บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อาหารเลี้ยงเชื้อ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Corn meal agar (CMA) (Criterion, USA)

1.2 Mueller-Hinton agar (MHA)(Difco™, USA)

1.3 Nutrient agar (NA) (Difco™, USA)

1.4 Nutrient broth (NB) (Difco™, USA)

1.5 Potato dextrose agar (PDA) (Difco™, USA)

1.6 Potato dextrose broth (PDB) (Difco™, USA)

1.7 Sabouraud dextrose agar (SDA) (Difco™, USA)

1.8 2% water agar (WA)

2 อุปกรณ์และสารเคมี

2.1 กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman®, England)

2.2 กรวยกรอง

2.3 กรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร (Witeg NS29, 2/32, Germany)

2.4 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CH30RF 200, Japan)

2.5 กล้อง stereo zoom (Zeiss STEMI SV6, Germany), Cold light source (Zeiss KL200, Germany)

2.6 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator) (Model JSSI-100C, Korea)

2.7 หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.8 หัวกรองขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร (Sartorius®, Germany)

2.9 Antibiotic Assay discs (AA-discs) ขนาด 6 มิลลิเมตร (Whatman™, UK)

2.10 Autopipette (Gilson®, USA)

2.11 Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

2.12 Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร (Pyrex®, USA)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.13 Rotary evaporator (Büchi® Model R-205/ V Basic), Vacuum pump system (Büchi® Model V-503), Water Circulating Cooling Bath (Model CB-10)

2.14 TLC siliga gel $60F_{254}$ (Merck, Germany)

2.15 UV-light transilluminator ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร (Spectroline Model TVC-312A, New York)

2.16 McFarland เบอร์ 0.5

2.17 อะซิโตน (Acetone) (AnalaR Normapur®, EC)

2.18 ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) (J.T. Baker, USA)

2.19 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulphoxide) (DMSO) (Fisher Scientific, India)

2.20 เอทานอล (Ethanol, EtOH) (Mallinckrodt chemicals, Malaysia)

2.21 เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate, EtOAc) (Fisher Scientific, UK)

2.22 เฮกเซน (Hexane) (Fisher Scientific, UK)

2.23 โทลูอีน (Toluene) (AnalaR Normapur®, EC)

3 ยาปฏิชีวนะ

3.1 แอมพิซิลลิน (Ampicillin) 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (Oxoid, England)

3.2 เจนตามัยซิน (Gentamicin) 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (Oxoid, England)

3.3 ฟลูโคนาโซล (Fluconazole) 25 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (Himedia®, India)

4 เชื้อทดสอบ

4.1 ราเอนโดไฟท์

ราเอนโดไฟท์จำนวน 150 ไอโซเลท แยกได้จากใบพืชชายเลนชนิดต่างๆ ได้แก่ โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata* Bl.), โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata* Poir.), ตะบัน (*Xylocarpus rumphii* (Kostel.) Mabberley), ตะบูนขาว (*Xylocarpus granatum* Koen.), ตาตุ่มทะเล (*Excoecaria agallocha* L.), ปรงทะเล (*Acrostichum auream* L.), โปรงแดง (*Ceriops tagal* (Perr.) C.B.Rob.), พังกาหัวสุมดอกขาว (*Bruguiera sexangula* (Lour.) Poir), พังกาหัวสุมดอกแดง (*Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Savigny), โพทะเล (*Thespesia populnea* (L.) Sol. ex Correa), ลำพูทะเล (*Sonneratia alba* J. Smith), ลำแพน (*Sonneratia ovata* Back) และแสมทะเล (*Avicennia marina*) เก็บเป็น stock culture ณ ห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.2 ราสาเหตุโรคพืช

4.2.1 *Alternaria brassicicola* DOAC 0436 (กรมวิชาการเกษตร)

4.2.2 *Colletotrichum capsici* DOAC 1511 (กรมวิชาการเกษตร)

4.2.3 *Colletotrichum gloeosporioides* DOAC 0782 (กรมวิชาการเกษตร)

4.2.4 *Fusarium oxysporum* DOAC 1808 (กรมวิชาการเกษตร)

4.2.5 *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 (กรมวิชาการเกษตร)

4.3 ยีสต์

4.3.1 *Candida albicans* ATCC 10231

4.3.1 *Candida albicans* ATCC 90028

4.4 แบคทีเรีย

4.4.1 *Bacillus cereus* TISTR 121 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.))

4.4.2 *Escherichia coli* ATCC 25922 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

4.4.3 *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

4.4.4 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกราเอนโดไฟท์จากใบพืชชายเลน

นำใบพืชที่มีลักษณะสมบูรณ์ไม่มีลักษณะอาการของโรคมาล้างด้วยน้ำประปาและตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้นต่อใบ แช่ใน แอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70% นาน 2 นาที และแช่ใน Clorox ความเข้มข้น 10% นาน 1 นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำมาซับบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ แล้วนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% water agar (WA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นเก็บ stock เชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเส้นใยวางลงบน 2% WA slant และ potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บเป็นเชื้อบริสุทธิ์ไว้ใช้ศึกษาต่อไป

คำนวณอัตราการแยกราเอนโดไฟท์ ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงจำนวนของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ต่อหนึ่งหน่วยของตัวอย่างพืช โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{อัตราการแยกราเอนโดไฟท์ (isolation rate)} = \frac{\text{จำนวนราเอนไฟท์ที่แยกได้}}{\text{จำนวนใบของตัวอย่างพืชที่นำมาแยก}}$$

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

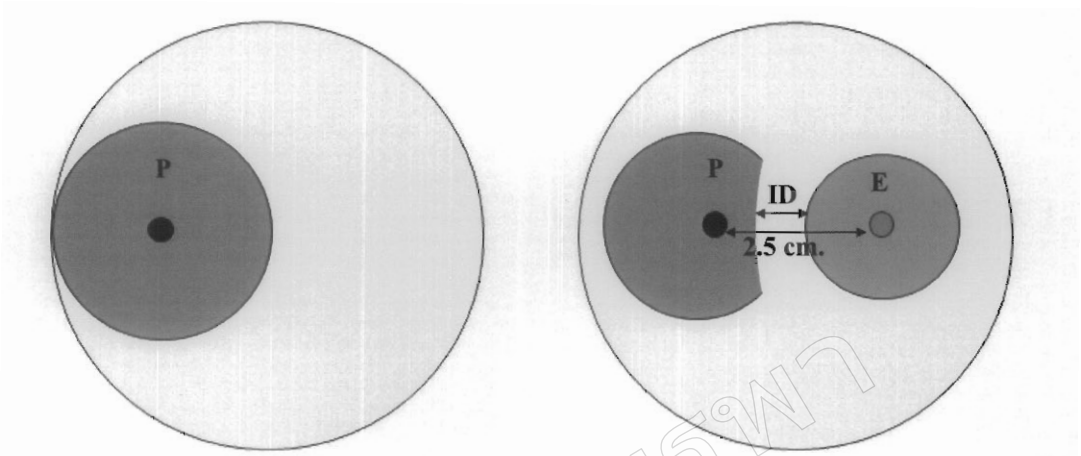
2. การจัดจำแนกกลุ่มราแอนโดไฟท์

เพาะเลี้ยงราแอนโดไฟท์บนอาหาร PDA และ corn meal agar (CMA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-21 วัน ศึกษาลักษณะโคโลนี สีโคโลนี ผิวโคโลนี การเปลี่ยนสีวุ้นอาหาร การสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อและศึกษาอัตราการเจริญ หลังจากนั้นจึงศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยศึกษาลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope และภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo zoom เป็นระยะๆ เชื้อที่ยังไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์จะนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ และนำมาศึกษาใต้กล้องอีกครั้ง บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วนำมาจำแนกชนิดราแอนโดไฟท์ ตามวิธีของ Hanlin (1997), Abbas (1995), และ Barnett & Hunter (2006) ราที่ให้ผลการทดสอบดีและสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์นำมาทำ slide culture เก็บไว้เป็น herbarium ณ ห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

3. การศึกษาราแอนโดไฟท์ที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์

3.1 การทดสอบเบื้องต้นในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราแอนโดไฟท์โดยวิธี Dual culture (ดัดแปลงจาก Shearer & Zare-Maivan, 1988)

นำราแอนโดไฟท์ที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน หรือจนกว่าเชื้อมีการเจริญที่เหมาะสม เพาะเลี้ยงราสาเหตุโรคพืชในลักษณะเดียวกัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะวุ้นที่มีเส้นใยราบริเวณขอบโคโลนีของราแอนโดไฟท์และราสาเหตุโรคพืช นำชิ้นวุ้นของราทั้งสองชนิดมาเพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA ให้มีระยะห่างกันประมาณ 2.5 เซนติเมตร ดังภาพที่ 3-1 ในกรณีที่ราแอนโดไฟท์หรือราสาเหตุโรคพืชมีการเจริญช้าให้วางชิ้นวุ้นราที่เจริญช้าก่อนบนอาหาร PDA เมื่อมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 2-3 เซนติเมตร จึงนำชิ้นวุ้นราอีกชนิดมาวางเลี้ยงร่วมกันให้มีระยะห่างกันประมาณ 2.5 เซนติเมตรเช่นกัน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 วัน สังเกตผลปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis บันทึกระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้ง (Inhibition distance; ID)



ภาพที่ 3-1 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกราเอนโดไฟท์ (E) ที่สร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (P) โดยวิธี dual culture

3.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟท์โดยวิธี Dual culture (ดัดแปลงจาก Dennis & Webster, 1971)

นำราเอนโดไฟท์จากการทดสอบข้อ 3.1 ที่มีค่า ID >2 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 3.1 แต่เพิ่มระยะห่างในการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์และราสาเหตุโรคพืชเป็น 5 เซนติเมตร และวางชิ้นวุ้นราสาเหตุโรคพืชลงบริเวณกลางจานอาหาร PDA อีกชุดหนึ่งเพื่อเป็นชุดควบคุม ดังภาพที่ 3-2 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บันทึกผลปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis และวัดขนาดรัศมีโคโลนีของราสาเหตุโรคพืชที่ถูกยับยั้งการเจริญและในชุดควบคุม นำมาคำนวณร้อยละการยับยั้งการเจริญ (percent of inhibition) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Percentage of inhibition} = [(R_1-R_2)/R_1]\times 100$$

R_1 = รัศมีโคโลนีของราสาเหตุโรคพืชในชุดควบคุม

R_2 = รัศมีโคโลนีของราสาเหตุโรคพืชในชุดทดสอบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

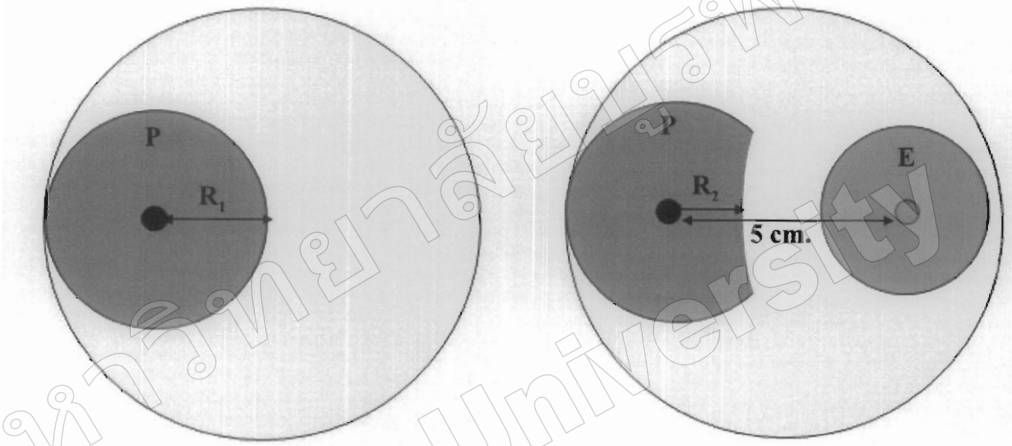
อ่านผลร้อยละการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชด้วยราเอนโดไฟท์โดยวิธี dual culture อ่านโดยใช้เกณฑ์ดังนี้

≥ 70% มีความสามารถในการยับยั้งที่ดีมาก (very high antagonistic activity)

50% - <70% มีความสามารถในการยับยั้งที่ดี (high antagonistic activity)

30% - <50% มีความสามารถในการยับยั้งปานกลาง (moderate antagonistic activity)

< 30% มีความสามารถในการยับยั้งน้อย (low antagonistic activity)



ภาพที่ 3-2 การยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช (P) ด้วยราเอนโดไฟท์ (E) โดยวิธี dual culture

3.3 การทดสอบความสามารถยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ด้วยราเอนโดไฟท์โดยวิธีขีดเชื้อทดสอบ

เพาะเลี้ยงราเอนไฟท์บนจุดกึ่งกลางอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ใช้ไม้พันสำลีจุ่มลงใน suspension ของเชื้อทดสอบ (ความขุ่นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5) *Bacillus cereus* TISTR 121, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028 และ *C. albicans* ATCC 10231 แล้วนำมาขีดเป็นเส้นตรงให้ห่างจากขอบโคโลนีราเอนโดไฟท์ประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บันทึกค่า ID ที่แบคทีเรียและยีสต์ถูกยับยั้ง (แบบ antibiosis) โดยใช้เกณฑ์เดียวกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชดังข้อ 5.1.1 นำราเอนโดไฟท์ที่มีค่า ID >2 มิลลิเมตรศึกษาในขั้นต่อไป

337471

4. การเพาะเลี้ยงราในอาหารเหลวและการสกัดสารก่อฤทธิ์ชีวภาพจากราเอนโดไฟท์

เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะวุ้นที่มีเส้นใยราบริเวณขอบโคโลนีของราเอนโดไฟท์ ใส่ชิ้นวุ้นเส้นใยรา 5 ชิ้น เพาะเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องแบบไม่เขย่าให้อากาศและแบบเขย่าให้อากาศที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

นำราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงทั้งแบบไม่เขย่าให้อากาศและเขย่าให้อากาศมากรองแยกเส้นใยราออกจากอาหารเหลวเลี้ยงราด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำอาหารเหลวเลี้ยงรามาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต (EtOAc) อัตราส่วน 1:1 ในกรวยแยกสองครั้ง โดยแต่ละครั้งเขย่ากรวยแยกประมาณ 30 นาที แล้ววางตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีเพื่อให้สารแยกชั้น เก็บสารส่วนเอทิลอะซิเตตที่สกัดสองครั้งมารวมกันและนำมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบแห้ง นำสารสกัดหยาบแห้งเอทิลอะซิเตตจากอาหารเลี้ยงราแบบไม่เขย่าให้อากาศมาละลายในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 50% ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อเก็บไว้ทดสอบต่อไป ส่วนสารสกัดหยาบแห้งเอทิลอะซิเตตจากอาหารเลี้ยงราแบบเขย่าให้อากาศ 2 ชุด ชุดหนึ่งนำมาละลายในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 50% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเก็บไว้ทดสอบต่อไป อีกชุดนำมาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (hexane) กับเอทานอล (EtOH) ผสมสารทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำมาละลายสารสกัดหยาบแห้ง แล้วเขย่ากรวยแยกประมาณ 30 นาทีและวางตั้งทิ้งไว้ให้สารแยกชั้น จากนั้นแยกสารส่วนเฮกเซนและเอทานอลออกจากกัน นำสารที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบแห้ง 2 ส่วนคือเฮกเซนและเอทานอลนำแต่ละส่วนมาละลายในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 50% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเก็บใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบในการทดสอบต่อไป

5. การทดสอบความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์

5.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์โดยวิธี Agar well diffusion

5.1.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

เพาะเลี้ยงราสาเหตุโรคพืชบนกลางอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะวุ้นให้มีระยะห่างจากขอบโคโลนีประมาณ 1 เซนติเมตร นำชิ้นวุ้นออก แล้วหยอดอาหาร PDB เลี้ยง

ราเอนโดไฟท์แบบไม่เขย่าให้อากาศปริมาตร 80 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เตรียมไว้ และหยอดอาหาร PDB ปลอดเชื้อที่บ่มไว้พร้อมกับการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ปริมาตร 80 ไมโครลิตรลงในหลุมเพื่อเป็นชุดควบคุม ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์และชุดควบคุมแพร่เข้าไปในอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บันทึกค่า ID ที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้ง (แบบ antibiosis) ดังภาพที่ 3-3

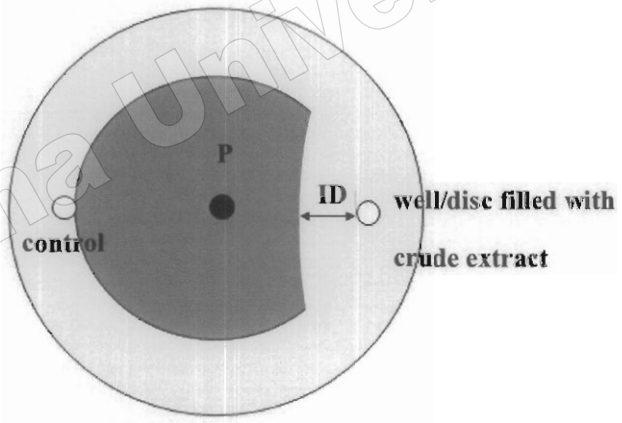
อ่านผลการทดสอบฤทธิ์ต้านราสาเหตุโรคพืช โดยใช้เกณฑ์ดังนี้

ID > 10 มิลลิเมตร มีฤทธิ์ยับยั้งดีมาก (very high antifungal activity)

ID > 6-10 มิลลิเมตร มีฤทธิ์ยับยั้งดี (high antifungal activity)

ID > 2-6 มิลลิเมตร มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลาง (moderate antifungal activity)

ID ≤ 2 มิลลิเมตร มีฤทธิ์ยับยั้งน้อย (low antifungal activity)



ภาพที่ 3-3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (P) โดยวิธี agar well diffusion และ disc diffusion

5.1.2 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์

5.1.2.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

นำ *B. cereus* TISTR 121, *E. coli* ATCC 25922 (non-pathogenic strain), *S.* Typhimurium ATCC 13311 และ *S. aureus* ATCC 25923 เพาะเลี้ยงบนอาหาร Nutrient agar (NA) ส่วน *C. albicans* ATCC 90028 และ *C. albicans* ATCC 10231 เพาะเลี้ยงบนอาหาร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Sabouraud dextrose agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อประมาณ 1-2 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Mueller-Hinton broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อเท่ากับความขุ่นของ McFarland เบอร์ 0.5 โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวเจือจาง จะได้ความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร และยีสต์จะมีความเข้มข้นประมาณ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร

5.1.2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์

ใช้ไม้พันสำลีจุ่มลงในสารแขวนลอย (suspension) ของเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วนำมาป้ายบนผิวหน้าอาหาร MHA ให้ทั่วจานอาหาร ทิ้งให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรเจาะวุ้นแล้วนำชิ้นวุ้นออก จากนั้นหยอดอาหารเหลวเลี้ยงราที่ต้องการทดสอบปริมาตร 80 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเหลวเลี้ยงราแอนโดไฟท์แพร่เข้าไปในอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บันทึกค่า ID ที่แบคทีเรียและยีสต์ถูกยับยั้งแบบ antibiosis

5.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดจากราแอนโดไฟท์โดยวิธี disc diffusion

5.2.1 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (ดัดแปลงจาก Hayes & Markovic, 2002)

5.2.1.1 การเตรียมดิสก์ทดสอบ

ปิเปตสารละลายสารสกัดจากราแอนโดไฟท์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นดิสก์ขนาด 6 มิลลิเมตร เตรียมชุดควบคุมเชิงลบโดยการหยดสารสะลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 50% ลงบนแผ่นดิสก์แทนการหยดสารสกัด วางทิ้งให้แห้งภายในตู้ปลอดเชื้อ

5.2.1.2 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

เพาะเลี้ยงราสาเหตุโรคพืชบนจุดกึ่งกลางอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน วางดิสก์ทดสอบลงบนผิวหน้าอาหาร ให้มีระยะห่างจากโคโลนีราสาเหตุโรคพืชประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วกดเบา ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บันทึกค่า ID ที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งแบบ antibiosis

5.2.1.3 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์

ใช้ไม้พันสำลีจุ่มลงใน suspension ของเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้แล้วนำมาป้ายบนผิวหน้าอาหาร MHA ให้ทั่วจานอาหาร ทิ้งให้ผิวหน้าอาหารแห้งจึงวาง disc ทดสอบลงบนผิวหน้าอาหาร แล้วกดเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ สังเกตและบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) ที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อ

อ่านผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยีสต์โดยวิธี disc diffusion อ่านโดยใช้เกณฑ์ดังนี้

เส้นผ่านศูนย์กลาง > 20 มม. มีฤทธิ์ยับยั้งดีมาก (very high antimicrobial activity)

เส้นผ่านศูนย์กลาง > 15-20 มม. มีฤทธิ์ยับยั้งดี (high antimicrobial activity)

เส้นผ่านศูนย์กลาง > 10-15 มม. มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลาง (moderate antimicrobial activity)

เส้นผ่านศูนย์กลาง > 6-10 มม. มีฤทธิ์ยับยั้งน้อย (low antimicrobial activity)

เส้นผ่านศูนย์กลาง $\leq$ 6 มม. ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง (non-antimicrobial activity)

การทดสอบระบบ สำหรับแบคทีเรียใช้ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยทดสอบกับแผ่นดิสก์ยามาตรฐานแอมพิซิลลิน (Ampicillin) (10 ไมโครกรัมต่อดิสก์) และเจนตามัยซิน (Gentamicin) (10 ไมโครกรัมต่อดิสก์) ส่วนยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 ทำการทดสอบกับแผ่นดิสก์ยามาตรฐานฟลูโคนาโซล (Fluconazole) (25 ไมโครกรัมต่อดิสก์) ด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน สังเกตและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อเทียบกับตารางมาตรฐาน ดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 การยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ควบคุมด้วยแผ่นดิสก์ยามาตรฐาน (CLSI, 2011)

จุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มม.)		
	แอมพิซิลลิน (10 ไมโครกรัมต่อดิสก์)	เจนตามัยซิน (10 ไมโครกรัมต่อดิสก์)	ฟลูโคนาโซล (25 ไมโครกรัมต่อดิสก์)
E. coli ATCC 25922	16-22	19-26	-
S. aureus ATCC 25923	27-35	19-27	-
C. albicans ATCC 90028	-	-	28-39

6. การแยกองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดโดยวิธี Thin-layer Chromatography (TLC) (Jois, Sarkar & Gurusiddaiah, 1986)

นำสารสกัดราเอนโดไฟท์มาแยกองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัด เริ่มจากการเตรียมวัฏภาคคงที่ (stationary phase) โดยใช้แผ่น TLC silica gel $60F_{254}$ กำหนดระดับ solvent front ให้อยู่ต่ำจากขอบบน 0.5 เซนติเมตร กำหนดระยะจุดสารให้ห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร และห่างจาก

ขอบด้านข้าง 0.5 เซนติเมตร จากนั้นใช้ capillary tube ขนาดเล็กดูดสารสกัดปริมาตร 2-5 ไมโครลิตรไปจุดลงบนแผ่น TLC พักให้สารที่จุดไว้แห้ง เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยใช้ โทลูอีนต่ออะซิโตน (อัตราส่วน 8:2 ปริมาตรต่อปริมาตร), โทลูอีนต่อเอทิลอะซิเตต (อัตราส่วน 8:2 ปริมาตรต่อปริมาตร), เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน (อัตราส่วน 7:3 ปริมาตรต่อปริมาตร), โทลูอีนต่อไดคลอโรมีเทน (อัตราส่วน 9:1 ปริมาตรต่อปริมาตร) และ ไดคลอโรมีเทนความเข้มข้น 100% ผสมวัฏภาคเคลื่อนที่แต่ละชุดให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในภาชนะปิดสนิทประมาณ 30 นาที เพื่อให้วัฏภาคเคลื่อนที่อิ่มตัว จากนั้นนำแผ่น TLC มาวางลงในภาชนะที่ปิดสนิทภายในบรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่ไว้ ปริมาณของวัฏภาคเคลื่อนที่จะต้องอยู่ต่ำกว่าจุดสารสกัดบนแผ่น TLC เมื่อวัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนมาถึงตำแหน่ง solvent front ให้นำแผ่น TLC ออกมาแล้วพักให้แห้ง จากนั้นนำมาส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตรในที่มืด สังเกตการเรืองแสงและสีของแถบสารและวัดระยะที่สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ได้บนแผ่น TLC คำนวณหาค่า R_f ของสารสกัด จากสมการดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

7. การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดราเอนโดไฟท์ โดยวิธี autobioassay

7.1การยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะวุ้นที่มีเส้นใยราบริเวณขอบโคโลนีของราสาเหตุโรคที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 3-5 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นำชิ้นวุ้นเส้นใยราวางบริเวณกึ่งกลางจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน วาง TLC disc ที่มีแถบขององค์ประกอบเคมีของสารที่สนใจวางลงบนผิวหน้าอาหาร ให้มีระยะห่างจากโคโลนีราสาเหตุโรคพืช 1 เซนติเมตร แล้วกดเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชและบันทึกค่า ID ที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งแบบ antibiosis

7.2 การยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์

ใช้ไม้พันสำลีจุ่มลงใน suspension ของเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ แล้วนำมาป้ายบนผิวหน้าอาหาร MHA ให้ทั่วจานอาหาร ทิ้งให้ผิวหน้าอาหารแห้ง วางแผ่น TLC ที่มีแถบองค์ประกอบเคมีของสารที่สนใจวางลงบนผิวหน้าอาหาร แล้วกดเบาๆ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ดึงแผ่น TLC ออก นำจานอาหาร MHA ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ สังเกตและบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University