บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กระบอกตวงขนาด 100 และ 1,000 ml
2. ขวดแก้วขนาด 15 และ 30 ml
3. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 และ 75 cm^2
4. ขวด Duran ขนาด 250 500 และ 1,000 ml
5. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม
6. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม
7. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม
8. ช้อนตักสาร
9. ถุงมือยาง
10. บีกเกอร์ขนาด 250 และ 500 ml
11. ปากคีบ (forcep)
12. ปิเปตแก้วขนาด 5 และ 10 ml
13. สำลี
14. อะลูมิเนียมฟอยล์
15. อุปกรณ์กรองอาหารเลี้ยงเซลล์
16. Fetal Bovine Serum (Hyclone®)
17. Freezer box
18. Hot air oven (Binder)
19. L-Glutamine 200 mM (GIBCO®)
20. Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 ml
21. Penicillin Streptomycin (GIBCO®)
22. Pipette tip ขนาด 200 และ 1,000 µl
23. parafilm (laboratory film)
24. Trypsin-EDTA 1X (GIBCO®) , 0.5%

เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) (Olympus, CKX41)
2. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Ohaus, ARC 120)
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, AB304-S)
4. ตู้แช่แข็ง -20 °C (Sanyo, SF-C991 NG) และ -80 °C (Sanyo, MPF-392)
5. ตู้ถ่ายเชื้อ (biosafety Cabinet Class II) (GIBCO®)
6. ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) (Shellab, 2323-2)
7. ตู้เย็น (LFS)
8. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) (Tomy, SS-325)
9. Automatic pipette 0.5-1000 ml (Biohit)
10. Pipette boy (TECNOMARA)
11. Rocking platform (ELMI, S 4)
12. Vortex mixer (Gemmy Industrial Copp., VM-300)
13. Water bath (Memmert, WB-10)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์

1. เชื้อไวรัสก่อโรคเริม

   1.1 Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) strain F

   1.2 Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) strain G

เซลล์เพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ก)

1. African Green Monkey Kidney cell (Vero cell) ได้รับความอนุเคราะห์จาก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. Human cervical carcinoma cell (HeLa cell) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. André M. Lieber, University of Washington, Seattle, USA

ยาที่ใช้ในการวิจัย

1. Acyclovir [acycloguanosine, 9-2-(hydroxyethoxy methyl) guanine] บริษัท SIGMA-Aldrich CHEMIE Gmbh Co.Po., Germany

2. Etoposide [4'-Demethylepipodophyllotoxin 9-(4,6-O-ethylidene-ß-D-glucopyranoside), VP-16-213] บริษัท SIGMA-Aldrich CHEMIE Gmbh Co.Po., Germany

สารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

สารสกัดจากโพรพอลิส ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท บี โปรดักส์ อินดัสตรี ตำบลมะเขือแจ้ อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ภาคผนวก ข)

1. DMEM Growth medium
2. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)
3. Maintenance medium
4. MEM Growth medium
5. Minimum essential medium (MEM)
6. Overlay medium

สารเคมีและสีย้อม (ภาคผนวก ค)

1. Crystal violet ใน 1% ethanol, 0.1%
2. Carboxymethyl cellulose, 1.5% (W/V)
3. Dimethyl sulphoxide (DMSO)
4. EDTA, 1% (W/V)
5. Ethanol, 70%
6. Gelatin, 0.4%
7. $NaHCO_3$, 10% (W/V)
8. Phosphate Buffer Saline (PBS)
9. Sodium Carboxy Methylcellulose, 1.5% (W/V)
10. Trypsin, 1% (W/V)
11. Trypsin-EDTA, 0.1% (W/V)

วิธีการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

1.1 การเพาะเลี้ยง Vero cell

1.1.1 นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียวบนผิวขวดพลาสติกขนาดพื้นที่ผิว 25 cm^2 มาทำการ subculture โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวด แล้วล้างด้วย PBS (1X) 2 ครั้ง

1.1.2 เติม 0.1% trypsin-EDTA 300 µl ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที เมื่อสังเกตเห็นเซลล์เริ่มแยกตัวออกจากกัน จึงเท 0.1% trypsin-EDTA ทิ้ง

1.1.3 เติม MEM growth medium 3.0 ml ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการดูดปล่อยอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากผิวขวดเลี้ยงเซลล์ และทำให้เซลล์แยกตัวกระจายออกเป็นเซลล์เดี่ยว

1.1.4 แบ่งเซลล์ใส่ขวดใหม่ ขวดละ 1.0 ml เติม MEM growth medium ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ให้ครบ 5 ml

1.1.5 นำเซลล์ไปบ่มที่ 37 °C ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อให้เซลล์เจริญเต็มพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์

1.2 การเพาะเลี้ยง Vero cell ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม

1.2.1 นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียวบนผิวขวดพลาสติกขนาดพื้นที่ผิว 25 cm^2 มาทำการ subculture โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวด แล้วล้างด้วย PBS (1X) 2 ครั้ง

1.2.2 เติม 0.1% trypsin-EDTA 300 µl ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที เมื่อสังเกตเห็นเซลล์เริ่มแยกตัวออกจากกัน จึงเท 0.1% trypsin-EDTA ทิ้ง

1.2.3 เติม MEM growth medium 3.0 ml ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการดูดปล่อยอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากผิวขวดเลี้ยงเซลล์และทำให้เซลล์แยกตัวกระจายออกเป็นเซลล์เดี่ยว

1.2.4 เติม MEM growth medium เพิ่มอีก 10 ml จากนั้นเติมลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม หลุมละ 500 µl

1.2.5 นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มที่ 37 °C ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิวของจานเพาะเลี้ยง

1.2.6 นำมาตรวจดูลักษณะเซลล์ภายใต้กล้อง inverted microscope เมื่อเห็นเซลล์เจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียวเต็มผิวพลาสติกทุกหลุม จึงนำไปทำการทดสอบต่อไป

1.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell)

1.3.1 นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียวบนผิวขวดพลาสติกขนาดพื้นที่ผิว 25 cm^2 มาทำการ subculture โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวด แล้วล้างด้วย PBS(1X) 1 ครั้ง

1.3.2 เติม 0.05% trypsin-EDTA 1.0 ml ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที ให้เซลล์หลุดออกจากพื้นขวดเพาะเลี้ยง

1.3.3 เติม DMEM growth medium 1.0 ml ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการดูดปล่อยอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อทำให้เซลล์แยกตัวกระจายออกเป็นเซลล์เดี่ยว

1.3.4 แบ่งเซลล์ใส่ขวดใหม่ ขวดละ 0.5 ml เติม DMEM growth medium ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ให้ครบ 5 ml

1.3.5 นำเซลล์ไปบ่มที่ 37 ° C ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อให้เซลล์เจริญเต็มพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์

2. การเพิ่มปริมาณไวรัส

2.1 เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เจริญเต็มพื้นผิวขวดเพาะเลี้ยง โดยเหลืออาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ประมาณ 1 ml

2.2 เติมเชื้อไวรัส $1x10^6$ PFU/ml 100 µl เขย่าโดยใช้ rocking platform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์ เมื่อครบเวลาเทไวรัสส่วนเกินทิ้งไป

2.3 ล้างเซลล์ด้วย PBS (1X) 2 ครั้ง เติม maintenance medium 3 ml

2.4 นำไปบ่มที่ 37° C ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 2-3 วัน

2.5 ตรวจการเกิด Cytopathic effect (CPE) ด้วย inverted microscope จนกระทั่งเซลล์ติดเชื้อไวรัสทั้งหมด (CPE+4)

2.6 ทำการเก็บไวรัสโดยนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสไปแช่แข็งที่ -80 ° C และนำมาทำการละลายอย่างรวดเร็ว นำกลับไปแช่แข็งที่ -80° C และทำการละลายใหม่อีกครั้ง เพื่อให้เซลล์แตก และเก็บ stock ไวรัสในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ -80° C

3. ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโพรพอลิสต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (Vero cell) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell)

3.1 เตรียมสารสกัดโพรพอลิส

3.1.1 นำสารสกัดโพรพอลิสที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท บีโปรดักส์อินดัสตรี้ จำกัด มาละลายใน Dimethyl sulphoxide (DMSO)

3.1.2 เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา เก็บสารสกัดที่อุณหภูมิประมาณ 4°C

3.2 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโพรพอลิสต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (Vero cell) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) (Reed and Muench, 1938)

3.2.1 นำ stock สารสกัดโพรพอลิสมาเจือจางด้วย Minimum Essential Medium (MEM) แบบ 2 เท่าลำดับส่วน ตั้งแต่ 1 : 2 – 1 : 2 [12]

3.2.2 เติมสารสกัดโพรพอลิสในแต่ละความเจือจาง ลงในหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม จากนั้นเติมเซลล์เพาะเลี้ยงลงในทุกหลุม

3.2.3 นำไปบ่มที่ 37°C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 4 วัน

3.2.4 ย้อมสีเซลล์ด้วย 0.1% crytal violet ใน 1% ethanol ทิ้งไว้ 15 นาที และล้างสีออก คำนวณความเข้มข้นของสารละลายที่เป็นพิษต่อเซลล์ 50% (CD_{50})

4. ตรวจหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque titration assay

4.1 นำเซลล์ที่เจริญเต็มหลุมจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม หาปริมาณไวรัส โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมจนเหลืออาหารในหลุม 200 µl

4.2 เจือจางไวรัสจาก stock โดยเจือจางแบบ 10 เท่าลำดับส่วน ตั้งแต่ 1:10 – 1:10^6

4.3 เติมไวรัสแต่ละความเจือจางลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม หลุม ละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนเครื่อง rocking platform เพื่อให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์

4.4 เติม overlay medium ลงในทุกหลุมๆ ละ 400 µl นำไปบ่มที่ 37 °C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลาประมาณ 3 – 4 วัน

4.5 ดูด medium แต่ละหลุมทิ้ง แล้วล้างด้วย PBS (1X) 1 ครั้ง ประมาณ 200 µl ทุกหลุม และย้อมสีเซลล์ติดเชื้อด้วย 0.1% crystal violet ใน 1% ethanol โดยหยดลงในแต่ละหลุม ประมาณ 3 – 4 หยดให้ท่วมเซลล์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 – 20 นาที แล้วดูดสีย้อมทิ้ง

4.6 ตรวจดูการติดสีย้อมของเซลล์ติดเชื้อ และนับปริมาณ plaque ซึ่งเป็นบริเวณของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและไม่ติดสีย้อม แล้วทำการคำนวณหาปริมาณไวรัส โดยมีหน่วยเป็น plaque forming unit /ml (PFU/ml)

5. การทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งเชื้อ HSV โดยวิธี plaque reduction assay

5.1 การทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมก่อนไวรัสเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง

5.1.1 เพาะเลี้ยง Vero cell ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม จนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิว โดยตรวจดูด้วยกล้อง Inverted microscope

5.1.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เจริญเต็มพื้นผิว ทิ้งไปหลุมละ 300 µl

5.1.3 เติมสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ลงในหลุมที่ต้องการทดสอบ ปริมาณ 200 µl เติม MEM ลงในหลุมไวรัสควบคุม ปริมาณ 200 µl

5.1.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนเครื่อง rocking platform

5.1.5 ทำการดูดสารแต่ละหลุมออก แล้วเติมไวรัสเจือจาง 1 X 10^{-6} PFU/ml ปริมาณ 100 µl ลงในทุกหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์

5.1.6 เติม overlay medium ทุกหลุมๆ ละ 300 µl นำไปบ่มที่ 37°C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 3 วัน

5.1.7 ย้อมสีเซลล์ที่ติดเชื้อด้วย 0.1% crystal violet ตรวจดูการติดสีย้อมของเซลล์ และนับปริมาณ plaque เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบกับยาต้านไวรัส acyclovir

5.2 การทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมขณะไวรัสเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง

5.2.1 เพาะเลี้ยง Vero cell ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม จนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิว โดยตรวจดูด้วยกล้อง Inverted microscope

5.2.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เจริญเต็มพื้นผิว ทิ้งไปหลุมละ 300 µl

5.2.3 เติมไวรัสเจือจาง 1 X 10^{-6} PFU/ml ปริมาณ 100 µl ลงในทุกหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการเติมสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ลงใน

หลุมที่ต้องการทดสอบ ปริมาณ 200 µl เติม MEM ลงในหลุมไวรัสควบคุม ปริมาณ 200 µl

5.2.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนเครื่อง rocking platform

5.2.5 ทำการดูดสารแต่ละหลุมออก จากนั้นทำการเติม overlay medium ทุกหลุมๆละ 300 µl

5.2.6 นำไปบ่มที่ 37 °C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 3 วัน

5.2.7 ย้อมสีเซลล์ที่ติดเชื้อด้วย 0.1% crystal violet ตรวจดูการติดสีย้อมของเซลล์ และนับปริมาณ plaque เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบกับยาต้านไวรัส acyclovir

5.3 การทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมหลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง

5.3.1 เพาะเลี้ยง Vero cell ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม จนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิว โดยตรวจดูด้วยกล้อง Inverted microscope

5.3.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เจริญเต็มพื้นผิว ทิ้งไปหลุมละ 300 µl

5.3.3 เติมไวรัสเจือจาง 1 X 10^{-6} PFU/ml ปริมาณ 100 µl ลงในทุกหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์

5.3.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนเครื่อง rocking platform

5.3.5 เติมสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ลงในหลุมที่ต้องการทดสอบ ปริมาณ 200 µl เติม MEM ลงในหลุมไวรัสควบคุม ปริมาณ 200 µl

5.3.6 เติม overlay medium ทุกหลุมๆ ละ 300 µl นำไปบ่มที่ 37°C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 3 วัน

5.3.7 ย้อมสีเซลล์ที่ติดเชื้อด้วย 0.1% crystal violet ตรวจดูการติดสีย้อมของเซลล์ และนับปริมาณ plaque forming unit/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบกับยาต้านไวรัส acyclovir

5.4 การทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการทำลายอนุภาคเชื้อไวรัสก่อโรคเริมโดยตรง

5.4.1 ผสมสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 300 µl กับไวรัส 1x10^{6} PFU/ml 300 µl ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

5.4.2 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

5.4.3 นำส่วนผสมในแต่ละเวลาไปหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque titration assay ตามวิธีดังข้อ 4 และคำนวณหาปริมาณไวรัสที่ลดลง เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ผสมสารสกัดโพรพอลิส ที่เวลาทดสอบเดียวกัน

5.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมที่ระยะเวลาต่างๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง

5.5.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 6 หลุมจนเจริญเต็มพื้นผิว โดยตรวจดูด้วยกล้อง Inverted microscope

5.5.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิวทิ้งไป โดยให้เหลืออาหารเลี้ยงเซลล์เดิมในหลุมเพียงหลุมละ 1 ml

5.5.3 เติมไวรัสปริมาณ 1 x 10^6 PFU/ml ลงในทุกหลุม บ่มบนเครื่อง rocking platform ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5.5.4 ดูดไวรัสส่วนเกินทิ้งไป ล้างเซลล์ด้วย PBS (1X) 2 ครั้ง

5.5.5 เติม MEM ปริมาณ 1 ml ในกลุ่มไวรัสควบคุม (negative control) เติมสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปริมาณ 1 ml ในกลุ่มทดสอบ และเติมยาต้านไวรัส acyclovir ความเข้มข้นซึ่งยับยั้งเชื้อ HSV ได้ 50% ปริมาณ 1 ml ในกลุ่มยาควบคุม (positive control)

5.5.6 นำไปบ่มที่ 37 ^{O}C ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 0, 6, 12, 24 และ 30 ชั่วโมง เก็บไวรัสภายหลังการติดเชื้อ ณ เวลาต่างๆ ที่ตู้ -80 ^{O}C

5.5.7 ตรวจสอบผลการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสโดยสารสกัดและยาต้านไวรัสเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสควบคุม ณ เวลาต่างๆ โดยวิธี plaque titration assay ตามวิธีดังข้อ 4 และคำนวณหาปริมาณไวรัสที่ลดลงของแต่ละชั่วโมงทดสอบ

6. การทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) โดย APO*Percentage* apoptosis assay (Biocolor,UK)

6.3.1 เติม 0.4% gelatin 50 µl ลงในแต่ละหลุมของ 96 well tissue culture plate และ incubate 10-20 นาที

6.3.2 เติม HeLa cell ($2x10^4$-$5x10^4$ cells/ml) 200 µl ลงในแต่ละหลุม บ่มที่ 37 $^{\circ}$C ใน CO_2 incubator 24 ชั่วโมง และล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์

6.3.3 เติมสารสกัดโพรพอลิส หรือ apoptotic inducer (etoposide) 100 µl ลงในแต่ละหลุม บ่มที่ 37 °C ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง

6.3.4 ก่อนจะครบเวลาในการบ่ม 30 นาที นำ plate เติมสีย้อม APO*Percentage* 100 µl ลงในแต่ละหลุม และบ่มต่ออีก 30 นาที

6.3.5 ล้างเซลล์ที่ย้อมด้วย PBS (1X) 200 µl ในแต่ละหลุม 2 ครั้ง

6.3.6 นำเซลล์ไปถ่ายรูปโดยใช้กล้อง inverted microscope จะพบว่าเซลล์ที่เกิด apoptosis จะติดสีแดง ส่วนเซลล์ที่ไม่เกิด apoptosis หรือ เกิด necrosis จะไม่ติดสีย้อม

6.3.7 ทำการ elute สีย้อมออก โดยทำการเติม dye release 150 µl

6.3.8 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

6.3.9 นำมาคำนวณเปอร์เซ็นการเกิด apoptosis

$$\% = (\text{OD test} - \text{OD control}) \times 100$$

OD test = ค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

OD control = ค่าการดูดกลืนแสงของ control