สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยเรื่อง การศึกษาจุลินทรีย์จากเปลือกผลไม้ทุเรียนและเปลือกมังคุดที่มีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีขั้นตอนการทำดังนี้

3.1. คัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่สามารถขึ้นในเปลือกทุเรียน และเปลือกมังคุด

นำเปลือกทุเรียนและมังคุดมาแช่น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อโรค ทำการเขย่าเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ก่อนมาทำการ spread บน plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37oC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับโคโลนีและเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาจำนวน 300 โคโลนี มาลงใน enrichment medium ทำการเลี้ยงเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปคัดเลือกคุณสมบัติในการออกฤทธิ์สร้างสารออกฤทธิ์

3.2. ดูความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะต่างๆของเชื้อจุลินทรีย์

ในการทดสอบหาเชื้อที่มีคุณสมบัติการต้านยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ เริ่มต้นด้วยการนำเชื้อ isolates ที่บริสุทธิ์ ผ่านการเลี้ยงในอาหารเหลว LB จนมีค่า absorbance ที่ 600 nm เท่ากับ 0.6-0.8 ที่จะใช้เวลานาน 24-48 ชั่วโมง แล้วนำแผ่น filter paper disc 1 แผ่นใส่ลงไปเชื้อเหลว นำไปเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลานาน 20 นาที ก่อนนำแผ่น disc มาใช้ทดสอบ disc diffusion test

Disc diffusion test

หลักการ disc diffusion test เป็นการทดสอบดูว่าเชื้อที่มีอยู่มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาตอบโต้กับเชื้อก่อโรคได้มากน้อยแค่ไหน โดยชุบแผ่นกระดาษกรอง filter paper disc ด้วยเชื้อเหล่านี้ว่าตอบโต้ต่อเชื้อก่อโรคมากน้อย หากมีการสร้างสารมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้ออื่นๆ จะเห็นเป็นแถบวงใส zone of inhibition ที่มีขนาดกว้าง หากวงใสกว้างมากจะแสดงถึงการสร้างสารที่ดีกว่าวงใสที่มีขนาดเล็ก โดยสามารถตั้งเป็นมาตราฐานเทียบกับการทดสอบการยับยั้งด้วยยาปฏิชีวนะมาตราฐานตามความเข้มข้น (mg/ml) ตั้งแต่ 10, 50, 100, 200 mg/ ml ที่จะมีการยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสร้างวงการยับยั้งเป็นวงใสขนาดจากเล็กไปใหญ่ ที่สามารถ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 25 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 247546
เลขเรียกหนังสือ

คำนวณหาพื้นที่ได้มาสร้างเป็นค่ามาตราฐานเปรียบเทียบ ที่สร้างค่าเป็น +1 +2 +3 และ +4 โดยจะถ่ายภาพ zone of inhibition แล้วใช้โปรแกรม image J มาช่วยหาพื้นที่ clear zone

ขั้นตอนการทำ disc diffusion test เริ่มที่การใช้แผ่นdisc ที่ผ่านการชุบแช่เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการ แล้วนำมาวางบนอาหารวุ้นแข็งที่มีเชื้อแบคที่เรียก่อโรคมาตราฐานได้ทำการ spread ลงให้เกิด lawn โดยวางแผ่น disc ให้มีระยะห่าง พอที่จะวัดการเกิด clear zone ของการยับยั้งที่เกิดจากเชื้อเหล่านี้สร้างสารออกฤทธิ์มาได้ ในการเปรียบเทียบการเกิดclear zone ใช้เทียบกับ control ของการเกิด clear zone ของการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยยาปฏิชีวนะออกฤทธิ์ดังนี้ คือ Penicillin Ampicillin Erythromycin และ chloramphenical ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-200 mg/ml เชื้อแบคที่เรียก่อโรคมาตราฐานที่ใช้ในการศึกษา ที่spread ทั่วผิวเจลเป็น lawn คือเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Bacillus cereus ATCC* 14579 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 *Candida albicans* ATCC 90028 *Saccharomyces* cerevisiae *ATCC* 9763

3.3. คัดเลือก จำแนก ศึกษาคุณลักษณะทางสรีรวิทยา กายภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์สูง

เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ถูกคัดแยกให้บริสุทธิ์ด้วยการ streak บน อาหารวุ้นแข็งจะถูกตรวจสอบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกหรือ แกรมลบ ด้วยวิธีการย้อมด้วยสีแกรมตามขั้นตอนคือ นำเชื้อที่ได้มาใส่บนแผ่นกระจก slide โดยใช้น้ำเปล่าช่วยในการเจือจางกระจาย ทำการ heat fix แล้วหยดสารเคมีของสีแกรมตามขั้นตอน แล้วแช่ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วล้างน้ำเปล่า จำนวน 5 ชนิด สารที่ใส่ตามขั้นตอนมี 1. Crystal violet 2. Gram iodine 3. 95% ethanol และ 4. Safranin หลังจากนั้นนำเชื้อบน slide ไปส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูขนาด รูปร่าง การย้อมติดสี

3.4. ศึกษาความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกไว้ และจำแนกชนิดสายพันธุ์ของเชื้อนี้ จากการศึกษายีนต์ ribosomal Ribonucleic acid (rRNA gene)

เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 isolates จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาณ 15 ml นาน 24 ชั่วโมง ก่อนจะถูกนำมาสกัดดีเอนเอด้วยชุดสกัดดีเอนเอ(DNA) ของ Promega แล้วตรวจสอบคุณภาพของดีเอนเอที่ได้ด้วยการ run agarose gel electrophoresis ดูขนาดและปริมาณของ DNA ก่อนทำ PCR โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้ ในปฏิกิริยาใส่ 5% acetamide (w/v, filter sterilized) เพื่อลดปัญหาการเกิด nonspecific amplification condition ที่ใช้ในการทำคือ 92°C denaturation นาน 5 นาที ตามด้วย 30 cycles ของ 92°C นาน 30 s แล้วต่อด้วย 53.5°C เป็นเวลานาน 30 วินาที แล้วใช้ 72°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วในรอบสุดท้ายของการ extension ที่ 72°C เป็นเวลานาน 5 นาที ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะถูกตรวจสอบด้วยการ agarose gel electrophoresis บน 1.5%–agarose gels ที่จะผ่านการย้อมด้วย ethidium bromide

3.5. ศึกษา พัฒนาขั้นตอนกระบวนการผลิตออกฤทธิ์สารชีวภาพ ให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถสร้างสารเหล่านี้ได้บริสุทธิ์จำนวนมาก

ในการพัฒนาขั้นตอนการเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพนั้น ต้องมีการเปรียบเทียบความสามารถในการสร้าง clear zone เทียบกับการเกิด clear zone ที่มาจากการใช้ยาปฏิชีวนะว่ามีการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารที่สร้างออกมาต่อเชื้อก่อโรคได้ในระดับมากน้อย แล้วทำการ score +1 +2 +3 +4 โดยจะทำการทดสอบการยับยั้งต่อเชื้อก่อโรคเชื้อ *S. aureus, B. subtilis* และ *E. coli* ด้วย ทั้งนี้จะทำการเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถให้ clear zone ที่มีขนาดใหญ่ในระดับ +4 เมื่อทำการบ่มเชื้อในระหว่าง disc diffusion โดยต้องมีการปรับหาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ทำให้สร้างสารออกฤทธิ์ได้ในปริมาณสูง ด้วยการตรวจสอบด้วย disc diffusion test แล้ว plot กราฟเพื่อหาความเหมาะสมจากกราฟที่ได้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย