บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

หลอด EYE GTOT8 10 Watt มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร เป็นแหล่งกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต-ซี

Color Reader รุ่น CR-10	ของบริษัท MINOLTA
กล้องจุลทรรศน์รุ่น CO 1	ของบริษัท Olympus
หม้อนึ่งความดันไอ	
ฐานเคลือบเพลต	
เครื่องบดปั่น	ของบริษัท National
Haemacytometer	ของบริษัท Clay-Adams
เครื่องระเหยความดันต่ำ รุ่นCA-1111	ของบริษัท EYELA
ชุดเครื่องแก้วกลั่นไอ	
ตู้อบลมร้อน รุ่น D 06061 Model 500	ของบริษัท MEMMERT
ตู้ดูดควัน รุ่น Chemfert 120-s	ของบริษัท FASTER
เครื่องชั่ง digital 210 g (4 ตำแหน่ง)	ของบริษัท OHAUS
เครื่องชั่ง digital 410 g (2 ตำแหน่ง)	ของบริษัท OHAUS
Hygrometer (Wet-dry thermometer)	
Micro pipette	

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ตัวทำละลายที่ใช้

อะซีโตน (acetone)	ของบริษัท Merck (commercial grade)
เอทธานอล (ethanol)	ของบริษัท Merck (commercial grade)
เมธานอล (methanol)	ของบริษัท Merck (commercial grade)
เอทธิลอะซีเตท (ethyl acetate)	ของบริษัท Merck (commercial grade)
เฮกเซน (hexane)	ของบริษัท Merck (proanalysis)
ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)	ของบริษัท Merck (commercial grade)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวทำละลายทุกตัวได้นำมากลั่นโดยชุดเครื่องแก้วกลั่นไอ เพื่อให้สารมีความบริสุทธิ์ก่อนการใช้ทดลองเสมอ

สารเคมีที่ใช้

สารละลาย lactic acid	ของบริษัท Fluka
tween-20	ของบริษัท Merck
ซิลิกาเจล G60	ของบริษัท Merck
แมกนีเซียมซัลเฟต	ของบริษัท Merck
lactophenol cotton blue	
อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)	
อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)	
อาหารเลี้ยงเชื้อ Meat Extract Agar (MEA)	

วัสดุพันธุ์พืชที่นำมาใช้ในการทดลอง

ผลส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้ง และส้มสีทอง ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-6 เซนติเมตร น้ำหนักเท่ากับ 90-120 กรัม มาจากแหล่งปลูกใน อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ ในเดือนพฤษภาคม ถึง มิถุนายน 2546

เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

Penicillium sp. ที่แยกได้จากผลส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้งที่มีอาการของโรคราเขียว

Cladosporium sp. ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณ พิชญาภรณ์ สุวรรณกูฏ จากผลลำไยพันธุ์ดอ ที่เป็นโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยว

การทดลองที่ 1 เวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ไม่ทำให้ผิวส้มเขียวหวาน

ตอนที่ 1.1 หาเวลาการฉายแสงที่ไม่ทำให้ผิวส้มไหม้

นำผลพันธุ์ส้มสายน้ำผึ้งและสีทองที่มีสีผิวสม่ำเสมอและสมบูรณ์ มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำเปล่าโดยใช้ฟองน้ำขัดเบาๆ ที่ผิวส้ม ผึ่งลมให้แห้ง 1 คืน มาฉายแสงด้วยหลอดอัลตราไวโอเลต โดยใช้หลอด EYE GTOT8 10 Watt มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 cm และมีความยาวของหลอด 30 cm จำนวน 4 หลอดเป็นแหล่งกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต โดยทดลองดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1 จัดให้ผิวผลส้มเขียวหวานห่างจากหลอดอัลตราไวโอเลต-ซี เท่ากับ 6 และ12 เซนติเมตร ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี เป็นเวลาตั้งแต่ 0 ,1, 2, 3, 4, 5 และ 6 นาที ซึ่งมีค่าพลังงานเท่ากับ 1.602 , 3.204, 4.806, 6.408, 8.010 และ 9.612 kJ. m^{-2} ตามลำดับ ซึ่งสามารถคำนวณได้จาก

ค่าพลังงานเฉลี่ยจากเครื่องวัดแสงอัลตราไวโอเลต-ซี ที่ระยะห่าง 12 เซนติเมตร

$= 2.67$ mW.cm^{-2}

การเปลี่ยนหน่วยจาก mW. cm^{-2} เป็น kJ. m^{-2}

เปลี่ยนหน่วยจาก mW ให้เป็น W

โดย 1/1000 X 2.67 W. cm^{-2} = 2.67 /1000 W. cm^{-2}

เปลี่ยนหน่วย cm^2 เป็น m^2

โดย 1/10000 เข้าไปหาร 2.67 /1000 = 26.7 W. m^{-2}

เอาเวลาที่ฉายแสงเข้าไปคูณค่า 26.7 W. m^{-2} ที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 1 นาที

โดย 1X 60 = 60 วินาที

ดังนั้นจะได้ = 26.7 X 60 W.s.m^{-2}

$= 1602 = 1.602 \times 10^3$ W.s.m^{-2}

เปลี่ยนเป็น J.m^{-2} เมื่อ W = J.s

ค่าพลังงานเท่ากับ $= 1.602 \times 10^3$ J.s.s^{-1}.m^{-2}

$= 1.602$ kJ.m^{-2}

ใช้ส้มเขียวหวาน 20 ผลต่อกรรมวิธี

1.2 นำผลส้มที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี แล้วเรียงใส่ตะกร้าโปร่ง ตะกร้าละ 20 ผล ไปไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90±5 เปอร์เซ็นต์ แล้วประเมินความเสียหายด้วยการมองเห็น (เปอร์เซ็นต์ผลส้มที่แสดงอาการไหม้) และวัดสีผิวส้มโดยเครื่องวัดสี (Color Reader) ของบริษัท Minolta และใช้แหล่งกำเนิดแสง D65 ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L*, a* และ b* โดยมีรายละเอียดดังนี้ คือ

ค่า L* = The lightness factor (value)

a*, b* = The chromaticity coordinates (hue, chroma)

C* = Chroma ($C^* = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$)

h° = Hue angle (h° = arctangent b*/a*)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อ L* มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หมายถึงวัตถุมีสีคล้ำ หากค่าเข้าใกล้ 100 แสดงว่าวัตถุมีความสว่าง

a* มีค่าเป็นบวก หมายถึงวัตถุมีสีแดง หากมีค่าเป็นลบหมายถึงวัตถุมีสีเขียว โดยค่า a* มีค่า –60 ถึง +60

b* มีค่าเป็นบวก หมายถึงวัตถุมีสีเหลือง หากมีค่าเป็นลบหมายถึงวัตถุมีสีน้ำเงิน โดยค่า b* มีค่า –60 ถึง +60 หากทั้ง a* และ b* มีค่าเท่ากับศูนย์ หมายถึงวัตถุมีสีเทา

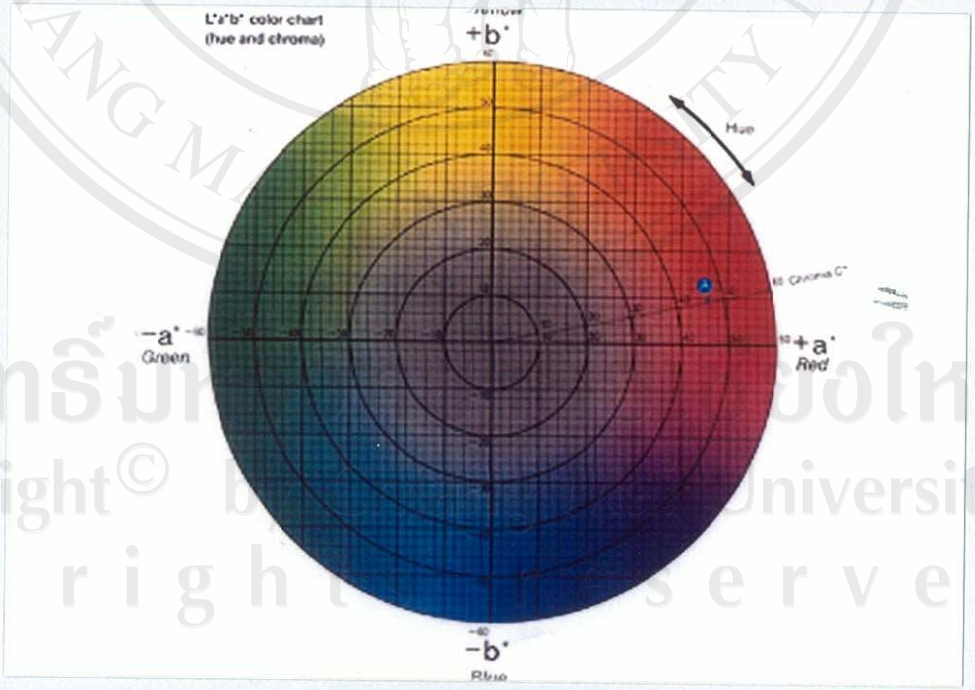
C* มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หมายถึงวัตถุมีสีซีดจาง หากมีค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึงวัตถุมีสีเข้ม

h° มีค่าเข้าใกล้มุม 90 องศา หมายถึงสีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเหลือง (+b) หากมีค่าเข้าใกล้ 180 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเขียว

นำค่าที่ได้มาเทียบกับแผ่นภาพของสี (ภาพที่ 4) เพื่อวิเคราะห์และอภิปรายผลการทดลอง

1.3 บันทึกผลการทดลองทุก 2 วัน เป็นเวลา 12 วัน

1.4 ประเมินความเสียหายด้วยการมองเห็น (เปอร์เซ็นต์ผลส้มที่แสดงอาการไหม้) ในวันที่ 12 ของการเก็บรักษา



ภาพ 4 แผนภาพของสีเพื่อแสดงค่า a*, b*, C* และ Hue angle

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 1.2 ใช้อุณหภูมิต่ำเพื่อลดอาการไหม้ของผิวผลส้ม

1.2.1 ทำการทดลองเหมือนตอนที่ 1.1 แต่ภายหลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี ที่ระยะห่างของหลอดถึงผิวส้มเท่ากับ 12 เซนติเมตรที่ระยะเวลาต่างๆ ซึ่งใช้ผลส้ม 20 ผลต่อกรรมวิธี โดย 10 ผลวางที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และอีก 10 ผล นำไปวางที่อุณหภูมิ 7±2 องศาเซลเซียส ทันที 30 นาทีแล้ว จัดเรียงใส่ตะกร้าโปร่ง แล้วจึงนำไปวางที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

1.2.2 ประเมินความเสียหายด้วยการมองเห็น (เปอร์เซ็นต์ผลส้มที่แสดงอาการไหม้) ในวันที่ 12 ของการเก็บรักษา

การทดลองที่ 2 ผลของการฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี ต่อการเจริญของราเขียวในจานเพาะเชื้อ

ตอนที่ 2.1 การเจริญของเส้นใยราเขียว

นำเส้นใยระยะเจริญของเชื้อรา *Penicillium* sp. มาเพาะบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Meat Extract Agar (MEA) ด้วยวิธี point inoculation แล้วนำไปบ่มที่ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ทำความสะอาดตู้อบแสงอัลตราไวโอเลต-ซี ก่อนฉายแสง โดยฉีดพ่นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ให้ทั่วทั้งตู้ เช็ดให้สะอาดแล้วเปิดแสงอัลตราไวโอเลต-ซี เพื่อฆ่าเชื้อเป็นเวลานาน 30 นาที ก่อนทดลอง โดยใช้เทคนิค aseptic technique เมื่อจับจานอาหาร เปิดฝาจานอาหาร แล้วฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี ที่ระยะห่าง 12 เซนติเมตร ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 นาที แล้วปิดฝาจานอาหาร ซึ่งใช้จานอาหารทั้งหมด 12 จาน ต่อกรรมวิธี โดย 6 จานเก็บเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และอีก 6 จาน วางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 7±2 องศาเซลเซียส ทันทีนาน 30 นาที โดยวางแผ่เพื่อให้ทุกจานอาหารได้รับอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกัน เก็บจานอาหารในลักษณะหงายจานอาหารลงในถุงพลาสติกใสแล้วปิดปากถุง แล้วจึงนำไปวางในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลาง colony ทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน

ตอนที่ 2.2 การงอกของสปอร์ราเขียว

2.2.1 การเตรียมสไลด์สำหรับเลี้ยงเชื้อ

เตรียม Petri dish ที่มีสไลด์วางบนกระดาษชื้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่ง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เทอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) จำนวน 5 มิลลิลิตรลงบน Petri dish ที่อบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 171 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้แข็ง แล้วตัดให้เป็นสี่เหลี่ยม ขนาด 1.5X1.5 เซนติเมตร แล้วนำมาวางบนสไลด์ ที่เตรียมไว้แล้ว 2 ตำแหน่ง หัวและท้ายของ สไลด์ เป็นจำนวน 14 สไลด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2. เตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราเขียว (*Penicillium* sp.)

เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีเชื้อราเขียวให้มีอายุ 5-7 วัน ใช้ loop เขี่ยเชื้อราเขียวเพื่อให้สปอร์กระจายตัว กรองผ่านผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้วเพื่อเอาเส้นใยและเศษวุ้นออก เติม Tween 20 1 หยดเพื่อให้สปอร์เชื้อรากระจายตัวได้ดีขึ้น เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปนับ สปอร์ให้ได้ 1 X 10^6 สปอร์/ มิลลิลิตร โดยใช้ haemacytometer

2.2.3. ทดสอบกับแสงอัลตราไวโอเลต-ซี

หยดสารแขวนลอยเชื้อราที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.2 ลงบนชิ้นวุ้น PDA บนสไลด์ที่เตรียมไว้แล้ว 10 ไมโครลิตร เปิดฝา Petri dish แล้วฉายแสง อัลตราไวโอเลต-ซี ที่ระยะห่างจากหลอด 12 เซนติเมตร ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ6 นาที แล้วปิดฝา Petri dish ใช้ สไลด์ทั้งหมด 2 สไลด์ ต่อกรรมวิธี โดย 1 สไลด์วางไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และอีก 1 สไลด์วางไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 7±2 องศาเซลเซียส ทันทีนาน 30 นาที โดยวางแผ่เพื่อให้ทุกจานอาหารได้รับอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกัน เก็บสไลด์ในลักษณะหงายจานอาหารลงในถุงพลาสติกใสปิดปากถุง แล้วจึงนำไปวางในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราเขียว เมื่อครบ 36 ชั่วโมง โดยนำสไลด์มาหยด lactophenol cotton blue ลงบนชิ้นวุ้น 1 หยด แล้วปิด cover glass นำไปตรวจดูการงอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X ซึ่งสปอร์ที่งอกนั้นจะมีความยาวของ germ tube มากกว่าความยาวของสปอร์ (ชิ้นวุ้น 1 ชิ้นตรวจนับสปอร์ 6 ตำแหน่ง)

การทดลองที่ 3 การเจริญของราเขียวบนผลส้มเขียวหวาน

นำผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งและสีทองที่มีสีผิวสม่ำเสมอและสมบูรณ์ ล้างให้ด้วยสะอาดเหมือนการทดลองที่ 1 แล้วนำ มาฉายแสงด้วยหลอดอัลตราไวโอเลต-ซี ยี่ห้อ รุ่นและความเข้มแสงเช่นเดียวกันกับที่ใช้ในการทดลองที่ 1 โดยทำการทดลองดังนี้

ตอนที่ 3.1 การคัดเลือกช่วงเวลาของการฉายแสง อัลตราไวโอเลต-ซีและช่วงเวลาการเก็บหลังจากฉายแสงก่อนปลูกเชื้อ ที่เหมาะต่อการควบคุมโรคราเขียว

3.1.1 จัดให้ผิวผลส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้งห่างจากหลอดอัลตราไวโอเลต-ซี 12 เซนติเมตร ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี เป็นเวลาตั้งแต่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ6 นาที ใช้ส้มเขียวหวาน 20 ผลต่อกรรมวิธี และ แต่ระยะเวลาที่ฉายแสงจะวางผลส้มเรียงในตะกร้าโปร่งเก็บในที่มืดเป็นระยะเวลา 0, 1 และ 2 วัน จากนั้นนำมาปลูกเชื้อราเขียว โดยใช้เข็มปลายแหลมแทงลงบนผิวส้มลึก 2 มิลลิเมตร วางกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้วบนตำแหน่งที่ทำแผล แล้วหยดสารแขวนลอย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ของสปอร์ที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.2.2 จำนวน 20 ไมโครลิตรเก็บเรียงลงตะกร้า ๆ 20 ผลแล้วบ่มไว้ในถุงควบคุมความชื้นนาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ เดียวกันกับการทดลองที่ 1

3.1.2 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่มีอาการของโรคราเขียวทุกๆวันเป็นเวลา 7 วัน

ตอนที่ 3.2 การคัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาผลส้มหลังจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี

3.2.1 เลือกเอาเวลาการฉายแสงและระยะเวลาที่เก็บไว้ในที่มืดก่อนปลูกเชื้อราเขียวที่มีอาการของโรคราเขียวน้อยที่สุดในทุกกรรมวิธีการทดลอง เพื่อทดลองต่อ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ปลูกเชื้อราเขียว

กรรมวิธีที่ 2 ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ไม่ปลูกเชื้อราเขียว

กรรมวิธีที่ 3 ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ปลูกเชื้อราเขียว

กรรมวิธีที่ 4 ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ไม่ปลูกเชื้อราเขียว

กรรมวิธีที่ 5 ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ปลูกเชื้อราเขียว + 7±2 องศาเซลเซียส 30 นาที

กรรมวิธีที่ 6 ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ไม่ปลูกเชื้อราเขียว + 7±2 องศาเซลเซียส 30 นาที

กรรมวิธีที่ 7 ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ปลูกเชื้อราเขียว + 7±2 องศาเซลเซียส 30 นาที

กรรมวิธีที่ 8 ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ไม่ปลูกเชื้อราเขียว + 7±2 องศาเซลเซียส 30 นาที

จากนั้นวางผลส้มทุกกรรมวิธีไว้ที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

3.2.2.วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอาการของโรคราเขียวทุกวัน

การทดลองที่ 4 ผลของการฉายแสง อัลตราไวโอเลต-ซี ต่อการผลิตสารต้านเชื้อราที่ผิวส้มเขียวหวาน

4.1 เก็บตัวอย่างเปลือกส้มเขียวหวาน

4.1.1 เลือกเวลาการฉายแสงและระยะเวลาที่เก็บไว้ในที่มืดก่อนปลูกเชื้อราเขียวที่ได้จากการทดลองที่ 3 มา ทดสอบกับผลส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้ง และสีทอง ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ปลูกเชื้อราเขียว

กรรมวิธีที่ 2 ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ไม่ปลูกเชื้อราเขียว

กรรมวิธีที่ 3 ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ปลูกเชื้อราเขียว

กรรมวิธีที่ 4 ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ไม่ปลูกเชื้อราเขียว

กรรมวิธีที่ 5 ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ปลูกเชื้อราเขียว + 7±2 องศาเซลเซียส 30 นาที

กรรมวิธีที่ 6 ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ไม่ปลูกเชื้อราเขียว + 7±2 องศาเซลเซียส 30 นาที

กรรมวิธีที่ 7 ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ปลูกเชื้อราเขียว + 7±2 องศาเซลเซียส 30 นาที

กรรมวิธีที่ 8 ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต-ซี+ ไม่ปลูกเชื้อราเขียว + 7±2 องศาเซลเซียส 30 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นวางผลส้มทุกกรรมวิธีไว้ที่ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

4.1.2 แล้วเก็บตัวอย่างเปลือกส้มเขียวหวานเฉพาะด้านที่ฉายแสง อัลตราไวโอเลต-ซี ในวันที่ 0, 3, 6 และ 9 วัน

4.2.สารสกัดหยาบจากเปลือกส้มเขียวหวาน

นำเปลือกส้มเขียวหวานที่เก็บได้จากข้อ 4.1.2 หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดปั่นแห้งไฟฟ้า ชั่งน้ำหนักให้ได้ 100 กรัม นำเปลือกส้มเขียวหวานใส่ flask ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม dichloromethane ปริมาณ 300 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วย foil แล้วปิดด้วยพาราฟิล์มอีกครั้งเพื่อไม่ให้ dichloromethane ระเหยออกไปมาก ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองกากเปลือกส้มออกโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บชั้น dichloromethane ไว้ ส่วนกากที่เหลือนำไปสกัดอีกครั้ง โดยทิ้งไว้อีก 24 ชั่วโมง กรองเอาชั้น dichloromethane ไว้แล้วนำไปผสมกับ dichloromethane ที่ได้ครั้งแรกเติมแมคนีเซียมซัลเฟต ลงใน dichloromethane เพื่อกำจัดน้ำออก ทิ้งให้ตกตะกอนก่อนกรองออก นำสารละลายที่ได้ไประเหยเอา dichloromethane ออกโดยใช้เครื่องระเหยความดันต่ำ (rotary evaporator) จะได้ส่วนของสารสกัดหยาบที่มีลักษณะข้นเหนียว ขูดเอาสารสกัดหยาบที่ได้ใส่ลงในขวดสารขนาดเล็ก ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการยับยั้งเชื้อ *Penicillium* sp.โดยวิธี paper disc technique ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์

เตรียมอาหาร PDA นำไปฆ่าเชื้อ แล้วอุ่นอาหารให้มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ดูดสารแขวนลอยเชื้อราลงบน Petri dish 1 มิลลิลิตร เทอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ หมุนจาน plate ให้อาหารและสารแขวนลอยเชื้อราให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเปลือกส้มที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดย ชั่งสารสกัดหยาบ 0.01 กรัม ใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ใช้ Micropipette 20 ไมโครลิตร เป็นตัวทำละลาย ตัดแผ่นกระดาษกรองเป็นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อ นำสารสกัดที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ หยดลงบนกระดาษกรองปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วรอให้สารละลายระเหยออกไปให้หมด หลังจากนั้นจึงนำไปวางบนจานอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ เก็บจานอาหาร ในลักษณะหงาย ลงในถุงพลาสติกใส ปิดปากถุง บ่มเชื้อไว้ที่ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จึงตรวจดูแถบยับยั้งที่เป็นวงใสรอบกระดาษกรอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบโดยวิธี TLC-bioassay (แน่งน้อย,2541)

4.4.1การเตรียมเชื้อรา *Penicillium* sp. และ *Cladosporium* sp.

เพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้มีอายุ 5-7 วัน

4.4.2 เตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา

เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีเชื้อราเขียว อายุ 5-7 วัน ใช้ loop เขี่ยเชื้อราเขียวเพื่อให้สปอร์กระจายตัว กรองผ่านผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้วเพื่อเอาเส้นใยและเศษวุ้นออก เติม Tween 20 จำนวน 1 หยดเพื่อให้สปอร์เชื้อรากระจายตัวได้ดีขึ้น เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปนับ สปอร์ให้ได้ $25X10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร โดยใช้ Haemacytometer แล้วใช้ pipette ดูดสารละลายมา 1 มิลลิลิตร นำไปนับสปอร์เชื้อราให้ได้ $1X10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร แล้วจึงนำอาหารเหลว PDB มาเจือจางสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อราต่อ PDB เท่ากับ 1 ต่อ 5

4.4.3.การเตรียมกล่องบ่มเชื้อ

ล้างกล่องพลาสติกที่ใช้เป็นกล่องบ่มเชื้อให้สะอาด เมื่อแห้งแล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอร์เพื่อฆ่าเชื้อ รอให้แห้งบุด้วยกระดาษชื้นที่ก้นกล่องและฝากล่อง แล้วพ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ทั่วแล้วปิดฝาไว้เพื่อให้ไอน้ำอิ่มตัว

4.4.4.การเตรียม TLC-plates สำหรับการแยกสาร

กระจกใสขนาด 5X20 เซนติเมตร มาวางบนฐานเคลือบ plate เช็ดด้วยอะซีโตนเพื่อขจัดคราบไขมันและสิ่งสกปรกอื่นๆ ล็อคฐานเคลือบ plate ให้แน่น ชั่ง ซิลิกาเจล (60GE-Merck) 60 กรัมกับน้ำ 120 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ปิดฝาด้วยจุกยางให้แน่นแล้วเขย่าให้เป็น suspension เทส่วนผสมที่ได้ใน applicator แล้วเลื่อนให้suspension ไหลบน plate ความหนา 1 มิลลิเมตร รอให้แห้งสนิท นำไปใส่ใน rack แล้วอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำมาใช้

4.4.6 การเตรียมตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Developing solvent)

ใช้ n-hexane : ethyl acetate : methanol = 60 : 40 : 1 (ศิริวรรณ, 2539)

4.4.7 เตรียม tank สำหรับTLC

ใส่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ใน tank ขนาด 9X12 นิ้ว ให้สูงประมาณ 1.5 เซนติเมตร ใส่กระดาษกรองไว้ด้านข้างของ tank ปิดฝาทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไอของตัวทำละลายเคลื่อนที่ อิ่มตัว

4.4.8 การจุดสารสกัดหยาบลงบนแผ่น TLC (ศิริวรรณ,2539)

นำสารสกัดหยาบละลายด้วย dichlorometane เล็กน้อย ใช้หลอดแคปิลารี หยดสารลงบนplate ให้ห่างจากขอบล่าง 2.5 เซนติเมตร เป็นจุด เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร รอให้ dichlorometane แห้งแล้วจุดสารทับอีกครั้ง ทิ้งไว้ให้สารละลายแห้งสนิท นำ plate ที่ได้ใส่ลงใน tank เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึง solvent front ซึ่งมีระยะทาง 15 เซนติเมตร จึงนำ plate ออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จาก tank เป่าลมร้อนเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยจนหมด แล้วทิ้งไว้ในตู้ควัน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้นนำสปอร์เชื้อราที่เตรียมไว้จากข้อ 5.1 มาฉีดพ่นลงบนplate ให้ชุ่มทั่วทั้งแผ่น แล้วนำมาใส่กล่องบ่มเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 4 บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบกำหนดจึงตรวจดูแถบสารต้านเชื้อรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved