



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากต่อการจำลองตัวเองของไวรัส

Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus

Effect of crude extracts from the root of *Stemona tuberosa* Lour. on the

replication of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus

นางอุณเรือน เพชรวัลย์

นางศุขณีย์ ธนะบริพัตน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2555

คณะวิทยาศาสตร์

รศ.ช

๗ 831๗

๘๕๕๕

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b.121638523

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

เลขหมู่

เลขทะเบียน

137326

รับเคาะ

22 ส.ย. 2558

ชื่อโครงการวิจัย ผลของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากต่อการจำลองตัวของไวรัส

Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus

แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย

ประจำปีงบประมาณ 2555 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2554 ถึง 30 กันยายน 2555

หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.อุ๋นเรื่อน เพชรวัลย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ผู้ร่วมโครงการวิจัย รศ.ดร.อุษณีย์ ธนะบริพัทธ์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

จุดมุ่งหมายของงานวิจัยคือศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก และฤทธิ์ต้านไวรัส *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (*AcMNPV*) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ใน *Spodoptera frugiperda* (Sf9) ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก *Stemona tuberosa* Lour. ขึ้นเขกเซน ไคโคลอโรมีเทน และเอทานอล ใช้วิธี MTT ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ แสดงค่า CC_{50} โดยทำการบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 48 และ 96 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบขึ้นไคโคลอโรมีเทนเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าสารสกัดหยาบขึ้นเขกเซน และเอทานอล เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 96 ชั่วโมง และค่า $CC_{50} = 1,708.98$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ผลของสารสกัดหยาบขึ้นไคโคลอโรมีเทน (ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ต่อการจำลองตัวของไวรัส *AcMNPV* พิจารณาจากค่าร้อยละการติดเชื้อ ไวรัสไตเตอร์ จำนวนเฉลี่ยฟลักโพลีฮีดรา (OBs ต่อมิลลิลิตร และ OB ต่อเซลล์) และร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส ทำการปลูกเชื้อ ไวรัสค่า MOI=2 บ่มในเซลล์นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดลงไป ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละการติดเชื้อในกลุ่มควบคุม (95.54%±3.18) ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับค่าเฉลี่ยร้อยละการติดเชื้อในสารสกัดหยาบขึ้นไคโคลอโรมีเทน (98.51%±1.34) อย่างไรก็ตาม ค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ในกลุ่มควบคุม ($2.06 \times 10^8 \pm 0.71$ PFU/มิลลิลิตร) มีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) กับค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ในสารสกัดหยาบขึ้นไคโคลอโรมีเทน ($2.65 \times 10^8 \pm 0.79$ PFU/มิลลิลิตร) และผลของจำนวนเฉลี่ยฟลักโพลีฮีดรา (OBs/มิลลิลิตร) ในกลุ่มควบคุม ($5.11 \times 10^6 \pm 0.63$ OBs/มิลลิลิตร) ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับจำนวนเฉลี่ยฟลักโพลีฮีดราในสารสกัดหยาบขึ้นไคโคลอโรมีเทน ($4.19 \times 10^6 \pm 0.31$ OBs/มิลลิลิตร) อย่างไรก็ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก็ตาม ค่าเฉลี่ยร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัสโคโรนาในกลุ่มควบคุม ($0\% \pm 0$) มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) กับค่าเฉลี่ยร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัสโคโรนาในสารสกัดหยาบชั้นโคคลอโรมีเทน ($-27.45\% \pm 4.36$) ดังนั้นเมื่อเติมสารสกัดหยาบชั้นโคคลอโรมีเทนลงในอาหาร หลังจากไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว สารสกัดไม่มีผลทำให้ค่าไวรัสโคโรนาลดลง จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบหนอนตายหยาบชั้นโคคลอโรมีเทน ไม่สามารถยับยั้งการเข้าติดเชื้อของ AcMNPV ในเซลล์ Sf9

คำสำคัญ: ไวรัส AcMNPV สารสกัดหยาบ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ วิธี MTT



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา **ii** ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Effect of crude extracts from the root of *Stemona tuberosa* Lour. on the replication of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus

Researcher: Asst.Prof.Dr. Ounruan Petcharawan

Assoc.Prof.Dr. Dusanee Thanaporipat

Faculty: Faculty of Science

Department: Department of Biology

ABSTRACT

The purpose of this research was to investigate the cytotoxicity of crude extracts from the root of *Stemona tuberosa* Lour. and also the potential antiviral activity of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV). Cytotoxicity of crude hexane, dichloromethane and ethanol extracts from the root of *S. tuberosa* were tested against *Spodoptera frugiperda* cell line (Sf9) using MTT assay. The cytotoxic activity, represented as CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) value and was observed after 48 h and 96 h of exposures. The results showed that dichloromethane extract exhibited to be more toxic than hexane and ethanol extracts and 96-h CC_{50} of dichloromethane extract was 1,708.98 $\mu\text{g/ml}$.

The effect of crude dichloromethane extract (31.25 $\mu\text{g/ml}$) on the replication of AcMNPV grown in Sf9 cell line was investigated by determining the percentage of infected cells, the virus titer, the number of polyhedra (OBs/ml), and the percentage reduction of virus titer, when the extract was added after 1 h post-infection of AcMNPV at the multiplicity of infection (MOI) of 2, in Sf9 cell line cultivated *in vitro*. The results showed that there was not significant different ($p>0.05$) between the percentage of infected cells in the control (95.54% \pm 3.18) and in the crude dichloromethane extract (98.51% \pm 1.34). However, there was significant different ($p<0.05$) between the average of virus titer in the control ($2.06 \times 10^8 \pm 0.71$ PFU/ml) and in the crude dichloromethane extract ($2.65 \times 10^8 \pm 0.79$ PFU/ml) and the result of the average number of polyhedra (OBs/ml) in the control ($5.11 \times 10^6 \pm 0.63$ OBs/ml) was not significant different ($p>0.05$) to the average number of polyhedra in the crude dichloromethane extract ($4.19 \times 10^6 \pm 0.31$ OBs/ml). However, there was significant different ($p<0.05$) between the percent reduction of virus titer in the control (0% \pm 0) and in the crude dichloromethane extract

(-27.45%±4.36). Therefore, when the crude dichloromethane extract was added to the medium after penetration of the virus into the host cells, the virus titer was not reduced. These results showed that the crude dichloromethane extract of *S. tuberosa* could not inhibit *AcMNPV* infection in Sf9 cells.

Keywords: *AcMNPV*, crude extract, cytotoxicity test, MTT assay



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา **iv** ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องผลของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากต่อการจำลองตัวเองของไวรัส *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus เป็นงานวิจัยพื้นฐาน มีประโยชน์ต่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี ในที่นี้คือไวรัสโรคแมลง ซึ่งถ้าใช้วิธีผสมผสานกับสารสกัดหยาบจากพืชประสิทธิภาพของการเข้าติดเชื้อของไวรัสอาจจะลดลงหรือเพิ่มขึ้น ทั้งนี้มีโอกาสเป็นไปได้ทั้งสองกรณี

งานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จได้เพราะได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัย นายเมธิณ ใจเกื้อ นายสาโรช เจริญศักดิ์ นางสาวกฤษนิษฐ์ เจริญสุข นางสาวทิพย์ปัญญา ครุณาสูง และ นายจิระ สากลาวรี ที่ช่วยเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ทดสอบการติดเชื้อไวรัส ผู้วิจัยคาดว่าผลการวิจัยนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจศึกษาต่อไป

ผศ.ดร.อุ้นเรือน เพชรวัลย์

รศ.ดร.ดุยณี ธนะบริพัฒน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
กิตติกรรมประกาศ	v
สารบัญ	vi
สารบัญตาราง	ix
สารบัญรูป	xi
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 หลักการและเหตุผลของโครงการวิจัย	
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นหนอนตายหยาก (<i>Stemona tuberosa</i> Lour.)	
2.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของรากหนอนตายหยาก (<i>Stemona tuberosa</i> Lour)	
2.3 เซลล์ไลน์ <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9 cell line)	
2.4 <i>Autographa californica</i> multiple nucleopolyhedrovirus (<i>AcMNPV</i>)	
2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	
2.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัส <i>AcMNPV</i>	
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงการพิเศษ	
3.2 วิธีการทดลอง	
3.2.1 การเตรียมสารสกัดจากรากหนอนตายหยาก	
3.2.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ Sf9	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา **vi** ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.3 การเพิ่มปริมาณเซลล์ไลน์ S9 ในขวดทดลอง
- 3.2.4 การศึกษากราฟการเจริญ (growth curve) ของเซลล์ไลน์ S9
- 3.2.5 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ S9 โดยวิธี MTT assay
- 3.2.6 การเตรียมหัวเชื้อไวรัส (virus inoculum)
- 3.2.7 การหาค่าไวรัสไตเตอร์ของหัวเชื้อไวรัสโดยวิธี end-point dilution
- 3.2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัส *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก
- 3.2.9 การตรวจสอบค่าไวรัสไตเตอร์ *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus
- 3.2.10 การนับจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส *AcMNPV*
- 3.2.11 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

29

- 4.1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก
- 4.2 กราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ S9
- 4.3 ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากที่มีต่อเซลล์ไลน์ S9 โดยวิธี MTT
- 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการจำลองตัวเองของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

45

- 5.1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน, ไคคโลโรมีเทน และเอทานอล
- 5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการจำลองตัวเองของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากชั้นไคคโลโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มนาน 96 ชั่วโมง
- 5.3 ผลการศึกษาค่าเฉลี่ย ร้อยละการติดเชื้อไวรัส *AcMNPV* จำนวนเซลล์ที่ติดเชื้อต่อมิลลิลิตร ไวรัสไตเตอร์ (PFU/มิลลิลิตร) จำนวนผลึกโปรตีน/มิลลิลิตร จำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์ และร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส *AcMNPV*
- 5.4 ผลค่าร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9

ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไค
คลอ โรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มนาน 96 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง	49
ภาคผนวก ก ข้อมูลดิบและการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ	54
ประวัตินักวิจัย	73



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา **viii** ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก	29
4.2 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไลน์ S๒ ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ภายหลังการปลูกเซลล์เป็นเวลา 7 วัน	30
4.3 ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ S๒ ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในชั้นเฮกเซน ไคคโลโรมีเทน และเอทานอล บ่มในสารสกัดนาน 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ	32
4.4 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ S๒ ร้อยละ 50	33
4.5 ค่าเฉลี่ยร้อยละการตายของเซลล์ไลน์ S๒ และค่า Corrected % mortality ใน 4 สิ่งทดลอง	40
4.6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ร้อยละการติดเชื้อไวรัส AcMNPV จำนวนเซลล์ที่ติดเชื้อ/มิลลิลิตร ไวรัสไตเตอร์ (PFU/มิลลิลิตร) จำนวนฟลัก โปรตีน/มิลลิลิตร จำนวนฟลัก โปรตีน/เซลล์ และร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส AcMNPV	41
ก-1 จำนวนเซลล์ไลน์ S๒ ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตรภายหลังการปลูกเซลล์เป็นเวลา 7 วัน	54
ก-2 ร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในชั้น เฮกเซน ไคคโลโรมีเทน และเอทานอล ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ S๒ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง	55
ก-3 ร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากในชั้น เฮกเซน ไคคโลโรมีเทน และเอทานอล ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ S๒ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง	58
ก-4 ร้อยละการตายของเซลล์ไลน์ S๒ และค่า Corrected % mortality ใน 4 สิ่งทดลอง	61
ก-5 ค่าร้อยละการติดเชื้อไวรัส AcMNPVในเซลล์ไลน์ S๒ ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคโลโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	63
ก-6 จำนวนเซลล์ S๒ ที่ติดเชื้อไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคโลโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	64
ก-7 ค่าไวรัสไตเตอร์ของไวรัส AcMNPV (PFU/มิลลิลิตร)ในเซลล์ไลน์ S๒ ซึ่งเพาะเลี้ยง ในอาหาร และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคโลโรมีเทน	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- ก-8 จำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส *AcMNPV* ต่อมิลลิลิตร ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร 67
และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไดคัลลอโรมีเทน ความเข้มข้น
31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเซลล์นาน 96 ชั่วโมง
- ก-9 จำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส *AcMNPV* ต่อมิลลิลิตร ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร 69
และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไดคัลลอโรมีเทน ความเข้มข้น
31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเซลล์นาน 96 ชั่วโมง
- ก-10 ค่าร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 70
TNM-FH และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไดคัลลอโรมีเทน
ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มนาน 96 ชั่วโมง



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า	
2.1	ต้นหนอนตายหยาก (<i>Stemona tuberosa</i> Lour) ก. ลักษณะของใบ ข. ลักษณะของราก ค. ลักษณะของดอก ง. ลักษณะของผล	5
2.2	เซลล์ไลน์ <i>Spodoptera frugiperda</i> (<i>Spodoptera frugiperda</i> cell line, SF9)	8
2.3	ลักษณะโครงสร้างของ Occluded virion 2 รูปแบบ คือ single-embedded virion และ multiple-embedded virion	10
2.4	แสดงลักษณะโครงสร้างของนิวคลีโอโพลีฮีโครไวรัส 2 รูปแบบ คือ Budded virion (BV) และ Occlusion derived virion (ODV)	13
2.5	อนุภาคไวรัสเข้าสู่ภายในเซลล์แมลงโดยวิธี adsorptive endocytosis และการเกิดถุง endosome ห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ในไซโทพลาสซึมของเซลล์โฮสต์ โดยส่วนของนิวคลีโอแคพซิด เท่านั้นที่ผ่าน nuclear pore เข้าภายในนิวเคลียส	13
2.6	แสดงกลไกการติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโครไวรัสเข้าสู่เซลล์แมลง โดยวิธี plasma membrane Fusion	14
3.1	แสดงลักษณะเซลล์ไลน์ SF9 หลังการย้อมสีด้วยทริปแฟน บลู	19
3.2	ช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ (primary square) 5 ช่อง (A-E) บนฮีมาไซโตมิเตอร์ ที่ใช้นับจำนวนเซลล์	19
3.3	แผนผังแสดงการปลูกเซลล์ไลน์ SF9 ลงในงานเพาะเลี้ยง 96 หลุม	23
3.4	แผนผังแสดงการปลูกเชื้อไวรัสรูปแบบ ECV ลงในเซลล์ไลน์ SF9 ค่าการเจือจาง 10^{-1} - 10^{-10}	23
3.5	แสดงเซลล์ไลน์ SF9 ที่ติดเชื้อไวรัส มีผลึกโปรตีน (polyhedra) อยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์	24
3.6	เซลล์มีชีวิตติดเชื้อ (ก) และเซลล์ตายติดเชื้อโดยติดสีของทริปแฟน บลู (ข)	26
3.7	แผนผังแสดงการทดสอบค่าไวรัสไตเตอร์ AcMNPV	27
4.1	กราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ SF9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 10	30
4.2	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเอทานอล ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ SF9 บ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 48 ชั่วโมง	34
4.3	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเอทานอลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ SF9 บ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 96 ชั่วโมง	34
4.4	ลักษณะเซลล์ไลน์ SF9 เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 5 และบ่มใน สารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล	35

ที่ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มนาน 48 ชั่วโมง (กำลังขยาย 200x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา **xi** ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5	ลักษณะเซลล์ไลน์ S๒9 บ่มในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มนาน 48 ชั่วโมง (กำลังขยาย 200x)	36
4.6	ลักษณะเซลล์ไลน์ S๒9 เพาะเลี้ยงในอาหารTNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 5 และบ่มในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก ชั้นเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มนาน 96 ชั่วโมง (กำลังขยาย 200x)	37
4.7	ลักษณะเซลล์ไลน์ S๒9 เพาะเลี้ยงในอาหารTNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 5 และบ่มในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก ชั้นเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มนาน 96 ชั่วโมง (กำลังขยาย 200x)	38
4.8	เซลล์ไลน์ S๒9 เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 5 (ก) เซลล์ไลน์ S๒9 ที่ติดเชื้อไวรัส AcMNPV ภายหลังจากติดเชื้อนาน 7 วัน (ข) (กำลังขยาย 200x)	39
4.9	เปรียบเทียบลักษณะเซลล์ไลน์ S๒9 ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ทำให้ติดเชื้อไวรัส AcMNPV MOI=2 บ่มนาน 96 ชั่วโมง	42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผลของโครงการวิจัย

การใช้สารเคมีกำจัดโรคพืชและแมลงศัตรูพืช มีผลกระทบต่อมนุษย์และสัตว์ รวมถึง สภาวะแวดล้อม ดังนั้นการใช้สารสกัดจากพืชจึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับควบคุมประชากรแมลง ศัตรูพืช ทั้งนี้เพราะมีความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิต และไม่มีสารพิษตกค้างในธรรมชาติ พืชสมุนไพรที่นิยม ใช้กำจัดศัตรูพืช ได้แก่ สารสกัดจาก สาระถิ สาบเสือ ใบน้อยหน่า เมล็ดน้อยหน่า ข่าลิง หางไหล สะเดา ข่า ตะไคร้ ยาสูบ ผักยี่โถ เมล็ดเทียนหยด เหง้าว่านน้ำ เมล็ดสลอด หัวบอระเพ็ดพุงช้าง ผลมะคำดีควาย และ ราก หนอนตายหยาก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพัฒนาสารที่สกัดจากรากหนอนตายหยาก และสารสกัด เพื่อนำมาใช้ทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ในกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต คาร์บาเมต ออร์กาโนคลอรีน เป็นต้น (ไพบูลย์, 2551)

หนอนตายหยาก (*Stemona* sp.) มีการแพร่กระจายแถบตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย ญี่ปุ่น จีน เวียดนาม โดยมีชื่อสามัญ ดังนี้ Non Tai Yak, Bai Bu และ Bach Bo (Pilli และคณะ, 2005; Greger, 2006) เป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ประโยชน์มาเป็นเวลานานมาก โดยนำรากมาใช้เป็นยา ทางการแพทย์แผนโบราณและการสาธารณสุข โดยใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาอาการไอ วัณโรค ขับ เสมหะ ขับลม โรคผิวหนัง ฆ่าพยาธิ กำจัดหมัดและเหา ใช้เป็นยาทาภายนอกสำหรับแผลที่เกิดจากหนอน หรือตัวอ่อนของแมลงบางชนิด ใช้เป็นยาต้มเพื่อรับประทานแก้โรคผื่นคัน ใช้รากสดทุบใส่ไหปลาร้า เพื่อกำจัดหนอน ด้านการเกษตรมีการนำเอารากของหนอนตาย หยากมาตำให้ละเอียดละลายน้ำและนำมา กรอง แล้วนำน้ำที่กรองได้นั้นมาใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช นำมาใช้ใส่แผลของโค กระบือ เพื่อฆ่าหนอน หรือทาตามแผลเพื่อป้องกันแมลงวันตอมหรือวางไข่ นอกจากนี้มีการใช้น้ำสกัดชีวภาพหนอนตายหยาก เป็นปุ๋ยในการเพาะปลูกพืช (Pundee และคณะ, 2003; นงคันทา, 2551)

สำหรับโครงการวิจัยนี้ จะทำการสกัดรากหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์แมลงที่สร้างจากเนื้อเยื่อรังไข่ของระยะดักแด้หนอนกระทู้ *Spodoptera frugiperda* และ ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากรากหนอนตายหยากที่มีผลต่อการจำลองตัวเองของนิวคลีโอโพลีดีโอไรไวรัส ในเซลล์ไลน์แมลง ผลการทดลองที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากรากหนอนตายหยาก ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์แมลง SF9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง

1.2.2 เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากรากหนอนตายหยากที่มีผลต่อการจำลองตัวเองของไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์แมลง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 เตรียมสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน (hexane) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) และเอทานอล (ethanol) ตามลำดับ

1.3.2 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไลน์ SF9 (*Spodoptera frugiperda*) และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากที่มีผลต่อการจำลองตัวเองของ AcMNPV

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 เตรียมสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล

1.4.2 เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ ในที่นี้ใช้อาหารชนิด TNM-FH

1.4.3 เพิ่มปริมาณเซลล์ไลน์ SF9 ในขวดทดลองขนาด 25 ตารางเซนติเมตร

1.4.4 ศึกษากราฟการเจริญ (growth curve) ของเซลล์ไลน์ SF9 คำนวณค่า Population doubling time จากสูตร (Mitsubishi, 2002)

$$PDT = (t-t_0) \log 2 / (\log N_t - \log N_0)$$

t_0	หมายถึง	เวลาเริ่มต้นที่นับเซลล์หรือปลูกเซลล์ (ชั่วโมงหรือวัน)
t	หมายถึง	เวลาที่เก็บเกี่ยวเซลล์ ช่วงที่เซลล์มีการเจริญสูงสุด (ชั่วโมงหรือวัน)
N_0	หมายถึง	จำนวนเซลล์ที่ปลูก (ต่อมิลลิลิตรหรือตารางเซนติเมตร) ณ เวลา t_0
N	หมายถึง	จำนวนเซลล์ที่เก็บเกี่ยว (ต่อมิลลิลิตรหรือตารางเซนติเมตร) ณ เวลา t

1.4.5 ทดสอบความเป็นพิษ ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ SF9 โดย MTT assay คำนวณค่า % Cytotoxicity (Valdivieso-Garcia และคณะ, 1993)

$$\% \text{ Cytotoxicity} = [(A-B)/A] \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงในหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B = ค่าการดูดกลืนแสงในหลุมที่มีเซลล์ในสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในแต่ละความเข้มข้น

1.4.6 การเตรียมหัวเชื้อไวรัส (virus inoculum)

1. ปลูกเซลล์ไลน์ S9 ในอาหาร TNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 5 โดยให้จำนวนเซลล์มีชีวิตเริ่มต้น 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดพลาสติกขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ปริมาตรขวดละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด จากนั้นนำบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

2. ดูดอาหารเดิมทิ้งไป และเติมไวรัสในรูปของ Extracellular virus (ECV) ลงไปขวดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบต่ำสุด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. เมื่อครบกำหนด ดูดไวรัสออกทั้งหมด และเติมอาหารใหม่ลงไปขวดละ 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4. เก็บเกี่ยวไวรัส ทำการดูดเซลล์โดยใช้อาหารเดิม จากนั้นดูดใส่หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนของ supernatant ซึ่งมี ECV และตะกอนเซลล์

5. ดูดส่วนที่เป็น supernatant ใส่หลอดไวแอล (vial) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ส่วนตะกอนเซลล์ให้เติม SDS ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.4.7 การคำนวณค่าไวรัสไตเตอร์ของหัวเชื้อไวรัส

1.4.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัส AcMNPV ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก จากนั้นนำไปคิดค่า % reduction จากสูตร

$$\% \text{ Reduction} = 100 - \left(\frac{\text{ปริมาณไวรัสในสารสกัด (pfu/ml)}}{\text{ปริมาณไวรัสในอาหาร (pfu/ml)}} \right) \times 100$$

ปรับค่า % reduction ให้เป็นค่าที่แท้จริง ดังนี้

$$\% \text{ Reduction ที่แท้จริง} = \% \text{ Reduction} - \% \text{ cytotoxicity}$$

1.4.9 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ด้วยวิธีของดันแคน (Duncan's New Multiple Range Test) (สุรพล, 2528) คำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS 17.0 และทำการหาค่าความเป็นพิษที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ของสารสกัดด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทำให้ทราบช่วงความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในตัวทำลายทั้ง 3 ชนิด ที่เป็นพืชต่อเซลล์ไลน์ SF9 (*Spodoptera frugiperda*) มากที่สุด

1.5.2 สามารถทราบถึงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ที่มีผลต่อการจำลองตัวเองของ *AcMNPV*

1.5.3 เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญชนิดอื่นๆ และนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการควบคุมแมลงศัตรูพืชแบบผสมผสานต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นหนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour.)

หนอนตายหยาก เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Stemonaceae เป็นไม้เลื้อยหรือไม้เนื้ออ่อนที่มีรากอยู่ใต้ดินจำนวนมาก มีรูปร่างคล้ายกระสวยหรือทรงกระบอก อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (รูปที่ 2.1 ข.) ยาวประมาณ 10-30 เซนติเมตร ใบเดี่ยว (รูปที่ 2.1 ก.) กว้าง 4-6 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร ติดอยู่กับลำต้นแบบสลับ ก้านใบยาว ฐานใบเว้ารูปหัวใจ ปลายใบแหลม เส้นใบเรียงในแนวขนานกับขอบใบดอก ออกดอกเดี่ยว ออกตามง่ามใบ กลีบดอกมี 4 กลีบ (รูปที่ 2.1 ค.) กลีบดอกด้านนอกสีเขียวอมเหลือง ลักษณะของผล เป็นฝักเล็กปลายจะแหลมกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ผลแห้งจะแตก (รูปที่ 2.1 ง.) (นิจศิริ, 2547)



รูปที่ 2.1 ต้นหนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour) ก. ลักษณะของใบ ข. ลักษณะของราก
ค. ลักษณะของดอก ง. ลักษณะของผล (นิจศิริ (2547))

2.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของรากหนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour)

ไพฑูรย์ และคณะ (2539) นำส่วนรากของต้นหนอนตายหยากมาใช้แทนการใช้สารเคมีฆ่าแมลง โดยทดสอบความเป็นพิษ และประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูในโรงเก็บ ทดสอบกับแมลงที่สำคัญ 2 ชนิด คือ มอดหัวป้อม (*Phytophera deminica* F.) และด้วงงวง (*Sitophilus* spp.) ผลการทดสอบความเป็นพิษและประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดแมลงในห้องปฏิบัติการพบว่าสารสกัดจากรากของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สวจนไวสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้นหนอนตายหยากมีพิษต่อมอดหัวป้อม ถ้าระดับความเข้มข้นสูงมากขึ้นจะมีผลทำให้มอดหัวป้อมตายเร็วและตายจำนวนมากขึ้น เมื่อครบ 30 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิลิตร/ข้าวกล้อง 200 กรัม มีมอดหัวป้อมตายร้อยละ 28, 46 และ 81 ตามลำดับ สำหรับด้วงวงงข้าว พบว่าสารสกัดจากรากหนอนตายหยากในอัตราและความเข้มข้นดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อด้วงวงงน้อยมาก เมื่อครบ 30 วัน ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิลิตร/ข้าวกล้อง 200 กรัม มีด้วงวงงตายร้อยละ 2, 1 และ 2 ตามลำดับ แสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน สารสกัดจากรากต้นหนอนตายหยากมีความเป็นพิษต่อมอดหัวป้อมมากกว่าด้วงวงง

ประเทศจีนจัดหนอนตายหยากเป็นพืชสมุนไพรในการรักษาโรคมะเร็งและมีฤทธิ์ต้านปรสิตภายนอกในร่างกายคนและสัตว์เลี้ยง ทั้งนี้ใช้ร่วมกับกับยาชนิดอื่นๆ (Lee และ Chiang, 1994) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในรากหนอนตายหยาก ได้แก่ อัลคาลอยด์ (alkaloids) สติลบินอยด์ (stilbenoids) และโทโคเฟอรอล (tocopherols) (Li และคณะ, 2007) จากการศึกษาชนิดของอัลคาลอยด์ในรากของหนอนตายหยาก (*S. tuberosa*) จำแนกได้ 7 ชนิด ได้แก่ 2-oxostenine, tuberostemonine, sessilifoliamide H, tuberostemonone, didehydrotuberostemonine, bisdehydrostemoninine, และtuberostemoamide (Hu และคณะ, 2009)

Akanitapichat *et al.* (2005) ศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสและต้านมะเร็ง ของรากหนอนตายหยากชนิด *Stemona collinsae* โดยสกัดในตัวทำละลายชนิด dichloromethane-methanol (DCM-M, 1:1) 95% ethanol และ aqueous extracts พบว่าสารสกัดหยาบชั้น DCM-M มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริม (herpes simplex virus, HSV) ชนิด 1 และ 2 โดยมีค่า $IC_{50} = 105 \pm 3.5$ และ 107 ± 6.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบชั้นเอทานอล และสารสกัดหยาบในชั้นน้ำมีฤทธิ์ต้านไวรัสเริมต่ำกว่าสารสกัดหยาบชั้น DCM-M มีค่า $IC_{50} = 300$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนฤทธิ์ต้านมะเร็ง KB และ MCF-7 มีค่า $CC_{50} = 85-270$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

Phurimsak และ Leardkamolkarn (2005) *S. tuberosa* สามารถยับยั้งไวรัส DEN2 ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (100% plaque inhibition) และเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิง (monkey kidney, LLC-MK2 cell lines) พบว่าค่า $CC_{50} = 2,590$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

Soonthornchareonnon และคณะ (2005) ทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเล ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก (*S. tuberosa*) โดยหมักในเอทานอล 80% พบว่าค่า $LD_{50} = 745$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

Promsiri และคณะ (2006) สกัดรากหนอนตายหยากด้วยเอทานอล 80% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) ระยะที่ 4 พบว่าค่า $LC_{50} = 75.2$ และ $LC_{90} = 114.9$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง และค่า $LC_{50} = 65.8$ และ $LC_{90} = 105.0$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อบ่มนาน 48 ชั่วโมง

Greger (2006) ศึกษาการใช้สารสกัดจากรากหนอนตายหยากต้านโรควัณโรค (anti-tuberculosic) ต้านเชื้อรา (antifungal) และต้านมะเร็ง (anticancer) Li และคณะ (2007) ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็ง medullary thyroid carcinoma (MIC) ซึ่งเป็น neuroendocrine tumor เกิดที่ต่อมไทรอยด์ และรักษาด้วยยาเคมีได้ไม่ดีนัก ดังนั้นจึงทำการสกัดสารจากรากหนอนตายหยาก ด้วยตัวทำละลาย ดังนี้ เฮกเซน (n-hexane fraction, ST-2) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane (DCM) fraction, ST-2) เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate (EtOAc) fraction, ST-3) และเมทานอล (methanol fraction, ST-4) และทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดดังกล่าวข้างต้นกับเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ MTC-SK และ SINJ พบว่า DCM fraction, ST-2 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด มีค่า $LC_{50} = 50$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อบ่มในเซลล์นาน 24 ชั่วโมง แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติของมนุษย์ (non-cancer human fibroblast cells, HF-SAR)

Issakul และคณะ (2007) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากรากหนอนตายหยาก (*S. tuberosa*) โดยทดสอบกับ brine shrimp ที่ฟักออกจากไข่ มีอายุ 48 ชั่วโมง และบ่มในสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าค่าความเป็นพิษที่ทำให้ brine shrimp ตายร้อยละ 50 เท่ากับ 253.27 มิลลิกรัม/ลิตร

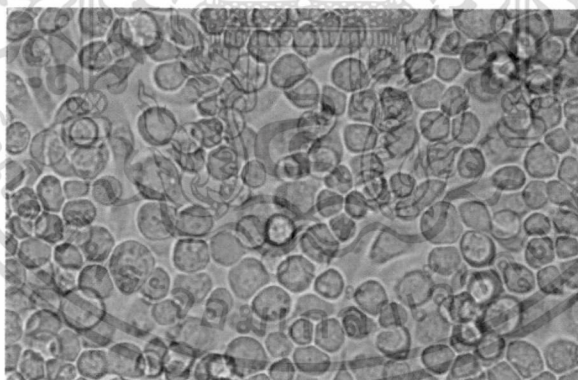
ธวัชชัย และ พนมกร (2551) ศึกษาพบว่าน้ำสกัดชีวภาพสมุนไพรหนอนตายหยากมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอน ดักแด้ และแมลงวันตัวเต็มวัยได้ดีกว่าน้ำสกัดชีวภาพสับปะรด โดยประสิทธิภาพในการควบคุมจะเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนน้ำสกัดชีวภาพที่สูงขึ้น แสดงว่าการนำพืชสมุนไพรมาใช้หมักเพื่อควบคุมหนอนแมลงวันมีความเป็นไปได้

นงคันทนา (2551) ศึกษาการใช้น้ำสกัดชีวภาพหนอนตายหยากเป็นปุ๋ยสำหรับการผลิตถั่วเหลือง ผลการศึกษา พบว่า น้ำสกัดชีวภาพหนอนตายหยากต่อน้ำธรรมดาในอัตราส่วน 2 : 1,000 ส่งผลให้ถั่วเหลืองมีแนวโน้มการเจริญเติบโตในส่วนของน้ำหนักแห้งของฝัก น้ำหนักแห้งรวมผลผลิต จำนวนฝักต่อต้น น้ำหนักเมล็ด และปริมาณโปรตีนในเมล็ดมากกว่าหน่วยการทดลองอื่นๆ รวมถึงมีระยะเวลาเจริญเติบโตทางการแพร่ขยายพันธุ์ที่ยาวกว่าปุ๋ยเคมี ส่วนความสูง จำนวนข้อ และพื้นที่ใบนั้น ปุ๋ยเคมีมีค่าสูงกว่าเล็กน้อย

Kim และคณะ (2008) ศึกษาความเป็นพิษของหนอนตายหยาก (*S. tuberosa*) โดยการหมัก และทดสอบให้สัมผัสกับผิวหนังของหนอนใยผัก *Plutella xylostella* (L.) ระยะที่ 3 พบว่าค่า $LC_{50} = 25,000$ ppm

เพ็ญญา และคณะ (2549) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากพืชต่อไปนี้ เมล็ดน้อยหน่า ใบน้อยหน่า ฝักยี่โถ เมล็ดเทียนหยด เหง้าว่านน้ำ เมล็ดสลอด หัวบอระเพ็ด พุงช้าง ผลมะคำดีควาย และ รากหนอนตายหยาก ที่มีต่อลูกน้ำยุง 2 ชนิด ได้แก่ ยุงลายบ้าน *Stegomyia aegypti* และ ยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* โดยใช้วิธีการสกัดสมุนไพรที่เหมือนกัน คือ วิธีการหมัก แต่ใช้ตัวทำละลายต่างกัน คือน้ำ และ เอทานอล โดยใช้ลูกน้ำระยะที่ 3 ช่วงปลาย (late third instar larvae) และ ระยะที่ 4 ตอนต้น (early fourth instar larvae) มาทำการทดสอบ ผลที่ได้คือประสิทธิภาพของสารสกัด 70% ethanol ต่อลูกน้ำยุงลายเรียงจาก มากไปหาน้อย ดังนี้ เมล็ดน้อยหน่า มะคำดีควาย เมล็ดสลอด เหง้าว่านน้ำ ใบน้อยหน่า และ เมล็ดเทียนหยด ตามลำดับ และประสิทธิภาพของสารสกัด 70% ethanol ต่อลูกน้ำยุงรำคาญเรียงจากมากไปหาน้อย ดังนี้ เมล็ดน้อยหน่า, หนอนตายหยาก, ยี่โถ, เมล็ดสลอด, เหง้าว่านน้ำ และ ใบน้อยหน่า

2.3 เซลล์ไลน์ *Spodoptera frugiperda* (SF9 cell line) (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 เซลล์ไลน์ *Spodoptera frugiperda* (*Spodoptera frugiperda* cell line, SF9)

Vaughn และคณะ (1997) ทำการสร้างเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อรังไข่ในระยะดักแด้ ของแมลงชนิด *Spodoptera frugiperda* และตั้งชื่อเซลล์ไลน์นี้ว่า IPLB-Sf-21 ต่อมาได้ทำการโคลนเซลล์เพื่องานวิจัยในด้านต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน ซึ่งใช้แบคทีริโอไวรัสที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์ชนิดนี้ โคลนที่สำคัญของแมลงชนิดนี้คือ โคลนที่ 9 ซึ่งให้ชื่อว่า SF9 ปัจจุบันนิยมใช้ศึกษาวิจัยในหลายด้าน และมีบริษัทที่เป็นตัวแทนจำหน่ายเซลล์ชนิดนี้ สำหรับโครงการวิจัยนี้ใช้เซลล์ไลน์ SF9 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

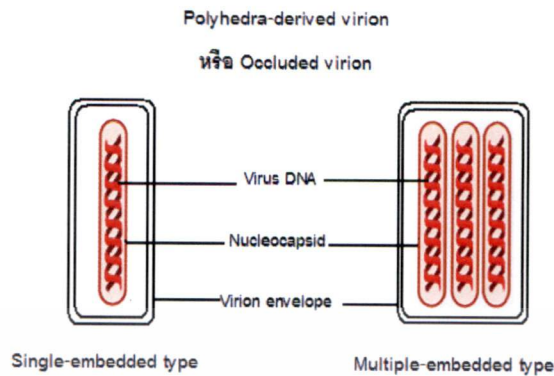
Cat. No. 11496-015 บริษัท GIBCO Invitrogen cell culture ซึ่งเซลล์ไลน์ชนิดนี้สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากซีรัมได้

2.4 *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)

Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus AcMNPV เป็นไวรัสโรคแมลง อยู่ใน Family Baculoviridae Genus Nucleopolyhedrovirus ซึ่งแยกได้ครั้งแรกจากแมลงชนิด Alfalfa looper (*Autographa californica*) มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์แมลงหลายชนิด เช่น Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) และ หนอนคืบกะหล่ำ (Cabbage looper, *Trichoplusia ni*) มีดีเอ็นเอเส้นคู่พันเกลียวเป็นวงกลม (supercoiled circular double-stranded DNA) มีขนาดประมาณ 135 Kb (Richardson, 1995; Vialard และคณะ, 1995) อนุภาคไวรัสเป็นท่อนตรง มีผนังล้อมรอบ และอยู่ในเปลือกโปรตีนที่ไวรัสสร้างขึ้น (capsid protein) ทั้ง capsid และ core รวมเรียกว่า นิวคลีโอแคพซิด (ทิพย์วดี, 2549; Bergold, 1963; Hughes, 1972) ลักษณะนิวคลีโอแคพซิดเป็นท่อนตรง (rod-shaped) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40-50 นาโนเมตร และยาวประมาณ 200-400 นาโนเมตร (Harrap, 1972) AcMNPV มีน้ำหนักโมเลกุล 7 กิโลดาลตัน (Szewczyk *et al*, 2006) มีนิวคลีโอแคพซิดที่มีผนังล้อมรอบเรียก วิวีรอน มี 2 แบบ คือ single-embedded virion และ multiple-embedded virion (รูปที่ 2.3) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนนิวคลีโอแคพซิดที่รวมกันอยู่ในผนังล้อมรอบ จากลักษณะดังกล่าวข้างต้นจึงแบ่งแบคทีเรียไวรัสออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

: Single-embedded virus (SEV) (Adams and McClintock, 1991) หรือ Single-nucleocapsid NPV (SNPV) (Volkman and Knudson, 1986) คือ อนุภาคของไวรัส (occlusion derived virus, ODV) ซึ่งภายใน 1 envelope มีเพียง 1 nucleocapsid เท่านั้น ได้แก่ *Heliothis zea* SNPV (*HsSNPV*) (Ignoffo และคณะ, 1971) *Helicoverpa armigera* SNPV (*HaSNPV*) *Trichoplusia ni* (*TnSNPV*) *Bombyx mori* (*BmSNPV*) (ทิพย์วดี, 2549) และ *Ordya leucostigma* SNPV (*OlsNPV*) (Sohi และคณะ, 1984)

: Multiple-embedded virus (MEV) (Adams and McClintock, 1991) หรือ Multinucleocapsid NPV (MNPV) (Volkman and Knudson, 1986) อนุภาคของไวรัส (occlusion derived virus, ODV) ซึ่งภายใน 1 envelope มี nucleocapsid หลายอัน ได้แก่ *Autographa californica* MNPV (*AcMNPV*) *Spodoptera frugiperda* MNPV (*SfMNPV*) (ทิพย์วดี, 2549) และ NPV ของหนอนคืบกะหล่ำในต่างประเทศ พบทั้งสองรูปแบบ คือ *TnSNPV* และ *TnMNPV* (Attathom, 1978)



รูปที่ 2.3 ลักษณะโครงสร้างของ Occluded virion 2 รูปแบบ คือ single-embedded virion และ multiple-embedded virion (ภาพดัดแปลงจาก ทิพย์วดี, 2549)

ตลอดการเข้าทำลายแมลงแต่ละตัวนั้น นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสจะสร้างไวรัสที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างกัน 2 แบบ ดังนี้ (ทิพย์วดี, 2549)

ก. Polyhedra derived virion (PDV) หรือ Occlusion derived virion (ODV) จัดเป็น invasive form เป็นรูปแบบของไวรัสที่สร้างขึ้นในนิวเคลียสของเซลล์ และฝังตัวอยู่ในผลึกโปรตีน ไวออนชนิดนี้มีผนังล้อมรอบซึ่งสร้างขึ้นใหม่โดยไวรัสเองในนิวเคลียสของเซลล์ที่ถูกทำลาย (Hughes, 1972; Stoltz และคณะ, 1973; Adams and McClintock, 1991) ไวออนรูปแบบ PDV มีหน้าที่ออกจากแมลงตัวเดิมและเข้าทำลายแมลงตัวใหม่ เพื่อเริ่มกระบวนการ primary infection ของไวรัส (ทิพย์วดี, 2549)

ข. Extracellular virion (ECV) หรือ Budded virion (BV) หรือ Nonoccluded virion (NOV) (Adams and McClintock, 1991) เป็นอีกรูปแบบหนึ่งของไวรัสที่สร้างขึ้นในนิวเคลียสของเซลล์ เป็นไวรัสที่ไม่เข้าไปอยู่ในผลึกโปรตีน เพราะจะต้องเคลื่อนตัวออกจากเซลล์เริ่มต้น (เซลล์รอบท่ออาหาร) เพื่อเข้าทำลายเซลล์อื่นต่อไป (secondary infection) (Tanada and Hess, 1976) ECV เกิดจากการ budding ของนิวคลีโอแคพซิด ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ของเซลล์ที่ติดเชื้อ แล้วออกสู่ของเหลวภายนอกเซลล์ อนุภาคของ ECV เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่านิวคลีโอแคพซิดเป็นรูปท่อน (rod-shaped nucleocapsid) ล้อมรอบด้วย envelope อย่างหลวมๆ เมื่อสังเกตปลายด้านหนึ่งของ envelope จะพบส่วนที่เรียกว่า peplomer มีลักษณะเป็นส่วนคล้ายหนามยื่นออกมา โครงสร้างพิเศษนี้ประกอบด้วย โกลโคโปรตีน gp64 (envelope fusion protein) (Adams และคณะ, 1977) ซึ่งไม่พบใน OV ระหว่างการเข้าติดเชื้อระยะ secondary infection โกลโคโปรตีน gp64 เป็นส่วนที่นำทางให้ไวรัสเคลื่อนเข้าสู่เซลล์อื่น โดยกระบวนการ adsorptive endocytosis (Volkman and Goldsmith, 1985)

2.4.1 ขั้นตอนการจำลองตัวเองเพื่อเพิ่มปริมาณของไวรัส NPV ในระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์

กระบวนการติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสในเซลล์ไลน์แมลง แบ่งออกเป็น 3 ระยะ ดังนี้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Early phase (the virus synthesis phase) เป็นระยะเริ่มต้นมีการจับกันของอนุภาคไวรัสกับ receptor ที่ผิวเซลล์แมลง และเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี membrane fusion หรือ adsorptive endocytosis ซึ่งการ fusion ระหว่างเยื่อหุ้มไวรัสกับ endosome จะเกิดในสถานะที่เป็นกรดจากนั้นนิวคลีโอแคพซิดจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เข้าไปในไซโตพลาสซึม และนิวคลีโอแคพซิดเท่านั้นที่ผ่านเข้าไปในนิวเคลียสทาง nuclear pore ของเซลล์แมลง ต่อมาดีเอ็นเอของไวรัสจะแยกออกจากแคพซิด เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ capsid-associated protein kinase ทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตใน basic p 6.9 (รูปที่ 2.4) และสามารถพบดีเอ็นเอของไวรัสภายในเวลา 30 นาที หลังจากปลูกเชื้อไวรัสลงในเซลล์แมลง จากนั้นไวรัสจะจำลองตัวเองภายใน 6 ชั่วโมงหลังจากทำให้ติดเชื้อ ดังนั้นระยะ viral synthesis จะปรากฏระหว่าง 0.5-6 ชั่วโมง หลังจากทำให้ติดเชื้อ

2. Late phase (The viral structure phase) เป็นช่วงเวลาที่มีการแสดงออกของ late gene และมีการจำลองดีเอ็นเอในขณะเดียวกัน เป็นช่วงที่มีการสร้างอนุภาคไวรัสอิสระ (extracellular virus, ECV, Budded virion, BV หรือ Non-occluded virion, NOV) ซึ่งไวรัสอิสระมี plasma membrane envelope และไกลโคโปรตีน (glycoprotein, gp) 64 ซึ่งจำเป็นกับไวรัสสำหรับการเข้าไปในเซลล์โฮสต์ด้วยวิธี endocytosis ระยะ late phase เกิดในช่วง 6-24 ชั่วโมงหลังจากทำให้ติดเชื้อ และมีการสร้างจำนวนไวรัสอิสระสูงสุดในช่วงเวลาระหว่าง 12-24 ชั่วโมงหลังจากทำให้ติดเชื้อ หลังจากนั้นการสร้างไวรัสอิสระจะลดลง

3. Very late phase (The viral occlusion protein phase) เป็นระยะที่มีการแสดงออกของ very late gene เช่น polyhedron และ p10 gene เริ่มต้นประมาณ 20 ชั่วโมงหลังจากทำให้ติดเชื้อ โดย polyhedrin gene ควบคุมการสร้างโปรตีน polyhedrin ที่มีขนาด 29 กิโลดาลตัน เพื่อห่อหุ้มอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในนิวเคลียสได้ไวรัสชนิด Occluded virion (OV) (Occlusion derived virion, ODV หรือ Polyhedral inclusion body, PIB หรือ Occlusion body, OB) มีการสร้างเยื่อหุ้มอนุภาคไวรัสเรียก *de novo* membrane และ virus polypeptide gp41 และ gp74 อนุภาคไวรัสถูกห่อหุ้มด้วย crystalline polyhedra matrix เป็นผลึกโปรตีนในนิวเคลียส เมื่อมีจำนวนผลึกเกิดขึ้นจำนวนมากอัดอยู่ในนิวเคลียส จะทำให้เซลล์แมลงแตก และปลดปล่อยผลึกโปรตีนออกมา

กลไกการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์แมลงมี 2 วิธี

1. Adsorptive endocytosis เริ่มต้นจากการที่อนุภาคไวรัสจับกับ receptor บนผิวเยื่อหุ้มเซลล์แมลง จากนั้นเยื่อหุ้มเซลล์จะเว้าลงไป (invagination) ในที่สุดกลายเป็นถุง endosome หุ้มอนุภาคไวรัส ต่อมาเกิดกระบวนการ acidification ซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ภายใน endosome ลดลง กระตุ้นให้เกิดการ fusion ระหว่าง viral envelope กับ endosome membrane จากนั้นมีการปลดปล่อยนิวคลีโอแคพซิดออกสู่ไซโตพลาสซึม และนิวคลีโอแคพซิดจะผ่านเข้าไปในนิวเคลียสทาง nuclear pore ต่อมา มีการจำลองตัวเองของไวรัสเกิดขึ้นภายในนิวเคลียส (รูปที่ 2.5)

2. Plasma membrane fusion เมื่อไวรัสจับกับเซลล์แล้ว จะเกิดกระบวนการ plasma membrane fusion โดยการที่ envelope ของไวรัสหลอมรวมกับพลาสมาเมมเบรนของเซลล์แมลง (รูปที่ 2.6) และปล่อยเฉพาะส่วนของนิวคลีโอแคพซิดเข้าไปในไซโตพลาสซึม และผ่านเข้าสู่นิวเคลียสทาง nuclear pore ต่อไป ต่อจากนั้นส่วนของ viral genome จะหลุดออกมาจากแคพซิด และมีการจำลองตัวเองของไวรัสเกิดขึ้นในนิวเคลียสต่อไป

2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัด ใช้วิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Mosmann, 1983) โดย MTT สามารถเข้าสู่เซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น โดยปกติสารละลาย MTT มีสีเหลือง แต่เมื่อเข้าไปในเซลล์ จะถูกรีดิวซ์ (reduce) โดย mitochondrial dehydrogenase (succinate dehydrogenase) เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ formazan มีสีม่วง ต่อมาใส่สารละลายลงในเซลล์ เซลล์จะแตก ผลิตภัณฑ์ formazan ละลายออกมาเป็นสีม่วง ความเข้มของสีม่วงจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์มีชีวิต จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่นระหว่าง 550-600 nm ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ filter ที่มีในห้องทดลอง และควรจะมีค่า reference wavelength มากกว่า 600 nm (Buckberry, 2005; Edziri *et al.*, 2011) นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่า % cytotoxicity จากสูตรต่อไป (Valdivieso-Garcia และคณะ, 1993; Sunilson, *et al.*, 2009, อุณเรื่อน และสุพัตรา, 2555)

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \left[\frac{A - B}{A} \right] \times 100$$

- A = ค่าการดูดกลืนแสงในหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)
 B = ค่าการดูดกลืนแสงในหลุมที่มีเซลล์ในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก
 แต่ละความเข้มข้น

2.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัส AcMNPV

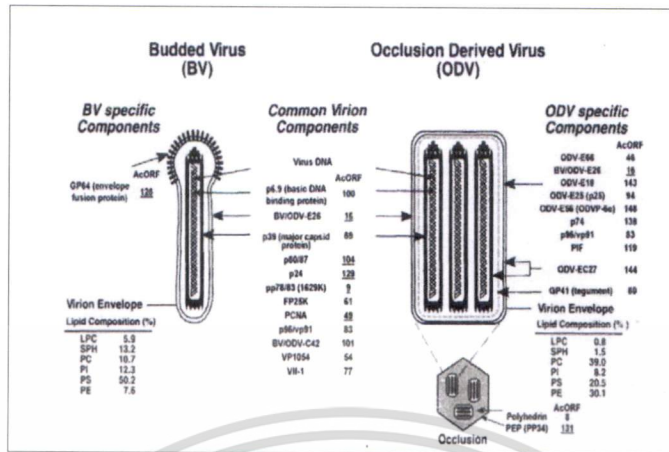
Kati *et al.* (2001) ศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสโรคแมลง AcMNPV โดยใช้สารสกัดหยาบจากพืชชนิด *Primula longipes* ส่วน Sökmen (2001) ศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสริมโดยใช้เซลล์ไลน์ Vero โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\% \text{ Reduction} = 100 - \left[\frac{\text{ปริมาณไวรัสในสารสกัด (pfu/ml)}}{\text{ปริมาณไวรัสในอาหาร (pfu/ml)}} \right] \times 100$$

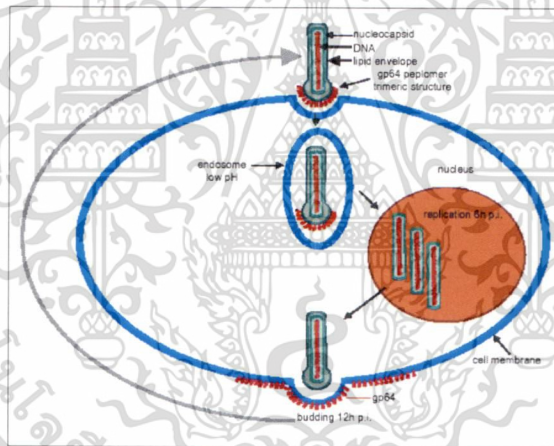
คำนวณค่า % reduction ที่แท้จริง (corrected % reduction) จากสูตร

$$\% \text{ Reduction ที่แท้จริง} = \% \text{ Reduction} - \% \text{ cytotoxicity}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

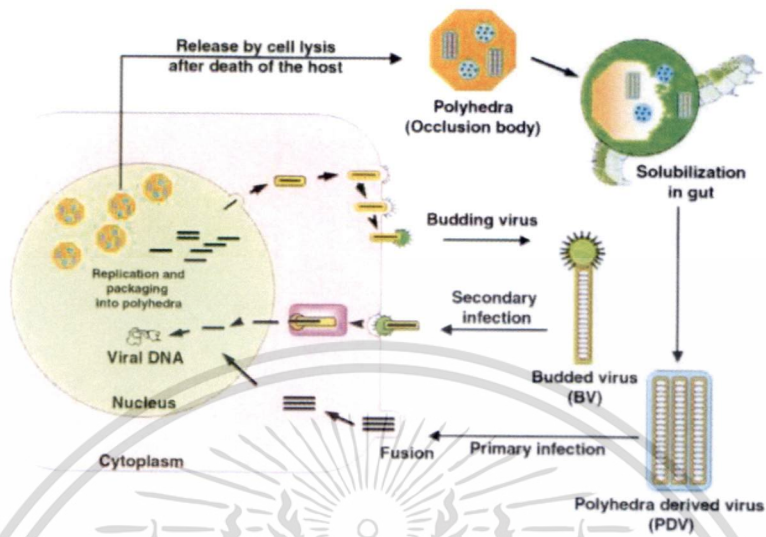


รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะโครงสร้างของนิวคลีโอโพลีดีโรวายรัส 2 รูปแบบ คือ Budded virion (BV) และ Occlusion derived virion (ODV) (O’ Reilly et al., 1992)



รูปที่ 2.5 อนุภาคไวรัสเข้าสู่ภายในเซลล์แมลงโดยวิธี adsorptive endocytosis และการเกิดถุง endosome ห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ในไซโตพลาสซึมของเซลล์โฮสต์ โดยส่วนของนิวคลีโอแคพซิดเท่านั้นที่ผ่าน nuclear pore เข้าภายในนิวเคลียส (Grabherr และคณะ, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 แสดงกลไกการติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีดรไวรัสเข้าสู่เซลล์แมลง โดยวิธี plasma membrane Fusion (Ghosh *et al.*, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย

3.1.1 อุปกรณ์

- 3.1.1.1 ตู้บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (low temperature incubator)
- 3.1.1.2 ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (laminar flow hood)
- 3.1.1.3 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted light microscope)
- 3.1.1.4 กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)
- 3.1.1.5 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer)
- 3.1.1.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 3.1.1.7 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave)
- 3.1.1.8 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- 3.1.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 3.1.1.10 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -70 องศาเซลเซียส
- 3.1.1.11 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 3.1.1.12 เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (automatic pipettor)
- 3.1.1.13 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH meter)
- 3.1.1.14 เครื่องเขย่าสารโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic sonicator)
- 3.1.1.15 เครื่องเขย่าแบบ rocking platform
- 3.1.1.16 ชุดกรองสารและแผ่นกรองช่องผ่านขนาด 0.22 และ 0.45 ไมโครเมตร
- 3.1.1.17 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดพลาสติกขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (tissue culture flask)
- 3.1.1.18 งานเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร
- 3.1.1.19 งานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate)
- 3.1.1.20 ขวดสำหรับบรรจุสาร ขนาด 50, 100, 500, 1,000 มิลลิลิตร
- 3.1.1.21 ไมโครเพลท รีดเดอร์ (microplate reader) และแผ่นกรอง (filter)
- 3.1.1.22 ปีเปตต์แก้วขนาด 1, 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร
- 3.1.1.23 เครื่องปั่นบด (blender)
- 3.1.1.24 ผ้าขาวบาง
- 3.1.1.25 เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (Vacuum evaporator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.1.26 ขวดขนาดเล็ก (vial)
- 3.1.1.27 กระจกทรง
- 3.1.1.28 แผ่นฟอยล์
- 3.1.1.29 หลอดสำหรับปั่นแยกสาร (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.1.2 สารเคมี

- 3.1.2.1 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซ (Grace's medium) แบบผง
- 3.1.2.2 แลกทาลบูมิน ไฮโดรไลเสท (lactalbumin hydrolysate)
- 3.1.2.3 ยีสต์โตเลท (yeastolate)
- 3.1.2.4 ซีรัม (fetal bovine serum ; FBS)
- 3.1.2.5 โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3)
- 3.1.2.6 ทริปแฟน บลู (trypan blue) ร้อยละ 0.4
- 3.1.2.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล (1 N NaOH)
- 3.1.2.8 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล (1 N HCl)
- 3.1.2.9 เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 และร้อยละ 95
- 3.1.2.10 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO)
- 3.1.2.11 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
- 3.1.2.12 เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และ เอทานอล
- 3.1.2.13 น้ำปราศจากไอออน (DI)

3.1.3 เซลล์แมลงและไวรัส

- 3.1.3.1 เซลล์ไลน์ที่ใช้คือ *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Cat.No.11496-015 (GIBCO Invitrogen cell culture)
- 3.1.3.2 ไวรัสโรคแมลงชนิด *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมสารสกัดจากรากหนอนตายหยาก

ทำการล้างรากของต้นหนอนตายหยากด้วยน้ำประปา จากนั้นใช้มีดหั่นรากหนอนตายหยากให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส จนกระทั่งรากหนอนตายหยากแห้งสนิท และบรรจุลงในถุงสุญญากาศ เก็บไว้ในตู้แช่เย็น -20 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะสกัดต่อไป

นำรากหนอนตายหยากที่อบแห้งแล้วมาบดให้ละเอียด ห่อด้วยผ้าขาวบางที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นแช่ลงในขวดโหล โดยให้มีอัตราส่วนของรากหนอนตายหยากต่อตัวทำละลายเฮกเซน เท่ากับ 1 กรัม : 15 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน ในตู้ที่มีด ระหว่างที่ทำการแช่ในตัวทำละลาย ต้องนำออกมาเขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 rpm นาน 1 ชั่วโมง ทุกวัน เมื่อครบ 7 วัน นำรากหนอนตายหยากที่ห่อด้วยผ้าขาวบางนี้ออกจากเฮกเซน ปล่อยให้แห้งสนิท จากนั้นนำรากหนอนตายหยากดังกล่าวข้างต้น ลงในตัวทำละลายต่อไป ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน และ เอทานอล ตามลำดับ โดยแช่ไว้เช่นเดียวกับการแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน นำสารสกัดทั้ง 3 ตัวทำละลาย กรองด้วยกระดาษกรองขนาดช่องผ่าน 0.45 ไมโครเมตร ทำการระเหยสารสกัดด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporater) เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกไป เหลือเพียงสารสกัดหยาบ ในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ใส่ลงในขวดขนาดเล็ก (Vial) ที่ทราบน้ำหนักขวด จากนั้นปิดปากขวดด้วยผ้าขาวบาง และปิดทับด้วยแผ่นฟอยล์ เจาะแผ่นฟอยล์เพื่อให้ตัวทำละลายที่เหลือระเหยออกทั้งหมด ห่อขวดด้วยแผ่นฟอยล์เพื่อป้องกันแสง ก่อนทดสอบต้องกำหนดความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ การเจือจางสารสกัดหยาบใช้ DMSO ร้อยละ 100 โดยความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดหยาบที่ใช้ทดสอบ ควรจะมี DMSO ไม่เกินร้อยละ 1 จากนั้นกรองด้วยแผ่นกรองขนาดช่องผ่าน 0.45 ไมโครเมตร เก็บสารสกัดหยาบที่กรองแล้วไว้ในขวดแก้ว ห่อด้วยแผ่นฟอยล์ และเก็บไว้ในตู้แช่เย็น -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมลงต่อไป

3.2.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ S9 (รุ่นเรือน, 2554)

3.2.2.1 เตรียมอาหาร TNM-FH โดยใช้อาหารเกรซ แบบผง 1 ขวด ละลายในน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) ที่ทำการปราศจากเชื้อแล้ว 800 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO₃) น้ำหนัก 0.35 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร จากนั้นเติม แลคทาบูมิน ไฮโดรไลเสท (lactalbumin hydrolysate) น้ำหนัก 3.33 กรัม และ TC- yeastolate น้ำหนัก 3.33 กรัม จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนที่ปราศจากเชื้อแล้ว ให้มีปริมาตร 1 ลิตร

3.2.2.2 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารในข้อ 3.2.2.1 โดยใช้ 1N HCl หรือใช้ 1N NaOH ให้มีค่า pH ประมาณ 6.1

3.2.2.3 กรองอาหารด้วยชุดกรองสาร โดยใช้แผ่นกรองที่ปราศจากเชื้อขนาดช่องผ่านเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร แบ่งอาหารเก็บใส่ขวดปราศจากเชื้อ ขวดละ 500 มิลลิลิตร เก็บอาหารในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.4 ทดสอบการปนเปื้อนของอาหารโดยดูอาหารปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด นำไปป้อนที่อุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

3.2.2.5 ทำการกรองซีรัม (FBS) ด้วยแผ่นกรองขนาดช่องผ่าน 0.22 ไมโครเมตรแบ่งใส่ขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อแล้ว ขวดละ 20 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2.6 นำอาหารที่ผ่านการทดสอบ และไม่มีการปนเปื้อน เดิมซีรัม (FBS) ลงในอาหารให้มี FBS ร้อยละ 10 เดิม Penicillin และ streptomycin ลงในอาหาร ความเข้มข้นสุดท้ายของ Penicillin เท่ากับ 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Ng and Schantz, 2010)

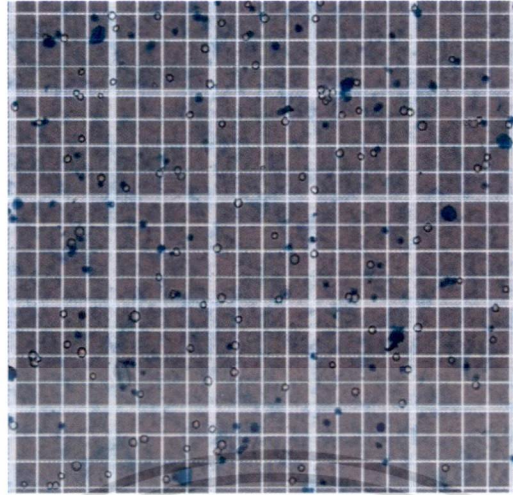
3.2.2.7 แบ่งอาหารที่เตรียมสมบูรณ์และปราศจากเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร วัดค่า pH ให้ได้เท่ากับ 6.18-6.2

3.2.3 การเพิ่มปริมาณเซลล์ไลน์ Sf9 ในขวดทดลอง (รุ่นเรือน, 2554)

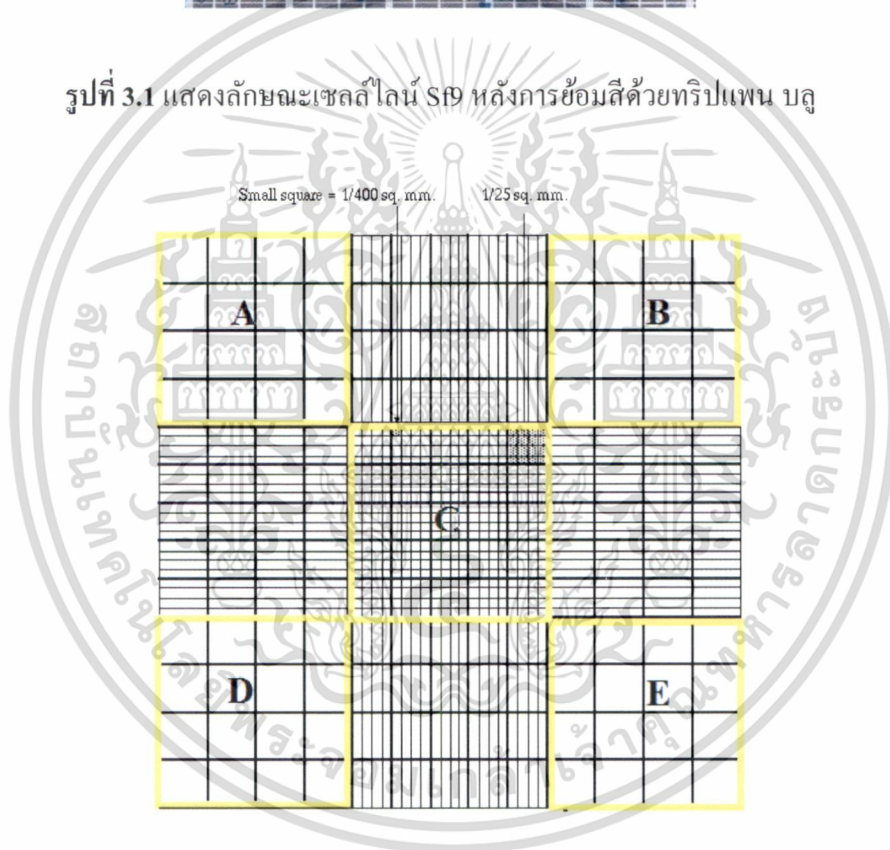
3.2.3.1 นำเซลล์ไลน์ Sf9 ที่เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 25 ตารางเซนติเมตร โดยพิจารณาเซลล์ที่เจริญบนพื้นผิวขวดประมาณร้อยละ 80-90 ของพื้นผิวทั้งหมด ซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted) เซลล์ที่สมบูรณ์จะมีลักษณะกลมมองเห็นขอบเซลล์และนิวเคลียสชัดเจน นอกจากนี้ต้องไม่ปรากฏแกรนูล (granule) และต้องไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อราแบคทีเรีย ยีสต์หรือจุลินทรีย์อื่นๆ

3.2.3.2 ดูดอาหารเดิมทิ้งทั้งหมด จากนั้นเติมอาหารใหม่ลงไป 5 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดเซลล์ (rubber policeman) ดูดเซลล์ออกจากผิวของขวด ดูดเซลล์แขวนลอยออกมาปริมาณ 0.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นแยกสาร (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมทริปแทน บลู ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน ดูดเซลล์ที่ย้อมสีแล้วใส่ลงในแอ่ง (chamber) ของฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer) ตรวจสอบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายในแต่ละช่องของฮีมาไซโตมิเตอร์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) โดยเซลล์มีชีวิตจะมีสีใสไม่ติดสีน้ำเงิน ส่วนเซลล์ตายจะติดสีน้ำเงินของทริปแทน บลู (รูปที่ 3.1)

3.2.3.3 นับจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ (primary square) ทั้งหมด 5 ช่อง คือ A, B, C, D และ E (รูปที่ 3.2) โดยแต่ละช่องมีความกว้าง 1 มิลลิเมตร ยาว 1 มิลลิเมตร และเมื่อปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) แต่ละช่องจะมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร ดังนั้นแต่ละช่องจะมีปริมาตรเท่ากับ $1/10 \times 1/10 \times 1/100 = 1/10,000$ ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ $1/10^4$ มิลลิลิตร หรือ 10^{-4} มิลลิลิตร และบันทึกจำนวนเซลล์มีชีวิต และเซลล์ตาย ทำการคำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะเซลล์ไลน์ Sfl9 หลังการย้อมสีด้วยทริปแฟน บลู



รูปที่ 3.2 ช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ (primary square) 5 ช่อง (A-E) บนฮีมาไซโตมิเตอร์ ที่ใช้นับจำนวนเซลล์

3.2.3.4 คำนวณหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร จากสูตร

$$\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร} = \bar{X} \times 10^4 \times \text{dilution factor}$$

$$\bar{X} = \text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต}$$

$$\text{Dilution factor} = \frac{\text{ปริมาตรเซลล์แขวนลอยที่ได้ออกมานับ} + \text{ปริมาตรสีย้อม}}{\text{ปริมาตรเซลล์แขวนลอยที่ได้ออกมานับ}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.5 ทำการถ่ายเซลล์ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์พลาสติกขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ขวดใหม่ ปลูกเซลล์มีชีวิตจำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรทั้งหมด 5 มิลลิลิตร ต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง โดยคำนวณได้จากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

หรือ

จำนวนเซลล์มีชีวิต/มล. ใน stock x ปริมาตร stock ที่ต้องใช้ = จำนวนเซลล์มีชีวิต/มล. ที่ต้องการ x ปริมาตรที่ต้องการ

ดังนั้น ปริมาตร stock ที่ต้องใช้ = (จำนวนเซลล์มีชีวิต/มล. ที่ต้องการ x ปริมาตรที่ต้องการ) / จำนวนเซลล์มีชีวิต/มล. ใน stock

3.2.3.6 นำขวดเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ที่ทำการปลูกเซลล์แล้วเก็บไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เซลล์จะเจริญเต็มพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยง แต่ถ้าเซลล์เจริญไม่เต็มพื้นผิว ต้องทำการเปลี่ยนอาหารใหม่และเก็บไว้ประมาณ 4 วัน จึงสามารถทำการถ่ายเซลล์ (subculture) ต่อไป

3.2.4 การศึกษากราฟการเจริญ (growth curve) ของเซลล์ไลน์ S19 (Mitsubishi, 2002)

3.2.4.1 นำเซลล์ไลน์ S19 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 10 ในขวดเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ทำการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ สังเกตการเจริญของเซลล์และการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์

3.2.4.2 ดูอาหารเดิมทิ้งทั้งหมด เติมน้ำใหม่ลงไป 5 มิลลิลิตร ใช้ที่ดูดเซลล์ดูดให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวทั้งหมด ใช้ปิเปตต์ดูดเซลล์แขวนลอยออกมาปริมาณ 0.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นแยกสารขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำรีแพน บลู ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน ดูเซลล์ที่ย้อมสีแล้วลงในแอ่ง (chamber) ของซีมาไซโตมิเตอร์ ตรวจสอบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์มีชีวิตจะมีสีใสไม่ติดสีน้ำเงิน ส่วนเซลล์ตายจะติดสีน้ำเงินของรีแพน บลู นับจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายจากช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ทั้งหมด 5 ช่อง บันทึกจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตรต่อไป

3.2.4.3 ปลูกเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร จำนวน 20 จานเพาะเลี้ยง ปริมาตรจานละ 2 มิลลิลิตร โดยให้มีจำนวนเซลล์มีชีวิตเริ่มต้นเท่ากับ 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดเก็บไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการนับจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายหลังจากปลูกเซลล์ทุกวัน จนครบ 10 วัน

3.2.4.4 ข้อมูลที่ได้นำมาแสดงในรูปของกราฟการเจริญของเซลล์ โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ทำให้เราทราบช่วงการเจริญของเซลล์ไลน์ S19 และคำนวณหาค่าของเวลาที่จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น 2 เท่า (population doubling time, PDT) จากสูตรต่อไปนี้ (Mitsubishi, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{Population doubling time (PDT)} = (t-t_0) \log 2 / (\log N - \log N_0)$$

N_0 คือ จำนวนเซลล์มีชีวิตตั้งต้นที่ทำการปลูก

N คือ จำนวนเซลล์มีชีวิตในวันที่เก็บเกี่ยว

t_0 คือ เวลาที่นับจำนวนเซลล์ตั้งต้น (คือ ชั่วโมงที่ 0 หรือ วันที่ 0)

t คือ เวลาที่มีจำนวนเซลล์สูงสุดก่อนที่จะลดจำนวนลง (กรณีที่มีจำนวนเซลล์ไม่ลดจำนวน ให้พิจารณาระยะเวลาหลังจากปลูกเซลล์ ซึ่งมีจำนวนเซลล์มีชีวิตเป็นสองเท่า หรือมากกว่าสองเท่าจากจำนวนเซลล์ตั้งต้น) ข้อมูลนี้ได้จากตารางบันทึกผลการนับจำนวนเซลล์ทุกวัน

3.2.5 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากที่มีผลต่อเซลล์ไลน์

SF9 โดยวิธี MTT assay (Mosmann, 1983)

3.2.5.1 ปลูกเซลล์ไลน์ SF9 ซึ่งเพาะเลี้ยงอาหาร TNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 5 จำนวนเซลล์มีชีวิตเท่ากับ 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในงานเพาะเลี้ยงพลาสติกที่มี 96 หลุม (96-well plate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ 1 คืน

3.2.5.2 ทำการเจือจางสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากในชั้น เฮกเซน (hexane) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) และเอทานอล (ethanol) ความเข้มข้น ดังนี้ 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.5.3 หลังจากบ่มเซลล์ไลน์ SF9 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว ดูดอาหารเก่าออก แล้วเติมสารสกัดจากรากหนอนตายหยากที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.5.2 ลงไป หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง

3.2.5.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ SF9

เตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้นเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำตาลละลาย MTT ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร หุ้มงานเพาะเลี้ยงด้วยแผ่นฟอยล์ เพื่อป้องกันแสง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อบ่มจนครบ 4 ชั่วโมงแล้วนำงานเพาะเลี้ยงออกจากตู้บ่ม ดูดอาหารที่มีสารละลาย MTT ทั้ง และเติมน้ำตาลละลาย SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 : DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 100 ในอัตราส่วน 1 : 9 หลุมละ 150 ไมโครลิตร เพื่อใช้ละลายสี จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร บันทึกผลของค่าการดูดกลืนแสง (Valdivieso-Garcia และคณะ, 1993; Sunilson, *et al.*, 2009, อุ๋นเรื่อน และสุพัตรา, 2555)

คำนวณหาค่าความเป็นพิษแต่ละความเข้มข้น ดังนี้

$$\% \text{ cytotoxicity} = [(A-B)/A] \times 100$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารสกัดแต่ละความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยค่า A และ B จะต้องนำค่าการดูดกลืนแสงของ Blank (ในที่นี้ คือหลุมที่เติมสารละลาย DMSO : 10% SDS) มาหักออกก่อน จากนั้นจึงนำไปคำนวณจากสูตรข้างต้น

3.2.6 การเตรียมหัวเชื้อไวรัส (virus inoculum)

3.2.6.1 ปลุกเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 5 จำนวนเซลล์มีชีวิตเริ่มต้นเท่ากับ 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดพลาสติกขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อขวด จำนวน 2 ขวด จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.6.2 เติมไวรัสในรูปของ Extracellular virus (ECV) ลงไปขวดละ 1 มิลลิลิตร โดยไม่ต้องดูดอาหารเดิมทิ้งจากนั้นนำไปเขย่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2.6.3 เมื่อครบกำหนด ดูดไวรัสออกทั้งหมด และเติมอาหารใหม่ลงไปขวดละ 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.2.6.4 เก็บเกี่ยวเซลล์และไวรัส โดยใช้ rubber policeman ขูดเซลล์ ไม่ต้องดูดอาหารเดิมทิ้ง ดูดเซลล์แขวนลอยใส่หลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนของ supernatant ซึ่งมี ECV และตะกอนเซลล์ที่มีไวรัสชนิด occlusion derived virus (ODV) โปรตีนอยู่ในเซลล์ที่ติดเชื้อ

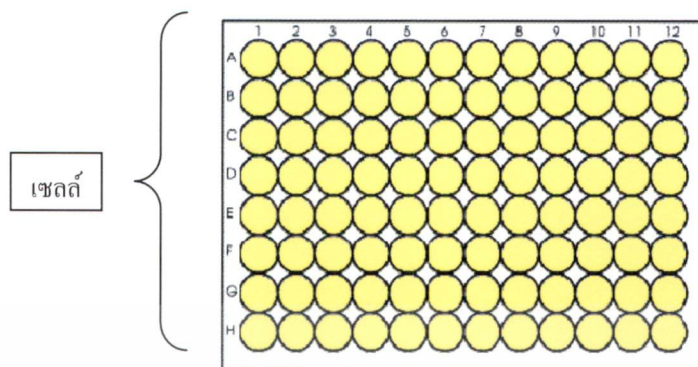
3.2.6.5 ใช้ปิเปตต์ดูด supernatant ซึ่งมี ECV ใส่ขวดขนาดเล็ก (vial) เก็บในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ส่วนตะกอนเซลล์ที่แยกได้มีไวรัสรูปแบบ occlusion derived virus (ODV) ให้เติม SDS ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปใช้ในเครื่อง ultrasonic sonicator นาน 30 นาที เพื่อให้เซลล์แตกและปลดปล่อยผลึกไวรัส ODV ออกมา

3.2.6.6 ทำการแยก SDS ออกโดยการปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วน supernatant ทิ้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดฟ้นเพื่อทำให้ตะกอนแขวนลอย ทำการนับจำนวนผลึกโปรตีนต่อมิลลิลิตร และคำนวณหาจำนวนผลึกโปรตีนต่อเซลล์ต่อไป

3.2.7 การหาค่าไวรัสไตเตอร์ของหัวเชื้อไวรัสโดยวิธี end-point dilution (O' Reilly *et al.*, 1992)

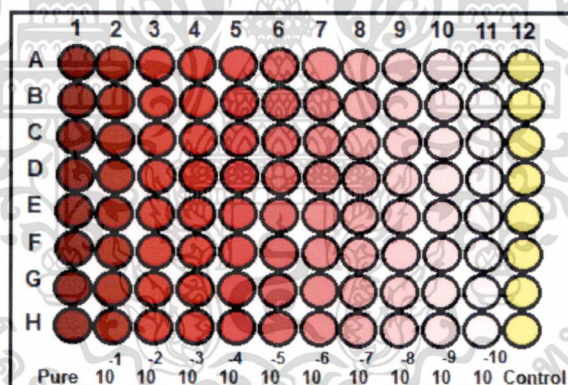
3.2.7.1 นำส่วนของ ECV มาทำการเจือจางเป็น 10 เท่าแบบต่อเนื่อง (serial ten-fold dilution) ดังนี้ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} และ 10^{-10} โดยเตรียมความเจือจางละ 450 ไมโครลิตร

3.2.7.2 ปลุกเซลล์ไลน์ S9 ในอาหาร TNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 5 ลงในงานเพาะเลี้ยงพลาสติกที่มี 96 หลุม (96-well plate) จำนวนเซลล์มีชีวิตเริ่มต้นเท่ากับ 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ดังรูปที่ 3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน



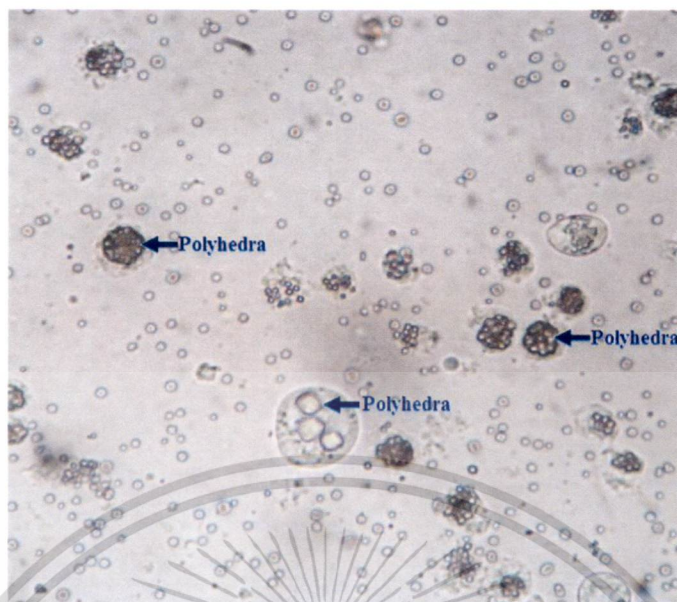
รูปที่ 3.3 แผนผังแสดงการปลูกเซลล์ไลน์ SF9 ลงในงานเพาะเลี้ยง 96 หลุม

3.2.7.3 เติมเชื้อไวรัสที่ทำการเจือจางดังกล่าวข้างต้น ลงในแต่ละคอลัมน์ (column) โดยเรียงลำดับจากความเข้มข้นมากที่สุดไปยังความเข้มข้นน้อยที่สุด ดังรูปที่ 3.4 ปริมาตรไวรัสที่ปลูก หลุมละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 3.4 แผนผังแสดงการปลูกเชื้อไวรัสรูปแบบ ECV ลงในเซลล์ไลน์ SF9 ค่าการเจือจาง 10^{-1} - 10^{-10}

3.2.7.4 ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส โดยสังเกตผลึกโพรตีน (polyhedra) ของไวรัสรูปแบบ ODV ที่เกิดขึ้นภายในนิวเคลียสของเซลล์ไลน์ SF9 ซึ่งผลึกจะมีลักษณะใสสะท้อนแสง ถ้าพบเซลล์ที่มีผลึกโพรตีนในหลุมใด บันทึกผลเป็น (+) และถ้าไม่พบผลึกโพรตีน บันทึกผลเป็น (-) ในหลุมนั้น



รูปที่ 3.5 แสดงเซลล์ไลน์ S9 ที่ติดเชื้อไวรัส มีผลึกโปรตีน (polyhedra) อยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์

3.2.7.5 การคำนวณค่าไวรัสไตเตอร์ของเชื้อไวรัส *AcMNPV* (O' Reilly *et al.*, 1992)

คำนวณหาค่า Proportionate distance (PD) โดยใช้ค่าของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมากกว่า 50 % และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อน้อยกว่า 50 % มาคำนวณโดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$PD = (A-50)/(A-B)$$

A = การติดเชื้อมากกว่าร้อยละ 50

B = การติดเชื้อน้อยกว่าร้อยละ 50

คำนวณหาปริมาณไวรัสที่ทำให้เซลล์ติดเชื้อร้อยละ 50 (50 % tissue-culture infective dose, TCID₅₀) จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{Log TCID}_{50} = \text{log ของค่าความเจือจางที่ทำให้เซลล์ติดเชื้อมากกว่า 50 \%} - (PD \times \text{log } h)$$

Log h = log 10 = 1 เนื่องจากทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution

จากค่า TCID₅₀ / มิลลิลิตร สามารถคำนวณหาค่า PFU/ มิลลิลิตร ได้จากสูตร ต่อไปนี้

$$PFU = TCID_{50} \times \mu$$

$$\mu = 0.69$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัส *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* ของ สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก

3.2.8.1 ปลุกเซลล์ไลน์ S9 ในอาหาร TNM-FH เสริมด้วยซีรัม FBS ร้อยละ 5 โดยให้มีจำนวนเซลล์มีชีวิตเริ่มต้นเท่ากับ 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.8.2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design: CRD) ประกอบด้วยสิ่งทดลอง 4 สิ่งทดลอง และแต่ละสิ่งทดลองทดสอบ 3 ซ้ำดังนี้คือ

สิ่งทดลองที่ 1 เซลล์ + อาหาร

สิ่งทดลองที่ 2 เซลล์ + สารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก

สิ่งทดลองที่ 3 เซลล์ + ไวรัส

สิ่งทดลองที่ 4 เซลล์ + ไวรัส + สารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก

3.2.8.3 นำเซลล์ไลน์ S9 ที่บ่มนาน 24 ชั่วโมงแล้ว งดอาหารเดิมทิ้งทุกจานเพาะเลี้ยงและดำเนินการต่อไปตามข้อกำหนดสิ่งทดลอง ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 งดอาหารเดิมทิ้งแล้วเติมอาหารใหม่ลงไป 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง

สิ่งทดลองที่ 2 งดอาหารเดิมทิ้งแล้วเติมสารสกัดหยาบในชั้นของตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษมากที่สุด โดยใช้ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง

สิ่งทดลองที่ 3 งดอาหารเดิมทิ้ง จากนั้นเติมไวรัสที่มีค่า MOI = 2 (ปริมาณไวรัสที่ใช้ติดเชื้อ 2 วัริออนต่อเซลล์ไลน์ S9 1 เซลล์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง จากนั้นบ่มบนเครื่อง rocking platform นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นงดไวรัสทิ้ง และเติมอาหารใหม่ลงไป ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง

สิ่งทดลองที่ 4 ทำเช่นเดียวกับสิ่งทดลองที่ 3 ต่างกันตรงที่หลังจากงดไวรัสออกทั้งหมดแล้วเติมสารสกัดหยาบในชั้นของตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษมากที่สุด ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง

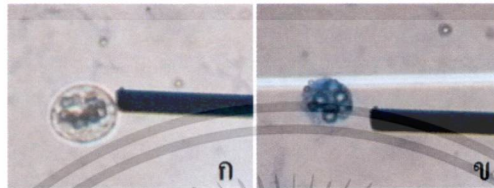
นำสิ่งทดลองทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

3.2.8.4 สิ่งทดลองทั้ง 4 เมื่อบ่มเซลล์ครบ 96 ชั่วโมง นำออกมานับจำนวนเซลล์

สิ่งทดลองที่ 1 และ 2 นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตาย คำนวณค่า ร้อยละเซลล์มีชีวิต และร้อยละเซลล์ตาย

สิ่งทดลองที่ 3 และ 4 นับจำนวนเซลล์มีชีวิต เซลล์ตาย เซลล์มีชีวิตติดเชื้อและเซลล์ตายติดเชื้อ (เพื่อคำนวณค่า ร้อยละเซลล์มีชีวิต ร้อยละเซลล์ตาย ร้อยละเซลล์มีชีวิตติดเชื้อ และร้อยละเซลล์ตายติดเชื้อ) จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอบ 3,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที คูด supernatant ซึ่งมีไวรัสรูปแบบ ECV ใส่ขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อ ส่วนตะกอนเซลล์ ทำให้เซลล์แตกออก โดยเติม SDS ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในเครื่อง sonicator นาน 30 นาที เพื่อให้เซลล์แตกและปลดปล่อยผลึกไวรัส ODV ออกมา จากนั้นทำการปั่นแยก SDS ออกทิ้ง ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm นาน 10 นาที คูดส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของ SDS ทิ้ง แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อให้ตะกอนแขวนลอย จากนั้นทำการนับจำนวนผลึกโปรตีนต่อมิลลิลิตร และจำนวนผลึกโปรตีนต่อเซลล์ต่อไป



รูปที่ 3.6 เซลล์มีชีวิตติดเชื้อ (ก) และเซลล์ตายติดเชื้อ โดยติดสีของทริปแทน บลู (ข)

3.2.8.5 ทำการปรับค่าร้อยละตาย (% mortality) ทั้ง 4 สิ่งทดลอง โดยใช้สูตรคำนวณของ Abbot (Abbot's formula) เป็นค่าร้อยละตายที่แท้จริง (corrected % mortality) ดังนี้ (Undeen and Vávra, 1997)

$$\text{Corrected \% mortality} = 100 \times \frac{(T\% - C\%)}{(100\% - C\%)}$$

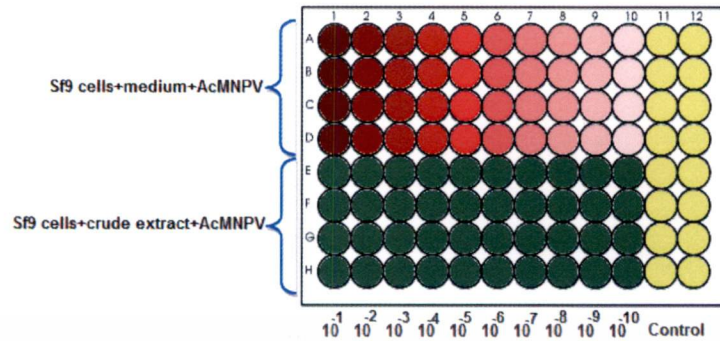
T% = ร้อยละเซลล์ตายในสิ่งทดลอง และ C% = ร้อยละเซลล์ตายในกลุ่มควบคุม (สิ่งทดลองที่ 1 คือ เซลล์+อาหาร)

3.2.9 การตรวจสอบค่าไวรัสไตเตอร์ *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus

3.2.9.1 ปักเซลล์ไลน์ S9 จำนวนเซลล์มีชีวิต 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในงานเพาะเลี้ยงพลาสต์ที่มี 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.2.9.2 เตรียมไวรัสรูปแบบ ECV ซึ่งอยู่ใน supernatant ของสิ่งทดลองที่ 3 (เซลล์ + ไวรัส) และสิ่งทดลองที่ 4 (เซลล์ + ไวรัส + สารสกัดจากรากหนอนตายหยาก) เจือจางเป็น 10 เท่า อย่างต่อเนื่อง (serial ten-fold dilution) ดังนี้ 10^{-1} , 10^{-2} , ... 10^{-10} โดยใช้อาหาร TNM-FH + FBS ร้อยละ 5

3.2.9.3 ทำการทดสอบค่าไวรัสไตเตอร์ ดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 แผนผังแสดงการทดสอบค่าไวรัสโคเดเตอร์ *AcMNPV*

(แถว A-D ในคอลัมน์ที่ 1-10 เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ SF9 ในอาหาร และ infect ไวรัส *AcMNPV* ความเจือจางเรียงลำดับจาก 10^{-1} - 10^{-10} ในคอลัมน์ที่ 1-10 ตามลำดับ แถว E-H ในคอลัมน์ที่ 1-10 เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ SF9 ในสารสกัดหยาบ และ infect ไวรัส *AcMNPV* ความเจือจางเรียงลำดับจาก 10^{-1} - 10^{-10} ในคอลัมน์ที่ 1-10 ตามลำดับ ส่วนคอลัมน์ที่ 11-12 กลุ่มควบคุม)

ปลูกเชื้อไวรัสแต่ละค่าความเจือจาง ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม ดังแผนผังในรูปที่ 3.7 ส่วนกลุ่มควบคุมจะเติมอาหารลงไปปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจผลการทดลอง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ

3.2.9.4 บันทึกผลการติดเชื้อไวรัส สังเกตจากผลึกโปรตีนที่ปรากฏอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ไลน์ SF9 โดยถ้าหลุมใดปรากฏผลึกโปรตีนบันทึกเป็น (+) แต่ถ้าหลุมใดไม่ปรากฏผลึกโปรตีนบันทึกเป็นลบ (-) จากนั้นคำนวณค่าไวรัสโคเดเตอร์

3.2.9.5 คำนวณร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส (% reduction) (Sökmen, 2001) ดังนี้

$$\% \text{ Reduction} = 100 - \{(\text{ปริมาณไวรัสในสารสกัด/ปริมาณไวรัสในอาหาร}) \times 100\}$$

$$\text{ร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัสที่แท้จริง} = \% \text{ Reduction} - \% \text{ Cytotoxicity}$$

3.2.10 การนับจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส *AcMNPV*

นำตะกอนเซลล์ (pellet) ไปทำให้เชื้อหุ้มเซลล์แตกโดยเติม SDS ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปแช่ในเครื่อง ultrasonic sonicator นาน 30 นาที เพื่อให้เซลล์แตกและปลดปล่อยผลึกไวรัส ODV ออกมา จากนั้นทำการการปั่นแยก SDS ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของ SDS ที่ทิ้ง แล้วเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ตะกอนแขวนลอย ดูตะกอนเซลล์ออกมา 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นแยกสารขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 0.1 มิลลิลิตร นับจำนวนผลึกโปรตีน ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ คำนวณหาค่า จำนวนผลึกโปรตีนต่อมิลลิลิตร และจำนวนผลึกโปรตีนต่อเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.11 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (สุรพล, 2528)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ด้วยวิธีของดันแคน (Duncan's New Multiple Range Test, DMRT) คำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS 14.0 และคำนวณค่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาดจากรากหนอนตายหยากที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5.0



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก

จากการสกัดรากหนอนตายหยาก โดยใช้น้ำหนักแห้งเท่ากับ 30 กรัม ได้ผลผลิตดังตารางที่ 4.1 ค่าร้อยละของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล เท่ากับ 0.52, 0.85 และ 1.99 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก

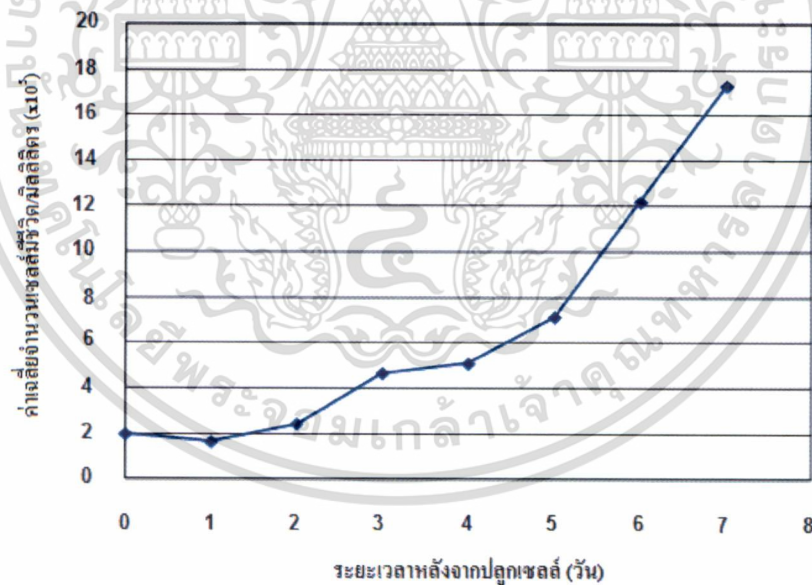
ชนิดของตัวทำละลาย	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละ ของสารสกัดหยาบ
เฮกเซน	30	0.155	0.52
ไดคลอโรมีเทน	30	0.256	0.85
เอทานอล	30	0.596	1.99

4.2 กราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ S9

การศึกษากราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ S9 โดยการปลูกเซลล์ตั้งต้นจำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และทำการนับจำนวนเซลล์ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน ผลการนับจำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.2 และลักษณะของกราฟการเจริญ (ดังรูปที่ 4.1) ระยะเวลาที่จำนวนประชากรเซลล์ไลน์ S9 เพิ่มขึ้น 2 เท่า (population doubling time, PDT) เท่ากับ 2.45 วัน

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไลน์ S9 ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากปลูกเซลล์เป็นเวลา 7 วัน (ตารางผนวกที่ ก-1)

ระยะเวลาหลังจากปลูกเซลล์ (วัน)	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร
0	2×10^5
1	1.66×10^5
2	2.44×10^5
3	4.68×10^5
4	5.10×10^5
5	7.15×10^5
6	1.22×10^6
7	1.73×10^6



รูปที่ 4.1 กราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากที่มีต่อเซลล์ไลน์ SF9 โดยวิธี MTT

4.3.1 ผลการวิเคราะห์ความเป็นพิษที่มีต่อเซลล์ไลน์ SF9 ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในชั้นเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 2,000 1,000 500 250 125 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2, 4.4-4.5 และตารางที่ 4.3) และ 96 ชั่วโมง (รูปที่ 4.3, 4.6-4.7 และตารางที่ 4.3)

ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษที่มีต่อเซลล์ไลน์ SF9 ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในชั้นเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเอทานอล กรณีที่บ่มในเซลล์นาน 48 ชั่วโมง และ นาน 96 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้นที่เป็นพิษมากที่สุด คือ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบในชั้นไคคลอโรมีเทนมีความเป็นพิษมากที่สุดที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มนาน 48 ชั่วโมง (42.68 ± 1.61) และ 96 ชั่วโมง (52.80 ± 2.13) การบ่มเซลล์ในสารสกัดถ้าใช้ระยะเวลาจะเป็นพิษมากกว่า ส่วนความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4.3)

ดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัส AcMNPV ของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก จึงใช้สารสกัดหยาบชั้นไคคลอโรมีเทน ที่ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ S9 ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากในชั้น
เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเอทานอล บ่มในสารสกัดนาน 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ
(ตารางผนวกที่ ก-2 และ ก-3)

ชนิดของตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์*	
		ค่าเฉลี่ย±S.D. (48 h)	ค่าเฉลี่ย±S.D. (96 h)
เฮกเซน	2000	19.86 ± 1.35 ^{cd}	41.05 ± 1.17 ^b
	1000	18.03 ± 1.29 ^{dc}	31.08 ± 0.93 ^c
	500	11.65 ± 0.91 ^{fg}	19.88 ± 2.17 ^{efg}
	250	10.12 ± 0.51 ^{gh}	17.19 ± 2.12 ^{fgh}
	125	9.49 ± 0.30 ^{ghi}	14.08 ± 3.20 ^{gh}
	62.5	5.67 ± 0.61 ^{jk}	12.50 ± 1.88 ^{hi}
	31.25	3.13 ± 1.38 ^{kl}	1.15 ± 0.13 ^{jk}
	1 % DMSO	1.54 ± 0.49 ^{lm}	1.32 ± 0.39 ^{ijk}
	0 (Control)	0 ± 0 ^m	0 ± 0 ^k
ไคคลอโรมีเทน	2000	42.68 ± 1.61 ^a	52.80 ± 2.13 ^a
	1000	35.03 ± 4.55 ^b	39.43 ± 4.24 ^b
	500	21.29 ± 0.60 ^c	29.82 ± 5.28 ^{cd}
	250	16.12 ± 0.36 ^c	25.20 ± 6.85 ^{cdc}
	125	11.69 ± 0.44 ^{fg}	20.74 ± 8.60 ^{ef}
	62.5	7.68 ± 0.18 ^{hij}	17.23 ± 10.11 ^{fgh}
	31.25	2.25 ± 0.73 ^{lm}	7.67 ± 0.77 ⁱ
	0.4 % DMSO	1.35 ± 0.02 ^{lm}	1.22 ± 0.10 ^{jk}
	0 (Control)	0 ± 0 ^m	0 ± 0 ^k
เอทานอล	2000	20.15 ± 2.14 ^{cd}	41.04 ± 2.59 ^b
	1000	16.23 ± 4.30 ^c	30.84 ± 3.24 ^c
	500	13.43 ± 2.68 ^f	24.17 ± 1.33 ^{dc}
	250	8.97 ± 0.30 ^{ghi}	21.96 ± 1.14 ^{cf}
	125	6.81 ± 0.83 ^{ij}	16.41 ± 1.21 ^{fgh}
	62.5	5.82 ± 0.89 ^j	7.25 ± 0.31 ^{ij}
	31.25	1.99 ± 1.40 ^{lm}	0.47 ± 0.44 ^k
	0.2 % DMSO	0.81 ± 0.56 ^{lm}	0.48 ± 0.45 ^k
	0 (Control)	0 ± 0 ^m	0 ± 0 ^k

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

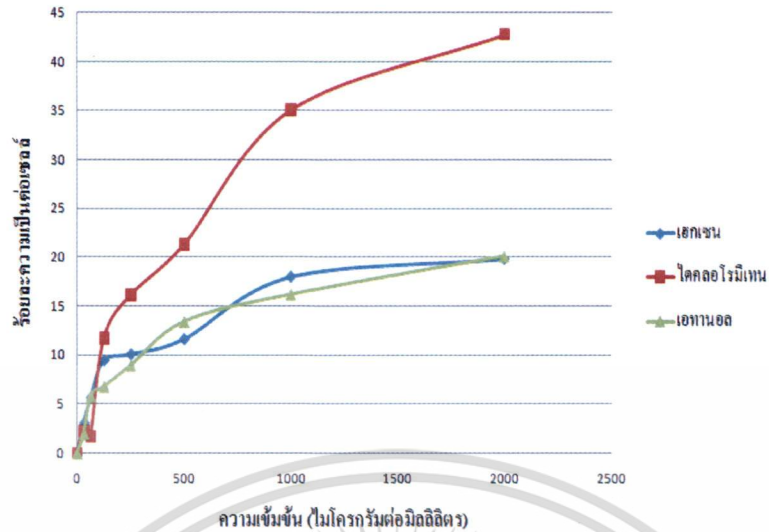
* ตารางที่ 4.3 ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองในคอลัมน์เดียวกัน ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3.2 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก ที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ SF9 ร้อยละ 50 (ตารางที่ 4.4)

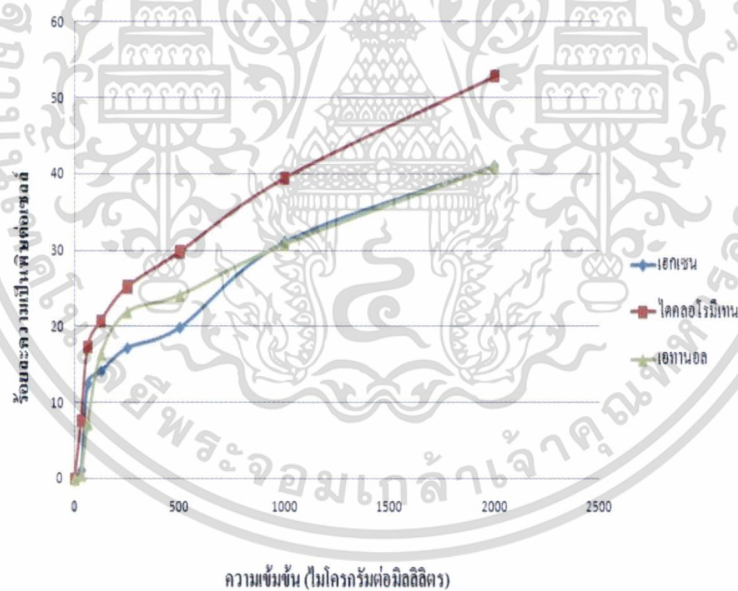
ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ SF9 ร้อยละ 50

ตัวทำละลาย	ระยะเวลาบ่มเซลล์ในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก (ชั่วโมง)	ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ SF9 ร้อยละ 50 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
เฮกเซน	48	>2000
	96	>2000
ไดคลอโรมีเทน	48	>2000
	96	1,708.98
เอทานอล	48	>2000
	96	>2000

จากข้อมูลในตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ SF9 ร้อยละ 50 สรุปได้ดังนี้ สารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากในชั้นไดคลอโรมีเทนมีความเป็นพิษมากที่สุด เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 96 ชั่วโมง โดยมีค่า $CC_{50} = 1,708.98$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดอื่นๆ มีค่า $CC_{50} > 2,000$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

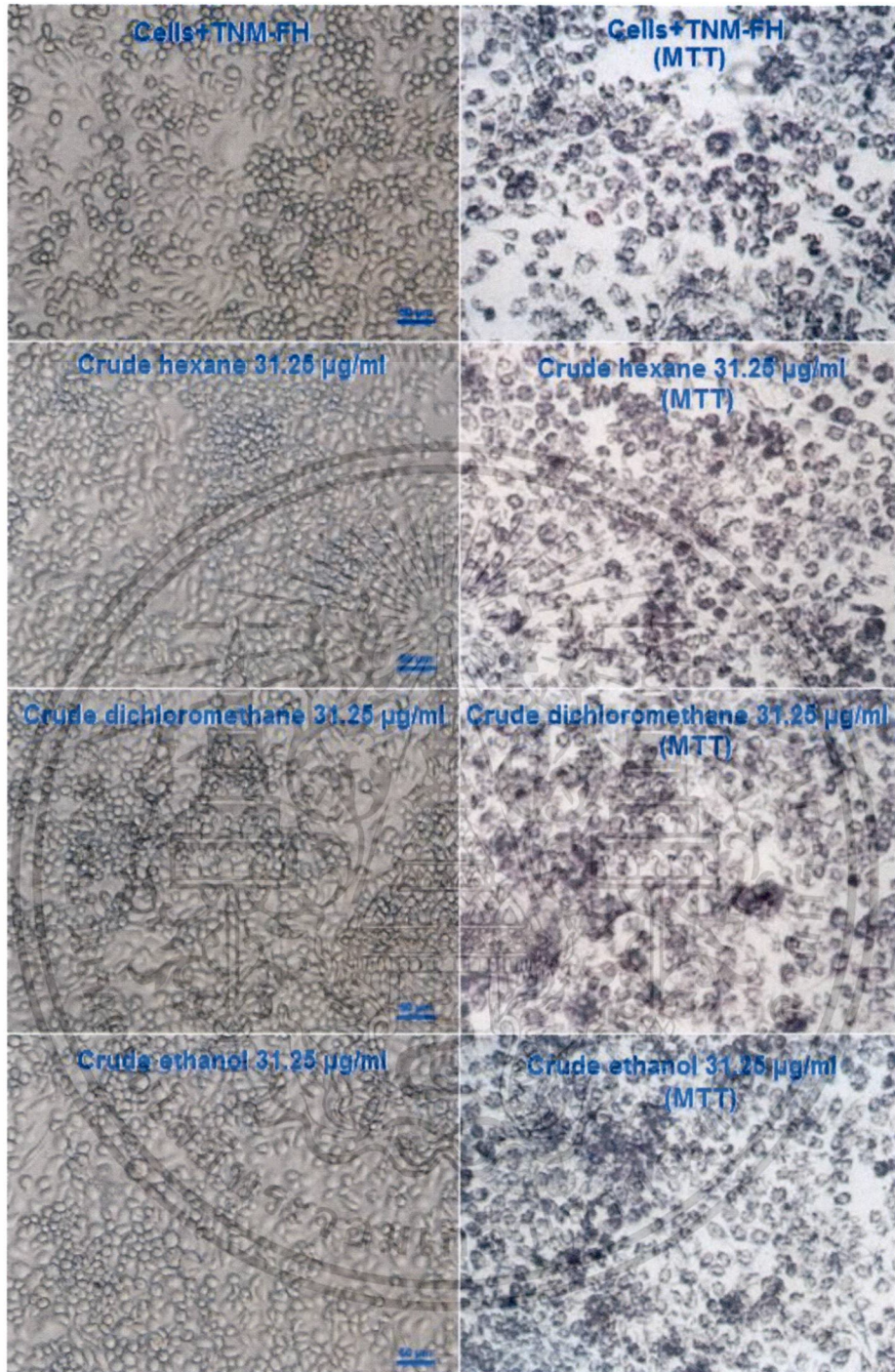


รูปที่ 4.2 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดยาบจากรากหนอนตายหยากชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเอทานอล ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ S9 บ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 48 ชั่วโมง



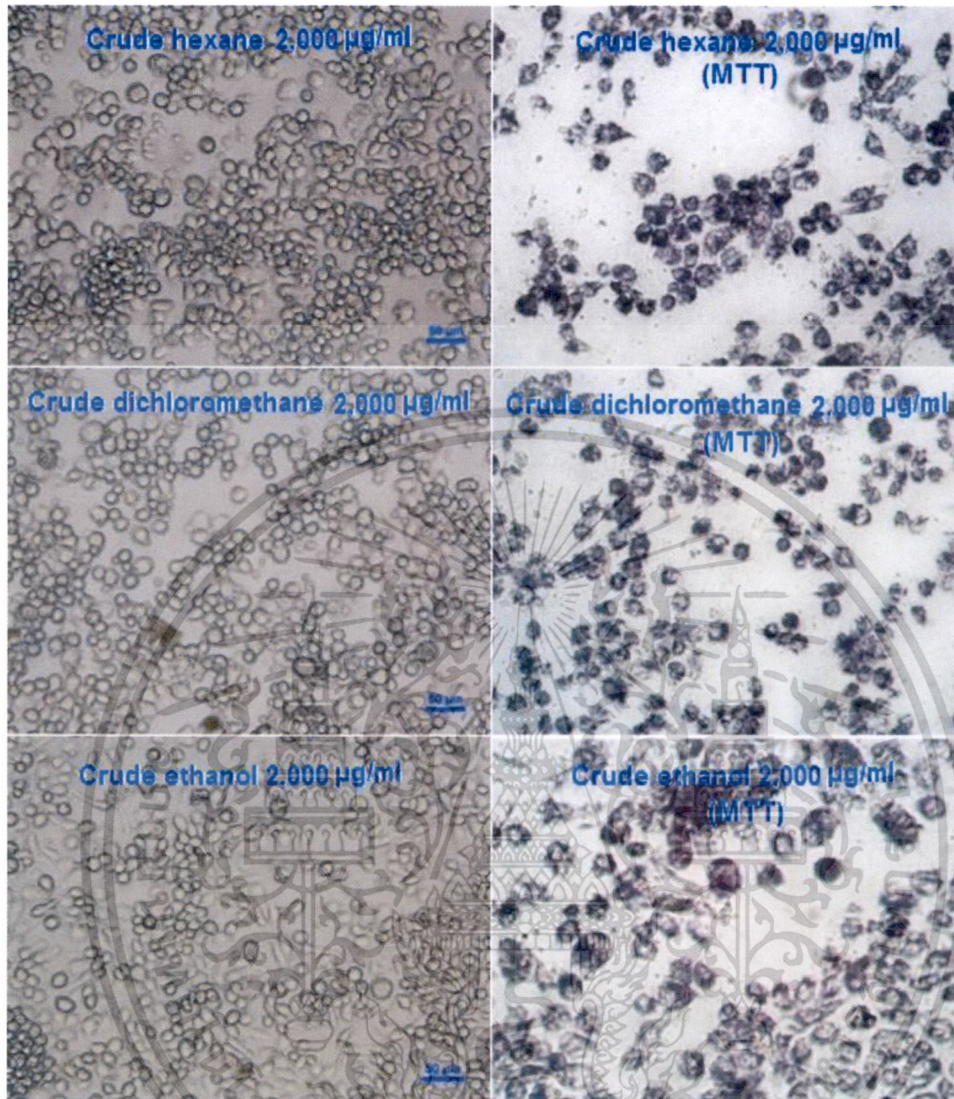
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดยาบจากรากหนอนตายหยากชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเอทานอลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ S9 บ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 96 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



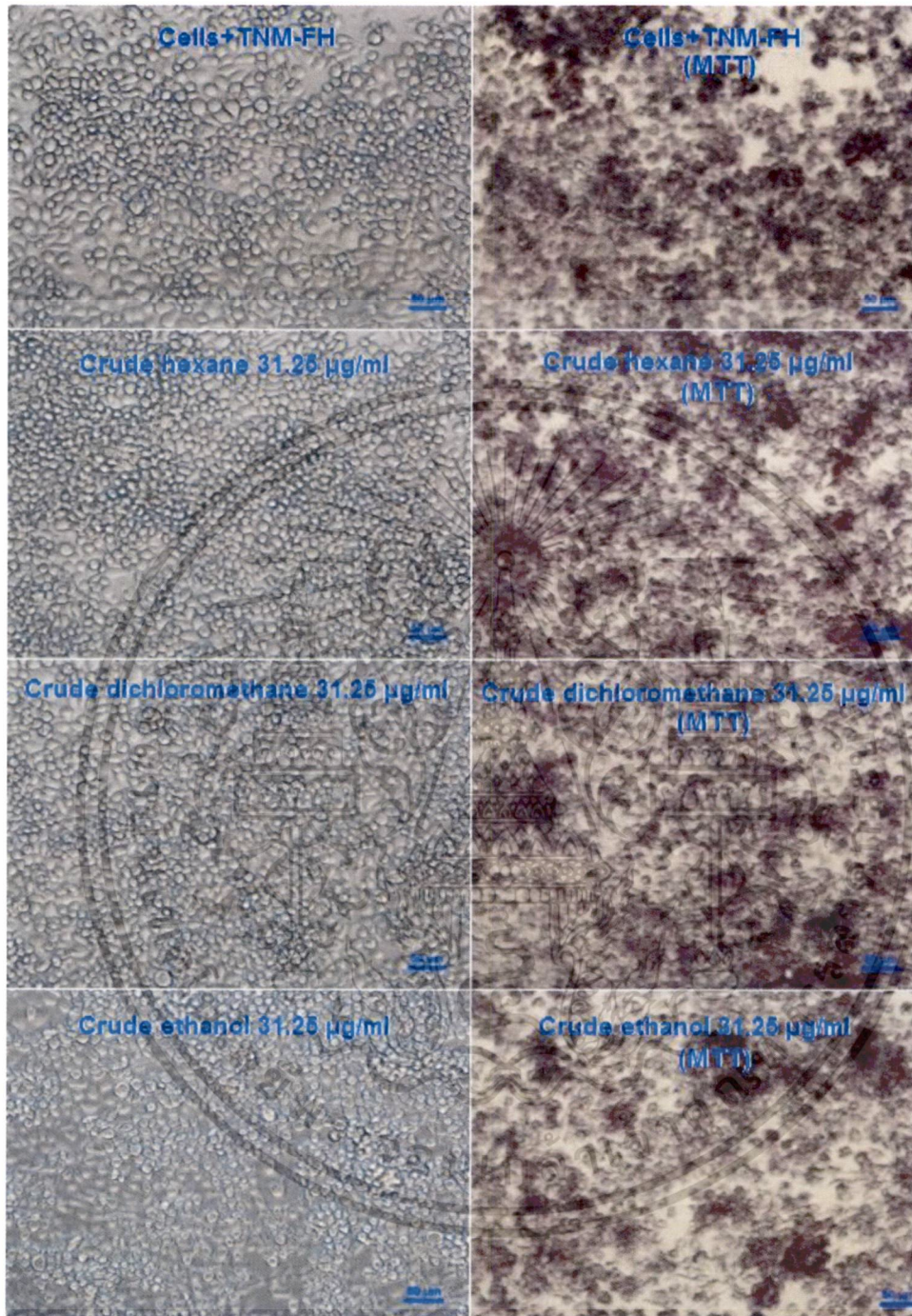
รูปที่ 4.4 ลักษณะเซลล์ไลน์ S9 เพาะเลี้ยงในอาหารTNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 5 และบ่มในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก ชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มนาน 48 ชั่วโมง (กำลังขยาย 200x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



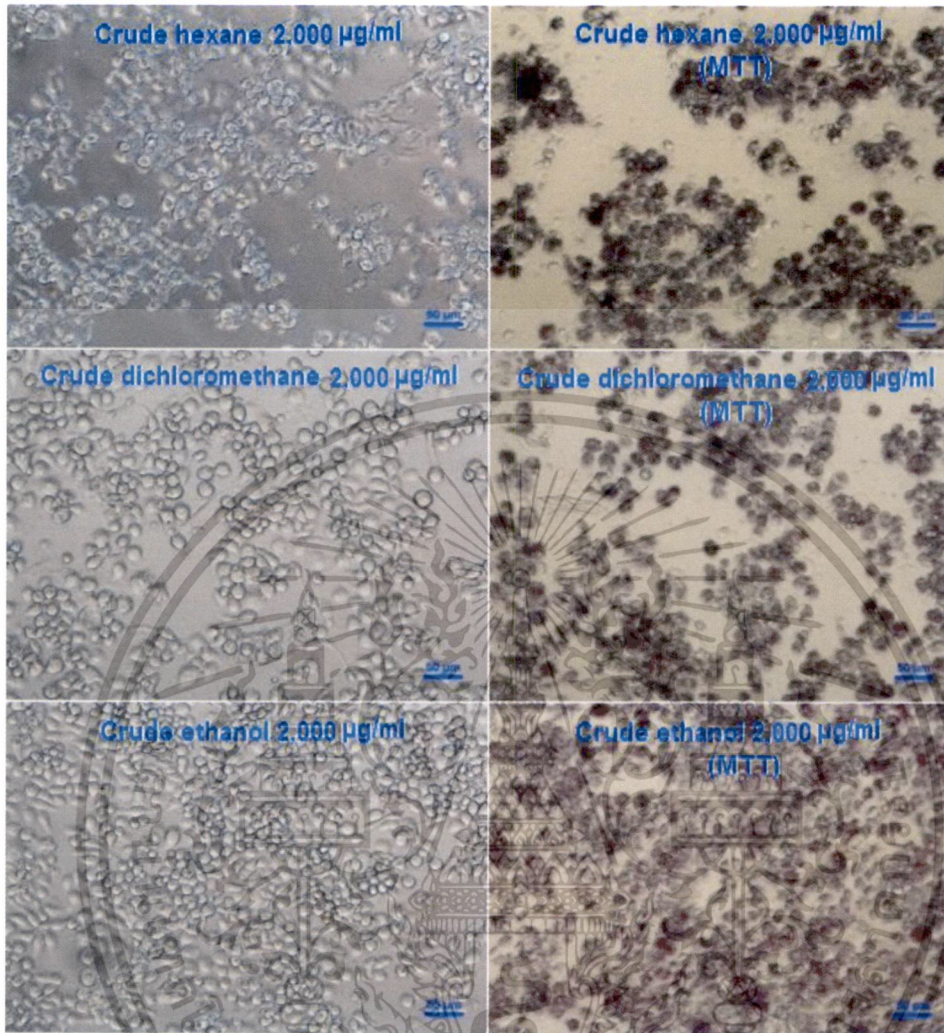
รูปที่ 4.5 ลักษณะเซลล์ไลน์ S9 บ่มในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก ชั้นเสกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มนาน 48 ชั่วโมง (กำลังขยาย 200x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ลักษณะเซลล์ไลน์ S9 เพาะเลี้ยงในอาหารTNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 5 และบ่มในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก ชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มนาน 96 ชั่วโมง (กำลังขยาย 200x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



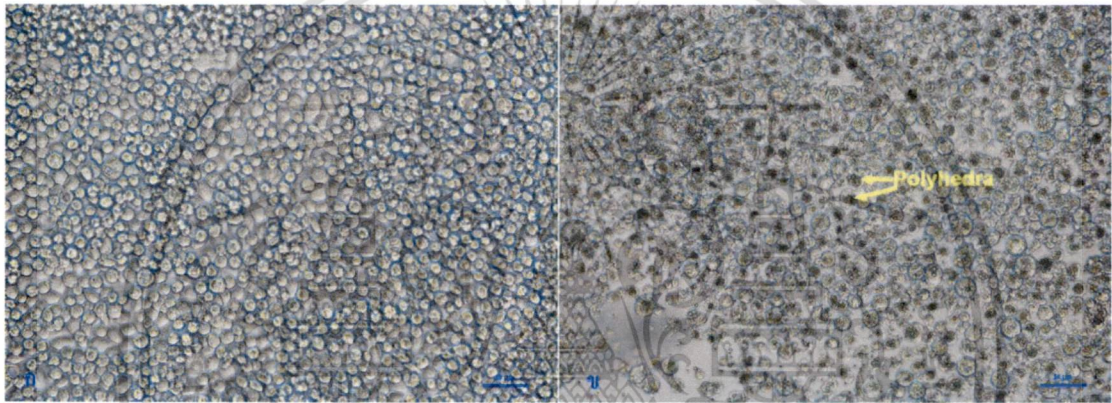
รูปที่ 4.7 ลักษณะเซลล์ไลน์ S9 เพาะเลี้ยงในอาหารTNM-FH เสริมด้วยFBS ร้อยละ 5 และบ่มในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก ชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มนาน 96 ชั่วโมง (กำลังขยาย 200x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการจำลองตัวเองของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ Sf9

4.4.1 ผลการทดสอบค่าไวรัสไตเตอร์ของไวรัส *AcMNPV* จากหัวเชื้อไวรัส (virus inoculum)

ค่าไวรัสไตเตอร์ของหัวเชื้อไวรัส *AcMNPV* จากการทำให้ติดเชื้อในเซลล์ไลน์ Sf9 โดยใช้อาหาร TNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 5 จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในงานเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 96 หลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยใช้ไวรัสในรูปของ budded virus (BV) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 7 วัน ตรวจสอบการเกิดพริกโปรตีน (polyhedra) (รูปที่ 4.8) ภายในนิวเคลียสเซลล์ไลน์ Sf9 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอร์ต (inverted microscope) ค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ของหัวเชื้อไวรัส *AcMNPV* passage ที่ 8 มีค่าเท่ากับ 1.46×10^8 PFUต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.8 เซลล์ไลน์ Sf9 เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 5 (ก) เซลล์ไลน์ Sf9 ที่ติดเชื้อไวรัส *AcMNPV* ภายหลังการติดเชื้อนาน 7 วัน (ข) (กำลังขยาย 200x)

4.4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการจำลองตัวเองของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ Sf9 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาดรากของต้นหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มนาน 96 ชั่วโมง

4.4.2.1 ร้อยละการตายของเซลล์ไลน์ Sf9 และค่า Corrected % mortality ของ 4 สิ่งทดลอง (ตารางผนวกที่ ก-4 และตารางที่ 4.5) ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 เซลล์+อาหาร (รูปที่ 4.9 ก)

สิ่งทดลองที่ 2 เซลล์+สารสกัดรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน (รูปที่ 4.9 ข)

สิ่งทดลองที่ 3 เซลล์+*AcMNPV*+อาหาร (รูปที่ 4.9 ค)

สิ่งทดลองที่ 4 เซลล์+ *AcMNPV*+สารสกัดรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน (รูปที่ 4.9 ง)

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยร้อยละการตายของเซลล์ไลน์ S9 และค่า Corrected % mortality ใน 4 สิ่งทดลอง (ตารางผนวกที่ ก-4)

สิ่งทดลอง	ร้อยละการตายของเซลล์ไลน์ S9 ค่าเฉลี่ย±S.D. (Corrected % mortality±S.D.) [*]
1. เซลล์+อาหาร	34.48±1.54 (0±0) ^a
2. เซลล์+สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคโลโรมีเทน	32.15±4.79 (-3.61±8.05) ^a
3. เซลล์+AcMNPV+อาหาร	55.62±2.65 (32.22±4.85) ^b
4. เซลล์+AcMNPV+สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคโลโรมีเทน	54.55±3.07 (30.55±5.97) ^b

* ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สรุปจากผลตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยวิธีดินแดน ดังนี้

1. ค่าเฉลี่ย Corrected % mortality ของสิ่งทดลอง เซลล์+AcMNPV+อาหาร (32.22±4.85) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับสิ่งทดลอง เซลล์+AcMNPV+สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคโลโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (30.55±5.97)

2. ค่าเฉลี่ย Corrected % mortality ของสิ่งทดลอง เซลล์+อาหาร (0±0) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับสิ่งทดลอง เซลล์+สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคโลโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (-3.61±8.05)

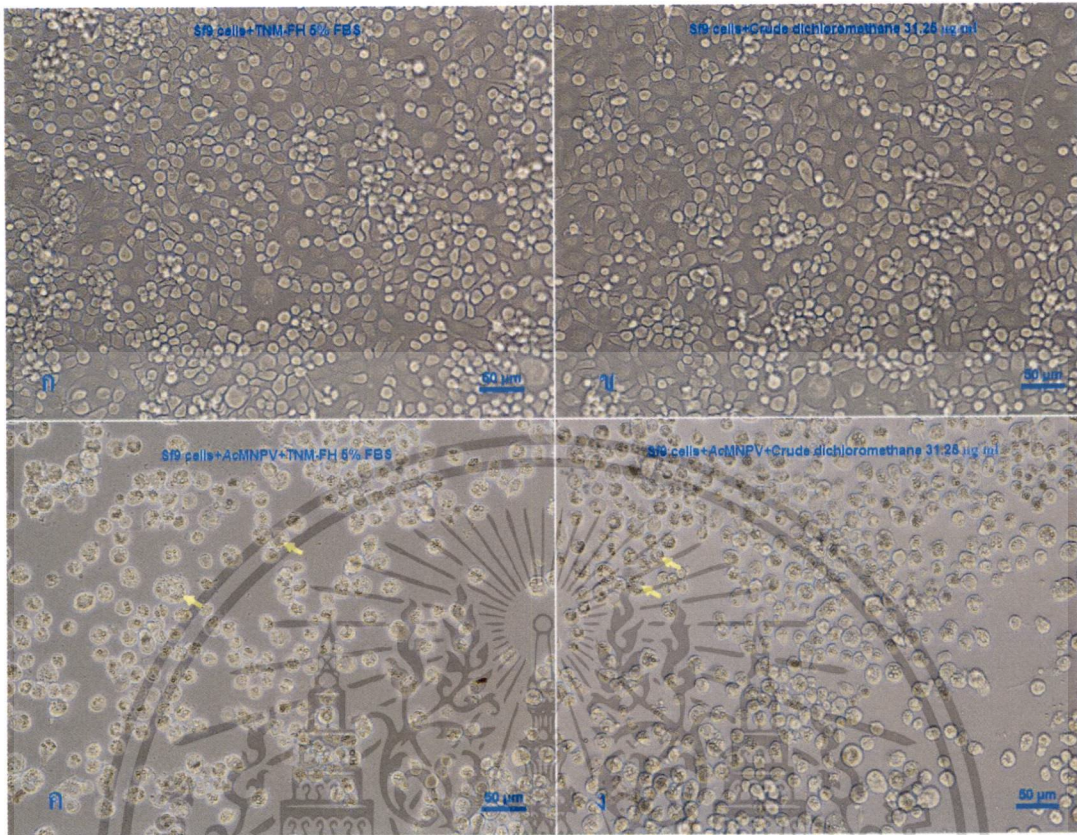
แสดงว่าสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ไลน์ S9 ใน 4 สิ่งทดลอง แต่เมื่อทำการติดเชื้อไวรัส *AcMNPV* MOI=2 พบว่าการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้นใน 2 สิ่งทดลอง คือ เซลล์+*AcMNPV*+อาหาร (32.22±4.85) และ เซลล์+*AcMNPV*+สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทนความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (30.55±5.97) สรุปการตายของเซลล์ไลน์ S9 มีผลมาจากการเข้าติดเชื้อของ *AcMNPV*

4.4.2.2 ผลการศึกษาค่าเฉลี่ย ร้อยละการติดเชื้อไวรัส *AcMNPV* จำนวนเซลล์ที่ติดเชื้อ/มิลลิลิตร ไวรัสไตเตอร์ (PFU/มิลลิลิตร) จำนวนผลึกโปรตีน/มิลลิลิตร จำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์ และร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส *AcMNPV* (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ร้อยละการติดเชื้อไวรัส *AcMNPV* จำนวนเซลล์ที่ติดเชื้อ/มิลลิลิตร ไวรัสไตเตอร์ (PFU/มิลลิลิตร) จำนวนผลึกโปรตีน/มิลลิลิตร จำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์ และร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส *AcMNPV*

สิ่งทดลอง	ค่าเฉลี่ย ± S.D.*					
	ร้อยละการติดเชื้อ	จำนวนเซลล์ติดเชื้อ/มล. ($\times 10^7$)	ไวรัสไตเตอร์ PFU/ml ($\times 10^8$)	จำนวนผลึกโปรตีน/มล. ($\times 10^6$)	จำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์	Corrected % Reduction
1. เซลล์+ <i>AcMNPV</i> +อาหาร	95.54±3.18 ^a	4.23±0.23 ^a	2.06±0.71 ^a	5.11±0.63 ^a	12.16±2.23 ^a	0±0 ^a
2. เซลล์+ <i>AcMNPV</i> +สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน	98.51±1.34 ^a	3.15±0.23 ^b	2.65±0.79 ^b	4.19±0.31 ^a	13.40±1.89 ^a	-27.45±4.36 ^b

* ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองในคอลัมน์เดียวกัน ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบลักษณะเซลล์ไลน์ S9 ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ทำให้ติดเชื้อไวรัส *AcMNPV* MOI=2 บ่มนาน 96 ชั่วโมง

(ก.) เซลล์ไลน์ S9 เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 5

(ข.) เซลล์ไลน์ S9 เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาดรอกนอนตายหยากชั้น ไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(ค.) เซลล์ไลน์ S9 ที่ทำให้ติดเชื้อไวรัส *AcMNPV*

(ง.) เซลล์ไลน์ S9 เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาดรอกนอนตายหยากชั้น ไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำให้ติดเชื้อไวรัส *AcMNPV* ภาพที่ถูกครีเสีเหลืองชี้ คือ เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส และภายในนิวเคลียส มีผลึกโปรตีน (กำลังขยาย 200x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองในตารางที่ 4.6 สรุปได้ดังนี้

1. ค่าร้อยละการติดเชื้อไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH (95.54 ± 3.18) ไม่แตกต่างจากค่าร้อยละการติดเชื้อไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (98.51 ± 1.34) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2. ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ S9 ที่ติดเชื้อไวรัส *AcMNPV* ต่อมิลลิลิตร ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ($4.23 \times 10^5 \pm 0.23$) มีความแตกต่างกับค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ S9 ที่ติดเชื้อไวรัส *AcMNPV* ต่อมิลลิลิตรที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($3.15 \times 10^5 \pm 0.23$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3. ค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ของไวรัส *AcMNPV* (PFU/มิลลิลิตร) ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร มีค่าแตกต่างกับค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ของไวรัส *AcMNPV* (PFU/มิลลิลิตร) ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

โดยค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ของไวรัส *AcMNPV* (PFU/มิลลิลิตร) ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($2.65 \pm 0.79 \times 10^8$ PFU/ml) มีค่ามากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารอย่างเดียว ($2.06 \pm 0.71 \times 10^8$ PFU/ml)

4. ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส *AcMNPV* ต่อมิลลิลิตร ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร ($5.11 \times 10^6 \pm 0.63$) มีจำนวนไม่แตกต่างกับที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($4.19 \times 10^6 \pm 0.31$) บ่มเซลล์นาน 96 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

5. ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส *AcMNPV* ต่อเซลล์ ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร (12.16 ± 2.23) มีจำนวนไม่แตกต่างกับที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (13.40 ± 1.89) บ่มเซลล์นาน 96 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

6. ค่าร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มนาน 96 ชั่วโมง

สรุปค่าเฉลี่ยของการลดจำนวนลงที่แท้จริง (Corrected % Reduction) ของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร มีค่าแตกต่างกับค่าเฉลี่ยของการลดจำนวนลงที่แท้จริง (Corrected % Reduction) ของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตาย หยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดยค่าเฉลี่ยของการลดจำนวนลงที่แท้จริง (Corrected % Reduction) ของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ -27.45 ± 4.36

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ไวรัส *AcMNPV* ที่ติดเชื้อในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตาย หยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นร้อยละ 127.45 ส่วนไวรัส *AcMNPV* ที่ติดเชื้อในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารมีการเพิ่มจำนวนขึ้นร้อยละ 100 แสดงว่าการเพาะเลี้ยงไวรัส *AcMNPV* ในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นถึงร้อยละ 27.45

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน, ไคคลอโรมีเทน และเอทานอล

ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน, ไคคลอโรมีเทน และเอทานอล เท่ากับ 0.155 (0.52 กรัม), 0.85 (0.256 กรัม) และ 1.99 (0.596 กรัม) ตามลำดับ

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากในชั้นไคคลอโรมีเทนมีความเป็นพิษมากที่สุด เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 96 ชั่วโมง โดยมีค่า $CC_{50} = 1,708.98$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดอื่นๆ มีค่า $CC_{50} > 2,000$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการจำลองตัวเองของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากของต้นหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มนาน 96 ชั่วโมง

5.2.1 ค่าเฉลี่ย Corrected % mortality ของสิ่งทดลอง เซลล์+*AcMNPV*+อาหาร (32.22±4.85) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับสิ่งทดลอง เซลล์+*AcMNPV*+สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (30.55±5.97)

5.2.2 ค่าเฉลี่ย Corrected % mortality ของสิ่งทดลอง เซลล์+อาหาร (0±0) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับสิ่งทดลอง เซลล์+สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (-3.61±8.05)

สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ไลน์ S9 ใน 4 สิ่งทดลอง แต่เมื่อทำการติดเชื้อไวรัส *AcMNPV* MOI=2 พบว่าการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้นใน 2 สิ่งทดลอง คือ เซลล์+*AcMNPV*+อาหาร (32.22±4.85) และ เซลล์+*AcMNPV*+สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน

ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (30.55 ± 5.97) สรุปการตายของเซลล์ไลน์ S9 มีผลมาจากการเข้าติดเชื้อของ AcMNPV

5.3 ผลการศึกษาค่าเฉลี่ย ร้อยละการติดเชื้อไวรัส AcMNPV จำนวนเซลล์ที่ติดเชื้อต่อมิลลิลิตร ไวรัสไตเตอร์ (PFU/มิลลิลิตร) จำนวนพริกโปรตีน/มิลลิลิตร จำนวนพริกโปรตีน/เซลล์ และร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส AcMNPV

5.3.1 ค่าร้อยละการติดเชื้อไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH (95.54 ± 3.18) ไม่แตกต่างจากค่าร้อยละการติดเชื้อไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (98.51 ± 1.34) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีผลต่อการติดเชื้อไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9

5.3.2 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ S9 ที่ติดเชื้อไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตร ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ($4.23 \times 10^5 \pm 0.23$) มีความแตกต่างกับค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ S9 ที่ติดเชื้อไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตรที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($3.15 \times 10^5 \pm 0.23$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สรุปจำนวนเซลล์ติดเชื้อต่อมิลลิลิตร พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารอย่างเดียวมีการติดเชื้อมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน

5.3.3 ค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ของไวรัส AcMNPV (PFU/มิลลิลิตร) ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร มีค่าแตกต่างกับค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ของไวรัส AcMNPV (PFU/มิลลิลิตร) ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สรุปค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ของไวรัส AcMNPV (PFU/มิลลิลิตร) ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($2.65 \pm 0.79 \times 10^8$ PFU/ml) มีค่ามากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารอย่างเดียว ($2.06 \pm 0.71 \times 10^8$ PFU/ml) แสดงว่าการสร้างไวรัสอิสระ (budded virus) ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณมากกว่าในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพียงอย่างเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3.4 ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส *AcMNPV* ต่อมิลลิลิตร ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร ($5.11 \times 10^6 \pm 0.63$) มีจำนวนไม่แตกต่างกันกับที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($4.19 \times 10^6 \pm 0.31$) บ่มเซลล์นาน 96 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สรุปจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส *AcMNPV* ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนไม่แตกต่างกัน ระหว่างกลุ่มที่เพาะเลี้ยงในอาหาร และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงในสารสกัด แสดงว่าสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการสร้างผลึกโปรตีนของไวรัสรูปแบบ Occluded virus (OV)

5.3.5 ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส *AcMNPV* ต่อเซลล์ ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร (12.16 ± 2.23) มีจำนวนไม่แตกต่างกันกับที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตาย หยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (13.40 ± 1.89) บ่มเซลล์นาน 96 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สรุปจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส *AcMNPV* (OV) ต่อเซลล์ มีจำนวนไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่เพาะเลี้ยงในอาหาร และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงในสารสกัด ผลที่ได้เป็นไปในทางเดียวกันกับข้อ 5.3.4

5.4 ผลค่าร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มนาน 96 ชั่วโมง

สรุปค่าเฉลี่ยของการลดจำนวนลงที่แท้จริง (Corrected % Reduction) ของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร มีค่าแตกต่างกับค่าเฉลี่ยของการลดจำนวนลงที่แท้จริง (Corrected % Reduction) ของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดยค่าเฉลี่ยของการลดจำนวนลงที่แท้จริง (Corrected % Reduction) ของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ -27.45 ± 4.36

กล่าวได้ว่าไวรัส AcMNPV ที่ติดเชื้อในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบราก
หนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเพิ่มจำนวน
มากขึ้นร้อยละ 127.45 ส่วนไวรัส AcMNPV ที่ติดเชื้อในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารมีการ
เพิ่มจำนวนขึ้นร้อยละ 100 แสดงว่าการเพาะเลี้ยงไวรัส AcMNPV ในสารสกัดหยาบรากหนอนตาย
หยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเพิ่มจำนวนมากกว่ากลุ่ม
ควบคุมร้อยละ 27.45

สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้ไวรัส AcMNPV เข้าติดเชื้อในเซลล์ไลน์ S9 ได้ดี โดยมีการสร้าง
ไวรัสรูปแบบ budded virus ปริมาณมากกว่าในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหาร



เอกสารอ้างอิง

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2550. ไวรัสของแมลง : นิคลีโอโพลีอีโดรไวรัส. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
กรุงเทพมหานคร. 396 หน้า.

ทศสินี นุชประยูร และเต็มศรี ชำนิจารกิจ. 2541. สถิติในวิจัยทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร.
สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัชชชัย สุภคิชฐ์ และ พนมกร ขุนอ่อน. 2551. การใช้น้ำสกัดภาพจากหนอนตายหยากและสับประรด
ควบคุมหนอนแมลงวันบ้าน. การประชุมสัมมนาวิชาการระบบเกษตรแห่งชาติ ครั้งที่ 4. วันที่ 27-28
พฤษภาคม 2551. [online] Available at: <<http://www.mcc.cmu.ac.th/Seminar/pdf/1519.pdf>>.

นิจศิริ เรืองรังษี. 2547. สมุนไพรไทย, สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร.

นงศ์ณา เกลี้ยงเกล้า. 2551. การใช้น้ำสกัดชีวภาพหนอนตายหยากเป็นปุ๋ยสำหรับการผลิตถั่วเหลือง.
วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์.

เพ็ญญา ชมะวิต ชำนาญ อภิวัฒน์สร นฤมล โกมลมิศรี ยูวดี ตรงต่อกิจ ขวัญชนก ชูจิตต์ พรพรรณ นฤภัย
และสาวิตรี บุตรี. 2549. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่มีต่อลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญ. การ
ประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. วันที่ 30 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ 2549.
หน้า 703-709.

ไพฑูรย์ อุไรรงค์ กิตติยา กิจควรดี ยูวดา เกิดโกมุติ ศิริวรรณ ตั้งวิสุทธิจิต กัมปนาท มุขดี และประสูติ สิทธิ
สรวง. 2539. รายงานวิจัยประจำปี 2539 เล่ม 2 ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการ
เกษตร. หน้า 754-758.

ไพบูลย์ ปะนะเส. 2551. ผลของสารกำจัดแมลงชีวภาพจากหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook. F.)
และสารกัก (Mammea siamensis Miq. T.) ต่อระดับอะซีทิล โคลิโนเอสเทอเรสและกิจกรรมไลโซไซม์
ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุรพล อุปติสสกุล. 2528. สถิติ การวางแผนการทดลองเบื้องต้น. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
กรุงเทพมหานคร.

อุ้นเรือน เพชราวลัย. 2554. ปฏิบัติการวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. สาขาวิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 69 หน้า

อุ้นเรื่อน เพชรวัลย์ และ สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม. 2555. การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร. 62 หน้า.

Undeen, A.H. and Vávra, J. 1997. Chapter IV Research methods for entomopathogenic protozoa. *In*:
Biological Techniques. Manual of Techniques in Insect Pathology. L.A. Lacey (ed.). Academic
Press, San Diego. Pp. 117-151.

Adams, J.R., Goodwin, R.H. and Wilcox, T.A. 1977. Electron microscopic investigations on invasion and
replication of insect baculoviruses *in vivo* and *in vitro*. *Biologie Cellulaire*, 28, 261-268.

Adams, J.R. and McClintock, J.T. 1991. Baculoviridae. Nuclear polyhedrosis viruses. Part 1. Nuclear
polyhedrosis viruses of insects. *In*: Atlas of Invertebrate Viruses. J.R. Adams and J.R. Bonami
(eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, London. pp. 87-204.

Akanitapichat, P., Tongngok, P., Wangmaneerat, A. and Sripanidkulchai, B. 2005. Antiviral and anticancer
activities of *Stemona collinsae*. *Thai J. Pharm. Sci.*, 29 (3-4), 125-136.

Attathom, T. 1978. A Comparative Study of Six Baculoviruses Isolated from Larvae of the Family
Noctuidae (Insecta: Lepidoptera). Ph.D. Dissertation, University of California, Riverside, USA.
120 p.

Bergold, G.H. 1963. The molecular structure of some insect virus inclusion bodies. *J. Ultrastr. Res.*, 8,
360-378.

Buckberry, L.D. 1999. Cytotoxicity testing using cell lines. *In* Animal Cell Biotechnology. Methods and
Protocol, Jenkins, N. (ed.). Humana Press, New Jersey. pp, 239-252.

Edziri, H., Mastouri, M., Mahjoub, M.A., Ammar, S., Mighri, Z., Gutmann, L. and Aouni, M. 2011.
Antiviral activity of leaves extracts on *Marrubium alysson* L. *J. Med. Plants Res.*, 5(3), 360-363.

Ghosh, S., Parvez, Md. K., Banerjee, K., Sarin, S.K. and Hasnain, S.E. 2002. Baculovirus as mammalian
cell expression vector for gene therapy: An emerging strategy. *Molecular Therapy*, 6(1), 5-11.

Grabherr, R., Ernst, W., Oker-Blom, C. and Jones, I. 2001. Developments in the use of baculoviruses for
the surface display of complex eukaryotic proteins. *Trend Biotechnol.*, 19, 231-236.

- Greger, H. 2006. Structural relationships, distribution and biological activities of *Stemona* alkaloids. *Planta Med.*, 72, 99–113.
- Harrap, K. 1972. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. II. The virus particle. *Virology*, 50: 124-132.
- Hu, J.-P., Yang, D.-H., Lin, W.H. and Cai, S.-Q. 2009. Alkaloids from the roots of *Stemona tuberosa*. *Helvetica Chemica Acta*, 92, 2125-2133.
- Hughes, K.M. 1972. Fine structure and development of two polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 19, 198-207.
- Issakul, K., Pawelzik, E., Jatisatienr, A., Jatisatienr, C. and Vearasilp, S. 2007. Screening of Thai local plant extracts for their insecticidal effectiveness and the effect of its active compound on diamondback moth larvae. Conference on International Agricultural Research for Development. University of Kassel-Witzenhausen and University of Göttingen, October 9-11, 2007.
- Kim, C., Pongphan, D., Wicharatana, C. and Doung sa-ard, C. 2008. Effectiveness of Non Tai Yak (*Stemona* spp.; Stemonaceae) extracts for controlling some insect pests of cauliflower through foliar application. *Agricultural Sci. J.*, 39(3), 193-196.
- Lee, H.L and Chiang, Y.F. 1994. Insecticidal activity of the herbal plant, *Stemona tuberosa* Lour. to mosquito larvae. *Trop Biomed.*, 11, 87–89.
- Li, S.L, Jiang, R.W, Hon, P.M. 2007. Quality evaluation of Radix *Stemona* through simultaneous quantification of bioactive alkaloids by highperformance liquid chromatography coupled with diode array and evaporation light scattering detectors. *Biomed Chromatogr.* (in press).
- Mitsuhashi, J. 2002. *Invertebrate Tissue Culture Methods*. Springer, Tokyo.
- Mosmann, T. 1983. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63.
- Ng, K.W. and Schantz, J.-T. 2010. *Manuals in Biomedical Research-Vol. 6. A Manual for Primary Human Cell Culture*, 2nd edition. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore.

- O' Reilly, D.R., Miller, L.K. and Luckow, V.A. 1992. Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual. W.H. Freeman and Company, New York.
- Phurimsak, C., Leardkamolkarn, V. 2005. Screening for antiviral effect of Thai herbs; *Kaempferia parviflora*, *Ellipeiopsis cherrevensis* and *Stemona tuberosa* against dengue virus type-2. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 - 20 October 2005.
- Pilli, R. A., Rosso, G. B. and de Oliveira, M. C. F. 2005. The *Stemona* alkaloid. In The Alkaloids, Cordell, G. A. (ed.) Vol 62, Chapter 2, pp 77-173.
- Promsiri, S., Naksathit, A., Kruatrachu, M. and Thavara, U. 2006. Evaluations of larvicidal activity of medicinal plant extracts to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and other effects on a non target fish. Insect Science, 13, 179-188.
- Pundee, S., Sangjun, N. and Jatisatienr, A. 2003. Toxicity study of *Stemona curtisii* Hk.f. Thai J. Phytopharm., 10(2), 13-21.
- Richardson, C.D. 1995. Baculovirus Expression Protocols. Humana Press, New Jersey.
- Sohi, S.S., Percy, J., Arif, B.M. and Cunningham, J.C. 1984. Replication and serial passage of singly enveloped baculovirus of *Orgyia leucostigma* in homologous cell lines. Intervirology., 21,50.
- Soonthornchareonnon, N., Mahakittikun, V., Wongsatit Chuakul, W. and Rongsriyam, K. 2005. Acaricidal activity of Thai medicinal plants. Thai J. Phytopharm. , 12(1), 1-7.
- Sökmen, A. 2001. Antiviral and Cytotoxic activity of extract from the cell culture and respective. parts of some turkish medicinal plant. TurkJ. Biol., 25: 343-350
- Stoltz, D.S., Pavan, C. and Cunha, B.A. 1973. Nucleopolyhedrosis virus: a possible example of de novo intranuclear membrane morphogenesis. J. Gen. Virol., 19, 145-150.
- Sunilson, A.J., Rajitha, G., Anandarajagopal, K., Das, A., Muthappan, M. and Promwichit, P. 2009. Cytotoxic effect of *Cayratia carnosa* leaves on human breast cancer cell lines. Int. J. Cancer Res., 5(3), 115-122.
- Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, I., and Lobo de souza, M., 2006. Baculoviruses-re-emerging biopesticides. Biotechnology Advances, 24(2), 143-160.

- Tanada, Y. and Hess, R.T. 1976. Development of a nuclear polyhedrosis virus in midgut cells and penetration of the virus into the hemocoel of the armyworm *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertebr. Pathol.*, 28, 67-76.
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.M., Tomkins, T. and MacCawley, P. 1977. Establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). *In vitro*, 13, 213-217.
- Valdivieso-Garcia, 1993. R.C. Clarke, K.fahn, A. Durette, D.L. MACLeod and C.L. Gyles. 1993, Neutral Red Assay for Measurement of Guantitative Vero cell, 59(6), 1981-1983
- Vialard, J.E., Arif, B.M. and Richardson, C.D. 1995. Introduction to the molecular biology of baculoviruses. *In: Baculovirus Expression Protocols*. C.D. Richardson, C.D. (ed.). Humana Press, New Jersey., pp. 1-24.
- Volkman, L.E. and Golgsmith, P.A. 1985. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology*, 143, 185-195.
- Volkman, L.E. and Knudson, D.L. 1986. *In vitro* replication of baculoviruses. *In: The Biology of Baculovirus. Volume I, Biological Properties and Molecular Biology*. R.R. Granados and B.A. Federici (eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. pp., 109-127.

ภาคผนวก ก

ข้อมูลดิบและการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ก-1 จำนวนเซลล์ไลน์ S9 ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตรภายหลังจากการปลูกเซลล์เป็นเวลา 7 วัน

ระยะเวลาหลังจากปลูกเซลล์ (วัน)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร		เฉลี่ย
	งานที่ 1	งานที่ 2	
0	2×10^5	2×10^5	2×10^5
1	1.65×10^5	1.67×10^5	1.66×10^5
2	2.63×10^5	2.25×10^5	2.44×10^5
3	5.08×10^5	4.28×10^5	4.68×10^5
4	4.68×10^5	5.53×10^5	5.10×10^5
5	7.58×10^5	6.73×10^5	7.15×10^5
6	1.40×10^6	1.04×10^6	1.22×10^6
7	1.73×10^6	1.73×10^6	1.73×10^6

คำนวณค่า Population Doubling Time (PDT) หรือระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนประชากรเป็นสองเท่า

วิธีการคำนวณของ (Misuhashi, 2002)

$$\text{Population doubling time (PDT)} = [(t-t_0)\log 2]/(\log N - \log N_0)$$

t_0 = เวลาที่นับเซลล์ตั้งต้น (คือชั่วโมงที่ 0 หรือวันที่ 0)

t = เวลาที่มีจำนวนเซลล์สูงสุดก่อนที่จะลดจำนวนลง ข้อมูลนี้ได้จากตารางบันทึกผลการนับ จำนวนเซลล์ทุกวัน

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า PDT} &= [(3-0) \times \log 2] / [(\log (4.68 \times 10^5) - \log (2 \times 10^5))] \\ &= 2.45 \text{ วัน หรือประมาณ 3 วัน} \end{aligned}$$

ตารางผนวกที่ ก-2 ร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในชั้น
เฮกเซน ไคคโลโรมีเทน และเอทานอล ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ S9
บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

ชนิดของตัว ทำลาย	ความเข้มข้น ของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย± S.D.
เฮกเซน	2,000	21.40	18.87	19.31	19.86±1.35 ^{cd}
	1,000	18.72	16.54	18.82	18.03±1.29 ^{de}
	500	10.88	12.65	11.42	11.65±0.91 ^{fg}
	250	10.52	9.54	10.29	10.12±0.51 ^{gh}
	125	9.15	9.60	9.73	9.49±0.30 ^{ghi}
	62.5	5.12	6.33	5.55	5.67±0.61 ^{jk}
	31.25	4.72	2.28	2.40	3.13±1.38 ^{kl}
	1 % DMSO	1.65	1.00	1.97	1.54±0.49 ^{lm}
Control	0	0	0	0±0 ^m	
ไคคโลโร มีเทน	2,000	42.61	44.33	41.11	42.68±1.61 ^a
	1,000	32.14	40.27	32.67	35.03±4.55 ^b
	500	20.60	21.71	21.56	21.29±0.60 ^c
	250	16.36	15.70	16.30	16.12±0.36 ^c
	125	11.96	11.19	11.93	11.69±0.44 ^{fg}
	62.5	7.75	7.81	7.48	7.68±0.18 ^{hij}
	31.25	2.95	1.50	2.30	2.25±0.73 ^{lm}
	0.4 % DMSO	1.37	1.33	1.36	1.35±0.02 ^{lm}
Control	0	0	0	0±0 ^m	
เอทานอล	2,000	21.01	17.71	21.72	20.15±2.14 ^{cd}
	1,000	19.05	11.28	18.36	16.23±4.30 ^e
	500	15.95	10.61	13.74	13.43±2.68 ^f
	250	8.65	9.02	9.25	8.97±0.30 ^{ghi}
	125	6.22	7.76	6.45	6.81±0.83 ^{ij}
	62.5	5.14	6.83	5.50	5.82±0.89 ^j
	31.25	3.58	1.49	0.91	1.99±1.40 ^{lm}
	0.2 % DMSO	1.00	1.25	0.18	0.81±0.56 ^{lm}
Control	0	0	0	0±0 ^m	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ S9 ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน, ไคคลอโรมีเทน และเอทานอล จากรากหนอนตายหยากบ่ม ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมงโดยใช้โปรแกรม SPSS 17.0 for Window

แผนการทดลองที่ใช้ในการวิจัย คือแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง โดยวิธีของดันแคน (Duncan's new multiple range test, DMRT) โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 For Window

การตั้งสมมติฐาน

H_0 : ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในชั้นเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ S9 บ่ม ณ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกัน

H_1 : ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในชั้นเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ S9 บ่ม ณ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างน้อย 1 คู่ ของความเข้มข้น

ตารางการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA)

Cytotoxicity 48 h

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8753.569	26	336.676	138.061	.000
Within Groups	131.685	54	2.439		
Total	8885.254	80			

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ S9 ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเอทานอล แต่ละความเข้มข้น เมื่อบ่มนาน 48 ชั่วโมง โดยวิธี Duncan's new multiple range test และใช้โปรแกรม SPSS 17.0 for window

จากข้อมูลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนในตาราง ANOVA มีค่า Sig. = 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า $\alpha = 0.05$ จึงปฏิเสธ H_0 แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์ S9 นาน 48 ชั่วโมง ในสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ S9 อย่างน้อย 1 คู่ มีความแตกต่างกัน จึงดำเนินการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง โดยวิธีของดันแคนต่อไป

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง โดยวิธีดuncan^a

Cytotoxicity 48 h

Duncan

Concentration	N	Subset for alpha = .05												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ConHex	3	.0000												
ConDi	3	.0000												
ConEth	3	.0000												
0.2DMSOEth	3	.8100	.8100											
0.4DMSODi	3	1.3533	1.3533											
1DMSOHex	3	1.5400	1.5400											
31.25Eth	3	1.9933	1.9933											
31.25Di	3	2.2500	2.2500											
31.25Hex	3		3.1333	3.1333										
62.5Hex	3			5.6667	5.6667									
62.5Eth	3				5.8233									
125Eth	3				6.8100	6.8100								
62.5Di	3				7.6800	7.6800	7.6800							
250Eth	3					8.9733	8.9733	8.9733						
125Hex	3					9.4933	9.4933	9.4933						
250Hex	3						10.1167	10.1167						
500Hex	3							11.6500	11.6500					
125Di	3								11.6933	11.6933				
500Eth	3									13.4333				
250Di	3										16.1200			
1000Eth	3											16.2300		
1000Hex	3												18.0267	18.0267
2000Hex	3													19.8600
2000Eih	3													20.1467
500Di	3													21.2900
1000Di	3													35.0267
2000Di	3													42.6833
Sig.		.138	.116	.052	.156	.058	.086	.061	.193	.164	.122	.297	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก-3 ร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในชั้น
เฮกเซน ไคคโลโรมีเทน และเอทานอล ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ S9
บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง

ชนิดของตัว ทำละลาย	ความเข้มข้น ของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย±S.D.
เฮกเซน	2,000	41.02	42.23	39.89	41.05±1.17 ^b
	1,000	31.48	30.02	31.75	31.08±0.93 ^c
	500	17.46	21.64	20.55	19.88±2.17 ^{efg}
	250	14.93	19.13	17.50	17.19±2.12 ^{gh}
	125	10.43	16.39	15.41	14.08±3.20 ^{gh}
	62.5	10.35	13.31	13.83	12.50±1.88 ^{hi}
	31.25	1.20	1.00	1.25	1.15±0.13 ^{jk}
	1 % DMSO	1.20	1.00	1.75	1.32±0.39 ^{ijk}
	Control	0	0	0	0±0 ^k
ไคคโลโร มีเทน	2,000	51.35	51.80	55.24	52.80±2.13 ^a
	1,000	37.20	36.77	44.32	39.43±4.24 ^b
	500	24.47	29.96	35.03	29.82±5.28 ^{cd}
	250	21.65	20.85	33.09	25.20±6.85 ^{cde}
	125	17.11	14.55	30.56	20.74±8.60 ^{ef}
	62.5	12.46	10.39	28.84	17.23±10.11 ^{fgh}
	31.25	8.52	7.01	7.48	7.67±0.77 ⁱ
	0.4 % DMSO	1.11	1.30	1.26	1.22±0.10 ^{jk}
	Control	0	0	0	0±0 ^k
เอทานอล	2,000	42.36	42.71	38.06	41.04±2.59 ^b
	1,000	29.15	28.79	34.58	30.84±3.24 ^c
	500	23.53	25.69	23.28	24.17±1.33 ^{de}
	250	22.93	22.26	20.70	21.96±1.14 ^{ef}
	125	17.04	17.18	15.02	16.41±1.21 ^{fgh}
	62.5	7.32	7.52	6.91	7.25±0.31 ^{ij}
	31.25	0.35	0.10	0.95	0.47±0.44 ^k
	0.2 % DMSO	1.00	0.25	0.18	0.48±0.45 ^k
	Control	0	0	0	0±0 ^k

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ S9 ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน, ไคคโลโรมีเทน และเอทานอล จากรากหนอนตายหยากบ่ม ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมงโดยใช้โปรแกรม SPSS 17.0 for Window

แผนการทดลองที่ใช้ในการวิจัย คือแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง โดยวิธีของคันแคน (Duncan's new multiple range test, DMRT) โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 For Window

การตั้งสมมติฐาน

H_0 : ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในชั้นเฮกเซน ไคคโลโรมีเทน และเอทานอล ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ S9 บ่ม ณ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง ทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกัน

H_1 : ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในชั้นเฮกเซน ไคคโลโรมีเทน และเอทานอล ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ S9 บ่ม ณ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างน้อย 1 คู่ ของความเข้มข้น

ตารางวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA)

Cytotoxicity 96 h

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18049.466	26	694.210	58.258	.000
Within Groups	643.469	54	11.916		
Total	18692.935	80			

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ S9 ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในตัวทำละลายเฮกเซน ไคคโลโรมีเทน และเอทานอล แต่ละความเข้มข้น เมื่อบ่มนาน 96 ชั่วโมง โดยวิธี Duncan's new multiple range test และใช้โปรแกรม SPSS 17.0 for window

จากข้อมูลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนในตาราง ANOVA มีค่า Sig. = 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า $\alpha = 0.05$ จึงปฏิเสธ H_0 แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์ S9 นาน 96 ชั่วโมง ในสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ S9 อย่างน้อย 1 คู่ มีความแตกต่างกัน จึงดำเนินการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง โดยวิธีของคันแคนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยวิธีคั่นแกน^a

Cytotoxicity 96 h

Duncan

Concentration	N	Subset for alpha = .05												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
ConHex	3	.0000												
ConDi	3	.0000												
ConEth	3	.0000												
31.25Eth	3	.4667												
0.2DMSOEth	3	.4767												
31.25Hex	3	1.1500	1.1500											
0.4DMSODi	3	1.2233	1.2233											
1DMSOHex	3	1.3167	1.3167											
62.5Eth	3		7.2500	7.2500										
31.25Di	3			7.6700										
62.5Hex	3			12.4967	12.4967									
125Hex	3				14.0767	14.0767								
125Eth	3				16.4133	16.4133	16.4133							
250Hex	3				17.1867	17.1867	17.1867							
62.5Di	3				17.2300	17.2300	17.2300							
500Hex	3					19.8833	19.8833	19.8833						
125Di	3						20.7400	20.7400						
250Eth	3							21.9633	21.9633					
500Eth	3								24.1667	24.1667				
250Di	3									25.1967	25.1967	25.1967		
500Di	3										29.8200	29.8200		
1000Eth	3											30.8400		
1000Hex	3												31.0833	
1000Di	3													39.4300
2000Eth	3													41.0433
2000Hex	3													41.0467
2000Di	3													52.7967
Sig.		.695	.051	.083	.141	.070	.089	.098	.062	.060	.593			1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก-4 ร้อยละการตายของเซลล์ไลน์ Sf9 และค่า Corrected % mortality
ใน 4 สิ่งทดลอง

สิ่งทดลอง	ร้อยละการตายของเซลล์ไลน์ Sf9 (Corrected % mortality)			ค่าเฉลี่ย±S.D. (Corrected % mortality±S.D.) *
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
1. เซลล์+อาหาร	35.08 (0)	32.73 (0)	35.63 (0)	34.48±1.54 (0±0) ^a
2. เซลล์+สารสกัดหยาบรากหนอน ตายหยากชั้น ไคคโลโรมีเทน	37.12 (3.14)	31.76 (-1.44)	27.57 (-12.52)	32.15±4.79 (-3.61±8.05) ^a
3. เซลล์+AcMNPV+อาหาร	52.56 (26.93)	57.25 (36.45)	57.05 (33.27)	55.62±2.65 (32.22±4.85) ^b
4. เซลล์+AcMNPV+สารสกัดหยาบ รากหนอนตายหยากชั้น ไคคโลโร มีเทน	56.03 (32.27)	56.60 (35.48)	51.02 (23.92)	54.55±3.07 (30.55±5.97) ^b

* ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ในที่นี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีต้นแคน และใช้โปรแกรม SPSS 17.0 for Window

ตารางวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA)

ค่า Corrected % mortality

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3328.058	3	1109.353	35.787	.000
Within Groups	247.992	8	30.999		
Total	3576.050	11			

การตั้งสมมติฐาน

H_0 : ค่าเฉลี่ย Corrected % mortality ของสิ่งทดลองไม่แตกต่างกัน

H_1 : ค่าเฉลี่ย Corrected % mortality ของสิ่งทดลองอย่างน้อย 1 คู่ แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ค่า Sig.= .000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า $\alpha = .05$ (ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) จึงปฏิเสธ H_0 สรุปได้ว่าค่าเฉลี่ย Corrected % mortality ของ 4 สิ่งทดลองอย่างน้อย 1 คู่มีความแตกต่างกัน จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยวิธีดันทันแคนต่อไป

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยวิธีดันทันแคน^a

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Cell+Crude	3	-3.6067	
Cell+Media	3	.0000	
Cell+Virus+Crude	3		30.5533
Cell+Virus	3		32.2167
Sig.		.450	.724

Mean for group in homogeneous subsets are displayed.

^a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

สรุปจากผลตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยวิธีดันทันแคน ดังนี้

1. ค่าเฉลี่ย Corrected % mortality ของสิ่งทดลอง เซลล์+AcMNPV+อาหาร (32.22±4.85) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับสิ่งทดลอง เซลล์+AcMNPV+สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทนความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (30.55±5.97)

2. ค่าเฉลี่ย Corrected % mortality ของสิ่งทดลอง เซลล์+อาหาร (0±0) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับสิ่งทดลอง เซลล์+สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (-3.61±8.05)

แสดงว่าสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ไลน์ S9 ใน 4 สิ่งทดลอง แต่เมื่อทำการติดเชื้อไวรัส AcMNPV MOI=2 พบว่าการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้นใน 2 สิ่งทดลอง คือ เซลล์+AcMNPV+อาหาร (32.22±4.85) และ เซลล์+AcMNPV+สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทนความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (30.55±5.97) สรุปการตายของเซลล์ไลน์ S9 มีผลมาจากการเข้าติดเชื้อของ AcMNPV ในเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก-5 ค่าร้อยละการติดเชื้อไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไดคอลลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สิ่งทดลอง	ร้อยละการติดเชื้อไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9			ค่าเฉลี่ยร้อยละการติดเชื้อไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9 \pm S.D. *
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
เซลล์+ไวรัส+อาหาร	92.31	95.65	98.66	95.54 \pm 3.18 ^a
เซลล์+ไวรัส+สารสกัด	97.41	98.11	100.00	98.51 \pm 1.34 ^a

* ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ กรณีเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละการติดเชื้อไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9 ในสิ่งทดลอง 2 สิ่งทดลอง คือ เซลล์+ไวรัส+อาหาร และ เซลล์+ไวรัส+สารสกัด ใช้วิธี T-Test แบบ Paired Samples Test การตั้งสมมติฐาน

H_0 : ค่าเฉลี่ยร้อยละการติดเชื้อไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9 ของ 2 สิ่งทดลองเท่ากัน

H_1 : ค่าเฉลี่ยร้อยละการติดเชื้อไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9 ของ 2 สิ่งทดลองไม่เท่ากัน

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 T1	95.5400	3	3.17643	1.83391
T2	98.5067	3	1.33979	.77353

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 T1 & T2	3	.958	.184

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 T1 - T2	-2.96667	1.93053	1.11459	-7.76236	1.82903	-2.662	2	.117

จากตาราง t (ทีสต์นี้ และเติมศรี, 2541) ค่า $t_{0.05}$ df 2 = 4.303 และ -4.303 (two-tailed) จากการคำนวณ ผลในตาราง Paired Samples Test ได้ค่า $t = -2.662$ ซึ่งตกอยู่ใน Acceptance region ดังนั้นค่า $p > 0.05$

สรุปค่าร้อยละการติดเชื้อไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ SF9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH ไม่แตกต่างจากค่าร้อยละการติดเชื้อไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ SF9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ก-6 จำนวนเซลล์ SF9 ที่ติดเชื้อไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สิ่งทดลอง	จำนวนเซลล์ SF9 ที่ติดเชื้อไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตร ($\times 10^5$) (ค่า Log)			ค่าเฉลี่ย \pm S.D.* (ค่า Log \pm S.D.)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
เซลล์+ไวรัส+อาหาร	4.32 (5.64)	3.97 (5.60)	4.41 (5.64)	4.23 \pm 0.23 ^a (5.63 \pm 0.02)
เซลล์+ไวรัส+สารสกัด	3.39 (5.53)	3.12 (5.49)	2.94 (5.47)	3.15 \pm 0.23 ^b (5.50 \pm 0.03)

* ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ กรณีเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ SF9 ที่ติดเชื้อไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนอนตายหยากชั้น ไคคอลลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้วิธี

T-Test แบบ Paired Samples Test

การตั้งสมมติฐาน

H_0 : ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ S9 ที่ติดเชื้อไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตรของ 2 สิ่งทดลอง
เท่ากัน

H_1 : ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ S9 ที่ติดเชื้อไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตรของ 2 สิ่งทดลอง
ไม่เท่ากัน

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 T1	5.6260	3	.02381	.01375
T2	5.4973	3	.03113	.01798

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 T1 & T2	3	-.097	.938

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 T1 - T2	.12867	.04099	.02367	-.02684	.23050	5.437	2	.032

จากตาราง t (ทัสตี่ และเดิมศรี, 2541) ค่า $t_{.05}$ df 2 = 4.303 (two-tailed) จากตาราง Paired Samples Test ค่า $t = 5.437 > t_{.05}$ df 2 = 4.303 ดังนั้นค่า $p < 0.05$

สรุปค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ S9 ที่ติดเชื้อไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตร ที่เพาะเลี้ยงในอาหารมีความแตกต่าง กับค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ S9 ที่ติดเชื้อไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตรที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยากหนอนตายหยากชั้น ไคคอลลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก-7 ค่าไวรัสไตเตอร์ของไวรัส AcMNPV (PFU/มิลลิลิตร) ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยากหนอนตาย หยากชั้น ไคคอสโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สิ่งทดลอง	ค่าไวรัสไตเตอร์ (PFU/มิลลิลิตร) ($\times 10^5$) (ค่า Log)			ค่าเฉลี่ย \pm S.D.* (ค่า Log)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
เซลล์+ไวรัส+อาหาร	2.70 (8.43)	2.18 (8.34)	1.29 (8.11)	2.06 \pm 0.71 ^a (8.29 \pm 0.17)
เซลล์+ไวรัส+สารสกัด	3.42 (8.53)	2.70 (8.43)	1.84 (8.26)	2.65 \pm 0.79 ^b (8.41 \pm 0.14)

* ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ กรณีเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยค่าไวรัสไตเตอร์ของไวรัส AcMNPV (PFU/มิลลิลิตร) ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยากหนอนตาย หยากชั้น ไคคอสโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้วิธี T-Test แบบ Paired Samples Test

การตั้งสมมติฐาน

H_0 : ค่าเฉลี่ยค่าไวรัสไตเตอร์ของ 2 สิ่งทดลองเท่ากัน

H_1 : ค่าเฉลี่ยค่าไวรัสไตเตอร์ของ 2 สิ่งทดลองไม่เท่ากัน

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 T1	8.2933	3	.16503	.09528
T2	8.4067	3	.13650	.07881

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 T1 & T2	3	.995	.063

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 T1 - T2	-.11333	.03215	.01856	-.19319	-.03348	-6.107	2	.026

จากตาราง t (ทัสตนี และเดิมศรี, 2541) ค่า $t_{0.05}$ df 2 = 4.303 และ -4.303 (two-tailed) จากการคำนวณ ผลในตาราง Paired Samples Test ได้ค่า $t = -6.107$ ซึ่งตกอยู่นอกเขต Acceptance region ดังนั้นค่า $p < 0.05$ จึงปฏิเสธ H_0

สรุปค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ของไวรัส AcMNPV (PFU/มิลลิลิตร) ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร มีค่าแตกต่างกับค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ของไวรัส AcMNPV (PFU/มิลลิลิตร) ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคโลโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ของไวรัส AcMNPV (PFU/มิลลิลิตร) ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคโลโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($2.65 \pm 0.79 \times 10^8$ PFU/ml) มีค่ามากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารอย่างเดียว ($2.06 \pm 0.71 \times 10^8$ PFU/ml)

ตารางผนวกที่ ก-8 จำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตร ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคโลโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเซลล์นาน 96 ชั่วโมง

สิ่งทดลอง	จำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตร ($\times 10^6$) (ค่า Log)			เฉลี่ย \pm S.D. (ค่า Log)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
เซลล์ + ไวรัส	4.82 (6.68)	5.84 (6.77)	4.68 (6.67)	5.11 ± 0.63^a (6.71 \pm 0.06)
เซลล์ + ไวรัส + สารสกัด	3.84 (6.58)	4.32 (6.64)	4.42 (6.65)	4.19 ± 0.31^a (6.62 \pm 0.04)

* ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ กรณีเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตรในสิ่งทดลอง 2 สิ่งทดลอง คือ เซลล์+ไวรัส+อาหาร และ เซลล์+ไวรัส+สารสกัด ใช้วิธี T-Test แบบ Paired Samples Test

การตั้งสมมติฐาน

H_0 : ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตรของ 2 สิ่งทดลองเท่ากัน

H_1 : ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตรของ 2 สิ่งทดลองไม่เท่ากัน

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 T1	6.7067	3	.05508	.03180
T2	6.6233	3	.03786	.02186

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 T1 & T2	3	.296	.809

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 T1 - T2	.08333	.05686	.03283	-.05792	.22459	2.538	2	.126

จากตาราง t (ทัสสนี่ และเดิมศรี, 2541) ค่า $t_{0.05}$ df 2 = 4.303 (two-tailed) จากกรคำนวณ ผลในตาราง Paired Samples Test ได้ค่า $t = 2.538$ ซึ่งตกอยู่ใน Acceptance region ดังนั้นค่า $p > 0.05$

สรุปค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส AcMNPV ต่อมิลลิลิตร ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร มีค่าไม่แตกต่างกันกับที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรอกนอนตายหยากชั้นไคคอลล โรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเซลล์นาน 96 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ก-9 จำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส AcMNPV ต่อเซลล์ ในเซลล์ไลน์ Sf9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอน ตายหยาบชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร บ่มเซลล์นาน 96 ชั่วโมง

สิ่งทดลอง	จำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส AcMNPV ต่อเซลล์			เฉลี่ย \pm S.D.*
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
เซลล์ + ไวรัส	11.16	14.71	10.61	12.16 \pm 2.23 ^a
เซลล์ + ไวรัส + สารสกัด	11.33	13.85	15.03	13.40 \pm 1.89 ^a

* ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ กรณีเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส AcMNPV ต่อเซลล์ในสิ่งทดลอง 2 สิ่งทดลอง คือ เซลล์+ไวรัส+อาหาร และเซลล์+ไวรัส+สารสกัด ใช้วิธี T-Test แบบ Paired Samples Test

การตั้งสมมติฐาน

H_0 : ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส AcMNPV ต่อเซลล์ของ 2 สิ่งทดลองเท่ากัน

H_1 : ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส AcMNPV ต่อเซลล์ของ 2 สิ่งทดลองไม่เท่ากัน

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 T1	12.1600	3	2.22542	1.28485
T2	13.4033	3	1.89001	1.09120

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 T1 & T2	3	.082	.948

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 T1 - T2	-1.24333	2.79886	1.61592	-8.19609	5.70943	-.769	2	.522

จากตาราง t (ทัสสนี และเตมศรี, 2541) ค่า $t_{.05}$ df 2 = 4.303 และ -4.303 (two-tailed) จากการคำนวณ ผลในตาราง Paired Samples Test ได้ค่า $t = -0.769$ ซึ่งตกอยู่ใน Acceptance region ดังนั้นค่า $p > 0.05$

สรุปค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส AcMNPV ต่อเซลล์ ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร มีค่าไม่แตกต่างกันกับที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเซลล์นาน 96 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ก-10 ค่าร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มนาน 96 ชั่วโมง

สิ่งทดลอง	ร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9 (Corrected % Reduction)			ค่าเฉลี่ยร้อยละการลดจำนวนลงของไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9 ± S.D. * (Corrected % Reduction ± S.D.)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
เซลล์+ไวรัส+อาหาร	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 ± 0 ^a (0 ± 0)
เซลล์+ไวรัส+สารสกัด	-26.67 (-29.81)	-23.85 (-22.41)	-42.64 (-30.12)	-31.05 ± 10.13 ^b (-27.45 ± 4.36)

* ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ กรณีเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการลดจำนวนลงที่แท้จริง (Corrected % Reduction) ของไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้วิธี T-Test แบบ Paired Samples Test การตั้งสมมติฐาน

H_0 : ค่าเฉลี่ยของการลดจำนวนลงที่แท้จริง (Corrected % Reduction) ของไวรัส AcMNPV 2 สิ่งทดลอง มีค่าเท่ากัน

H_1 : ค่าเฉลี่ยของการลดจำนวนลงที่แท้จริง (Corrected % Reduction) ของไวรัส AcMNPV 2 สิ่งทดลอง มีค่าไม่เท่ากัน

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	T1	.0000	3	.00000	.00000
	T2	-27.4467	3	4.36463	2.51992

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 T1 - T2	27.44667	4.36463	2.51992	16.60431	38.28902	10.892	2	.008

จากตาราง t (ทัสสันี และเดิมศรี, 2541) ค่า $t_{.05, df 2} = 4.303$ (two-tailed) จากการคำนวณ ผลในตาราง Paired Samples Test ได้ค่า $t = 10.892$ ซึ่งตกอยู่นอกเขต Acceptance region ดังนั้นค่า $p < 0.05$ จึงปฏิเสธ H_0

สรุปค่าเฉลี่ยของการลดจำนวนลงที่แท้จริง (Corrected % Reduction) ของไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร มีค่าแตกต่างกับค่าเฉลี่ยของการลดจำนวนลงที่แท้จริง (Corrected % Reduction) ของไวรัส AcMNPV ในเซลล์ไลน์ S9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดยค่าเฉลี่ยของการลดจำนวนลงที่แท้จริง (Corrected % Reduction) ของไวรัส *AcMNPV* ในเซลล์ไลน์ SF9 ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ -27.45 ± 4.36

สรุปได้ว่าไวรัส *AcMNPV* ที่ติดเชื้อในเซลล์ไลน์ SF9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นร้อยละ 127.45 ส่วนไวรัส *AcMNPV* ที่ติดเชื้อในเซลล์ไลน์ SF9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารมีการเพิ่มจำนวนขึ้นร้อยละ 100 แสดงว่าการเพาะเลี้ยงไวรัส *AcMNPV* ในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากชั้นไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเพิ่มจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุมร้อยละ 27.45



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุ่นเรือน เพชราวลีย์

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Asst. Prof. Dr. Ounruan Petcharawan

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-1406-00071-25-5

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อดีสะดวก

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถนน
ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร โทรศัพท์ 02-3298000 ต่อ 3581

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
ปร.ค.	ชีววิทยา/กัญญาวิทยาทาง การแพทย์	มหาวิทยาลัยมหิดล	2537
วท.ม.	สัตววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2524
กศ.บ. (เกียรตินิยม อันดับ 2)	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ	2517

ประสบการณ์งานวิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

- ชื่อโครงการ การสำรวจปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในพริกป่นในโรง
อาหารของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ปี พ.ศ. 2554

ผู้ร่วมวิจัย

- ชื่อโครงการ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านมะเร็งของ
สารสกัดหยาบจากเห็ดบางชนิด
ทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ปี พ.ศ. 2553

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

- อุนเรือน สิริวานิชกุล. 2540. การศึกษาชีววิทยาของด้วงถั่ว *Callosobruchus
maculatus* F. (Coleoptera:Bruchidae) และแตนเบียนหนอน *Dinarmus basalis* Rondani
(Hymenoptera:Pteromalidae) ในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. 1(7):36-
48.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Ratanatham, S.; Sirivanichkul, O. ; Upatham, E.S. ; Sobhon, P. ; Viyananth, V. and Ketavan, C. 1997. Scanning Electron Microscopic Study of Microfilaria and the Third Stage Larva of *Wuchereria bancrofti*. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 28(4):820- 825.
3. Ratanatham, S.; Sirivanichkul, O. ; Upatham, E.S. ; Sobhon, P.; Viyananth, V. and Ketavan, C. 1998. Scanning Electron Microscopy of the eggs of *Aedes (Finlaya) niveus* group (Diptera:Culicidae). J.E.M.S.T. 12(1):1-8.
4. อุ๋นเรื้อน เพชรวาลัย์ และ สุวัฒน์ มงคลวราภรณ์. 2545. การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวไวรัสโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทุ้หอม (*SeMNPV*) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทุ้หอม. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบ้ง. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบ้ง. 11(2):28-39.
5. Somlake, W., Petcharawan, O., and Belloncik, S. 2003. Virulence of *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus to diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) after serial passage in *Spodoptera frugiperda* cells cultivated *in vitro*. In : Biological Control and Bio-technology, Yang Qian (ed.), Harbin, Heilongjiang Science and Technology Press: 235-256.
6. Petcharawan, O., Charoensak, S. and Belloncik, S. 2005. Establishment and some characteristics of cell line derived from embryonic tissue of the American cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). The 3rd International Symposium on Bio-Control and Biotechnology in Wuhan, Yang Qian (ed.), Harbin, Heilongjiang Science and Technology Press: 107-121.
7. Petcharawan, O., Mongkolpoch, K. and Belloncik, S. 2006. A new cell line derived from embryonic tissue of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) KMITL Science and Technology Journal, 6(2):56-66.
8. Belloncik, S., Petcharawan, O., Couillard, M., Chapentier, G., Larue, B., Guardado, H., Chareonsak, S. and Imanishi, S. 2007. Development and characterization of continuous cell line, AF-On-H, from hemocytes of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera, Pyralidae). In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal, 43:245-254.
9. Petcharawan, O., Suriyasakol, K. and Vichamcharoensuk, N. 2009. Cytotoxicity of crude extracts from golden trumpet (*Allamanda cartica* L.) on Sf9 and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-HA-E1 cell lines. *In* : Study on Biological Control and Biotechnology, Yang Qian (ed.), Harbin, Heilongjiang Science and Technology Press: 101-107.

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล(ภาษาไทย) รองศาสตราจารย์ ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์

ชื่อ-นามสกุล(ภาษาอังกฤษ) Assoc. Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 -3099- 01593- 27-3

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถนน
ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร โทรศัพท์ 02-3298000 ต่อ 3581
โทรสาร 02-3298412 Email: ktdusane@kmitl.ac.th

ประวัติการศึกษา

ชื่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีจบ
Ph.D.	Applied Microbiology	มหาวิทยาลัย Strathclyde, UK.	2522-2526
วท.บ.	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2517-2521

ประสบการณ์งานวิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อโครงการวิจัย การคัดเลือกและวิเคราะห์หายีนที่ต้านสาร Benzimidazole ของ *Trichoderma harzianum* โดยเทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs)

ทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2548

2. ชื่อโครงการวิจัย การคัดเลือกยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีประสิทธิภาพในการ
ดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

(อยู่ระหว่างการขอทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2554)

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

1. Thanaboripat, D., Roisoongnoen, P., Nuchong, S. and Chantrapanthakul, M. 1996. Inhibition of aflatoxin production during tempeh preparation. *Srinakarinwirot Univ. J. Sci.* 12(2) 8-15.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Thanaboripat, D., Prem Sri, T., Punbusayakul, N. and Sukchareon, O. 1996. Effects of food preservatives on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in liquid medium. *ASEAN Food J.* 11(2) 61-64.
3. Thanaboripat, D., Kraipeerapun, K., Pattanaphongsak, C., Srisana, S. and Nanasombat, S. 1997. Detoxification of aflatoxin by *Streptococcus lactis* and lactic acid bacteria in commercial yoghurt. *Kasetsart J. (Natural Science)* 31, 117-123.
4. Thanaboripat, D., Nontabenjawan, K., Leesin, K., Teerapiannont, D., Sukchareon, O. and Ruangrattanamatee, V. 1997. Inhibitory effect of garlic, clove and carrot on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *J. Forestry Res.* 8(1) 39-42.
5. Thanaboripat, D. and Sukchareon, O. 1997. Survey of aflatoxin in human breast milk. *J. KMITL* 5(2)1-5.
6. Poonsapaya, P., Boonmee, W. and Thanaboripat, D. 1998. Mycelium culture of *Ganoderma lucidum* and its cytotoxic principles. Proceedings of the Asia-Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology, pp. 170-175, Hua Hin, Prachuapkhirikhan.
7. Pongpratoom, K., Thanaboripat, D. and Ruangrattanamatee, V. 1999. Control of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* 102566 by some preservatives. Proceedings of the 37th Kasetsart University Annual Conference in Science and Engineering, pp. 183-188, 3-5 February 1999, Kasetsart University, Bangkok.
8. Pattanawong, P., Lipipun, V. and Thanaboripat, D. 1999. Detection of *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 by ELISA. *Journal of Government Pharmaceutical Organization* 25(1) 49-61.
9. Prem Sri, T., Visarathanontha, N. and Thanaboripat, D. 2000. Resistance of *Euphorbia* spp. to *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and its control by *Trichoderma*. Proceedings of the International Conference in Plant Pathology, Harbin Institute of Technology, P.R. China.
10. Thanaboripat, D., Cheunoy, W. and Petcharat, U., Ruangrattanamatee, V. and Kraisintu, K. 2001. Control of aflatoxigenic fungi by Thai neem. *J. Gov. Pharma. Org.* 27(1) 42-50.
11. Thanaboripat, D. 2002. Importance of aflatoxins. *KMITL Sci. J.* 2(1) 38-45.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. Thanaboripat, D., Im-erb, A. and and Ruangrattanametee, V. 2003. Effect of Ling Zhi mushroom on aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. In Biological Control and Biotechnology, pp. 22-30. Heilongjiang Science and Technology Press, China.
13. Thanaboripat, D. 2003. Mycotoxins: Occurrence and Control in Foods. The International Review of Food Science and Technology, November 2003, pp.130-133.
14. Thanaboripat, D., Mongkontanawut, N., Suvathi, Y. and Ruangrattanametee, V., 2004. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil. *KMITL Sci. J.* 4(1)1-8.
15. Ruiqian, L., Qian, Y., Thanaboripat, D. and Thansukon, P. 2004. Screening of *Trichoderma* species for biological control activity on *Aspergillus flavus*. *KMITL Sci. J.* 4(1)81-89.
16. Ruiqian, L., Qian, Y., Thanaboripat, D. and Thansukon, P. 2004. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *KMITL Sci. J.* 4(1) 238-250.
17. Thanaboripat, D., Prugchareon, P. and Ruangrattanametee, V. 2005. Inhibitory effect of some medicinal plant extracts on the growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. In Study on Plant Pest and Disease Biological Control and Biotechnology, pp. 52-62. Edited by Yang Qian. Heilongjiang Science and Technology Press, China.
18. Thanaboripat, D., Suvathi, Y. and Chantarateptawan, V. 2005. Control of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by medicinal and aromatic plants. In Study on Plant Pest and Disease Biological Control and Biotechnology, pp. 13-24. Edited by Yang Qian. Heilongjiang Science and Technology Press, China.
19. Thanaboripat, D., Chareonsettasilp, S., Pandee, K. and Udomwongsup, K. 2006. Inhibitory effect of kaffir lime, bitter cucumber and tobacco extracts on the growth of *Aspergillus flavus*. *KMITL Sci. Tech. J.* 6(1)18-24.
20. Thanaboripat, D., Sukchareon, O. and Ruangtaweessin, V. 2007. Optimization condition for xylanase production from *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 in solid state fermentation. *J. KMITL* 15(1) 23-31.
21. Thanaboripat, D., Suvathi, Y., Srilohasin, P., Sripakdee, S., Patthanawanitchai, O. and Charoensettasilp, S. 2007. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. *KMITL Sci. Tech. J.* 7(1) 1-7.

22. Thanaboripat, D., Nuntakarn, C. and Charoensettasilp, S. 2009. The effect of ammonium carbonate and ammonium chloride on aflatoxin production. In Study on Biological and Bio- technology, pp.1-13. Edited by Yang Qian. Heilongjiang Science and Technology Press, China.
24. Thanaboripat, D., Sukcharoen, O., Thipsuwan, K., Wanasitt, J. and Duangjai, N. 2009. Aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* during soy sauce fermentation. In Study on Biological and Bio- technology, pp.140-149. Edited by Yang Qian. Heilongjiang Science and Technology Press, China.
25. Jantarach, J. and Thanaboripat, D. 2010. Efficacy of crude extract of *Trichoderma* spp. on growth inhibition and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* IMI 242684 in peanut grains. In The Proceeding of 48th Kasetsart University Annual Conference. Vol. 6, Subject: Science, pp. 191-199. Papermate, Thailand.

