บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. เชื้อราที่ศึกษา

1.1 เชื้อราแมลง *H. scutata* จำนวน 31 isolates เก็บรวบรวมตัวอย่างจากป่าพรุสิรินธร อำเภอสุไหงโกลก จังหวัดนราธิวาส เมื่อวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2545

1.2 เชื้อราแมลง *H. scutata* จำนวน 3 isolates (SSC18, SSC47 และ SSC55) เป็นเชื้อราบริสุทธิ์ที่ทำการแยกไว้แล้วโดย Srichan (2003) จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างรา *H. scutata* จากป่าพรุสิรินธร อำเภอสุไหงโกลก จังหวัดนราธิวาส

2. จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ

2.1 แบคทีเรีย

2.1.1 แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่

- *Staphylococcus aureus* ATCC25923
- Methicillin-resistant *S. aureus* SK1 (MRSA)

2.1.2 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่

- *Escherichia coli* ATCC25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

2.2 เชื้อรา

2.2.1 Filamentous fungi ได้แก่

- *Microsporum gypseum*
- *Penicillium marneffei*
- *Aspergillus flavus*

- *Aspergillus niger*
- *Rhizopus* sp.
- *Mucor* sp.
- *Cladosporium* sp.
- *Alternaria* sp.
- *Curvularia* sp.

2.2.2 ยีสต์ ได้แก่

- *Candida albicans* NCPF3153
- *Cryptococcus neoformans* PSU

ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อที่ใช้ในการทดสอบจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

- potato dextrose agar (PDA, Difco)
- potato dextrose agar (PDA, วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก)
- potato dextrose agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ (PDA ที่ผสมยาปฏิชีวนะ, วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก)
- potato dextrose broth (PDB, วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก)
- pumpkin dextrose agar (PuDA, วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก)
- glucose yeast extract agar (GYA, วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก)
- sweet potato dextrose broth (SPDB, วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก)
- Sabouraud' s dextrose agar (SDA, Merck)
- Sabouraud' s dextrose broth (SDB, Merck)
- agar granulated (BBL)
- Czapek-dox broth (CDB, Difco)

- minimum salt medium (MSM, วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก)
- Mueller Hinton agar (MHA, Difco)
- yeast extract (Difco)
- PDB+Chitin (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก)

4. สารเคมี (analytical grade)

- 100% ethanol (LAB-SCAN)
- 95% ethanol (LAB-SCAN)
- methanol (LAB-SCAN)
- ethyl acetate (LAB-SCAN)
- butanol (CARLO ERBA)
- dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)
- sodium chloride (Merck)
- liquid nitrogen
- 2.5% glutaraldehyde
- 0.1M phosphate buffer pH 7.3
- 1% OsO_4
- glucose (Fluka)

5. ยาต้านจุลินทรีย์

5.1 แผ่นยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน

- vancomycin (Va, Difco) 30 ไมโครกรัม
- amikacin (Ak, Oxoid) 30 ไมโครกรัม
- gentamicin (Gen, Oxoid) 10 ไมโครกรัม
- ampicillin (Am, BBL) 10 ไมโครกรัม
- tetracycline (Tet, BBL) 30 ไมโครกรัม

5.2 ยาต้านแบคทีเรีย

- penicillin G (Sigma)
- streptomycin (Sigma)
- chloramphenicol (BBL)

5.3 ยาต้านเชื้อรา

- amphotericin B (Sigma) (10ไมโครกรัมต่อแผ่น, วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก)
- miconazole (Sigma)

6. อุปกรณ์

- ตู้บ่มเชื้อรา อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Sanyo)
- ตู้บ่มเชื้อแบคทีเรีย อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Gallenkamp)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow carbinet, Microflow)
- ตู้อบไอร้อน (hot air oven, Venticell)
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave, Tomy)
- ตู้เย็น (Sanyo)
- เครื่องระเหยแบบหมุนพร้อมลดความดัน (rotary evaporator, Buchi)
- Vacuum pump (Fisher Scientific)
- Stereozoom microscope (Olympus)
- Freeze dryer (Labconco)
- SAMDRAI (polaron CPD 7501 critical point drier)
- JSM-5800LV scanning electron microscope (SEM, JEOL)
- SPI-MODULE sputter coater
- เครื่องนับเซลล์ (hemacytometer, Boeco)
- เตาแม่เหล็ก (stirring heating plate)
- เครื่องชั่ง (balance, Diethelm)

- vortex mixer (Scientific)
- vernier caliper (0-150มิลลิเมตร)
- micropipette (Eppendorf Research)
- microtiter plate (Nunc) 96 well และ 24 well
- paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Schleicher & Schuell)
- millipore filter ที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร (Millipore Corporation)
- eppendorf tube
- water bath (Memmert)
- loop
- เครื่องบด
- สำลีป้ายเชื้อ
- เข็มเขี่ยเชื้อรา
- ปากคีบ
- กล่องพลาสติกสำหรับเลี้ยงไรสีน้ำตาล
- Glass bead

7. เครื่องแก้ว

- จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
- หลอดทดลอง
- สไลด์
- บีกเกอร์
- กระบอกตวง
- ขวดชมพู่
- ขวดดูแรน (Schott)
- ขวดก้นกลม

- ขวดแบน ขนาด 350 มิลลิลิตร
- กรวยแยก
- กรวยกรอง
- pasteur pipette

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *H. scutata* และการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

เชื้อรา *H. scutata* พบเป็นปรสิตของเพลี้ยหอย (scale insect) ที่มาเกาะอยู่ด้านบนของใบพืชในสกุล *Syzygium* ได้แก่ หว้าหิน (*S. tumida)* และหว้าน้ำ *(S. oblatum)* ซึ่งพบมากในป่าพรุสิรินธร อำเภอสุไหงโกลก จังหวัดนราธิวาส การเก็บตัวอย่างทำโดยเก็บใบไม้ที่มี stroma ของเชื้อรา *H. scutata* มาใส่ในถุงพลาสติกใสหรือกล่องพลาสติกใส แล้วจดบันทึกวันที่เก็บ ชนิดของต้นหว้า แหล่งหรือบริเวณที่พบเชื้อราชนิดนี้ เพื่อนำไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ

การแยกเชื้อรา *H. scutata* ให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ โดยแยกเชื้อจากสปอร์ที่ถูกปล่อยออกมาจาก stroma วิธีการคือนำใบไม้ที่มี stroma มาตัดหรืออาจใช้มีดแซะเอาส่วนของ stroma ออกจากใบไม้แล้วใช้วาสลีนยึดไว้กับฝา petri dish ครอบฝาไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ (streptomycin, chloramphenicol และ penicillin ความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ascospores จะถูกปล่อยออกมาบนอาหาร ตัดชิ้นวุ้นในบริเวณที่มีสปอร์ถูกปล่อยออกมาเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 2-4 สัปดาห์และต้องตรวจดูผลทุกวันเพื่อเฝ้าระวังการปนเปื้อนจากยีสต์และเชื้อราชนิดอื่นๆ นำเชื้อที่แยกได้ไปศึกษาต่อไป

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น (ดัดแปลงมาจาก Lorian, 1996)

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *H. scutata*

นำเชื้อราแมลง *H. scutata* ที่แยกได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 31 isolates และจากเชื้อราบริสุทธิ์ที่ทำการแยกไว้แล้วโดย Srichan (2003) จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างรา *H. scutata* จากป่าพรุสิรินธร อำเภอสุไหงโกลก จังหวัดนราธิวาสจำนวน 3 isolates เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใช้ที่เจาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6

มิลลิเมตร เจาะวุ้นรอบโคโลนีของเชื้อราแมลง นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

เชื้อที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC25923, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1, *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ทำการทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี agar diffusion

วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียจาก stock culture ที่เก็บไว้ในอาหาร nutrient agar (NA) slant มา streak บนอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วนำโคโลนีเดี่ยวๆ มา 2-3 โคโลนี ใส่ใน 0.85% NaCl ไร้เชื้อ และปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก)

วิธีการทดสอบ

ใช้ cotton swab ไร้เชื้อ จุ่มแบคทีเรียที่เตรียมไว้ บิดข้างหลอดพอหมาดๆ นำมาป้ายให้ทั่วบนอาหาร MHA โดยป้าย 3 แนวทำมุม 60 องศา จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่เจาะรอบโคโลนีรา *H. scutata* วางลงบนวุ้นอาหาร ใน 1 plate วางประมาณ 4 จุด โดยมีชุดควบคุมเป็นวุ้นอาหารไร้เชื้อและแผ่นยามาตรฐานที่เหมาะสมต่อเชื้อทดสอบ นำไปเพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 -18 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 2 ซ้ำ

S. aureus ATCC25923 ใช้แผ่นยามาตรฐาน vancomycin amikacin หรือ ampicillin

MRSA SK1 ใช้แผ่นยามาตรฐาน vancomycin

E. coli ATCC25922 ใช้แผ่นยามาตรฐาน ampicillin amikacin หรือ tetracycline

P. aeruginosa ATCC27853 ใช้แผ่นยามาตรฐาน tetracycline

การอ่านผล

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นด้วย vernier caliper

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์และรา

2.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์

เชื้อยีสต์ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* NCPF3153 และ *C. neoformans* PSU ทำการทดสอบแบบ agar diffusion เช่นเดียวกับการทดสอบแบคทีเรีย (ข้อ2.1)

วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เขี่ยเชื้อยีสต์จาก stock culture ที่เก็บไว้ในอาหาร Sabouraud's dextrose agar (SDA) slant มา streak บนอาหาร SDA plate ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. albicans* ส่วน *C. neoformans* บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 31-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำโคโลนีเดี่ยวๆ มา 2-3 โคโลนี ใส่ใน 0.85% NaCl ไร้เชื้อ และปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 2 McFarland standard (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก)

วิธีการทดสอบ

ใช้ cotton swab ไร้เชื้อ จุ่มเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ บิดข้างหลอดพอหมาดๆ นำมาป้ายให้ทั่วบนอาหาร SDA โดยป้าย 3 แนวทำมุม 60 องศา จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่เจาะรอบโคโลนีรา *H. scutata* (จากข้อ 2) วางลงบนวุ้นอาหาร ใน 1 plate วางประมาณ 4 จุด โดยมีชุดควบคุมเป็นวุ้นอาหารไร้เชื้อและยา amphotericin B (10 ไมโครกรัมต่อแผ่น disc) นำไปเพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. albicans* ส่วน *C. neoformans* บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 31-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 32-36 ชั่วโมง

การอ่านผล

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นด้วย vernier caliper

2.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดเส้นใย

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นต่อเชื้อ *M. gypseum, P. marneffei, A. flavus, A. niger, Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. โดยวิธี agar diffusion ดังนี้

วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เขี่ยเชื้อรา *M. gypseum* และ *P. marneffei* จาก stock culture มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยง *M. gypseum* เป็นเวลา 4 วัน *P. marneffei* เป็นเวลา 5 วัน และเลี้ยงเชื้อราอื่นๆ บนอาหาร PDA ให้มีขนาดโคโลนีประมาณ 1-2 เซนติเมตร

วิธีการทดสอบ

นำชิ้นวุ้นที่เจาะรอบโคโลนีรา *H. scutata* วางให้ห่างขอบโคโลนีราที่ทดสอบ 0.5 เซนติเมตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตผลที่เกิดขึ้นทุกวันเป็นเวลา 7 วัน ใช้วุ้นอาหารไร้เชื้อเป็นชุดควบคุม

การอ่านผล

สังเกตผลที่เกิดขึ้นหากสามารถยับยั้งเชื้อราได้สายราบริเวณที่อยู่ใกล้กับชิ้นวุ้นที่วางจะไม่เจริญหรือเจริญช้าลง เปรียบเทียบกับด้านที่ไม่ได้อยู่ใกล้ชิ้นวุ้นและชุดควบคุม

บันทึกผลดังนี้

- ไม่มีการยับยั้ง เชื้อราเจริญเลยชิ้นวุ้น
+ มีการยับยั้งเพียงเล็กน้อย
++ มีการยับยั้งเห็น inhibition zone ชัดเจน

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น ทำการคัดเลือกเชื้อราแมลง 4 isolates มาศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิต่อการเจริญต่อไป

3. การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา *H. scutata*

คัดเลือกเชื้อราที่มีศักยภาพในการต้านจุลินทรีย์ดีที่สุด 4 isolates นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิด ได้แก่ potato dextrose agar (PDA), PDA ที่เติม yeast extract 1 % (PDA+YE), pumpkin dextrose agar (PuDA), PuDA ที่เติม yeast extract 1 % (PuDA+YE), glucose yeast extract agar (GYA) และ sweet potato dextrose agar (SPDA) ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราทุกๆ สัปดาห์ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ นำผลการทดลองมาหาค่าเฉลี่ย

(mean) โดยใช้โปรแกรม SPSS เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี One-Way Anova และหาความแตกต่างของชุดการทดลองโดยใช้ Duncan's new multiple range test (DMRT) คัดเลือกอาหารที่ให้ผลต่อการเจริญของเชื้อดีที่สุดนำมาใช้ในการศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาต่อการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ในการศึกษาต่อไป

4. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *H. scutata*

4.1 สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *H. scutata* บนอาหารแข็ง

สังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *H. scutata* บริสุทธิ์ที่แยกได้ บนอาหาร PDA เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์

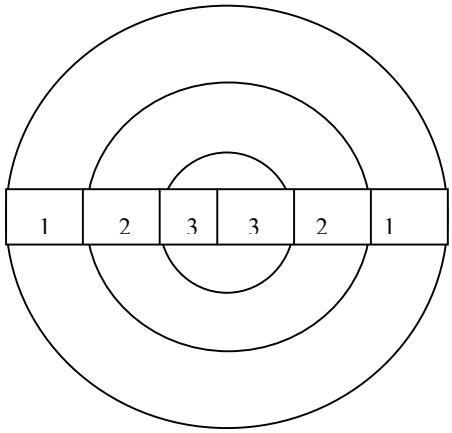
4.2 สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *H. scutata* จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิด ส่องกราด (SEM)

นำ stroma ของเชื้อรา *H. scutata* จากการเก็บตัวอย่างและโคโลนีเชื้อรา *H. scutata* ที่เลี้ยงไว้เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหาร PDA ที่ให้ผลการเจริญดีที่สุด นำมาเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด

นำโคโลนีเชื้อรามาตัดเป็น 3 ตำแหน่งจากเส้นผ่านศูนย์กลาง แต่ละตำแหน่งมี 3 ซ้ำ (ภาพที่ 3) และ stroma บนใบไม้ที่ตัดตามแนวตั้ง มาทำ primary fixation โดยแช่ใน 2.5% glutaraldehyde 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างชิ้นตัวอย่างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.3 จำนวน 3 ครั้งๆละ 5 นาที นำมาทำ post fixation โดยแช่ใน 1% OsO_4 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.3 จำนวน 2 ครั้งๆละ 10 นาที แล้วทำการ dehydration ใน ethanol 50%, 70%, 80% และ 90 % อย่างละ 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และใน ethanol 100% จำนวน 2 ครั้งๆละ 30 นาที

นำตัวอย่างเชื้อราที่ได้เข้าเครื่อง SAMDRAI (Polaron CPD7501 Critical point drier) ทำให้ตัวอย่างแห้งสนิท จากนั้นนำตัวอย่างเชื้อราติดบนแท่งทองเหลือง นำไปเคลือบด้วยทอง โดยวิธี ion sputter ด้วยเครื่อง SPI-MODULE Sputter Coater

นำตัวอย่างเชื้อที่เตรียมเสร็จไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (JSM-5800 LV Scanning electron microscope) ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ภาพที่ 3 การตัดโคโลนีรา 3 ตำแหน่ง สำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด

Figure 3 Diagram showing 3 cutting positions of *H. scutata* colony for SEM study

5. การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาในการเลี้ยงต่อการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อรา *H. scutata*

เลี้ยงเชื้อรา *H. scutata* ในอาหารที่ให้ผลการเจริญของเชื้อรา *H. scutata* ดีที่สุด 1 ชนิด จากการทดลองในข้อ 3 โดยเตรียมเป็นอาหารเหลว และอาหาร PDB ที่ผสมเปลือกกุ้ง 1% (PDB+chitin 1 %), minimum salt medium (MSM) และ Czapek-dox broth (CDB) โดยเตรียมอาหาร 50 มิลลิลิตร ในขวดชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมกับการเจริญ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทุกๆ 4 สัปดาห์จะดูด broth มา 2 มิลลิลิตร นำมาทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ผลการยับยั้งจากการทดสอบเบื้องต้น ด้วยวิธี agar diffusion และเมื่อครบ 8 และ 12 สัปดาห์ นำเชื้อที่เลี้ยงไว้มาหาน้ำหนักแห้ง

6. การเลี้ยงเชื้อรา *H. scutata* เพื่อนำมาสกัดสารและการสกัดสาร (ภาพที่ 4)

การเลี้ยงเชื้อรา

นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่ผ่านการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการสร้างสารต้านจุลินทรีย์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (จากผลการทดลองในข้อ 4) จากนั้นนำมากรองแยกส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate, CF) และส่วนมวลชีวภาพ (biomass, Bm) ออกจากกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปสกัด

การสกัดสารจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่แช่แข็งไว้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ละลาย และสกัดด้วยเอธิลอะซิเตท (ethyl acetate, EtOAc) โดยใช้กรวยแยก แล้วไขส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดต่อจนครบ 4 ครั้ง รวมสารสกัดชั้นเอธิลอะซิเตทที่ได้ในแต่ละครั้ง และนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่เหลือไปสกัดต่อด้วย บิวธานอล (n-butanol, BuOH) อีก 4 ครั้ง ด้วยวิธีการเดียวกัน ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดแต่ละครั้งประมาณ 1/3 ของปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำส่วนสกัดทั้ง 2 ส่วนไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนพร้อมลดความดัน (rotary evaporator) ชั่งน้ำหนักส่วนสกัดหยาบที่ได้และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อหลังการสกัด (after extraction, AE) และที่ไม่ผ่านการสกัด (non extraction, NE) นำมาทำให้แห้ง (freeze drying, FD) แล้วชั่งน้ำหนักของของแข็งที่ได้และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเช่นกัน

การสกัดสารจากส่วนมวลชีวภาพ

นำส่วนมวลชีวภาพมาทำให้เซลล์แตก โดยการแช่ในไนโตรเจนเหลวแล้วบดในครก จากนั้นนำไปสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทและเมธานอล ตามลำดับ โดยนำเซลล์แช่ในตัวทำละลายนานประมาณ 15 นาที แล้วจึงกรองแยกส่วนตัวทำละลายออกมา ทำเช่นนี้จนส่วนตัวทำละลายที่แยกออกมาไม่มีสี จากนั้นนำสารละลายที่ได้แต่ละชนิดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนพร้อมลดความดัน ชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. การทดสอบฤทธิ์ของสารที่สกัดได้จากเชื้อรา *H.scutata* SSC18 และ P36

7. 1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดเส้นใยของสารสกัดโดยวิธี disc diffussion

วิธีการเตรียมเชื้อราที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อรา *M. gypseum* บนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ส่วนเชื้อราอื่นๆ เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน (จนได้ขนาดโคโลนีประมาณ 1 เซนติเมตร)

วิธีการเตรียมสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ละลายสารสกัดใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปทดสอบ sterility โดยนำสารสกัดไป streak บนอาหาร NA บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ้าสารสกัดมีเชื้อปนเปื้อนนำไปกรองโดยใช้แผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ที่ทนต่อ DMSO

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

นำแผ่น disc ที่หยดสารสกัดแล้ว 10 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อแผ่น) วางห่างจากปลายเส้นใย (บริเวณขอบโคโลนี) 0.5 เซนติเมตร วางแผ่น disc 4 แผ่นต่อเชื้อรา 1 plate โดยใช้แผ่น disc ที่หยด DMSO เป็นชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สังเกตผลทุกวัน ทำการทดสอบ 2 ซ้ำ

การอ่านผล

สังเกตการยับยั้งเชื้อ โดยเชื้อจะไม่สามารถเจริญเติบโตชิดขอบแผ่น disc เปรียบเทียบกับชุดควบคุม บันทึกผลดังนี้

- ไม่มีการยับยั้ง
+ มีการยับยั้งเพียงเล็กน้อย
++ มีการยับยั้งเห็น inhibition zone ชัดเจน

7.2 การทดสอบหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัด ต่อเชื้อราชนิดเส้นใย โดยวิธี broth microdilution (ดัดแปลงจาก NCCLS, 1997)

วิธีการเตรียม Conidial suspension

เลี้ยงเชื้อรา *M. gypseum* บนอาหาร SDA เป็นเวลา 20 วัน และเลี้ยงเชื้อราอื่นๆ บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่ glass bead ไร้เชื้อลงไป 10-15 เม็ด และกลิ้ง glass bead ไปมาบนโคโลนีของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงไว้ จนเส้นใยแบนราบ ใส่น้ำกลั่นไร้เชื้อ 5 มิลลิลิตร และใช้ pasteur pipette ไร้เชื้อดูดน้ำกลั่นขึ้นลงบนโคโลนีของเชื้อ นำ conidial suspension ที่ได้มานับจำนวนโคนิเดีย (สำหรับ *M. gypseum* นับเฉพาะชนิด macroconidia) ด้วย hemacytometer แล้วปรับความเข้มข้นของโคนิเดียให้เป็น 4×10^3 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

วิธีการเตรียมยาที่ใช้ในการทดสอบ

ละลายยา miconazole ใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 3,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางยาในอาหาร SDB และ PDB ให้ได้ความเข้มข้น 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางยาแบบลำดับสองในอาหาร SDB และ PDB จำนวน 10 ความเข้มข้น โดยมีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นสุดท้ายของยาในการทดสอบเป็น 2 เท่า (ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 32-0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

วิธีการเตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

ละลายสารสกัดใน DMSO แล้วเจือจางสารสกัดแบบลำดับสองในอาหาร SDB และ PDB ให้ได้สารสกัด 10 ความเข้มข้น (1,024–2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งมีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในการทดสอบเป็น 2 เท่า (ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 512–1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

วิธีการทดสอบเพื่อหาค่า MIC (แผนภาพ 96 well microtiter plate แสดงใน ภาคผนวก)

ผสมยาหรือสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:1) ใน 96 well microtiter plate ไร้เชื้อ สำหรับหลุมที่ 11 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว เพื่อตรวจสภาวะไร้เชื้อ และหลุมที่ 12 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

และเชื้อเพื่อเป็น growth control นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สำหรับ *M. gypseum* และ 3 วันสำหรับเชื้อราอื่นๆ ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

การอ่านผล

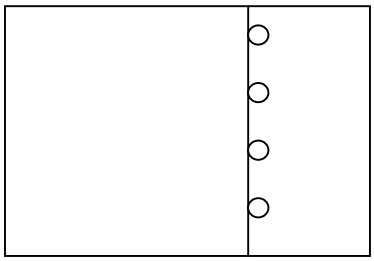
ค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 80% เมื่อเปรียบเทียบกับ growth control ซึ่งอ่านผลโดยสังเกตความขุ่นและตรวจดูเส้นใยรา ด้วยกล้องสเตอริโอซูม

7.3 การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นต่อเซลล์ไรสีน้ำตาล Brine shrimp cytotoxicity test ของสารสกัด (Solis *et al*., 1993)

วิธีฟักและเพาะเลี้ยงไรสีน้ำตาล (*Artemia salina)*

เตรียมน้ำทะเลเทียม โดยชั่ง NaCl 38 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรอง โดยใช้เครื่องดูดสูญญากาศ ใส่ภาชนะปิดป้องกันฝุ่น

เติมน้ำทะเลเทียม ลงในกล่องพลาสติกสำหรับเพาะเลี้ยง *A. salina* ที่มีที่กั้นแบ่งเป็น 2 ส่วน เจาะรูที่กั้น (ดังภาพที่ 5)



(A) (B)

ภาพที่ 5 กล่องพลาสติกสำหรับเพาะเลี้ยง *A. salina* (A) ด้านที่ใส่ cyst, (B) ด้านที่ตัวอ่อนว่ายน้ำผ่านรูออกมา

Figure 5 Plastic box for *A. salina* culture. (A) Cyst inoculating chamber, (B) Nauplii chamber

โรยผง *A. salina* cyst ประมาณครึ่งช้อนชาลงในน้ำเฉพาะช่องด้าน (A) แล้วปิดด้วยแผ่น foil เพื่อให้มืดทึบที่ด้าน (A) คลุมทั้งกล่องพลาสติกด้วยผ้าขาวบาง เปิดไฟ

(หลอด day light 25 watt) ให้แสงสว่างด้าน (B) ให้ระยะห่าง 30 เซนติเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส *A. salina* cyst ที่ฟักออกเป็นตัวอ่อน (nauplii) ระยะที่ 1 จะว่ายน้ำผ่านรูมาด้านที่มีแสงสว่าง นำมาใช้ในการทดสอบ โดยใช้ไมโคร ปิเปตดูดตัวอ่อน *A. salina*

วิธีการเตรียมสารสกัด

ชั่งสารสกัด 4 มิลลิกรัม ละลายใน DMSO 80 ไมโครลิตร เติมน้ำทะเลเทียม 3,120 ไมโครลิตร ได้เป็นสารละลายที่ 1 ดูดสารละลายที่ 1 400 ไมโครลิตรเจือจางด้วยน้ำทะเลเทียม 3,600 ไมโครลิตร ได้เป็นสารละลายที่ 2 ดูดสารละลายที่ 2 400 ไมโครลิตรเจือจางด้วยน้ำทะเลเทียม 3,600 ไมโครลิตร ได้เป็นสารละลายที่ 3

วิธีการทดสอบ (แผนภาพ 24 well microtiter plate แสดงในภาคผนวก)

ดูดตัวอ่อน *A. salina* 10 ตัวในน้ำทะเลเทียม 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 24 well microtiter plate จนครบทุกหลุม จากนั้นดูดสารละลายแต่ละสารปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลุม ทดสอบความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายที่ 1, 2 และ 3 คือ 1,000, 100 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ชุดควบคุมใช้ DMSO 80 ไมโครลิตรผสมน้ำทะเลเทียม 3,120 ไมโครลิตร แล้วจึงนำ plate มาปิดฝา ส่องไฟ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส

การอ่านผล

ตรวจนับจำนวนตัวไรที่ตายเมื่อครบเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ด้วยกล้องสเตอริโอซูมนำผลไปคำนวณหา LC_{50} โดยใช้โปรแกรม Probit Analysis

การวิเคราะห์ผล

คำนวณค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงโดยใช้โปรแกรม Probit Analysis

ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด แบ่งได้ 3 ระดับ ดังนี้ (กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ, 2544)

1. สารสกัดที่มีฤทธิ์ในระดับสูง (High activity) จะมีค่า $LC_{50} < 10$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. สารสกัดที่มีฤทธิ์ในระดับปานกลาง (Medium activity) จะมีค่า $LC_{50} < 100$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดที่มีฤทธิ์ในระดับต่ำ (Low activity) จะมีค่า $LC_{50} < 1000$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร