บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

บัวสายพันธุ์ต่างๆ ในสกุล *Nymphaea* spp. จะถูกเก็บบริเวณ พื้นที่อุทยานแห่งชาติทะเลน้อย อำเภอควนขนุน จังหวัด พัทลุง ซึ่งมีพื้นที่ครอบคลุม 3 จังหวัด ได้แก่ พัทลุง สงขลา และนครศรีธรรมราช สุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง โดยทำการเก็บตัวอย่างบัว ชนิดละ 5 ต้น นำตัวอย่างบัวมาตัดเพื่อแยกออกเป็นส่วน ดอก ใบ ราก และลำต้น จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละส่วนมาล้างด้วยน้ำสะอาดและทำความสะอาดพื้นผิวเพื่อทำลายเชื้ออิพิไฟท์ ด้วยสารละลายเอทานอล และ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ เชื้อราเอนโดไฟท์จะถูกแยกจากส่วน ดอก ใบ ราก และลำต้น ด้วย aseptic technique โดยตัดชิ้นตัวอย่างในแต่ละส่วน ขนาด 0.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 72 ชิ้นต่อ 1 ต้น จากนั้นนำไปวางในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C สังเกตและแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ทุกวันเป็นเวลา 2 อาทิตย์ ลงในอาหาร PDA ที่ไม่ผสมยาปฏิชีวนะ และถ่ายเชื้อราเอนโดไฟท์โดยเทคนิค hyphal tip isolationจนได้เชื้อบริสุทธิ์

3.2 การจัดจำแนกเชื้อราเอนโดไฟท์

เชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ ถูกนำมาจัดกลุ่มและจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) ที่อุณหภูมิ25 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจัดจำแนกเชื้อราด้วย macroscopic morphology โดยดูลักษณะของโคโลนี สี และลักษณะของเส้นใย เป็นต้น และจัดจำแนกโดยใช้ microscopic morphology ด้วย โดยดู ขนาด สี และรูปร่างของโครงสร้างสืบพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วน

เชื้อที่ไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์และไม่สามารถจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จะถูกจัดเก็บใน 20%กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -80 °C ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อนำไปจัดจำแนกโดยวิธีทางชีวโมเลกุล และใช้ในการศึกษาอื่นต่อไป

3.3 การสกัดสารจากเชื้อราเอนโดไฟท์

เชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมดจะถูกจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเลือกตัวแทนกลุ่มมาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ต่อเชื้อ 1 ไอโซเลท วางไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ กรองแยกตัวเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกัน โดยตัวเซลล์สกัดด้วย methanol (MeOH) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน และนำสารส่วนนี้มาสกัดต่อด้วย ethyl acetate และ hexane และทำให้แห้งด้วย anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4) และ rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 45 °C จะได้สารสกัดหยาบในส่วน cell ethyl acetate (CE) และ cell hexane (CH) ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อถูกสกัดด้วย ethyl acetate ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ด้วยกรวยแยก นำสารที่ได้จากส่วนนี้มารวมกัน และทำให้แห้งด้วย anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4) และ rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 45 °C ก็จะได้สารสกัดหยาบในส่วนของ broth ethyl acetate (BE) (Phongpaichit et al., 2006) สารสกัดหยาบที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและมีสัญญาณ NMR ที่น่าสนใจจะถูกนำไปศึกษาโครงสร้างสารในงานวิจัยอื่นต่อไป

3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อก่อโรค

เชื้อทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

Staphylococcus aureus ATCC25923

Clinical isolate of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

Escherichia coli ATCC25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC27853

ยีสต์

Candida albicans ATCC90028

C. albicans NCPF3153

Cryptococcus neoformans ATCC90112

C. neoformans ATCC900113

การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบมาละลายด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้นข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางต่อด้วย DMSO ให้ได้ความเข้นข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อทดสอบต่อไป โดยทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

ละลายยา vancomycin และ gentamicin ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนยา amphotericin B เตรียมที่ความเข้นข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยา miconazole 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยาปฏิชีวนะมาตรฐานทั้งหมดถูกเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20

องศาเซลเซียส ยา vancomycin และ gentamicin ใช้เป็นยามาตรฐานกับแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ตามลำดับ และยา amphotericin B ใช้เป็นยามาตรฐานกับยีสต์

การเตรียมเชื้อทดสอบ

แบคทีเรีย : เขี่ยแบคทีเรีย 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร nutrient broth (NB) และเขย่าที่ตู้บ่มเชื้อความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อด้วย น้ำเกลือ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 0.5 McFarland standard (เชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml) และเจือจางต่อที่อัตราส่วน 1:200 ด้วยอาหาร Mueller-Hinton Broth (MHB)

ยีสต์: เขี่ยยีสต์ 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร Sabouraud's dextrose broth (SDB) และเขย่าที่ตู้บ่มเชื้อ ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง สำหรับ *Candida albicans* และที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง สำหรับ *Cryptococcus neoformans* จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อด้วย น้ำเกลือ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 2 McFarland standard และเจือจางต่อที่อัตราส่วน 1:20 ด้วยอาหาร SDB

3.5 การทดสอบของสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี colorimetric broth microdilution tests (CLSI, 2002a, 2002b; Sarker, et al., 2007)

ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดที่ความเข้นข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบที่ความเข้นข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี colorimetric broth microdilution นำสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาเจือจางด้วยอาหาร MHB และ SDB เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ ให้ได้ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หยดสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร

ลงใน 96 well plate จำนวน 3 หลุม และหยดเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สำหรับ *S. aureus,* MRSA, *E. coli, P. aeruginosa* และ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง สำหรับ *C. neoformans* หยดสี resazurin ที่เจือจาง (1:10) ลงในหลุมทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และยีสต์ (*C. albicans*) ส่วน *C. neoformans* นำไปบ่มต่อเป็นเวลา 1 วัน อ่านผลการทดสอบโดยสังเกตุสีของ resazurin หากสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อได้จะยังคงเห็นสีของ resazurin เป็นสีน้ำเงิน หากสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้สีของ resazurin จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู หรือไม่มีสี

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (The minimum inhibitory concentrations; MICs) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ (The minimum bactericidal concentration; MBCs)

สารสกัดที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะนำมาทดสอบและหาค่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (MICs) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ (MBCs) ด้วยวิธี colorimetric broth microdilution tests เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ โดยเตรียมสารสกัดหยาบใน microtiter plates ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.025-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ จะบันทึกเป็นค่า MIC จากนั้น streak เชื้อจากหลุมทดสอบที่ให้ผลการยับยั้งทุกหลุมจาก microtiter plate ลงบนอาหาร nutrient agar (NA) สำหรับแบคทีเรีย และ Sabouraud's dextrose agar (SDA) สำหรับยีสต์ โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้จะถูกบันทึกเป็นค่า MBC

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์การกระจายของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากบัวสายพันธุ์ต่างๆ และจากส่วนต่างๆของบัวสายโดยหาค่า Isolation rate (IR) (Gong and Guo, 2009; JianQiu et al., 2008) ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3. การวิเคราะห์การกระจายเชื้อราเอนโดไฟท์

การวิเคราะห์	**ความหมาย**	**การคำนวณ**
Isolation rate	อัตราการแยกเชื้อที่ได้จากตัวอย่างพืช	IR = จำนวนเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด / จำนวนชิ้นตัวอย่างทั้งหมด