บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1) เครื่องชั่งไฟฟ้า รุ่น AG245 ยี่ห้อ METTLER TOLEDO
2) เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) รุ่น R-124 ยี่ห้อ BUCHI
3) Vortex mixer รุ่น G-560E ยี่ห้อ Scientific Industries
4) เครื่องแก้วต่าง ๆ
5) กระดาษกรอง Whatman No. 1
6) Micropipette ยี่ห้อ BRAND
7) ตู้อบอุณหภูมิสูง (hot air oven)
8) ตู้เลี้ยงเชื้อ (incubator)
9) ตู้ถ่ายเชื้อ (transfer chamber)
10) หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
11) เครื่องปั่นผลไม้ (blender)
12) เครื่องนับเซลล์ (hemacytometer)
13) Water bath (Memmert)
14) Loop
15) เข็มเขี่ยเชื้อรา
16) สำสี
17) ผ้าขาวบาง
18) กล่องพลาสติก
19) เตาไมโครเวฟ

3.2 สารเคมี

1) Hexane (C_6H_{14})
2) Ethyl acetate ($CH_3COOCH_2CH_3$)
3) Methanol (CH_3OH)
4) Ethanol (CH_3CH_2OH)
5) Dichloromethane (CH_2Cl_2)
6) Acetone (CH_3COCH_3)
7) Polysorbate 20 (Tween 20)
8) สารเคมีควบคุมเชื้อรา benomyl 20 WP และ mancozeb 80 WP
9) TLC silica gel aluminium sheet
10) Agar
11) Millipore filter paper

12) Distilled water

3.3 พืชสมุนไพรและพืชทดสอบ

1) ดีปลี (ผล)

2) ไพล (เหง้า)

3) ข่า (เหง้า)

4) ผลพริกสดพันธุ์หัวเรือ

ภาพที่ 3.1 พริกพันธุ์หัวเรือ

3.4 เชื้อราที่ใช้ทดสอบ

Cladosporium cladosporioides

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato dextrose agar (PDA)

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชกระทำโดยการนำตัวอย่างพืชทั้ง 3 ชนิด (ดีปลี ไพล และข่า) มาทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำประปาตามด้วยน้ำกลั่น และผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้ว

บรรจุลงในภาชนะแก้ว เติมตัวทำละลาย คือ เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์จนท่วมตัวอย่างพืช จากนั้นปิดฝาภาชนะให้สนิท แช่ตัวอย่างในตัวทำละลาย 3 วัน จากนั้นกรองแยกเอาชิ้นพืชออกจากตัวอย่างสารสกัด นำกากสารตัวอย่างที่กรองออกทำการสกัดซ้ำอีก 2 ซ้ำ แล้วนำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารสกัดพืชมีลักษณะข้น แล้วจึงนำตัวอย่างสารสกัดมาระเหยให้แห้ง ชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบ (crude extracts) จากนั้นคำนวณหา ค่าความเข้มข้นของสารสกัดในล้านส่วน (ppm) เก็บสารสกัดพืชที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ตลอดการทดลอง

3.6.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

- มันฝรั่ง 200 กรัม
- กลูโคส 20 กรัม
- ผงวุ้น 15 กรัม
- น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ รูปลูกเต๋า จากนั้นนำไปต้มด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนสุก นำมากรองโดยใช้ตะแกรงเพื่อเอาเศษมันฝรั่งออก ใส่กลูโคสลงในสารละลาย คนจนกลูโคสละลายหมด (สารละลายที่ 1) นำน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร เทผงวุ้นลงไปต้มจนร้อน คนตลอดเวลาจนวุ้นสุก นำมาเทผสมกับสารละลายที่ 1 คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จะได้เป็นอาหารแข็ง (PDA) ถ้านำสารละลายที่ 1 มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จะได้เป็นอาหารเหลว (potato dextrose broth, PDB) จากนั้นนำ PDA และ PDB เทใส่ขวดแก้วที่เตรียมไว้ แล้วนำไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อเป็นเวลา 20 นาที

3.6.3 การเตรียมเชื้อ *Cladosporium cladosporioides*

การเตรียมเชื้อ *Cladosporium cladosporioides* โดยเก็บตัวอย่างพริกพันธุ์ต่าง ๆ ที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสโดยตัดชิ้นพืชบริเวณที่เป็นโรคต่อกับเนื้อเยื่อปกติเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร นำมาแยกเชื้อด้วยวิธี Tissue transplanting technique ฆ่าเชื้อบนพื้นผิวของชิ้นพืชโดยนำมาแช่ใน 0.525 % ของ sodium hypoclorite เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำชิ้นพืชที่ได้ไปวางบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ผสม rifampicin 100 ppm บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสามารถแยกเชื้อจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้ว นำเชื้อที่แยกได้ไปพิสูจน์ความสามารถในการเกิดโรคตาม Koch's postulate (Agrios, 1997) เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยให้แสงสว่างสลับมืดอย่างละ 12 ชั่วโมงต่อวัน นำเชื้อ *Cladosporium cladosporioides* ที่แยกได้จนบริสุทธิ์ไปเก็บในหลอดอาหาร และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เก็บรักษาสำหรับใช้ตลอดการทดลอง

การปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรคตามวิธีของ Koch (Koch's postulation) โดยเลี้ยงเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7-10 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะปลายเส้นใยบริเวณขอบของโคโลนีเชื้อรา นำไปวางบนผลพริกที่ปกติไม่แสดง

อาการโรค และผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการพ่นหรือเช็ดผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ วิธีการปลูกเชื้อมีทั้งการทำแผลด้วยปลายเข็มหมุดและไม่ทำแผลบนผลพริก จากนั้นบ่มเชื้อโดยนำไปวางในกล่องพลาสติกชื้นเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูอาการโรคที่เกิดขึ้นและแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้งก่อนดำเนินการตามวิธีข้างต้น

3.6.4 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*

นำจานเลี้ยงเชื้อไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 171 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำ PDA มาให้ความร้อนด้วยเตาไมโครเวฟความร้อนระดับปานกลางเป็นเวลา 3 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นพอประมาณโดยอย่าให้ PDA แข็งตัว นำมาเทใส่จานเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ประมาณ 15-20 มิลลิลิตรต่อจาน หยดกรดแลคติกลงไป 1 หยด เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย แล้วตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง นำเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ที่มีอายุ 7 วัน ใช้ loop ขูดเอาสปอร์ออกมาแล้วลากบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ เพาะเชื้อราที่อุณหภูมิห้องให้ได้อายุ 5 วัน

เทน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารที่มีเชื้อราอายุ 5 วัน ใช้ loop เขี่ยเบา ๆ ให้สปอร์กระจายตัวออกมา กรองด้วยผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ชั้น เพื่อเอาเส้นใยเชื้อราออก นำไปนับสปอร์ให้ได้ $25x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เติม tween 20 ในอัตราส่วน 0.04 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วปิเปตต์มา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยอาหาร PDB จนได้ 25 มิลลิลิตร นำไปนับสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ hemacytometer ปรับความเข้มข้นให้ได้ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.6.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยวิธี TLC-bioassay (วีระณีย์ ทองศรี, 2546)

นำสารสกัดหยาบมาละลายด้วยเอทานอลแล้ว spot ลงบน TLC silica gel aluminium sheet ตั้งทิ้งไว้ให้เอทานอลระเหยหมดแล้วนำไปใส่ใน TLC tank ที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (developing solvent) เป็น hexane : ethyl acetate : methanol ตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ โดยนำแผ่น TLC ที่ได้มาพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร บันทึกค่า R_f ของแถบที่ต้านเชื้อราจาก clear zone ที่เห็น

การเตรียมกล่องบ่มเชื้อ (Moist chamber)

นำกล่องพลาสติกใสที่มีฝาปิดสนิท ขนาด 15x25x12 เซนติเมตร นำมาล้างทำความสะอาดทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการพ่นหรือเช็ดผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ บุที่ก้นกล่องพลาสติกด้วยกระดาษทิชชูและพ่นด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ชื้น

การทดสอบต้านเชื้อรา *C. Cladosporioides*

นำส่วนสารสกัดหยาบจาก ดีปลี ไพล และข่า มาหยดลงบนแผ่นโครมาโตกราฟีผิวบาง ซึ่งมีซิลิกาเจลเป็นเฟลคงที่ โดยทำการหยดสารสกัดหยาบด้วยหลอดคาปิลารีขนาดเล็กตรงกลางแผ่นโครมาโตกราฟีผิวบางให้ห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร จากนั้นนำไปใส่ในแท้งค์ที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ สำหรับตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย hexane : ethyl acetate : methanol เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ระยะห่างจากจุดหยดสาร 15 เซนติเมตร จึงนำแผ่นโครมาโตกราฟีผิวบางออกจากแท้งค์แล้วทิ้งให้แห้งเพื่อไล่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ออกในตู้ดูดควัน

เมื่อไล่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ออกหมดแล้ว ทำการนำสปอร์ของเชื้อรา *C. Cladosporioides* ที่เตรียมได้ดังข้างต้น พ่นลงบนแผ่นโครมาโตกราฟีผิวบาง แล้วนำไปใส่ลงในกล่องบ่มเชื้อ (moist chamber) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4-5 วัน

3.6.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชต่อการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการเจริญของเส้นใย

ตรวจสอบการออกฤทธิ์ควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. cladosporioides* โดยวิธี poison food technique เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ส่วนต่อล้านส่วน ผสมในอาหาร PDA ทิ้งให้เย็นตัวลง แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อราบริเวณรอบ ๆ โคโลนี เพื่อให้ได้เส้นใยใหม่ที่กำลังเจริญ จากนั้นนำเข็มที่ทำการฆ่าเชื้อด้วยการลนด้วยเปลวไฟแล้ว ทำการย้ายชิ้นวุ้นที่มีปลายเส้นใยเชื้อรา ไปวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยคว่ำด้านที่มีเส้นใยให้สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเส้นใยเจริญจนเต็มจานอาหารควบคุม (control) จึงทำการวัดขนาดของโคโลนี คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้ง ตามวิธีของธรรมศักดิ์ (2528) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา} = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \qquad (1)$$

A คือ ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (control)
B คือ ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัด

3.6.7 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* วิธีนี้ดัดแปลงจากวิธี glass slides (สิริวรรณ สมิทธอาภรณ์, 2547 และ Dhingra and Sinclair, 1995) ด้วยการนำแผ่นสไลด์แก้วที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที วางลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเตรียมอาหาร PDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วผสมสารสกัดพืชในอาหาร PDA ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นเทอาหารที่ผสมสารสกัดแล้วลงในจานเลี้ยงเชื้อทับแผ่นสไลด์ให้ทั่วทั้งแผ่น ในส่วนของชุดเปรียบเทียบจะไม่ผสมสารสกัด หลังจากผิวหน้าของอาหารแห้งสนิทแล้วจึงหยดสารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงบนอาหาร แล้วเกลี่ยให้สปอร์กระจายอย่างสม่ำเสมอบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อครบกำหนดตัดชิ้นวุ้นในจานเลี้ยงเชื้อรอบ ๆ แผ่นสไลด์ทิ้ง และนำแผ่นสไลด์ที่มีชิ้นวุ้นอยู่ด้านบนมาหยด ด้วย lactophenol ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำสไลด์ดังกล่าวไปตรวจนับจำนวนสปอร์ ที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสุ่มนับสปอร์จำนวน 100 สปอร์ แล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \qquad (2)$$

เมื่อ A คือค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์เชื้อราที่งอกบนอาหารเลี้ยงเชื้อราชุดเปรียบเทียบ
B คือค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์เชื้อราที่งอกบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสมสารสกัด

3.6.8 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกด้วยวิธี Detached fruit technique

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกทดสอบ โดย เตรียมผลพริกที่ใช้ทดสอบโดยใช้ผลพริกปกติที่ไม่พบอาการของโรค นำมาล้างน้ำให้ไหลผ่านประมาณ 5 นาที ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวของผลพริกด้วยการพ่นหรือเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วผึ่งให้แห้ง ทำแผลบนผลพริกด้วยการใช้ปลายเข็มหมุดจิ้มลงบนผลพริก (1 แผลต่อจุด) จากนั้นวางกระดาษกรอง (paper disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลงตรงบริเวณที่ทำแผลด้วยเข็มหมุด แล้วหยดสารสกัดพืช (ไพล ข่า และดีปลี) ลงบนกระดาษกรอง 20 ไมโครลิตร นำผลพริกไปบ่มไว้ในกล่องให้ความชื้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนกระดาษกรอง กรรมวิธีเปรียบเทียบใช้สารเคมี benomyl ความเข้มข้น 1,200 ppm และ mancozeb ความเข้มข้น 2,000 ppm แทนสารทดสอบ กรรมวิธีควบคุมใช้ 2 % methanol แทนสารทดสอบ

การเตรียมสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* โดยตรวจนับด้วย haemacytometer ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร หยดลงบนกระดาษกรองปริมาตร 20 ไมโครลิตร ให้ทำการบ่มเชื้อโดยการในกล่องให้ความชื้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำกระดาษกรองออก ตรวจผลโดยการวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นบนผลพริกเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมหลังปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การควบคุมโรค