



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชสมุนไพรบางชนิดในวงศ์ Acanthaceae และ  
ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี (*Barleria strigosa*)

Phylogenetic relationships among some medicinal plants in  
Acanthaceae and cytotoxicity of crude extracts from *Barleria strigosa*

ผศ.ดร.สุพัตรา ไพริ์เอี่ยม  
นายวินัย สมประสงค์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH

ศ ๙๓๑ค

๒๕๕๖

.b.....  
.i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

สาขา..... ไม่สามารถคัดลอกหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต หากฝ่าฝืนมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลขทะเบียน 137335

วันเดือนปี 22 ต.ย. 2558

ชื่อโครงการวิจัย (ไทย) ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชสมุนไพรบางชนิดในวงศ์ Acanthaceae และ  
ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี (*Barleria strigosa*)  
(ภาษาอังกฤษ) Phylogenetic relationships among some medicinal plants in  
Acanthaceae and cytotoxicity of crude extracts from *Barleria strigosa*

แหล่งเงิน เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 จำนวนเงิน 350,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2555 - 30 กันยายน 2556

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม  
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
E-mail: poeaim@hotmail.com

ชื่อ-สกุล ผู้ร่วมโครงการ นายวินัย สมประสงค์  
กลุ่มวิจัยเพื่อการคุ้มครองพันธุ์พืช  
กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร  
E-mail: winny\_utd@hotmail.com

คำสำคัญ: พืชวงศ์ Acanthaceae, สังกรณี, ความหลากหลายทางพันธุกรรม,  
ความเป็นพิษต่อเซลล์, เทคนิค MTT

Keywords: Acanthaceae, *Barleria strigosa*, genetic diversity,  
cytotoxicity, MTT assay

#### บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของพืชในวงศ์ Acanthaceae ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี (*Barleria strigosa*) โดยศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ Acanthaceae จำนวน 55 ตัวอย่าง โดยเทคนิค PCR ในตำแหน่ง *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ *c/d* หรือ *c/f* พบว่าผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดประมาณ 550 คู่เบส และ 900 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 5 สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างพืชได้เป็น 2 วงศ์ย่อย คือ วงศ์ย่อย Thunbergioideae ที่มีตัวอย่างเฉพาะสกุล *Thunbergia* และวงศ์ย่อย Acanthoideae ที่สามารถแบ่งเป็น 2 เผ่า ได้แก่ เผ่า Ruellieae และเผ่า Acantheae โดยเผ่า Ruellieae จำแนกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ เผ่าย่อย ขาไก่ (Justiciinae) เผ่าย่อยต้อยติ่ง (Ruellinae) เผ่าย่อยฟ้าทะลายโจร (Andrographinae) และเผ่าย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อังกาบ (Barleriinae) และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในสกุลหอมช้าง จำนวน 14 ตัวอย่าง ด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnL-trnF* และเทคนิค sequence-related amplified polymorphism (SRAP) พบว่าทั้งสองเทคนิคให้ผลที่แตกต่างกัน อาจเนื่องจากเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *trnL-trnF* เพียงตำแหน่งเดียว แต่เทคนิค SRAP เป็นการศึกษาดีเอ็นเอทั้งจีโนม โดยแสดงค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนตามวิธี simple matching ระหว่าง 0.45 - 0.98 สำหรับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ด้วยวิธีแยกส่วน เมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในระดับต่ำ โดยสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายบิวทานอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* และ *Staphylococcus aureus* และเมื่อนำสารสกัดหยาบมาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 8 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF7 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT29 เซลล์มะเร็งช่องปากของมนุษย์ชนิด KB เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ชนิด HeLa เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์ไตลิงชนิด Vero cell ที่ระดับความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในหลอดทดลอง ด้วยวิธี Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) พบว่าสารสกัดหยาบแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายบิวทานอลแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์เป็นพิษ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC<sub>50</sub>) ในเซลล์ชนิด P388, MCF7, KB และ HeLa เท่ากับ 177.74, 456.66, 238.73 และ 946.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่จากสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายบิวทานอลที่วิเคราะห์โดย GC-MS คือ cyclohexaneacetic acid และ benzonitrile

## ABSTRACT

The objective of this study was to determine the phylogenetic relationships and genetics diversity of family Acanthaceae and biological activities of crude extracts from *Barleria strigosa* were investigated. The genetic diversity and relationship of family Acanthaceae in Thailand was carried out. PCR technique was amplified sequence data from the intron and spacer of the *trnL-trnF* chloroplast DNA by primer C/D or C/F from 55 samples of Acanthaceae. The size of amplified products is approximately 550 base pairs (C/D primer) and 900 base pairs (C/F primer). A phylogenetic analysis using neighbour-joining method was conducted in MEGA 5. The tree was divided the samples into 2 subfamily: Thunbergioideae that has only *Thunbergia* sp. and Acanthoideae. Acanthoideae was divided the samples into 2 tribes; Ruellieae and Acantheae. Ruellieae was divided into 4 sub-group; Justiciinae, Ruelliinae, Andrographinae and Barleriinae. We are studying genetic relationships among 14 samples of *Phlogacanthus* using the *trnL-trnF* nucleotide sequence of chloroplast DNA and sequence-related amplified polymorphism (SRAP). Assessment technique, that was different because of analysis of nucleotide sequence data from one

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

region of the chloroplast genome while SRAP technique amplified preferentially targets coding sequences that distributed throughout genome. The SRAP results, the similarity coefficients were calculated using simple matching ranged from 0.45 - 0.98. The methanol crude extract of *B. strigosa* leaves was partitioned to obtain hexane, dichloromethane, ethylacetate and butanol. The antibacterial activity of crude extracts was studied against selected bacteria using paper disc diffusion method. The crude extracts were demonstrated the lower antibacterial activity. The butanol extract at 200 mg/ml. presented a good activity against *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*. Crude extracts were investigated for their cytotoxic activity against for eight cell lines: murine lymphocytic (P388), human breast cancer (MCF7), human colon adenocarcinoma (HT29), human hepatoma (HepG2), human mouth epidermal adenocarcinoma (KB), human cervical adenocarcinoma (HeLa), mouse fibroblast (L929) and African green monkey kidney (Vero cell) in culture using the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The cell lines were exposed to crude extracts (0 - 1000 µg/ml) for 24 hours. The crude extracts from leaves of *B. strigosa* were exhibited the low cytotoxic effect on cell lines. The butanol extract was exhibited the most effective cytotoxic activity. The crude butanol was toxic to P388, MCF7, KB and HeLa cell line with 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) at 177.74, 456.66, 238.73 and 946.98 µg/ml., respectively. The mostly chemical constituents from butanol extract that analyzed by GC-MS were cyclohexaneacetic acid and benzonitrile.

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินงบประมาณประจำปี 2556 และสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

ขอขอบคุณคุณวินัย สมประสงค์ กลุ่มวิจัยเพื่อการคุ้มครองพันธุ์พืช กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างบางส่วน และจัดจำแนกและระบุสปีชีส์พืชตัวอย่างร่วมกัน ดร.พรทิพา ทิชา งานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ และศูนย์เครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ไลน์ และสวนพฤกษศาสตร์ภาคตะวันออก (เขาหินซ้อน) จังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ให้ความอนุเคราะห์ใบส่งกรมที่ใช้ในการสกัดสาร รวมทั้งลูกศิษย์ทุกคนที่ร่วมในการวิจัย ครอบครัวยุติวงศ์ และทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	IV
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	IX
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 ทฤษฎีและกรอบแนวคิดของการวิจัย	3
1.5 คำสำคัญของการวิจัย	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>5</b>
2.1 พีชในวงศ์ Acanthaceae	5
2.2 พีชสกุลห้อมช้าง	7
2.2.1 <i>Phlogacanthus curviflorus</i> (Wall.) Nees	8
2.2.2 <i>Phlogacanthus paniculatus</i> (T. Anderson) Imlay	9
2.2.3 <i>Phlogacanthus pedunculatus</i> Imlay	9
2.2.4 <i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> T.Anderson	9
2.2.5 <i>Phlogacanthus rectiflorus</i> Imlay	10
2.2.6 <i>Phlogacanthus vitellinus</i> T. Anderson	10
2.3 พีชสกุลอังกาบ	11
2.3.1 อังกาบ ( <i>Barleria cristata</i> L.)	13
2.3.2 เสลดพังพอนตัวผู้ ( <i>Barleria lupulina</i> L.)	14
2.3.3 อังกาบหนู ( <i>Barleria prionitis</i> L.)	15
2.3.4 สัngerณี ( <i>Barleria strigosa</i> Willd.)	16
2.4 เทคนิคที่ใช้ในการวิจัย	17
2.4.1 เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์	17
2.4.2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	18
2.4.3 Sequence-related amplified polymorphism (SRAP)	19
2.5 การทดสอบความเป็นพืชต่อเซลล์	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.1 ชนิดของเซลล์ไลน์	20
2.5.2 การวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT	22
2.6 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion	23
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	24
<b>บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง</b>	<b>27</b>
3.1 วัสดุ อุปกรณ์	27
3.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง	27
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย	27
3.1.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการวิจัย	27
3.1.4 อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง	28
3.1.5 อุปกรณ์ในการสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบพืช	28
3.1.6 อุปกรณ์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR และ SRAP	29
3.1.7 อุปกรณ์ในการทำเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	29
3.1.8 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	29
3.1.9 อุปกรณ์ในการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยชุด GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel)	29
3.1.10 อุปกรณ์ในการสกัดสารจากตัวอย่างใบพืช	30
3.1.11 อุปกรณ์ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion	30
3.1.12 อุปกรณ์ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT	31
3.2 สารเคมี	31
3.2.1 สารเคมีในการสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอ	31
3.2.2 สารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR และ SRAP	32
3.2.3 สารเคมีในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	33
3.2.4 สารเคมีในการสกัดสารจากตัวอย่างใบพืช	33
3.2.5 สารเคมีในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion	34
3.2.6 สารเคมีในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT	34
3.3 วิธีการทดลองระดับโมเลกุล	34
3.3.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ	34
3.3.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง	35
3.3.3 การวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	36
3.3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อ VI ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.5 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์	37
3.3.6 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์	37
3.3.7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี (SRAP)	37
3.3.8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิคเอสอาร์เอพี (SRAP)	38
3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	38
3.4.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี	38
3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion	41
3.4.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์	42
3.4.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ด้วยวิธี MTT assay	43
<b>บทที่ 4 ผล และอภิปรายผลการทดลอง</b>	<b>45</b>
4.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง	45
4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล	45
4.2.1 ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ	45
4.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชวงศ์ Acanthaceae ด้วยเทคนิคพีซีอาร์	49
4.2.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ Acanthaceae ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์	50
4.2.4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหอมช้างด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์	56
4.2.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหอมช้างจากเทคนิค SRAP	57
4.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	62
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ	63
4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์	64
4.5.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ mitomycin C ต่อเซลล์ไลน์	64
4.5.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ไลน์	67
<b>บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ</b>	<b>71</b>
<b>เอกสารอ้างอิง</b>	<b>72</b>
<b>ผลงานตีพิมพ์จากงานวิจัย</b>	<b>80</b>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ universal primer จำนวน 6 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอบริเวณ non-coding region ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ	18
2.2	ตัวอย่างไพรเมอร์ SRAP	19
3.1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR	32
3.2	ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค SRAP	33
3.3	แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในเทคนิค SRAP	38
4.1	รหัส ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และแหล่งที่มาของพืชในวงศ์ Acanthaceae	46
4.2	รหัส ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และแหล่งที่มาของพืชในสกุลห้อมช้าง	48
4.3	ปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่วัดได้โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	49
4.4	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค SRAP	58
4.5	แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS	62
4.6	แสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC <sub>50</sub> ) ของสารละลาย mitomycinC (MMC) ที่มีต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay	66
4.7	แสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC <sub>50</sub> ) ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีจากตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay	68

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	<i>Phlogacanthus curviflorus</i> (Wall.) Nees	9
2.2	<i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> T.Anderson	10
2.3	<i>Phlogacanthus vitellinus</i> T. Anderson	11
2.4	แสดงสีของดอกอังกาบ ( <i>B. cristata</i> ) (A-B) อังกาบดอกสีม่วง (C) อังกาบดอกสีขาว แดงม่วง และ (D) อังกาบดอกสีขาว	14
2.5	ลักษณะใบและดอกของเสลดพังพอนตัวผู้ ( <i>B. lupulina</i> )	15
2.6	ลักษณะดอกของต้นอังกาบหนู ( <i>B. prionitis</i> )	16
2.7	ลักษณะดอกของต้นสังกรณี ( <i>B. strigosa</i> )	17
2.8	ลักษณะของไพรเมอร์ SRAP	19
2.9	กลไกการทำงานของเทคนิค SRAP	20
2.10	ลักษณะเซลล์ไลน์ P388 ที่กำลังขยาย 20 เท่า	21
2.11	ลักษณะเซลล์ไลน์ชนิดเกาะพื้นผิว	22
2.12	ตัวอย่างไมโครเพลตที่ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT	23
3.1	สรุปขั้นตอนการสกัดสารจากตัวอย่างใบสังกรณี	40
4.1	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ Acanthoideae บริเวณยีน trnL-trnF ด้วยวิธี neighbor-joining จากโปรแกรม MEGA 5 โดยสุ่มค่า bootstrap เท่ากับ 1,000	51
4.2	แสดงลักษณะของดอกในพืชเผ่าย่อยชาโก้ (Justiciinae) (A) ฮว่านง็อก (B) เฒ่าหลังลาย (C) บายหาดอกสีขาวแต้มม่วง และ (D) บายหาดอกสีเหลือง	54
4.3	แสดงลักษณะของดอกในพืชเผ่าย่อยต้อยติ่ง (Ruelliinae) (A) ต้อยติ่งเทศดอกม่วง (B) ต้อยติ่งเทศดอกชมพู (C) ต้อยติ่ง และ (D) ต้อยติ่งที่มีลักษณะดอกเล็กและกลีบบาง	54
4.4	แสดงลักษณะของดอกในพืชย่อยอังกาบ (Barleriinae) (A) อังกาบหนู (B) เสลดพังพอนตัวผู้ (C) อังกาบ (D) สังกรณี (E) เปรียบเทียบลักษณะของเสลดพังพอนตัวผู้: ซ้าย และอังกาบหนู: ขวา และ (F) เปรียบเทียบลักษณะของสังกรณี: ซ้าย และอังกาบ: ขวา	55
4.5	เปรียบเทียบลักษณะของสังกรณีและหญ้าห้วนาค (A) ความสูงของสังกรณี (ซ้าย) และหญ้าห้วนาค (ขวา) (B) ใบมีขนสั้นหยาบหนาแน่นของหญ้าห้วนาค และ (C) ใบมีขนสั้นปริมาณเล็กน้อยของสังกรณี	56
4.6	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลห้อมช้าง บริเวณยีน trnL-trnF ด้วยวิธี neighbor-joining จากโปรแกรม MEGA 5 โดยสุ่มค่า bootstrap เท่ากับ 1,000	57
4.7	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค SRAP จากไพรเมอร์ Me3-Em3	59
4.8	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค SRAP จากไพรเมอร์ Me5-Em1	59

## สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
4.9 Dendogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิค SRAP ของตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา	61
4.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ mitomycinC (MMC) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ 4 ชนิด คือ P388, HT29, MCF7 และ Vero cell ที่บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	66
4.11 แสดงค่า $CC_{50}$ ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีในชั้นเมทานอลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 5 ชนิด	67
4.12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล จากใบสังกรณีต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ชนิด P388	69
4.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย (A) เฮกเซน (B) ไดคลอโรมีเทน (C) เอทิลอะซิเตท และ (D) บิวทานอล จากใบสังกรณีต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิด P388, MCF7, HT29, KB, HepG2, HeLa, L929 และ Vero cell	70

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

องค์การสหประชาชาติได้กำหนดให้ปี พ.ศ. 2553 เป็นปีสากลแห่งความหลากหลายทางชีวภาพ (International year of biodiversity) และให้วันที่ 22 พฤษภาคมของทุกปีเป็นวันสากลแห่งความหลากหลายทางชีวภาพ (International day for biodiversity) เพื่อเป็นการเสริมสร้างความตระหนักถึงความสำคัญของความหลากหลายทางชีวภาพ และการดำรงอยู่ของทุกชีวิตบนพื้นโลก ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ. 2555-2559) ที่เน้นการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่น เพื่อนำไปสู่การพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพในระยะยาว ส่งเสริมการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพในการสร้างความมั่นคงของภาคเศรษฐกิจท้องถิ่นและชุมชน รวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถ และสร้างนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่เป็นเอกลักษณ์ของประเทศ โดยภูมิประเทศของประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น ทำให้เป็นแหล่งรวบรวมความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น พืชพรรณต่างๆ ที่มีอยู่หลากหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางการเกษตร และการแพทย์

ประเทศไทยมีการใช้สมุนไพรกันอย่างกว้างขวางมานาน และใช้ประโยชน์สำหรับเป็นทางเลือกในการรักษาโรค แต่พืชชนิดเดียวกันในแต่ละท้องถิ่นมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป หรือพืชต่างชนิดกันแต่มีชื่อเรียกที่เหมือนกัน รวมทั้งพืชในสกุลเดียวกันบางชนิดมีลักษณะคล้ายกัน ทำให้เกิดความสับสนทั้งในการจัดจำแนก และการนำไปใช้ประโยชน์ รวมทั้งการรุกรานของชนิดพันธุ์ต่างถิ่น ซึ่งนับว่าเป็นภัยคุกคามที่ร้ายแรงต่อความหลากหลายทางชีวภาพ

พืชในวงศ์เหงือกปลาหมอ หรือวงศ์ต้อยติ่ง (Acanthaceae) อยู่ในอันดับ Lamiales (Olmstead และคณะ, 1993) เป็นวงศ์พืชขนาดใหญ่ มีประมาณ 250 สกุล สายพันธุ์มากกว่า 2500 ชนิดพันธุ์ (Cramer, 1998) ในประเทศไทยมีประมาณ 40 สกุล ประมาณ 230 ชนิดพันธุ์ ขึ้นกระจายอยู่ทั่วไปในหลายท้องถิ่น บางชนิดนำมาใช้เป็นไม้ประดับ เช่น อังกาบแดง หรืออังกาบสีปุน (*Barleria repen*) ใบเงิน-ใบทอง (*Graptophyllum pictum*) แดงประทัด (*Odontonema cuspidatum*) แดงพันธุ์ทิพย์ (*Megaskepasma erythrochlamys*) ห้อมช้าง (*Phlogacanthus curviflorus*) เหลืองศิริบุณ (*Pachystachys lutea*) และต้อยติ่งเทศ (*Ruellia squarrosa*) หลายชนิดมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร เช่น ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) เสลดพังพอนตัวเมีย (*Clinacanthus nutans*) เสลดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina*) อังกาบ (*Barleria cristata*) สัngerณี (*Barleria strigosa*) รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) ติปลากั้ง (*Phlogacanthus pulcherrimus*) และเหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus*) เป็นต้น รวมทั้งหลายชนิดเป็นวัชพืช เช่น บาทยา (*Asystasia gangetica*) และต้อยติ่ง (*Ruellia tuberosa*) เป็นต้น

เนื่องจากพืชในวงศ์ Acanthaceae เป็นวงศ์ที่มีความหลากหลายทั้งทางด้านสัณฐานวิทยา และนิเวศวิทยา แม้ว่าพืชเหล่านี้จะมีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกันไปตามกลุ่มย่อย แต่พืชที่อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกันมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะที่คล้ายคลึงกัน เช่น ดอกของรางจืด (*Thunbergia laurifolia*) จะคล้ายกับดอกของสร้อยอินทนิล (*Thunbergia grandiflora*) เป็นอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่ในนามของสำนักงานส่งเสริมวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อม (สสว.) และสงวนลิขสิทธิ์ไว้  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาก แต่มีข้อแตกต่าง คือใบของรางจืดมีลักษณะคล้ายรูปไข่ขอบใบจะเรียบ เรียวแหลมสู่ปลายใบ แต่ใบของสร้อยอินทนิล มีลักษณะรูปหัวใจขอบใบหยักเว้าเป็นแฉก อีกทั้งปัญหาหนึ่งคือการมีเชื้อฟอง เช่น ต้นเสลดพังพอนมีเชื้อฟองกัน คือ เสลดพังพอนตัวเมีย (*C. nutans*) และเสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*) โดยเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกันแต่คนละสกุล รวมทั้งบาทยาที่มีลักษณะของดอกและสีดอกที่แตกต่างกันแต่มีชื่อวิทยาศาสตร์เดียวกัน คือ *Asystasia gangetica* เป็นต้น ดังนั้นการนำพืชบางชนิดในวงศ์นี้ โดยเฉพาะชนิดที่มีการใช้ประโยชน์ในทางสมุนไพรมาใช้อาจมีความสับสนแก่การจัดจำแนก และในประเทศไทยยังไม่มีรายงานข้อมูลในการจัดจำแนกในระดับโมเลกุลของพืชสมุนไพรในวงศ์ Acanthaceae จึงควรมีการบ่งชี้สายพันธุ์ และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของพืชในสกุลนี้ ทั้งเพื่อการบ่งชี้สายพันธุ์ การอนุรักษ์สายพันธุ์ และหาสารสำคัญจากสายพันธุ์ต่างๆ อย่างจำเพาะมากขึ้น

สารสกัดจากพืชในวงศ์นี้โดยส่วนใหญ่ใช้เป็นยาสมุนไพร เช่น อังกาบหนู (*Barleria prionitis*) ใช้ในการรักษาอาการไอ ขับเหงื่อ และขับเสมหะ (Singh และคณะ, 2005) ต้านเชื้ออหิวส ต้านการอักเสบ และใช้เป็นสารคุมกำเนิด (Singh และคณะ, 2003; Gupta และคณะ, 2000) ทองพันชั่ง (*R. nasutus*) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา (Panichayupakaranant และคณะ, 2003) รวมทั้งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Wu และคณะ, 1998) ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) มีฤทธิ์ในระบบทางเดินหายใจใช้เป็นยาแก้เจ็บคอและลดการติดเชื้อ (Gabrielian และคณะ, 2002; Spasov และคณะ, 2004) มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (Burgos และคณะ, 2001) ฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคหลายชนิด (Aromdee และคณะ, 2003; วิษณุ และ สุรภี, 2533) กระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Ajaya และคณะ, 2004) นอกจากนี้ยังมีผลทำให้การผลิตต่อสูจิลลดลง (Akbarsha และคณะ, 2000) เสลดพังพอน (*B. lupulina*) มีฤทธิ์ในการลดน้ำตาล และมีความสามารถในการต้านอาการอักเสบ (Suba และคณะ, 2004a; 2004b; 2005) สำหรับอังกาบหนู (*B. prionitis*) มีความสามารถทำให้เกิดความเป็นหมันในหนูหรือนำมาใช้เป็นสารคุมกำเนิดได้ (Gupta และคณะ, 2000; Verma และคณะ, 2005) โดยปัจจุบันมีข้อมูลด้านองค์ประกอบทางเคมีในบางสกุลเท่านั้น แต่ข้อมูลการวิจัยของพืชในสกุลอังกาบยังมีรายงานอยู่น้อย โดยเฉพาะสังกรณี (*B. strigosa*)

ในงานวิจัยนั้นนอกจากการบ่งชี้สายพันธุ์ และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิคทางโมเลกุลในพืชสมุนไพรในวงศ์ Acanthaceae แล้ว ยังทำการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบของสังกรณี (*B. strigosa*) ที่ทำการสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอล แบบ Maceration และนำมาสกัดแบบแยกส่วนในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน และบิวทานอล ตามลำดับ และนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (P388) เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (HT-29) เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (HepG2) เซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ (HeLa) เซลล์มะเร็งช่องปากของมนุษย์ (KB) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนู (L929) และเซลล์ไตลิง (Vero cell) โดยข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยมีส่วนช่วยสนับสนุน หรือส่งเสริมการพัฒนาวิธีการใช้สารสกัดมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง รวมทั้งทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จะทำให้ทราบถึงทั้งระดับความเข้มข้น และการนำมาใช้เพื่อความปลอดภัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 บ่งชี้สายพันธุ์ และหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชสมุนไพรบางชนิดในวงศ์ Acanthaceae ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

1.2.2 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบของสังกรณี (*B. strigosa*) ต่อเซลล์มะเร็งบางชนิดในหลอดทดลอง ด้วยวิธี MTT assay

1.2.3 ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบของสังกรณี (*B. strigosa*) ด้วยวิธี paper disc diffusion

1.2.4 รวบรวม และส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชของประเทศ

## 1.3 ขอบเขตการวิจัย

บ่งชี้สายพันธุ์และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสมุนไพรบางชนิดในวงศ์ Acanthaceae ที่รวบรวมได้ในประเทศไทย ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และ DNA Sequencing บริเวณ non-coding regions ของ chloroplast DNA (cpDNA) ที่ยืนตำแหน่ง *trnL* หรือบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของ genomic DNA (gDNA) ในตำแหน่ง rDNA และศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบของต้นสังกรณีกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม (human breast cancer cell: MCF-7), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (human colorectal cancer cell: HT-29), เซลล์มะเร็งตับ (human liver carcinoma cell: HepG2 cell), เซลล์ไตลิง (monkey kidney cell: Vero cell) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (murine leukemia cell: P388)

## 1.4 ทฤษฎีและกรอบแนวคิดของการวิจัย

ในประเทศไทยมีทั้งพืชประจำถิ่น และนำเข้ามาหรือกระจายมาจากต่างประเทศ การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในวงศ์ Acanthaceae บางชนิดที่นิยมใช้เป็นพืชสมุนไพร นอกจากเป็นการบ่งชี้สายพันธุ์ การกระจาย และเป็นข้อมูลพืชพรรณหรือรวบรวมพันธุกรรมพืชที่เป็นเอกลักษณ์ของประเทศ นอกจากนั้นพืชสมุนไพรมีคุณค่าและมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ และมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคต่างๆได้แตกต่างกัน เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดก่อนการนำมาใช้ประโยชน์ จึงควรมีการบ่งชี้สายพันธุ์ และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งสารสำคัญต่างๆ

## 1.5 คำสำคัญของการวิจัย

สกุลอังกาบ (*Barleria* sp.), อังกาบ (*Barleria cristata* L.), ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity), สารสกัดหยาบ (crude extract), ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) และเทคนิค MTT (Methyl tetrazolium assay)

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การวิจัยนี้จะช่วยสนับสนุนการวิจัยทางด้านการจำแนกสายพันธุ์ และหาความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของพืชในวงศ์ Acanthaceae ด้วยเทคนิคทางโมเลกุลซึ่งยังไม่มีข้อมูลการศึกษาในประเทศไทย รวมทั้งศึกษาการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาทดสอบกับเซลล์ในหลอดทดลอง ซึ่งในขั้นแรกนี้เป็นการทดสอบด้วยสารสกัดอย่างหยาบก่อน อันนำไปสู่ข้อมูลทั้งทางเภสัชวิทยา พิษวิทยาในอนาคต และโอกาสพัฒนาไปเป็นยา ดังนี้

- 1.6.1 เพื่อการจำแนกสายพันธุ์ และหาความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของพืชในวงศ์ Acanthaceae
- 1.6.2 เพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช และการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรพืชในประเทศไทย
- 1.6.3 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์จากสารสกัดหยาบของใบของต้นสังกรณีในหลอดทดลอง
- 1.6.4 เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาหาสารประกอบต่างๆ และองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญต่อไป
- 1.6.5 เพื่อช่วยพัฒนาและเพิ่มคุณค่าของพืชสมุนไพรให้มีมูลค่าทางการค้ามากขึ้น
- 1.6.6 มีบทความวิจัยในการนำเสนอทั้งในระดับประเทศ และนานาชาติ

โดยหน่วยงานที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์มีทั้งภาครัฐ และเอกชน เช่น กรมวิชาการเกษตร และองค์การเภสัชกรรม เป็นต้น โดยองค์การเภสัชกรรมสามารถนำข้อมูลไปเพิ่มผลผลิตและพัฒนาคุณภาพขององค์ประกอบทางเคมีหรือสารสกัด รวมทั้งเป็นการส่งเสริมสุขภาพและคุณภาพชีวิตของผู้บริโภค และกรมวิชาการเกษตรเป็นการรวบรวมแหล่งพันธุ์ จัดจำแนก และอนุรักษ์พันธุกรรมพืชของประเทศไทย

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

องค์การสหประชาชาติได้กำหนดให้ปี พ.ศ. 2553 เป็นปีสากลแห่งความหลากหลายทางชีวภาพ (International year of biodiversity) และให้วันที่ 22 พฤษภาคมของทุกปีเป็นวันสากลแห่งความหลากหลายทางชีวภาพ (International day for biodiversity) เพื่อเป็นการเสริมสร้างความตระหนักถึงความสำคัญของความหลากหลายทางชีวภาพ และการดำรงอยู่ของทุกชีวิตบนพื้นโลก ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ. 2555-2559) ที่เน้นการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่น เพื่อนำไปสู่การพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพในระยะยาว ส่งเสริมการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพในการสร้างความมั่นคงของภาคเศรษฐกิจท้องถิ่นและชุมชน รวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถและสร้างนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่เป็นเอกลักษณ์ของประเทศ โดยภูมิประเทศของประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น ทำให้เป็นแหล่งรวบรวมความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น พืชพรรณต่างๆที่มีอยู่หลากหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางการเกษตร และการแพทย์

ประเทศไทยมีการใช้สมุนไพรกันอย่างกว้างขวางมานาน และใช้ประโยชน์สำหรับเป็นทางเลือกในการรักษาโรค แต่พืชชนิดเดียวกันในแต่ละท้องถิ่นมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป หรือพืชต่างชนิดกันแต่มีชื่อเรียกที่เหมือนกัน รวมทั้งพืชในสกุลเดียวกันบางชนิดมีลักษณะคล้ายกัน ทำให้เกิดความสับสนทั้งในการจัดจำแนก และการนำไปใช้ประโยชน์ รวมทั้งการรุกรานของชนิดพันธุ์ต่างถิ่น ซึ่งนับว่าเป็นภัยคุกคามที่ร้ายแรงต่อความหลากหลายทางชีวภาพ

#### 2.1 พืชในวงศ์ Acanthaceae

พืชในวงศ์เหงือกปลาหมอ หรือวงศ์ต้อยติ่ง (Acanthaceae) อยู่ในอันดับ Lamiales (Olmstead และคณะ, 1993) เป็นวงศ์พืชขนาดใหญ่ มีประมาณ 250 สกุล สายพันธุ์มากกว่า 2500 สายพันธุ์ (Cramer, 1998) ส่วนใหญ่เป็นไม้พุ่ม โดยมากพบกระจายอยู่ทั่วไปตามเขตร้อนและเขตร้อนชื้น ทั้งอินโดนีเซียและมาเลเซีย แอฟริกา บราซิล และอเมริกากลาง ส่วนใหญ่มีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นไม้ประดับและพืชสมุนไพร Bhattacharyya และ Johri (1998) ได้อธิบายลักษณะทางพฤกษศาสตร์ประจำวงศ์ Acanthaceae ว่า เป็นไม้พุ่มหรือไม้ล้มลุก อาจพบเป็นไม้ต้นขนาดกลางหรือเป็นเถา บางชนิดอาจเป็นพืชทนแล้ง ลำต้นไม่มีเนื้อไม้ สีเขียว บ่อยครั้งอาจพบรูปร่างเป็นสัน ใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามหรือตรงข้ามสลับฉาก ไม่มีหูใบ มีหรือไม่มีก้านใบ ดอกช่อออกที่ปลายยอด หรือช่อกระจุกเชิงซ้อนออกตามข้อ หรืออาจเป็นช่อกระจุก หรือดอกเดี่ยวออกตามข้อ มีใบประดับหรือใบประดับย่อย ใบประดับหรือใบประดับย่อยเห็นได้ชัดเจน บางครั้งอาจเป็นหนาม สมมาตรด้านข้าง มี 2 เพศ มีก้านดอกย่อยขนาดใหญ่เห็นชัด วงกลีบเลี้ยงมี 4-5 กลีบ เป็นแฉกลีบ ขอบอาจเป็นหนามหรือขนแข็ง หรือลดรูปไป เรียงซ้อน เหลื่อม พบน้อยมากที่เรียงตัวบิดเวียน วงกลีบดอกมี 4-5 กลีบ ซ้อนเหลื่อม ส่วนมากเป็นรูปปากเปิด ปากบนปลายแยกเป็น 2 กลีบและตั้งตรง ปากล่าง 3 กลีบส่วนใหญ่ค่อนข้างเป็นแนวนอนตั้งฉากกับหลอดกลีบดอก มีวาลวดด้านในมีขนจำนวนมากและแผ่ออกมาถึงปาก ปลายกลีบดอกเรียงซ้อนเหลื่อมหรือบิดเวียน เกสรเพศผู้ 2 หรือ 4 อันติดบนกลีบดอก ถ้าพบว่ามี 4 อันจะเป็นแบบมี 2 คู่ยาวไม่เท่ากัน ส่วนอีกหนึ่งอันจะไม่เจริญหรือเป็นหมัน ถ้ามี 2 อันจะติดอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านหน้ากลีบดอก ก้านชูเกสรเพศผู้ยาวและแยกกัน ชูอับริณูโผล่พ้นหลอดกลีบดอก ก้านชู 1 อันจะมี อับริณู 1-2 อัน ถ้ามี 1 อันแสดงว่ายังไม่เจริญเต็มที่ ถ้ามี 2 อันจะเป็นแฉกยาวเท่ากันเชื่อมติดกัน หรือบางครั้งทั้ง 2 อันอาจยาวไม่เท่ากัน อับริณูติดด้านหลัง หรือติดไหวได้ ก้านชูเกสรเพศเมีย 1 อัน ยึดยาวคล้ายเส้นด้าย ปลายยอดแยกเป็น 2 แฉกรูปกรวย รั้งไขมี 2 ช่องเชื่อมติดกัน อยู่เหนือวงกลีบ ใน 1 ช่องมีออวูล 2 อันหรือมากกว่า มีหรือไม่มีอวัยวะที่ช่วยติดเมล็ดซึ่งติดด้านล่างออวูล ผลส่วนใหญ่ เป็นแบบผลแห้งแตกกลางพู เมล็ดมีจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีอาหารสะสม

การจัดจำแนกพืชในวงศ์ Acanthaceae ใช้ข้อมูลอ้างอิงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Bentham และ Hooker, 1965; Hansen, 1985; Hansen, 1989; Bremekamp, 1995) โดย Bentham and Hooker (1965) ได้ศึกษาและรวบรวมรายชื่อพรรณไม้ในแถบภูมิภาคเอเชีย ตะวันออกเฉียงใต้บรรยายลักษณะพืชในอันดับสกุล การกระจายพันธุ์ พบว่ามีพรรณไม้ในเผ่าย่อย Barleriinae 5 สกุล คือ *Asystasia*, *Barleria*, *Clinacanthus*, *Codonacanthus* และ *Graptophyllum* Hansen (1989) ศึกษาพรรณไม้วงศ์ Acanthaceae ในแถบภูมิภาคเอเชีย ตะวันออกเฉียงใต้พบพรรณไม้ในสกุล *Pseuderanthemum* จำนวน 3 ชนิด คือ *P. graciliflorum*, *P. lapathifolium* (Vahl) B. Hansen และ *P. latifolium* (Vahl) B. Hansen ต่อมาจึงนำข้อมูล ทางพันธุกรรมมาใช้ในการจัดจำแนก (Scotland และคณะ, 1995; Scotland และ Vollesen, 2000) ซึ่งในปัจจุบันนิยมแบ่งตาม Scotland และ Vollesen (2000) โดยได้จัดจำแนกพืชวงศ์เป็น 3 วงศ์ย่อย คือ Nelsonioideae, Thunbergioideae และ Acanthoideae ซึ่งใกล้เคียงกับ McDade and Moody (1999) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Acanthaceae จากลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ สามารถแบ่งกลุ่มพืชวงศ์ Acanthaceae ออกเป็น 4 กลุ่มที่สำคัญ คือ *Acanthus*, *Barleria*, *Ruellia* และ *Justicia* โดย *Ruellia*, *Justicia* และ *Barleria* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกัน และแสดงลักษณะ monophyletic ซึ่งต่างจาก *Acanthus* อย่างไรก็ตามข้อมูลด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลระดับโมเลกุลไม่สัมพันธ์กัน ดังเช่นการรายงานของ McDade และคณะ (2005) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชเผ่า Acantheae ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระดับโมเลกุลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 บริเวณ คือ บริเวณ ITS ในนิวเคลียส และบริเวณ *rps16*, *trnG-trnS* และ *trnL-trnF* ในคลอโรพลาสต์ ทำการศึกษาตัวอย่างพืช 18 สกุล จาก 20 สกุล โดยใช้ *Justicieae* เป็น out groups

ในประเทศไทยการจัดจำแนกพืชตามหลักวิทยาศาสตร์กล่าวไว้ในหนังสือ 84 วงศ์พรรณไม้ เท็ดไทองค์ราชนวามีนักพฤกษศาสตร์หลายท่านจัดจำแนกพืชวงศ์ Acanthaceae แต่ในปัจจุบันพืช วงศ์นี้มีการจัดจำแนกตาม Scotland และ Vollesen (2000) ซึ่งศึกษาข้อมูลจากการเรียงของกลีบ ดอก เรณู และมีด้านความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการชาติพันธุ์ ทำให้สามารถแยกพืชวงศ์ Acanthaceae ได้ 3 วงศ์ย่อย ได้แก่ Nelsonioideae, Thunbergioideae และ Acanthoideae มีประมาณ 40 สกุล ประมาณ 230 ชนิดพันธุ์ ขึ้นกระจายอยู่ทั่วไปในหลายท้องที่ บางชนิดนำมาใช้เป็นไม้ประดับ เช่น อังกาบแดง หรืออังกาบสีปูน (*Barleria repen*) ใบเงิน-ใบทอง (*Graptophyllum pictum*) แดงประทัด (*Odontonema cuspidatum*) แดงพันธุ์ทิพย์ (*Megaskepasma erythrochlamys*) ห่อมช้าง (*Phlogacanthus curvijlorus*) เหลืองศิริปูน (*Pachystachys lutea*) และต้อยติ่งเทศ (*Ruellia squarrosa*) หลายชนิดมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร เช่น ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) เสลดพังพอนตัวเมีย (*Clinacanthus nutans*) เสลดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina*) อังกาบ (*Barleria cristata*) สังกกรณี (*Barleria strigosa*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) และเหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus*) เป็นต้น รวมทั้งหลายชนิดเป็นวัชพืช เช่น ต้อยติ่ง (*Ruellia tuberosa*) โดยสมศักดิ์ คงพริ้ว (2552) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสมุนไพรวงศ์ต้อยติ่งโดยวิธีสัณฐานวิทยา ไอโซไซม์ และเซลล์พันธุศาสตร์ จำนวน 18 ตัวอย่าง ซึ่งปลูกรวบรวมไว้ที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ คือ เหงือกปลาหมอแอฟริกา (*Acanthus montanus* T. Anderson) อังกาบดอกสีขาว (*Barleria cristata* L. white flowered) อังกาบดอกสีม่วง (*B. cristata* L. violet flowered) อังกาบดอกสีขาวแถบม่วง (*B. cristata* L. white with violet strip flowered) อังกาบหนู (*B. prionitis* L.) พญาปล้องทอง (*Clinacanthus nutans* Lindau) ลิ้นงูเห่า (*C. siamensis* Bremek.) กระจูดไก่เขียว (*Justicia gendarussa* Burm. f.) กระจูดไก่ดำ (*J. gendarussa* Burm. f.) กระจูดไก่อดำ (*J. gendarussa* Burm. f.) บัวชาดำ (*J. ventricosa* Wall.) กำลั้งเจ็ดข้างสาร (*Peristrophe bivalvis* Merr.) หัวชะอำ (*P. lanceolaria* Nees) ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* Kuntze) ขาไก่ (*Ruellia schomburgkii* (Craib) Bremek.) ต้อยติ่ง (*R. tuberosa* L.) คราม (*Strobilanthes cusia* Berm.) และรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) พบว่ามีลักษณะเด่นประจำวงศ์เป็นไม้ล้มลุก ไม้พุ่ม หรือไม้เลื้อย ดอกออกเป็นช่อ ดอกมีกลีบเลี้ยง 4 หรือ 5 กลีบเชื่อมติดกัน กลีบดอกมีโคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด เกสรเพศผู้มี 2 หรือ 4 อัน รังไข่อยู่เหนือวงกลีบ รังไข่มี 2 ช่อง แต่ละช่องมีออวูล 1 ถึงหลายอัน ผลเป็นแบบแห้งแตกกลางพู สามารถใช้ลักษณะของลำต้น ใบ ช่อดอก ดอกย่อย และเกสรเพศผู้มาระบุพืชได้ การศึกษาจำนวนโครโมโซมร่างกายแตกต่างกันจาก 30-80 แท่ง โดยที่สกุล *Justicia* และ *Rhinacanthus* มี  $2n = 30$  *Ruellia*, *Strobilanthes* มี  $2n = 32$  *Clinacanthus* มี  $2n = 34-50$  *Barleria* มี  $2n = 36-60$  *Thunbergia* มี  $2n = 54$  *Peristrophe* มี  $2n = 60$  และ *Acanthus* มี  $2n = 80$  การวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์สามารถจำแนกตัวอย่างทั้งหมดออกจากกันได้

## 2.2 พืชสกุลห้อมช้าง (ดัดแปลงจาก Jiaqi และคณะ, 2011; วินัย และคณะ, 2554)

พืชสกุลห้อมช้าง (*Phlogacanthus* Nees) เป็นไม้ล้มลุกหรือไม้พุ่มตั้งตรง ลำต้นเป็นช่อที่ยอด ใบเป็นใบเรียงตรงข้าม ขอบใบเรียบหรือหยักมน พบซิสโทลิท (cystolith) ได้ที่เนื้อเยื่อชั้นผิวหนังด้านล่าง (epidermis) และชั้นแพลลิสเตด (palisade) ปากใบเป็นแบบไดอะไซติก (diacytic) และพบรยางค์ทั้งต่อม (sessile glandular trichome) และขนที่ผิวใบ (non glandular trichome) ช่อดอกแบบช่อกระจจะ (thyrses) หรือช่อกระจุก (cymes) เกิดที่ปลายยอด ซอกใบ ใบประดับ (bract) ขนาดเล็ก ใบประดับย่อย (bracteole) มีลักษณะคล้ายใบ มีรูปร่างเป็นรูปหอกหรือรูปแถบ วงกลีบเลี้ยง (calyx) ปลายแยก 5 แฉกไม่เท่ากัน กลีบดอกเรียงแบบแอสเซนดิ้ง โคเคลียร์ (ascending - cochlear aestivation) วงกลีบดอก (corolla) ที่โคนมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกส่วนปลายโค้งข้างเดียว ส่วนปลายหลอดวงกลีบ มีลักษณะโค้งหรือเหยียดตรง ปลายแยก 5 ส่วน แต่ละส่วนไม่เท่ากัน เกสรเพศผู้ (stamen) จำนวน 2 อัน ออวูล (ovule) จำนวน 6 อัน จนถึงจำนวนมาก ผลแบบผลแห้งแตก (capsule) เมล็ดเกิดที่ช่วงปลายของผล มีก้านตะขอติดเมล็ด (jaculator) มีจำนวน 8 - 16 เมล็ด มีการจัดหมวดหมู่พืชสกุลห้อมช้างแตกต่างกันไป เช่นตามฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI Family: Acanthaceae, Subfamily: Acanthoideae, Tribe: Ruellieae, Subtribe: Andrographinae และ Genus: *Phlogacanthus* การจัดหมวดหมู่ตาม Scotland และ Vollesen (2000a); Scotland และ Vollesen (2000b) อ้างโดย วินัย และคณะ (2554); วินัย และ

คณะ (2555); Ningombam (2012); จากข้อมูลการเรียงของกลีบดอก (aestivation) ข้อมูลเรณู และข้อมูลด้านความสัมพันธ์ของพืชเชิงวิวัฒนาการชาติพันธุ์ คือ Family: Acanthaceae, Subfamily: Acanthoideae, Tribe: Ruellieae, Subtribe: Andrographinae และ Genus: *Phlogacanthus* ยกตัวอย่างพืชสกุลหอมช้างที่พบในประเทศไทย และนำมาศึกษาในครั้งนี้ ดังนี้

### 2.2.1 *Phlogacanthus curviflorus* (Wall.) Nees

หอมช้าง (*P. curviflorus* (Wall.) Nees) พบในประเทศไทย (ธวัชชัย, 2549; วินัย และคณะ, 2554; Bremekamp, 1961; Jiaqi และคณะ, 2011) อินเดีย (Anderson, 1867; Clarke, 1885; Jiaqi และคณะ, 2011) ภูฏาน จีน ลาว เวียดนาม (Jiaqi และคณะ, 2011) และเมียนมาร์ (เต็ม, 2544; Bremekamp, 1961; Craib, 1912; Jiaqi และคณะ, 2011) ในไทยส่วนมากจะพบทางภาคเหนือแทบทุกจังหวัด เช่น จังหวัดเชียงใหม่ (ก่องกานดา, 2550; เต็ม, 2544; วินัย และคณะ, 2555; Craib, 1912; Elliott, 1994) แม่ฮ่องสอน น่าน (วินัย และคณะ, 2555; Srisanga, 2005) และเชียงราย (Maxwell, 2008; Meeboon, 2006) เป็นต้น พบประปรายทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่จังหวัดเลย และภาคกลางที่จังหวัดนครนายก กาญจนบุรี (ปตท. จำกัด (มหาชน), 2553; Darumas และคณะ, 2007) โดยขึ้นในป่าดิบแล้งและป่าดิบเขาที่มีความชุ่มชื้นสูง ที่ระดับความสูง 300 - 1500 เมตร หอมช้าง (รูปที่ 2.4) เป็นไม้พุ่ม สูง 3 - 6 เมตร ใบเรียงตรงข้าม รูปรีหรือรูปขอบขนาน ยาว 12 - 35 เซนติเมตร ปลายใบแหลมหรือแหลมยาว โคนใบรูปปลีมน เรียวสอบจรดก้านใบ แผ่นใบมีขนละเอียดตามเส้นแขนงใบด้านล่าง เส้นแขนงใบข้างละ 12 - 17 เส้น ก้านใบยาว 1.5 - 5 เซนติเมตร ช่อดอกแบบช่อกระจุกแยกแขนงสั้นๆ ออกตามปลายกิ่ง ยาว 14 - 18 เซนติเมตร แต่ละช่อกระจุกมี 1 - 5 ดอก ก้านดอกยาว 0.5 - 1.2 เซนติเมตร มีขนสั้นนุ่ม ใบประดับรูปใบหอก ยาว 3 - 7 มิลลิเมตร ใบประดับย่อยยาว 2 - 3 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยง 5 กลีบ แฉกเล็ก ยาวเท่าๆ กัน รูปใบหอก ปลายเรียวแหลม ยาว 0.6 - 1 เซนติเมตร ด้านนอกมีขนประปราย มีขนหนาแน่นด้านใน กลีบดอกรูปปากเปิด สีม่วงอมแดงหรืออมชมพู ด้านนอกมีขนละเอียดหนาแน่น หลอดกลีบดอกยาวประมาณ 4.2 เซนติเมตร กลีบล่าง 3 กลีบ กลีบรูปรี ยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร กลีบบน 2 กลีบ สั้นกว่ากลีบล่างเล็กน้อย เกสรเพศผู้ 4 อัน เป็นหมัน 2 อัน ติดภายในหลอดกลีบดอก ยื่นพ้นปากหลอดกลีบดอกเล็กน้อย ก้านชูอับเรณูเกลี้ยง อับเรณูยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร เกสรเพศผู้ที่เป็นหมันขนาดเล็ก รังไข่และก้านเกสรเพศเมียเกลี้ยง ผลแบบผลแห้งแตก รูปแถบ มีสันเป็นเหลี่ยม 4 เหลี่ยม ยาว 3.5 - 5 เซนติเมตร มี 8 - 10 เมล็ด เมล็ดแบน เว้าตื้นๆ ยาว 5.5 - 6.5 มิลลิเมตร มีขนสั้นนุ่ม (<http://web3.dnp.go.th/botany/detail.aspx?words=หอมช้าง&typeword=group>) ดอกของหอมช้างมีน้ำหวานที่รับประทานได้ ดอกรับประทานสดกับน้ำพริกหรือนำไปแกง เช่น แกงบอน หรือลวกกินกับน้ำพริก มีรสขม ใบ ผิงไฟประคบร้อนหรือนำมาตำแล้วเอามานวดหรือถู บริเวณกล้ามเนื้อที่เป็นตะคริวช่วยบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อ หรือนำมาทุบและใช้ขัดตัวทำความสะอาด ([http://eherb.hrdi.or.th/search\\_result\\_details.php?herbariumID=938&name=หอมช้าง](http://eherb.hrdi.or.th/search_result_details.php?herbariumID=938&name=หอมช้าง)) ตัณนำมาต้มน้ำดื่มไล่ไข้ รากต้มน้ำดื่มแก้ลมพิษเดือน (ชูศรี และปรีทรรศน์, 2554)



### รูปที่ 2.1 *Phlogacanthus curviflorus* (Wall.) Nees

ที่มา: <http://www.mirrorwild.com/archives/6363/khoa-chong-yen-adventure-59>

#### 2.2.2 *Phlogacanthus paniculatus* (T. Anderson) Imlay

ห้อมขาว (*P. paniculatus* (T. Anderson) Imlay) พบในประเทศไทย (วินัย และคณะ, 2554) จีน และลาว ซึ่งในประเทศไทยพบที่จังหวัดน่าน (วินัย และคณะ, 2555) และอุทยานแห่งชาติ นาแห้ว (Eriksen และคณะ, 2004) ซึ่งปัจจุบันคือ อุทยานแห่งชาติภูสวนทราย จังหวัดเลย

#### 2.2.3 *Phlogacanthus pedunculatus* Imlay

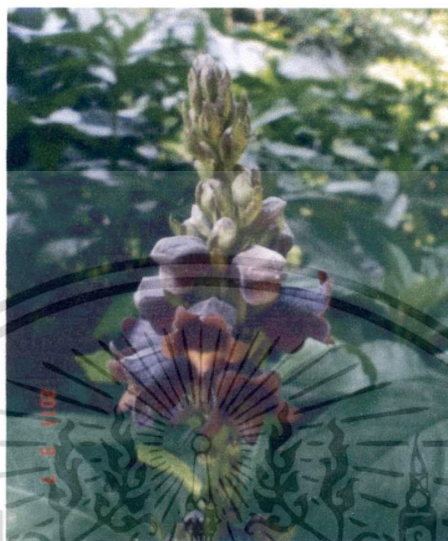
ห้อมคราม (*P. pedunculatus* Imlay) พบในประเทศไทย (วินัย และคณะ, 2554; <http://apps.kew.org/herbcat/getImage.do?imageBarcode=K000950002>) โดยพบที่จังหวัดราชบุรี (วินัย และคณะ, 2555; Imlay, 1939) จังหวัดลำพูน และอำเภอแจ้ห่ม จังหวัดลำปาง และอำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี (Imlay, 1939) และที่ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ (<http://sonneratphoto.mnhn.fr/2011/09/22/4/P03033010.jpg>)

#### 2.2.4 *Phlogacanthus pulcherrimus* T.Anderson

ดีปลากั้ง (*P. pulcherrimus* T.Anderson) พบในประเทศไทย (วินัย และคณะ, 2554) เวียดนาม กัมพูชา และอินเดีย โดยในประเทศไทยพบที่จังหวัดเชียงใหม่ ตาก (วินัย และคณะ, 2555) ศรีสะเกษ น่าน ชัยภูมิ และอุบลราชธานี ดีปลากั้ง (รูปที่ 2.2) เป็นไม้พุ่มสูง 50 - 150 เซนติเมตร ลำต้นตั้งตรง ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามกัน แผ่นใบรูปรีแกมรูปขอบขนาน ยาว 8 - 16 เซนติเมตร กว้าง 3 - 5 เซนติเมตร ปลายใบเรียวแหลม โคนใบรูปลิ้ม ขอบใบเรียบ ก้านใบ ยาว 1 - 3 เซนติเมตร ช่อดอกแบบช่อเชิงลด ออกที่ปลายยอด ดอกสมบูรณ์เพศ กลีบเลี้ยงมีสีเขียว รูปประฆัง ยาว 5 มิลลิเมตร กลีบดอกสีม่วงอมแดง เชื่อมกันเป็นรูปคนโท ส่วนหลอดกลีบพองออกด้านเดียว ส่วนปลายแยกเป็น 5 แฉก ผลแบบผลแห้งแตก ยาว 2.5 - 3.5 เซนติเมตร ดีปลากั้งถือเป็นผักสวนครัวชนิดหนึ่ง ทางภาคเหนือนำมาใบอ่อนมาทานกับลาบ มีสรรพคุณ คือ รากใช้ต้มน้ำดื่มแก้ปวดเมื่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(วงศ์สฤติย, 2553) แก้วไข่ และแก้วหีดหอบ โรคความดัน ลำต้นใช้ต้มบำรุงโลหิต บำรุงธาตุ ขับลมในลำไส้ ใบใช้ปรุงอาหาร มีรสขม แก้วโรคเบาหวาน ดอกใช้เป็นยาขับลมในลำไส้ ทำให้ผายลมและเรอ (คัดแปลงจาก <http://www.bansuanporpeang.com/node/13753>)



รูปที่ 2.2 *Phlogacanthus pulcherrimus* T.Anderson

ที่มา:

<http://www.flickr.com/photos/60209130@N03/5504986569/sizes/o/in/photostream/>

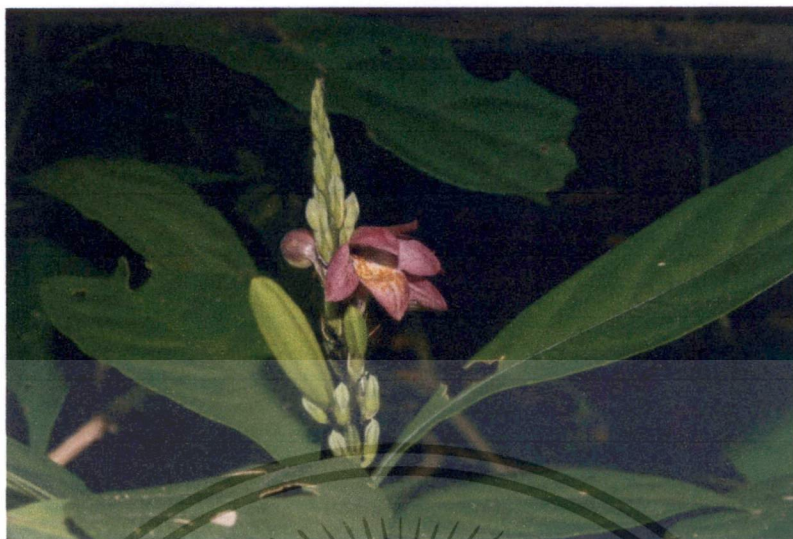
#### 2.2.5 *Phlogacanthus rectiflorus* Imlay

ห้อมใต้ลายจุด (*P. rectiflorus* Imlay) พบในประเทศไทย (วินัย และคณะ, 2554) โดยพบที่จังหวัดภูเก็ตและพังงา (Imlay, 1939)

#### 2.2.6 *Phlogacanthus vitellinus* T. Anderson

ห้อมแดง (*P. vitellinus* T. Anderson) พบในประเทศไทย (วินัย และคณะ, 2554) จีน และอินเดีย (Anderson, 1867) ในประเทศไทยพบที่อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ห้อมแดง (รูปที่ 2.3) เป็นไม้พุ่มเตี้ยติดดิน เกิดตามโคก เขิงเขา ยอดและใบอ่อน รับประทานเป็นผักสดร่วมกับลาบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 *Phlogacanthus vitellinus* T. Anderson

ที่มา: [http://www.flickr.com/photos/tony\\_rodd/6943417417/sizes/o/in/photostream/](http://www.flickr.com/photos/tony_rodd/6943417417/sizes/o/in/photostream/)

### 2.3 พืชสกุลอังกาบ

พืชสกุลอังกาบ (*Barleria* L.) อยู่ในวงศ์ Acanthaceae วงศ์ย่อย Acanthoideae เผ่า (Tribe) Ruellieae เผ่าย่อย (Subtribe) Barleriinae สกุล *Barleria* เป็นพืชสกุลใหญ่ที่นำมาใช้เป็น พืชสมุนไพร และส่วนใหญ่เป็นพืชล้มลุก และเป็นไม้พุ่ม ใบเดี่ยว ปลายและขอบใบแหลมคม เห็นซิสโทลิท (cystolith) ชัดเจน ดอกช่อแบบช่อเชิงลด (spike) หรือ แบบช่อกระจุก ไม่มีก้านดอก มีใบประดับของช่อดอกที่ลดรูปเป็นลักษณะคล้ายหนาม เกิดที่ซอกใบ มีหลายสี ใบประดับเรียงซ้อนเหลื่อม วงกลีบเลี้ยง เป็นหยักลึก 4 แฉก แบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นนอกขนาดใหญ่กว่าชั้นใน หลอดวงกลีบรูปกรวย มี 5 แฉก รูปไข่ บานไปทางด้านบนของดอก เกสรเพศผู้มี 4 อัน แบ่งเป็นเกสรที่ยื่นออกไปด้านหน้า 2 อัน มีอับเรณู 2 อัน สมมาตร เกสรเพศผู้ที่อยู่ด้านในมี 2 อัน ลักษณะเป็นหมัน ผลแห้งแตก คล้ายรูปไข่ หรือรูปขอบขนาน ไม่มีก้าน เมล็ดมีจำนวน 2 หรือ 4 เมล็ด รูปค่อนข้างกลม ผิวหยาบแบนชนิด ไม่มีขนที่ไวต่อความชื้น (Benoist, 1912; Ridley, 1923; Cramer, 1998)

พืชสกุลนี้พบทั่วไปในเขตแห้งแล้งของเขตร้อนทั่วโลก มีประมาณ 300 สายพันธุ์ มีความเชื่อว่าพืชในสกุล *Barleria* มีการแพร่จากประเทศญี่ปุ่น เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย แอฟริกา หรือ เกาะมาดากัสการ์ไปยังทวีปอเมริกา และเม็กซิโก ซึ่งมีการกระจายมากในแถบ Old World เช่น ในทวีปแอฟริกา มีความหลากหลายของพืชในสกุล *Barleria* บริเวณเขตอบอุ่นด้านตะวันออกประมาณ 80 สายพันธุ์ และตอนใต้ประมาณ 70 สายพันธุ์ สำหรับอเมริกาพบเพียง *B. oenotheroides* สายพันธุ์เดียวเท่านั้น (Balkwill และ Balkwill, 1998)

ในสกุล *Barleria* แบ่งออกเป็น 2 สกุลย่อย คือ *Barleria* และ *Prionitis* (Nees) C.B. Clarke และแบ่งออกเป็น 7 หมู่ (sections) โดยสกุลย่อย *Barleria* มี 2 หมู่ คือ *Barleria* และ *Chrysothrix* M. Balkwill และสกุลย่อย *Prionitis* มี 5 หมู่ คือ *Cavirostrata* M. Balkwill, *Stellatohirta* M. Balkwill, *Fissimura* M. Balkwill, *Somalia* (Oliv.) Lindau และ *Prionitis* (Nees) Lindau ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างจากการแบ่งแบบเดิมที่เป็น 3 สกุลย่อย คือ *Barleria*, *Somalia* และ *Prionitis* (Balkwill และ Balkwill, 1997) โดย Sections *Barleria* และ *Prionitis* มีการกระจายอยู่ทั่วไป แตกต่างจาก *Somalia* (Oliv.) Lindau, *Fissimura* M. Balkwill และ *Stellatohirtae* M. ที่มีการแพร่กระจายอยู่เฉพาะทวีป Africa สำหรับ Sections *Chrysothrix* M. Balkwill และ *Cavirostrata* M. Balkwill มีการแพร่กระจายอยู่มากในประเทศ India และ Sri Lanka (Balkwill และ Balkwill, 1998) การศึกษาการกระจายตัวของพืชในสกุลอังกาบบางชนิดในหมู่เกาะอินโดนีเซีย พบว่า *B. cristata* L. หรือ Philippine violet มีแหล่งกำเนิดจาก India, Burma และพบแพร่กระจายอยู่ในประเทศ Australia, Fiji, French Polynesia และ Hawaii สำหรับ *B. lupulina* Lindley หรือ Hophead มีแหล่งกำเนิดจาก Madagascar และพบแพร่กระจายอยู่ในประเทศ Australia, Hawaii, La Réunion และ *B. prionitis* L. หรือ Porcupine flower มีแหล่งกำเนิดจาก India และพบแพร่กระจายอยู่ในประเทศ Australia และ Samoa (Meyer และ Lavergne, 2004) เป็นต้น รวมทั้ง Darbyshire (2009) พบความหลากหลายของ *B. fulvostellata* C. B. Clarke มากในบริเวณตะวันออกของ Africa

Darbyshire (2008a) ได้ทำการศึกษา *B. descampsii* Lindau บริเวณรอยต่อระหว่างสาธารณรัฐแซมเบียและสาธารณรัฐแซมเบียด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถย้ายกลุ่มจาก sect. *Stellatohirta* M. Balkwill ไปเป็น sect. *Cavirostrata* ที่ใกล้เคียงกับ *B. grandipetala* De Wild และ *B. richardsiae* I. Darbysh และพบสปีชีส์ใหม่ คือ *B. samhanensis* บริเวณทางเหนือของประเทศโอมาน (Knees และคณะ, 2007) เช่นเดียวกับ Darbyshire (2008b) ได้ศึกษาด้านสัณฐานวิทยาพบสปีชีส์ใหม่ในพืชสกุล *Barleria* sect. *Stellatohirta* จากประเทศ Africa 3 สปีชีส์ คือ *B. aristata* จาก south-central Tanzania, *B. aenea* จาก south-western Tanzania และ northeast Zambia และ *B. purpureotincta* จาก south-western Zambia รวมทั้ง Malombe และ Malombe และ Darbyshire (2010) ที่ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุล *Barleria* ใน Somalia พบสปีชีส์ใหม่ คือ *Barleria compacta* ที่อยู่ในส่วน (Section) ของ *Prionitis*

โดยมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และข้อมูลในพืชสกุล *Barleria* ในระดับโมเลกุลน้อย มีเพียง Makholela และคณะ (2003) ที่ศึกษาด้วยเทคนิคทาง allozyme ใน *B. greenii* จากพื้นที่สามแหล่งในประเทศแอฟริกา โดยทำการศึกษาตำแหน่งของ เอนไซม์จำนวน 16 ตำแหน่ง เช่น Asparatate aminotransferase, Esterase, Glucose-6-phosphate isomerase และ Isocitrate dehydrogenase เป็นต้น พบว่า 7 ตำแหน่ง (43.8%) สามารถแยกความแตกต่างของประชากรทั้ง 3 ได้ และพบว่า 9 ตำแหน่ง (56.2%) ปรากฏเพียงลักษณะเดียว

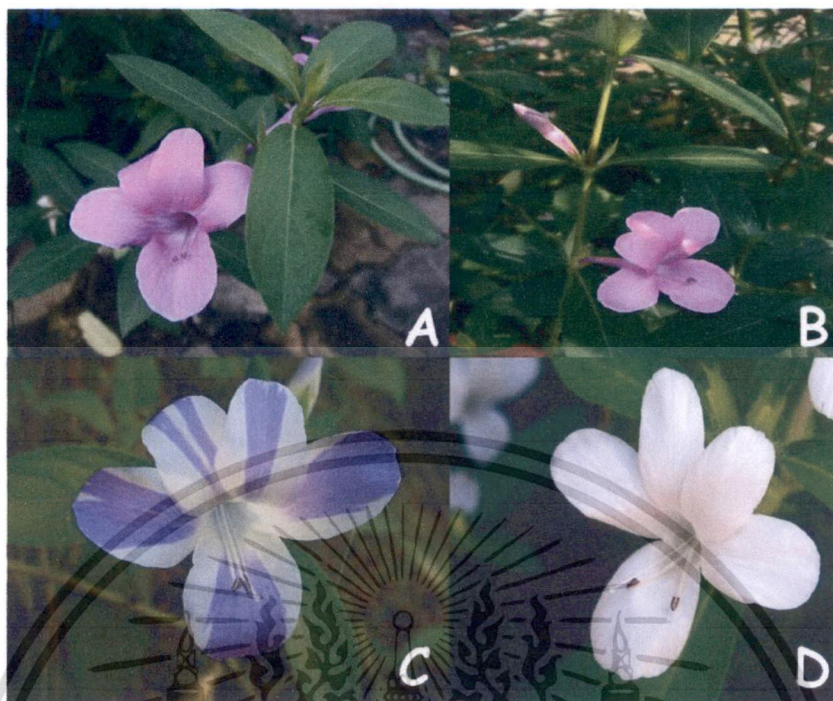
Craib (1918) ศึกษาพรรณไม้ในประเทศไทยและแถบภูมิภาคอินโดจีน โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของพืช พบพรรณไม้ในเผ่าย่อย Barleriinae 6 ชนิด คือ *Asystasia kerrii* L., *Asystasiella neesiana* L., *Barleria cristata*, *B. lupulina*, *B. siamensis* Craib และ *B. strigosa* Willd. และในประเทศไทยพบพืชในสกุลอังกาบได้ในพื้นที่แห้งแล้ง รกร้าง ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าดิบแล้งของทุกภาคของทั่วประเทศ จำนวน 5 ชนิด (Hansen, 1985) และในการประชุมสัมมนาพิพิธภัณฑ์สิรินธรกับการพัฒนาการเกษตร และสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย ประจำปี 2552 แสดงให้เห็นว่าพบพืชในสกุลอังกาบอย่างน้อย 8 ชนิด คือ อังกาบเขา (*B. biloba*), อังกาบ (*B. cristata* L.), เท้าถ้ำ (*B. longiflora* L.), เสลดพังพอน (*B. lupulina* Lindl.), อังกาบหนู (*B.*

*prionitis* L.), *B. polytricha* Wall., กระจับ (*B. siamensis* Craib) และสังกรณี (*B. strigosa* Willd.) ซึ่งพบว่ามียลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน เช่นลักษณะสีดอก ลักษณะไม้พุ่มหรือไม้เลื้อย ซึ่งพืชในสกุลนี้มีรูปแบบที่ไม่แน่นอน รวมทั้งในประเทศไทยการเรียกชื่อนั้นส่วนใหญ่มีการเรียกชื่อที่แตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น ซึ่งอาจเกิดความสับสนได้ เช่น *B. strigosa* Willd. ชื่อสามัญ สังกรณี (Sang-ko-ra-ni) ชื่อท้องถิ่น กำแพงใหญ่ (kam-phaeng-yai) ในจังหวัดเลย, ชี่ไฟนกคุ้ม (Khi-fai-nok-khum) ในจังหวัดปราจีนบุรี, เห่งดี (Thoeng-de) ในจังหวัดกาญจนบุรี, หล้าหงอนไก่ (Ya-ngon-kai) หรือ หล้าหัวนาค (Ya-hua-nak) ในภาคเหนือ, กวางที่แฉะ (Kwang-hi-chae) ในจังหวัดสุโขทัย และยังพบในชื่อ ดอกสังกรณี ต้นสังกรณี ใบสังกรณี ผลสังกรณี และรากสังกรณี เป็นต้น *B. prionitis* L. ชื่อท้องถิ่น เขี้ยวแก้ว (Khaio-kaeo) เขี้ยวเนื้อ (Khiao-nuea) อังกาบหนู (Ang-kap-nu) (ภาคกลาง) มันไก่ (Man-kai) (ภาคเหนือ) *B. lupulina* Lindl. ชื่อสามัญ เสดดพังพอน (Salet-phang-phon) ชื่อท้องถิ่น พิมเสนต้น (Phimsen-ton) เสดดพังพอนตัวผู้ (Salet-phang-phon-tua-phu) (ภาคกลาง), ดอกเสดดพังพอน, ต้นเสดดพังพอน, ใบเสดดพังพอน, ผลเสดดพังพอน, รากเสดดพังพอน, เช็กเซเกี่ยม Chek-che-kiam (Chinese) *B. siamensis* Craib ชื่อท้องถิ่น กระจับ (Ra-ngap), กระจับพิษ (Ra-ngap-phit) และหญ้ากำแพง (Ya-kam-phaeng) (ในจังหวัดเลย) *B. longflora* L. ชื่อท้องถิ่น เท้าฤาษี (Thao ruesi) (นครราชสีมา) *B. biloba* Imlay ชื่อท้องถิ่นอังกาบเขา (Ang kap khao) และ *B. cristata* L. ชื่อท้องถิ่น ก้านชั่ง (Kan chang), สีมเฒ่าใหญ่ (Luem thao yai) (เชียงใหม่), คันชั่ง (Khan chang) (ตาก), ทองระอา (Thong ra a) (กรุงเทพฯ), อังกาบ (Ang kap), อังกาบเมือง (Ang kap mueang) (ภาคกลาง) และอังกาบกานพลู (Ang kap kan phlu) สำหรับภาคเหนือ ดังนั้นในการจัดจำแนก หรือการนำมาใช้ประโยชน์ อาจผิดพลาดจากการมีชื่อท้องถิ่น โดยในประเทศไทยนำพืชสกุลอังกาบมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การนำอังกาบมาใช้เป็นไม้ดอกและไม้ประดับ ใช้เป็นพืชสมุนไพร ได้แก่ เสดดพังพอน อังกาบหนู และสังกรณี (นันทวัน และอรนุช, 2543a; นันทวัน และอรนุช, 2543b) อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานข้อมูลทางในการจัดจำแนก หรือความหลากหลายในระดับโมเลกุล มีเพียงข้อมูลด้านองค์ประกอบทางเคมีในบางสปีชีส์เท่านั้น คือ เสดดพังพอน ตัวอย่างพืชในสกุล *Barleria*

### 2.3.1 อังกาบ (*Barleria cristata* L.)

อังกาบ (*Barleria cristata*) มีชื่อท้องถิ่น เช่น ก้านชั่ง สีมเฒ่าใหญ่ อังกาบกานพลู อังกาบเมือง ทองระอา และคันชั่ง เป็นต้น เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ลำต้นมีความสูงประมาณ 1-2 เมตร กิ่งก้านและใบมีขนสีเหลืองอ่อน ใบออกตรงข้ามเป็นคู่ๆ ใบรูปไข่แกมรี กว้าง 2-5 เซนติเมตร ยาว 4.5-8 เซนติเมตร มีขนทั้งสองด้านโดยเฉพาะตามเส้นใบ ปลายใบแหลม โคนใบสอบ ขอบใบเรียบ ก้านใบยาว 0.3-1.3 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อ ค่อนข้างแน่นที่ปลายยอด หรือบริเวณใกล้ปลายยอด สีฟ้าอมม่วงหรือแกมชมพู ที่โคนช่อดอกมีใบประดับรูปขอบขนานยาว ขอบใบเว้า ปลายเป็นหนามแหลม ยาว ดอกส่วนโคนเชื่อมเป็นหลอด ยาว 3-4 เซนติเมตร ส่วนปลายแยกเป็น 5 กลีบ ขนาดไม่เท่ากัน กลีบล่างจะใหญ่กว่า 4 กลีบบน ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ด้านนอกมีขน เกสรผู้ 4 อัน สั้น 2 ยาว 2 ผลเป็นฝักรูปยาวรี ปลายและโคนแหลม ส่วนปลายกว้างกว่าส่วนโคน เมล็ดมี 4 เมล็ด พบขึ้นทั่วไปตามหัวไร่ปลายนา ป่าละเมาะ ป่าดงดิบ และป่าเต็งรัง ตามรายงานของสมศักดิ์ (2552) พบได้ทั้งอังกาบดอกสีม่วง (รูปที่ 2.4 A และ B) อังกาบดอกสีขาวแถบม่วง (รูปที่ 2.4 C) และอังกาบดอกสีขาว (รูปที่ 2.4 D)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

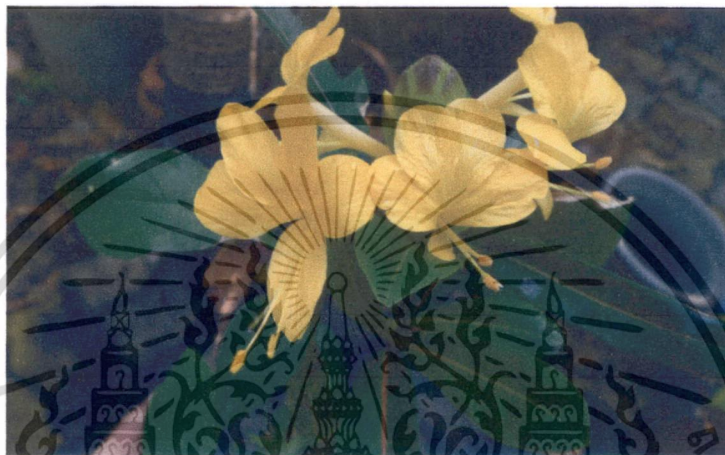


รูปที่ 2.4 แสดงสีของดอกอังกาบ (*B. cristata*) (A-B) อังกาบดอกสีม่วง (C) อังกาบดอกสีขาวแถบม่วง และ (D) อังกาบดอกสีขาว

### 2.3.2 เกล็ดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina* L.)

เสลดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina*) มีชื่อท้องถิ่น เช่น เช็กเซเกียม พิมเสนตัน เป็นไม้พุ่มสูง 1-2 เมตร แตกกิ่งจำนวนมาก สีสน้ำตาลอมเขียวหรือสีน้ำตาลแดง ใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามสลับฉาก เรียงชิดกันใกล้ซอกดอก ใบรูปใบหอก ยาว 4-10 เซนติเมตร ปลายใบแหลม โคนใบเรียวสอบจรดก้านใบ ขอบใบเรียบ แผ่นใบเกลี้ยง สีเขียวเข้มหรืออมม่วง เส้นกลางใบส่วนมากมีสีแดงหรือสีชมพู ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ก้านใบสั้น มีหนามที่โคนหนึ่งคู่ โค้งอ ยาว 1-2 เซนติเมตร มีหนามสั้นๆ ตรง 1 อัน ซอกดอกแบบช่อเชิงลด ออกตามปลายกิ่ง ยาว 8-10 เซนติเมตร ใบประดับมีโคนสีเขียว สีสน้ำตาลอมม่วงครึ่งบน หรือทั้งใบประดับมีสีแดงอมเขียวหรือสีม่วงอมน้ำตาล รูปไข่เกือบกลม ปลายเป็นติ่งแหลม ยาวได้ประมาณ 1.5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ เรียงตรงข้ามเป็นคู่ ยาว 0.8-1 เซนติเมตร คู่นอกมีขนาดใหญ่กว่าคู่ใน ปลายเป็นติ่งหนาม กลีบดอกคล้ายรูปปากเปิด หลอดกลีบเรียวยาว ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร กลีบดอก 5 กลีบ สีส้มหรือเหลือง กลีบส่วนบนส่วนใหญ่มี 4 กลีบ เรียงซ้อนแผ่ชิดกันบานแผ่ออก ขนาดใหญ่กว่ากลีบล่าง ยาว 1-2 เซนติเมตร กลีบล่างขนาดเล็ก พังงอเล็กน้อย เกสรเพศผู้ 2 อัน ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ยื่นพ้นปากหลอดกลีบดอก ดังแสดงในรูปที่ 2.5 และมีเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน 2 อัน สั้นๆ รังไข่ 2 ช่อง ก้านเกสรเพศเมียเรียวยาว ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร ผลแบบแคปซูล รูปไข่หรือแกมรูปขอบขนานแบน ยาว ประมาณ 1.5 เซนติเมตร แห้งแล้วแตกเป็น 2 ซีก มี 1-2 เม็ด ในแต่ละซีก ในการนำมาใช้ประโยชน์พบว่า มีฤทธิ์ลดการอักเสบ โดย Kanchanapoom และคณะ (2001) สกัดสาร 8-O-acetyl-6-O-trans-p-coumaroylshanzhiside, saletpangponosides เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A-C and 8-O-acetylmussaenoside จากยอดอ่อนของเสลดพังพอนตัวผู้ เมื่อทดสอบสารดังกล่าว มีฤทธิ์ลดการอักเสบได้ มีฤทธิ์ลดอาการปวด โดยพบว่าสารสกัดคลอโรฟอร์มจากส่วนเหนือดิน ความเข้มข้นระหว่าง 125-500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดอาการปวดในหนูถีบจักร เมื่อใช้การทดสอบด้วย acetic acid หรือฟอร์มาลิน รวมทั้งมีความเป็นพิษโดยเมื่อให้หนูถีบจักรกินสารสกัดเมทานอลจากส่วนเหนือดิน หรือฉีดเข้าช่องท้อง ในระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้หนูตายครั้งหนึ่ง (LD50) เท่ากับ 4.5 และ 3.7 กรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ (Suba และคณะ, 2004)



รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะใบและดอกของเสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*)

### 2.3.3 อังกาบหนู (*Barleria prionitis* L.)

อังกาบหนู (*Barleria prionitis*) มีชื่อท้องถิ่น เช่น มันไก่ เขี้ยวเนื้อ และเขี้ยวแก้ว เป็นต้น เป็นไม้พุ่ม สูง 1-1.5 เมตร แตกกิ่งจำนวนมาก ลำต้นเกลี้ยง มีหนามยาวรอบข้อ หนามยาว 1-2 เซนติเมตร ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปรี รูปไข่ หรือรูปขอบขนาน ยาว 4-12 เซนติเมตร ปลายใบแหลม ปลายเป็นติ่งแหลม โคนใบเรียวสอบจรดก้านใบ ขอบใบมีขนแข็ง แผ่นใบมีขนสั้นนุ่มกระจายด้านล่าง ก้านใบยาวได้ประมาณ 2.5 เซนติเมตร ใบตามซอกดอกมีขนาดเล็กกว่าตามลำต้น ดอกออกเป็นกระจุก ตามซอกใบใกล้ปลายกิ่ง ออกหนาแน่นช่วงปลายกิ่งคล้ายช่อเชิงลดสั้นๆ ใบประดับรูปแถบ ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใบประดับย่อยเป็นหนาม ติดทน ยาว 1-1.5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ เรียงซ้อนเหลื่อม ขนาดไม่เท่ากัน คุ้นอกมีขนาดใหญ่กว่า ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ปลายเป็นติ่งหนาม กลีบคู้ในรูปไข่ ปลายแหลมยาว กลีบดอกคล้ายรูปปากเปิด หลอดกลีบยาว 2-2.5 เซนติเมตร กลีบดอก 5 กลีบ สีเหลือง กลีบบน 4 กลีบ ยาวเท่าๆ หลอดกลีบ เรียงซ้อนเหลื่อม กลีบล่างขนาดเล็กกว่าเล็กน้อย เกสรเพศผู้ 2 อัน ติดที่โคนกลีบดอก ยื่นเลยปากหลอดกลีบเล็กน้อย ดังรูปที่ 2.6 อับเรณู ยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน 2 อัน ขนาดเล็ก รั้งไข่อูรูปไข่ ยาวประมาณ 3-4 มิลลิเมตร มี 2 ช่อง แต่ละช่องมีอวูล 2 เม็ด ก้านเกสรเพศเมียเรียวยาว ยาวกว่าเกสรเพศผู้ ยอดเกสรเป็น 2 พู ไม่ชัดเจน ผลแบบแคปซูล รูปไข่แกมรูปขอบขนาน ยาว 1.5-2 เซนติเมตร ปลายเป็นงอย เมล็ดแบน รูปคล้ายรูปไข่ ยาว 5-7 มิลลิเมตร มีขนคล้ายไหมแบนราบ มีชื่อพ้อง คือ *Barleria*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*hystrix* ที่พบเฉพาะที่ปากีสถานและอินเดียซึ่งใบและดอกมีขนาดใหญ่กว่า ประโยชน์ ใบใช้แก้งูกัด  
เคี้ยวแก้ปวดฟัน

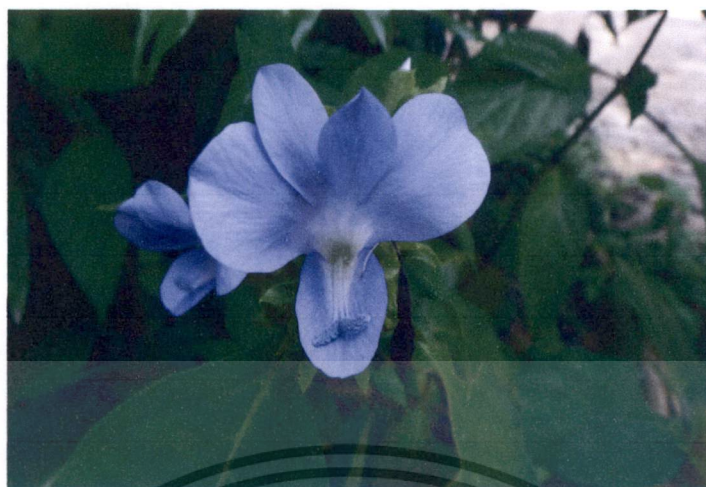


รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะดอกของต้นอังกาบหนู (*B. prionitis*)

#### 2.3.4 สังกกรณี (*Barleria strigosa* Willd.)

สังกรณี (*Barleria strigosa*) มีชื่อท้องถิ่น เช่น กำแพงใหญ่ ชีไพนกุ่ม ตับปิ้ง หญ้าหงอนไก่ และหญ้าหัวนาค เป็นต้น เป็นไม้พุ่ม สูง 1-1.5 เมตร แตกกิ่งมาก ลำต้นและกิ่งมีขนหยาบ ไม่มีหนาม ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปรี รูปขอบขนาน หรือรูปใบหอก ยาวได้ประมาณ 20 เซนติเมตร ปลายใบแหลม แหลมยาว หรือยาวคล้ายหาง โคนใบเรียวสอบจรดก้านใบหรือรูปลิ้ม ขอบใบเรียบ แผ่นใบมีขนด้านล่าง ไร้ก้านหรือมีก้านยาวได้ประมาณ 3 เซนติเมตร ดอกออกเป็นกระจุกช่อคล้ายช่อเชิงลดสั้นๆ ตามซอกใบหรือปลายกิ่ง ใบประดับรูปรี รูปขอบขนาน รูปใบหอกหรือรูปแถบ ยาว 1-2 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ เรียงซ้อนเหลื่อม ขนาดไม่เท่ากัน คู่นอกมีขนาดใหญ่กว่า รูปไข่แกมรูปสามเหลี่ยม รูปรี หรือรูปขอบขนาน ยาว 1-3 เซนติเมตร ขอบจักถี่ เป็นดิ่งหนามสั้นๆ ปลายแหลมหรือแหลมยาว บางครั้งแยก 2 แฉก ตื้นๆ กลีบคู่ในรูปรีหรือรูปขอบขนาน แคบและสั้นกว่าคู่นอก ขอบส่วนมากมีขนครุย กลีบดอกคล้ายรูปปากเปิด หลอดกลีบยาว 2-4 เซนติเมตร กลีบดอก 5 กลีบ สีม่วงอมน้ำเงิน เรียงซ้อนเหลื่อม กลีบบน 4 กลีบขนาดไม่เท่ากัน ยาว 2-3 เซนติเมตร 2 กลีบนอกรูปไข่กลับ 2 กลีบในแคบกว่าเล็กน้อย กลีบล่างเกือบกลม ขนาดเล็กกว่ากลีบบนเล็กน้อย ดังรูปที่ 2.7 เกสรเพศผู้ 4 อัน ติดที่โคนกลีบดอก อันสั้น 2 อัน ยาว 2 อัน อันยาวยื่นเลยปากหลอดกลีบเล็กน้อย อับเรณูยาวประมาณ 3-4 มิลลิเมตร รั้งไขรูปขอบขนาน เกสรตัวเมีย มี 2 ช่อง แต่ละช่องมีอวุล 2 เม็ด ก้านเกสรเพศเมียเรียวยาว ยาวเท่าเกสรเพศผู้อันยาว ยอดเกสรแยก 2 แฉก เรียบ ผลแบบแคปซูล เรียวแคบ ยาวประมาณ 2 ซม. เกสรตัวเมีย เมล็ดแบน กลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร มีขนแบนราบ สังกกรณีมีเขตการกระจายพันธุ์ในภูมิภาคอินโดจีน ในไทยพบทั่วทุกภาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะดอกของต้นสังกรณี (*B. strigosa*)

## 2.4 เทคนิคที่ใช้ในการวิจัย

### 2.4.1 เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ปัจจุบันนิยมหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอในการหาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของพืชดอก Taberlet และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาไพรเมอร์ชนิดใหม่ขึ้นมาเพื่อใช้ในการจำแนกพืช โดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของ tobacco, marchantia และ rice บริเวณยีน *trnT* (UGU) และ *trnF* (GAA) ซึ่งเป็น single-copy region ขนาดใหญ่ที่มีความจำเพาะ และพบว่ายีน *trn* เป็นยีนอนุรักษ์ เมื่อออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้ความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน tRNA 6 ชนิด คือ a, b, c, d, e, และ f แสดงดังตารางที่ 2.1 โดยไพรเมอร์ a และ b ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trnT*(UGU) และ *trnL*(UAA) 5'exon ไพรเมอร์ c และ d ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trnL*(UAA) 5'exon และ *trnL* (UAA) 3'exon และไพรเมอร์ e และ f ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trnL* (UAA) 3'exon และ *trnF* (GAA) ขนาดของผลผลิต (PCR product) ที่คาดว่าจะพบมีขนาด 773, 833 และ 251 คู่เบส (base pair: bp) ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ a และ b ขนาด 577, 614 และ 389 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ c และ d และ ขนาด 438, 324 และ 158 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ e และ f ในพืชชนิด tobacco , marchantia และ rice เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิดนี้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใน algae, bryophytes, pteridophytes, gymnosperms และ angiosperm จำนวน 19 สายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ c และ d สามารถจำแนกพืชดังกล่าวได้มาก ชนิดที่สุด คือจำแนกได้ถึง 15 ชนิดใน 19 ชนิด จึงนิยมนำไพรเมอร์ c และ d มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ universal primer จำนวน 6 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เอบริเวณ non-coding region ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ

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

#### 2.4.2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จะใช้ชีวสารสนเทศ (bioinformatics) มาช่วยในการวิเคราะห์ซึ่งชีวสารสนเทศเป็นศาสตร์แขนงใหม่ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการนำความรู้ด้านเทคโนโลยีสารสนเทศมาใช้ในการศึกษาและใช้เพื่อการจัดการกับข้อมูลจำนวนมากที่ได้จากการวิจัยด้านชีวภาพ (biological Science) เช่น การนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีมาเปรียบเทียบทีละคู่ (pairwise sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ซึ่งทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่นั้นว่าเหมือนหรือต่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล แล้วแสดงออกมาเป็นคะแนนในรูปของ graphic view รวมไปถึงการแสดงข้อมูลทั้งหมดของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล เช่น เลขประจำตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) รายละเอียดต่างๆ เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณใด แหล่งที่มา หรือการใช้โปรแกรม Webcutter 2.0 มาใช้ตรวจสอบตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree analysis) มีความสำคัญในการจัดจำแนกกลุ่มและศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ในปัจจุบันโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมาก ในแง่ของ phylogenetic tree building method โปรแกรมซึ่งเป็นที่นิยมมากคือโปรแกรม PHYLIP ถูกเขียนขึ้นโดย Joe Felsenstein (วสันต์ จันทราทิตย์ และคณะ, 2547) โปรแกรม PHYLIP ประกอบไปด้วย phylogenetic analysis method มากมาย เช่น distance matrix, pasimony และ likelihood method ซึ่งมีความยืดหยุ่นในการปรับค่าการทำงานอีกด้วย ซึ่งในงานวิจัยนี้จะเลือกวิธี วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราโดยการใช้ distance matrix method โดยหลักการสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปของ phylogenetic tree คือ จัดเรียงข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยโปรแกรม BioEdit เพื่อให้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันอยู่ตรงกัน จากนั้นตรวจสอบเช็คความถูกต้อง และตัดแต่งให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมดที่จะนำมาหาความสัมพันธ์ให้มีหัวและท้ายเท่ากัน แล้วจึงเปรียบเทียบข้อมูลโดยวิธี alignment ด้วยโปรแกรม เช่น ClustalW, ClustalX เป็นต้น พร้อมใช้ distance matrix method เป็น substitution model แล้วทำการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (tree construction) โดยอาศัยโปรแกรม PHYLIP ได้แก่ seqboot.exe, dnadist.exe, neighbor.exe และ consense.exe พร้อมปรับแต่งแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม tree viewer หรือ tree editor เช่น TreeView32

เอกสารนี้เป็นเอกสารสำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

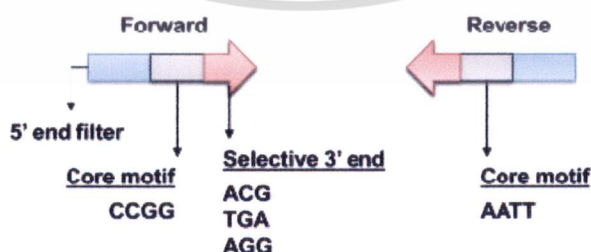
### 2.4.3 Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) (ดัดแปลงจาก ฤทธิ, 2553)

Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) (Li และ Quiros, 2001) เป็นวิธีการที่มีวัตถุประสงค์ เพื่อการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอ จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอใน ส่วน open reading frames (ORFs) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของยีน โดยคู่ไพรเมอร์ (รูปที่ 2.8) ที่มีขนาด 17 หรือ 18 นิวคลีโอไทด์ ที่มีส่วนของลำดับแกนดีเอ็นเอที่เรียกว่า core sequences ซึ่งจะยาวประมาณ 13 - 14 นิวคลีโอไทด์ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 10 - 11 นิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นส่วนของปลาย 5' โดยอาจเรียกลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ว่า filler sequences และตามด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ CCGG ในไพรเมอร์ตัวที่เคลื่อนไปด้านหน้า (forward primer) ส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ AATT ในไพรเมอร์ย้อนกลับ (reverse primer) และตามด้วยส่วนที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะจากปลาย 3' ตัวอย่างไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างไพรเมอร์ SRAP

รหัส	Forward primer	รหัส	Reverse primer
Me01	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	Em01	5'-GACTGCGTACGAATTCAA-3'
Me02	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	Em02	5'-GACTGCGTACGAATTCTG-3'
Me03	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	Em03	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
Me04	5'-TGAGTCCAAACCGGACA-3'	Em04	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
Me05	5'-TGAGTCCAAACCGGTGC-3'	Em05	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
Me06	5'-TGAGTCCAAACCGGAGA-3'	Em06	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
Me07	5'-TGAGTCCAAACCGGACG-3'	Em07	5'-GACTGCGTACGAATTGAG-3'
Me08	5'-TGAGTCCAAACCGGAAA-3'	Em08	5'-GACTGCGTACGAATTGCC-3'
Me09	5'-TGAGTCCAAACCGGAAC-3'	Em09	5'-GACTGCGTACGAATTTCA-3'
Me10	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	Em10	5'-GACTGCGTACGAATTCAT-3'

ที่มา: ดัดแปลงจาก Liao และคณะ (2012)

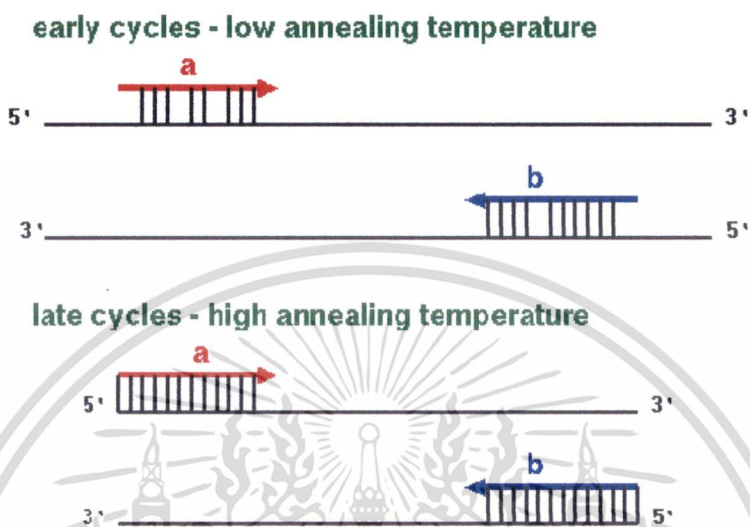


รูปที่ 2.8 ลักษณะของไพรเมอร์ SRAP

ที่มา: ดัดแปลงจาก <http://www.plantmethods.com/content/figures/1746-4811-9-6-11.jpg>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมีจำนวน 40 รอบ โดยใน 5 รอบแรก จะใช้อุณหภูมิของการจับกับไพรเมอร์ที่ 35 องศาเซลเซียส และตามด้วย 50 องศาเซลเซียส ในอีก 35 รอบ (รูปที่ 2.9) เมื่อได้ผลผลิตของปฏิกิริยา จะนำไปทำการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอใน denaturing acrylamide gels และ autoradiography ด้วยการย้อมสีเรืองแสง



รูปที่ 2.9 กลไกการทำงานของเทคนิค SRAP

ที่มา: ดัดแปลงจาก <http://home.cc.umanitoba.ca/~frist/PLNT7690/lec08/lec08.2.html>

จากเทคนิค SRAP จะพบว่ามีลักษณะเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น เช่นเดียวกันกับวิธี amplified fragment length polymorphism (AFLP) ซึ่งทำให้พืชที่อยู่ในสกุลเดียวกันมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน ซึ่งเรียกว่า co-dominant ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และจะพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งเป็นลักษณะเด่นในพืชแต่ละชนิดที่เรียกว่า dominant ที่อาจจะใช้จำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชที่เพาะปลูกในแต่ละสถานที่ออกจากกันได้ เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Pinus koraiensis* จำนวน 480 ตัวอย่างในระหว่าง 24 มณฑลของประเทศจีน (Feng และคณะ, 2009) โดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่ ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอของพืชแต่ละชนิดจำนวน 24 - 33 แถบ ที่มีขนาดตั้งแต่ 100 - 1,500 คู่เบส รวมทั้งสิ้น 249 แถบ และมีแถบที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมจำนวน 143 แถบ หรือ 55.42 เปอร์เซ็นต์

## 2.5 การทดสอบความเป็นพืชต่อเซลล์

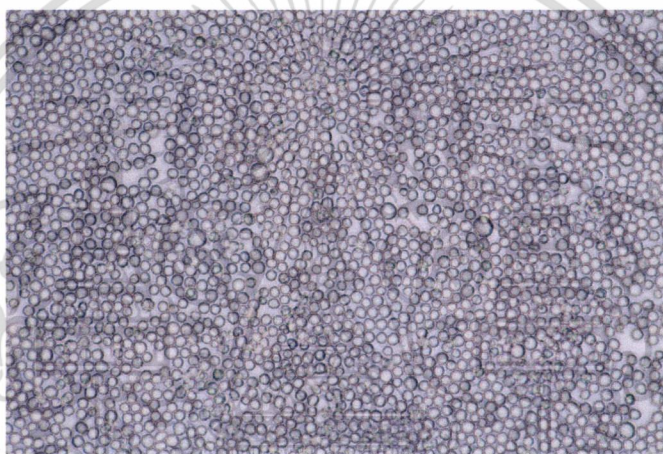
### 2.5.1 ชนิดของเซลล์ไลน์

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดลอง ประกอบไปด้วยเซลล์ทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 (Murine lymphocytic leukemia cell line: P388) เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF7 (Human breast cancer cell line: MCF7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT29 (Human colon adenocarcinoma cell line: HT29) เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากของมนุษย์ชนิด KB (Human oral epidermoid carcinoma: KB) เซลล์ไตลิงชนิด Vero (African green monkey kidney cell line: Vero) เซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ชนิด HeLa (human cervical cancer cell line: HeLa) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

adenocarcinoma epithelial cell line: HeLa) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 (mouse fibroblast cell line: L929) และเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 (Human hepatoma cell line: HepG2) โดยสามารถแยกชนิดของเซลล์ไลน์ที่นำมาศึกษาได้เป็น 2 ชนิด คือ

### 2.5.1.1 เซลล์ไลน์ชนิดแขวนลอย (suspension cell line)

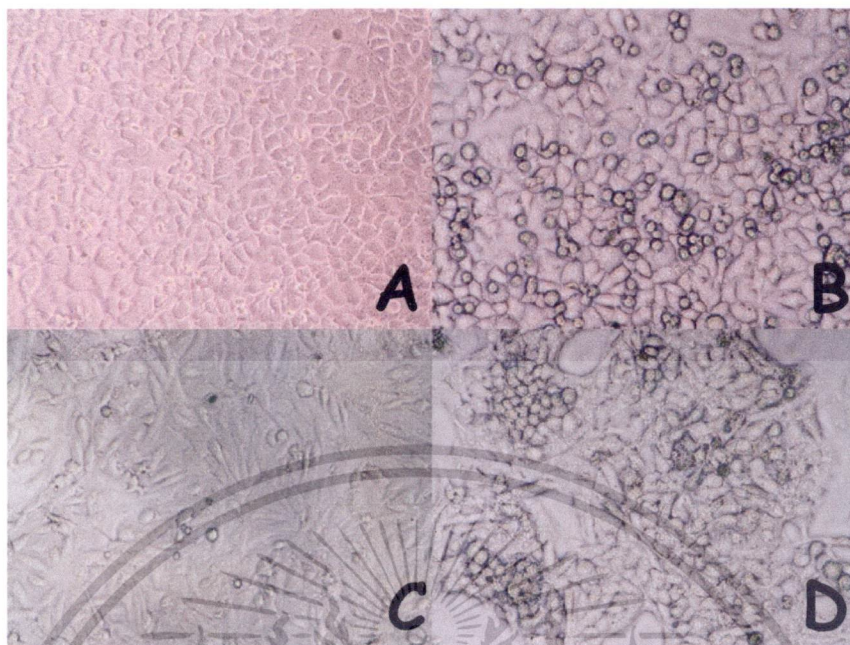
เซลล์ไลน์ชนิดแขวนลอยที่ใช้ในการศึกษา ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เซลล์ P388 เป็นเซลล์ไลน์ชนิดแขวนลอยชนิดเดียวในการทดลองครั้งนี้ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู มีลักษณะรูปร่างของเซลล์เป็นแบบกลมใส มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 2.10 มีระดับความปลอดภัยทางชีวภาพ หรือ Biosafety อยู่ที่ระดับ 1 สามารถนำไปใช้ในงานด้านอื่นๆได้อีก เช่น การนำไปใช้เป็น Host ของการ Transfection คือ ลักษณะเซลล์ P388 เมื่อเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640



รูปที่ 2.10 ลักษณะเซลล์ไลน์ P388 ที่กำลังขยาย 20 เท่า

### 2.5.1.2 เซลล์ไลน์ชนิดเกาะพื้นผิว (adherent cell line)

เซลล์ไลน์ชนิดเกาะพื้นผิวที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ เซลล์ MCF7 เป็นเซลล์มะเร็งเต้านมที่แยกได้จากผู้หญิงวัยอายุ 69 ปี โดยเซลล์มีรูปร่างคล้ายโดมสี่เหลี่ยม เซลล์ HT29 เป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของคน เจริญเติบโตโดยการเกาะบนพื้นผิวของพลาสติกสามารถนำไปใช้เป็น Transfection host ได้เช่นเดียวกัน เซลล์ Vero คือ เซลล์ไลน์ที่แยกได้จากไตของลิง มีรูปร่างคล้ายกับกระสวย สามารถนำไปใช้ในงานด้านอื่นได้มาก เช่น ใช้สำหรับตรวจหาไวรัส หรือการศึกษาเกี่ยวกับโรคมาลาเรีย และเซลล์ HepG2 ได้จากเนื้อเยื่อตับ โดยเซลล์ไลน์ชนิดเกาะพื้นผิวมีลักษณะการเจริญเติบโตในพลาสติก ตัวอย่างตามรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 ลักษณะเซลล์ไลน์ชนิดเกาะพื้นผิว (A) เซลล์ไลน์ชนิด MCF7 (B) เซลล์ไลน์ชนิด HT29 (C) เซลล์ไลน์ชนิด Vero และ (D) เซลล์ไลน์ชนิด HepG2 ถ่ายโดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับที่กำลังขยาย 20 เท่า

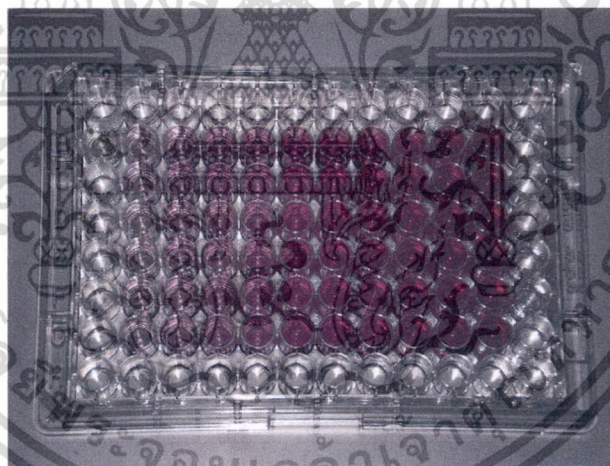
### 2.5.2 การวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT

โดยทั่วไปการทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity Test) สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และการนำไปใช้ประโยชน์ โดยสามารถจำแนกวิธีการทดสอบตามผลของการนำไปใช้ประโยชน์ได้ 2 ประเภท คือ การทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย (Bioassays) และการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย หรือการใช้สัตว์ทดลอง เช่น หนู กระต่ายและสุนัข เป็นต้น การใช้สัตว์ทดลองนั้นจะสามารถทดสอบได้หลายวิธีการ เช่น การกิน การสัมผัสโดยผิวหนัง การหายใจ และการฉีดสารเคมีเข้าลำตัว เป็นต้น ซึ่งเมื่อทำการทดลอง สัตว์จะแสดงอาการตอบสนองต่อสารเคมีที่ได้รับในลักษณะต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการอักเสบของเนื้อเยื่อ การระคายเคือง การเกิดเนื้องอก อัมพาต หรือแม้กระทั่งตาย ซึ่งอาการทั้งหลายเหล่านี้ล้วนแล้วแต่สร้างความเจ็บปวดและทุกข์ทรมานแก่สัตว์ทดลองทั้งสิ้น อีกทั้งยังสิ้นเปลืองงบประมาณมากในการทดสอบแต่ละครั้ง ดังนั้นเพื่อเหตุผลทางเศรษฐศาสตร์ และศีลธรรม นักพิษวิทยาจึงคิดหาวิธีการอื่นๆ เพื่อลดการใช้สัตว์ในการทดสอบสารพิษ จากข้อจำกัดดังกล่าว นักพิษวิทยาจึงได้มีการพัฒนานำเอาเนื้อเยื่อ และเซลล์จากส่วนต่างๆ ของสัตว์และมนุษย์มาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมี เช่น การนำเอาเม็ดเลือดแดง (Red blood cells: RBCs) มาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารที่ก่อให้เกิดการระคายเคือง (Irritant) สำหรับการทดลองนี้จะเลือกใช้วิธีการทดสอบแบบ MTT assay โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Mosmann (1983) เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารกัมมันตภาพรังสีที่ยุ่ยยาก และเครื่องเก็บเกี่ยวเซลล์ที่มีราคาแพง

MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็นสีสังเคราะห์ประเภท tetrazolium salt ที่ในปัจจุบันมีผู้นิยมใช้ในการทดสอบทางชีววิทยาในงานด้านเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างๆ มากมาย เพื่อหลีกเลี่ยงวิธีทดสอบมาตรฐานที่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณ โดยทดสอบหา Cell viability โดยหลักการของวิธีนี้ คือ เซลล์ที่ทำการทดสอบ ถ้าเป็นเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้ enzyme succinate dehydrogenase ใน mitochondria ทำปฏิกิริยากับสาร MTT ที่มีสีเหลือง เปลี่ยนเป็น formazan product ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงิน หลังจากละลายสีภายในเซลล์ด้วย DMSO จึงทำการวัดหาปริมาณ formazan product ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่า Optical Density (OD) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ในปัจจุบันมีการใช้สารอนุพันธ์ (derivatives) ของ MTT หรือ สารที่ทำงานคล้ายคลึงกับ MTT เช่น การใช้ MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, XTT (sodium 3'-[1-[(phenylamino)carbo-nyl]-3,4-tetra-zolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene- sulfonic acid hydrate, AP (acid phosphatase), NR (neutral red), CVDE (crystal violet dye elution), SRB (sulforhodamine B), lactate dehydrogenase, hexosa-minidase เป็นต้น (Buttke และคณะ, 1993) แต่สารที่เป็นอนุพันธ์ของ MTT มีราคาสูงกว่า MTT มาก และ MTT เป็น tetrazolium salt ที่มีผู้นิยมใช้กันมาก เพราะให้ค่าที่ถูกต้อง แม่นยำ และมีความสม่ำเสมอ เมื่อเทียบกับสารอื่น โครงการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ MTT ในการพัฒนาวิธีการทดสอบ ซึ่งตัวอย่างของไมโครเพลตในการทดสอบครั้งนี้ แสดงไว้ในรูปที่ 2.12

(<http://www.mtec.or.th/laboratorycellunit/index.php/tools-and-services/29>)



รูปที่ 2.12 ตัวอย่างไมโครเพลตที่ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT  
(ที่มา: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:MTT\\_Plate.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:MTT_Plate.jpg))

## 2.6 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย คือ การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารที่มีอยู่ในสมุนไพร โดยวิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุด คือ paper disc diffusion method (Kirby-Bauer) เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น วิธีนี้เป็น การทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลักการทั่วไปคือ การทำให้สารสกัดสมุนไพรที่มีในแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ที่เตรียมไว้ก่อนซึบไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อ เจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบแผ่น disc ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของ inhibition zone วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบสมุนไพรเพียงความเข้มข้นเดียว และใช้เป็นการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในเบื้องต้น นอกจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบแล้ว ยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร ความสามารถในการละลายหรือซึบไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสมุนไพร อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ

## 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารสกัดจากพืชในสกุลนี้โดยส่วนใหญ่ใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านในการรักษาอาการไอ ขับเหงื่อ และขับเสมหะ (Singh และคณะ, 2005) ต้านเชื้ออักเสบ ต้านการอักเสบ และใช้เป็นสารคุมกำเนิด (Singh และคณะ, 2003; Gupta และคณะ, 2000) Samuel และคณะ (2010) ศึกษาถึงการใช้น้ำสมุนไพรพื้นบ้านในประเทศมาเลเซีย พบว่าใช้ใบของ *B. lupulina* ในการพอกเพื่อกำจัดหูด และใช้ใบของ *B. prionitis* มาบดเพื่อพอกในการแก้การอักเสบ โดยมีองค์ประกอบทางเคมีชนิด iridoid glucoside (Kanchanapoom และคณะ, 2001) betaine (Tuntiwachwuttikul และคณะ, 1998) และสารสกัดมีความสามารถในการต้านไวรัสชนิด herpes simplex virus type 2 (HSV-2) (Yoosook และคณะ, 2000) Suba และคณะ (2004a, 2004b) เมื่อให้หนูถีบจักรกินสารสกัดเมทานอลจากส่วนเหนือดินของต้นเสลดพังพอน (*B. lupulina*) หรือฉีดเข้าช่องท้อง ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้หนูตายครึ่งหนึ่ง ( $LD_{50}$ ) เท่ากับ 4.5 และ 3.7 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยมีฤทธิ์ในการลดน้ำตาลในเลือดหลังรับสารสกัดภายใน 4 ชั่วโมง และฤทธิ์สามารถอยู่ได้นาน 12 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ Suba และคณะ (2005) ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอาการอักเสบจากสารสกัดใบของ *B. lupulina* Lindl. ทั้งในแบบเฉียบพลัน และกึ่งเฉียบพลันในหนูเผือก (albino rat) ในทุกความเข้มข้น (200-300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สามารถลดอาการบวมที่ซิกน้าโดย carrageenin และ serotonin ลงได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และที่ขนาดความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่ทำให้เกิดแผลในกระเพาะ

Ata และคณะ (2009) ศึกษาทางองค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรจากสารสกัดเอทานอลของใบ *B. prionitis* สามารถแยกสารองค์ประกอบทางเคมีชนิด phenylethanoid glycoside ชนิดใหม่ คือ barlerinoside และ iridoid glycosides จำนวน 6 ชนิด คือ shanzhiside methyl ester, 6-O-transp-coumaroyl-8-O-acetylshanzhiside methyl ester, barlerin, acetylbarlerin, 7-methoxydiderroside และ lupulinoside

Gupta และคณะ (2000) ศึกษาสารสกัดจากรากของ *B. prionitis* มีความสามารถทำให้เกิดความเป็นหมันในหนูได้ โดยให้สารสกัดจากรากขนาด 100 mg: rat: day ในหนูเพศผู้ เป็นระยะเวลา 60 วัน ซึ่งไม่มีผลทำให้น้ำหนักตัวลด แต่มีผลทำให้เกิดการขัดขวางการสร้างอสุจิ โดยปริมาณของ spermatids ลดลง 73.6% แต่ปริมาณของ secondary spermatocytes ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับ Verma และคณะ (2005) ได้ศึกษาความสามารถในการคุมกำเนิดของสารสกัดจากส่วน

ของเมทานอลของส่วนรากจาก *B. prionitis* ในหนูเพศผู้ ที่ได้รับสารสกัดในขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 60 วัน

Banerjee และคณะ (2012) ได้รวบรวมผลการวิจัยถึงองค์ประกอบทางเคมีของ *B. prionitis* ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีสารที่องค์ประกอบหลากหลายชนิด เช่น balarenone (1), pipataline (2), lupeol (3), prioniside A (4), prioniside B (5) and prioniside C (6) ที่พบในสารสกัดจากเอทานอล และสารชนิด glycosides ประกอบด้วย barlerinoside (7), verbascoside (8), shanzhiside methyl ester (9), 6-O-trans-p-coumaroyl-8-O-acetylshanzhiside methyl ester (10), barlerin (11), acetylbarlerin (12), 7-methoxydideroside (13) และ lupulinoside (14) เป็นต้น รวมทั้งสารสกัดจากใบที่มีองค์ประกอบทางเคมี เช่น scutellarein (15), melilotic acid (16), syringic acid (17), vanillic acid (18), p-hydroxybenzoic acid (19), 6-hydroxyflavones (20), luteolin-7-O- $\beta$ -D-glucoside (21),  $\beta$ -sitosterol (22), scutellarein 7-neohesperidoside (23), apigenin 7-O-glucoside (24), 13, 14-seco-stigmasta-5 และ 14-diene-3-a-ol (25) เป็นต้น

Amoo และคณะ (2009) ศึกษาสารสกัดจากส่วนต่างๆของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 3 สปีชีส์ คือ *B. prionitis*, *B. greenii* และ *B. albostellata* พบว่ามีความสามารถในการเป็นยับยั้งแบคทีเรียโดยมีค่า minimum inhibitory concentrations (MIC) ระหว่าง 0.059 - 6.25 mg/ml และมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านการอักเสบ โดยมีสารสกัดจำนวน 12 จากสารสกัดทั้งหมด 21 ชนิดที่มีผลต่อ cyclooxygenase COX-1 ขณะที่สารสกัดจำนวน 10 จากสารสกัดทั้งหมด 21 ชนิดที่มีผลต่อ cyclooxygenase COX-2

Kanchanapoom และคณะ (2004) ศึกษาหาค่าองค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรในวงศ์เหงือกปลาหมอ 4 ชนิด คือ ย่าหยา (กลีบดอกกลม) ย่าหยา (กลีบดอกเรียวยาวแหลม) สังกรณี และปึกไก่ดำ โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี และสเปกโตรสโคปี จากต้นสังกรณี (*B. strigosa*) สามารถแยกสารองค์ประกอบทางเคมี ได้ 9 ชนิด โดยเป็นสารประกอบที่พบทั่วไปในพืช 7 ชนิด คือ verbascoside, isoverbascoside, decaffeoylverbascoside, (+)-lyoniresinol 3a-O-b -D-glucoside, apigenin 7-O-a-L-rhamnosyl-(1-6)-O-b -D-glucoside, 7-O-acetyl-8-epi-loganic acid และ (3R)-1-octen-3-ol-3-O-b -D-xylosyl-(1-6)-b -D-glucoside และเป็นสารใหม่ 2 ชนิด คือ Phenylethanoid (4-hydroxyphenylethyl 4-O-b -D-glucopyranosyl-(1-3)-O-a-L-rhamnopyranoside) และ iridoid (10-O-trans-coumaroyl-eranthemoside)

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากอังกาบที่กล่าวมานี้มีเพียงรายงานของ Salib และคณะ (2013) ที่สกัดสารจากเปลือกของอังกาบ ด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และเอทานอล พบว่าสารสกัดจากเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งต่อ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *S. mutans*

ในการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Antibacterial activity) โดย balarenone, pipataline และ 13, 14-seco-stigmasta-5, 14-diene-3-a-ol ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในสารสกัดจาก *B. prionitis* ด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* และ *P. aeruginosa* (Kosmulalage และคณะ, 2007) และ Aneja และคณะ (2010) แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคในช่องปาก โดยพบว่าสารสกัดจากส่วนเปลือกลำต้น ใบ และยอด ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans*, *S.*

*aureus*, *P. aeruginosa* และ *B. cereus* โดยเฉพาะสารสกัดจากส่วนของเปลือกด้วยตัวทำละลายเมทานอลให้ผลดีที่สุด เช่นเดียวกับ Shukla และคณะ (2011) ที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบและแคลลัสของ *B. prionitis* ด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ เอทานอล และคลอโรฟอร์ม มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก โดยสารสกัดด้วยตัวทำละลายอีเทอร์แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียสูงสุด ขณะที่สารสกัดด้วยน้ำไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย นอกจากนี้แล้วสารสกัดจากส่วนของยอดและรากด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* (Amoo และคณะ, 2011) ในด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) Chetan และคณะ (2011) รายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากต้น *B. prionitis* ด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ และในด้านความเป็นพิษมีเพียงรายงานการศึกษาในหนู โดยไม่พบหนูตายภายใน 14 วันหลังจากการให้หนูกินสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (Dheer และ Bhatnagar, 2010) แต่ยังไม่มียางานการศึกษาด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง (cytotoxicity)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

#### 3.1 วัสดุ อุปกรณ์

##### 3.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ทำการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชในวงศ์ Acanthaceae จากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย โดยได้รับการจำแนกและระบุชนิดจากคุณวินัย สมประสงค์ หัวหน้ากลุ่มวิจัยเพื่อการคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร เก็บส่วนใบของตัวอย่างพืชโดยใช้กรรไกรตัดกิ่งตัดเอาส่วนของใบ จากนั้นนำตัวอย่างใบพืชมาล้างให้สะอาด ผึ่งไว้ให้แห้ง เก็บใส่ถุงซิปล็อค เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และรวมทั้งเก็บตัวอย่างใบส่งกรณีจากสวนพฤกษศาสตร์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เขาค้อ) จังหวัดฉะเชิงเทรา เพื่อใช้ใบในการสกัดสาร

##### 3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.1.2.2 *Escherichia coli* ATCC 25922

3.1.2.3 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.1.2.4 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

3.1.2.5 *Micrococcus luteus* ATCC 9341

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341

ได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

##### 3.1.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.3.1 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 (murine lymphocytic leukemic cell line: P388)

3.1.3.2 เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF7 (human breast cancer cell line: MCF7)

3.1.3.3 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT29 (human colon adenocarcinoma cell line: HT29)

3.1.3.4 เซลล์ไตลิงชนิด Vero cell (African green monkey kidney cell line: Vero cell)

3.1.3.5 เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 (human hepatoma cell line: HepG2)

3.1.3.6 เซลล์มะเร็งช่องปากของมนุษย์ชนิด KB (human mouth epidermal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

adenocarcinoma cell line: KB)

3.1.3.7 เซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ชนิด HeLa (human cervical adenocarcinoma epithelial cell line: HeLa)

3.1.3.8 เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 (mouse fibroblast cell line: L929)

โดยลำดับที่ 1-4 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.พรทิพา ทิชา งานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ลำดับที่ 5-8 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### 3.1.4 อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง

3.1.4.1 กรรไกรตัดกิ่ง (pruning shears)

3.1.4.2 ถุงซิปล็อค (ziploc bag) ขนาดต่างๆ

3.1.4.3 อ่างน้ำ (sink)

3.1.4.4 กล้องถ่ายรูป (camera)

### 3.1.5 อุปกรณ์ในการสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบพืช

3.1.5.1 โกร่ง (mortar) และที่บด (pestle)

3.1.5.2 กรรไกร (scissors)

3.1.5.3 ปากคีบ (forceps)

3.1.5.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)

3.1.5.5 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dishes)

3.1.5.6 ช้อนตักสาร (spatula)

3.1.5.7 ปีกเกอร์ (beaker)

3.1.5.8 หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 1.5, 15, 50 มิลลิลิตร

3.1.5.9 ชุดไมโครปิเปต (micropipettes) และทิป (micropipette tips) ขนาดต่างๆ

3.1.5.10 กระบอกไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen container)

3.1.5.11 อุปกรณ์สำหรับใส่หลอดทดลอง (rack)

3.1.5.12 ตู้ดูดควัน (fume hood)

3.1.5.13 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

3.1.5.14 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge); Hettich Mikro 22R

3.1.5.15 ตู้บ่ม (incubator)

3.1.5.16 เครื่องช่วยผสม (vortex)

3.1.5.17 กล่องให้ความร้อน (heat block)

3.1.5.18 ตู้เย็น (refrigerator)

3.1.5.19 ตู้แช่แข็ง (freezer)

3.1.5.20 พาราฟิล์ม (parafilm)

3.1.5.21 กระดาษทิชชู (tissue paper)

3.1.5.22 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer); Eppendorf

BioPhotometer™

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.5.23 คิวเวตควอตซ์ (quartz semi-cuvette)

### 3.1.6 อุปกรณ์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR และ SRAP

- 3.1.6.1 หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 0.5 และ 0.2 มิลลิลิตร
- 3.1.6.2 อุปกรณ์สำหรับใส่หลอดทดลอง (rack) ขนาด 0.5 และ 0.2 มิลลิลิตร
- 3.1.6.3 ชุดไมโครปิเปต (micropipettes) และทิวป์ (micropipette tips) ขนาดต่างๆ
- 3.1.6.4 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (thermal cycler);  
Eppendorf Mastercycler® ep Gradient S
- 3.1.6.5 เครื่องผสมสาร (vortex)
- 3.1.6.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (spin down)

### 3.1.7 อุปกรณ์ในการทำเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

- 3.1.7.1 กระดาษขึงสาร
- 3.1.7.2 เครื่องชั่ง (balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 3.1.7.3 ช้อนตักสาร (spatula)
- 3.1.7.4 ฟลาสก์ (flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร
- 3.1.7.5 เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven)
- 3.1.7.6 ชุดอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis);  
Mupid®-exU submarine electrophoresis system
- 3.1.7.7 ถุงมือยาง (rubber glove)
- 3.1.7.8 ฟิล์มพลาสติก (plastic wrap)
- 3.1.7.9 ชุดไมโครปิเปต (micropipettes) และทิวป์ (micropipette tips) ขนาดต่างๆ
- 3.1.7.10 คอมพิวเตอร์ (computer)
- 3.1.7.11 ชุดถ่ายภาพเจล (gel document system); SYNGENE InGenius Bio  
Imaging

### 3.1.8 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

- 3.1.8.1 คอมพิวเตอร์ (computer)
- 3.1.8.2 โปรแกรม Notepad
- 3.1.8.3 โปรแกรม MEGA6
- 3.1.8.4 โปรแกรม NTSYSpc version 2.10m

### 3.1.9 อุปกรณ์ในการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยชุด GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel)

- 3.1.9.1 ชุด GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel); Vivantis
- 3.1.9.2 หลอดทดลอง (tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.9.3 Rack สำหรับใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.9.4 ชุดไมโครปิเปต (micropipettes) และทิวป์ (micropipette tips) ขนาดต่างๆ
- 3.1.9.5 ใบมีด (surgical blade)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.9.6 ถุงมือยาง (rubber glove)
- 3.1.9.7 หน้ากากป้องกันแสงยูวี (UV face shield)
- 3.1.9.8 เครื่องส่องแถบตีเอ็นเอ (UV transilluminator)
- 3.1.9.9 พาราฟิล์ม (parafilm)
- 3.1.9.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 3.1.9.11 เครื่องชั่ง (balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 3.1.9.12 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge); Hettich Mikro 22R

### 3.1.10 อุปกรณ์ในการสกัดสารจากตัวอย่างใบพืช

- 3.1.10.1 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- 3.1.10.2 เครื่องปั่น (blender)
- 3.1.10.3 เครื่องซีล (hand impulse sealer)
- 3.1.10.4 ถุงพลาสติก (plastic bag) ขนาดต่างๆ
- 3.1.10.5 เครื่องชั่ง (balance)
- 3.1.10.6 เครื่องเขย่า (shaker or rotator)
- 3.1.10.7 ขวดแก้ว (vial) ขนาดต่างๆ
- 3.1.10.8 ผ้าขาวบาง (white cloth)
- 3.1.10.9 กระดาษฟอยล์ (foil)
- 3.1.10.10 กระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 (Whatman No. 1 filter paper)
- 3.1.10.11 ชุดกรองสารแบบสุญญากาศ (vacuum filter)
- 3.1.10.12 ชุดเครื่องระเหยสารแบบสุญญากาศชนิดหมุน (rotary evaporator); BUCHI
- 3.1.10.13 ช้อนตักสาร (spatula)
- 3.1.10.14 โถดูดความชื้น (desicator)
- 3.1.10.15 กรวยแยก (separating funnel)
- 3.1.10.16 บีกเกอร์ (beaker)
- 3.1.10.17 กระบอกตวง (cylinder)
- 3.1.10.18 กรวย (glass funnel)
- 3.1.10.19 Magnetic stirrer และ magnetic bar

### 3.1.11 อุปกรณ์ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion

- 3.1.11.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- 3.1.11.2 ขวดแก้ว (vial) ขนาดต่างๆ
- 3.1.11.3 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow hood)
- 3.1.11.4 ตู้บ่ม (incubator)
- 3.1.11.5 เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) และห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
- 3.1.11.6 ปากคีบ (forcept)
- 3.1.11.7 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตเห็นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปได้

- 3.1.11.8 คิวเวตพลาสติก (plastic cuvette)
- 3.1.11.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)
- 3.1.11.10 ไม้พันสำลี (cotton bud)
- 3.1.11.11 ชุดไมโครปิเปต (micropipettes) และทิวป์ (micropipette tips) ขนาดต่างๆ
- 3.1.11.12 แผ่นกระดาษกลมขนาด 6 มิลลิเมตร (paper disc); whatman
- 3.1.11.13 เวอร์เนียแบบดิจิตอล (digital vernier caliper)

### 3.1.12 อุปกรณ์ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

- 3.1.12.1 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow hood)
- 3.1.12.2 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ (compound light microscope)
- 3.1.12.3 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope)
- 3.1.12.4 จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96 well plate)
- 3.1.12.5 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemocytometer) และแผ่นปิดสไลด์ (cover slip)
- 3.1.12.6 หลอดทดลอง (tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.12.7 ชุดไมโครปิเปต (micropipettes) และทิวป์ (micropipette tips) ขนาดต่างๆ
- 3.1.12.8 เครื่องนับเซลล์ (cell counter)
- 3.1.12.9 ปิเปตต์ (pipette) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.1.12.10 ปิเปตแบบอัตโนมัติ (pipette boy)
- 3.1.12.11 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (flask) ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร
- 3.1.12.12 ชุดอุปกรณ์การกรองพร้อมกระดาษกรองขนาด 0.2 และ 0.45 ไมโครเมตร
- 3.1.12.13 ตู้บ่ม (incubator)
- 3.1.12.14 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- 3.1.12.15 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
- 3.1.12.16 ตู้เย็น (refrigerator) 4 และ -20 องศาเซลเซียส
- 3.1.12.17 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)
- 3.1.12.18 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.1.12.19 เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader); Biochrom Anthos Multiread 400 ฟิวเตอร์ (filter) สำหรับความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร
- 3.1.12.20 คอมพิวเตอร์ (computer)
- 3.1.12.21 โปรแกรม GraphPad Prism 5.0

## 3.2 สารเคมี

### 3.2.1 สารเคมีในการสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

- 3.2.1.1 Cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB)

#### 3.2.1.2 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.4.3 โพลีไวนิลไพร์โรลิโดน (Polyvinylpyrrolidone)
- 3.1.4.4  $\beta$  - mercaptoethanol
- 3.2.1.3 Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1)
- 3.2.1.4 20 mg/ml RNase A
- 3.2.1.5 Isopropanol
- 3.2.1.6 Absolute ethanol
- 3.2.1.7 70 % Ethanol
- 3.2.1.8 10 % CTAB ใน 0.7 M NaCl
- 3.2.1.9 Ethylenediaminetetraacetate, EDTA) ; Vivantis
- 3.2.1.10 Tris-base; Vivantis
- 3.2.1.11 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
- 3.2.1.12 เอนไซม์ RNaseA เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร; Vivantis

### 3.2.2 สารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR และ SRAP

- 3.2.2.1 Deionized water (DI water)
- 3.2.2.2 10X Taq buffer
- 3.2.2.3 Deoxynucleotidetriphosphate, dNTPs); Vivantis แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก
- 3.2.2.4 50 mM Magnesium chloride ( $MgCl_2$ )
- 3.2.2.5 5000 U/ml Taq DNA polymerase; Biolabs
- 3.2.2.6 ชุด purify สำเร็จรูป GF-1 Ambiclean kit (PCR & Gel); Vivantist
- 3.2.2.7 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR (Taberlet และคณะ, 1991) สั่งเคราะห์จากบริษัท 1st BASE Custom Oligos ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 3.1
- 3.2.2.8 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค SRAP (Li และ Quiros, 2001) สั่งเคราะห์จากบริษัท 1st BASE Custom Oligos ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR

ชนิดไพรเมอร์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Forward primer	c	5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'
Reverse primer	d	5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3'
	f	5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค SRAP

ชนิดไพรเมอร์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Forward primer	Me1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'
	Me2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'
	Me3	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'
	Me4	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'
	Me5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'
Reverse primer	Em1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
	Em2	5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
	Em3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
	Em4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
	Em5	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
	Em6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'

#### 3.2.3 สารเคมีในการทำอะกาโรสเจลอเล็กโทรโฟรีซิส

- 3.2.3.1 อะกาโรส (agarose)
- 3.2.3.2 Tris-borate EDTA buffer (TBE buffer) แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก
- 3.2.3.3 3X loading dye
- 3.2.3.4 Deionized water
- 3.2.3.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ขนาด 100 คู่เบส และ 1 กิโลเบส; Vivantis
- 3.2.3.6 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide: EtBr) แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก
- 3.2.3.7 น้ำกลั่น
- 3.2.3.8 สีย้อม (loading dye); Vivantis

#### 3.2.4 สารเคมีในการสกัดสารจากตัวอย่างใบพืช

- 3.2.4.1 เมทานอล (methanol)
- 3.2.4.2 เฮกเซน (hexane)
- 3.2.4.3 เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate)
- 3.2.4.4 ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)
- 3.2.4.5 บิวทานอล (butanol)
- 3.2.4.6 น้ำกลั่น
- 3.2.4.7 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride: NaCl)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.5 สารเคมีในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion**
- 3.2.5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Mueller Hinton broth (MHB) และ Mueller Hinton agar (MHA) แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก
- 3.2.5.2 Normal saline solution (NSS)
- 3.2.5.3 สารละลายเจนต้ามัยซิน (gentamycin) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก
- 3.2.5.4 สารละลาย McFarland standard
- 3.2.6 สารเคมีในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT**
- 3.2.6.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก
- 3.2.6.2 ซีรัม (fetal bovine serum: FBS)
- 3.2.6.3 อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เสริมด้วยซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก
- 3.2.6.4 ยาปฏิชีวนะ gentamicin
- 3.2.6.5 เอนไซม์ทริปซิน (trypsin enzyme)
- 3.2.6.6 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer saline, PBS)
- 3.2.6.7 สีย้อมทริปแทนบลู (trypan blue)
- 3.2.6.8 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO)
- 3.2.6.9 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ต่อเอทานอล (1: 1) แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก
- 3.2.6.10 สีย้อมทริปแทน บลู (trypan blue) 0.4 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.6.11 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก
- 3.2.6.12 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline: PBS) แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก
- 3.2.6.13 สารละลายไมโตมัยซิน ซี (mitomycin C) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก

### 3.3 วิธีการทดลองระดับโมเลกุล

#### 3.3.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Doyle and Doyle (1987) โดยนำตัวอย่างใบมาล้างทำความสะอาดและปล่อยให้แห้ง นำส่วนใบของตัวอย่างพืช ประมาณ 100 มิลลิกรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปแช่ใน CTAB 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ท่วมตัวอย่าง และทิ้งไว้ข้ามคืน หรือหากสารละลายมีสีน้ำตาลเข้มให้เปลี่ยนสารละลายใหม่และแช่ตัวอย่างต่อจนสารละลายมีสีน้ำตาลจางลง นำตัวอย่างที่ผ่านการแช่สารละลาย CTAB ใส่ลงในโกร่ง เติมนิโตรเจนเหลวแล้วบดส่วนใบจนละเอียด จากนั้นเติม 2X CTAB buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และเติม  $\beta$ -mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้นใส่ตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วนำมาทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง spin down นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง และกลับหลอดไปมาทุก 15 นาที หรือจนเนื้อเยื่อพืชเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย เมื่อครบเวลาให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาอย่างระมัดระวัง เพื่อหลีกเลี่ยงการขาดของซินดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ (บันทึกปริมาตรที่ได้ โดยเฉลี่ยประมาณ 650 ไมโครลิตร) ในขณะที่ดูดควรระวังไม่ให้ดูดส่วนที่เป็นเศษเซลล์หรือโปรตีนขึ้นมา เติม RNaseA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1-2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30-60 นาที และนำมาเติม CTAB 10 เปอร์เซ็นต์ (ละลายใน sodium chloride ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex อย่างระมัดระวัง

เติม chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร (หรือปริมาตร 1: 1 ของสารละลายที่ได้) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาอย่างระมัดระวัง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ (บันทึกปริมาตรที่ได้ โดยเฉลี่ยประมาณ 750 ไมโครลิตร) โดยดูอย่างระวังเพื่อไม่ให้ดูดส่วนที่เป็นเศษเซลล์หรือโปรตีนขึ้นมา เติม isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือในปริมาตร 2/3 ของปริมาตรสารละลายที่ได้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลามากกว่า 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสออก โดยคว่ำหลอดทดลองบนกระดาษที่ซับน้ำได้ นาน 1-2 นาที เพื่อให้ isopropanol ที่ตกค้างในหลอดไหลลงมา ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้วัน 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็น ethanol ออก ล้างด้วย absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็น ethanol นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 20-30 นาที เพื่อให้ ethanol ที่ตกค้างอยู่ระเหย ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 100-150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอในสารละลาย TE buffer

### 3.3.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 495 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเอ็นเอตัวอย่าง ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (ค่าการเจือจาง หรือ dilution factor เท่ากับ 100) ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายตัวอย่างดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วใส่คิวเวตต์ วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นค่ามาตรฐาน (Blank) ปรากฏค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ใช้สำหรับการคำนวณความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และ O.D. ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร มาใช้คำนวณปริมาณดีเอ็นเอจากค่ามาตรฐานถ้าวัดค่า O.D. ที่ 260 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1 แสดงว่ามี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนักผู้จัดทำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสูตร ปริมาณดีเอ็นเอ = O.D. ที่ 260 นาโนเมตร x 50 x dilution factor

### 3.3.3 การวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อการวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ทำโดยซึ่งผงอะกาโรสตามปริมาณที่คำนวณได้ เช่น ต้องการบออะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผงวุ้น 0.4 กรัม เติม Tris-borate EDTA (1X TBE buffer) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วทำการละลายโดยใช้ไมโครเวฟจนละลายเป็นของเหลวใส จากนั้นร่อนจนกว่าอุณหภูมิลดลงจนสามารถใช้มือเปล่าสัมผัสขวดที่ใช้ละลายเจลได้ แล้วจึงนำมาเทลงถาดเทเจล (gel tray) ที่มีหัวเสียบเจล (sample combs) เพื่อทำให้เกิดหลุมสำหรับหยอดดีเอ็นเอ เมื่อเจลมีการแข็งตัวเรียบร้อยแล้ว ดึงหัวออกและนำไปใส่ลงในอ่างสำหรับรันเจล (chamber) ที่มีสารละลาย TBE buffer 1X อยู่ โดยบัฟเฟอร์นั้นจะมีปริมาตรท่วมผิวหน้าของแผ่นเจล จากนั้นจึงหยอดผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 3-5 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ dye ความเข้มข้น 6X ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงไปในหลุม เมื่อหยอดผลผลิตพีซีอาร์ครบทุกหลุม รวมทั้งดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 หรือ 100 คู่เบส แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นระยะเวลาประมาณ 30-40 นาที นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยการแช่น้ำกลั่น เป็นระยะเวลา 10 นาที เพื่อล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออก และนำไปวิเคราะห์ภาพเจลโดยใช้ชุดถ่ายภาพอะกาโรสเจล (gel documentary system) ที่ผ่านเครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ (UV transmission)

### 3.3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA: cpDNA) ตำแหน่ง trnL intron ระหว่าง trnL (UAA) 5' exon และ trnL (UAA) 3' exon ด้วยคู่ไพรเมอร์ c (CGAAATCGGTAGACGCTACG) และไพรเมอร์ d (GGGGATAGAGGGACTTGAAC) หรือไพรเมอร์ f (ATTTGAACTGGTGACACGAG) ตาม Taberlet et al. (1991) โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100-200 นาโนกรัม ไพรเมอร์ c และ d หรือ f ความเข้มข้นไพรเมอร์ละ 0.8 พิโคโมล (pM) คือออกซินิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล (μM) ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสความเข้มข้น 1 ยูนิต บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1 เท่า และน้ำ นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สภาวะดังนี้ ขั้น initiation denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที ขั้น annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 2 นาที ขั้น elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ และตามด้วยขั้น final elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่มีความเข้มข้นวุ้นอะกาโรสร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 100 คู่เบส ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นานประมาณ 40 นาที ย้อมสีเจลด้วย ethidium bromide เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 10 นาที และนำไปวิเคราะห์ภาพเจลโดยใช้เครื่อง Gel documentary system เก็บรักษาผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.5 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยชุด GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel); Vivantis ภายหลังจากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์แล้ว ในกรณีต้องการทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ในเจลอะกาโรสบริสุทธิ์ เช่น พบว่ามีแถบดีเอ็นเออื่นที่ไม่ต้องการให้นำผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมดมาแยกขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เมื่อการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยใช้ UV transilluminator แล้ว ใช้ใบมีดตัดเจลอะกาโรสบริเวณมีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ขณะที่ทำการส่องแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเจลไปซังน้ำหนัก โดยต้องซังน้ำหนักลอดทดลองที่ใช้ไว้ก่อน แล้วคำนวณหาเฉพาะน้ำหนักรวม เติมน้ำ buffer DB ปริมาตร 1: 1 โดยปริมาตร (เจลอะกาโรสน้ำหนัก 0.1 กรัม ใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) โดยจะต้องให้บัฟเฟอร์ท่วมเจล นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าเจลอะกาโรสจะละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับบัฟเฟอร์ หรือในกรณีการทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ในหลอดทดลองบริสุทธิ์ เช่นหลังการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วพบว่ามีแถบดีเอ็นเอ เฉพาะแถบที่ต้องการเพียงแถบเดียว โดยนำผลผลิตพีซีอาร์มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร เติมน้ำ buffer DB ปริมาตร 1: 1 โดยปริมาตร และผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา เมื่อสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ในที่รองรับด้านล่างทิ้ง ใส่ wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ในที่รองรับด้านล่างทิ้ง นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัดเอทานอลที่เป็นส่วนผสมของ wash buffer ออก เปลี่ยนคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติมน้ำ elution buffer หรือ TE buffer ปริมาตร 50 - 60 ไมโครลิตร โดยให้ท่วมแผ่นเมมเบรน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในหลอดทดลองด้านล่าง ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ก่อนจะส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

### 3.3.6 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตพีซีอาร์ดังกล่าว ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st BASE DNA Sequencing Division ประเทศมาเลเซีย นำผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST (Altschul และคณะ, 1990) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และจัดจำแนกกลุ่ม ใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 ในการตรวจสอบและแก้ไขความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่างแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.83 และสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามวิธี neighbor-joining กำหนดค่า bootstrapping คือ 1000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม MEGA6 (Tamura และคณะ, 2013)

### 3.3.7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี (SRAP)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP (ดัดแปลงจาก Li และ Quiros, 2001) เริ่มต้นจากการจับคู่ forward และ reverse primer ดังตารางที่ 3.2 โดยนำตัวอย่างมาเพียง 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่าง พร้อมเจือจางปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ทุกอย่างให้มีความเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 40 นาโนกรัม ดังตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นของ forward และ reverse primer อย่างละ 0.8 พิโคโมล (pM) ดึงออกซิโนวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล ( $\mu\text{M}$ ) ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสความเข้มข้น 1 ยูนิต บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1 เท่า และน้ำ แล้วผสมด้วยเครื่อง vortex นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Eppendorf Mastercycler® ep Gradient S โดยมีสภาวะดังตารางที่ 3.3 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker ขนาด 100 คู่เบส เมื่อคัดเลือกว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและนับแถบได้แล้ว จากนั้นนำคูปริเมอร์ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในทุกๆตัวอย่างจึงนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมต่อไป

ตารางที่ 3.3 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในเทคนิค SRAP

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Predenaturing	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	35 องศาเซลเซียส	1 นาที	5 รอบ
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	50 องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	7 นาที	1 รอบ

### 3.3.8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิคเอสอาร์เอพี (SRAP)

แปลผลขนาดขั้นดีเอ็นเอ หรือแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิค SRAP ของแต่ละไพรเมอร์ โดยการให้คะแนนแบบ binary data matrix โดยให้คะแนนเป็น 1 เมื่อมีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น 0 เมื่อไม่มีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่าง นำคะแนนที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี simple matching (Sneath และ Sokal, 1973) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA แสดงผลในรูปแบบ dendrogram โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.10m (Rohlf, 2000)

## 3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

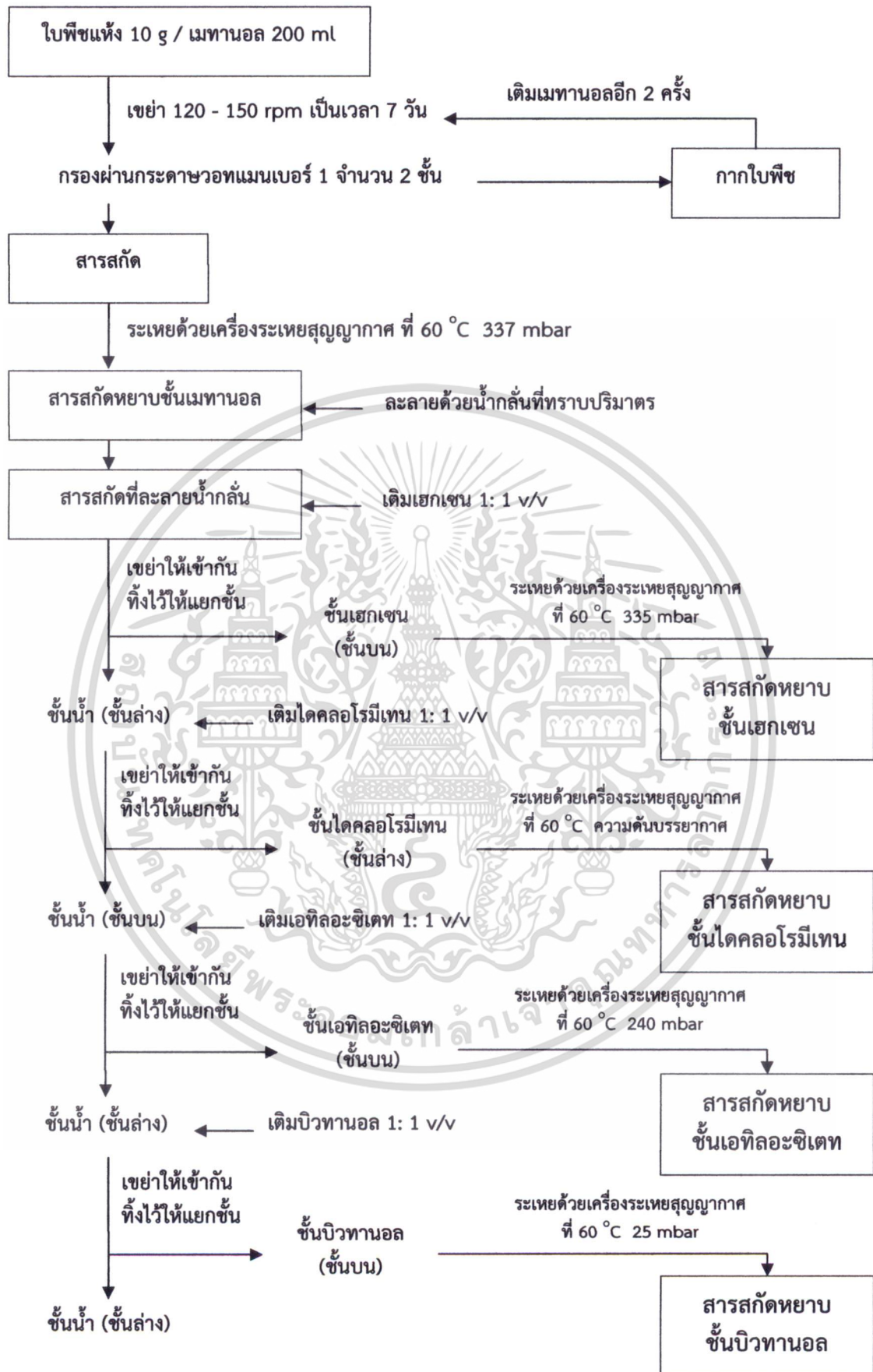
### 3.4.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี

เก็บตัวอย่างใบสังกรณีมาล้างให้สะอาด และผึ่งลมให้แห้งนาน 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาประมาณ 4-5 วัน เพื่อกำจัดความชื้นออกจากตัวอย่าง หรือรอจนกว่าน้ำหนักของตัวอย่างคงที่ เมื่อแห้งสนิทแล้วนำมาบดด้วยเครื่องปั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และนำตัวอย่างมาสกัดด้วยเมทานอล โดยใช้ตัวอย่างใบพืชแห้ง 10 กรัม ต่อเมทานอลปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วที่หุ้มด้วยกระดาษเพื่อป้องกันแสง เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบประมาณ 120 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบ 7 วัน ทำการเปลี่ยนเมทานอลใหม่ นำตัวอย่างไปสกัดซ้ำด้วยเมทานอลอีกจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 7 วัน นำสารสกัดที่ได้มารองผ่านกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 จำนวน 2 ชั้น โดยใช้ชุดกรองสารแบบลดความดัน จากนั้นนำสารสกัดที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ก็จะได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล เก็บไว้ในขวดแก้วป้องกันแสง และเก็บไว้ในโถดูดความชื้นจนสารสกัดแห้ง

นำสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล มาทำการแยกส่วน (partition) โดยทำการละลายสารสกัดหยาบด้วยน้ำกลั่น โดยเติมน้ำกลั่นที่ละ 100 มิลลิลิตร และใช้ magnetic stirrer กวนสาร เป็นระยะเวลา 10 นาที หากสารสกัดหยาบยังไม่ละลายเติมน้ำกลั่นลงไปอีก 100 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้จนกว่าสารสกัดหยาบจะละลายหมด เมื่อสารสกัดหยาบละลายหมด เติมเฮกเซนลงไปในส่วน 1:1 โดยปริมาตร จากนั้นใส่สารละลายลงในกรวยแยก เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกว่าสารละลายจะแยกเป็น 2 ชั้น โดยชั้นบน คือ สารละลายชั้นเฮกเซน นำมาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว ใส่ลงในกรวยแยก เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นเอาสารละลายชั้นเฮกเซนไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความดัน 337 มิลลิบาร์ ชั้นน้ำเกลือทิ้งไป ส่วนชั้นล่าง คือ สารละลายชั้นน้ำ นำมาสกัดด้วยเฮกเซนอีก 2 ครั้ง ดังที่กล่าวมา จากนั้นนำไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลาย 3 ครั้ง สรุปรูปที่ 3.1 จะได้สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล นำสารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละตัวทำละลายใส่ในขวดสีชาขนาดเล็กที่แห้งสนิทและอบฆ่าเชื้อแล้ว บันทึกน้ำหนักและลักษณะของสาร เก็บในที่เย็น สำหรับใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป พร้อมนำบางส่วนส่งวิเคราะห์ทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละตัวทำละลาย ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS)



รูปที่ 3.1 สรุปขั้นตอนการสกัดสารจากตัวอย่างใบสังกรณี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion

#### 3.4.2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดสอบ

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micococus luteus* ATCC 9341 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion ดัดแปลงมาจาก Farhana และคณะ (2009) โดยเชื้อแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hilton agar (MHA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว เชื้อโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของเชื้อที่ต้องการทดสอบมาทำให้อยู่ในรูปสารละลายเซลล์แขวนลอย โดยใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hilton broth (MHB) ปริมาตรหลอดละ 3-5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปตรวจสอบปริมาณของเชื้อ โดยการนำวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ปรับความขุ่นให้มีค่าประมาณ 0.5 – 1 ซึ่งจะได้เชื้อจุลินทรีย์ประมาณ  $10^8 - 10^9$  cfu/ml หรือนำไปเทียบความขุ่นกับสารละลาย McFarland 0.05 เพื่อให้มีเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ  $1 \times 10^8$  cfu/ml จากนั้นใช้ไม้พินสำลิตั้งฆ่าเชื้อจุ่มในเชื้อที่ทราบความเข้มข้นแล้ว ซับให้แห้งกับข้างหลอดทดลอง นำไปเกลี่ย (swab) บางๆให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

#### 3.4.2.2 การเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไคลอลโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล มาละลายด้วยเอทานอล 99.7 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งสารสกัดหยาบ 100 มิลลิกรัม จากนั้นเติมเอทานอล 99.7 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ stock ของสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำ stock มาเจือจางด้วยเอทานอล 99.7 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นเป็น 50 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยอดสารสกัดหยาบจากใบสั่งกรณีที่มีความเข้มข้น 100, 50 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 3.4.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disc diffusion

เมื่อได้สารละลายเซลล์แขวนลอยที่มีจำนวนเซลล์ที่ต้องการแล้ว นำไม้พินสำลิตั้งฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารละลายเซลล์แขวนลอยมาเกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหารแข็งโดยแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงในอาหาร MHA จากนั้นรอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ทำการหยดชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) ซึ่งใช้ยาปฏิชีวนะชนิด gentamycin ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ใช้ตัวทำละลายเอทานอล 99.7 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงในกระดาษ AA paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อ paper disc จากนั้นรอให้แห้ง หรือทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออก ใช้ปากคีบแผ่น paper disc วางลง และกดเบาๆ บนอาหารในจานเพาะเลี้ยงที่ทำการเกลี่ยเชื้อไว้แล้ว โดยให้สารสกัดหยาบ ชุดควบคุมทางบวก และชุดควบคุมทางลบ อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเดียวกัน ตามตำแหน่งที่กำหนด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของสารสกัดหยาบ โดยในการวิเคราะห์ผลการทดลองนั้นจะวิเคราะห์ใน 3 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำมาหาค่าเฉลี่ย และในการวิเคราะห์ทางสถิตินำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลอง กับกลุ่มควบคุม

### 3.4.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์

#### 3.4.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF7 (human breast cancer cell line: MCF7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT29 (human colon adenocarcinoma cell line: HT29) เซลล์ไตลิงชนิด Vero cell (African green monkey kidney cell line: Vero cell) เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 (human hepatoma cell line: HepG2) และเซลล์มะเร็งช่องปากของมนุษย์ชนิด KB (human mouth epidermal adenocarcinoma cell line: KB) เซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ชนิด HeLa (human cervical adenocarcinoma epithelial cell line: HeLa) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 (mouse fibroblast cell line: L929) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร การ subculture นั้นมีวิธีการปฏิบัติดังนี้ นำอาหารเก่าทั้งหมดออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ และล้างด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร หลังการนำสารละลาย PBS ออก ใส่สารละลายเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที ถึง 2 นาที ขึ้นกับชนิดของเซลล์ไลน์ เพื่อให้เซลล์เริ่มหลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะ เมื่อเซลล์ใกล้หลุดโดยเซลล์จะมีลักษณะกลม นำสารละลายเอนไซม์ทริปซินออก และเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของสารละลายเอนไซม์ทริปซิน เคาะขวดเพาะเลี้ยงเซลล์กับฝ่ามือเบาๆ หรือใช้การดูด-ปล่อยเซลล์เบาๆ แบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ และใส่อาหารให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดหยาบต่อไป

#### 3.4.3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดแขวนลอย

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 (murine lymphocytic leukemic cell line: P388) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดแขวนลอย โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยในการ subculture ทำได้โดยดูดเซลล์ที่เลี้ยงอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนของอาหารเก่าทิ้งแล้วเขย่าหลอดทดลองเบาๆ เพื่อให้เซลล์ที่ตกตะกอนกระจายตัว จากนั้นเติมอาหารใหม่ลงไป 5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับเซลล์ ดูดฟันทิ้งเข้ากัน จากนั้นดูดเซลล์ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือนำอาหารเก่าและเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ แบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในกรณีที่มีเซลล์จำนวนน้อย และปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ในกรณีที่มีเซลล์จำนวนมาก และใส่อาหารให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดหยาบต่อไป

### 3.4.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ด้วยวิธี MTT assay

#### 3.4.4.1 การปลูกเซลล์ใน 96 - wells plate

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay โดยดัดแปลงวิธีการจาก Mosmarin (1983) และ Hussain และคณะ (1993) ในการทดลองนี้จะทำการศึกษากับเซลล์ 8 ชนิด ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารดั่งที่กล่าวมาแล้ว ในเซลล์ชนิดเกาะพื้นผิวทำการ trypsinization ด้วยทริปซินที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับเซลล์ชนิด P388 เพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มีซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ นำเซลล์ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงไปปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่งมาทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธีทริบแพนบลู จากนั้นปลูกเซลล์ โดยเซลล์ชนิด P388 เริ่มต้นปลูกเซลล์จำนวน  $0.8 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร MCF7, L929, HeLa และ KB เริ่มต้นปลูกเซลล์จำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์ HT29, HepG2 และ Vero cell เริ่มต้นจำนวน  $1.5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร ( $0.8-1.5 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม) ลงใน 96-wells plate หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### 3.4.4.2 การเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล มาละลายด้วย DMSO 100 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งสารสกัดหยาบ 100 มิลลิกรัม จากนั้นใส่ DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ stock ของสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำ stock มาเจือจางให้ได้สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดหยาบจาก stock ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4900 ไมโครลิตร และทำการกรองสารละลายด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเตรียมสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 2000, 1000, 500, 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96 - wells plate ครบ 24 ชั่วโมง นำมาลงสารสกัดหยาบในระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงใน 96-wells plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยมีหลุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ต้องใส่สารสกัดหยาบแต่ใส่อาหารใหม่ที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (control) หลุมที่ใส่เฉพาะอาหารที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็น blank หลุมที่ใส่ DMSO ที่เจือจางในอาหารที่เติมซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) ในการตรวจสอบว่าผลการทดลองเป็นผลมาจาก DMSO หรือไม่ และหลุมที่ใส่สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารละลาย MitomycinC (MMC) เจือจางในอาหารที่เติมซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) โดยต้องมีการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนการนำมาใช้ จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### 3.4.4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดหยาบเป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง นำ 96 - wells plate มาใส่สารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นหุ้ม 96 - wells plate ด้วยกระดาษฟรอยด์เพื่อป้องกันแสง นำไปบ่มต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์เสียชีวิตเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการดูอาหารที่มีสารละลาย MTT โดยใช้เครื่องดูสารหรือการคว่ำลงเบาๆบนกระดาษซับ จากนั้นละลายผลึกฟออร์มาซานโดยเติมสารละลาย 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:  $CC_{50}$ )



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผล และอภิปรายผลการทดลอง

#### 4.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่างของพืชในวงศ์ Acanthaceae ที่ใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้มีทั้งหมด 70 ตัวอย่าง โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย โดยในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลแบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ 1. การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ Acanthaceae ในประเทศไทยด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณตำแหน่งยีน trnL-trnF บนคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ซึ่งแบ่งตัวอย่างเป็น 2 กลุ่ม คือ ตัวอย่างพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae จำนวน 52 ตัวอย่าง และตัวอย่างพืชวงศ์ย่อย Thunbergioideae เฉพาะสกุล *Thunbergia* จำนวน 3 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.1 และ 2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลห้อมช้าง (*Phlogacanthus* Nees) ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน trnL-trnF บนคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ร่วมกับเทคนิค sequence-related amplified polymorphism (SRAP) จำนวน 14 ตัวอย่าง และตัวอย่างพืช *Peristrophe lanceolaria* (Roxb.) Nees ที่ใช้เป็นตัวอย่างนอกสกุลของห้อม ดังตารางที่ 4.2 รวมทั้งตัวอย่างใบสังกรณี (AC12) จากสวนพฤกษศาสตร์ภาคตะวันออก (เขาหินซ้อน) จังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ใช้สำหรับการสกัดสาร โดยตัวอย่างพืชทั้งหมดได้รับการจำแนกและระบุชนิดจากคุณวินัย สมประสงค์ หัวหน้ากลุ่มวิจัยเพื่อการคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

#### 4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

##### 4.2.1 ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างพืชจำนวน 70 ตัวอย่าง ด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) โดยนำตัวอย่างใบมาล้างทำความสะอาดและปล่อยให้แห้ง นำส่วนใบของตัวอย่างพืชประมาณ 100 มิลลิกรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปแช่ใน CTAB 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ท่วมตัวอย่าง และทิ้งไว้ข้ามคืน หรือหากสารละลายมีสีน้ำตาลเข้มให้เปลี่ยนสารละลายใหม่และแช่ตัวอย่างต่อจนสารละลายมีสีน้ำตาลจางลง (โองการ, ติดต่อส่วนตัว) นำตัวอย่างที่ผ่านการแช่สารละลาย CTAB ไปทำให้แห้งด้วยไนโตรเจนเหลวและสกัดตามขั้นตอนมาตรฐานนั้น จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จะมีความเข้มข้นเพียงพอ และมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง แม้ว่าบางตัวอย่างมีการปนเปื้อนของสารที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ดังตัวอย่างปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอของพืชสกุลห้อมที่วัดโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Eppendorf BioPhotometer™ เมื่อมีค่า dilution factor เท่ากับ 100 แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.1 รหัส ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และแหล่งที่มาของพืชในวงศ์ Acanthaceae

รหัส	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่มา	เทคนิค	
				c-d	c-f
AC02	ฮว่านจ็อก	<i>Pseuderanthemum palatiferum</i>	กทม.	✓	
AC03	ด้อยตั้งเทศดอกม่วง	<i>Ruellia squarrosa</i>	กทม.	✓	
AC04	บาทยา	<i>Asystasia gangetica</i>	ศรีสะเกษ		✓
AC05	ด้อยตั้ง	<i>Ruellia tuberosa</i>	กทม.	✓	
AC08	-	<i>Gymnostachyum venustum</i>	ราชบุรี		✓
AC09	อังกาบ	<i>Barleria cristata</i>	สระบุรี	✓	
AC12	สังกรณี	<i>Barleria strigosa</i>	ฉะเชิงเทรา	✓	
AC13	อังกาบหนู	<i>Barleria prionitis</i>	กรมส่งเสริม	✓	
AC14	ด้อยตั้งเทศดอกม่วง	<i>Ruellia squarrosa</i>	สมุทรปราการ	✓	
AC15	อังกาบหนู	<i>Barleria prionitis</i>	ปราจีนบุรี	✓	
AC16	สังกรณี	<i>Barleria strigosa</i>	ชลบุรี	✓	
AC17	สังกรณี	<i>Barleria strigosa</i>	ปราจีนบุรี	✓	
AC18	เสลดพังพอนตัวผู้	<i>Barleria lupulina</i>	ปราจีนบุรี	✓	
AC19	เสลดพังพอนตัวผู้	<i>Barleria lupulina</i>	ราชบุรี	✓	
AC21	เหงือกปลาหมอ	<i>Acanthus ebracteatus</i>	ฉะเชิงเทรา		✓
AC22	อังกาบหนู	<i>Barleria prionitis</i>	น่าน	✓	
AC23	จ้ำฮ่อม	<i>Peristrophe lanceolaria</i>	พิจิตรภัณฑ์		✓
AC24	ฟ้าทลายโจร	<i>Andrographis paniculata</i>	สระบุรี		✓
AC25	เสลดพังพอนตัวผู้	<i>Barleria lupulina</i>	แม่ฮ่องสอน	✓	
AC26	ชำชำ	<i>Hygrophila plilomides</i>	พิจิตรภัณฑ์		✓
AC27	เสนียด	<i>Justicia adhatoda</i> L.	ฉะเชิงเทรา		✓
AC28	ตรีखा	<i>Justicia betonica</i>	ฉะเชิงเทรา		✓
AC29	เสลดพังพอนตัวเมีย	<i>Clinacanthus nutans</i>	ฉะเชิงเทรา		✓
AC30	ฮ่อมช้าง	<i>Phlogacanthus curviflorus</i> Nees	กาญจนบุรี		✓
AC31	เฒ่าหลังลาย	<i>Pseuderanthemum graciliflorum</i>	ฉะเชิงเทรา		✓
AC32	กระดุกไก่อดำ	<i>Justicia grossa</i> C.B. Clarke	ฉะเชิงเทรา		✓
AC33	บาทยา	<i>Asystasia gangetica</i>	ฉะเชิงเทรา		✓
AC34	เหงือกปลาหมอดอกขาว	<i>Acanthus ebracteatus</i>	พิจิตรภัณฑ์		✓
AC35	ด้อยตั้งเทศดอกชมพู	<i>Ruellia squarrosa</i> (Fenzl.) Cufod.	ชลบุรี	✓	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิอนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) รหัส ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และแหล่งที่มาของพืชในวงศ์ Acanthaceae

รหัส	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่มา	เทคนิค	
				c-d	c-f
AC36	เหงือกปลาหมอ	<i>Acanthus ebracteatus</i>	กทม.		✓
AC37	อังกาบใบเล็ก	<i>Barleria cristata</i>	ชลบุรี	✓	
AC38	เหงือกปลาหมอด่าง	<i>Acanthus montanus</i> (Nees) T.Anderson	ชลบุรี		✓
AC39	เหงือกปลาหมอเครือ	<i>Acanthus volubilis</i> Wall.	ชลบุรี		✓
AC40	ต้อยติ่งเทศแคระ	<i>Ruellia squarrosa</i> (Fenzl.) Cufod.	ชลบุรี	✓	
AC41	ฟ้าทลายโจร	<i>Andrographis paniculata</i>	ชลบุรี		✓
AC42	ต้อยติ่ง	<i>Ruellia tuberosa</i>	ชลบุรี	✓	
AC43	อ่อมแซบ (พุ่มเล็ก)	<i>Asystasia gangetica</i>	ชลบุรี		✓
AC44	รัศมีจันทร์	<i>Pseuderanthemum reticulatum</i>	ชลบุรี		✓
AC45	อ่อมแซบ (พุ่มใหญ่)	<i>Asystasia gangetica</i>	ปราจีนบุรี		✓
AC46	กระตูดไก่ดำ	<i>Justicia gendarussa</i>	ชลบุรี		✓
AC47	ใบทอง	<i>Graptophyllum pictum</i>	ชลบุรี		✓
AC48	-	<i>Lepidagathis dissimilis</i> Imlay	นครพนม		✓
AC49	-	<i>Peristrophe lanceolaria</i> (Roxb.) Nees	พะเยา		✓
AC50	-	<i>Gymnostachyum trilobatum</i> Ride	ระนอง		✓
AC51	ทองพันชั่ง	<i>Rhinacanthus nasutus</i>			✓
AC52	ชว้านจ็อก	<i>Pseuderanthemum palatififerum</i>			✓
AC53	เฒ่าหลังลาย	<i>Pseuderanthemum graciliflorum</i>			✓
AC54	ใบนาก	<i>Pseuderanthemum atropurpureum</i>			✓
AC55	-	<i>Barleria</i> sp.		✓	
AC56	อังกาบ (สีม่วง-ขาว)	<i>Barleria cristata</i>		✓	
AC57	อังกาบ (ใบมีขน)	<i>Barleria cristata</i>		✓	
AC58	สังกรณี (ใบมีขน ต้นสูง)	<i>Barleria strigosa</i>		✓	
OG02	รางจืด	<i>Thunbergia laurifolia</i>	กทม.		✓
OG03	ช้องนาง	<i>Thunbergia affinis</i>	ชลบุรี		✓
OG04	ช้องนางเล็ก	<i>Thunbergia erecta</i>	ชลบุรี		✓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 รหัส ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และแหล่งที่มาของพืชในสกุลห้อมช้าง

รหัส	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่มา
PH01	หว่าชะอำ	<i>Peristrophe lanceolaria</i> (Roxb.) Nees	พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร
PH02	ห้อมแดง	<i>Phlogacanthus vitellinus</i> T. Anderson	พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร
PH03	ดีปลากั้ง	<i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> T. Anderson	พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร
PH04	ดีปลากั้ง	<i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> T. Anderson	สวนพฤกษศาสตร์ภาคตะวันออกเฉียง (เขาหินซ้อน) ฉะเชิงเทรา
PH05	ห้อมคราม	<i>Phlogacanthus pedunculatus</i> Imlay	พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร
PH06	ห้อมขาว	<i>Phlogacanthus paniculatus</i> (T. Anderson) Imlay	พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร
PH07	ห้อมช้าง	<i>Phlogacanthus curviflorus</i> Nees	พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร
PH08	ห้อมใต้ลายจุด	<i>Phlogacanthus rectiflorus</i> Imlay	พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร
PH09	ดีปลากั้ง	<i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> T. Anderson	อำเภอเมือง จังหวัดหนองบัวลำภู
PH10	ดีปลากั้ง	<i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> T. Anderson	อำเภอนากลาง จังหวัดหนองบัวลำภู
PH11	ดีปลากั้ง	<i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> T. Anderson	อำเภอเสเมิง จังหวัดเชียงใหม่
PH12	ดีปลากั้ง	<i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> T. Anderson	อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา
PH14	ดีปลากั้ง	<i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> T. Anderson	อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์
PH15	ดีปลากั้ง	<i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> T. Anderson	อำเภอจังหาร จังหวัดร้อยเอ็ด
PH16	ดีปลากั้ง	<i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> T. Anderson	อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

หมายเหตุ พืชสิรินธร กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่วัดได้โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

รหัสตัวอย่าง	OD260	OD280	ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (OD260: OD280)	ปริมาณดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)
PH01	0.011	0.004	2.70	53.52
PH02	0.021	0.014	1.47	106.05
PH03	0.021	0.014	1.53	106.04
PH04	0.058	0.023	2.47	287.65
PH05	0.105	0.059	1.78	526.41
PH06	0.066	0.035	1.88	328.86
PH07	0.052	0.039	1.35	261.53
PH08	0.044	0.030	1.46	220.85
PH09	0.044	0.036	1.22	222.03
PH10	0.033	0.026	1.25	162.52
PH11	0.049	0.034	1.44	243.00
PH12	0.021	0.017	1.24	104.39
PH14	0.029	0.019	1.48	143.52
PH15	0.055	0.038	1.46	277.48
PH16	0.039	0.025	1.59	197.40

#### 4.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชวงศ์ Acanthaceae ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชวงศ์ Acanthaceae จำนวน 2 วงศ์ย่อย คือ วงศ์ย่อย Acanthoideae จำนวน 52 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 15 สกุล ได้แก่ สกุล *Graptophyllum* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Pseuderanthemum* จำนวน 6 ตัวอย่าง, *Asystasia* จำนวน 4 ตัวอย่าง, *Clinacanthus* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Gymnostachyum* จำนวน 2 ตัวอย่าง, *Rhinacanthus* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Justicia* จำนวน 4 ตัวอย่าง, *Hygrophila* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Ruellia* จำนวน 6 ตัวอย่าง, *Andrographis* จำนวน 2 ตัวอย่าง, *Peristrophe* จำนวน 2 ตัวอย่าง, *Phlogacanthus* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Lepidagathis* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Barleria* จำนวน 15 ตัวอย่าง และ *Acanthus* จำนวน 5 ตัวอย่าง และวงศ์ย่อย Thunbergioideae คือพืชสกุล *Thunbergia* จำนวน 3 ตัวอย่าง ดังตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง trnL-trnF ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ โดยการใช้ไพรเมอร์ c (5' -CGAAATCG GTAGACGCTACG -3') และ d (5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3') หรือ f (5'- ATTTGAACTGGTG ACACG AG -3') มีการทำ Negative ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่ใส่สารที่เป็น Master mix (Master mix คือสารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ประกอบด้วย PCR buffer, mix dNTP, taq DNA polymerase และไพรเมอร์) เหมือนกับชุดการทดลองอื่น แต่ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อเปรียบเทียบว่าสารที่ใช้ทำ Master mix นั้นไม่ผิดพลาด จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาแยกด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส พบว่าไพรเมอร์ c และ d สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยของนักวิจัยที่สังกัดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี หากมีข้อสงสัยหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาติดต่อที่ โทร. 02-214-9200 หรือ อีเมล: scs@kmutt.ac.th

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพียง 2 สกุลเท่านั้น คือ สกุล *Barleria* และ *Ruellia* โดยผลผลิตพีชีอาร์มีขนาดประมาณ 550 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ และไพรเมอร์ c และ f สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในพืชทุกสกุล โดยผลผลิตพีชีอาร์มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส

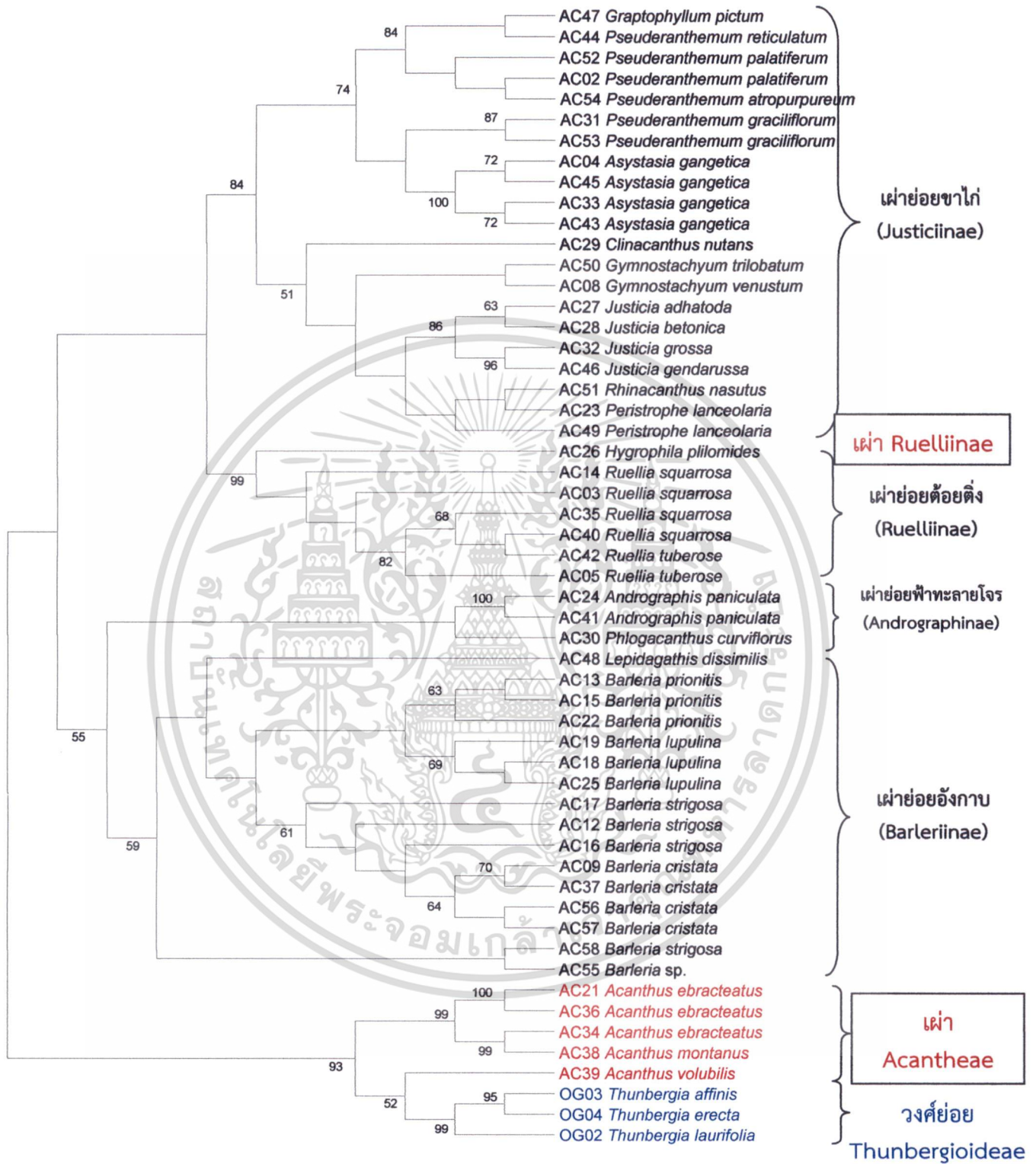
#### 4.2.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ Acanthaceae ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae จำนวน 52 ตัวอย่าง และวงศ์ย่อย Thunbergioideae จำนวน 3 ตัวอย่าง คือ รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) ช้องนาง (*Thunbergia affinis*) และช้องนางเล็ก (*Thunbergia erecta*) เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสบริเวม *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ c และ f พบขึ้นดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 900-950 คู่เบส จากการนำผลผลิตพีชีอาร์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Kit GF-1 AmbiClean และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ โดยทำการตัดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bioedit และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ในรูปของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี neighbor-joining ด้วยโปรแกรม MEGA 5 (Tamura et al., 2011) ทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae ที่ศึกษา มีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์อย่างชัดเจน โดยดูจากค่า bootstrap ซึ่งเป็นค่าทดสอบความเชื่อมั่นของ phylogenetic tree บ่งบอกจำนวนข้อมูลที่เกิดการสุ่มข้อมูลตัวอย่างเปรียบเทียบกับซ้ำๆ สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างพืชได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ 1. พืชชนิดต่างๆ จำนวน 47 ตัวอย่าง และ 2. พืชสกุล *Acanthus* จำนวน 5 ตัวอย่างและพืชสกุล *Thunbergia* จำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Scotland และ Vollesen (2000) ที่ได้จำแนกพืชวงศ์ Acanthaceae ออกเป็น 3 วงศ์ย่อย ได้แก่ Nelsonoideae, Thunbergioideae และ Acanthoideae ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้ไม่มีตัวอย่างในวงศ์ย่อย Nelsonoideae เนื่องจากพืชในวงศ์ย่อยนี้มีไม่แพร่หลายในพืชที่ต่างๆ และมักพบบ่อยในป่าลึก แต่อย่างไรก็ตามแสดงให้เห็นว่าพืชสกุล *Acanthus* ซึ่งอยู่ในเผ่า Acantheae ของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae มีความใกล้ชิดกับวงศ์ย่อย Thunbergioideae มากกว่า

ในการศึกษาคั้งนี้ใช้ตัวอย่างพืชวงศ์ย่อย Thunbergioideae เพียงสกุล *Thunbergia* จำนวน 3 ตัวอย่าง คือ รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) ช้องนาง (*Thunbergia affinis*) และช้องนางเล็ก (*Thunbergia erecta*) เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามแสดงให้เห็นความใกล้ชิดกันระหว่างช้องนาง (*T. affinis*) และช้องนางเล็ก (*T. erecta*) มากกว่ารางจืด (*T. laurifolia*) จึงควรมีการศึกษาจำนวนพืชสกุล *Thunbergia* เพิ่มเติม เช่น สร้อยอินทนิล (*Thunbergia grandiflora*) เป็นต้น

พืชวงศ์ย่อย Acanthoideae แบ่งเป็น 2 เผ่า คือ Acantheae และ Ruellieae หรือบางครั้งแบ่งเป็นเผ่าเหงือกปลาหมอ และเผ่าต้อยติ่ง ตามลำดับ ในการศึกษาคั้งนี้มีเพียงสกุล *Acanthus* ซึ่งจัดอยู่ในเผ่า Acantheae ที่แสดงความใกล้ชิดกับวงศ์ย่อย Thunbergioideae มากกว่า โดยเฉพาะเหงือกปลาหมอเครือ (*Acanthus volubilis*: AC39) แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของสีของดอกเหงือกปลาหมอ เนื่องจากสีของเหงือกปลาหมอมิทั้งสีม่วงและขาว ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้เหงือกปลาหมอดอกขาว (*Acanthus ebracteatus*: AC34) แสดงความใกล้ชิดกับเหงือกปลาหมอใบด่าง (*Acanthus montanus*: AC38) มากกว่าเหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus*) ในตัวอย่าง AC21 และ AC36 จึงควรมีการศึกษาจำนวนตัวอย่างที่เพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ Acanthoideae บริเวณยีน *trnL-trnF* ด้วยวิธี neighbor-joining จากโปรแกรม MEGA 5 โดยสุ่มค่า bootstrap เท่ากับ 1,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับพืชในเผ่าต้อยติ่ง หรือเผ่า Ruelliinae จำนวน 47 ตัวอย่าง ที่พบว่ามีความหลากหลายสูงนั้น แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย (เผ่าย่อย) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Scotland และ Vollesen (2000) ที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะของใบ ชีวสโทลิท ดอก การออกดอก และกลีบเลี้ยง สามารถจำแนกวงศ์ย่อย Acanthoideae ออกเป็น 2 เผ่า คือ เผ่า Acantheae และเผ่า Ruellieae โดยเผ่า Ruellieae นั้นจำแนกเป็น 4 เผ่าย่อย คือ เผ่าย่อยต้อยติ่ง (Ruelliinae) เผ่าย่อยชาไก่ (Justiciinae) เผ่าย่อยอังกาบ (Barleriinae) และเผ่าย่อยฟ้าทะลายโจร (Andrographinae) โดยเผ่าย่อยอังกาบแสดงความใกล้ชิดกับเผ่าย่อยฟ้าทะลายโจร และเผ่าย่อยต้อยติ่งแสดงความใกล้ชิดกับเผ่าย่อยชาไก่ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Mcdade และ Moody (1999) ที่ศึกษาในระดับโมเลกุลในตำแหน่งนี้เช่นกัน สามารถแบ่งพืชวงศ์ Acanthaceae เป็น 4 lineages คือ Acanthus, Barleria, Ruellia และ Justicia โดย Ruellia แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ Justicia lineages แต่ไม่ได้กล่าวถึง Andrographis

เมื่อพิจารณาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าเผ่า Ruellieae แบ่งเป็น 4 เผ่าย่อย มีจำนวน 14 สกุล โดยเผ่าย่อยชาไก่ (Justiciinae) แสดงความหลากหลายมากที่สุดคือ 8 สกุล คือ สกุล *Graptophyllum* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Pseuderanthemum* จำนวน 6 ตัวอย่าง, *Asystasia* จำนวน 4 ตัวอย่าง, *Clinacanthus* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Gymnostachyum* จำนวน 2 ตัวอย่าง, *Justicia* จำนวน 4 ตัวอย่าง, *Rhinacanthus* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Peristrophe* จำนวน 2 ตัวอย่าง เช่นเดียวกับ Mcdade และ Moody (1999) ที่พบว่าเฉพาะ Justicia lineages สามารถแบ่งเป็น sublineages โดยพืชที่น่าสนใจในเผ่าย่อยนี้คือ ฮวานง็อก (*Pseuderanthemum palatiferum*: AC02 และ AC52) รูปที่ 4.2 A และเผ่าหลังลาย (*Pseuderanthemum graciliflorum*: AC31 และ AC53) รูปที่ 4.2 B และพืชในสกุลบาทยา มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Asystasia gangetica* มีลักษณะทั่วไปเป็นไม้พุ่มหรือไม้ล้มลุก บางครั้งเป็นเถา ลำต้น และกิ่งเป็นเหลี่ยม ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามมีลักษณะเป็นรูปไข่หรือคล้ายรูปสามเหลี่ยม ปลายแหลมโคนใบเว้าเล็กน้อย ขอบใบเรียบหรือหยักมน แผ่นใบมีขนสั้นนุ่มหรือเกลี้ยง ดอกเป็นช่อกระจุก โดยดอกจะติดอยู่บนแกนช่อดอก และทยอยบานจากโคนช่อขึ้นไปตามปลายยอด บาทยาเป็นพืชที่สามารถพบได้ทั่วไปตามข้างทางจึงเป็นที่มาของชื่อชุมชนาริมทาง รวมทั้งยังมีสีดอกที่หลากหลายจึงได้ชื่อว่า เบญจรงค์ห้าสี และอาจรู้จักกันในชื่อ ยาหย่า ผักกูดเนา และอ่อมแซบ โดยแต่ละชื่อขึ้นอยู่กับสถานที่ที่พบ ซึ่งในส่วนของพืชได้เป็นที่นิยมนำมาใช้ในการรับประทานเพื่อรักษาโรค แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยสามารถแบ่งตามสีดอกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มสีขาวย้ำแดง (รูปที่ 4.2C) ที่มักขึ้นเองโดยทั่วไป และกลุ่มสีต่างๆ เช่นขาว เหลือง ม่วง และชมพู เป็นต้น ที่นิยมมาบริโภค ดังแสดงลักษณะสีดอกเหลืองในรูปที่ 4.2D แต่มีชื่อวิทยาศาสตร์ที่เหมือนกัน จึงควรมีการศึกษาด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลอื่นๆ และในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น

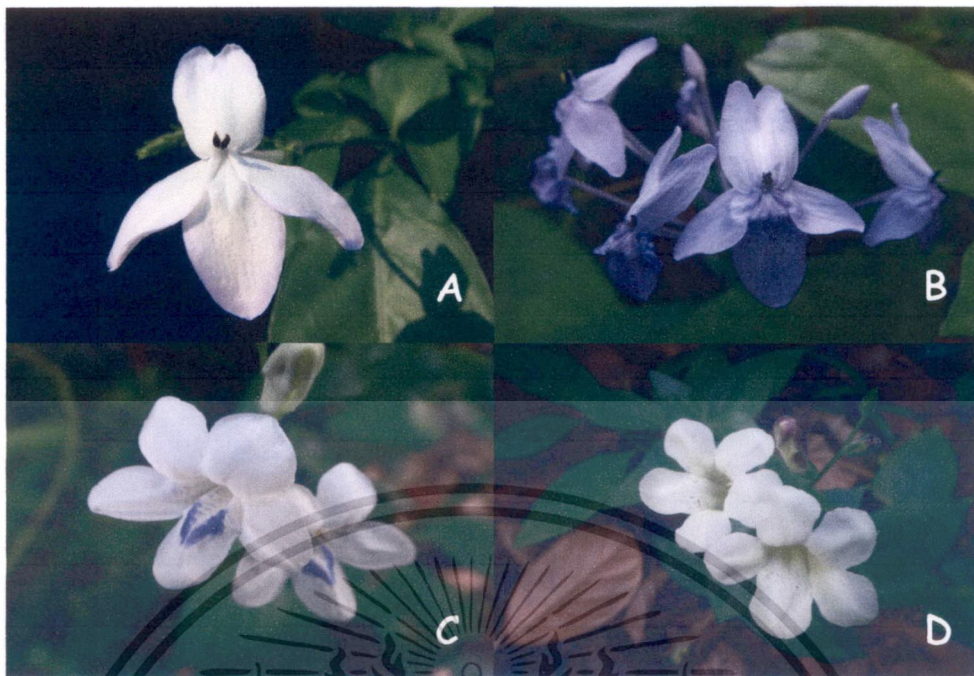
เผ่าย่อยต้อยติ่ง (Ruelliinae) ในการศึกษาในครั้งนี้ มีจำนวน 6 ตัวอย่าง แบ่งเป็นสกุล *Ruellia* จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยมีลักษณะ 5 ลักษณะด้วยกันคือ ต้อยติ่งเทศหรือต้อยติ่งฝรั่ง (*Ruellia squarrosa*) ที่เป็นไม้พุ่มเล็ก ลำต้นสูงประมาณ 50-80 เซนติเมตร ใบเดี่ยวออกเรียงตรงข้าม ใบยาวรีวปลายแหลมโคนมน ขอบใบเรียบกว้าง 1.5-3 ซม. ยาว 10-15 ซม. ดอกออกเป็นช่อๆ ละ 2-3 ดอก รูปลำโพงแยกเป็นแฉก 5 แฉก กลีบดอกหยักย่น มีทั้งสีม่วง (รูปที่ 4.3A) ในตัวอย่าง AC03 และ AC14 และดอกสีชมพู (รูปที่ 4.3B) ) ในตัวอย่าง AC35 และต้อยติ่งแคระ (*Ruellia squarrosa*) ในตัวอย่างที่ AC40 ที่มีลักษณะของใบและดอกเช่นเดียวกับต้อยติ่งเทศแต่ต้นเตี้ยมากกว่า รวมทั้งต้อยติ่ง (*Ruellia tuberosa*) ที่เป็นวัชพืชพบเห็นโดยทั่วไป ดังรูปที่ 4.3C ในตัวอย่างที่ AC42 นอกจากนี้ยังพบต้อยติ่ง ดังตัวอย่างที่ AC05 (ดังรูปที่ 4.3D) ที่มีลักษณะดอกคล้ายคลึงกับต้อยติ่ง แต่มีลักษณะ

กลีบดอกที่เล็กและบางกว่า และแสดงความสัมพันธ์ที่แตกต่างออกไป แม้ว่ายังรวมอยู่ในสกุล *Ruellia* นอกจากนั้นแล้วในเผ่าย่อยด้อยต้ง (Ruellinae) มีพืชอีกสปีชีส์หนึ่ง คือ ซ้ำซ่า (*Hygrophila plilomides*) จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่น่าสนใจและศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจากเป็นสกุลไม้น้ำ

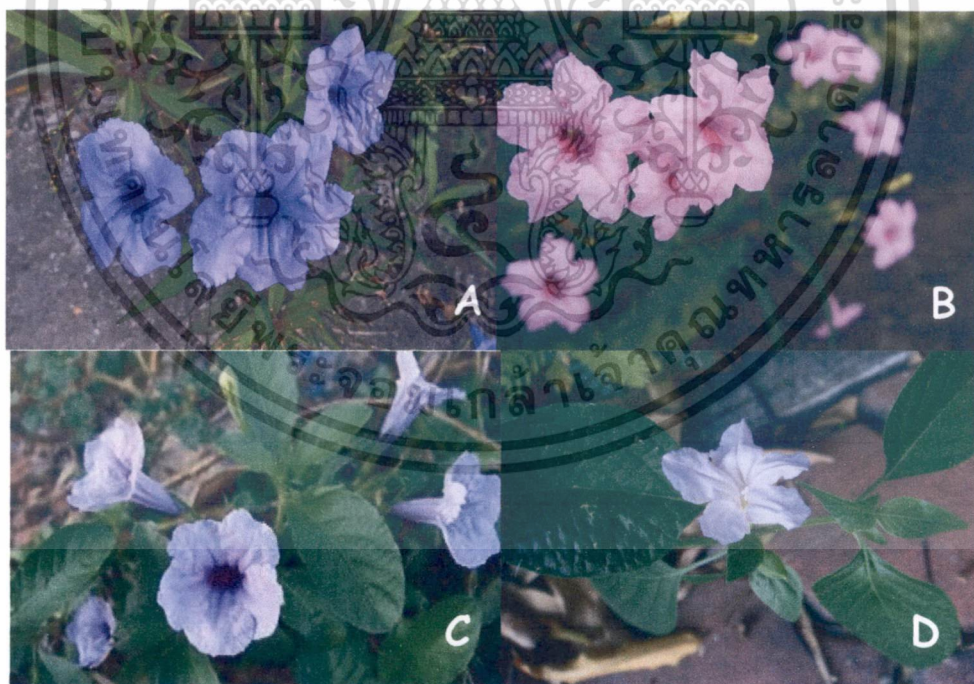
เผ่าย่อยฟ้าทะลายโจร (*Andrographinae*) ในการศึกษาเบื้องต้นมีเพียงตัวอย่างเพียง 3 ตัวอย่าง คือฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) จำนวน 2 ตัวอย่าง และห้อมช้าง (*Phlogacanthus curviflorus*) จำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งจะมีการศึกษาโดยเทคนิคอื่นต่อไป และเผ่าย่อยอังกาบ (*Barleriinae*) ประกอบด้วย *Lepidagathis dissimilis* จำนวน 1 ตัวอย่าง (AC48) ที่แยกออกไปอย่างชัดเจน และพืชสกุล *Barleria* จำนวน 15 ตัวอย่าง ที่สามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มอังกาบหนู (*Barleria prionitis*) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ AC13, AC15 และ AC22 เป็นไม้พุ่ม สูง 1-1.5 เมตร แตกกิ่งจำนวนมาก ลำต้นเกลี้ยง มีหนามยาวรอบข้อ หนามยาว 1-2 เซนติเมตร ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปรี รูปไข่ หรือรูปขอบขนาน ยาว 4-12 เซนติเมตร ปลายใบแหลม กลีบดอก 5 กลีบ สีเหลืองส้ม กลีบบน 4 กลีบ ยาวเท่าๆ หลอดกลีบ เรียงซ้อนเหลื่อม กลีบล่างขนาดเล็กกว่าเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.4A กลุ่มที่ 2 กลุ่มเสลดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina*) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ AC18, AC19 และ AC25 เป็นไม้พุ่ม สูง 1-2 เมตร แตกกิ่งจำนวนมาก สีน้ำตาลอมเขียว หรือสีน้ำตาลแดง ใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามสลับฉาก เรียงชิดกันใกล้ข้อดอก ใบรูปใบหอก ยาว 4-10 เซนติเมตร ปลายใบแหลม โคนใบเรียวสอบจรดก้านใบ ขอบใบเรียบ แผ่นใบเกลี้ยง สีเขียวเข้มหรืออมม่วง เส้นกลางใบส่วนมากมีสีแดงหรือสีชมพู ก้านใบสั้น มีหนามที่โคนหนึ่งคู่ โค้งงอ ยาว 1-2 เซนติเมตร มีหนามสั้นๆ ตรง 1 อันกลีบดอก 5 กลีบ สีส้มหรือเหลือง กลีบส่วนบนส่วนใหญ่มี 4 กลีบ เรียงซ้อนแผ่ชิดกัน บานแผ่ออก ขนาดใหญ่กว่ากลีบล่าง ยาว 1-2 เซนติเมตร กลีบล่างขนาดเล็ก พับงอเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.4B กลุ่มที่ 3 กลุ่มอังกาบ (*Barleria cristata*) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ AC09, AC37, AC56 และ AC57 เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-2 เมตร กิ่งก้านและใบมีขนสีเหลืองอ่อน ใบออกตรงข้ามเป็นคู่ๆ ใบรูปไข่แกมรี กว้าง 2-5 เซนติเมตร ยาว 4.5-8 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อค่อนข้างแน่นที่ปลายยอด หรือบริเวณใกล้ปลายยอด สีฟ้าอมม่วงหรือแกมชมพู ดอกส่วนโคนเชื่อมเป็นหลอด ยาว 3-4 เซนติเมตร ส่วนปลายแยกเป็น 5 กลีบ ขนาดไม่เท่ากัน กลีบล่างจะใหญ่กว่า 4 กลีบบน ดังรูปที่ 4.4C กลุ่มที่ 4 กลุ่มสังกรณี (*Barleria strigosa*) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ AC12, AC16 และ AC17 เป็นไม้พุ่ม สูง 1-1.5 เมตร แตกกิ่งมาก ลำต้นและกิ่งมีขนหยาบ ไม่มีหนาม ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปรี รูปขอบขนาน หรือรูปใบหอก ยาวได้ประมาณ 20 เซนติเมตร ปลายใบแหลม แหลมยาว ขอบใบเรียบ แผ่นใบมีขนด้านล่าง ดอกออกเป็นกระจุกช่อคล้ายช่อเชิงลดสั้นๆ ตามซอกใบหรือปลายกิ่ง กลีบดอก 5 กลีบ สีม่วงอมน้ำเงิน เรียงซ้อนเหลื่อม กลีบบน 4 กลีบขนาดไม่เท่ากัน ยาว 2-3 เซนติเมตร 2 กลีบบนอกรูปไข่กลับ 2 กลีบในแคบกว่าเล็กน้อย กลีบล่างเกือบกลม ขนาดเล็กกว่ากลีบบนเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.4D เมื่อนำลำดับนิเวศลิโอไทด์มาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างเสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*) แสดงความใกล้ชิดกับอังกาบหนู (*B. prionitis*) และสังกรณี (*B. strigosa*) แสดงความใกล้ชิดกับอังกาบ (*B. cristata*) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบว่าอังกาบหนูและเสลดพังพอนตัวผู้เป็นพืชที่มีหนาม และมีดอกสีเหลือง สำหรับและสังกรณีและอังกาบ เป็นพืชที่ไม่มีหนาม และมีดอกสีชมพู ม่วง ดังแสดงในรูปที่ 4.3E และ F ตามลำดับ นอกจากนั้นแล้วยังพบว่ามีตัวอย่างสังกรณี (*Barleria strigosa*) ตัวอย่างที่ AC58 ที่ใบมีขนมาก ซึ่งเมื่อศึกษาเพิ่มเติมพบว่าเป็นชนิดหญ้าห้วนาค (*B. strigosa* var. *polytricha*) ที่แยกออกไปจากสังกรณีอื่นอย่างชัดเจน ทั้งด้านความสูง และใบมีขนสั้นหยาบหนาแน่นของหญ้าห้วนาค ดังแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 4.5A-C รวมทั้งตัวอย่าง AC55 ยังไม่สามารถจำแนกได้ในระดับสปีชีส์ จึงควรมีการทบทวนเรื่องการจัดจำแนกของพืชชนิดนี้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

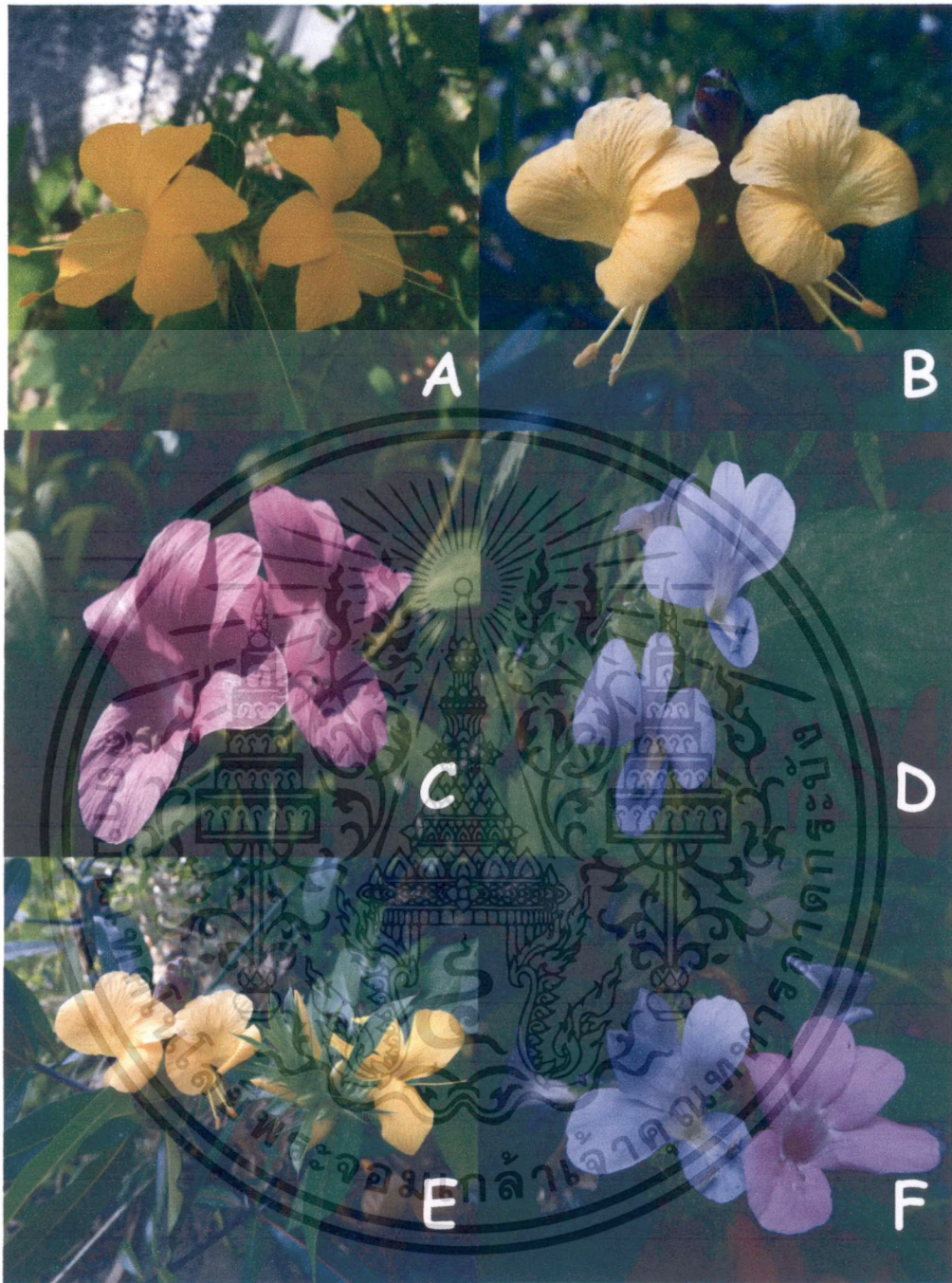


รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะของดอกในพืชเผ่าย่อยชาไก่ (Justiciaceae) (A) ชว่านงือก (B) เฒ่าหลังลาย (C) บายาดอกสีขาวแต้มม่วง และ (D) บายาดอกสีเหลือง



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของดอกในพืชเผ่าย่อยต้อยตึง (Ruelliacae) (A) ต้อยตึงเทศดอกม่วง (B) ต้อยตึงเทศดอกชมพู (C) ต้อยตึง และ (D) ต้อยตึงที่มีลักษณะดอกเล็กและกลีบบาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะของดอกในพืชย่อยอังกาบ (Barleriinae) (A) อังกาบหนู (B) เสลดพังพอนตัวผู้ (C) อังกาบ (D) สังกะณี (E) เปรียบเทียบลักษณะของ เสลดพังพอนตัวผู้: ซ้าย และอังกาบหนู: ขวา และ (F) เปรียบเทียบลักษณะของ สังกะณี: ซ้าย และอังกาบ: ขวา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

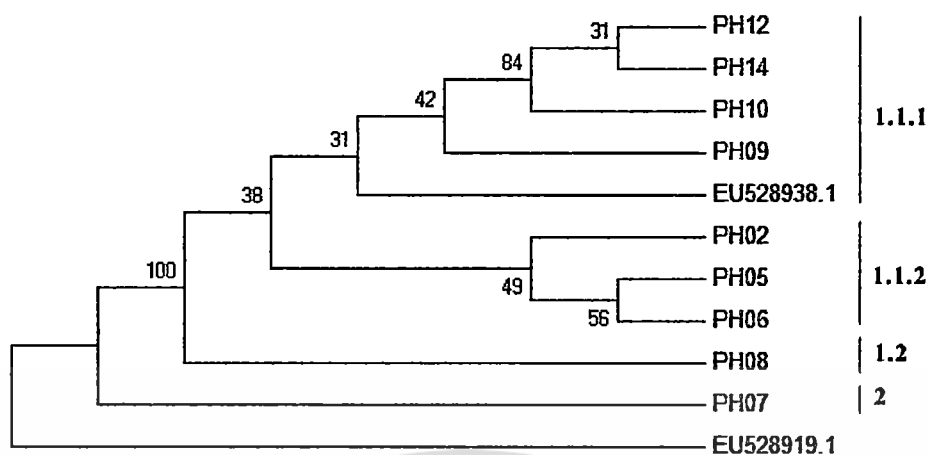


รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบลักษณะของสังกรณีและหญ้าหัวนาค (A) ความสูงของสังกรณี (ช้าย) และหญ้าหัวนาค (ขวา) (B) ใบมีขนสั้นหยาบหนาแน่นของหญ้าหัวนาค และ (C) ใบมีขนสั้นปริมาณเล็กน้อยของสังกรณี

4.2.4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหอมช้างด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาแล้วเผ่าย่อยฟ้าทะลายโจร (*Andrographinae*) มีตัวอย่างเพียง 3 ตัวอย่าง คือฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) จำนวน 2 ตัวอย่าง และหอมช้าง (*Phlogacanthus curviflorus*) จำนวน 1 ตัวอย่าง จึงได้มีการรวบรวมตัวอย่างพืชในสกุลหอมช้างและศึกษาด้วยเทคนิคอื่นต่อไป โดยศึกษาเพิ่มเติมในสกุลหอมช้าง ที่ประกอบด้วยตัวอย่างหอมแดง (*Phlogacanthus vitellinus*) หอมคราม (*Phlogacanthus pedunculatus*) หอมขาว (*Phlogacanthus paniculatus*) หอมช้าง (*Phlogacanthus curviflorus*) และหอมใต้ลายจุด (*Phlogacanthus rectiflorus*) อย่างละ 1 ตัวอย่าง รวมทั้งตีปลากั้ง (*Phlogacanthus pulcherrimus*) จำนวน 9 ตัวอย่าง และหว่าชะอำ (*Peristrophe lanceolaria*) ตามรหัส ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และแหล่งที่มาของพืชในสกุลหอมช้างในตารางที่ 4.2 โดยวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าตัวอย่างที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ คือ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 900 เบส มีจำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ PH02, PH05, PH06, PH07, PH08, PH09, PH10, PH12 และ PH14 นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI มาร่วมในการวิเคราะห์ คือ หอมใต้ (*Phlogacanthus thrysiflorus*) รหัส EU528938.1 ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกัน และ *Cystacanthus turgidus* รหัส EU528919.1 ซึ่งเป็นพืชนอกกลุ่มสกุล แต่อยู่ในเผ่าย่อยเดียวกัน ผลการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 4.6 พร้อมกับแสดงค่า bootstrapping ที่ได้จากการทำซ้ำ 1000 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหอมช้าง บริเวณยีน trnL-trnF ด้วยวิธี neighbor-joining จากโปรแกรม MEGA 5 โดยสุ่มค่า bootstrap เท่ากับ 1,000

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (รูปที่ 4.6) สามารถแบ่งตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษาได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 1 ได้แก่ PH09, PH10, PH12 และ PH14 ตีปลากิ่ง (*P. pulcherrimus* T. Anderson) EU528938.1 หอมใต้ (*P. thysiflorus*) PH06 หอมขาว (*P. paniculatus* (T. Anderson) Imlay) PH02 หอมแดง (*P. vitellinus* T. Anderson) และ PH05 หอมคราม (*P. pedunculatus* Imlay) กลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่ PH08 หอมใต้ลายจุด (*P. rectiflorus* Imlay) ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ PH07 หอมช้าง (*P. curviflorus* Nees) โดยพืชแต่ละชนิดจะแยกออกจากกันชัดเจน ส่วนตีปลากิ่งนั้นก็ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน สอดคล้องกับ McDade และ Moody (1999); Moylan และคณะ (2004) อ้างโดย กมลพรและคณะ (2553) ที่ระบุว่าลำดับเบสในส่วน of intron และ spacer ของยีน *trnL-trnF* ที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ สามารถบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Acanthaceae ได้

#### 4.2.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหอมช้างจากเทคนิค SRAP

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค SRAP จากการคัดเลือกไพรเมอร์จากการจับคู่ระหว่าง forward primer จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Me1-5 และ reverse primer จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ Em1-6 ดังตารางที่ 3.2 สามารถจับคู่ไพรเมอร์ได้จำนวน 30 คู่ จากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จำนวน 4 ตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ดังกล่าว สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และให้แถบที่ชัดเจนสามารถนับแถบได้จำนวน 10 คู่ ดังตารางที่ 4.4 พร้อมนำไพรเมอร์นั้นมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้ครบตัวอย่างที่ต้องการศึกษาทั้ง 15 ตัวอย่าง พบว่าขนาดดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในช่วง 30 - 2000 คู่เบส โดยไพรเมอร์ Me4-Em3 ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 11 แถบ และไพรเมอร์ Me5-Em1 ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 25 แถบ

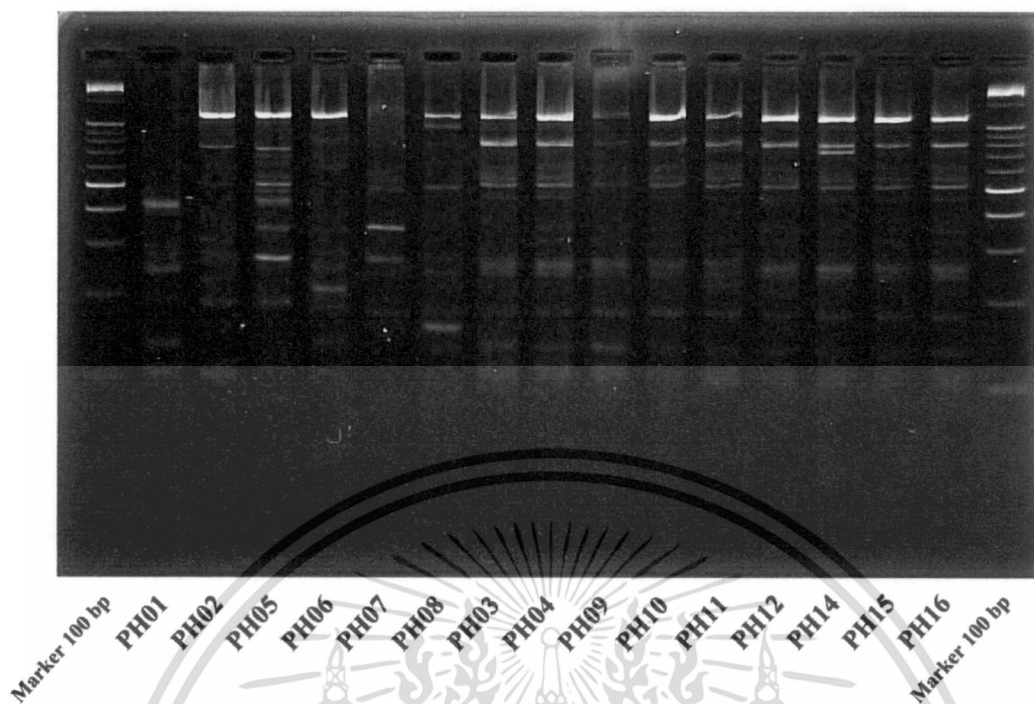
ตารางที่ 4.4 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค SRAP

Primer	Total amplified band	Total polymorphic band	% Polymorphic band
Me1-Em1	22	21	95.45
Me1-Em5	19	19	100
Me2-Em1	19	19	100
Me2-Em4	12	11	91.67
Me3-Em2	14	13	92.86
Me3-Em3	19	17	89.47
Me4-Em3	11	10	90.90
Me4-Em4	16	16	100
Me5-Em1	25	25	100
Me5-Em3	24	24	100
Total	181	175	96.69

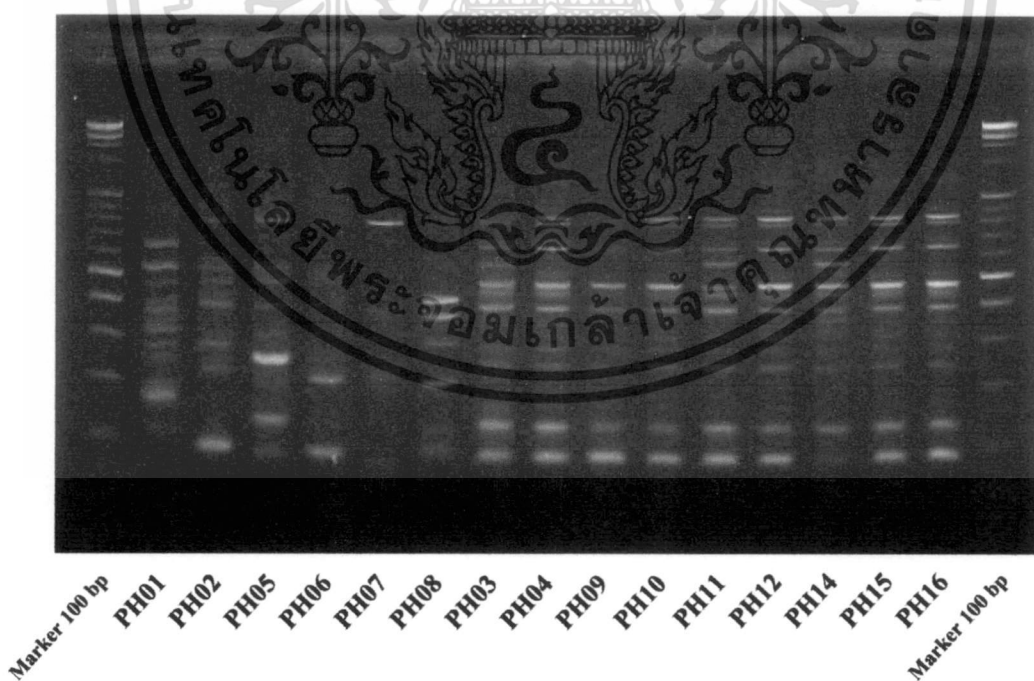
จากไพรเมอร์ทั้ง 10 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แถบทั้งหมดจำนวน 181 แถบ ซึ่งแถบที่ได้มีอยู่ในช่วง 30 - 2000 คู่เบส โดยเป็น polymorphic band 175 แถบ คิดเป็น 96.69 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับ Li และคณะ (2010) ที่ทำการศึกษาในพืชสกุล *Ziziphus* โดยใช้เทคนิค SRAP ได้ polymorphic band 98.28 เปอร์เซ็นต์ และในการศึกษาของ Amar และคณะ (2011) ที่ศึกษาพืชในสกุลส้ม (*Citrus*) ได้รับ polymorphic band 93 เปอร์เซ็นต์ โดยในการศึกษานี้แต่ละไพรเมอร์แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของตัวอย่างที่เป็นคนละชนิดกัน พร้อมกับมีไพรเมอร์ที่สามารถแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างชัดเจนของตัวอย่างพืชที่เป็นชนิดเดียวกัน เช่น ไพรเมอร์ Me3-Em3 (รูปที่ 4.7) ที่สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของดีปลากิ่ง PH11 และ PH14 กับดีปลากิ่งตัวอย่างอื่น โดยพบแถบที่แตกต่างคือ แถบที่มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 700 คู่เบส และไพรเมอร์ Me5-Em1 (รูปที่ 4.8) ที่สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของดีปลากิ่ง PH03, PH11 และ PH14 กับดีปลากิ่งตัวอย่างอื่น โดยพบแถบที่แตกต่างคือ แถบที่มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 550 คู่เบส เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการแปลผลแถบที่ได้จากเทคนิค SRAP นำมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี simple matchinig พบว่าอยู่ในช่วง 0.456 (ระหว่าง PH01 กับ PH04) ถึง 0.984 (ระหว่าง PH04 กับ PH12) ซึ่ง PH01 นั้นเป็นพืชนอกกลุ่มสกุล จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA โดยโปรแกรม NTSYSpc version 2.10m แสดงผลในรูปแบบของ dendrogram (รูปที่ 4.9) พบว่าแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 นั้นแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 1 ได้แก่ ห้อมแดง (*Phlogacanthus vitellinus* T. Anderson: PH02) และห้อมขาว (*P. paniculatus* (T. Anderson) Imlay: PH06) กลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่ ห้อมช้าง (*P. curviflorus* Nees: PH07) และห้อมใต้ลายจุด (*P. rectiflorus* Imlay: PH08) ส่วนกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ห้อมคราม (*P. pedunculatus* Imlay: PH05) และตีปลากั้ง (*P. pulcherrimus* T. Anderson) ได้แก่ ตัวอย่าง PH03, PH04, PH09, PH10, PH11, PH12, PH14, PH15 และ PH16 เมื่อสังเกตในกลุ่มของตีปลากั้งจะพบว่า PH03 แยกออกจากตีปลากั้งตัวอื่น อาจเนื่องจากลักษณะสัณฐานของใบนั้นโคนใบมีลักษณะเป็นรูปหัวใจชัดเจน ซึ่งแตกต่างจากตีปลากั้งตัวอื่นที่โคนใบมีลักษณะเป็นติ่งรูปหัวใจขนาดเล็ก ในส่วนของตีปลากั้งตัวอย่างอื่นนั้น ก็อาจมีการพัฒนาทางพันธุกรรมต่อเนื่องกันมา และเมื่อสังเกตลักษณะสัณฐานของใบก็พบว่ารูปใบมีลักษณะที่แตกต่างกันเล็กน้อย โดย PH04 กับ PH12 ซึ่งจัดอยู่ด้วยกัน และ PH10 กับ PH15 ซึ่งจัดอยู่ด้วยกันนั้น เมื่อสังเกตลักษณะสัณฐานของใบพบว่ารูปใบมีลักษณะที่ค่อนข้างคล้ายคลึงกันมาก อาจเป็นไปได้ว่าในความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตีปลากั้งนั้นมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ถ้าหากใช้การจัดกลุ่มด้วยสัณฐานวิทยาก็จะเป็นการยากกว่า เพราะเนื่องจากตีปลากั้งในบางตัวอย่างนั้นมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก แต่ต่างกันเพียงเล็กน้อยอาจทำให้ผลที่ได้นั้นผิดพลาด แต่หากเมื่อสังเกตลักษณะของตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษาซึ่งเป็นคนละชนิดกันนั้น เช่น PH08 ห้อมใต้ลายจุด กับ PH07 ห้อมช้าง ก็พบว่ามีความสัมพันธ์ของใบที่แตกต่างกันมาก ถ้าหากใช้ลักษณะสัณฐานในการจัดกลุ่มก็อาจจัดเป็นคนละกลุ่มกัน แต่ผลจากการศึกษานี้พบว่าเป็นกลุ่มเดียวกัน ดังนั้นหากใช้สัณฐานในการจัดกลุ่มอาจทำให้ผิดพลาดได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Shao และคณะ (2010) ทำการศึกษาเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยากับเครื่องหมาย ISSR และ SRAP ของเบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium*) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยากับเครื่องหมาย SRAP เท่ากับ 0.624 กล่าวคือ การจัดกลุ่มจากลักษณะทางสัณฐานวิทยากับเครื่องหมาย SRAP นั้นอาจมีความแตกต่างกัน



รูปที่ 4.7 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค SRAP จากไพรเมอร์ Me3-Em3



รูปที่ 4.8 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค SRAP จากไพรเมอร์ Me5-Em1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิค SRAP ของตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อสังเกตแหล่งของตัวอย่างดีปลากิ่งที่นำมาศึกษาเทียบกับผลที่ได้จากการศึกษา พบว่า แหล่งของตัวอย่างนั้นอาจไม่มีความสัมพันธ์กับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เนื่องจากผลการวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากตัวอย่างดีปลากิ่งที่ใช้ศึกษานั้น ไม่สามารถแยกออกเป็นกลุ่มของดีปลากิ่งตามภูมิภาคของแหล่งตัวอย่างได้อย่างชัดเจน ต่างจาก Liu และคณะ (2008) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรามี่ (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.) สายพันธุ์แท้ในประเทศจีน ด้วยเทคนิค SRAP พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนั้นมีความสัมพันธ์กับแหล่งตัวอย่างพืช อาจเป็นเพราะในการศึกษานี้ตัวอย่างดีปลากิ่งที่ใช้ศึกษายังมีจำนวนตัวอย่างที่น้อยเกินไป ทำให้ผลการศึกษาที่ได้นั้น ยังบ่งบอกไม่ชัดเจนว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับแหล่งของตัวอย่างนั้นมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ ซึ่งก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษาต่อไป เมื่อเปรียบเทียบผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พันธุกรรมในเทคนิค PCR และ SRAP พบว่า มีความแตกต่างกัน เนื่องจากในเทคนิค PCR นั้นเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากบริเวณยีน *trnL-trnF* ซึ่งเป็นบริเวณยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ บริเวณเดียวกัน ส่วนในเทคนิค SRAP นั้นเป็นการสุ่มเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่เป็นยีนจากทั้งจีโนม ดังนั้นจึงทำให้ผลที่ได้นั้นมีความแตกต่างกัน

#### 4.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS) โดยในการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบในชั้นจะได้สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล พบสารทั้งหมด 13, 28, 26 และ 22 พีค ตามลำดับ ปริมาณสารที่พบที่มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

สารสกัด	สาร
เฮกเซน (hexane)	9,12,15-Octadecatrien-1-ol (18.75%) 9-Octadecenoic acid (14.82%) Phytol (12.78%)
ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)	Benzofuranone (40.17%)
เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate)	Benzoic acid (11.80%) 2-Propenoic acid (17.92%)
บิวทานอล (butanol)	Cyclohexaneacetic acid (10.30%) Benzonitrile (16.58%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยพบสารที่ทราบโครงสร้างทั้งในชั้นเฮกเซน ส่วนใหญ่เป็นกรดไขมัน เช่น Octadecatrienoic acid หรือ กรดลิโนเลนิก (linolenic acid) เป็นกรดไขมันชนิดกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม และมีพันธะคู่ (double bond) 3 ตำแหน่ง ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9, 12 และ 15 เป็น polyunsaturated fatty acid กรดลิโนเลนิกเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย (essential fatty acid) และเป็นกรดไขมันในกลุ่มโอเมกา 3 (omega-3 fatty acid) พบมากในน้ำมันพืช เช่น น้ำมันเมล็ดแฟลก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันคาโนลาและสาหร่ายสไปรูลินา (spirulina) เป็นต้น สำหรับ benzoic acid หรือ กรดเบนโซอิก ที่พบในชั้นเอทิลอะซิเตท เป็นกรดอ่อนในอาหาร และใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) เพื่อเป็นสารกันเสีย (preservative) สามารถพบกรดเบนโซอิกปริมาณเล็กน้อยในผลไม้ตามธรรมชาติ เช่น ลูกพรุน แครนเบอร์รี่ อบเชย และกานพลู ซึ่งประสิทธิภาพของกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตนี้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ซึ่งมีผลต่อผนังเซลล์และเอนไซม์ของจุลินทรีย์ โดยเบนโซเอตจะไปทำให้กระบวนการแทรกซึมของอาหารเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ผิดปกติไป ในขณะเดียวกันจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์บางชนิดและปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้

#### 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion เบื้องต้นของสารสกัดจากชั้นเมทานอล ก่อนการนำมาสกัดแบบ partition ต่อเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่ระดับความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่หยดลงกระดาษปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมทานอลเป็น positive และ negative control ตามลำดับ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (clear zone) มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC6633 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 1000 และ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีขนาดของ clear zone เท่ากับ 29 และ 26.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเชื้อ *S. aureus* ATCC25923 ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีขนาดของ clear zone เท่ากับ 14 มิลลิเมตร แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC27853

อย่างไรก็ตามเมื่อนำสารสกัดหยาบจากชั้นเมทานอลมาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล นำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion จากสารสกัดหยาบของใบสังกรณีในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ที่มีความเข้มข้น 200, 100, 50, 25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะ คือ gentamicin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 พบว่าสารสกัดในชั้นบิวทานอลเท่านั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* และ *Staphylococcus aureus* โดยที่ความเข้มข้นของสาร

สกัด 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีขนาดของ clear zone เท่ากับ 8.81 และ 8.22 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในส่วนของสารสกัดอื่นๆทั้งในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตท ทุกระดับ ความเข้มข้นไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ มีเพียงยาปฏิชีวนะเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ส่วนสารละลายเมทานอล 99.7 เปอร์เซ็นต์ที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ เช่นกัน สอดคล้องกับ Amoo และคณะ (2009) ศึกษาสารสกัดจากส่วนต่างๆของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 3 สปีชีส์ คือ *B. prionitis*, *B. greenii* และ *B. albostellata* พบว่ามีความสามารถในการเป็นยับยั้งแบคทีเรียโดยมีค่า minimum inhibitory concentrations (MIC) ระหว่าง 0.059-6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

##### 4.5.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ mitomycin C ต่อเซลล์ไลน์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ที่ดัดแปลงวิธีการมาจาก Mosmarin (1983) และของ Hussain และคณะ (1993) ซึ่งเป็นการทดสอบการทำงานของเซลล์จากความสามารถในการทำงานของไมโทคอนเดรียในการรีดิวซ์สาร 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) โดยเซลล์ที่มีชีวิต และมีการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติ เอนไซม์ dehydrogenase และ cofactor ในไมโทคอนเดรียจะรีดิวซ์ MTT ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ formazan ได้ ดังนั้นเมื่อนำสารละลาย MTT ไปบ่มในเซลล์ที่ต้องการทดสอบ เซลล์ที่มีการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติจะรีดิวซ์ MTT ให้เป็น formazan ที่มีสีม่วง โดยเซลล์ที่ตายนั้นจะมีลักษณะใส ไม่มีสี ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะติดสีม่วง ซึ่งเมื่อนำมาละลายในตัวทำละลายจะได้สารละลายสีม่วง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ ซึ่งนิยมรายงานเป็นระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งเซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC<sub>50</sub>)

ในการทดลองนี้จะทำการศึกษากับเซลล์ 8 ชนิด แบ่งเป็นเซลล์ชนิดแวนลอย 1 ชนิด คือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 (murine lymphocytic leukemic cell line) และเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว 7 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF7 (human breast cancer cell line) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT29 (human colon adenocarcinoma cell line) เซลล์ไตลิงชนิด Vero cell (African green monkey kidney cell line) เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 (human hepatoma cell line) เซลล์มะเร็งช่องปากของมนุษย์ชนิด KB (human mouth epidermal adenocarcinoma cell line) เซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ชนิด HeLa (human cervical adenocarcinoma epithelial cell line) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 (mouse fibroblast cell line) นำมาทดสอบกับสารสกัดยาที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ก่อนการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดยา ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารละลาย mitomycinC (MMC) ต่อเซลล์ไลน์ 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF7 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT29 และเซลล์ไตลิงชนิด Vero cell เพื่อนำไปใช้เป็น positive control ในความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ชนิด P388, MCF7, HT29 และ Vero cell ที่ทำการทดสอบด้วยสารละลาย mitomycinC ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 200, 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาตรวจสอบหาค่าระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารละลาย mitomycinC ในระดับความเข้มข้นต่างๆ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด ทำให้มีอัตราการมีชีวิตรอดลดลงแตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเป็นพิษต่อเซลล์ P388 ซึ่งเป็นเซลล์ประเภท lymphocyte มากที่สุด โดยเซลล์ไลน์ชนิด P388, MCF7, HT29 และ Vero cell มีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ 51.20, 118.97, 61.65 และ 78.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ในตารางที่ 4.6 ซึ่งเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมีผลทำให้อัตราการมีชีวิตรอดลดลง ดังแสดงในกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย mitomycinC กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด ในรูปที่ 4.10 mitomycin C เป็นยาปฏิชีวนะที่ได้มาจากเชื้อ *Streptomyces caespitosus* มีส่วนที่เป็น active alkylating moiety หรือ alkyl group ที่มีคุณสมบัติในการเข้าไปจับกับส่วน sulfur, nitrogen, oxygen หรือ phosphorus ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสายดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) และการสังเคราะห์โปรตีน โดยไม่จำเพาะต่อระยะใดในวัฏจักรของเซลล์ (cell-cycle non-specific) ทำให้ไม่สามารถแบ่งเซลล์และตายไปในที่สุด (Sadeghi และคณะ, 1998) mitomycinC จึงนำมาใช้เป็นยารักษาเนื้องอก และมะเร็ง นอกจากนี้ mitomycinC ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านรูปร่างและลักษณะของเซลล์ โดยจะไปยับยั้งกระบวนการในสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA synthesis) ในวัฏจักรของเซลล์ และเมื่อใช้ mitomycinC ที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ กับเซลล์ชนิด Chang's cells (human conjunctival cell line) บ่มเป็นเวลา 2 และ 4 นาที ไม่ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากปกติ (Murayama และคณะ, 1996)

Sadeghi และคณะ (1998) ได้ทดสอบความเป็นพิษของ mitomycinC ที่มีต่อเซลล์ Keratocyte ของมนุษย์ โดยใช้ความเข้มข้นของ mitomycin C เท่ากับ 0.05, 0.5, 5 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรบ่มร่วมกับเซลล์เป็นเวลา 5 นาที และ 1 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดพบว่า mitomycinC สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ได้ เมื่อใช้ mitomycinC ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที โดยความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (inhibitory dose;  $ID_{50}$ ) เท่ากับ 38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะมีค่า  $ID_{50}$  เท่ากับ 4.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ mitomycinC ไม่ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้เท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการบ่มด้วย สอดคล้องกับ Park และคณะ (2002) ที่ได้รายงานว่า mitomycinC สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ alpha-TN4 mouse lens epithelial cells (LECs) ซึ่งฤทธิ์ของยาที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณและเวลาที่ได้รับ อย่างไรก็ตาม mitomycin C มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero ซึ่งเป็นเซลล์ปกติอีกด้วย ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารละลาย mitomycinC ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) ในขั้นตอนต่อไป

ในการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้นี้ได้ทำการทดสอบสารละลาย mitomycinC กับเซลล์ชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 160, 80, 40, 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์

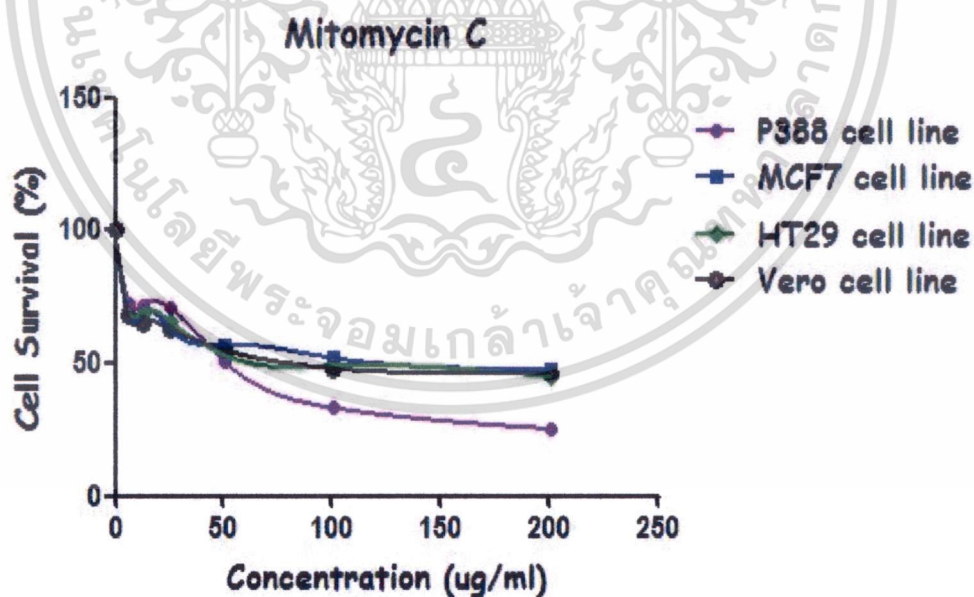
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(CC<sub>50</sub>) ในเซลล์ชนิด P388, MCF7, HT29 และ Vero cell เท่ากับ 49.77, 52.49, 99.34 และ 88.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ยกเว้นต่อเซลล์ MCF7 รวมทั้งสารละลาย beauvericin ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า mitomycinC เนื่องจากใช้ความเข้มข้นที่น้อยกว่า โดยเซลล์ชนิด P388, MCF7, HT29 และ Vero cell มีค่า CC<sub>50</sub> เท่ากับ 2.25, 13.40, 15.05 และ 10.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC<sub>50</sub>) ของสารละลาย mitomycinC (MMC) ที่มีต่อเซลล์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay

Treatment	Cell Line Types	50% cytotoxic concentration: CC <sub>50</sub> (µg/ml)
mitomycinC (MMC)	P388	51.20
	MCF7	118.97
	HT29	61.65
	Vero Cell	78.62

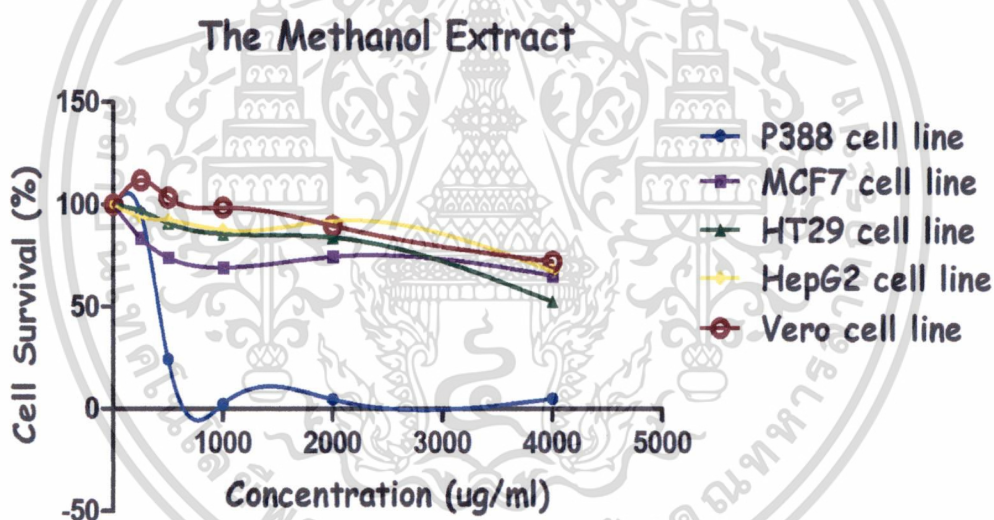


รูปที่ 4.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ mitomycinC (MMC) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ 4 ชนิด คือ P388, HT29, MCF7 และ Vero cell ที่บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ไลน์

ในการศึกษาเบื้องต้นจากสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอลต่อเซลล์ไลน์ 5 ชนิด (P388, HT29, HepG2, MCF7 และ Vero) ด้วยวิธี MTT พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 250, 500, 1000, 2000 และ 4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มสารร่วมเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดหยาบจากใบสังกรณีมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนูมากที่สุด โดยมีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ 413.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่แสดงความเป็นพิษในระดับต่ำต่อเซลล์ HT29, HepG2, MCF7 และ Vero จาก  $CC_{50} > 4000$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแสดงสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีในชั้นเมทานอลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 5 ชนิดในรูปที่ 4.11 ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองจากต้นสังกรณี แต่ Suba *et al.* (2004) ที่ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ *B. lupulina* ต่อการลดน้ำตาลในหนู โดยให้หนูกินสารสกัดหยาบ และฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้หนูตายครึ่งหนึ่ง ( $LD_{50}$ ) เท่ากับ 4.5 และ 3.7 กรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ



รูปที่ 4.11 แสดงค่า  $CC_{50}$  ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีในชั้นเมทานอลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 5 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากตัวทำละลายในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ของใบสังกรณีมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 8 ชนิด แบ่งเป็นเซลล์มะเร็ง คือ P388, MCF7, HT29, KB, HeLa และ HepG2 และเซลล์ปกติ คือ Vero cell และ L929 ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ และค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ดังนั้นหาก  $CC_{50} > 1000$  ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร นับว่ามีค่าความเป็นพิษต่ำ พบว่าสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเฮกเซนจากใบสังกรณี ไม่แสดงความเป็นพิษในทุกๆเซลล์ สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมีผลเฉพาะเซลล์ไลน์ชนิด P388 และ L929 เท่านั้น สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท มีผลเฉพาะเซลล์ไลน์ชนิด P388, L929 และ HeLa เท่านั้น แต่สารสกัดหยาบในตัวทำละลายบิวทานอลจากใบสังกรณี แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด P388, MCF7, KB และ HeLa และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT29, HepG2, Vero และ L929 โดยค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ของสารสกัดหยาบในทุกตัวทำละลาย แสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ( $CC_{50}$ ) ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีจากตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอลต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay

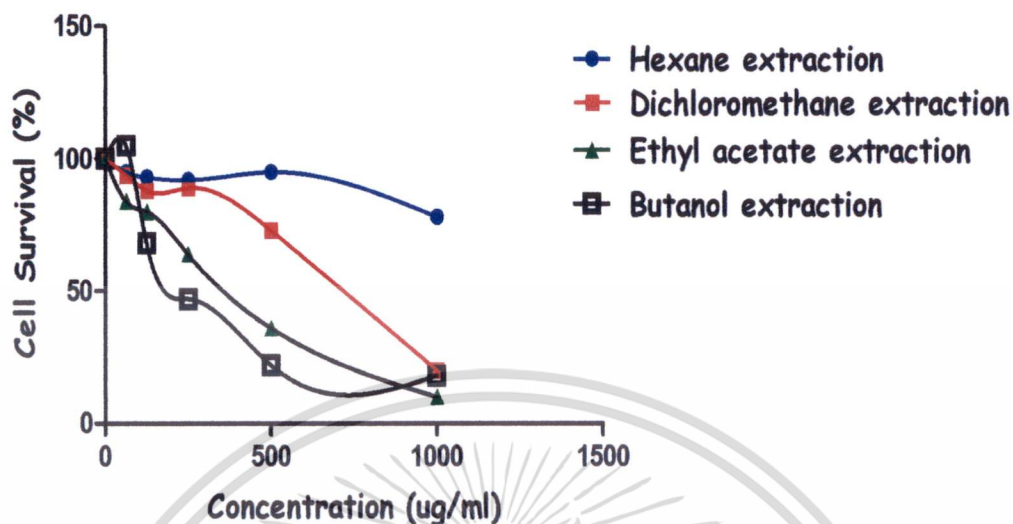
Cell Types	50% Cytotoxic Concentration: $CC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Hexane	Dichloromethane	Ethyl acetate	Butanol
P388	>MCT	719.38	354.94	177.74
MCF7	>MCT	>MCT	>MCT	456.66
HT29	>MCT	>MCT	>MCT	>MCT
KB	>MCT	>MCT	>MCT	238.73
HepG2	>MCT	>MCT	>MCT	>MCT
Vero	>MCT	>MCT	>MCT	>MCT
HeLa	>MCT	>MCT	790.99	946.98
L929	>MCT	776.73	970.09	>MCT

MCT=maximal concentration tested ( $\geq 1000 \mu\text{g/ml}$ )

สารสกัดจากใบสังกรณีทั้งสารสกัดหยาบในชั้นไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด P388 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration:  $CC_{50}$ ) เท่ากับ 719.38, 354.94 และ 177.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในทั้ง 4 ตัวทำละลาย กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ชนิด P388 ในรูปที่ 4.12

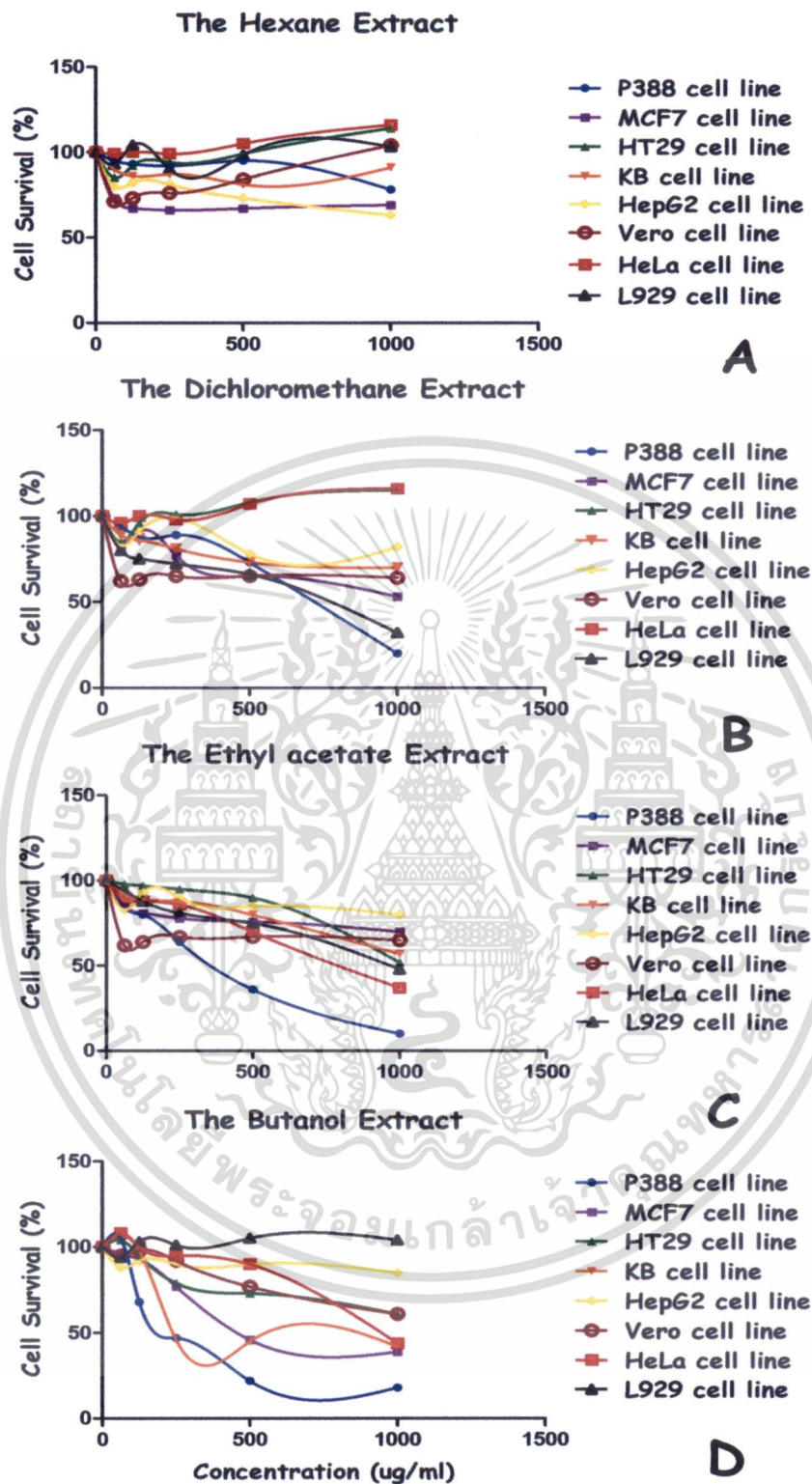
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### P 388 Cell Line



รูปที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล จากใบสังกรณีต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ชนิด P388

สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายบิวทานอลของใบสังกรณีแสดงความเป็นพิษมากที่สุด โดยสารสกัดหยาบในชั้นบิวทานอลแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดต่างๆมากที่สุด โดยมีผลต่อเซลล์ชนิด P388, MCF7, KB และ HeLa โดยมีระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 177.74, 456.66, 238.73 และ 946.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเซลล์ที่ไม่แสดงความเป็นพิษในทุกสารสกัด คือ HT29, HepG2 และ Vero ที่ค่าความเข้มข้นสูงสุดในการศึกษา โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิดต่างๆ ดังรูปที่ 4.13 A-D โดยยังไม่มีรายงานการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีต่อเซลล์ในหลอดทดลอง มีเพียงการศึกษาของสารสกัดจากรากและใบของอังกาบหนู ที่เป็นพิษในสกุลเดียวกัน โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อ albino rats (Dheer และ Bhatnagar, 2010) โดยไม่ก่อให้เกิดหนูตายเมื่อให้หนูกินสารสกัดในความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 14 วัน รวมทั้งการศึกษาของ Singh และคณะ (2005) ที่ศึกษา iridoid glucosides ที่พบมากในสารสกัดจากอังกาบหนูที่สกัดด้วยน้ำ ไม่สามารถทำให้เกิดความผิดปกติในหนูที่ได้รับสารสกัดทางปากที่ระดับความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 15 วัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อฉีดสารสกัดด้วยน้ำเข้าทางช่องท้องหนู พบค่าที่ทำให้หนูตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 2530 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม



รูปที่ 4.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย (A) เฮกเซน (B) ไดคลอโรมีเทน (C) เอทิลอะซิเตท และ (D) บิวทานอล จากใบสังกรณีต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิด P388, MCF7, HT29, KB, HepG2, HeLa, L929 และ Vero cell

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์ Acanthaceae ที่ใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ จำนวน 70 ตัวอย่าง โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย การศึกษาแบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ 1. การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ Acanthaceae ในประเทศไทยด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน trnL-trnF บนคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ และ 2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลห้อมช้าง (*Phlogacanthus* Nees) ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน trnL-trnF บนคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ร่วมกับเทคนิค sequence-related amplified polymorphism (SRAP) จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) โดยการนำไปแช่ใน CTAB 2 เปอร์เซ็นต์ ซ้ำมึน หรือจนกว่าสารละลายมีสีน้ำตาลเข้มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจางก่อนการสกัดดีเอ็นเอ ทำให้ได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอเหมาะแก่การทดลอง เมื่อศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ Acanthaceae จำนวน 55 ตัวอย่าง โดยนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถจำแนกความหลากหลายของพืชได้ในระดับสกุล โดยสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ 2 วงศ์ย่อย คือ วงศ์ย่อย Acanthoideae จำนวน 52 ตัวอย่าง และวงศ์ย่อย Thunbergioideae คือพืชสกุล *Thunbergia* จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae สามารถแบ่งออกเป็น 2 เผ่า คือ เผ่า Acantheae ที่มีเฉพาะสกุล *Acanthus* จำนวน 5 ตัวอย่าง และเผ่า Ruellieae ที่จำแนกเป็น 4 เผ่าย่อย คือ เผ่าย่อยต้อยตึง (*Ruellinae*) เผ่าย่อยชาไก่ (*Justiciinae*) เผ่าย่อยอังกาบ (*Barleriinae*) และเผ่าย่อยฟ้าทะลายโจร (*Andrographinae*) ซึ่งมีจำนวน 14 สกุล ได้แก่ สกุล *Graptophyllum* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Pseuderanthemum* จำนวน 6 ตัวอย่าง, *Asystasia* จำนวน 4 ตัวอย่าง, *Clinacanthus* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Gymnostachyum* จำนวน 2 ตัวอย่าง, *Rhinacanthus* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Justicia* จำนวน 4 ตัวอย่าง, *Hygrophila* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Ruellia* จำนวน 6 ตัวอย่าง, *Andrographis* จำนวน 2 ตัวอย่าง, *Peristrophe* จำนวน 2 ตัวอย่าง, *Phlogacanthus* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Lepidagathis* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Barleria* จำนวน 15 ตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตามक्रमการศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น และหลายตำแหน่งหรือหลายเทคนิค เพื่อให้ข้อมูลความหลากหลายมากขึ้น

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลห้อมช้าง จากตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 15 ตัวอย่าง ได้แก่ ห้อมแดง (*Phlogacanthus vitellinus*) ห้อมขาว (*P. paniculatus*) ห้อมช้าง (*P. curvijlorus*) ห้อมใต้ลายจุด (*P. rectiflorus*) ห้อมคราม (*P. pedunculatus*) และตีปลากั้ง (*P. pulcherrimus*) และพืชนอกกลุ่ม คือ หว่าชะอำ (*Peristrophe lanceolaria*) วิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ของห้อมใต้ (*P. thyrsiflorus*) ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกัน ในตำแหน่งยีน *trnL-trnF* ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ สามารถแยกตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษาแต่ละตัวอย่างออกจากกันได้ เมื่อนำมาศึกษาด้วยเทคนิค SRAP โดยทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้จำนวน 10 คู่ จากทั้งหมด 30 คู่ ได้แถบทั้งหมดจำนวน 181 แถบ มีขนาดขึ้นดีเอ็นเออยู่ในช่วง 30 - 2000 คู่เบส โดยเป็น polymorphic band 175 แถบ คิดเป็น 96.69 เปอร์เซ็นต์ ทำการแปลผลแถบดีเอ็นเอแล้วนำมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี simple matching พบว่าอยู่ในช่วง 0.456 ถึง 0.984

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการสกัดสารจากใบสังกรณีนี้ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด จากนั้นนำมาแยกส่วนโดยใช้เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS) โดยพบสารที่ทราบโครงสร้างทั้งในชั้นเฮกเซน ส่วนใหญ่เป็นกรดไขมัน เช่น Octadecatrienoic acid หรือ กรดลิโนเลนิก (linolenic acid) ในชั้นไดคลอโรมีเทน พบ Benzofuranone ในชั้นเอทิลอะซิเตท พบ Benzoic acid และ 2-Propenoic acid (17.92%) และในชั้นบิวทานอล พบ Cyclohexaneacetic acid และ Benzonitrile

ในการทดลองเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี โดยเมื่อนำสารสกัดหยาบทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion จากสารสกัดหยาบของใบสังกรณีในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ที่มีความเข้มข้น 200, 100, 50, 25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ในระดับต่ำ โดยสารสกัดในชั้นบิวทานอลที่ความเข้มข้นของสารสกัด 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่านั้น แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *M. luteus* และ *S. aureus* โดยมีขนาดของ clear zone เท่ากับ 8.81 และ 8.22 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ต่อเซลล์ไลน์ 8 ชนิด แบ่งเป็นเซลล์ชนิดแขวนลอย 1 ชนิด คือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 (murine lymphocytic leukemic cell line) และเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว 7 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF7 (human breast cancer cell line) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT29 (human colon adenocarcinoma cell line) เซลล์ไตลิงชนิด Vero cell (African green monkey kidney cell line) เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 (human hepatoma cell line) เซลล์มะเร็งช่องปากของมนุษย์ชนิด KB (human mouth epidermal adenocarcinoma cell line) เซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ชนิด HeLa (human cervical adenocarcinoma epithelial cell line) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 (mouse fibroblast cell line) นำมาทดสอบกับสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนไม่แสดงความเป็นพิษในทุกๆเซลล์ สารสกัดหยาบในชั้นไดคลอโรมีเทนมีผลเฉพาะเซลล์ไลน์ชนิด P388 และ L929 เท่านั้น สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท มีผลเฉพาะเซลล์ไลน์ชนิด P388, L929 และ HeLa เท่านั้น แต่สารสกัดหยาบในตัวทำละลายบิวทานอลจากใบสังกรณี แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด P388, MCF7, KB และ HeLa และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT29, HepG2, Vero และ L929 แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดจากใบสังกรณีทั้งสารสกัดหยาบในชั้นไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด P388 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC50) เท่ากับ 719.38, 354.94 และ 177.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีในชั้นบิวทานอลอาจมีสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงควรมีการศึกษาองค์ประกอบของสารบริสุทธิ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- ก่องกานดา ชยามฤต. 2550. พรรณไม้ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์. กรุงเทพฯ: สำนักอุทยานแห่งชาติ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช. หน้า 144.
- ชูศรี ไตรสนธิ และปริทรรศน์ ไตรสนธิ. 2554. พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวละแวกและชาวถิ่นบนดอยภูคา จังหวัดน่าน. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย. 3(2): 163 - 185.
- ธวัชชัย สันติสุข. 2549. ป่าของประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช. หน้า 36.
- ฤทธิ์ วัฒนชัยเจริญยิ่ง. 2553. การวิเคราะห์ความหลากหลายของพืชโดยวิธีอณูชีววิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 220 หน้า.
- วิชญ์ ธรรมลิขิตกุล สุรภี พฤกษชาติวุฒิ. 2533. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร. สารศิริราช. 42: 431-434.
- วินัย สมประสงค์, ปราโมทย์ ไตรบุญ, ยุพดี เผ่าพันธุ์, นพรัตน์ ทูลมัลย์ และภัทรวีร์ พรหมนัส. 2554. ความหลากหลายและการใช้ประโยชน์พืชสกุลหอมช้าง (*Phlogacanthus* Nees) ในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 42(2)(พิเศษ): 656 - 658.
- วินัย สมประสงค์, จารุวรรณ จาติเสถียร, พงษ์ศักดิ์ พลตรี, กาญจนา พฤษพันธ์, วิลาสินี จิตต์บรรจง, บดินทร สอนสุภาพ, ปาจริย์ อินทะซุบ, ภัทรวีร์ พรหมนัส และชัยนาท ชุ่มเงิน. 2555. การศึกษาอนุกรมวิธานและการใช้ประโยชน์ของพืชวงศ์เหงือกปลาหมอในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. [Online]. Available: [http://www.doa.go.th/research/files/2270\\_2555.pdf](http://www.doa.go.th/research/files/2270_2555.pdf) (5 พฤศจิกายน 2556)
- เต็ม สมิตินันท์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2 ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. กรุงเทพฯ: ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. หน้า 407.
- นันทวัน บุญยะประภัศร และ อรุณช โชคชัยเจริญพร. 2543a. สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน (4). บริษัท ประชาชน จำกัด, 740 น.
- นันทวัน บุญยะประภัศร และ อรุณช โชคชัยเจริญพร. 2543b. สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน (5). บริษัท ประชาชน จำกัด, 508 น.
- สมศักดิ์ คงพริ้ว. 2552. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสมุนไพรวงศ์ต้อยติ่งโดยวิธี สัณฐานวิทยา ไอโซไซม์ และเซลล์พันธุศาสตร์. วิทยานิพนธ์หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Ajaya, K.R., Sridevi, K., Vijaya, K.N., Nanduri, S. and Rajagopal, S. 2004. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. Journal of Ethnopharmacology. 92: 291-295.
- Akbarsha, M.A. and Murugaiyan, P. 2000. Aspects of the male reproductive toxicity/male antifertility property of andrographolide in albino rats: effect on the testis and the cauda epididymidal spermatozoa. Phytotherapy Research. 14: 432-435.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Akujabi, C., Anyanwu, B.N., Onyeze, C. and Ibekwe, V.I. 2004. Antibacterial activities and preliminary phytochemical screening of four medicinal plants. *Journal of applied Sciences*. 7: 4328-4338.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 215: 403-410.
- Amoo, S.O., Finnie, J.F. and Van Staden, J. 2009. In vitro pharmacological evaluation of three *Barleria* species. *Journal of Ethnopharmacology*. 121: 274-277.
- Amoo, S.O., Ndhlala, A.R., Finnie, J.F. and Van Staden, J. 2011. Antifungal, acetylcholinesterase inhibition, antioxidant and phytochemical properties of three *Barleria* species. *The South African Journal of Botany*. 77: 435-445.
- Anderson, T. 1867. An enumeration of the Indian species of Acanthaceae. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*. 9(39): 425-454.
- Aneja, K.R., Joshi, R. and Sharma, C. 2010. Potency of *Barleria prionitis* L. bark extracts against oral diseases causing strains of bacteria and fungi of clinical origin. *New York Science Journal*. 3: 5-12.
- Aromdee, C., Khunkitti, W., Chitropas, P. and Boonsang, I. 2003. Autography evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Acanthaceae family. *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 27(suppl): 61.
- Ata, A., Kalhari, K.S. and Samarasekera, R. 2009. Chemical constituents of *Barleria prionitis* and their enzyme inhibitory and free radical scavenging activities. *Phytochemistry Letters*. 2: 37-40.
- Balkwill, M.J. and Balkwill, K. 1997. Delimitation and infrageneric classification of *Barleria* (Acanthaceae). *Kew Bulletin*. 52: 535-573.
- Balkwill, M.J. and Balkwill, K. 1998. A preliminary analysis of distribution patterns in a large, pantropical genus, *Barleria* (Acanthaceae). *Journal of Biogeography*. 25: 95-110.
- Banerjee, D., Maji, A.K., Mahapatra, S. and Banerji, P. 2012. *Barleria prionitis* Linn.: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicity. *Research Journal of Phytochemistry*. 6: 31-41.
- Benoist, R. 1912. Acanthaceae. In pp.610-771. Lecmte, H. and H. Humbert (eds.). *Fl. Gen. L'Indo-Chine. Tome Quatrieme*. Masson et Cie, Editeurs, Paris.
- Bentham, G. and Hooker J.D. 1965. *Généra Plantarum. Vol.2*. Weinheim Verag Von J. Cramer. Germany.
- Bhattacharyya, B. and Johri B.M. 1998. Flowering plants: taxonomy and phylogeny. Narosa Publishing House, New Delhi. 753 p.
- Bremekamp, C.E.B. 1961. Scrophulariaceae, Nelsonieae, Thunbergiaceae; Acanthaceae. In Gram, K., Larsen, C.S. and Sørensen, Th. (Eds.). *Dansk botanisk arkiv. Vol. 20: Studies in the flora of Thailand*. pp. 76 - 77.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bremekamp C.E.B. 1995. Delimitation and subdivision of the Acanthaceae. Bulletin of the Botanical Survey of India. 7: 21-30.
- Burgos, R.A., Aguila, M.J., Santiesteban, E.T., Sanchez, N.S., Hancke, J.L. 2001. *Andrographis paniculata* (Nees) induces relaxation of uterus by blocking voltage operated calcium channels and inhibits Ca<sup>2+</sup> influx. Phytotherapy Research. 15: 235-239.
- Chetan, C., Suraj, M., Maheshwari, C., Rahul, A. and Priyanka, P. 2011. Screening of antioxidant activity and phenolic content of whole plant of *Barleria prionitis* Linn. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 2: 1313-1319.
- Clarke, C.B. 1885. Acanthaceae. In Hooker, J.D. (Ed.). The Flora of British India. Vol. 4. pp. 510 - 513.
- Craib, W.G. 1912. Contributions to the flora of Siam: Dicotyledones. Aberdeen: University of Aberdeen. pp. 158 - 159.
- Craib, W. G. 1918. Contribution to the Flora of Siam. Kew Bulletin. 19: 367.
- Cramer, L.H. 1998. Acanthaceae. In pp.1-139. Dassanayake, M.D. (ed.). A Revised Handbook to the Flora of Ceylon Vol. XII. A.A. Balkema, Rotterdam. Netherlands.
- Darbyshire, I. 2008a. A reassessment of the status of *Barleria* sect. *Cavirostrata* (Acanthaceae) in tropical Africa, with a new species, *B. richardsiae*, described from the Tanzania–Zambia border region. Kew Bulletin. 63: 601-611.
- Darbyshire, I. 2008b. New species in *Barleria* sect. *Stellatohirta* (Acanthaceae) from Africa. Kew Bulletin. 63: 261-268.
- Darbyshire, I. 2009. The *Barleria fulvostellata* (Acanthaceae) complex in east Africa. Kew Bulletin. 64: 673-679.
- Darumas, P., Khunwasi, C. and Seelanan, T. 2007. Diversity of vascular plants in spring water swamp areas of Thong Pha Phum district, Kanchanaburi province, Thailand. BRT Research Reports 2007: Western Thong Pha Phum. pp. 128 - 145.
- Dheer, R. and P. Bhatnagar, 2010. A study of the antidiabetic activity of *Barleria prionitis* Linn. Indian Journal of Pharmacology. 42: 70-73.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 19: 11-15.
- Elliott, S. 1994. The effects of urbanization on Doi Suthep-Pui national park. Proceedings of the international symposium on urbanization and forests, 14 - 15 December 1994, Chiang Mai University. pp. 76 - 86.

- Eriksen, M., Larpkern, P., Dhillon, S.S. and Ampornpan, L. 2004. Mycorrhizal herbaceous plants in the land use types of an agro-forest landscape in Northeastern Thailand. [Online]. Available: <http://www.aseanbiodiversity.info/Abstract/53005960.pdf> (14 พฤศจิกายน 2556)
- Feng, F., Chen, M., Zhang, D., Sui, X. and Han, S. 2009. Application of SRAP in the genetic diversity of *Pinus koreaiensis* of different provenances. *African Journal of Biotechnology*. (8)6: 1000 - 1008.
- Gabrielian, E.S., Shukarian, A.K., Goukasova, G.I., Chandanian, G.L., Panossian, A.G., Wikman, G. and Wagner, H. 2002. A double blind, placebo-controlled study of *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jang in the treatment of acute upper respiratory tract infections including sinusitis. *Phytomedicine*. 9: 589-597.
- Gupta, R.S., Pramod, K., Dixit, V.P., Dobhal, M.P., 2000. Antifertility studies of the root extract of the *Barleria prionitis* Linn in male albino rats with special reference to testicular cell population dynamics. *Journal of Ethnopharmacology*. 70: 111-117.
- Hansen, B. 1985. Studies on the Acanthaceae of Thailand. *Fl. Malesiana* 38: 173-178.
- Hansen, B. 1989. Note on SE Acanthaceae 1. *Nordic Journal of Botany*. 9: 209-215.
- Hansen, B. 1995. Notes on SE Asian Acanthaceae 2. *Nordic Journal of Botany*. 15: 583-585.
- Hussain, R.F., Nouri, A.M. and Oliver, R.T. 1993. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *Journal Immunol method*. 160: 89-96.
- Li, G. and Quiros, C.F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*. 103: 455 - 461.
- Liao, L., Guo, Q., Wang, Z., Liu, L. and Zhu, Z. 2012. Genetic diversity analysis of *Prunella vulgaris* in China using ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 45: 209 - 217.
- Imlay, J.B. 1939. Contributions to the flora of Siam. *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Botanic Gardens, Kew)*. 3:109 - 150.
- Jiaqi, H., Yunfei, D. and Daniel, T.F. 2011. Acanthaceae (*Phlogacanthus*). In Zhengyi, W., Raven, P.H. and Deyuan, H. (Eds.). *Flora of China*. Vol. 19. pp. 474 - 475.
- Kanchanapoom, T., Kasai, R. and Yamasaki, K. 2001. Iridoid glucosides from *Barleria lupulina*. *Phytochemistry*, 58: 337-341.
- Kanchanapoom, T., Nolarsa, P., Ruchirawat, S., Kasai, R. and Otsuka, H. 2004. Phenylethanoid and iridoid glycosides from the Thai medicinal plant, *Barleria strigosa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 52: 612-614.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kosmulalage, K.S., Zahid, S., Udenigwe, C.C., Akhtar, S., Ata, A. and Samarasekera, R. 2007. Glutathione S-transferase, acetylcholinesterase inhibitory and antibacterial activities of chemical constituents of *Barleria prionitis*. *Z. Naturforsch.*, 62; 580-586.
- Knees, S.G., Laser, S., Miller, A.G. and Patzelt, A. 2007. A new species of *Barleria* (Acanthaceae) from Oman. *Edinburgh Journal of Botany*. 64: 107-112.
- Maxwell, J.F. 2008. Addendum to vegetation of Doi Tung, Chiang Rai province, Northern Thailand. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 2(1): 37 - 139.
- Meeboon, J. 2006. Taxonomy of *Cercospora* fungi and allied genera found in Northern Thailand. Thesis submitted for the degree of Master of Science in Plant Pathology. The Graduate School, Chiang Mai University. p. 106.
- Makholela, T., Van der Bank, H. and Balkwill, K. 2003. A preliminary study of allozyme variation in three rare and restricted endemic *Barleria greenii* (Acanthaceae) populations. *Biochemical Systematics and Ecology*. 31: 141-154.
- Malombe, I. and Darbyshire, I. 2010. *Barleria compacta*: a new species in *Barleria* sect. *Prionitis* (Acanthaceae) from Somalia. *Kew Bulletin* 65: 443-447.
- Mcdade, L.A. and Moody, M.L. 1999. Phylogenetic relationships among Acanthaceae: evidence from noncoding *TrnL-TrnF* chloroplast DNA sequences. *American Journal of Botany*. 86: 70-80.
- Mcdade, L.A., Daniel, T.F., Kiel, C.A. and Vollesen, K. 2005. Phylogenetic relationships among Acanthaceae (Acanthaceae): major lineages present contrasting patterns of molecular evolution and morphological differentiation. *Systematic Botany*. 30: 834-862.
- Meister, J., Hubaishan, M.A., Kilian, N. and Oberprieler, C. 2005. Chloroplast DNA variation in the shrub *Justicia areysiana* (Acanthaceae) endemic to the monsoon affected coastal mountains of the southern Arabian Peninsula. *Plant Systematics and Evolution*. 262: 153-171.
- Meyer, J.Y. and Lavergne, C. 2004. Beasts fatales: Acanthaceae species as invasive alien plants on tropical Indo-Pacific Islands. *Diversity and Distributions*. 10: 333-347.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 1017-1023.
- Ningombam, D.S. 2012. Systematic study of the plant species under acanthaceae family in the valley districts of Manipur. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy in Life sciences. Department of Life sciences, School of Life sciences, Manipur University, Manipur, India. 199 p.

- Olmstead, R.G., Bremer, B., Scott, K.M. and Palmer, J.D. 1993. A parsimony analysis of the Asteridae sensu lato based on rbcL sequence. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 80: 700-722.
- Panichayupakaranant, P. and Kongchai, N. 2003. Antifungal activities of rhinacanthins and *Rhinacanthus nasutus* extract. *Proceeding of the third Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences*, May 20-23, 2003. Bangkok, Thailand.
- Ridley, H.N. 1923. *The Flora of the Malay Peninsula Vol. II Gamopetalae*. L. Reeve and Co., London.
- Salib, J.Y., Shafik, N.H., Michael, H.N. and Eskander, E.F. 2013. Antibacterial activity of *Barleria cristata* bark extracts. *Journal of Applied Sciences Research*. 9: 2156-2159.
- Samuel, A.J.S.J., Kalusalingam, A., Chellappan, D.K., Gopinath, R., Radhamani, S., Husain, H.A., Muruganandham, V. and Promwichit, P. 2010. Ethnomedical survey of plants used by the Orang Asli in Kampung Bawong, Perak, West Malaysia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 6: 1-6.
- Scotland, R.W., Sweere, J.A. and Olmstead, R.G. 1995. Higher-level systematics of Acanthaceae determined by chloroplast DNA sequences. *American Journal of Botany*. 82: 266-275.
- Scotland, R.W. and Vollesen, K. 2000. Classification of Acanthaceae. *Kew Bull.* 55: 513-589.
- Shukla, P., Singh, A., Crawri, S., Alexande, A. and Sonwane, S. 2011. In vitro Propagation of *Barleria prionitis* Linn and its antibacterial activity. *International Journal of Pharma Professional's Research*. 2: 198-200.
- Singh, B., Bani, S., Gupta, D.K., Chandan, B.K., Kaul, A. 2003. Anti-inflammatory activity of 'TAF' an active fraction from the plant *Barleria prionitis* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*. 85: 187-193.
- Singh, B., Chandan, B.K., Prabhakar, A., Taneja, S.C., Sing, J., Qazi, G.N. 2005. Chemistry of Hepatoprotective activity of an active fraction from *Barleria prionitis* Linn in experimental animals. *Phytotherapy Research*. 19: 391-404.
- Spasov, A.A., Ostrovskij, O.V., Chernikov, M.V. and Wikman, G. 2004. Comparative controlled study of *Andrographis paniculata* fixed combination, Kan Jang and Echinaceapreparation as adjuvant, in the treatment of uncomplicated respiratory disease in children. *Phytother Res.* 18: 47-53.
- Srisanga, P. 2005. Biodiversity of Vascular Plants on Doi Phu Kha National Park. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy in Biology. The Graduate School, Chiang Mai University. p. 83.

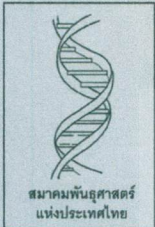
- Suba, V., Murugesan, T., Arunachalam, G., Mandal, S.C. and Saha, B.P. 2004a. Anti-diabetic potential of *Barleria lupulina* extract in rats. *Phytomedicine*. 11: 202-205.
- Suba, V., Murugesan, T., Bhaskara Rao, R., Ghosh, L., Pal, M., Mandal, S.C. and Saha, B.P. 2004b. Antidiabetic potential of *Barleria lupulina* extract in rats. *Fitoterapia*. 75: 1-4.
- Suba, V., Murugesan, T., Kumaravelrajan, R., Mandal, S.C. and Saha, B.P. 2005. Antiinflammatory, analgesic and antiperoxidative efficacy of *Barleria lupulina* Lindl. extract. *Phytotherapy Research*. 19: 695-699.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. and Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17: 1105-1109.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tuntiwachwuttikul, P., Pandiaroen, O. and Taylor W.C. 1998. Iridoid glucosides of *Barleria lupulina*. *Phytochemistry*. 49: 163-166.
- Verma, P.K., Sharma, A., Joshi, S.C., Gupta, R.S. and Dixit, V.P. 2005. Effect of isolated fractions of *Barleria prionitis* root methanolic extract on reproductive function of male rats: preliminary study. *Fitoterapia*. 76: 428-432.
- Wu, T.S., Hsu, H.C., Wu, P.L., Teng, C.H. and Wu, Y.C. 1998. Rhinacanthin-Q, a naphthoquinone from *Rhinacanthus nasutus* and its biological activity. *Phytochemistry*. 49: 2001-2003.
- Yoosook, C., Bunyaphatsara, N., Boonyakiat, Y. and Kantasuk, C. 2000. Anti-Herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants. *Phytomedicine*. 6: 411-419.

# Thai Journal of Genetics

The Journal of Genetics Society of Thailand

<http://202.44.8.54/index.php/gst/>

July 2013 Vol. S1 (Special Issue 1)



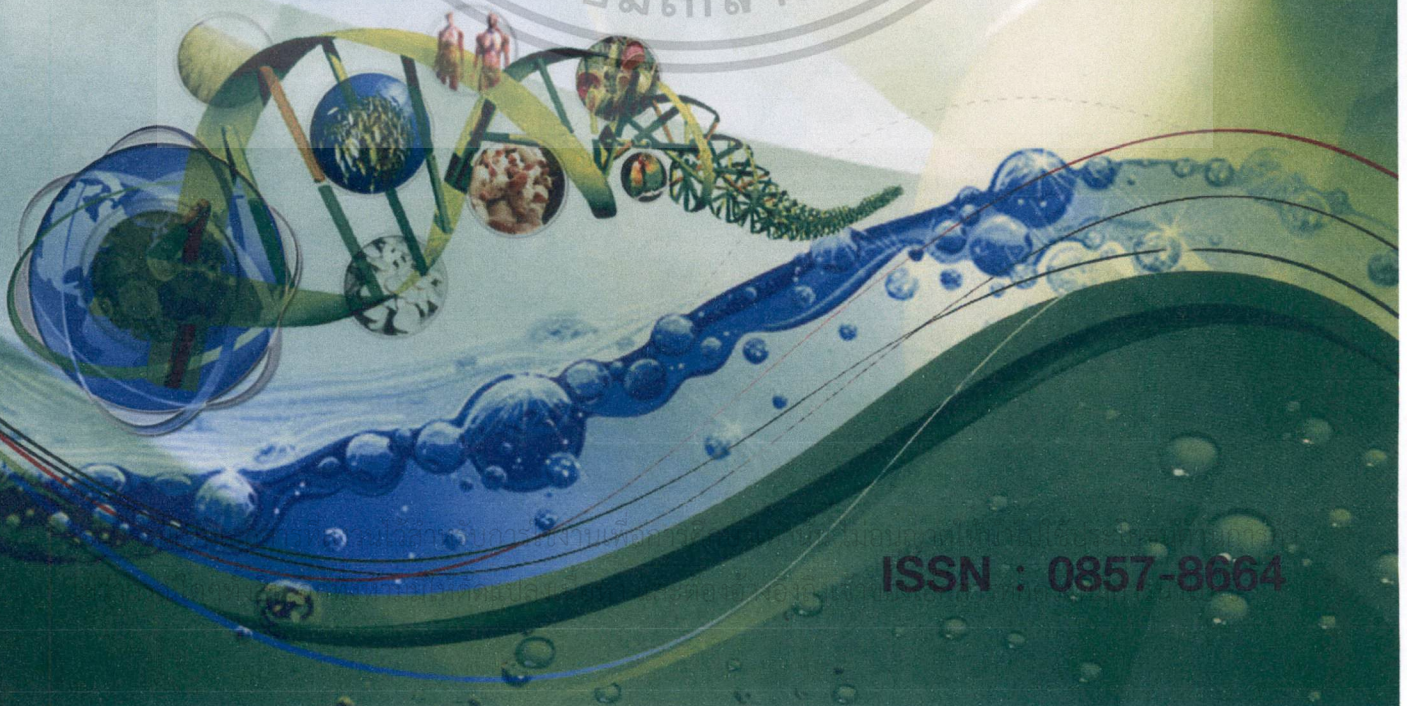
National Genetics Conference 2013  
**NGC2013**  
Genetics towards ASEAN  
Bangkok, July 17-19, 2013



## การประชุมวิชาการ พันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18 “พันธุศาสตร์ก้าวหน้าสู่อาเซียน”

17 - 19 กรกฎาคม 2556

ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ สุขุมวิท กรุงเทพมหานคร



ISSN : 0857-8664

PPH-08-19	ความชุกของพาหะธาลัสซีเมียจากการตรวจคัดกรองหญิงตั้งครรภ์ในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย <i>อัญชลี ระวังการ, นางลักษณ์ เจนวิที, พีระพล วง และ แนน้อย เจริญนิม</i>	156
PPH-09-20	การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพืชกัตกัตนวกโธฏต่อการแสดงออกของยีนแอลดีแอลรีเซปเตอร์และยีนเอชเอ็มจีโคเอ ริคักเตส <i>สุดารัตน์ สุภาพรเหมินทร์, อัญชลีกร ไสมเกษตริน, ภูมิ สุขธิติพัฒน์, อุทัย ไสธนะพันธ์ และ เนตรนภิส วีระวัลย์ชัย</i>	160
PPH-10-21	ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนพาราออกซิเนส 2 ชนิด A148G ต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจในผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่ 2 <i>ณัฐพัชร์ ไทบาง, ธวัชชัย พิรพัฒน์ดิษฐ์, ดำรัส ตริสุโกศล, ศุภชัย รัตนมณีฉัตร และ อธิป ลิขิตลิลิต</i>	164
PPH-11-22	การศึกษาความแปรผันของยีน CDKN2A/2B, CDKAL1, HHEX, KCNQ1, MTNR1B, SLC30A8, TCF7L2 และUBE2E2 กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่สองในประเทศไทย <i>ศุภนันท์ บุตรแก้ว, วชิรย์ ตั้งจิตติโกติน, นลินี จงเจริญ, กาญจนา ชาญประเสริฐ, เพทาย เย็นจิตโสมนัส และ ณัฐเชษฐี เปล่งวิทยา</i>	167
PPH-12-23	การแสดงออกของยีน TPT1 ในเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันมนุษย์เมื่อได้รับความร้อน <i>คุณสนันท์ จิรโชติคุณ, อรุณีพร เกตุจรรยา-เล็กกัต, ศิษฎา ตันนุกิจ และ สุปรียา วาณิชย์ปกรณ์</i>	171
PPH-13-24	ผลของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ชนิดใหม่ต่อเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ <i>จิรพร แสงสุวรรณ, อรุณีพร เกตุจรรยา-เล็กกัต, กนกวรรณ ปัญญารงค์ และ สุปรียา วาณิชย์ปกรณ์</i>	175
PPH-14-25	การพัฒนาการตรวจสอบโครโมโซมเพศของมนุษย์ด้วยเทคนิค Fluorescent in situ Hybridization และ Real time PCR <i>สุภัตรา พรวิลาศสิริ, เสาวนีย์ สุพุทธิภาดา และ สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช</i>	179
PPH-15-26	ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อยีสต์ที่ขาดยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมยา <i>สิริลักษณ์ บารมี และ นิษกัณิภา สุนทรกุล</i>	183
PPH-16-27	การทดสอบความเป็นพิษของน้ำกระชายคั้นด้วยวิธีไมโครนิวเคลียสในหนูขาวเพศผู้ <i>จรัสพร อุบัติ และ ไพวรรณ สุตวรรค</i>	187
PPH-17-28	ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี <i>ณัฐพร มานะประดิษฐ์, สุภัตรา ไพธิ์เอี่ยม และ พัทธนี เจริญยิ่ง</i>	192
PPB-01-29	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์จำปาด์ด้วยเทคนิค แสตอาร์เอพีดี <i>วิรสรา แทนสง่า, เปรมณัช ชุนปักซี่, วีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์</i>	196
PPB-02-30	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวชาด้วยเทคนิค แสตอาร์เอพีดี <i>จิตติพร ทั้มโสฎา, เปรมณัช ชุนปักซี่, วีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์</i>	201

## ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี

### Biological Activity of Crude Extract from *Barleria strigosa*

ณัฐพร มานะประดิษฐ์<sup>1\*</sup>, สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม<sup>1</sup> และ พัชนี เจริญยิ่ง<sup>2</sup>

Nuttaporn Manapradit<sup>1\*</sup>, Supattra Poeaim<sup>1</sup> and Patchanee Charoenying<sup>2</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาชีววิทยา; <sup>2</sup>สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

<sup>1</sup>Department of Biology; <sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520

\*Corresponding author: cool\_coo24@hotmail.com

#### บทคัดย่อ

ตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีในชั้นเมทานอล โดยทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ในเซลล์ไลน์ (cell line) จำนวน 5 ชนิด (P388, HT-29, MCF-7, HepG-2 และ Vero) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดระหว่าง 250-4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT colorimetric assay พบว่าสารสกัดหยาบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (50% cytotoxicity concentration : CC<sub>50</sub>) เท่ากับ 413.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิดอื่นในระดับต่ำ เมื่อศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์ในเซลล์ไลน์ P388 ที่มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 59-61 โครโมโซม พบว่าค่าดัชนีการแบ่งเซลล์ (mitotic index : MI) ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 50 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า MI เท่ากับ 66.49 และ 57.73% ตามลำดับ และเมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) ต่อแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa*) ที่ระดับความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ดีที่สุด

#### ABSTRACT

Crude methanol extract of *Barleria strigosa* leaf was screened for their biological activities. Cytotoxicity of the crude methanol extract was analyzed using an MTT colorimetric assay in five different cell lines (P388, HT-29, MCF-7, HepG-2 and Vero) at concentrations ranging from 250 to 4000 µg/ml. The results found the extract are highly toxic against to murine leukemia cell line (P388). The 50% cytotoxicity concentration (CC<sub>50</sub>) of the extract for 24 hours was 413.89 µg/ml. For preliminary study of the genotoxic potential, P388 cell line had a chromosome number range from 59 to 61 chromosomes per metaphase. The mitotic index (MI) is used for genotoxic potential in P388. The mitotic index decreases compared with the control have 66.49 and 57.73% at 50 and 200 µg/ml concentrations, respectively. The obtained extracts were tested for their antimicrobial activity against three bacterial strains (*Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) at 62.5, 125, 250, 500 and 1000 mg/ml using paper disc diffusion method. The results indicated that crude methanolic extract exhibited strong antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*.

**คำสำคัญ:** ความเป็นพิษต่อเซลล์, การยับยั้งจุลินทรีย์, ดัชนีการแบ่งตัว, สังกรณี

**Keywords:** cytotoxicity, antimicrobial, mitotic index, *Barleria strigosa*

**บทนำ**

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายของทรัพยากรทางชีวภาพ และมีการใช้ยาสมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆมาเป็นเวลานาน แต่ความนิยมในการใช้ได้ลดลงอย่างมากในช่วงอุตสาหกรรมผลิตยาเคมีสังเคราะห์แผนปัจจุบันได้เจริญอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งผู้บริโภคได้ตระหนักถึงอันตรายจากผลข้างเคียง ทำให้สมุนไพรเป็นที่สนใจและมีความสำคัญอีกครั้ง ที่วงศ์ Acanthaceae ถูกนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพรและหาสารที่สำคัญ เช่น รวงจืด ฟ้าทะลายโจร และทองพันชั่ง เป็นต้น ซึ่งสกุล *Barleria* อยู่ในวงศ์นี้เช่นกัน และมีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เสลดพังพอน (*B. lupulina*) มีฤทธิ์ในการลดน้ำตาล และมีความสามารถในการต้านอาการอักเสบ (Suba et al., 2004) อังกาบหนู (*B. prionitis*) ทำให้เกิดความเป็นหมันในหนูหรือนำมาใช้เป็นสารคุมกำเนิด (Verma et al., 2005) และสารสกัดเอทานอลจากเมล็ดของอังกาบ (*B. cristata*) มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของหนู (Singh et al., 2012) รวมทั้งแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก *B. prionitis*, *B. greenii* และ *B. albostellata* (Amoo et al. 2009) และสารสกัดจากใบและแคลลัสของ *B. prionitis* (Shukla et al., 2011) แต่ยังไม่พบการรายงานด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง การแบ่งเซลล์ และการตายของเซลล์ของพืชสกุล *Barleria* โดยเฉพาะสังกรณี (*Barleria strigosa* Willd.)

เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทั้งในรูปสมุนไพร และการหาสารที่สำคัญต่อไป วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี ทั้งความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์ไลน์จำนวน 5 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนู (P388) เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งตับ (HepG-2) และเซลล์ไตลิงแอฟริกันปกติ (Vero) ด้วยวิธี MTT colorimetric assay ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ด้วยวิธี paper disc diffusion รวมทั้งผลต่อการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากค่าดัชนีการแบ่งเซลล์ (mitotic index) ในเซลล์ไลน์ P388 ด้วย

**อุปกรณ์และวิธีการ**

**1. การเตรียมสารสกัด**

นำใบสังกรณีสดมาล้างและอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C จนน้ำหนักคงที่ บดให้เป็นผงก่อนห่อด้วยผ้าขาวบาง สกัดสารด้วยวิธีการสกัดแบบการหมัก (maceration) ในตัวทำละลายเมทานอล ในสภาวะเขย่า โดยเปลี่ยนตัวทำละลายใหม่ทุก 7 วัน จนครบ 3 ครั้ง กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำไปทำการระเหยด้วยเครื่อง evaporator

**2. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT colorimetric assay**

เลี้ยงเซลล์ไลน์ (P388, HT-29, HepG-2, MCF-7 และ Vero) ในอาหาร RPMI-1640 ที่มี Fetal Bovine Serum (FBS) 8% ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ที่มี CO<sub>2</sub> 5% ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการทดสอบระยะสั้นกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในภาชนะนอกร่างกาย (*in vitro*) ด้วยวิธี MTT colorimetric assay ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Mosmann (1993) โดยปลูกเซลล์ใน 96-well plates ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น ดังนี้ P388 (8x10<sup>4</sup> cell/ml), MCF-7 (1x10<sup>5</sup> cell/ml), HT-29, HepG-2 และ Vero (1.5x10<sup>5</sup> cell/ml) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ที่มี CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยอดสารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 250, 500, 1000, 2000 และ 4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น positive control และใช้ DMSO 1% เป็น negative control ก่อนครบเวลา 4 ชั่วโมงทำการเติมสาร MTT ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มต่อจนครบเวลา และละลายผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซันด้วย DMSO: methanol (1: 1) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

**3. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งการแบ่งเซลล์ (mitotic index)**

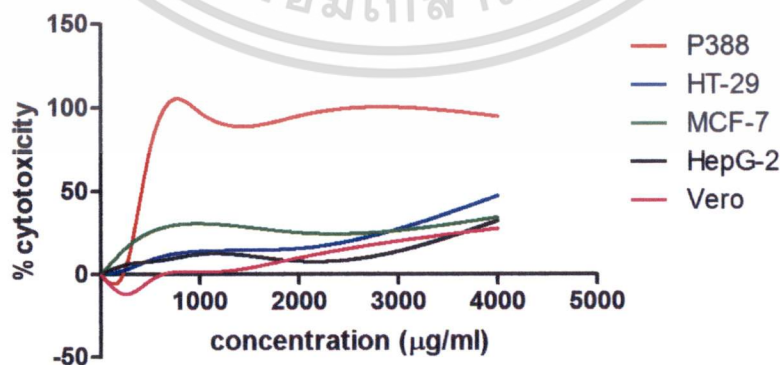
เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ P388 ในอาหาร RPMI-1640 ที่มี FBS 8% ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ที่มี CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารสกัดยับยั้งที่ความเข้มข้น 50 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง ก่อนครบเวลาทำการเติมสาร colcemid ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อครบเวลานำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก และทำให้เซลล์บวม (hypotonic treatment) โดยสารละลายโบแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 0.075 M และตรึงเซลล์ เติร์ยมสไลด์และย้อมสีโครโมโซมด้วยสี giemsa นับจำนวนโครโมโซมและศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์ ซึ่งได้จากการสุ่ม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากจำนวนเซลล์เมทาเฟส 2000 เซลล์ ของกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

**4. การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion**

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis* ATCC6633, *S. aureus* ATCC25923 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 ในอาหาร Muller Hinton Broth (MHB) ให้มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland No. 05 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ตามวิธีของ Ansari *et al.* (2005) โดย swap เชื้อลงบนอาหาร Muller Hinton Agar (MHA) ละลายสารสกัดยับยั้งด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดสารสกัดลงในแผ่น paper disc แล้ววางลงบนอาหารที่ swab เชื้อแล้ว ใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมทานอลเป็น positive และ negative control ตามลำดับ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (clear zone) มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

**ผลการทดลองและวิจารณ์**

จากการทดลองศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดยับยั้งต่อเซลล์ไลน์ 5 ชนิด (P388, HT-29, HepG-2, MCF-7 และ Vero) ด้วยวิธี MTT พบว่าเมื่อบ่มสารร่วมเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดยับยั้งจากใบสังกรณีมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนู มากที่สุด โดยมีค่า CC<sub>50</sub> เท่ากับ 413.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่แสดงความเป็นพิษในระดับต่ำต่อเซลล์ HT-29, HepG-2, MCF-7 และ Vero ดังแสดงค่า CC<sub>50</sub> ของสารสกัดยับยั้งจากใบสังกรณีในชั้นเมทานอลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 5 ชนิดในรูปที่ 1 ซึ่งยังไม่มียางานการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองจากต้นสังกรณี แต่ Suba *et al.* (2004) ที่ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ *B. lupulina* ต่อการลดน้ำตาลในหนู โดยให้หนูกินสารสกัดยับยั้งและฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้หนูตายครึ่งหนึ่ง (LD<sub>50</sub>) เท่ากับ 4.5 และ 3.7 กรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ



รูปที่ 1 ค่า CC<sub>50</sub> ของสารสกัดยับยั้งจากใบสังกรณีในชั้นเมทานอลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 5 ชนิด

ก่อนการศึกษาถึงผลต่อสารสกัดต่ออัตราการแบ่งเซลล์ ได้ศึกษาจำนวนโครโมโซมของเซลล์ไลน์ P388 พบว่าเซลล์ไลน์ P388 มีจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่เท่ากับ 59-61 โครโมโซมต่อหนึ่งเมทาเฟส ซึ่ง *Mus musculus* (mouse) มีจำนวนโครโมโซม  $2n=40$  และเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งการแบ่งเซลล์ จากดัชนีการแบ่งเซลล์ (mitotic index ; MI) ในเซลล์ไลน์ P388 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 50 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ไลน์ P388 มีดัชนีการแบ่งเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยค่า mitotic index ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 50 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 66.49 และ 57.73% ตามลำดับ และการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC6633 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 1000 และ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีขนาดของ clear zone เท่ากับ 29 และ 26.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเชื้อ *S. aureus* ATCC25923 ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีขนาดของ clear zone เท่ากับ 14 มิลลิเมตร แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC27853 สอดคล้องกับ Amoo และคณะ (2009) ศึกษาสารสกัดจากส่วนต่างๆของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 3 สปีชีส์ คือ *B. prionitis*, *B. greenii* และ *B. albostellata* พบว่ามีความสามารถในการเป็นยับยั้งแบคทีเรียโดยมีค่า minimum inhibitory concentrations (MIC) ระหว่าง 0.059-6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านการอักเสบ ซึ่งสอดคล้องกับพืชสกุล *Barleria* คือ *B. lupulina* และ *B. cristata* ที่มีองค์ประกอบทางเคมีชนิด iridoid glucoside ที่มีความสามารถในการต้านไวรัสชนิด herpes simplex virus type 2 (HSV-2) และต้านการอักเสบได้

### สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล พบว่าแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด โดยมีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ 413.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสของเซลล์ไลน์ P388 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดหยาบ 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าใบสังกรณีมีสารที่สำคัญและมีฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงเป็นแนวทางในการศึกษาหาสารที่สำคัญต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังงบประมาณประจำปี 2556 และขอขอบคุณสวนพฤกษศาสตร์ภาคตะวันออก (เขาหินซ้อน) จังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบสังกรณี

### เอกสารอ้างอิง

Amoo, S.O., Finnie, J.F. and Van Staden, J. 2009. *In vitro* pharmacological evaluation of three *Barleria* species. J. Ethnopharmacol. 121: 274-277.

Ansari, M.A., Tirry L. and Moens, M. 2005. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbions of entomopathogenic nematodes. Biol. Control 50: 465-475.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Method 65:55-63.

Shukla, P., Singh, A., Gawri, S., Alexande, A. and Sonwane, S. 2011. *In vitro* propagation of *Barleria prionitis* Linn and its antibacterial activity. Int. J. Pharma Prof. Res. 2: 198-200.

Singh, R., Rajasree, P.H. and Sankar, C. 2012. Screening for anti-diabetic activity of the ethanolic extract of *Barleria cristata* seeds. Int. J. of Pharm. Life Sci. 3: 2044-2047.

Suba, V., Murugesan, T., Arunachalam, G., Mandal, S.C. and Saha, B.P. 2004. Anti-diabetic potential of *Barleria lupulina* extract in rats. Phytomedicine. 11: 202-205.

Verma, P.K., Sharma, A., Joshi, S.C., Gupta, R.S. and Dixit, V.P. 2005. Effect of isolated fractions of *Barleria prionitis* root methanolic extract on reproductive function of male rats: preliminary study. Fitoterapia. 76: 428-432.

PPB-03-31	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ <i>Saccharum spontaneum</i> และลูกผสม โดยเทคนิคอาร์เอพีดี <u>ไอลดา ไชยบุตร, สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และ กษิตติ ดิษฐบรรจง</u>	206
PPB-04-32	ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae ในประเทศไทย <u>เจติยา ด้านธนาวิเศษ, สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ วินัย สมประสงค์</u>	210
PPB-05-33	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล <i>Passiflora</i> <u>อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม, สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และ ทศนารถ กระจ่างวุฒิ</u>	214
PPB-06-34	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพารา ( <i>Hevea siliensis</i> Muell Arg.) จากลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase</i> <u>อรวรรณ วราพุด และ ชุตตา บุญภักดี</u>	218
PPB-07-35	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล <i>Barleria</i> โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ trnL-trnF <u>สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, วิภารัตน์ ศิริพงษ์, ชัยวัฒน์ ฤทธิเดชากุล, ดวงทิพย์ อภิรัตน์มนตรี และ วินัย สมประสงค์</u>	222
PPB-08-36	การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแพรวเชียงใต้ ( <i>Portulaca grandiflora</i> ) ด้วยเครื่องหมายแอสตาอาร์เอพีดี <u>เกียรติชัย แซ่ใต้, เปรมณัช ชุนป์ภี, ธีระชัย ธนนานันต์ และ นฤมล ธนนานันต์</u>	226
PPB-09-37	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาสกุล <i>Camellia</i> จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน <i>Chalcone synthase</i> <u>จิตรอนงค์ คำรอด และ ชุตตา บุญภักดี</u>	230
PPB-10-38	หลักฐานทางพันธุกรรมการแพร่กระจายพืชต่างถิ่น <i>Crassocephalum rubens</i> ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ <u>โองการ วณิชชาติวะ</u>	235
PPB-11-39	รูปแบบการขยายพันธุ์เพื่อการค้ากับหลักฐานความแปรปรวนทางพันธุกรรมของทุเรียนการค้าของไทย <u>เดือนใจ ไก่สกุล และ ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ</u>	240
PPB-12-40	การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR เพื่อใช้ในการจำแนกลำไยลูกผสมระหว่างพันธุ์ดอ 27 กับสีชมพู <u>จันทร์เพ็ญ สระระ, ฉันทนา วิชรัตน์, ธีรนุช เจริญกิจ และ แสงทอง พงษ์เจริญกิต</u>	244
PPB-13-41	การประยุกต์เทคนิคแอสตาอาร์เอพีดีเพื่อตรวจสอบการกลายในถั่วเขียว <u>จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ธีระชัย ธนนานันต์ และ นฤมล ธนนานันต์</u>	248
PPB-14-42	การตรวจสอบข่าวโศกและผลิตภัณฑ์จากข่าวโศกดัดแปลงพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส <u>นคร สอนสมบุญ, ปาริยา ณ นคร, ธีระชัย ธนนานันต์ และ นฤมล ธนนานันต์</u>	253
PPB-15-43	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมอสส์ และการประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ <u>ชาธิยา ฉัตรโรดม, สหัช จันทนารพินท์ และ เครือวัลย์ ยุนรัมย์</u>	258
PPB-16-44	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพาราจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน <i>caffeate O- methyl-transferase</i> <u>นิจรดา ยี่หมื่น และ ชุตตา บุญภักดี</u>	262

## ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae ในประเทศไทย

### Genetic Diversity and Relationship of Subfamily Acanthoideae in Thailand

เจติยา ด่านธนวานิช<sup>1\*</sup>, สุพัตตรา โพธิ์เอี่ยม<sup>1</sup>, อนรุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม<sup>1</sup> และ วินัย สมประสงค์<sup>2</sup>  
Chetiya Danthanawanit<sup>1\*</sup>, Supattra Poeaim<sup>1</sup>, Anurug Poeaim<sup>1</sup> and Winai Somprasong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520;

<sup>2</sup>กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520; <sup>2</sup>Plant Variety Protection Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900

\*Corresponding author: miharuka\_rainbow@hotmail.com

#### บทคัดย่อ

ศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae จำนวน 52 ตัวอย่าง ร่วมกับ outgroup 3 ตัวอย่าง โดยเทคนิค PCR ในตำแหน่ง *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ C/D หรือ C/F พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส และ 550 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 5 สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างพืชได้เป็น 2 เผ่า ได้แก่ เผ่า Ruellieae และเผ่า Acantheae โดยเผ่า Ruellieae จำแนกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ เผ่าย่อยชาไก่ (Justiciinae) เผ่าย่อยต้อยติ่ง (Ruellinae) เผ่าย่อยฟ้าทะลาย (Andrographinae) และเผ่าย่อยอังกาบ (Barleriinae)

#### ABSTRACT

The genetic diversity and relationship of subfamily Acanthoideae in Thailand was carried out. PCR technique was amplified sequence data from the intron and spacer of the *trnL-trnF* chloroplast DNA by primer C/D or C/F from 52 samples of Acanthoideae and 3 samples of outgroup. The size of amplified products is approximately 550 base pairs (C/D primer) and 900 base pairs (C/F primer). A phylogenetic analysis using neighbour-joining method was conducted in MEGA 5. The tree was divided the samples into 2 tribes; Ruellieae and Acantheae. Ruellieae was divided into 4 sub-group; Justiciinae, Ruellinae, Andrographinae and Barleriinae.

**คำสำคัญ:** เทคนิค PCR, คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ, วงศ์ย่อย Acanthoideae

**Keywords:** PCR technique, chloroplast DNA, Acanthoideae

## บทนำ

พืชวงศ์ย่อย Acanthoideae จัดอยู่ในวงศ์ Acanthaceae โดย Scotland และ Vollesen (2000) ได้จำแนกพืชวงศ์นี้เป็น 3 วงศ์ย่อย ได้แก่ Nelsonioideae, Thunbergioideae และ Acanthoideae และยังจำแนกวงศ์ย่อย Acanthoideae เป็น 2 เผ่า คือ Acantheae และ Ruellieae โดยเผ่า Ruellieae จำแนกเป็น 4 เผ่าย่อย คือ เผ่าย่อยต้อยติ่ง (Ruellinae) เผ่าย่อยขาไก่ (Justiciinae) เผ่าย่อยอังกาบ (Barleriinae) และเผ่าย่อยฟ้าทะลาย (Andrographinae) ลักษณะทั่วไปของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae เป็นไม้พุ่ม ลำต้นมีหนามและไม่มีหนาม ใบมีรูปรีค่อนข้างยาว โคนและปลายใบเรียวแหลม พบดอกออกเป็นกระจุกหรือดอกเดี่ยว ดอกมีหลายสี เช่น ดอกสีม่วง สีม่วงอมชมพู สีเหลือง สีขาว และสีขาวแถบม่วง เป็นต้น พบมากตามป่าร้อนชื้น ป่าไผ่ และป่าดงดิบ ปัจจุบันในประเทศไทยพบประมาณ 40 สกุล 230 สปีชีส์ (Hansen, 1985) พืชวงศ์ย่อยนี้ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในทางการแพทย์ จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae ที่พบในประเทศไทย

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชมากขึ้น เนื่องจากข้อมูลที่ได้มีความถูกต้อง แม่นยำ และสามารถระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของพืชได้อย่างชัดเจน มากกว่าการใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว เช่นการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ของพืชสกุล *Justicia* ได้ (Meister และคณะ, 2005) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายและหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae ที่พบในประเทศไทย โดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR: Polymerase chain reaction)

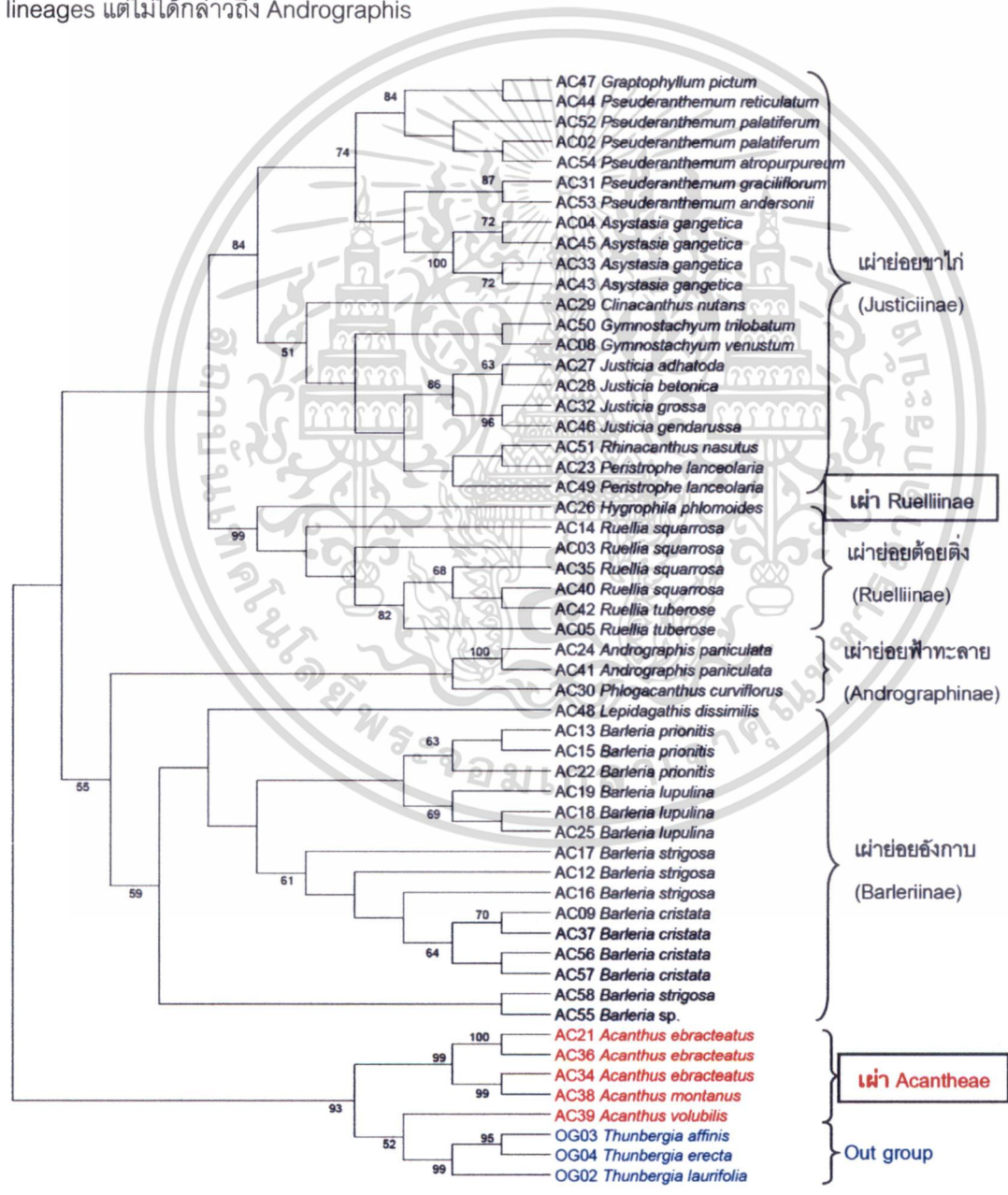
## อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างใบพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae จากสถานที่ต่างๆ และได้รับการจำแนกและระบุสปีชีส์จากคุณวินัย สมประสงค์ หัวหน้ากลุ่มวิจัยเพื่อการคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร และสกุล *Thunbergia* จำนวน 3 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็น outgroup นำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนใบของพืชด้วยวิธี CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ C (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3')/ D (5'-GGGATAGAGGGACTTGAAC-3') หรือ F (5'-ATTGAACTGGTGACACGAG-3') (Taberlet et al., 1991) โดยกำหนดให้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที, annealing ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 2 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 35 รอบ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ทำการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอเล็กโทรโฟรีซิส หลังจากนั้นทำการ purification และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบ (alignment) ด้วยโปรแกรม Bioedit และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining โดยโปรแกรม MEGA 5 (Tamura et al., 2011) ทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ

## ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างใบพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae จำนวน 52 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 15 สกุล ได้แก่ สกุล *Graptophyllum*, *Pseuderanthemum*, *Asystasia*, *Clinacanthus*, *Gymnostachyum*, *Rhinacanthus*, *Justicia*, *Hygrophila*, *Ruellia*, *Andrographis*, *Peristrophe*, *Phlogacanthus*, *Lepidagathis*, *Barleria*, และ *Acanthus* เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ C/D หรือ C/F พบว่ามีเพียง 2 สกุลเท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยไพรเมอร์ C/D คือ สกุล *Barleria* และ *Ruellia* โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 550 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ สำหรับสกุลอื่นๆ รวมทั้ง outgroup สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ C/F โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining โดยโปรแกรม MEGA 5 จากแผนภูมิ (รูปที่ 1) สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างพืชได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (เผ่า) และในเผ่าขนาดใหญ่ นั้นแบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย (เผ่าย่อย) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Scotland และ Vollesen (2000) ที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะของใบ ชีสโทลิท ดอก การออกดอก และกลีบเลี้ยง สามารถจำแนกวงศ์ย่อย Acanthoideae ออกเป็น 2 เผ่า คือ เผ่า Acantheae และเผ่า Ruellieae โดยเผ่า Ruellieae นั้นจำแนกเป็น 4 เผ่าย่อย คือ เผ่าย่อยต้อยตึง (Ruellinae) เผ่าย่อยชาไก่ (Justiciinae) เผ่าย่อยอังกาบ (Barleriinae) และเผ่าย่อยฟ้าทะลาย (Andrographinae) โดยเผ่าย่อยอังกาบแสดงความใกล้ชิดกับเผ่าย่อยฟ้าทะลาย และเผ่าย่อยต้อยตึงแสดงความใกล้ชิดกับเผ่าย่อยชาไก่ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Mcdade และ Moody (1999) ที่ศึกษาในระดับโมเลกุลในตำแหน่งนี้เช่นกัน สามารถแบ่งพืชวงศ์ Acanthaceae เป็น 4 lineages คือ Acanthus, Barleria, Ruellia และ Justicia โดย Ruellia แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ Justicia lineages แต่ไม่ได้กล่าวถึง Andrographis



รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่วารณี่ใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามการประมุขวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 18 งดเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าเผ่า Acantheae มีเฉพาะสกุล *Acanthus* แต่สำหรับเผ่า Ruellieae แบ่งเป็น 4 เผ่าย่อย มีจำนวน 14 สกุล โดยเผ่าย่อยชาไก่ (Justiciinae) แสดงความหลากหลายมากที่สุดคือ 8 สกุล เช่นเดียวกับ Mcdade และ Moody (1999) ที่พบว่าเฉพาะ *Justicia* lineages สามารถแบ่งเป็น sublineages และเผ่าย่อยย่อยตั้ง (Ruelliinae) มีพืชอีกสปีชีส์หนึ่งคือ ชำชำ (*Hygrophila phlomisoides*) ที่น่าสนใจและศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจากเป็นสกุลไม้ล้มลุก รวมทั้งในเผ่าย่อยอังกาบ (Barleriinae) ที่ตัวอย่าง AC50 ยังไม่สามารถจำแนกได้ในระดับสปีชีส์ และตัวอย่าง AC58 *Barleria strigosa* ที่แยกจากกลุ่มของ *B. strigosa* หรือสังกรณี ซึ่งอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

### สรุปผลการทดลอง

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae จำนวน 52 ตัวอย่าง ร่วมกับสกุล *Thunbergia* จำนวน 3 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็น outgroup เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถจำแนกความหลากหลายของพืชได้ในระดับสกุล โดยสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae ออกเป็น 2 เผ่า คือ เผ่า Acantheae ที่มีเฉพาะสกุล *Acanthus* และเผ่า Ruellieae ที่จำแนกเป็น 4 เผ่าย่อย คือ เผ่าย่อยย่อยตั้ง (Ruelliinae) เผ่าย่อยชาไก่ (Justiciinae) เผ่าย่อยอังกาบ (Barleriinae) และเผ่าย่อยฟ้าทะลาย (Andrographinae) ซึ่งมีจำนวน 14 สกุล แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น และหลายตำแหน่งหรือหลายเทคนิค เพื่อให้ข้อมูลความหลากหลายมากขึ้น

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังงบประมาณประจำปี 2556 และขอขอบคุณพิพิธภัณฑสถานแห่งชาติสิรินธร กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างบางส่วน

### เอกสารอ้างอิง

- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 1987; 19: 11-15.
- Hansen, B. Studies on the Acanthaceae of Thailand. *Fl. Malesiana Bulletin* 1985; 38: 173-178.
- Meister, J., Hubaishan, M.A., Kilian, N. and Oberprieler, C. Chloroplast DNA variation in the shrub *Justicia areysiana* (Acanthaceae) endemic to the monsoon affected coastal mountains of the southern Arabian Peninsula. *Plant Systematics and Evolution* 2005; 262: 153-171.
- Mcdade, L.A. and Moody, M.L. Phylogenetic relationships among Acanthaceae: evidence from noncoding *trnL-trnF* chloroplast DNA sequences. *American Journal of Botany* 1999; 86: 70-80.
- Scotland, R.W. and Vollesen, K. Classification of Acanthaceae. *Kew Bulletin* 2000; 55: 513-589.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 1991; 17: 1105-1109.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 2011; 28: 2731-2739.