

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการวิจัย

การเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำของมะหาดนั้นเตรียมได้จากการนำผงของเปลือก มะหาด น้ำหนัก 10 กรัม มาทำการสกัดด้วยน้ำทำให้ได้สารสกัด 1.34 กรัม คิดเป็นร้อยละ 13.4 ส่วนการเตรียมสารสกัดด้วยน้ำของราชพฤกษ์โดยการนำเอาเนื้อในของฝักแก่ของราชพฤกษ์ น้ำหนัก 18.95 กรัม มาทำการสกัดด้วยน้ำได้สารสกัด 9.01 กรัม คิดเป็นร้อยละ 47.55 ในขณะที่การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำของแก้ว โดยนำส่วนใบของแก่น้ำหนัก 162 กรัม มาทำการสกัดด้วยน้ำได้สารสกัด 3.27 กรัม คิดเป็นร้อยละ 2.02 นำสารสกัดที่ได้ของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมาละลายใน Tyrod's solution 100 ml. ได้ Stock ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดลอง (ตาราง 4)

ตาราง 4 ผลของการเตรียมสารสกัดด้วยน้ำของพืชสมุนไพร

พืชสมุนไพร	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)
มะหาด	13.4
ราชพฤกษ์	90.1
แก้ว	32.7

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม 0.2 M Phosphate buffer

โดยการเตรียม Stock solution ของสาร A และ สาร B จากนั้นผสมสาร A และ B ในอัตราส่วน 23 : 77 ซึ่งจะได้ 0.2 M Phosphate buffer pH= 7.3 หากต้องการทำให้เป็น 0.1 M phosphate buffer ก็ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 1

สาร A 0.2 M Sodium phosphate monobasic

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 กรัม

หรือ

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.21 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

สาร B 0.2 M Sodium phosphate dibasic

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.61 กรัม

หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัม

หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.64 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

การเตรียมน้ำยาคงสภาพของออสเมียมเทตรออกไซด์ (Osmic acid fixative)

เตรียมสารละลาย stock ของ 4 % OsO_4 (ทำในตู้ดูดไอสารเคมี)

1. นำหลอดแก้วที่มีผลึก OsO_4 บรรจุอยู่ (ขนาด 1 กรัม) มาทำความสะอาดโดยล้างน้ำ เช็ดให้สะอาดและแห้ง
2. ห่อหลอดแก้วที่มี OsO_4 อยู่ ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ตามยาว

3. ทูบหลอดแก้วในข้อ 2 ให้แตก และแกะห่อออก ถ่ายลงในเออร์เลนไมเออร์ฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 ml.
4. เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร (เพื่อจะได้สารละลาย OsO_4 ที่มีความเข้มข้น 4 %) เขย่าให้ดี ปิดปากภาชนะด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) 2 ชั้น นำฟลาสก์นี้ไปใส่ในขวดแก้วปากกว้างมีฝาปิดอีกชั้นหนึ่ง แช่ในตู้เย็นทิ้งไว้ข้ามคืน OsO_4 จะละลายน้ำได้ช้า
5. วันรุ่งขึ้นกรองเศษแก้วออกจากสารละลายดังกล่าว ด้วยกระดาษกรองเนื้อหยาบ เทสารละลายลงในขวดแก้วมีจุก เก็บขวดแก้วในภาชนะขนาดใหญ่มีฝาปิดอีกชั้นหนึ่ง และเขียนป้ายหรือทำสลาก เก็บไว้เป็นสารละลายสำรองเพื่อเตรียมน้ำยาสภาพต่อไป แต่ต้องเก็บไว้ในตู้เย็นตลอดเวลา

การเตรียมสารละลายของ 1% OsO_4

โดยการผสมของดังสารละลายดังนี้

4 % OsO_4 1 ส่วน

0.1 M phosphate buffer 2 ส่วน

น้ำกลั่น 1 ส่วน

การเตรียม 10 % Paraformaldehyde solution

โดยชั่ง paraformaldehyde (powder) 2.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและอุ่นให้ถึงอุณหภูมิ 60 -65 องศาเซลเซียส ค่อยๆ เติม 1N NaOH ลงในสารละลาย 2-3 หยด จนสารละลายในทิ้งไว้ให้ เย็นที่อุณหภูมิห้อง

Paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative (Karnovsky's fixative) { 2.5 % glutaraldehyde }

0.1 M phosphate buffer 50 มิลลิลิตร

10 % paraformaldehyde 20 มิลลิลิตร

25 % glutaraldehyde 10 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย เพื่อเตรียมตัวอย่างพยาธิ

1. 0.85 % NaCl

ชั่ง NaCl 8.5 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2. 1% pepsin

ชั่ง pepsin 10 กรัม

เติม Concentrated HCl 10 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหารเลี้ยงพยาธิ Tyrod's solution

โดยการผสมของสารดังต่อไปนี้

NaCl	6.5 กรัม
NaHPO ₄	0.01 กรัม
KCl	0.14 กรัม
CaCl ₂	0.12 กรัม
Glucose	2.0 กรัม
น้ำกลั่น	750 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

แผนภูมิการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ตัวอย่างของพยาธิ



Fixation: 2.5 % glutaraldehyde ที่ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
Pre fixed 1% osmium tetroxide เป็นเวลา 2 ชั่วโมง



Dehydration: เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%
และ 100% ขึ้นตอนละ 30 นาทีและสุดท้ายด้วย อะซีโตน นาน 30 นาที



ขั้นตอนทำตัวอย่างให้แห้งด้วยเครื่อง critical point dryer



ติดตัวอย่างบน stub แล้วนำไปฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง



ศึกษาด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล

ภัสสรณ์พัฒน์ หลวงไผ่

วัน เดือน ปี เกิด

19 มกราคม 2519

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย

จากโรงเรียนสวนบุญโญปถัมภ์ ลำพูน ปีการศึกษา 2536

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา

จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2540

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved