รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเงินงบประมาณ

ประจำปีงบประมาณ 2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม องค์ประกอบทางเคมี ความเป็นพิษต่อเซลล์ และสารพันธุกรรมของต้นจักรนารายณ์

Genetic Diversity, Chemical Constituents, Cytotoxicity and Genotoxicity of *Gynura divaricata*

ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

RCH
QK
495
.J84
ส831ก
ฉ.1

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....116122
วัน,เดือน,ปี.....-2 พ.ค. 2554

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2552
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b.....12314006.....
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินงบประมาณประจำปี 2552 และสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

และขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย (ไทย) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม องค์ประกอบทางเคมี ความเป็นพิษต่อเซลล์ และสารพันธุกรรมของต้นจักรนารายณ์

(อังกฤษ) Genetic Diversity, Chemical Constituents, Cytotoxicity and Genotoxicity of *Gynura divaricata*

แหล่งเงิน เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552 จำนวนเงิน 200,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2551 - 30 กันยายน 2552

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

สาขาวิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

E-mail: poeaim@hotmail.com

คำสำคัญ: จักรนารายณ์, บริเวณ *trn*L intron, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ความเป็นพิษต่อเซลล์

Keywords: *Gynura divaricata*, *trn*L (UAA) intron, genetic diversity, Cytotoxicity

บทคัดย่อ

จักรนารายณ์ (*Gynura divaricata* (L.) DC.: Asteraceae) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น ควบคุมระดับไขมัน เบาหวาน ความดันโลหิตสูง และการอักเสบ เป็นต้น ลักษณะสัญฐานวิทยาเป็นพืชอวบน้ำ ใบมีตั้งแต่กลมมน จนถึงเรียวยาว บนใบมีลักษณะเป็นขน และกิ่งหรือลำต้นมีทั้งสีเขียว และสีอมม่วง ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของจักรนารายณ์ และความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบของต้นจักรนารายณ์ ต่อเซลล์ไลน์ 5 ชนิด ในหลอดทดลอง

การศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจักรนารายณ์ (*Gynura divaricata*) จากแหล่งต่างๆในประเทศไทย จำนวน 32 ตัวอย่าง *G. psudochina* และ *G. formosana* ที่นิยมใช้เป็นพืชสมุนไพร รวมทั้ง *Zinnia violacea* และ *Wedelia trilobata* โดยเทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ตำแหน่ง *trn*L intron ระหว่าง *trn*L (UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon ด้วยคู่ไพร์เมอร์ c และ d พบว่าทุกตัวอย่างมีขนาดชิ้นของดีเอ็นเอประมาณ 550 คู่เบส เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม ClustalX และ PHYLIP เพื่อหาแผนภูมิความสัมพันธ์โดยวิธี Neighbour-Joining แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายในระดับสปีชีส์ต่ำ จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง *trn*L (UAA) intron มีความหลากหลายไม่เพียงพอกับการนำมาใช้หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในสกุล *Gynura*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีประชาชนจำนวนมากที่เชื่อว่าพืชนี้มีคุณสมบัติในการเป็นยาสูง แต่อย่างไรก็ตามการนำพืชสมุนไพรไปใช้อย่างไม่ระวังอาจเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อได้ ดังนั้นการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจึงมีความจำเป็น ได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 5 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์ไตลิง (Vero) และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (P388) จากสารสกัดหยาบจากใบของจักรนารายณ์ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย คือ เฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเอทานอล ด้วยวิธี MTT assay โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร RPMI ที่มี Fetal Bovine Serum (FBS) 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ที่ควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ศึกษาอัตราการรอดของเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (125, 250, 500, 1000 และ 2000 µg/ml) พบความแป็นเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ 50 % ของ KB เซลล์ (50% Cytotoxicity Concentration) ในทุกชั้นของสารสกัด โดยในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเอทานอลมีค่าที่ 1439.18, 1620.27 และ 978.86 µg/ml ตามลำดับ สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ต้านทานเฉพาะ *C. utilis* ที่ระดับความเข้มข้น 1000 µg/ml โดยพบสารที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่จากสารสกัดหยาบที่วิเคราะห์โดย GC-MS คือ Naphthalene และ Hexadecanoic acid จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าอาจก็ความเป็นพิษได้ถ้าใช้อย่างไม่ระวัง แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ เพื่อการพัฒนาการนำสมุนไพรไทยมาใช้ต่อไป

ABSTRACT

Juk-Na-Rai (*Gynura divaricata* (L.) DC.: Asteraceae) is widely used in folk medicine to control cholesterol, diabetes, hypertension and inflammation. Morphogically, the species can be recognized by being fleshy in its upper parts but woody and procumbent at the base, by having ascending scapose or leafy flowering shoots, and ribbed stems which usually are purple-tinged when dried.

Genetic diversity and phylogenetic relationships within 32 samples of the Juk-Na-Rai (*Gynura divaricata*) in Thailand, *G. psudochina* and *G. formosana* are widely used in folk medicine, including *Zinnia violacea* and *Wedelia trilobata* were investigated by PCR and nucleotide sequencing technique based on chloroplast DNA (cpDNA). Amplification and sequencing of the *trn*L intron between *trn*L (UAA) 5'exon and *trn*L (UAA) 3'exon was performed using c and d primers. The PCR amplification of this region was detected a unique fragment of approximately 550 bp. The nucleotide sequences were analyzed against those of sequences using the ClustalX program and PHYLIP software for phylogenetic analysis. The neighbour-joining dendrogram was generated which provided more information on polymorphism. Most of *Gynura* sp. was revealed a very low genetic diversity.

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลงเนื้อหา เผยแพร่ หรือจำหน่าย และขอสงวนสิทธิ์ในการใช้งานเพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The result was suggest that direct sequencing of the trnL (UAA) intron region do not evolve rapidly enough to resolve relationships at these lower taxonomic levels.

A lot of people believed that this plant has high medicinal properties. However, the possible alterations caused by the use of herb indiscriminately can potentially cause damage to normal tissues. Thus, cytotoxic potential assessment is necessary to ensure the safe use of medicinal plants. The hexane, Ethyl acetate and ethanol were extracted from the leaves of *G. divaricata*. The cytotoxicity of the crude extracts was tested against for five cell lines: breast cancer cells (MCF-7), colorectal cancer cells (HT-29), oral cancer cell (KB cell), monkey kidney cells (Vero cell) and leukemia cell in rats (P388) in culture using the MTT assay. Cell lines were grown in RPMI enriched with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) at 37°C in humidified air containing 5% CO_2. The results obtained for cell viability after 24 of exposure to different concentrations crude extracts (125, 250, 500, 1000 and 2000 µg/ml). The cytotoxicity in KB of hexane, ethyl acetate and ethanol extracts was observed with the CC_{50} values (50% Cytotoxicity Concentration) of 1439.18, 1620.27 and 978.86 µg/ml. for 24 hr, respectively. The crude extracts were found to be active against to *C. utilis* at 1000 µg/ml. The mostly chemical constituents from crude extracts that analyzed by GC-MS were Naphthalene and Hexadecanoic acid. The results from this study shown that herb can be harmful in large or prolonged dosages. Therefore, some herbs should not be used indiscriminately. However, study on the other biological activities of *G. divaricata* should be extensively investigated in order to beneficial for Thai herbs development.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ..... V

สารบัญ..... V

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญรูป.....VIII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....3

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....3

1.4 ทฤษฎี.....3

บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....7

2.1 วัสดุ อุปกรณ์.....7

2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง.....7

2.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....7

2.1.3 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ.....7

2.1.4 วัสดุ และสารเคมี.....9

2.2 วิธีการทดลอง.....10

2.2.1 การเก็บตัวอย่างต้นจักรนารายณ์.....10

2.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นจักรนารายณ์.....10

2.2.3 การศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.....10

2.2.4 การสกัดสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์.....11

2.2.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disc diffusion.....12

2.2.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์.....13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....14
2.2.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม.....15

บทที่ 3 ผล และอภิปรายผลการทดลอง.....18
3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง.....18
3.2 ผลการศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาของจักรนารายณ์.....19
3.3 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.....22
3.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....23
3.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี disc diffusion.....25
3.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์.....27
3.7 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม.....31

บทที่ 4 สรุป และเสนอแนะ.....33

บรรณานุกรม.....35

ภาคผนวก.....38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ universal primer จำนวน 6 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding region ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอพันธุกรรม.....4

3.1 รหัส และแหล่งที่มาของตัวอย่างจักรนารายณ์ที่ใช้ในการศึกษา.....18

3.2 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS จำนวน 2 ครั้ง.....25

3.3 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอทานอล ที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ต่อเซลล์ชนิดต่างๆด้วยวิธี MTT assay.....28

3.4 แสดงผลของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ที่ระดับความเข้มข้น 40 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำกลั่น และ Mitomycin C ต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว.....31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

3.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Gynura divaricata* A: ใบรูปร่างค่อนข้างกลม, B: ใบเรียวยาว, C: ลำต้นมีสีเขียว จนถึงสีม่วง, D: ลำต้นตั้งตรง และเป็นพุ่ม, E: กิ่งที่มีตาข้างจำนวนน้อย และ F: กิ่งที่มีตาข้างจำนวนมาก.....20

3.2 แสดงความหลายหลายทางสัณฐานวิทยาของ *Gynura divaricata* ที่แสดงทั้งลักษณะใบ สีของกิ่ง และลำต้น และการเจริญของตาข้างที่ต่างกันแม้ว่าอยู่ในต้นเดียวกัน.....20

3.3 Phylogenetic tree ของจักรนารายณ์ จำนวน 32 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับ *G. psudochina*, *G. formosana*, *Z. violacea* และ *W. trilobata* ในบริเวณ *trn*L (UAA) intron โดยใช้พารามิเตอร์ Neighbor-joining method โดยเลขแสดงค่าที่มาจากค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000.....23

3.4 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. utilis* ของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ที่ความเข้มข้น 1000 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 1%DMSO และ ethanol ที่ใช้เป็นตัวทำละลายเป็นตัวเปรียบเทียบ.....26

3.5 อัตราการอยู่รอดของเซลล์จากสารสกัดหยาบจากใบของต้นจักรนารายณ์ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอทานอล ในเซลล์ชนิดต่างๆ A: เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cells: MCF-7), B: เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer cells: HT-29), C: เซลล์มะเร็งในช่องปาก (oral cancer cell: KB cell), D: เซลล์ไตลิง (monkey kidney cells: Vero cell), E: เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (leukemia cell in rats: P388) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ และ F: Mitomycin C ที่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ชนิดต่างๆ.....30

3.6 แสดงลักษณะโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน A: โครโมโซมของคนปกติ และ B: ความผิดปกติของโครโมโซมที่ได้รับ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย

จากยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554) ที่เน้นการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่น เพื่อนำไปสู่การพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพในระยะยาว โดยใช้หลักเศรษฐกิจพอเพียงเป็นแนวทางสำคัญ ส่งเสริมการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพในการสร้างความมั่นคงของภาคเศรษฐกิจท้องถิ่นและชุมชน รวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถและสร้างนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่เป็นเอกลักษณ์ของประเทศ สมุนไพรไทยนำมาใช้ทั้งเป็นอาหารและยารักษาโรค มาอย่างช้านานแล้ว จนเป็นเอกลักษณ์ของชาติ และในปัจจุบันคนไทยกลับมานิยมใช้พืชสมุนไพรในการรับประทานและรักษาโรคต่าง ๆ อย่างกว้างขวางมากขึ้น เช่น พลู กะเพรา ว่านมหากาฬ ทองพันชั่ง พญายอ ฟ้าทะลายโจร และมะระขี้นก เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่มีสรรพคุณที่สามารถรักษาได้หลายโรค เช่น ว่านมหากาฬ (*G. psudochina*) มีสรรพคุณในการรักษาโรคอีสุกอีใส ริดสีดวง เบาหวาน ทองพันชั่ง มีสรรพคุณในการรักษาโรค ไขข้ออักเสบ เบาหวาน และมะเร็ง เป็นต้น

พืชสกุลว่านมหากาฬ (*Gynura* Cass.) มีการกระจายตัวมากในเขตร้อนของทวีปเอเชีย โดยมีความหลากหลายมากที่สุดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ของพืชวงศ์ทานตะวัน (Asteraceae) จากการศึกษาพบว่าเป็นการยากหากอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ในการจัดจำแนกพืชในสกุลนี้เพียงอย่างเดียว เนื่องจากมีความแปรผันในระดับสปีชีส์สูงมาก เช่น สีและลักษณะของลำต้นและใบ เป็นต้น (Vanijajiva 2008) ในประเทศไทย Vanijajiva (2009) ได้จัดจำแนก และบ่งชี้สายพันธุ์พืชในสกุลนี้ได้ 10 สายพันธุ์ คือ *G. procumbens* (Lour.) Merr., *G. calciphila* var. *calciphila* Kerr, *G. calciphila* var. *dissecta* F.G. Davies, *G. integrifolia* Gagnep., *G. pseudochina* (L.) DC., *G. nepalensis* DC., *G. hmopaengnsis* H. Koyama, *G. cusimbua* (D.Don) S. Moore, *G. bicolor* (Roxb. Ex Willd.) DC.

จักรนารายณ์ (*Gynura divaricata*) หรือ แป๊ะตำปึง จินฉี่เหมาเยี่ย กิมกอยมอเช่า หรือผักพันปี เป็นพรรณไม้ล้มลุกขนาดเล็กที่มีอายุหลายปี ลำต้น ก้านใบ และใบอวบน้ำ และมีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาสูง เช่น ลำต้นรวมถึงใบพบได้ตั้งแต่สีเขียวจนถึงม่วง ลักษณะของใบมีตั้งแต่ใบกลมจนถึงเรียวยาว โดยทั่วไปแล้วชนิดใบกลม ลักษณะใบจะหนา มีขนหนานุ่มแบบกำมะหยี่ทั้งด้านบนและด้านล่าง และชนิดใบยาว จะมีลักษณะใบค่อนข้างยาวและแหลมกว่าชนิดใบกลม และมีผิวใบค่อนข้างเรียบเพราะมีขนน้อย ขอบใบหยัก เป็นต้น และลักษณะดอกของพืชสกุลนี้จะออกดอกเป็นช่อสีเหลืองประกอบด้วยดอกย่อยเล็ก ๆ (Vanijajiva, 2008; Poeaim and Vanijajiva 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีความเชื่อว่ามีสรรพคุณในการรักษาโรคได้หลายชนิด เช่น เบาหวาน เริม ความดันสูง และภูมิแพ้ เป็นต้น เช่นเดียวกันกับว่านมหากาฬ (*G. psudochina*) นอกจากนี้เชื่อว่าเป็นพืชชนิดนี้ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนตอนใต้ โดยมีชื่อเรียกทั่วไปว่า "Bai Bei San Qi" ที่นิยมนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพร (Chen *et al.*, 2009) โดย *G. divaricata* นี้มีการเรียกชื่อเป็น *G. auriculata* , *G. procumbens* หรือ *G. sarmentosa* จึงมีความสับสนกันระหว่างว่านมหากาฬ (*G. psudochina*) และ *G. procumbens* ที่เป็นพืชสมุนไพรของจีน และเกาหลี ซึ่งนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ ได้เช่นกัน ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาวิจัยที่ให้ชื่อวิทยาศาสตร์ของแป๊ะตำปึงว่า *G. procumbens* (ยุวลักษณ์, 2541; ศิริเพ็ญ, 2543; Sriwanthana, 2007) ซึ่ง *G. procumbens* เป็นพืชสมุนไพรของจีน และเกาหลี ที่ไม่พบการกระจายตัวในภูมิภาคเอเชียตะวันออก (Vanijajiva, 2008) จึงอาจกล่าวว่ามีความสับสนในด้านการจำแนกสายพันธุ์ของพืชที่ใช้ในการศึกษา และการเรียกชื่อ ดังนั้นจำเป็นต้องใช้ผู้ที่มีประสบการณ์และเชี่ยวชาญพิเศษ และในบางครั้งอาจใช้เวลานานในการจำแนก ดังเช่นกรณีของจักรนารายณ์ที่ไม่เกิดการออกดอกในประเทศไทย จึงเป็นการยากในการบ่งชี้สายพันธุ์

จึงควรมีการบ่งชี้ถึงสายพันธุ์ แต่การศึกษาโดยอาศัยความรู้ทางด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาอาจให้ข้อแตกต่างของแต่ละชนิดไม่ชัดเจน รวมทั้งต้องใช้ผู้ที่มีประสบการณ์และเชี่ยวชาญพิเศษ จึงควรมีการคัดเลือกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสมุนไพร ทั้งเพื่อการบ่งชี้สายพันธุ์ การอนุรักษ์พันธุ์ และหาสารสกัดจากสายพันธุ์ต่างๆ อย่างจำเพาะมากขึ้น ซึ่งผลการวิจัยจะช่วยสนับสนุนการจัดจำแนกสายพันธุ์ให้ถูกต้อง และรวดเร็ว รวมทั้งเพื่อประโยชน์ต่อการนำไปใช้ที่ให้มีผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค และมีโอกาสพัฒนาไปเป็นยาต่อไป

การนำสมุนไพรมาใช้เนื่องจากไม่มีผลข้างเคียงกับผู้ป่วยเหมือนยารักษาโรคที่ได้มาจากการสังเคราะห์ทั่วไป แต่ก็ไม่ให้การรักษาเฉพาะเจาะจงกับโรคเนื่องจากไม่ได้มีเฉพาะสารใดสารหนึ่ง ดังนั้นสมุนไพรไทยจึงน่าจะมีการศึกษาอย่างจริงจัง ทั้งข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ สารประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือผลการรักษาทางคลีนิก ความเป็นพิษ และการทดสอบความเป็นพิษ รวมทั้งต้องมีการเพิ่มมูลค่าทางการค้า แต่ในปัจจุบันนี้การผลิตพืชสมุนไพรเพื่อเป็นการค้าในประเทศนั้นเป็นเพียงสมุนไพรผง ไม่ใช่สารสกัดสมุนไพร โดยการนำเอาพืชสมุนไพรนั้นมาอบแห้งแล้วบดเป็นผง แล้วบรรจุเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายตามท้องตลาด และยังไม่มีการระบุถึงคุณภาพ และสารสำคัญในสมุนไพร จึงควรมีการอนุรักษ์สมุนไพรที่พบในประเทศไทย พร้อมทั้งมีการหาสารสกัด ศึกษาคุณสมบัติ พัฒนาผลผลิตทั้งปริมาณและคุณภาพ ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ หรือกับเซลล์มะเร็ง รวมทั้งความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม เพื่อการนำไปใช้อย่างถูกต้องและเหมาะสมทั้งในเรื่องของชนิดของเซลล์มะเร็ง และระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง แต่ไม่มีผลกระทบหรือเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1.2.1 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสายพันธุ์ของต้นจักรนารายณ์จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทยโดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

1.2.2 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบของต้นจักรนารายณ์

1.2.3 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบของต้นจักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และหาระดับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดการเป็นพิษโดยวิธี MTT test

1.2.4 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบของต้นจักรนารายณ์ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (human lymphocyte) ในอาหารเพาะเลี้ยง และหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ก่อให้เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมในอาหารเพาะเลี้ยง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นจักรนารายณ์จากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย โดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา, เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และ DNA Sequenceing บริเวณ non-coding regions ของ chloroplast DNA (cpDNA) ที่ยีนตำแหน่ง *trn*L และศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบของต้นจักรนารายณ์กับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง 5 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cells: MCF-7), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer cells: HT-29), เซลล์มะเร็งในช่องปาก (oral cancer cell: KB cell), เซลล์ไตลิง (monkey kidney cells: Vero cell) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (leukemia cell in rats: P388) และศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 5 ชนิด คือ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida utilis*

1.4 ทฤษฎี

ปัจจุบันนิยมหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอในการหาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของพืชดอก Taberlet et al. (1991) ได้ทำการศึกษาไพรเมอร์ชนิดใหม่ขึ้นมา เพื่อใช้ในการจำแนกพืช โดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของ tobacco , marchantia และ rice บริเวณยีน *trn*T (UGU) และ *trn*F (GAA) ซึ่งเป็น single-copy region ขนาดใหญ่ที่มีความจำเพาะ และพบว่ายีน *trn* เป็นยีนอนุรักษ์ เมื่อออกแบบไพรเมอร์ เพื่อให้มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน tRNA 6 ชนิด คือ a, b, c, d, e, และ f แสดงดังตารางที่ 1 โดยไพรเมอร์ a และ b ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*T(UGU) และ *trn*L(UAA) 5'exon

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไพรเมอร์ c และ d ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*L(UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon และไพรเมอร์ e และ f ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*L (UAA) 3'exon และ *trn*F (GAA) ขนาดของ PCR product ที่คาดว่าจะพบมีขนาด 773, 833 และ 251 bp. ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ a และ b ขนาด 577, 614 และ 389 bp. ตามลำดับ เมื่อใช้ ไพรเมอร์ c และ d และ ขนาด 438, 324 และ 158 bp. ตามลำดับเมื่อใช้ไพรเมอร์ e และ f ในพืชชนิด tobacco , marchantia และ rice เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิดนี้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใน algae, bryophytes, pteridophytes, gymnosperms และ angiosperm จำนวน 19 สายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ c และ d สามารถจำแนกพืชดังกล่าวได้มากชนิดที่สุด คือจำแนกได้ถึง 15 ชนิดใน 19 ชนิด จึงนิยมนำไพรเมอร์ c และ d มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของพืช

ตารางที่ 1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ universal primer จำนวน 6 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding region ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ

Name	sequence 5' – 3'
a	CATTACAAATGCGATGCTCT
b	TCTACCGATTTCGCCATATC
c	CGAAATCGGTAGACGCTACG
d	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
e	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
f	ATTTGAACTGGTGACACGAG

สารสกัดหยาบ (crude extract) เป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากสมุนไพรโดยใช้ตัวทำละลาย สารสกัดอย่างหยาบนี้เป็นของผสมองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งมักเรียกว่า สารสำคัญ (active constituents)

Jong and Chou-Hwang (1997) เก็บส่วนยอดของ *Gynura formosana* มาทำแห้งและสกัดด้วยเมทานอลร้อน ภายหลังจากการทำให้เข้มข้นจะได้สารสกัดหยาบ 15 กรัม ละลายในเฮกเซน ส่วนที่ไม่ละลายนำมาละลายในเอธิลอะซิเทรต นำส่วนที่สกัดได้จากเอธิลอะซิเทรตมาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีและตรวจสอบโครงสร้างของสารโดย UV, MS, H-NMR ได้สาร chromanoneชนิดใหม่ คือ 6-acetyl-2-hydroxymethyl-2'-methylchroman-4-one

Lin et al. (2000) นำรากของ *Gynura elliptica* มาทำแห้ง สกัดด้วยคลอโรฟอร์มและตรวจสอบโครงสร้างของสารโดย UV, IR, H-NMR, MS พบสาร p-hydroxyacetophenone-like

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

derivative, (+)-gynunone และ chromane กับสารประกอบอีก 6 ชนิด ในจำนวนสารทั้งหมดที่แยกได้ 6-acetyl-2,2-dimethylchroman-4-one และ vanillin จะสามารถป้องกันการรวมตัวกันของเกล็ดเลือดเมื่อถูกชักนำโดยกรดอะราชิโดนิค (arachidonic acid) ในหลอดทดลอง

จุฑามาศก์ (2544) ได้ศึกษาสูตรโครงสร้างและการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดและน้ำคั้นของจักรนารายณ์ (*G. procumbens*) ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริมในปริมาณที่มากเพียงพอต่อการพัฒนาและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากจักรนารายณ์ โดยเทคนิค HPLC ได้สาร phytosterol และ phytosteryl glucoside จากสารสกัดคลอโรฟอร์ม และทำการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีโดยเทคนิค NMR ซึ่งสกัดสาร phytosteryl glucoside สามารถแยกได้ในปริมาณมากและเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริม ปริมาณของ phytosteryl glucoside ที่พบในสารสกัด เอทานอลและในน้ำคั้นที่ทำให้แห้งด้วยความเย็น คือ 0.35% w/w และ 0.096% w/w ตามลำดับ

Chen et al. (2009) นำส่วนยอดของ *G. divaricata DC* มาทำแห้ง สกัดด้วยเอทานอล 95% นำมาแยกส่วนโดยใช้ตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ และน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดต่อด้วยเอธิลอะซิเทรต นำส่วนเอธิลอะซิเทรตมาแยกในคอลัมน์โครมาโตรกราฟี ได้ 20 ส่วน นำส่วนที่ 14 (5 กรัม) มาแยกในคอลัมน์โดยใช้เอธิลอะซิเทรต : เมทานอล 10 : 1 ได้สารประกอบ (1) ปริมาณ 7 มิลลิกรัม วิเคราะห์หาโครงสร้างของสารด้วย NMR ได้ cerebroside ชนิดใหม่ คือ 1-0-β-D-glucopyranosyl-(2S,3S,4R,10E)-2-[(2'R)-2'-hydroxyltricosanoyl-amino]-10-octadecene-1,3,4-triol ซึ่งเป็น Sphingolipid ชนิดหนึ่งที่อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ โดยมีรายงานว่า Sphingolipids เช่น ceramide และ glucosylceramides เป็นส่วนสำคัญที่จะเป็นต่อผนังเซลล์และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณในโมเลกุลทำให้เซลล์มีคุณสมบัติต่าง ๆ รวมทั้งทำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง เกิดอะพอพโตซิส และตอบสนองต่อแรงเค้น (stress responses)(Teng et al., 2008) ซึ่ง *G. divaricata* มี Sphingolipid ชนิดหนึ่งที่อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ มีหลายวิธี ในงานวิจัยนี้จะทำการทสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มีหลายวิธี ซึ่งวิธีการย้อมสี trypan blue เป็นวิธีที่สะดวกที่สุด ซึ่งสามารถใช้ตรวจเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต และเซลล์ที่ตายได้ โดยใช้เทคนิคสีย้อมที่เรียกว่า dry exclusion method ซึ่งทำให้เซลล์ตายติดสี ขณะที่เซลล์เป็นไม่ติดสี และการตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay โดยใช้สาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) เป็นวิธีที่ใช้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง โดยข้อดีของวิธีนี้ คือ สาร MTT ที่อยู่ในรูปสารละลายสีเหลืองสามารถเข้าสู่เซลล์ที่มีชีวิตเนื่องจากเซลล์จะนำสาร MTT ไปใช้เป็นพลังงานของเซลล์โดยนำเข้าสู่ไมโตคอนเดรียของเซลล์ และเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) และโคแฟกเตอร์ (cofactor) ที่มีอยู่ใน ไมโตคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตจะ

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้เพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ที่ใช้

รีดิวส์สารละลาย MTT ไปเป็นผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ซึ่งมีสีม่วง ผลึกฟอร์มาซานนี้จะแสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ดังเช่น Zhang and Tan (2000) ได้ทำการศึกษาสารสกัดเอทานอลจากใบ *Gynura procumbens* ในการตรวจสอบเกี่ยวกับระดับกลูโคส คลอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของหนูทดลองโดยการให้หนูทดลองกินสารสกัดเอทานอลจากใบจักรนารายณ์ 1 ครั้ง เพื่อตรวจสอบกลูโคสในกระแสเลือดของหนูที่ทดลองที่เป็นเบาหวานและหนูปกติ ผลที่ได้พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลจากใบ *G. procumbens* 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือเท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เหมาะสมที่สุดในการลดระดับกลูโคสในกระแสเลือด ซึ่งในหนูปกติจะไม่มีผลการเปลี่ยนแปลง เมื่อทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วจึงนำไปให้หนูที่เป็นเบาหวานกินสารสกัดเอทานอลจากใบ *G. procumbens* 14 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสามารถลดระดับคลอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวานได้

Iskander et al. (2002) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการลดการอักเสบติดเชื้อ ที่มีอยู่ในสารสกัดอทานอลอย่างหยาบจากใบ *G. procumbens* พบว่า สามารถลดการอักเสบของหูหนูทดลองได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลจากใบ *G. procumbens* 0.75 มิลลิกรัมต่อหูหนูทดลอง โดยมีเปอร์เซ็นต์การลดการอักเสบของหูหนูทดลอง 65.2 เปอร์เซ็นต์โดยสารสกัดเฮกเซนและโทลูอีนจากใบ *G. procumbens* ชนิดเดียวกันพบว่าสามารถลดการอักเสบของหูหนูทดลองได้ 44.6 เปอร์เซ็นต์ และ 34.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสเตอรอยด์จากสารสกัดเอทานอลจากใบ *G. procumbens* มีผลในการลดการอักเสบของหูหนูทดลองได้ดีที่สุด แต่สารสกัดที่ได้จากน้ำนั้นไม่มีผลในการลดการอักเสบของหูหนูทดลอง โดยยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์ และสารพันธุกรรมของสารสกัดจาก *G. procumbens* ในหลอดทดลอง

Chen et al. (2009) นำส่วนยอดของ *G. divaricata DC* มาทำแห้ง สกัดด้วยเอทานอล 95% นำมาแยกส่วนโดยใช้ตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ และน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดต่อด้วยเอธิลอะซิเทรต นำส่วนเอธิลอะซิเทรตมาแยกในคอลัมน์โครมาโตรกราฟี ได้ 20 ส่วน นำส่วนที่ 14 (5 กรัม)มาแยกในคอลัมน์โดยใช้เอธิลอะซิเทรต : เมทานอล 10 : 1 ได้สารประกอบ (1) ปริมาณ 7 มิลลิกรัม นำสารประกอบที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10, 20 µg/mL มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L1210 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ของลิวคีเมียในหลอดทดลอง พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ L1210 ได้ 92, 93, 95 และ 95% ตามลำดับ แสดงว่ามีความเป็นพิษสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ อุปกรณ์

2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ทำการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างต้นจักรนารายณ์ จากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย นำตัวอย่างที่เก็บได้มาเพาะปลูกที่กรุงเทพมหานคร และตัวอย่างของว่านมหากาฬ (*G. psudochina*) ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกัน รวมทั้งพืชในวงศ์เดียวกัน คือ บานชื่น (*Zinnia violacea*) และกระดุมทองเลื้อย (*Wedelia trilobata*)

2.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.2.1 *Escherichia coli* DMST 4212

2.1.2.2 *Bacillus cereus* DMST 5040

2.1.2.3 *Staphylococcus aureus* TISTR 118

2.1.2.4 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

2.1.2.5 *Candida utilis* TISTR 5046

2.1.3 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ

2.1.3.1 บีกเกอร์ (beaker)

2.1.3.2 กระบอกตวง (cylinder)

2.1.3.3 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)

2.1.3.4 ขวดแก้ว (bottle) ขนาดต่างๆ

2.1.3.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

2.1.3.6 แท่งแก้วงอ (spreader)

2.1.3.7 เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลม (needle)

2.1.3.8 เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลมงอ (hook)

2.1.3.9 ห่วงเขี่ยเชื้อปลายกลม (loop)

2.1.3.10 คอกบอร์เรอร์ (cock borer)

2.1.3.11 ปากคีบ (forcept)

2.1.3.12 หลอดทดลอง (tube) ขนาด 0.2, 0.5, 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร

2.1.3.13 ลูกยาง (rubber bulb)

2.1.3.14 ช้อนตักสารเคมี (spatular)

2.1.3.15 โกร่ง และที่บด (mortar and pestle)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.16 คาร์ลิเปอร์ชนิดอัตโนมัติ (digital caliper)

2.1.3.17 ปีเปตต์ (pipette) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

2.1.3.18 ปีเปตแบบอัตโนมัติ (pipette boy)

2.1.3.19 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

2.1.3.20 ทิป (tip) ขนาดต่างๆ

2.1.3.21 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (flask)

2.1.3.22 ตะเกียง (burner)

2.1.3.23 คิวเวท (cuvette)

2.1.3.24 สไลด์แก้ว (glass slide)

2.1.3.25 กระจกปิดสไลด์ (cover slip)

2.1.3.26 ชุดอุปกรณ์การกรองพร้อมกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

2.1.3.27 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

2.1.3.28 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)

2.1.3.29 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

2.1.3.30 ตู้เย็น (refrigerator) หรือตู้แช่แข็ง (deep freeze)

2.1.3.31 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

2.1.3.32 กล้องจุลทรรศน์ชนิด bright field

2.1.3.33 กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted

2.1.3.34 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)

2.1.3.35 เครื่องชั่ง (balance)

2.1.3.36 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)

2.1.3.37 เครื่องช่วยผสม (vortex)

2.1.3.38 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

2.1.3.39 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

2.1.3.40 เครื่องเขย่า (shaker or rotator)

2.1.3.41 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

2.1.3.42 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler)

2.1.3.43 เครื่องอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

2.1.3.44 เครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ (UV transilluminator)

2.1.3.45 ชุดถ่ายภาพเจล (gel document)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 วัสดุ และสารเคมี

2.1.4.1 ยาปฏิชีวนะ gentamycin

2.1.4.2 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด nutrient broth (NB), nutrient agar (NA), Mueller-Hilton agar

2.1.4.3 อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 และ MEM

2.1.4.4 ซีรั่ม (Fetal bovine serum: FBS)

2.1.4.5 ไฟโตฮีแมกกลูตินิน (Phytohemagglutinin-M: PHA)

2.1.4.6 เฮปาริน (heparin)

2.1.4.7 สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride)

2.1.4.8 น้ำยาคงสภาพ (fixative solution)

2.1.4.9 โคลชิมิด (colcemid)

2.1.4.10 ฟอสเฟตไวน์บัฟเฟอร์ (phosphate wise buffer)

2.1.4.11 สีย้อม Gimsa

2.1.4.12 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (phosphate buffer saline: PBS)

2.1.4.13 ทริปซิน (Trypsin)

2.1.4.14 เฮกเซน (hexane)

2.1.4.15 เอธิลอะซิเตรท (ethyl acetate)

2.1.4.16 เอทานอล (ethanol)

2.1.4.17 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

2.1.4.18 DMSO

2.1.4.19 แอลกอฮอล์ (alcohol)

2.1.4.20 น้ำกลั่น (distilled water)

2.1.4.21 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

2.1.4.22 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปชุด DNeasy plant mini kit ของบริษัท Qiagen

2.1.4.23 บัฟเฟอร์ (buffer) เช่น ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ tris borate EDTA (TBE) เป็นต้น

2.1.4.24 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (deoxynucleotide, dNTPs) ของบริษัท Roche

2.1.4.25 ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase) บริษัท New England Biolabs

2.1.4.26 ไพร์เมอร์ (primer) 1 คู่ คือ ไพร์เมอร์ c (CGAAATCGGTAGACGCTACG) และไพร์เมอร์ d (GGGGATAGAGGGACTTGAAC) ตาม Taberlet *et al.* (1991) (Invitrogen)

2.1.4.27 เจลอะกาโรส (agarose gel)

2.1.4.28 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromind)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การเก็บตัวอย่างต้นจักรนารายณ์

ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างต้นจักรนารายณ์ จากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย เก็บใบอ่อนจำนวน 1-2 ใบ เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ พร้อมนำกิ่งมาเพาะปลูกที่กรุงเทพมหานคร เพื่อศึกษาลักษณะของการเจริญ และใช้สำหรับการนำมาสกัดอย่างหยาบ รวมทั้งการเก็บตัวอย่างใบของว่านมหากาฬ (*G. psudochina*) ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกัน และพืชในวงศ์เดียวกัน คือ บานชื่น (*Zinnia violacea*) และกระดุมทองเลื้อย (*Wedelia trilobata*)

2.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นจักรนารายณ์

เมื่อสำรวจตัวอย่างต้นจักรนารายณ์ บันทึกรายละเอียดลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะของลำต้น ใบ สิ่งปกคลุมใบ ตายอด ตาข้าง เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกสายพันธุ์ และเมื่อนำมาปลูกที่กรุงเทพ เพื่อให้อยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน สังเกตและบันทึกลักษณะการเจริญ

2.2.3 การศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

2.2.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบของจักรนารายณ์ ว่านมหากาฬ บานชื่น และกระดุมทองเลื้อย จำนวน 1-2 ใบ ที่เก็บมาได้มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำมาบดโดยไนโตรเจนเหลว พร้อมทั้งตักตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Plant DNA Extraction (Vivantis, Malaysia) โดยใช้วิธีการตามคู่มือของชุดสกัดดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอมาวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอทางด้านคุณภาพและปริมาณ โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของวุ้นอะกาโรสร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า กระแสไฟฟ้า 100 โวตต์ พร้อมทั้งเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ขนาด 10,000 คู่เบส หรือ λ Hind III หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และดูแผ่นเจลภายใต้แสงยูวีจากเครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ สำหรับการวิเคราะห์ทางด้านปริมาณทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร นำมาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในขั้นต่อไป

2.2.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA: cpDNA) ตำแหน่ง *trn*L intron ระหว่าง *trn*L (UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon ด้วยคู่ไพร์เมอร์ c (CGAAATCGGTAGACGCTACG) และไพร์เมอร์ d (GGGGATAGAGGGACTTGAAC) ตาม Taberlet *et al.* (1991) โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม ไพร์เมอร์ c และ d (Invitrogen) ความเข้มข้น 0.8 พิโคโมล (*p*M) ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสความเข้มข้น 1 ยูนิต บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1 เท่า และน้ำ นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สภาวะดังนี้ ขั้น initiation denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที ขั้น annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 นาที ขั้น elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ และตามด้วยขั้น final elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบ PCR product จากทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ที่มีความเข้มข้นวุ้นอะกาโรสร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 100 คู่เบส เก็บรักษา PCR product ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2:2.3.3 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำ PCR product ดังกล่าว ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Tech Dragon Limited เขตบริหารพิเศษฮ่องกงแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีน นำผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST (Altschul และคณะ, 1990) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และจัดจำแนกกลุ่ม วิเคราะห์หา phylogenetic tree ทั้งเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ภายในสกุลเดียวกัน คือ ว่านมหากาฬ (*G. psudochina*) และ *G. formosana* (AF 460136) (Pelser *et al.*, 2002) จากฐานข้อมูล GenBank และพืชในวงศ์เดียวกัน คือ บานชื่น (*Zinnia violacea*) และกระดุมทองเลื้อย (*Wedelia trilobata*) โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 ในการตรวจสอบและแก้ไขความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่างแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.83 และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยโปรแกรม Phylip package version 3.6 ที่รวมการใช้งานหลายโปรแกรม คือ Seqboot, Dnadist, Neighbor และ Consense ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 และใช้วิธี Neighbor-joining เมื่อได้ phylogenetic tree จึงกำหนดรูปแบบแผนภูมิด้วยโปรแกรม Tree view version 1.6.6

2.2.4 การสกัดสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์

นำใบจักรนารายณ์มาล้างให้สะอาด จากนั้นนำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดความชื้นออกจากตัวอย่าง ทำการอบจนกว่าน้ำหนักของตัวอย่างคงที่ นำตัวอย่างที่ได้มาบดให้มีขนาดชิ้นเล็กลง นำตัวอย่างมาห่อด้วยผ้าขาวบางแล้วแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอทานอล ตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนใบจักรนารายณ์ (กรัม): สารสกัด (มิลลิลิตร) เท่ากับ 1: 10 ห่อภาชนะด้วยฟอยด์เพื่อป้องกันไม่ให้สารตัวอย่างโดนแสง ทำการเขย่าตัวอย่างบนเครื่องเขย่าที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 วัน ในแต่ละตัวทำละลาย นำสารละลายที่ได้มากรอง และนำไประเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง Evaporator จนได้สารสกัดหยาบ พร้อมนำบางส่วนส่งวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS)

2.2.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disc diffusion

2.2.5.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดสอบ

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจักรนารายณ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อยีสต์ ได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 4212, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida utilis* TISTR 5046 โดยเชื้อแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient agar (NA) และเชื้อยีสต์จะเพาะเลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 37 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้วใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีเดี่ยว (single colony) 1 โคโลนี มาทำให้อยู่ในรูปสารละลายเซลล์แขวนลอย โดยแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) และในยีสต์จะเพาะเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) ที่อุณหภูมิ 37 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปตรวจสอบปริมาณ โดยการนำมาวัดความขุ่นที่ 625 นาโนเมตร ซึ่งควรมีความขุ่นที่ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.08 - 0.1 แล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

2.2.5.2 การเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบหยาบ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอทานอล มาละลายด้วย 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO โดยชั่งสารสกัดหยาบ 100 มิลลิกรัม จากนั้นใส่ DMSO 1 มิลลิลิตร จะได้ stock ของสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร นำ stock มาเจือจางให้ได้สารสกัดหยาบหยาบที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 1000 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดหยาบจาก stock มา 50 ไมโครลิตร ผสมกับเอธานอลปริมาตร 4950 ไมโครลิตร สารสกัดหยาบที่ได้จะมีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร เมื่อต้องการทดสอบให้เจือจางสารละลายด้วยเอธานอลในระดับความเข้มข้นต่างๆแล้วจึงนำไปทดสอบ

2.2.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disc diffusion

เมื่อได้สารละลายเซลล์แขวนลอยที่มีจำนวนเซลล์ที่ต้องการแล้ว นำไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารละลายเซลล์แขวนลอยมาสตรีคให้ทั่วหน้าอาหารแข็งโดยแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงในอาหาร mueller-hilton agar และเชื้อยีสต์จะเพาะเลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(PDA) จากนั้นรอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง และตัวควบคุมทางบวก (ยาปฏิชีวนะ), 1%DMSO และตัวควบคุมทางลบ (เอธานอล) และสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงในกระดาษ AA disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร โดยใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อ disc รอให้แห้ง ใช้ปากคีบแผ่น disc วางลงบนจานเพาะเลี้ยงที่ทำการสตรีคเชื้อแล้ว โดยให้สารสกัดหยาบ ตัวควบคุมทางบวกและตัวควบคุมทางลบอยู่ในจานเพาะเลี้ยงเดียวกัน สำหรับเชื้อแบคทีเรียนั้นจะเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และเชื้อยีสต์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของสารสกัดหยาบ โดยในการทดสอบฤทธิ์ต้านต่อเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ของสารสกัดหยาบ ด้วยวิธี disc diffusion นี้จะใช้ตัวควบคุมเชิงบวก คือยาปฏิชีวนะ gentamycin, ampicillin และ ketokonazole ที่ระดับความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์ผลการทดลองนั้นจะวิเคราะห์ใน 2 ซ้ำโดยนำมาหาค่าเฉลี่ย และในการวิเคราะห์ทางสถิตินำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลอง กับกลุ่มควบคุม

2.2.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์

2.2.6.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว

เลี้ยงเซลล์ชนิดเซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cells: MCF-7), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer cells: HT-29), เซลล์มะเร็งในช่องปาก (oral cancer cell: KB cell) และเซลล์ไตลิง (monkey kidney cells: Vero cell) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร การ subculture นั้นมีวิธีการปฏิบัติดังนี้ นำอาหารเก่าทั้งหมดออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ และใส่ PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นใส่สารละลายเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้เซลล์เริ่มหลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะ เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะแล้ว ทำการเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของสารละลายเอนไซม์ทริปซิน แบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และใส่อาหารให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดหยาบต่อไป

2.2.6.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดแขวนลอย

ทำการเลี้ยงเซลล์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (leukemia cell in rats: P388) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดแขวนลอย โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยในการ subculture ทำได้โดยดูดเซลล์ที่เลี้ยงอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 – 5 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนของอาหารเก่าทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วเขย่าหลอดทดลองเบาๆ เพื่อให้เซลล์ที่ตกตะกอนกระจายตัว จากนั้นเติมอาหารใหม่ลงไป 5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับเซลล์ ดูดพ่นให้เข้ากัน จากนั้นดูดเซลล์ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดหยาบต่อไป

2.2.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

2.2.7.1 การปลูกเซลล์ใน 96 - wells plate

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay โดยดัดแปลงวิธีการของ Hussain และคณะ (1993) ในการทดลองนี้จะทำการศึกษากับเซลล์ 5 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cells: MCF-7), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer cells: HT-29), เซลล์มะเร็งในช่องปาก (oral cancer cell: KB cell), เซลล์ไตลิง (monkey kidney cells: Vero cell) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (leukemia cell in rats: P388) ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารดังที่กล่าวมาแล้ว ในเซลล์ชนิดเกาะพื้นผิวทำการ trypsinization ด้วยทริปซินที่ความเข้มข้น 0.25% และสำหรับเซลล์ชนิด P388 เพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มีซีรัม 10% นำเซลล์ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 - 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเลี้ยงเซลล์ลงไปปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธีทริปแพนบลู จากนั้นปลูกเซลล์เริ่มต้นจำนวน 1 – 1.5 X 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร (1 – 1.5 X 10^4 เซลล์ต่อหลุม) ลงใน 96 - wells plate หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.7.2 การเตรียมสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอธิลอะซิเตรต และเอทานอล มาละลายด้วย 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO โดยชั่งสารสกัดหยาบ 100 มิลลิกรัม จากนั้นใส่ DMSO 1 มิลลิลิตร จะได้ stock ของสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร นำ stock มาเจือจางให้ได้สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 2000 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดหยาบจาก stock มา 100 ไมโครลิตร ในกรณีเป็นเซลล์ชนิด MCF-7, HT-29, KB และ Vero cell ผสมกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4900 ไมโครลิตร ในกรณีเป็นเซลล์ชนิด P388 ผสมกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ และทำการกรองสารละลายด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นเตรียมสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1000, 500, 250, 125 และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96 - wells plate ครบ 24 ชั่วโมง นำมาลงสารสกัดหยาบ โดยการนำ 96 – wells plate ที่บ่มไว้มาดูดอาหารเก่าออกโดยใช้เครื่องดูดสาร จากนั้นใส่สารสกัดหยาบที่เตรียมในระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงใน 96-wells plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยมีหลุมที่ไม่ต้องใส่สารสกัดหยาบ เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (negative control) หลุมที่ใส่เฉพาะอาหารที่

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีซีรัม 10% เพื่อใช้เป็น blank หลุมที่ใส่ DMSO ที่เจือจางในอาหารที่เติมซีรัม 10% ที่ระดับความเข้มข้น 2% เพื่อใช้ในการตรวจสอบว่าผลการทดลองเป็นผลมาจาก DMSO หรือไม่ และหลุมที่ใส่ Mitomycin C ที่เจือจางในอาหารที่เติมซีรัม 10% เพื่อใช้เป็น positive control จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

2.2.7.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดหยาบเป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง นำ 96 – wells plate มาใส่สารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นหุ้ม 96 – wells plate ด้วยกระดาษฟรอยด์เพื่อป้องกันแสง นำไปบ่มต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการดูดอาหารที่มีสารละลาย MTT โดยใช้เครื่องดูดสาร จากนั้นละลายผลึกฟอร์มาซานโดยเติมสารละลาย DMSO: ethanol 95% ปริมาตร 1: 1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micro plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ วาดกราฟระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด และความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ ในแกน y และ x ตามลำดับ จากนั้นหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ค่าการการมีชีวิตของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่ง (50% cytotoxicity: CC_{50})

2.2.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม

2.2.8.1 การเตรียมเลือด

ใช้ Heparin เคลือบกระบอกฉีดยาและเข็มเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นเปลี่ยนเข็มสำหรับเจาะเลือดเพื่อป้องกันไม่ให้ heparin เข้าสู่เส้นเลือด เจาะเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขนของบุคคลตัวอย่างที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงโดยเพศชาย 1 คนและเพศหญิง 1 คน ใช้เลือดประมาณ 5-10 มิลลิลิตรต่อคน

2.2.8.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ผสมกับ 10% Fetal bovine serum ในขวดปลอดเชื้อ หยดเลือดประมาณ 8-10 หยด ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดขวดและนำไปเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยดสารสกัดหยาบที่ต้องการศึกษาในกลุ่มทดลองปริมาตร 100 ไมโครลิตร และใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และ mitomycin C ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นกลุ่ม negative และ positive control ตามลำดับ ก่อนครบชั่วโมงที่ 72 ประมาณ 50 นาที หยดสารละลาย colcemid ตวามเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดการแบ่งเซลล์ นำไปเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 72 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ และในทุกขั้นตอนต้องปลอดเชื้อ

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.8.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์

หลังจากเลี้ยงเซลล์ครบ 72 ชั่วโมง นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเทใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นดูดส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง นำไปผสมให้เข้ากันเบาๆ บนเครื่องผสมสาร (vortex) เพื่อให้เซลล์กระจาย ใส่สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.075 โมล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 นาที ดูดส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง และทำซ้ำอีกครั้ง ตามด้วยการคงสภาพเซลล์โดยดูดส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง และค่อยๆใส่น้ำยาคงสภาพทีละหยด จนครบปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 นาที ทำซ้ำกัน 3-4 รอบจนได้ตะกอนขาวของเม็ดเลือดขาว

2.2.8.4 การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครโมโซม

ก่อนการหยดเซลล์บนสไลด์ให้ปรับความเข้มข้นของเซลล์ โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 นาที ดูดส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง และปรับความเข้มข้นด้วยน้ำยาคงสภาพให้เซลล์มีความขุ่นพอสมควร หยดเซลล์ที่ผ่านการปรับความเข้มข้นแล้วลงบนสไลด์สะอาดที่ขัดด้วยน้ำยาคงสภาพ 1-2 หยด แล้วหยดตามด้วยน้ำยาคงสภาพที่เย็น 1 หยด ปล่อยให้สไลด์แห้ง ย้อมสีเซลล์ด้วยสารละลายสี Giemsa ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ใน Phosphate wise buffer เป็นเวลา 5-7 นาที ตามด้วยการล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น ปล่อยให้แห้ง นำไปศึกษาทั้งจำนวนเมทาเฟส และการแตกหักของโครโมโซม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2.8.5 การศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์

ในการตรวจนับโครโมโซมจะนับเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสเท่านั้น เพื่อศึกษาผลของสารสกัดต่ออัตราการแบ่งเซลล์จะศึกษาจากค่า mitotic index เพื่อประเมินผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยนำสไลด์ตัวอย่างที่ย้อมสีแล้วมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวแบบสุ่ม โดยการนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส จากจำนวนเซลล์ทั้งหมด 2000 เซลล์ แล้วนำมาคำนวณหาค่า mitotic index จากสูตร

$$\text{Mitotic index} = [A / B] \times 100$$

เมื่อ A = จำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ในหน่วยทดลอง

B = จำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ในหน่วยควบคุม

2.2.8.6 การวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซม

การศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมศึกษาจากเซลล์ในระยะเมทาเฟสที่โครโมโซมกระจายดี โดยในเซลล์นั้นต้องมีจำนวนโครโมโซมไม่น้อยกว่า 45 และไม่เกิน 47 โครโมโซม และนับจากเซลล์ในระยะเมทาเฟสจำนวน 50 เซลล์ จดบันทึกชนิดของความผิดปกติและนับจำนวนที่เกิดความผิดปกติตามชนิดของความผิดปกตินั้นดังนี้

เอกสารนี้ได้รับการคุ้มครองลิขสิทธิ์ ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

- Single Chromatic gap (SG) เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในส่วนของโครมาทิดแท่งใดแท่งหนึ่ง แต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกัน และแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ให้นับเป็น 1 หักต่อ 1 SG

- Isochromatid gap (ISCG) เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในส่วนโครมาทิดทั้งสองแท่งของโครโมโซมเดียวกัน แต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกัน และแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ให้นับเป็น 2 หักต่อ 1 ISCG

- Single chromatid break (SB) เป็นความผิดปกติที่จะมีโครมาทิดแท่งหนึ่งเกิดการหักหรือขาดออกจากกันโดยสิ้นเชิง และแนวของปลายที่หักอาจอยู่หรือไม่อยู่ในแนวเดียวกัน ให้นับเป็น 1 หักต่อ 1 SB

- Isochromatid break (ISCB) เป็นความผิดปกติที่จะมีโครมาทิดทั้งสองแท่งหักออกจากกันโดยสิ้นเชิง และแนวของปลายที่หักอาจอยู่หรือไม่อยู่ในแนวเดียวกัน ให้นับจำนวนหักเป็น 2 หักต่อ 1 ISCB

ในการคำนวณค่าเฉลี่ย จำนวนหักของโครโมโซม จะนับจำนวนหักทั้งหมดคำนวณหาค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มที่ศึกษา นำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองแต่ละระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายแต่ละตัว กับกลุ่มควบคุม

116122

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
ผล และอภิปรายผลการทดลอง

3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่างจักรนารายณ์ที่ใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้มีตัวอย่างทั้งหมด 32 ตัวอย่าง (GD 01 – GD 32) โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างต้นจักรนารายณ์ จากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย ดังตารางที่ 3.1 และนำตัวอย่างที่เก็บได้มาเพาะปลูกที่กรุงเทพมหานคร และตัวอย่างของว่านมหากาฬ (*G. psudochina*) ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกัน รวมทั้งบานชื่น (*Zinnia violacea*) และกระดุมทองเลื้อย (*Wedelia trilobata*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกัน

ตารางที่ 3.1 รหัส และแหล่งที่มาของตัวอย่างจักรนารายณ์ที่ใช้ในการศึกษา

รหัส	แหล่งที่มา	ไอโซเลต	แหล่งที่มา
GD 001	กรุงเทพฯ	GD 017	กรุงเทพฯ
GD 002	หนองคาย	GD 018	ตราด
GD 003	กรุงเทพฯ	GD 019	ปราจีนบุรี
GD 004	จันทบุรี	GD 020	ชลบุรี
GD 005	จันทบุรี	GD 021	ฉะเชิงเทรา
GD 006	จันทบุรี	GD 022	แพร่
GD 007	พิษณุโลก	GD 023	นครสวรรค์
GD 008	ลพบุรี	GD 024	ประจวบคีรีขันธ์
GD 009	ระยอง	GD 025	สุราษฎร์ธานี
GD 010	กรุงเทพฯ	GD 026	ภูเก็ต
GD 011	สมุทรสงคราม	GD 027	นนทบุรี
GD 012	สิงห์บุรี	GD 028	นครนายก
GD 013	หนองคาย	GD 029	ขอนแก่น
GD 014	นครราชสีมา	GD 030	ปราจีนบุรี
GD 015	กรุงเทพฯ	GD 031	สมุทรปราการ
GD 016	อยุธยา	GD 032	ชัยภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

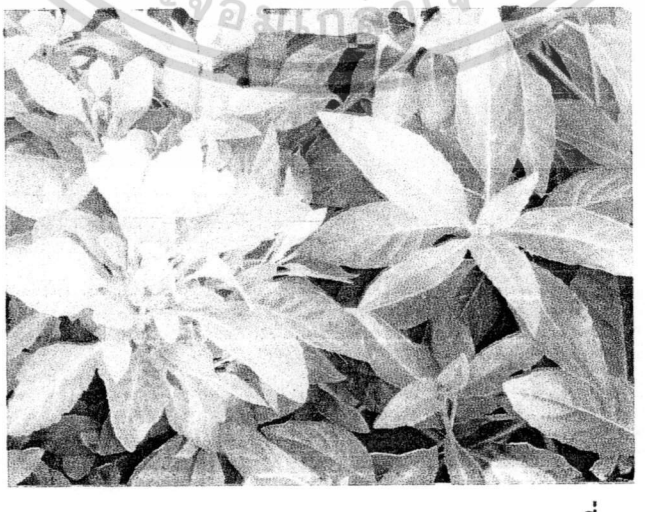
3.2 ผลการศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาของจักรนารายณ์

ในการบ่งชี้สายพันธ์ด้วยลักษณะทางสันฐานวิทยา คือ *Gynura divaricata* (L.) DC. จากลักษณะต่างๆ คือ เป็นพืชที่มีทั้งลำต้นและใบอวบน้ำ ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ แผ่นใบมีทั้งรูปร่างค่อนข้างกลม (รูปที่ 3.1 A) ถึงยาว (รูปที่ 3.1 B) แผ่นใบมีขอบใบเรียบ จนถึงขอบใบหยักจักซี่ฟันบนใบมีลักษณะเป็นขนอ่อนๆ ก้านใบมีขนาดยาวประมาณ 0.5- 5 เซนติเมตร ลำต้นมีสีเขียว จนถึงสีม่วง (รูปที่ 3.1 C) มีทั้งลำต้นที่ตั้งตรง และทอดเลื้อยไปตามพื้น และเป็นทรงพุ่ม (รูปที่ 3.1 D) รวมทั้งที่กิ่งมีการเจริญของตาข้าง (lateral หรือ axillary bud) จำนวนน้อย (รูปที่ 3.1 E) และมีการเจริญของตาข้างจำนวนมาก (รูปที่ 3.1 F) ซึ่งกิ่งประเภทที่มีการเจริญของตาข้างจำนวนน้อยมักจะยาวขึ้น และตั้งตรง หรือทอดยาวไปกับพื้น และใบมักจะยาวรี แต่สำหรับกิ่งที่มีการเจริญของตาข้างจำนวนมาก กิ่งประเภทนี้มักไม่ทอดยาว และใบมักจะค่อนข้างมนกลม

ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจักรนารายณ์จำนวน 32 ตัวอย่าง เป็นระยะเวลา 2 ปี โดยเมื่อนำกิ่งมาปลูกในแหล่งเดียวกัน พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความหลากหลาย โดยเมื่อนำกิ่งจากต้นเดียวกันมาและปลูกในบริเวณเดียวกันแล้วยังมีความแตกต่างกันทั้งลักษณะสีของลำต้นที่มีตั้งแต่สีม่วงเข้ม ไปยังเขียว รวมทั้งมีทั้งม่วงและเขียว ข้อที่แสดงความหลากหลายอีกลักษณะหนึ่ง คือ การที่กิ่งมีการเจริญของตาข้างจำนวนน้อย และมีการเจริญของตาข้างจำนวนมาก ซึ่งกิ่งประเภทที่มีการเจริญของตาข้างจำนวนน้อยมักจะยาวขึ้น ทำให้มีลักษณะของลำต้นตั้งตรงหรือทอดยาวไปกับพื้น และกิ่งที่มีการเจริญของตาข้างจำนวนน้อยจะมีลักษณะใบที่ยาวรีมากกว่า และสามารถปรากฏทั้ง 2 ลักษณะในต้นเดียวกันได้ (รูปที่ 3.2) สำหรับลักษณะของใบมีลักษณะค่อนข้างยาวมากกว่ากลมมน ใบมีความอวบน้ำ เส้นกลางใบมีสีเขียวปนม่วงเล็กน้อย โดยจะเจริญเติบโตได้ดีในที่มีแดด และจากการสังเกตจะไม่มีปัญหาจากแมลงศัตรูพืช แต่อย่างไรไม่ปรากฏการเกิดดอกได้ในระยะเวลาที่ปลูกในทุกตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Gynura divaricata* A: ใบรูปร่างค่อนข้างกลม, B: ใบเรียวยาว, C: ลำต้นมีสีเขียว จนถึงสีม่วง, D: ลำต้นตั้งตรง และเป็นพุ่ม, E: กิ่งที่มีตาข้างจำนวนน้อย และ F: กิ่งที่มีตาข้างจำนวนมาก



รูปที่ 3.2 แสดงความหลายหลายทางสัณฐานวิทยาของ *Gynura divaricata* ที่แสดงทั้งลักษณะใบ สีของกิ่ง และลำต้น และการเจริญของตาข้างที่ต่างกันแม้ว่าอยู่ในต้นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชสกุลว่านมหากาฬ (*Gynura* Cass.) มีการกระจายตัวมากในเขตร้อนของทวีปเอเชีย โดยมีความหลากหลายมากที่สุดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ของพืชวงศ์ทานตะวัน (Asteraceae) จากการศึกษาพบว่าเป็นการยากหากอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ในการจัดจำแนกพืชในสกุลนี้เพียงอย่างเดียว เนื่องจากมีความแปรผันในระดับสปีชีส์สูงมาก เช่น สีและลักษณะของลำต้นและใบ เป็นต้น (Davies, 1980; Vanijajiva, 2008) ในประเทศไทย Vanijajiva (2009) ได้จัดจำแนก และบ่งชี้สายพันธุ์พืชในสกุลนี้ได้ 10 สายพันธุ์ คือ *G. procumbens* (Lour.) Merr., *G. calciphila* var. *calciphila* Kerr, *G. calciphila* var. *dissecta* F.G. Davies, *G. integrifolia* Gagnep., *G. pseudochina* (L.) DC., *G. nepalensis* DC., *G. hmopaengnsis* H. Koyama, *G. cusimbua* (D.Don) S. Moore, *G. bicolor* (Roxb. Ex Willd.) DC. และคาดว่าจะเป็นพืชชนิดใหม่จำนวน 1 สายพันธุ์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการรายงานเพิ่มเติมในการพบพืชสกุลนี้ในประเทศไทยอีก 1 สายพันธุ์ คือ *G. divaricata* (L.) DC ที่เรียกชื่อทั่วไปว่า จักรนารายณ์ หรือแป๊ะตำปึง ซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพร

จักรนารายณ์ (*Gynura divaricata*) หรือ แป๊ะตำปึง จินฉี่เหมาเยี่ย กิมกอยมอเช่า หรือผักพันปี เป็นพรรณไม้ล้มลุกขนาดเล็กที่มีอายุหลายปี ลำต้น ก้านใบ และใบอวบน้ำ และมีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาสูง เช่น ลำต้นรวมถึงใบพบได้ตั้งแต่สีเขียวจนถึงม่วง ใบกลมจนถึงเรียวยาว เป็นต้น (Vanijajiva, 2008; Poeaim and Vanijajiva 2010) มีความเชื่อว่ามีสรรพคุณในการรักษาโรคได้หลายชนิด เช่น เบาหวาน เริม ความดันสูง และภูมิแพ้ เป็นต้น นอกจากนี้เชื่อว่าเป็นพืชชนิดนี้ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนตอนใต้ โดยมีชื่อเรียกทั่วไปว่า "Bai Bei San Qi" ที่นิยมนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพร (Chen *et al.*, 2009) โดยพืชชนิดนี้มีรายงานครั้งแรกโดย Linnaeus ในปี ค.ศ. 1838 ในชื่อ *Senecio divaricatus* ต่อมา De Candolle (1838) ได้มีการจัดและแบ่งกลุ่มใหม่โดยเปลี่ยนชื่อสกุลจาก *Senecio divaricatus* เป็น *Gynura divaricata* (L.) ซึ่งพบว่าสปีชีส์นี้มีเฉพาะในประเทศจีน ต่อมาในปี ค.ศ. 1979, Davies ได้ทำการศึกษาพืชในสกุล *Gynura* ในทวีป Eastern Asia และเทือกเขา Himalayas และจัดกลุ่มพืชในสกุลนี้ไว้ 9 สปีชีส์ โดย *G. divaricata* มี 3 subspecies คือ subsp. *divaricata*, subsp. *barbareifolia* และ subsp. *formosana* แต่อย่างไรก็ตามพบว่า *G. divaricata* มีความสับสนกันกับ *G. procumbens* ซึ่งมีการแพร่กระจายอยู่ในทวีป Southeast Asia เช่นกัน และมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับ *G. procumbens* อย่างมากโดยเฉพาะด้านสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Zhang, et al., 2000; Iskander, et al., 2002; Kim, et al., 2006)

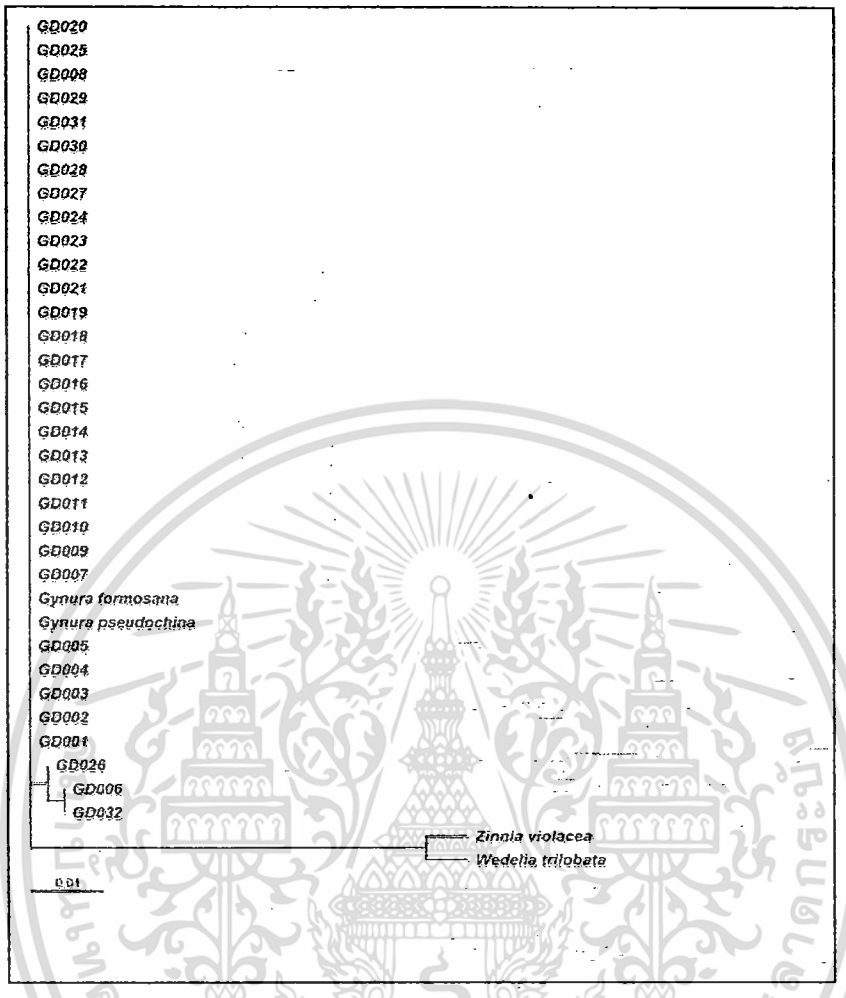
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

ในการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล โดยเทคนิค PCR ในตำแหน่ง *trn*L (UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon ด้วยคู่ไพร์เมอร์ c และ d ในทุกตัวอย่าง พบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอเพียงขนาดเดียวประมาณ 550 คู่เบส ซึ่งมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอใกล้เคียงกับยาสูบที่มีขนาดประมาณ 577 คู่เบส (Taberlet *et al.*, 1991) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง GD001-032 กับ *G. psudochina* และ *G. formosana* ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกัน รวมทั้งพืชในวงศ์เดียวกัน คือ *Z. violacea* และ *W. trilobata* มาวิเคราะห์ ดังแสดงในรูปที่ 3.3 ซึ่งพบว่า *Z. violacea* และ *W. trilobata* แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจน แต่ไม่แตกต่างทั้งในระดับสปีชีส์ และระดับสกุล ยกเว้น GD006, GD026 และ GD032 ที่มาจากจังหวัดจันทบุรี ภูเก็ต และขอนแก่น ตามลำดับ การที่จักรนารายณ์เป็นพืชที่ปลูกได้ง่ายโดยการปักชำ และเชื่อว่านำมาจากประเทศจีนเพื่อใช้เป็นพืชสมุนไพร จึงอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างพืชส่วนใหญ่ไม่แสดงความแตกต่างกันเนื่องจากมาจากแหล่งเดียวกัน

จึงอาจกล่าวว่าในการศึกษาพืชในสกุล *Gynura* ในตำแหน่ง *trn*L (UAA) intron ด้วยคู่ไพร์เมอร์ชนิด c และ d มีข้อจำกัดในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสปีชีส์ และในระดับสกุล ดังที่ Vanijajiva (2008) พบว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างสกุลในระดับต่ำ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาตำแหน่งอื่นๆ ทั้งในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ เช่น ตำแหน่ง *trnT-L* intergenic spacer หรือ *trnK* intron และในไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ตำแหน่ง ITS1, 5.8S และ ITS2 ดังเช่น Pelser และคณะ (2002) ที่สามารถแยกความแตกต่างของ *Senecio* sect. *Jacobaea* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ทานตะวันเช่นกัน รวมทั้งการใช้ marker อื่น เช่น RAPD เพื่อประกอบการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.3 phylogenetic tree ของจักรนารายณ์ จำนวน 32 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับ *G. psudochina*, *G. formosana*, *Z. violacea* และ *W. trilobata* ในบริเวณ *trn*L (UAA) intron โดยใช้พารามิเตอร์ Neighbor-joining method โดยเลขแสดงค่าที่มาจากค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000

3.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS) โดยได้ทำการศึกษาจากการสกัดหยาบจากใบของจักรนารายณ์ 2 ครั้ง ในการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ครั้งที่ 1 พบมีสารทั้งหมด 41, 27 และ 25 พีค สำหรับครั้งที่ 2 พบมีสารทั้งหมด 72, 52 และ 52 พีค ตามลำดับ ปริมาณสารที่พบที่มากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 3.2 โดยพบสารที่ทราบโครงสร้างทั้งในชั้นเฮกเซน และเอธิลอะซิเทรตส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหญ่ คือ Naphthalene และ Hexadecanoic acid และในชั้นเอธานอล พบ 9, 12, 15-Octadecatrien-1-ol (15.31) และ Hexadecanoic acid โดยสารที่พบโดยส่วนใหญ่เป็นกรดไขมัน เช่น hexadecanoic acid หรือ กรดปาล์มิติก (palmitic acid): $CH_3(CH_2)_{14}COOH$ ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัว โดยทั่วไปพบในพืชน้ำมัน เช่น น้ำมันปาล์ม หรือไขปลาวาฬ แต่สารที่ควรได้รับความสนใจในการศึกษาครั้งนี้ คือ แนพทาลีน ซึ่งสารนี้เป็นของแข็งหรือผลึกสีขาว มีกลิ่นแรง ไม่ละลายน้ำ ระเหิด หรือเปลี่ยนสถานะจากของแข็งกลายเป็นไอได้ที่อุณหภูมิห้อง แนพทาลีนพบในถ่านหิน น้ำมันปิโตรเลียม และการเผาไหม้ของสารประกอบอินทรีย์ เช่น ไม้และบุหรี่ ปัจจุบันนำแนพทาลีนไปใช้ประโยชน์ต่างๆ เช่น ใช้ในการผลิตพลาสติกพีวีซี เรซิน สารฟอกหนัง สีย้อม สารฆ่าแมลงคาบาริล หรือนำไปใช้โดยตรง เช่น ลูกเหม็น เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกกำจัดที่ตับและขับออกทางปัสสาวะ แนพทาลีนจะระคายเคืองต่อตา จมูก คอ และผิวหนัง การได้รับแนพทาลีนในปริมาณมาก เช่น จากการกินลูกเหม็น ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน และเมื่อได้รับปริมาณมาก เม็ดเลือดแดงจะถูกทำลาย ทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง หรืออาจทำให้เสียชีวิตได้ ดังนั้นเมื่อเป็นสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในใบของจักรนารายณ์ที่ประชาชนทั่วไปนำมารับประทาน จึงควรมีการประเมิน หรือวิเคราะห์ในรายละเอียด เพราะอาจทำให้เกิดการสะสมจนก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายได้ รวมทั้งมีแนวโน้มในการนำไปใช้ประโยชน์ในการกำจัดแมลง เช่น การนำใบแห้งไปใช้ป้องกันแมลงสาบในตู้เสื้อผ้า เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS จำนวน 2 ครั้ง

Hexane		**Ethyl acetate**		**Ethanol**	
ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 1**	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 1**	**ครั้งที่ 2**
Delta.-cadinene, Naphthalene (13.67)	Delta.-cadinene, Naphthalene (10.02)	Delta.-cadinene, Naphthalene (15.58)	Delta.-cadinene, Naphthalene (3.88)	Neophytadiene (5.08)	Ethyl.alpha.-d-glucopyranoside (5.93)
Naphthalene (8.78)	Naphthalene (19.00)	Naphthalene (10.31)	Naphthalene (4.64)	Hexadecanoic acid (11.43)	Hexadecanoic acid (12.67)
Eicosane (7.19)	Hexadecanoic acid (21.05)	Neophytadiene (9.34)	Hexadecanoic acid (11.53)	9, 12, 15-Octadecatrien-1-ol (15.31)	Octadecadienoic acid (8.14)
Beta.-Sitosterol (6.29)	Phytol, Hexadecen (6.38)	Hexadecanoic acid (6.82)	Octadecadienoic acid (5.83)	Hentriacontane (13.73)	9, 12, 15-Octadecatrien-1-ol (8.98)
	Octadecadienoic acid (14.97)	Octadecadienoic acid (5.79)	Stigmastan (5.64)	Stigmastan (5.13)	23S-Ethylcholest-5-en-3.beta.-ol (9.60)
		b-sitrosterol (8.27)	23S-Ethylcholest-5-en-3.beta.-ol (8.37)	23S-Ethylcholest-5-en-3.beta.-ol (11.74)	
41	72	27	52	25	52

ปริมาณใน () มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

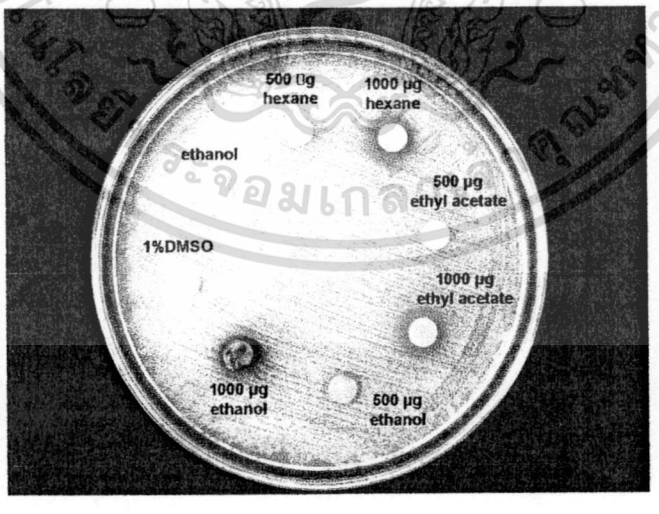
3.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี disc diffusion

นำส่วนของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอลที่ความเข้มข้น 1000 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะ คือ gentamycin, ampicillin และ ketokonazole ที่ระดับความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion โดยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ทดสอบ คือ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 4212, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pseudomonas*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

aeruginosa ATCC 27853 และ *Candida utilis* TISTR 5046 โดยใช้ยาปฏิชีวนะต่างชนิดกันตามความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ คือ *E. coli* และ *S. aureus* ใช้ ampicillin เป็น positive control ส่วน *B. cereus* และ *P. aeruginosa* ใช้ gentamycin เป็น positive control และ *C. utilis* ใช้ ketokonazole เป็น positive control และทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง พบว่าสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล นั้น ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใดๆ ได้ เนื่องจากไม่พบบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (inhibition zone) หรือบริเวณที่เชื้อไม่เจริญจึงเห็นเป็นบริเวณใส (clear zone) ของเชื้อ *E. coli, S. aureus, B. cereus* และ *P. aeruginosa* โดยในแต่ละการทดลองมีเพียงยาปฏิชีวนะเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดย gentamycin ที่ระดับความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.00, 30.20, 20.80 และ 20.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ

สำหรับเชื้อ *C. utilis* สารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอลที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ แต่ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญได้ โดยพบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.93, 9.26 และ 8.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดย 1%DMSO และ ethanol ที่ใช้เป็นตัวทำละลายไม่แสดงผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. utilis* ดังรูปที่ 3.4 และมี ketokonazole เป็น positive control มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 26.50 มิลลิเมตร (ไม่ได้แสดงข้อมูล)



รูปที่ 3.4 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. utilis* ของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ที่ความเข้มข้น 1000 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 1%DMSO และ ethanol ที่ใช้เป็นตัวทำละลายเป็นตัวเปรียบเทียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay โดยดัดแปลงวิธีการของ Hussain และคณะ (1993) ซึ่งเป็นการทดสอบการทำงานของเซลล์จากความสามารถในการทำงานของไมโทคอนเดรียในการรีดิวซ์สาร 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) โดยเซลล์ที่มีชีวิต และมีการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติ เอนไซม์ dehydrogenase และ cofactor ในไมโทคอนเดรียจะรีดิวซ์ MTT ให้กลายเป็นผลึก formazan ได้ ดังนั้นเมื่อนำสารละลาย MTT ไปบ่มในเซลล์ที่ต้องการทดสอบ เซลล์ที่ไมโทคอนเดรียทำงานปกติจะรีดิวซ์ MTT ให้เป็น formazan ที่มีสีม่วง โดยเซลล์ที่ตายนั้นจะมีลักษณะใสไม่มีสี ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะติดสีม่วง ซึ่งเมื่อนำมาละลายในตัวทำละลายจะได้สารละลายสีม่วง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ ซึ่งนิยมรายงานผลเป็นความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50})

ในการทดลองนี้จะทำการศึกษากับเซลล์ 5 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cells: MCF-7), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer cells: HT-29), เซลล์มะเร็งในช่องปาก (oral cancer cell: KB cell), เซลล์ไตลิง (monkey kidney cells: Vero cell) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (leukemia cell in rats: P388) นำมาทดสอบกับสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอทานอล เมื่อพิจารณาในแต่ละเซลล์ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากใบของต้นจักรนารายณ์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ที่ทำการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ที่ระดับความเข้มข้น 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ที่ทำให้เซลล์ชนิด MCF7 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50}) เท่ากับ 1439.18, 1620.27 และ 978.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3.5 A) เซลล์ชนิด HT29 มีเฉพาะสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนเท่านั้นที่มีระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (CC_{50}) คือ 1671.85ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดหยาบในชั้นเอธิลอะซิเทรต และเอธานอล เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงที่สุดที่ใช้ในการทดสอบ (maximal concentration tested: MCT) คือ $\geq$ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ยังมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3.5 B) สำหรับเซลล์ชนิด KB ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นเอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (CC_{50}) เท่ากับ 1616.43 และ 1508.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงที่สุดที่ใช้ในการทดสอบ คือ $\geq$ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการอยู่รอดของเซลล์ยังมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3.5 C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับเซลล์ชนิด Vero cell มีเฉพาะสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนเท่านั้นที่มีระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (CC_{50}) คือ 1040.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดหยาบในชั้นเอธิลอะซิเทรต และเอธานอล เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงที่สุดที่ใช้ในการทดสอบ คือ $\geq$ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการอยู่รอดของเซลล์ยังมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3.5 D) และเซลล์ชนิด P388 ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นเอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (CC_{50}) เท่ากับ 1000.38 และ 1648.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงที่สุดที่ใช้ในการทดสอบ คือ $\geq$ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการอยู่รอดของเซลล์ยังมากกว่า 50% (รูปที่ 3.5 E) แสดงรายละเอียดของความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50}) ในเซลล์ชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอทานอล ที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ต่อเซลล์ชนิดต่างๆด้วยวิธี MTT assay

Crude extract	50% cytotoxic concentration (CC_{50})				
	MCF7	HT29	KB	Vero cell	P388
Hexane	1439.18	1671.85	>MCT	1040.55	>MCT
Ethylacetate	1620.27	>MCT	1616.43	>MCT	1000.38
Ethanol	978.86	>MCT	1508.74	>MCT	1648.56

MCT = maximal concentration tested ($\geq$ 2000 µg/ml)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบยาปฏิชีวนะชนิด Mitomycin C กับเซลล์ชนิดต่าง เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมชนิดบวก โดย Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40, 80 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (CC_{50}) ในเซลล์ชนิด MCF-7, HT-29, KB, Vero cell และ P388 เท่ากับ 52.49, 99.34, 82.34, 88.15 และ 49.77 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3.5 F)

ซึ่งการศึกษาสารสกัดหยาบจากใบของต้นจักรนารายณ์นี้สอดคล้องกับการศึกษาของสุพัตรา และคณะ (2551) ที่ทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากใบจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 0, 0.078, 0.156, 0.313, 0.6, 25, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบว่าค่า CC_{50} ของสารสกัดที่สกัดหยาบด้วยเอทานอลจากใบ

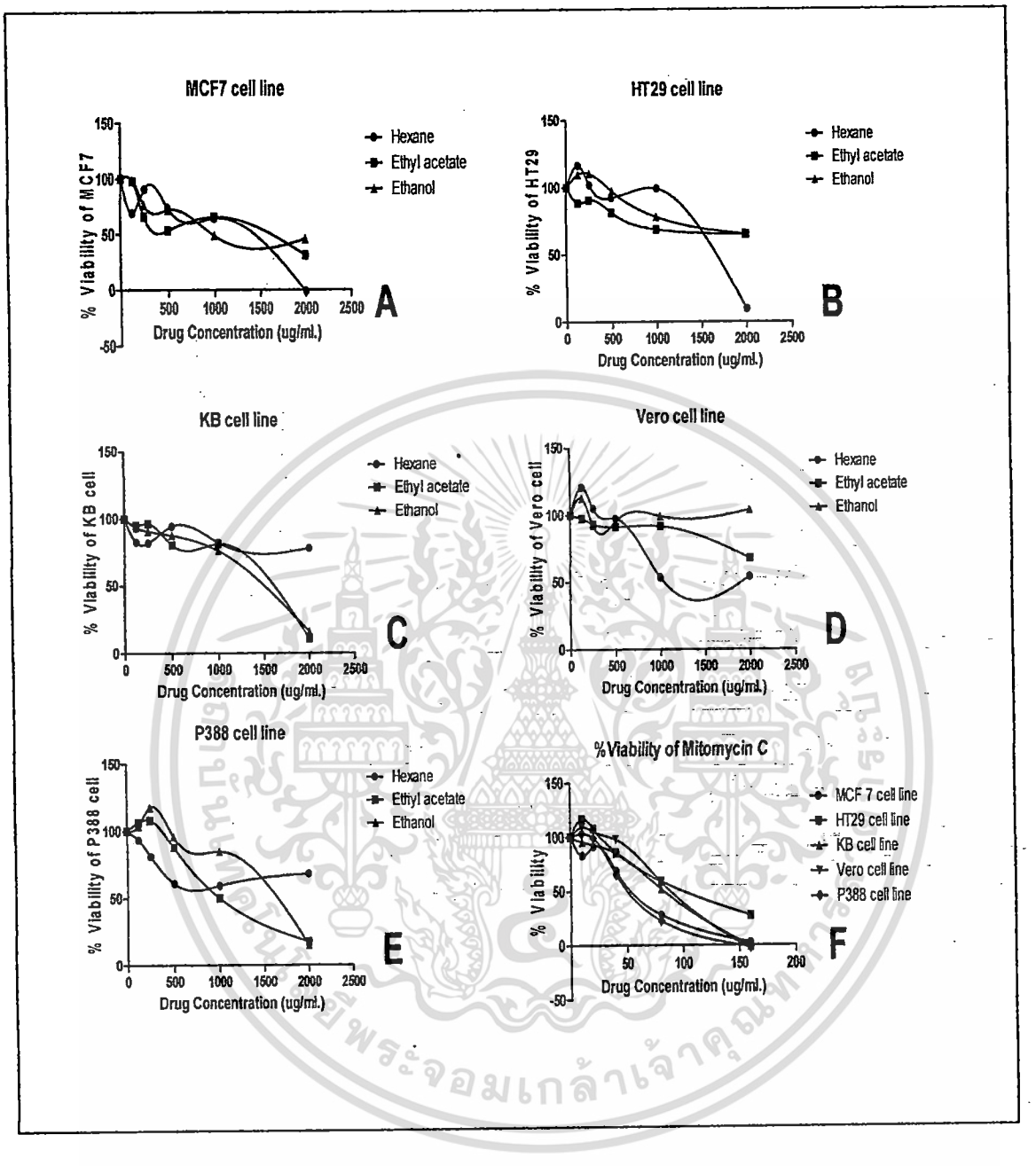
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของต้นจักรนารายณ์มีค่าเท่ากับ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำกลั่นไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด L929 เช่นเดียวกับ Iskender et al. (2002) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ในการลดการอักเสบติดเชื้อในหูหนูทดลองของสารสกัดอย่างหยาบจากใบ *Gynura procumbens* โดยใช้สารสกัด 4 ชนิด คือ เอทานอล เฮกเซน โทลูอีน และน้ำกลั่น พบว่าสารสกัดจากเอทานอลมีฤทธิ์ในการลดการอักเสบติดเชื้อได้มากที่สุด แต่สารสกัดน้ำกลั่นไม่มีผลในการลดการอักเสบติดเชื้อในหูหนูทดลอง โดยสามารถลดการอักเสบติดเชื้อได้ 62.5, 44.6, 34.8 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดนั้น Zhang และ Tan (2000) ที่ทำการศึกษาสารสกัดเอทานอลจากใบ *Gynura procumbens* ที่มีผลต่อระดับน้ำตาลกลูโคส คลอเรสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในเลือดหนูทดลอง พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคส คลอเรสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในเลือดหนูทดลองได้ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด คือ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Kim และคณะ (2006) ที่ศึกษาผลของสารสกัดต่อการลดความดันโลหิตสูง โดยให้หนูกินสารสกัดจากใบของ *Gynura procumbens* ขนาด 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักของหนูทดลอง 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สามารถลดความดันโลหิตสูงของหนูทดลองได้ รวมทั้ง Sriwanthana และคณะ (2007) ที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 8 ชนิดต่อการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte proliferation) ในหลอดทดลอง โดยมี *Gynura procumbens* รวมอยู่ด้วย พบว่าสารสกัดจากใบที่ระดับสูงกว่า 1 μg/ml. สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการแบ่งเซลล์มากขึ้น จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดนี้สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในหลอดทดลองได้ ซึ่งอาจนำมาใช้ในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้

มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในพืชสกุล *Gynura* เช่น pyrrolizidine alkaloids, terpene coumarin และ spirostene derivatives (Yuan, et al., 1990; Lin, et al., 2000) อย่างไรก็ตาม Dai และคณะ (2007) รายงานว่าโรคตับชนิด hepatic veno-occlusive disease (HVOD) มีความสัมพันธ์กับการรับประทานรากของ *G. segetum* และ Chen และคณะ (2009) พบว่าสารประกอบที่มีความสำคัญที่ได้จากใบของ *G. divaricata* คือ cerebroside และพบว่า cerebroside ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด L1210 (L1210 murine leukemic cell) ได้ 92, 93, 95 และ 95% ตามลำดับ

สารสกัดจากธรรมชาติโดยเฉพาะสมุนไพรเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคต่างๆ แม้ว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการทดสอบแบบเบื้องต้น (screening method) เนื่องจากมีปัจจัยอีกหลายชนิดที่มีผลต่อการทดลอง เช่น อายุของต้นจักรนารายณ์ สถานที่เพาะปลูก และส่วนต่างๆ ของต้น เป็นต้น ดังนั้นก่อนที่จะนำสารสกัดจักรนารายณ์หรือสมุนไพรอื่นมาใช้จะต้องมีการศึกษาวิจัยอย่างจริงจังเพื่อให้มีข้อมูลที่ถูกต้องและครบถ้วน ทั้งเรื่องของเมทาบอลิซึม การกำจัดสาร ตลอดจนพัฒนารูปแบบการใช้ให้มีความทันสมัยยิ่งขึ้น

เอกสารนี้มีไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.5 อัตราการอยู่รอดของเซลล์จากสารสกัดหยาบจากใบของต้นจักรนารายณ์ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอทานอล ในเซลล์ชนิดต่างๆ A: เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cells: MCF-7), B: เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer cells: HT-29), C: เซลล์มะเร็งในช่องปาก (oral cancer cell: KB cell), D: เซลล์ไตลิง (monkey kidney cells: Vero cell), E: เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (leukemia cell in rats: P388) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ และ F: Mitomycin C ที่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการแบ่งเซลล์ หลังการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเติมสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต เอธานอล และ Mitomycin C ที่ใช้เป็นกลุ่ม positive control และน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ใช้เป็นกลุ่ม negative control ทำการบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ และกระจายเซลล์บนสไลด์ เมื่อนับเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดจำนวน 2,000 เซลล์ และคำนวณจำนวนเซลล์เมทาเฟส นำไปหาค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (Mitotic index) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใส่เฉพาะน้ำกลั่น ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3.4 ดังนี้

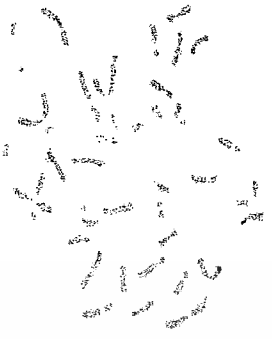
ตารางที่ 3.4 แสดงผลของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ที่ระดับความเข้มข้น 40 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำกลั่น และ Mitomycin C ต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์	จำนวนซ้ำ	ค่า mitotic index (%)		
		เฮกเซน	เอธิลอะซิเทรต	เอธานอล
Negative Control	3	100^{a}	100^{a}	100^{a}
20 µg/ml	3	66.94^{b}	50.89^{b}	42.26^{b}
40 µg/ml	3	27.17^{c}	21.27^{c}	25.02^{c}
Possitive Control 10 µg/ml	3	20.27^{c}		

หมายเหตุ : อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความค่าแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เมื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ที่ระดับความเข้มข้น 40 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำกลั่น และ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อความผิดปกติของโครโมโซม พบว่าในกลุ่มที่เติมเฉพาะน้ำกลั่นไม่พบความผิดปกติ (รูปที่ 3.6 A) สำหรับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบความผิดปกติน้อยมาก โดยพบเพียง single chromatid gap เพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น แตกต่างจาก Mitomycin C ที่แสดงความผิดปกติของโครโมโซมทั้งชนิด single chromatid gap, isochromatid gap, single chromatid break และ isochromatid break (รูปที่ 3.6 B)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



A B

รูปที่ 3.6 แสดงลักษณะโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน A: โครโมโซมของคนปกติ และ B: ความผิดปกติของโครโมโซมที่ได้รับ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
สรุป และเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสายพันธุ์ของต้นจักรนารายณ์จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทยโดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (human lymphocyte) ในอาหารเพาะเลี้ยง รวมทั้งฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ในการบ่งชี้สายพันธุ์ด้วยลักษณะทางสันฐานวิทยาของจักรนารายณ์ คือ *Gynura divaricata* (L.) DC. และเมื่อศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจักรนารายณ์จำนวน 32 ตัวอย่าง, *G. psudochina* และ *G. formosana* ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกัน รวมทั้งพืชในวงศ์เดียวกัน คือ *Zinnia violacea* และ *Wedelia trilobata* โดยเทคนิค PCR ในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ตำแหน่ง *trn*L (UAA) intron ด้วยคู่ไพร์เมอร์ c และ d แสดงความหลากหลายในระดับสปีชีส์ต่ำ จึงไม่สามารถนำไพร์เมอร์คู่นี้มาใช้ศึกษาความหลากหลายในสกุลว่านมหากาฬได้

เมื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS) โดยสารที่พบโดยส่วนใหญ่เป็นกรดไขมัน เช่น hexadecanoic acid หรือ กรดปาล์มิติก (palmitic acid): $CH_3(CH_2)_{14}COOH$ ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัวโดยทั่วไปพบในพืชน้ำมัน แต่สารที่ควรได้รับความสนใจในการศึกษาครั้งนี้ คือ แนพทาลีน (Naphthalene) โดยสารนี้เมื่อได้รับปริมาณมาก เม็ดเลือดแดงจะถูกทำลาย ทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง หรืออาจทำให้เสียชีวิตได้ ดังนั้นประชาชนที่รับประทานอย่างต่อเนื่อง อาจทำให้เกิดการสะสมจนก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายได้ รวมทั้งมีแน้วโน้มในการนำไปใช้ประโยชน์ในการกำจัดแมลง เช่น การนำใบแห้งไปใช้ป้องกันแมลงสาบในตู้เสื้อผ้า

เมื่อนำส่วนของสารสกัดหยาบจากใบจักรนารายณ์ในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอลที่ความเข้มข้น 1000 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion ใน *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida utilis* พบเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *C. utilis* ได้

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 5 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์ไตลิง (Vero) และ เซลล์มะเร็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เม็ดเลือดขาวในหนู (P388) จากสารสกัดหยาบจากใบของจักรนารายณ์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอธิลอะซิเตรท และเอทานอล ด้วยวิธี MTT assay ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (125, 250, 500, 1000 และ 2000 µg/ml) พบความแป็นเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ 50 % (50% Cytotoxicity Concentration) ในทุกชั้นของสารสกัดมีความเข้มข้นมากกว่า 1000 µg/ml ยกเว้นสารสกัดหยาบจากใบของจักรนารายณ์ในชั้นเอทานอล ต่อเซลล์ MCF-7 มีค่า CC_{50} ที่ระดับความเข้มข้น 978.86 µg/ml และในทุกความเข้มข้นในทุกๆตัวทำละลายไม่มีผลต่อความผิดปกติของโครโมโซม โดยผลจากการศึกษาในครั้งนี้แม้ว่าสารสกัดมีฤทธิ์ในการต้านทานต่อเชื้อ *C. utilis* และจะเป็นพิษต่อเซลล์ได้ต้องใช้ในระดับความเข้มข้นสูง แต่พบว่ามีสารที่เป็นองค์ประกอบชนิด Naphthalene จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคต่อไป รวมทั้งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมการนำพืชชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ในเรื่องของการกำจัดแมลง โดนเฉพาะแมลงสาปต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จุฑามาศก์ แสงไสย์. 2544. การแยก การพิสูจน์โครงสร้าง และการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดและน้ำคั้นของแป๊ะตำปึงโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟีที่ใช้แรงดันสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิตภาควิชาเภสัชเคมีและพฤกษเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศิริเพ็ญ จริเกษม. 2543. การศึกษาทางพฤกษเคมีของสารต้านไวรัสเริมจากแป๊ะตำปึง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

ยุวลักษณ์ ผายดี. 2541. การขยายพันธุ์แป๊ะตำปึงโดยวิธีในหลอดทดลอง และการวิเคราะห์ทางเคมีของกล้าเพาะเลี้ยง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

Aziz, D.M. 2006. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. Animal Reproduction Science. 92:1-8.

Chen, L., Wang, J.J., Song, H.T., Zhang, G.G. and Qin, L.P. 2009. New cytotoxic cerebroside from *Gynura divaricata*. Chinese Chemical Letters. 20: 1091–1093.

Chen, L., Li, H, Song, H. and Zhang, G. 2009. A new cerebroside from *Gynura divaricata*. Fitoterapia. 80: 517-520.

Dai, N., Yu, Y.C., Ren, T.H., Wu, J.G., Jiang, Y., Shen, L.G. and Zhang, J. 2007. *Gynura* root induces hepatic veno-occlusive disease: A case report and review of the literature. World Journal of Gastroenterology. 13: 1628-1631.

Davies, F.G. 1979. The genus *Gynura* (Compositae) in Eastern Asia and the Himalayas. Kew Bulletin. 33: 629-640.

Davies, F.G. 1980. The genus *Gynura* (Compositae) in Malesia and Australia. Kew Bulletin. 35: 711-734.

De Candolle, A.P. 1838. *Prodromus* VI. Paris: Treuttel & Wurtz.

Fotakis, G. and Timbrell, J.A. 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicology Letters. 160:171-177.

Holst, C.M. and Oredsson, S.M. 2005. Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lines. Toxicology in Vitro. 19: 379–387.

Iskander, M.N., Song Y., Coupar, I.M. and Jiratchariyakul, W. 2002. Antiinflammatory screening of the medicinal plant *Gynura procumbens*. Plant Foods for Human Nutrition. 57: 233-244.

Issa, Y., D.C. Watts, P.A. Brunton, C.M. Waters and A.J. Duxbury. 2004. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human fibroblast in vitro. Dent. Mater. 20: 12-20.

Jopse, J.C. and Mathew, P.M. 1990. Cytology of south Indian species of *Gynura* Cass. (Compositae). New Botanist; an International Quarterly Journal of Plant Science Research. 17: 133-141.

Kim, M.J., Lee, H.J., Wiryowidagdo, S. and Kim, H.K. 2006. Antihypertensive effects of *Gynura procumbens* extract in spontaneous hypertensive rats. Journal of Medicinal Food. 9: 587-590.

Lin, W.Y, Teng, C.M., Tsai, I.L. and Chen, I.S. 2000. Anti-platelet aggregation constituents from *Gynura elliptica*. Phytochemistry. 53: 833–836.

Pelser, P. B., Gravendeel, B. and van der Meijden, R. 2002. Tackling speciose genera: species composition and phylogenetic position of *Senecio* sect. *Jacobaea* (Asteraceae) based on plastid and nrDNA sequences. American Journal of Botany. 89: 929-939.

Poeaim, S., Pattamake, A., Praianan, A. and Petcharawan, O. 2008. Cytotoxicity of crude extracts from *Gynura divaricata* on L929 cell lines. Proceedings of 46th Kasetsart University Annual Conference: Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. p. 587-593.

Poeaim, S. and O. Vanijajiva. 2010. Morphological identification and in vitro cytotoxic evaluation of crude extracts from Jak-Na-Rai (*Gynura divaricata* (L.) DC.), pp. 436-439. In Proceedings of the 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology. 25-27 August 2510, Bangkok, Thailand.

Sriwanthana, B., Treesangsri, W., Boriboontrakul, B., Niumsakul, S. and Chavalittumrong, P. 2007.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

In vitro effects of Thai medicinal plants on human lymphocyte activity. Songklanakarin Journal of Science Technology., 29 (Suppl. 1): 17-28.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology. 17: 1105-1109.

Vanijajiva, O. 2008. Systematics and biogeography of Southeast Asian Senecioneae (Asteraceae): revision of *Cissampelopsis* and *Gynura* and hybridisation in the introduced *Crassocephalum*. Ph.D. Thesis. Johannes Gutenberg University, Mainz.

Vanijajiva, O. 2009. The genus *Gynura* in Thailand. Thai Journal of Botany. 1: 25-36.

Vahidi, H., Berry, D.R. and Harvey, L.M. 1998. MTT test (cytotoxicity test) as a tool for identification of bioactive compounds with TNF inhibitory effect from microbial source. Toxicology Letters. 95: 159.

Yuan, S.Q., Gu, G.M. and Wei T.T. 1990. Studies on the alkaloids of *Gynura segetum* (Lour.) Merr. Yaoxue Xuebao. 25: 191-197.

Zhang, X.F. and Tab, B.K. 2000. Effects of an ethanolic extract of *Gynura procumbens* on serum glucose, cholesterol and triglyceride levels in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Singapore Medical Journal. 41: 9-13.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียม PBS (1X)

ปริมาตรที่เตรียม 1,000 มิลลิลิตร

NaCl	8.0 กรัม
KCl	0.2 กรัม
KH_2HPO_4	0.2 กรัม
Na_2HPO_4	2.9 กรัม
น้ำกลั่น	

นำสารเคมีที่เตรียมไว้ ใส่ลงในบีกเกอร์ และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่า pH ของสารละลายให้ได้ 7.0 พร้อมปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ในกระบอกตวง นำไปทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียม Versene – EDTA (phenol red – EDTA)

ปริมาตรที่เตรียม 2,000 มิลลิลิตร

NaCl	16.0 กรัม
KCl	0.4 กรัม
Na_2HPO_4 (anhyd.)	2.3 กรัม
KH_2PO_4	0.4 กรัม
EDTA	0.4 กรัม
Phenol red	3.0 กรัม

นำสารเคมีที่เตรียมไว้ ใส่ลงในบีกเกอร์ และเติมน้ำกลั่น 1,800 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่า pH ของสารละลายให้อยู่ในช่วง 7.2 – 7.4 ปรับปริมาตรสารละลายด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่นให้เป็น 2,000 มิลลิลิตร ในกระบองตวง นำสารละลายที่เตรียมไปทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียมเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์

นำผงเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 25 กรัม/ลิตร ปริมาณ 2.5 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้นข้นของสารละลายทริปซินเป็น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการเจือจางสารละลายเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ 10 เท่า โดยนำสารละลายเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับ Versene – EDTA ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นทำการฆ่าเชื้อโดยกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.22 ไมครอน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียม Fetal bovine serum (FBS)

นำซีรั่มมาทำการ inactivate ที่อุณหภูมิ56 องศาเซลเซียส โดยการนำซีรั่มออกมาจากตู้เย็น เมื่อน้ำละลายแล้ว นำไปวางใน water bath ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมเปิดเครื่อง เมื่ออุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส แล้ว ให้เขย่าเบาๆ เป็นเวลานาน 30 นาที นำมาเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

5. การเตรียม Freezing medium

โดยเตรียมอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์มาผสมกับ 10% DMSO (อาหารปริมาตร 9 มิลลิลิตร กับ DMSO 1 มิลลิลิตร) ทำการฆ่าเชื้อโดยกรองผ่าน Millipore filter ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. การเตรียมทริปแพน บลู

ละลายผงทริปแพน บลูปริมาณ 0.5 กรัม ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน กรองเอาตะกอนออกด้วย Millipore filter ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. การนับเซลล์และการคำนวณเซลล์มีชีวิตด้วย Haemacytometer

เตรียมเซลล์ โดยถ้าเป็นเซลล์เกาะจะต้องทำการย่อยด้วยทริปซินก่อน แล้วใช้ปิเปตดูดพ่นเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ แขวนลอย ดูดเซลล์แขวนลอยปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาผสมกับ Trypan blue ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เตรียม Haemacytometer โดยวาง coverslip บน Haemacytometer ดูดเซลล์ที่ผสมกับ Trypan blue แล้ว มาใส่ลง Haemacytometer ดังรูป ก – 1 นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 และ 40 เท่า โดยเซลล์มีชีวิตจะไม่ติดสีฟ้าของ Trypan blue ส่วนเซลล์ไม่มีชีวิตจะติดสีฟ้าของ Trypan blue นับจำนวนเซลล์ใน 5 ช่องใหญ่ ดังรูป ก – 2 (ช่องตรงตัวอักษร A – E) จากนั้นบันทึกเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ทำการคำนวณเซลล์มีชีวิตต่อ 1 มิลลิลิตร จากสูตรดังต่อไปนี้

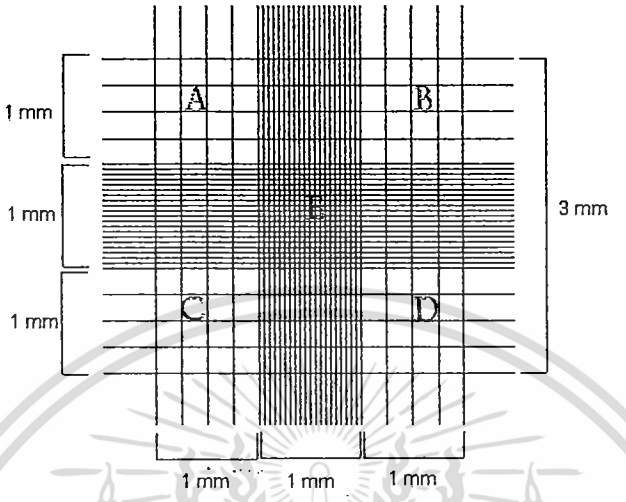
จำนวนเซลล์มีชีวิต/มิลลิลิตร = จำนวนเซลล์มีชีวิตเฉลี่ย X 10^4 X ค่าความเจือจาง (dilution factor)

% ความมีชีวิต = (จำนวนเซลล์มีชีวิต/จำนวนเซลล์ทั้งหมด) x 100

รูป ก - 1 แสดงการโหลดเซลล์ลง Hemacytometer

ที่มา : www.vivo.colostate.edu

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป ก - 2 แสดงบริเวณที่ใช้นับจำนวน A, B, C D และ E (Counting areas)

ที่มา : www.web.agri.cmu.ac.th/ppath/course/360301/lesson...

9. การเตรียมเซลล์เพื่อใช้ทดสอบ

นับเซลล์ด้วย Haemacytometer และคำนวนจำนวนเซลล์มีชีวิต นำค่าที่ได้มาเข้าสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

<u>ตัวอย่าง</u> ต้องการเตรียมเซลล์ให้ได้ 2.5×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ในอาหารปริมาตร 27 มิลลิลิตร

เซลล์มีชีวิตที่คำนวณได้เท่ากับ 4.28×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร

จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

แทนค่า $2.5 \times 10^4 \times 27 = 4.28 \times 10^5 \times V_2$

$V = 1.58$ mL

ดังนั้น ใช้เซลล์จากแขวนลอยที่เตรียมไว้ปริมาตร 1.58 มิลลิลิตร กับอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 25.423 มิลลิลิตร

10. การเตรียมสารละลาย MTT

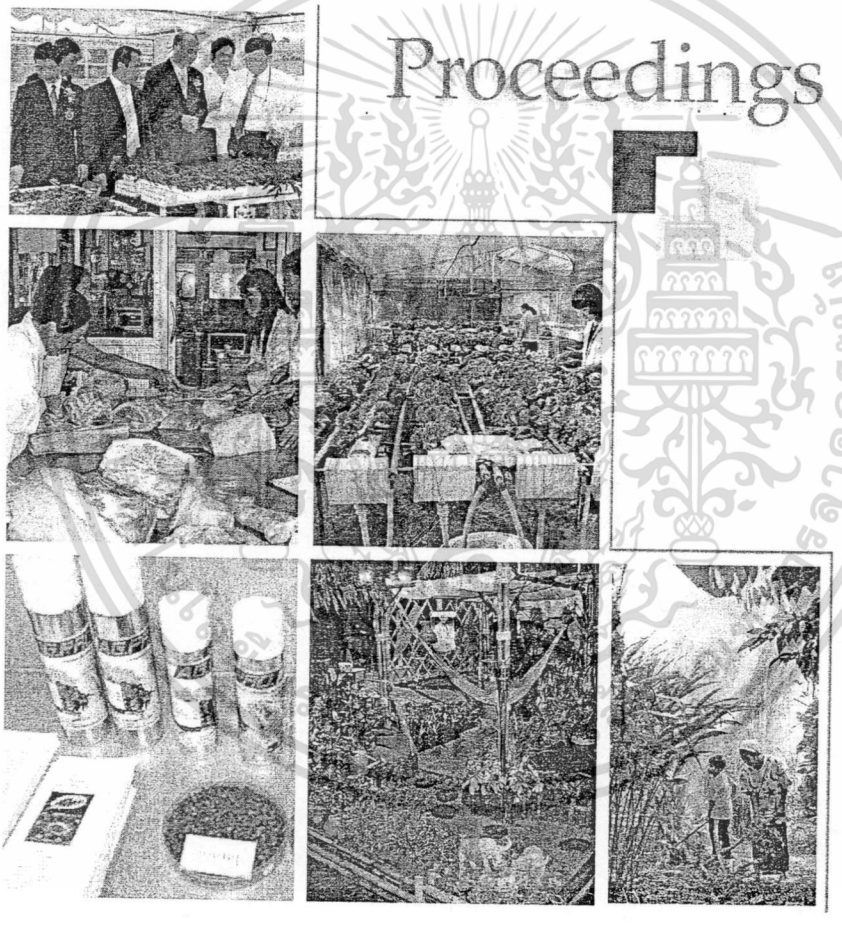
โดยใช้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ถ้าต้องการเตรียมปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยการละลายผง MTT ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ด้วยสารละลาย 1% PBS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เมตริกสเตอเลอร์ ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology

"Sufficiency Agriculture"

25-27 August 2010, Bangkok, Thailand



Organized by

Tokai University, JAPAN

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, THAILAND

Faculty of Agricultural Technology, KMITL, THAILAND

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

P1-22	**Effect of Pre Harvest Factors and Post Harvest Ripening Treatments on Response of Cavendish Bananas to 1-Methylcyclopropene** MORADINEZHAD, F.[1,2]*, A. ABLE and M. SEDGLEY	
P1-23	**Broomcorn Allelopathy on Corn, Lentil and Chickpea** VALIZADEH, V.*, S. BARGHI, P. BARZEGAR and K. RASHI	P409
P1-24	**Evaluation of Chickpea Cultivars Reaction to Chilling Stress in Germination and Primary Growth Stages** IMAMI, S.*, S. JAMSHIDI and S. AZARABADI	P413
P1-25	**Determination of the Salinity Tolerance Indices in Barley (*Hordeum volgare*) Varieties** GHOREISHI, S.M.[1]*, S.A. TABATABAEI[2] and A.R. AHRAR[1]	
P1-26	**Effect of Water Stress on Flower Yield and Yield Components of Saffron** AHRAR, A.R.* and S.M. GHOREISHI	
P1-27	**Effects of Salinity on Growth Parameters and Tolerance Threshold of Local Sorghum Lines at Germination Stage** AHRAR, A.R.[1]*, S.A. TABATABAEI[2] and S.M. NAGHIB ALGHORA[1]	
P1-28	**Evaluation of Physiological Indices of Salinity Tolerance in Forage Sorghum *(Sorghum bicolor)* Lines** TABATABAEI, S.A.[1]*, A.R. AHRAR[2], and S.M. NAGHIB ALGHORA[2]	
P1-29	**Determination of Growth and Yield of Rice (*Oryza sativa* L.) Based on Farmers' Practices in Thailand** KESARUK, P. and N. PHAKAMAS*	P417
P1-30	**Effects of Rice Growing Systems and PGPR on Nitrogen Fixation and Rice Yield** LONGTONGLANG, A.[1], N. BOONKERD[2], N. TEAUMROONG[2] and S. WONPRASAID[1]*	P421
P1-31	**Effect of Water Deficiency and Plant Density on Agronomic Traits of Two Soybean Cultivars (*Glycine max* L.) in Varamin-Iran** KHOSHOUEE, S.[1]*, R. ZARGHAMI[2], M.M. AKBAR BOOJAR[3], M. TARIGHALESLAMI[4] and M.M. TORABI[5]	P425
P1-32	**Allelopathic Effects of *Echinochloa colona* on the Growth of the Rice Plant** ISMAIL, B.S* and A.B. SIDDIQUE	P429
P1-33	**To Increase The Straw Mushroom Yield with *Bacillus* spp.** PAYAPANON, A.[1]*, S. SUTHIRAWUT[2], P. RUNGRAVEE[1], T. KULPIYAWAT[1] and A. SOMRITH[1]	P432
P1-34	**Morphological Identification and *In Vitro* Cytotoxic Evaluation of Crude Extracts from Jak-Na-Rai (*Gynura divaricata* (L.) DC.)** POEAIM, S.[1]* and O. VANIJAJIVA[2]	P436
P1-35	***In vitro* Multiplication of *Vanilla pilifera* from Axillary Bud Explants** POEAIM, A.[1]*, S. KHUNSRI,[1] K.SOYTONG[2] and T. KRAJANGVUTHI[3]	P440
P1-36	**Effects of Sowing Dates on Grain Yield and Morpho-Physiological Traits Associated with Terminal Drought Stress in Bread Wheat *(Triticum aestivum* L.*)* New Lines** HASSANPOUR, S.R.[1]*, S. MAHFOOZI[2], A. AMINI[2], S.M TOURABI[1], M. TARIGHALESLAMI[1] and A.H MOHSENBEIGI[1]	P444
P1-38	**Effect of Supplemental Irrigation on Grain Yield and Physiological Characteristics in Advanced Bread Wheat (*Triticum aestivum*) Genotypes** SHARIFI, E.*, E. LORESTANI and S. KASHFI	P448
P1-39	**Effect of Weeds and Seed Density on Grain Yield of Barley Varieties under Dryland Condition in Kermanshah** ZOLFAGHARI, M.*, E. SHARIFI, R. HAGHPARAST and M. GHASEMI	P452
P1-40	**A Selection of Suitable Cash Crops for Dry Season Planting (Tung Kula Ronghai Case Study)** CHAICHANROM, S. and B. EMARUCHI*	P456

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

P1-34

Morphological Identification and *In Vitro* Cytotoxic Evaluation of Crude Extracts from Jak-Na-Rai (*Gynura divaricata* (L.) DC.)

POEAIM, S.[1] and O. VANIJAJIVA[2]
[1]School of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand
[2]Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Rajabhat University, Bangkok 10220, Thailand
*Corresponding author: poeaim@hotmail.com

Abstract

Juk-Na-Rai (*Gynura divaricata* (L.) DC.: Asteraceae) is widely used in folk medicine to control cholesterol, diabetes, hypertension and inflammation. Morphologically, the species can be recognized by being fleshy in its upper parts but woody and procumbent at the base, by having ascending scapose or leafy flowering shoots, and ribbed stems which usually are purple-tinged when dried. A lot of people believed that this plant has high medicinal properties. However, the possible alterations caused by the use of herb indiscriminately can potentially cause damage to normal tissues. Thus, cytotoxic potential assessment is necessary to ensure the safe use of medicinal plants. The hexane, dichloromethane and ethanol were extracted from the leaves of *G. divaricata*. The cytotoxicity of the crude extracts was tested against mouse fibroblast cell line (L929) in culture using the MTT assay. L929 cells were grown in DMEM enriched with 10% fetal bovine serum at 37°C in humidified air containing 5% CO_2. The results obtained for L929 cell viability after 24 and 48 h of exposure to different concentrations (0.375, 0.75, 1.50 and 3.0 mg/ml). The cytotoxicity of hexane, dichloromethane and ethanol extracts was observed with the CC_{50} values (50% Cytotoxicity Concentration) of 2.19, 1.31 and 1.72 mg/ml for 24 hr whereas the CC_{50} produced for 48 hr were 1.71, 0.94 and 1.10 mg/ml, respectively. The dichloromethane extract showed stronger cytotoxic activity than the others. The results from this study shown that herb can be harmful in large or prolonged dosages. Therefore, some herbs should not be used indiscriminately. However, study on the molecular identification, bioactive compounds and other biological activities of *G. divaricata* should be extensively investigated in order to beneficial for Thai herbs development.

Keywords: cytotoxicity, *Gynura divaricata*, MTT Assay

Introduction

Many plants synthesize substances that can be extracted and used in the preparation of drugs, or the plants itself can be used directly as a medication. However, the possible alterations caused by the use of herb indiscriminately can potentially cause damage to normal tissues. Thus, cytotoxic potential assessment is necessary to ensure the safe use of medicinal plants. The genus *Gynura* Cass. (Asteraceae-Senecioneae) is one of the most species-rich genera of Senecioneae-Asteraceae occurring in tropical Asia with its highest diversity in Southeast Asia. This genus is considered to be difficult taxonomically and differences between species are small while intraspecific variation is large (Davies, 1980; Vanijajiva, 2008). Recently, this genus has been revised for Thailand, with ten taxa recorded (Vanijajiva, 2009). In this latest treatment, unseen one cultivated species indicated that there is a new species record *Gynura divaricata* (L.) DC. for Thailand which is popularly known as Juk-Na-Rai.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gynura divaricata (L.) DC. is a perennial herb with a native distribution in south China commonly known as "Bai Bei San Qi" with having a long traditional use in Chinese folk medicine (Chen *et al.*, 2009). This species was first described by Linnaeus in 1838 as *Senecio divaricatus*. After that, De Candolle (1838) transferred *Senecio divaricatus* into *Gynura divaricata* (L.) and noted that the species was known only from China. In 1979, Davies published a treatment of *Gynura* in eastern Asia and the Himalayas in which she recognized nine species including three subspecies of *G. divaricata* namely subsp. *divaricata*, subsp. *barbareifolia* and subsp. *formosana*. However, this plant is often confused with *G. procumbens* that is widely distributed in certain areas of southeast Asia. *G. procumbens* has a lot of reports on bioactive compounds and biological activity. On the other hand, *G. divaricata* has a little report on both bioactive compounds and biological activity. A new compound of this plant is cerebroside that showing strong cytotoxicity against L1210 leukemia cell line *in vitro* (Chen *et al.*, 2009).

G. divaricata has drawn wide attention during the last decade in Thailand because a lot of people believed that this plant has high medicinal properties and widely used as a vegetable and as a folk medicine. Recent studies suggest that *in vitro* cytotoxicity assays might be helpful in predicting toxicity and estimating toxic concentrations *in vivo*. Cytotoxicity assays such as LDH leakage, the neutral red and the MTT assay are widely used to determine cell viability following exposure to toxic substances. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) is a water soluble tetrazolium salt, which is converted to an insoluble purple formazan by cleavage of the tetrazolium ring by mitochondria dehydrogenases, which accumulate in healthy cells. This assay is a qualitative, more sensitive test and also high-throughput method than that has been documented in the literature for many different applications (Holst and Oredsson, 2005). Thus, the objective of this study was mainly focused on the morphological characteristics of *G. divaricata* and the cytotoxic potential of crude extract for various solvent system was also assessed on a mouse fibroblast cell line, L929 using the MTT assay.

Materials and Methods

Plant material

The plant Juk-Na-Rai, *G. divaricata* used in this experiment was grown in Bangkok, Thailand. Identification and classification of this species are based on their morphological characteristics. The fresh leaves were collected, oven dried at 45°C for 2-3 days, after that they were ground in a blender to powder. The powdered leaves were extracted using different organic solvents with increasing polarity (hexane, dichloromethane and ethanol) at room temperature. Supernatants were filtrated through a Whatman filter paper number 1 and concentrated by rotary evaporation at 40°C. The crude extracts were dissolved in DMSO. This solution was sterilized by filtration through 0.22 mm filters and kept at 20°C until use.

Cell cultures

The mouse fibroblast cell line (L929) was a kind gift from Dr. Porntipa Phicha (National Cancer Institute, Thailand). Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS in 5% CO_2 humidified incubator at 37°C. Cells in exponential growth phase were detached with 0.25% trypsin, centrifuged and the cell viability was determined by the tryphan blue dye exclusion method. The optimum cell concentration as determined by the growth profile of the cell line was 10^5cells/ml. Five thousand viable cells were seeded per individual 96-microplate wells and cultured for 24 h for cell adherence and growth.

Cell exposure to crude extracts and MTT assay

Modification of Mosmarin (1983) method was used. Briefly, exponentially growing cells were seeded into a 96-well plate and allowed to attach for 24 h before treatment. Cells were treated with 100 µl of those crude extracts within a range of concentrations from 0.375

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

to 3 mg/ml for 24 and 48 h. Fresh culture medium were used as negative control. After the exposure period, 50 µl of a 2 mg/ml solution of MTT was added to each well and incubated further for 4 h at 37°C. All the exposure conditions were tested in triplicate and photomicrographs were taken for cell morphological analysis. The MTT solution was then replaced with DMSO and ethanol (1:1) in order to dissolve a purple formazan product for 10 min under shaking. The absorbance was determined with a multi well spectrophotometer at 570 nm. Absorbance values were expressed as percentages relative to untreated controls. The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was defined as the concentration required for 50% cytotoxicity of cell growth.

Results and Discussion

For morphological identification, Description: *Gynura divaricata* (L.) DC., Prodr. 6 (1838) 301.-*Senecio divaricatus* L., Sp. Pl.: (1753) 866. Type: Osbeck s.n. (holo LINN photo), China, Canton.

Plants: 50-120 cm high, stems erect or procumbent, sparsely pubescent to glabrescent. *Petioles:* 0.5-5 cm long or leaves sessile, auricles 0.3-1 x 0.4-1.5 cm, pubescent to glabrescent. *Blades:* ovate, elliptical, lanceolate, oblanceolate or lyrate, 2-15 x 1.5-5 cm, sparsely to densely pubescent, base cordate or truncate, apex obtuse or acute, margin entire or distantly dentate. *Capitula:* 1-5 per corymb; peduncles 1-15 cm long, pubescent to subglabrous, bracts 3-7, pubescent to glabrescent; involucres 8-12 mm long, 5-7.5 mm in diameter; calycular bracts 7-8, 4-5 mm long, pubescent; phyllaries 12-14, 1-2 mm broad, sparsely pubescent. *Florets* c. 30-40, orange to yellow, 9-11 mm long, exserted part 2-3 mm long. *Anther:s* 3.5 mm long, anther collar short. *Style arms:* 2.5 mm long. *Cypselas:* 4-6 mm long, pilose; carpopodium hemispherical, yellowish; pappus 10-12 mm long, white or dirty-white. 2n = 20 (Jose and Mathew, 1990).

Table 1 Cytotoxic effects of *G. divaricata* extracts by different solvents on L929 cells.

Sovents	Concentration (mg/ml)	Viability (% of control)		CC_{50} (mg/ml)	
		24 hour	48 hour	24 hour	48 hour
Hexane	0.375	117.87	91.44	2.19	1.71
	0.75	109.17	88.93		
	1.50	99.47	65.91		
	3.00	6.53	1.85		
Dichloromethane	0.375	99.10	73.69	1.31	0.94
	0.75	47.30	36.92		
	1.50	24.70	7.69		
	3.00	9.57	5.34		
Ethanol	0.375	112.82	71.43	1.72	1.10
	0.75	76.40	59.52		
	1.50	36.70	11.36		
	3.00	18.27	4.14		

The hexane, dichloromethane and ethanol extracts prepared from leaves of *G. divaricata* were tested for cytotoxic activity (0.375-3 mg/ml) on L929 cells using the MTT assay after for 24 and 48 h co-incubation. Results showed that L929 cells became pyknosis, condensation and even lyses after treated with crude extracts in a dose-dependent manner. These characteristics are recognized as the general appearance of apoptosis or program cell death. Measurements were performed three times and the concentration required for 50% cytotoxicity (CC_{50}) was determined. The cell viability presented in Table 1. The CC_{50} of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

hexane, dichloromethane and ethanol extracts in L929 cells were 2.19, 1.31 and 1.72 mg/ml for 24 h and 1.71, 0.94 and 1.10 mg/ml for 48 h, respectively (Table 1). Among all extracts, the dichloromethane extract showed stronger cytotoxic activity than the others. In a previous work, we reported the cytotoxic effects of *G. divaricata* in L929 cell lines. The crude ethanolic extract showed stronger cytotoxic activity than the crude aqueous extract. The CC_{50} value for ethanolic extract on L929 cells was 1.25 mg/ml whereas the CC_{50} value produced by the aqueous extract (0-10 mg/ml) was not found cytotoxicity (Poeaim *et al.*, 2008). Other results (Chen, *et al.*, 2009) have indicated an association between the concentrations of chemicals leading to cytotoxicity *in vitro*. Cerebroside is a new compound from the aerial parts of *G. divaricata*. At the concentrations of 2, 5, 10, 20 mg/ml of cerebroside exhibited 92, 93, 95, and 95%, respectively, inhibition of L1210 murine leukemic cell growth that showing strong cytotoxicity (Chen, *et al.*, 2009).

Gynura sp. is a herbal folk medicine that popular as a vegetable and as a folk medicine. The literature has reported the presence of several interesting components in the *Gynura* genus, such as pyrrolizidine alkaloids, a terpene coumarin, and several new spirostene derivatives. (Lin *et al.*, 2000). However, Dai *et al.* (2007) reported and reviewed that hepatic veno-occlusive disease (HVOD) is associated with the *G. segetum* root.

The results of the CC_{50} value evaluation of *G. divaricata* will provide indicators of safe level use this plant as a traditional medicine. However, an agent is added to the cell culture it becomes readily available to the cells, which does not occur in the living systems. In addition, the metabolic processes in animal systems are more complex and dynamic than in cell cultures. For future, there is great interest not only in the molecular identification but also determination and purification of active components.

Acknowledgements

This work was supported by a grant of the National Research Council of Thailand and Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

References

Chen, L., J.J. Wang, H.T. Song, G.G. Zhang and L.P. Qin. 2009. New cytotoxic cerebroside from *Gynura divaricata*. Chinese Chemical Letters 20: 1091–1093.

Dai, N., Y.C. Yu, T.H. Ren, J.G. Wu, Y. Jiang, L.G. Shen and J. Zhang. 2007. *Gynura* root induces hepatic veno-occlusive disease: A case report and review of the literature. World Journal of Gastroenterology 13: 1628-1631.

Davies, F.G. 1979. The genus *Gynura* (Compositae) in Eastern Asia and the Himalayas. Kew Bulletin 33: 629-640.

Davies, F.G. 1980. The genus *Gynura* (Compositae) in Malesia and Australia. Kew Bulletin 35: 711-734.

De Candolle, A.P. 1838. *Prodromus* VI. Paris: Treuttel & Wurtz.

Holst, C.M. and S.M. Oredsson. 2005. Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines. Toxicology in Vitro 19: 379–387.

Jopse, J.C. and P.M. Mathew. 1990. Cytology of south Indian species of *Gynura* Cass. (Compositae). New Botanist; an International Quarterly Journal of Plant Science Research 17: 133-141.

Lin, W.Y, C.M. Teng, I.L. Tsai and I.S. Chen. 2000. Anti-platelet aggregation constituents from *Gynura elliptica*. Phytochemistry 53: 833–836.

Poeaim, S., A. Pattamake, A. Praianan, and O. Petcharawan. 2008. Cytotoxicity of crude extracts from *Gynura divaricata* on L929 cell lines. Proceedings of 46th Kasetsart University Annual Conference: Science, Kasetsart University, Thailand. 587-593.

Vanijajiva, O. 2008. Systematics and biogeography of Southeast Asian Senecioneae (Asteraceae): revision of *Cissampelopsis* and *Gynura* and hybridisation in the introduced *Crassocephalum*. Ph.D. Thesis. Johannes Gutenberg University, Mainz.

Vanijajiva, O. 2009. The genus *Gynura* in Thailand. Thai Journal of Botany 1: 25-36.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของจักรนารายณ์บริเวณ *trn*L intron ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม[1*], มธุรา อุณหศิริกุล[1], อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม[1] และ โองการ วณิชาชีวะ[2]

[1] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพ 10520

[2] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร, กรุงเทพ 10220

*Corresponding author: poeaim@hotmail.com

บทคัดย่อ

ศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจักรนารายณ์ (*Gynura divaricata*) จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย จำนวน 32 ตัวอย่าง *G. psudochina* และ *G. formosana* ที่นิยมใช้เป็นพืชสมุนไพร รวมทั้ง *Zinnia violacea* และ *Wedelia trilobata* โดยเทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ตำแหน่ง *trn*L intron ระหว่าง *trn*L (UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon ด้วยคู่ไพร์เมอร์ c และ d พบว่าทุกตัวอย่างมีขนาดชิ้นของดีเอ็นเอประมาณ 550 คู่เบส เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม ClustalX และ PHYLIP เพื่อหาแผนภูมิความสัมพันธ์โดยวิธี Neighbour-Joining แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายในระดับสปีชีส์ต่ำ จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง *trn*L (UAA) intron มีความหลากหลายไม่เพียงพอกับการนำมาใช้หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในสกุล *Gynura*

ABSTRACT

Genetic diversity and phylogenetic relationships within 32 samples of the Juk-Na-Rai (*Gynura divaricata*) in Thailand, *G. psudochina* and *G. formosana* are widely used in folk medicine, including *Zinnia violacea* and *Wedelia trilobata* were investigated by PCR and nucleotide sequencing technique based on chloroplast DNA (cpDNA). Amplification and sequencing of the *trn*L intron between *trn*L (UAA) 5'exon and *trn*L (UAA) 3'exon was performed using c and d primers. The PCR amplification of this region was detected a unique fragment of approximately 550 bp. The nucleotide sequences were analyzed against those of sequences using the ClustalX program and PHYLIP software for phylogenetic analysis. The neighbour-joining dendrogram was generated which provided more information on polymorphism. Most of *Gynura* sp. was revealed low genetic diversity. This study indicated that nucleotide sequencing of the *trn*L (UAA) intron region do not evolve rapidly enough to resolve relationships at these lower taxonomic levels.

คำสำคัญ: จักรนารายณ์, บริเวณ *trn*L intron, คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ, ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Keywords: *Gynura divaricata*, *trn*L (UAA) intron, chloroplast DNA, genetic diversity

คำนำและวัตถุประสงค์

พืชสกุลว่านมหากาฬ (*Gynura* Cass.) มีการกระจายตัวมากในเขตร้อนของทวีปเอเชีย โดยมีความหลากหลายมากที่สุดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ของพืชวงศ์ทานตะวัน (Asteraceae) จากการศึกษาพบว่าเป็นการยากหากอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ในการจัดจำแนกพืชในสกุลนี้เพียงอย่างเดียว เนื่องจากมีความแปรผันในระดับสปีชีส์สูงมาก เช่น สีและลักษณะของลำต้นและใบ เป็นต้น (Vanijajiva 2008) ในประเทศไทย Vanijajiva (2009) ได้จัดจำแนก และบ่งชี้สายพันธุ์พืชในสกุลนี้โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาได้ 10 สายพันธุ์ คือ *G. procumbens* (Lour.) Merr., *G. calciphila* var. *calciphila* Kerr, *G. calciphila* var. *dissecta* F.G. Davies, *G. integrifolia* Gagnep., *G. pseudochina* (L.) DC., *G. nepalensis* DC., *G. hmopaengnsis* H. Koyama, *G. cusimbua* (D.Don) S. Moore, *G. bicolor* (Roxb. Ex Willd.) DC.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ห้ามทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือจำหน่ายในรูปแบบใดๆ ก่อนได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากเจ้าของลิขสิทธิ์ เว้นแต่เพื่อการใช้งานส่วนตัวหรือเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคาดว่าจะเป็นพืชชนิดใหม่จำนวน 1 สายพันธุ์ ต่อมา Poeaim และ Vanijajiva (2010) รายงานเพิ่มเติม 1 สายพันธุ์ คือ *G. divaricata* (L.) DC ที่เรียกชื่อทั่วไปว่าจักรนารายณ์ หรือแป๊ะตำปึง ซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพร เช่นเดียวกันกับว่านมหากาฬ (*G. psudochina*)

จักรนารายณ์ (*Gynura divaricata*) หรือ แป๊ะตำปึง จินฉี่เหมาเยี่ย กิมกอยมอเช่า หรือผักพันปี เป็นพรรณไม้ล้มลุกขนาดเล็กที่มีอายุหลายปี ลำต้น ก้านใบ และใบอวบน้ำ และมีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาสูง เช่น ลำต้นรวมถึงใบพบได้ตั้งแต่สีเขียวจนถึงม่วง ใบกลมจนถึงเรียวยาว เป็นต้น (Vanijajiva, 2008; Poeaim and Vanijajiva 2010) มีความเชื่อว่ามีสรรพคุณในการรักษาโรคได้หลายชนิด เช่น เบาหวาน เริม ความดันสูง และภูมิแพ้ เป็นต้น นอกจากนี้เชื่อว่าเป็นพืชชนิดนี้ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนตอนใต้ โดยมีชื่อเรียกทั่วไปว่า "Bai Bei San Qi" ที่นิยมนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพร (Chen *et al.*, 2009)

ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาวิจัยที่ให้ชื่อวิทยาศาสตร์ของแป๊ะตำปึงว่า *G. procumbens* (ยุวลักษณ์, 2541; ศิริเพ็ญ, 2543; Sriwanthana, 2007) ซึ่ง *G. procumbens* เป็นพืชสมุนไพรของจีน และเกาหลี ที่ไม่พบการกระจายตัวในภูมิภาคเอเชียตะวันออก (Vanijajiva, 2008) จึงอาจกล่าวว่ามีความสับสนในด้านการจำแนกสายพันธุ์ของพืชที่ใช้ในการศึกษาและการเรียกชื่อ ดังนั้นจำเป็นต้องใช้ผู้ที่มีประสบการณ์และเชี่ยวชาญพิเศษ และในบางครั้งอาจใช้เวลานานในการจำแนก ดังเช่นกรณีของจักรนารายณ์ที่ไม่เกิดการออกดอกในประเทศไทย จึงเป็นการยากในการบ่งชี้สายพันธุ์ ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของจักรนารายณ์จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทยโดยเทคนิคทางโมเลกุล ซึ่งผลการวิจัยจะช่วยสนับสนุนการจัดจำแนกสายพันธุ์ให้ถูกต้องและรวดเร็ว เพื่อประโยชน์ต่อการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค และมีโอกาสพัฒนาไปเป็นยาต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บรวบรวมตัวอย่างต้นจักรนารายณ์จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย จำนวน 32 ตัวอย่าง (GD001-032) โดยจดรายละเอียดลักษณะเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกสายพันธุ์ของจักรนารายณ์ และตัวอย่างของว่านมหากาฬ (*G. psudochina*) ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกัน รวมทั้งพืชในวงศ์เดียวกันคือ บานชื่น (*Zinnia violacea*) และกระดุมทองเลื้อย (*Wedelia trilobata*) นำส่วนของใบอ่อนจำนวน 1-2 ใบ มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำมาบดโดยไนโตรเจนเหลว และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Plant DNA Extraction (Vivantis, Malaysia) โดยใช้วิธีการตามคู่มือของชุดสกัดดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอมาวิเคราะห์คำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอทางด้านคุณภาพและปริมาณ โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis และการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 ˚C นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA: cpDNA) ตำแหน่ง *trn*L intron ระหว่าง *trn*L (UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon ด้วยคู่ไพร์เมอร์ c (CGAAATCGGTAGACGCTACG) และไพร์เมอร์ d (GGGGATAGAGGGACTTGAAC) ตาม Taberlet *et al.* (1991) ปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 µl ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 500 ng ไพร์เมอร์ c และ d (Invitrogen) 1 µl (0.8 *p*M) Deoxynucleotide, dNTPs (Roche) 0.5 µl (200 µM) *Taq* DNA polymerase (Biolabs) 0.2 µl (1 U) และ 10 X PCR Buffer (Biolabs) 2.5 µl (1 X) โดยมีอุณหภูมิในขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ initiation denaturation อุณหภูมิ 95˚C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 94˚C นาน 1 นาที 30 วินาที อุณหภูมิ 55˚C นาน 2 นาที และอุณหภูมิ 72˚C นาน 3 นาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72˚C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจผลการทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis นำผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) พร้อมทั้งนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) และวิเคราะห์หาแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) เปรียบเทียบกับ *G. formosana* (AF 460136) (Pelser *et al.*, 2002) โดยโปรแกรม BioEdit, Clustal X 1.83 และ PHYLIP software (Neighbor-joining method, NJ) ที่ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000

ผลและวิจารณ์

ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจักรนารายณ์จำนวน 32 ตัวอย่าง พบว่ามีลักษณะไม่แตกต่างกัน โดยใบมีลักษณะค่อนข้างยาว อวบน้ำ ลำต้นและเส้นกลางใบมีสีเขียวปนม่วงเล็กน้อย และเมื่อนำตัวอย่างมาปลูก พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสีม่วงที่ลำต้น และเส้นกลางใบ แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถเกิดดอกได้ในระยะเวลาประมาณ 2 ปี ทุกตัวอย่าง

ในการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล โดยเทคนิค PCR ในตำแหน่ง *trn*L (UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon ด้วยคู่ไพร์เมอร์ c และ d ในทุกตัวอย่าง พบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอเพียงขนาดเดียวประมาณ 550 คู่เบส ซึ่งมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอใกล้เคียงกับยาสูบที่มีขนาดประมาณ 577 คู่เบส (Taberlet *et al.*, 1991) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง GD001-032 กับ *G. psudochina* และ *G. formosana* ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกัน รวมทั้งพืชในวงศ์เดียวกัน คือ *Z. violacea* และ *W. trilobata* มาวิเคราะห์ดังแสดงในรูปภาพที่ 1 ซึ่งพบว่า *Z. violacea* และ *W. trilobata* แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจน แต่ไม่แตกต่างทั้งในระดับสปีชีส์ และระดับสกุล ยกเว้น GD006, GD026 และ GD032 ที่มาจากจังหวัดจันทบุรี ภูเก็ต และขอนแก่น ตามลำดับ การที่จักรนารายณ์เป็นพืชที่ปลูกได้ง่ายโดยการปักชำ และเชื่อว่านำมาจากประเทศจีนเพื่อใช้เป็นพืชสมุนไพร จึงอาจเป็นไปได้ว่าการที่ตัวอย่างพืชส่วนใหญ่ไม่พบความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง *trn*L (UAA) intron เพราะเป็นตัวอย่างพืชที่มาจากแหล่งเดียวกัน

จึงอาจกล่าวว่าในการศึกษาพืชในสกุล *Gynura* ในตำแหน่ง *trn*L (UAA) intron ด้วยคู่ไพร์เมอร์ c และ d มีข้อจำกัดในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสปีชีส์ และในระดับสกุล ดังที่ Vanijajiva (2008) พบว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างสกุลในระดับต่ำ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาตำแหน่งอื่นทั้งในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ตำแหน่ง *trn*T-L intergenic spacer, *trn*K intron และในไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ตำแหน่ง ITS1, 5.8S และ ITS2 ดังเช่น Pelser และคณะ (2002) ที่สามารถแยกความแตกต่างของ *Senecio* sect. *Jacobaea* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ทานตะวันเช่นกัน รวมทั้งการใช้ marker อื่น เช่น RAPD เพื่อประกอบการศึกษาต่อไป

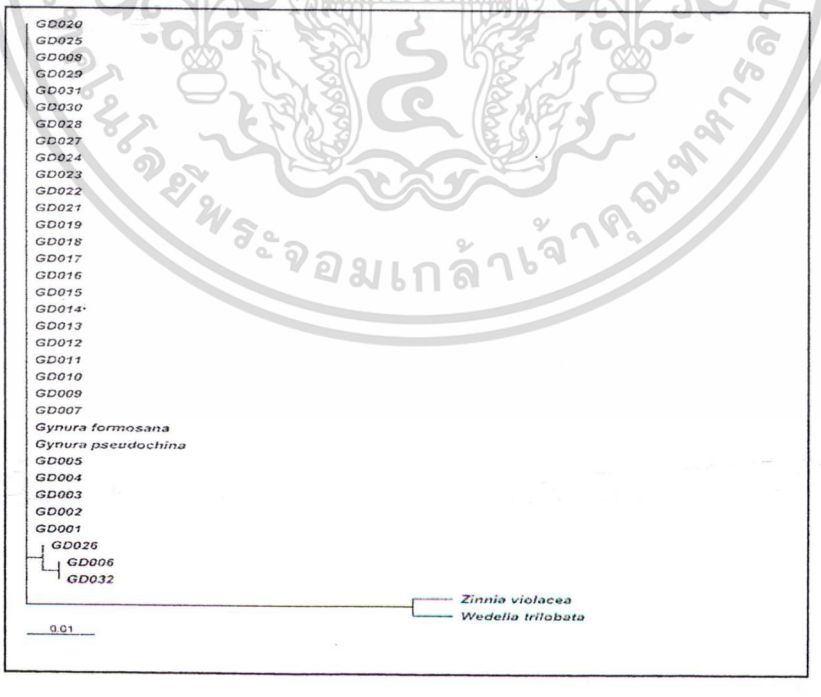


Figure 1. Phylogram analysis on *trn*L (UAA) intron sequence of chloroplast DNA, 32 varities of *G. divaricata* comparative with *G. psudochina*, *Zinnia violacea* and *Wedelia trilobata* as well as *G. formosana* that from GenBank using bootstrap 1,000 replicates and Neighbour-joining algorithm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

ศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจักรนารายณ์ (*G. divaricata*), *G. psudochina* และ *G. formosana* ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกัน รวมทั้งพืชในวงศ์เดียวกัน คือ *Zinnia violacea* และ *Wedelia trilobata* โดยเทคนิค PCR ในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ตำแหน่ง *trn*L (UAA) intron ด้วยคู่ไพร์เมอร์ c และ d แสดงความหลากหลายในระดับสปีชีส์ต่ำ จึงไม่สามารถนำไพร์เมอร์คู่นี้มาใช้ในการบ่งชี้ และศึกษาความหลากหลายในสกุลว่านมหากาฬได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2552

เอกสารอ้างอิง

ศิริเพ็ญ จริเกษม. 2543. การศึกษาทางพฤกษเคมีของสารต้านไวรัสเริมจากแป๊ะตำปึง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

ยุวลักษณ์ ผายดี. 2541. การขยายพันธุ์แป๊ะตำปึงโดยวิธีในหลอดทดลอง และการวิเคราะห์ทางเคมีของกล้าเพาะเลี้ยง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

Chen, L., Li, H, Song, H. and Zhang, G. 2009. A new cerebroside from *Gynura divaricata*. Fitoterapia. 80, 517-520.

Pelser, P. B., Gravendeel, B. and van der Meijden, R. 2002. Tackling speciose genera: species composition and phylogenetic position of *Senecio* sect. *Jacobaea* (Asteraceae) based on plastid and nrDNA sequences. American Journal of Botany. 89, 929-939.

Poeaim, S. and O. Vanijajiva. 2010. Morphological identification and *in vitro* cytotoxic evaluation of crude extracts from Jak-Na-Rai (*Gynura divaricata* (L.) DC.), pp. 436-439. In Proceedings of the 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology. 25-27 August 2510, Bangkok, Thailand.

Sriwanthana, B., Treesangsri, W., Boriboontrakul, B., Niumsakul, S. and Chavalittumrong, P. 2007. *In vitro* effects of Thai medicinal plants on human lymphocyte activity. Songklanakarin Journal of Science Technology., 29 (Suppl. 1), 17-28.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology. 17, 1105-1109.

Vanijajiva, O. 2008. Systematics and biogeography of Southeast Asian Senecioneae (Asteraceae): revision of *Cissampelopsis* and *Gynura* and hybridisation in the introduced *Crassocephalum*. Ph.D. Thesis. Johannes Gutenberg University, Mainz.

Vanijajiva, O. 2009. The genus *Gynura* in Thailand. Thai Journal of Botany. 1, 25-36.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้