3. ปิดฝาขวดอาหารวุ้นที่เตรียมเสร็จแล้ว (ไม่ต้องแน่นมาก) แล้วใส่ในถุงพลาสติก รัดปากถุงด้วยยางรัด

4. นึ่งฆ่าเชื้ออาหาร และอุปกรณ์ด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8.2. การฆ่าเชื้อด้วยวิธีการอบแห้งด้วย hot air oven

วิธีนี้จะใช้กับอุปกรณ์พวกเครื่องแก้ว ขวดใส่อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปิเปต และ จานเพาะเชื้อ เป็นต้น โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ล้างเครื่องแก้วให้สะอาด เช็ดให้แห้ง

2. ปิเปต อุดปลายด้านบนของปิเปต ด้วยสำลี อย่าให้แน่นมาก แล้วใส่ลงในกระบอกใส่ปิเปต

3. อบให้แห้งด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

8.3. การฆ่าเชื้อภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (lamina air –flow cabinet)

1. พ่นแอลกอฮอล์ 70% แล้วเช็ดให้ทั่วภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ ยกเว้นบริเวณแผ่นกรองอากาศ

2. เปิดแสง uv ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที

3. หลังจากที่แสง uv ดับแล้ว ให้เปิดพัดลมภายในตู้ แล้วเปิดไฟ

4. เช็ดอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการถ่ายเนื้อเยื่อ (ที่ผ่านขั้นตอน 8.1. หรือ 8.2. แล้ว) ด้วยแอลกอฮอล์ 70% ก่อนนำเข้าตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ

5. เมื่อใช้ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อเสร็จแล้ว นำอุปกรณ์ทั้งหมดออกจากตู้ เช็ดทำความสะอาดภายในตู้ด้วยแอลกอฮอล์ 70% อีกครั้งปิดตู้ให้สนิท

6. เปิดแสง uv ทิ้งไว้ 15 นาที ก่อนที่จะปิดตู้ เพื่อฆ่าเชื้อโรคที่ยังหลงเหลืออยู่ภายในตู้

279225

ก
ธม.53
ก 3 ก
ฉ-1

9. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาเทคนิคในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาจากเหง้าขมิ้นชัน

1. เลือกชิ้นส่วนตาจากเหง้าของขมิ้นชัน ที่มีความสมบูรณ์ ปราศจากโรค ขนาดประมาณ 1 ซม. มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน และน้ำกลั่น
2. นำชิ้นส่วนตาจากขั้นตอนที่ 1 ไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อรา คาเบนดาซิน 0.2% ที่ผสมในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่ใน $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที รวม 9 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 18 ซ้ำ ดังตาราง 3.6

ตาราง 3.6 ความเข้มข้นของ $HgCl_2$ และ เวลาที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาจากเหง้าขมิ้นชัน

$HgCl_2$	เวลา (นาที)		
(%)	5	10	15
0.5	T1	T2	T3
1.0	T4	T5	T6
3.0	T7	T8	T9

3. นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อจากขั้นตอนที่ 2 มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วจึงนำไปจุ่มใน กรดซิตริก ความเข้มข้น 0.01% เป็นเวลา 5 นาที สุดท้ายนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียส และได้รับแสง 2,000-3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน
4. บันทึก เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช BA (6-benzyl adenine) และ NAA (Napthaleneacetic acid) ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตาขมิ้นชัน

1. เลือกชิ้นส่วนตาจากหน่อของขมิ้นชัน ที่มีความสมบูรณ์ ปราศจากโรค ขนาดประมาณ 1 ซม. มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน และน้ำกลั่น
2. นำชิ้นส่วนตาจากขั้นตอนที่ 1 ไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อรา คาแบนดาซิน 0.2% ที่ผสมในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่ใน $HgCl_2$ ความเข้มข้น 1.0% เป็นเวลา 5 นาที (ชุดที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1) แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 3 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 mg/l รวม 25 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 18 ซ้ำ ดังตาราง 3.7

ตาราง 3.7 ความเข้มข้นของ BA และ NAA ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชัน

NAA	BA (mg/l)				
(mg/l)	0	0.5	1.0	2.0	3.0
0	T1	T2	T3	T4	T5
0.1	T6	T7	T8	T9	T10
0.2	T11	T12	T13	T14	T15
0.5	T16	T17	T18	T19	T20
1.0	T21	T22	T23	T24	T25

3. นำเนื้อเยื่อทั้งหมดไปเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียส และได้รับแสง 2,000-3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์
4. บันทึก เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ความสูงของยอด และเปอร์เซ็นต์การเกิดราก

การทดลองที่ 3 การศึกษาอัตราการรอดชีวิตภายหลังการย้ายต้นอ่อนขมิ้นชันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูก

1. นำต้นอ่อนขมิ้นชันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการทดลองที่ 2 อายุ 6 สัปดาห์ มาคลายฝาแกลียวทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วเปิดฝาทิ้งไว้อีก 24 ชม
2. ใช้ปากคีบนำต้นอ่อนขมิ้นชันออกจากขวด แล้วแช่ต้นอ่อนในน้ำยาฆ่าเชื้อราคาเบนดาซิน 0.2% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
3. ปลูกต้นอ่อนในถาดหลุม โดยใช้วัสดุปลูกคือ ทรายหยาบ: ขุยมะพร้าว: ถ่านแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 ซึ่งวัสดุปลูกดังกล่าวได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
4. รดน้ำให้ชุ่มแล้วคลุมถาดหลุมที่ปลูกต้นอ่อนขมิ้นด้วยถุงพลาสติกใส แล้วฉีดพ่นละอองน้ำก่อนปิดปากถุงพลาสติก นำไปวางในสภาพที่มีแสงปานกลางเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยภายใน 3 สัปดาห์นี้ควรมีการเปิดปากถุงเพื่อฉีดพ่นละอองน้ำบ้าง
5. เมื่อครบ 3 สัปดาห์ นำถุงพลาสติกใสที่คลุมต้นอ่อนออก แล้วนำต้นอ่อนไปไว้ในเรือนเพาะชำ รดน้ำทุกวัน วันละ 1 ครั้ง
6. บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ความสูงของต้น จำนวนใบ ของต้นอ่อนขมิ้นชันทุกๆ 1 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์

การทดลองที่ 4 การสกัด และแยกสารสกัดของขมิ้นชันโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีผิวบาง

การทดลองที่ 4.1. การสกัดสารจากส่วนต่างๆ ของขมิ้นชัน

การทดลองที่ 4.1.1. การสกัดสารจากขมิ้นชันที่ได้จากธรรมชาติ

1. นำเหง้าของขมิ้นชันจาก จ.แม่ฮ่องสอน มาปลูกในถุงดำเป็นเวลา 2 เดือน
2. แยกส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบ ลำต้น ราก และหัวของขมิ้นชัน แล้วนำไปล้างไปสะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำชิ้นส่วนต่างๆ มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนักสดของแต่ละส่วน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท
3. นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้วมาชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นบดให้ละเอียด แล้วจึงชั่งน้ำหนักของตัวอย่างจากแต่ละส่วนให้มีน้ำหนัก 6.33 กรัม เท่ากัน นำตัวอย่างใส่ในขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ สกัดแต่ละส่วนของขมิ้นชันโดยเติมตัวทำละลาย เอทานอล 95% ให้ท่วมตัวอย่าง (ประมาณ 50 มล) ปิดฝาขวด
4. นำไปเขย่าด้วย ultrasonic bath เป็นเวลา 30 นาที
5. กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เอาส่วนที่เป็นกากทิ้ง

6. นำสารสกัดของแต่ละส่วนที่ได้ไปทำระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evapolator จนสารสกัดที่ได้แห้งสนิท ตั้งทิ้งไว้ให้ เอทานอล 95% ระเหยที่อุณหภูมิห้อง และให้สารสกัดเย็น ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ แล้วเท หรือขูดสารสกัดเข้มข้นออกจากขวดระเหย บันทึกลักษณะของสารสกัดที่ได้ และเก็บใส่ขวดสีชาไว้ในตู้เย็น

การทดลองที่ 4.1.2. การสกัดสารจากขมิ้นชันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. นำต้นอ่อนขมิ้นชันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ออกจากขวด ทำความสะอาดส่วนต่างๆ ล้างวุ้นออกจากรากให้หมด
2. แยกส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบ ลำต้นเหนือดิน และราก แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนักสดของแต่ละส่วน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท
3. นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้วมาชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นบดให้ละเอียด แล้วจึงชั่งน้ำหนักของตัวอย่างจากแต่ละส่วนให้มีน้ำหนัก 6.33 กรัม เท่ากัน นำตัวอย่างใส่ในขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ สกัดแต่ละส่วนของขมิ้นชันโดยเติมตัวทำละลาย เอทานอล 95% ให้ท่วมตัวอย่าง (ประมาณ 50 มล) ปิดฝาขวด
4. นำไปเขย่าด้วย ultrasonic bath เป็นเวลา 30 นาที
5. กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เอาส่วนที่เป็นกากทิ้ง
6. นำสารสกัดของแต่ละส่วนที่ได้ไปทำระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evapolator จนสารสกัดที่ได้แห้งสนิท ตั้งทิ้งไว้ให้ เอทานอล 95% ระเหยที่อุณหภูมิห้อง และให้สารสกัดเย็น ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ แล้วเท หรือขูดสารสกัดเข้มข้นออกจากขวดระเหย บันทึกลักษณะของสารสกัดที่ได้ และเก็บใส่ขวดสีชาไว้ในตู้เย็น

การทดลองที่ 4.1.3. การสกัดสารจากต้นอ่อนขมิ้นชันภายหลังการย้ายออกปลูก

1. นำต้นอ่อนขมิ้นชันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มาล้างทำความสะอาด เอาเศษวัสดุปลูกออกให้หมด

2. แยกส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบ ลำต้นเหนือดิน และราก แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนักสดของแต่ละส่วน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท
3. นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้วมาชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นบดให้ละเอียด แล้วจึงชั่งน้ำหนักของตัวอย่างจากแต่ละส่วนให้มีน้ำหนัก 6.33 กรัม เท่ากัน นำตัวอย่างใส่ในขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ สกัดแต่ละส่วนของขมิ้นชันโดยเติมตัวทำละลาย เอทานอล 95% ให้ท่วมตัวอย่าง (ประมาณ 50 มล) ปิดฝาขวด
4. นำไปเขย่าด้วย ultrasonic bath เป็นเวลา 30 นาที
5. กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เอาส่วนที่เป็นกากทิ้ง
6. นำสารสกัดของแต่ละส่วนที่ได้ไปทำระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evapolator จนสารสกัดที่ได้แห้งสนิท ตั้งทิ้งไว้ให้ เอทานอล 95% ระเหยที่อุณหภูมิห้อง และให้สารสกัดเย็น ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ แล้วเทหรือขูดสารสกัดเข้มข้นออกจากขวดระเหย บันทึกลักษณะของสารสกัดที่ได้ และเก็บใส่ขวดสีชาไว้ในตู้เย็น

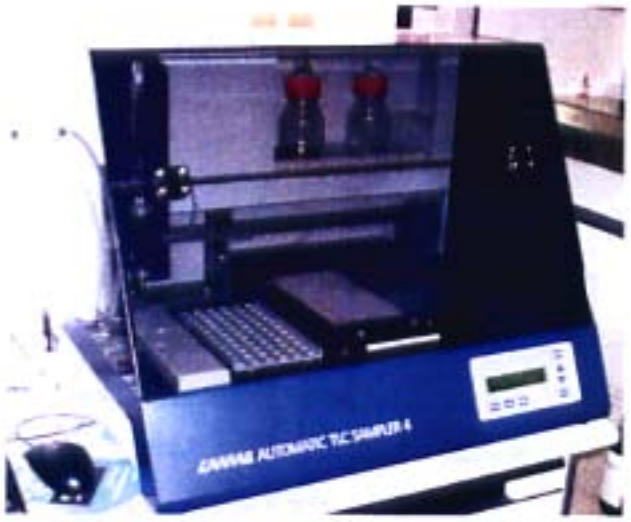
การทดลองที่ 4.2 การแยกสารสกัดโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีผิวบาง

1. เตรียมตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ TLC Tank โดยผสม เฮกเซน: คลอโรฟอร์ม: เอทานอล อัตราส่วน 4.1:4.9:1.0 v/v ใส่ลงในแทงค์ปิดฝาให้สนิท
2. ใช้ดินสอขีดเส้นบางๆ เพื่อกำหนดแนวเคลื่อนที่ของสารละลาย (solvent front) ให้ห่างจากขอบบนของแผ่น TLC สำเร็จรูป 1 เซนติเมตร
3. เตรียมความเข้มข้นของสารตัวอย่างให้เท่ากับ 5% โดยชั่งสารตัวอย่างจากส่วนต่างๆ ของขมิ้นชันทั้ง 3 แหล่ง มาอย่างละ 0.05 กรัม แล้วละลายด้วยเอทานอล 1 มล
4. เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน ความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1.0% และ 2.0% โดยใช้เอทานอล 1 มล เป็นตัวทำละลาย
5. ดูดสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน และสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในขวดทำ TLC (vial) ปิดฝาขวดด้วยจุกยาง วางขวดสารละลายทั้งหมดในเครื่อง Automatic TLC Sample 4 ของบริษัท CAMAG (ภาพ 3.1) แล้วเข้าโปรแกรม

winCATS Planar Chromatography Manager เพื่อ spot สาร ทั้งสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

6. นำแผ่น TLC ที่ spot สารแล้ว ใส่ลงในแทงค์ตัวทำละลายที่เตรียมไว้ โดยให้ตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าตำแหน่งที่ spot สาร ปิดฝาแทงค์ให้สนิท รอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึง solvent front
7. นำโครมาโตแกรมที่ได้ ไปตรวจหาตำแหน่งสาร โดยดูภายใต้แสง UV 254 nm บันทึกภาพ วัดค่า R_f value

   R_f value = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่/ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่
8. ตรวจสอบหาสารมาตรฐานในสารตัวอย่าง โดยวางแผ่นโครมาโตแกรมในเครื่อง Manual TLC Scanner 3 ของบริษัท CAMAG (ภาพ 3.2) แล้ว scan ที่ความยาวคลื่น 254 nm เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายทั้งหมด แล้วจึง integrate เลือก peak ที่น่าจะเป็นสารเดียวกับสารมาตรฐาน โดยดูเปรียบเทียบกับ peak ของสารมาตรฐาน
9. Scan Wavelength (nm) และ Absorption unit ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ความเข้มข้น และสารตัวอย่างที่มี peak ในช่วงที่ integrate เหมือนกับสารมาตรฐาน เพื่อตรวจสอบว่า peak ของสารตัวอย่างนั้นเป็นสารมาตรฐานจริง แล้วเครื่อง scan จะประเมินผลออกมาว่าเป็นสารตัวเดียวกัน หรือไม่ ถ้าเป็นสารเดียวกันจะบอกปริมาณของสาร
10. เมื่อ integrateเลือกช่วงการดูดกลืนแสงจะได้กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานระหว่างความสูงของ peak และพื้นที่ของ peak ต่อปริมาณสารเคอร์คูมิน เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างในช่วงเดียวกับสารมาตรฐานก็จะทราบปริมาณของสารเคอร์คูมินในสารตัวอย่าง



ภาพ 3.1 เครื่อง Automatic TLC Sample 4 ของบริษัท CAMAG

ภาพ 3.2 เครื่อง Manual TLC Scanner 3 ของบริษัท CAMAG