บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารก่อกลายพันธุ์จากตัวอย่างอาหาร

Chloroform A.R. (Lab-scan Asia Co., Ltd, Bangkok) Dichloromethane A.R. (Lab-scan Asia Co., Ltd, Bangkok) Dimethyl sulfoxide A.R. (Lab-scan Asia Co., Ltd, Bangkok) EthanolA.R. (Lab-scan Asia Co., Ltd, Bangkok) Methanol A.R. (Lab-scan Asia Co., Ltd, Bangkok) Petroleum ether A.R. (Lab-scan Asia Co., Ltd, Bangkok) Sodium hydroxide A.R. (Lab-scan Asia Co., Ltd, Bangkok)

2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

Acetonitrile (J.T. Baker Inc., Phillipsburg, USA) 1-Aminopyrene (Sigma-Aldrich, St Louise, USA) Ammonium sulfamate ($NH_2SO_3NH_4$) (Sigma Chemical, Co. St Louise, USA) Ampicillin sodium (General drugs house, Bangkok, Thailand) Bacto agar (Merck, Darmstadt, Germany) Citric acid (Merck, Darmstadt, Germany) Crystal violet indicator (E. Merck, Darmstadt, Germany) D-biotin (Sigma Chemical, Co. St Louise, USA) D(+)-Glucose anhydrous (Fluka, Biochemika, Switzerland) Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St Louise, USA) Dipotassium hydrogen phosphate anhydrous (K_2HPO_4) (Fluka, Biochemika, Switzerland) Disodium hydrogen phosphate dihydrate ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (Fluka, Biochemika, Switzerland) Histidine monohydrochloride (Merck, Darmstadt, Germany) Hydrochloric acid (Merck, Darmstadt, Germany) Magnesiumsulphate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$) (Merck, Darmstadt, Germany) Oxoid nutrient broth No.2 (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) Potassium chloride (KCl) (Merck, Darmstadt, Germany) Sodium ammonium hydrogen phosphate tetrahydrate GR ($NaNH_4HPO_4.4H_2O$) (Fluka, Biochemika, Switzerland) Sodium chloride (NaCl) (Merck, Darmstadt, Germany) Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) (Sigma Chemical, Co. St Louise, USA) Sodium nitrite (Sigma Chemical, Co. St Louise, USA)

วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้

Filters paper Whatman No. 1 2 และ 41 Laboratory sealing film Whatman pH paper 1-4 และ 1-14 Culture tube with screw cap Darkfield colony counter (Quebec AO spencer) Hot Air Oven Incubator Micropipet pH meter Pressure sterilizer (All American, model 1941X) Separatory funnel Shaker bath (Hotech, model 905) Suction flask Test tube Transferpipette Transfersyringe (Nichiryo, model 8100) Ultraviolet Spectrophotometer (Unicam SP1800) Vortex-2

แผนการศึกษา (รูปที่ 1)

การศึกษาวิจัยนี้ประกอบด้วยการสกัดแมลงทอด 10 ชนิด นำสารสกัดที่ได้มาศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์เมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรท จากนั้นเลือกสารสกัดแมลงทอดบางชนิดที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์สูงสุดต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 หรือ/และ TA100 มาทำการศึกษาศักยภาพของเส้นใยอาหารที่สกัดจากใบตำลึงต่อฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และการเกิดสารก่อกลายพันธุ์ แสดงดังรูปที่ 1

ตัวอย่างอาหาร

1. ตัวอย่างแมลงทอด 10 ชนิด ชนิดละ 50 กรัม ซื้อจากตลาดคลองเตย ได้แก่ แมลงดานา (Giant water bug ; *Lethocerus indicus* Lep.-Serv.) แมลงตับเต่า (True water beetle ; *Cybister limbatus* Fabricius) แมลงกระชอน (Mole cricket ; *Gryllotalpa africana* Beauvois) จิโปม (Short tailed cricket ; *Brachytrupes portentosus* Licht) จิ้งหรีด (House cricket ; *Acheta testacea* Walker) แมลงกินูน (Scarab beetle ; *Holotrichia* sp.) ตั๊กแตนปาทังก้า (Bombay locust ; *Patanga succincta* Linnaeus) ตั๊กแตนหนวดยาว (Long-horned grasshopper ; *Euconocephalus* sp.) มดเป้ง (Red Ant, young female ; *Oecophylla smaragdina* Fabricius) ดักแด้ไหม (Silk worm pupae ; *Bombyx mori* Linnaeus) (ดูภาคผนวก ก) และเนื่องจากผลการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ปฐมภูมิเปรียบเทียบระหว่างตั๊กแตนปาทังก้าที่ซื้อจากสะพานพระพุทธยอดฟ้าจุฬาโลกมหาราช และตลาดคลองเตยมีค่าใกล้เคียงกัน (ภาคผนวก ข.) และที่ตลาดคลองเตยมีชนิดของแมลงทอดมากกว่า ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกแมลงจากแหล่งเดียวมาทำการศึกษา

2. เส้นใยที่สกัดได้จากใบตำลึง ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.แก้ว กังสดาลอำไพ สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเส้นใยที่นำมาศึกษาได้จากส่วนใบและก้านของใบตำลึง (*Coccinia indica*) นำมาปั่นบดกับน้ำ แช่แข็งไว้ 1 คืน นำมาล้างน้ำหลายๆ ครั้ง เพื่อกำจัด

โปรตีน วิตามิน และสารที่ละลายน้ำได้ จากนั้นกำจัดสารที่ละลายได้ในไขมันด้วยเฮ็กเซน (hexane) และอะซิโตน (acetone) อัตราส่วน 3:2 ซึ่งกากใยที่เหลือนำมาบดละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 20 mesh (ประภาศรี เลาหเวชวานิช, 2537)

การสกัดสารก่อกลายพันธุ์จากแมลงทอด ดัดแปลงจาก Overvik และคณะ (1987) (รูปที่ 2)

นำแมลงทอดมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อให้ได้สารก่อกลายพันธุ์มาทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ดังนี้

1. นำแมลงทอดส่วนที่รับประทานได้ 50 กรัมมาปั่นละเอียด

2. เติมตัวทำละลาย 250 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม (chloroform) 125 มิลลิลิตร และเมทานอล (methanol) 125 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายนี้ 2 ครั้ง โดยใช้เวลาสกัดครั้งละ 5 ชั่วโมง รวบรวมสารสกัดที่ได้ใส่ขวดแก้วมีฝาปิด

3. เติมเมทานอล 250 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายนี้ 2 ครั้ง โดยใช้เวลาสกัดครั้งละ 5 ชั่วโมง รวบรวมสารสกัดที่ได้

4. รวม (2) และ (3) นำมาแช่ในช่องแช่แข็งของตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ –4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน แล้วกรอง เพื่อแยกเอาโปรตีน และไขมันออก

5.นำมาทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator อุณหภูมิของเครื่องตั้งไว้ที่ 70 องศาเซลเซียส

6. สารสกัดเข้มข้นที่ได้นำมาเติมเอทานอล (ethanol) ร้อยละ 70 ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) 1 นอร์มอล โดยใช้แอลกอฮอล์ 5 มิลลิลิตร ต่อ 1 กรัมสารสกัดแห้ง

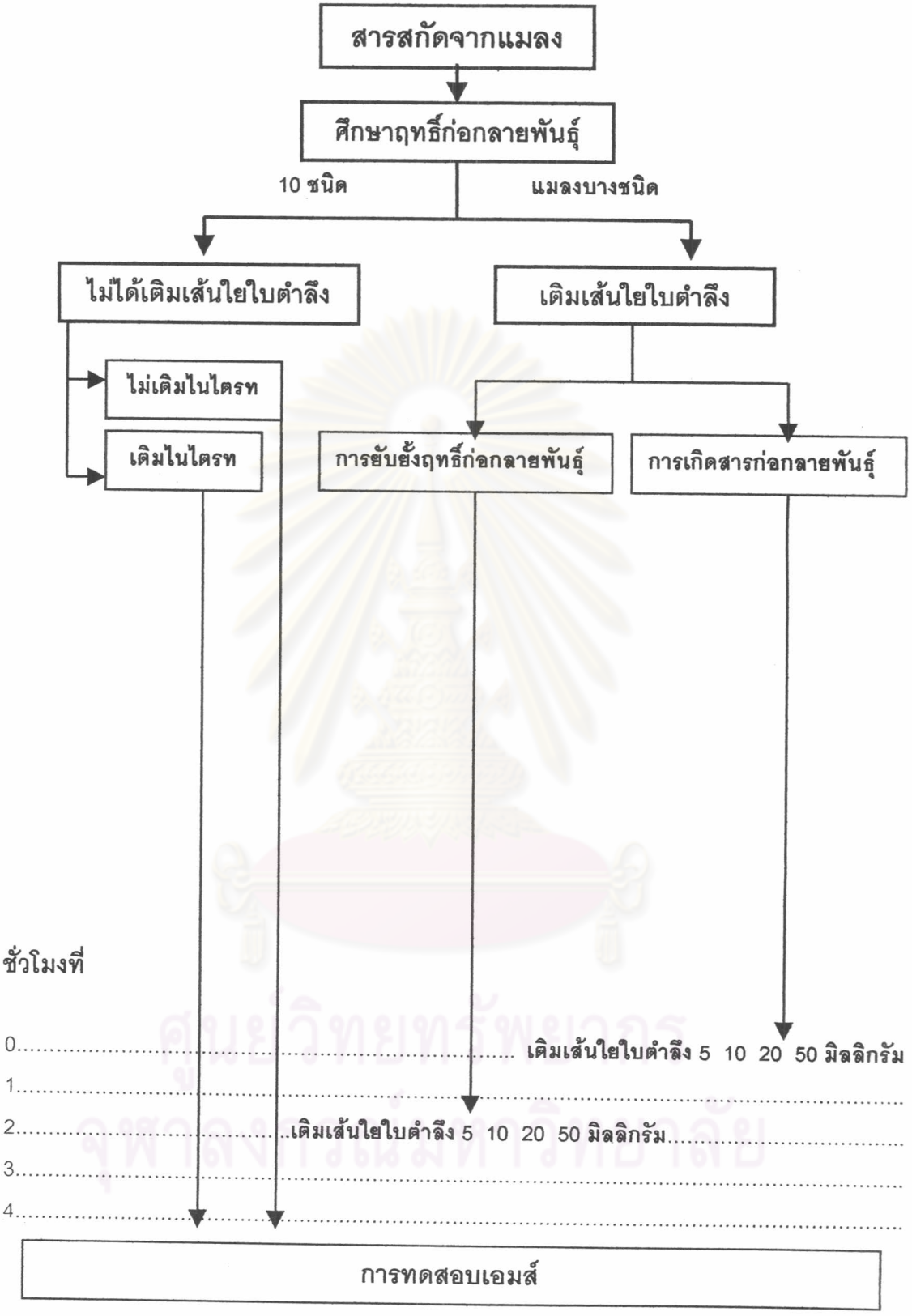
7. กำจัดไขมันที่ปนเปื้อนมากับสารสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether)โดยปริมาตรที่ใช้เท่ากับปริมาตรของเอทานอลที่ใช้ใน (6) เขย่า และตั้งทิ้งไว้ 5 ชั่วโมง ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง

8. นำส่วนของเอทานอลมาปรับค่าความเป็นกรดด่าง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 0.1 นอร์มอล ให้มีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 10 ถึง 12

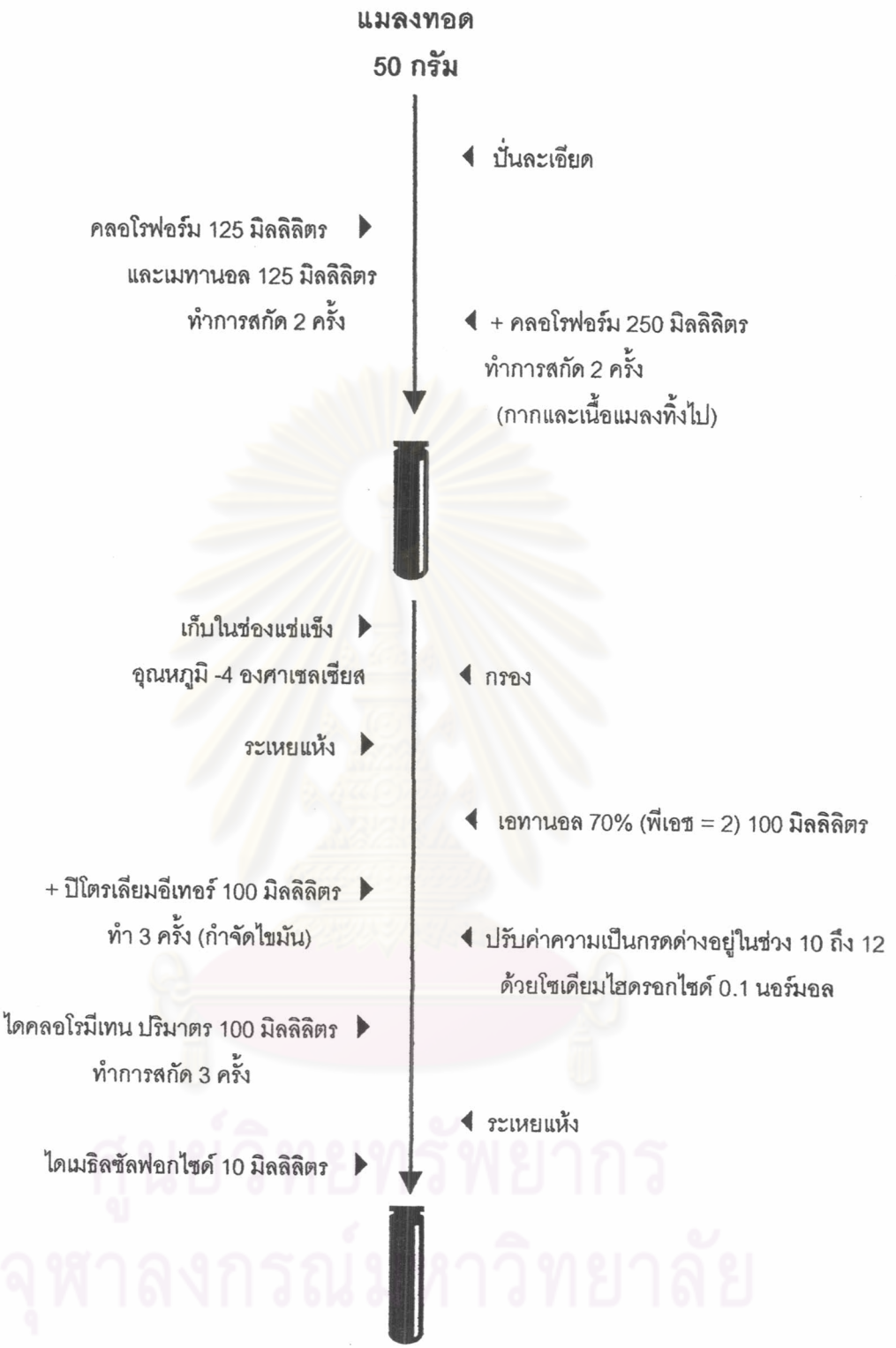
9. เติมไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) ปริมาตรที่ใช้พอๆ กับปริมาตรของสารละลายที่ได้ เขย่า และตั้งทิ้งไว้ 5 ชั่วโมง ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง รวบรวมส่วนของไดคลอโรมีเทน

10. นำส่วนของไดคลอโรมีเทน มาทำการระเหยแห้ง

11. ละลายด้วยไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (dimetyl sulfoxide) เก็บในช่องแช่แข็ง เพื่อรอทำการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อไป



รูปที่ 1 แผนการศึกษา



รูปที่ 2 ขั้นตอนและวิธีการสกัดสารก่อกลายพันธุ์จากแมลงทอดโดยสรุป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20973421

การทดสอบการกลายพันธุ์ของสารสกัดจากแมลงทอด

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ใช้วิธีเอมส์ (Ames Salmonella assay) ในสภาวะกรด (ค่าพีเอช 3-3.5) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เป็นการศึกษาสารก่อกลายพันธุ์ที่อาจมีผลต่อกระเพาะอาหาร ซึ่งทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากแมลงทอดที่สกัดได้กับแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะนี้ต้องการกรดอะมิโนฮิสทีดีนในการเจริญเติบโต (His^-) เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในสารที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ สารดังกล่าวสามารถเปลี่ยนแปลงเบสในสายดีเอ็นเอทำให้เกิดความผิดปกติขึ้น คือแบคทีเรียสามารถสร้างกรดอะมิโนฮิสทีดีนขึ้นมาใช้เองได้ (His^+) ไม่ต้องพึ่งจากอาหารอีกต่อไป ทำให้แบคทีเรียเจริญจนกระทั่งเห็นเป็นโคโลนี เรียกว่า โคโลนีกลายพันธุ์ (revertant colony) และใช้เทคนิค preincubation (ภาคผนวก ค.) โดยสารเคมีที่ทดสอบ บัฟเฟอร์ และแบคทีเรียถูกปล่อยให้อยู่ด้วยกันเป็นเวลา 20 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส (Yahagi และคณะ, 1975) แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงไป เมื่อเลี้ยงเชื้อในตู้อบครบ 48 ชั่วโมงแล้ว จึงนับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (His^+ revertants) ต่อจานเลี้ยงเชื้อที่ปรากฏให้เห็นด้วยตาเปล่า

ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากแมลงทอด (รูปที่ 3)

<u>วิธีการศึกษา</u>

1. เติมสารละลายสารสกัดจากแมลงทอดปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง
2. เติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล เพื่อทำให้ระบบมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 3.0 ถึง 3.5
3. เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1000 ไมโครลิตร
4. เขย่าในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลา นำหลอดทดลองใส่ลงในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา
6. เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ปริมาตร 1250 ไมโครลิตร
7. แช่ลงในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปทำการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อไป
8. นำ (7) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ (Na_3PO_4-KCl buffer) ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.4 และเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ที่เพาะเชื้อไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ($1\text{-}2 \times 10^8$ เซลล์)
9. เขย่าในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
10. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (top agar) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่เติมบัฟเฟอร์และเชื้อแบคทีเรียไว้แล้ว เขย่าให้เข้ากัน

11. เทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อ โดยเอียงจานไปมาเล็กน้อยเพื่อให้ส่วนผสม (10) กระจายสม่ำเสมอทั่วจานเพาะเชื้อ

12. นำเข้าตู้อบ (incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

13. นับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่ได้

ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสารสกัดจากแมลงทอดทำปฏิกิริยากับไนไตรท (รูปที่ 4)

วิธีการศึกษา

1. เติมสารละลายสารสกัดจากแมลงทอดปริมาตร 50 100 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง

2. เติมไดเมธิลซัลฟอกไซด์ ให้ทุกหลอดทดลองมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ไมโครลิตร

3. เติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล เพื่อทำให้ระบบมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 3.0 ถึง 3.5

4. เติมโซเดียมไนไตรท 2 โมล่าร์ หลอดละ 250 ไมโครลิตร

5. เขย่าในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

6. เมื่อครบเวลา นำหลอดทดลองใส่ลงในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา

7. เติมแอมโมเนียมซัลฟาเมต (ammonium sulphamate) 2 โมล่าร์ หลอดละ 250 ไมโครลิตร

8. แช่ลงในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปทำการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อไป

9. นำ (7) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ (Na_3PO_4-KCl buffer) ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.4 และเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ที่เพาะเชื้อไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ($1\text{-}2 \times 10^8$ เซลล์)

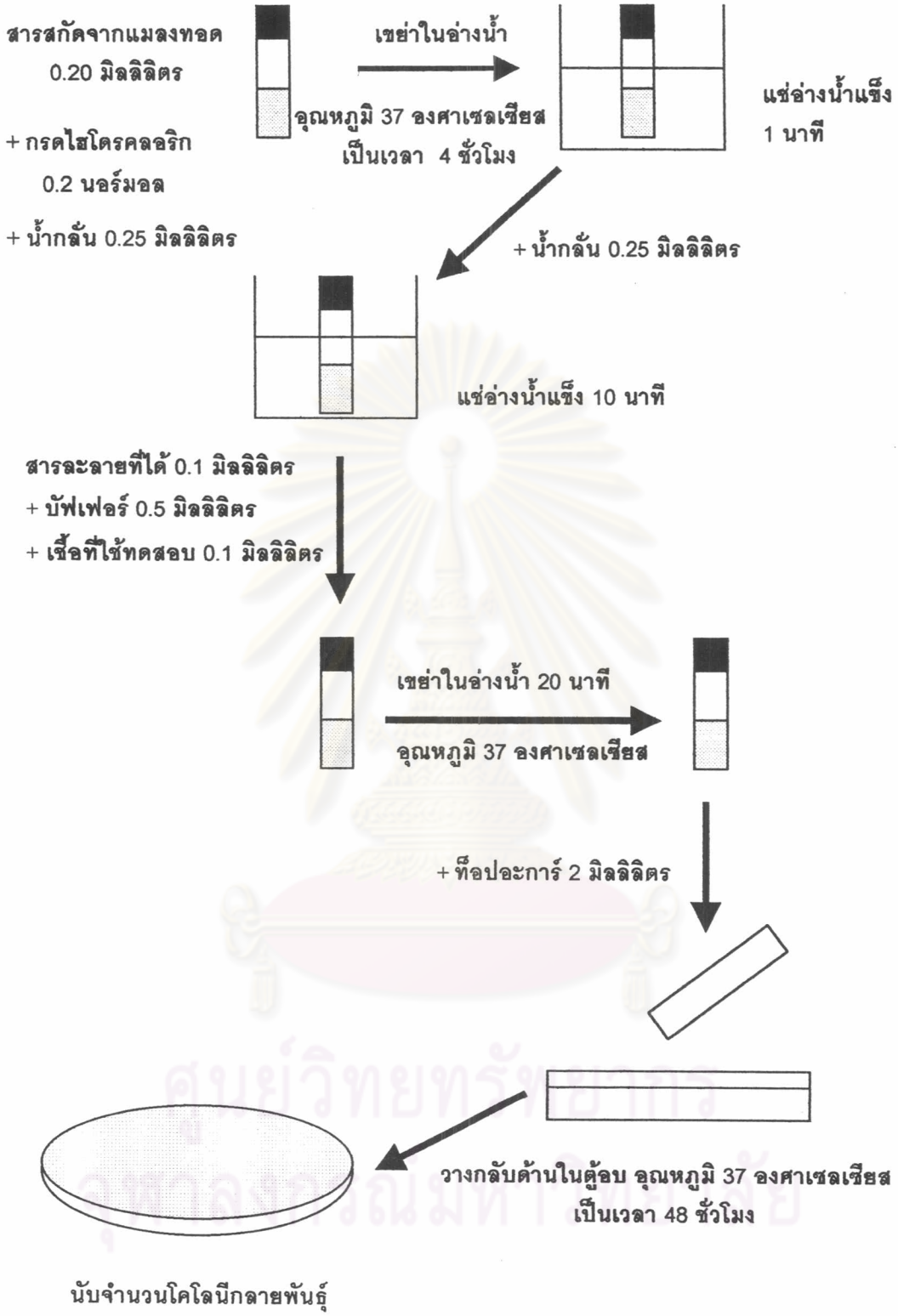
10. เขย่าในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

11. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (top agar) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่เติมบัฟเฟอร์และเชื้อแบคทีเรียไว้แล้ว เขย่าให้เข้ากัน

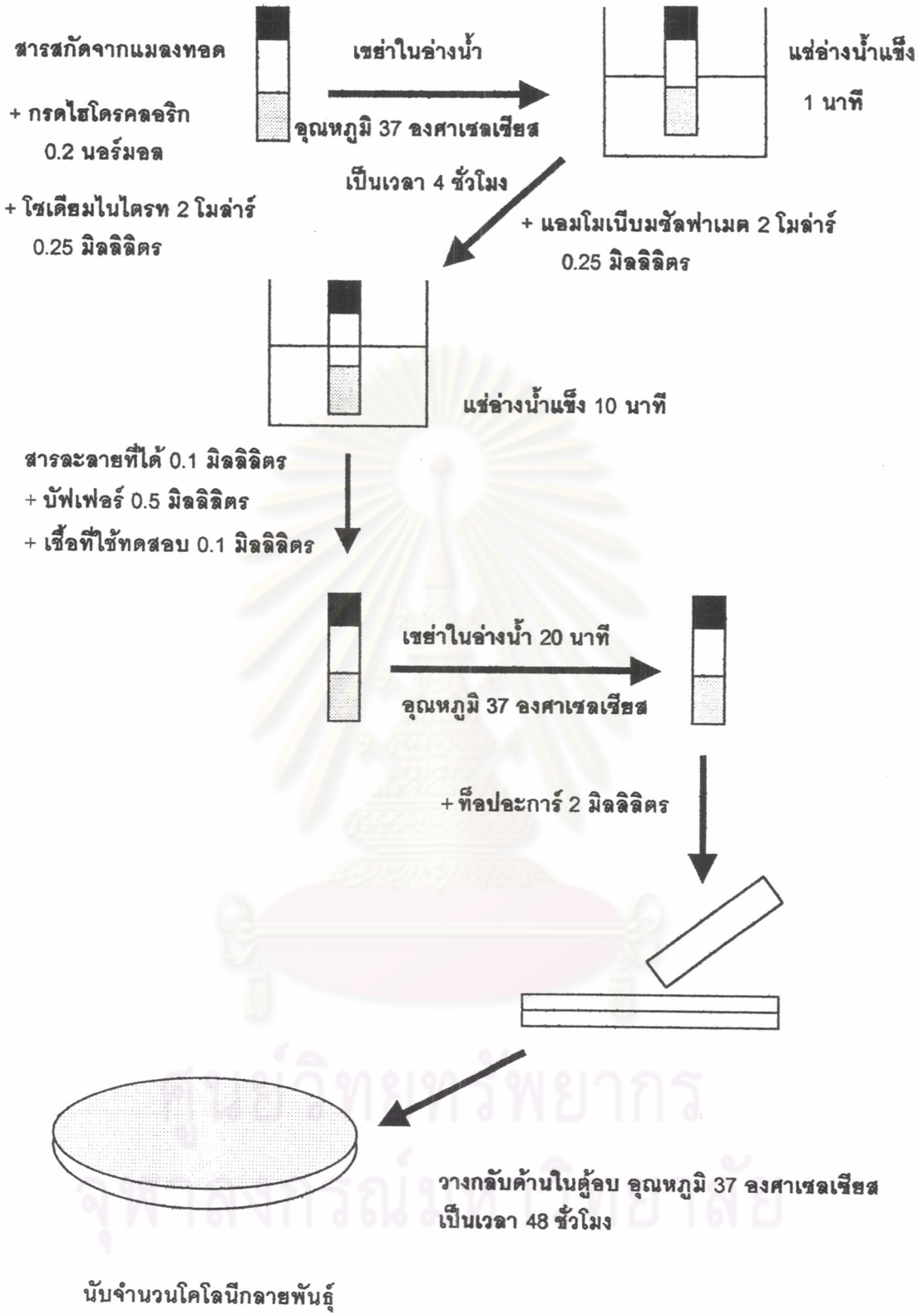
12. เทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อ โดยเอียงจานไปมาเล็กน้อยเพื่อให้ส่วนผสม (10) กระจายสม่ำเสมอทั่วจานเพาะเชื้อ

13. นำเข้าตู้อบ (incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

14. นับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่ได้



รูปที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธ์ของสารสกัดจากแมลงทอด โดยการทดสอบเอมส์ (pre-incubation modification)



รูปที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธ์ของสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดจากสารสกัดจากแมลงทอดทำปฏิกิริยากับไนไตรท โดยการทดสอบเอมส์ (pre-incubation modification)

การควบคุมบวก

วิธีการเช่นเดียวกับการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสารสกัดจากแมลงทอดทำปฏิกิริยากับไนไตรทแต่จะใช้อะมิโนพัยรีน (aminopyrene) ในอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) 0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 และ 50 ไมโครลิตร สำหรับ TA98 และ 50 และ 100 ไมโครลิตร สำหรับ TA100 แทนสารสกัดจากแมลงทอด

การควบคุมลบ หรือการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียตามธรรมชาติ

วิธีการเช่นเดียวกับการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากแมลงทอด แต่ใช้ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 200 ไมโครลิตร แทนสารสกัดจากแมลงทอด

ผลของเส้นใยอาหารที่สกัดจากใบตำลึงที่มีต่อฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากแมลงทอดทำปฏิกิริยากับไนไตรท

การศึกษาผลของเส้นใยอาหารที่เตรียมจากผัก และผลไม้ 6 กลุ่ม ได้แก่ พืชตระกูลกะหล่ำปลี (cruciferous vegetables) พืชตระกูลส้ม (citrous fruits) พืชที่มีเพคตินเป็นองค์ประกอบ พืชที่มีเบต้าแคโรทีน ธัญพืช และกลุ่มอื่นๆ ในสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหาร พบว่า เส้นใยอาหารที่เตรียมจากใบตำลึงมีความสามารถในการจับไนไตรทสูงสุด (ประภาศรี เลาหเวชวานิช, 2537) จึงนำเส้นใยอาหารที่สกัดจากใบตำลึงมาศึกษาการยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ใน 2 ลักษณะ คือ ในแง่ยับยั้งฤทธิ์ของสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น จากปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดจากแมลงทอดกับไนไตรทที่ให้ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์สูงสุดต่อเชื้อ *S. Typhimurium* สายพันธุ์ TA98 หรือ/และ TA100 ซึ่งจะเติมเส้นใยใบตำลึงหลังจากปฏิกิริยาดำเนินไปแล้ว 2 ชั่วโมง และในแง่การป้องกันการก่อตัวของสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยาไนโตรเซชัน (nitrosation) โดยเติมเส้นใยจากใบตำลึงตั้งแต่เริ่มต้นปฏิกิริยาไนโตรเซชัน

การยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (antimutagenic effect) (รูปที่ 5)

<u>วิธีการศึกษา</u>

1. นำเส้นใยอาหาร 0 5 10 25 และ 50 มิลลิกรัมใส่หลอดทดลองแล้วนำไปฆ่าเชื้อ
2. นำสารละลายสารสกัดจากแมลงทอดปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาใส่ลงในหลอดทดลอง 5 หลอด
3. เติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล เพื่อทำให้ระบบมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 3.0 ถึง 3.5
4. เติมโซเดียมไนไตรท 2 โมล่าร์ หลอดละ 250 ไมโครลิตร
5. เขย่าในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6. ถ่ายสารผสม (5) ลงหลอดทดลองที่มีเส้นใยอาหาร

7. เขย่าในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

8. เมื่อครบเวลา นำหลอดทดลองใส่ลงในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา

9. เติมแอมโมเนียมซัลฟาเมต 2 โมล่าร์ หลอดละ 250 ไมโครลิตร

10. แช่ลงในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที

11. นำไปปั่นเพื่อแยกเส้นใยออกจากสารผสมด้วยเครื่องปั่นแยกความเร็วสูงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

12. นำส่วนใส (11) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ (Na_3PO_4-KCl buffer) ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.4 และเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ที่เพาะเชื้อไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

13. เขย่าในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

14. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (top agar) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

15. เทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อ โดยเอียงจานไปมาเล็กน้อยเพื่อให้ส่วนผสมกระจายสม่ำเสมอทั่วจานเพาะเชื้อ

16. นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

17. นับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่ได้

การยับยั้งการเกิดสารก่อกลายพันธุ์ (antiformation) (รูปที่ 6)

<u>วิธีการศึกษา</u>

1. นำเส้นใยอาหาร 0 5 10 25 และ 50 มิลลิกรัมใส่หลอดทดลองแล้วนำไปฆ่าเชื้อ

2. เติมสารละลายสารสกัดจากแมลงทอดหลอดละ 200 ไมโครลิตร

3. เติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล เพื่อทำให้ระบบมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 3.0 ถึง 3.5

4. เติมโซเดียมไนไตรท 2 โมล่าร์ หลอดละ 250 ไมโครลิตร

5. เขย่าในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

6. เมื่อครบเวลา นำหลอดทดลองใส่ลงในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา

7. เติมแอมโมเนียมซัลฟาเมต 2 โมล่าร์ หลอดละ 250 ไมโครลิตร

8. แช่ลงในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปทำการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อไป

9. นำไปปั่นเพื่อแยกเส้นใยออกจากสารผสมด้วยเครื่องปั่นแยกความเร็วสูง ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

10. นำ (9) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ (Na_3PO_4-KCl buffer) ที่มีค่า

ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.4 และเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ที่เพาะเชื้อไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (1-2 x 10^8 เซลล์)

11. เขย่าในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

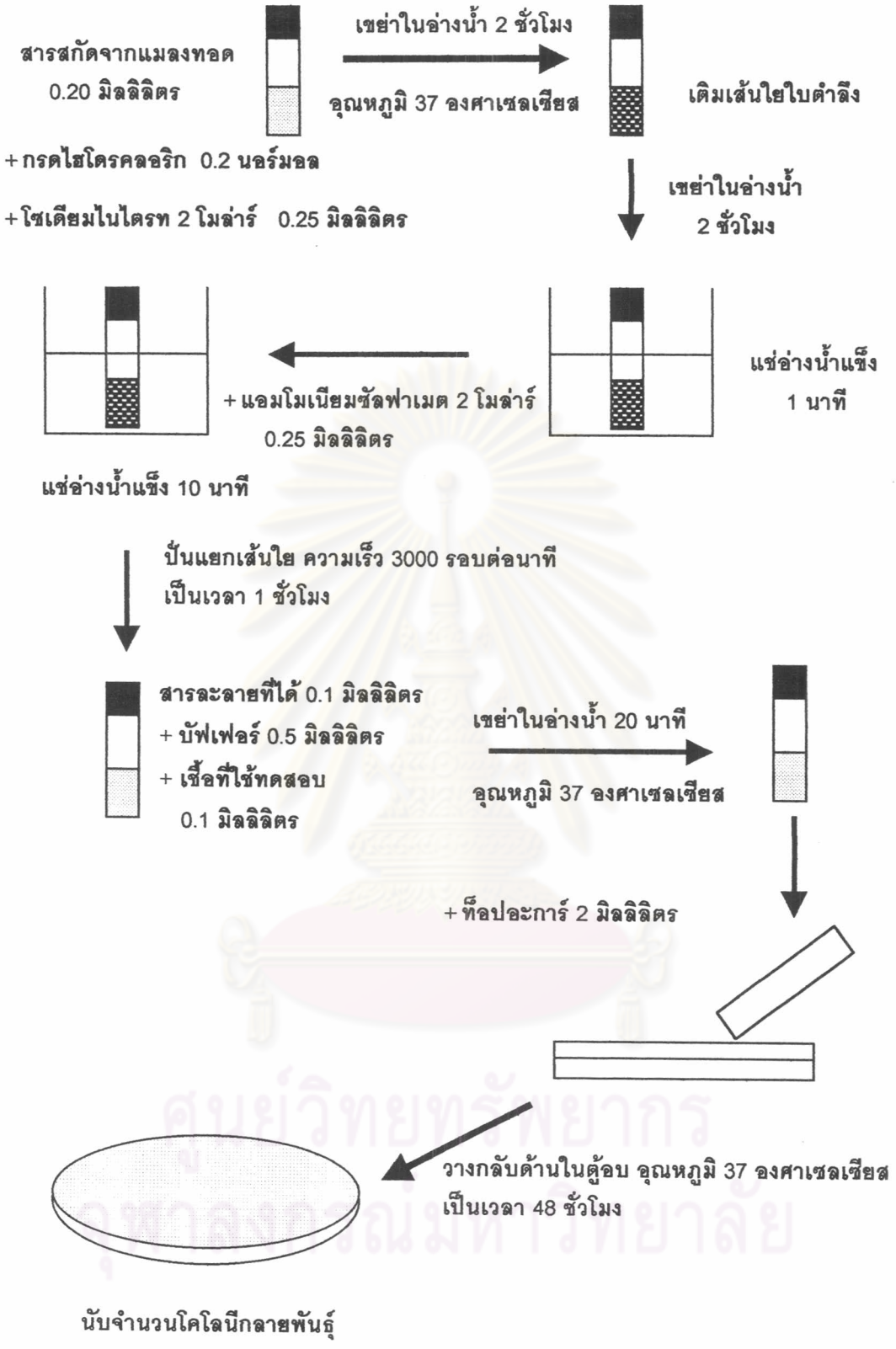
12. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (top agar) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

13. เทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อ โดยเอียงจานไปมาเล็กน้อยเพื่อให้ส่วนผสมกระจายสม่ำเสมอทั่วจานเลี้ยงเชื้อ

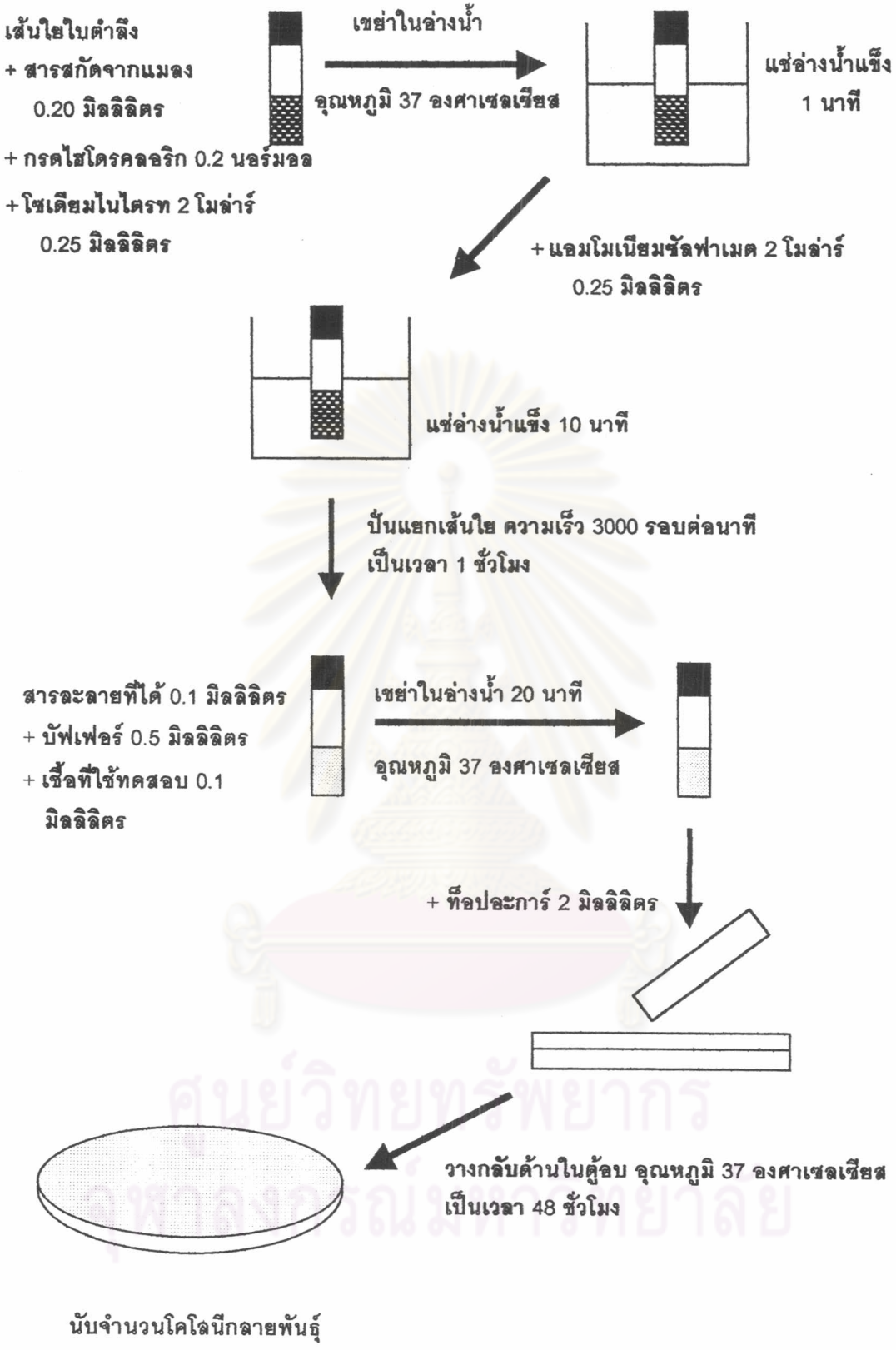
14. นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

15. นับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 ขั้นตอนและวิธีการศึกษาผลของเส้นใยใบตำลึงกับการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากแมลงทอดเมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรท



รูปที่ 6 ขั้นตอนและวิธีการศึกษาผลของเส้นใยใบตำลึงกับการเปลี่ยนแปลงการเกิดสารก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากแมลงทอดเมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรท

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดแมลงทอด แสดงโดย ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อ เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้งๆ ละ 2 จาน และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ถ้าพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่ทดสอบกับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ คือ เมื่อปริมาณสารสกัดเพิ่มขึ้น จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ก็เพิ่มขึ้นด้วย และพบว่าอย่างน้อย 2 ความเข้มข้นที่ทำการศึกษาให้ค่าจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อ มากกว่าจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ และต้องมีอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นที่สามารถทำให้จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อสูงเกิน 2 เท่าของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ แสดงว่าสารสกัดจากแมลงทอดชนิดนั้นมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ นอกจากนี้ได้แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในรูปจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกลายพันธุ์ต่อกรัมแมลงทอด และเปรียบเทียบความสามารถในการก่อกลายพันธุ์ด้วยค่าดัชนีชี้วัดฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (Mutagenicity index หรือ MI) ซึ่งคำนวณได้จากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดจากสารสกัดจากแมลงทอดที่ทดสอบ หารด้วยจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสกัดจากแมลงทอดกับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ และจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ที่ได้จากสารสกัดจากแมลงทอด 1 กรัม หลังทำปฏิกิริยากับไนไตรท ในสภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 3 – 3.5) และไม่มีระบบเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ ทำการคำนวณโดยใช้การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (Simple Linear Regression Analysis)

ผลของเส้นใยใบตำลึงต่อฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และการเกิดสารก่อกลายพันธุ์จะพิจารณาโดยเมื่อพบว่าอย่างน้อยที่ปริมาณเส้นใยใบตำลึงระดับสูงสุดที่ใช้ในการศึกษา คือ 5.26 มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ ทำให้จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ และค่าดัชนีการกลายพันธุ์ลดลงต่ำกว่าร้อยละ 20 แสดงว่าเส้นใยใบตำลึงสามารถลดฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ หรือ/และการเกิดสารก่อกลายพันธุ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย