

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### ตัวอย่างพืชสมุนไพรไทย

พืชสมุนไพรไทยที่ใช้ในการทดลองมี 13 ชนิด ดังตารางที่ 2 เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรในเขตอำเภอบ้านลาดและอำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552

ตารางที่ 3.1 พืชสมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษา

| ชื่อพืชสมุนไพร                     | ส่วนที่ใช้ทดลอง |
|------------------------------------|-----------------|
| กระดังงาไทย ( <i>C. odorata</i> )  | F T             |
| การเวก ( <i>A. siamensis</i> )     | T               |
| สัตบรรณ ( <i>A. scholaris</i> )    | T               |
| โมก ( <i>W. religiosa</i> )        | T               |
| ปีบ ( <i>M. hortensis</i> )        | F T             |
| เล็บมือนาง ( <i>Q. indica</i> )    | F T             |
| จัน ( <i>D. decandra</i> )         | T               |
| สารภี ( <i>M. siamensis</i> )      | F T             |
| นางแย้ม ( <i>C. philippinium</i> ) | T               |
| ประคำ ( <i>P. macrocarpus</i> )    | T               |
| จำปี ( <i>M. alba</i> )            | F T             |
| พิกุล ( <i>M. elengi</i> )         | F T             |
| แก้ว ( <i>M. paniculata</i> )      | T               |

หมายเหตุ : F หมายถึง ดอก และ T หมายถึง กิ่ง

## แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี จำนวน 6 ชนิด ได้แก่

*S. aureus* *B. subtilis* *E. faecalis* *M. luteus* *K. pneumoniae* และ *C. violaceum*

## สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ก)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) (ภาคผนวก ก)
4. สารละลายมาตรฐานแมคฟาร์แลนด์ (McFarland standards No. 0.5) (ภาคผนวก ข)
5. ตัวทำละลายแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์)

## วัสดุและอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
2. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
3. ขวดรูปชมพู่ (Flask)
4. ปีกเกอร์แก้ว (Beaker)
5. หลอดทดลอง (Test tube)
6. กระบอกตวงสาร (Graduated cylinder)
7. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
8. เข็มเย็บเชื้อ (Loop)
9. ปิเปตต์ (Pipette)
10. ไมโครปิเปตต์ (Micropette)
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamps)
12. ปากคีบ (Forceps)
13. กระดาษกรอง Whatman No. 2 และ No. 5
14. ตู้เป่าเชื้อ (Laminar air flow)

15. ตู้เก็บบ่มเชื้อ (Incubator)
16. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
17. เครื่องชั่งสารไฟฟ้า (Balance)
18. เครื่องเขย่า (Shaker)
19. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
20. เวอร์เนียส แคลลิเปอร์ (Vernier slide calliper)
21. กล้องถ่ายภาพดิจิทัล (Digital camera)
22. กระดาษจุ่มสารสกัด เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm (paper disc)
24. ยาปฏิชีวนะ choramphenicol

## วิธีการดำเนินงานวิจัย

**ตอนที่ 1 ศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรไทย 13 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด ด้วย วิธี agar diffusion method**

### 1.1 การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย

1.1.1 นำส่วนของสมุนไพรมาล้างน้ำให้สะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ นำไปทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.1.2 ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 25 g ใส่ในขวดรูปชมพู่ แล้วเติมตัวทำละลายเอทานอล 95 % ปริมาตร 150 ml ปิดด้วยกระดาษฟอยด์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

1.1.3 นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.2

1.1.4 นำไประเหยตัวทำละลายออกจนหมด เพื่อให้ได้สารสกัดที่เข้มข้นขึ้น

1.1.5 นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งในขั้นต่อไป

### 1.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด

1.2.1 เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหาร NA ด้วยวิธี Cross Streak เก็บบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

1.2.2 ใช้เข็มเจาะเชื้อจากข้อ 1.2.1 จำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB 50 ml เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 1.3 การทดสอบผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

1.3.1 นำเชื้อจากข้อ 1.2.2 มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA (อุณหภูมิ 50 °C) ปรับความข้นให้ได้เท่ากับสารละลายมาตรฐานแมคฟาร์แลนด์ 0.5 (McFarland standards No. 0.5) จะได้เชื้อประมาณ  $10^7$ - $10^8$  CFU/ml แล้วเทอาหารลงในจานเพาะเชื้อ

1.3.2 ทดสอบปริมาตรของสารสกัดใน paper disc ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้ไมโครปิเปต พบว่า paper disc สามารถอุ้มสารสกัดได้ปริมาตร 30  $\mu$ l

1.3.3 ลนไฟปากกิบ แล้วคีบกระดาษกรองที่มีสารสกัดวางลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1.3.1 โดยแต่ละเชื้อทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3.4 ตรวจสอบการยับยั้งโดยการวัดขนาดวงใส (Clear Zone) ที่เกิดขึ้น บันทึกผล

1.3.5 นำขนาดวงใสของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมาวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบ One Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

1.3.6 เลือกสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุดมาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้

**ตอนที่ 2 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี agar disc diffusion**

2.1 นำสารสกัดพืชสมุนไพรไทยที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุด มาทำการเจือจางสารสกัดที่ความเข้มข้น 4 1.5 0.67 0.25 0.025 0.0025 และ 0.00025 g/ml ตามลำดับ

2.2 เตรียมเชื้อเหมือนข้อ 1.3.1 แล้วเทอาหาร MHA ลงในจานเพาะเชื้อ ลนไฟปากกิบ แล้วคีบกระดาษกรองที่มีสารสกัดวางลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใน 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อจะวางสารสกัดทุกความเข้มข้นด้วยวิธี agar diffusion method เพื่อเปรียบเทียบขนาดวงใส แต่ละความเข้มข้นจะทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เก็บบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดตรวจสอบการยับยั้งโดยวัดขนาดวงใสและบันทึกผลการทดลอง

2.3 เปรียบเทียบผลการยับยั้งของสารสกัดกับยาปฏิชีวนะ