บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

ชุดกลั่นไอน้ำ	
เครื่องระเหยความดันต่ำ (rotary evaporator)	ของ บริษัท Buchi R-124
เครื่อง GC-MS	ของบริษัท Shimadzu Japan
Haemacytometer	Clay-Adams U.S.A.
เครื่องบด	ของบริษัท National
ฐานเคลือบเพลต	ของบริษัท Corning
กล้องจุลทรรศน์	
หม้อนึ่ง (autoclave)	

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ตัวทำละลายที่ใช้

ไดคลอโรมีเทน	(dichloromethane)	(Merck) commercial grade
เมธานอล	(methanol)	(Merck) proanalysi
อะซีโตน	(acetone)	(J.T. Baker)
เอธานอล	(ethanol)	(Merck) proanalysi

ตัวทำละลายทุกตัวได้นำมากลั่นก่อนใช้เสมอ

สารเคมีที่ใช้

แมกนีเซียมซัลเฟต	(Merck)
ซิลิกาเจล G60	(Merck)
tween-20	(Merck)
lactic acid	(Fluka)
capronaldehyde	(Fluka)

capric acid (Fluka)

lactophenol cotton blue

yeast extract

malt extract

ผงวุ้นตรานางเงือก

กลูโคส (D-glucose)

พืชที่นำมาใช้ในการทดลอง

ใบพลูดาวจากตลาดเมืองใหม่ ต.สุเทพ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ในเดือนธันวาคม 2544 – เมษายน 2545

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ จากสวนมะม่วง อ.แม่แตง จ. เชียงใหม่ ในเดือนเมษายน 2545

เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

Colletotrichum gloeosporioides แยกได้จากผลมะม่วงน้ำดอกไม้

Cladosporium cladosporioides แยกได้จากใบมะม่วง

การทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> การสกัดสารจากใบพลูดาวและศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

1. การสกัดส่วนน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) จากใบพลูดาว

นำใบพลูดาวมาล้างให้สะอาด เลือกเฉพาะที่มีสีเขียวสดและไม่ช้ำ ตากผึ่งลมให้แห้งโดยใช้เวลาประมาณ 20 นาที หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วบดให้ละเอียดโดยเครื่องบดไฟฟ้า ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน เติมน้ำให้ท่วมแล้วนำมากลั่นด้วยไอน้ำ

เก็บส่วนที่กลั่นออกมากับไอน้ำนำมาสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยด้วยไดคลอโรมีเทนโดยใช้กรวยแยก นำชั้นของไดคลอโรมีเทนมากำจัดน้ำโดยใช้แมกนีเซียมซัลเฟต คนให้ทั่วแล้วทิ้งให้แมกนีเซียมตกตะกอนแล้วกรองตะกอนออกโดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วนำส่วนของน้ำมันหอมระเหยที่ละลายอยู่ในไดคลอโรมีเทนมาระเหยเอาตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (rotary evaporator) จะได้ส่วนของน้ำมันหอมระเหย ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

2. การสกัดส่วนสกัดหยาบจากกากพลูคาวที่เหลือจากการกลั่นน้ำมันหอมระเหย

นำกากที่ได้จากการกลั่นใบพลูคาวจากข้อ 1 มาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน นำมาแช่ในไดคลอโรมีเทนให้ท่วมเพื่อทำการสกัดสารที่ไม่มีขั้ว (nonpolar) นำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เพื่อกรองตะกอนออก เก็บตะกอนไว้เพื่อนำมาสกัดส่วนที่มีขั้ว (polar) ด้วยเมธานอล จากนั้นเติมแมกนีเซียมเพื่อกำจัดน้ำลงในสารละลายไดคลอโรมีเทน คนให้ทั่วแล้วทิ้งให้แมกนีเซียมตกตะกอนก่อนกรองเอาออก นำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาไดคลอโรมีเทนออกโดยใช้เครื่องระเหยความดันต่ำ (rotary evaporater) จะได้ส่วนของสารสกัดหยาบ ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนโดยใช้ไดคลอโรมีเทนเล็กน้อยละลายสารในขวด แล้วดูดสารละลายใส่ในขวดชั่งสารขนาดเล็กแล้วนำไปเป่าไล่ไดคลอโรมีเทนออกโดยใช้เครื่องปั๊มอากาศ เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำกากที่ได้จากการกรองข้างต้นมาสกัดซ้ำด้วยเมธานอลซึ่งสามารถทำได้ตามวิธีเดียวกันกับที่ได้กล่าวมาแล้ว เพียงเปลี่ยนตัวทำละลายจากไดคลอโรมีเทนเป็นเมธานอลก็จะได้สารส่วนที่มีขั้ว

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบโดยวิธี TLC-bioassay (แน่งน้อย, 2541)

3.1 การเตรียมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Cladosporium cladosporioides*

3.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา

สูตรอาหารเหลว PDB (Potato Dextrose Broth)

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

สูตรอาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar)

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
ผงวุ้น	17	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

3.1.2 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDAให้มีอายุ 5-7 วัน

3.1.3 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา

เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีอายุ 5-7 วันใช้ loop เขี่ยเชื้อราเพื่อให้สปอร์กระจายตัว กรองผ่านผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้วเพื่อเอาเส้นใยและวุ้นออก นำไปนับสปอร์ให้ได้ 25 x 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เติม Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurat , E-Merck) 1 หยด เพื่อให้สปอร์เชื้อรากระจายตัวเขย่าให้เข้ากันแล้วใช้ปิเปตดูดมา 1 มิลลิลิตร นำไปนับจำนวนสปอร์เชื้อราให้ได้ 1 X 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร แล้วจึงนำอาหารเหลว PDB มาเจือจางสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อราอีกทีหนึ่งโดยใช้อัตราส่วนระหว่างสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อราต่อ PDB เท่ากับ 1 ต่อ 5

3.1.4 การเตรียมกล่องบ่มเชื้อ

ล้างกล่องพลาสติกที่ใช้เป็นกล่องบ่มเชื้อให้สะอาด เมื่อแห้งแล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเชื้อ รอให้แห้ง บุด้วยกระดาษทิสชูและพ่นน้ำกลั่นให้ทั่วแล้วปิดฝาไว้เพื่อให้ไอน้ำอิ่มตัว

3.2 การเตรียม TLC-plates สำหรับการแยกสาร

3.2.1 การเตรียมเพลต

นำกระจกใสขนาดเท่าที่ต้องการมาวางบนฐานเคลือบเพลต เช็ดด้วยอะซีโตนเพื่อขจัดคราบไขมันและสิ่งสกปรกอื่น ๆ ล็อกฐานเคลือบเพลตให้แน่น ชั่งซิลิกาเจล (60GE-Merck) 60 กรัมผสมกับน้ำ 120 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ปิดฝาด้วยจุกยางให้แน่นแล้วเขย่าให้เป็น suspension เทส่วนผสมที่ได้ใส่ใน applicator แล้วเลื่อนให้ suspension ไหลบนเพลต ความหนา 1 มิลลิเมตร รอให้แห้งสนิทนำไปใส่ใน rack แล้วอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำมาใช้

3.2.2 การเตรียมตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Developing solvent)

ใช้ ไดคลอโรมีเทน : เมธานอล = 95 : 5

3.2.3 การเตรียม tank สำหรับ TLC

ใส่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ใน tank ขนาด 9 X 12 นิ้ว ให้สูงประมาณ 1.5 เซนติเมตร ใส่กระดาษกรองไว้ด้านข้างของ tank ปิดฝาทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไอของตัวทำละลายเคลื่อนที่อิ่มตัว

3.2.4 การจุดสารสกัดหยาบลงบนแผ่น TLC

นำสารสกัดหยาบละลายด้วยไดคลอโรมีเทนเล็กน้อย ใช้หลอดแคปิลาลีหยดสารลงบนเพลตให้ห่างจากขอบกระจกล่าง 2.5 เซนติเมตรเป็นแถบยาวติดต่อกัน รอให้ไดคลอโร-มีเทนแห้งแล้วจุดสารทับลงไปอีกครั้ง จากนั้นรอให้ไดคลอโรมีเทนแห้งจนหมดก่อน นำเพลตที่ได้ใส่ลงใน tank เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึง solvent front ซึ่งมีระยะทาง 15 เซนติเมตร จึงนำเพลตออกจาก tank ทิ้งในตู้ควันประมาณครึ่งชั่วโมง เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยจนหมด หลังจากนั้นนำสปอร์เชื้อราที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 มาฉีดพ่นลงบนเพลต แล้วนำมาใส่กล่องบ่มเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบกำหนดจึงตรวจดูแถบต้านเชื้อรา (Inhibit zone)

4. นำสารสกัดบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* มาหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง GC-MS

ทำการขูดแถบที่ยับยั้งเชื้อราจากข้อ 3 แล้วนำมาสกัดด้วย ไดคลอโรมีเทนต่อเมธานอลในอัตราส่วน 50:50 กรองเอาซิลิกาเจลออก จากนั้นกำจัดน้ำออกโดยใช้แมกนีเซียมซัลเฟต แล้วกรองตะกอนออกโดยนำไปผ่านสำลีที่อยู่ในหลอดหยดเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ สารที่ได้นำไปจุ่มใน water bath ที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ตัวทำละลายออก หลังจากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง GC-MS

5. การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides*

นำน้ำมันหอมระเหยและสารที่ได้จากแถบยับยั้งเชื้อราจากข้อ 3 มาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำมาละลายในไดคลอโรมีเทน และนำสารฆ่าเชื้อรา benomyl มาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน แต่นำมาละลายในน้ำกลั่น แล้วทำการลดความเข้มข้นของสารลงมาครึ่งหนึ่งตามลำดับ แล้วหยดสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมได้ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร หรือ 50 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระจกที่เคลือบซิลิกาเจลซึ่งดูวิธีเตรียมได้จากวิธีการทดลอง ข้อ 4 แล้วทำการพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่เตรียมได้จาก ข้อ 3 หลังจากนั้นให้บ่มเชื้อไว้ประมาณ 2 วัน จึงตรวจดูแถบยับยั้ง

6. การทดสอบสารสกัดในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยวิธี paper disc technique ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมอาหาร PDA (วิธีเตรียมเหมือนวิธีการทดลองข้อ 2) แล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นนำมาเทลงในจานอาหาร รอให้อาหารแข็งตัว แล้วจึงดูดสารแขวนลอยเชื้อราลงบนอาหาร 0.1 มิลลิลิตร แล้วทำการ spread plate ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร

เตรียมความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ ความเข้มข้น ดังนี้ 5,000 , 4,000 , 3,000 , 2,000 , 1,000 ppm และ ชุดควบคุม (ไดคลอโรมีเทน) หลังจากนั้นตัดกระดาษกรองเป็นรูปวงกลม โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อ ซึ่งเมื่อผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว จึงนำน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หยดลงบนกระดาษกรอง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วรอให้ตัวทำละลายระเหยออกไปให้หมด หลังจากนั้นจึงนำไปวางบนจานอาหาร PDA ที่ผ่านการ spread plate ด้วยเชื้อรา มาเรียบร้อยแล้ว บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน จึงตรวจดูแถบยับยั้งที่เป็นวงรอบกระดาษกรอง

7. การหาประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา

นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้และน้ำกลั่นซึ่งเป็นชุดควบคุม หยดลงบนแผ่นกรอง millipore ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร แผ่นละ 10 ไมโครลิตร รอให้ตัวทำละลายระเหยออกไปจนหมด แล้วหยดสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา 10 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง แล้วหยด lactophenol cotton blue เมื่อเวลาผ่านไป 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 และ 12 ชั่วโมง จึงตรวจดูการงอกของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ชั่วโมงต่าง ๆ

8. ตรวจดูการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเชื้อรา (morphology) โดยใช้กล้อง TEM (Transmission Electron Microscope)

เตรียมอาหาร PDB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดขนาดเล็กแล้วนำไปฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นนำมาเติมน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 5,000 ppm ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หยด tween 20 ลงไปเล็กน้อย เพื่อให้น้ำมันหอมระเหยละลายในอาหาร ทำให้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยในขวดอาหาร PDB มีความเข้มข้น 500 ppm หลังจากนั้นจึงใช้ cork boror ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เลี้ยงไว้ในจานอาหาร PDA แล้วนำมาเลี้ยงต่อในขวดอาหาร PDB ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีการเขย่าตลอดเวลา บ่มเชื้อไว้จนเชื้อราที่เลี้ยงเจริญเห็นได้ชัดจึงนำมาส่องดูด้วยกล้อง TEM เพื่อตรวจดูการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา

<u>การทดลองที่ 2</u> การประยุกต์ใช้กับมะม่วง

นำน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยว โดยเริ่มจากความเข้มข้นต่ำสุด คือ 2,000 , 4,000 , 6,000 , 8,000 และ 10,000 ppm ซึ่งใช้น้ำกลั่นผสม tween 20 ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อลิตร เป็นตัวทำละลาย และชุดควบคุมเป็น น้ำกลั่นผสม tween 20 เช่นกัน โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 7 ผล แต่ละผลนำมาทำแผล 3 ตำแหน่ง

เริ่มการทดลองจากการนำมะม่วงน้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยวซึ่งมีอายุได้ 90 วัน มาล้างด้วยน้ำแล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นำมาทำแผลโดยการใช้เข็มเจาะให้มีความลึกเท่า ๆ กัน จากนั้นนำสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 25×10^6 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนกระดาษกรอง millipore แล้วนำไปวางบนแผลที่ทำไว้บนผลมะม่วง นำไปบ่มในตะกร้าให้ความชื้นที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเวลาผ่านไปครบ 12 ชั่วโมง จึงนำน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และชุดควบคุมมาหยดซ้ำลงบนกระดาษกรองที่อยู่บนผลมะม่วง และเมื่อครบ 48 ชั่วโมงจึงนำออกมาบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ได้ให้ความชื้น แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของแผล

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University