บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและสารเคมีที่ใช้

1. พืชสมุนไพร 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง
   1.1. เมล็ดสารภี
   แหล่งที่มาเก็บมาจากบริเวณ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
   1.2. รากหนอนตายหยาก
   แหล่งที่มาเก็บมาจากบริเวณสวนยางพารา จ.ตรัง
   1.3. ต้นสาบเสือ
   แหล่งที่มาเก็บมาจากบริเวณ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ยูจินอล (eugenol) สารสกัดบริสุทธิ์จากกานพลู
3. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง
   3.1. น้ำกลั่น
   3.2. 95 % Ethanol
   3.3. Tween 80
   3.4. Captan
   3.5. พอสซ์ (คาร์โบซัลแฟน)
4. เชื้อราที่ใช้ทดสอบ
   4.1. *Colletotrichum gloeosporioides* แยกจากเบญจมาศที่เป็นโรคใบจุด
   4.2. *Septoria* sp. แยกจากเบญจมาศที่เป็นโรคใบจุด
   4.3. *Cladosporium* sp. แยกจากกุหลาบที่เป็นโรคใบไหม้
   4.4. *Cladosporium cladosporioides*
5. อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อราทดสอบ ได้แก่
   Potato dextrose agar (PDA)
6. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง
   6.1. หม้อนึ่งความดัน
   6.2. ตู้อบอุณหภูมิสูง
   6.3. ตู้ถ่ายเชื้อ
   6.4. ตู้บ่มเชื้อ
   6.5. ตู้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.6. Ultrasonic bath

6.7. Rotary evaporator

6.8. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

6.9. Blender

6.10. เครื่องชั่งไฟฟ้า แบบทศนิยม 3 ตำแหน่ง

6.11. Vortex

6.12. ขวด Universal

6.13. จานอาหารเพาะเชื้อ (Petri dish)

6.14. ปิเปตขนาด 1 และ 10 มล.

6.15. Autopipette ขนาด 5 – 50 µl และ 50 – 200 µl

6.16. ที่เจาะจุกคอร์ก (Cork borer)

6.17. เข็มเขี่ยเชื้อรา

6.18. กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ

6.19. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

6.20. สไลด์หลุม (Concave slide)

6.21. Capillary tube

6.22. Tube ขนาด 16 X 100 มม.

6.23. Tip

6.24. บีกเกอร์

6.25. ขวดรูปชมพู่

6.26. ปากคีบ

6.27. กระดาษกรอง Whatman No. 2

6.28. ผ้าขาวบาง

6.29. สำลี

6.30. ตะเกียงแอลกอฮอล์

6.31. Stage micrometer

6.32. Ocular micrometer

6.33. กล่องพลาสติกขนาด 15 x 20 เซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การทดสอบการทำงานร่วมกันของยูจินอล และ สารสกัดสารภี หนอนตายหยาก และสาบเสือ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

1.1 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

นำรากหนอนตายหยาก และ ต้นสาบเสือ ล้างน้ำให้สะอาด แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และเมล็ดสารภีที่ล้างน้ำจนสะอาดดีแล้ว ไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 60° C จนกระทั่งแห้ง ตรวจสอบได้โดยการนำชิ้นส่วนของพืชที่แบ่งใส่ถุงกระดาษอบไว้ ชั่งน้ำหนักเป็นระยะๆ จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง blender ส่วนเมล็ดสารภีบดด้วยโกร่งบด สกัดสารโดยแช่ใน 95 % ethanol ข้ามคืน และนำไปแช่ใน ultrasonic bath ที่อุณหภูมิ 50° C นาน 30 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง บีบคั้นเอาของเหลวออกมาให้หมด และกรองเศษพืชออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 2 แล้วนำส่วนของเหลวไประเหยตัวทำละลายออกจนหมดโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60° C จนสารสกัดแห้ง เก็บรักษาสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิตู้เย็นประมาณ 4 – 8 ° C

1.2 การเตรียม PDA ผสมสารที่ใช้ทดสอบต่าง ๆ

เตรียม stock solution ดังตาราง 1 โดยใช้ตัวทำละลายคือ 95 % ethanol ปริมาณ 40.5 ml และ Tween 80 ปริมาณ 1 ml เก็บ Stock solution แต่ละชนิดที่ได้ในขวดแก้วสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็นประมาณ 4 – 8 ° C

ทำสไลด์หลุมให้ปราศจากเชื้อโดยชุบ 95 % Ethanol แล้วลนไฟ วางสไลด์หลุมที่ทำการทดสอบทุกชุดในกล่องพลาสติกขนาด 15 x 20 ซม. ที่เทวุ้น (water agar) ที่ปราศเชื้อ หรือสำลีชุบน้ำกลั่นที่ปราศเชื้อ เป็นตัวให้ความชื้น

นำ Stock solution ต่างๆที่เตรียมไว้ 415 µl มาผสมกับ PDA ที่หลอมเหลวไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 50 – 60 °C จำนวน 4,585 µl ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันดีด้วย Vortex หยด PDA ที่มีสารผสมต่างๆ ลงในสไลด์หลุม หลุมละ 100 µl (สุมาลี , 2540)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 การเตรียม Stock solution ของสารที่ใช้ทดสอบ

Stock solution	ปริมาณสาร	
	Eugenol (µl)	สารสกัดพืชสมุนไพร (g)
พืชสมุนไพร 0.05 %	-	0.25
พืชสมุนไพร 0.15 %	-	0.75
พืชสมุนไพร 0.45 %	-	2.25
ยูจินอล 0.02 %	100	-
ยูจินอล 0.06 %	300	-
ยูจินอล 0.18 %	900	-
ยูจินอล 0.02 % + พืชสมุนไพร 0.05 %	100	0.25
ยูจินอล 0.02 % + พืชสมุนไพร 0.15 %	100	0.75
ยูจินอล 0.02 % + พืชสมุนไพร 0.45 %	100	2.25
ยูจินอล 0.06 % + พืชสมุนไพร 0.05 %	300	0.25
ยูจินอล 0.06 % + พืชสมุนไพร 0.15 %	300	0.75
ยูจินอล 0.06 % + พืชสมุนไพร 0.45 %	300	2.25
ยูจินอล 0.18 % + พืชสมุนไพร 0.05 %	900	0.25
ยูจินอล 0.18 % + พืชสมุนไพร 0.15 %	900	0.75
ยูจินอล 0.18 % + พืชสมุนไพร 0.45 %	900	2.25

สารสกัดพืชสมุนไพรได้แก่ สารสกัดสารภี สารสกัดหนอนตายหยาก และสารสกัดสาบเสือ

1.3 การทดสอบสารผสมยูจินอล กับสารสกัดพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ

1.3.1 เตรียมเชื้อตั้งต้นของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช *Colletotrichum gloeosporioides* , *Cladosporium* sp. และ *Septoria* sp. ที่จะใช้ทดสอบ จาก stock culture ลงบนกึ่งกลางอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 5 – 7 วัน

1.3.2 เมื่อเชื้อราเจริญสร้างโคโลนีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 ซม. ใช้ Capillary tube ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม. ตัดเส้นใยที่บริเวณริมโคโลนีพร้อมทั้งวุ้นอาหารออกเป็นชิ้นกลมโดยวิธีปลอดเชื้อ แล้วจึงใช้ปากคีบปราศจากเชื้อ คีบชิ้นวุ้นไปเพาะเลี้ยงเชื้อตรงกลางสไลด์หลุมที่มีอาหาร PDA ผสมสารต่าง ๆ แล้วนำกล่องพลาสติกที่มีชุดการทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 3 – 5 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 การตรวจและบันทึกผลการทดลอง

นำสไลด์ที่เพาะเลี้ยงเชื้อมาวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อสองแนวตั้งฉากกันภายใต้กล้อง stereo microscope ที่มี ocular micrometer ทำการวัดทุกๆวัน เป็นเวลา 3 วัน บันทึกและนำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบจากสมการต่อไปนี้ (Gamliel *et al.*, 1989)

$$\% \text{ การยับยั้งการเจริญของเส้นใย} = 100 - [\,(r^2 / R^2) \times 100\,]$$

โดยที่ r = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีเชื้อราชุดทดสอบ

R = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีเชื้อราชุดควบคุม

1.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำตัวเลขการยับยั้งการเจริญไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย LSD (Least Significance Difference)

2. การทดสอบอายุการเก็บของสารผสมยูจินอลกับสารภี และสารผสมยูจินอลกับหนอนตายหยาก ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

2.1 แสงต่ออายุการเก็บสาร

2.1.1 เตรียมสารผสม ยูจินอล 0.06 % กับสารภี 0.15 % และสารผสมยูจินอล 0.06 % กับหนอนตายหยาก 0.15 % โดยสารผสมทั้ง 2 ชนิดมี 95 % Ethanol 8 % และ Tween 80 0.2 % เป็นตัวทำละลาย ส่วน Control ประกอบด้วย 95 % Ethanol 8 % และTween 80 0.2 % ทำการเตรียมทุกสารผสมทดสอบอย่างละ 4 ขวด โดย 2 ขวดเป็นขวดแก้วใส และ อีก 2 ขวดเป็นขวดแก้วสีชา วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.1.2 ทดสอบผลการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อรา *C. cladosporioides*

ผสมสารผสมที่ใช้ทดสอบกับอาหาร PDA แล้วดำเนินตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 1.3 1.4 และ 1.5 โดยใช้เชื้อ *C. cladosporioides* เป็นเชื้อทดสอบ

2.1.3 ทำการตรวจสอบเดือนละครั้งเป็นเวลา 6 เดือน

2.2 อุณหภูมิต่ออายุการเก็บสาร

2.2.1 เตรียมสารผสม ยูจินอล 0.06 % กับสารภี 0.15 % และสารผสมยูจินอล 0.06 % กับหนอนตายหยาก 0.15 % โดย 95 % Ethanol 8 % และ Tween 80 0.2 % เป็นตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำละลาย ส่วน Control ประกอบด้วย 95 % Ethanol 8 % และTween 80 0.2 % ทำการเตรียมทุกสารผสมทดสอบอย่างละ 6 ขวด ใส่ในขวดแก้วสีชา โดย 2 ขวดตั้งไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น (4 – 8 $^{\circ}$ C) 2 ขวดตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ 2 ขวดตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 45 $^{\circ}$ C

2.2.2 ทดสอบผลการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อรา *C. cladosporioides* ผสมสารผสมที่ใช้ทดสอบกับอาหาร PDA แล้วดำเนินตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 1.3 1.4 และ 1.5 โดยใช้เชื้อ *C. cladosporioides* เป็นเชื้อทดสอบ

2.2.3 ทำการตรวจสอบเดือนละครั้งเป็นเวลา 6 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved