

บทที่ 3  
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (*Rattus norvegicus*) สายพันธุ์ Wistar เพศเมีย อายุ 21 วัน น้ำหนักตัว ระหว่าง 80 - 120 กรัม

2. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง

2.1 กรงสเตนเลส ขนาด 30 x 35 x 15 เซนติเมตร พร้อมฝาปิด

2.2 ขวดน้ำ

2.3 ขี้เลื่อย

2.4 อาหารหนูสำเร็จรูปชนิดเม็ด (C.P. mice feed) No.082 ของบริษัทกรุงเทพอาหารสัตว์จำกัด

3. อุปกรณ์ที่ใช้ป้อนสารแก่สัตว์ทดลอง

3.1 กระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร

3.2 เข็มป้อนยา (ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 15 และ 23 ตัดปลายหุ้ ลบคม ทำให้โค้ง)

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดจากว่านชักมดลูกและกระชายดำ

4.1 พงว่านชักมดลูก

4.2 พงกระชายดำ

4.3 น้ำกลั่น (Distilled water)

4.4 กระดาษขึงสาร

4.5 เครื่องขึงสาร

4.6 ซ้อนตักสาร

4.7 ปีกเกอร์ขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร

4.8 แท่งแก้วคน

5. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผ่าตัด

5.1 ชุดเครื่องมือผ่าตัด ได้แก่ กรรไกร มีดผ่าตัด และปากคีบ (forcep)

5.2 คลอโรฟอร์ม (chloroform)

6. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

6.1 Bouin's fixative

6.2 Staining jar

6.3 สี Eosin

6.4 สี Hematoxyline

- 6.5 Grading alcohol
- 6.6 Butyl alcohol
- 6.7 Xylen
- 6.8 Destain (1% Acid Alc)
- 6.9 Stop-Destain (70% Alc)
- 6.10 Permout
- 6.11 เครื่อง Microtome Ao 820
- 6.12 กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์
- 6.13 ขวดเก็บตัวอย่าง
- 6.14 อ่างพาราฟิน
- 6.15 เข็มเขี่ย
- 6.16 forceps
- 6.17 กระจาขอคูมิเนียม
- 6.18 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 6.19 ฟู่กัน
- 6.20 Hot plate

#### 7. อุปกรณ์ในการบันทึกผล

- 7.1 กล้องถ่ายรูปดิจิทัล
- 7.2 กล้องจุลทรรศน์
- 7.3 สมุดบันทึกและปากกา

#### 8. สถานที่ทำวิจัย

- 8.1 หน่วยวิจัยการทดสอบความเป็นพิษของสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- 8.2 อาคารเลี้ยงสัตว์ทดลอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

#### วิธีการวิจัย

##### 1. การเตรียมสารสกัดจากแก่นซังมดลูกและกระชายดำ

นำวานชักมดลูกหรือกระชายดำล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจะได้วานชักมดลูกแห้งหรือกระชายดำแห้ง นำไปบดด้วยเครื่องบดสมุนไพรจนกระทั่งได้ผงวานชักมดลูกหรือผงกระชายดำ นำผงแห้งของวานชักมดลูกหรือผงแห้งของกระชายดำไปสกัดด้วย soxhlet extractor โดยใช้ น้ำเป็นตัวสกัดจนกระทั่งได้สารสกัดเข้มข้น หลังจากนั้นระเหยสารสกัดด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) แล้วนำไปอบที่

อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารสกัดแห้ง ซึ่งสารนี้จะถูกเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ ประมาณ 3-5 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

## 2. การป้อนสารแก่หนู

การป้อนน้ำกลั่น ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 18 ที่ตัดปลาย ลบคมให้หยาบ ทำให้โค้งเพื่อสะดวกในการ ป้อนและต่อเข้ากับกระบอกฉีดยา ขนาด 2.5 มล.

การป้อนสารสกัด ใช้กระบอกฉีดยาขนาดเดียวกับการป้อนน้ำกลั่น แต่จะใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 15 ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า เพื่อสะดวกในการป้อน เพราะสารสกัดจะมีความเข้มข้นมากกว่าน้ำกลั่น ทั้ง การป้อนน้ำกลั่นและการป้อนสารสกัด จะใช้กระบอกฉีดยาคูดสารขึ้นมา 1 มล. ใช้นิ้วโป้งและนิ้วชี้ ของมือซ้ายจับรวบบริเวณต้นคอหนู ส่วนนิ้วที่เหลือจะใช้พยุงและบังคับตัวหนูไว้ให้นิ่ง หนูจะอยู่ในลักษณะอ้าปากเล็กน้อย ค่อย ๆ สอดเข็มเข้าไปทางมุมปากด้านซ้ายให้ถึงหลอดอาหารลึก พอประมาณแล้วจึงป้อนสารเข้าไปอย่างรวดเร็วและต้องระมัดระวัง ต้องระวังไม่ให้สอดเข็มผิดเข้าไปในหลอดลม ซึ่งจะทำให้หนูสำลักตายได้

## 3. การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

ใช้หนูทดลองเพศเมีย อายุ 21 วัน น้ำหนักประมาณ 100-150 กรัม โดยแบ่งหนูทดลอง ออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว โดยแบ่งป้อนสารดังนี้ เป็นระยะเวลา 30 วัน โดยแต่ละวันที่ป้อนสาร จะมีการบันทึก น้ำหนักตัวของหนูด้วย

กลุ่มที่ 1 ป้อนน้ำกลั่น 1 มล/ตัว/วัน

กลุ่มที่ 2 ป้อนสารสกัดจากवानชักมดลูกขนาด 120 มก/กกน้ำหนักตัว/วัน 1 มล.

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารสกัดจากवानชักมดลูกขนาด 180 มก/กกน้ำหนักตัว/วัน 1 มล.

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารสกัดจากกระชายดำขนาด 120 มก/กกน้ำหนักตัว/วัน 1 มล.

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารสกัดจากกระชายดำขนาด 180 มก/กกน้ำหนักตัว/วัน 1 มล.

กลุ่มที่ 6 ป้อนสารสกัดจากवानชักมดลูกต่อกระชายดำ ขนาด 120:120 มก/กก น้ำหนักตัว/วัน 1 มล.

กลุ่มที่ 7 ป้อนสารสกัดจากวานชักมดลูกต่อกระชายดำ ขนาด 180:180 มก/กก

น้ำหนักตัว/วัน 1 มล.

เก็บหนูทดลองในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 24-25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง คือตั้งแต่เวลา 06.00 น. ถึงเวลา 18.00 น. และมีมืดตั้งแต่เวลา 18.00 น. ถึงเวลา 06.00 น. ให้ อาหารสำเร็จรูป และน้ำตามปกติตลอดระยะเวลาการทดลอง

#### 4. การตรวจสอบผลการทดลอง

เมื่อครบกำหนด 30 วัน นำหนูกทุกกลุ่มมาชั่งน้ำหนักแล้วผ่าตัดเพื่อตรวจสอบผลดังนี้

##### 4.1 การตรวจสอบผลต่ออวัยวะสืบพันธุ์

ทำการสลับหนูแล้วผ่าตัดเปิดช่องท้อง ตัดเอารังไข่และมดลูก ออกมาวางบน Petri dish หลังจากนั้นใช้กรรไกรเลาะส่วนไขมันที่ติดมาจากรังไข่และมดลูกออกให้หมดก่อนนำไปชั่ง ส่วนการตัดต่อมน้ำนมให้ทำการเลาะชั้นผิวหนังออกจากชั้นกล้ามเนื้อ หลังจากนั้นใช้มีดตัดต่อมน้ำนมออกจากตัวหนูแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัว คัดน้ำหนักอวัยวะต่าง ๆ ที่ได้ออกมาในหน่วยของกรัมเปอร์เซ็นต์ บันทึกผลที่ได้

##### 4.2 การตรวจสอบผลทางด้านเนื้อเยื่อวิทยา

เก็บตัวอย่างต่อมน้ำนมชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.5 ซม. โดยเลือกส่วนของต่อมน้ำนมในตำแหน่งเดียวกัน นำมาเก็บไว้ในน้ำยารักษาสภาพ (Bouin's fixative) นำมา Dehydrate ด้วย Grading alcohol แล้วทำการ Clearing ด้วย Xylene จากนั้นนำมาทำ Paraffin section หนา 7 ไมโครเมตร ( $\mu\text{m}$ ) และย้อมสีด้วย Hematoxylin และ Eosin ต่อจากนั้น Mount ด้วย Permount นำไปอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมกับบันทึกภาพ

#### 5. การตรวจสอบทางสถิติ

ใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และการวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ Least Significance Difference (LSD) โดยโปรแกรม SPSS For Windows