สารสกัดมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียระดับปานกลางโดยมีสารมาตรฐาน ciprofloxacin (Mishra และคณะ, 2009) ต้านเชื้อราอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน fluconazole

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก ใบ ราก และผลของมะม่วงหาวมะนาวโห่ พบว่าให้ผลดี ดังนั้นในการศึกษานี้ จะทำการทดสอบฤทธิ์ของน้ำจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ และสารสกัดจาก ใบ และผล ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทิลอะซิเทต และเฮกเซน การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชชนิดนี้จะนำไปสู่การผลิตในภาคอุตสาหกรรมและการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ จะทำให้ได้รับประโยชน์จากพืชสมุนไพรชนิดนี้อย่างคุ้มค่า ทั้งด้านการนำไปรับประทานเป็นอาหารประเภทผักผลไม้ และใช้เป็นพืชสมุนไพรในการป้องกันหรือรักษาโรคดังนั้น จึงควรมีการเผยแพร่สรรพคุณและส่งเสริมให้มีการปลูกและการนำไปใช้ประโยชน์ให้มากขึ้น โดยต้องอาศัยข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เป็นปัจจัยหลักที่ช่วยสนับสนุนและผลักดันให้บรรลุวัตถุประสงค์

2.5 การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) ในหลอดทดลอง (*In Vitro*) เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถให้ข้อมูลเบื้องต้นได้และเป็นวิธีที่สะดวกมากขึ้น ได้ผลรวดเร็วขึ้นและสามารถลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองลงได้การตรวจสอบมีหลายวิธีเช่น Lactate dehydrogenase (LDH), Neutral Red (NR), Trypan Blue (TB) และ Methyl tetrazolium 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างมะม่วงหาวมะนาวโห่

ตัวอย่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เก็บจากอำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม เดือน พฤษภาคม 2559

3.2 วัสดุอุปกรณ์สารเคมี

3.2.1 สารเคมี

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

Ethanol (absolute, 70% ethanol)

Ethyl acetate, Hexane, Methanol

3.2.2 วัสดุ เครื่องมือ และอุปกรณ์

หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
ตู้เลี้ยงเชื้อ (incubator)
เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง (2 and 4-decimal balance)
ตู้เย็น (refrigerator)

ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Freezer -20°C)
ตู้อบอุณหภูมิสูง (hot air oven)

ตู้ปลอดเชื้อ (biohazardlaminar air flow)

เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator)

เครื่องทำให้แห้งด้วยความเย็น (lyophilizer)

เครื่องเขย่า (shaker)

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

ไมโครเวฟ (microwave)
เครื่องผสมสาร (vortex mixer) เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)
แท่นให้ความร้อน (hot plate) เครื่องปั่นผลไม้ (blender)

กล้องถ่ายรูป (camera) Microcentrifuge tube (1.5 ml)
ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100, 1000 ไมโครลิตร

ปากคีบ (forcep) กระบอกฉีดพ่น (foggy sprayer) ตะเกียงแก๊ส

จานเพาะเชื้อ (petri dish) ขวดแก้ว (Duran) Round bottom flask
เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลม (needle) เข็มเขี่ยเชื้อปลายห่วง (loop)

3.2.3 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง (Bacterial Strains) จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มีดังนี้

Gram positive bacteria

Staphylococcus aureus ATCC 25923

*Listeria monocytogenes*DMST 17303

Gram negative bacteria

*Escherichia coli*ATCC 25922

Salmonella Typhimurium ATCC 13311

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิด ให้มีปริมาณเชื้อ ประมาณ 10^8-10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บในกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ (%) ที่อุณหภูมิ -80°C

3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Nutrient Broth (NB)

อาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA)

3.2.5 ยาปฏิชีวนะ

แอมพิซิลลิน (Ampicillin)

3.3 การสกัดสารสำคัญจากมะม่วงหาวมะนาวโห่

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างชิ้นส่วนจากมะม่วงหาวมะนาวโห่เตรียมตัวอย่างจากส่วนต่างๆ ดังนี้

3.3.1.1 ตัวอย่าง ใบ เก็บใบล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อน (oven) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด บันทึกน้ำหนักแห้งที่ได้ นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เมทานอล เฮกเซน และเอทิลอะซิเทต โดยใช้ปริมาณตัวอย่างต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1:10 โดยปริมาตร ระยะเวลาการสกัด 72 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำมากรองกากออกด้วยผ้าขาวบางแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 อีกครั้งหนึ่ง นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวอย่างไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ เก็บไว้ใช้ทำการทดลองต่อไป

3.3.1.2 การเตรียมตัวอย่างผลการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ในระยะผลกึ่งสุก (half-ripened) และ ผลสุก (fully-ripened)

1) การเตรียมตัวอย่างผลกึ่งสุก นำตัวอย่างผลกึ่งสุกที่มีสีชมพู มาล้างให้สะอาดวางให้สะเด็ดน้ำจากนั้นผ่าแยกส่วนเนื้อและเมล็ดออกจากกัน นำตัวอย่างไปชั่งน้ำหนักบันทึกผล แล้ว นำไปอบในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 45°C จนแห้งสนิทจะได้ตัวอย่างเนื้อของผลกึ่งสุกที่แห้งสนิทเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2) การเตรียมตัวอย่างผลสุก นำผลสุกมีสีดำของมะม่วงหาวมะนาวโห่ มาล้างทำความสะอาด จากนั้นผ่าแยกส่วนเนื้อและเมล็ดออกจากกัน นำแต่ละส่วนไปชั่งน้ำหนักบันทึกผล แล้ว นำไปอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 45 °C จนแห้งสนิท เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปในตัวอย่างส่วนนี้จะได้น้ำจากผล นำน้ำจากผลไปทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง (freeze dehydration หรือ Lyophilization)เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.1.3การเตรียมตัวอย่างเมล็ด นำเมล็ดมาอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 45°C จนแห้งสนิท เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.2 การสกัดสารสำคัญจากส่วนต่างๆ ของมะม่วงหาวมะนาวโห่ ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ขั้นตอนการสกัด มีดังนี้

ในการทดลองนี้จะสกัดสารด้วยวิธี Maceration โดยการนำตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาบดให้ละเอียดนำมาใส่ในถุงผ้าขาวบาง แล้วนำไปแช่ในตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตท และ เฮกเซน ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลาการสกัดใช้เวลานาน 1 สัปดาห์ ขณะแช่ปิดฝาภาชนะบรรจุให้สนิทห่อหุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟรอยด์ให้มิดชิด และเก็บไว้ในที่ทึบแสง หลังจากนั้นนำมากรองกากออกนำสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวอย่างไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง Rotary evaporator ชั่งน้ำหนักสารสกัดแต่ละชนิด และเก็บตัวอย่างแต่ละชนิดในภาชนะสะอาดที่ปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

การหา % yield (w/w) คำนวณ ดังนี้

$$\% \text{ yield (w/w)} = \frac{\text{weight of extract (g)} \times 100}{\text{weight of raw materials (g)}}$$

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิคทั้งหมด (Total Phenolic Content)

วิธีทำการทดลอง มีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1) สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid โดยละลาย gallic acid ในเมทานอล เจือจางให้มีความเข้มข้น 0.015625,0.3125, 0.06125 ,0.125 ,0.25 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml)

2) ทำการทดสอบโดยปิเปตต์น้ำกลั่น 0.5 mlผสมกับสารละลายมาตรฐานGallic acid หรือส่วนของสารสกัดที่อยู่ในเมทานอลปริมาตร 125 ไมโครลิตร (µl) แล้วเติมสารละลาย Folin Cioculteu's reagent 125 µl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติม 7% Sodium carbonate 1.25 ml และน้ำกลั่น 1 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง 30 นาทีนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เมทานอลเป็น Blank ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ

3) นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณฟีโนลิคทั้งหมดจากสมการ

C = cV/Mเมื่อ

C = ปริมาณสารประกอบฟีโนลิคที่เทียบจากกราฟ gallic acid (mg/g)

c = ความเข้มข้นของ gallic acid (mg/ml) V = ปริมาณของสารสกัด (ml)

M = น้ำหนักของสารสกัด (g)

แสดงค่าปริมาณฟีนอลรวมเฉลี่ยเป็นกรดแกลิค (GAE)/สารสกัด 1mg

3.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ในการทดสอบครั้งนี้ ใช้วิธีการต่าง ๆ 3 วิธี ดังนี้

3.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เทคนิค DPPHมีวิธีการ ดังนี้

1) เตรียม 0.3 mM DPPH (1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl) ละลายใน absolute ethanol เตรียมทันทีก่อนใช้ เก็บได้นาน ประมาณ3 วัน

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐานButylated hydroxytoluene(BHT) ละลายใน absolute ethanol

3) การเตรียมสารตัวอย่าง ใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลายให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ 5 ระดับ

4) ปิเป็ตสารตัวอย่าง แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 500µl ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด สำหรับชุดควบคุม ให้ใช้น้ำกลั่น 500µl และ blank น้ำกลั่น 500µl เอทานอล ปริมาตร 500µl แทนสารสกัดตัวอย่าง แล้วเติม 0.3 mM DPPH หลอดละ 500µl ยกเว้น blank ให้เติม เมทานอลปริมาตร 500 µl แทน

5) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ความยาวคลื่น 51 7nm ในทุกสารตัวอย่างทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้น นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้ ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH (DPPHfree radical scavenging activity: %) และความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50 % (SC_{50})

DPPHfree radical scavenging activity (%) = [(A0-A1/A0] X 100

A0 = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม A1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.5.2 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing power) มีวิธีการ ดังนี้

1) สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน gallic acid โดยเตรียม gallic acid ละลายในเมทานอลนำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1.0 mg /ml

2) ทำการทดสอบโดยเริ่มจากนำสารละลายมาตรฐาน gallic acid หรือสารสกัดที่ละลายใน เมทานอลปริมาตร 200 µlผสมกับ phosphate buffer (0.2 M, pH = 6.6) ปริมาตร 0.5 ml และ 1% $K_3Fe(CN)_6$ ปริมาตร 0.5 mlเขย่าผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 20 นาที

3) เติม 10% trichloroacetic acid ปริมาตร 0.5 mlเขย่าผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 90 g (3000 rpm) นาน 10 นาที

4) ปิเป็ตสารละลายส่วนบนปริมาตร 0.5 ml ผสมกับน้ำกลั่น 0.5 mlและสารละลาย 0.1% $FeCl_3$ ปริมาตร 0.1 ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์แบบ UV-visible โดยใช้เมทานอลเป็น blank ทำ 3 ซ้ำหาค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ได้ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

5) แสดงค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฉลี่ยในรูป mg ของกรดแกลลิค (GAE) ต่อสารสกัด 1 g

3.5.3 การหาค่า Total antioxidant capacity โดยวิธี Phosphomolybdenum method (Ammonium molybdate reduction)มีวิธีการ ดังนี้

การทดสอบโดยวิธีนี้อาศัยหลักการเกิด reduction ของ Mo (VI) ไปเป็น Mo (V) โดยสารสกัด เกิดเป็น green phosphate/Mo (V) complex ที่สภาวะกรดมีวิธีการ ดังนี้

1) สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid (วิตามิน C) เตรียมโดยละลาย ascorbic acid ในเมทานอลให้มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้31.25, 62.5,125, 250, 500 และ 1000 mg/ml ใน methanol

2) ทำการทดสอบโดยเริ่มจากนำสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid หรือสารสกัดที่ละลายในเมทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ปริมาตร 300 µlผสมกับ0.6 M sulphuric acid, 28 mM sodium phosphate และ 4 mM ammonium molybdate ปริมาตร 3 ml บ่มที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 90 นาทีนำออกมาตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 695 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์แบบ UV-visibleโดยblankเติม methanol แทนสารสกัด (ทำ 3 ครั้ง) หาค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ได้และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

3) แสดงค่า **Total antioxidant capacity**เฉลี่ย ในรูป mg ของกรดแอสคอบิค (ascorbic acid equivalent) ต่อสารสกัด 1 g (mg ascorbic acid/g of dry sample)

3.6 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Antibacterial activity) ของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่

3.6.1 การเตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

นำสารสกัดชนิดต่าง ๆ ที่ได้ มาเจือจางด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้น 200 mg/ml

3.6.2 การหา Inhibition zone โดยวิธี Agar well diffusion

3.6.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อตามน้ำหนักที่กำหนดโดยชั่ง Mueller Hinton Agar (MHA) 34 g เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ให้ความร้อนพร้อมกับคนไปด้วยจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมดแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส่หลอดเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 20 ml ปิดฝาหลวมๆ นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลง ใกล้ 60°C จึงนำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 50°C

3.6. 2.2การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบนำเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* และ*Salmonella typhimrium* ที่เลี้ยงบนอาหาร Mueller Hinton Agar มาเขี่ย colony เดี่ยวของแต่ละเชื้อเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °Cเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 เพื่อให้ได้เชื้อประมาณ 10^8 เซลล์/ ml

3.6.2.3 การหา Inhibition zone โดยวิธี Agar well diffusion มีวิธีการ ดังนี้

1) เตรียมอาหาร Tryptone Soy Bean (TSB) ที่มี 0.6% yeast extract และ 1.5% Agar powder ให้ความร้อนโดยวางบนแท่นให้ความร้อน พร้อมกับคนไปด้วย จนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมดดูดแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส่หลอดเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 20 ml ปิดฝาหลอดหลวมๆนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°Cเป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นนำมาวางในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 50°C

2) ดูดเชื้อจากข้อ 3.6. 2.2ปริมาตร 500 µ l ลงในอาหาร TSB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ข้อ 1) ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบา ๆ เพื่อป้องกันการเกิดฟอง เทใส่จานเพาะเชื้อ (Petri disc) ที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วรอให้วุ้นแข็งโดยเปิดฝาจานเพาะเชื้อไว้เล็กน้อยผึ่งในตู้ปลอดเชื้อ (Biohazardlaminar air flow) เพื่อให้ผิวหน้าแห้ง

3) นำปลายพาสเจอร์ปิเป็ต (Pasteur pipette) หรือ cork borer No. 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว มาเจาะลงบนอาหารแข็ง (จากข้อ 2) จานละ 6 หลุมหลังจากนั้นหยอดสารสกัดที่ต้องการทดสอบลงในหลุมๆละ 50 ไมโครลิตรโดยใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 1 mg/ml เป็น positive control และ 1% DMSO เป็น negative control จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°Cนาน 16 ชั่วโมงอ่านผลโดยวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบหลุมอาหารเลี้ยงเชือ (inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียร์หรือไม้บรรทัด หน่วยเป็นมิลลิเมตรทำการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำและรายงานเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน($\bar{x}$±SD)

3.6.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัด

3.6.3.1การเตรียมสารสกัด นำสารสกัดที่ได้แต่ละชนิดมาเจือจาง ตั้งแต่ความเข้มข้น ต่าง ๆ กัน โดยการทำserial two-fold dilution

3.6.3.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดเช่นเดียวกับข้อ3.6.2.3

3.6.3.3 เติมสารสกัดที่เตรียมจากข้อ 3.6.3.1 จำนวน 50 µl ลงในหลุมๆละ 50 µl โดยใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 1 mg/ml เป็น positive control และ 1 % DMSO เป็น negative control จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC 16 ชั่วโมงอ่านผลโดยวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเวอร์เนียร์หน่วยเป็นมิลลิเมตรทำการทดลองซ้ำสามซ้ำและรายงานเป็น $\bar{x}$ ±SD การวัด ขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้นให้วัดโดยวัดจากขอบด้านข้างหนึ่งไปยังขอบอีกข้างหนึ่งโดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของหลุมบันทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร

3.6.3.4 การอ่านผล ดูความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ

เชื้อแบคทีเรียซึ่งถือเป็น MIC

3.7 การหาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity against Vero cells)(African green monkey kidney)

การหาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity Screening) ในหลอดทดลอง (*In Vitro*) เป็นวิธีการอย่างหนึ่งที่สามารถให้ข้อมูลเบื้องต้นในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดต่าง ๆ ได้ซึ่งการทดสอบมีหลายวิธีได้แก่ Neutral Red (NR), Trypan Blue (TB) และ Methyl tetrazolium 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay เป็นต้นโดยในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากผลและเมล็ดที่สกัดด้วยเมทานอลของมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเซลล์ปกติคือ เซลล์ไตของลิง (African Green Monkey Kidney Cell: Verocells (African green monkey kidney fibroblast)

การทดสอบนี้ ทำโดยการส่งตัวอย่างสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดและผลสุก ไปทดสอบ Cytotoxicity against Vero) test ที่ Bioassay laboratory (สวทช) วิเคราะห์ด้วยวิธี Green Fluorescent Protein (GFP)-based assay มี Negative control เป็น 0.5% DMSO ค่า IC50 ของ positive control : Ellipticine = 1.31 μg/ml ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ใช้ เท่ากับ 50 μg/ml

% Cytotoxicity Activity; < 50% Non-cytotoxic, ≥ 50% Cytotoxic (IC50 included)

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติ

3.8.1 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการหาค่าเฉลี่ยเลขคณิต ($\bar{x}$) และการหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซ้ำ ด้วยโปรแกรม Standard Deviation Calculator (www.easycalculation.com/ statistics /standard-deviation.php)

3.8.2 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' Multiple Range test ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS

บทที่ 4

ผลการวิจัย