ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียมสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดอินทนิลน้ำ และ DMSO สำหรับใช้ในการทดสอบ

สารอินทนิลน้ำอยู่ในรูปผง สกัดได้จากส่วนใบอินทนิลน้ำถูกนำมาชั่งปริมาณ 0.1 กรัม ถูกละลาย ใน DMSO 1 มิลลิลิตร เติม DMEM 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vourtex แล้วนำมากรองด้วย filter ที่มีขนาด 0.2 ไมโครเมตร Stock ของสารสกัดอินทนิลน้ำที่ได้มีความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Stock solution) จากนั้นสารสกัดจะถูกแบ่งเก็บ 1 มิลลิลิตรต่อหลอด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซล์เซียส เมื่อนำมาใช้งานก็จะนำมาเจือจางด้วย DMEM 10% FBS ความเข้มข้น 100, 10, 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเริ่มหลอดที่หนึ่งใส่ media 0.28 มิลลิลิตร และใส่สารสกัดจาก stock solution 13.72 มิลลิลิตร หลอดที่สองใส่ media 1.4 มิลลิลิตร และใส่สารสกัดจาก stock solution 12.6 มิลลิลิตร. และหลอดที่สามใส่ media 1.4 มิลลิลิตร แล้วใส่สารสกัดจาก stock solution 12.6 มิลลิลิตร ทำการเจือจางแบบ Tenfold dilution แล้วนำมาใช้ทดสอบกับการเจริญของเซลล์ เนื่องจากสารสกัดอินทนิลน้ำถูกละลายใน DMSO ซึ่งในการทดสอบจึงทำการทดสอบฤทธิ์ของ DMSO ที่ความเข้มข้น (%) ต่างๆ ดังนั้นจึงเตรียมสารละลาย DMSO สำหรับใช้ในการทดสอบ โดยเริ่มเตรียม DMSO 10% โดยผสม DMSO 1 มิลลิลิตร และ DMEM 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vourtex แล้วนำมากรองด้วย filter ที่มีขนาด 0.2 ไมโครเมตร Stock ของสารละลาย DMSO ที่ได้มีความเข้มข้น 10% ถูกแบ่งเก็บ 1 มิลลิลิตรต่อหลอด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้งานก็จะนำมาเจือจางด้วย DMEM 10% FBS ที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.001, 0.01% (เนื่องจาก DMSO เป็นสารละลาย ดังนั้นในการเตรียมสารละลาย DMSO ให้ควบคู่ไปกับสารสกัดอินทนิลน้ำ โดยที่สารสกัดอินทนิลน้ำถูกละลายด้วย DMSO 10% สารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมี DMSO เท่ากับ 10% สารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี DMSO เท่ากับ 0.01%, สารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี DMSO เท่ากับ 0.001%, สารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี DMSO เท่ากับ 0.0001%) เพื่อนำมาใช้ทดสอบกับการเจริญของเซลล์ควบคู่ไปกับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำ

2.การเตรียม Dragon’s blood และ Propanediol : Water (P:W)

เลือดมังกร (Dragon’s Blood Tree) มีลักษณะเป็นยางไม้สีแดงสด สกัดได้จากต้น *Croton* ssp. ถูกละลายด้วยตัวทำละลาย Propanediol : Water (P:W) การสกัดเลือดมังกรจะใช้อัตราส่วน Propanediol : Water ในอัตราส่วน 1 : 1 ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท เบรนน์แท็ก อินกรีเดียนส์ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) ยางเลือดมังกรความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านการกรองด้วย filter ขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นสารสกัดจะถูกแบ่งเก็บ 1 มิลลิลิตรต่อหลอด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้งานก็จะนำมาเจือจางด้วย DMEM 10% FBS ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาใช้ทดสอบกับการเจริญของเซลล์ การเตรียมตัวทำละลาย P:W ผ่านการกรองด้วย filter ขนาด 0.2 ไมครอน ถูกแบ่งเก็บ 1 มิลลิลิตรต่อหลอด ที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้งานก็จะนำมาเจือจางด้วย DMEM 10% FBS ที่ความเข้มข้น 0.0032%, 0.032%, 0.32% (เนื่องจาก P:W เป็นสารละลาย ดังนั้นในการเตรียม P:W ให้ควบคู่ไปกับ Dragon's blood จะได้ Dragon's blood : P:W จะต้องคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยดูด Dragon's blood มา 6.4 มิลลิลิตร ผสมกับ DMEM จำนวน 3.6 มิลลิลิตร เมื่อเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์จะได้ Dragon's blood เท่ากับ 64% สารละลาย 64% ของ PW : Dragon's blood ดังนั้นจึงมี P:W เท่ากับ 32% Dragon's blood ที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมี P:W เท่ากับ 32% , Dragon's blood ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี P:W เท่ากับ 0.32%, Dragon's blood ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี P:W เท่ากับ 0.0032%) เพื่อนำมาใช้ทดสอบกับการเจริญของเซลล์ควบคู่ไปกับการทดสอบฤทธิ์ของยางเลือดมังกร

ภาคผนวก ข

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการเจริญของเซลล์

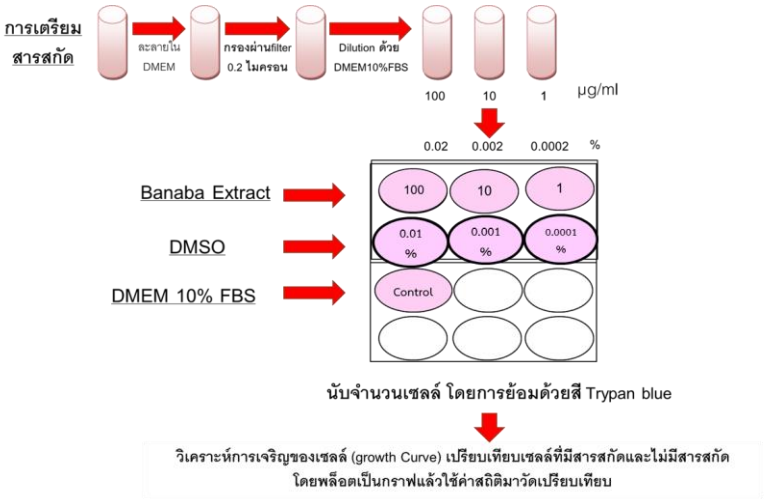
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการเจริญของเซลล์

1.การทดสอบฤทธิ์สารสกัดอินทนิลน้ำต่อการเจริญของเซลล์

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมา โดยจำนวนเซลล์ที่เลือกใช้ในการทดสอบครั้งนี้คือ $2x10^5$ เซลล์ต่อหลุม โดยเซลล์ถูกเลี้ยงใน Media (DMEM+10% FBS) 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด Media ออก แล้วเติม Media ที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำ และ DMSO ในความเข้มข้นของสารสกัดอินทนิลน้ำ 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในสัดส่วนของ DMSO คิดเป็น 0.0001, 0.001 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนับจำนวนเซลล์ในแต่ละวัน และนำจำนวนเซลล์มาวิเคราะห์โดยวาดกราฟการเจริญของเซลล์ (Growth Curve)

ทำการทดสอบเซลล์เมลาโนมากับสารสกัดอินทนิลน้ำ และ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายสารสกัดดังกล่าวที่มีการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นค่าต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ ข-1

1. DMEM 10% PBS (Control)
2. DMEM 10% PBS Queen's flower 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. DMEM 10% PBS Queen's flower 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
4. DMEM 10% PBS Queen's flower 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
5. DMEM 10% PBS DMSO 0.0001%
6. DMEM 10% PBS DMSO 0.001%
7. DMEM 10% PBS DMSO 0.01%



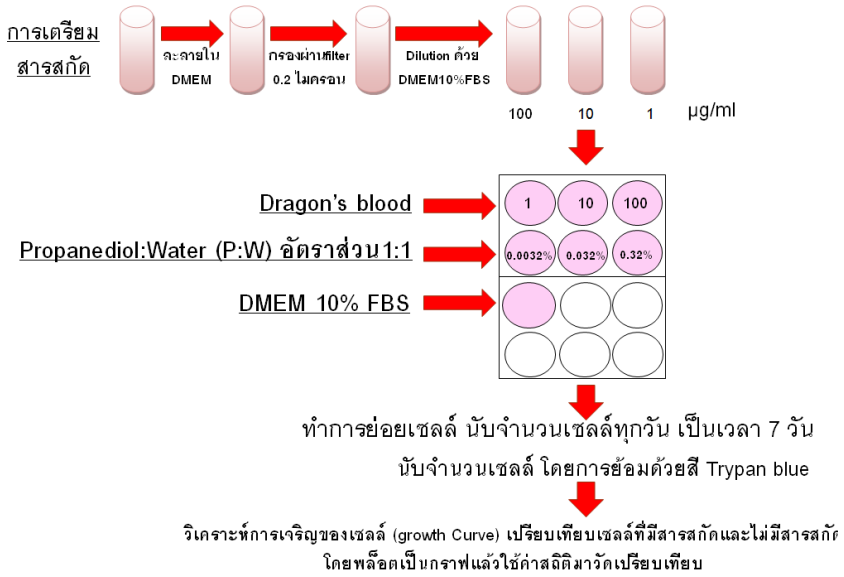
ภาพที่ ข-1 แสดงการออกแบบการทดลองในการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ของสารสกักอินทนิลน้ำ

1. การทดสอบฤทธิ์ยางเลือดมังกรต่อการเจริญของเซลล์

การทดสอบฤทธิ์ของยางเลือดมังกรต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมา โดยจำนวนเซลล์ที่เลือกใช้ในการทดสอบครั้งนี้คือ $2x10^5$ เซลล์ต่อหลุม โดยเซลล์ถูกเลี้ยงใน Media (DMEM+10% FBS) 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด Media ออก แล้วเติม Media ที่มียางเลือดมังกร และ P:W ในความเข้มข้นของยางเลือดมังกร 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในสัดส่วนของ P:W คิดเป็น 0.0032, 0.032 และ 0.32 % เลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนับจำนวนเซลล์ในแต่ละวัน และนำจำนวนเซลล์มาวิเคราะห์โดยวาดกราฟการเจริญของเซลล์ (Growth Curve)

ทำการทดสอบเซลล์เมลาโนมากับยางเลือดมังกร และ P:W ซึ่งเป็นตัวทำละลายสารสกัดดังกล่าวที่มีการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นค่าต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ ข-2

1. DMEM 10% PBS (Control)
2. DMEM 10% PBS Dragon's blood 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. DMEM 10% PBS Dragon's blood 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
4. DMEM 10% PBS Dragon's blood 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
5. DMEM 10% PBS P:W 0.0032%
6. DMEM 10% PBS P:W 0.032%
7. DMEM 10% PBS P:W 0.32%



ภาพที่ ข-2 แสดงการออกแบบการทดลองในการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ของยางเลือดมังกร