

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องมือ

- 3.1.1.1 กล้องจุลทรรศน์(Light microscope, Olympus)
- 3.1.1.2 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius)
- 3.1.1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius)
- 3.1.1.4 เครื่องทำน้ำเย็น (Eyela cool)
- 3.1.1.5 เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave, Tommy รุ่น SS-325)
- 3.1.1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Beckman)
- 3.1.1.7 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer, TECHNE)
- 3.1.1.8 เครื่องระเหย (Rotary evaporator, Buchi)
- 3.1.1.9 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH-Meter, Schott)
- 3.1.1.10 เครื่องอบความร้อนแห้ง (Hot air oven, Memmert)
- 3.1.1.11 เครื่อง ultrasonication bath (Gust)
- 3.1.1.12 เครื่องUV (Fotodyne)
- 3.1.1.13 ชุดสกัด (Soxhlet apparatus,Quickfit)
- 3.1.1.14 ชุด run gel (Myrun)
- 3.1.1.15 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิและคาร์บอนไดออกไซด์ (Incubator, NuAire)
- 3.1.1.16 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow Class II, NuAire)
- 3.1.1.17 ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -4° C (Philco)
- 3.1.1.18 ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -85 ° C (NuAire)
- 3.1.1.19 แท่นให้ความร้อน (Hot plate, Corning)
- 3.1.1.20 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Memmert)

3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์เครื่องแก้ว

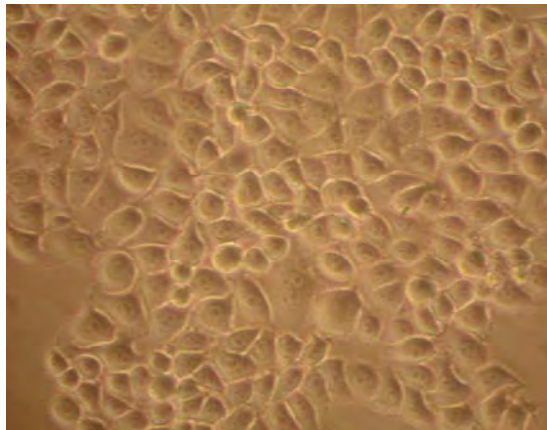
- 3.1.2.1 กระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร
- 3.1.2.2 กระบอกตวงขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.1.2.3 กระบอกจุ่มขนาด 5 มิลลิลิตร
- 3.1.2.4 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.1.2.5 ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 และ 75 ตารางเซนติเมตร
- 3.1.2.6 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ 6 หลุม
- 3.1.2.7 ตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร
- 3.1.2.8 ตัวกรองอาหาร
- 3.1.2.9 ตัวปั๊มอากาศ
- 3.1.2.10 โถดูดความชื้น
- 3.1.2.11 ปีกเกอร์ขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3.1.2.12 ปีเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.1.2.13 สไลด์ Heamacytometer
- 3.1.2.14 หลอดทดลอง (test tube)
- 3.1.2.15 หลอดปั่นเหวี่ยง
- 3.1.2.16 หน้ากากกันแสง UV
- 3.1.2.17 Autopipette ขนาด 1-10 μ l
- 3.1.2.18 Autopipette ขนาด 50-200 μ l
- 3.1.2.19 Autopipette ขนาด 100-1000 μ l

3.2 สารเคมี

3.2.1	Acetone	Labscan
3.2.2	Agarose gel	Gibco
3.2.3	Chloroform	Labscan
3.2.4	Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma
3.2.5	Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Fluka
3.2.6	Ethidium bromide	Sigma
3.2.7	Fetal Bovine Serum	Hyclone
3.2.8	Hexane	Labscan
3.2.9	Isoamyl alcohol	Labscan
3.2.10	DNA ladder 1 Kb	Invitrogen
3.2.11	Methanol	Labscan
3.2.12	Phenol	Labscan
3.2.13	Proteinase K	USB
3.2.14	Ribonuclease A	Ameresco
3.2.15	Sodium bicarbonate	Sigma
3.2.16	Sodium chloride	Sigma
3.2.17	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Fluka
3.2.18	Sodium hydroxide	Fluka
3.2.19	Trypan blue	Sigma
3.2.20	Trypsin 1: 250	Sigma

3.3 เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 HeLa (Human cervical adenocarcinoma)



รูปที่ 3.1 Human cervical adenocarcinoma cell (ATCC CCL 2)

ลักษณะ

Epithelial-like

อวัยวะ

ปากมดลูก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

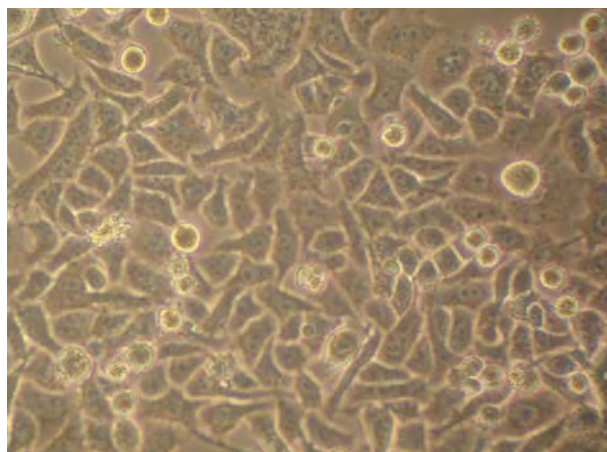
Minimum essential medium (MEM)

ที่มา

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนนิยาสัตว์

3.3.2 KB (Human mouth epidermal carcinoma)



รูปที่ 3.2 Human mouth epidermal carcinoma (ATCC CCL 17)

ลักษณะ

Epithelial-like

อวัยวะ

ช่องปาก

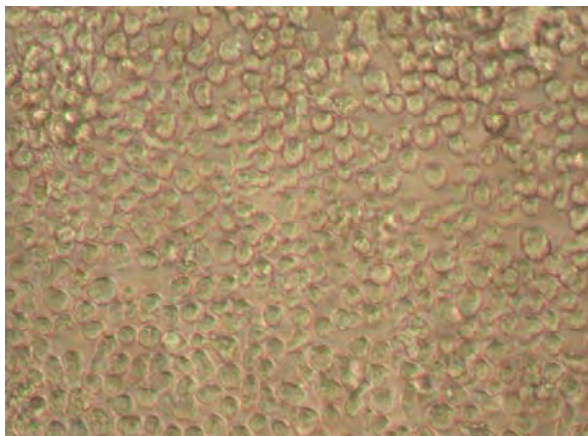
อาหารเลี้ยงเชื้อ

Minimum-essential medium (MEM)

ที่มา

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

3.3.3 P388 (Murine leukemia)



รูปที่ 3.3 Murine leukemia (ATCC CCL 46)

ลักษณะ Lymphoblast-like

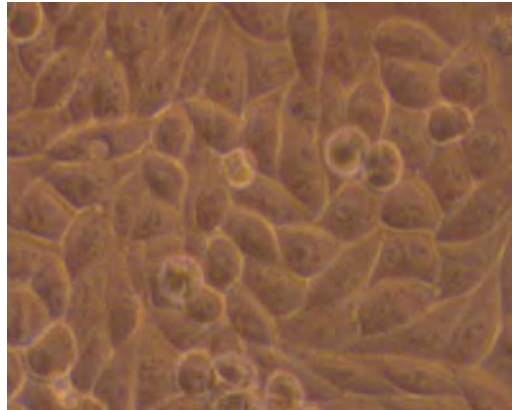
อวัยวะ เม็ดโลหิตขาว

อาหารเลี้ยงเชื้อ Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640)

ที่มา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

มหาวิทยาลัยศิลปากร งามนวลสุนทร

3.3.4 SW620 (Human colon adenocarcinoma)



รูปที่ 3.4 Human colon adenocarcinoma (ATCC CCL 227)

ลักษณะ Epithelial -like

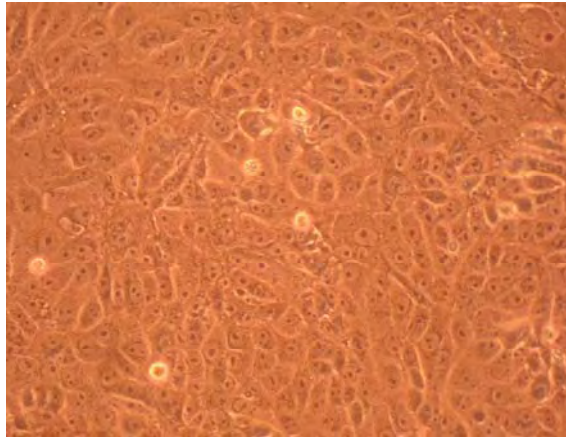
อวัยวะ ลำไส้ใหญ่

อาหารเลี้ยงเชื้อ Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640)

ที่มา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสุโขทัย

3.3.5 Vero (African green monkey kidney fibroblast)



รูปที่ 3.5 Vero cell (ATCC CCL 81)

ลักษณะ Fibroblast-like

อวัยวะ ไต (ลิง)

อาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum essential medium (MEM)

ที่มา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสุพรรณบุรี

3.4 พืชที่ใช้ในงานวิจัย

3.4.1. ชื่อวิทยาศาสตร์ *Anethum graveolens* L.

วงศ์ Umbelliferae

ชื่อสามัญ ผักชีลาว (Dill)

ชื่ออื่น/ชื่อท้องถิ่น เทียนตักแตน



มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 3.6 ผักชีลาว

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ผักชีลาวเป็นพืชล้มลุกตระกูลเดียวกับผักชี ลำต้นสีเขียวเข้มขนาดเล็ก ลักษณะใบเป็นใบประกอบแบบขนนก สีเขียวสดออกเรียงสลับกัน ดอกมีขนาดเล็กสีเหลืองเป็นช่อ ก้านดอกมีลักษณะคล้ายซี่ร่ม ผลแก่เป็นรูปไข่แบนสีน้ำตาลอมเหลืองการบริโภครับประทานทั้งในรูปผักสดและแห้งหรือใช้เป็นเครื่องเทศ

สารสำคัญที่พบ

ผลผักชีลาวมีน้ำมันหอมระเหยซึ่งประกอบไปด้วย สารดิลลาโนไซด์ สารประเภทกรดฟีนอลิก โปรตีน ไขมันเป็นต้นโดยปริมาณน้ำมันที่ได้จะขึ้นอยู่กับแหล่งเพาะปลูกและฤดูกาลที่เก็บเกี่ยว น้ำมันผักชีลาวที่ได้จากการนำผลแห้งไปกลั่นด้วยไอน้ำจะพบ คาร์โวนดี - ไล โมโนอัลฟา - เฟลเลน ดีรีน สารอื่นที่มีปริมาณรองลงมาคือ ไดไฮโดรคาร์โวน ยูจีนอล ไพนีนและอะนีทอล เป็นต้น

สรรพคุณทางยาโบราณ

ผลแก่แห้งบดชงกับน้ำดื่มวันละ 4 – 5 แก้ว แก้อาการปวดท้อง แน่นท้อง ท้องอืด ท้องเฟ้อ ช่วยขับลมหรือใช้ทั้งต้นสดของผักชีลาวผสมกับนมให้เด็กอ่อนดื่มแก้ท้องอืดท้องเฟ้อได้เช่นกัน ส่วนน้ำมันมักใช้ผสมในยาอายุอาหาร ทั้งต้นใช้แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้วม แก้วเห็บซา และขับเหงื่อได้ ส่วนเมล็ดช่วยผายลมและเรอ แก้วหอบ บำรุงปอด แก้วไอ แก้วลมที่ทำให้สะอึก แก้วลมวิงเวียน แก้วอาเจียน ผลใช้ขับลม แก้วไอ แก้วหอบหืด และแก้คลื่นไส้อาเจียน ใบมีผลดีต่อกระเพาะม้าม และตับอีกทั้งมีวิตามินเอ ช่วยการทำงานของกระเพาะ (www. Doae.go th/library/html/2549/1809/Dill/index.htm)

3.4.2. ชื่อวิทยาศาสตร์ *Eryngium foetidum* L.

วงศ์ Umbelliferae

ชื่ออื่น/ชื่อท้องถิ่น หอมป้อมกุลา



รูปที่ 3.7 ผักชีฝรั่ง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ผักชีฝรั่งเป็นไม้ล้มลุกสูง 15 – 51 ซม. ลำต้นใบรูปไข่ ขอบขนานยาวรีปลายแหลม ฐานใบเรียวแหลม ริมใบหยักคล้ายฟันเลื่อย ใบยาว 7 – 15 ซม. กว้าง 1 – 2 ซม. ใบมีสีเขียว แต่ละครดกมี 5 – 7 กลีบ ผลมีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.

ประโยชน์ทางโภชนาการ

ผักชีฝรั่ง 100 กรัม ให้พลังงานต่อร่างกาย 32 กิโลแคลอรี ประกอบด้วยเส้นใย 1.7 กรัม แคลเซียม 21 มิลลิกรัม เหล็ก 2.9 มิลลิกรัม วิตามินเอ 5,250 IU วิตามินบีหนึ่ง 0.31 มิลลิกรัม วิตามินบีสอง 0.21 มิลลิกรัม ไนอาซิน 0.7 มิลลิกรัม และ วิตามินซี 38 มิลลิกรัม สรรพคุณทางยา บำรุงธาตุ บำรุงหัวใจ ขับปัสสาวะ (WWW.prc.ac.th/lannagardrn/ground 04.html-6K)

4.3.3. ชื่อวิทยาศาสตร์ *Curcuma mangga* Valetton & van Zyp.

วงศ์ Zingiberaceae

ชื่อสามัญ ขมิ้นขาว



รูปที่ 3.8 ขมิ้นขาว

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสรรพคุณทางยาโบราณ

ขมิ้นขาวเป็นพืชล้มลุก ลำต้นและใบคล้ายขมิ้นธรรมดาทุกอย่างคือ มีลำต้นประกอบด้วย แถบของก้านใบหลายก้านซ้อนกัน ใบเป็นรูปใบพาย ปลายแหลม โคนใบมนติดก้านใบ พื้นใบ สีเขียว เส้นกลางใบสีแดง โคนต้นมีสีเขียวอ่อนปนเหลืองเล็กน้อย หัวติดกันเป็นแง่งซ้อนกันหนา 3-4 ชั้น ทำให้ขนาดของแง่งใหญ่มาก สีของหัวเมื่อแรกออกจะขาวจัด เมื่อแก่มีสีเหลืองแต่ไม่ เข้มเหมือนขมิ้นธรรมดา แง่งมีกลิ่นฉุนกว่าขมิ้นธรรมดาเล็กน้อย เป็นพืชที่เจริญงอกงามในฤดูฝน การบริโภคโดยทั่วไปใช้หัวรับประทานกับน้ำพริก ปลาร้าหรือใส่แกง เป็นยาอายุวัฒนะ ใช้ดับ พิษร้อนอันเกิดจากการถูกว่านพิษหรือใบไม้ที่มีพิษ (ชัยพล, 2528)

3.4.4. ชื่อวิทยาศาสตร์ *Alpinia nigra* (Gaerth.) B.L. Burtt

วงศ์ Zingiberaceae

ชื่อสามัญ ข่า

ชื่ออื่น ข่าหลวง ข่าหยวก



มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 3.9 ข่า

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ข่าเป็นไม้ล้มลุก หัวอยู่ใต้ดิน ลำต้นมีข้อปล้องอยู่ใต้ดิน ส่วนที่อยู่เหนือดินจะเป็นก้านและใบ สูงประมาณ 1 – 2 เมตร ใบมีลักษณะเป็นรูปไข่ยาว หรือรูปรีขอบขนานคล้ายใบพาย ใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ออกเป็นแบบสลับ ใบกว้าง 5 – 11 ซม. กว้าง 20 – 40 ซม. ปลายใบแหลม มีกาบใบหุ้มลำต้น ดอกออกที่ยอดเป็นดอกช่อ ดอกย่อยมีขนาดเล็ก สีชมพูหรือสีขาวอมม่วงแดง มีเมื่อดอยู่ภายใน

ประโยชน์ทางโภชนาการ

เหง้าอ่อน 100 กรัม ให้พลังงานต่อร่างกาย 20 กิโลแคลอรี มีเส้นใย 1.1 กรัม แคลเซียม 5 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 27 มิลลิกรัม เหล็ก 0.1 มิลลิกรัม เบต้าแคโรทีน 18 ไมโครกรัม วิตามินบีหนึ่ง 0.13 มิลลิกรัม วิตามินบีสอง 0.15 มิลลิกรัม ไนอาซิน 0.4 มิลลิกรัม และวิตามิน ซี 23 มิลลิกรัม

สรรพคุณทางยา ส่วนเหง้าแก่รสเผ็ดแก้ฟกบวม ขับโลหิตในมดลูก ขับลมในลำไส้ รักษากลากเกลื้อน (www.prc.ac.th/lannagardrn/head05.html)

3.4.5. ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ocimum gratissimum* L.

วงศ์ Labiatae

ชื่อสามัญ ยี่หระ (Tree basil)

ชื่ออื่น โหระพาช้าง กระเพราควาย (กลาง) หระ (ใต้)



มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนลิขสิทธิ์

รูปที่ 3.10 ยี่หระ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสรรพคุณทางยาโบราณ

ต้น เป็นไม้พุ่มเตี้ย ความสูง 50-80 ซม. แตกกิ่งก้านสาขา ลำต้นมีสีน้ำตาลแก่ ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามคู่กัน ขอบใบหยัก ปลายแหลม แผ่นใบไม่เรียบ ดอกออกเป็นช่อ บริเวณปลายยอด ประกอบด้วยดอกเล็กๆ ประมาณ 50 -100 ดอก ผลเป็นเมล็ดเล็กๆ รูปไข่แบน มีกลิ่นหอมมากกว่าส่วนใดๆ ของต้นขนาดเล็กประมาณ 1 มม. ผลอ่อนเป็นสีเขียว เมื่อแก่มีสีน้ำตาลอ่อน ทั้งต้นราก ตากให้แห้งใช้เป็นยาขับลม แก้ปวดท้อง ท้องอืด ท้องเฟ้อ

([http : // chachoengsao.doae.go.th/knowledge/samunpri/s_yeera.htm](http://chachoengsao.doae.go.th/knowledge/samunpri/s_yeera.htm))

3.4.6. ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ocimum americanum* L.

วงศ์ Labiatae

ชื่ออื่น ก่อมก้อขาว (ภาคเหนือ) มังลัก



มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 3.1.1 ใบแมงลัก

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

แมงลักมีลำต้นขนาดเล็ก มีลักษณะเป็นพุ่ม คล้ายกระเพราและโหระพา ทุกส่วนของลำต้นมีกลิ่นหอม ใบเป็นรูปไข่สีเขียวอ่อน ขอบใบหยักเล็กน้อย มีขนอ่อนๆ อยู่ตามใบและก้านใบ ดอกออกเป็นช่อที่ปลายกิ่งมีสีขาว เมื่อดกกลมยาวสีดำมีเมือกห่อหุ้มเมื่อโดนน้ำจะพองตัว

สรรพคุณทางยา

เมล็ดแมงลักใช้เป็นยาระบาย ใบแมงลักช่วยขับเหงื่อขับลม น้ำต้มใบแมงลักช่วยแก้ไข้ บรรเทาอาการปวดฟัน แก้โรคทางเดินอาหาร หรือโรคที่เกี่ยวข้องกับลำไส้ ใบยังใช้ทาภายนอกแก้โรคผิวหนัง

3.4 อาหารเลี้ยงเซลล์

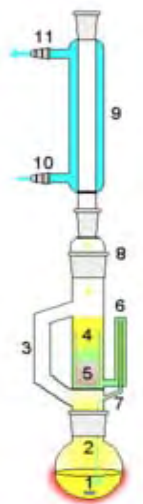
อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้มี MEM medium ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์ Hela, KB และ Vero อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ใช้สำหรับเลี้ยง SW620 และ P388

3.5 ระเบียบวิธีวิจัย

3.5.1 การสกัดสารจากพืชด้วยวิธี Sonication ร่วมกับ Soxhlet extraction

นำพืชที่ล้างทำความสะอาดแล้วไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C นำมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบด นำผงพืชอบแห้ง 30 กรัม ใส่ใน flask ที่มีตัวทำละลาย 300 ml ปิดฝาด้วยจุกสำลีนำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonication bath ที่ความถี่ 40 kHz ใช้เวลาในการ sonicate 1 ชั่วโมง กรองแยกผงพืชออกจากตัวทำละลาย นำผงพืชใส่ใน cellulose thimble และตัวทำละลายใส่ใน flask เพื่อใช้สกัดต่อด้วยวิธี Soxhlet extraction นานจนการสกัดเสร็จสมบูรณ์โดยสังเกตจากสีตัวทำละลายในบริเวณ Siphon top (ดังรูปที่ 3.6) จะเป็นสีของตัวทำละลายปกติที่ใช้ ทั้งนี้ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 5 - 7 ชั่วโมง ทำสารละลายที่สกัดได้ให้เข้มข้นด้วยเครื่อง Rotary ระบบ

สูญญากาศที่อุณหภูมิ 60°C แล้วจึงนำสารละลายที่เข้มข้นนั้นอบต่อที่อุณหภูมิ 60°C จนแห้งซึ่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้และเก็บในตู้ดูดความชื้น



1: Stirrer bar 2: Still pot 3: Distillation path 4: Thimble 5: Solid 6: Siphon top 7: Siphon exit
8: Expansion adapter 9: Condensor 10: Cooling water in 11: Cooling water out

รูปที่ 3.6 แสดงส่วนประกอบของ Soxhlet extraction apparatus

3.5.2 วิธีเตรียมสารสกัดเพื่อใช้ทดสอบ

ซึ่งสารสกัด 100 mg ละลายใน DMSO 1 ml เติมหอาหารปริมาตร 9 ml กรองสารละลายผ่าน acrodisc 0.2 μm . สารสกัดที่ได้จะมีความเข้มข้น 10 mg/ml โดยมี DMSO 10% เมื่อต้องการทดสอบให้เจือจางสารละลายด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นของ DMSO ไม่เกิน 1% ทั้งนี้ เพื่อหลีกเลี่ยงการทำลายเซลล์จากฤทธิ์ของ DMSO ที่เข้มข้นเกินไป

3.5.3 การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัด

นำเซลล์ออกจากภาชนะเลี้ยงด้วยวิธี trypsinization และนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer เจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความหนาแน่น 2×10^4 cell/ml บ่มเลี้ยงเซลล์ใน 24 well plate โดยให้มีปริมาตรหลุมละ 2 ml บ่มเลี้ยงในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ให้เป็นอาหารที่มีสารสกัดความเข้มข้น 1 mg/ml บ่มเลี้ยงต่อในตู้บ่มนาน 48 ชั่วโมง แล้วนำมาหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี trypan blue exclusion

3.5.4 การทดสอบหาค่า IC_{50} ของสารสกัดที่มีต่อเซลล์ทดสอบ

นำเซลล์ออกจากภาชนะเลี้ยงด้วยวิธี trypsinization และนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer เจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความหนาแน่น 2×10^4 cell/ml บ่มเลี้ยงเซลล์ใน 24 well plate โดยให้มีปริมาตรหลุมละ 2 ml บ่มเลี้ยงในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนไปเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดที่มีแนวโน้มเป็นพิษจากการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นแล้ว โดยให้มีความเข้มข้นของสารสกัดในอาหารเป็น 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 mg/ml บ่มเลี้ยงในตู้บ่มต่ออีก 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติที่ไม่มีสารสกัด นำค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดไปสร้างกราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์ทดสอบมีชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) โดยเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติที่ไม่ใส่สารสกัด

3.5.5 การทดสอบความสามารถในการสร้างโคโลนีของเซลล์ (plating efficiency) ที่ความเข้มข้น IC_{50} ของสารสกัด

นำเซลล์ออกจากภาชนะเลี้ยงด้วยวิธี trypsinization นับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer แล้วเจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของสารทดสอบที่ IC_{50} ให้ได้ความหนาแน่น

เซลล์เหมาะสมเป็น 300 cell/well ของถาดเลี้ยงเซลล์ (6 well plate) ในการทดลองนี้จะทำการทดลองเป็น 2 ชุดคือชุดที่ 1 บ่มเลี้ยงเซลล์ 300 cell/well ในอาหารที่มีสารสกัดความเข้มข้น IC_{50} บ่มเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ $37^{\circ}C$ ที่มีการควบคุมให้ $5\% CO_2$ นาน 12 วันแล้วจึงย้ายเซลล์ไปชุดที่ 2 บ่มเลี้ยงเซลล์ 300 cell/well ในอาหารที่มีสารสกัดความเข้มข้น IC_{50} นาน 48 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารปกติที่ไม่มีสารสกัดและบ่มต่อ 10 วัน

การย้อมสีโคโลนีทำโดยดูดอาหารเก่าทิ้งและล้างด้วย PBS buffer ตรึงโคโลนีด้วยสารละลาย methanol : glacial acetic acid (3:1) เป็นเวลา 10 นาที และย้อมโคโลนีด้วย 1% crystal violet เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เห็นโคโลนีเป็นสีม่วงให้สะดวกต่อการนับจำนวนโคโลนี

3.5.6. การตรวจหาการตายของเซลล์แบบ apoptosis

3.5.6.1 ตรวจการเกิด DNA fragmentation

เลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางมิลลิเมตร บ่มเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ $37^{\circ}C$ ที่มีการควบคุมให้ CO_2 เป็น 5% เมื่อเซลล์มีความหนาแน่น 80% confluence เปลี่ยนอาหารโดยใส่อาหารที่มีสารสกัดความเข้มข้นที่ IC_{50} บ่มเลี้ยงต่อในตู้บ่มนาน 48 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ไปสกัด DNA ด้วยการ trypsinization เก็บเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ $4^{\circ}C$ 1,000 rpm นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย PBS นำตะกอนเซลล์หลังล้างไปเติม TE buffer 300 μl ปิเปตขึ้นลงเพื่อกระจายเซลล์แล้วเติม SDS ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 60 μl และ proteinase K (20mg/ml) 20 μl บ่มในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ $50^{\circ}C$ นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม RNase (10mg/ml) 10 μl บ่มในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ $37^{\circ}C$ นาน 1 ชั่วโมง เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 M ปริมาตร 200 μl เติมสารละลายผสมของ phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ในปริมาณเท่ากับสารละลายทั้งหมดที่มีอยู่ในหลอด เขย่าแบบ repeated inversion นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $4^{\circ}C$ 12,000 rpm นาน 5 นาที ดูดสารละลายใสหลอดใหม่ เติม cold absolute ethanol นำไปเก็บที่ $-80^{\circ}C$ นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $4^{\circ}C$ 12,000 rpm นาน 5 นาที และล้างด้วย 70% ethanol ปล่อยให้แห้ง หลังจากนั้นละลายใน 100 μl TE buffer แล้วตรวจสอบ DNA ด้วยการ run 2% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 volts นานประมาณ 40 – 50 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.5.6.2 ตรวจการเปลี่ยนแปลงลักษณะของ membrane (membrane alterations) ด้วย

Vybrant Apoptosis Assay Kit 2

หลังจากครบเวลาบ่มเซลล์ร่วมกับสารทดสอบ เก็บเซลล์ทั้งที่เกาะผิวและที่แขวนลอย ล้างเซลล์ด้วย PBS และเจือจางเซลล์ด้วย (1x) annexin – binding buffer ให้ได้เซลล์ความหนาแน่นประมาณ 10^6 cell/ml ดูดสารละลายเซลล์ 100 μ l เติมน Annexin V 10 μ l และ PI 1 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ล้างเซลล์ด้วย (1x) annexin – binding buffer นำไปส่องใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์

3.5.7 การวัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Thiocyanate (FTC)

จากปฏิกิริยา lipid peroxidation จะเกิด peroxide ซึ่งเป็น free radical โดย peroxide ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ ferrous chloride เกิดเป็น ferric ions และรวมตัวกับ ammonium thiocyanate เกิดเป็น ferric thiocyanate (สีแดง) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm ทั้งนี้ค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณของ free radical ที่เกิดขึ้นในที่นี้คือ peroxide ดังนั้นสารที่มีคุณสมบัติลดปริมาณ peroxide จึงแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง lipid peroxidation (Gulcin และคณะ) ได้ดังนี้

$$\text{Lipid peroxidation (\%)} = 100 - [(A1 / A2) \times 100]$$

เมื่อ A1 คือ ค่าดูดกลืนแสงของ sample

A2 คือ ค่าดูดกลืนแสงของ control

ขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระทำได้ดังนี้

นำสารสกัด 4 mg ใส่หลอดฝาเกลียว ละลายด้วย absolute ethanol 4 ml เติมน้ำ 4.1 ml สารละลาย linoleic acid ความเข้มข้น 2.25% ใน absolute ethanol เติมน้ำ 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) ปริมาตร 8 ml เติมน้ำ 3.9 ml บ่มในที่มืดอุณหภูมิ 40°C เมื่อครบ 24 ชั่วโมงดูดสารละลาย 0.1 ml ใส่หลอดอันใหม่ เติมน้ำ 75% ethanol ปริมาตร 9.7 ml เติมน้ำ ammonium thiocyanate 0.1 ml เติมน้ำ 0.1 ml ของสารละลาย ferrous chloride ความเข้มข้น 0.02 M ใน 3.5% hydrochloride acid ที่ทิ้งไว้ 3 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 500 nm. เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง จนกว่าค่าดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมจะคงที่ คำนวณหาค่า Total antioxidant activity