บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และ วิธีการวิจัย

อาหารเลี้ยงเชื้อ

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจากบริษัท Merck (Germany) ได้แก่ Potato dextrose broth , Sabouraud dextrose broth, Glucose ,Polypeptone ,Yeast extract และ Agar

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

Ethanol 95% (โรงงานสุรา องค์การสุรา กรมสรรพสามิต ส่วนสารเคมีจากบริษัท Merck (Germany) ได้แก่ Nystatin, Methanol, Chloroform, Ethyl acetate, Dimethyl sulfoxide และ Iodine

วัสดุอุปกรณ์ ได้แก่

Paper disc	Filter paper Whatman No.1
Spore color chart	Test tube
Petri disc	Micropipette
Digital vernier caliper	Microscope
Autoclave	Reciprocal shaker
Incubator	Test tube
pH meter	Beaker
Computer	Erlenmeyer flask
Laminar flow	Magnetic stirrer
Steriomicroscope	Rotary evaporator
Separating funnel	Vial
Microtiter plate	TLC plate
TLC tank	Hand Lens
Volumetric flask	ขวดเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Duran

กล่องพลาสติกใสบรรจุตัวอย่างเห็ด

เครื่องอบผลไม้แห้งขนาดเล็ก (ไว้สำหรับอบตัวอย่างเห็ดเวลาออกภาคสนาม)

เชื้อยีสต์ทดสอบ

Candida albicans ATCC 90028

C. tropicalis

C. krusei

วิธีการวิจัย

1. ทำการสำรวจ รวบรวมตัวอย่างเห็ดป่าในเขตอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้าทั้ง 3 ช่วงฤดู คือ ฤดูฝน ฤดูร้อน และฤดูหนาว บริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติ จำนวน 17 จุด โดยการสุ่ม ทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป บันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ ทั้งลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และลักษณะที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สภาพถิ่นกำเนิด โดยการเก็บรวบรวมตัวอย่างสองเดือนต่อ 1 ครั้ง จำนวนทั้งหมด 6 ครั้ง เป็นระยะเวลานาน 12 เดือน

2. ศึกษาการจัดจำแนกชนิดเห็ดป่า โดยศึกษาจากลักษณะรูปร่าง โครงสร้างต่างๆของดอกเห็ด ขนาด สี กลิ่น ถิ่นกำเนิดอาศัย ของ fruiting body ลักษณะ Basidium สี รูปร่างสปอร์ รวมทั้งข้อมูลอื่นๆ ที่สำคัญที่ใช้ประกอบในการคีย์ [27-32, 39-48,50]

3. นำตัวอย่างเห็ดบางชนิดที่มีขนาดใหญ่ และมีเนื้อเยื่อหนาเพียงพอที่สามารถทำการแยกเส้นใย เพื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แล้ว subculture ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar [33,43]

4. ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ที่สามารถแยกได้บางชนิด บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 7-10 วัน ใช้ cork borer ตัดเป็นเชิ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว PDB และ GYP ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเพาะเลี้ยงเส้นใยที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นกรองเอาส่วนน้ำเลี้ยง เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส สำหรับไว้คัดเลือกส่วนน้ำเลี้ยงของตัวอย่างเห็ดที่มีฤทธิ์ต้านแคนดิดา

5. ส่วนดอกเห็ดที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมด หลังจากทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วนำไปอบแห้งใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท (ประมาณ 3-5 วัน) จากนั้น นำไปบดให้ละเอียดด้วย stone motorized grinder แล้วนำผงละเอียดไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ methanol , Ethyl acetate และ chloroform 2.5 กรัม/100 มิลลิลิตร (W/V) [25,34] จากนั้นกรองเอาส่วน organic solvent เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส สำหรับไว้คัดเลือกตัวอย่างเห็ดที่มีฤทธิ์ต้านแคนดิดา

6. นำส่วนที่ได้จากข้อ 4 และ 5 ของตัวอย่างเห็ดแต่ละชนิด มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแคนดิดา แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแคนดิดา โดยวิธี agar paper disc diffusion method[35] ใช้เชื้อทดสอบยีสต์ 3 สายพันธุ์ *คือ* *Candida albicans*, *C. krusei* และ *C. tropicalis*

6.1 โดยทำการถ่ายเชื้อทดสอบจาก stock culture แต่ละชนิด มาเพาะเลี้ยงใน Petri disc ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.2 จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose broth (SDB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการบ่มเชื้อทดสอบที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 18-20 ชั่วโมง

63 ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ได้จากข้อ 6.2 ด้วย Hematocytometer และทำการเจือจาง cell suspension ด้วย SDB ให้มีปริมาณเซลล์ ใน cell suspension สุดท้ายประมาณ $1x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร

6.4 นำ cell suspension ที่ได้จากข้อ 6.3 มาเกลี่ย (swab) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA นำสารสกัดของเห็ดแต่ละชนิดที่ได้ในขั้นตอนที่ 4 และ 5 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ไปหยดลงบน paper disc (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว

6.5 จากนั้นวาง Paper disc ที่ได้หยดสารละลายสารสกัดเห็ดแล้ว ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งใน chamber ของ Laminar flow แล้วนำ Paper disc เหล่านี้ มาวางบน Petri disc ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการบันทึกผล วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (clear zone หรือ inhibition zone) ที่เกิดขึ้นด้วย digital vernier caliper มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

7. ทำการทดสอบมาทดสอบหาค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration) ของสารสกัดหยาบที่แยกได้ โดยวิธี broth dilution method [15]

7.1 โดยคัดเลือกสารสกัดเห็ดที่ให้ผลการทดฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ที่มีวงใสกว้างมากที่สุด มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเห็ดที่มีฤทธิ์ในการการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยทำการเตรียมสารสกัดเห็ดที่ได้จากข้อ 4 และ 5 มาทำให้แห้งโดยใช้ rotary evaporator เพื่อให้ได้ crude extract แล้วจึงนำ crude extract มาละลาย ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB ที่มีความเข้มข้นสองเท่า ที่บรรจุในหลอดทดลองมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอด (หลอดที่ 1) จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB ที่มีความเข้มข้นปกติ และมี cell suspension ของเชื้อทดสอบอยู่ประมาณ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร อีกจำนวน 8 หลอดๆละ 1 มิลลิลิตร รวมหลอดทดลองทั้งชุดมี 9 หลอด

7.2 ทำการถ่ายสารละลายจากหลอดทดลองที่ 1 ลงในหลอดทดลองที่ 2 ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB ที่มีความเข้มข้นปกติ และมี cell suspension ของเชื้อทดสอบอยู่ประมาณ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองด้วย vortex จากนั้น ถ่ายสารละลายจากหลอดทดลองที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 3 เขย่าหลอดทดลองด้วย vortex ทำเช่นเดียวกันนี้ไปตลอดจนถึงหลอดที่ 8 แล้วถ่ายสารละลายจากหลอดที่ 8 ทิ้งไป 1 มิลลิลิตร ดังนั้น จะได้ความเข้มข้นของสาร

สกัดเห็ดลดลงครึ่งหนึ่งในแต่ละหลอดทดลอง และหลอดที่ 9 เป็นหลอดควบคุมที่มีเฉพาะเชื้อทดสอบอย่างเดียว การปฏิบัติต้องทำด้วยความระมัดระวังโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ในทุกขั้นตอน

7.3 นำชุดหลอดทดลองนี้ทั้ง 9 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจเช็คการเจริญของเชื้อทดสอบโดยการดูความขุ่นที่ความเข้มข้นต่างๆของแต่ละหลอดทดลอง บันทึกระดับความเจือจางของสารสกัดเห็ดสูงสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบหรืออาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น เป็นค่า MIC

8. นำสารสกัดเห็ดที่ให้ผลการทดลองดีที่สุดในการทดลองขั้นตอนที่ 6 มาทำการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer Chromatography, TLC) [30] และตรวจสอบ active fraction ของสารสกัดเห็ดที่แยกได้โดยวิธี Bioautography

8.1 spot ตัวอย่างสารละลายสารสกัดเห็ดบนแผ่นกระจก TLC ที่เคลือบด้วย silica gel ทำหน้าที่เป็น stationary phase นำแผ่น TLC หย่อนลงใน chamber ที่มีส่วนผสมของสารละลายที่ทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ chloroform : methanol 10:1 อย่างช้าๆ ในแนวดิ่ง ด้วยความระมัดระวัง โดยให้มีหยดสารสารสกัดเห็ดอยู่เหนือระดับสารละลายของเฟสเคลื่อนที่ ปิดฝาchamber แล้วรอจนสารละลายเคลื่อนที่ถึงระดับที่ต้องการ คือประมาณ 0.5 ซม.จากขอบบนของแผ่น TLC ตำแหน่งนี้เรียกว่า solvent front ยกแผ่น TLC ออก รีบทำเครื่องหมายตรง solvent front ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง 2 – 3 นาที ทำการบันทึกผลตำแหน่งสารจากการนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต แล้วทำเครื่องหมายรอบจุดทึบแสง และ/หรือ สเปรย์ด้วยสารละลายไอโอดีน บันทึกระยะทางที่สารเคลื่อนที่ แล้วคำนวณค่า Rf แต่ละ fraction ที่แยกได้

8.2 การตรวจสอบ active fraction ของสารสกัดเห็ดที่แยกได้โดยวิธี Bioautography โดยการนำ cell suspension ที่มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ $1x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร ของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด 3 มาเกลี่ย (swab) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA แล้วนำแผ่น TLC ที่หยดสารละลายสารสกัดเห็ด และผ่านการชะด้วย mobile phase และปล่อยทิ้งไว้ให้ mobile phase แห้งสนิทแล้ว มาวางนาบบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA โดยให้ด้านที่เคลือบด้วย silica gel ติดกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วยกแผ่น TLC ออก นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรอยของสารตัวอย่างเห็ดแต่ละ fraction อยู่ ไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการบันทึกผลโดยการตรวจดูวงใส (clear zone หรือ inhibition zone) ที่เกิดขึ้นในแต่ละ fraction