

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาแบ่งเป็น 6 ส่วน คือ การสกัดสารจากเมล็ดผลไม้ที่ต้องการศึกษา 7 ชนิด จำนวน 11 ตัวอย่าง คือ มะม่วงพันธุ์ฟ้าลั่น และพันธุ์เขียวเสวย มะละกอ ลำไย ขนุน เงาะ มังคุด เนื้อในเมล็ดมะขามสด เนื้อในเมล็ดมะขามคั่ว เปลือกหุ้มเนื้อในเมล็ดมะขามสด และเปลือกหุ้มเนื้อในเมล็ดมะขามคั่ว จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาหาปริมาณสารประกอบ phenolics และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์

#### ตัวอย่างเมล็ดผลไม้

ใช้เมล็ดผลไม้จำนวน 7 ชนิด เก็บตัวอย่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2548 จากจังหวัดพิษณุโลก ได้แก่ เนื้อในเมล็ดมะม่วงพันธุ์ฟ้าลั่น (*Mangifera indica* Linn. cultivars Fa-Lvang.) เมล็ดมะละกอสุกพันธุ์พื้นเมือง (*Carica papaya* Linn.) และเมล็ดขนุนพันธุ์ศรีบรรจง (*Artocarpus heterophyllu* Linn.) จากจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ เมล็ดลำไยพันธุ์อีดอ (*Dimocarpus longan* Lour) และเก็บตัวอย่างเมล็ดผลไม้ในช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2549 จากจังหวัดระยอง ได้แก่ เมล็ดเงาะโรงเรียน (*Nephelium lappaceum* Linn.) และเมล็ดมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) และเก็บตัวอย่างเนื้อในเมล็ดมะม่วงพันธุ์เขียวเสวย (*Mangifera indica* Linn. cultivars Khiew Sawoey.) และเมล็ดแก่มะขามเปรี้ยวพันธุ์พื้นเมือง (*Tamarindus indica* Linn.) จากจังหวัดลพบุรี

#### อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotaevapor R-200/205, Switzerland), ตู้เย็ยซ็ือ (HVR2472, Denmark), เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน (TOMY SS-325, Japan), ตู้อบแห้ง (DIGITAL SERIES, USA), ตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดหมุนเหวี่ยง (Innova 4330, USA), ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Innova 4230, USA), เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (MILTON ROY, USA), อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Type SBD 50 cold 432820 E, Denmark), เครื่องบด (Waring Blender, USA), เครื่อง

ปั๊มสุญญากาศ (System B-169, U.S.A), เครื่องเขย่าผสมสาร (BOHEMIA, USA), เครื่องชั่ง (Sartorius Analytic AC 2105 /Sartorius BP3100S, USA)

### สารเคมีอาหารเลี้ยงเชื้อและยาปฏิชีวนะ

1. Ampicillin (Oxoid, England)
2. Bacto agar (Difco, USA)
3. Barium chloride (Carloerba, Switzerland)
4. Blood Agar Base (HIMEDIA, India)
5. Biotin (Fluka, Switzerland)
6. Buffer tablet (BDH, England)
7. Cetrinide agar (MERCK, Germany)
8. Chloramphenicol (Oxoid, England)
9. Citric acid monohydrate (MERCK, Germany)
10. Dibasic Potassium phosphate (anhydrous) (Riedel-de haen, Germany)
11. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (MERCK, Germany)
12. 1, 1 -diphenyl-2-picrylhydrazyl (Sigma, England)
13. Eosin Methylene Blue agar (MERCK, Germany)
14. Folin reagent (MERCK, Germany)
15. Gallic acid (Sigma, England)
16. Gentamicin (Oxoid, England)
17. Glucose (Riedel-de haen, Germany)
18. Glycerol (MERCK, Germany)
19. L-histidine monohydrochloride (Labchem, Australia)
20. Mannitol salt agar (LAB-SCAN, Ireland)
21. Magnesium sulfate heptahydrate (Fluka, Switzerland)
22. 95% Methanol (MERCK, Germany)
23. Mueller hinton broth (Biomark, India)
24. 4- nitroquinoline-1-oxide (NQO) (Fluka, Germany)
25. Nutrient agar (HIMEDIA, India)

26. Nutrient broth (HIMEDIA, India)
27. Nutrient broth No2 (Oxoid, England)
28. Penicillins (Oxoid, England)
29. Plate count agar (HIMEDIA, India)
30. Salmonella Shigella agar (MERCK, Germany)
31. Sodium ammonium phosphate (Fluka, Switzerland)
32. Sodium carbonate (MERCK, Germany)
33. Sodium chloride (MERCK, Germany)
34. Sulfuric acid (Carloerba, Switzerland)
35. Tryptic Soy Broth (MERCK, Germany)
36. Xylose Lysine Deoxycholate agar (Difco, France)

#### การเตรียมสารสกัดจากเมล็ดผลไม้

นำเมล็ดผลไม้ผึ่งไว้ในที่ร่ม 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบด (Waring Blender, USA) จนได้ผงละเอียด นำผงละเอียดของเมล็ดผลไม้ที่ได้มาแช่หมักกับเมธานอลในอัตราส่วนผงละเอียดของเมล็ดผลไม้ 1 ส่วน ต่อเมธานอล 2 ส่วน (w /v) แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นกรองสารสกัดผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยใช้เครื่องปั๊มสุญญากาศ นำสารสกัดที่ได้ไประเหยโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เก็บสารสกัดที่แห้งไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

#### การหาปริมาณสารประกอบ phenolics ของสารสกัดจากเมล็ดผลไม้

หาปริมาณสารประกอบ phenolics ของสารสกัดเมธานอลจากเมล็ดผลไม้ โดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent assay [132] โดยนำสารสกัดที่ละลายในเมธานอล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ Folin reagent ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และสารละลาย sodium carbonate (20% w/v) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm คำนวณเทียบปริมาณสารประกอบ phenolics เป็นหน่วย gallic acid equivalents (GAE) mg /

g ของน้ำหนักรสสกัด จากกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid และค่าดูดกลืนแสงที่ 765 nm (ภาคผนวก ข)

### การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดผลไม้

ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging test ซึ่งเป็นการดูความสามารถในการเข้าจับอนุมูลอิสระ DPPH [133] ทำโดยละลายสารสกัดจากเมล็ดผลไม้ใน DMSO นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 0.004 % w/v ในเมทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ที่เวลาเริ่มต้น และ 70 นาที ใช้ DMSO ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ DPPH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นหลอดควบคุม (blank) และใช้สารละลายมาตรฐาน Trolox เป็นหลอดควบคุมบวก คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (% inhibition) จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{OD blank} - \text{OD sample}) \times 100}{\text{OD blank}}$$

นำค่า % inhibition ที่ได้ และความเข้มข้นของสารสกัดมาสร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าความเข้มข้นในการการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50 % ( $IC_{50}$ ) จากกราฟที่ได้ (ภาคผนวก)

คำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือ Antiradical activity [140] ซึ่งเท่ากับ

$$\text{Antiradical activity} = 1/IC_{50}$$

จากนั้นหาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นโดยสร้างกราฟระหว่างปริมาณ phenolics กับ Antiradical activity

## การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเมล็ดผลไม้

### 1. แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียก่อโรคที่มักปนเปื้อนมากับอาหารสายพันธุ์มาตรฐานซึ่งได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี จำนวน 8 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli*

DMST 4212, *Salmonella* Typhi DMST 5784, *Shigella sonnei* DMST 17564, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* DMST 15896, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 4739, *Serratia marcescens* DMST 4228, *Listeria monocytogenes* DMST 17303 และจากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* 517148 TISTR 517 ส่วนกลุ่มแบคทีเรียดื้อยาได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี จำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* DMST 20039 Lot 1120 ดื้อต่อยา Imipenem สายพันธุ์ที่ดื้อต่อ Meropenem และ Imipenem ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* DMST 19228 Lot 1118 และ *Acinetobacter baumannii* DMST 19229 Lot 1113, *Streptococcus pneumoniae* DMST 7591 ดื้อต่อยา Fluoroquinolones, *Streptococcus pneumoniae* DMST 8226 ดื้อต่อยา Erythromycin, *Streptococcus pneumoniae* DMST 19616 ดื้อต่อยา Penicillin, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 19214 และ *Pseudomonas aeruginosa* DMST 19222 ดื้อต่อยา Imipenem, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 19232 ดื้อต่อยา Imipenem และ Meropenem และได้จากโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* ดื้อต่อยาเมธิซิลลิน จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ MRSA BH1, MRSA BH2, MRSA BH3 แบคทีเรียกลุ่มที่สองใช้ศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ต้านก่อกลายพันธุ์ได้จากสถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium สายพันธุ์ TA 98 และ *Salmonella* Typhimurium สายพันธุ์ TA 100

## 2. การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

เตรียมกล้าเชื้อโดยถ่ายโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่มีอายุประมาณ 18-24 ชั่วโมง (เชื้อได้จากการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส นำมาเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการทำการลากบนผิวหน้าอาหาร แยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาหาความเข้มข้น โดยเทียบความขุ่นของเชื้อกับ McFarland standard No 0.5 หรือนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 nm ให้อยู่ในช่วง 0.08-0.1 [134] เพื่อได้เซลล์ความเข้มข้นประมาณ  $10^8$  CFU/มิลลิลิตร สำหรับเป็นเชื้อเริ่มต้นในการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อไป

## 3. วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดเมธานอลจากเมล็ดผลไม้

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion method [134] ใช้ไม้พันสำลีจุ่มเชื้อที่เตรียมในหัวข้อการเตรียมแบคทีเรียทดสอบ จากนั้นถ่ายเชื้อลงที่ผิวหน้าจานอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ให้ทั่ว ส่วน *S. pneumoniae* ใช้อาหาร Mueller Hinton Agar ที่เติมเลือด 5 % โดยทำการป้ายเชื้อใน 3 ระบาย นำแผ่นกระดาษวงกลม [standard paper disc (Oxoid, England)] เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถ่ายเชื้อไว้บนผิวหน้าแล้ว โดยห่างจากขอบจานอาหารและห่างจากแผ่นกระดาษอื่นๆ ประมาณ 1.5 เซนติเมตร จากนั้น ดูดสารสกัดที่ละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ใส่ลงบนกระดาษที่วางไว้ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร/แผ่น และใช้ DMSO เป็นสารควบคุมลบ ส่วนสารควบคุมบวกใช้แผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐาน chloramphenical 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England) จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และ *S. pneumoniae* ให้นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่มี 5% CO<sub>2</sub> หลังจากบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

การหาค่า MIC ทดสอบด้วยวิธี agar dilution method [134] โดยทำการเจือจางสารสกัดด้วย 50 % v/v ของสาร DMSO ในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นของสารสกัด 100 mg/ml จากนั้นเจือจางสารสกัดที่ได้และดูดสารสกัดมา 2 มิลลิลิตร ผสม Mueller Hinton Agar 18 มิลลิลิตร ที่หลอมไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส ก่อนเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเท่ากับ 100, 10, 5, 2.5 และ 1.25 mg/มิลลิลิตร ในแต่ละจานอาหาร ถ่ายเชื้อจำนวน  $10^5$  CFU/ml โดยการหยดกล้าเชื้อของแต่ละเชื้อทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เทียบกับจาน

อาหารควบคุมลบ (DMSO และน้ำกลั่น) ค่า MIC ประเมินได้จากความเข้มข้นของจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่ำสุดที่สังเกตไม่มีการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร

การประเมินค่า MBC ด้วยวิธี broth microdilution [134] โดยทำการเจือจางลำดับขั้น ครั้งละ 2 เท่า ของสารสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ความเข้มข้น 0-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ใน 96-well microtiter plate จากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ในหัวข้อการเตรียมแบคทีเรียทดสอบ ลงในแต่ละหลุม ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ  $10^5$  CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายสารแขวนลอยของเชื้อจากหลุมที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร Nutrient agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูการเจริญของเชื้อบริเวณที่ถ่ายเชื้อลงไป เทียบกับหลุมของสารควบคุมลบ และ สารควบคุมบวก ค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ประเมินจากค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดและสังเกตไม่มีการเจริญของเชื้อ

#### การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบวิธีเอ็มเอส [122]

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบสารก่อกลายพันธุ์จะต้องมีการตรวจคุณสมบัติเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์อย่างสม่ำเสมอ เพราะคุณสมบัติบางอย่างอาจหายไปได้ เนื่องจากการเก็บนานเกินไป อุณหภูมิที่เก็บไม่เหมาะสม หรือควรตรวจคุณสมบัติทุกครั้งที่ทำ การแยกโคโลนีเดี่ยวเพื่อเตรียมแบคทีเรียใหม่ S. Typhimurium สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ที่ใช้ในการทดสอบวิธีเอ็มเอส มีคุณสมบัติดังนี้

1. การตรวจความต้องการกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine requirement) เนื่องจากแบคทีเรีย S. Typhimurium ที่นำมาทดสอบเป็นสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์แบบ point mutation ของจีนที่สร้างกรดอะมิโนฮิสทีดีน ดังนั้นแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบจึงต้องเติมกรดอะมิโนฮิสทีดีนเพื่อให้เชื้อเจริญได้ โดยทำดังนี้ ผสม 100 ไมโครลิตร ของ 1 mM สารละลายไปไอดินกับ 100 ไมโครลิตร ของเชื้อที่เพาะไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติม 2 มิลลิลิตร ของสารละลาย Top agar ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าให้ผสมกันแล้วเทลงบน minimal glucose agar plate หมุนจานเลี้ยงเชื้อให้สารละลายกระจายสม่ำเสมอตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นจานที่ 1 จานที่ 2 เติม 300 ไมโครลิตร ของ 0.1 M ฮิสทีดีนแทนสารละลายไปไอดิน จานที่ 3 เติมทั้งไปไอดินและฮิสทีดีน ส่วนจานที่ 4 ไม่เติมทั้งไปไอดินและฮิสทีดีน (glucose agar plate)

ผลการทดสอบจะพบว่าโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีทั้งไปไอดีนและฮีสทีดีน เท่านั้น

2. การตรวจสอบ rfa mutation เนื่องจากแบคทีเรีย *S. Typhimurium* ขาดสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้สารก่อกลายพันธุ์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปได้และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียได้ดีขึ้น โดยทำการทดสอบดังนี้ ใส่ 100 ไมโครลิตร ของเชื้อที่เพาะไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อเดิม 2 มิลลิลิตรของสารละลาย top agar ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เหย้าให้ผสมกันแล้วเทลงบน minimal glucose agar plate ที่เติมสารละลายผสมของ 0.5 mM ฮีสทีดีนและไปไอดีน หมุนจานเลี้ยงเชื้อให้สารละลายกระจายสม่ำเสมอตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที วางกระดาษกรองหนึ่งผ่าเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm ที่จุ่มสารละลาย 0.1 % crystal violet บนจานอาหารที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดสอบรอบๆกระดาษกรองที่มีสารละลาย crystal violet จะเห็นเป็นวงกลมใส เนื่องจากส่วนนี้จะไม่มีแบคทีเรียเจริญ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมใสนี้ต้องจะมีขนาดประมาณ 12-14 มิลลิเมตร จึงจะถือว่าแบคทีเรียมี rfa mutation

3. การตรวจสอบ R-factor เพื่อทดสอบว่าแบคทีเรียนั้นมีพลาสมิดอยู่ โดยทดสอบความทนทานต่อยาแอมพิซิลลิน วิธีทดสอบอาจทำควบคู่ไปกับการตรวจสอบ rfa mutation คือทำใน plate เดียวกันเพียงแต่แบ่งส่วนเพื่อวางกระดาษกรองจุ่มแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 8 mg/ มิลลิลิตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ลงไปบนผิววุ้นที่เคลือบด้วยส่วนผสมของฮีสทีดีนกับไปไอดีน แบคทีเรีย และ Top agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดสอบจะสังเกตเห็นการเจริญของแบคทีเรียรอบๆกระดาษกรองจุ่มแอมพิซิลลิน ทั้งนี้เพราะมี R-factor ซึ่งทำให้แบคทีเรียด้านต่อยาแอมพิซิลลินได้

4. การตรวจสอบ uvr B mutation แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จะต้องขาดระบบซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA excision repair) ดังนั้นเมื่อเกิดการก่อกลายพันธุ์การซ่อมแซมไม่มีการกลายพันธุ์จึงยังคงอยู่การตรวจสอบทำได้โดยตรวจดูความไวต่อรังสีอัลตราไวโอเล็ตดังนี้ เตรียม minimal glucose agar plate เคลือบด้วย 100 ไมโครลิตร ของ 0.1 M สารละลายฮีสทีดีน และ 100 ไมโครลิตร ของ 1 mM สารละลายไปไอดีน ใช้หลอดเชื้อเชื้อแต่ละเชื้อที่เพาะไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วขีดลงบนวุ้น 2 รอยขนานกัน นำ plate ไปวางใต้หลอด UV ขนาด 15 วัตต์ให้ห่างจาก plate เป็นระยะ 30 เซนติเมตร ก่อนที่จะเปิดไฟให้ปิดฝา plate ไว้ครึ่งหนึ่ง จะทำให้แบคทีเรียที่ขีดไว้ถูกแสง UV เพียงครั้งเดียว เปิดแสง UV นาน 8 วินาที ผลการทดสอบ

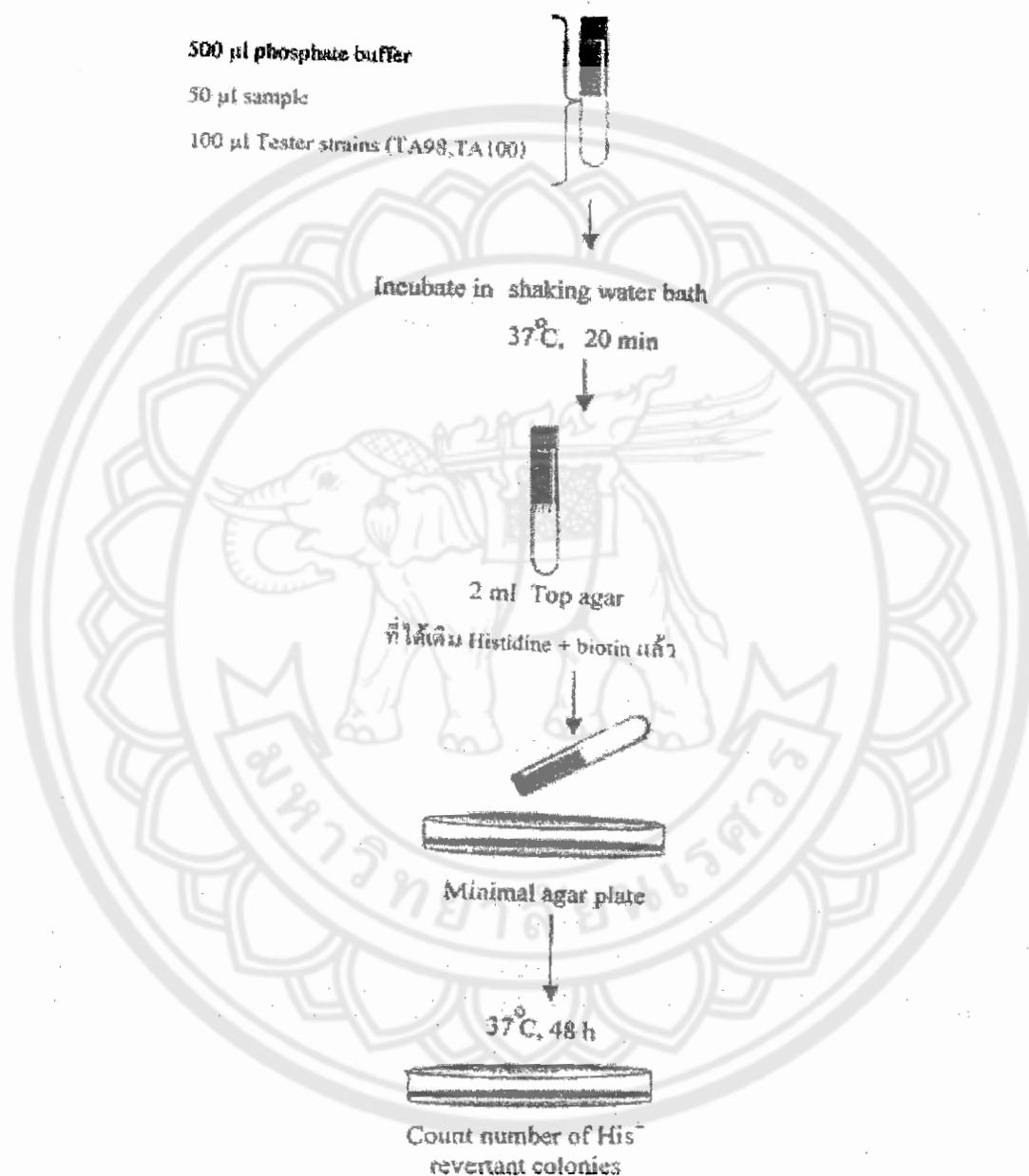
แบคทีเรียที่มี uvr B mutation จะไม่มีการเจริญด้านที่ถูกแสง UV แต่ด้านที่ไม่ถูกแสงจะเจริญเป็นโคโลนีให้เห็น

### การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากเมล็ดผลไม้มะม่วง

ทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากเมล็ดผลไม้มะม่วงโดยใช้วิธีเอ็มเอส [131] ซึ่งเป็น การทดสอบการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ (Backward or reverse mutation) การศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิค preincubation ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด โดยดูการกลายพันธุ์ของเชื้อ S. Typhimurium สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 มีวิธีดังนี้ นำเชื้อทดสอบทั้งสองชนิดไปเพาะเลี้ยงใน nutrient broth No. 2 โดยบ่มเชื้อในอ่างน้ำอุ่นเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาปริมาณ 100 ไมโครลิตร (มีเชื้อประมาณ  $1-2 \times 10^8$  เซลล์) ผสมกับ sodium phosphate buffer ที่มี pH 7.4 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารสกัดละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1 และ 1.0 mg / plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากผสมให้เข้ากันดีแล้ว นำไปเขย่าในอ่างน้ำอุ่นที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 2 มิลลิลิตร ของ molten top agar (ที่เติม histidine และ biotin ความเข้มข้น 0.5 mM ลงไป) ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal glucose agar โดยเอียงจานไปมาเพื่อให้ส่วนผสมกระจายสม่ำเสมอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญ ทั้งนี้การควบคุมบวก ใช้สาร 4-nitroquinoline-1-oxide (NQO) ซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.05 mg/plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ละลายใน DMSO เพื่อดูผลการตอบสนองต่อสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานของเชื้อที่ใช้ทดสอบ ส่วนการควบคุมลบเป็นการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียตามธรรมชาติ (spontaneous reversion) เนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบอาจเกิดการกลายพันธุ์ได้เองตามธรรมชาติ (ภาพ 2)

การวิเคราะห์ข้อมูลของผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากพืช แสดงโดยค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อ จากการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 3 จาน ซึ่งถ้าพบ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสกัดที่ทดสอบกับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์คือ เมื่อปริมาณสารสกัดเพิ่มขึ้น จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น และพบว่าอย่างน้อย 2 ความเข้มข้นที่ศึกษาให้ค่าจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อมากกว่าจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ และต้องมีอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นที่สามารถทำให้จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของ

แบคทีเรียที่ต่อต้านแสงยูวีสูงเกิน 2 เท่าของจำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ต่อต้านแสงยูวีที่  
เกิดตามธรรมชาติ แสดงว่าสารสกัดมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ [135]



ภาพ 2 แสดงขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากเมล็ดผลไม้  
ที่มา: ทายาท ศรียาภัย. การปรับเปลี่ยนฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารประกอบที่ทำปฏิกิริยากับ  
ไนเตรทด้วยสีธรรมชาติที่ได้มาจาก *Monascus* spp. ด้วยวิธี Ames test. วิทยานิพนธ์  
สาขาพิษวิทยาทางอาหารและโภชนาการ. มหาวิทยาลัยมหิดล.)

### การทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากเมล็ดผลไม้

ทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเมธานอลจากเมล็ดผลไม้ เมื่อเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ NQO ในเชื้อ *S. Typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 โดยนำสารสกัดเมธานอลของเมล็ดผลไม้มาละลายใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1 และ 1.0 mg / plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสาร NQO ที่ความเข้มข้น 0.05 mg/plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ sodium phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองไปเขย่าในอ่างน้ำอุ่นที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 2 มิลลิลิตร ของ Top agar (ที่เติม histidine และ biotin ความเข้มข้น 0.5 mM ลงไป) ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal glucose agar โดยเอียงจานไปมาเพื่อให้ส่วนผสมกระจายสม่ำเสมอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญได้ และนำผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากเมล็ดผลไม้ได้มาหาค่าเฉลี่ยแล้วนำมาคำนวณค่า % antimutagenic activity ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ antimutagenic activity} = \frac{(N-P) - (S-P)}{(N-P)} \times 100$$

N คือ จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร NQO

S คือ จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร NQO ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดผลไม้

P คือ จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation)

### การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ความแตกต่างของข้อมูลวิเคราะห์โดยใช้ One-way ANOVA ด้วย Turkey HSD Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) และวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นของข้อมูล ด้วย correlation coefficient (R) โปรแกรม Microsoft Excel software

