บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

วัตถุดิบ

1. เมล็ดหว้าอบแห้ง ความชื้นร้อยละ 5.22 โดยน้ำหนัก ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (a_w) เท่ากับ 0.45 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดลำปาง เตรียมในเดือนพฤษภาคม 2554

ภาพที่ 3.1 เมล็ดหว้าอบแห้ง

2. โหระพาสด ไม่มีรอยหนอนเจาะ (ตลาดสามย่าน แผงที่ 45)

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

Escherichia coli (*E. coli*) ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium (*S.* Typhimurium) ATCC 13311 และ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923 จากห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำแบคทีเรียมาเขี่ยลงบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บรักษาแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการต่อเชื้อทุก 2 สัปดาห์

วัสดุและอุปกรณ์

1. กระดาษกรองวอทแมน (whatman) เบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร
2. กระบอกตวงขนาด 25, 100 และ 500 มิลลิลิตร
3. กรวยแก้ว
4. เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม (loop)
5. ขวดก้นกลม
6. ขวดก้นแบน

7. ขวด duran ขนาด 500 มิลลิลิตร
8. ขวดปรับปริมาตรขนาด 10, 50, 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
9. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
10. ขวดสีชาสำหรับเก็บสาร
11. คิวเวตชนิดแก้ว
12. คีมคีบ (forceps)
13. จานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก (plastic petri dish)
14. ช้อนตักสาร
15. ชุดกรองพร้อมขวดลดความดัน (suction flask)
16. ตะแกรง
17. ตะแกรงร่อนขนาด 45 เมช (mesh)
18. ตะเกียงแอลกอฮอล์
19. ถุงตีตัวอย่าง (stomacher bag)
20. ถุงพลาสติกชนิดปิดผนึก (ถุงซิปล็อค) ขนาด 8 x 12 นิ้ว
21. ถ้วยหาความชื้น
22. ทิมเบิลบรรจุตัวอย่าง (extraction thimble)
23. ที่คีบ (tong)
24. แท่งแก้วคนสาร
25. เทอร์โมมิเตอร์ช่วง 0 - 100 องศาเซลเซียส
26. บีกเกอร์ขนาด 100, 250, 600 และ 1000 มิลลิลิตร
27. ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตรและลูกยาง
28. เปเปอร์ดิสก์ (paper disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร
29. พาราฟิล์ม
30. ไมโครปิเปตขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร และปิเปตทิป
31. สเปรดเดอร์
32. หลอดทดลองฝาเกลียวและแร็ค
33. หลอดทดลองฝาตรงและแร็ค
34. หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร

4138052479

35. หลอดหยด

เครื่องมือ

1. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator, Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
2. เครื่องเขย่าสาร (shaker, New bruns wick scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)
3. เครื่องฆ่าเชื้อแบบใช้ความดัน (autoclave, Tomy SX 700 ประเทศญี่ปุ่น)
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo ML204/01 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
5. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo ML 1602/01 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
6. เครื่องบดตัวอย่าง (stomacher, Seward 400 ประเทศอังกฤษ)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich zentrifugen 19 ประเทศเยอรมัน)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Kubota 5310 ประเทศญี่ปุ่น)
9. เครื่องทำสุญญากาศ (vacuum pump, Gast ประเทศสหรัฐอเมริกา)
10. เครื่องผสมสาร (vortex mixer, Vortex - 2 Genie ประเทศสหรัฐอเมริกา)
11. เครื่องโม่แห้ง (Lita ประเทศไทย)
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Genesys 20 ประเทศไทย)
13. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC, SHIMADZU LC - 10 ประเทศญี่ปุ่น) และคอลัมน์ชนิด C_{18} reversed phase ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร: 5 ไมโครเมตร (Inertsil ODS3 ประเทศญี่ปุ่น)
14. ชุดสกัดซอกห์เล็ต (Soxhlet extractor, MTOPS ประเทศเกาหลี)
15. ตู้แช่แข็ง (Sanyo MDF - 236 ประเทศญี่ปุ่น)
16. ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (WTC Binder ประเทศเยอรมัน)
17. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow cabinet, ISSCO BVT - 123 ประเทศไทย)
18. ตู้เย็น (Whirlpool WRN - 57HGG3 ประเทศเกาหลี)
19. ตู้อบ (WTC binder ประเทศเยอรมัน)
20. เตาอบไมโครเวฟ (LG MS2127CW ประเทศไทย)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. กรดแกลลิก (gallic acid, Sigma - Aldrich ประเทศเยอรมัน)
2. เควอร์เซทิน แอนไฮดรัส (quercetin anhydrous, Sigma - Aldrich ประเทศเยอรมัน)
3. รูทิน ไฮเดรต (rutin hydrate, Sigma - Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)
4. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, Univar ประเทศออสเตรเลีย)

4138052479

5. โซเดียม แอนไฮดรัส คาร์บอเนต (sodium anhydrous carbonate, Univar ประเทศออสเตรเลีย)

6. นิวเทรียน อาการ์ (nutrient agar (NA), Himedia ประเทศอินเดีย)

7. เปปโตนวอเตอร์ (peptone water, Merck ประเทศเยอรมัน)

8. เพลทเคานท์ อาการ์ (plate count agar (PCA), Himedia ประเทศอินเดีย)

9. โพแทสเซียมอะซิเตต (potassium acetate, QREC ประเทศมาเลเซีย)

10. โฟลิน - ซิโอแคลทู (Folin - Ciocalteu reagent, Merck ประเทศเยอรมัน)

11. มุลเลอร์ ฮินตัน บรอท (Mueller Hinton broth (MHB), Merck ประเทศเยอรมัน)

12. มุลเลอร์ ฮินตัน อาการ์ (Mueller Hinton agar (MHA), Merck ประเทศเยอรมัน)

13. อะลูมิเนียมคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต (aluminium chloride hexahydrate, QREC ประเทศมาเลเซีย)

14. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดสำเร็จรูปแบบแห้งสำหรับตรวจ *E. coli* และ *coliform* (EC compact dry, Nissui ประเทศญี่ปุ่น)

15. เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จากห้างหุ้นส่วนจำกัด เอิร์ต เคมี แล็บ ประเทศไทย

3.2 วิธีทดลอง

3.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำเมล็ดหว้าอบแห้งมาบดให้เป็นผงด้วยเครื่องโม่แห้งและร่อนด้วยตะแกรง ขนาด 45 เมช เก็บรักษาผงเมล็ดหว้าในขวดแก้วปิดสนิทที่อุณหภูมิห้องประมาณ 27 ± 2 องศาเซลเซียส และในที่มืด

3.2.2 การสกัดเมล็ดหว้า

3.2.2.1 การสกัดเมล็ดหว้าด้วยตัวทำละลายและเวลาต่าง ๆ

นำผงเมล็ดหว้ามาสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 โดยใช้อัตราส่วนผงเมล็ดหว้าต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 กรัมต่อ 5 มิลลิลิตร (Acharyya *et al.*, 2009) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราความเร็ว 150 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้อง เปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกกากด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงอัตราความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที และกรองส่วนใสผ่านกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 4 เก็บตัวอย่างส่วนใสส่วนหนึ่งปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปตรวจวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ตรวจหาชนิดหรือกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC และนำส่วนใสที่ผ่านการกรองขั้นต้นไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ละลายสารสกัดหยาบด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อในอัตราส่วนสารสกัดต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1 กรัม ต่อ 5 มิลลิลิตร และนำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสด้วยตู้อบเพื่อให้ได้สารสกัดแห้ง

ก่อนตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ วางแผนการทดลองแบบ 3 × 5 factorial in CRD ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

3.2.2.2 การสกัดเมล็ดหว้าด้วยอุณหภูมิต่าง ๆ

นำผงเมล็ดหว้ามาสกัดด้วยตัวทำละลายและเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.2.1 โดยใช้อัตราส่วนผงเมล็ดหว้าต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 กรัมต่อ 5 มิลลิลิตร (Acharyya *et al.*, 2009) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 45 และ 80 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราความเร็ว 150 รอบต่อนาที และสกัดผงเมล็ดหว้าด้วยชุดสกัดซอกห์เล็ต โดยใช้ตัวทำละลายและเวลาเดียวกันกับการสกัดที่อุณหภูมิอื่น ๆ ด้วยการเขย่า เหวี่ยงแยกกากและตรวจวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ระเหยตัวทำละลายและตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ด้วยวิธีเดียวกันกับข้อ 3.2.2.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

3.2.3 การตรวจวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

3.2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดหรือค่า TPC (total phenolic contents) โดยวิธีโฟลิน - ซิโอแคลทู (Folin - Ciocalteu) ดัดแปลงจาก Saravanakumar *et al.* (2009) ทำโดยปิเปตสารสกัดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโฟลิน - ซิโอแคลทู ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกจากภาคผนวก ก รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักผงเมล็ดหว้า 1 กรัม (mg GAE/g dry seed powder)

3.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดหรือค่า TFC (total flavonoid contents) โดยวิธีอะลูมิเนียมคลอไรด์ คัลเลอริเมทริก (aluminium chloride colorimetric) ตามวิธีของ Saravanakumar *et al.* (2009) โดยปิเปตสารสกัดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร สารละลายโพแทสเซียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานเควอร์เซทินจากภาคผนวก ก รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซทินต่อน้ำหนักผงเมล็ดหว้า 1 กรัม (mg QE/g dry seed powder)

3.2.4 การตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

3.2.4.1 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *S.* Typhimurium และ *S. aureus* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง และปรับความขุ่นด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ให้มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.30 - 0.40 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จะได้จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 8 ล็อกซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (log cfu/ml)

3.2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธีดิสก์ดิฟฟิวชัน หรือ DDM

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี DDM (disc diffusion method) ดัดแปลงจาก Chandrasekaran and Venkatesalu (2004) ทำโดยปิเปตสารละลายเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร MHA และใช้เทคนิคสเปรดเพลท (spread plate) ให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปิเปตสารสกัดเมล็ดหว้าความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนเปเปอร์ดิสก์ (ปลอดเชื้อ) ขนาด 6 มิลลิเมตรและวางลงบนอาหาร MHA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ เปเปอร์ดิสก์ด้วยไม้บรรทัด รายงานผลเป็นมิลลิเมตร ในการวิเคราะห์ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร เป็นชุดควบคุมผลลบ (negative control) และใช้สารต้านการเจริญของแบคทีเรีย (antibiotic) คือ แอมพิซิลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก (positive control) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.4.3 การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเมล็ดหว้าที่ใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือค่า MIC

หาค่า MIC (minimum inhibitory concentration) โดยเทคนิคบรอทไดลูชัน (broth dilution technique) ดัดแปลงจากวิธีของ Rollins (2000) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

- เตรียมสารสกัดเมล็ดหว้าเริ่มต้น (stock solution) ความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- เตรียมหลอดทดลองเปล่า (ปลอดเชื้อ) จำนวน 1 หลอด ติดป้ายเป็นหลอดที่ 1

- เตรียมหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB (ปลอดเชื้อ) 1 มิลลิลิตร จำนวน 11 หลอด ติดป้ายเป็นหลอดที่ 2 - 12

- ปิเปตสารสกัดจาก stock solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่ 1 และ 2

- ปิเปตสารละลายจากหลอดที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่ 3 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร

4138052479

- ปิเปตสารละลายจากหลอดทดลองที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่ 4 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร และทำซ้ำไปจนถึงหลอดทดลองที่ 11

- ปิเปตสารละลายจากหลอดทดลองที่ 11 ทิ้ง 1 มิลลิลิตร เพื่อให้มีปริมาตรเหลือ 1 มิลลิลิตรเท่ากับหลอดทดลองอื่น ๆ

- หลอดทดลองที่ 12 จะมีเพียงอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพียงอย่างเดียว เป็นชุดควบคุม

- ปิเปตสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในทุกหลอดทดลอง (หลอดที่ 1 - 12) ทำให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดทดลองเท่ากับ 2 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดหว้าสรุปได้ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดหว้าในแต่ละหลอดทดลองที่ทำการวิเคราะห์หาค่า MIC

หลอดทดลอง	ความเข้มข้นสารสกัดเมล็ดหว้า (mg/ml)
1	50.00
2	25.00
3	12.50
4	6.25
5	3.13
6	1.56
7	0.78
8	0.39
9	0.20
10	0.10
11	0.05
12	0.00

- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีความขุ่นโดยการใช้สายตา ซึ่งหลอดที่ไม่มีความขุ่นหมายถึงไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย บันทึกค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่หลอดทดลองนั้นเป็นค่า MIC ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.4.4 การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเมล็ดหว้าที่ใช้ฆ่าแบคทีเรีย หรือค่า MBC

หาค่า MBC (minimum bactericidal concentration) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Chandrasekaran and Venkatesalu (2004) ทำโดยเขี่ย 1 loop จากหลอดทดลองทุกหลอด

ที่ไม่มีความขุ่นจากข้อ 3.2.4.3 ไปสเปรด (spread) บนอาหาร MHA และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่แบคทีเรียไม่เจริญบนอาหาร MHA บันทึกค่าความเข้มข้นของสารสกัดนั้นเป็นค่า MBC ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.5 การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ส่งตัวอย่างสารสกัดเมล็ดหว้าวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยรังสิต โดยมีภาวะการวิเคราะห์ ดังนี้

เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)	A = กรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 1 (1% acetic)
	B = อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile)
เกรเดียนท์ (gradient)	0 นาที = A (ร้อยละ 90) ต่อ B (ร้อยละ 10)
	15 - 20 นาที = A (ร้อยละ 60) ต่อ B (ร้อยละ 40)
	30 นาที = A (ร้อยละ 40) ต่อ B (ร้อยละ 60)
	45 - 55 นาที = A (ร้อยละ 20) ต่อ B (ร้อยละ 80)
	60 - 70 นาที = A (ร้อยละ 0) ต่อ B (ร้อยละ 100)
	75 - 90 นาที = A (ร้อยละ 90) ต่อ B (ร้อยละ 10)
อัตราการไหล (flow rate)	0.8 มิลลิลิตรต่อนาที
เตาอบ (oven)	35 องศาเซลเซียส
คอลัมน์ (column)	Inertsil ODS3 C_{18} (4.6 x 250 มิลลิเมตร; 5 ไมโครเมตร)
ตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector)	DAD 271 นาโนเมตร
ปริมาตรสารตัวอย่าง (sample injection)	20 ไมโครลิตร
สารมาตรฐาน	กรดแกลลิก

3.2.6 การประยุกต์ใช้สารสกัดเมล็ดหว้ากับโหระพา

3.2.6.1 การตรวจหาจุลินทรีย์เริ่มต้นจากโหระพา

ตรวจหาจุลินทรีย์ทั้งหมดหรือ TBC (total bacterial count) และ *E. coli* เริ่มต้นจากโหระพา โดยนำตัวอย่างโหระพา 25 กรัม ใส่ในถุงตีตัวอย่าง เติมสารละลายเปปโตนวอเตอร์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร บดผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องบดตัวอย่าง (stomacher) ที่อัตราความเร็ว 230 รอบต่อนาที เวลา 2 นาที ทำการเจือจางด้วยเทคนิคซีเรียลไดลูชัน (serial dilution) ตรวจหาจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยอาหาร PCA โดยตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มครบเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ตรีอุบล แก้วหย่อง และ บวรศักดิ์ ลีนานนท์, 2544) และตรวจหา *E. coli* โดยใช้ EC compact dry บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีที่มีสีน้ำเงิน (AOAC Research Institute, 2013) ทำการทดลอง 6 ซ้ำ

4138052479

3.2.6.2 การหาเวลาที่เหมาะสมของการแช่โหระพาด้วยสารสกัดเมล็ดหว้า

นำโหระพา 25 กรัม แช่ในสารสกัดเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยภาวะเหมาะสมจากข้อ 3.2.2 ปริมาตร 475 มิลลิลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 2 MBC แปรเวลาแช่เท่ากับ 10, 20, 30 และ 40 นาที เมื่อครบเวลาแช่ที่กำหนด สะเด็ดน้ำและผึ่งแห้งบนตะแกรงปลอดเชื้อนาน 30 นาทีในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow cabinet) นำตัวอย่างโหระพาใส่ในถุงตีตัวอย่าง เติมสารละลายเปปโตนวอเตอร์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร บดผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องบดตัวอย่างที่อัตราความเร็ว 230 รอบต่อนาที เวลา 2 นาที ทำการเจือจางด้วยเทคนิคซีเรียลไดลูชัน ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *E. coli* ด้วยวิธีเดียวกับข้อ 3.2.6.1 เปรียบเทียบกับโหระพาที่ไม่แช่สารสกัด (เวลาแช่ 0 นาที) วางแผนการทดลองแบบ RCBD ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

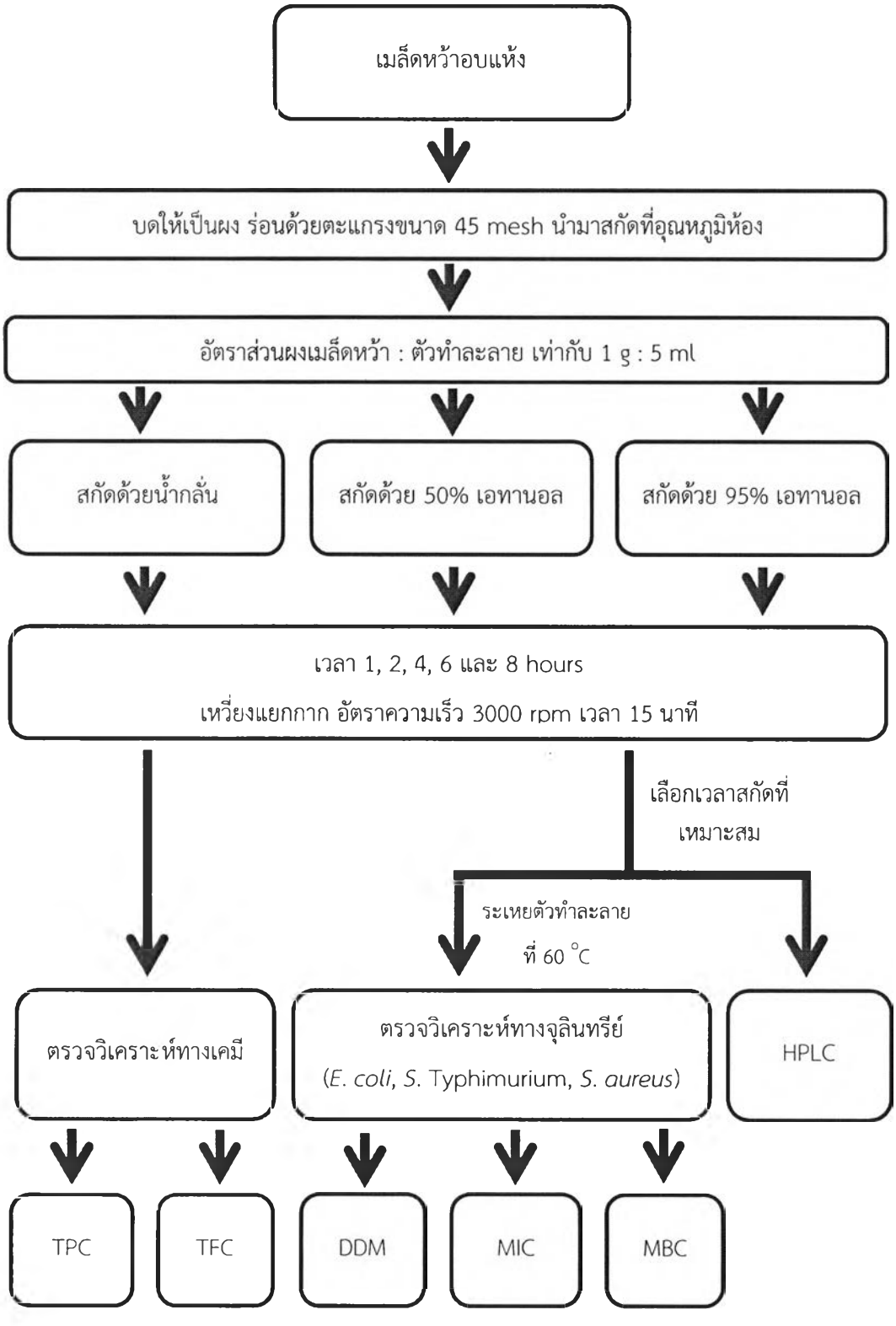
3.2.6.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดเมล็ดหว้าที่ใช้แช่โหระพา

นำโหระพา 25 กรัม แช่ในสารสกัดเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยภาวะเหมาะสมจากข้อ 3.2.2 ปริมาตร 475 มิลลิลิตร ในเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.6.2 แปรความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 2 เท่าของค่า MBC (2 MBC) 4 เท่าของค่า MBC (4 MBC) และ 6 เท่าของค่า MBC (6 MBC) เมื่อครบเวลาแช่ที่กำหนด สะเด็ดน้ำและผึ่งแห้งบนตะแกรงปลอดเชื้อนาน 30 นาทีในตู้ปลอดเชื้อ และนำตัวอย่างโหระพาใส่ในถุงตีตัวอย่าง เติมสารละลายเปปโตนวอเตอร์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร บดผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องบดตัวอย่างที่อัตราความเร็ว 230 รอบต่อนาที เวลา 2 นาที เจือจางด้วยเทคนิคซีเรียลไดลูชัน ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *E. coli* ด้วยวิธีเดียวกับข้อ 3.2.6.1 เปรียบเทียบกับโหระพาที่ไม่แช่สารสกัดและแช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ RCBD ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

3.2.7 อายุการเก็บรักษาของสารสกัดเมล็ดหว้า

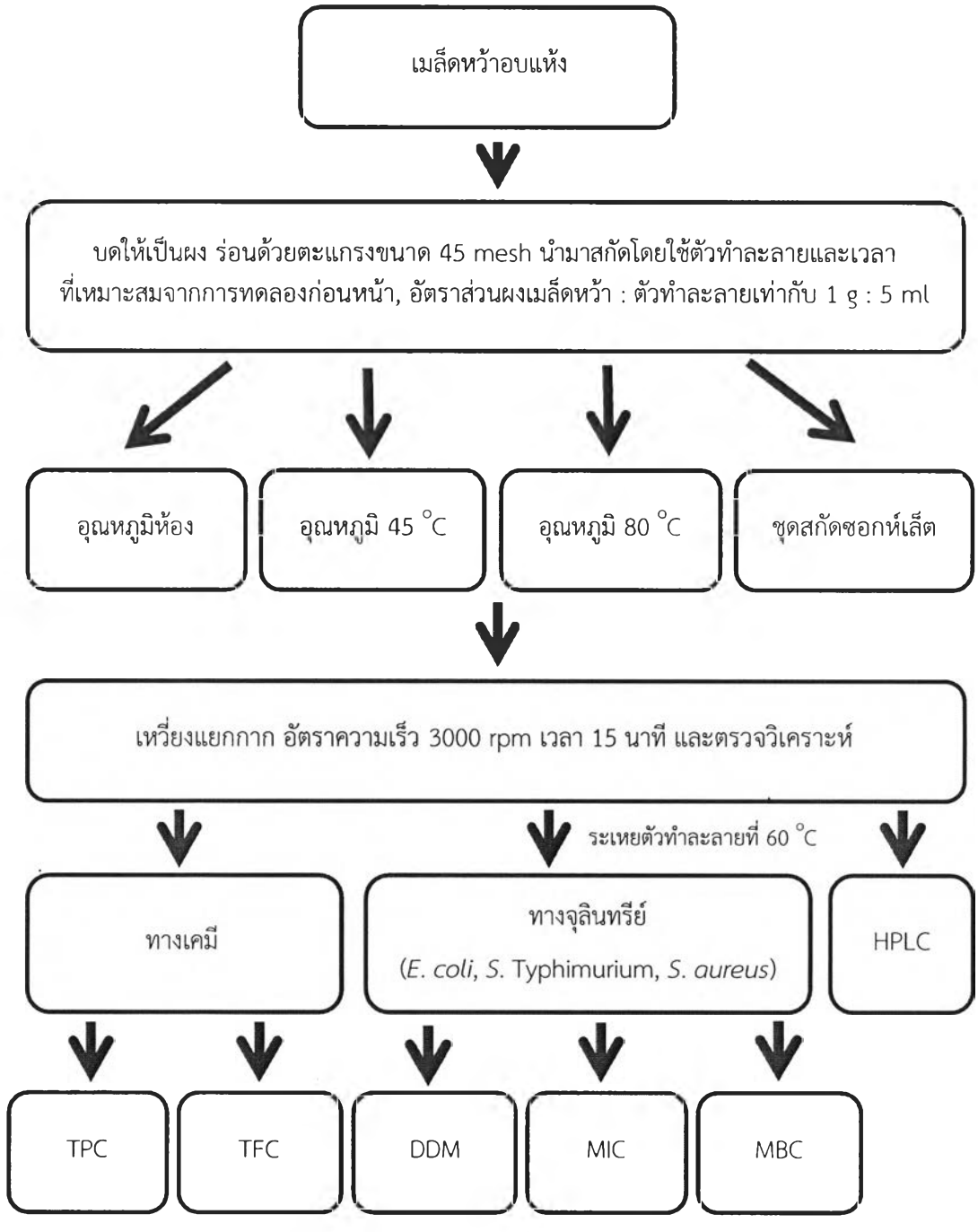
สกัดเมล็ดหว้าด้วยภาวะเหมาะสมและเตรียมสารสกัดแห้งตามข้อ 3.2.2 ละลายสารสกัดแห้ง 3 กรัมด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร เก็บรักษาสารละลายสารสกัดในขวดสีชาปิดสนิท ขนาดความจุ 150 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 - 4 เดือนด้วยวิธีเดียวกับข้อ 3.2.3 และตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3 และ 4 เดือนด้วยวิธีเดียวกับข้อ 3.2.4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

4138052479



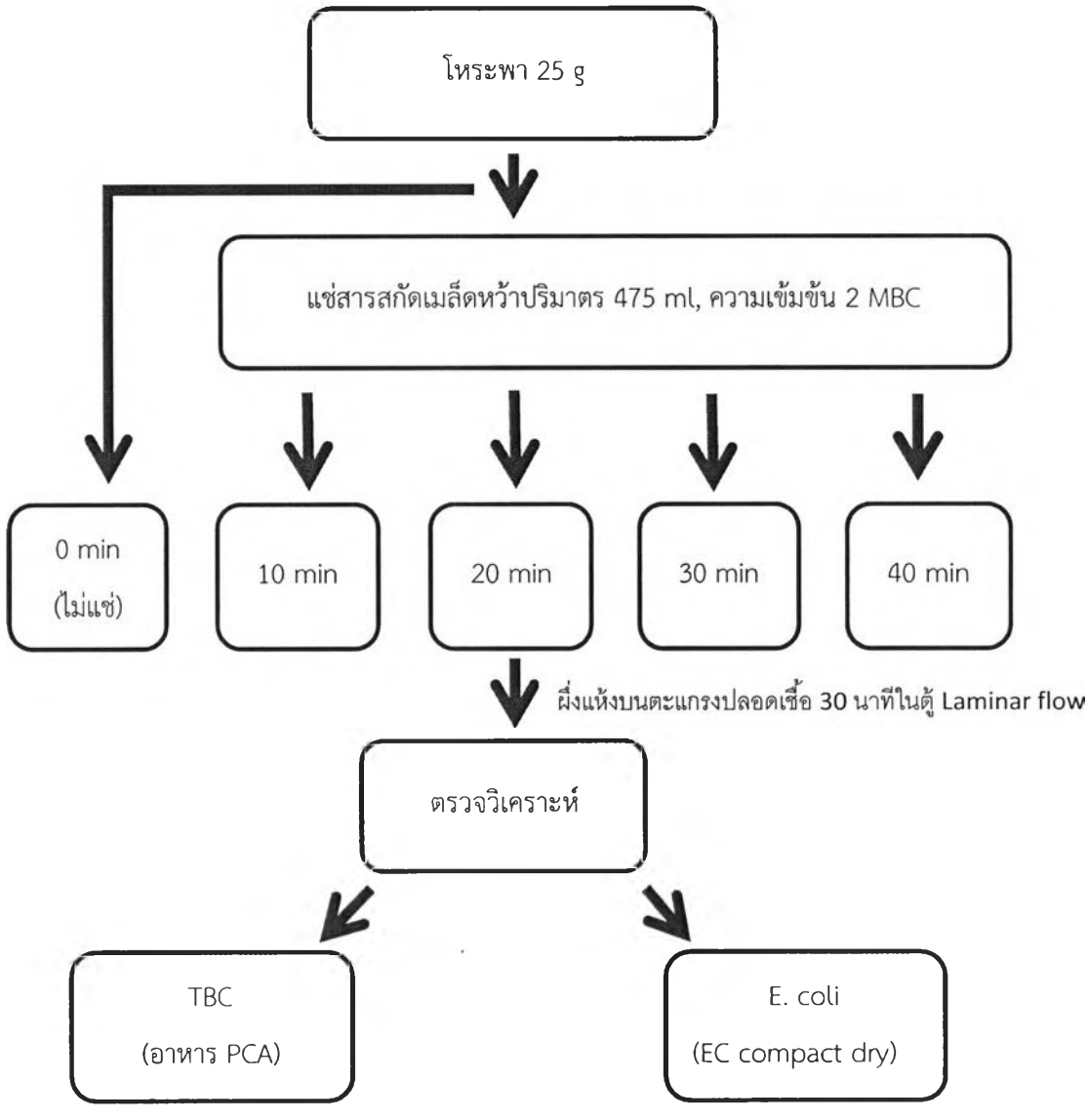
ภาพที่ 3.2 แผนผังสรุปการสกัดเมล็ดหว้าด้วยตัวทำละลายและเวลาต่าง ๆ

4138052479



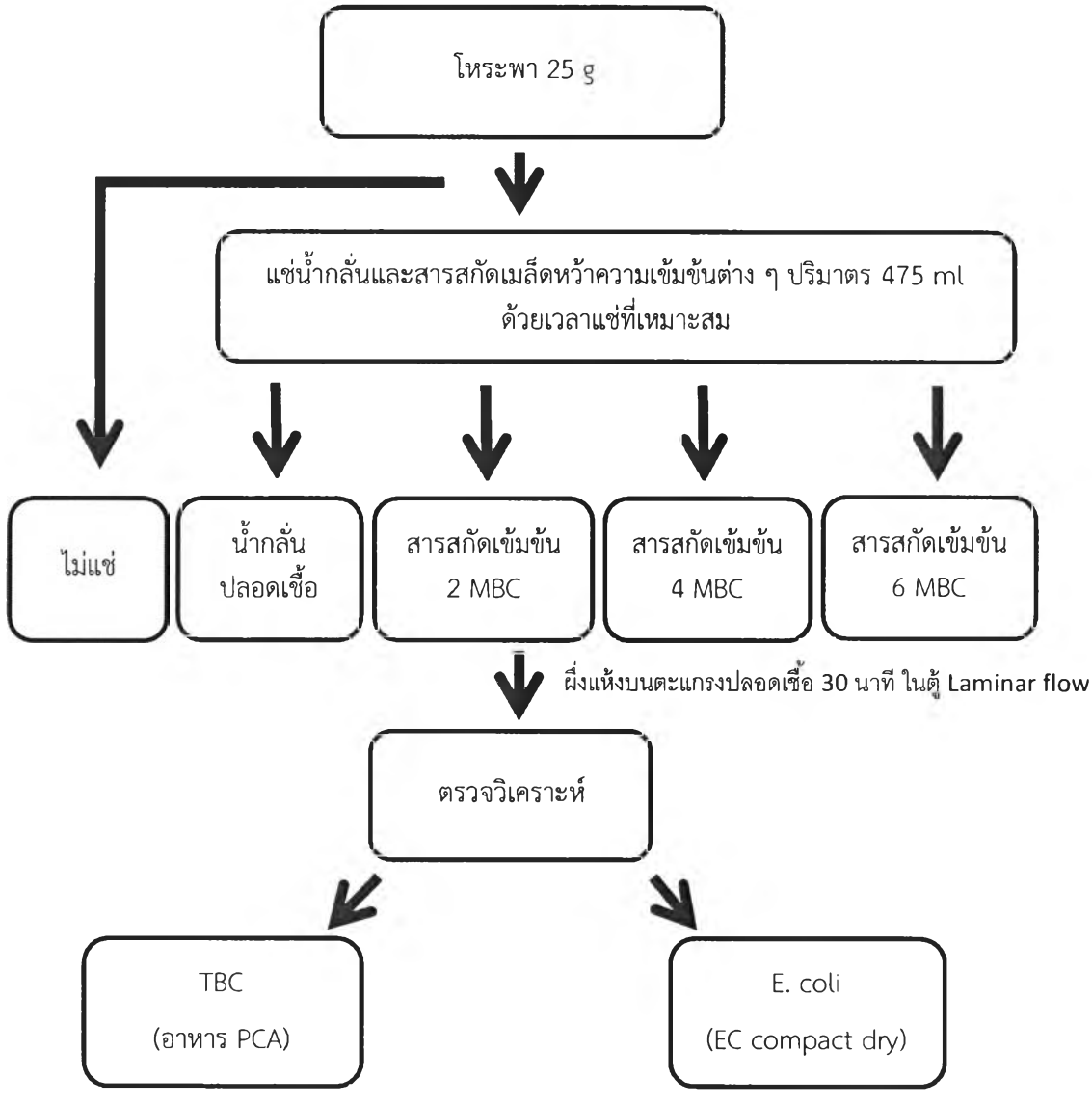
ภาพที่ 3.3 แผนผังสรุปการสกัดเมล็ดหว้าที่อุณหภูมิต่าง ๆ

4138052479



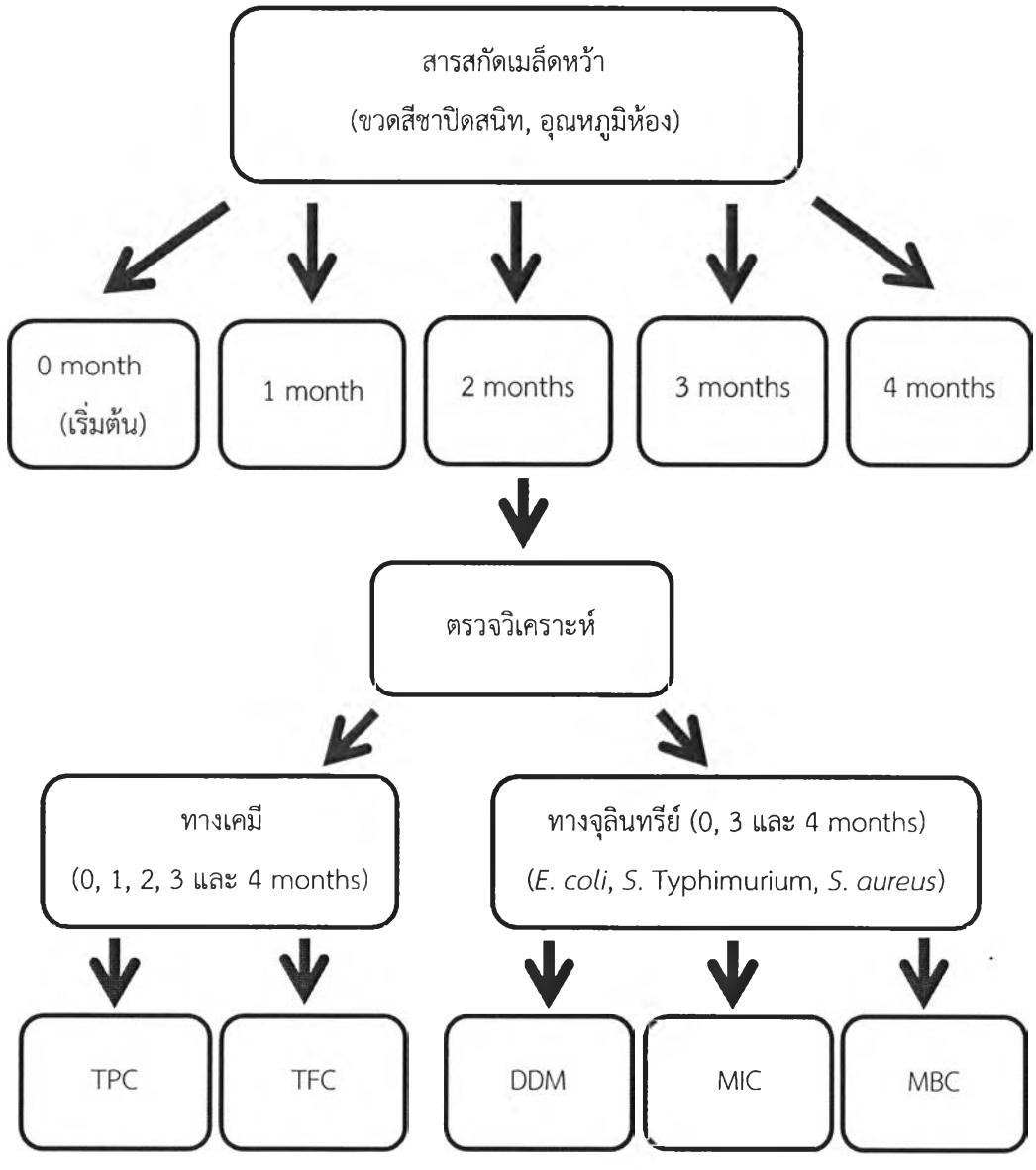
ภาพที่ 3.4 แผนผังสรุปการแช่โหระพาด้วยสารสกัดเมล็ดหว้าที่เวลาต่าง ๆ

4138052479



ภาพที่ 3.5 แผนผังสรุปการแช่โหระพาด้วยสารสกัดเมล็ดหว้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4138052479



ภาพที่ 3.6 แผนผังสรุปการเก็บรักษาสารสกัดเมล็ดหว้า

4138052479