บทที่ 3

การทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR)

เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) รุ่น Varian Mercury 400 NMR สำหรับการหาโปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรา โดยวัดค่าเคมิคอลชิฟท์เป็นพีพีเอ็ม (ppm) สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$), ดิวเทอร์เรียมออกไซด์ (D_2O), เมธานอล-d_4 (CD_3OD) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์-d_6 (DMSO-d_6) โดยวิเคราะห์สเปกตรัมของ ^{1}H-NMR ที่ 400 MHz สำหรับ ^{1}H nuclei ค่าเคมิคอลชิฟท์ (δ) อ้างอิงกับค่าเคมิคอลชิฟท์ของตัวทำละลายที่ตกค้างอยู่ในตัวทำละลายชนิดดิวทีเร็ท โดยที่ $CDCl_3$ อ้างอิงที่ 7.26 (s) ppm, D_2O อ้างอิงที่ 4.79 ppm, CD_3OD อ้างที่ 3.31 ppm และ DMSO-d_6 อ้างอิงที่ 2.50 ppm และ วิเคราะห์ ^{13}C-NMR ที่ 100 MHz สำหรับ ^{13}C nuclei ค่าเคมิคอลชิฟท์ (δ) อ้างอิงกับค่าเคมิคอลชิฟท์ของตัวทำละลายที่ตกค้างอยู่ในตัวทำละลายชนิดดิวทีเร็ท โดยที่ $CDCl_3$ อ้างอิงที่ 77.16 (t) ppm, CD_3OD อ้างที่ 49.00 ppm และ DMSO-d_6 อ้างอิงที่ 39.52 ppm

3.1.2 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR)

เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) ของบริษัท Nicolet Impact รุ่น 410 สำหรับวัดอินฟราเรดสเปกตราของสาร สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยบดผสมกับโปแตสเซียมโบรไมด์ (KBr) อัดเป็นแผ่น (pellet) เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร

3.1.4 Mass spectrometer

วัดมวลโมเลกุลของสารประกอบวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High resolution electrospray-truce of flight (HR/ES-TOF) mass spectrometry โดยเครื่อง Mass Spectrometer รุ่น LCT บริษัท Micromass UK Limited

3.1.3 Ultraviolet-visible Spectrophotometer (UV-VIS)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Varian Cary 50 Probe ทำได้โดยนำสารที่ต้องการวัดมาละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่สารนั้นละลายได้ดี แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.1.4 Optical Rotation

Polarimeter รุ่น 341 โดยใช้ sodium lamp ที่ความยาวคลื่น 589 นาโนเมตร ของบริษัท Perkin-Elmer

3.1.5 เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Fisher-John Melting Point Apparatus)

สำหรับการหาจุดหลอมเหลวใช้เครื่อง Fisher-John Melting Point Apparatus ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำได้โดยนำสารตัวอย่างมาบดให้ละเอียด จากนั้นบรรจุลงในหลอดแก้วสำหรับตรวจหาจุดหลอมเหลว (capillary tube) ให้ได้ความสูงพอประมาณ แล้วนำไปหาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่องวัดจุดหลอมเหลว

3.1.6 Rotary Vacuum Evaporator

เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ของบริษัท Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 <u>ตัวทำละลายอินทรีย์</u>

ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิด commercial grade นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่นก่อนนำมาใช้ ได้แก่

- คลอโรฟอร์ม
- ไดคลอโรมีเธน
- เมธานอล
- เอธิลอะซิเตต
- เฮกเซน
- แอซิโตน

ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิด AR Grade ได้แก่

- คลอโรฟอร์ม
- ไดคลอโรมีเธน
- เมธานอล
- เอธิลอะซิเตต
- เฮกเซน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 ตัวดูดซับ

- ซิลิกาเจล silica gel 60 No. 1.09385.1000 (230-400 mesh ASTM) (E. Merck). สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.2.3 แผ่นธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography)

- แผ่น TLC สำเร็จรูปชนิด Art.5554 TLC Aluminium sheet Silicagel 60 F_{254} (1.05554.0001) ของบริษัท Merck, Damstadt ประเทศเยอรมัน

3.2.3 Sephadex

- Sephadex LH-20 ของบริษัท Pharmacia Biotech AB. ประเทศสวีเดน

3.3 เทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

บรรจุตัวดูดซับซิลิกาเจล Silica gel 60 No. 109385.1000 หรือ Sephadex LH-20 ลงในคอลัมน์ ซึ่งวิธีนี้จะใช้แรงดันจากอากาศช่วยให้ตัวทำละลายไหลได้เร็วขึ้น

3.3.2 ธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี

ใช้แผ่น TLC สำเร็จรูปแต้มสารด้วยหลอดรูเล็ก (Capillary tube) แล้วปล่อยให้เกิดการแยกในขวดแก้วโดยให้วัฏภาคเคลื่อนที่ขึ้นไปจนถึงแนวตัวทำละลาย จากนั้นทำให้แห้งแล้วนำไปตรวจหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC โดยส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือด้วยไอของไอโอดีน หรือรีเอเจนท์ที่ประกอบด้วยวานิลิน 1 กรัม เอธานอล 95 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 4.5 มิลลิลิตร

3.3.3 พรีพาเรทีฟธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (Preparative TLC)

เป็นธินแลเยอร์โครมาโทกราฟีที่ต้องมี absorbent หนาขึ้นถึง 2 มิลลิเมตร เพื่อใช้แยกสารเมื่อมีปริมาณมากขึ้น ซึ่งในการทดลองอาจเตรียม TLC plate ได้เองสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ แต่ในการวิจัยนี้จะใช้แผ่นธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) สำเร็จรูปชนิด Art. 5554 TLC Aluminium sheets Silica gel $60F_{254}$ (1.05554.0001) ของบริษัท Merck, Damstadt ประเทศเยอรมนี ทั้งนี้เพื่อความรวดเร็วและความสะดวกในการวิจัย

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง (ดูรายละเอียดสูตรอาหารและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในภาคผนวก ก) ประกอบด้วย

อาหารแข็ง

1. Corn meal Extract Agar (CMA)
2. Malt Extract Agar (MEA)
3. Nutreint Agar (NA)
4. Potato Dextrose Agar (PDA)
5. Sabouraud's Dextrose Agar (SDA)
6. Yeast Extract Sucrose Agar (YEA)
7. Yeast-Malt Extract Agar (YMA)

อาหารเหลว

1. Corn meal Extract Broth (CMB)
2. Malt Extract Broth (MEB)
3. Nutreint Broth (NB)
4. Potato Dextrose Broth (PDB)
5. Sabouraud's Dextrose Broth (SDB)
6. Yeast Extract Sucrose Broth (YEB)
7. Yeast-Malt Extract Broth (YMB)
8. Mueller-Hinton Broth (MHB)

3.5 การแยกราเอนโดไฟต์จากใบกวาวเครือขาวและการเก็บรักษา

3.5.1 การแยกราเอนโดไฟต์จากใบกวาวเครือขาว

สุ่มเก็บตัวอย่างใบกวาวเครือขาวที่แข็งแรง ไม่เป็นโรค จากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย 4 แหล่ง คือ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย-กรุงเทพมหานคร อำเภอเมือง-จังหวัดลพบุรี จังหวัดตาก และจังหวัดเชียงราย ในช่วงเดือนมกราคม-มิถุนายน ปี พ.ศ. 2547 โดยนำส่วนใบกวาวเครือขาวที่เก็บตัวอย่างมาล้างน้ำทำความสะอาดแล้วฆ่าเชื้อที่ผิวโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Petrini ดังนี้ (Petrini, 1986)

1. นำส่วนใบที่ล้างน้ำทำความสะอาดแล้วไปตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร จากนั้นแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที และสุดท้ายแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ อีก 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วซับให้แห้งบนระดาษที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2. นำส่วนใบกวาวเครือขาวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) หรือ malt extract agar (MEA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง(ประมาณ 30°C) แล้วสังเกตการงอกของเส้นใยของเชื้อราออกมาจากเนื้อเยื่อส่วนใบกวาวเครือขาวทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

3. เมื่อพบว่ามีเส้นใยของราเอนโดไฟต์เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อส่วนใบกวาวเครือขาว จึงเขี่ยส่วนปลายเส้นใยของเชื้อราไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) หรือ malt extract agar (MEA) จนได้เชื้อบริสุทธิ์ต่อไป

4. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5.2 การเก็บรักษาราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์สามารถทำการเก็บรักษาได้ 2 วิธี ดังนี้

1. ตัดราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หรือ MEA ขนาดประมาณ 0.3x0.3 เซนติเมตร จำนวน 8-10 ชิ้น เขี่ยใส่ลงในขวดบรรจุน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

2. เพาะราเอนโดไฟต์ลงในขวดเก็บเชื้อ (Vial) ซึ่งมีอาหารแข็ง PDA หรือ MEA ที่เตรียมแบบวางเอียง (Slant) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง จนเชื้อเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร ราดทับด้วยพาราฟินเหลว (liquid paraffin) สูงจากผิวหน้าอาหารประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นพันขวดด้วยพาราฟิน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.6 การคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้วิธี Dual Agar diffusion (Weaver และคณะ, 1994 และ Joseph, Dave และ Shah, 1998)

-เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่

เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Staphylococcus aureus ATCC 25923

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

-เชื้อราที่ใช้ทดสอบ คือ *Candida albicans* ATCC 10231

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ โดยเชื้อแบคทีเรียใช้ อาหาร NA ส่วนเชื้อราใช้อาหาร YM จากนั้นเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบในอาหารที่เตรียมไว้แล้วทำการเขี่ยเชื้อลงบนอาหารเพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นเขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนีแล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว โดยเชื้อแบคทีเรียใช้ อาหารเหลว NB ส่วนเชื้อราใช้อาหารเหลว YMB บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบมาวัดความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland standard ถ้าความขุ่นเกินปรับโดยใช้อาหารเหลวทำให้เจือจาง และอ่านค่าจากเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ 625 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08-0.1 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^6-10^7 CFU/ml ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานสำหรับใช้เปรียบเทียบกับเชื้อราเอนโดไฟต์ที่นำมาทดสอบฤทธิ์ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้ไม้ที่พันปลายด้วย

สำลีจุ่มลงในเชื้อดังกล่าว ป้ายเชื้อลงบนอาหารที่เตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อในลักษณะ 3 ทิศทาง แต่ละทิศทางทำมุม 60 องศา จากนั้นใช้ Cork borer เจาะลงบนเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ ซึ่งทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA (potato dextrose agar) และ MEA (malt extract agar) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่เจาะได้มาวางลงในจานเพาะเชื้อที่ทำการถ่ายเชื้อแล้วในข้างต้น บ่มจานเพาะเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน แล้วทำการวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้น คัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่เกิดวงใสกว้างและเกิดวงใสกับเชื้อทดสอบหลายชนิด

3.7 การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือก

นำเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.6 มาเลี้ยงในอาหารแข็งทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ PDA (potato dextrose agar), MEA (malt extract agar), YEA (yeast extract sucrose agar), SDA (sabouraud's dextrose agar) และ CMA (corn meal agar) เมื่อเชื้อราเจริญสมบูรณ์แล้วจึงนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Dual Agar diffusion ทำเหมือนในข้อ 3.6 จากนั้นเลือกอาหารที่ทำให้เชื้อรามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ที่สุด ด้วยการสังเกตวงใสที่เกิดขึ้น

3.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์และการจัดจำแนกราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01

3.8.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.8.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่ต่างกัน 5 ชนิด

นำราเอนโดไฟต์ที่มีความบริสุทธิ์แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ PDA (potato dextrose agar), MEA (malt extract agar), YEA (yeast extract sucrose agar), SDA (sabouraud's dextrose agar) และ CMA (corn meal agar) ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องจนราเจริญเต็มจานเพาะเชื้อ หลังจากนั้นนำมาศึกษาลักษณะต่างๆ ของเชื้อรา เช่น ลักษณะของโคโลนีหรือสีของเส้นใยและสปอร์ สีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราสร้างขึ้น เป็นต้น โดยสังเกตด้วยตาเปล่าและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ บันทึกภาพ

3.8.1.2 การทำ slide culture

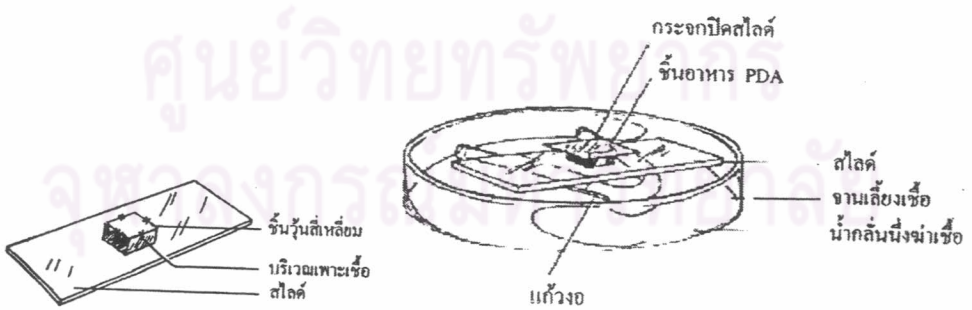
การทำ slide culture (รูปที่ 3.1) เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใย สปอร์ ก้านชูสปอร์ หรือลักษณะอื่นๆ ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีวิธีการทำดังนี้

1. นำกระดาษกรองวางลงในจานเพาะเชื้อแล้ววางแท่งแก้วรูปตัววีหรือหลอดน้ำที่มีความยาวพอเหมาะ 2 แท่ง ทับบนกระดาษกรอง วางแผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์ (cover glass) บนกระดาษกรอง จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

2. เตรียมอาหารแข็ง PDA หรือ MEA จากนั้นใช้ needle ตัดชิ้นอาหารให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5x0.5 ตารางเซนติเมตร แล้ววางลงบนแผ่นสไลด์ เขี่ยเชื้อราที่ต้องการศึกษาใส่ลงที่ด้านข้างของชิ้นวุ้นทั้ง 4 ด้าน จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

3. เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ลงในจานเพาะเชื้อพอให้ชุ่มกระดาษกรอง ปิดฝาจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 30°C เป็นเวลา 3-5 วันหรือจนกว่าเชื้อราจะเจริญเต็มที่ สังเกตการเจริญของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน โดยยกทั้งจานเพาะเชื้อขึ้นมาวางบนสเตจของกล้องจุลทรรศน์ เปิดฝาออก แล้วจึงส่องดูด้วยเลนส์กำลังขยายต่ำสุด

4. ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของสปอร์ โดยการหยดสีย้อมแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู (Lactophenol Cotton Blue) ลงบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่ นำไปศึกษาลักษณะเส้นใย สปอร์และลักษณะอื่นๆ ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทาขอบสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บเพื่อป้องกันสีย้อมแห้งหากเก็บไว้ศึกษาต่อไป



รูปที่ 3.1 การทำ Slide Culture

3.8.2 การพิสูจน์ทางอณูชีววิทยา

เป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราโดยการวิเคราะห์ลำดับ DNA ของส่วน ITS ของ ribosomal RNA ทำได้โดยการเลี้ยงราเอนโดไฟต์ 63LVM01 ในอาหาร PDB จากนั้นสกัด DNA จากเส้นใย (White,T.J., 1990) แล้วนำทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PowerSoil™ DNA Isolation kit (Mo Bio Lab.)โดยใช้ Primers ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) และ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ ITS1-5.8-ITS2 regions จาก DNA ทั้งหมดที่สกัดได้ แล้วเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย thermal cycle program (ปฏิกิริยาเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาซ้ำ จำนวน 30 รอบที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 50 วินาที, 45 °C เป็นเวลา 40 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 40 วินาที

ลำดับเบสบริเวณ DNA นำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ Primers ITS5 และ ITS4 BLASTN 2.2.10 (Altschul, S.F., 1997) นำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของราสายพันธุ์ต่างๆ ใน GenBank DNA database โดยใช้ ClustalW (1.82) multiple sequence alignment program (Thompson, J.D., 1994)

3.9 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต (growth curve) และการสร้างสารเมแทบอไลต์ที่ทีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01

3.9.1 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01

เพาะเลี้ยงเชื้อราใน อาหารที่เหมาะสม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นเจาะชิ้นวุ้นที่มีราเจริญอยู่เต็มบนอาหารเพาะเชื้อโดยใช้ sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5 มิลลิเมตร นำชิ้นเชื้อราที่เจาะได้ถ่ายลงขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast Extract Sucrose Broth (YEB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใส่ชิ้นวุ้น 5 ชิ้นต่อขวดแก้ว 1 ขวด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บผลการทดลองวันเว้นวันและเก็บ 3 ซ้ำ กรองแยกเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกัน เส้นใยเชื้อราที่ได้จะนำไปอบแห้งในเครื่อง Hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 °C นำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งจนน้ำหนักที่ได้คงที่ จากนั้นทำการ plot graph ระหว่างน้ำหนักแห้งกับวันที่เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา

3.9.2 การสร้างสารเมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

น้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองได้จะนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Agar well diffusion (Acar, 1992 และ Jorgensen และคณะ, 1999) โดยวิธีนี้จะคล้ายกับวิธี Dual Agar diffusion แต่จะต่างกันตรงอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อที่ใช้ในการทดสอบนี้จะต้องใช้ sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5 มิลลิเมตร เจาะเป็นหลุมก่อนจากนั้นใช้เข็มเขี่ยชิ้นวุ้นออกแล้วจึงทำการถ่ายเชื้อที่ใช้ในการทดสอบลงในจานเพาะเชื้อที่ทำการเขี่ยชิ้นวุ้นออกแล้ว จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อนั้นมาหยอดน้ำเลี้ยงเชื้อลงไปในหลุมที่เขี่ยชิ้นวุ้นออกไปแล้วโดยใช้ micropipette ปริมาณหลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นเก็บผลการทดลองเพื่อดูว่าต้องเลี้ยงเชื้อราเป็นระยะเวลานานเท่าใดเชื้อราจึงจะสร้างสารเมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด

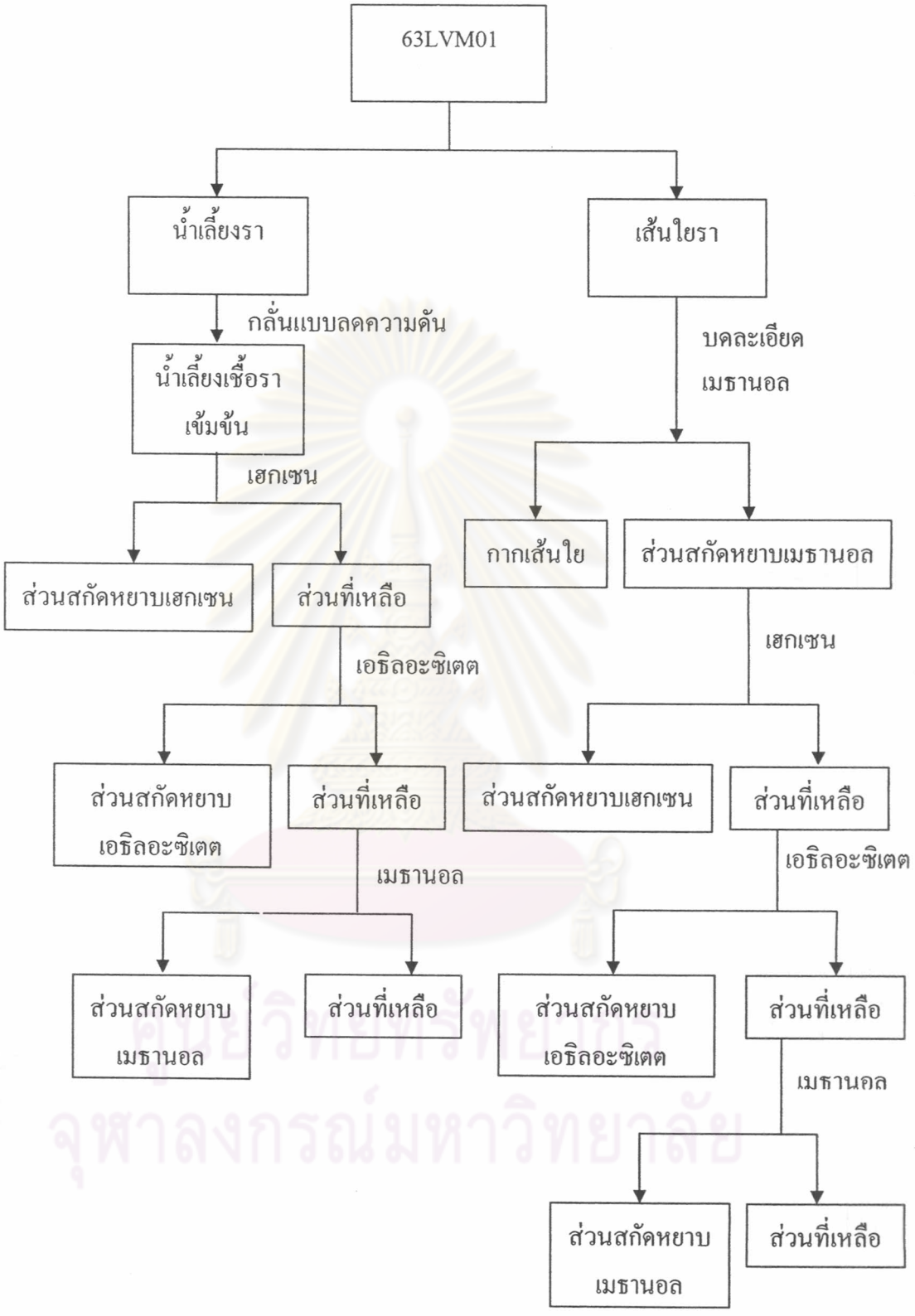
3.10 การเลี้ยงเชื้อ การสกัด และการทดสอบส่วนสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01

3.10.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01

นำราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง YEA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เจาะชิ้นเชื้อราโดยใช้ sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5 มิลลิเมตร นำชิ้นเชื้อราจำนวน 5 ชิ้น ถ่ายใส่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงทั้งหมด 22 ลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 วัน เมื่อครบกำหนดนำอาหารเลี้ยงเชื้อมากรองแยกเส้นใยเชื้อรากับน้ำเลี้ยงเชื้อราออกจากกัน

3.10.2 การสกัดสารที่ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 สร้างขึ้น

นำราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 ที่เพาะเลี้ยงไว้ในข้อ 3.11.1 มาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งจะได้ส่วนของเส้นใยราและส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงนำทั้ง 2 ส่วนที่แยกได้นี้มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอธิลแอซิเตต และเมธานอล ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3.1



แผนภาพที่ 3.1 วิธีการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราและเส้นใยเชื้อรา

3.10.3 การทดสอบส่วนสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้วิธี paper disk diffusion method (Weaver และคณะ, 1994 และ Joseph, Dave และ Shah, 1998) มีขั้นตอนดังนี้

ก. <u>การเตรียมตัวอย่างทดสอบ</u>

นำส่วนสกัดหยาบจากเส้นใยราและน้ำเลี้ยงราทั้ง 8 ส่วน ได้แก่ ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตส่วนสกัดหยาบเมธานอลและส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเมธานอล มาตัวอย่างละ 20.0 มิลลิกรัม ผสมกับตัวทำละลาย 10% DMSO ในน้ำปริมาตร 1 ml จะได้สารละลายบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 20.0 mg/ml แล้วนำไปเจือจางต่อด้วยตัวทำละลายให้ได้ระดับความเข้มข้น 10.0 mg/ml และ 5.0 mg/ml ตามลำดับ

ข. <u>การเตรียมสารละลายสารชุดควบคุม</u>

<u>ชุดควบคุมบวก</u> (Positive Control)

- Penicillin G 10 µg/disk
- Streptomycin 10 µg/disk
- Ketoconazole 10 µg/disk

<u>ชุดควบคุมลบ</u> (Negative Control)

- ตัวทำละลาย 10% DMSO

ค. <u>การเตรียมเชื้อจุลชีพ</u>

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 ทำการถ่ายเชื้อทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำเหมือนในข้อ 3.6

ง. <u>การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์</u>

นำตัวอย่างทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ ก. มาหยดลงบน paper disk ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.0 มิลลิเมตร (อบฆ่าเชื้อแล้ว) ปริมาตร 10 µl เมื่อ paper disk แห้ง จึงนำมาวางบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ ค. จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน แล้วทำการวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้น

นอกจากนั้นยังได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช 4 ชนิด คือ *Phytoptera* sp., *Alternalia* sp., *Collectoticum* sp. และ *Fusarium* sp. โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA ให้มีอายุ 4 วัน จากนั้นนำตัวอย่างทดสอบในข้อ ก. มาทำการทดสอบฤทธิ์เหมือนข้อ ง. จากนั้นนำ paper disk แห้งแล้วมาวางบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อราก่อโรคเจริญอยู่ โดยจะวาง 4 จุด ห่างจากโคโลนีของเชื้อรา ประมาณ 1.5 cm. ใช้ Captane Iprodine และ Ketokonazole ความเข้มข้น10 µg เป็น Positive control จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3-4 วัน แล้วอ่านผลการทดลอง

3.11 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ 63LVM01 ให้บริสุทธิ์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

3.11.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงรา

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ 63LVM01 น้ำหนัก 5.30 กรัม มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (320 กรัม) คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติมตร สูง 80 เซนติมตร ชะคอลัมน์โดยเพิ่มสภาพขั้วตัวชะจากต่ำไปสูง นั่นคือจาก เฮกเซน-ไดคลอโรมีเธน, ไดคลอโรมีเธน, ไดคลอโรมีเธน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.8

3.11.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 880-989 (BE18)

นำลำดับส่วนที่ 880-989 (BE18) น้ำหนัก 398.2 มิลลิกรัม มาแยกอีกครั้งด้วยเทคนิคแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (80 กรัม) คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติมตร สูง 30 เซนติมตร ตัวชะที่ใช้จะเพิ่มสภาพขั้วเป็นลำดับขั้นดังนี้ ไดคลอโรมีเธน, ไดคลอโรมีเธน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.9

3.11.3 การทำให้บริสุทธิ์และการพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ 1

สารประกอบ 1 เป็นของแข็งสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งได้มาจากส่วนที่เหลือจากการนำสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดลำดับส่วนด้วยเอธิลแอซิเตตและเมธานอล ล้างของแข็งที่ได้ด้วยเมธานอล ได้ของแข็งสีครีมหนัก 800 มิลลิกรัม และได้มาจากลำดับส่วนที่ BE13, 16 และ BE22 ของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 2-10% เมธานอลในไดคลอโรมีเธนเป็นตัวชะ แยกของแข็งโดยการกรองและล้างของแข็งที่ได้ด้วยเมธานอล ได้ของแข็งสีน้ำตาลอ่อนหนัก 820 มิลลิกรัม (สารประกอบ 1)

3.11.4 การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ 2

สารประกอบ 2 เป็นผลึกสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ BE11 ของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ แยกผลึกออกมาโดยการตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน ได้ผลึกสีขาวหนัก 11 มิลลิกรัม (สารประกอบ 2)

3.11.5 การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ 3

สารประกอบ 3 เป็นของแข็งสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ BE20 ของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 4-6 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ แยกของแข็งโดยการกรองจากนั้นล้างของแข็งที่ได้ด้วยตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทน-เมธานอล ได้ของแข็งสีขาวหนัก 5 มิลลิกรัม (สารประกอบ 3)

3.11.6 การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ 4

สารประกอบ 4 เป็นของแข็งสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ RBE03 ซึ่งได้มาจากการนำ BE18 ของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาแยกอีกครั้งด้วยแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 4-6 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ แยกของแข็งออกมาโดยการกรองจากนั้นล้างของแข็งที่ได้ด้วยเมธานอล ได้ของแข็งสีขาวหนัก 15 มิลลิกรัม

3.12 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบที่แยกได้

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบด้วยวิธี The Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) (Jorgensen และคณะ, 1999) เป็นการหาความเข้มข้นของสารที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยใช้ Microtiter Plate Broth Dilution Technique ที่มีขั้นตอนการทดสอบ ดังนี้

ก. <u>การเตรียมสารละลายสารประกอบ</u>

ในการเจือจางสารละลายสารประกอบให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการนั้น ทำได้โดยการนำสารประกอบ 1.0 มิลลิกรัม ผสมกับตัวทำละลาย 10 % DMSO ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสารประกอบที่ความเข้มข้น 250 µg / ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นแรกในระดับความเข้มข้นที่เราต้องการ หลังจากนั้นก็เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ระดับความเข้มข้น 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 และ 3.91 µg / ml ตามลำดับ

ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ คือ

250 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 125 µg / ml)

125 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 62.5 µg / ml)

62.5 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 31.25 µg / ml)

31.25 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 15.63 µg / ml)

15.63 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 7.81 µg / ml)

7.81 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 3.91 µg / ml)

3.91 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 1.96 µg / ml)

ความเข้มข้นสุดท้าย คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายสารประกอบที่วัดได้ใน 96 well microtiter plate หลังจากเติม Broth Media + Suspension ของเชื้อลงไป

ข. การเตรียมสารละลายสารชุดควบคุมบวก (Positive Control)

ใช้ Penicillin G, Erythromycin, Sulfadimidine, Streptomycin, iprodine และ Ketoconazole เป็นสารชุดควบคุมบวก ในการเจือจางสารละลายทำเช่นเดียวกับการเจือจางสารละลายสารประกอบในข้อ 3.14.1 ก

ค. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบ ประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด และเชื้อรา 1 ชนิด ดังแสดงไว้ในข้อที่ 3.7 การเตรียมเชื้อทดสอบจะเตรียมตามข้อ 3.7 โดยเชื้อแบคทีเรียจะนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) และเชื้อราจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast-Malt Extract Broth (YMB)

ง. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จะทำการทดสอบใน 96 well microtiter plate โดยก่อนการหยอดสารละลายสารประกอบและสารชุดควบคุมบวก ให้ทำแผนผังระบุชนิดและตำแหน่งของสารที่จะหยอดลงใน 96 well microtiter plate เสียก่อนเพื่อความถูกต้องของการแปลผลการทดสอบที่ได้

สารที่จะหยอดลงใน 96 well microtiter plate มีดังนี้

Negative Control -Broth Media + 10% DMSO

-Broth Media + 10% DMSO + Suspension ของเชื้อ (ให้อ่านผลทันทีก่อนการบ่มเชื้อ)

-Broth Media + 10% DMSO + Suspension ของเชื้อ (ผ่านการบ่มเชื้อก่อนอ่านผล เพื่อเป็น control ว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้สามารถเจริญได้

-Broth Media + สารละลายสารประกอบตามระดับความเข้มข้น

Positive Control -Broth Media + Suspension ของเชื้อ + ระดับความเข้มข้นของยา

Test sample -Broth Media + Suspension ของเชื้อ + ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ

ปริมาตรที่ใช้ คือ Suspension ของเชื้อ 50 µl และสารละลายสารประกอบ 50 µl ซึ่งจะรวมได้ปริมาตรที่ใช้ 100 µl / 1 well

จ. การอ่านผล

อ่านผลการทดลองเป็นค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่อง Sunrise Microtiter Plate Reader

ฉ. การแปลผล

ให้เปรียบเทียบค่า Absorbance ของ Broth media + suspension ของเชื้อก่อนบ่มเชื้อกับค่า Absorbance ของ Broth media + ลำดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ โดยให้เปรียบเทียบกับค่า Absorbance ของ Broth media + suspension ของเชื้อ + ลำดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ (Test Sample) หลังจากบ่มเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมง

หากค่า Absorbance ของ Test Sample หรือยา Positive Control มีค่าสูงกว่า แสดงว่าสารละลายสารประกอบหรือยาในความเข้มข้นนั้นๆ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้

แต่ถ้าค่า Absorbance ของ Test Sample หรือยา Positive Control มีค่าต่ำกว่า แสดงว่าสารละลายสารประกอบหรือยาในความเข้มข้นนั้นๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้

ความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบตัวสุดท้ายที่มีค่าต่ำกว่า ค่านั้นคือค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration)

หมายเหตุ อาจมีการเพิ่มระดับความเข้มข้น หรือลดระดับความของสารละลายสารประกอบเพื่อหาค่า MIC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย