เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP และฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดเมล็ดมะขามป้อม

MOLECULAR MARKER SRAP AND PRELIMINARY STUDY OF BIOACTIVITIES OF INDIAN GOOSEBERRY SEED EXTRACT

ธนกฤต แก้วสงวน
พรพรรณ น้าวิไลเจริญ
พรหมพร มะโนน็ก

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP และฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดเมล็ดมะขามป้อม

MOLECULAR MARKER SRAP AND PRELIMINARY STUDY OF BIOACTIVITIES OF INDIAN GOOSEBERRY SEED EXTRACT

ธนกฤต แก้วสงวน
พรพรรณ น้าวิไลเจริญ
พรหมพร มะโนนึก

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MOLECULAR MARKER SRAP AND PRELIMINARY STUDY OF BIOACTIVITIES OF INDIAN GOOSEBERRY SEED EXTRACT

Thanakrit Kaewsahnguan
Phonphan Nawilaijaroen
Promporn Manonuek

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP และฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดเมล็ดมะขามป้อม Molecular marker SRAP and preliminary study of bioactivities of Indian gooseberry seed extract
ชื่อนักศึกษา	นายธนกฤต แก้วสงวน รหัสนักศึกษา 56050841 นางสาวพรพรรณ น้าวิไลเจริญ รหัสนักศึกษา 56050870 นางสาวพรหมพร มะโนนึก รหัสนักศึกษา 56050872
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ดร.วินัย สมประสงค์ กรรมการ	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP และฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดเมล็ดมะขามป้อม

ชื่อนักศึกษา นายธนกฤต แก้วสงวน รหัสนักศึกษา 56050841
นางสาวพรพรรณ น้าวิไลเจริญ รหัสนักศึกษา 56050870
นางสาวพรหมพร มะโนนึก รหัสนักศึกษา 56050872

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2559
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะขามป้อมและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกเมล็ด (seed coat) และเอ็มบริโอ (embryo) ของมะขามป้อม ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) กับตัวอย่างมะขามป้อมจำนวน 15 ตัวอย่าง ที่เก็บรวมรวมจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแพร่ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย SRAP ไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 172 แถบ มี polymorphic bands จำนวน 145 แถบ คิดเป็น 84.30 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.11X ด้วยวิธี UPGMA ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.66 ถึง 0.90 แสดงว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกเมล็ด และเอ็มบริโอของมะขามป้อมที่ได้จากชั้นเมทานอล โดยศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB ด้วยวิธี MTT แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ โดยที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 28.51, 23.26 และ 21.43 ตามลำดับ และสารสกัดจากเอ็มบริโอมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 2.32, -11.85 และ 19.68 ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากส่วนเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (50% inhibitory concentration: IC50) เท่ากับ 18.91 และ 22.13 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ : ความเป็นพิษต่อเซลล์ ความหลากหลายทางพันธุกรรม มะขามป้อม สารต้านอนุมูลอิสระ SRAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Molecular marker SRAP and preliminary study of bioactivities of Indian gooseberry seed extract
Students	Mr. Thanakrit Kaewsahnguan Student ID 56050841
	Miss Phonphan Nawilaijaroen Student ID 56050870
	Miss Promporn Manonuek Student ID 56050872
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2559
Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim

Abstract

This study aimed to investigate genetic diversity of Indian gooseberry and to evaluate bioactivities of seed coat and embryo methanolic extracts from Indian gooseberry. Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) was used to assess the genetic diversity among 15 samples collected from Phrae Horticultural Research Center, Thailand. Seven SRAP primer combinations amplified 172 fragments, out of which 145 bands (84.30%) were polymorphic. The dendrogram generated by NTSYS-pc (version 2.11X) based on UPGMA using similarity coefficient. Their genetic similarity coefficients ranged from 0.66 to 0.90 indicating that high genetic variation. Methanol extracts from seed coat and embryo were tested for bioactivities. The cytotoxicity against MCF-7 breast cancer cell lines, HT-29 colon cancer cell lines and KB oral cancer cell lines were assessed with MTT assay demonstrate poor cytotoxic activity. Cells were exposed at 1000 µg/ml, the percentage of cytotoxicity of seed coat extract on MCF-7, HT-29 and KB cell lines were 28.51, 23.26 and 21.43%, respectively. Embryo extract was 2.32, -11.85 and 19.68% respectively. Furthermore, seed coat and embryo extracts show strong DPPH radical scavenging activity with 50% inhibitory concentration (IC50) of 18.91 and 22.13 µg/ml, respectively.

Keywords : Cytotoxicity assay, Genetic diversity, Indian gooseberry, Antioxidant activity, SRAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาโครงงานพิเศษเรื่องเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP และฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดเมล็ดมะขามป้อม สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆ เป็นอย่างดียิ่ง ผู้จัดทำจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ และ ดร.วินัย สมประสงค์ กรรมการ ขอบคุณคุณวิภาดา แสงสร้อย และคณะจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแพร่ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลและตัวอย่างใบมะขามป้อม ขอขอบคุณคุณมังกรและคุณวิสิทธิ์ที่เอื้อเฟื้อผลมะขามป้อมเพื่อใช้ในการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้

นอกจากนี้คณะผู้จัดทำขอขอบคุณพ่อ แม่ ที่ให้กำลังใจและคอยช่วยเหลือ สุดท้ายนี้ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ จนการจัดทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ธนกฤต แก้วสงวน
พรพรรณ น้าวิไลเจริญ
พรหมพร มะโนนึก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นและความสำคัญของโครงงานพิเศษ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ข้อมูลทั่วไปของมะขามป้อม 3
2.1.1 มะขามป้อม 3
2.1.2 ถิ่นกำเนิดและการแพร่กระจาย 3
2.1.3 ลักษณะของใบ ดอก ผล และเมล็ด 3
2.1.4 คุณสมบัติของมะขามป้อม 4
2.2 Sequence-ralated amplified polymorphism (SRAP) 5
2.3 การสกัดสารด้วยวิธี Maceration 7
2.4 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT 8
2.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 12
3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา 12
3.2 ตัวอย่างเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ 13
3.3 อุปกรณ์ 13
3.4 สารเคมี 16
3.5 วิธีการทดลอง 18
3.5.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP 18
3.5.2 การสกัดสาร 22
3.5.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ 22
3.5.4 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดด้วยวิธี MTT 22
3.5.5 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH 23
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 24
4.1 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค SRAP 24
4.1.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิค SRAP ด้วยโปรแกรม NTSTSpc 2.11X 26
4.2 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเบื้องต้นด้วยวิธี MTT 31
4.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH 33
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 37
เอกสารอ้างอิง 39
ภาคผนวก 43
ภาคผนวก ก 44
ภาคผนวก ข 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 รหัสตัวอย่าง และชื่อสายพันธุ์ของมะขามป้อม 15 สายพันธุ์ 12
3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SRAP primers ที่ใช้ในการศึกษานี้ 17
3.3 แสดงส่วนประกอบสารเคมีที่ในเทคนิค PCR สำหรับ 1 ตัวอย่าง 21
3.4 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP 21
4.1 ชนิดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอ จำนวน monomorphic bands จำนวน polymorphic bands เปอร์เซ็นต์ monomorphic bands และเปอร์เซ็นต์ polymorphic bands ของมะขามป้อม 15 สายพันธุ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP 26
4.2 ค่า similarity coefficient ด้วยวิธี simple matching ของมะขามป้อม 15 สายพันธุ์ 29
4.3 ค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 32
4.4 เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ IC_{50} ของสารมาตราฐานโทรลอกซ์ 33
4.5 เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ IC_{50} ของสารสกัดหยาบเปลือกเมล็ดจากมะขามป้อม 35
4.6 เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ IC_{50} ของสารสกัดหยาบเอ็มบริโอจากมะขามป้อม 35
4.7 ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์และสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของทั้งเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อม 35
ข-1.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 54
ข-1.2 ตาราง t-test แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อมที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 54
ข-2.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29 55
ข-2.2 ตาราง t-test แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อมที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29 55
ข-3.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ KB 56
ข-3.2 ตาราง t-test แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อมที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ KB 56
ข-4.1 วิเคราะห์ความแปรปวนของความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารมาตราฐานโทรลอกซ์ สารสกัดหยาบเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอจากชั้นเมทานอล 57
ข-4.2 เปรียบเทียบความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารมาตราฐานโทรลอกซ์ สารสกัดหยาบเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอจากชั้นเมทานอล ซึ่งทดสอบโดยวิธี DMRT 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะของใบ (ก) ดอก (ข) ผล (ค) และเมล็ด (ง)	4
2.2 ลักษณะของไพรเมอร์ SRAP	6
2.3 กลไกการทำงานของเทคนิค SRAP	6
2.4 โครงสร้างของ MTT และผลึกสี formazan	8
2.5 สูตรโครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical)	11
3.1 เมล็ดมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) และองค์ประกอบ : (A) เปลือกเมล็ด (seed coat) (B) ช่องบรรจุเมล็ด (chamber) และ (C) เอ็มบริโอ (embryo)	13
4.1 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะขามป้อม 3 สายพันธุ์ ทั้งหมด 7 คู่ ไพรเมอร์ ได้แก่ Me2-Em1 (ก) Me3-Em5 (ข) Me4-Em2 (ค) Me4-Em3 (ง) Me4-Em5 (จ) Me5-Em2 (ฉ) และ Me5-Em5 (ช)	24
4.2 ดีเอ็นโปรไฟล์ของมะขามป้อมที่ได้จากการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค SRAP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Me2-Em1 (ก) Me3-Em5 (ข) Me4-Em2 (ค) และ Me4-Em3 (ง) โดยเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส	25
4.3 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิค SRAP ของมะขามป้อม 15 สายพันธุ์	30
4.4 ลักษณะของเซลล์ไลน์ MCF-7, HT-29 และ KB ก่อนและหลังทดสอบกับสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับที่กำลังขยาย 100 เท่า	31
4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

มะขามป้อมมีชื่อที่นิยมเรียกทั่วไปคือ Emblic หรือ Indian gooseberry มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phyllanthus emblica* L. อยู่ในวงศ์ (family) Euphorbiaceae มะขามป้อมเป็นพืชท้องถิ่นที่มีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติอย่างกว้างขวาง พบได้ทั่วไปในป่าเบญจพรรณแล้ง ป่าละเมาะหรือตามป่าชุมชน มะขามป้อมจัดเป็นพืชเขตกึ่งร้อนมากกว่าที่จะเป็นพืชเขตร้อน (นคร และนิภา, 2554) มะขามป้อมเป็นสมุนไพรไทยอีกชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากพบเห็นได้ในป่าธรรมชาติทุกภาคของประเทศไทย เป็นสมุนไพรที่มีการใช้กันมายาวนานเพราะทุกส่วนของต้นมะขามป้อมมีคุณสมบัติทางยาสามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง มีการนำไปใช้ในการรักษาโรค เช่น แก้เยื่อบุตาอักเสบ โรคหนองใน ติดเชื้อที่ผิวหนัง ผลมะขามป้อมมีคุณสมบัติเป็นยาฝาดสมาน ลดไข้ บำรุงหัวใจ ฟอกเลือด แก้ไอ ใช้ละลายเสมหะ แก้เจ็บคอ แก้โรคลักปิดลักเปิดหรือโรคเลือดออกตามไรฟัน มะขามป้อมมีปริมาณวิตามินซีสูง ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดสาเหตุของการเกิดโรคที่อันตราย เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โดยเฉพาะโรคเส้นเลือดหัวใจอุดตันและโรคหลอดเลือดแข็ง (อุดมลักษณ์ และคณะ, 2553) สารสกัดของมะขามป้อมนั้นประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น Emblicanin-A, Emblicanin-B, Pedunculagin และ Punigluconin ซึ่งมีความสามารถช่วยต้านการเกิดเกล็ดเลือด (antiplatelet activity) และสามารถป้องกันการแข็งตัวของเลือดได้ดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับยาต้านเกล็ดเลือด (Fatima *et al.*, 2014) ที่ผ่านมามีการรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเนื้อผลของมะขามป้อมจำนวนมาก (Luo *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2016) จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเมล็ดมะขามป้อม เพื่อเป็นแนวทางในการนำเมล็ดมะขามป้อมที่เป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตร มาเพิ่มมูลค่าและไปประยุกต์ใช้ต่อไป

มีรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Phyllanthus* ทั้งหมด 12 สปีชีส์ ซึ่งมีต้นกำเนิดจากประเทศอินเดียโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR และ RAPD พบว่าเปอร์เซ็นต์ polymorphic bands มีค่าเท่ากับ 97.08 และ 95.54 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนจาก 2 เครื่องหมายข้างต้นทำให้แยกพืชออกได้เป็น 2 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน (Rout and Aparajita, 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะขามป้อมพื้นเมือง อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน โดยเครื่องหมายโมเลกุล AFLP โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.65-1.00 ทำให้สามารถจำแนกกลุ่มของมะขามป้อมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (นคร และคณะ, 2554) จากรายงานการศึกษาข้างต้นทำให้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะขามป้อมที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ต่างๆ ในภาคเหนือโดยศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแพร่ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ โดยอาศัยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) โดย SRAP จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นส่วนที่เกิดการถอดรหัสด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ open reading frames โดยทั่วไปแล้วจะใช้เครื่องหมาย SRAP ในเชิงการเกษตร เพื่ออนุรักษ์และเก็บรักษาพันธุ์พืช (Robarts and Wolfe, 2014) โดย Peng *et al.* (2014) ได้เปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 เครื่องหมายในตังเซียม (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) จำนวน 53 ตัวอย่างที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกันทั้งหมด พบว่าค่าความสามารถในการจำแนกกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาเครื่องหมาย SRAP มีค่ามากกว่าเครื่องหมาย Inter-simple sequence related (ISSR) ซึ่งเป็นเช่นเดียวกับที่ Wu *et al.* (2010) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดพิมเสน (*Pogostemon cablin*) ทั้งหมด 16 กลุ่มประชากร ในประเทศจีน ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุล SRAP ให้ polymorphic bands มากกว่า จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างของพืชในระดับโมเลกุลได้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะขามป้อมสายพันธุ์ต่างๆ โดยเครื่องหมายโมเลกุล SRAP

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) ด้วยเทคนิค SRAP

1.2.2 เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เบื้องต้นและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อม

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

การหาความหลากหลายของมะขามป้อม (*P. emblica* L.) ศึกษาเฉพาะเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) โดยใช้ตัวอย่างใบมะขามป้อมที่เก็บรวบรวมจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแพร่ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ ทั้งหมด 15 สายพันธุ์

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากมะขามป้อม ทำโดยใช้สารสกัดจากเมล็ดที่เหลือจากการบริโภค ซึ่งเก็บรวบรวมจากแหล่งชุมชนบริเวณ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ โดยจะนำมาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เบื้องต้น (cytotoxicity assay) ด้วยวิธี MTT กับเซลล์ต่างๆ ดังนี้ MCF-7 (เซลล์มะเร็งเต้านม) HT29 (เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์) และ KB (เซลล์มะเร็งช่องปาก) และตรวจสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถเพิ่มมูลค่าของเมล็ดมะขามป้อมที่เป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตร

1.4.2 เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์และอนุรักษ์สายพันธุ์ของมะขามป้อม

1.4.3 สามารถนำสารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อมมาประยุกต์ใช้ในการผลิตยารักษาโรค อาหาร และเครื่องสำอาง ได้อย่างคุ้มค่าและมีประสิทธิภาพสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของมะขามป้อม (ดัดแปลงจากนคร และนิภา, 2554)

2.1.1 มะขามป้อม

มะขามป้อม มีชื่อเรียกทั่วไปคือ Emblic หรือ Indian gooseberry มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phyllanthus emblica* L. อยู่ในตระกูล (Family) Euphorbiaceae นอกจากนี้ยังมีชื่ออื่นๆ ตามท้องถิ่นอีก เช่น emblic myrobalan, aonla, amla, emblique, officinale, bilimbi madras, myrobalan emblique

2.1.2 ถิ่นกำเนิดและการแพร่กระจาย

มะขามป้อมเป็นพืชท้องถิ่นที่มีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติอย่างกว้างขวางตั้งแต่บริเวณประเทศเนปาล อินเดีย ศรีลังกา มาจนถึงประเทศในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และขึ้นไปจนถึงประเทศจีนตอนใต้ นอกจากนี้ยังมีการปลูกเป็นการค้าในประเทศจีน อินเดีย ญี่ปุ่นและมาดากัสการ์ คำว่า “emblica” อาจมีที่มาจากคำว่า “amlah” ในภาษาเปอร์เซียหรือคำว่า “ambaliji” ในภาษาอาราบิก ตามธรรมชาติจะพบมะขามป้อมบริเวณป่าเบญจพรรณแล้ง ป่าละเมาะหรือตามป่าชุมชน มะขามป้อมจัดเป็นพืชเขตกึ่งร้อน (subtropical) มากกว่าที่จะเป็นพืชเขตร้อน

2.1.3 ลักษณะของใบ ดอก ผล และเมล็ด

มะขามป้อมเป็นไม้ผลัดใบ (deciduous) ขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลำต้นตั้งตรง ทรงพุ่มโปร่ง ปกติจะมีความสูงที่ประมาณ 7-8 เมตร แต่อาจสูงได้ถึง 25 เมตร มีลักษณะที่สำคัญโดยทั่วไปดังนี้

2.1.3.1 ใบ

มีสีเขียวเข้มขนาดเล็กกว้าง 1-5 มิลลิเมตร ยาว 5-25 มิลลิเมตร รูปร่างขอบขนาน (oblong) ขอบใบเรียบ ปลายใบมน (obtuse) หรือมีหยัก ฐานใบไม่เท่ากัน เป็นใบเดี่ยวแต่เรียงเป็น 2 แถวสลับตรงข้ามระนาบเดียวกันและมีระยะห่างเท่าๆ กัน ปริมาณค่อนข้างหนาแน่นบนกิ่งย่อยขนาดเล็ก (lateral twig) จึงทำให้ดูคล้ายใบประกอบแบบขนนก ไม่มีก้านใบ (sessile) มีหูใบเป็นรูปสามเหลี่ยม (รูปที่ 2.1 ก)

2.1.3.2 ดอก

ดอกเป็นกระจุกเกิดที่ซอกใบบริเวณกลางของกิ่งแขนงย่อย ในแต่ละกระจุกดอกมีดอกเพศผู้หลายดอก ดอกเพศเมีย 1-2 ดอก ดอกเพศผู้มีกลีบเลี้ยง 6 กลีบรูปขอบขนานแกมรูปไข่กลีบหรือรูปช้อน มีต่อม 6 ต่อมที่ฐานรองดอก เกสรเพศผู้ 3 เกสร ดอกเพศเมียมีกลีบเลี้ยง 6 กลีบ รูปขอบขนานหรือรูปช้อนฐานรองดอกเป็นวงมีสัน (Welzen and Chayamarit, 2007) (รูปที่ 2.1 ข)

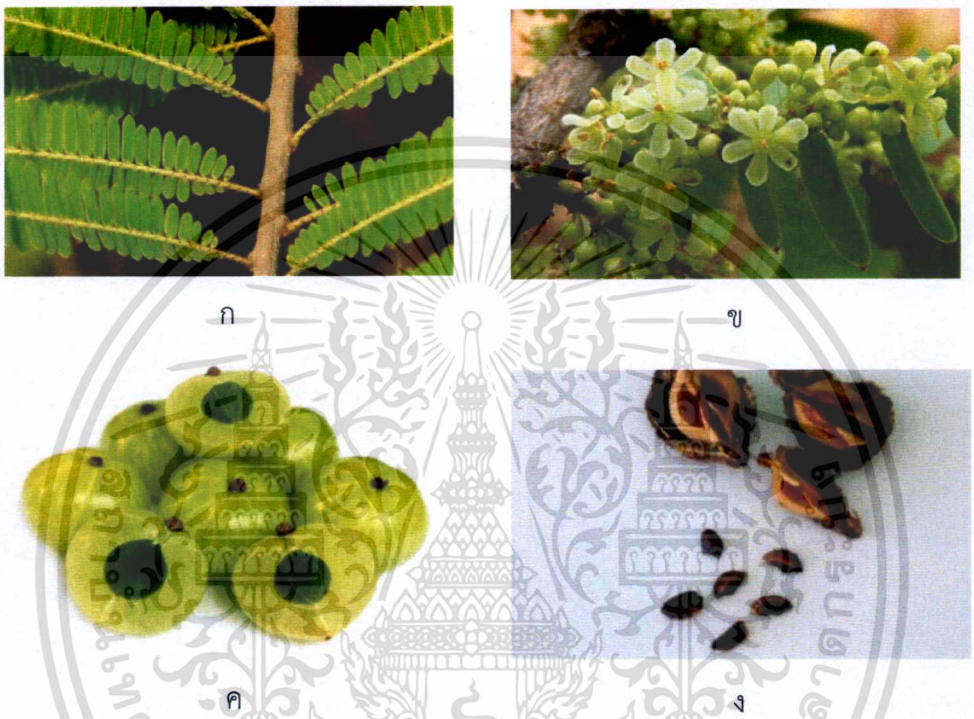
2.1.3.3 ผล

ลักษณะกลมถึงกลมแป้นเป็นผลแบบเมล็ดเดียวแข็ง มีสันผลตามแนวตั้งเป็น 6 สัน ผลดิบสีเขียวเมื่อแก่มีสีเหลืองอมเขียวสดใส เปลือกผลบาง เนื้อผลใส่กรอบฉ่ำน้ำ เนื้อผล (pericarp) เป็นส่วนที่ใช้รับประทาน (รูปที่ 2.1 ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.4 เมล็ด

เปลือกเมล็ด (seed coat) มี 6 กลีบ ซึ่งเมื่อแตกออกจะมี 3 พู แต่ละพูจะมี 2 เมล็ด ในหนึ่งผลจึงมี 6 เมล็ด แต่อาจไม่สมบูรณ์ทั้ง 6 เมล็ด เมล็ดมีรูปร่างเป็นรูปสามเหลี่ยมสีน้ำตาลดำ ยาวประมาณ 4-5 มิลลิเมตร กว้าง 2-3 มิลลิเมตร หรือขึ้นอยู่กับขนาด ความสมบูรณ์ของผล และสายพันธุ์ (รูปที่ 2.1 ง)



รูปที่ 2.1 ลักษณะของใบ (ก) ดอก (ข) ผล (ค) และเมล็ด (ง)
(ที่มา: https://goo.gl/UyNTjA (ก) https://goo.gl/8uLNz9 (ข) https://goo.gl/8uLNz9 (ค) https://goo.gl/8uLNz9 (ง))

2.1.4 คุณสมบัติของมะขามป้อม

ผลมะขามป้อมมีคุณสมบัติทางยามากมาย จากการมีวิตามินซีและแทนนินเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูง ในส่วนต่างๆ ของต้นมะขามป้อมไม่ว่าจะเป็นผลใบหรือเปลือกของลำต้นจะมีปริมาณแทนนินสูงมาก แทนนินเป็น polyphenol จากพืชที่มีรสฝาดเป็นสารฝาดสมาน (astringent) มีสถานะเป็นกรดอ่อน พบได้ในพืชหลายชนิด มีคุณสมบัติทำให้โปรตีนตกตะกอน คุณสมบัติที่มีฤทธิ์ฝาดสมานจึงมีการนำไปใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคท้องร่วงและยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย แทนนินในผลมะขามป้อมจัดอยู่ในพวก gallotannins และ ellagitannins ซึ่งเป็นพวก hydrolysable tannin เมื่อถูก hydrolyze จะได้ gallic acid, ellagic acid และ glucose โดยส่วนใหญ่จะได้ gallic acid การที่ผลมะขามป้อมมีแทนนินอยู่ในปริมาณมากเป็นเหตุผลที่ใช้อธิบายถึงคุณสมบัติในการใช้รักษาโรคต่างๆ โดยเฉพาะความผิดปกติในลำไส้ ลำไส้อักเสบ ระบบหายใจ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า polyphenols มีคุณสมบัติในด้านการรักษาสุขภาพ โดยช่วยลด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณไขมันและน้ำตาลในเลือด กระตุ้นการไหลเวียนของโลหิตและยับยั้งกิจกรรมของสารก่อมะเร็ง (carcinogens) ซึ่งโดยรวมแล้วก็จัดว่ามะขามป้อมมีคุณสมบัติเป็นยาอายุวัฒนะได้ (นคร และนิภา, 2554)

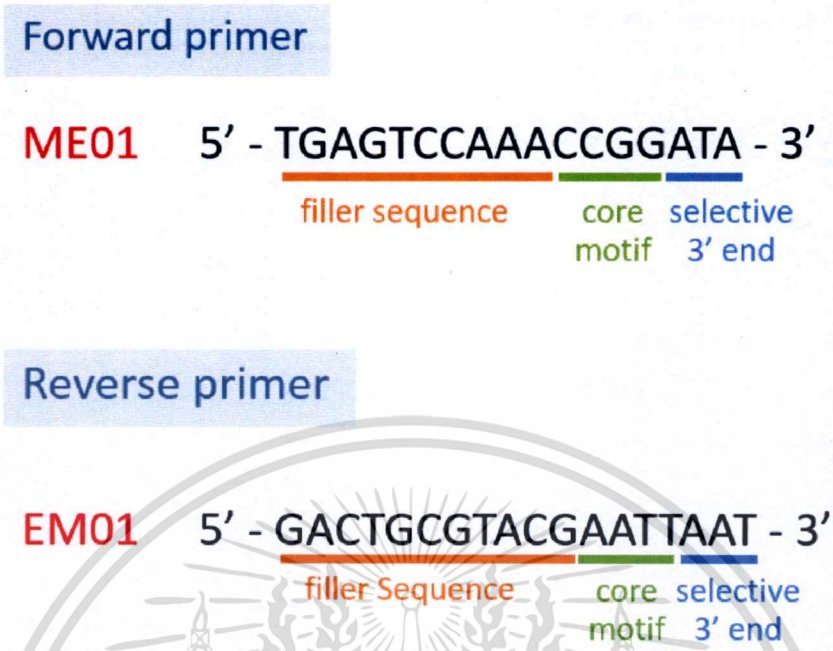
ผลมะขามป้อมมีวิตามินซีสูงมาก จากน้ำคั้นของผล 100 กรัม มีวิตามินซีประมาณ 600-1,300 มิลลิกรัม เนื้อผลสด 100 กรัม มีวิตามินซี 470-680 มิลลิกรัม คุณสมบัติเด่นของวิตามินซีในมะขามป้อมคือ การมีแทนนิน ellagic เป็นตัวช่วยรักษาการคงสภาพของวิตามินซี ไม่ว่าจะแปรรูปโดยการดองในน้ำเกลือหรือการแปรรูปเป็นผงก็ยังคงรักษาคุณสมบัติของวิตามินซีไว้ได้ในขณะที่ผลไม้ชนิดอื่นไม่มี น้ำที่คั้นจากผลมะขามป้อมสามารถคงคุณภาพวิตามินซีได้นานเป็นสัปดาห์ ดังนั้นการบริโภคอาหารทุกวันจำเป็นต้องมีวิตามินซีอยู่ในอาหารในแต่ละวันอย่างสม่ำเสมอ เพราะวิตามินซีไม่สามารถสะสมอยู่ในร่างกายได้ ร่างกายเราได้รับวิตามินซีอย่างเพียงพออยู่แล้วจากการรับประทานอาหารในแต่ละวัน ถ้าเราบริโภคเข้าไปมากเกินกว่าความต้องการของร่างกาย วิตามินซีจะถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะ วิตามินซีมีบทบาทมากมายในร่างกายของเรา เช่น ช่วยปกป้องรักษาเซลล์ให้สมบูรณ์เป็นปกติ ช่วยทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมธาตุเหล็กจากอาหารที่เรารับประทาน การขาดวิตามินซีทำให้เกิดอาการลักเปิดลักปิด (scurvy) ระยะต่อมาก็จะเกิดอาการของโรคโลหิตจาง (anaemia) เลือดออกที่เหงือก (bleeding from the gums) เลือดไหลไม่หยุด (petechial and sheet haemorrhages) และแผลหายช้า ในผู้ใหญ่การขาดวิตามินซีอาจมีอาการเริ่มเหนื่อยล้า (fatigue) อ่อนเพลีย (weakness) ปวดตามข้อและกล้ามเนื้อ (นคร และนิภา, 2554)

2.2 Sequence-related amplified polymorphism (SRAP)

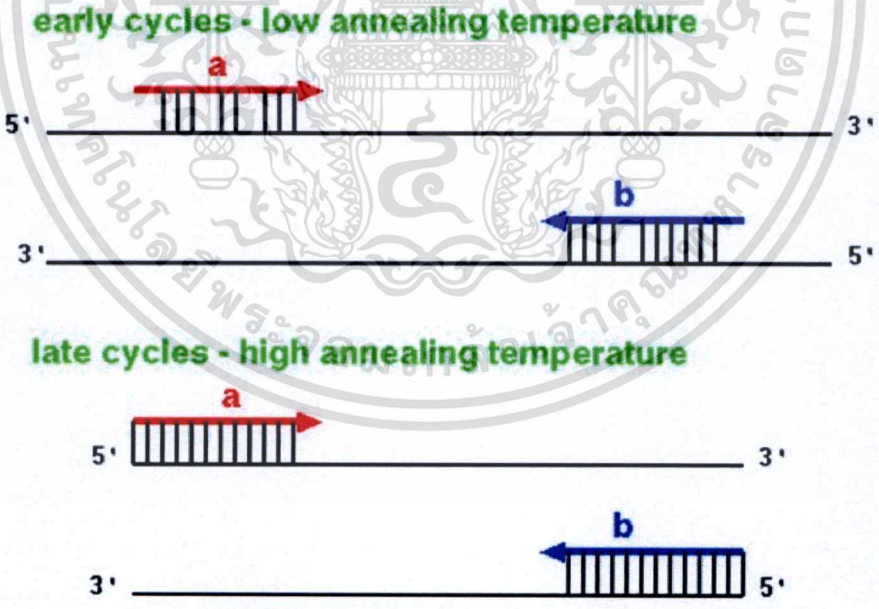
เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นโดย Li and Quiros (2001) ซึ่งได้ออกแบบไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ชนิด forward มีขนาด 17 เบส ที่ประกอบด้วยลำดับเบสแกน (core sequence) ที่เหมือนกันยาว 14 เบสเป็นส่วนของลำดับเบสที่ไม่มีอะไรพิเศษเรียกว่า filler ยาว 10 เบส ต่อด้วยเบส CCGG เพื่อให้จับได้กับส่วนเอ็กซอน (exon) หรือ Open Reading Frames (ORFs) ซึ่งมักเป็นบริเวณที่มีองค์ประกอบของเบสเป็น GC สูง (GC rich) ตรงปลาย 3' ของไพรเมอร์เป็นเบสคัดเลือก (selective base) อีก 3 เบส ที่เปลี่ยนแปลงได้โดยอาศัยหลักการเดียวกับไพรเมอร์ของเครื่องหมาย AFLP ส่วน reverse มีขนาด 18 เบส ประกอบด้วยลำดับเบสแกนที่เหมือนกันยาว 15 เบส เป็นส่วน filler ยาว 11 เบส ต่อด้วยเบส AATT เพื่อให้จับได้กับดีเอ็นเอในจีโนมบริเวณที่มี AT สูง ซึ่งมักพบในส่วนอินทรอน (intron) และ promoter ของยีนตรงปลาย 3' ของไพรเมอร์เป็นเบสคัดเลือกที่เปลี่ยนแปลงได้อีก 3 เบส ดังรูปที่ 2.2

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้วิธี step up PCR คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ต่ำที่ 35 องศาเซลเซียส 5 รอบ เพื่อให้ไพรเมอร์ทั้ง forward และ reverse จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ดีแล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิ annealing ให้สูงขึ้นตามปกติแล้วเพิ่มจำนวนอีก 35 รอบ เพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นแบบทวีคูณเฉพาะส่วนที่มาจาก 5 รอบแรกเท่านั้น ทำให้ผลที่ได้มีประสิทธิภาพและคงที่ ดังรูปที่ 2.3 หากเพิ่มจำนวนรอบเป็น 40 รอบ จะส่งผลให้ประสิทธิภาพของแถบดีเอ็นเอแย่ลง หลังจากนั้นตรวจสอบผลด้วยเจลพอลิอะครีลาไมด์ ผลที่ได้จะพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน โดยการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ลักษณะของไพรเมอร์ SRAP
(ที่มา: ดัดแปลงจาก https://www.scienceopen.com/document_file/11fe6323-727f-474a-9a52-1ae9b91d3b00/PubMedCentral/image/1746-4811-9-6-11)



รูปที่ 2.3 กลไกการทำงานของเทคนิค SRAP
(ที่มา: ดัดแปลงจาก http://images.slideplayer.com/25/8613108/slides/slide_28.jpg)

Li and Quiros (2001) ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค SRAP marker และ AFLP marker ในการทำแผนที่ยีนเพื่อติดตามยีน GLS-ALK และหาลำดับเบสในลูกผสมระหว่างสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่เป็น double-haploid ของ *Brassica oleracea L.* พบว่า SRAP marker จะครอบคลุมส่วนต่างๆ ของจีโนมได้กว้างทำได้ง่าย จำเพาะต่อส่วน Open Reading Frames ผลน่าเชื่อถือ ทำการทดลองซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) ง่ายต่อการแยกแถบดีเอ็นเอมาเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเมื่อนำมาทำการหาแผนที่ยีนจะพบว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ของแถบที่เกิดขึ้นเป็นแบบ co-dominant ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบ AFLP marker นอกจากนั้นยังเป็นที่ทราบกันดีว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดจาก AFLP marker นั้นยากต่อการแยกเนื่องจากแถบเกิดการซ้อนทับกัน (overlapping) ด้วยเหตุนี้เองจึงนิยมนำเทคนิค SRAP มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิด

Wu *et al.* (2010) รายงานการศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมของพืชชนิดพิมเสน (*Pogostemon cablin*) ที่ได้จาก 16 พื้นที่ที่แตกต่างกันทางตอนใต้ของประเทศจีน โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล 2 ชนิด คือ SRAP และ ISSR โดยในเทคนิค SRAP นั้นใช้ไพรเมอร์ 18 คู่ เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 294 แถบ เฉลี่ย 16.3 แถบต่อคู่ ไพรเมอร์ และพบแถบที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม 241 แถบจาก 294 แถบ คิดเป็น 81.97 เปอร์เซ็นต์

Abedian *et al.* (2012) รายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในเชอร์รี Saint Lucie (*Prunus mahaleb* L.) 47 จีโนไทป์ และเชอร์รี่ป่า (*Prunus avium* L.) 6 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน โดยอาศัยเทคนิค SRAP ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 13 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 114 แถบ เฉลี่ย 8.77 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ โดยแตกต่างกัน 55 แถบ (48 เปอร์เซ็นต์) เมื่อนำมาสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram) ทำให้สามารถแบ่งเชอร์รี่ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนตั้งแต่ 0.16-0.93

2.3 การสกัดสารด้วยวิธี Maceration

วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด โดยเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารในพืชสมุนไพร แล้วนำสมุนไพรไปแช่ในภาชนะที่ปิดเขย่าเป็นเวลาและแช่ไว้อย่างน้อย 2-7 วัน จากนั้นนำมากรองเอาสารสกัดออกมาจากการสมุนไพรให้ได้มากที่สุด นำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกแล้วจึงนำสารที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อ วิธีนี้มีข้อดี คือ สารสกัดจะไม่ถูกความร้อนทำให้โอกาสในการสลายตัวของสารสกัดลดลง ข้อเสียของวิธีนี้คือจะสิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก (ประสาทพร และคณะ, 2551)

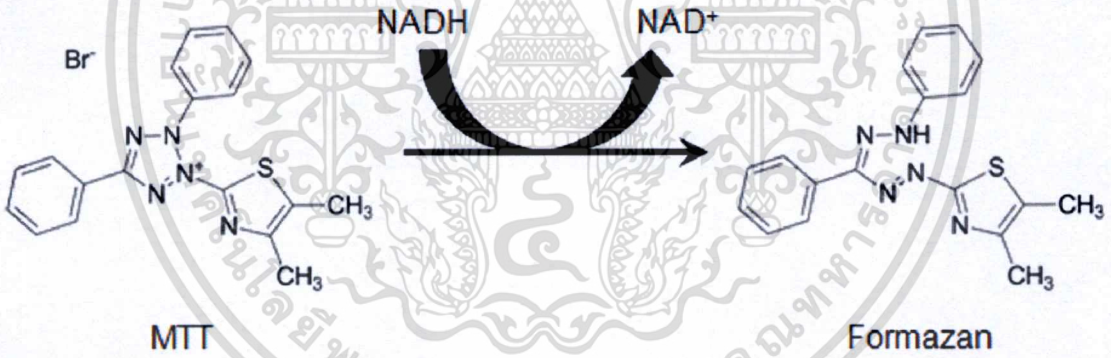
Dinesh *et al.* (2016) ได้ทำการศึกษาสารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) บดเมล็ดมะขามป้อมเป็นผงแห้ง 300 กรัม รอบแรกสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ รอบสองสกัดด้วยเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดเมทานอลมาวิเคราะห์หาสารประกอบด้วย GC–MS (Gas Chromatography - Mass Spectroscopy) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดมะขามป้อมประกอบไปด้วย อัลคาลอย (alkaloid) แทนนิน (tannin) ไฟโตสเตอรอล (phytosterol) และฟีนอล (phenol) นอกจากนี้ในเมล็ดมะขามป้อมยังพบปริมาณฟีนอลทั้งหมด 48.242 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid) 12.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจะพบปริมาณฟีนอลมากกว่าเมื่อเทียบกับปริมาณฟลาโวนอยด์ สารฟีนอลที่พบส่วนมากเป็นสาร octyl-β-D-Glucopyranoside อัตราส่วน 43.795 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดที่ได้จากเมล็ดมะขามป้อมมีคุณสมบัติเป็น antioxidant และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) หรือตัวรีดิวซ์ (reducing) ที่มีส่วนช่วยในการย่อยสลายสารประกอบ nitrophenol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

เป็นการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิด reaction oxygen species (ROS) ขึ้นในเซลล์สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจลดการตายของเซลล์เนื่องจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) และเซลล์ที่ตาย (dead cell) หรือทดสอบจากการทำงานของไมโทคอนเดรีย และคำนวณเซลล์ที่มีชีวิตเป็นร้อยละของความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (%cell viability) วิธีที่นิยมทดสอบ คือ MTT reduction assay (รัชฎาพร และคณะ, 2554)

หลักการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี MTT reduction assay (3-(4,5-dimethylyhiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) คือการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยวัดจาก mitochondrial succinic dehydrogenase activity ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะมี mitochondrial function ในเซลล์ Krebs cycle ที่เกิดใน mitochondria เป็น metabolic pathway ที่สำคัญในการสังเคราะห์ adenosine triphosphate จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยขั้นตอนแรก คือ การเปลี่ยน succinate ไปเป็น fumarate โดย succinic dehydrogenase (SDH) ส่วน FAD เป็นตัวที่ทำให้ปฏิกิริยา reduction สมบูรณ์โดยผ่าน $FADH_2$ และ $FADH_2$ สามารถเปลี่ยน tetrazolium salt ที่มีสีเหลือง ไปเป็น formazan ที่มีสีน้ำเงินและตกตะกอนใน mitochondria ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ MTT และผลึกสี formazan
(ที่มา: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/figure/mttassays.F1/?report=Objectonly)

MTT เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบจำนวนเซลล์ การมีชีวิตของเซลล์ และการเจริญเติบโตของเซลล์ (Riss, 2014) โดย MTT เป็นสาร tetrazolium salt ซึ่งเป็นสารที่ให้ค่าถูกต้อง แม่นยำ และมีความสม่ำเสมอ ในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อเทียบกับสารอื่น เช่น MTS (เบ็ญจมาศ, 2553) โดยการทดสอบของวิธี MTT ต้องการ disodium succinate เป็นตัวตั้งต้นเมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์มีผลทำให้มีการเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีน้ำเงิน และระดับของการเปลี่ยนสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ enzymatic reduction ของ tetrazolium salt ผลึกของ MTT formazan สามารถละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (รัชฎาพร และคณะ, 2554) โดยสาร MTT จะเตรียมในรูปสารละลายที่มีส่วนช่วยในการรักษาสมดุลของสรีรวิทยาของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ ความเข้มข้นของสาร MTT ที่ใช้เติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยทั่วไปจะมีความเข้มข้นสุดท้าย 0.2-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มเป็นระยะเวลาประมาณ 1-4 ชั่วโมง ปริมาณของผลึก formazan เป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร โดยใช้ plate reading spectrophotometer (Riss *et al.*, 2016)

Mosmann (1983) ได้นำ tetrazolium salt มาใช้ในการทดลองปริมาณความอยู่รอดและการแพร่กระจายของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การทดสอบนี้สามารถตรวจพบได้เฉพาะเซลล์มีชีวิตเท่านั้น แต่ไม่สามารถตรวจเซลล์ที่ตายแล้วได้และสัญญาณที่สร้างขึ้นอยู่กับระดับของกิจกรรมของเซลล์ วิธีการนี้จึงสามารถนำมาใช้ในการวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ การแพร่กระจายหรือกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ ผลลัพธ์ที่ได้สามารถอ่านได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer multiwell (ELISA Reader) และมีความแม่นยำของข้อมูลที่สูง ข้อดีของการทดสอบด้วยสีมีความรวดเร็ว มีความแม่นยำที่สูงและไม่จำเป็นต้องติดรังสีไอโซโทป

Zhong *et al.* (2011) ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) ที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และอะซีติกอีเทอร์ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5, 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดจากใบมะขามป้อมที่แยกได้จากชั้นอะซีติกอีเทอร์มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ BEL-7404 (เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์) สูง โดยความเข้มข้นที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ BEL-7404 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) อยู่ที่ 15.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้สารสกัดนี้ศึกษาความเป็นพิษต่อภูมิคุ้มกันกับ T และ B cell ด้วยวิธี MTT ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความเข้มข้นที่ทาให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ T และ B cell ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) อยู่ที่ 256.74 และ 305.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สรุปได้ว่าสารสกัดจากใบมะขามป้อมที่ได้จากชั้นอะซีติกอีเทอร์มีความเป็นพิษต่อภูมิคุ้มกันต่ำในหลอดทดลอง

ศศมล และประเสริฐ (2557) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 (เซลล์มะเร็งเต้านม) และ Caco2 (เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่) ของสารสกัดหยาบจากใบและลำต้นของฮว่านง็อก (*Pseuderanthemum palatiferum*) ที่ความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 และ 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบจากใบเมื่อทดสอบกับเซลล์ MCF-7 และ Caco2 มีค่า (IC_{50}) อยู่ที่ 593±12 และ 445±45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากลำต้นเมื่อทดสอบกับเซลล์ MCF-7 และ Caco2 มีค่า (IC_{50}) มากกว่า 5,000 และ 620±94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากลำต้นฮว่านง็อกไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม

2.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

รัชนี และคณะ (2551) ได้กล่าวไว้โดยสรุปดังนี้ อนุมูลอิสระ (Free Radicle) คือ โมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน ซึ่งโดยปกติในร่างกายของเรามีโมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนคู่ ในกรณีที่ร่างกายมีการสูญเสียอิเล็กตรอนจากการถูกอนุมูลอิสระแย่งจับ กล่าวคืออนุมูลอิสระจะเข้าไปทำลายเซลล์ เมื่อร่างกายไม่สามารถผลิตหรือได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอที่จะไปยับยั้งหรือไปจับอนุมูลอิสระได้ ผลคือทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง หัวใจและหลอดเลือด และโรคอื่นๆ สารต้านอนุมูลอิสระจะทำหน้าที่ป้องกันหรือแย่งจับกับอนุมูลอิสระ และนำอนุมูลอิสระเหล่านั้นไปทิ้งนอกเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่ถูกทำลายใน

เอกสารนี้ถือเป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือจำหน่ายในรูปแบบใดๆ ทั้งสิ้น
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

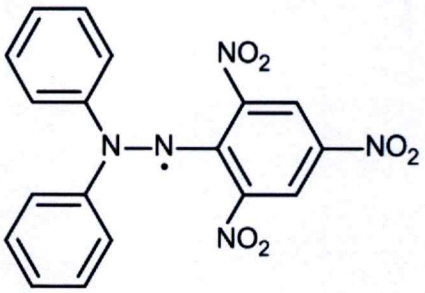
ร่างกายของมนุษย์มีเอนไซม์ที่สร้างขึ้นเพื่อจับกับอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เอนไซม์ catalase glutathione peroxidase แต่ร่างกายมักสร้างไม่เพียงพอ และเมื่อคนเรามีอายุมากขึ้น การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระจะลดลง ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาสารต้านอนุมูลอิสระจึงมีความสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์

สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง คือ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์และจากธรรมชาติ (บุหรัน, 2556) สารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในธรรมชาติ คือ สารประกอบฟีนอลิก เช่น กรดฟีนอลิก ฟีนิลโปรพานอยด์ และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงโครงสร้างโพลีเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น โดยพบมากใน พืชผัก ผลไม้ และชาเขียว (ปรีชา และคณะ, 2549) จากการศึกษาของ Zhang *et al.* (1999) ในคนไข้ผู้หญิง 83,234 คน ช่วงอายุตั้งแต่ 33-60 ปี พบว่าการบริโภคผักและผลไม้ที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์ วิตามินเอ วิตามินซี และวิตามินอีในปริมาณสูง สามารถลดความเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งเต้านม นอกจากนี้ Klipstein-Grobusch *et al.* (1999) ได้รายงานว่าการบริโภคผักและผลไม้ที่มีปริมาณเบต้า-แคโรทีนสูง ในผู้สูงอายุจำนวน 4,802 คน ที่มีอายุตั้งแต่ 55-95 ปี นั้นสามารถป้องกันการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดได้จริง ดังนั้นการรับประทานผักผลไม้ที่ประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระสามารถก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพของผู้รับประทาน

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ โดยวิธีที่นิยม คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้เช่น DPPH การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหาได้จากอัตราส่วนของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน (เช่น Trolox, vitamin C และ ferrous sulfate) หน่วยของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณแสดงได้ 2 แบบ คือ (1) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูงก็แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงและ (2) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}, 50% of inhibitory concentration) โดยค่าตัวเลขค่าแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ทั้งสองแบบสามารถแสดงหน่วยได้หลากหลาย ได้แก่ μM/mg, mM/mg, μM/mL, mM/mL เป็นต้น (บุหรัน, 2556)

DPPH เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ดังรูปที่ 2.5 เป็น stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical)
(ที่มา: ดัดแปลงจากhttps://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e9/ DPPH_ radical.svg)

ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH• เหลืออยู่ 50 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาความสามารถในการต้านการออกซิเดชัน ในสารตัวอย่างนิยมรายงานเป็นค่า EC_{50} ทำโดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %Remaining DPPH• กับความเข้มข้นของสารมาตราฐานตัวอย่าง เพื่อหาค่า EC_{50} โดยคำนวณ %Remaining DPPH• ดังนี้

$$\%\text{Remaining DPPH}\bullet = (Abs_{sample}/Abs_{control}) \times 100$$

และนอกจากนี้แล้วยังมีการรายงานรูปของค่า IC_{50} ด้วย ซึ่งทำโดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition DPPH• กับความเข้มเข้นของสารตัวอย่าง เพื่อหาค่า IC_{50} โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์ Inhibition DPPH• ดังนี้ (ปรียานันท์, 2549)

$$\%\text{ Inhibition DPPH}\bullet = ((Abs_{control} - Abs_{sample})/ Abs_{control}) \times 100$$

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน

ข้อเสียของวิธีนี้ คือ DPPH• มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์ร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้ โครงสร้างทางเคมีของ DPPH• ที่แสดงจะเห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตรทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง ทั้งๆที่สารต้านอนุมูลนั้นมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้สี DPPH• จางลงอีกด้วย (บังอร และศศิลักษ์, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างพืชมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) โดยจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ใบ ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเทคนิค SRAP และเมล็ด ใช้ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.1.1 ตัวอย่างใบที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลาย

ตัวอย่างใบมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแพร่ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ แทนด้วยรหัสตัวย่อ PE ตามด้วยตัวเลข ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 รหัสตัวอย่าง และชื่อสายพันธุ์ของมะขามป้อม 15 สายพันธุ์

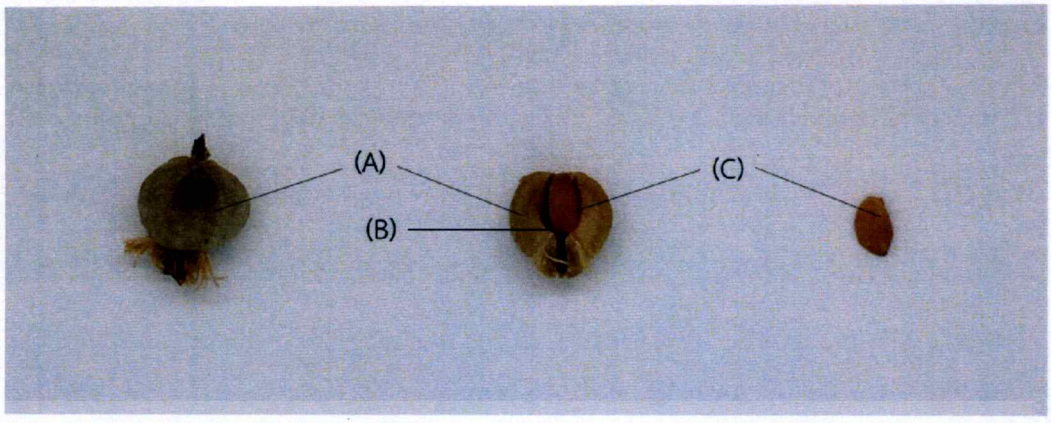
รหัสตัวอย่าง	สายพันธุ์	แหล่งพันธุ์ (จังหวัด)
PE01	ปากกาง	แพร่
PE03	น้ำคะ	พะเยา
PE04	สีกาแฟ	กาญจนบุรี
PE05	แม่ลูกดก	กาญจนบุรี
PE06	วังหงส์	แพร่
PE07	นาคูหา	แพร่
PE08	แป้นสยาม	กาญจนบุรี
PE09	ปางเคาะ	แพร่
PE10	ลูกท้อ	กาญจนบุรี
PE11	ห้วยลึก	เชียงใหม่
PE12	หนองห้า	พะเยา
PE13	บ่อแก้ว	แพร่
PE14	ดงเย็น	เชียงใหม่
PE15	หยกมณี	กาญจนบุรี
PE16	นาพูน	แพร่

(ที่มา: วิภาดา และคณะ (2558) และ ศรีสุดา และคณะ (2558))

3.1.2 ตัวอย่างเมล็ดที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตัวอย่างเมล็ดมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนคุณวิสิทธิ์และคุณมังกร จ.แพร่ ประเทศไทย แสดงดังรูปที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 เมล็ดมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) และองค์ประกอบ : (A) เปลือกเมล็ด (seed coat) (B) ช่องบรรจุเมล็ด (chamber) และ (C) เอ็มบริโอ (embryo)
(ที่มา: พรพรรณ น้าวิไลเจริญ)

3.2 ตัวอย่างเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 3 เซลล์ ดังนี้

3.2.1 เซลล์มะเร็งเต้านม (Human Breast Adenocarcinoma Cell Line :MCF-7) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.พรทิพา พิชา งานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

3.2.2 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ (Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line :HT29) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.พรทิพา พิชา งานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

3.2.3 เซลล์มะเร็งช่องปาก (Oropharyngeal Epidermoid Carcinoma Cell Line :KB) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบพืช

3.3.1.1 โกร่ง (mortar) และที่บด (Pestle)
3.3.1.2 กรรไกร (Scissors)
3.3.1.3 ปากคีบ (Forceps)
3.3.1.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
3.3.1.5 ช้อนตักสาร (Spatula)
3.3.1.6 บีกเกอร์ (Beaker)
3.3.1.7 ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes) และทิป (Micropipette tips) ขนาดต่างๆ
3.3.1.8 กระบอกไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen contaminer)
3.3.1.9 หลอดทดลอง (Eppendorf tube) ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
3.3.1.10 ที่ใส่หลอดทดลอง (Rack) ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
3.3.1.11 ตู้ดูดควัน (Fume hood)
3.3.1.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.3.1.14 ตู้บ่ม (Incubator)

3.3.1.15 เครื่องทำความร้อน (Heat block)

3.3.1.16 ตู้เย็น (Refrigerator)

3.3.1.17 กระดาษทิชชู่ (Tissue paper)

3.3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

3.3.2.1 ชุด GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel)

3.3.2.2 หลอดทดลอง (PCR tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.3.2.3 ที่ใส่หลอดทดลอง (Rack) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.3.2.4 ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes) และทิป (Micropipette tips) ขนาดต่างๆ

3.3.2.5 ถุงมือยาง (Rubber glove)

3.3.2.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.3.2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.3.2.8 เครื่องทำความร้อน (Heat block)

3.3.2.9 ตู้แช่แข็ง (Freezer)

3.3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

3.3.3.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer); Eppendorf BioPhotometer™

3.3.3.2 กระดาษทิชชู่ (Tissue paper)

3.3.3.3 คิวเวตควอตซ์ (Quartz semi-cuvette)

3.3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

3.3.4.1 กระดาษชั่งสาร

3.3.4.2 กระดาษทิชชู่ (Tissue paper)

3.3.4.3 เครื่องชั่งสาร (Balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.3.4.4 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.3.4.5 ฟลาสก์ (Flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร

3.3.4.6 ไมโครเวฟ (Microwave oven)

3.3.4.7 Magnetic stirrer

3.3.4.8 ชุดอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

3.3.4.9 ถุงมือยาง (Rubber glove)

3.3.4.10 ฟิล์มพลาสติก (Plastic wrap)

3.3.4.11 ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes) และทิป (Micropipette tips) ขนาดต่างๆ

3.3.4.12 คอมพิวเตอร์ (Computer)

3.3.4.13 ชุดถ่ายภาพเจล (Gel document system); SYNGENE InGenuis Bio Imaging

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

3.3.5.1 หลอดทดลอง (PCR tube) ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร

3.3.5.2 ที่ใส่หลอดทดลอง (Rack)ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร

3.3.5.3 ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes) และทิป (Micropipette tips) ขนาดต่างๆ

3.3.5.4 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองยี่ห้อ Eppendorf รุ่น Master cycler ep GradientS

3.3.5.5 เครื่องผสมสาร (Vortex)

3.3.5.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (Spin down centrifuge)

3.3.6 อุปกรณ์ในการสกัดสารจากตัวอย่างเมล็ด

3.3.6.1 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.3.6.2 เครื่องปั่น (Blender)

3.3.6.3 ถุงพลาสติก (Plastic bag) ขนาดต่างๆ

3.3.6.4 เครื่องชั่ง (Balance)

3.3.6.5 ขวดแก้ว (Vial) ขนาดต่างๆ

3.3.6.6 ผ้าขาวบาง (White cloth)

3.3.6.7 กระดาษฟรอยด์ (Foil)

3.3.6.8 กระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 (Whatman No. 1 filter paper)

3.3.6.9 ชุดกรองสารแบบสุญญากาศ (Vacuum filter)

3.3.6.10 ชุดเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)

3.3.6.11 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.3.6.12 โถดูดความชื้น (Desicator)

3.3.6.13 กรวยแยก (Separating funnel)

3.3.6.14 กรวย (Glass funnel)

3.3.6.15 บีกเกอร์ (Beaker)

3.3.6.16 Magnetic stirrer และ Magnetic bar

3.3.7 อุปกรณ์ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เบื้องต้นด้วยวิธี MTT

3.3.7.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow hood)

3.3.7.2 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ (Compound light microscope)

3.3.7.3 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted microscope)

3.3.7.4 จานเพาะเลี้ยง 96 หลุม (96 Well plate)

3.3.7.5 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) และแผ่นปิดสไลด์ (Cover slip)

3.3.7.6 หลอดทดลอง (Tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.3.7.7 ปิเปตแก้ว

3.3.7.8 สำลี

3.3.7.9 กระดาษทิชชู่ (Tissue paper)

3.3.7.10 ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes) และทิป (Micropipette tips) ขนาดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7.11 เครื่องนับเซลล์ (Counter)

3.3.7.12 ไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader)

3.3.7.13 ตู้บ่ม (Incubator)

3.3.7.14 คอมพิวเตอร์ (Computer)

3.3.7.15 โปรแกรม GraphPad Prism 7.0

3.3.8 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay

3.3.8.1 จานเพาะเลี้ยง 96 หลุม (96 Well plate)

3.3.8.2 Multichannel pipette

3.3.8.3 Microplate reader

3.3.8.4 บีกเกอร์ (Beaker)

3.3.8.5 ขวดแก้ว (Vial) ขนาดต่างๆ

3.3.8.6 กระดาษฟรอยด์ (Foil)

3.3.8.7 ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes) และทิป (Micropipette tips) ขนาดต่างๆ

3.4 สารเคมี

3.4.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบพืช

3.4.1.1 2X CTAB buffer

3.4.1.2 β-meraptonethanol

3.4.1.3 Choloform:isoamyl alcohol (24:1)

3.4.1.4 RNase A

3.4.1.5 10% CTAB

3.4.1.6 Isopropanol

3.4.1.7 70% Ethanol

3.4.1.8 Absolute ethanol

3.4.1.9 TE buffer

3.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยชุด GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel)

3.4.2.1 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (DI water)

3.4.2.2 Buffer DB

3.4.2.3 Absolute ethanol

3.4.2.4 Wash buffer

3.4.2.5 Elution buffer

3.4.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

3.4.3.1 ผงอะกาโรส

3.4.3.2 1X TBE buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3.3 เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide)

3.4.3.4 สีย้อม (loading dye) ความเข้มข้น 3X

3.4.3.5 1 kb DNA Ladder

3.4.3.6 100 bp DNA Ladder

3.4.4 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

3.4.4.1 10X PCR buffer

3.4.4.2 $MgCl_2$

3.4.4.3 dNTPs

3.4.4.4 Taq DNA polymerase ของบริษัท New England Biolabs

3.4.4.5 Forward และ Reverse primers แสดงดังตารางที่ 3.2

3.4.4.6 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (DI water)

3.4.4.7 DNA template

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SRAP primers ที่ใช้ในการศึกษานี้

Forward primers	Reverse primers
Me1: 5' - TGAGTCCAAACCGGATA - 3'	Em1: 5' – GACTGCGTACGAATTAAT - 3'
Me2: 5' - TGAGTCCAAACCGGAGC - 3'	Em2: 5' – GACTGCGTACGAATTTGC - 3'
Me3: 5' - TGAGTCCAAACCGGAAT - 3'	Em3: 5' – GACTGCGTACGAATTGAC - 3'
Me4: 5' - TGAGTCCAAACCGGACC - 3'	Em4: 5' – GACTGCGTACGAATTTGA - 3'
Me5: 5' - TGAGTCCAAACCGGAAG - 3'	Em5: 5' – GACTGCGTACGAATTAAC - 3'
	Em6: 5' – GACTGCGTACGAATTGCA - 3'

(ที่มา: Li and Quiros (2001))

3.4.5 สารเคมีที่ใช้สกัดสารจากตัวอย่างเมล็ด

3.4.5.1 สารละลายเมทานอล (Methanol)

3.4.6 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เบื้องต้นด้วยวิธี MTT

3.4.6.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institue 1640 (RPMI 1640)

3.4.6.2 ซีรั่ม (Fetal Bovine Serum : FBS)

3.4.6.3 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide : DMSO)

3.4.6.4 สีทริปแพนบลู (Trypan blue) 0.4 เปอร์เซ็นต์

3.4.6.5 สารฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate Buffer Saline : PBS)

3.4.6.6 สารละลายไมโตมัยซิน ซี (Mitomycin C)

3.4.6.7 สารละลาย MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.7 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay

3.4.7.1 สารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

3.4.7.2 สารละลายโทรลอกซ์ (Trolox)

3.4.7.3 สารละลายเมทานอล (Methanol)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP

3.5.1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบพืชโดยใช้วิธี CTAB (ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle, 1990)

นำตัวอย่างใบที่ล้างทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโกร่งที่แช่เย็น จากนั้นเติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมตัวอย่างใบ และบดตัวอย่างใบจนละเอียดเป็นผงแห้ง ตักตัวอย่างใบที่บดใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร ทำการเติม 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และ β-mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กลับหลอดทดลองไปมาเพื่อผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำมาบ่มที่อ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-4 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุก 15 นาที หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 นาที เมื่อครบเวลาทำการเติม chloroform:isoamylalcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาอย่างเบาๆ นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 2 มิลลิลิตร ในขณะดูดควรระวังไม่ให้ดูดโดนส่วนที่เป็นเศษขึ้นมา และทำการเติม RNase A ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ขั้นตอนต่อมาเติม 10%CTAB ใน 0.7 M NaCl ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการเติม chloroform:isoamylalcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาอย่างเบา ๆ นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในขณะดูดควรระวังไม่ให้ดูดโดนส่วนที่เป็นเศษขึ้นมา จากนั้นเติม isopropanol ที่เย็นจัดให้มีปริมาตร 1 : 1 โดยปริมาตร (v/v) ของสารละลายส่วนใส กลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส 1 คืน เมื่อครบกำหนด นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสออก คว่ำหลอดทดลองบนกระดาษที่ซับน้ำได้นาน 1-2 นาที เพื่อให้ isopropanol ที่ตกค้างในหลอดไหลลงมา จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นเอทานอล ทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย 90% ethanol หรือ absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นเอทานอล ทิ้ง จากนั้นคว่ำหลอดทดลองบนกระดาษทิชชู่ เป็นระยะเวลาประมาณ 30-60 นาที หรือ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที เพื่อให้เอทานอลที่ตกค้างอยู่บนตะกอนดีเอ็นเอระเหยออกไป และทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ก่อนใช้งานควรบ่มที่ 65 องศา-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส แล้วเติมลงหลอดทดลองที่มีตะกอนดีเอ็นเอ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมด โดยบ่มไม่เกิน 1 คืน จากนั้นเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำการวิเคราะห์คุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วง 260-280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Eppendorf BioPhotometer™ แสดงวิธีการดังข้อ 3.5.1.3

3.5.1.2 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยชุด GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ของมะขามป้อมที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (DI water) ให้มีปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร นำมาเติม buffer DB ปริมาตร 1 : 1 โดยปริมาตร (v/v) และผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกัน เติม absolute ethanol 1 เท่าของตัวอย่างดีเอ็นเอ และทำการย้ายใส่ลงในคอลัมน์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,460 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่อยู่ในคอลัมน์ด้วย wash buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,460 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง และนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,460 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง และเป็นการกำจัดเอทานอล ที่หลงเหลือให้หมดไป ซึ่งถ้าเอาออกไม่หมดจะมีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอย้ายคอลัมน์ลงหลอดทดลองหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม elution buffer ก่อนใช้ elution buffer ต้องบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เพื่อให้การชะดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพ เติมปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยแบ่งใส่ elution buffer ครั้งละ 25 ไมโครลิตร ทำ 2 รอบ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,460 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในหลอดทดลองด้านล่าง ขั้นตอนสุดท้ายเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.1.3 การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 495 ไมโครลิตร (dilution factor เท่ากับ 100) เปิดเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Eppendorf BioPhotometer™ กด dilution ตั้งค่าปริมาตรตัวอย่าง (sample) เท่ากับ 5 ไมโครลิตร จากนั้นกด enter ตั้งค่าปริมาตรน้ำกลั่น (diluent) เท่ากับ 495 ไมโครลิตร กด enter จากนั้นใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคิวเวตควอตซ์ กด blank และทำการล้างคิวเวตควอตซ์ แล้วเช็ดให้แห้ง ดูดสารละลายที่เตรียมได้ในข้อที่ 3.5.1.2 ใส่ลงในคิวเวตควอตซ์แล้วใส่ลงในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Eppendorf BioPhotometer™ จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยกด sample บันทึกค่าการดูดกลืนแสง หรือค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และปริมาณดีเอ็นเอในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร ที่อ่านได้จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำซ้ำจนครบทุกตัวอย่าง จากนั้นคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และปริมาณดีเอ็นเอในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร หรือ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อตรวจสอบความถูกต้องจากสูตรดังนี้

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (µg/ml) = OD260 x 50 µg/ml x dilution factor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.1.4 เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ชั่งผงอะกาโรสตามปริมาณที่ต้องการ จากนั้นเติม 1X TBE buffer ลงไปตามปริมาตรที่ต้องการ เช่น หากต้องการเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ชั่งผงอะกาโรส 0.4 กรัม เติม TBE buffer 40 มิลลิลิตร แล้วทำการละลายโดยใช้ไมโครเวฟจนได้สารละลายเหลวใส รอจนกว่าอุณหภูมิจะลดลงเหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเทลงถาดเจล (gel tray) ที่มีหวี (combs) เพื่อทำให้เกิดหลุมสำหรับการหยอดดีเอ็นเอ เมื่อเจลมีการแข็งตัวตัว สังเกตได้จากแถบสีดำบนถาดเจลจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า นำไปใส่ลง chamber ที่เติม TBE buffer และต่อเข้ากับตัวจ่ายกระแสไฟฟ้า จากนั้นทำการเตรียมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หรือดีเอ็นเอ ปริมาตร 3-5 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม (loading dye) ความเข้มข้น 3X ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บนแผ่นพาราฟิล์ม จากนั้นหยอดลงไปในหลุม เมื่อหยอดผลิตผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หรือดีเอ็นเอครบทุกหลุมแล้ว ทำการปล่อยกระแสไฟฟ้าลงไป 100 โวลต์ เป็นระยะเวลาประมาณ 30-40 นาที ในขั้นตอนการหยอดผลิตผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หรือดีเอ็นเอควรระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ เมื่อครบเวลาให้นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยน้ำกลั่น 10 นาที เพื่อล้างเอาเอธิเดียมโบรไมด์ออก จากนั้นนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และถ่ายภาพโดยชุดถ่ายภาพเจลด้วยเครื่อง gel document system

3.5.1.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี (Sequence-Related Amplified Polymorphism, SRAP)

การวิเคราะห์หาความหลากหลายด้วยเทคนิค SRAP ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Abedian *et al.* (2012) ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกประกอบด้วย 15 ไพรเมอร์ แสดงดังตารางที่ 3.2 ส่วนผสมของปฏิกิริยาดำเนินการในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X PCR buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTPs 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase 5,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร forward และ reverse primers 20 พิโคโมล ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร DNA template 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ DI water แสดงดังตารางที่ 3.3

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (amplification) ดำเนินการในเครื่อง Eppendorf รุ่น Mastercycler ep gradient S โดยโปรแกรมการทำ PCR มีทั้งหมด 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก Pre heat block ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ขั้นตอนที่สอง denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 1 นาที และ elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที โดยทำทั้งหมด 5 รอบ และขั้นตอนที่สาม denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 1 นาที และ elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที โดยทำทั้งหมด 35 รอบ จากนั้นตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที แสดงดังตารางที่ 3.4 โดย PCR products ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจะนำมาวิเคราะห์หาความหลากหลายด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ PCR products ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม (loading dye) ความเข้มข้น 3X ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใช้ Marker DNA ขนาด 100 bp บน 2 % agarosegel ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE running ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสีเอธิเดียมโบรไมด์ 10 นาที ตามด้วยน้ำกลั่น 10 นาที เพื่อล้างเอาเอธิเดียมโบรไมด์ออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และถ่ายภาพโดยชุดถ่ายภาพเจลด้วยเครื่อง gel document system

ตารางที่ 3.3 แสดงส่วนประกอบสารเคมีที่ในเทคนิค PCR สำหรับ 1 ตัวอย่าง

สารเคมี	Stock	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA Template	50 ng	2	100 ng
Reverse Primer	20 pmol	1	1 pmol
Forward Primer	20 pmol	1	1 pmol
Taq DNA polymerase	5000 U/ml	0.2	0.1 U/ml
dNTPs	1.25 mM	4	0.25 mM
$MgCl_2$	50 mM	1	2.5 mM
10X buffer	-	2	1x
DI water	-	8.8	-
ปริมาตรรวม		20 µl	

ตารางที่ 3.4 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Pre heat block	95	-	-
Pre denaturation	94	3	-
Denaturation	94	1	5
Annealing	35	1	
Extension	72	1	
Denaturation	94	1	35
Annealing	50	1	
Extension	72	1	
Final extension	72	10	-
Cold down	4	-	-

3.5.1.6 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.11X

แปลผลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SRAP ของแต่ละไพรเมอร์ โดยให้คะแนนแบบ binary data matrix คือ เมื่อเกิดแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 1 และเมื่อไม่มีแถบดีเอ็นเกิดขึ้น ณ ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่างให้คะแนนเป็น 0 จากนั้นนำคะแนนที่เกิดจากแต่ละไพรเมอร์มาเรียงเพื่อคิดคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แล้ววิเคราะห์สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.11X (Rohlf, 2004) ตามงานวิจัยของ

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wu *et al.* (2010) โดยเลือกวิธีการจัดแบบ unweighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA)

3.5.2 การสกัดสาร (ดัดแปลงมาจาก Dinesh *et al.*, 2016)

นำผลมะขามป้อมมาล้างให้สะอาดแล้วนำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการแยกเนื้อผลกับเมล็ดออกจากกัน นำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส จนกว่าน้ำหนักของมะขามป้อมจะคงที่ เพื่อแยกเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอออกจากกัน ทำการแยกบดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอนำส่วนผงของเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอห่อด้วยผ้าขาวบางจากนั้นนำมาสกัดสารด้วยวิธี maceration ในตัวทำละลายเมทานอลซึ่งจะได้เป็นสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล เมื่อได้สารสกัดแล้วจะนำไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดันสุญญากาศ (rotary evaporator) หลังนั้นจึงนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อไปด้วยวิธี MTT แสดงวิธีดังข้อ 3.5.2.3

3.5.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (ดัดแปลงจาก Ramasamy *et al.*, 2011)

เพาะเลี้ยงเซลล์ MCF-7, HT29 และ KB ในอาหาร RPMI 1640 เสริมด้วย Fetal Bovine Serum 8 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตร และอาหาร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการ sub cultured ทุก 2-3 วันและตรวจสอบการปนเปื้อนเป็นประจำโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ

3.5.4 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดด้วยวิธี MTT

เป็นการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เบื้องต้นโดยดัดแปลงจากวิธีของ Zhong *et al.* (2011) โดยนำเซลล์ MCF-7, HT-29 และ KB ที่เจริญอยู่ในระยะ exponential phase ย่อยด้วย trypsin แล้วปลูกเซลล์ลงใน 96-well plate (ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเซลล์ที่อยู่ในกลุ่มทดลองจะทดสอบด้วยสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหาความเป็นพิษของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอโดยใช้สารละลาย MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra- zolium bromide) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย MTT ทิ้งและเติมสารละลาย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร บันทึกค่าดูดกลืนแสงเพื่อใช้ในการคำนวณค่า %Cytotoxicity โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง คำนวณ %Cytotoxicity ได้จากสมการดังนี้

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

A คือ ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุม
B คือ ค่าดูดกลืนแสงของชุดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยค่า A และ B นำไปหาค่าการดูดกลืนแสงของ blank มาลบออกก่อน จึงนำไปคำนวณดังสูตรข้างต้น

3.5.5 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay

ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดมะขามป้อมโดยใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ตามวิธีการของ Prieto (2012) เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายเมทานอล 100 มิลลิลิตร และสารมาตราฐาน นำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อมมาเจือจางด้วยสารละลายเมทานอลให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการลงใน 96-well plate ให้ปริมาตรสารตัวอย่างต่อสารละลาย DPPH ในอัตราส่วน 1 : 2 โดยมี Blank และสารมาตราฐานเป็นเมทานอลและโทรลอกซ์ (5-30 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ตามลำดับ เขย่าอย่างรุนแรง ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ได้จากสมการดังนี้

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

A_0 คือ ค่าดูดกลืนแสงชุดควบคุม
A_1 คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

จากนั้นคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ มาสร้างกราฟเพื่อหาค่า IC_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (%DPPH radical scavenging activity) กับความเข้มเข้นของสารสกัด และคำนวณ DPPH radical scavenging ในหน่วยร้อยละเทียบกราฟมาตราฐานของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ เพื่อหาค่า Trolox equivalents (TE)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

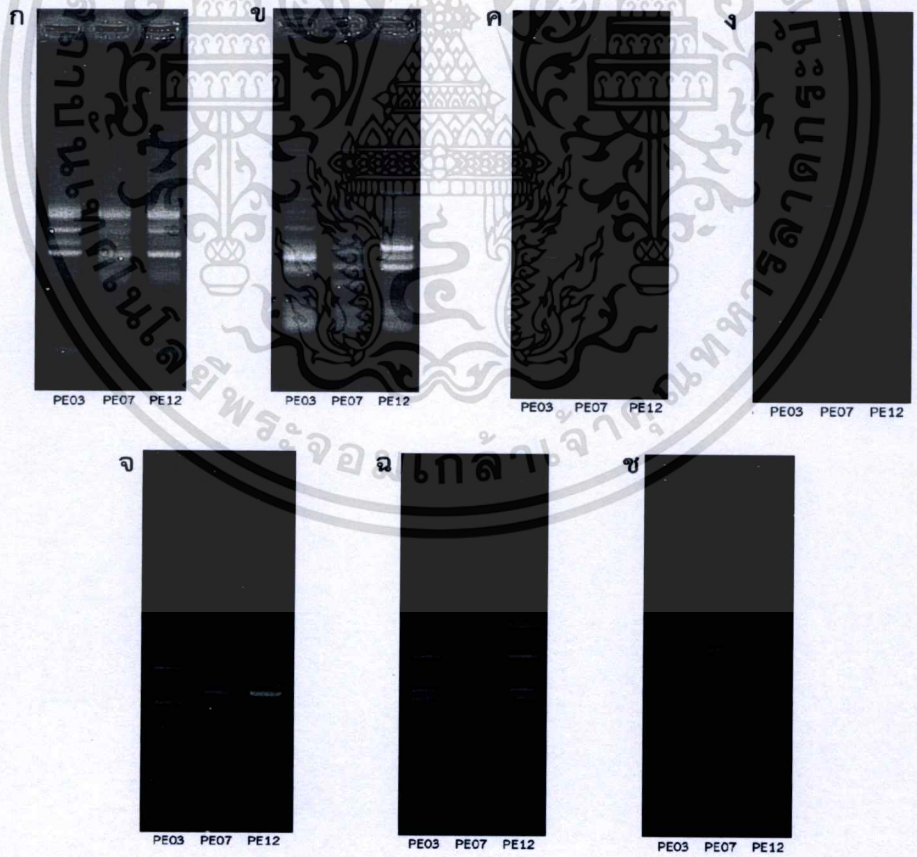
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค SRAP

4.1.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ในเบื้องต้นเพื่อหาคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยคัดเลือกมะขามป้อมจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ PE03, PE07 และ PE12 ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกันมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับไพรเมอร์จำนวน 30 คู่ พบว่าสามารถคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ซึ่งสามารถแสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างมะขามป้อม 3 สายพันธุ์ได้ทั้งหมด 7 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ Me2-Em1, Me3-Em5, Me4-Em2, Me4-Em3, Me4-Em5, Me5-Em2 และ Me5-Em5 ดังรูปที่ 4.1 ก-ช

เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับตัวอย่างมะขามป้อมทั้งหมด 15 สายพันธุ์ พบว่าแถบดีเอ็นเอของมะขามป้อมที่เกิดขึ้นจะมีความแตกต่างกันในแต่ละคู่ไพรเมอร์ ดังตัวอย่างดีเอ็นโปรไฟล์ของมะขามป้อมของจำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ คือ Me2-Em1, Me3-Em5, Me4-Em2 และ Me4-Em3 ดังรูปที่ 4.2 ก-ง



รูปที่ 4.1 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะขามป้อม 3 สายพันธุ์ ทั้งหมด 7 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ Me2-Em1 (ก) Me3-Em5 (ข) Me4-Em2 (ค) Me4-Em3 (ง) Me4-Em5 (จ) Me5-Em2 (ฉ) และ Me5-Em5 (ช)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 ตัวอย่างดีเอ็นโปรไฟล์ของมะขามป้อมที่ได้จากการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค SRAP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Me2-Em1 (ก) Me3-Em5 (ข) Me4-Em2 (ค) และ Me4-Em3 (ง) โดยเทียบจากเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของมะขามป้อมได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SRAP ของแต่ละไพรเมอร์มาทำการแปลผลแถบดีเอ็นเอที่โดยให้คะแนนแบบ binary data matrix และทำการวิเคราะห์ผลหาจำนวน polymorphic bands และ monomorphic bands ได้ผลดังตารางที่ 4.1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 7 ไพรเมอร์ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 172 แถบ มี polymorphic bands จำนวน 145 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ polymorphic bands ทั้งหมด 84.30 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ Me2-Em1 ให้จำนวน polymorphic bands สูงสุดคือ 28 แถบ คิดเป็น 93.33 เปอร์เซ็นต์ และไพรเมอร์ Me4-Em5 ให้จำนวน polymorphic bands น้อยสุดคือ 14 แถบ คิดเป็น 77.78 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 172 แถบ มี monomorphic bands จำนวน 27 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ monomorphic bands ทั้งหมด 15.70 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ Me4-Em5 ให้จำนวน polymorphic bands สูงสุดคือ 4 แถบ จากจำนวนแถบดีเอ็นเอ 18 แถบ คิดเป็น 22.22 เปอร์เซ็นต์ และไพรเมอร์ Me2-Em1 ให้จำนวน polymorphic bands น้อยสุดคือ 2 แถบ คิดเป็น 6.67 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ชนิดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอ จำนวน monomorphic bands จำนวน polymorphic bands เปอร์เซ็นต์ monomorphic bands และเปอร์เซ็นต์ polymorphic bands ของมะขามป้อม 15 สายพันธุ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวน monomorphic bands	จำนวน polymorphic bands	monomorphic bands (%)	polymorphic bands (%)
Me2-Em1	30	2	28	6.67	93.33
Me3-Em5	28	5	23	17.86	82.14
Me4-Em2	26	4	22	15.38	84.62
Me4-Em3	19	3	16	15.79	84.21
Me4-Em5	18	4	14	22.22	77.78
Me5-Em2	23	5	18	21.74	78.26
Me5-Em5	28	4	24	14.29	85.71
รวม	172	27	145	15.70	84.30

4.1.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิค SRAP ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.11X

เมื่อนำผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP ของมะขามป้อม 15 สายพันธุ์ มาแปลผลแถบดีเอ็นเอ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นทั้งหมด 172 แถบ แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี simple matching ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่ามะขามป้อมทั้ง 15 สายพันธุ์ คือ รหัส PE01, PE03, PE04, PE05, PE06, PE07, PE8, PE09, PE10, PE11, PE12, PE13, PE14, PE15 และ PE16 มีความหลากหลายในระดับสายพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์เดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบค่า similarity coefficient ของมะขามป้อมรายคู่ระหว่างรหัส PE06 กับ PE09 มีค่า similarity coefficient สูงสุด เท่ากับ 0.90 แสดงให้เห็นว่า มะขามป้อมทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูง ในทางเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบมะขามป้อมรายคู่ระหว่างรหัส PE01 กับ PE03 มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.87 แสดงให้เห็นว่า มะขามป้อมทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูง นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่า similarity coefficient ของมะขามป้อมรายคู่ระหว่างรหัส PE08 กับ PE01, PE03, PE04, PE05, PE06, PE07, PE09, PE10, PE11, PE12, PE13, PE14, PE15 และ PE16 ให้ค่า similarity coefficient ที่น้อยมาก โดยเมื่อเทียบรายคู่ระหว่างรหัส PE08 กับ PE11, PE13 และ PE16 พบว่า มีค่า similarity coefficient ที่น้อยที่สุด คือ 0.62 แสดงให้เห็นว่า มะขามป้อมรหัส PE08 มีความแตกต่างและห่างกันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์เดียวกันอย่างมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากแผนภาพเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.11X ด้วยวิธี UPGMA ได้ค่า similarity coefficient อยู่ระหว่าง 0.66-0.90 ดังรูปที่ 4.3 เมื่อพิจารณาค่า similarity coefficient ที่ 0.66 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างมะขามป้อมออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 สามารถแบ่งกลุ่มได้อีก 2 กลุ่มย่อย ที่ค่า similarity coefficient ที่ 0.71 คือ กลุ่มที่ 1.1 ประกอบด้วย PE01, PE03, PE04, PE05, PE06 และ PE09 เมื่อพิจารณาจากลักษณะสัณฐานวิทยาของใบภายในกลุ่ม พบว่าส่วนใหญ่มีขนาดเฉลี่ยของใบที่ยาวใกล้เคียงกัน แต่มีเพียงตัวอย่างรหัส PE04 และ PE05 ที่มีขนาดใบสั้นแตกต่างจากตัวอย่างอื่นๆ ส่วนในกลุ่มที่ 1.2 ประกอบด้วย PE07, PE10, PE11, PE12, PE13, PE14, PE15 และ PE16 ซึ่งกลุ่มนี้มีลักษณะของขนาดใบที่หลากหลาย มีทั้งขนาดใบยาวและขนาดใบสั้นอยู่รวมกันภายในกลุ่ม และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย PE08 ซึ่งเมื่อพิจารณาจากลักษณะสัณฐานวิทยาของใบพบว่ามีใบขนาดสั้น อีกทั้งยังสันนิฐานว่า PE08 เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุกรรมเพื่อพัฒนาในทางการเกษตร เป็นสายพันทางการค้า มีผลขนาดใญ่จึงทำให้เกิดความแตกต่างและห่างกันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์เดียวกันอย่างมาก จากข้อมูลแผนภาพเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นให้ผลที่สอดคล้องกับค่า similarity coefficient ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี simple matching ดังแสดงในตารางที่ 4.2 นอกจากนี้ยังใกล้เคียงกับงานวิจัยของ นคร และคณะ (2554) ที่ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะขามป้อมพื้นเมือง อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลชนิด AFLP กับมะขามป้อมทั้ง 17 สายพันธุ์ ด้วย 10 ไพรเมอร์ จากผล phylogenetics tree พบว่ามีค่า similarity coefficient ตั้งแต่ 0.65-1.00 แสดงให้เห็นว่าสามารถจัดจำแนกกลุ่มของมะขามป้อมได้เช่นเดียวกันกับผลการทดลองของกลุ่มผู้วิจัย

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิค SRAP ของมะขามป้อม แสดงให้เห็นว่าการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะขามป้อมในงานวิจัยนี้อาจจะไม่ได้จำแนกตามขนาดของใบเพียงเท่านั้น เนื่องจากภายในกลุ่มที่ 1.1 และ 1.2 มีทั้งใบมะขามป้อมที่มีขนาดใบยาวและใบสั้นอยู่ภายในกลุ่มเดียวกัน จึงเป็นที่น่าสนใจว่าอาจจะใช้ลักษณะทางกายภาพของผลมะขามป้อมร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยาของใบในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของมะขามป้อม ซึ่งเมื่อพิจารณาแผนภาพเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเทียบกับข้อมูลลักษณะทางกายภาพของรูปร่างผลมะขามป้อม พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยกลุ่มที่ 1.1 ลักษณะของผลมะขามป้อมมีรูปร่างของผลกลม กลุ่มที่ 1.2 ลักษณะของผลมะขามป้อมส่วนมากมีรูปร่างของผลแป้น แต่ไม่พบข้อมูลในบางตัวอย่าง และกลุ่มที่ 2 ลักษณะของผลมะขามป้อม รหัส PE08 มีรูปร่างของผลแป้น (วิภาดา และคณะ, 2558; ศรีสุดา และคณะ, 2558) จากงานวิจัยของ พวงพรรณ และคณะ (2547) รายงานว่าผลของมะขามป้อมที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติจำนวน 6 ต้น มีลักษณะทางกายภาพของผลและเมล็ดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งในสปีชีส์เดียวกันหรือต่างสปีชีส์กัน ซึ่งจะมีลักษณะของน้ำหนักและขนาดของผลกับเมล็ด เป็นข้อบ่งชี้ว่าลักษณะทางกายภาพนี้เป็นลักษณะที่แสดงออกถึงความแตกต่างทางพันธุกรรม Singh *et al.* (2012) รายงานว่าลักษณะภายนอกของผลมะขามป้อมได้แสดงถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมอย่างมาก โดยเฉพาะในด้านน้ำหนักผล ซึ่งมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง และการสืบทอดทางพันธุ์กรรมได้สูง อีกทั้งเป็นลักษณะทางพันธุกรรมที่มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้ประโยชน์ อย่างไรก็ตามควรมีการนำลักษณะทางกายภาพของมะขามป้อมที่ได้กล่าวมาข้างต้นมาพิจารณาร่วมด้วยว่าการวิเคราะห์จากดีเอ็นเอนั้นมีความเกี่ยวข้องกับลักษณะทางกายภาพอย่างไร

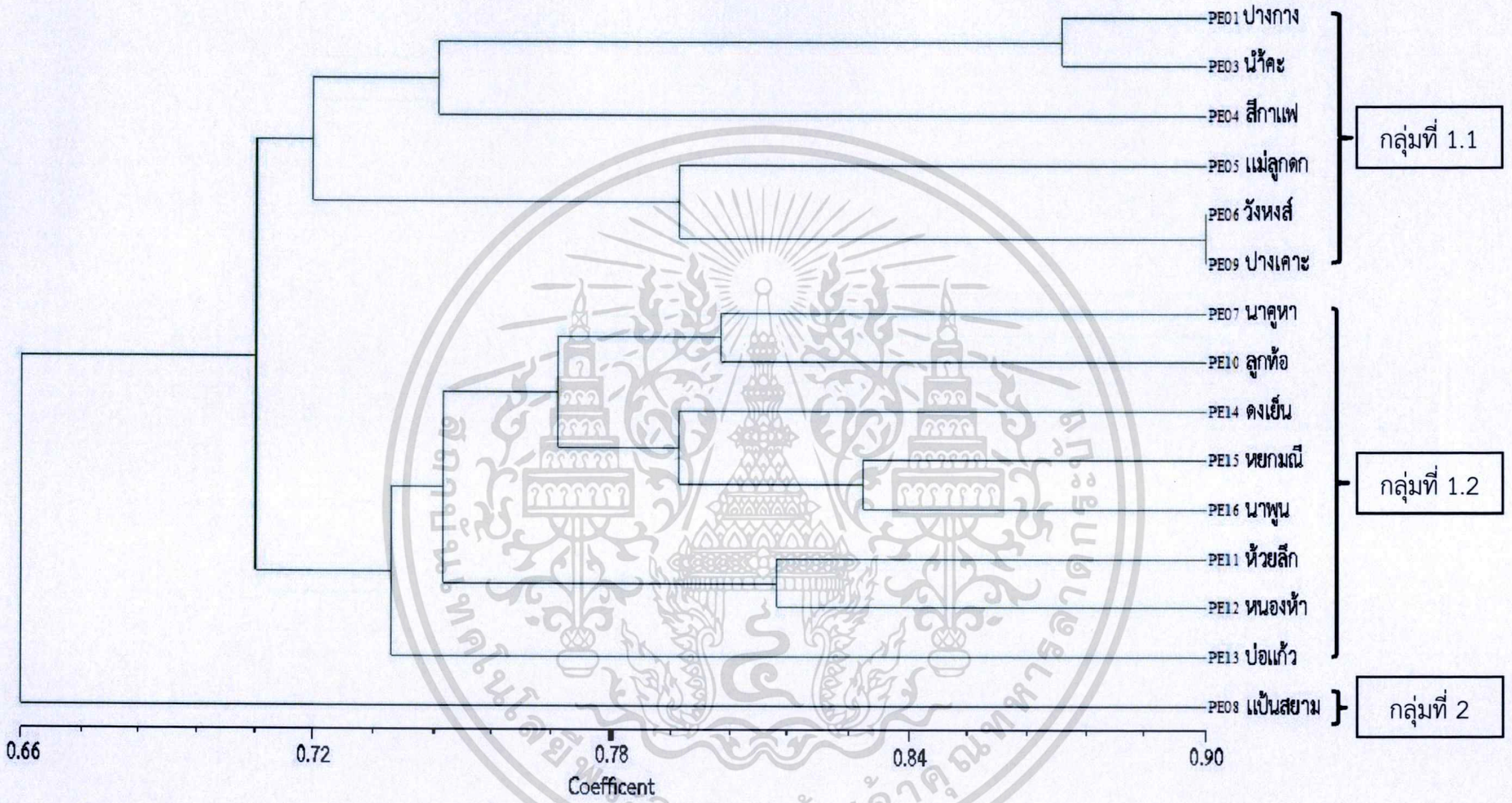
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะขามป้อมทั้ง 15 สายพันธุ์ ที่ได้จากเทคนิค SRAP สามารถที่จะจำแนกความหลากหลายของมะขามป้อมภายในสปีชีส์เดียวกันได้ดี Rout and Aparajita (2010) ได้หาความสัมพันธ์ของพืชสกุล *Phyllanthus* ทั้ง 12 สปีชีส์ที่ต่างกัน โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR และ RAPD พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands เท่ากับ 97.08 และ 95.54 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าผลที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุล SRAP ของผู้วิจัยที่เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands เท่ากับ 84.30 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากงานวิจัยของผู้วิจัยศึกษาเฉพาะความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะขามป้อมภายในสปีชีส์เดียวกันเท่านั้นและยังใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ Abedian *et al.* (2012) รายงานว่าเครื่องหมายทางโมเลกุล SRAP ที่ใช้หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชอร์รี่ 2 สายพันธุ์ mahaleb cherry (*Prunus mahaleb* L.) และ sweet cherry (*Prunus avium* L.) เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลพื้นฐานที่มีประสิทธิภาพอย่างมาก สำหรับการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชภายในสปีชีส์เดียวกัน นอกจากนี้เทคนิค SRAP ยังให้ข้อมูลที่มากกว่าเทคนิคอื่นๆ เช่น AFLP, ISSR และ SSR อย่างไรก็ตามตัวอย่างมะขามป้อมที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นสายพันธุ์ที่รวบรวมจากบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย จึงเป็นน่าสนใจว่าควรศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะขามป้อมที่เก็บจากพื้นที่อื่นๆ เพื่อศึกษาความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของแต่ละสายพันธุ์และใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่า similarity coefficient ด้วยวิธี simple matching ของมะขามป้อม 15 สายพันธุ์

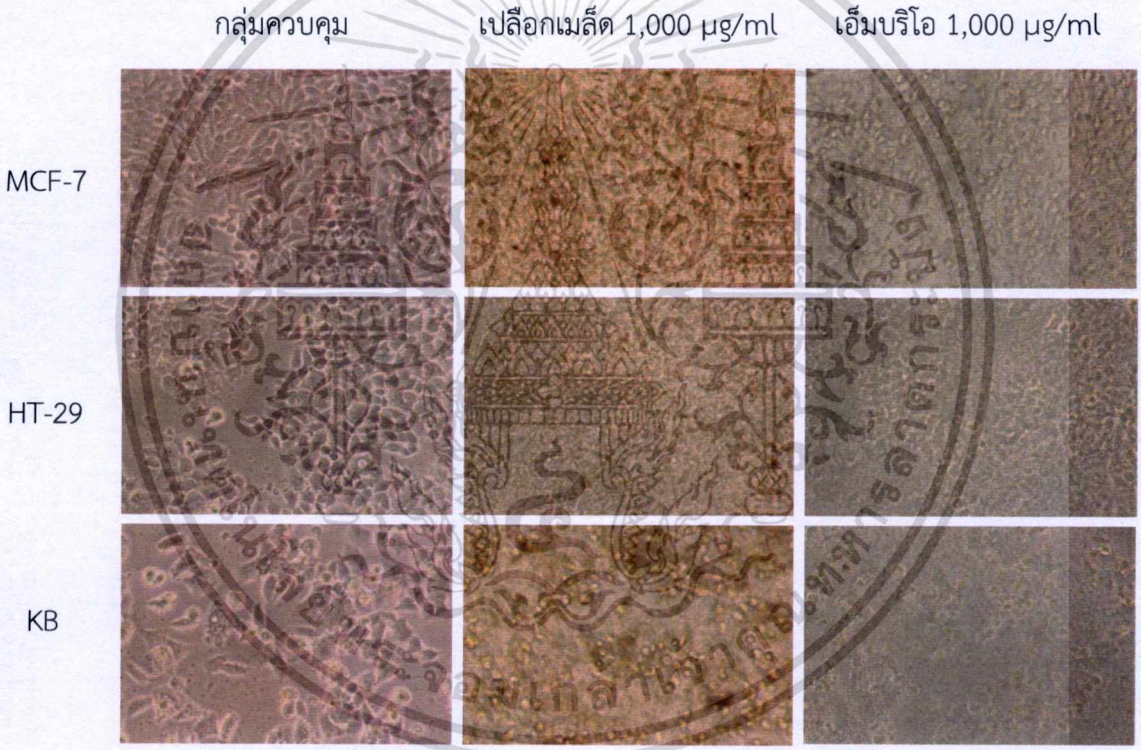
	PE01	PE03	PE04	PE05	PE06	PE07	PE08	PE09	PE10	PE11	PE12	PE13	PE14	PE15	PE16
PE01	1.00														
PE03	0.87	1.00													
PE04	0.72	0.77	1.00												
PE05	0.68	0.69	0.71	1.00											
PE06	0.74	0.74	0.73	0.80	1.00										
PE07	0.74	0.72	0.74	0.74	0.76	1.00									
PE08	0.63	0.65	0.63	0.69	0.72	0.70	1.00								
PE09	0.73	0.72	0.73	0.78	0.90	0.78	0.67	1.00							
PE10	0.72	0.71	0.73	0.76	0.78	0.80	0.70	0.79	1.00						
PE11	0.67	0.68	0.67	0.65	0.71	0.73	0.62	0.73	0.75	1.00					
PE12	0.65	0.67	0.65	0.65	0.66	0.67	0.63	0.69	0.75	0.81	1.00				
PE13	0.67	0.69	0.72	0.67	0.67	0.70	0.62	0.69	0.72	0.69	0.75	1.00			
PE14	0.74	0.76	0.70	0.67	0.73	0.79	0.67	0.72	0.78	0.78	0.76	0.76	1.00		
PE15	0.73	0.74	0.69	0.67	0.72	0.74	0.67	0.74	0.81	0.76	0.73	0.75	0.81	1.00	
PE16	0.70	0.71	0.70	0.67	0.69	0.76	0.62	0.71	0.74	0.75	0.77	0.78	0.78	0.83	1.00



รูปที่ 4.3 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิค SRAP ของมะขามป้อม 15 สายพันธุ์

4.2 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเบื้องต้นด้วยวิธี MTT

จากการศึกษาความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อมที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, HT-29 และ KB โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบความเป็นพิษกับสารสกัดในชั้นเมทานอลที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.4) จากนั้นประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้สารละลาย MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยในการศึกษานี้ใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) และใช้ 1% DMSO เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) และคำนวนเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์แสดงผลดังตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.4 ลักษณะของเซลล์ไลน์ MCF-7, HT-29 และ KB ก่อนและหลังทดสอบกับสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับที่กำลังขยาย 100 เท่า

จากการศึกษาข้างต้นเมื่อทำการเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เบื้องต้นระหว่างสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม ซึ่งได้วิเคราะห์ค่าทางสถิติ t-test (ภาคผนวก ข) พบว่าสารสกัดเปลือกเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 เท่ากับ 28.51 ซึ่งมากกว่าสารสกัดจากเอ็มบริโอที่มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 2.32 ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (t =3.172, $p \leq 0.05$) เซลล์ HT-29 พบว่าสารสกัดเปลือกเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 23.26 ซึ่งมากกว่าสารสกัดจากเอ็มบริโอที่มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ -11.85 ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (t = 5.134 , $p \leq 0.05$) และเซลล์ KB พบว่าสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 21.43 และ 19.68 ตามลำดับ ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (t = 0.23, $p > 0.05$) จากการทดลองพบว่าสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ

ตารางที่ 4.3 ค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชนิดของเซลล์ไลน์	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารสกัดมะขามป้อม (%) ± SE	
	เปลือกเมล็ด	เอ็มบริโอ
MCF-7	28.51 ± 6.39	2.32 ± 0.12
HT-29	23.26 ± 0.75	-11.85 ± 6.80
KB	21.43 ± 3.74	19.68 ± 6.39

หมายเหตุ: ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากงานวิจัยของ Dinesh *et al.* (2017) ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดและสารสกัดเมล็ดที่มี PdNPs เป็นคะตะลิสต์ของมะขามป้อมจากชั้นเมทานอลต่อเซลล์ HeLa โดยมีการกำจัดสารจำพวกไฮโดรคาร์บอนออกจากสารสกัดโดยใช้ตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ สารสกัดเมล็ดและสารสกัดเมล็ดที่มี PdNPs เป็นคะตะลิสต์ ที่ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 58.00 และ 65.00 ตามลำดับ พบว่าสารสกัดเมล็ด สารสกัดเมล็ดที่มี PdNPs เป็นคะตะลิสต์ และ cyelophosphamide (ตัวควบคุมเชิงบวก) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 50.12, 30.45 และ 15.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของผู้ทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดและสารสกัดเมล็ดที่มี PdNPs เป็นคะตะลิสต์มีความเป็นพิษมากกว่าสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของผู้วิจัย อาจมีผลมาจากผู้วิจัยมีการแยกส่วนเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอในการศึกษา ความบริสุทธิ์ของสารสกัดเนื่องจากในขั้นตอนการสกัดสารผู้วิจัยไม่ได้กำจัดสารจำพวกไฮโดรคาร์บอนที่อาจทำปฏิกิริยากับเซลล์ออก และสารสกัดมีความจำเพาะต่อชนิดของเซลล์ไลน์ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจส่งผลให้การทดลองของผู้วิจัยมีความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7, HT-29 และ KB ในระดับต่ำ จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาว่าควรทำให้สารสกัดมีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากส่วนเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมที่สกัดด้วยเมทานอลมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (DPPH radical scavenging capacity assay) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยเจือจางสารสกัดหยาบเปลือกเมล็ดจากชั้นเมทานอลให้มีความเข้มข้น 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบเอ็มบริโอจากชั้นเมทานอลให้มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งในการทดลองมีสารมาตราฐานเป็นโทรลอกซ์ จากผลการทดลอง คำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตราฐานโทรลอกซ์ แสดงดังตารางที่ 4.4

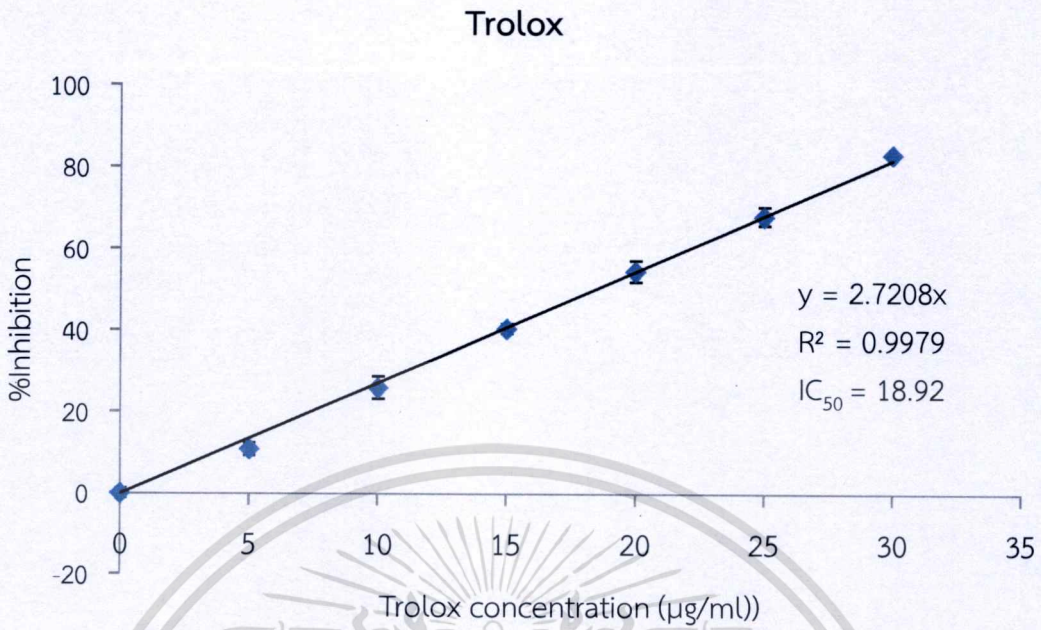
นำเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ จากตารางที่ 4.4 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 7.0 ได้กราฟ ดังรูปที่ 4.5 เป็นกราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ซึ่งเป็นความแปรผันที่เกิดขึ้นกับตัวแปร Y มีผลเนื่องมาจากตัวแปร X เท่ากับ 0.9979 หรือ 99.79 เปอร์เซ็นต์ โดยค่า R^2 เป็นค่าการประมาณความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ได้มากหรือน้อย ในการคำนวณค่าที่ได้จะอยู่ในช่วงระหว่าง 0-1 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารมาตราฐานโทรลอกซ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) พบว่าสารมาตราฐานโทรลอกซ์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 18.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ IC_{50} ของสารมาตราฐานโทรลอกซ์

ความเข้มข้นโทรลอกซ์ (µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ± SE	IC_{50} (µg/ml)
5	10.78 ± 0.67	
10	25.90 ± 0.90	
15	40.37 ± 1.61	
20	54.41 ± 0.69	18.92
25	67.89 ± 1.51	
30	82.87 ± 1.25	

หมายเหตุ: ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of the mean) ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH

หมายเหตุ: R^2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination)

จากการคำนวนเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอจากชั้นเมทานอล ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ นำเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอ จากตารางที่ 4.5 และ 4.6 มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอกับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้โปรแกรม GraphPad 7.0 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสนะ DPPH ให้ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ จากตารางที่ 4.7 ทั้งสารสกัดหยาบจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยสารสกัดเปลือกเมล็ดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเอ็มบริโออย่างมีนัยสำคัญ คือมีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.91 และ 22.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หรืออาจกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบจากเปลือดเมล็ดที่มีความเข้มข้นเพียง 18.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ และถือได้ว่ามีฤทธิ์เทียบเท่าสารมาตรฐานโทรลอกซ์ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนของสารสกัดหยาบจากเอ็มบริโอนั้นมีค่า IC_{50} น้อยกว่าส่วนเปลือกเมล็ดเพียงเล็กน้อย ซึ่งต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่าในการทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ IC_{50} ของสารสกัดหยาบเปลือกเมล็ดจากมะขามป้อม

ความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกเมล็ด (µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด ± SE	IC_{50} (µg/ml)
15	39.79 ± 0.16	18.91
20	52.78 ± 1.24	
25	61.92 ± 1.67	
30	68.34 ± 2.03	
35	78.34 ± 1.59	
40	84.52 ± 1.98	

ตารางที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ IC_{50} ของสารสกัดหยาบเอ็มบริโอจากมะขามป้อม

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเอ็มบริโอ (µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด ± SE	IC_{50} (µg/ml)
10	24.09 ± 2.68	22.13
20	45.28 ± 2.37	
30	66.46 ± 0.73	
40	82.27 ± 1.05	
50	92.15 ± 0.47	
60	94.87 ± 0.21	

ตารางที่ 4.7 ค่า IC_{50} ของสารมาตราฐานโทรลอกซ์และสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของทั้งเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อม

สาร	IC_{50} ± SE (µg/ml)
โทรลอกซ์	18.92^{a} ± 0.54
เปลือกเมล็ด	18.91^{a} ± 0.43
เอ็มบริโอ	22.13^{b} ± 1.06

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตราฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of the mean)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH เป็นวิธีสามัญทั่วไปนิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (บังอร และศศิลักษ์, 2549) ซึ่งเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลจากงานวิจัยของ Dinesh *et al.* (2016) พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอที่เป็นเนื้อเดียวกันจากชั้นเมทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 85.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีกรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตราฐาน แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าผลการทดลองของผู้วิจัย อาจเกิดจากในขั้นตอนการสกัดสาร คือ งานของผู้วิจัยมีการแยกส่วนเปลือกเมล็ดกับเอ็มบริโอในการศึกษา และไม่ได้กำจัดสารจำพวกไฮโดรคาร์บอนและอะโรมาติกที่ไม่อิ่มตัวออก เป็นเหตุให้ค่า IC_{50} มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ Liu *et al.* (2008) ได้ศึกษาสารสกัดผลสดมะขามป้อมจากชั้นเมทานอล ที่เก็บจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน 6 พื้นในประเทศจีน ซึ่งประกอบด้วย Guangzhou, Putian, Haikou, Liuzhou, Huizhou และ Chuxiong ให้ค่า IC_{50} แตกต่างกันดังนี้ 14.71, 18.52, 28.39, 45.44, 11.23 และ 11.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างมะขามป้อมจากส่วนต่างๆและพื้นที่ที่เพาะปลูกแตกต่างกันนั้นส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันออกไป จากข้อมูลข้างต้นในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม มีขอบเขตของการศึกษาเฉพาะในจังหวัดแพร่เพียงเท่านั้น ดังนั้นจึงควรเก็บตัวอย่างจากหลากหลายพื้นที่ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะขามป้อมจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค SRAP โดยใช้ตัวอย่างมะขามป้อมจำนวน 15 สายพันธุ์ และทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้จำนวน 7 คู่ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 30 คู่ไพรเมอร์ ผลที่ได้จากการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับไพรเมอร์ทั้ง 7 คู่ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นทั้งหมด 172 แถบ โดยเป็น polymorphic bands 145 แถบ คิดเป็น 84.30 เปอร์เซ็นต์ และ monomorphic bands 27 แถบ คิดเป็น 15.70 เปอร์เซ็นต์ ทำการแปลผลแถบดีเอ็นเอแล้วนำมาคำนวณค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี simple matching ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.62 ถึง 0.90 เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นรายคู่ระหว่างตัวอย่างมะขามป้อม พบว่ามะขามป้อมทั้ง 15 สายพันธุ์ มีความหลากหลายในระดับสายพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์เดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบค่า similarity coefficient ของมะขามป้อมรายคู่ระหว่างรหัส PE06 กับ PE09 มีค่า similarity coefficient สูงสุดเท่ากับ 0.90 แสดงให้เห็นว่า มะขามป้อมทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมอย่างมาก และเมื่อเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนรายคู่ระหว่างรหัส PE08 กับ มะขามป้อม 14 สายพันธุ์พบว่ามีค่า similarity coefficient ที่น้อยมาก ซึ่งค่า similarity coefficient ที่น้อยที่สุด คือ 0.62 แสดงให้เห็นว่า มะขามป้อมรหัส PE08 มีความแตกต่างและห่างกันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์เดียวกันอย่างมาก จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.11X ด้วยวิธี UPGMA เพื่อสร้างแผนภาพเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ ได้ค่า similarity coefficient อยู่ระหว่าง 0.66 ถึง 0.90 และที่ค่า similarity coefficient 0.66 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างมะขามป้อมออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่ม ที่ 1 สามารถแบ่งกลุ่มได้อีก 2 กลุ่มย่อย ที่ค่า similarity coefficient 0.71 คือ กลุ่มที่ 1.1 ประกอบด้วยมะขามป้อมรหัส PE01, PE03, PE04, PE05, PE06 และ PE09 ส่วนในกลุ่มที่ 1.2 ประกอบด้วยมะขามป้อมรหัส PE07, PE08, PE10, PE11, PE12, PE13, PE14, PE15 และ PE16 และสุดท้ายกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยมะขามป้อมรหัส PE08 จากการศึกษานี้ทำให้ทราบว่ามะขามป้อมทั้ง 15 สายพันธุ์ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างมากภายในสปีชีส์เดียวกัน โดยการประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล SRAP ร่วมกับการพิจารณาจากลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ อย่างไรก็ตามควรมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นโดยเก็บรวบรวบใบมะขามป้อมจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพิ่มเติมจากรูปร่างผล น้ำหนัก เส้นผล ขนาดเมล็ด และลำต้น ตามช่วงเวลาการออกผลของแต่ละสายพันธุ์ เพื่อวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพนี้ว่ามีความเกี่ยวข้องผลดีเอ็นเออย่างไร นอกจากนี้ควรมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีนต่างๆ เช่น *rbc*L, *mat*K, *trn*L-*trn*F, *trn*T-*trn*L หรือ *ITS* ศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplifild Fragment Length Polymorphism (AFLP) และ Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)

จากการศึกษาความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อม ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, HT-29 และ KB ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MCF-7 มากที่สุด เท่ากับ 28.51 และมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษกับเซลล์ HT-29 และเซลล์ KB เท่ากับ 23.26 และ-11.85 ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดเอ็มบริโอมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ KB เท่ากับ 19.68 ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 และ HT-29 มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ -8.73 และ -11.85 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าสารสกัดทั้งสองมีความเป็นพิษต่อไลน์เซลล์ในระดับที่ต่ำ อาจเนื่องจากในการศึกษานี้เป็นการศึกษาความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลเท่านั้น ผู้วิจัยเห็นว่าควรนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปผ่านการแยกแบบลำดับส่วน (partition) ต่อไปโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันและควรมีการสกัดสารให้มีความบริสุทธิ์สูงปราศจากสารเจือปนอื่นๆ ที่อาจรบกวนการทำปฏิกิริยาภายในเซลล์

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อมโดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยมีโทรลอกซ์เป็นสารมาตราฐาน พบว่าทั้งสารสกัดหยาบเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยสารสกัดเปลือกเมล็ดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดเอ็มบริโอ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.91 และ 22.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ในทางสถิติยังกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบเปลือกเมล็ดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารมาตราฐานโทรลอกซ์ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบจากส่วนที่ต่างกันของมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการจับอนุมูลอิสระ DPPH เพื่อทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน ในการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากชั้นเมทานอลเท่านั้น ดังนั้นควรศึกษาเพิ่มเติมโดยการนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปผ่านการแยกแบบลำดับส่วน (partition) ต่อไปโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน และเพิ่มการเก็บตัวอย่างจากภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นคร เหลืองประเสริฐ และนิภา เขื่อนควบ. 2554. “มะขามป้อม ไม้ผลที่มีคุณค่าเกินกว่าจะมองข้าม.” *วารสารเกษตรก้าวหน้า.* 24(2) : 6-18.

นคร เหลืองประเสริฐ, วิสิฐ กิจสมพร, นวลปรางค์ ไชยตะขบ, วิระศรี เมฆตรง และอุดมลักษณ์ สุขอัตตะ. 2554. **คุณภาพผลและความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะขามป้อมพื้นเมือง อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://kukr.lib.ku.ac.th/db/kukr/search_detail/result/12431

บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์. 2549. **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/newspdf/specialproject/2549-21.pdf.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. “อนุมูลอิสระ สานต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Free radicals, Antioxidants and Antioxidant Activity Determination.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 21(3) : 275-286.

เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์. 2553. **การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/3746/2/Fulltext.pdf.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญบุตร และสาธร พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. **การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://vet.kku.ac.th/semi9_2551/011-%BB%C3%D0%CA%D2%B7%BE%C3%CB%B9%E9%D2%2091-101%20new.pdf.

ปรีชา บุญจง, โอภา วัชระคุปต์, จันทนา บุณยะรัตน์ และมาลีรักษณ์ อัตต์สินทอง. 2549. **สารต้านอนุมูลอิสระ.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : พีเอส.พริ้นท์.

ปรียานันท์ บัวสด. 2549. **การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนตี้ออกซิแดนท์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.thapra.lib.su.ac.th/objects/thesis/fulltext/snamcn/Preeyanan_Buasod/Fulltext.pdf.

พวงพรรณ ยงรัตนา, สุวรรณ ตั้งมิตรเจริญ และปทุม บุญนะฤธี. 2547. **ชีพลักษณ์ลักษณะดอกและผล และความสำเร็จการสืบพันธุ์ของไม้มะขามป้อม**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://web1.forest.go.th/forest/silvic/Report/p2.pdf.

รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์, จิราวรรณ อุ่นเมตตาอารี และจิตรา สิงห์ทอง. 2554. **ฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดย่านางเครือหมาน้อย และรางจืด**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/3916/1/Fulltext SUT3- 305-53-12-24.pdf.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

รัชนี คงคาฉุยฉาย, ริญ เจริญศิริ, อภิชาติ วรรณวิจิตร และศิริพัฒน์ เรืองพยัคฆ์. 2551. **สารต้านอนุมูลอิสระ**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.inmu.mahidol.ac.th/download.php?f=anti-oxidant-and-rice_Thai.pdf.

วิภาดา แสงสร้อย, ประนอม ใจอ้าย, สุทธินี เจริญคิด, คณิศร มนุษย์สม และสากล มีสุข. 2558. **คัดเลือกสายต้นมะขามป้อมพันธุ์ดีที่มีผลใหญ่และสารสำคัญสูงในภาคเหนือตอนบน.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=2178.

ศรีสุดา โท้ทอง, แสงมณี ชิงดวง, สุนิตรา คามีศักดิ์, จอมใจ ชลาเขต, อนัญญา เอกพันธ์ไพโรจน์, บุญอ่อน และ วิภาดา แสงสร้อย. 2558. **คัดเลือกสายต้นมะขามป้อมพันธุ์ดีที่มีผลใหญ่และสารสำคัญสูงในภาคตะวันตก**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=2178.

ศศมล ผาสุข และประเสริฐ มีรัตน์. 2557. **ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ของสารสกัดหยาบฮว่านง็อก**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://tujournals.tu.ac.th/tstj/detailart.aspx?ArticleID=694.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, ประภัสสร รักถาวร, นคร เหลืองประเสริฐ, นวลปรางค์ ไชยตะขบ และนิภา เขื่อนควบ. 2553. "สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะขามป้อม 12 สามพันธุ์." *วารสารสำนักการแพทย์ทางเลือก*. 3(1) : 20-21.

Abedian, M., Talebi, M., Golmohammdi, H. R. and Sayed-Tabatabaei, B.E., 2012. "Genetics diversity and population structure of mahaled cherry (*Prunus mahaled* L.) and sweet cherry (*Prunus mahaled* L.) using SRAP markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 40 : 112-117.

Dinesh, M., Roopan, S.M. and Selvaraj, C.I. 2016. "Photocatalytic degradation of nitro-phenol using biologically active *Phyllanthus emblica* seed extract." *Photochemistry and Photobiology*. 161 : 273-278.

Dinesh, M., Roopan, S.M., Selvaraj, C.I., and Arunachalamc, P. 2017. "Phyllanthus emblica seed extract mediated synthesis of PdNPs against antibacterial, heamolytic and cytotoxic studies." *Photochemistry and Photobiology*. 167 : 64-71.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. "Isolation of plant DNA from fresh tissue." *Focus*. 121 : 13-15.

Fatima, N., Pingali, U., Muralidhar, N. 2014. "Study of pharmacodynamic interaction of *Phyllanthus emblica* extract with clopidogrel and ecosprin in patients with type II diabetes mellitus. " *Phytomedicine*. 21 : 579-585.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Klipstein-Grobusch, K., Geleijnse, J.M., den Breeijen, J.H., Boeing, H., Hofman, A., Grobbee, D.E. and Witteman, J.C. 1999. "Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study." *Journal of National Cancer Institute*. 91(6) : 547-56.

Li, G. and Quiros, C.F. 2001. "Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica." *Theoretical and Applied Genetics*. 103(1-2) : 455-461.

Liu, X., Zhao, M., Wanga, J. and Yang, B. 2008. "Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (Phyllanthus emblica L.) from six regions in China." *Journal of Food Composition and Analysis*. 21 : 219-228.

Liu, X., Zhao, M., Wu, K., Chai, X., Yu, H., Tao, Z. and Wang, J. 2012. "Immunomodulatory and anticancer activities of phenolics from emblica fruit (Phyllanthus emblica L.)." *Food Chemistry*. 131 : 685-690.

Lu, C.C., Yanga, S.H., Hsiab, S.M., Wub, C.H. and Yena, G.C. 2016. "Inhibitory effects of Phyllanthus emblica L. on hepatic steatosis and liver fibrosis in vitro." *Food Chemistry*. 20 : 20–30.

Luo, W., Zhao, M., Yang, B., Ren, J., shen, G. and Rao, G. 2011. "Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from Phyllanthus emblica L. fruit." *Food Chemistry*. 126 : 277-282.

Mosmann, T. 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of Immunological Methods*. 65(1-2) : 55-63.

Peng, L., Ru, M., Wang, B., Wang, Y., Li, B., Yu, J. and Liang, Z. 2014. "Genetic diversity assessment of a germplasm collection of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. based on morphology, ISSR and SRAP markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 55 : 84-92.

Prieto, J.M. 2012. **Procedure: Preparation of DPPH Radical, and antioxidant scavenging assay**. [Online]. Retrieved from : https://www.researchgate.net/post/Can_anyone_explain_the_DPPH_method_for_antioxidant_activity_in_details.

Ramasamy, S., Wahab, N.A., Abidina, N.Z. and Manickam, S. 2011. "Effect of extracts from Phyllanthus watsonii airy shawmonmcell apoptosis in cultured human breast cancer MCF-7 cells." *Experimental and Toxicologic Pathology*. 65 : 341–349.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J. and Minor, L. 2016. **Cell Viability Assays**. [Online]. Retrieved from : https://www.ncbi.nlm. nih.gov/books/NBK144065/pdf/Bookshelf_NBK144065.pdf.

Riss, T. 2014. **Is Your MTT Assay Really the Best Choice?**. [Online]. Retrieved from : https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/is-your-mtt-assay-really-the-best-choice/.

Robarts, D.W. and Wolfe, A.D. 2014. "Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology." *Application in Plant Sciences*. 2(7) : 1-13.

Rohlf, F.J. 2004. **NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2**. [Online]. Retrieved from : https://www.exetersoftware.com/downloads/ntsysguide21.pdf.

Rout, G.R. and Aparajita, S. 2010. "Phylogenic Study of Twelve Species of Phyllanthus Originated from India through Molecular Markers for Conservation." *American Journal of Plant Sciences*. 1 : 32-37.

Singh, B., Uniyal, A. K., Rawat, S. M. and Rana, D.K. 2012. "Estimation of genetic variability in Phyllanthus emblica L. -Towards a contribution in sustainable rural development." *Journal of Horticulture and Forestry*. 4 : 92-95.

Welzen, P.C.V. and Chayamarit, K. 2007. "EUPHORBIACEAE." *Floral of Thailand*. 8(2) :-305-592.

Wu, Y.G., Guo, Q.S., He, J.C., Lin, Y.F., Luo, L.J. and Liu, G.D. 2010. "Genetic diversity analysis among and within populations of Pogostemon cablin from China with ISSR and SRAP markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 38 : 63–72.

Zhang, S., Hunter, D.J., Forman, M.R., Rosner, B.A., Speizer, F.E., Colditz, G.A., Manson, J.E., Hankinson, S.E. and Willett, W.C. 1999. "Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer." *Journal of National Cancer Institute*. 91(6) : 547-56.

Zhong, Z., Wu, D., Huang, J., Liang, H., Pan, Z., Zhang, W. and Lu, H. 2011. "Progallin A isolated from the acetic ether part of the leaves of Phyllanthus emblica L. induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma BEL-7404 cells by up-regulation of Bax expression and down-regulation of Bcl-2 expression." Journal of Ethnopharmacology. 133 : 765-772.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสาร

1. การเตรียม 2X CTAB

เตรียม 2X CTAB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1.1 สารเคมี

1.1.1 CTAB	10	กรัม
1.1.2 5 M NaCl	140	มิลลิลิตร
1.1.3 0.5 M EDTA pH 8	20	มิลลิลิตร
1.1.4 Polyvinylpyrrolidone (PVP)	5	กรัม
1.1.5 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (DI water)		

1.2 ขั้นตอน

1.2.1 เตรียมสารละลาย NaCl 5 โมลาร์ EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8 และน้ำกลั่น พร้อมกับกระบอกตวง ขวดดูแรน และบีกเกอร์พร้อม magnetic bar ห่อฟอยล์ให้เรียบร้อย แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดย autoclave

1.2.2 ชั่ง CTAB 10 กรัม และ PVP 5 กรัม ละลายด้วย NaCl 5 โมลาร์ ปริมาตร 140 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer จากนั้นเติม EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

1.2.3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จนได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 500 มิลลิลิตรหรือปริมาตรที่ต้องการ เก็บใส่ขวดดูแรนที่ปลอดเชื้อแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียม RNase A

เตรียม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียมดังนี้

2.1 สารเคมี

2.1.1 RNase A	20	มิลลิกรัม
2.1.2 DI water	1	มิลลิลิตร

2.2 ขั้นตอน

2.2.1 ชั่ง RNase A 20 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2.2 เติม DI water ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2.3 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร จากนั้นเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม TE buffer

เตรียม TE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนที่เตรียมดังนี้

3.1 สารเคมี

3.1.1 1 M Tris HCl pH 8	1000	ไมโครลิตร
3.1.2 0.5 M EDTA	200	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

3.1.3 น้ำกลั่น

3.2 ขั้นตอน

3.2.1 ดูด Tris HCl 1 โมลาร์ pH 8 ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร

3.2.2 ผสมกับ EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

3.2.3 ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลตร นำไปฆ่าเชื้อโดย autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. การเตรียมเอธิเดียมโบรไมด์

เตรียมเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนดังนี้

4.1 สารเคมี

4.1.1 เอธิเดียมโบรไมด์	0.5	มิลลิลิตร
4.1.2 น้ำกลั่น	499.5	มิลลิลิตร

4.2 ขั้นตอน

4.2.1 เตรียมถาดและฝาปิด ห่อฟอยล์ให้เรียบร้อยสำหรับใส่สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์

4.2.2 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 499.5 มิลลิลิตร เติมเอธิเดียมโบรไมด์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและปิดฝาให้สนิท

5. การเตรียม Tris-borate EDTA buffer

เตรียม TBE buffer ปริมาตร 1 ลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียมดังนี้

5.1 สารเคมี

5.1.1 Tris-base	108	กรัม
5.1.2 EDTA	9.305	กรัม
5.1.3 Boric acid	61.38	กรัม

5.1.4 น้ำกรอง

5.2 ขั้นตอน

5.2.1 ชั่ง Tris-base, EDTA และ Boric acid แล้วค่อยๆละลายด้วยน้ำกรองจนเป็นเนื้อเดียวกัน

5.2.2 ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองจนมีปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร

6. การเตรียมสีย้อม (loading dye)

เตรียมสีย้อม (loading dye) ความเข้มข้น 3X ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนดังนี้

6.1 สารเคมี

6.1.1 สีย้อม (loading dye) ความเข้มข้น 6X	100	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

6.1.2 DI water 100 ไมโครลิตร

6.2 ขั้นตอน

6.2.1 เติมสีย้อม (loading dye) ความเข้มข้น 6X ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

6.2.2 DI water ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง (tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (vortex)

7. การเตรียมไพรเมอร์ (Primers)

เตรียมไพรเมอร์ (Primers) ความเข้มข้น 20 พิโคโมล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนดังนี้

7.1 สารเคมี

7.1.1 ไพรเมอร์ (Primers) ความเข้มข้น 100 พิโคโมล 10 ไมโครลิตร

7.1.2 DI water 40 ไมโครลิตร

7.2 ขั้นตอน

7.2.1 ปิเปต DI water ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

7.2.2 ไพรเมอร์ (Primers) ความเข้มข้น 100 พิโคโมล ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง (tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

7.2.3 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (vortex) จากนั้นเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

8. การเตรียม dNTPs 1.25 มิลลิโมลาร์

เตรียม dNTPS 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียมดังนี้

8.1 สารเคมี

8.1.1 dATP 100 มิลลิโมลาร์ 1.25 ไมโครลิตร

8.1.2 dGTP 100 มิลลิโมลาร์ 1.25 ไมโครลิตร

8.1.3 dCTP 100 มิลลิโมลาร์ 1.25 ไมโครลิตร

8.1.4 dTTP 100 มิลลิโมลาร์ 1.25 ไมโครลิตร

8.1.5 DI water 95 ไมโครลิตร

8.2 ขั้นตอน

8.2.1 ดูด DI water 95 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

8.2.2 ดูดสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ dATP, dGTP, dCTP และ dTTP อย่างละ 1.25 ไมโครลิตร ลงหลอดทดลอง

8.2.3 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร แล้วเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

9. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (Incomplete media)

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 1 ลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียมมีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

9.1 สารเคมี

9.1.1 อาหารสำเร็จรูป RPMI 1640	1	ซอง
9.1.2 Na_2HCO_3	2	กรัม
9.1.3 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	1	ลิตร

9.2 ขั้นตอน

1.2.1 เตรียมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ กระบอกตวงขนาด 1,000 มิลลิลิตร บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ชุดกรอง 0.22 ไมโครเมตร ขวดดูแรนขนาด 500 มิลลิลิตร 2 ขวด และ magnetic bar นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave

1.2.2 เทอาหารสำเร็จรูป RPMI จำนวน 1 ซอง ต่อน้ำ 1 ลิตร ลงบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตรที่ปลอดเชื้อ

1.2.3 เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 900 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

1.2.4 เติม Na_2HCO_3 2 กรัม แล้วกวนให้เข้ากัน

1.2.5 ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2–7.4 ด้วยกระดาษลิสมัต

1.2.6 ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1 ลิตร

1.2.7 กรองผ่านชุดกรอง 0.22 ไมโครเมตร โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ เก็บใส่ขวดดูแรน แบ่งใส่ขวดยาหม่องทดสอบการปนเปื้อน นำไปบ่มที่ตู้ incubator 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2.8 อาหารที่ใส่ขวดดูแรน นำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

10. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วยซีรั่ม 5 และ 8 เปอร์เซ็นต์

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วยซีรั่ม 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียมมีดังนี้

10.1 สารเคมี

10.1.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (Incomplete media)		
10.1.2 FBS	5	มิลลิลิตร
10.1.3 FBS	8	มิลลิลิตร
10.1.4 50 µl/ml gentamycin	100	ไมโครลิตร

10.2 ขั้นตอน

10.2.1 เตรียม FBS โดยทำการ heat inactivate ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

10.2.2 เทอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ลงขวดดูแรนปริมาตร 90 มิลลิลิตร เติม FBS ตามที่ต้องการ ถ้าต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วยซีรั่ม 5 เปอร์เซ็นต์ ให้เติม FBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

10.2.3 เติม gentamycin 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรอาหารให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

10.2.4 กรองผ่านชุดกรอง 0.22 ไมโครเมตร โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ เก็บใส่ขวดดูแรน แบ่งใส่ขวดทดสอบการปนเปื้อน นำไปบ่มที่ตู้ incubator 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

10.2.5 อาหารที่ใส่ขวดดูแรน นำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

11. การเตรียม Phosphate Buffered Saline (PBS)

เตรียม PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนดังนี้

11.1 สารเคมี

11.1.1 PBS	1	เม็ด
11.1.2 น้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

11.2 ขั้นตอน

11.2.1 เติมน้ำกรองปริมาตร 90 มิลลิลิตร และ PBS 1 เม็ด ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร

11.2.2 ใช้แท่งแก้วคนจนละลายเข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร

11.2.3 กรองใส่ขวดดูแรนขนาด 100 มิลลิลิตร โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดรูพรุน 11 ไมโครเมตร

11.2.4 autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

12. การเตรียม trypsin

เตรียม trypsin ความเข้มข้น 0.25 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนดังนี้

12.1. สารเคมี

12.1.1 trypsin	0.25	กรัม
12.1.2 EDTA	3.74	กรัม
13.1.3 PBS	100	มิลลิลิตร

12.2 ขั้นตอน

12.2.1 ชั่ง trypsin 0.25 กรัม และ EDTA 3.74 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร

12.2.2 เติม PBS ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer ต่อมาปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร โดยใช้กระบอกตวงและเทใส่ขวดดูแรนขนาด 100 มิลลิลิตร

12.2.3 จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ในตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)

13. การเตรียมสารสกัดหยาบสำหรับศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดโดยวิธี MTT assay

13.1 การเตรียม stock สารสกัดความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

13.1.1 ชั่งสารสกัดหยาบเมทานอล endocarp และ seed อย่างละ 200 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

13.1.2 ละลายด้วย 100% DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จนสารสกัดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

13.1.3 เติม PBS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมสารสกัดจนเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ stock สารสกัดความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 20,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

13.2 การเตรียมสารสกัดความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2,400 มิลลิลิตร จาก stock สารสกัดความเข้มข้น 20,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

13.2.1 ดูด stock สารสกัดความเข้มข้น 20,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร

13.2.2 ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วยซีรั่ม FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร เขย่าจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

13.3 การเตรียมสารสกัดความเข้มข้นที่ต้องการเช่น ต้องการสารสกัดความเข้มข้นที่ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบดังนั้นจะต้องเตรียมสารสกัดให้มีความเข้นข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2,800 มิลลิลิตร จาก stock สารสกัดความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

13.3.1 ดูด stock สารสกัดความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1,120 ไมโครลิตร

13.3.2 ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วยซีรั่ม FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,680 ไมโครลิตร เขย่าจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

14. การเตรียมสารละลาย gentamycin

เตรียมสารละลาย gentamycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลตร ปริมาตร 1 มิลลิลตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียมดังนี้

14.1 สารเคมี

14.1.1 gentamycin 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	2.5	ไมโครลิตร
14.1.2 DI water	997.5	ไมโครลิตร

14.2 ขั้นตอน

14.2.1 ดูด DI water ปริมาตร 997.5 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลตร

14.2.2 เติม gentamycin 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง

14.2.3 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

15. การเตรียมสารละลาย MTT

เตรียมสารละลาย MTT 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียมดังนี้

15.1 สารเคมี

15.1.1 MTT 50 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

15.1.2 PBS 25 ไมโครลิตร

15.2 ขั้นตอน

15.2.1 ชั่ง MTT ปริมาณ 50 มิลลิกรัม

15.2.2 ละลายด้วย PBS 25 มิลลิลตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในขวดดูแรนที่ห่อด้วยฟอยล์เพื่อป้องกันแสง แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

16. การเตรียมสารละลาย mitomycin C

เตรียมสารละลาย mitomycin C 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5000 ไมโครลิตร สำหรับใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ในการทดสอบความเป็นพิษ สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียมดังนี้

16.1 สารเคมี

16.1.1 mitomycin C 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 625 ไมโครลิตร

16.1.2 RPMI 1640 (5% FBS) 4,375 ไมโครลิตร

16.2 ขั้นตอน

16.2.1 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (5% FBS) ปริมาตร 4375 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดแก้ว แล้วปิเปต

16.2.2 เติม mitomycin C 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 625 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

17. การเตรียมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ต่อเอทานอล (1:1)

เตรียมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ต่อเอทานอล (1:1) ปริมาตร 50 มิลลิลตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียมดังนี้

17.1 สารเคมี

17.1.1 DMSO 25 มิลลิลิตร

17.1.2 absolute ethanol 25 ไมโครลิตร

17.2 ขั้นตอน

17.2.1 ตวง DMSO ปริมาตร 25 มิลลิลตร

17.2.2 เติม absolute ethanol อีก 25 มิลลิตร ลงในขวดดูแรน จากนั้นกลับขวดไปมาให้สารเข้ากัน แล้วเก็บในตู้ดูดควัน

18. การเตรียมสารสกัดหยาบสำหรับศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay

18.1 การเตรียม stock สารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

18.1.1 ชั่งสารสกัดหยาบเมทานอล endocarp และ seed อย่างละ 100 มิลลิกรัม

18.1.2 ละลายด้วย เมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จนสารสกัดละลายเป็นเนื้อเดียวกันจะได้ stock สารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

18.2 การเตรียมสารสกัดความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร จาก stock สารสกัดความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

18.2.1 ดูด stock สารสกัดความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร

18.2.2 เติมเมทานอล ปริมาตร 1,350 ไมโครลิตร ผสมจนสารสกัดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

18.3 การเตรียมสารสกัดความเข้มข้นที่ต้องการเช่น ต้องการสารสกัดความเข้มข้นที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 700 มิลลิลิตร จาก stock สารสกัดความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

18.3.1 ดูด stock สารสกัดความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 70 ไมโครลิตร

18.3.2 เติมเมทานอล ปริมาตร 630 ไมโครลิตร ผสมจนสารสกัดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

19. การเตรียมสารละลายโทรลอกซ์

เตรียมสารละลายโทรลอกซ์ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สำหรับใช้เป็นสารละลายมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียมดังนี้

19.1 สารเคมี

19.1.1 โทรลอกซ์ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	100	ไมโครลิตร
19.1.2 เมทานอล	900	ไมโครลิตร

19.2 ขั้นตอน

19.2.1 ปิเปตเมทานอล ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่หอด้วยฟอยล์เพื่อป้องกันแสง

19.2.1 เติมโทรลอกซ์ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

20. การเตรียมสารเพื่อทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)

เตรียมสารละลาย DPPH 0.2 mM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียมดังนี้

20.1 สารเคมี

20.1.1 DPPH	3.945	มิลลิกรัม
20.1.2 เมทานอล	50	มิลลิลตร

20.2 ขั้นตอน

20.2.1 ชั่ง DPPH 3.945 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้วที่ห่อฟอยล์ เพื่อป้องกันแสง

20.2.2 เติมเมทานอลพอประมาณลงในขวดแล้วเขย่าขวดไปมาให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

20.2.3 ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร เทกลับลงในขวดแก้วที่ห่อฟอยล์ แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

21. การนับจำนวนเซลล์ไลน์และการคำนวณ

การนับจำนวนเซลล์ไลน์และการคำนวณ จำเป็นต้องใช้สารเคมีและขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

21.1 สารเคมี

21.1.1 trypan blue	20	ไมโครลิตร
21.1.2 สารละลายเซลล์ไลน์	20	ไมโครลิตร

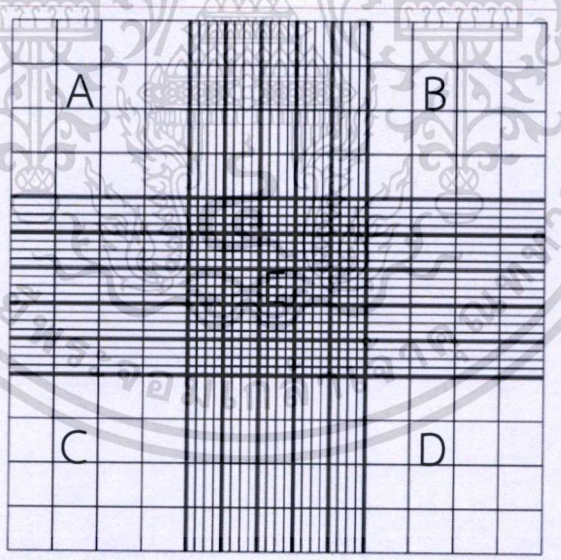
21.2 ขั้นตอน

21.2.1 ปิเปตสารละลายเซลล์ไลน์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลตร ปิเปต trypan blue ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต จากนั้นดูดเซลล์ที่ย้อมสีแล้วมาใส่ลงในแอ่ง (chamber) ของฮีมาไซโตมิเตอร์

21.2.2 นำฮีมาไซโตมิเตอร์วางบนแท่นวางวัตถุของกล้องจุลทรรศน์แบบ compound หาตาราง (grid) ด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 4X แล้วนับจำนวนเซลล์ด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 10X

21.2.3 สังเกตเซลล์มีชีวิตโดยมีคุณสมบัติคือไม่ติดสี trypan blue ส่วนเซลล์ตายจะติดสีฟ้าหรือน้ำเงินของ trypan blue

21.2.4 นับจำนวนเซลล์มีชีวิต ทั้งหมด 5 ช่อง คือ A, B, C, D และ E ดังรูปที่ และบันทึกผลการนับจำนวนเซลล์



รูปที่ 2.8 ตารางฮีมาไซโตมิเตอร์
(ที่มา: http://www.microbehunter.com/wp/wp-content/uploads/2010/06/counting_chamber7.jpg)

21.2.5 จากนั้นนำมาคำนวณจำนวนเซลล์มีชีวิตต่อ 1 มิลลิลตรดังสูตรต่อไปนี้

จำนวนเซลล์มีชีวิตต่อ 1 มิลลิลิตร = จำนวนเซลล์มีชีวิตเฉลี่ย $\times 10^4 \times$ dilution factor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

จำนวนเซลล์มีชีวิตเฉลี่ย = ได้จากการรับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

10^4 = ปริมาตรช่อง 1×1×0.1 mm

dilution factor = $\frac{\text{ปริมาตรเซลล์ที่ดูดออกมานับ + ปริมาตรสีย้อม}}{\text{ปริมาตรเซลล์ที่ดูดดออกมานับ}}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7

ตารางภาคผนวกที่ ข-1.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7

sample	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
เปลือกเมล็ด	3	28.5106	11.07412	6.39365
เอ็มบริโอ	2	2.3250	0.16263	0.11500

ตารางภาคผนวกที่ ข-1.2 ตาราง t-test แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อมที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Differen-ce	Std. Error Differe-nce	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	9.302	0.055	3.172	3	0.050	26.18562	8.25461	-0.08423	52.45546
Equal variances not assumed			4.095	2.001	0.055	26.18562	6.39468	-1.31143	53.68267

*หมายเหตุ ค่า Sig. ≤ 0.05 คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
ค่า Sig. > 0.05 คือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

2. การวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29

ตารางภาคผนวกที่ ข-2.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29

sample	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
เปลือกเมล็ด	3	23.2645	1.29959	0.75032
เอ็มบริโอ	3	-11.8543	11.77755	6.79977

ตารางภาคผนวกที่ ข-2.2 ตาราง t-test แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อมที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Differen-ce	Std. Error Differe-nce	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	11.785	0.026	5.134	4	0.007	35.11875	6.84104	16.12496	54.11253
Equal variances not assumed			5.134	2.049	0.034	35.11875	6.84104	6.34451	63.89298

*หมายเหตุ ค่า Sig. ≤ 0.05 คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
ค่า Sig. > 0.05 คือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

3. การวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ KB

ตารางภาคผนวกที่ ข-3.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ KB

sample	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
เปลือกเมล็ด	3	21.4343	6.47641	3.73916
เอ็มบริโอ	3	19.6785	11.07469	6.39397

ตารางภาคผนวกที่ ข-3.2 ตาราง t-test แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอมะขามป้อมที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ KB

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Differen-ce	Std. Error Differe-nce	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	1.083	0.357	0.237	4	0.824	1.75586	7.40704	-18.80937	22.32110
Equal variances not assumed			0.237	3.225	0.827	1.75586	7.40704	-20.91409	24.42582

*หมายเหตุ ค่า Sig. ≤ 0.05 คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
ค่า Sig. > 0.05 คือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

4. การวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางภาคผนวกที่ ข-4.1 วิเคราะห์ความแปรปวนของความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารมาตราฐานโทรลอกซ์ สารสกัดหยาบเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอจากชั้นเมทานอล

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20.737	2	10.369	6.459	0.032
Within Groups	9.632	6	1.605		
Total	30.369	8			

ตารางภาคผนวกที่ ข-4.2 เปรียบเทียบความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารมาตราฐานโทรลอกซ์ สารสกัดหยาบเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอจากชั้นเมทานอล ซึ่งทดสอบโดยวิธี DMRT

extracts	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
เปลือกเมล็ด	3	18.19033	
โทรล็อกซ์	3	18.9167	
เอ็มบริโอ	3		22.1300
Sig.		0.990	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้