

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 พืชที่ใช้ในการศึกษา

กล้วยไม้ตัวอย่างเก็บจากตำบลเชียงดาว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่

- 1) กล้วยไม้เอื้องคำ
- 2) กล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด
- 3) กล้วยไม้กะเหรกะร้อน

3.2 เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 เครื่องมือ

- 1) เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator), Buchi R-124, B-480, B-169, Switzerland
- 2) เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital weighing scales), Sartorius BSA224S-CW, Germany
- 3) เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (Microplate Reader), SPECTRO star Nano, BMG Labtech, Germany
- 4) เครื่องปั่น (Blender), MX-337N, Matsushita Electronic Industrial, Malaysia
- 5) เครื่องให้ความร้อน (Hot plate), Kendo Electric, Thailand
- 6) เครื่องดูดจ่ายสารละลายแบบทางเดียว (Single Channel Pipette), Pipetman G P100G, Gilson, USA
- 7) หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) TOMY, USA.
- 8) ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Incubator) CONTHERM DIGITAL SERIES,
- 9) ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubator) N-BIOTEK,
- 10) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) MEMMERT,
- 11) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer) SHIMADZU,
- 12) เครื่องบดตัวอย่าง (Cyclone mill) RETSCH,
- 11) เครื่องวัดพีเอช (pH-meter) METROHM,

3.2.2 วัสดุ-อุปกรณ์

- 1) ขวดบรรจุสาร (Laboratory Bottle)
- 2) ขวดระเหย (Evaporating Flask)
- 3) ปีกเกอร์ (Beaker)
- 4) กระบอกตวง (Graduated cylinder)
- 5) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 6) กรวยกรอง (Glass funnel)
- 7) ขวดปริมาตร (Volumetric flask)
- 8) หลอดทดลอง (Test tube)
- 9) หลอดหยด (Dropper)
- 10) หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube)
- 11) ไมโครเวลเพลท (Microwellplate)
- 12) ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
- 13) แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)
- 14) เอฟเพนดอร์ฟ (Eppendorf)
- 15) อลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum foil)
- 16) สำลี (cotton wool)
- 17) กรวยกรองแก้ว (Glass funnel)
- 18) คิวเวทท์ (Cuvette)
- 19) หัวถ่ายเชื้อ (Inoculating loop)
- 20) เข็มเขี่ยเชื้อ (Inoculating needle)
- 21) ฟิล์มใสถนอมอาหาร (Cling wrap)

3.2.3 สารเคมี

- 1) กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4), AR, Assay 96.5%, d 1.84 g/cm³, MW 98.08, J.T. Baker, USA
- 2) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric, HCl), AR, Assay 37.35%, d 1.18 g/cm³, MW 36.46, J.T. Baker, USA
- 3) กรดกลacialอะซิติก (Glacial acetic acid, CH_3COOH), AR, Assay 99.7%, D 1.049 g/cm³, MW 60.05, V.S. Chem house, Thailand
- 4) คลอโรฟอร์ม (Chloroform, CHCl_3), AR, Assay 99.7%, d 1.49 g/cm³, MW 119.8, V.S. Chem House, Thailand

- 5) แอมโมเนีย (Ammonia, NH_3), AR, Assay 29%, d 0.73 g/cm³, MW 35.05, J.T. Baker, USA
- 6) เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride, FeCl_3), AR, Assay 98%, MW 162.21, Ajax Finechem, Australia
- 7) กรดแกลลิก (Gallic acid, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$), AR, Assay 98.0%, MW 188.13, Sigma-aldrich, China
- 8) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3), AR, Assay 99.5%, MW 105.99 g/mol, Loba Chemie, India
- 9) เคอร์ซีติน (Quercetin, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$), ACS, Assay 95.0%, MW 302.24 g/mol, Sigma Aldrich, USA
- 10) อลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride, AlCl_3), AR, Assay 99.0%, MW 241.45, Loba Chemie, India
- 11) วิตามินซี (Ascorbic acid, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), AR, Assay 99.75%, MW 176.13, Chem-supply, Australia
- 12) ดีพีพีเอส (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), AR, Assay 85.0%, MW 394.32, Sigma-aldrich, Germany
- 13) เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride, FeCl_3), Assay 98.0%, MW 162.21 g/mol, Ajax Finechem, Australia
- 14) เมทานอล (Methanol, CH_3OH), AR, Assay 99.7%, d 0.7918 g/cm³, MW 32.04, V.S. Chem house, Thailand
- 15) เอทานอล (Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), AR, Assay 99.9%, d 0.789 g/cm³, MW 46.07, J.T. Baker, Malaysia
- 16) โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide, KI), AR, Assay 99.0%, MW 166, Ajax Finechem, Australia
- 17) บิสมัท ซับไนเตรต (Bismuth subnitrate, $\text{Bi}_5\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_{22}$), ACS Assay 98.0%, MW 485.07 g/mol, Aldrich, USA
- 18) ลวดแมกนีเซียม (Magnesium, Mg), MW 24.31, Labchem, Australia
- 19) ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide, DMSO), ACS Assay 99.9%, MW 78.13, Aldrich, USA
- 20) ยาปฏิชีวนะ (Tetracycline)
- 21) Nutrient agar (NA)

22) Nutrient broth (NB)

23) Mueller-Hinton agar (MHA)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมสารสกัดจากดอกกล้วยไม้

นำส่วนดอกของตัวอย่างกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด มาผึ่งลมในที่ร่มนาน 5-7 วัน จากนั้นนำตัวอย่างกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิดมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นโดยการแยกบดกล้วยไม้แต่ละชนิด และนำส่วนที่บดละเอียดมาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

นำตัวอย่างแต่ละชนิดมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล 3 ครั้ง ครั้งละ 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง โดยวิธีการแช่หมัก (Maceration) นำสารละลายของส่วนสกัดทั้งหมดรวมกันแล้วกรองผ่านสำลี และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดจากดอกกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด

คำนวณหาร้อยละผลผลิตของสารสกัดต่อน้ำหนักแห้งของดอกกล้วยไม้ (% yield) จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น หาปริมาณสารพิษเคมี ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อไป

3.4.2 การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening) ของสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด แบ่งการตรวจสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ออกเป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ แอนทราควิโนน เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน แอลคาลอยด์ และคาร์ดิแอก-ไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน

1) การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthraquinones)

ปิเปตต์สารสกัดที่เตรียมไว้ปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำละลาย 10% v/v (H_2SO_4) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นโดยใช้เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) เป็นเวลา 5 นาที แล้วปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำละลายแอมโมเนีย 10% v/v (NH_3) จำนวน 2-3 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

2) การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)

ปิเปตต์สารสกัดที่เตรียมไว้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่า จากนั้นค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลแดงตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์

3) การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ปิเปตต์สารสกัดที่เตรียมไว้ปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมเอทานอล ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 2-3 ชิ้นแล้วนำไปต้มโดยใช้เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) จำนวน 10-15 หยด ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง สีส้ม หรือสีแดง แสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

4) การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

ใช้การทดสอบแบบการเกิดฟอง โดยปิเปตต์สารสกัดที่เตรียมไว้ปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร นำไปต้มโดยใช้เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) จนเดือด แล้วนำมาเติมน้ำกลั่น 2-3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบซาโปนิน

5) การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

ปิเปตต์สารสกัดที่เตรียมไว้ปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นโดยใช้เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3) 2-3 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือสีน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

6) การตรวจสอบแอลคาลอยด์ (Alkaloids)

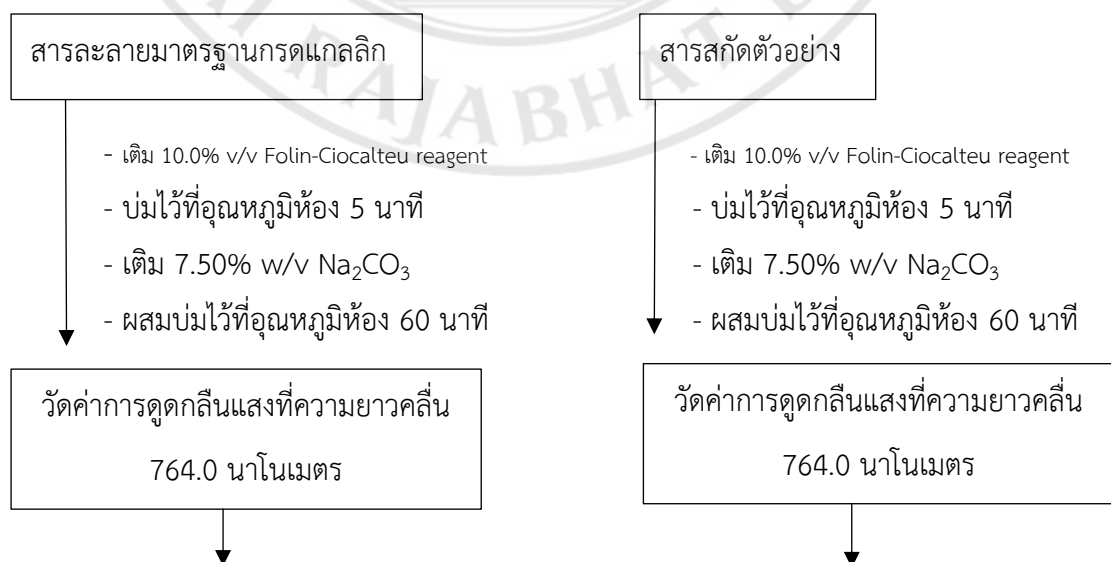
ปิเปตต์สารสกัดที่เตรียมไว้ปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย กรดซัลฟิวริก 2% v/v (H_2SO_4) ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นโดยใช้เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วหยดสารละลายน้ำยา ดรากENDORFF (Dragendorff's reagent) จำนวน 5 หยด ถ้าปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

7) การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycoside)

ปิเปตต์สารสกัดที่เตรียมไว้ปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมกรดแกลซีลิก แอซิด ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่า เติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3) จำนวน 2-3 หยด จากนั้นแล้วค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) จำนวน 2-3 หยด ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

3.4.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

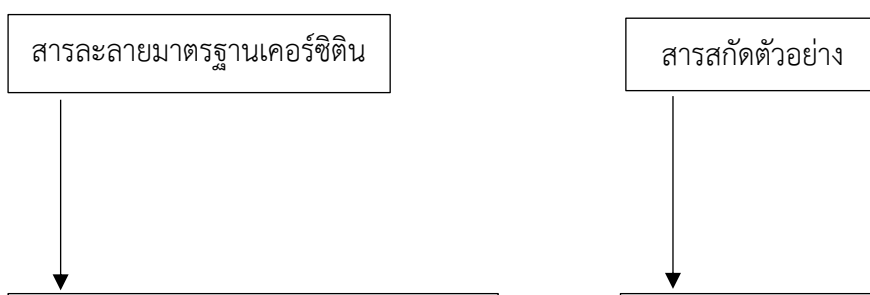
การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric เป็นวิธีที่คิดแปลงมาจาก เมธิน ผดุงกิจ และคณะ (2560) โดยสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้นระหว่าง 0.0078-0.0005 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ตัวอย่างปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10.0% v/v ปริมาตร 80.0 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 7.50% w/v ปริมาตร 100.0 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 764.0 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (Microplate Reader) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid equivalent : GAE) ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ป่าตัวอย่าง (mgGAE.g^{-1}) ดังแสดงในรูปที่ 3.2



ภาพที่ 3.1 แผนภาพแสดงการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

3.4.4 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content)

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminium chloride (AlCl_3) colorimetric method เป็นวิธีที่คัดแปลงมาจาก อรรถพล พันธุ์งาม และคณะ (2560) และนิสา จุลโพธิ์ (2559) โดยสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน (Quercetin) ความเข้มข้นระหว่าง 0.0158-0.0005 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ตัวอย่าง ปริมาตร 30.0 ไมโครลิตร เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) ความเข้มข้น 0.1 mg/mL ปริมาตร 170.0 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 416.0 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบ่มไมโครเพลต (Microplate Reader) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ป่าตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานเคอร์ซีติน (Quercetin equivalent : QE) ในรูปมิลลิกรัม สมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมของสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ป่าตัวอย่าง (mgQE.g^{-1}) ดังแสดงในรูปที่ 3.3



- เติมนสารละลาย 1.0 mol/L AlCl_3

- ผสมบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

- เติมนสารละลาย 1.0 mol/L AlCl_3

- ผสมบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

ภาพที่ 3.2 แผนภาพแสดงการหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

3.4.5 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีดีพีพีเอช (DPPH Method)

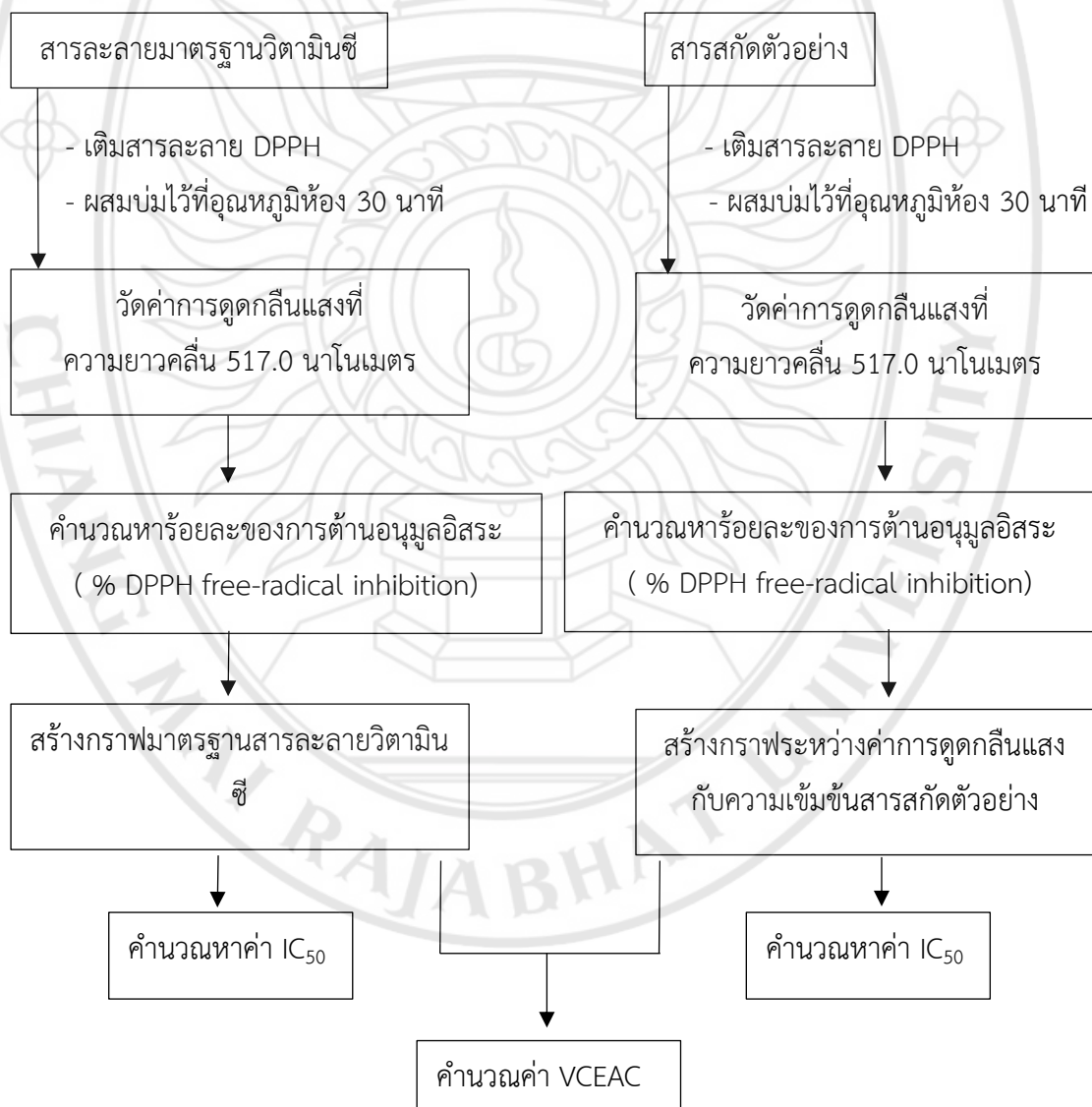
การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Assay เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก นิสา จุลโพธิ์ (2559) โดยใช้วิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน เตรียมในเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ป่าตัวอย่าง ปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร เติมนสารละลาย (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl : DPPH) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 180.0 ไมโครลิตร นำสารผสมที่ได้เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517.0 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (Microplate Reader) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free-radical inhibition) ดังสมการ (3.1) จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานวิตามินซี และหาความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ป่าตัวอย่าง ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน นำไปคำนวณหา (Vitamin C equivalent antioxidant capacity : VCEAC) ในรูป

มิลลิกรัมของวิตามินซีต่อกรัมของสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ป่าตัวอย่าง (mg Vitamin C/g extract)
 ดังแสดงในรูปที่ 3.4

$$\% \text{ DPPH free-radical inhibition} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad \dots (3.1)$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารตัวอย่าง

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารตัวอย่าง



ภาพที่ 3.3 แผนภาพแสดงการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีดีพีพีเอช (DPPH Method)

3.4.6 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

1) การเจือจางสารสกัดหยาบ

เตรียมสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 10 % DMSO เป็นตัวทำละลาย จากนั้นทำการเจือจางสารสกัดหยาบลดทอนทีละ 2 เท่า (two fold serial dilution) จนได้ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น คือ 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

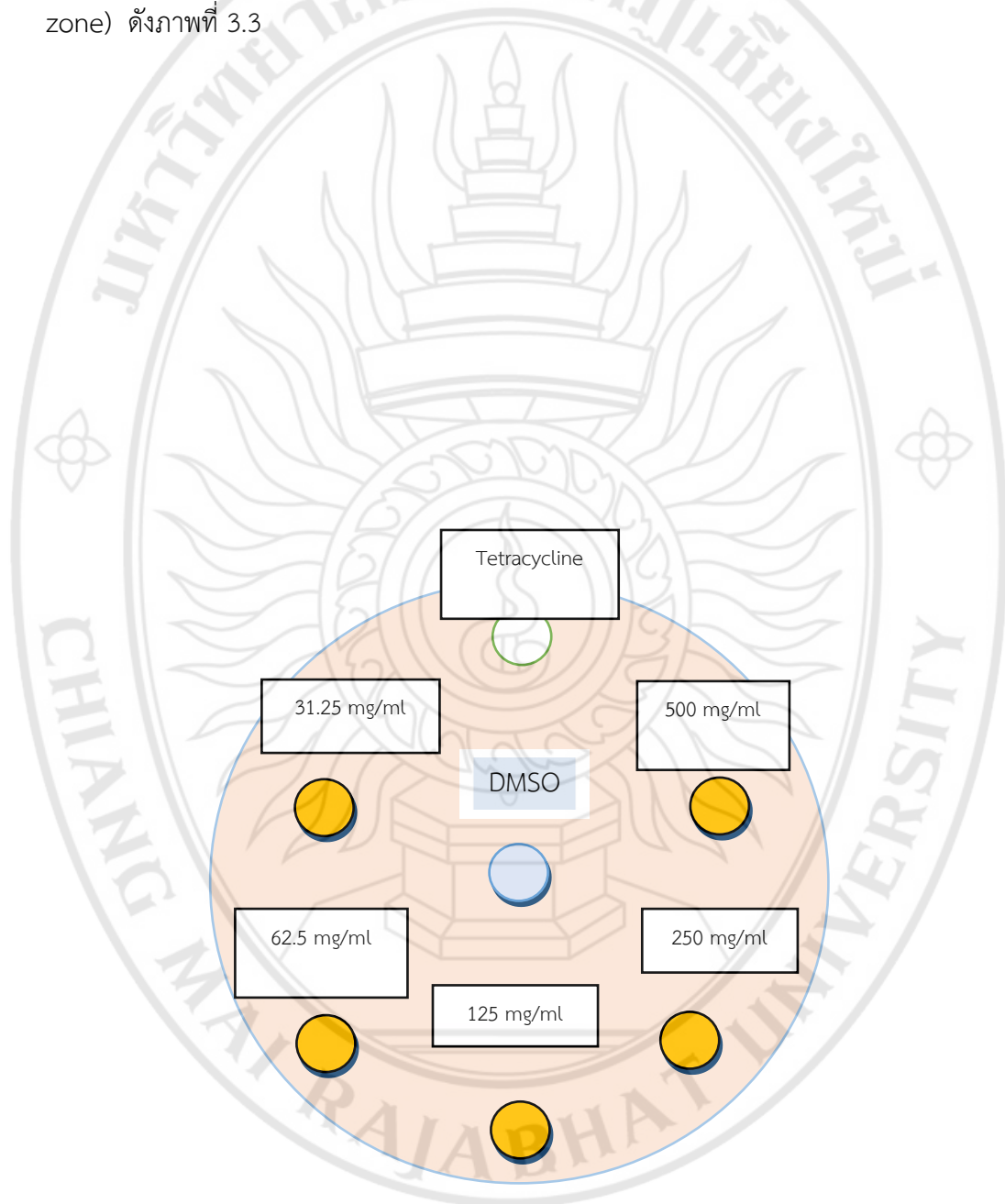
2) การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* โดยการ streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 18-22 ชั่วโมง นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้ได้ค่าดูดกลืนแสงประมาณ 0.80-1.00 (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/ml)

3) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Agar well diffusion method

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.80-1.00 มาทำการ swab ลงบนอาหาร Mueller-Hinton โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ในข้อ 2) จากนั้นเกลี่ยเชื้อบนเพลทของอาหาร Mueller-Hinton ดังภาพที่ 3.1 รอให้เชื้อแห้งติดผิวหน้าอาหาร โดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที ใช้ cork borer ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะอาหาร Mueller-Hinton จำนวน 7 หลุม (วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมได้ประมาณ 0.6 เซนติเมตร) ใช้ไมโครปิเปตหยดสาร

สกัดหยาบในข้อ 1) ลงในหลุมอาหาร ปริมาณหลุมละ 30 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายยาเตตราไซคลีน ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) และใช้ 10% DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ดังภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.4 การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar well diffusion method

4) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ นำข้อมูลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Clear zone) มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ One-way ANOVA โดยทดสอบความแตกต่างพหุคูณด้วยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.4.7 การขยายพันธุ์กล้วยไม้ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.4.7.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง คือ ฝักของกล้วยไม้กะระร้อน (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด (*Aerides falcata* Lindl.) และเอื้องคำ (*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.) ซึ่งเลือกเก็บฝักที่มีเปลือกสีเหลือง เปลือกหุ้มฝักยังไม่มีรอยเปิด จากนั้นนำเมล็ดกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรกิตติศักดิ์ (2558) หรือ KS (2015) ซึ่งเตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ตรา Hydrowork สูตรสำหรับผักสลัด Stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิตรต่อลิตร เท่าๆ กัน เติมน้ำตาล 20 g/L ปรับ pH เป็น 4.9 และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารโดยวิธีของ Chotikadachanarong (2013) คือ เติมไฮเตอร์ 0.5 ml/L ลงในอาหาร ทำการเพาะเลี้ยง ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ในอุณหภูมิห้อง ในสภาวะให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 เดือน

3.4.7.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ชุดควบคุมเชิงบวกใช้อาหารวุ้นสูตร Vacent and Went (VW, 1949) VW ที่เติมน้ำตาล 20 g/L (5 ช้อนชา) ปรับ pH เป็น 4.9 เติม ผงวุ้น (ตรานางเงือก) 7 g/L (2 ช้อนชา) สำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตรทดลอง คือ อาหารสูตรกิตติศักดิ์ (2558) หรือ KS (2015) ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ OKS, 1/5KS, 2/5KS, 3/5KS, 4/5KS และ KS เตรียมโดยเติมน้ำประปา 300 มิลลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร จากนั้นเติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ตรา Hydrowork สูตรสำหรับผักสลัด Stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละเท่าๆ กันคือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิตรต่อลิตร เติมน้ำตาล 20 g/L ปรับปริมาตรด้วยน้ำประปาเป็น 1 ลิตร ปรับค่า pH เป็น 4.9 ด้วย 1 M NaOH หรือ 1 M HCl เติมผงวุ้น (ตรานางเงือก) 7 g/L อาหารทุกสูตรนำไปต้มจนวุ้น

ละลาย รอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 60°C จึงเติมน้ำยาฟอกผ้าขาว Haite 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร (Chotikadachanarong, 2013) เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร เทใส่แก้วพลาสติกขนาด 4 ออนซ์ ปิดฝา รอจนอุ่นแข็งตัวแล้วจึงนำไปใช้ในการทดลอง

3.4.7.3 การศึกษาผลของอาหารวันสูตร KS ความเข้มข้นต่าง ๆ และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้ 3 ชนิดในสภาพปลอดเชื้อ

เตรียมตู้เนื้อเยื่อซึ่งในการทดลองนี้ใช้ตู้ปลาขนาด 20×10×12 นิ้ว โดยพ่นด้วย แอลกอฮอล์ 70% และเช็ดจนทั่วก่อนใช้งาน ถาดสแตนเลสสำหรับรองตัดเนื้อเยื่อให้พ่นด้วย แอลกอฮอล์ 70% ให้ชุ่มอยู่ตลอดเวลา และอุปกรณ์สำหรับตัดเนื้อเยื่อ ได้แก่ มีดผ่าตัด และคีมคีบแช่ในแอลกอฮอล์ 70% ก่อนและหลังการใช้งานเสมอเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ขณะใช้งาน จากนั้นคัดเลือกต้นอ่อนของกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด ในสภาพปลอดเชื้อที่มีความสูงประมาณ 0.5 cm มาทำการย้ายเลี้ยงภายในตู้ปลาที่เตรียมไว้โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารวันสูตร VW และอาหารวันสูตร OKS, 1/5KS, 2/5KS, 3/5KS, 4/5KS และ KS รวม 7 ชุดการทดลอง นำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2°C เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในห้องที่เปิดหน้าต่างและมีการถ่ายเทอากาศตลอดเวลา โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ยในระหว่างการทดลองคือเดือนสิงหาคม ถึงกันยายน พ.ศ. 2561 เท่ากับ 29.9°C รวม 14 ชุด ๆ ละ 15 ซ้ำ การทดลองทั้งหมดให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกอัตราการปนเปื้อน จำนวนยอด ความสูงของยอด จำนวนใบ และจำนวนราก

3.4.7.4 การย้ายต้นอ่อนออกปลูก

เตรียมวัสดุปลูก คือ มอสแห้ง นำมาล้างน้ำ 3 ครั้ง แล้วแช่น้ำเป็นเวลา 1 คืน ก่อนบรรจุในแก้วพลาสติกใสขนาด 6 ออนซ์ จากนั้นนำต้นอ่อนเอื้องคำที่ได้จากการทดลองทั้งหมดมาทำการล้างเอาวันออก นำลงปลูกในวัสดุที่เตรียมไว้ ปิดฝา นำไปไว้ในโรงเรือนที่มีการพลางแสง 50% เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงเปิดฝาแล้วรดน้ำวันละ 1 ครั้ง เลี้ยงในโรงเรือนต่อไปอีก 3 สัปดาห์ บันทึกอัตราการรอดชีวิต

3.4.7.5 การวิเคราะห์ผล

กล้วยไม้แต่ละชนิดมีการทดลองทั้งหมด 14 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 15 ซ้ำ ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomization design) โดยอัตราการปนเปื้อน และอัตราการรอดชีวิตภายหลังการย้ายออกปลูกแสดงผลเป็นร้อยละ สำหรับจำนวนยอด ความสูงของยอด จำนวนใบ และจำนวนราก แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวจากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

