บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator) ยี่ห้อ EYELA รุ่น SB-651 ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น UNB-450 ประเทศเยอรมัน
3. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ Gemmy Industrial Corp รุ่น HL-340 ประเทศไต้หวัน
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Analytical Balance) ยี่ห้อ Satorius รุ่น A200S ประเทศเยอรมัน
5. เครื่องผสมสาร (Vortex Mixture) ยี่ห้อ Scientific industries ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
6. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaking Incubator) ยี่ห้อ Shel Lab ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. ตู้เขี่ยเชื้อ (Biological Safety Cabinets) ยี่ห้อ Nuaire รุ่น NU-440-400E ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 2-1,000 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Gilson ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
10. ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
11. แท่งแก้วเขี่ยเชื้อ (spreader)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Ethanol absolute (AR Grade) ยี่ห้อ QRëC ประเทศนิวซีแลนด์
2. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (AR Grade) ยี่ห้อ RCI Labscan ประเทศไทย
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton broth ยี่ห้อ Himedia ประเทศอินเดีย
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone soya broth ยี่ห้อ Himedia ประเทศอินเดีย
5. ยาปฏิชีวนะ ampicillin
6. วุ้น (agar)

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ ATCC 25923
2. เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* สายพันธุ์ ATCC 12228

การเตรียมสารสกัดหยาบสมอไทย

เตรียมสารสกัดหยาบสมอไทยด้วยวิธีการหมักโดยดัดแปลงจากวิธีของ Bag et al. (2012) โดยนำผลสมอไทยมาล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำเนื้อที่ได้จากผลสมอไทยไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจนแห้งสนิทแล้วนำมาบดให้เป็นผงละเอียด แล้วทำการสกัดด้วย 70% เอทานอลด้วยวิธีการหมัก ในอัตราส่วนสมอไทย 25 กรัม ต่อเอทานอล 150 มิลลิลิตร โดยทำการแช่เย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกรองแล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเอทานอล (ethanolic extract) จากนั้นทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้เพื่อคำนวณหาร้อยละของน้ำหนัก (% yield) ของสารสกัดหยาบ เก็บสกัดหยาบที่ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในที่มืดจนกว่าจะนำไปใช้

การประเมินฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นจากสารสกัดหยาบสมอไทยส่วนเอทานอล

ประเมินฤทธิ์ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* ของสารสกัดสมอไทยด้วยวิธี agar well diffusion โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ahmed and Bej (2001) กล่าวคือทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ ATCC 25923 และ *S. epidermidis* สายพันธุ์ ATCC 12228 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของแบคทีเรียให้มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ $1.5x10^8$ CFU/ml หรือเทียบเท่ากับ McFarland No. 0.5 จากทำการเจือจางแบคทีเรีย 10 เท่าให้มีจำนวน $1.5x10^7$ CFU/ml นั้นใช้ไม้พันสำลี (cotton swab) ที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงไปในสารละลายของเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ กดและบิด cotton swab กับข้างหลอด แล้วกระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี three dimension swab ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที ให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง จากนั้นทำการเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย steriled cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วปิเปตสารสกัดสมอไทยความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาณ 40 µl ต่อหลุม ลงไปในหลุมที่เจาะเอาไว้ ใช้ 0.5% DMSO เป็น negative control และใช้ ampicillin ความเข้มข้น 5 mg/ml เป็น positive control จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดบริเวณการยับยั้ง (inhibition zone) แต่ละการทดลองทำ 3 ครั้งและนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การหาค่า MIC_{50} และ MBC ของสารสกัดสมอไทย

หาค่า MIC_{50} และ MBC ของสารสกัดสมอไทยต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* ด้วยวิธี broth macrodilution โดยดัดแปลงจากวิธีของ Jone et al. (1985) กล่าวคือเตรียมสารสกัดหยาบสมอไทยความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เตรียมให้มีจำนวนเชื้อ $1.5x10^5$

CFU/ml ในปริมาณที่เท่ากันลงไปในหลอดแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง โดย positive control คือหลอดที่มีแต่เชื้อแบคทีเรียไม่มีการเติมสารสกัดสมอไทย สังเกตุผล MIC โดยดูความขุ่นของเชื้อที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอดเปรียบเทียบกับ positive control และนำหลอดที่ไม่มีความขุ่นไปทำการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA เพื่อหาค่า MIC_{50} และ MBC

การพัฒนาตำรับเจลจากสารสกัดสมอไทย

การเตรียมเจลเบส

การเตรียมเจลจากสารสกัดสมอไทย ส่วนผสมของตำรับที่ใช้ในการเตรียมดังแสดงในตารางที่ 3.1 แยกส่วนผสมเป็น 4 ส่วน คือ A, B, C และ D ในการผสมแยกแต่ละส่วนผสมให้เป็นเดียวกัน จากนั้นเติมส่วน B ลงในส่วน A ผสมให้เข้ากันภายใต้เครื่องกวนสาร (overhead stirrer) แล้วเติมส่วน C ลงไปผสมกัน จากนั้นเติมส่วน D แล้วกวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมของตำรับเจลสมอไทย

Part	Trade Name	INCI Name	%(w/w)
A	DI Water	DI Water	55.0
	Carbopol 940	Carbomer 940	0.5
B	Propylene glycol	Propylene glycol	15.0
	DI Water	DI Water	22.1
	EDTA 2 Na	Disodium EDTA	0.1
C	DI Water	DI Water	5.0
	Triethanolamine	Triethanolamine	0.3
D	Cremophor RH-40	PEG-40 hydrogenated castor oil	1.0
	Tween 80	Polysorbate 80	1.0
	Terminalia chebula extract	*Terminalia chebula* extract	qs

การศึกษาในครั้งนี้ปริมาณสารสกัดสมอไทยที่เติมลงไปในตำรับจะเป็นปริมาณที่ได้จากค่า MBC โดยศึกษาปริมาณ Carbopol 940 ในช่วงร้อยละ 0.3-1.0 โดยน้ำหนัก (%w/w) โดยคงปริมาณของ Cremophor RH 40 และ Tween 80 ที่ร้อยละ 3.0 โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วน 1:1 และปรับปริมาณของน้ำให้ครบ ร้อยละ 100.0 โดยน้ำหนักปริมาณของน้ำให้ครบ ร้อยละ 100.0 โดยน้ำหนัก เพื่อเลือกความข้นหนืดของเจลให้เหมาะสมเมื่อได้ปริมาณของ Carbopol 940 ที่เหมาะสมแล้ว จะทำการศึกษาปริมาณ Creamophor RH-40 และ Tween 80 ในช่วงร้อยละ 1.0-4.0 โดยน้ำหนัก (% w/w) ในอัตรส่วน 1:1 เพื่อเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นเก็บตัวอย่างในขวดแก้วใสมีฝาปิดแล้วนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ประเมินคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของตำรับเจลสารสกัดสมอไทย

คุณลักษณะทางเคมีกายภาพที่ทำการประเมินได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รวมทั้งการวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter และวัดค่าความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืด (viscometer)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อแสดงค่าร้อยละ (Percentage) ของข้อมูล ค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ในกรณีที่เป็นข้อมูลเชิงปริมาณ