ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 (yeast extract – malt extract agar)

Bacto – yeast extract 4.0 กรัม

Bacto – malt extract 10.0 กรัม

Bacto – glucose 4.0 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร สำหรับเลี้ยงเชื้อ รหัส CP-PH

Bacto – yeast extract 4.0 กรัม

Bacto – malt extract 10.0 กรัม

Bacto – Glucose 4.0 กรัม

น้ำทะเล+น้ำกลั่น 200+800 มิลลิลิตร สำหรับเลี้ยงเชื้อ รหัส CH , A

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 และ 2000 มิลลิลิตร ตามลำดับ และส่วนที่ทำเป็นอาหารแข็งเติม 1.5 % Agar ทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ขวดที่เตรียมไว้ แล้วนำไปใส่หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. วิธีวิเคราะห์ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$

2.1 วิธีเตรียมสารละลาย

0.2 mM DPPH ในเมทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (DPPH; M.W. = 394.323 g/mol)

- ชั่งน้ำหนักสาร DPPH 0.00394 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4.0 องศาเซลเซียส สารละลายที่เตรียมเก็บได้ไม่เกิน 3 วัน

2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid

ชั่งน้ำหนัก Ascorbic acid 0.002 กรัม (จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ละลายด้วยเมทานอล 1000 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้เป็นสารละลายมาตรฐาน stock ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางสารละลายมาตรฐาน stock ที่เตรียมไว้ด้วยเมทานอล ให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ทำการทดสอบช่วง 0.781 – 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

2.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างแอคติโนมัยซีท 0.008 กรัม (จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ละลายด้วยเมทานอล 1000 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้เป็นสารละลาย stock ความเข้มข้น 8000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางสารละลายมาตรฐาน stock ที่เตรียมไว้ด้วยเมทานอล ให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ทำการทดสอบช่วง 3.13 – 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

3. วิธีวิเคราะห์ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS$^{+\bullet}$

3.1.วิธีเตรียมสารละลายอนุมูล ABTS$^{+\bullet}$

- เตรียมสารละลาย ABTS$^{+\bullet}$ ให้มีความเช้มช้น 7 mM โดยชั่ง ABTS 0.0192 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

- เตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 140 mM โดยชั่งโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.3784 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

- ผสมสารละลาย 7 mM ABTS 2 มิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 140 mM ($K_2S_2O_8$) 35.5 ไมโครลิตร (ซึ่งทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ประมาณ 2.45 mM) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้งาน

- เจือจางสารละลายอนุมูล ABTS$^{+\bullet}$ ด้วยเมทานอล โดยปิเปตสารละลาย ABTS$^{+\bullet}$ stock มา 140 ไมโครลิตร กับเมทานอล 7 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.70$\pm$0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (วัดค่าได้ 0.714 นาโนเมตร)

3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน โทรลอกซ์ (Trolox)

- ชั่งน้ำหนัก Trolox 0.002 กรัม (จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ละลายด้วยเมทานอล 1000 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้เป็นสารละลายมาตรฐาน stock ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางสารละลายมาตรฐาน stock ที่เตรียมไว้ด้วยเมทานอล ให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.195 – 25.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.3 การเตรียมสารตัวอย่าง

- ชั่งตัวอย่างแอคติโนมัยซีท 0.002 กรัม (จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ละลายด้วยเมทานอล 1000 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้เป็นสารละลาย stock ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางสารละลายตัวอย่าง stock ที่เตรียมไว้ด้วยเมทานอล ให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 3.13 – 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร