บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

พืชที่ใช้ในการทดลอง

ผลลำไยที่ใช้ในการสกัดสารเป็นลำไยพันธุ์ดอจากสวนอาจารย์ประสิทธิ์ วัฒนวงศ์วิจิตร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ โดยเก็บในเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2541 ซึ่งทำการเก็บผลลำไยทุก 7 วันตั้งแต่ 4 สัปดาห์ก่อนเก็บเกี่ยว ที่อายุเก็บเกี่ยว (ประมาณ 160 วันหลังดอกบาน) และที่บ่มไว้ 3 วันหลังเก็บเกี่ยว

เชื้อราและแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Cladosporium cladosporioides

Lasiodiplodia sp.

Pestalotiopsis sp.

Colletotrichum sp.

Erwinia carotovora

Seratia marcescens

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองและบริษัทที่ผลิต

อุปกรณ์	บริษัท
เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-แมสสเปคโตรมิเตอร์	SHIMADZU JAPAN
rotatory evaporator	BUCHI SWITZERLAND
เครื่องบด (blender)	NATIONAL
ฐานเคลือบเพลต	CORNING
หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)	HIRAYAMA JAPAN
tank แก้ว	-
แผ่นแก้วขนาด 20 x 20 ซม. และ 5 x 20 ซม.	-
กล่องพลาสติก (บ่มเชื้อ)	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

อุปกรณ์	บริษัท
haemacytometer	Clay-Adams New York U.S.A
plus hand counter	Plus company L.T.D.Japan
^{1}H-NMR spectrometor รุ่น R-1500	HITACHI
Infrared Spectrometer (IR) รุ่น IR 810	NICOLET
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	ไซแอนติฟิคโปรโมชั่น
จานแก้วเลี้ยงเชื้อ	-
UV-visible spectophotometer รุ่น U 2000	HITACHI
micropepett	-

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สาร	บริษัท
เมทานอล (Methanol)*	E-Merck Germany
เอทานอล (Ethanol)*	-
ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)*	Solvaly
อะซีโตน (Acetone)	J.T. Baker U.S.A.
เฮกเซน (Hexane)*	E-Merck Germany
เอทิลอาซิเตท (Ethyl acetate)*	B.D.H England
ซิลิกาเจล (Silica gell 60G) TLC	E-Merck Germany
โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส	Carlo Erba
ผงวุ้น (Agar)	ศรีอิศรา
lactic acid	Fluka Switzexland
tween-20	E-merck Germany
beef-extract	DIFCO

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สาร	บริษัท
bacto-peptone	DIFCO
glucose-D	-
lactophenol cotton blue	-
peptone	-
lactose	-
K_2HPO_4	-
Na_2SO_3	-
basic fuchsin	-

* ทำการกลั่นและเก็บไว้ใช้

การทดลอง

3.1 การสกัดสารต้านเชื้อราและแบคทีเรียจากเปลือกและเมล็ดของผลลำไย

ในการสกัดสารจากเปลือกและเมล็ดของผลลำไย ใช้ตัวทำละลายคือ เอทานอล 95% โดยนำผลลำไยในช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ มาล้างด้วยน้ำให้สะอาด แกะเอาส่วนเปลือกและเมล็ดแยกกัน ชั่งเปลือกและเมล็ดหนัก 400 กรัม ใส่ในเครื่องบดพร้อมกับเติมตัวทำละลายลงในเครื่องบดเล็กน้อย นำเปลือกและเมล็ดที่บดละเอียดแล้วมาแช่ในตัวทำละลาย โดยใช้เปลือกและเมล็ดลำไยส่วนละ 400 กรัมต่อตัวทำละลาย 1,200 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วกรองเอาสารละลายออกจากกากเปลือกและเมล็ดลำไย เก็บกากเปลือกและเมล็ดลำไยไว้เพื่อที่จะสกัดด้วยวิธีเดิมอีกครั้งหนึ่ง

นำสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมาระเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำจนแห้งได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ของส่วนเปลือกและเมล็ดลำไย นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.2 การเตรียมเชื้อราและแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดสอบสารสกัด

การเตรียมเชื้อรา

นำจานเลี้ยงเชื้อ อบด้วยความร้อน 171 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นนำ PDA และ NA มาให้ความร้อนด้วยเตาไมโครเวฟที่ความแรงของเครื่องระดับปานกลาง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นพอประมาณโดยอย่าให้อาหารวุ้นแข็งตัว นำมาเทใส่ในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตรต่อหนึ่งจาน ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง นำเชื้อราและแบคทีเรียมา streak บนจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้

3.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียบนผลลำไยหลังการเก็บเกี่ยวของสารสกัดจากผลลำไยในช่วงอายุต่าง ๆ ก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว

3.3.1 การหาข้อมูลเบื้องต้น

การงอกของสปอร์เชื้อราในน้ำกลั่น

นำน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วมาเทใส่จานอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่อายุประมาณ 7 วัน ใช้ loop ขูดให้เชื้อรากระจายตัวในน้ำ แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อ ได้สารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา หยด tween 20 หนึ่งหยดลงไปเพื่อให้สปอร์กระจายสม่ำเสมอจากนั้นใช้ Micropepett ดูดไปหยดบนแผ่นกรอง millipore ที่ตัดขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ซึ่งวางบนแผ่นกระจก (สไลด์) แผ่นละ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่ใส่กระดาษกรองชุบน้ำ เพื่อให้ความชื้น (โดยทำกับเชื้อราชนิดละ 3 ซ้ำ) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หยดสาร lactophenol cotton blue ลงบนแผ่นกรองที่เวลา 5, 6, 7, 8, 9, 10 ชั่วโมง หลังบ่มเชื้อ เพื่อหาจำนวนชั่วโมงการงอกของสปอร์เชื้อราโดยถือว่าสปอร์ที่งอก germ tube มากกว่าขนาดความกว้างของสปอร์เป็นสปอร์ที่งอกแล้ว

การทดสอบสารสกัดหยาบกับสปอร์เชื้อรา

การทดสอบสารสกัดหยาบกับการงอกของสปอร์เชื้อรา

โดยนำสารสกัดหยาบจากเปลือกและเมล็ดของลำไยที่อายุการเก็บเกี่ยวมาละลายด้วยเอทานอล 95 % เล็กน้อยพอให้ละลายเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนสารละลายของสารสกัดหยาบกับน้ำกลั่น 50 : 50 แล้วหยดบนแผ่นกรอง millipore ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร แผ่นละ 10 ไมโครลิตร นำไประเหย solvent ให้แห้งโดยนำไปวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดดูดความชื้นประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วหยดสารแขวนลอยของเชื้อรา 10 ไมโครลิตร ที่เตรียมเช่นเดียวกับการหาจำนวนชั่วโมงการงอกของสปอร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วหยด lectophenol cotton blue ใน

เวลาที่สปอร์เชื้อราชนิดต่าง ๆ งอกในน้ำกลั่น แล้วตรวจดูการงอกของสปอร์ โดยการทดลองทำ 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันความถูกต้อง

การทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกับสปอร์เชื้อรา

โดยนำสารสกัดหยาบจากเปลือกและเมล็ดของลำไยที่อายุการเก็บเกี่ยวมา 1 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 95 % เล็กน้อยพอให้ละลายแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นระดับแรกผสม tween 20 เล็กน้อย แล้วลดความเข้มข้นของสารลง 10 เท่าลงมาตามลำดับ 10 ลำดับ ได้สารละลายสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 1/10, $1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$, $1/10^5$, $1/10^6$, $1/10^7$, $1/10^8$, $1/10^9$, $1/10^{10}$ (v/v) นำไปหยดบนแผ่นกรอง millipore ที่ตัดขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ที่วางบนกระจก (สไลด์) นำไประเหย solvent ให้แห้งโดยนำไปวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดดูดความชื้นประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วหยดสารแขวนลอยของเชื้อรา 10 ไมโครลิตร ที่เตรียมเช่นเดียวกับการหาจำนวนชั่วโมงการงอกของสปอร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วหยด Lectophenol cotton blue ในเวลาที่สปอร์เชื้อรางอกในการทดสอบสารละลายสารสกัดหยาบกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 50 : 50 แล้วตรวจดูการงอกของสปอร์เชื้อรา โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำเพื่อยืนยันความถูกต้อง

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบบนผลลำไย

การเตรียมผลลำไย

นำผลลำไยอายุการเก็บเกี่ยวมาตัดก้านให้มีขั้วติดผลยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร โดยคัดเอาลูกที่รูปทรงไม่ดี เน่าเสีย ลูกที่มีรอยแมลงเจาะและลูกที่มีแผลที่ผิวออก

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบบนผลโดยใช้สารความเข้มข้นต่าง ๆ

นำสารสกัดหยาบจากเมล็ดลำไยช่วงอายุการเก็บเกี่ยว 2 กรัมละลายในเอทานอลเล็กน้อยพอละลาย เติมน้ำ 200 มิลลิลิตรและ tween 20 สองหยด คนให้เข้ากันนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการเติมสารความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นต่าง ๆที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบบนผลลำไย

ลำดับที่	สารละลายสารสกัดหยาบที่ใช้ (มิลลิลิตร)	น้ำ (มิลลิลิตร)	อัตราส่วนความเข้มข้นของสารที่ได้	ความเข้มข้นของสารที่ได้ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ปริมาตรสุดท้ายของสารละลาย (มิลลิลิตร)
1	200	-	1 : 100	10	180
2	20 จาก 1	180	1 : 1,000	1	200
3	20 จาก 2	180	1 : 10,000	0.1	200
4	20 จาก 3	180	1 : 100,000	0.01	200
5	20 จาก 4	180	1 : 1,000,000	0.001	200
6	20 จาก 5	180	1 : 10,000,000	0.0001	200
7	control(water)	200	-	-	200

การทดสอบฤทธิ์สารสกัดหยาบจากลำไยช่วงอายุต่าง ๆ บนผลลำไย

นำสารสกัดหยาบจากเมล็ดลำไยช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ มาชั่งน้ำหนักช่วง 2--3.5 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 6 ละลายในเอทานอลและน้ำ หยด tween 20 แล้วคนให้เข้ากันเพื่อใช้ทดสอบกับผลลำไยต่อไป

ตารางที่ 6 สารสกัดหยาบจากลำไยช่วงอายุต่าง ๆที่ใช้ในการทดสอบบนผลลำไย

สารสกัดหยาบจากลำไยช่วงอายุต่าง ๆ	ปริมาณสารสกัดหยาบที่ใช้ (มิลลิลิกรัม)	น้ำ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารที่ได้ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
ก่อนเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์	35	200	0.175
ก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์	25	200	0.125
ก่อนเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์	20	200	0.100
ก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์	21	200	0.105
อายุเก็บเกี่ยว	26	200	0.130
หลังเก็บเกี่ยวบ่ม 3 วัน	21	200	0.105
control (water)	-	200	-

ลำไยที่ใช้ทดสอบทั้งการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบบนผลโดยความเข้มข้นต่าง ๆ และในการทดสอบสารสกัดหยาบจากลำไยช่วงอายุต่าง ๆ จะใช้ลำไยกรรมวิธีละ 10 ผล และทำ 3 ซ้ำ โดยนำผลลำไยมาชุบสารละลายสารสกัดหยาบแล้วบรรจุลงในถาดโฟมขนาด 5 x 5 นิ้ว จำนวน 10 ผลต่อถาด หุ้มด้วยฟิลม์ถนอมอาหาร (M-raped) เก็บลำไยไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลองด้วยการนับจำนวนผลที่เกิดโรค โดยจำแนกตามระดับความรุนแรงของโรคจนกระทั่งผลลำไยมีระดับความรุนแรงของโรคมากกว่า 3 ขึ้นไป นำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการทางสถิติแบบ ANOVA จากนั้นนำลำไยไปวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราสาเหตุโรค

การให้คะแนนระดับความรุนแรงของโรคจะให้คะแนนตามพื้นที่ผิวที่ถูกปกคลุมด้วยเส้นใย

ระดับคะแนน 1 = ไม่ปรากฏเส้นใยของเชื้อรา
ระดับคะแนน 2 = ปริมาณเส้นใยของเชื้อรา 1-25 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด
ระดับคะแนน 3 = ปริมาณเส้นใยของเชื้อรา 26-50 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด
ระดับคะแนน 4 = ปริมาณเส้นใยของเชื้อรา 51-75 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด
ระดับคะแนน 5 = ปริมาณเส้นใยของเชื้อรา 76-100 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

3.3.3 การแยกเชื้อโรคที่เกิดขึ้นหลังการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบบนผลลำไย

นำผลลำไยที่ขึ้นรามาทำการแยกเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเส้นใยของเชื้อรามาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวางจานละ 4 จุดเก็บจานอาหารไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 องศาเซลเซียส เมื่อมีเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมาจากจุดที่ทำการแยกเชื้อ จึงย้ายเชื้อ นำเชื้อที่เจริญในลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ นำไปทำการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์

3.4 การตรวจหาแอบสารต้านเชื้อราและแบคทีเรียโดยวิธี TLC-bioassay

การเตรียมกล่องบ่มเชื้อ

นำกล่องพลาสติกใสขนาดกว้าง 15 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร สูง 12 เซนติเมตร มาล้างด้วยน้ำแล้วผึ่งให้แห้ง นำมาเช็ดด้วยเอทานอล 70 % เพื่อฆ่าเชื้อตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำกระดาษทิชชูมาบุที่พื้นด้านล่างของกล่องและฝาบนด้านในของกล่อง ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ชุ่มปิดฝาไว้ที่อุณหภูมิห้องเตรียมไว้เป็นกล่องบ่มเชื้อ (moist chamber) ต่อไป

การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์

เทน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารที่มีเชื้อ *Cladosporium cladosporioides* อายุ 7 วัน ใช้ loop เขี่ยเบา ๆ ให้สปอร์กระจายตัวออกมา กรองด้วยผ้าขาวบาง เอาเส้นใยเชื้อราออก นำไปนับจำนวนสปอร์ให้ได้ $25x10^6$ สปอร์ / มิลลิลิตร เติม Tween 20 ในอัตราส่วน 0.04 มิลลิลิตร / 100 มิลลิลิตร แล้วปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยอาหาร PDB (Potato Dextrose Broth) สำหรับเชื้อราและ NB (Nutrient Broth) สำหรับแบคทีเรีย *Seratia marcescens* นำไปนับจำนวนสปอร์ด้วย Haemacytometer ให้ได้ $1x10^6$ สปอร์ / มิลลิลิตร หากไม่ได้ตามนี้ให้เติมสารแขวนลอยสปอร์ $25x10^6$ สปอร์ / มิลลิลิตร ครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร เมื่อได้ความเข้มข้นสปอร์ตามต้องการแล้วจึงเติม Tween 20 ในอัตราส่วน 0.04 มิลลิลิตร / 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อนำไปสเปรย์บนแผ่น TLC ที่หยดสารไว้

การเตรียมสารสกัดเพื่อนำไปตรวจหาแถบสารต้านเชื้อราและแบคทีเรีย

นำสารสกัดหยาบจากข้อ 3.1 มาทำละลายด้วยไดคลอโรมีเทนและน้ำกลั่นในอัตราส่วน 60 : 40 มิลลิลิตร เขย่าในกรวยแยกและแยกชั้นของไดคลอโรมีเทนออก นำมากำจัดน้ำด้วยผงโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสแล้วกรองโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสออกด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำไประเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotatory evaporator (ได้สารสกัดส่วนที่ 1)

ส่วนสารสกัดที่ละลายในชั้นของน้ำนำมาเขย่ากับเอทิลอาซิเตทและน้ำกลั่นในอัตราส่วน 60 : 40 มิลลิลิตรแล้วนำไปแยกส่วนที่มีเอทิลอาซิเตทและน้ำด้วยกรวยแยก นำส่วนที่ละลายในเอทิลอาซิเตทมากำจัดน้ำออกและทำให้แห้งเช่นเดียวกับสารสกัดที่ละลายในไดคลอโรมีเทน (ได้สารสกัดส่วนที่ 2)

การเตรียมแผ่น TLC

ชั่ง Silica gel 60 G 60 กรัมเติมน้ำกลั่น 120 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเคลือบบนแผ่นกระจกขนาด 20 x 20 เซนติเมตร และขนาด 5 x 20 เซนติเมตร ด้วยความหนา 1 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้หมาดนำไปอบที่อุณหภูมิ 120 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

นำสารสกัดส่วนที่ 1 จากเปลือกและเมล็ดไปจุดบนแผ่น TLC plate นำไปจุ่มในสารละลายตัวพาชนิดที่ 1 และ 2 ส่วนสารสกัดส่วนที่ 2 นำไปจุ่มสารละลายตัวพาชนิดที่ 3

สารละลายตัวพาชนิดที่ 1 ประกอบด้วย dichloromethane : methanol สัดส่วน 95 : 5

สารละลายตัวพาชนิดที่ 2 ประกอบด้วย hexane : ethylacetate : methanol

สัดส่วน 60 : 40 : 1

สารละลายตัวพาชนิดที่ 3 ประกอบด้วย ethylacetate

หลังจากนั้นปล่อยให้สารละลายตัวพาระเหยออกไปจนหมดทำการสเปรย์สารแขวนลอย (suspension) ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* และเชื้อแบคทีเรีย *Seratia marcescens* นำไปบ่ม (incubated) ในกล่องที่เตรียมไว้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วันเพื่อตรวจหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย

3.5 การเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการต้านเชื้อราของสารสกัดจากลำไยอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ

นำสารสกัดส่วนที่ 1 ซึ่งสกัดจากลำไยในช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ โดยสกัดเช่นเดียวกับข้อ 3.4 มาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน เติมไดคลอโรมีเทน 1 มิลลิลิตร เขย่าจนส่วนสกัดละลายหมด แล้วนำไปจุดลงบนแผ่น TLC plate เป็นจุดเดียว โดยใช้ syring ใช้ปริมาณสาร 50 ไมโครลิตร ปล่อยไว้ให้ไดคลอโรมีเทนระเหยหมดนำแผ่น TLC ไป develop ด้วยตัวทำละลายตัวพาชนิดที่ 2 โดยมีระยะทางตัวทำละลายเคลื่อนที่ 15 เซนติเมตร รอให้แห้ง หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ไปสเปรย์ เชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ที่ความเข้มข้นของสปอร์ $1x10^6$ สปอร์ / มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในกล่องบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 วัน แล้ววัดผ่าศูนย์กลางของวงกลมต้านเชื้อรา (inhibition zone) ที่ Rf ช่วง 0-0.1 ของสารสกัดเพื่อเปรียบเทียบกันจากสารสกัดลำไยในช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ

3.6 การทำสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ให้บริสุทธิ์ขึ้น

ขูดเอาซิลิกาเจลในส่วนที่มีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราจาก TLC-plate (ที่ Rf ช่วง 0-0.1) ในข้อ 3.4 จำนวน 50 plate มาสกัดด้วยเมทานอล กรองเอาซิลิกาเจลออก ระเหยตัวทำละลายออกได้น้ำมันเหนียวแล้วจึงนำไปจุดบนแผ่นซิลิกาเจลแล้ว develop ในสารละลายตัวพาเมทานอล นำไปพ่นเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* เช่นเดียวกันกับข้อ 3.4 บันทึกค่า Rf ที่ปรากฏแถบยับยั้งเชื้อราแล้วขูดไปละลายในเมทานอล จากนั้นกรองเอาซิลิกาเจลและระเหยตัวทำละลายออกก่อนนำไปศึกษาโดยเครื่อง Spectrometer

3.7 การศึกษาสารที่เป็นองค์ประกอบในแถบสารที่สามารถยับยั้งเชื้อราด้วยเครื่อง Spectrometer

3.7.1 การศึกษาสารที่สามารถยับยั้งเชื้อรา ด้วยวิธี ^{1}H-NMR

นำสารที่สามารถยับยั้งเชื้อราจากข้อ 3.6 ละลายใน Duterated methyl alcohol (CD_3OD) เล็กน้อยใช้ syringe ดูดใส่ในหลอด NMR เติม CD_3OD ให้สูงประมาณ 2.5 เซนติเมตร และเติม TMS 1 หยด ทำการวัด ^{1}H-NMR

3.7.2 การวิเคราะห์สารที่สามารถยับยั้งเชื้อราด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตมิเตอร์

นำสารที่สามารถยับยั้งเชื้อราจากข้อ 3.6 มาวิเคราะห์โดยใช้สภาวะการทดลองของเครื่อง GC-MS ดังนี้

column : J&W DB-1 30 m I.D. 2.05 mm Film thickness 0.25 μm

carrier gas : He 0.75 kg/cm^2

oven temp : 70 °C (2 min) 15 °C/min 225°C (8 min)

injector temp : 250 °C

interface temp : 250 °C

sample size : 0.2 μl

Ionization method : EI

Ionization voltage : 70 eV

3.7.3 การวิเคราะห์สาร ด้วยเครื่องอินฟาเรดสเปกโตมิเตอร์ (infrared spectrometer)

นำสารจากข้อ 3.6 ทาบน NaCl-cell แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง

3.7.4 การวิเคราะห์สารด้วย UV-spectroscopy

นำสารจากข้อ 3.6 มาละลายในเมทานอล แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสง ในช่วงคลื่น 200-800 nm เทียบกับเมทานอลบริสุทธิ์

3.8 การหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

การเตรียมสารละลายสารต้านเชื้อราที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

นำสารที่ได้จากข้อ 3.6 มาชั่งน้ำหนักโดยใช้สารจากเมล็ด 0.0310 กรัม และสารจากเปลือก 0.0350 กรัม แล้วนำมาละลายในไดคลอโรมีเทน 1,000 ไมโครลิตรและผสม tween 20 ลงไป 0.04% เพื่อช่วยให้สารละลายมีการแพร่กระจายได้ดีขึ้น นำสารละลายที่เตรียมได้มาใช้เป็นสารละลายเริ่มต้นในลำดับที่ 1 จากนั้นทำการลดความเข้มข้นของสารละลายลงตามอัตราส่วนที่แสดงไว้ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเตรียมสารต้านเชื้อรา เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

ลำดับที่	สารละลายที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ไดคลอโรมีเทนที่ใช้ (ไมโครลิตร)	อัตราส่วนความเข้มข้นของสารที่ได้ (v/v)	ความเข้มข้นของสารจากเมล็ดที่ได้ (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นของสารจากเปลือกที่ได้ (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)
1	1,000	-	1	31.00	35.00
2	500 จาก 1	500	1 : 2	15.50	17.50
3	500 จาก 2	500	1 : 4	7.75	8.75
4	500 จาก 3	500	1 : 8	3.88	4.38
5	500 จาก 4	500	1 : 16	1.94	2.19
6	500 จาก 5	500	1 : 32	0.97	1.09
7	500 จาก 6	500	1 : 64	0.48	0.55
8	500 จาก 7	500	1 : 128	0.24	0.27
9	500 จาก 8	500	1 : 256	0.12	0.14
10	500 จาก 9	500	1 : 512	0.06	0.07
11	control	-	-	-	

การทดสอบบน TLC-plate

นำสารความเข้มข้นต่าง ๆ จากตารางที่ 7 ปริมาณ 10 µl มาหยดบน TLC-plate เป็นจุดเดียวรอไว้ให้ตัวทำละลายระเหยหมดแล้วนำสารแขวนลอยเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*, *Lasiodiplodia* sp. และเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* พ่นบน TLC-plate โดยเชื้อราผสมกับ PDB (Potato Dextrose Broth) ส่วนเชื้อแบคทีเรียผสมกับ Endo Agar แล้วนำไปเก็บในกล่องบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องโดยทำ 3 ซ้ำเทียบกับชุดควบคุม

การเตรียมจานเลี้ยงเชื้อ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผ่านการอุ่นให้ละลาย อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส มาใส่จานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้วจานละประมาณ 20 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องให้อาหารแข็ง แล้วนำสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา *Cladosporium cladosporioies* มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อจนทั่วทั้งจาน นำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วและใส่สารที่เตรียมไว้ในความเข้มข้นต่าง ๆ จากตารางที่ 7 ปริมาณ 10 µl ทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้ไดคลอโรมีเทนซึ่งเป็นสารละลายระเหยออกไปจนหมด จึงนำไปวางในจานเลี้ยงเชื้อ โดยใช้จานเลี้ยงเชื้อ 3 จานต่อหนึ่งค่าความเข้มข้นของสารละลาย จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อที่ได้มาบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 3 วัน บันทึกระยะห่างของแถบขาวรอบกระดาษกรอง

3.9 การทดสอบสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นกับการงอกของสปอร์เชื้อรา

นำสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโดยใช้ความเข้มข้นเช่นเดียวกับการทดสอบเพื่อหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) จากข้อ 3.8 และทำเช่นเดียวกับการทดสอบสารสกัดหยาบกับสปอร์เชื้อราในการหาข้อมูลเบื้องต้น (ข้อ 3.3.1)