บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้ ทำการศึกษาลักษณะผลผลิตของกระเจี๊ยบเขียว การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของกระเจี๊ยบเขียว และการทดสอบความเป็นพิษของกระเจี๊ยบเขียว ดังนี้

1. การศึกษาลักษณะผลผลิตของกระเจี๊ยบเขียว

1.1 การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) มีกระเจี๊ยบเขียว จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ SR18-0058 PC 5706, SR18-0059 PC 5707 และ SR18-0060 PC 5709 เป็นสายพันธุ์ที่มีผลผลิตสูง มีสารพอลิแซ็กคาไรด์สูง และต้านทานโรคไวรัส จำนวน 4 ซ้ำ มีหน่วยทดลอง คือ แปลงปลูกกระเจี๊ยบเขียวขนาด 1X5 เมตร จำนวนต้นกระเจี๊ยบเขียว 10 ต้นต่อแปลง

1.2 การปลูกทดสอบกระเจี๊ยบเขียว ณ ศูนย์การเรียนรู้วิชาการเกษตรในเมือง สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และสหกรณ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช (ภาพที่ 3.1)

1) การเตรียมดินโดยการไถดินในพื้นที่เปิดใหม่ทิ้งไว้ 15 – 20 วัน จึงไถพรวนและยกแปลงทดลองขนาด 1X5 เมตร ใส่ปุ๋ยคอกอัตรา 1,000 กิโลกรัม/ไร่ ปูนขาวอัตรา 100 กิโลกรัม/ไร่ และปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 20 กิโลกรัม/ไร่ รองพื้น จากนั้นไถกลบ แล้วคลุมแปลงด้วยผ้าพลาสติก

2) การเตรียมต้นกล้ากระเจี๊ยบเขียว เพาะเมล็ดกระเจี๊ยบเขียวแต่ละสายพันธุ์ในถาดเพาะขนาด 72 หลุม ใส่พีทมอสในถาดเพาะ รดน้ำให้ชุ่ม จากนั้นหยอดเมล็ด 1 เมล็ดต่อหลุม ดูแลต้นกล้า โดยการรดน้ำและป้องกันกำจัดโรคและแมลงอย่างสม่ำเสมอ เมื่อต้นกล้าอายุ 20 – 25 วัน สามารถย้ายปลูกได้

3) การย้ายปลูก นำต้นกล้าที่เตรียมไว้ ย้ายปลูกในแปลง แบบแถวคู่ ระยะห่างระหว่างต้น 75 เซนติเมตร

4) การดูแลรักษา ใส่ปุ๋ยคอกอัตรา 1,000 กิโลกรัม/ไร่ และปุ๋ยสูตรเคมีสูตร 15 – 15 – 15 อัตรา 100 กิโลกรัม/ไร่ โดยโรยรอบๆ โคนต้นกระเจี๊ยบเขียว แบ่งใส่เท่ากัน จำนวน 5 ครั้ง ช่วงอายุ 15 30 45 60 และ 75 วันหลังย้ายปลูก และรดน้ำทุกวัน วันละ 2 ครั้ง เช้า – เย็น และป้องกันกำจัดโรคและแมลง จนต้นกระเจี๊ยบให้ผลผลิต

5) การเก็บเกี่ยวผลผลิต เมื่อต้นกระเจี๊ยบเขียวโตเต็มที่และให้ผลผลิตจะเก็บผลหลังจากดอกบาน 5 วัน โดยทยอยเก็บเกี่ยวเป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยใช้มีดตัดก้านผลกระเจี๊ยบเขียว แล้วเก็บผลกระเจ๊ยบเขียวใส่ในถุงตาข่ายในแต่ละสายพันธุ์

1.3 การบันทึกข้อมูลลักษณะผลผลิตกระเจี๊ยบเขียว ได้แก่ รูปร่างผล ขนาดผล สีผล ผิวผล น้ำหนักผล จำนวนผลต่อต้น และผลผลิตต่อต้น

1.4 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติพรรณา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ภาพที่ 3.1 (ก) แปลงปลูกกระเจี๊ยบเขียว (ข) ผลกระเจี๊ยบเขียวที่สามารถเก็บเกี่ยวได้

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของกระเจี๊ยบเขียว

2.1 ปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดสารเมือก ดัดแปลงจากวิธีของ Samavati V. (2013) นำกระเจี๊ยบเขียวสดทั้งผล จำนวน 100 กรัม ล้างให้สะอาด นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาบดให้ละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงจนได้ผงกระเจี๊ยบเขียวละเอียด จากนั้นนำผงกระเจี๊ยบเขียวจำนวน 1 กรัม แช่ในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ทำการเก็บส่วนใสด้านบน แล้วทำให้เกิดการตกตะกอนด้วย 95% ethanol จากนั้นล้างตะกอนให้สะอาดด้วย 50% ethanol จนได้พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดสารเมือก ทำการกำจัดน้ำออกด้วย 80% ethanol และ acetone ตามลำดับ นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง แล้วนำไปชั่งและคำนวณหา % น้ำหนักแห้งของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดสารเมือก (% polysaccharides extraction yield) ตามสูตรดังนี้

$$\%\ \text{Polysaccharides extraction yield (w/w)} = \frac{\text{dried crude extraction weight (g)}}{\text{powder weight (1 g)}}$$

2.2 ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ โดยวิธีวิ ธี ดี พี พี เอช (1, 1-diphenyl-2picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Brand และคณะ (1995)

วิ ธี ดี พี พี เอช (1, 1-diphenyl-2picrylhydrazyl (DPPH) radical scave nging assay) โดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระคืออนุมูลอิสระ ดีพีพีเอช (DPPH, 1,1-diphenyl–2–picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและ มีสีม่วง เมื่อ DPPH' ทำปฏิกิริยากับแอนติออกซิแดนท์ที่ละลายด้วยเอทานอล จะทำให้ได้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง การเตรียมสารละลายดีพีพีเอช (DPPH reagent) โดยชั่งดีพีพีเอช 0.0079 กรัม ละลายใน เอทานอล 100 มิลลิกรัม ทำการทดสอบสารตัวอย่าง โดย ผสมสารละลายตัวอย่าง 100 กรัม กับสารละลายดีพีพี เอช 100 ไมโครลิตร ใน 96 well plate ตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสง ที่ได้มาคำนวณหาการยับยั้งอนุมูลอิสระจากสมการ

การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) = $[(A_{\text{ดีพีพีเอช}} - A_{\text{สารตัวอย่าง}})/(A_{\text{ดีพีพีเอช}} - A_{\text{สารมาตรฐาน}})] \times 100$

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจะแสดงเป็นค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 %

วิธีเอบีทีเอส (ABTS radical cationdecolorization assay) (Re et al., 1999) เป็นการทดสอบด้วย $ABTS'^{+}$, 2, 2′-azino-bis (3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical สาร สังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร การเตรียมสารละลายเอบีทีเอส (ABTS reagent) โดยการชั่งสารเอบีทีเอส 0.0036 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ผสมสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.00067 กรัม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ทำการทดสอบ สารตัวอย่างโดยผสมสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร กับ สารละลายเอบีทีเอสปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน 96 well plate ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้โทรลอกซ์เป็น สารมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มา คำนวณหาการยับยั้งอนุมูลอิสระจากสมการ

การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) = $[(A_{\text{เอบีทีเอส}} - A_{\text{สารตัวอย่าง}})/(A_{\text{เอบีทีเอส}} - A_{\text{สารมาจรฐาน}})] \times 100$
ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจะแสดงเป็นค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % โดยการแทนค่า y = 50 ในสมการเพื่อหา x จะได้ผลค่า IC50 ซึ่งการแปรผลค่า IC50 หมายถึง ค่าของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ค่ายิ่งน้อยยิ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ

2.3 ปริมาณกลูตาไทโอน โดยเครื่องยูวี-วิสิเบิลตามวิธีของ ชื่นสุมณ ยิ้มถิน เกรียงศักดิ์ ศรีวิจิตรกมล และสาโรจน์ ยิ้นถิน. (2556) ชั่งผงตัวอย่างกระเจี๊ยบเขียว ปริมาณ 1 มิลลิกรัม มาแช่ในสารละลาย 5% meta-phosporic ในอัตราส่วน 1:10 ทิ้งไว้ในตู้เย็น 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปกรองด้วยกระดาษ

กรอง นำสารละลายที่ได้ไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้ 50 µl แล้วเติม 100 µl ของ 5% meta-phosporic นำไป dilute ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.6) ในอัตราส่วน 1:20 เติม glutathione reductase (1 unit/ml) 50 µl และ DTNB (5-5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) 50 µl เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม NADPH (β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 50 µl นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เป็นเวลา 3 นาที คำนวณหาปริมาณกลูตาไทโอน (total glutathione) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูตาไทโอน ผลิตภัณฑ์ที่ได้เกิดจาก glutathione reductase (GR) ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทกลูตาไทโอนไดซัลไฟด์ (GSSH) จะได้ reduced glutathione (GSH) ซึ่งเมื่อรวมตัวกับ DTNB จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลือง ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย µM

2.4 ปริมาณฟลาโวนอยด์ วิเคราะห์ด้วยวิธีของ (Wolfe et al., 2003) โดยชั่งสารตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม ละลายด้วย 80 % เอทานอล 1 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรสีชา เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (2.5 %) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และโซเดียมอะซิเดต (100 กรัม/ลิตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิกรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิกรัม ผสมให้เข้า กันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไป วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ใช้สารละลายเควอซิตินเป็นสารมาตรฐาน ปริมาณฟลาโวนอยด์หาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของ สารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเควอซิติน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย มิลลิกรัม/กรัม extract as quercetin equivalent.

2.5 ปริมาณโพลีฟีนอล วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method (Wolfe et al., 2003) โดยชั่งสารตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม ละลายด้วย 80 % เอทานอล 1 มิลลิกรัม นำสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรสีชา เติม สารละลาย 0.2 N Folin-Ciocalteau,s phenol reagent 2.5 มิลลิกรัม ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 % ปริมาตร 2 มิลลิกรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิกรัม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ปริมาณโพลีฟีนอลหาได้จากการนำค่าการ ดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน ของสารละลายกรดแกลลิก ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย มิลลิกรัม/กรัม extract as gallic acid equivalent

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ Duncan Multiple Range Test Test (DMRT) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3. การทดสอบความเป็นพิษของกระเจี๊ยบเขียว

3.1 การเตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบเขียว นำผลกระเจี๊ยบเขียวมาล้างสิ่งสกปรกออกและเช็ดให้แห้ง ผึ่งกระเจี๊ยบเขียวในที่ร่ม จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และนำมาบดให้ละเอียดเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง นำผงกระเจี๊ยบเขียวแห้งที่ได้สกัดด้วยเอทานอล โดยใช้เครื่องสกัด soxhlet เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จนสารสกัดออกมาหมด ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วกรองเฉพาะส่วนน้ำด้วยผ้าก๊อซ 3 ชั้น และกรองอีกครั้งด้วยกระดาษ กรอง Whatman No.4 นำส่วนที่กรองได้ไปทำให้

แห้งด้วย เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilizer) เก็บใส่ขวดสีชา ในเครื่องดูดความชื้น (desiccator) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการศึกษาความเป็นพิษ (toxicity studies) ของกระเจี๊ยบเขียว

3.2 วิธีการทดสอบสารเคมีเบื้องต้น (chemical screening) ทำได้โดยนำสารสกัดกระเจี๊ยบเขียว 0.50 g รีฟลักซ์ (reflux) ด้วยน้ำ 30 มิลลิลิตร นาน 1 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง no.4 นำไปทดสอบเพื่อให้ทราบกลุ่มสารเคมีในกระเจี๊ยบเขียว ดังนี้ สารกลุ่มฟีโนลิก (phenolic compounds) ทดสอบปฏิกิริยากับสารละลายเฟอริกคลอไรด์ สารกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids) ทำปฏิกิริยากับ รีเอเจนต์ดราเจนดรอฟฟ์ (Dragendorff's reagent) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ทดสอบปฏิกิริยากับไซยานิดินส์ (cyanidins reaction) สารกลุ่มซาโปนินทำการทดสอบการเกิดฟอง (froth test) และทดสอบการเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar test) ด้วยวิธีเฟลิ่ง (Fehling solution test) 7 เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ SV-80, Chang liver (Hela derivative) และ HEK-293 จากบริษัทซีแอลเอส (CLS Cell line service GmbH) ประเทศเยอรมนี เซลล์ SV-80 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM) ส่วนเซลล์ Chang-Liver และHEK-293 สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดอีเอ็มอีเอ็ม (Eagle's minimal essential medium: EMEM) ที่มี 2 mM L-Glutamine, 0.1 mM Non-essential amino acid, 1 mM Sodium pyruvate และ Fetal bovine serum ร้อยละ 10 บ่มในตู้อบเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 ºC ±1 ºC ความชื้นร้อยละ 90±10 และความเข้มข้น CO_2 ร้อยละ 5.0 ±1.0

3.3 การทดสอบความเป็นพิษของกระเจี๊ยบเขียวต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT โดยใช้เซลล์มนุษย์ (human normal cell) เนื้อเยื่อบุผิว เซลล์ปกติของมนุษย์ Hs 746T ที่เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนัง และ RAW264.7 ที่เป็นเนื้อเยื่อบุผิวและไฟโบรบลาสต์จากกระเพาะอาหารที่มาจากบริเวณที่มีการแพร่กระจายของขาซ้าย เลี้ยงเซลล์ในเพลทชนิด 96 หลุม หลุมละ 5,000 เซลล์ บ่มในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์นาน 24 ชั่วโมง เตรียมสารละลายและเจือจาง (Serial dilution) ความเข้มข้นต่างๆ 8 ระดับ โดยใช้สารมาตรฐาน เวลาที่กำหนด จึงปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมทิ้งและเติมสารละลายสารสกัดที่เตรียมไว้แล้ว ลงในหลุมหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทในตู้บ่มเซลล์นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 0.5 กรัม/มิลลิกรัม MTT 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทในตู้บ่มนาน 4 ชั่วโมง ปิเปตสารละลาย MTT ทิ้ง เติม DMSO 200 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท เมื่อครบเวลาตามกำหนดวัดปริมาณเซลล์ด้วยการทดสอบ MTT นำไปหาค่าการดูดกลืนแสง วิเคราะห์หาค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% of cell viability) จากสูตร

$$\text{Viability (\%)} = 100 \times \text{OD Sample/ OD (Control)}$$

จากนั้นนำค่าไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ แล้วคำนวณหาค่า IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration)

การวิจัยนี้ ทำการปลูกกระเจี๊ยบเขียวในสภาพแปลงเปิดและศึกษาลักษณะผลผลิตของกระเจี๊ยบเขียว ณ ศูนย์วิชาการเกษตรในเมือง สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และสหกรณ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของกระเจี๊ยบเขียว และการทดสอบความเป็นพิษของกระเจี๊ยบเขียว ณ ห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข