# บทที่ 2 วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสาหร่ายอบแห้ง

นำสาหร่ายมาล้างน้ำให้สะอาด หลังจากนั้นนำสาหร่ายมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่ออบจนแห้งแล้วนำสาหร่ายมาบดด้วยเครื่องปั่นอาหารให้เป็นผงละเอียดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่าย 3 วิธี คือ (1) ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (2) การหาปริมาณโพลีฟีนอล (Total Phenolic Content, TPC) และ (3) การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Reducing power)

2.1 ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH โดยชั่งสาหร่ายแห้งที่บดละเอียด 1 กรัม สกัดด้วยเอทานอล 95%, อะซิโตน และน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 12000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดึงส่วนใสมาปิเปตลงหลอดทดลอง 1.08 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH (ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์) 0.12 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Murakami *et al*. 2004) และนำมาคำนวณ

สมการ DPPH (Absorbance ที่ 517 นาโนเมตร) = 1.0376(DPPH) – 0.0197

สูตร DPPH %DPPH ที่เหลือ = DPPH (ตัวอย่าง)/DPPH(standard)*100

2.2 การหาปริมาณโพลีฟีนอล โดยชั่งสาหร่ายแห้งที่บดละเอียด 1 กรัม สกัดด้วยเอทานอล 95%, อะซิโตน และน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งที่ไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 12000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดึงส่วนใส มาปิเปตลงหลอดทดลอง 0.5มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteau หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย $Na_2CO_3$ 10% 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ตามวิธี Folin-Ciocealteau (Wolfe *et al*. 2003) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค

2.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิค

2.2.1.1 ละลายกรดแกลลิค 0.0200 กรัม ด้วยเอทานอล (95%) ปรับปริมาตรจนได้ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2.2.1.2 ปิเปตสารละลายกรดแกลลิคที่เตรียมไว้ลงในหลอดทดลอง โดยให้มีปริมาณกรดแกลลิค ตั้งแต่ 0-140 ไมโครกรัม เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 10 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** การเตรียมหลอดทดลองสำหรับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค

| หลอดที่ | ไมโครลิตรของ working solution | ไมโครกรัมของกรดแกลลิค | มิลลิลิตรน้ำกลั่น |
|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 0 | 10.00 |
| 2 | 50 | 20 | 9.95 |
| 3 | 100 | 40 | 9.90 |
| 4 | 150 | 60 | 9.85 |
| 5 | 200 | 80 | 9..80 |
| 6 | 250 | 100 | 9.75 |
| 7 | 300 | 120 | 9.70 |
| 8 | 350 | 140 | 9.65 |

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.2.1.3 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteau หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

2.2.1.4 เติมสารละลาย $Na_2CO_3$ (10%) (วิธีเตรียม $Na_2CO_3$ จำนวน 10กรัม ละลายด้วยน้ำจำนวน 100 มิลลิลิตร) หลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาที เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายหลอดที่ 1 เป็น blank

2.2.1.5 นำผลที่วัดได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงกับปริมาณของกรดแกลลิคได้เป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve)

2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Reducing power) โดยชั่งสาหร่ายแห้งที่บดละเอียด 0.005 กรัม และ 0.01 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2M, pH6.6) 2.5 มิลลิลิตร และเติม potassium ferriccyanide (1%) 2.5 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath 50 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม trichloroacetic acid (10%) 2.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ดึงส่วนใส 2.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และเติม $FeCl_3$ (0.1%) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร (Kumar *et al*, 2008) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค

2.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิค

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ - 3 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 246791
เลขเรียกหนังสือ

2.3.1.1 ละลายกรดแกลลิค 0.0200 กรัม ด้วยเอทานอล (95%) ปรับปริมาตรจนได้ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2.3.1.2 ปิเปตสารละลายกรดแกลลิคที่เตรียมไว้ลงในหลอดทดลอง โดยให้มีปริมาณกรดแกลลิค ตั้งแต่ 0-140 ไมโครกรัม เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 10 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 1

2.3.1.3 เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2M, pH6.6) 2.5 มิลลิลิตรและเติม potassium ferriccyanide (1%) 2.5 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath 50 °C เป็นเวลา 30 นาที

2.3.1.4 เติม trichloroacetic acid (10%) 2.5 มิลลิลิตร ดึงstandard 2.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และเติม $FeCl_3$ (0.1%) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

2.3.1.5 นำผลที่วัดได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงกับปริมาณของกรดแกลลิคได้เป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve)

3. การทดสอบเชื้อแบคทีเรีย

ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยสารสกัดจากสาหร่ายจะใช้วิธีการ Alamar Colorimetric Microdilution Broth Assay โดยใช้ Alamar Blue เป็นอินดิเคเตอร์

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NB ยกเว้น *Vibrio harveyi* ใช้ TSB โดยบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.1 การทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์

นำเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเหลว 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเทอาหารทิ้ง แล้วล้างเชื้อด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้น *Vibrio harveyi* ใช้ 2% โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทโซเดียมคลอไรด์ทิ้ง และเติมโซเดียมคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร อีกครั้งปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทโซเดียมคลอไรด์ทิ้ง หลังจากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นทำการเจือจางเชื้อด้วยโซเดียมคลอไรด์แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความเจือจาง แล้วนำค่าการ

ดูดกลืนแสงแต่ละความเจือจางของเชื้อไปเจือจางเพื่อหาจำนวนเซลล์ด้วยวิธีการหยดเชื้อ 5 จุด ใช้ปริมาตรจุดละ 10 ไมโครลิตร บนอาหาร NA ยกเว้น *Vibrio harveyi* ใช้ TSA แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ ทำการคำนวณหาจำนวนเซลล์ในปริมาตร 1มิลลิลิตร และนำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานพร้อมกับหาสมการเส้นตรง

3.2 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมสารสกัดจากสาหร่ายทั้ง4 ชนิด (สาหร่ายหางกระรอก, สาหร่ายข้าวเหนียว, สาหร่ายคาบอมบ้า, และสาหร่ายขนนก) ที่ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.125, 0.0625, 0.03125, และ 0.015625 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydophilla*, *Vibrio Harveyi* ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ CFU/ml โดยทำการล้างเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการในข้อ 3.1.1 เติมเชื้อที่ได้ลงในอาหาร NB ยกเว้น *Vibrio harveyi* ใช้ TSB เพื่อใช้เป็นเชื้อทดสอบ หยดสารสกัดจาสาหร่ายในแต่ละความเข้มข้นลงในจานเพาะเชื้อ 96 หลุม โดยแถวที่ 1 และ 2 เติมอาหาร NB ยกเว้น *Vibrio harveyi* ใช้ TSB ในทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร แถวที่ 3-4 บนแถว A ใส่ยา Oxytetracycline(ยา0.002กรัม/น้ำ 10มิลลิลิตร) หลุมละ 200 ไมโครลิตร โดยทำการ dilute ครั้งละ 100 ไมโครลิตร ส่วนแถวที่ 5-12บนแถว A ใส่สารสกัดจากสาหร่ายทั้ง 4 ชนิด โดยชนิดละ 2 ซ้ำ จำนวนหลุมละ 200 ไมโครลิตร ดึงจากหลุมแรกมา 100 ไมโครลิตร โดยทำการ dilute ครั้งละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเชื้อเติมเชื้อแบคทีเรียในทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร และเติม Alamar Blue หลุมละ 1 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของ Alamar Blue โดยปกติ Alamar Blue จะมีสีน้ำเงิน ถ้าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู

**การบันทึกข้อมูล**

1. บันทึกการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบกับสารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้นต่างๆ

2. บันทึกค่าการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระของ DPPH, TPC และ Reducing power

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองได้แก่ ความสามารถในการทำลายสารอนุมูลอิสระ DPPH, ปริมาณโพลีฟีนอล มาวิเคราะห์และประเมินผลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS window version 10.0 เพื่อหาความสัมพันธ์และ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสาหร่ายแต่ละชนิดในการทดลอง