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. พรอพอลิส
17. สารเคมีโพรคลอราช (Prochloraz)

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยเรื่องประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของไม้ผล ผู้วิจัยมีวิธีดำเนินงานดังนี้

1. การสกัดสารสกัดหยาบจากพรอพอลิส

การสกัดสารสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชั่น (maceration) โดยนำพรอพอลิสของชันโรงจากเกษตรกรในจังหวัดจันทบุรี น้ำหนัก 200 กรัม ใส่ในขวดแก้วสีชาปากกว้าง เติมเอทิลแอลกอฮอล 95 เปอรเซ็นต ปริมาตร 800 มิลลิลิตร (ในอัตราสวนพืชต่อตัวทำละลาย 1 : 4 โดยปริมาณตอปริมาตร) ทำการหมักในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง (28$\pm$2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน โดยคนสาร

ทุกวัน ๆ ละ 1 ครั้ง จากนั้นกรองเศษที่ไม่ละลายออกด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองอีกครั้งด้วยกระดาษ Whatman No.1 นำสวนแอลกอฮอล์ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสารสกัดและตะกอนออกจากกัน หลังจากนั้นนำสารสกัดพรอพอลิสที่กรองได้ไประเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบ (crude extracted) ซึ่งมีลักษณะของเหลวหนืดข้น ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บสารสกัดจากพืชไว้ในขวดสีชา ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การแยกและเก็บรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของไม้ผล

นำไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของจังหวัดจันทบุรีได้แก่ ผลมะม่วง ทุเรียน กล้วย มะละกอ ชมพู่ และเงาะที่แสดงอาการเป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวจากแหล่งเพาะปลูกในจังหวัดจันทบุรี มาทำการแยกเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ ด้วยเทคนิควิธี tissue transplanting โดยการตัดชิ้นส่วนของผิวบริเวณขอบแผลให้ติดบริเวณที่ไม่เป็นโรคขนาดประมาณ 0.5 X 0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อด้วย 1% sodium hypochlorite เวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับฆ่าเชื้อ นำไปวางบนอาหาร WA (water agar) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 3 วัน ตัดปลายเส้นใยที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนของพืช วางลงบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโดยศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA จากนั้นเขี่ยเส้นใย และสปอร์เชื้อราวางลงบนกระจกสไลด์ ตรวจโครงสร้างเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ (compound microscope) ทำการเก็บรักษาเชื้อราบริสุทธิ์โดยใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยเก็บลงอาหาร PDA ในหลอดทดลอง (PDA slant) เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3. การศึกษาผลของสารสกัดจากพรอพอลิสที่มีต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

ทำการทดสอบผลของสารสกัดพรอพอลิสที่มีต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคไม้ผล ที่สำคัญทางเศรษฐกิจที่แยกได้จากขั้นตอนที่ 2 ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง ชมพู่ และเงาะ, *Colletotrichum musae* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วย, *Dothiorella dominicans* สาเหตุโรคขั้วผลเน่าของมะม่วง, *Fusarium* spp. สาเหตุโรคผลเน่าของทุเรียน, *Lasiodiplodia theobromae* สาเหตุโรคขั้วหวีเน่าของกล้วย โรคผลเน่าของทุเรียน และโรคผลเน่าของมะละกอ ด้วยวิธี poisoned food technique (Dhingra and Sinclair, 1995) โดยการเตรียมอาหาร PDA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำสารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 1, 2 และ 3% ผสมในอาหาร PDA ที่มีอุณหภูมิ 60 องศา

เซลเซียส ผสมให้เข้ากันแล้วเทใส่จานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เทประมาณ 15 มิลลิลิตร ในส่วนของชุดควบคุมจะเป็นอาหาร PDA ที่ไม่มีการผสมสารใด ๆ และอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราโพรคลอราช (Prochloraz) 0.05%

หลังจากผิวหน้าอาหารผสมสารทดสอบแห้งสนิท นำชิ้นวุ้นที่ได้จากการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณรอบโคโลนีเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบที่อายุ 7 วัน วางบนผิวหน้าอาหารผสมสารสกัดพรอพอลิส โดยคว่ำให้ด้านที่มีเชื้อราอยู่ทางด้านล่าง บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD, Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 8 ซ้ำ ตรวจวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) ทุกวัน จนกระทั่งเชื้อราชุดควบคุมเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยโดยใช้สูตร ดังนี้

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

เมื่อ A คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนชุดควบคุม

B คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนชุดทดสอบ

4. การศึกษาผลของสารสกัดจากพรอพอลิสที่มีต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา

ทำการทดสอบผลของสารสกัดพรอพอลิสที่มีต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคไม้ผลที่แยกได้ในขั้นตอนที่ 2 โดยผสมสารสกัดพรอพอลิสในอาหาร WA (water agar) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 1, 2 และ 3% ผสมในอาหาร WA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อผสมให้เข้ากันแล้วเทใส่จานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เทประมาณ 15 มิลลิลิตร ในส่วนของชุดควบคุมจะเป็นอาหาร WA ที่ไม่มีการผสมสารใด ๆ และอาหาร WA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราโพรคลอราช 0.05%

ทำการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา โดยการทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปเตรียมสารละลายสปอร์ โดยเทน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงบนอาหาร PDA จากนั้นใช้แท่งแก้วงอนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยบริเวณผิวหน้าอาหารเพื่อให้สปอร์กระจาย แล้วกรองเส้นใยออกด้วยผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์ให้มีความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้อุปกรณ์ตรวจนับสปอร์ (hemacytometer)

หลังจากผิวหน้าอาหารผสมสารทดสอบแห้งสนิท ทำการทดสอบของสารสกัดจากพรอพอลิสที่มีต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยว โดยหยดสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงผิวหน้าอาหาร และทำการเกลี่ย (spread) โดยใช้แท่งแก้วงอที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยให้สปอร์กระจายตัวบนผิวอาหารอย่างสม่ำเสมอ บ่มทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้องที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 90-100 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงจึงนำมาตรวจลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อรา โดยตัดชิ้นวุ้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 2x2 เซนติเมตร นำมาวางบนแผ่นสไลด์ โดยให้ด้านที่มีเชื้อราหงายขึ้น หยด lactophenol เพื่อย้อมให้สปอร์มองเห็นได้ชัดเจนขึ้น และบันทึกจำนวนสปอร์ที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยถือว่าสปอร์ที่งอก คือ สปอร์ที่มี germ tube ยาวเกินกว่าครึ่งหนึ่งของขนาดสปอร์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD, Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์โดยใช้สูตร ดังนี้

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

เมื่อ A คือ จำนวนสปอร์เชื้อราที่งอกเมื่อไม่ได้ผสมสารทดสอบ (ชุดควบคุม)

B คือ จำนวนสปอร์เชื้อราที่งอกเมื่อได้ผสมสารทดสอบ

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ตาราง ANOVA (analysis of variance) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT (Duncan’s new multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

RAMBHAI BARNI RAJABHAT UNIVERSITY
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี