

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย

ใบลองกอง จากจังหวัดพัทลุง ประเทศไทย

#### เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible spectrophotometer) ยี่ห้อ Josco รุ่น V-530 ประเทศญี่ปุ่น
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance) ยี่ห้อ Ohaus รุ่น Adventure ประเทศจีน
3. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น UNB-450 ประเทศเยอรมันนี
4. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Nichiryo ประเทศญี่ปุ่น
5. เครื่องไมโครเพลท สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Microplate spectrophotometer) รุ่น Spectra Count, ยี่ห้อ Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา

#### สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. L-ascorbic acid (Lot no.1007089) ยี่ห้อ AJAX ประเทศออสเตรเลีย
2. 2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Lot no. STDB4145V) ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. Dimethyl sulfoxide (DMSO, AR grade) (Lot no. 12060109) ยี่ห้อ LabScan ประเทศไทย
4. Ethanol absolute (AR Grade, Lot no. 6417) ยี่ห้อ QRëC ประเทศนิวซีแลนด์
5. Folin- Calteu reagent (Lot no. BCBK6010V) ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. Formic acid (Lot no. F503332501) ยี่ห้อ QRëC ประเทศนิวซีแลนด์
7. Gallic acid (98% HPLC grade, Lot no. 098K0245V) ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. Kojic acid (99% HPLC grade, Lot no. 501304) ยี่ห้อ ACROS Organics ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. Methanol (AR grade, Batch No. 11070342) ยี่ห้อ Labscan ประเทศไทย
10. Propylene glycol (PG) (Lot no. 12190655NO) ยี่ห้อ P.C ประเทศไทย

11. Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Lot no. 1201007) ยี่ห้อ AJAX ประเทศออสเตรเลีย
12. Sodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ยี่ห้อ Fisher ประเทศอังกฤษ
13. Sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ยี่ห้อ Fisher ประเทศอังกฤษ
14. Tyrosinase from mushroom (Batch no. SLBG4386V) ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. L-tyrosine (Lot no. 0000146814) ยี่ห้อ Hi media ประเทศอินเดีย

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การเตรียมพืช

นำใบสดลองกอง (ใบแก่) จากคุณหนับสะ ชูศรีอ่อน อำเภอองครักษ์ จังหวัดพิจิตร ประเทศไทย มาสับเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องตู้อบความร้อน (Oven) เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (Blender) (Manosroi et al., 2012 และ Kumgoun et al., 2011)

### 2. การสกัดใบลองกอง (Extraction)

การสกัดใบลองกองใช้วิธีการหมัก (maceration technique) ซึ่งใบลองกองที่ผ่านการบดแล้ว นำไปห่อด้วยผ้าขาวบางมัดให้แน่น จากนั้นนำไปใส่ภาชนะที่มีฝาปิดสนิท แล้วทำการสกัดตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ เมทานอล (methanol) และโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol, PG) โดยใช้อัตราส่วนของใบลองกองแห้งต่อตัวทำละลายเท่ากับ 100 g ต่อ 100 mL แช่สกัดไว้เป็นเวลา 3 วัน นำมากรองสารสกัดออกมาเก็บไว้ แล้วนำกากใบมาแช่ต่อด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมทำซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำสารสกัดที่อยู่ในรูปแบบสารละลาย (solution extract) ที่ได้ เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity)

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดจากใบลองกอง ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay (Viyoch, Buranajaree, Grandmottet, Robin, Binda, Viennet, Waranuch, Humbert, 2010) โดยการเตรียมสารสกัดจากใบลองกองในตัวทำละลายเมทานอล และสารสกัดในตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol, PG) ให้มีความเข้มข้น 0.4–50.0 mg/mL จากนั้นผสมสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.7 mL กับสารละลาย 0.2 mM DPPH ปริมาตร 1.3 mL เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 515 nm ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า free radical scavenging activity (%) โดยใช้วิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate)

$$\text{Free radical scavenging activity (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

เมื่อ  $A_{\text{sample}}$  = ค่า absorbance ที่วัดได้ของสารผสมระหว่างสารละลาย DPPH กับสารตัวอย่าง  
 $A_{\text{control}}$  = ค่า absorbance ที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

จากนั้นคำนวณหาค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (half maximal inhibition concentration, IC<sub>50</sub>) โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05 (Graph Pad Software ประเทศสหรัฐอเมริกา)

#### 4. การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ในสารสกัดใบลองกอง ตรวจสอบด้วยวิธี Folin–Ciocalteu assay (Noridayu, Hii, Faridah, Khozirah, Lajis, 2011) วิธีการทดสอบดังรายละเอียดต่อไปนี้

##### 4.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) กรดแกลลิก (gallic acid)

4.1.1 นำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 1 mg/mL มาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้นเป็น 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.8 mg/mL โดยแยกแต่ละหลอดการทดลอง

4.1.2 จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานแกลลิกในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 mL เติมน้ำกลั่น (DI water) ปริมาตร 2.8 mL เขย่าให้เข้ากันดี และเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) เข้มข้น 2.0 % ปริมาตร 2.0 mL ผสมสารละลายและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นเติม สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent เข้มข้น 50% ปริมาตร 0.1 mL ลงในส่วนผสม ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV–Vis spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 750 nm ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate)

4.1.3 นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ที่ความยาวคลื่น 750 nm และความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) มาเขียนกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดต่อไป

##### 4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบลองกอง

4.2.1 เตรียมความเข้มข้นของสารสกัดในตัวทำละลายเมทานอล และในตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol, PG) ให้มีความเข้มข้น 1.0 mg/mL

4.2.2 บีเปตต์สารละลายสารสกัด มา 0.1 mL เติมน้ำกลั่น (DI water) ปริมาตร 2.8 mL และเติมโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) เข้มข้น 2.0 % ปริมาตร 2.0 mL ผสมสารละลายและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นเติม สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent เข้มข้น 50% ปริมาตร 0.1 mL ลงในส่วนผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 750 nm ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate)

4.2.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดโดยเทียบจากกราฟสารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) คำนวณในรูปมิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid equivalents (GAE) ต่อ สารสกัด 1 g

### 5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition assay)

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition assay) ทดสอบด้วยวิธี dopachrome method โดยใช้สารไทโรซีน (tyrosine) เป็นสารสับสเตรท (substrate) (Manosoi et al., 2012) มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

5.1 เตรียมความเข้มข้นของสารสกัดใบลองกองทั้ง 2 ตัวทำละลาย ให้มีความเข้มข้น 0.001-10 mg/mL โดยใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) เป็นตัวทำละลาย

5.2 บีเปตต์สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  ผสมกับ tyrosinase mushroom ความเข้มข้น 100 units (ละลายใน 0.1 M phosphate buffer pH 6.8) ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  หลังจากนั้นเติมไทโรซีน (tyrosine) (ละลายใน 0.1 M phosphate buffer pH 6.8) ความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  และเติม 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  ผสมสารละลายลงใน 96-well plate และผสมสารละลายดังกล่าวตามลำดับ

5.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer

5.4 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่า tyrosinase inhibition activity (%) โดยใช้กรดโคจิก (kojic acid) (ความเข้มข้น 0.001-10 mg/mL) เป็นสารควบคุมที่ให้ผลเชิงบวก (positive control) และ สารควบคุมที่ให้ผลเชิงลบ (negative control) คือ สารละลายที่ไม่เติมสารสกัด ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate)

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

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่เติมสารสกัด (negative control) หรือหลังสารควบคุมที่ให้ผลเชิงบวก (positive control)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารสกัด

5.5 คำนวณหาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ) โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05 (Graph Pad Software ประเทศ

สหรัฐอเมริกา) พล็อตกราฟระหว่าง tyrosinase inhibition activity (%) และความเข้มข้นของสารสกัด หรือสารควบคุมที่ให้ผลเชิงบวก (positive control)

#### 6. การวิเคราะห์ผลข้อมูล (Statistic analysis)

ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบลองกองในแต่ละตัวทำละลาย จะทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อแสดงร้อยละ (percentage) ของข้อมูล ค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และมีการเปรียบเทียบข้อมูลกลุ่มที่มีสารสกัด และกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ไม่มีสารสกัด