ความเข้มข้น 2000 ppm ปริมาตร 100 μ L มาเติม 0.1 mM DPPH ปริมาตร 3 mL เขย่าให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 517 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ค่าการดูดกลืนแสงต่ำแสดงว่ามีค่า free radical scavenging activity สูง โดยใช้ ethanol เป็น control และใช้สารละลาย TROLOX ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารมาตรฐาน การคำนวณ % DPPH Scavenging effect ตามสูตร ดังนี้

$$\% \text{ DPPH Scavenging effect} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) \times 100$$

A_{blank} คือ ค่า absorbance ของสารควบคุม โดยเติม ethanol แทนการเติมสารสกัด

A_{sample} คือ ค่า absorbance ของสารสกัดที่ต้องการทดสอบ

- วิธีการวิเคราะห์การเป็นสาร antioxidant ด้วย 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) assay

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเพื่อประเมินคุณสมบัติการเป็นสาร antioxidant ของชะครามและผักแพว โดยใช้วิธี ABTS ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Devi และคณะ. (2008) นำสารสกัดของพืชแต่ละชนิดปริมาณ 100 μ L มาเติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 4 mL เขย่าให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 734 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ค่าการดูดกลืนแสงต่ำแสดงว่ามีค่า free radical scavenging activity สูง โดยใช้ ethanol เป็น control และใช้สารละลาย TROLOX ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารมาตรฐาน

3.2.1.6. การวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic ด้วย Folin-ciocateau methods

นำตัวอย่างพืชจำนวน 30 g ปั่นกับ 80% ethanol ปริมาตร 45 mL ให้ละเอียด นำตัวอย่างที่ได้ไปทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบของเครื่อง 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาเจือจาง 20 เท่า โดยดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 0.05 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.95 mL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixture นำสารละลายที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม 10% Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 10 mL ผสมให้เข้ากันทันที เติม 7.5% sodium carbonate ปริมาตร 8 mL ผสมให้เข้ากัน และเตรียมหลอด blank โดยใช้ น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง เติม 10% Folin-Ciocalteu phenol reagent และ 7.5% sodium carbonate เช่นเดียวกับตัวอย่าง หลังจากนั้นนำสารละลายไปใส่ใน water bath 35°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นแช่ น้ำแข็ง 0°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง นำสารละลายที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

(absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer เทียบกับ blank โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิก เทียบผลกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก ความเข้มข้น 0-0.06 $\mu\text{g/mL}$ (Singleton และคณะ, 1965)

3.2.1.7. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SAS วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดย Duncan New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%