

ฤทธิ์ทางชีวภาพของนาโนชิฟฟ์เบสจากธรรมชาติในการต้านเชื้อรา
ของกระบวนการผลิตยางแผ่นสู่ชุมชน
Biological investigation of nano natural Schiff bases antifungal of
production rubber sheet to community

สมหมาย ปะติตังโข*

กิ่งแก้ว ปะติตังโข**

บทคัดย่อ

Abstract

บทนำ

ยางพาราเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยและประเทศในภูมิภาคอาเซียน โดยไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกยางธรรมชาติเป็นอันดับหนึ่งของโลก ด้วยปริมาณการส่งออกกว่า 2.73 ล้านตัน คิดเป็นร้อยละ 39.61 ของปริมาณการส่งออกยางธรรมชาติของโลกซึ่งมีปริมาณ 6.882 ล้านตัน มีพื้นที่ปลูกยางกว่า 16.89 ล้านไร่ โดยพื้นที่ที่ปลูกยางมากที่สุดคือภาคใต้ รองลงมาคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกและภาคกลางบางจังหวัด การส่งออกยางธรรมชาติของไทยส่วนใหญ่ส่งออกในรูปของวัตถุดิบ ได้แก่ ยางแผ่นรมควัน ยางแท่ง น้ำยางข้น เป็นต้น (ข้อมูลวิชาการยางพารา. 2553) ที่ผ่านมาเกษตรกรมีการปลูกยางในหลายพื้นที่และได้ผลผลิตที่ดีดังกล่าวแล้ว แต่เนื่องจากขณะนี้สภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปจึงทำให้เกษตรกรเริ่มประสบปัญหาต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นภัยจากธรรมชาติ ความแปรปรวนของอากาศ ปริมาณของน้ำฝนในแต่ละช่วงฤดูกาล และโดยเฉพาะอย่างยิ่งการระบาดของโรค ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบการปลูกยางพารา เช่น โรคเส้นดำที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora botryosa* Chee, *P.palmivora*(Butler.)Butler, โรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* spp., โรคเปลือกเน่าเกิดจากเชื้อรา *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst., โรครากขาวเกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (Fr.) Overeem [Syn:*Rigidoporus lignosus* (Klozsch) Imazeki] และที่เป็นปัญหาหลักและส่งผลกระทบต่ออย่างสำคัญยิ่งของเกษตรกรในจังหวัดบุรีรัมย์ คือ การเกิดเชื้อราของแผ่นยางพาราดิบจากเชื้อรา *Penicillium* sp. และ *Aspergillus* sp. โดยมักเกิดเชื้อราในขั้นตอนการเก็บผลผลิตเพื่อรอจำหน่าย และในสภาพอากาศที่มีความชื้นสูง ส่งผลให้แผ่นยางมีคุณภาพต่ำ เปอร์เซ็นต์แผ่นยางน้อย เกษตรกรต้องใช้สารเคมีในการกำจัดเชื้อราของแผ่นยาง ทำให้เกษตรกรต้องมีรายจ่ายที่เพิ่มสูงขึ้นเพื่อคงคุณภาพ

ของแผ่นยางพาราให้อยู่ในเกณฑ์ดี ซึ่งส่งผลให้เกิดสารพิษตกค้างในแผ่นยางพารา อีกทั้งยังส่งผลเสียต่อเกษตรกร และสิ่งแวดล้อมด้วย (<http://www.yangpara.com>. 2550)

จากเหตุผล ความจำเป็น และผลงานวิจัยที่ผ่านมาของกลุ่มวิจัยนี้ได้นำสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ ทั้งในกลุ่ม แอลดีไฮด์และคีโตนมาทำการผสม (Hybrid) กับเอมีน แล้วได้สารใหม่เป็นตัวรีดิคัลที่ดี ซึ่งเรียกว่า Schiff base และยังเป็น nano natural iron chelators ที่มีประสิทธิภาพสูง มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านแบคทีเรีย และต้านเชื้อราหลายชนิด ทำให้คณะผู้วิจัยมีเป้าหมายที่จะพัฒนาสารต้านเชื้อราจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่มนี้ต่อไป โดยนำ syringal dehyde สารสกัดจากเปลือกสน และ coumarin สารสกัดจากชะเอม อบเชย หรือวานิลลา ซึ่งเป็นพืชที่พบมากในท้องถิ่น มาเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปของ Double pharmacophore แล้วนำไปรีดิคัลเกลือของโลหะ และทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของยางแผ่น ซึ่งกำลังระบาดและเป็นปัญหาหนักของเกษตรกรที่ผลิตยางแผ่นในเขตจังหวัดบุรีรัมย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสำคัญและจำเป็นเร่งด่วนในการหาสารควบคุมหรือกำจัดเชื้อรา *Penicillium* sp. และ *Aspergillus* sp. และนอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังจะได้นำสารไปใช้ทดสอบกับเชื้อราต่างๆ เช่น *Phytophthora botryosa* Chee, *Rigidoporus microporus* และ *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst. เพื่อให้ผลงานวิจัยนี้เกิดประโยชน์สูงสุดและเป็นแนวทางในการผลิตสารดังกล่าวในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ มอร์โฟโลยีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารซีฟพีเบส ซีฟพีเบสคอปเปอร์คอมเพล็กซ์ ในการต้านเชื้อราของแผ่นยาง *Penicillium* sp. และ *Aspergillus* sp. รวมทั้งฤทธิ์การต้านเชื้อราก่อโรคของต้นยางพารา *Phytophthora botryosa* Chee, *Rigidoporus microporus* และ *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst. ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (normal Vero cell line) แบบมีส่วนร่วมของชุมชน
2. ถ่ายทอดความรู้ให้กับเกษตรกรกลุ่มปลูกยางพาราและหรือผลิตยางแผ่น
3. เพื่อศึกษาส่วนผสมของยาต้านเชื้อราในแผ่นยาง
4. เพื่อศึกษาแนวทางในการผลิตยาต้านเชื้อราในระดับอุตสาหกรรม

วิธีการทดลอง

1. การสังเคราะห์ลิแกนด์ (Schiff base hydrazone ligands)

1.1 การสังเคราะห์สาร Coumarin-Salicylic hydrazone (KU-Sal)

1.1.1 ชั่งสารคูมาริน (Coumarin; 0.1 g) ละลายในขวดก้นกลมด้วย เมทานอล (Methanol; 5 mL) กวนสารอย่างต่อเนื่องพร้อมกับให้ความร้อน ณ อุณหภูมิ 40-60 °C เป็นเวลา 20 นาที สารละลายจะใสไม่มีสี

1.1.2 เติมสารที่จะเข้าทำปฏิกิริยาซาลิไซลิกไฮดราไซด์ (Salicylic hydrazone; 0.0938 g) สารผสมเริ่มต้นมีสีขาวขุ่น จึงเติม Methanol (5 mL) สารละลายจะใสไม่มีสีเช่นเดิมเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที สารละลายเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนเกิดขึ้น

1.1.3 ทดสอบความสมบูรณ์ของการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทิลเลเยอร์-โครมาโทกราฟี โดยทำการชะ (Develop) ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม แล้วสังเกตผลภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต (UV-lamp)

1.1.4 ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใน 2 วัน

1.1.5 นำสารละลายที่ได้มากรองและปล่อยให้แห้งภายใต้ระบบสุญญากาศเป็นเวลา 2 วัน

1.2 การสังเคราะห์สาร Coumarin-Izoniazid (KU-INH)

1.2.1 ชั่งสารคูมาริน (Coumarin; 0.1 g) ละลายในขวดก้นกลมที่มีตัวทำละลายเมทานอลอยู่ 10 mL ให้ความร้อนและกวนอย่างต่อเนื่อง จนคูมารินละลายหมด

1.2.2 เติมสาร Izoniazid 0.0845 g ลงไปผสมกัน และกวนสารผสมนี้ต่อเนื่องไปพร้อมกับอุณหภูมิตั้งแต่ 40-60 °C เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที สารละลายเริ่มเปลี่ยนแปลงโดยเปลี่ยนจากใสไม่มีสีเป็นสีเหลืองอ่อน แสดงว่าสารทั้งสองทำปฏิกิริยากันและมีสารใหม่เกิดขึ้น

1.2.3 ทดสอบความสมบูรณ์ของการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทิลเลเยอร์-โครมาโทกราฟีดีเวลลอป (Develop) ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม และสังเกตผลภายใต้แสงยูวี (UV-lamp)

1.2.4 ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใน 6 ชั่วโมง

1.2.5 กรองและเก็บสารละลายในระบบสุญญากาศ

1.3 การสังเคราะห์สาร Syringal dehyde -Salicylic hydrazone

(SRA-Sal)

1.3.1 ชั่งสารไซลิงกอลดีไฮด์ (Syringal dehyde; 0.1 g) ละลายในขวดก้นกลมด้วยตัวทำละลายเมทานอล (Methanol) ปริมาตร 10 mL กวนอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer) พร้อมให้ความร้อนที่อุณหภูมิช่วง 40-60 °C จนไซลิงกอลดีไฮด์ละลายหมด

1.3.2 จากนั้นเติมสารละลายซาลิไซลิกไฮดราไซด์ในเมทานอล (Salicylic hydrazide; 0.0835 g) สารอินทรีย์ทั้งสองชนิดจะทำปฏิกิริยาการควบแน่นกัน โดยสังเกตเบื้องต้นจากสารละลายเริ่มเปลี่ยนแปลงจากใสไม่มีสีเป็นสีเหลืองใส

1.3.3 กวนต่อไปและให้ความร้อน ทดสอบความสมบูรณ์ของการเกิดปฏิกิริยาด้วย เทคนิคทิลเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยดีเวลลอป (Develop) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม แล้วนำไปสังเกตผลภายใต้แสงยูวี

1.3.4 เมื่อปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์แล้วกรองและเก็บสารใหม่ไฮดราโซน (Novel hydrazone ligand) ไว้ในระบบสุญญากาศ (Vacuum) ขำมคีนจะได้ผลึกเกิดขึ้น

1.4 การสังเคราะห์สาร Syringaldehyde – Isoniazid (SRA-INH)

1.4.1 ชั่งสารซาลิไซลิกไฮดราไซด์ 0.1 g ละลายเมทานอล 10 mL กวนอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องกวนสารพร้อมให้ความร้อนที่อุณหภูมิระหว่าง 40-60 °C จนซาลิไซลิกไฮดราไซด์ละลายหมด จะสังเกตเห็นสารละลายใส

1.4.2 เติมนีเอเจนต์ Isoniazid (INH; 0.0752 g) ประมาณ 1 ชั่วโมง สารละลายเริ่มเปลี่ยนแปลงจากใสไม่มีสีเป็นสีเหลืองใส แสดงว่าได้ผลผลิตเกิดขึ้น

1.4.3 หลังจากปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้วกรองและเก็บไว้ในระบบสุญญากาศ จะได้ผลึกของไฮดราโซน

2. วิธีการสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน

สารประกอบเชิงซ้อนทุกตัวสังเคราะห์ด้วยวิธีที่คล้ายคลึงกันคือนำสาร Schiff base ligands มาทำปฏิกิริยากอนจุกเกิดขึ้นกับ Cu ในตัวทำละลายเมทานอล (methanolic solvent) ด้วยอัตราส่วนโดยโมล 1:1 ปรับความเป็นกรด-เบสของสารละลายให้ได้ pH ~6 กวนสารละลายอย่างต่อเนื่อง ณ อุณหภูมิ 40-60 °C ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

3. การศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ของสารตัวอย่าง (Physicochemical properties) นำสารที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดมาศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ (Physicochemical properties) โดยใช้เทคนิคดังต่อไปนี้

3.1 การวัดสมบัติการละลายในตัวทำละลายต่างๆ เช่น เมทานอล เอทานอล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และไดเมทิลฟอร์มมาไมด์

3.2 วิเคราะห์หาจุดหลอมเหลว (Melting point) นำสารที่สังเคราะห์ได้ทุกตัวมาหาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่อง Melting point

3.3 การสังเกตลักษณะผลึก สี และคำนวณหาผลผลิตร้อยละ (% yield)

3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectroscopy

3.5 วิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบ (Elemental analysis) วิเคราะห์หาธาตุ Carbon, Hydrogen, Nitrogen และ Oxygen ในสารตัวอย่างที่สังเคราะห์ได้

4. การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM

- 4.1 ตัดตัวอย่างบนแท่นวางตัวอย่าง (stub) ด้วยเทปกาวสองหน้า
- 4.2 นำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่อง Ion sputter (ยี่ห้อ Balzers, model SCD 040)
- 4.3 นำไปส่องดูด้วย SEM (ยี่ห้อ JEOL, model JSM-6400)

5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.1 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

การทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay หรือ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl เป็นสารอนุมูลอิสระ (Free radical) สามารถรับ Electron หรือ Hydrogen radical ได้ ซึ่งเมื่อ DPPH อยู่ในรูปสารละลายใน Absolute methanol จะมีสีม่วง และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ Antioxidant จะทำให้มีสีจางลง โดยใช้ BHT (Butylated hydroxytoluene) เป็นสารมาตรฐานที่ให้ผลบวกในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้ ค่าที่ได้จากการทดสอบจะแสดงเป็นค่า IC₅₀ โดยต้องมีค่าต่ำกว่า 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงจะถือว่ามียุทธิต้านอนุมูลอิสระ

5.1.1 การเตรียมสารละลายเพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

1. เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100 µg/mL ในสารละลาย absolute methanol
2. เตรียมสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 12.5, 25, 50 และ 100 ตามลำดับ
โดยความเข้มข้น 12.5 ppm บีเปิดสารมา 1.25 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL
ความเข้มข้น 25 ppm บีเปิดสารมา 2.5 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL
ความเข้มข้น 50 ppm บีเปิดสารมา 5 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL
3. เตรียมขวดสีชา 24 ขวด เพราะในแต่ละความเข้มข้นจะต้องใช้ขวดสีชาจำนวน 3 ขวด และอีก 1 ขวด เป็นขวด control รวมเป็น 25 ขวด
4. นำขวดสีชา ทั้ง 25 ขวด ไปอบไวก์ที่อุณหภูมิ 100 °C รอให้ขวดเย็น จึงนำมาใช้ได้

5.1.2 วิธีการวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

1. บีเปิด 1 ml ของสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐาน ในแต่ละความเข้มข้น ใส่ในขวดสีชา 3 ใบ เพื่อทำการทดสอบสารตัวอย่างละ 3 ครั้ง (triplicate)
2. บีเปิด Methanolic DPPH radical 2 ml ใส่ขวดสีชาในแต่ละความเข้มข้น

3. เขย่าให้สารเข้ากัน นำขวดทั้ง 25 ใบ เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง SPECTRONIC 20 GENESYS ที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยวัดจากความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง

5. คำนวณหาค่า % inhibition ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100$$

OD_{control} คือ ค่า absorbance ของ control (มีเฉพาะ DPPH)

OD_{sample} คือ ค่า absorbance ของ สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน

5.2 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)

การทดสอบด้วยวิธี FRAP assay (Ferric reducing antioxidant power) assay เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระ (reducing agent) โดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา redox-linked colorimetric method โดยที่ ferric tripyridyltriazine (Fe³⁺-TPTZ) complex จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ ทำให้เกิด Fe²⁺-TPTZ complex ดังนั้นวิธีนี้ สามารถใช้วัด total reducing power ของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ Fe³⁺ เปลี่ยนเป็น Fe²⁺ ได้ เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานคือ FeSO₄ สร้างกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณ Fe²⁺ ที่เกิดจากปฏิกิริยาของสารตัวอย่าง แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นค่า FRAP value (Fe(II)/g)

5.2.1 การเตรียมสารละลายเพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) ทำได้ดังนี้

1. Acetate buffer (300 ml, pH 3.6) โดยชั่ง 3.1 g ของ Sodium acetate, glacial acetate acid 16 ml ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 L ผสมให้เข้ากัน

แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

2. Dilute HCl เป็น 40 mM โดยบีเบต 1.46 ml ของน้ำกลั่นผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. Ferric chloride มา 0.051 g ละลายโดยน้ำกลั่น 10 ml

4. TPTZ (2, 4, 6 – tri [2 – pyridyl] – s – triazin) 10 ml, 0.031 g ละลายใน HCl 40 mM จากนั้นละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 °C (เตรียมใหม่ทุกครั้ง เวลาใช้)

5. การเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยการนำสารละลาย acetate buffer, Ferric chloride และ TPTZ ในปริมาตร 100 ml, 10 ml, 10 ml ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C

5.2.2 วิธีการวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)

1. ปิเปตสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นเท่ากับ 12.5, 25, 50 และ 100 ตามลำดับ โดยปิเปต 150 μ L ของสารละลายตัวอย่าง แล้วปิเปต 3 mL ของสารละลาย FRAP ลงขวดเดิมที่มีสารละลายตัวอย่างอยู่ เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C
2. วัดค่าการดูดกลืนแสงในนาที่ที่ 6 ที่ความยาวคลื่น 593 nm
3. ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Ferrous sulfate คำนวณหาปริมาณ Relative antioxidant activity (FRAP value) จากกราฟมาตรฐานของ FeSO_4 ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FeSO_4 กับค่า absorbance โดยต้องเจือจางสารตัวอย่างให้อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน

6. การทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา

6.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา มีวิธีการดังนี้

1. ชั่ง Potato dextrose agar
2. ละลายและทำให้สุกด้วยความร้อนบน Hot plate ซึ่งใช้ความร้อนระดับ 2
3. ปรับค่า pH ของอาหารให้เหมาะสมกับเชื้อรา
4. นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
5. นำอาหารไปเทลง Plate (จานเลี้ยงเชื้อ) ในเครื่อง Laminar flow

6.2 เชื้อราที่นำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์

1. *Penicillium* sp.
2. *Aspergillus* sp.

6.3 ขั้นตอนการเขี่ยเชื้อ

1. เผลา loop จนร้อนแดง รอให้ loop เย็น จากนั้นใช้ loop เขี่ยเชื้อมาแตะที่ผิววุ้นไกล้ๆ จานเพาะเชื้อ ลาก loop เบาๆ โดยใช้ด้านแบนของปลาย loop แตะเบาๆ บนผิววุ้นไปมา 4-5 ครั้ง ระวังอย่าให้ loop ผังลงในวุ้น ปิดฝาจานเพาะเชื้อ
2. ขีดเชื้อแบบ Streak plate ทำการขีดครั้งที่ 2 โดยใช้ loop เขี่ยเชื้อผ่านเชื้อที่แตะไว้ครั้งแรก ลากไปมา 5-6 ครั้ง ขีดครั้งที่ 3 โดยการหมุนจานเล็กน้อยให้เหมาะและ การขีดครั้งที่ 4 ให้ลาก loop ไปมา 2-3 ครั้ง

7. การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา โดยมีวิธีการศึกษาการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา ดังนี้

7.1. นำเชื้อราเกลี่ยบน plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ โดยใช้ loop เขี่ยเชื้อจากสต็อกมาเกลี่ยลงบน plate แล้วใช้ Cotton bud ที่ฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave นาน 15 นาที เกลี่ยเชื้อราให้ทั่ว plate

7.2. เตรียมสารตัวอย่างโดยชั่งสารตัวอย่างทั้ง 8 ชนิด เตรียมเป็นความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ สาร KU-Sal เตรียมความเข้มข้นเป็น 100, 200 และ 300 ppm โดยชั่งสารมา 0.0050 g ปรับปริมาตรด้วย DMSO (Dimethyl sulfoxide)

7.3. บีบเปิดสารตัวอย่างจากความเข้มข้น 300 ppm ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ที่ความเข้มข้นดังต่อไปนี้

ความเข้มข้น 100 ppm บีบเปิด 3.33 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml

ความเข้มข้น 200 ppm บีบเปิด 6.66 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml

7.4. นำ Paper disk วางบนแผ่นกระดาษที่แห้งแล้วแต่ละความเข้มข้น แล้วบีบเปิดสารละลายตัวอย่าง 20 µl ลงบน Paper disk ในแต่ละความเข้มข้น แล้วนำ Paper disk เก็บไว้ในที่มีแสงสว่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางบนเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ในข้อที่ 1

7.5. นำเชื้อไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ในกรณีของเชื้อราใช้อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-5 วัน

7.7 วัด Clear zone และบันทึกผล

8. การทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อราในยางแผ่น

การทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อราในยางแผ่นประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้

8.1. นำแผ่นยางพารามาตัดเป็นวงกลมให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร แล้ววางแผ่นยางพาราใน plate

8.2. นำแผ่นยางพาราที่ตัดได้ไปฆ่าเชื้อด้วยแสง UV เป็นเวลา 15 นาที

8.3. นำเชื้อราเกลี่ยบน plate ที่มียางแผ่นอยู่ โดยเผา loop จนร้อนแดง รอให้ loop เย็น จากนั้นใช้ loop เขี่ยเชื้อมาแตะที่แผ่นยางลาก loop เบาๆ โดยใช้ด้านแบนของปลาย loop แตะเบาๆ บนยางแผ่นไปมา 4-5 ครั้ง ปิดฝาจานเพาะเชื้อ ขีดเชื้อแบบ Streak plate ทำการขีดครั้งที่ 2 โดยใช้ loop เขี่ยเชื้อ ผ่านเชื้อที่แตะไว้ครั้งแรก ลากไปมา 5-6 ครั้ง ขีดครั้งที่ 3 โดยการหมุนจานเล็กน้อยให้เหมาะและการขีดครั้งที่ 4 ให้ลาก loop ไปมา 2-3 ครั้ง

8.4 เตรียมสารตัวอย่างโดยชั่งสารตัวอย่างทั้ง 8 ชนิด เตรียมเป็นความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ เช่นสาร KU-Sal เตรียมความเข้มข้นเป็น 100, 200 และ 300 ppm โดยชั่งสารมา 0.0050 g ปรับปริมาตรด้วย DMSO (Dimethyl sulfoxide)

8.5 บีบสารตัวอย่างจากความเข้มข้น 300 ppm ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ที่ความเข้มข้นดังต่อไปนี้

ความเข้มข้น 100 ppm บีบ 3.33 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml

ความเข้มข้น 200 ppm บีบ 6.66 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml

8.6 นำ Paper disk วางบนแผ่นกระจกสีเหลืองแต่ละความเข้มข้น แล้วบีบสารละลายตัวอย่าง 20 μ l ลงบน Paper disk ในแต่ละความเข้มข้น แล้วนำ Paper disk เก็บไว้ในที่มีแสงสว่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางบนเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ในข้อที่ 3

8.7 นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ในกรณีของเชื้อราใช้อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3-5 วัน

8.8 วัด Clear zone และบันทึกผล

9. การทดสอบสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกลของยางแผ่น

9.1 ทดสอบความต้านทานแรงดึง (Tensile properties)

นำยางแผ่นที่ผ่านการผสมกับสารตัวอย่างทั้ง 8 ชนิดโดยตัดแผ่นยางให้มีขนาด 3x5 เซนติเมตร มาทดสอบความต้านทานแรงดึง (Tensile properties) ตามมาตรฐาน ISO 37-1994 (E) ด้วยเครื่อง Lloyd โดยใช้ความเร็วในการดึงขึ้นทดสอบ 500 มิลลิเมตรต่อนาที เพื่อทดสอบหาค่ามอดูลัสที่ระยะยืด 100%, ค่าความต้านทานต่อแรงดึง (tensile strength) และระยะยืดก่อนขาด (elongation at break) แล้วหาค่าเฉลี่ยของขึ้นทดสอบ 8 ตัวอย่าง

9.2 การทดสอบความทนแรงฉีกขาด (Tear strength)

ทดสอบความต้านทานแรงฉีกขาด (Tear strength) ตามมาตรฐาน ISO 34 (Angle test piece) ด้วยเครื่องเทนไซล์ (Tensile test machine) ด้วยอัตราเร็วในการดึง 500 มิลลิเมตรต่อนาที ค่าความต้านทานแรงฉีกขาดคือค่าแรงดึงสูงสุดที่ทำให้เกิดการฉีกขาดต่อความหนาของชิ้นตัวอย่าง (มีหน่วยเป็น N/mm)

9.3 ทดสอบค่าความแข็ง (Hardness Shore A)

ทดสอบความแข็ง (Shore a hardness) ด้วยเครื่องวัด Shore Durometer (Model 716) ทดสอบตามมาตรฐาน ASTM D2240 โดยที่การวัดจะรายงานค่าความแข็ง (hardness number) ภายใต้อัตราเวลากด (Indentation time) 15 วินาที และบันทึกค่า Median จากค่าที่วัดได้ทั้งหมด 5 ค่า

10. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cells) โดยเติม Vero cells 45 μl (3.3×10^4 cells/mL) ลงในแต่ละหลุมของ 384-well plates ที่มีสารตัวอย่างอยู่ 5 μl เจือจางด้วย DMSO 0.5 % แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C มี CO₂ 5% เป็นเวลา 4 วันแล้ววัดค่าฟลูออเรสเซนซ์ (excitation ที่ 485 nm และ emission ที่ 535 nm) สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับค่าการตอบสนองของเซลล์เพื่อหา IC₅₀

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้งตัวรีติวซ์และอนุภาคนาโนคอปเปอร์ พบว่า ได้ผลผลิตในเปอร์เซ็นต์สูงและอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นผลึก (Crystal) มีรูปร่างและมอร์โฟโลยีที่แตกต่างกัน ลักษณะที่โดดเด่นเป็นรูปเข็ม (Needle forms) ขนาดของอนุภาคอยู่ระหว่าง 35 ถึง 81 nm มีจุดหลอมเหลวอยู่ระหว่าง 144.4 ถึง 288.9 °C

เทคนิค DPPH method จะเห็นว่า อนุภาคส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีโดยเฉพาะอนุภาค SRA-Sal และ KU-INH-Cu ส่วนผลการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค FRAP method พบว่า อนุภาค KU-Sal มีประสิทธิภาพในการรีติวซ์ Fe³⁺ ไปเป็น Fe²⁺ ได้สูงสุด รองลงมาคือ KU-INH ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ของสารที่สังเคราะห์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH และ เทคนิค FRAP ที่มีความสัมพันธ์กันน้อย ทั้งนี้เนื่องจากสารที่มีความสามารถในการรีติวซ์เหล็กได้ดีอาจจะแสดงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนไม่ดี (โอภา วัชรคุปต์. 2549) นอกจากนี้ ยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายและขนาดของโมเลกุลของสารที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ (มันทนา ภาณุมาภรณ์. 2552) ดังนั้น การที่ตัวรีติวซ์และอนุภาคนาโนคอปเปอร์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีเพราะมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีและโมเลกุลไม่เกะกะ (Steric effect) จึงเกิดปฏิกิริยารีดักชันได้ดี แต่มีความสามารถในการรีติวซ์เหล็กได้น้อยในเทคนิค FRAP

ผลการต้านเชื้อราก่อโรคของยางแผ่น พบว่า อนุภาคทั้ง 8 ชนิด สามารถต้านเชื้อราก่อโรคของยางแผ่นทั้ง *Penicillium* sp. และ *Aspergillus* sp. บนจานเพาะเชื้อได้ และเมื่อนำอนุภาคทั้งหมดนี้ไปทดสอบกับเชื้อราดังกล่าวที่เจริญเติบโตอยู่บนยางแผ่น พบว่า ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า แสดงว่าอนุภาคคอปเปอร์นาโนต้านเชื้อราเหล่านี้ได้ดีบนยางแผ่นของเกษตรกร (ระพีพันธ์์ แดงตันกี และคณะ. 2554) จึงเป็นการค้นพบใหม่ที่มีประโยชน์อย่างยิ่ง

ผลการศึกษาความเครียดและความเค้น เมื่อเติมอนุภาคคอปเปอร์นาโนในยางแผ่น พบว่า ยางแผ่นทนทานต่อแรงดึงเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอนุภาคนาโนที่มีตัวรีติวซ์เป็นไซลิกโกลดีไฮด์ ซาลิไซลิกไฮดราโซน (SRA-Sal-Cu) มีค่าเฉลี่ยที่ 7.00 กิโลกรัม และแผ่นยางที่รับแรงดึงได้น้อย

ที่สุดคือ แผ่นยางที่ทดสอบกับสาร KU-Sal ซึ่งมีค่าเฉลี่ยที่ 5.33 กิโลกรัม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสารควบคุม พบว่า แผ่นยางทดสอบเติมสารตัวอย่างมีความทนต่อแรงดึงดีกว่าแผ่นยางควบคุม นั่นคือการเติมอนุภาคนาโนคอปเปอร์ลงในกระบวนการผลิตยางแผ่นนอกจากจะป้องกันกำจัดเชื้อราแล้วยังเพิ่มสมบัติเชิงกลของยางให้สูงขึ้น

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการนำองค์ความรู้ทางด้านนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการเกษตร ซึ่งถือเป็นการวิจัยที่แปลกใหม่ของประเทศไทย หลักการ ทฤษฎีรวมทั้งผลที่ได้จากการวิจัยยังสามารถถูกถ่ายทอดให้กับเกษตรกร จึงถือเป็นการวางรากฐาน ให้ความรู้และในขณะเดียวกันยังเป็นการสร้างความตระหนักให้กับเกษตรกรได้รับประโยชน์ รู้ทันเทคโนโลยีใหม่ และป้องกันการถูกหลอกจากพ่อค้าบางกลุ่มได้อีกด้วย สิ่งสำคัญและจำเป็นที่จะต้องดำเนินการต่อไปอีก

1. ข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยครั้งต่อไป

1.1 จะต้องวิจัยเพื่อวิเคราะห์กลไกที่แท้จริงเกี่ยวกับ Mode of action ของผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้กับการออกฤทธิ์ต่อราและเพลี้ยว่าเป็นอย่างไร

1.2 ศึกษาต้นทุนในการผลิตสารตัวอย่าง

1.3 ต้องทดสอบสารตัวอย่างในหลายพื้นที่และหลายช่วงเวลา เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าสามารถใช้ได้ในสภาพอย่างไรบ้าง

2. ข้อเสนอแนะเพื่อการนำไปใช้

2.1 สารนาโนที่สังเคราะห์ได้สามารถนำไปใช้ฉีดพ่นในแปลงผัก เช่น หอม และกระเทียม เพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อราได้ สารเหล่านี้ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์

2.2 สามารถนำอนุภาคนาโนคอปเปอร์ไปใช้ในกระบวนการผลิตยางแผ่น และแปลงปลูกยางพาราได้เป็นอย่างดี

บรรณานุกรม

ฉันททิพย์ คำนวนกทิพย์และคณะ. (2551). การพัฒนาสมบัติในการต้านทานการติดไฟของ

ยางธรรมชาติโดยใช้ nano clay และ Zeolite. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุน

สนับสนุนการวิจัย (สกว).

ณัฐวุฒิ สุทธิพงษ์, วรากร ศรีสุระพล. (2010). ค้นเมื่อ 6 กันยายน 2555 ค้นจาก

<http://www.ie.eng.chula.ac.th/academics/course>

[2104328/assignments/01-industries](http://www.ie.eng.chula.ac.th/academics/course), 21.pdf.

ณัฐพันธุ์ ศุภกา และ วราภรณ์ ถิรสิริ. (2549). นาโนเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

- เนื่องพนิช สินชัยศรี และสาทร สิริสิงห์. (2548). **ข้อเท็จจริง การใช้สารเคมี กับ การพัฒนาเกษตร ไทย.** กรุงเทพฯ : มุลนิธิมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เยาวพา สุวัตติ. (2009). ค้นเมื่อ 6 กันยายน 2555 ค้นจาก <http://www.gpo.or.th/rdi/html/microbe.html> 2009.
- ปิยบุช ทองผาสุก. (2550). **ผลของรังสีแกมมาต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน.** ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีนิวเคลียร์ครั้งที่ 10 วันที่ 16-17 สิงหาคม 2550. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรรณี เตนรุ่งเรือง. (2550). **ฤทธิ์การการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกต้นวงศ์อบเชย.** ในรายงานผลงานวิจัย ประจำปี 2550. กรุงเทพฯ : สำนักงานวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้.
- รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพรร.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ระพีพันธ์ แดงตันกี และคณะ. (2554). **ยางธรรมชาติผสมอนุภาคซิลเวอร์และคอปเปอร์นาโนต้านเชื้อราและแบคทีเรียเพื่อประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ยางในห้องน้ำ.** กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- วราภรณ์ ขจรไชยกูล. (2552). **ผลิตภัณฑ์ยาง : กระบวนการผลิตและเทคโนโลยี.** กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.).
- วิมล อินทอง. (2554). **นาโนคอมโพสิตของโครงข่ายพอลิเมอร์แบบแทรกสอดในสถานะน้ำยางจากยางธรรมชาติ พอลิเมทิลเมทาครีเลทและเลเยอร์ซิลิเกต.** กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.).
- สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2553). **ข้อมูลวิชาการยางพารา 2553.** กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- อรสา ภัทร์ไพบลูย์ชัย. (2554). **การเตรียมและใช้งานซิงค์ออกไซด์นาโนในยางธรรมชาติ.** กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.).
- อิทธิพล พจนสัจ. (2551). **การตรวจวัดความเข้มข้นโดยวิธีวัดค่าความหนืดและโดยวิธีทางแสง.** กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.).
- โอภา วัชรคุปต์. (2549). **สารต้านอนุมูลอิสระ.** กรุงเทพฯ : พีเอสพรีนท์.

- Al-Haiza, M.A., Mostafa, M.S., and El-Kady, M.Y. (2003). "Synthesis and biological evaluation of some new coumarin derivatives," **Molecules**. 8 : 275-286.
- Das, Manash R., et al. (2011). "Synthesis of silver nanoparticles in an aqueous suspension of graphene oxide sheets and its antimicrobial activity," **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**. 83 : 16-22.
- DiSilvestra, R.A. *et al.* (2005). "Soy isoflavone supplementation elevates erythrocyte superoxide dismutase, but not plasma ceruloplasmin in postmenopausal breast cancer survivors," **Breast Cancer Research & Treatment**. 89 : 251-255.
- He, Lili, Liu, Yang, Mustapha, Azlin, and Lin, Mengshi. (2011). "Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*," **Microbiological Research**. 166 : 207-215.
- Kostova, Irena, *et al.* (2005). "Cytotoxic activity of new lanthanum (III) complexes of bis-coumarins," **EJ Med Chem**. 40 : 542-551.
- Leonard, Kwati, et al. (2011). "In situ green synthesis of biocompatible ginseng capped gold nanoparticles with remarkable stability," **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**. 82 : 391-396.
- Lopez, Lidia M., *et al.* (2002). "Effect of the lipophilic *o*-naphthoquinone CG 10-248 on rat liver mitochondria structure and function," **Biocell**. 26(2) : 237-245.
- Lewis, Anne., *et al.* (2004). "Treatment of pancreatic cancer cells with dicumarol induces cytotoxicity and oxidative stress," **Clinical Cancer Research**. 10 : 4550-4558.
- Mu, Bin, Lu, Chunyin, and Liu, Peng. (2011). "Disintegration-controllable stimuli-responsive polyelectrolyte multilayer microcapsules via covalent layer-by-layer assembly," **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 82 : 385-390.
- Smid, Eddy J., et al. (1995). "Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicillium* rot on tulip bulbs," **Postharvest Biological and Technology**. 6 : 303-312.