บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. อุปกรณ์การศึกษา

1.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.1.1 บีกเกอร์ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 ml

1.1.2 ปิเปตขนาด 5 และ 10 ml

1.1.3 กระบอกตวงขนาด 25, 50 และ 1,000 ml

1.1.4 ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 ml

1.1.5 ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 ออนซ์ พร้อมฝาพลาสติกทนความร้อน

1.1.6 แท่งแก้วสำหรับคนสาร

1.1.7 ช้อนตักสาร

1.1.8 ปากคีบ

1.1.9 มีดผ่าตัด พร้อมใบมีดเบอร์ 11

1.1.10 จานแก้ว (petri dish)

1.1.11 อะลูมิเนียมฟอยล์

1.1.12 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.1.13 เตาอบความร้อน (hot air oven)

1.1.14 เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)

1.1.15 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet)

1.1.16 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

1.1.17 ตู้เย็น (refrigerator)

1.1.18 เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)

1.1.19 กระดาษชั่งสารเคมี

1.1.20 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง (balance)

1.1.21 pipette tip ขนาดปริมาตร 200 และ 1,000 µl

1.1.22 micropipette ขนาดปริมาตร 20, 200 และ 1,000 µl (Gilson, France)

1.1.23 ชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1.24 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน

1.1.25 เครื่องเขย่าแบบวน (orbital platform shaker) ที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที

1.2 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ antioxidant activity

1.2.1 96 well plate

1.2.2 micro-titer plate reader (BIOTEX ®)

1.2.3 กระดาษกรอง Whatman No 1.

1.2.4 nylon syringe filter 0.22 µm

1.2.5 syringe ขนาด 5 ml

1.2.6 Eppendorf tube ขนาด 2 ml

1.2.7 หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 5 ml

1.2.8 หลอดทดลอง

1.2.9 homogenizer (WiseTis ®)

1.2.10 กรวยแก้ว

1.2.11 แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์

1.2.12 พาราฟิล์ม

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ DPPH scavenging activity

2.1.1 absolute ethanol

2.1.2 95% ethanol

2.1.3 $DPPH^{\cdot}$ (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

2.1.4 methanol

2.1.5 ascorbic acid

2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ phenolic compounds

2.2.1 Folin-Ciocalteu's reagent

2.2.2 gallic acid

2.2.3 2% sodium carbonate (Na_2CO_3)

2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ flavonoid

2.3.1 2% aluminum chloride ($AlCl_3$)

2.3.2 rutin

3. วิธีการศึกษา

3.1 เก็บตัวอย่างผักดีดจากตำบลดู่ใต้ อำเภอเมือง จังหวัดน่าน โดยเก็บส่วนใบ ดอก และผลมาทำตัวอย่างแห้งเพื่อตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ และเก็บผลแก่เพื่อนำเมล็ดมาใช้ในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

3.2 เพาะเมล็ดผักดีดในหลอดทดลอง

3.2.1 นำเมล็ดผักดีดที่สมบูรณ์ และแก่เต็มที่ ล้างน้ำสะอาด แช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย NaOCl 3% เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (ทำในตู้ปลอดเชื้อ)

3.2.2 นำเมล็ดมาวางเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง MS (Murashige and Skoog, 1962) (ภาคผนวก ก) ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

3.2.3 เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 °C แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน จนกระทั่งเมล็ดงอกเป็นต้นอ่อนและเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นย้ายต้นอ่อนลงเลี้ยงในอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ เพื่อใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการทดลอง

3.3 ศึกษาผลของไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดยอดของผักดีด

3.3.1 ใช้ตัวอย่างพืชที่เลี้ยงไว้ในข้อ 3.2.3 มาตัดให้ได้ชิ้นส่วนใบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และปล้องขนาด 0.3-0.4 เซนติเมตร เลี้ยง

แยกกันในอาหารกึ่งแข็ง MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนิน ได้แก่ benzyladenine (BA) หรือ kinetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังในตารางที่ 7 ซึ่งมี 11 ชุดการทดลองในแต่ละชิ้นส่วน โดยในแต่ละชุดการทดลองมีจำนวนซ้ำละ 10 ขวด (replication) และเลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละ 2 ชิ้น

3.3.2 วางชุดการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 ° C แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์

3.3.3 เก็บผลการทดลองโดยบันทึกจำนวนชิ้นส่วนใบ หรือ ปล้องที่เกิดยอด จำนวนยอดที่เกิดใหม่ต่อชิ้นส่วน น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอด

3.3.4 ทำการทดลองจากข้อ 3.3.1-3.3.4 ซ้ำอีกหนึ่งรอบ

ตารางที่ 7 ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ชักนำให้เกิดยอด จากชิ้นส่วนใบและปล้องของผักดีดในอาหารกึ่งแข็ง MS

ชุดการทดลองที่	ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช	ความเข้มข้น (mg/L)
1	-	0
2	benzyladenine (BA)	0.25
3		0.5
4		1
5		2
6		3
7	kinetin	0.25
8		0.5
9		1
10		1.5
11		2

3.4 ศึกษาผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของผักดีด

3.4.1 ใช้ตัวอย่างที่เลี้ยงไว้ในข้อ 3.2.3 มาตัดให้ได้ชิ้นส่วนใบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และปล้องขนาด 0.3-0.4 เซนติเมตร เลี้ยงแยกกันในอาหารกึ่งแข็ง MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), BA และ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังในตารางที่ 8 ซึ่งมี 15 ชุดการทดลองในแต่ละชิ้นส่วน โดยในแต่ละชุดการทดลองมีจำนวนซ้ำละ 10 ขวด (replication) และเลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละ 2 ชิ้น

3.4.2 วางชุดการทดลองแบบ RCBD ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 $^{\circ}$C แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์

3.4.3 เก็บผลการทดลองโดยบันทึกจำนวนชิ้นส่วนใบ หรือ ปล้องที่เกิดแคลลัส น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส และบันทึกลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น

3.4.4 ทำการทดลองจากข้อ 3.4.1-3.4.2 ซ้ำอีกหนึ่งรอบ

ตารางที่ 8 ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส จากชิ้นส่วนใบและปล้องของผักดีดในอาหารกึ่งแข็ง MS

ชุดการทดลองที่	ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ความเข้มข้น (mg/L)		
	2,4-D	NAA	BA
1	-	-	-
2	0.1	-	0
3			0.25
4			0.5
5			1
6	1	-	0
7			0.25
8			0.5
9			1
10	2	-	0
11			0.25
12			0.5
13			1
14	0.1	1	0.25
15			0.5

3.5 เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของผักดีดเพื่อศึกษาการเติบโต และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

3.5.1 ชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้องด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.1 mg/L ตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.4 จากนั้นย้ายแคลลัสวางลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.25 mg/L ร่วมกับ BA 0.05 mg/L เพื่อเพิ่มจำนวนแคลลัสสำหรับใช้ในการทดลอง

3.5.2 นำแคลลัสในข้อ 3.5.1 มาเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.25 mg/L ร่วมกับ BA 0.05 mg/Lโดยใช้แคลลัส 300 มิลลิกรัมต่ออาหารเหลว 12 มิลลิลิตร ใน flasks ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยวางชุดการทดลองแบบ RCBD ทำการทดลองจำนวน 2 รอบ รอบละ 50 flasks

3.5.3 วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 rpm ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชควบคุมอุณหภูมิ 25±2 °C แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน

3.5.4 เก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอย ณ วันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 จำนวน 3 flasks ในแต่ละช่วงเวลา เพื่อศึกษาการเติบโตของเซลล์แขวนลอย โดยบันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

3.5.5 เตรียมสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยในแต่ละช่วงเวลาเช่นเดียวกับ 3.5.4 จำนวน 3 flasks ในแต่ละช่วงเวลา เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างสดจากส่วนใบ และปล้องของผักดีดที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และใบจากธรรมชาติทั้งตัวอย่างสด และแห้ง โดยนำตัวอย่างสดที่ทราบน้ำหนักมาสกัดด้วย เอทานอล ในสัดส่วน 1 กรัมต่อ 5 มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างแห้งที่ทราบน้ำหนักมาสกัดด้วยเอทานอลในสัดส่วน 1 กรัมต่อ 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียด ด้วยเครื่อง homogenizer รอจนกระทั่งตัวอย่างสดตกตะกอน หลังจากนั้นดูดส่วนใสด้วย micropipette มากรองผ่าน nylon syringe filter 0.22 µm เก็บสารสกัดตัวอย่างสดและแห้งใน Eppendorf tube ขนาด 2 ml ที่อุณหภูมิ -20 °C จนทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

3.5.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity assay (Hatano *et al.*, 1988)

3.5.6.1 เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM ใน methanol เก็บไว้ในที่มืดโดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ห่อหุ้มและแช่ในตู้เย็น

3.5.6.2 เตรียมสารสกัดสดและแห้งจากข้อ 3.5.5 โดยสารสกัดสดให้มีความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/ml และสารสกัดแห้งให้มีความเข้มข้น 2.06, 4.13, 8.25, 16.50, 33.00 mg/ml ด้วย absolute ethanol

3.5.6.3 ปิเปตสารสกัดสดและแห้งที่ได้จากข้อ 3.5.6.2 ลงใน 96 well plates ในปริมาตร 100 µl/well

3.5.6.4 เติมสารละลาย DPPH ลงใน 96 well plates ที่มีสารสกัดสดและแห้ง ความเข้มข้นต่างๆ ในปริมาตร 100 µl/well

3.5.6.5 เก็บ 96 well plates ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

3.5.6.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 517 nm ด้วยเครื่อง micro-plate reader

3.5.6.7 คำนวณค่า Scavenging activity (%) เพื่อนำไปสร้างกราฟ

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [\ (A_0 - A_1) / A_0\ ] \times 100$$

3.5.7 การวิเคราะห์ปริมาณ phenolic compounds (Slinkard and Singleton, 1977)

3.5.7.1 เตรียมสารสกัดสดและแห้งจากข้อ 3.5.5 ให้มีความเข้มข้น 200 mg/ml และ 33 mg/ml ตามลำดับ

3.5.7.2 ปิเปตสารสกัดสดและแห้งที่ได้ลงในหลอดทดลอง 100 µl

3.5.7.3 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 4.5 ml ลงไป

3.5.7.4 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent (dilute 3 เท่า) ปริมาตร 100 µl

3.5.7.5 เติมสารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 300 µl

3.5.7.6 เก็บหลอดทดลองไว้ในที่มืดโดยการห่อด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.5.7.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 670 nm ด้วยเครื่อง micro-plate reader

3.5.7.8 บันทึกค่าที่ได้เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาตร phenolic compounds ในสารสกัดสดและแห้งโดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid

3.5.8 การวิเคราะห์ปริมาณ flavonoid content (Djeridane *et al.*, 2006)

3.5.8.1 เตรียมสารสกัดสดและแห้งจากข้อ 3.5.5 ให้มีความเข้มข้น 100 mg/ml และ 16.50 mg/ml ตามลำดับ

3.5.8.2 ปิเปตสารสกัดสดและแห้งลงใน 96 well plate ในปริมาตร 100 µl

3.5.8.3 เติม 2% $AlCl_3$ ลงใน 96 well plate ปริมาตร 100 µl

3.5.8.4 เก็บ 96 well plates ในที่มืดโดยการห่อด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์เป็นเวลา 15 นาที

3.5.8.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 433 nm ด้วยเครื่อง micro-plate reader

3.5.8.6 บันทึกค่าที่ได้เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาตร flavonoid ในสารสกัดสดและแห้งโดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย rutin

3.6 วิเคราะห์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในโปรแกรม SPSS Statistic 17.0 (บริษัท SPSS Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา)