บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope
2. ตู้เขี่ยเชื้อ (lamina flow)
3. ตู้เย็น (refrigerator)
4. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
5. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
6. เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator)
7. อุปกรณ์ตรวจนับสปอร์ (haemacytometer)
8. เครื่องชั่งแบบดิจิตอล ทศนิยม 2 และ 3 ตำแหน่ง (digital balance)
9. ไมโครปิเปต (micro pipette) และไมโครทิป
10. แผ่นสไลด์แก้วและกระจกปิดสไลด์
11. อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น flask, Petri dish, test tube, cylinder
12. อุปกรณ์แยกเชื้อ (เข็มเขี่ย, มีดผ่าตัด, cork borer, ตะเกียงแอลกอฮอล์, ไฟแช็ค)
13. วัสดุงานบ้านงานครัว กล่องพลาสติก/ ตะกร้าพลาสติก/ถุงพลาสติกร้อน
14. อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (potato dextrose agar, PDA)
15. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์
16. ผงสมุนไพรอบเชย และโป๊ยกั๊ก
17. กัมอะราบิก
18. ผลมะม่วง
19. สารเคมีเบนโนมิล

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อบริสุทธิ์และการศึกษาเชื้อรา

นำผลมะม่วงอกร่องสุกที่แสดงอาการเป็นโรคแอนแทรคโนสจากบ้านเสม็ดงาม ตำบลหนองบัว อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ด้วยเทคนิควิธี tissue transplanting โดยการตัดชิ้นส่วนของผิวบริเวณขอบแผลให้ติดบริเวณที่ไม่เป็นโรคขนาดประมาณ 0.5 X 0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อด้วย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เวลา 5 นาที

ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับฆ่าเชื้อ นำไปวางบนอาหาร WA (water agar) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 3 วัน ตัดปลายเส้นใยที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนของพืช วางลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโดยศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA และเขี่ยเส้นใยและสปอร์เชื้อราวางลงบนกระจกสไลด์ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope เพื่อศึกษาโครงสร้างเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อได้เชื้อราบริสุทธิ์ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยเก็บลงอาหาร PDA ในหลอดทดลอง (PDA slant) เก็บรักษาในตู้เย็นเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

2. การสกัดสารสกัดหยาบจากพืช

การสกัดสารสกัดหยาบจากพืชโดยวิธีมาเซอเรชั่น (maceration) โดยนำผงอบแห้งของพืชแต่ละชนิดที่บดละเอียดแล้วมาตัวอย่างละ 200 กรัม ใส่ในขวดแก้วสีชาปากกว้าง เติมเอทิลแอลกอฮอล 95 เปอรเซ็นต ปริมาตร 800 มิลลิลิตร (ใช้อัตราส่วนพืชต่อตัวทำละลาย 1 : 4 โดยปริมาณต่อปริมาตร) ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน โดยคนสารทุกวัน ๆ ละ 1 ครั้ง จากนั้นกรองเศษพืชออกด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำส่วนแอลกอฮอล์ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบ (crude extracted) ซึ่งมีลักษณะของเหลวหนืดข้น ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บสารสกัดจากพืชไว้ในขวดสีชาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3. การศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใย

การทดสอบผลของสารสกัดจากอบเชย โป๊ยกั๊ก และกัมอะราบิกกับเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงอกร่องด้วยวิธี poisoned food technique (Dhingra and Sinclair, 1995) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะบริเวณปลายเส้นใยเชื้อราที่เลี้ยงอยู่บนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน นำมาวางบนจุดศูนย์กลางของจานอาหารทดลอง โดยวางคว่ำให้ด้านที่มีเส้นใยของเชื้อราสัมผัสกับอาหาร PDA ที่ผสมสารทดสอบได้แก่ อบเชย โป๊ยกั๊ก กัมอะราบิก และอาหาร PDA ที่ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราเบนโนมิล โดยมีชุดควบคุม คือ อาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารใด ๆ บ่มจานอาหารทดลองที่อุณหภูมิห้องในที่มีการควบคุมแสงฟลูออเรสเซนต์ และมืดสลับกัน 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) แต่ละทรีตเม้นต์มี 10 ซ้ำ โดยมีทรีตเม้นต์ที่ใช้ศึกษาดังนี้

ทรีตเม้นต์ที่ 1 ชุดควบคุม (PDA เปล่าที่ไม่ผสมสารใด ๆ)
ทรีตเม้นต์ที่ 2 PDA + สารสกัดจากอบเชย 0.5%
ทรีตเม้นต์ที่ 3 PDA + สารสกัดจากอบเชย 1.0%
ทรีตเม้นต์ที่ 4 PDA + สารสกัดจากโป๊ยกั๊ก 0.5%
ทรีตเม้นต์ที่ 5 PDA + สารสกัดจากโป๊ยกั๊ก 1.0%
ทรีตเม้นต์ที่ 6 PDA + สารสกัดจากอบเชย 0.5% +กัมอะราบิก 10%
ทรีตเม้นต์ที่ 7 PDA + สารสกัดจากอบเชย 1.0% +กัมอะราบิก 10%
ทรีตเม้นต์ที่ 8 PDA + สารสกัดจากโป๊ยกั๊ก 0.5% +กัมอะราบิก 10%
ทรีตเม้นต์ที่ 9 PDA + สารสกัดจากโป๊ยกั๊ก 1.0% +กัมอะราบิก 10%
ทรีตเม้นต์ที่ 10 PDA + กัมอะราบิก 10%
ทรีตเม้นต์ที่ 11 PDA + เบนโนมิล 0.05%

วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราทุกวันหน่วยเป็นเซนติเมตร เมื่อโคโลนีเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารทดลอง นำค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรามาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากสูตร ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใย = [(A – B) / A] X 100

A = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดควบคุม

B = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบ

4. การศึกษาผลการยับยั้งการงอกของสปอร์

การทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากอบเชย โป๊ยกั๊ก และกัมอะราบิกต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงอกร่องดวยวิธี cavity slide technique เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) โดยตัดปลายเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน เมื่อเชื้อราเจริญเติบโตเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีการสร้างสปอร์ ทำการล้างเอาสปอร์ที่ผิวหน้าอาหารออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยการใช้แท่งแก้วขูดบริเวณผิวหน้าโคโลนีเบา ๆ กรองด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำเอาสารละลายสปอร์ที่ได้มานับจำนวนสปอร์บน Haemacytometer แล้วตรวจนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ปรับความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากอบเชย โป๊ยกั๊ก และกัมอะราบิกกับสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนสไลด์หลุม วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละทรีตเม้นต์มี 5 ซ้ำ โดยมีทรีตเม้นต์ที่ใช้ศึกษาดังนี้

ทรีตเม้นต์ที่ 1 ชุดควบคุม (PDA เปล่าที่ไม่ผสมสารใด ๆ)
ทรีตเม้นต์ที่ 2 PDA + สารสกัดจากอบเชย 0.5%
ทรีตเม้นต์ที่ 3 PDA + สารสกัดจากอบเชย 1.0%
ทรีตเม้นต์ที่ 4 PDA + สารสกัดจากโป๊ยกั๊ก 0.5%
ทรีตเม้นต์ที่ 5 PDA + สารสกัดจากโป๊ยกั๊ก 1.0%
ทรีตเม้นต์ที่ 6 PDA + สารสกัดจากอบเชย 0.5% +กัมอะราบิก 10%
ทรีตเม้นต์ที่ 7 PDA + สารสกัดจากอบเชย 1.0% +กัมอะราบิก 10%
ทรีตเม้นต์ที่ 8 PDA + สารสกัดจากโป๊ยกั๊ก 0.5% +กัมอะราบิก 10%
ทรีตเม้นต์ที่ 9 PDA + สารสกัดจากโป๊ยกั๊ก 1.0% +กัมอะราบิก 10%
ทรีตเม้นต์ที่ 10 PDA + กัมอะราบิก 10%
ทรีตเม้นต์ที่ 11 PDA + เบนโนมิล 0.05%

บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 90 - 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จึงนำมาตรวจลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อรา และนับเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนสปอร์ที่งอกต่อการสุ่มนับจำนวน 100 สปอร์ โดยนับว่าสปอร์งอกเมื่อความยาวของ germ tube ยาวเท่ากับหรือมากกว่าความยาวของสปอร์ เปรียบเทียบจำนวนสปอร์ที่งอกบนชุดทดสอบกับสปอร์ที่งอกบนชุดควบคุมที่เป็นน้ำกลั่นไม่ผสมสารใด ๆ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกสปอร์เปรียบเทียบกับชุดควบคุมของเชื้อราจากสูตร ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ = [(A – B) / A] X 100

เมื่อ A คือ จำนวนสปอร์เชื้อราที่งอกเมื่อไม่ได้ผสมสารทดสอบ (ชุดควบคุม)

B คือ จำนวนสปอร์เชื้อราที่งอกเมื่อได้ผสมสารทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan’s new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี