อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สายพันธุ์บัว

บัวที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 6 พันธุ์ (ภาพที่ 9) ดังนี้

1. พันธุ์บัวหลวง รวบรวมจากบริเวณภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี 2 ชนิด คือ บัวหลวงสัตตบงกช (ดอกสีชมพู) บัวหลวงสัตตบุตย์ (ดอกสีขาว) ซึ่งมีชั้นของกลีบดอกหลายชั้น และพันธุ์บัวหลวงเก็บจากกรมการปกครอง อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี ซึ่งเป็นบัวหลวงสีชมพู มีกลีบดอกอยู่รวมกันหลวมๆ

2. พันธุ์บัวสาย จากพิพิธภัณฑ์บัว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี 3 ชนิด คือ บัวขาวมงคล (ดอกสีขาว) บัวมะเหมี่ยว (ดอกสีแดง) และบัวฉลองขวัญ (King of Siam ดอกสีน้ำเงิน)

2. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

2.1 แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์

-แบคทีเรียแกรมบวก

- *Bacillus subtilis* TISTR No.008

- *Staphylococcus aureus* TISTR No.1466

-แบคทีเรียแกรมลบ

- *Escherichia coli* TISTR No.780

2.2 เชื้อรา 3 สายพันธุ์ แยกจากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ได้แก่ เชื้อรา *Sclerotium* sp.7 (แยกเชื้อจากมันฝรั่ง), *Sclerotium* sp.8 (แยกเชื้อจากกล้วยไม้รองเท้านารี) และ *Lasiodiplodia* sp. (แยกเชื้อจากส้มโอ) และเก็บรักษาเชื้อราเหล่านี้ในอาหารพีดีเอ (Potato Dextrose Agar, PDA)

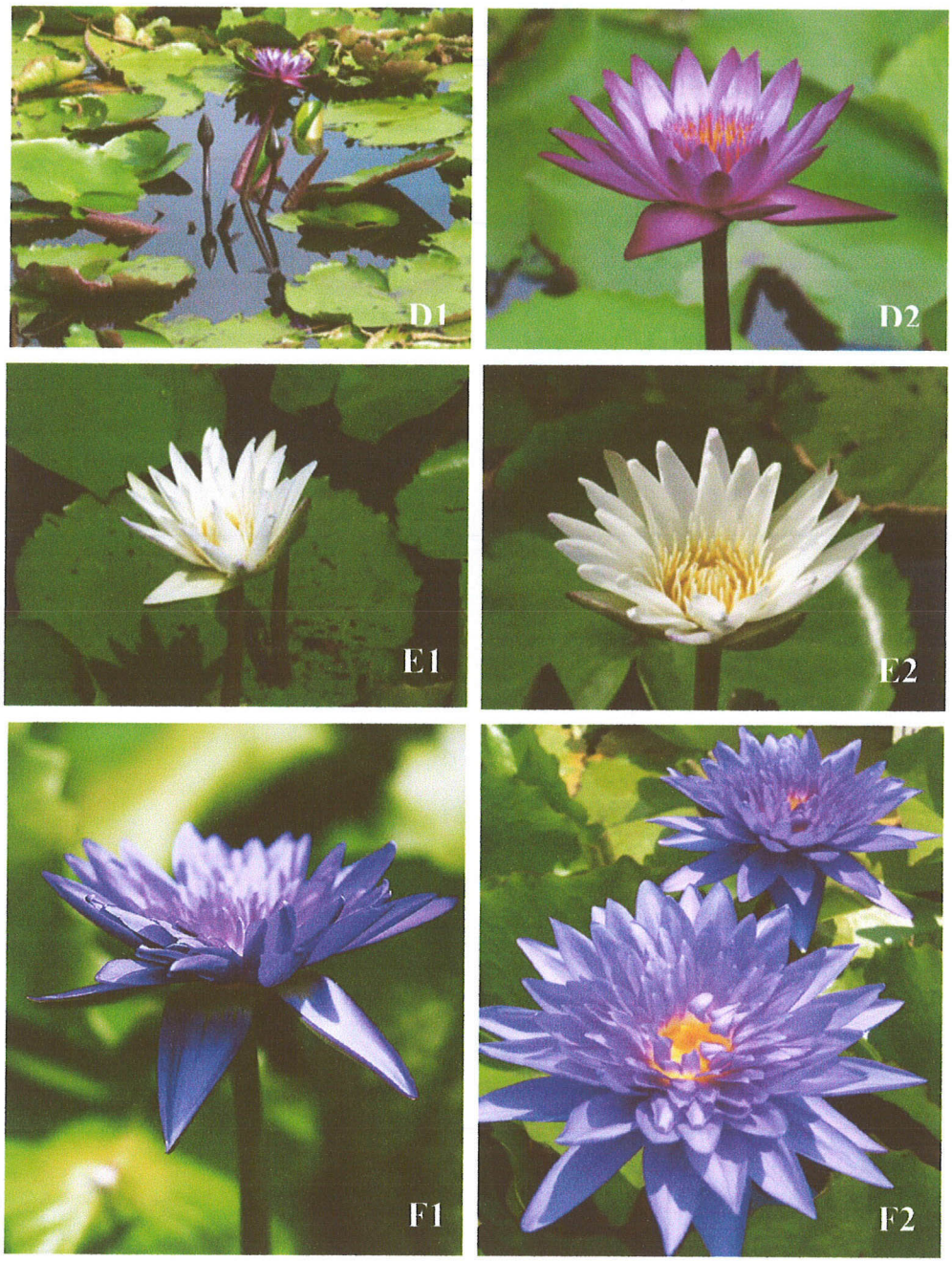
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ ใช้เชื้อแบคทีเรียของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สำหรับเชื้อราได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ภาพที่ 9 ลักษณะดอกบัวหลวงและบัวสายที่ใช้ในการทดสอบ

A1-2. ดอกบัวหลวงสัตตบงกช

B1-2. ดอกบัวหลวงสัตตบุตย์

C1-2. ดอกบัวหลวงปทุม



ภาพที่ 9 (ต่อ) ลักษณะดอกบัวหลวงและบัวสายที่ใช้ในการทดสอบ

D1-2. ดอกบัวสายมะเหมี่ยว

E1-2. ดอกบัวสายขาวมงคล

F1-2. ดอกบัวสายฉลองขวัญ

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1 การสกัดสารจากพืชและการทดสอบทางเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- ขวดแช่สกัด
- ชุดกรอง suction พร้อมเครื่องปั๊ม 1 ชุด
- กระดาษกรองเบอร์ 4
- โครมาโทรกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-layer chromatography, TLC) สำเร็จรูป เคลือบ ซิลิกาเจล 60 จีเอฟ$_{254}$ (Silica gel GF$_{254}$ Merck) ฉาบบนแผ่นอะลูมิเนียม มีความหนาของซิลิกา 0.2 มม. การตรวจสอบหาจุด (spot) ของแผ่น TLC ใช้วิธีมองด้วยตาเปล่า (เฉพาะสารที่มีสี) และดูด้วยแสงอุตราไวโอเลตของเครื่อง UV
- เครื่อง Rotary evaporator
- Column ขนาด 3 เซนติเมตร และ 1.3 เซนติเมตร
- ขวดเก็บสาร 50 มิลลิลิตร
- Volumetric flask ขนาด 10 ml และ 50 ml
- ปิเปต 5 ml (Gruaduate), 1 ml (transfer)
- เครื่อง UV-Visible Spectroscopy

3.1.2 สารเคมี

Ethanol, Hexane, Chloroform, Dichloromethane, Ethyl acetate และ Silica gel G$_{60}$ สำหรับคอลัมน์โครมาโทรกราฟี (Column chromatography) สารเคมีทุกชนิดที่ใช้เป็นเกรดวิเคราะห์

3.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- Volumetric flask ขนาด 10 ml และ 50 ml
- ปิเปต 5 ml (Gruaduate) , 1ml (transfer) และ 10 ml (transfer)
- เครื่อง UV-Vissible Spectroscopy ยี่ห้อ Jasco V 570

3.2.2 สารเคมี

- Absolute Ethanol
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- Vitamin E

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัด

3.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)
- กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)
- ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator)
- เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer)
- เครื่องชั่ง (Balance)
- แผ่นแม่เหล็กให้ความร้อนพร้อมที่กวนสาร (Magnetic stirer)
- เครื่องนับโคโลนี (Colony counter)
- ปิเปตขนาด 1 ml (transfer) , 5 ml (transfer) และ 10 ml (transfer)
- ขวดเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบมีฝาปิดขนาด 500 ml
- ลูปและเข็มเขี่ยเชื้อ (Loop and needle)
- ปากคีบ (Forceps)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- กระดาษกรอง
- เครื่องแก้ว ได้แก่ จานเลี้ยงเชื้อ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซ็นติเมตร) บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ หลอดทดลอง กรวยกรอง และแท่งแก้วคน เป็นต้น

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

- Nutrient Agar (NA)
- Nutrient Broth (NB)
- Potato Dextrose Agar (PDA)

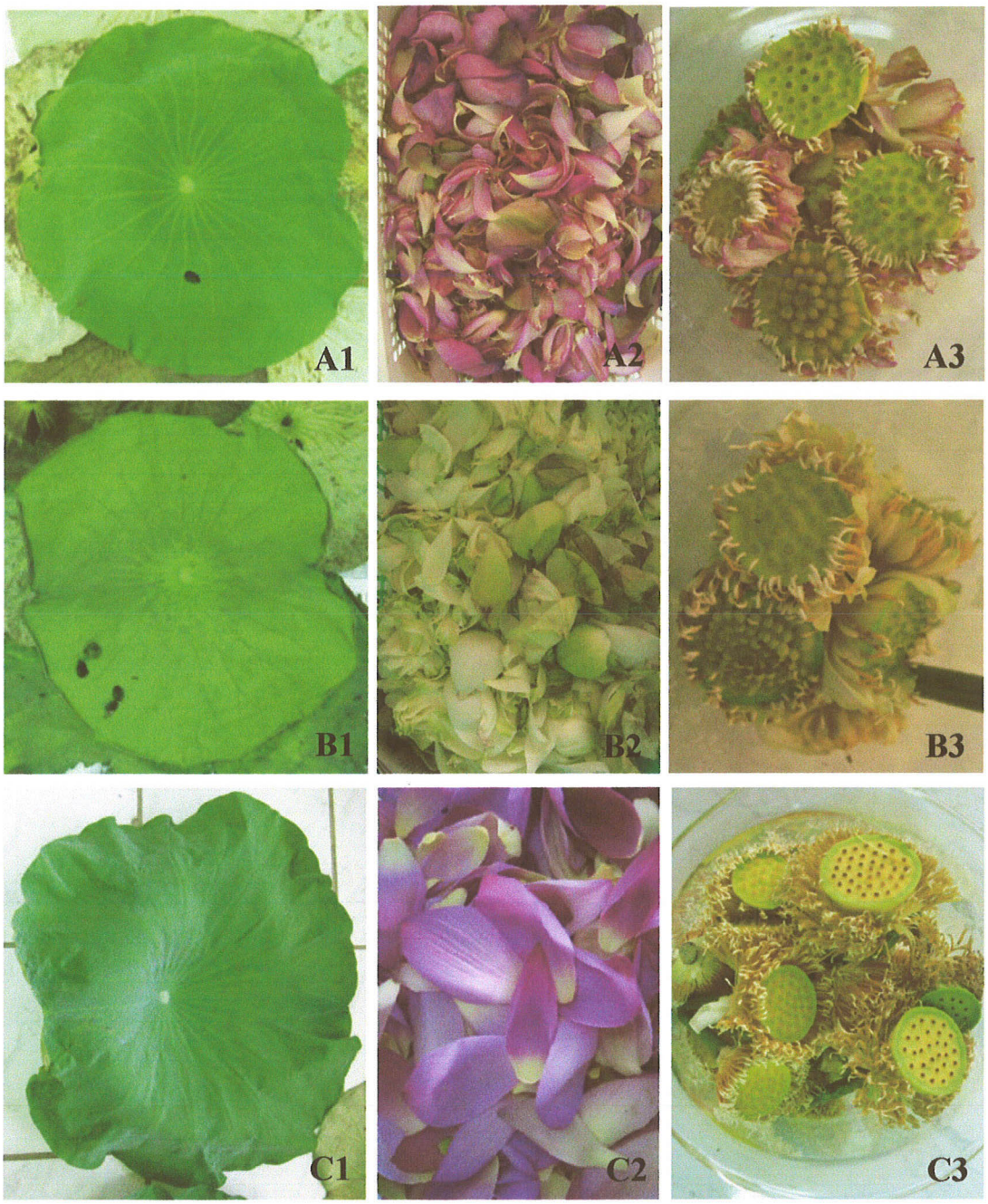
3.3.3 สารเคมี

- Ethanol
-Amphotericin B

วิธีการ

1. การสกัดสารจากบัว

นำบัวที่เก็บมาจำนวน 6 ตัวอย่าง แยกบัวแต่ละพันธุ์เป็น 3 ส่วน ประกอบด้วยส่วนใบ กลีบดอก และเกสร (ภาพที่ 10) นำไปตากในที่ร่มที่มีอากาศถ่ายเท เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 2-3 ซม. นำไปบดให้ละเอียดและชั่ง นำมาหมักเปียกด้วยเอทานอล และสกัดเย็น (Cold extraction) ด้วยการแช่ด้วยตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากเป็นวิธีง่าย สะดวก และทำให้สารเกิดการเสื่อมสลายน้อย โดยนำพืชที่จะทำการสกัดใส่ในถุงผ้าดิบและเริ่มต้นการสกัดด้วยการแช่ในเอทานอล โดยใช้พืชแห้ง 200 กรัม ต่อตัวทำละลาย 3 ลิตร แช่ในตัวทำละลายนาน 7 วัน และทำการหมักซ้ำอีก 2 ครั้ง จนไม่มีสารออกมาจากตัวอย่างบัว นำส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้จากการหมักไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสูญญากาศ (Rotary evaporator) จนได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) จากใบ กลีบดอก และเกสร ที่มีลักษณะข้นเหนียว (ภาพที่ 11) จากนั้นแยกสารสกัดด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีด้วยตัวทำละลายคือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอาซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ ใช้เทคนิค TLC เพื่อดูรูปแบบของสารสกัดที่ได้ในตัวทำละลายต่างๆ และรวม Fraction ที่มีรูปแบบเหมือนกันไว้ด้วยกัน นำสารสกัดที่ได้นี้ไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป



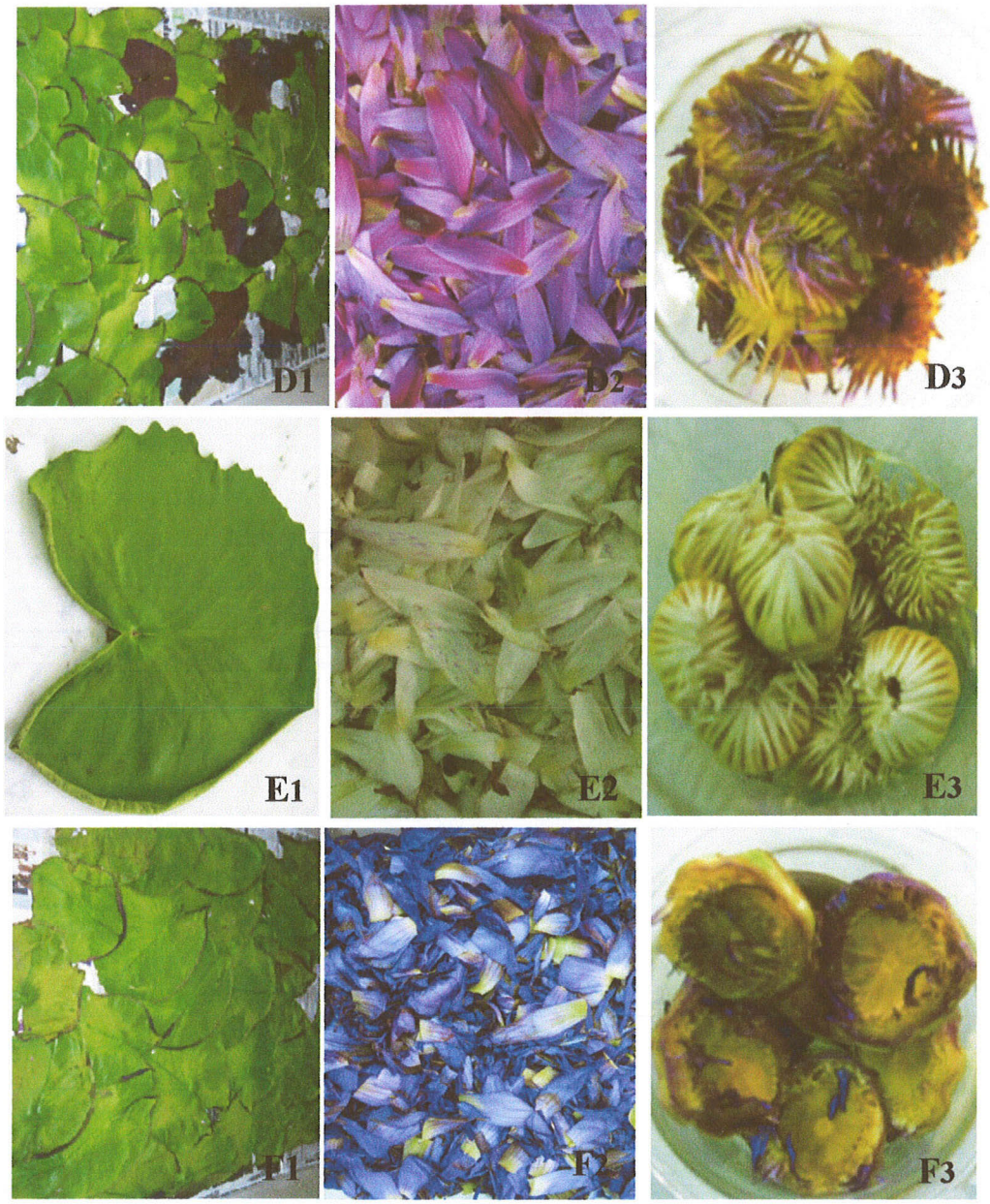
ภาพที่ 10 ใบ กลีบดอก และเกสร ของบัวที่นำมาสกัดสาร

A1-3. ดอกบัวหลวงสัตตบงกช

B1-3. ดอกบัวหลวงสัตตบุตย์

C1-3. ดอกบัวหลวงปทุม

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพที่ 10 (ต่อ) ใบ กลีบดอก และเกสร ของบัวที่นำมาสกัดสาร

D1-3. ดอกบัวสายมะเหมี่ยว

E1-3. ดอกบัวสายขาวมงคล

F1-3. ดอกบัวสายฉลองขวัญ

ภาพที่ 11 ขั้นตอนการสกัดสารจากบัว

A, B. ใบ และกลีบดอกที่แห้ง

C. ใส่พืชที่แห้งในถุงผ้าดิบ

D. การหมักเปียกด้วยเอทานอล

E. เครื่องกลั่นระเหยสูญญากาศ (Rotary evaporator)

F. สารสกัดหยาบ (Crude extract)

2. วิธีแยกสารด้วยเทคนิค Column Chromatography

2.1 เตรียม Column Chromatography ใช้ Silica gel G_{60} เป็นตัวดูดซับผสมกับ Hexane แล้วผ่านลงใน Column โดยใช้อัตราส่วน สาร: Silica gel เท่ากับ 1:10 โดยใช้ Hexane เป็นตัวชะโดยให้ระดับของ Silica gel เรียบสม่ำเสมอ จากนั้นผ่าน Hexane ลงใน Column ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (Column ขนาดไดมิเตอร์ 1.3 เซนติเมตร) และ 100 มิลลิลิตร (Column ขนาดไดมิเตอร์ 3.0 เซนติเมตร) เวลาปล่อย Hexane ให้เหลือ Hexane อยู่เหนือ Silica gel เล็กน้อยเพื่อไม่ให้ Silica gel แห้งและแตก

2.2 นำสารสกัดผสมกับSilica gel โดยบดตัวอย่างให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ค่อยๆเติมสารที่บดไว้ลงใน Column

2.3 สารละลายสำหรับชะโดยใช้ Hexane : Dichloromethane, Dichloromethane: Ethyl acetate, Ethyl acetate : Ethanol , Ethanol : Methanol และ Methanol 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนแต่ละครั้งจะเก็บ Fraction ครั้งละ 10 มิลลิลิตร(Column ขนาดไดมิเตอร์ 1.3 เซนติเมตร) และ 50 มิลลิลิตร (Column ขนาดไดมิเตอร์ 3.0 เซนติเมตร) ใส่ขวดเก็บสารซึ่งสารที่อยู่ใน column จะมีการแยกออกมาทำ TLC เพื่อตรวจสารและรวม Fraction ที่มีเหมือนกันไว้ด้วยกัน

2.4 นำสารที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกันมาแยกด้วย Column Chromatography อีกครั้ง โดยเตรียม Column Chromatography ใช้ Silica gel G_{60} เหมือนขั้นตอนที่ 2.1

3. การทดสอบหากลุ่มสารสำคัญในสารสกัด

สารสำคัญในสารสกัด ได้แก่ สารในกลุ่ม alkaloids, tannins, terpenoids, steroids, flavonoids, antraquinones และ cardiac glycosides เป็นต้นโดยนำวิธีของ Farnsworth *et al.*, 1966; อ้อมบุญ, 2536; ถนอมศรี, 2523; นันทวัน, 2523 และ พรรนิภา, 2523 มาปรับใช้ในการทดสอบหากลุ่มสารสำคัญ ดังนี้

1. Alkaloids สารสกัด EtOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 5% HCl 20 ml อุ่น 15 นาที กรอง ทดสอบกับ Dragendorff's test, Mayer's test, Wanger's test, และ Kruat' s test

2. Tannins และ phenolic compounds สารสกัด EtOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายในน้ำ 20 ml อุ่น 15 นาที กรอง ถ้าขุ่นหยด 4-5 หยด 10% NaCl กรอง นำมาทดสอบกับ gelatin solution, gelatin salt solution, 1% $FeCl_3$, Br_2 water, Vanilin, 40% Formalin / HCL, และ Lime water

3. Triterpenes และ Steroids สารสกัด EtOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายด้วย $CHCl_3$ 1-2 ml นำมาทดสอบวิธี Liebermann Burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc.H_2SO_4 ลงในหลอดทดลอง สังเกตวงแหวนที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

4. Flavonoids สารสกัด EtOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน Petoleum ether 4 ml กรอง แล้วเอา residue ละลายใน 80 % ethanol 8 ml นำมาทดสอบ Cyadinin test โดยนำลวด Mg มาใส่ในหลอดทดลอง 3-4 ชิ้น แล้วค่อยหยด conc. HCl 3 หยด สังเกตฟองที่เกิด ทิ้งไว้ให้ละลายจนหมด จากนั้น เติมน้ำ 1 ml และ Octyl alcohol 1 ml สังเกตสีในชั้นของ Octyl alcohol

5. Antraquinones สารสกัด EtOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 0.5 M KOH จำนวน 10 ml แล้วเติม 3% H_2O_2 1 ml ต้มบนหม้ออังไอน้ำ 10 นาที กรอง ทิ้งให้เย็น หยด CH_3COOH จนเป็นกรด สกัดด้วย C_6H_6 10 ml นำมาทดสอบ Modified Borntragers test โดยนำชั้นของ C_6H_6 ไปหยด NH_3 จำนวน 1-2 หยด ตั้งทิ้งไว้

6. Cardiac glycosides สารสกัด EtOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 10% Lead acetate 10 ml อุ่น 15 นาที ทิ้งให้เย็น กรอง สกัดด้วย $CHCl_3$ 5 ml จำนวน 3 ครั้ง นำมาทดสอบวิธี Liebermann burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc.H_2SO_4 จำนวน 1-2 หยด ลงใน หลอดทดลอง สังเกตสีที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

การทดสอบกลุ่มสาร Flavonoids (Screening for Flavonoids (Shinoda test) และการทดสอบหมู่ฟังก์ชัน

1. สารเคมี ได้แก่ Petroleum ether, Conc. Hydrochloric acid, 80% Ethanol, ลวด Mg และ $Br_2/CHCl_3$

2. วิธีการทดสอบกลุ่มสาร Flavonoids

- นำสารสกัดหยาบใส่หลอดทดลองปริมาณ 3 mg เติม Petroleum ether จนกว่าสารไม่มีสี จากนั้นเติม 80% Ethanol เพื่อทำการสกัดอีกครั้ง แล้วแยกส่วนสารละลาย Ethanol ออก จะได้ส่วนที่เป็นสารสกัดหยาบ

- นำลวด Mg 2-3 ชิ้นเล็กๆ ใส่ลงไปในหลอดที่มีสารสกัดหยาบที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น เติม Conc. Hydrochloric 2-3 หยด สังเกตจากฟองแก๊สที่เกิดขึ้น ถ้าได้สีส้มแสดงว่าสารสกัดนั้นมีสารกลุ่ม Flavonoid เป็นองค์ประกอบ

3. วิธีการทดสอบหมู่ฟังก์ชัน (หมู่ฟังก์ชันไม่อิ่มตัว)

นำสารละลายตัวอย่าง 2 หยดใส่หลอดทดลอง หยดสารละลาย $Br_2/CHCl_3$ ค่อยๆหยดสารทีละหยดพร้อมเขย่า สังเกตสีของสารละลายจางลง

4. วิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

1. เตรียม Stock Solution DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เข้มข้น 0.01 M 50 มิลลิลิตร

2. เตรียม DPPH เข้มข้น 0.0001 M โดยปิเปตจาก Stock Solution 2.5 มิลลิลิตรปรับปริมาตรด้วย Ethanol 250 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask

3. เตรียม Vitamin E หนัก 5 mg ปรับปริมาตรด้วย DPPH 0.0001 M 10 ml

4. เตรียมสารตัวอย่าง ชั่งสารตัวอย่าง 5 mg ปรับปริมาตรด้วย DPPH 0.0001 M 10 ml

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectroscopy ที่ 517 nm ของตัวอย่างเทียบกับ Vitamin E

6. คิดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งด้วยสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \frac{(Abs_{DPPH} - Abs_{sample})x100}{Abs_{DPPH}}$$

5. การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัด

5.1 เชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหารแข็ง โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient Agar (NA) 14 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร บรรจุใส่ขวดปิดฝา

2. เตรียมอาหารเหลว โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient Broth (NB) 6.5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปิเปตอาหารเหลว (NB) ใส่หลอดทดลอง ปริมาตร 9 ml และปิดปากหลอดทดลองด้วยฝาจุกให้เรียบร้อย

3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมทั้งหมด (NA และ NB) เข้าเครื่อง autoclave เพื่อทำการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อน ที่อุณหภูมิ 121 ^{0}C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

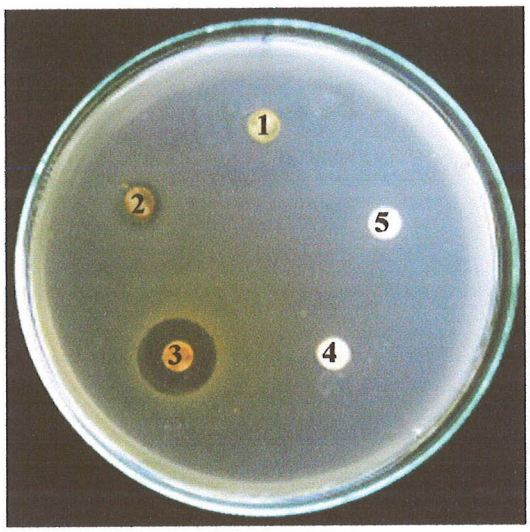
การเตรียมเชื้อเริ่มต้นสำหรับใช้ในการทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรีย 1 ลูป (loop) ใส่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ที่มีอาหาร Nutrient Broth (NB) 15 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. ปิเปตเชื้อหลังจากบ่มแล้ว 5 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 100 ml นำไปบ่มพร้อมเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. และหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยปิเปตเชื้อที่ได้ 1 ml ใส่ในอาหาร NB 9 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) ได้สารละลายเจือจาง (Dilution 10^{-1}) จากนั้นนำเชื้อ Dilution 10^{-1} 1 ml ใส่ในอาหาร NB 9 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารได้สารละลายเจือจาง (Dilution 10^{-2}) ทำการเจือจางเชื้อจนถึง 10^{-6} หรือ 10^{-7} ใช้เชื้อที่ Dilution 10^{-5} 1 ml ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ เททับด้วยอาหาร NA วนจานเลี้ยงเชื้อไปมาเบาๆ เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อผสมเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชม.โดยทำ 2 ซ้ำ และเลี้ยงเชื้อที่ Dilution 10^{-6}และ Dilution 10^{-7} เช่นเดียวกัน ตรวจนับปริมาณเชื้อที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มครบตามกำหนด โดยปริมาณเชื้อที่สามารถนับได้ควรอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี และคำนวณปริมาณเชื้อเริ่มต้นจากจำนวนเชื้อที่นับได้คูณด้วยค่าความเจือจางของเชื้อ

วิธีการทดสอบการยับยั้งเชื้อ

ในการทดสอบควรใช้เชื้อแบคทีเรียปริมาณ 10^{5} - 10^{6} CFU ml^{-1} โดยใช้เชื้อ 1 ml ต่ออาหาร NA 20 ml ใส่ใน 1 จานเลี้ยงเชื้อ เริ่มจากการนำเชื้อที่ได้เตรียมไว้ใส่ในอาหาร NA ที่หลอมละลายอุณหภูมิประมาณ 55°C โดยใช้เชื้อ 1 ml ต่อ อาหาร NA 20 ml เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อผสมอยู่ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ (ปริมาตรอาหารประมาณ 20 ml ต่อจาน) ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว แล้วจึงนำแผ่นดิสค์ (กระดาษกรองขนาด 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) หยดสารสกัดที่ต้องการทดสอบความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิสค์ และปล่อยให้แห้ง นำมาวางลงบนอาหารที่เตรียมไว้ ตามตำแหน่งต่างๆ (ภาพที่ 12) ทำ 3 ซ้ำ นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

ตรวจวัดขนาดบริเวณใสที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Clear zone, Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นดิสค์



ภาพที่ 12 ตัวอย่างตำแหน่งการวางสารสกัด 4-2/H/DCM/E ทดสอบกับเชื้อ *B. subtilis*

จุดที่ 1 สารสกัดกลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยวใน Hexane

จุดที่ 2 สารสกัดกลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยวใน Dichloromethane

จุดที่ 3 สารสกัดกลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยวใน Ethanol

จุดที่ 4 ตัวควบคุมที่ไม่ชุบสารสกัด

จุดที่ 5 ตัวควบคุมที่ชุบ Ethanol

5.2 เชื้อรา

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารแข็ง โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Potato Dextrose Agar (PDA) 39 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร บรรจุใส่ขวดปิดฝา และนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ^{0}C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

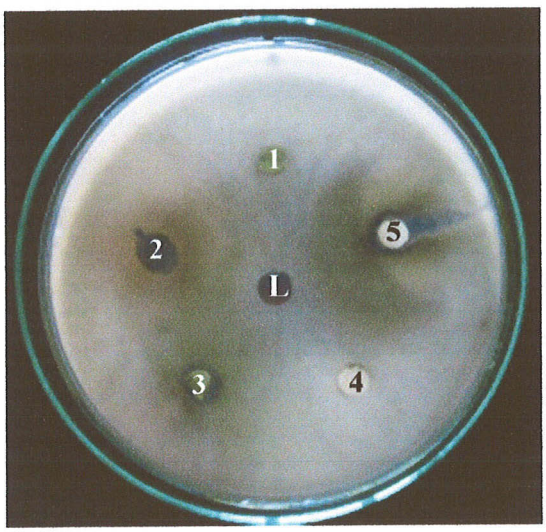
การเตรียมเชื้อรา

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยเชื้อรามาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อบนอาหารพีดีเอ ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อราเจริญเต็มที่จึงนำมาใช้ในการทดสอบ

วิธีการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา

การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดบัว ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี

Disc Diffusion method (Daru *et al.*, 2003) โดยเทอาหารพีดีเอปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซ็นติเมตร ผึ่งให้ผิวหน้าอาหารแห้งจึงนำมาใช้ในการทดสอบ นำสารสกัดบัวหยดลงบนแผ่นดิสค์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ความเข้มข้นของสารสกัด 2 มิลลิกรัมต่อดิสค์ รอจนแผ่นดิสค์แห้ง นำแผ่นดิสค์ไปวางบนผิวอาหารที่เตรียมไว้ โดยมีแผ่นดิสค์ที่ไม่ชุบสารสกัดเป็นตัวควบคุมลบ (negative control) และแผ่นดิสค์ที่หยด Amphotericin B ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อดิสค์ เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) เพื่อใช้เปรียบเทียบกับสารสกัดบัว จากนั้นใช้ cork borer เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะกลุ่มเส้นใยบริเวณที่เชื้อกำลังมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วคือส่วนขอบโคโลนีของเชื้อราที่เตรียมไว้ วางชิ้นเส้นใยเชื้อตรงกลางจานที่มีแผ่นดิสค์ของสารสกัดวางอยู่ก่อน (ภาพที่ 13) พันรอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม ทำจำนวน 3 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น การวัดผลยับยั้งเชื้อราขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิด เนื่องจากเชื้อ *Sclerotium* spp. และ *Lasiodiplodia* sp. มีการเจริญอย่างรวดเร็ว การวัดขนาดบริเวณใสจะวัดในวันที่ 5 และ 3 ตามลำดับ โดยทำการทดสอบ 2 ครั้ง



ภาพที่ 13 ตัวอย่างตำแหน่งการวางสารสกัด 6-1/H/DCM/E ทดสอบกับเชื้อ *Lasiodiplodia* sp.(L)

จุดที่ 1 สารสกัดกลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยวใน Hexane

จุดที่ 2 สารสกัดกลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยวใน Dichloromethane

จุดที่ 3 สารสกัดกลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยวใน Ethanol

จุดที่ 4 ตัวควบคุมลบ (Negative control) โดยใช้กระดาษกรองที่ไม่ชุบสารสกัด

จุดที่ 5 ตัวควบคุมบวก (Positive control) โดยใช้ Amphotericin B

5.3 การวิเคราะห์ผล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (SPSS Statistics 17.0 for Windows) โดยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของดันแคน (Duncan's new multiple range test, DMRT)

6. สถานที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองที่คณะเทคโนโลยีการเกษตร และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

7. ระยะเวลาทำการวิจัย

ระยะเวลาทำการวิจัยตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2551 ถึง 30 กันยายน 2553