บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้

3.1.1. hexane

3.1.2. sodium sulfate anhydrous

3.1.3. blood agar base

3.1.4. Mueller-hintom agar

3.1.5. alkane standard solution C8-C20

3.1.6. alcohol

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ ที่ใช้

3.2.1. beaker ขนาดต่างๆ

3.2.2. erlenmeyer flask ขนาดต่างๆ

3.2.3. petridish PS 90 x 15 mm. (sterile)

3.2.4. cylider ขนาดต่างๆ

3.2.5. antibiotic test disk 6 mm.

3.2.6. micropipette

3.2.7. Laboratory sealing film 4"x125FT

3.2.8. Digital analytical balance

3.2.10. rotary evaporator

3.2.11. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

PAYAP UNIVERSITY

3.2.12. incubator

3.2.13. freezer

3.2.14. volumetric flask ขนาด 10 มล.

3.2.15. clevenger apparatus

3.2.16 forceps

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยศึกษามีขั้นตอนการดำเนินการวิจัยดังนี้

3.3.1. <u>การเก็บตัวอย่างพืช</u>

3.3.1.1) ศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับพืชในสกุล Myrtaceae สกุล *Eugenia* spp ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ชมพู่ทับทิมจันทร์ ชมพู่มะเหมี่ยว หว้า มะเกี๋ยง

3.3.1.2) ดำเนินการสืบหาต้นไม้ที่ถูกต้องตามต้องการเพื่อเก็บใบนำมาใช้ศึกษาวิจัยต่อไป

3.3.1.3) เก็บใบจากต้นพืชทั้ง 4 ชนิด โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 นำใบพืชแต่ละชนิดที่ได้ ไปสกัดเก็บน้ำมันตามวิธีการในขั้นตอนต่อไป

ส่วนที่ 2 นำใบพืชแต่ละชนิดที่ได้ทำให้แห้ง เพื่อเก็บรักษาเป็น voucher specimen ไว้ที่ พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติ หอพรรณไม้ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

3.3.2 <u>การสกัดน้ำมัน</u>

3.3.2.1) วิธีการกลั่นด้วยน้ำ

3.3.2.1) (1) นำใบไม้สดของพืชแต่ละชนิด ล้างให้สะอาด หั่นใบสดให้เป็นชิ้นเล็ก

3.3.2.1) (2) ชั่งน้ำหนักใบสด

PAYAP UNIVERSITY

3.3.2.1) (3) นำพืชใส่ลงภาชนะ เติมน้ำสะอาดจนท่วมพืช ต้มน้ำให้เดือดกลายเป็นไอน้ำ น้ำมันและน้ำจะระเหย จากนั้นถูกทำให้เย็นตัวลงกลับมาเป็นของเหลว

3.3.2.1) (4) ไขเก็บชั้นส่วนของน้ำมันหอมระเหย

3.3.2.1) (5) เติม sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4 anhydrous) เก็บในภาชนะทึบแสง เก็บในตู้เย็น ก่อนนำไปใช้ต่อไป

3.3.2.2) <u>วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย</u>

3.3.2.2) (1) นำใบไม้สดของพืชแต่ละชนิด ล้างให้สะอาด หั่นใบสดให้เป็นชิ้นเล็ก

3.3.2.2) (2) ใส่พืชลงใน flask เติม n-hexane จนเหนือระดับพืชเล็กน้อย ปิดปาก flask ให้ สนิท แช่ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง

3.3.2.2) (3) นำสารกรองด้วยกระดาษกรอง นำสารที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator เพื่อระเหยตัวทำละลายออกให้หมดได้ crude extract

3.3.3 การเปรียบเทียบร้อยละของผลผลิตน้ำมันที่ได้ (% yield of extracted oil) เทียบกับใบสดจากพืชแต่ละชนิดที่ได้จากวิธีการสกัดที่ต่างกัน คำนวณด้วยสมการดังต่อไปนี้

% yield of extracted oil) เท่ากับ $\frac{\text{น้ำหนักของน้ำมันที่ได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักใบสด (กรัม)}} \times 100$

3.3.4 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมัน

3.3.4.1) เตรียมน้ำมันที่สกัดได้เพื่อส่งตรวจวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค GC-MS

3.3.4.2) วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันสกัดที่ได้ ด้วยเทคนิค GC-MS วิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatography mass spectrometry (Agilent 6890) โดยใช้ สภาวะในการวิเคราะห์ มีรายละเอียดดังนี้

Oven	Initial temp	70°C (on)
	Initial time	3 min
	Final temp	280°C

PAYAP UNIVERSITY

	Run time	49.93
	Maximum temp	325°C
	Equibration time	0.50
Mode	Spiltless constant flow	
Column	Capillary column model HP 19091S-433 HP-5MS 5% Phenyl methyl siloxane	
	Max temperature	325°C
	Nominal length	30.0 m
	Nominal diameter	250.0 m
	Nominal film thickness	0.25 µm
	Initial flow	1.0 ml/min
	Nominal init pressure	8.81 psi
	Average velocity	36 cm/sec

3.3.4.3) แปลข้อมูลจากโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์เพื่อทราบองค์ประกอบของสารในน้ำมันแต่ละชนิด ทำการวิเคราะห์

- ใช้ค่า Kovats retention index (KI) มาวิเคราะห์ โดยนำค่า retention time ของสารที่สนใจมาเปรียบเทียบกับ retention time สารมาตรฐาน alkane ในการศึกษานี้ใช้ช่วงคาร์บอนอะตอม C9-C20 ซึ่งค่านี้เป็นค่าคงที่สำหรับสารแต่ละชนิด
- ในการวิเคราะห์โดยสามารถคำนวณได้จากสูตร (Adam 2001)

$$I = 100Z + 100\left[\frac{t'_{R(x)} - t'_{R(Z)}}{t'_{R(Z+1)} - t'_{R(Z)}}\right]$$

เมื่อ

I	คือ retention index
$t'_{R(x)}$	คือ retention time
x	คือ สารที่สนใจ
Z	คือ n-alkane Z carbon atom
Z+1	คือ n-alkane Z+1 carbon atom

PAYAP UNIVERSITY

- เปรียบเทียบค่า KI ที่ได้จากการทดลองและจากหนังสือ Identification of Essential Oil Components by Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy (Adam, 2001) ร่วมกับการเปรียบเทียบกับแมสเสปกตรัมของสารมาตรฐานในฐานข้อมูล NIST กับฐานข้อมูลสเปคตรัมจากฐานข้อมูลในเครื่อง GC-MS

3.3.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนมแบบไม่แสดงอาการ

3.3.5.1) พิจารณาเลือกน้ำมันจากพืชแต่ละชนิดจากวิธีที่ได้ค่าร้อยละของผลผลิตน้ำมันสูงสุดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.3.5.2) ทดสอบการยับยั้งต่อเชื้อเชิงคุณภาพ ด้วยวิธี disc diffusion มีรายละเอียดดังนี้

เชื้อมาตรฐาน ได้แก่ *Stapphylococcus aureus* จำนวน 1 isolate

เชื้อ field strain 2 ชนิด ได้แก่

coagulase negative *Stapphylococcus* spp.

Streptococcus spp.

จำนวน $\leq$ 30 isolate

3.3.5.2) (1) ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในอาหารวุ้น เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อผสมอยู่ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว

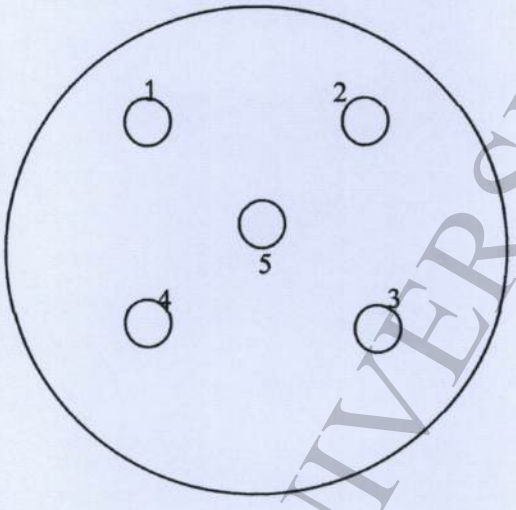
3.3.5.2) (2) ใช้ปากคีบ (forceps) ที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่นดิสก์ (กระดาษกรองวงกลม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) หยดน้ำมันที่ต้องการทดสอบ ปล่อยให้แห้ง มาวางบนอาหารที่เตรียมไว้

3.3.5.2) (3) นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.3.5.2) (4) ตรวจวัดขนาดบริเวณใสที่น้ำมันสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (clear zone หรือ inhibition zone) ที่เกิดรอบแผนดิสก์

PAYAP UNIVERSITY

3.3.5.3) เปรียบเทียบความสามารถการยับยั้งกลุ่มเชื้อ coagulase negative *Stapphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ของน้ำมันจากใบพืชทั้ง 4 ชนิด



รูปที่ 3.1 ตัวอย่างตำแหน่งการวางแผ่นดิสก์ชุบน้ำมันที่ต้องการทดสอบ

จุดที่ 1 น้ำมันจากใบชมพู่มะเหมี่ยว

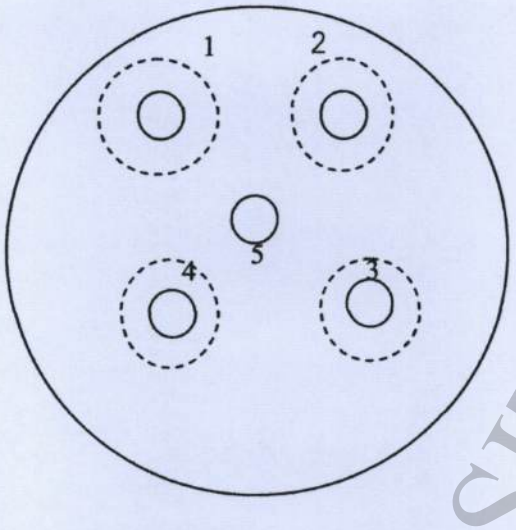
จุดที่ 2 น้ำมันจากใบชมพู่ทับทิมจันทร์

จุดที่ 3 น้ำมันจากใบลูกหว้า

จุดที่ 4 น้ำมันจากใบมะเกี๋ยง

จุดที่ 5 ตัวควบคุม

PAYAP UNIVERSITY



รูปที่ 3.2 ตัวอย่างขนาดบริเวณใสที่น้ำมันสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เกิดรอบแผ่นดิสก์ชุบน้ำมันที่ทดสอบ

จุดที่ 1 น้ำมันจากใบชมพู่มะเหมี่ยว

จุดที่ 2 น้ำมันจากใบชมพู่ทับทิมจันทร์

จุดที่ 3 น้ำมันจากใบลูกหว้า

จุดที่ 4 น้ำมันจากใบมะเกี๋ยง

จุดที่ 5 ตัวควบคุม

PAYAP UNIVERSITY

3.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.3.6.1) ปริมาณน้ำมันที่สกัด จากใบพืช 4 ชนิด ได้แก่ ชมพู่ทับทิมจันทร์ ชมพู่มะเหมี่ยว หว้า มะเกี๋ยง รายงานข้อมูลค่าเฉลี่ยในรูปร้อยละของผลผลิตน้ำมันที่สกัดได้จากแต่ละวิธีสกัด

3.3.6.2) เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณร้อยละของผลผลิตน้ำมันที่สกัดได้จากวิธีสกัดที่แตกต่างกัน

3.3.6.3) ข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.3.6.3)(1) รายงานค่า inhibition zone รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความแปรปรวนของน้ำมันจากใบพืชแต่ละชนิด ในแต่ละกลุ่มเชื้อ

3.3.6.3)(2) เปรียบเทียบความแตกต่างในการยับยั้งกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนมแบบไม่แสดงอาการของน้ำมันจากใบพืชแต่ละชนิด สถิติที่ใช้ คือ t-test

3.3.7 รวบรวมผลข้อมูล สรุปผล และจัดทำรายงานรูปเล่ม

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษา มารวบรวม สรุปผล จัดทำรายงานรูปเล่ม

PAYAP UNIVERSITY