บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย
(Methodology)

1. อุปกรณ์

1. Analytical balance (Satorius)
2. pH meter
3. Incubator (Binder)
4. Hot air oven (Binder)
5. Water bath (Memmert)
6. Soxhlet's apparatus (Pyrex)
7. UV and Visible Spectrophotometer (Spactronic)
8. Microplate spectrophotometer (Beckman Coulter)
9. Electrophoresis set (Amersham)

2. สารเคมี

2.1. การสกัดผักพื้นบ้านและสมุนไพร

1. Absolute Ethanol (Merck)
2. Distilled water (DW)

2.2. ABTS (2,2′-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) free radical

1. ABTS (2,2′-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) (Sigma-aldrich)
2. Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) (Merck)
3. Absolute Ethanol (Merck)
4. Trolox (Sigma-aldrich)
5. Distilled water (DW)

2.3. Reducing power of ferric (FRAP)

1. TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) (Sigma-aldrich)
2. Iron (III) chloride (Ajex finechem)

3. Iron (II) sulfate heptahydrate (Ajex finechem)
4. Acetic acid (Fisher)
5. Sodium hydroxide (Merck)
6. Sodium acetate-3-hydrate (Ajex finechem)
7. Hydrochloric acid (Merck)
8. Sulfuric acid (Merck)

2.4.Chelating effect on ferrous

1. Iron (II) sulfate heptahydrate (Ajex finechem)
2. Sulfulic acid (H_2SO_4) (Merck)
3. Ferrozine (Ajex finechem)
4. Distilled water (DW)
5. Ethylene diamine tertraacetate (EDTA) (Fisher)

2.5 Protective effect on DNA damage induced by Fenton reaction

1. Plasmid DNA PUC18 (Fermentas)
2. Ethylene diamine tertraacetate (EDTA) (Fisher)
3. Hydrogen peroxide (Sigma)
4. Agarose (Wako)
5. Ethidium bromide (Wako)
6. Ferrous sulfate (Fisher)
7. 6x loadind buffer (Fermentas)
8. Tris (Merck)
9. Boric acid (Lab scan)

3. วิธีการทดสอบ

3.1. การสกัดผักพื้นบ้านและสมุนไพร

3.1.1 ผักพื้นบ้าน

สกัดโดย DW

นำตัวอย่างผักพื้นบ้านทั้งต้น(ยกเว้นราก)มาล้างให้สะอาด

↓

นำตัวอย่างมาบด 150 กรัม

↓

เติมน้ำกลั่น (DW) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

↓

ให้ความร้อนจนสารสกัดเดือด 30 นาที

↓

นำไปกรอง

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer

↓

Water Extract

↓

ชั่งน้ำหนัก

↓

เก็บสารสกัดที่ได้ใส่ขวดสีชาที่แห้ง อุณหภูมิ 4 °C

สกัดโดย Absolute Ethanol

นำตัวอย่างผักพื้นบ้านทั้งต้น(ยกเว้นราก)มาล้างให้สะอาด

↓

นำตัวอย่างมาบด 200 กรัม

↓

ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

↓

เติมตัวทำละลายใช้ EtOH:H_2O อัตราส่วน 7:3 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

↓

นำไปใส่เครื่อง Shaker เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 2 ครั้ง

↓

นำสารสกัดที่ได้มากรอง

↓

ระเหยตัวมำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator

↓

Alcohol Extract

↓

ชั่งน้ำหนัก

↓

เก็บสารสกัดที่ได้ใส่ขวดสีชาที่แห้ง อุณหภูมิ 4 °C

3.1.2 **สมุนไพร**

สกัดโดย DW

นำสมุนไพรทั้งต้น(ยกเว้นราก)ที่สกัดด้วย Absolute Ethanol นำมาตากให้แห้ง

↓

นำไปต้มด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 300-400 มิลลิลิตร

↓

ให้ความร้อนจนเดือด ใช้เวลา 30 นาที

↓

ตั้งทิ้งไว้ให้สารสกัดเย็น

↓

นำไปกรอง

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dry

↓

Water Extract

↓

ชั่งน้ำหนัก

↓

เก็บสารสกัดที่ได้ใส่ขวดสีชาที่แห้ง อุณหภูมิ 4 °C

สกัดโดย Ethanol

นำสมุนไพรทั้งต้น(ยกเว้นราก)บดให้ละเอียด

↓

นำสมุนไพร 100 g

↓

เติมตัวทำละลายใช้ EtOH:H_2O อัตราส่วน 7:3 ปริมาตร 700 มิลลิลิตร

↓

ให้ความร้อนจนกว่าตัวทำละลายใสใน Soxlhet's apparatus

↓

ตั้งทิ้งไว้จนสารสกัดเย็น

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปกรอง

↓

ระเหยด้วยเครื่อง Rotary Evaporator

↓

Alcohol Extract

↓

ชั่งน้ำหนัก

↓

เก็บสารสกัดที่ได้ใส่ขวดสีชาที่แห้ง อุณหภูมิ 4 °C

3.2 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

3.2.1 ABTS (2,2′-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) free radical

หลักการ

เป็นการทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ทำให้เกิดสีโดยการกระตุ้นให้เกิดอนุมูล ABTS จาก ABTS (2,2′-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) ด้วย Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยา ดังสมการ

$$ABTS + K_2S_2O_8 \longrightarrow ABTS^{\bullet+}$$

(สีน้ำเงิน-ม่วง)

จากหลักการดังกล่าว ถ้าในปฏิกิริยามีสารต้านอนุมูลอิสระมาก ก็จะทำให้ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำเงิน-ม่วง ลดลง ในทางตรงกันข้ามถ้าในปฏิกิริยามีสารต้านอนุมูลอิสระน้อยจะทำให้ขบวนการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลดลงตามลำดับ

ขั้นตอนในการทดสอบ

1. เตรียม ABTS stock solution

- ABTS:$K_2S_2O_8$ (1:0.5 mol:mol)
- ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

2. เตรียม ABTS working solution

ทำการเจือจาง ABTS stock solution ด้วยน้ำกลั่นโดยกำหนดให้ได้ค่า absorbance ที่ 734 nm. เท่ากับ 0.7-0.75

3. เตรียม Trolox ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานสำหรับการทดสอบ ที่ความเข้มข้นตามต้องการเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

4. เตรียมตัวอย่างสารสกัดตามความเข้มข้นที่ต้องการ

5. ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของตัวอย่างสารสกัด โดยวัดปฏิกิริยาการเกิดสี น้ำเงิน-ม่วง ของ $ABTS^{\bullet+}$ โดยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer (Shimadzu, UV-1201V) ที่ความยาวคลื่น 734 nm

6. คำนวณหาปริมาณสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน Trolox

3.2.2 Reducing power (FRAP Assay)

หลักการ

Reducing power เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยอาศัยความสามารถในการยับยั้งการเปลี่ยน Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} วัดค่าการดูดกลืนแสงของ Fe^{2+} - TPTZ complex ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ดังสมการ

$$Fe^{3+} - TPTZ + A \longrightarrow Fe^{2+} - TPTZ + A^{\bullet+}$$

(สีน้ำเงิน)

ขั้นตอนในการทดสอบ

1. เตรียม 10 mM TPTZ

2. เตรียม 20 mM $FeCl_3$

3. เตรียม 300 mM Acetate buffer pH 3.6

4. เตรียม FRAP reagent

โดยใช้ 300 mM Acetate buffer pH 3.6 : 10 mM TPTZ : 20 mM $FeCl_3$ (10:1:1)

5. เตรียม Ferrous sulfate ($FeSO_4$) ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานสำหรับการทดสอบ ที่ความเข้มข้นตามต้องการ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

6. เตรียมตัวอย่างสารสกัดตามความเข้มข้นที่ต้องการ

7. ทดสอบฤทธิ์ reducing power ของตัวอย่างสารสกัด โดยวัดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำเงิน ของ Fe^{2+} - TPTZ + $A^{\bullet+}$ โดยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer (Shimadzu, UV-1201V) ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

8.คำนวณหาปริมาณสารต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน Ferrous sulfate ($FeSO_4$)

3.2.3. Chelating effect on ferrous

หลักการ

เป็นความสามารถในการเป็น Chelating agent ของตัวอย่างสารสกัดโดยการ chelate กับFe (II) หรือ ferrous ion อาศัยหลักการ Fe (II) จะจับกับ Ferrozine เกิดเป็น Fe^{2+}- ferrozine complex วัดการดูดกลืนแสงที่ 562 nm และเมื่อเติมสารตัวอย่างเข้าไป สารตัวอย่างจะจับกับ Fe (II) ทำให้การดูดกลืนแสงลดลง

Fe^{2+}- ferrozine + A ⟶ Fe^{2+}- A + Ferrozine

(สีชมพู)

ขั้นตอนในการทดสอบ

1. เตรียม Ferrozine Solution 5 mM

2. เตรียม $FeSO_4.7H_2O$ Solution 0.5 mM

3. EDTA 3 mM ใน 300 mM Acetate buffer pH 3.6 ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานสำหรับการทดสอบ ที่ความเข้มข้นตามต้องการ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

4. เตรียมตัวอย่างสารสกัดตามความเข้มข้นต้องการ

5. ทดสอบฤทธิ์ reducing power ของตัวอย่างสารสกัด โดยวัดปฏิกิริยายับยั้งการเกิดสีชมพูของ Fe^{2+}- ferrozine โดยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer (Shimadzu, UV-1201V) ที่ความยาวคลื่น 593 nm.

6.คำนวณหาปริมาณสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน EDTA

3.2.4 Protective effect on DNA damage induced by Fenton reaction

หลักการ

โดยปกติแล้ว Plasmid DNA เมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจะพบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะมีปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ในรูป Supercoiled form (Form I) สูงและอยู่ในรูป Relaxed form (Form II) ปริมาณเล็กน้อย หลังจากที่ Incubated Plasmid DNA กับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์อกไซด์ (H_2O_2) และสารละลาย Fe (II) หรือ Fe (III) ในความเข้มข้นที่เหมาะสมจะเกิดการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิล เมื่ออนุมูลไฮดรอกซิลเข้าทำลายดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจะมีปริมาณแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในรูป Supercoiled form (Form I) ลดลงและมีการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอในรูป Relaxed form (Form II) และ Linear form (Form III)

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^{-}$$

ขั้นตอนการทดสอบ

1. เตรียมสารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 50 ng/µl
2. Incubate สารละลายดีเอ็นเอ กับสารละลาย Hydrogen peroxide และสารละลาย Ferrous sulfate รวมทั้งสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
3. เตรียมเจลสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ Agarose ความเข้มข้น 10 mg/ml โดยใช้ TBE buffer เป็นตัวทำละลาย
4. นำสารละลายที่ได้จาก Incubate มรทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับกลุ่มควบคุม
5. นำมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Gel documentation

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. typhimurium* TA98

การเตรียมเชื้อ *S. typhimurium* (OD 0.132 เทียบกับ McFarland standards No. 0.5)

1. เลี้ยงเชื้อใน nutrient slant
2. ถ่ายเชื้อลงใน nutrient broth, incubate 24 hr.
3. นำ เชื้อ *S. typhimurium* ที่ได้ไปวัด UV ความยาวคลื่น 600 nm. ให้ค่าOD 0.132

การเตรียม disc

1. ปิเปตสารสกัด 25 µl ลงบน disc
2. ทิ้งไว้ให้แห้ง
3. ปิเปตสารสกัด 25 µl ลงบนอีกด้านหนึ่งของ disc

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. typhimurium* TA98

1. swab เชื้อ *S. typhimurium* ลงใน Muller-Hinton agar (MHA) เป็น 3 ระนาบโดยใช้ sterile cotton swab ทั้งให้หมาด
2. นำ disc ที่เตรียมจากสารสกัดพืชมาวางลงบน agar โดยใช้ sterile forcep กดเบาๆ
3. incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C 16-18 hrs.
4. บันทึกผลโดยวัด clear zone

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์

1. ละลายสารสกัดใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 100mg/ml
2. กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร
3. ผสมสารสกัด 50 µl กับ *S. typhimurium TA98* 100 µl
4. เติม S9-mix 0.5 ml
5. เติม top agar 2 ml + 2AA 0.5 mcg
6. ปั่นใน vortex ให้ผสมกันดี
7. เทลงบน Davis minimal agar plate
8. incubate ที่ 37°c เป็นเวลา วัน 2

หมายเหตุ ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และ Control: DMSO 50µl แทนสารสกัดจากพืช

การวิเคราะห์ผล

การทดสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์แสดงผลเป็น

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A-B) / (A-C)] \times 100$$

โดย

A = a number of His+ revertants induced by 2-AA(positive control)

B = a number of His+ revertants induced by 2-AA in the presence of vegetable extract

C = a number of spontaneous His+ revertants per plate.

การแปลผล

ตารางที่3.1 ตางรางการแปลผล Anti mutagenic activity

Anti-mutagenic activity	Percentage of inhibition
strongly active	> 60%
moderately active	41-60%
weakly active	21-40%
not active	0-20%

3.5 การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

1. ละลายสารสกัดใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 100 mg/ml
2. กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร
3. ผสมสารสกัด 50 µlกับ *S. typhimurium* TA98 100 µl
4. เติม ของ S9-mix 0.5 ml
5. เติม top agar 2 ml
6. ปั่นใน vortex ให้ผสมกันดี
7. เทลงบน Davis minimal agar plate
8. incubate ที่ 37°c เป็นเวลา วัน 2

หมายเหตุ ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และ Positive control :ใช้ 2-AA 0.5µg

การวิเคราะห์ผล

ฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ MI (Mutagenicity Index) คำนวณจาก

$$MI = \frac{\text{mean of colony} - \text{background colony}}{\text{background colony}}$$

Background colony คือ จำนวน colony ที่นับได้จาก negative-control

Mean colony คือ ค่าเฉลี่ยของโคโลนีที่นับได้จาก plate ที่ทำการทดสอบ

การแปลผล

ตารางที่3.2 ตารางแปลผลฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

แปลผล	MI	Dose effect relationship
Mutate	≥2	/
Possible mutate	1.70-1.99	/
No-mutate	0.00-1.69	x