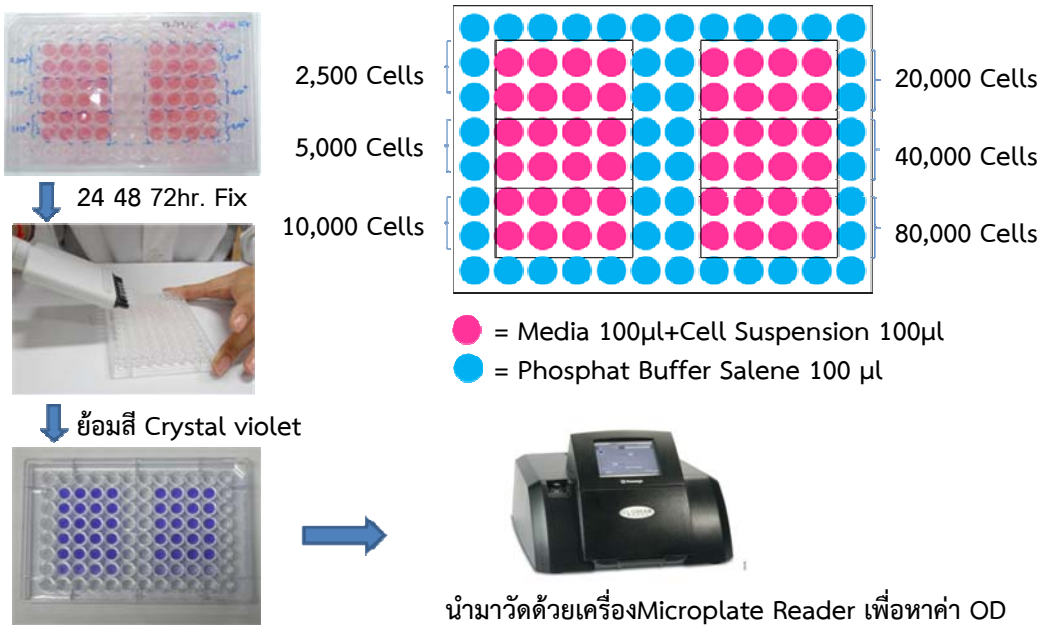
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

คู่มือการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดสุมนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

คู่มือการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

1. ศึกษาการเจริญของเซลล์เมลาโนมา เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด โดยการเลือกใช้เซลล์เพาะเลี้ยงจำนวนเซลล์ที่เหมาะสม และระยะเวลาที่เลี้ยงเซลล์ที่อยู่ในช่วงอัตราการเจริญเป็น 2 เท่า จากจำนวนเซลล์ตั้งต้น



ภาพที่ 1 เลี้ยงเซลล์เริ่มต้นใน 96-well ในจำนวนที่ต่างกัน ซึ่งมีทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ8 หลุม คือ ที่จำนวนเซลล์ 2,500, 5,000, 10,000, 20,000, 40,000 และ 80,000 เซลล์ และเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง

ขั้นตอนมีดังนี้

1.1 ใส่อาหารหลุมละ 100µlต่อหลุม ทั้ง 48 หลุม (หลุมสีชมพูดังภาพที่ 1)

1.2 นำเซลล์ที่ได้จากการย่อยเป็นเซลล์เดี่ยวมาคำนวณหาจำนวนเซลล์แล้ว ใส่เซลล์ในหลุม 100 µl ต่อหลุม (หลุมสีชมพูดังภาพที่ 1) แล้วใส่ PBS 100 µlต่อหลุม (ภาพที่ 1 หลุมสีฟ้า) ใช้สก็อตเทปใสปิดคาดระหว่างฝาและฐานของจานหลุม เพื่อป้องกันการเปิดของฝา แล้วนำไปบ่มที่ตู้อุณหภูมิ 37^{O}C เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง

1.3 เมื่อครบเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมงให้นำจานหลุม ส่องกล้องดูการเจริญเติบโตของเซลล์แล้ว ล้างอาหารออก โดยเริ่มสะบัดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก ซับด้วยกระดาษทิชชู แล้วใส่ PBS 150 µl ต่อหลุม แล้วสะบัดPBS (ล้าง2 ครั้ง) ทิ้งให้แห้ง

1.4 ตึงเซลล์ให้ติดอยู่ในหลุม (fix cells) ด้วย เมทานอล (methanol) โดยใส่ เมทานอล หลุมละ100µl ทิ้งไว้ 5 นาที สะบัดเมทานอลทิ้ง ซับด้วยกระดาษทิชชู ปล่อยให้แห้ง

1.5 ทำการย้อมเซลล์ด้วยสี คริสตัลไวโอเล็ต โดยใส่สี 100µl ต่อหลุม ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปา หลังจากนั้นสะบัดน้ำออกให้หมด ซับให้แห้ง นำจานหลุมไปส่องดูเซลล์ที่ติดสี

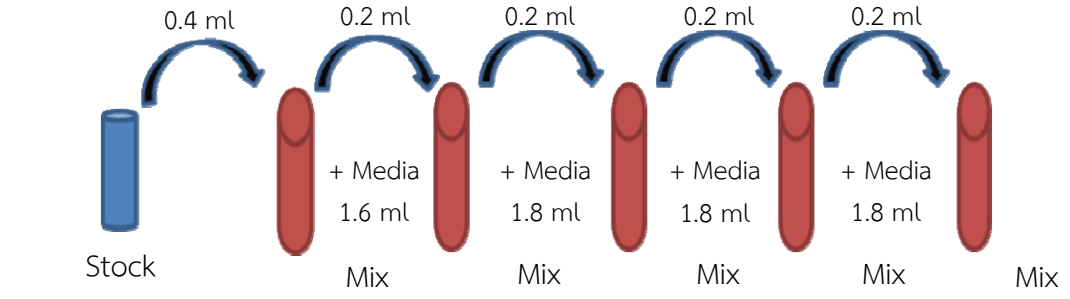
1.6 การละลายสีคริสตัลไวโอเล็ค โดยใส่น้ำยาที่มีส่วนผสมของเมทานอล กับ 0.1 N ไฮโดคลอลิค (HCL) ในอัตราส่วน 1:9 ใช้ปริมาตร 200 µlต่อหลุม แล้วนำไปวัดค่า OD ที่คลื่นความถี่ 560 nm

1.7 นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของความมีชีวิตของเซลล์ (% of cell viability) เวลาที่ 24, 48, 72 ชั่วโมง วิเคราะห์ผล และพลอตกราฟ ซึ่งค่าOD จะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น

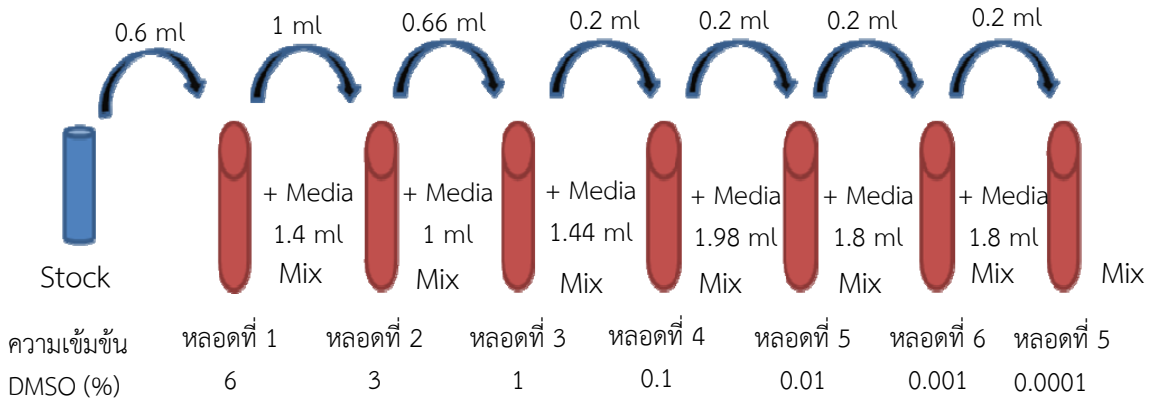
2. การเตรียมสารสกัดอินทนิลน้ำหรือสารสกัดสมุนไพร

เตรียมเจือจางสารสกัดสมุนไพร 1:10 เพื่อหาช่วงของความเข้มข้นของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ทำให้เซลล์ตาย คือ 1000,100,10,1,0.1 µg/ml ตามลำดับ โดยทำStock สารสกัดอินทนิลน้ำที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 10000 µg/ml

2.1 ชั่งสารสกัดใบอินทนิลน้ำมา 100 mg ละลายด้วยดีเอ็มเอสโอ 1 ml นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortexe) ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำสารสกัดที่ละลายแล้วมาทำการ เจือจางโดย



ภาพที่ 2 การเตรียมสารสกัดอินทนิลน้ำ เพื่อใช้ในการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการเจือจางแบบ 1:10 แล้วนำสารสกัดมาให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่าน ฟิลเตอร์



ภาพที่ 3 การเจือจางสารดีเอ็มเอสโอ (DMSO) เพื่อหาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา C32 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำ

3. 1 จำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลอง คือ 4 X 10^4 โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานหลุม 96 หลุม ทำทั้งหมด 3 จานหลุม เลี้ยงเป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง

3.2 โดยใส่อาหารเลี้ยงเซลล์หลุมละ 100 µl ก่อน แล้วค่อยลงเซลล์ที่อยู่ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 µlต่อหลุม

3.3 หลุมด้านข้างใส่ PBS หลุมละ 100 µl ใช้สก็อตเทปแปะฝากับตัวจานหลุม ป้องกันการเปิดของฝา แล้วนำไปบ่มที่ตู้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยจะมีเซลล์ที่ไม่ได้ใส่สารสกัดเพื่อนำมาเป็นตัว control เปรียบเทียบกับหลุมที่ใส่สารสกัด

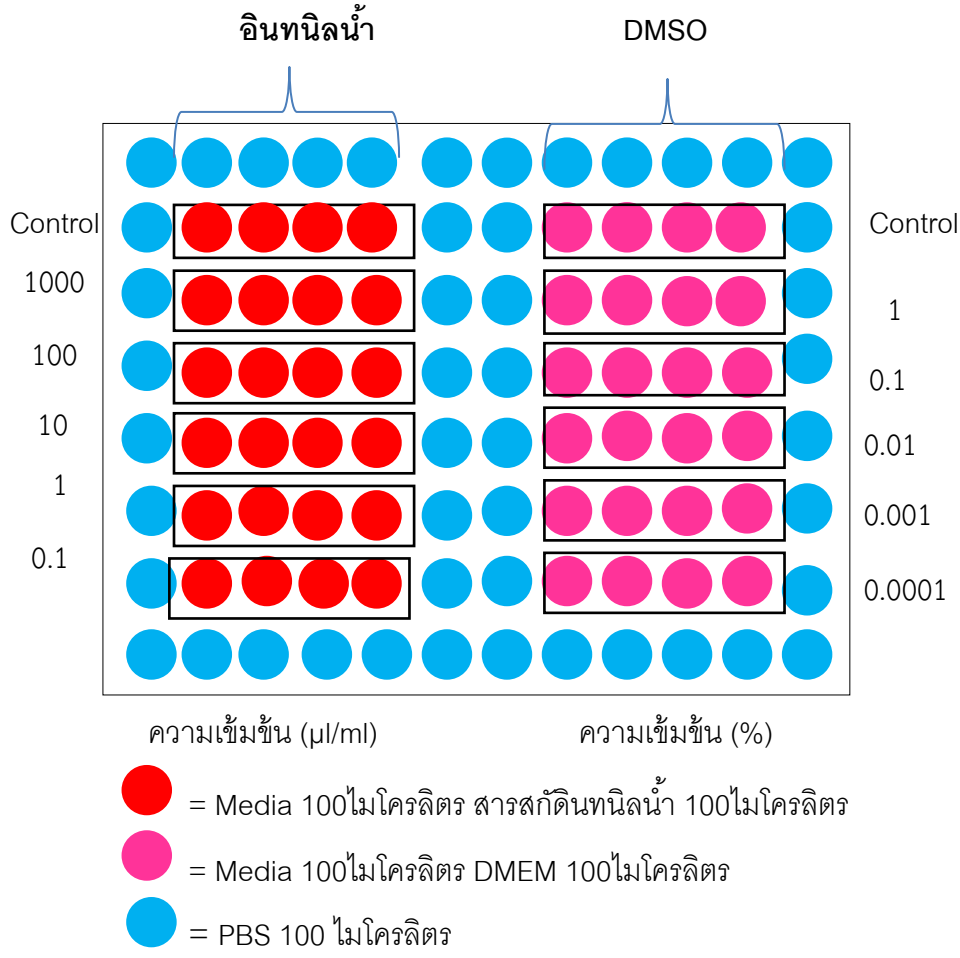
3.4 หลังครบเวลา 24 ชั่วโมง สะบัดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่ความเข้มข้นต่างๆ เจือจาง 1:10 (เตรียมความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า แสดงในภาพที่ 4)

3.5 เมื่อครบเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมงให้นำจานหลุมมาส่องกล้องดูการเจริญเติบโต แล้วล้างเซลล์ โดยเริ่มสะบัดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก ซับด้วยกระดาษทิชชู

3.6 ใช้ PBS ล้างคราบโปรตีนออก โดยใช้ปริมาตร150 µl ล้าง2 ครั้ง แล้วสะบัด PBS ทิ้งให้แห้ง

3.7 ตึงเซลล์ด้วยเมทานอล หลุมละ100 µl ทิ้งไว้5 นาที สะบัดเมทานอลทิ้ง ซับด้วยกระดาษทิชชู ปล่อยให้แห้ง

3.8 ย้อมเซลล์ด้วยสีคริสทอลไวโอเล็ต หลุมละ100 µl ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วล้างออกจนน้ำใส สะบัดน้ำออกให้หมด ซับให้แห้ง นำจานหลุมส่องดูการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ว่ามีการติดสีคราบโปรตีนที่ไม่ใช่เซลล์หรือไม่



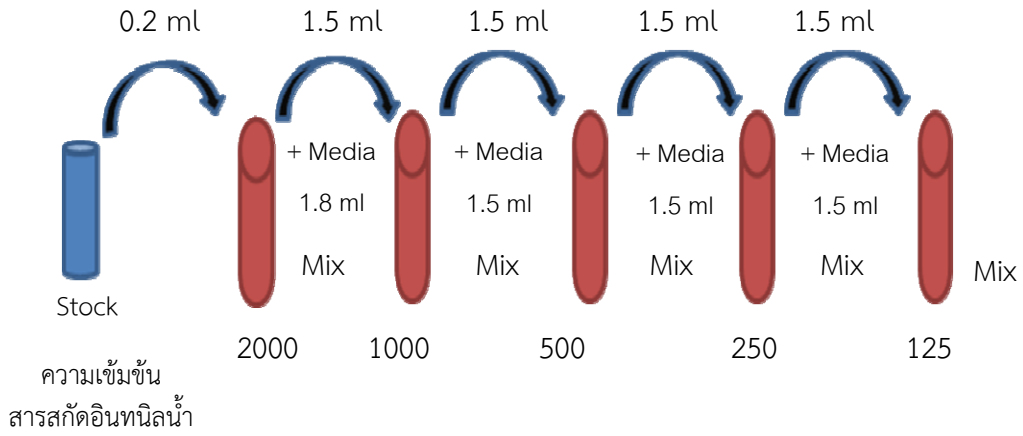
ภาพที่ 4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมา เจือจาง อัตตรา 1:10

3.9 ทำการละลายยสีคริสตัลไวโอเล็ ด้วยสารผสมของเมทานอล กับ 0.1N HCL ในอัตราส่วน 1:9 ใช้ปริมาตร 200 µl แล้วนำไปวัดค่า OD ที่คลื่นความถี่ 560 nm

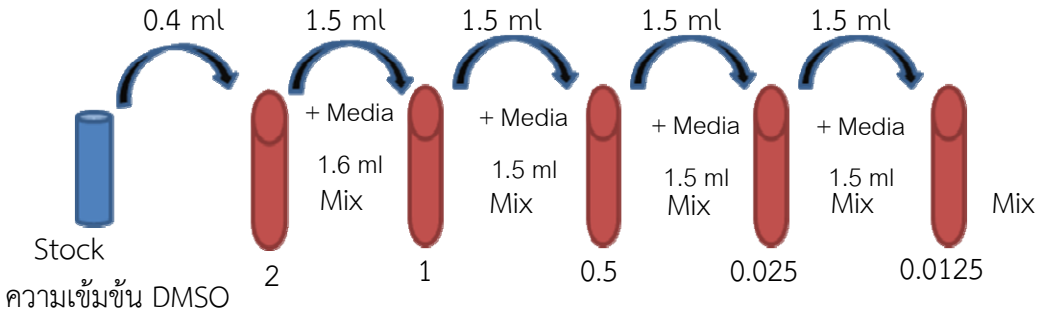
3.10 นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต (% cell viability) ที่เวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง และวิเคราะห์ค่าทางสถิติ และพลอตกราฟ ซึ่งค่าOD จะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มี

3.11 เมื่อทำการทดลองในอัตราส่วน 1:10 ทำให้เราทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลง แล้วทำการทดสอบให้ละเอียดขึ้น โดยเจือจางสารสกัดที่ความเข้มข้นในอัตราส่วน 1:2 จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125 µl/ml (ภาพที่ 5)

3.12 ทำการ เจือจางสารสกัดในอัตราส่วน 1:2 จาก stock solution 0.8 ml (อินทนิลน้ำ) หลอดที่หนึ่ง ใส่ อาหาร 1.6 ml และใส่ สารสกัด จาก stock Solution 0.4 ml แล้วทำการเจือจางแบบ Two fold dilution ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การเตรียมสารสกัดอินทนิลน้ำ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ถูกเจือจางแบบ 1:2



ภาพที่ 6 การเตรียมสารละลาย DMSO ที่มีสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ กัน ภูกเจือจางแบบ1:2

4. วิธีการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในสัดส่วน 1:2

4.1 จำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลอง คือ 4 X 10^4 เซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงในจานหลุม 96 หลุม ทำทั้งหมด 3 จาน

4.2 ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์หลุมละ 100 µl ก่อน แล้วค่อยใส่เซลล์ที่อยู่ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์อีก 100 µlต่อหลุม จะได้ปริมาตร 200µl

4.3 หลุมด้านข้างเติมด้วย PBS หลุมละ 100 µl ใช้สก็อตเทปแปะฝากับตัวจาน ป้องกันการเปิดของฝา แล้วนำไปบ่มที่ตู้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.4 ใส่สารสกัด โดยการสะบัดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ที่ความเข้มข้นที่กำหนดไว้ ทั้ง สารสกัดอินทนิลน้ำ และ สารละลายดีเอ็มเอสโอ ในสัดส่วนที่เทียบเคียงกัน

4.5 สารสกัด มีปริมาณสารอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำการเจือจาง 1:2

4.6 เมื่อครบเวลา24 ชั่วโมงให้นำจานมาทำการ ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูการเจริญเติบโต แล้วทำการตึงเซลล์ (Fixe cells) โดยการ ที่ สะบัดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก ซับด้วยกระดาษทิชชู

4.7 ใช้ PBS ล้างคราบโปรตีนออก โดยใช้ปริมาตร 150µl ล้าง2 ครั้ง แล้วสะบัดPBS ทิ้ง แห้ง ซึ้งที่ 48,72 ชั่วโมงก็มีวิธีการทำเช่นกัน

4.8 เพื่อเพลทแห้งแล้ว ตามด้วย Methanol หลุมละ100µl ทิ้งไว้ 5 นาที สะบัดเมทานอลทิ้ง ซับด้วยกระดาษทิชชู ปล่อยให้แห้งดี

4.9 ทำการย้อมเซลล์ด้วยสี คริสตัลไวโอเล็ต ทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วล้างออกจนน้ำใส สะบัดน้ำออกให้หมด ซับให้แห้ง นำเพลทไปส่องดูการติดสี ว่ามีการติดสีคราบโปรตีนที่ไม่ใช่เซลล์หรือไม่

4.10. ทำการละลายยสีคริสทอลไวโอเล็ โดยใช้ เมทานอล กับ 0.1N HCL ในอัตราส่วน 1:9 ใช้ปริมาตร 200 µl แล้วนำไปวัดค่า OD ที่คลื่นความถี่ 560 nm

4.11 นำค่าที่ได้มาคำนวณหา % cell viability เปรียบเทียบที่ 24, 48, 72 ชั่วโมง ว่าเซลล์ที่มีปริมาณเริ่มต้นเท่าใดที่มีการเจริญเติบโตในระยะ log phase พอดีที่72 ชั่วโมง ซึ่งใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ และพลอตกราฟ ซึ่งค่าOD จะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มี

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการคำนวณค่า % cell viability โดยเทียบกับหลุมควบคุม กำหนดให้หลุมควบคุมมี % cell viability หรืออัตราการมีชีวิตของเซลล์คิดเป็น100%

$$\% \text{ of cell viability} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของ OD ที่อ่านได้จากหลุมทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ย OD ที่ได้จากหลุมควบคุม}}$$

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ผศ. ดร. ทัศนีย์ พาณิชย์กุล
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Asst.Prof. Tasanee Panichakul, Ph.D.
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ถ. สิรินทร เขตบางพลัด กทม. 10700 โทร 02-4239423, 085-1994988, email tasanee_p@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปี 2528

ปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล ปี 2532

ปริญญาเอก ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาอายุรศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ปี 2550

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Cell biology, Hematopoietic stem cells, Immunology, Cell culture, Cholangiocarcinoma, Malaria culture

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัยเรื่อง การควบคุมและป้องกันโรคติดต่อมือเท้าปากในเด็กปฐมวัยและตรวจหาเชื้อไวรัส (Control and prevention of Hand-foot-mouth disease in children and viruses detection) ทุนสนับสนุนโดยมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปี 2552 (ดำเนินการลุล่วง 100 %)

หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง ผลกระทบต่อการพัฒนาของเม็ดเลือดแดงที่เกิดจากการติดเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ *Plasmodium vivax* (Effect of *Plasmodium vivax* infection on erythropoietic development) ทุนสนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปี 2553-2555 (ดำเนินการลุล่วง 100 %)

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้วในปี 2009-2012

1. **Panichakul T.**, Thophon S. Hand, foot and mouth disease in children. J Public Health. 2009, 39: 214-223. (supported by University Suan Dusit Rajabhat University)
2. **Panichakul T.**, Thophon S., Kakhai C., Patumasut P., Somboon S., Sukasem C., Srichanrusami C. Surveillance and prevention of enterovirus spreading and hand-foot-mouth disease occurrence in young children. J Public Health & Develop. 2010, 8: 173-185. (supported by University Suan Dusit Rajabhat University)
3. Ponnikorn S., **Panichakul T.**, Sresanga K., Wongboriuth C., Roytrakul S., Hongeng S., Tungpradabkul S. Phosphoproteomic analysis of apoptotic

hematopoietic stem cells from hemoglobin E/□-thalassemia. J. Translational Medicine. 2011, 9: 96. (supported by Mahidol University)

4. Chootong P., **Panichakul T.**, Permmongkol C., Barnes S.J., Udomsangpetch R., Adams J.H. Characterization of inhibitory anti-Duffy binding protein II immunity: Approach to Plasmodium vivax vaccine development in Thailand. Plos One, 2012, 4: e35769.
5. **Panichakul T.**, Payuhakrit W., Panburana P., Wongborisuth C., Hongeng S., Udomsangpetch R. Suppression of erythroid development in vitro by Plasmodium vivax. Malaria J, 2012. (supported by Thailand research fund, Commission on Higher Education, Ministry of Education and Suan Dusit Rajabhat University, Bangkok, Thailand, MRG5380092)

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว ณัฐพร บู๊ฮวด
ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Nattaporn Boohuad
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อ หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต โทรศัพท์ 02 4239420-1 โทรศัพท์มือถือ 089 1416790 E-mail NATTAPORN2608@GMAIL.COM
ประวัติการศึกษา
1998-2001 B. Sc. (Environmental science) Silapakorn University,
2005-2007 M. Sc. (Cosmetic science) MaeFahLaung University
สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

ชื่อภาษาไทย นางสาว ปิยนุช พรมภมร
ชื่อภาษาอังกฤษ Miss Piyanuch Prompamorn
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
สถานที่ทำงาน หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต e-mail piyanuch_ppm@hotmail.com
ประวัติการศึกษา
ปริญญาตรี คณะประมง ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วทบ. (ประมง) ปีพ.ศ. 2548
ปริญญาโท คณะประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วทม. (ประมง) ปีพ.ศ. 2550
ปริญญาเอก คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
(เทคโนโลยีชีวภาพ) ปีพ.ศ. 2555
ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

1. The development of loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for detection of *Vibrio parahaemolyticus*. 2011. *Lett Appl Microbiol.* 52 (4):344-51
2. Rapid identification and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* from *Vibrio* spp. in seafood samples using developed monoclonal antibodies. 2013. *World J Microbiol Biotechnol.* 29(4):721-31.
3. Effects of High Water Temperature on the Elimination of White Spot Syndrome Virus in Juveniles of *Litopenaeus vannamei*. 2010. Kasetsart University Fisheries Research Bulletin (ผู้ร่วมวิจัย)