

การระบุสายพันธุ์ของผักอีหนูโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ
การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น

IDENTIFICATION OF E-NOON USING NUCLEOTIDE SEQUENCE
AND PRELIMINARY STUDY ON THE BIOACTIVITIES



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IDENTIFICATION OF E-NOON USING NUCLEOTIDE SEQUENCE
AND PRELIMINARY STUDY ON THE BIOACTIVITIES



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF BACHLOR OF SCIENCE
(BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การระบุสายพันธุ์ของผักอินทรีย์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น	
	Identification of E-Noon using Nucleotide Sequence and Preliminary Study on the Bioactivities	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชวลิตา เฟ็งเจริญรัตน์	รหัสนักศึกษา 58050739
	นางสาวโยษิตา วังศรีคุณ	รหัสนักศึกษา 58050803
	นายเอกลักษณ์ นครเก่า	รหัสนักศึกษา 58050851
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
ปีการศึกษา	2561	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัทธรา โพธิ์เอี่ยม	

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ กรรมการ	
ผศ.ดร.สุพัทธรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การระบุสายพันธุ์ของผักอินูนโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น	
	Identification of E-Noon using Nucleotide Sequence and Preliminary Study on the Bioactivities	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชวลิตา เฟ็งเจริญรัตน์	รหัสนักศึกษา 58050739
	นางสาวโยษิตา วังศรีคุณ	รหัสนักศึกษา 58050803
	นายเอกลักษณ์ นครเก่า	รหัสนักศึกษา 58050851
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
ปีการศึกษา	2561	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัชรา โพธิ์เอี่ยม	

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ ระบุสายพันธุ์ของผักอินูน และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผักอินูนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลจากส่วนต่างๆ (ใบ ดอก และผล) การระบุชนิดของผักอินูนจำนวน 3 ตัวอย่างที่ได้มาจากจังหวัดกำแพงเพชร นครราชสีมา และอุทัยธานี โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน ITS และ *trnL-trnF* พบว่ามีความสัมพันธ์กับ *Adenia heterophylla* โดยมีค่าความคล้ายคลึงร้อยละ 93.06 และ 98.33 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามในฐานข้อมูลไม่ปรากฏลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. viridiflora* และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก และผลของผักอินูน ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ไม่แสดงฤทธิ์การต้านแบคทีเรียทั้ง *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus epidermidis* ในด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าเฉพาะสารสกัดจากใบที่แสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (50% Inhibition Concentration: IC₅₀) โดยมีค่าเท่ากับ 489.42 และ 778.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ : อินูน ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Identification of E-Noon using Nucleotide Sequence and Preliminary Study on the Bioactivities	
Students	Miss Chalida Pengcharoenrat	Student ID 58050739
	Miss Yosita Wangsrikhun	Student ID 58050803
	Mr. Akekaluk Nakronkao	Student ID 58050851
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic	Year 2561	
Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim	

Abstract

The purpose of this study was to identify species of E-noon plant and to examine the bioactivity of methanolic extract from different parts (leaf, flower and fruit) of E-noon plant. Three E-Noon plant from Kamphaeng Phet, Nakhon Ratchasima and Uthai Thani provinces were identified using DNA sequences from the ITS and *trnL-trnF* regions. This study has found that the DNA sequences related to *Adenia heterophylla* which showed 93.06% and 98.33% identity with the ITS and *trnL-trnF* regions, respectively. However, *A. viridiflora* sequences are not present in the NCBI database. Methanolic extracts from leaves, flowers and fruits in concentration 1,000 mg/disc did not present any antibacterial activity against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus epidermidis*. The antioxidant activities in DPPH and ABTS assay were evaluated of plant extracts. Results showed that only methanolic extract from E-Noon leaves exhibited IC₅₀ (50% Inhibition Concentration) of 489.42 and 778.61 µg/ml for DPPH and ABTS scavenging activities, respectively.

Keywords : E-Noon, Antibacterial, Antioxidant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิด ตลอดจนการเสนอแนวทางการวางแผนและการแก้ปัญหาต่าง ๆ ระหว่างการทำโครงการพิเศษ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ในการใช้ชีวิตได้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ และ ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ ที่ร่วมเป็นกรรมการสอบโครงการพิเศษนี้ นอกจากนี้ยังคอยช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ และชี้แนะในการแก้ไขโครงการพิเศษเล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณพี่ ๆ ปริญญาโททุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำในทุก ๆ ด้าน จนโครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับการทดลองโครงการพิเศษนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบิดา มารดา ตลอดจนเพื่อน ๆ ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำโครงการพิเศษนี้จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ชาลิตา เพ็งเจริญรัตน์
โยชิตา วังศรีคุณ
เอกลักษณ์ นครเก่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ผักอินูน.....	3
2.2 การระบุชนิดของพืชโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	4
2.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	7
2.3.1 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.....	7
2.3.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ.....	8
2.3.2.1 วิธี DPPH.....	8
2.3.2.2 วิธี ABTS.....	8
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	10
3.1 ตัวอย่างพืช.....	10
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	10
3.3 สารเคมี.....	11
3.4 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา.....	12
3.5 การระบุชนิดของผักอินูนโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	13
3.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ.....	13
3.5.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ.....	13
3.5.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	15
3.6 การสกัดสารสกัดจากผักอินทรีย์.....	15
3.7 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	16
3.7.1 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.....	16
3.7.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ.....	16
3.7.2.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	16
3.7.2.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS.....	17
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	19
4.1 ผลการระบุชนิดของผักอินทรีย์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	19
4.1.1 ผลการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ.....	19
4.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณชนิดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	19
4.1.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	20
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	22
4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.....	22
4.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	24
4.2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS.....	26
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	29
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	29
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	29
เอกสารอ้างอิง.....	30
ภาคผนวก.....	33
ภาคผนวก ก.....	34
ภาคผนวก ข.....	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ.....	14
3.2 องค์กรประกอบสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	14
3.3 ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	14
4.1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบของตัวอย่างผักอินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา.....	18
4.2 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก และผลของผักอินทรีย์.....	24
4.3 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก และผลของผักอินทรีย์.....	27



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ลักษณะเฉพาะของผักอินูน..... 3
2.2	โครงสร้างของ Ribosomal DNA ในพืช..... 5
2.3	แผนภาพแสดงบริเวณ <i>trnL-trnF</i> intergenic spacer..... 6
4.1	แสดงชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์..... 19
4.2	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิคพีซีอาร์ที่บริเวณ ITS..... 20
4.3	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิคพีซีอาร์ที่บริเวณ <i>trnL-trnF</i> 20
4.4	ลักษณะวงใสของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์..... 22
4.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไทโรลอคซ์..... 23
4.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารสกัดจากใบ ดอก และผลของผักอินูน และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH..... 25
4.7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ต่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไทโรลอคซ์..... 26
4.8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารสกัดจากใบ ดอก และผลของผักอินูน และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS..... 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
ITS	Internal Transcribed Spacer
<i>trnL-trnF</i>	<i>trnL-trnF</i> Intergenic Spacers
GenBank	ฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DPPH	Diphenylpicrylhydrazyl
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
IC ₅₀	Inhibitory Concentration of 50%
mM	Millimolar
μM	Micromolar
PCR	Polymerase chain reaction
DNA	Deoxyribonucleic acid
MEGA6	Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ผักอินทรีย์เป็นพืชเถาเลื้อยพันธุ์ที่ขึ้นอยู่ในป่า และเจริญเติบโตขึ้นคลุมยอดไม้ต่าง ๆ ซึ่งเลื้อยพาดพันยอดไม้ที่สูงจากพื้นดินมากกว่า 20 เมตร (Santisuk *et al.*, 2010) ชาวบ้านนิยมนำมารับประทานแต่ข้อมูลในส่วนของพฤกษเคมี (Phytochemicals) ที่คาดว่าจะมีผลต่อการบริโภคในเชิงของสารออกฤทธิ์อันเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ผู้บริโภคนั้นยังมีไม่มากนัก ทั้งนี้สารพฤกษเคมีที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากแต่การศึกษายังมีน้อย ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และคลอโรฟิลล์ เพราะสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Pourmorad *et al.*, 2006) ซึ่งอนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์มีปัจจัยที่เกิดขึ้นมากมายทั้งภายใน และภายนอกร่างกาย วิถีชีวิตในปัจจุบันที่เปลี่ยนแปลงไป การไม่ใส่ใจสุขภาพ ไม่ว่าจะเป็นเรื่องการคัดเลือกคุณค่า และปริมาณของอาหารที่รับประทานไม่เหมาะสม การพักผ่อนไม่เพียงพอ ไม่มีเวลาสำหรับการออกกำลังกาย การมีความเครียดท่ามกลางสภาวะแวดล้อม และมลภาวะรอบตัว ทั้งหมดล้วนเป็นปัจจัยที่เพิ่มอนุมูลอิสระในตัวเราทั้งสิ้น ซึ่งในวงการแพทย์ พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์เสื่อม นำไปสู่การแก่ชราหรือความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน และโรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น ทำให้พบปัญหาสุขภาพจากโรคเรื้อรังมากขึ้น จากรายงานการศึกษาต่าง ๆ พบว่าสารพฤกษเคมีจำนวนมากโดยเฉพาะสารกลุ่มฟีนอลิก มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ การได้รับสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงลดความเสี่ยง และความเสี่ยงโรคเรื้อรังที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้ การค้นพบสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้จากธรรมชาติจึงเป็นที่ยอมรับได้อย่างมากในปัจจุบัน ผักอินทรีย์เป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีสรรพคุณทางยา เช่น การแก้ท้องเสีย บำรุงตับ บำรุงเลือดหลังคลอด ฯลฯ จากสรรพคุณดังกล่าวข้างต้น พบว่าผักอินทรีย์เป็นพืชที่มีประโยชน์ทั้งทางเภสัชศาสตร์ และทางโภชนาการ (ระบบฐานข้อมูลทรัพยากรชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่นของชุมชน, 2553)

อย่างไรก็ตามผักอินทรีย์ยังไม่มีกระบวนการสายพันธุ์ที่แน่ชัดได้ เนื่องจากมีการเรียกชื่อท้องถิ่นของพืชที่แตกต่างกัน เช่น อนุ นู นานูน และผักสาบ เป็นต้น มีการแบ่งชนิดของผักอินทรีย์โดยใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ต่างกัน แต่ไม่พบข้อมูลยืนยันว่าผักอินทรีย์นั้นสามารถแบ่งชนิดออกจากกันได้ จึงควรมีการระบุชนิดให้ถูกต้อง โดยการระบุชนิดพืชนั้นทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การตรวจสอบทางเภสัชวิทยา และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี แต่วิธีการดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในเรื่องความถูกต้อง และความรวดเร็ว จึงอาจต้องใช้หลายวิธีร่วมกันในการระบุชนิดพืชที่ถูกต้อง (World Health Organization, 1998) เพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดเหล่านี้ในปัจจุบันได้มีการนำข้อมูลรหัสพันธุกรรมซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงสั้น ๆ ที่มีความแปรผันสูง และสามารถใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตได้ มาใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ รวมทั้งพืชได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ (Hebert *et al.*, 2003 ; Hebert *et al.*, 2004) นอกจากนั้นยังสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการควบคุมเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณภาพยาสมุนไพรได้ในอนาคต งานวิจัยนี้ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะมาใช้ในการระบุชนิดของพืช เพราะพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกันนั้นมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมากทำให้ยากต่อการระบุชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงการพิเศษนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาตำแหน่งดีเอ็นเอของพืชสกุล *Adenia* จำนวน 2 บริเวณ ได้แก่ ดีเอ็นเอในนิวเคลียส คือ internal transcribed spacer และดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ คือ *trnL-trnF* intergenic spacers โดยประเมินความสามารถในการระบุชนิดของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 บริเวณดังกล่าว เพื่อที่จะระบุสายพันธุ์ได้อย่างแน่ชัด

นอกจากนี้ยังสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผักอินูน โดยการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านแบคทีเรียชนิดที่เกี่ยวข้องกับทางเดินอาหารของมนุษย์ เพื่อหวังว่าการพบฤทธิ์ทางชีวภาพของผักอินูนนี้จะสามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งหรือเป็นยาแก้ท้องเสียได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียและการต้านอนุมูลอิสระของผักอินูนจากส่วนใบ ดอก และผล
- 1.2.2 การระบุสายพันธุ์ของผักอินูนได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาตัวอย่างผักอินูนจากจังหวัดนครสวรรค์ จังหวัดกำแพงเพชร จังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดอุทัยธานี
- 1.3.2 ศึกษาเฉพาะสารสกัดในตัวทำละลายชั้นเมทานอลจากใบ ดอก และผลของผักอินูน
- 1.3.3 ศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียโดยใช้แบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Salmonella typhimurium* DMST 0562 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- 1.3.4 ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Diphenylpicrylhydrazyl radical scavenging (DPPH) และวิธี Radical cation decolorization (ABTS)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถทราบฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันในส่วนต่าง ๆ ของผักอินูนว่า ส่วนใบ ดอก และผล มีฤทธิ์ในด้านกรยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และการต้านอนุมูลอิสระ ทำให้สามารถที่จะใช้ประโยชน์โดยการนำผลการศึกษาที่ได้ไปพัฒนาต่อในอนาคต เช่น ด้านเภสัชวิทยา
- 1.4.2 สามารถระบุสายพันธุ์ของผักอินูนได้อย่างถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผักอีหนู

ผักอีหนูมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Adenia viridiflora* Craib เป็นผักพื้นเมืองของจังหวัดนครสวรรค์ และบริเวณจังหวัดใกล้เคียง แต่พบมากในบริเวณพื้นที่ป่าชุมชนบ้านเขาดิน ตำบลวังน้ำลาด อำเภอไพศาลี จังหวัดนครสวรรค์ เป็นผักเศรษฐกิจที่ขึ้นเองตามธรรมชาติในป่า "ดอกอีหนู" เป็นดอกไม้ที่สร้างรายได้ให้ชาวบ้าน แต่ออกดอก และเก็บผลผลิตได้แค่ปีละครั้งเท่านั้น โดยดอกอีหนูเริ่มออกดอกตั้งแต่เดือนธันวาคม และมีมากในเดือนมกราคมถึงมีนาคม ปัจจุบันพบเห็นได้มากตามป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรัง ลักษณะเป็นเถาเนื้อแข็ง (รูปที่ 2.1 ก) และเลื้อยพาดพันอยู่กับต้นไม้สูง (รูปที่ 2.1 ข) เมื่อถึงฤดูแล้งเถาอีหนูจะผลัดใบแล้วแตกดอกออกผล ซึ่งเป็นช่วงสำคัญที่ชาวบ้านจะเข้าไปเก็บมาขาย พอหมดฤดูกาลที่ออกดอก และผลเถาอีหนูจะผลิใบแตกยอด และขยายพันธุ์ (กรมป่าไม้, 2553) โดยมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ดังนี้

ต้น ไม้เถาเลื้อยพาดพันต้นไม้ยืนอายุหลายปีแตกแขนงข้าง เถามีลักษณะกลมสีเขียวเข้ม ผิวเรียบและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน และผิวขรุขระมีร่องเล็กๆ ตามลำต้น

ใบ ใบเดี่ยวออกตรงกันข้ามกันใบสั้น ใบรูปหัวใจ โคนใบสอบปลายใบแหลมขอบใบเรียบ แผ่นใบเรียบค่อนข้างแข็งสีเขียวเข้ม ขนาดใบกว้าง 5-8 ซม. ยาว 8-15 ซม.

ดอก ออกเป็นกลุ่มตามซอกใบแบบก้านร่ม มีก้านดอกยาวประมาณ 3 ซม. มีกลีบดอกสีเขียวออกเหลือง จำนวน 4-5 กลีบ ขนาดประมาณ 1 ซม.

ผล ลักษณะทรงกลมสีเขียวขนาดเท่าหัวแม่มือ ภายในมีเมล็ดเดี่ยว (เต็ม, 2523)



ก

ข

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะเถาของผักอีหนู (ก) และ แสดงลักษณะเถาของผักอีหนูที่เลื้อยพันต้นไม้สูง (ข)

(ที่มา : นางสาวหวานใจ ศรีโฉมงาม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจัดอนุกรมวิธานของผักอีนูนดังนี้

Kingdom Plantae Super division Angiosperms

Division : Eudicots

Class : Rosids

Order : Malpighiales

Family : Passifloraceae

Genus : *Adenia*

Species : *viridiflora*

(ที่มา : ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์)

ผักอีนูนมีชื่อเรียกที่ต่างกันออกไปตามแต่ละท้องถิ่น เช่น อะนูน นางนูน และผักสาบ เป็นต้น แต่ในปัจจุบันมีบทความของ ขจิต ฝอยทอง (2558) กล่าวว่าสามารถแบ่งผักอีนูนได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่เรียกว่า “นางนูน” มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Adenia heterophylla* (Blume) Koord และชนิดที่เรียกว่า “ผักสาบ” มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Adenia viridiflora* Craib ซึ่งสังเกตจากรูปลักษณ์ภายนอกของทั้งสองชนิด จะเห็นส่วนที่แตกต่างกันชัดเจนในส่วนผล โดย “นางนูน” มีผลเล็กกว่า มีรูปร่างแบนรูปไข่ ส่วน “ผักสาบ” มีผลโตกว่า รูปทรงกลมกว่า และเปลือกของผลหนา แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบงานวิจัยที่สามารถแบ่งผักอีนูน และผักสาบออกจากกัน ได้ดังบทความข้างต้น ซึ่งในหนังสือพืชกินได้ในป่าสะแกราช ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยได้ใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ของผักอีนูนว่า *Adenia viridiflora* Craib โดยบอกว่าชื่อผักอีนูนเป็นชื่อเรียกในท้องถิ่น แต่ชื่อสามัญมีชื่อว่าผักสาบ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551) ทำให้เกิดความสับสนในการใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ของผักอีนูน

2.2 การระบุชนิดของพืชโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์

การระบุชนิดพืชด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถลดความผิดพลาดของการใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว มีความรวดเร็วในการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต และที่สำคัญสามารถใช้จัดจำแนกสิ่งมีชีวิตในทุกระยะของการเจริญ (Lee *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2012a)

2.2.1 ดีเอ็นเอในนิวเคลียส

Ribosomal DNA (rDNA) เป็นบริเวณดีเอ็นเอที่มีการถอดรหัส (Coding region) เป็น Ribosomal RNA (rRNA) ซึ่ง rDNA จะมีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ กัน (Repeat unit) เป็นพัน ๆ ซ้ำในจีโนมพืชซึ่งแต่ละหน่วยซ้ำจะมีส่วนของ intergenic spacer (IGS) คั่นกลางอยู่ และแต่ละหน่วยซ้ำจะถูกถอดรหัสโดยเริ่มจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี จำนวน 17 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ในประเทศไทยจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ กะทกรก (*P. foetida*) และเสาวรส (*P. edulis* var. *flavicarpa*) พบว่า มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับชนิด (Species) สูง และมีความสัมพันธ์กันค่อนข้างสูงมากกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่างใบ

2.2.2 ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์

ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์เป็นโฮโมไซกัสที่ได้รับมาจากแม่เพียงฝ่ายเดียวทำให้ง่ายต่อการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ และจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์พืชมีสูงมาก จึงมีความเหมาะสมในการนำมาสกัดดีเอ็นเอ ตัวอย่างยีนในคลอโรพลาสต์ คือ *trnL-trnF* intergenic spacer เป็นดีเอ็นเอส่วนที่ไม่มีการควบคุมการสร้างโปรตีน (non-coding region) ที่อยู่ระหว่างยีน *trnL* และยีน *trnF* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างกรดอะมิโนลิวซีน (leucine, L) และฟีนิลอะลานีน (phenylalanine, F) ตามลำดับ (รูปที่ 2.3) ซึ่งดีเอ็นเอบริเวณนี้จะมีอัตราการแทนที่ของเบสสูงจึงสามารถใช้ในการระบุชนิดพืชได้ และนิยมใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับวงศ์ และสกุล เพื่อแก้ปัญหาเกี่ยวกับการจัดจำแนกกลุ่มพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่ชัดเจน (Bayer and Starr, 1998 ; Bortiria *et al.*, 2001 ; Nyffeler, 2001) นอกจากนี้ยังมีการใช้ดีเอ็นเอบริเวณ *trnL-trnF* นี้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในวงศ์เหงือกปลาหมอ (McDade and Moody, 1999 ; McDade *et al.*, 2005) และมีการใช้ในการระบุชนิดพืชสมุนไพรในสกุล *Cinnamomum* อีกด้วย (Kojoma *et al.*, 2002)



รูปที่ 2.3 แผนภาพแสดงบริเวณ *trnL-trnF* intergenic spacer

(ที่มา : ปิยาภรณ์ วงศ์อักษร, 2558)

Shaw และคณะ (2002) กล่าวว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ non-coding sequence ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นิยมนำมาใช้ในการจัดจำแนกพืชซึ่งมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและกระบวนการวิวัฒนาการของพืชได้ดี

McDade and Moody (1999) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ *Acanthaceae* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ intron และ spacer ของบริเวณ *trnL-trnF* ที่สกัดได้จากคลอโรพลาสต์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ intron และ spacer ของบริเวณ *trnL-trnF* มีความคล้ายคลึงในกลุ่มที่เป็นสกุลเดียวกัน และต่างสกุลกันอีกทั้งยังบ่งชี้ว่า พืชสกุลต่าง ๆ ที่อยู่วงศ์ *Acanthaceae* คือ *Ruelia*, *Justicia* และ *Barleria* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพืชในสกุล *Eritraria* มากกว่าพืชสกุล *Thumbergia* และ *Mendoncia* ตามลำดับ และสามารถแบ่งกลุ่มของพืชวงศ์ *Acanthaceae* ออกเป็น 4 กลุ่มสำคัญคือ *Acanthus*, *Ruelia*, *Justicia* และ *Barleria*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุพัตรา และคณะ (2556) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 16 ตัวอย่าง และนอกสกุล *Barleria* จำนวน 2 ตัวอย่าง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอสามารถแบ่งพืชสกุล *Barleria* ออกได้ตามชนิด แต่หญ้าห้วนาค (*B. strigosa* var. *polytricha*) ที่จัดให้อยู่ในพืชชนิดเดียวกันกับสังกรณี (*B. strigosa*) แสดงความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ

2.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.3.1 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

อมรรัตน์ (2550) กล่าวว่าวิธีการวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion เป็นวิธีที่นิยมมากในห้องปฏิบัติการเนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถปฏิบัติได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว รวมทั้งสามารถให้ผลที่แน่นอนและถูกต้อง การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เติมลงบนกระดาษกรอง (filter paper disc) ซึ่งวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ใช้ในการตรวจสอบไว้ สารออกฤทธิ์จะแพร่จากจุดเริ่มต้นไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อระยะทางที่สารแพร่ออกไปเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารนั้นจะลดลงทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสาร ณ จุดต่าง ๆ กันรอบแผ่นกระดาษกรอง ในขณะเดียวกันเชื้อแบคทีเรียบนผิวของอาหารที่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารออกฤทธิ์ ณ ความเข้มข้นของสารที่จุดใด ๆ (ไกลกระดาษกรอง) ก็จะเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นจนเห็นได้ชัด แต่บริเวณใกล้กระดาษกรองซึ่งมีความเข้มข้นของสารมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้ จะไม่มีการเจริญของเชื้อให้เห็นจึงเกิดเป็นวงใส (Clear zone) ขึ้น อัตราการแพร่ของสารออกฤทธิ์ผ่านไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส ซึ่งจะบอกถึงความสามารถของสารที่นำมาทดสอบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้มากน้อยเพียงใด ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียวัดได้จากขนาดของวงใส โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC)

Saravanan และคณะ (2014) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในเสาวรสหวานพันธุ์สีทอง (*Passiflora ligularis*) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับผักอินูน ทำการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion โดยการนำสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลจากเนื้อผลมาหยดลงบนกระดาษกรองแล้วนำไปวางบนอาหารแข็งที่มีเชื้อ และบ่มทิ้งไว้แล้วบันทึกผล โดยวัดค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโต ในหน่วยมิลลิเมตร (รวมถึงเส้นผ่านศูนย์กลางแผ่นดิสก์ 6 มิลลิเมตร) พบว่าสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลจากเนื้อผลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus fecalis* (13 มิลลิเมตร) *S. pyogenes* (13 มิลลิเมตร) *Bacillus subtilis* (11.33 มิลลิเมตร) *Klebsiella pneumonia* (19 มิลลิเมตร) *Salmonella paratyphi* (21.67 มิลลิเมตร) *S. typhi A* (20.67 มิลลิเมตร) *S. typhi B* (18 มิลลิเมตร) และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเชื้อรา *Candida albicans* (11.34 มิลลิเมตร) และ *Aspergillus niger* (13.13 มิลลิเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

2.3.2.1 วิธี DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl radical scavenging assay)

บุหรัน (2556) กล่าวไว้ว่าเป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ก็คืออนุมูลอิสระ DPPH (Diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว และมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) แล้วบ่มเป็นระยะเวลา 30 นาที ในที่มืด จะทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลืองทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้สารมาตรฐานในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ โทรลอกซ์ (Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) แสดงค่าเป็น TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) มีหน่วยเป็น มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม หรือ ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัม ซึ่งสามารถคำนวณได้จากนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังนี้



โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสียคือ DPPH[•] ค่อนข้างเสถียรไม่ว่าต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อน และโลหะจะรบกวน (Interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรบกวนแล้วทำให้สีของ DPPH[•] จางลงได้เช่นกัน

2.3.2.2 วิธี ABTS (Radical cation decolorization assay)

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoli=ne-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจาก ABTS^{•+} ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS^{•+} ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ABTS^{•+} ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจาง ซึ่งจะทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ซึ่งวิธีการคำนวณ และการเทียบกับสารมาตรฐาน โทรลอกซ์ กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ABTS^{•+} ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ ABTS⁺ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกาย หรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ

Saravanan และคณะ (2014) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเสาวรสวนพันธุ์สีทอง (*P. ligularis*) ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับผักอีหนูด้วยวิธี DPPH และ ABTS โดยการนำตัวอย่างเนื้อผลมาอบให้แห้งหลังจากนั้นบดให้ละเอียดแล้วนำไปสกัดกับชุดสกัด Soxhlet ด้วยเมทานอล แล้วนำไปประเหยตัวทำละลายออก พบว่ามีความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 23.71 กรัมต่อมิลลิตร และมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระเทียบกับโทลอกซ์ด้วยวิธี ABTS เท่ากับ 4,725.45 ไมโครโมลต่อลิตรโทลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

- 3.1.1 ตัวอย่างใบสดของผักอินูนจากจังหวัดนครสวรรค์
 - 3.1.2 ตัวอย่างใบสดของผักอินูนจากจังหวัดกำแพงเพชร
 - 3.1.3 ตัวอย่างใบสดของผักอินูนจากจังหวัดนครราชสีมา
 - 3.1.4 ตัวอย่างใบ ดอก และผลของผักอินูนที่อบแห้งแล้วจากจังหวัดอุทัยธานี
- ตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่างได้รับความอนุเคราะห์จาก นางสาวหวานใจ ศรีโฉมงาม

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.2.1 กระดาษกรอง Whattman เบอร์ 1
- 3.2.2 กระดาษฟอยล์ (aluminium foil)
- 3.2.3 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)
- 3.2.4 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (balance)
- 3.2.5 เครื่องถ่ายภาพเจล (UV transilluminator)
- 3.2.6 เครื่องทำความเย็น (freezer) ได้แก่ ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส และตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
- 3.2.7 เครื่องปั่น (blender)
- 3.2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge)
- 3.2.9 เครื่องผสมสาร (mixer)
- 3.2.10 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
- 3.2.11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- 3.2.12 เครื่องระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator)
- 3.2.13 เครื่องอบลมร้อน (hot air oven)
- 3.2.14 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler machine)
- 3.2.15 เครื่องแก้ว (glassware)
- 3.2.16 จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plates)
- 3.2.17 ชุดกรองสารแบบลดความดัน (buchner)
- 3.2.18 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis set)
- 3.2.19 ชุดโม่บดตัวอย่าง (mortar และ pestle)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.20 ช้อนตักสาร (spetula)
- 3.2.21 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (burner)
- 3.2.22 ตู้ดูดควัน (protector laboratory hood)
- 3.2.23 ตู้ปลอดเชื้อ (larmina air flow)
- 3.2.24 ปากคีบ (forcepts)
- 3.2.25 ปิเปตทิป ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (pipette tip)
- 3.2.26 ปิเปตแบบอัตโนมัติ (automatic pipette)
- 3.2.27 ผ้าขาวบาง (filter cloth)
- 3.2.28 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
- 3.2.29 หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube)
- 3.2.30 หลอดสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส
- 3.2.31 ห่วงเชี่ยเชื้อ (loop)
- 3.2.32 แผ่นดิสก์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร (paper disc)
- 3.2.33 โถดูดความชื้น (desicator)
- 3.2.34 ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (sterile cotton swab)
- 3.2.35 เตาไมโครเวฟ (microwave)
- 3.2.36 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 ภูัน (Agar)
- 3.3.2 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)
- 3.3.3 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- 3.3.4 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)
- 3.3.5 Agarose gel
- 3.3.6 Absolute ethanol
- 3.3.7 Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)
- 3.3.8 Chloroform
- 3.3.9 Deionized water
- 3.3.10 DNA ladder ขนาด 1 kb และ 100 bp
- 3.3.11 DNA loading buffer
- 3.3.12 dNTPs

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.13 Ethidium bromide
- 3.3.14 Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)
- 3.3.15 Gentamicin
- 3.3.16 Isoamylalcohol
- 3.3.17 Isopropanol
- 3.3.18 Magnesium chloride ($MgCl_2$)
- 3.3.19 Methanol
- 3.3.20 Mueller hinton broth (MHB)
- 3.3.21 Nutrient broth (NB)
- 3.3.22 Potassium persulfate
- 3.3.23 Polyvinyl pyrolidone (PVP)
- 3.3.24 Primer C (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3')
- และ Primer F (5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3')
- 3.3.25 Primer ITS1 Passiflora (5'-AAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3')
- และ Primer ITS2 Passiflora (5'-TATGCTTAAACTCAGCGGG-3')
- 3.3.26 RNase A
- 3.3.27 10X Standard *taq* reaction buffer
- 3.3.28 Sodium acetate
- 3.3.29 *Taq* DNA polymerase
- 3.3.30 TBE Buffer
- 3.3.31 TE Buffer
- 3.3.32 Tris-HCl
- 3.3.33 β -mercaptoethanol

3.4 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

- 3.4.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- 3.4.2 *Escherichia coli* ATCC 25922
- 3.4.3 *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- 3.4.4 *Salmonella typhimurium* DMST 0562
- 3.4.5 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การระบุชนิดของผักอีนูนโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงวิธีของ Doyle and Doyle (1990) โดยนำตัวอย่างใบจากจังหวัดกำแพงเพชร นครราชสีมา และอุทัยธานี มาล้างน้ำให้สะอาด ซับให้แห้งแล้วตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโกร่ง จากนั้นใส่ ไนโตรเจนเหลว และบดจนละเอียด เติม 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับตัวอย่าง ถ่ายตัวอย่าง ที่บดลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร และเติมสาร β -Mercaptoethanol 2 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุก 10 นาที แล้วทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร เติม Rnase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองบ่มในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม CTAB 10 เปอร์เซ็นต์ (ใน 0.7 M NaCl) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 2.5 เท่า ของส่วนใสที่ดูดได้ นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไว้ 1 คืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายทิ้ง ตกตะกอนดีเอ็นเอไว้ให้แห้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อ นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย Absolute ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายทิ้ง ตกตะกอนดีเอ็นเอไว้ให้แห้ง และเติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายหมด จากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.5.2 การตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยดูอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (OD 260/OD 280) และวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb จากนั้นย่อยแลบดีเอ็นเอด้วยเอซิดีเอ็มโบรไมด์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของผักอีหนูจากจังหวัดกำแพงเพชร นครราชสีมา และอุทัยธานีมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR) โดยเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยไพรเมอร์ ITS1 Passiflora และไพรเมอร์ ITS2 Passiflora (Desfeux and Lejeune, 1996) และบริเวณ *trnF-trnL* ด้วยไพรเมอร์ c และ f (Taberlet *et al.*, 1991) (ตารางที่ 3.2) ซึ่งในการทำพีซีอาร์ประกอบด้วยส่วนผสมต่อ 1 หลอด แสดงดังตารางที่ 3.2 โดยมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

องค์ประกอบ	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
1. 10X PCR buffer	2.5
2. 50 mM MgCl ₂	0.2
3. 1.25 mM dNTPs	4
4. Primer ITS1 Passiflora หรือ Primer F (20 ไมโครโมล)	1
5. Primer ITS2 Passiflora หรือ Primer C (20 ไมโครโมล)	1
6. Taq DNA Polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.2
7. DI water	14.1
8. DNA template (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2
ปริมาตรรวม	25

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์(5'→ 3')	Reference
C	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
F	ATTTGAACTGGTGACACGAG	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
ITS1 Passiflora	AAGGTTTCCGTAGGTGAAC	Desfeux and Lejeune. (1996)
ITS2 Passiflora	TATGCTTAAACTCAGCGGG	Desfeux and Lejeune. (1996)

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยมีรอบการทำพีซีอาร์แสดงดังตารางที่ 3.3 ตรวจสอบผลโดยการรันผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์

ปฏิกิริยาแต่ละขั้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	1	1
Denaturation	94	1	
Annealing	55	1	35
Extension	72	2	
Final Extension	72	1	1

3.5.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำส่งบริษัท U2Bio (Thailand) Co., Ltd. จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล GenBank นำตัวอย่างจากฐานข้อมูล ได้แก่ *A. heterophylla* (DQ521297), *A. kirkii* (DQ521358), *A. hondala* (AY632699), *P. foetida* (KY968834), *P. quadrangularis* (AY636107) เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง ITS ทั้งสามตัวอย่าง และนำตัวอย่างจากฐานข้อมูล ได้แก่ *A. kirkii* (AY632723), *A. heterophylla* (JX470860), *A. hondala* (AY632724), *P. quadrangularis* (KT730705), *P. foetida* (KM652224) มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง *trnL-trnF* ทั้งสามตัวอย่าง ซึ่งอย่างไรก็ตามในฐานข้อมูลไม่มีข้อมูลของ *A. viridiflora* จึงไม่ได้นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ วิเคราะห์หาแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม BioEdit Version 7.2 ในการตรวจสอบและแก้ไขความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA6 Version 6.0 วิเคราะห์ข้อมูลค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยใช้ Kimura 2-parameter model หาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี Neighbor-Joining โดยการสุ่มค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง

3.6 การสกัดสารสกัดจากผักอินูน

3.6.1 การเตรียมผักอินูน

นำตัวอย่างผักอินูนจากจังหวัดนครสวรรค์ทั้งสามส่วน ได้แก่ ใบ ดอก และผลไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้น้ำหนักแห้งคงที่ จากนั้นนำไปบดให้เป็นผงด้วยเครื่องปั่นละเอียด

3.6.2 ขั้นตอนการสกัด

นำตัวอย่างพืชทั้งสามส่วนที่ปั่นละเอียด น้ำหนักประมาณ 50 กรัม ห่อด้วยผ้าขาวบางแล้วนำมาสกัดแบบหมักด้วยตัวทำละลายเมทานอล 400 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วที่หุ้มกระดาษเพื่อป้องกันไม่ให้โดนแสง ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน และทำการเปลี่ยนตัวทำละลายเมทานอลใหม่ จนครบ 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้มากรองเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 จำนวน 2 ชั้น โดยใช้ชุดกรองสารแบบลดความดัน จากนั้นนำสารสกัดที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ จะได้สารสกัดชั้นเมทานอล เก็บไว้ในขวดแก้วที่หุ้มด้วยกระดาษฟอยล์เพื่อป้องกันแสง และเก็บไว้ในโถดูดความชื้นจนสารสกัดแห้ง

3.7 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.7.1 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ดัดแปลงจากวิธีของ Saravanan และคณะ (2014)

3.7.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Salmonella typhimurium* DMST 0562 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ทำการกระตุ้นการเจริญของเชื้อด้วยเทคนิค Cross streak plate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NA และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำอีกครั้งเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว นำเชื้อที่เตรียมไว้มาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้นอยู่ประมาณ 10^8 Colony form units (CFU)/mL โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08 - 0.13 จากนั้นใช้ไม้น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในเชื้อที่เจือจางแล้วมา Swab ลงบนอาหาร MHA ให้ทั่วด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วรอแห้ง

3.7.1.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย

ทำการเตรียมสารทดสอบโดยหยดสารสกัดเมทานอลจากส่วนใบ ดอก และผลของผักอินูนที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ลงบนแผ่นดิสก์ และรอให้แห้ง โดยมี Gentamicin ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และตัวทำละลายเมทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ จากนั้นใช้ปากคีบวางแผ่นดิสก์ลงบนอาหาร MHA ที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางจากวงใส (Clear zone) ที่เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

3.7.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.7.2.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ดัดแปลงจากวิธีของ Natungnuy, K. and Poaim, S. (2018)

เตรียมสารละลายดีพีพีเอช (DPPH reagent) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ละลายในเมทานอล ทำการทดสอบกับสารตัวอย่าง โดยผสมสารละลายดีพีพีเอช 100 ไมโครลิตร กับสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1 : 1) ลงในงานขนาด 96 หลุม และบ่มเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็น Blank control และโทรลอคซ์ (Trolox) เป็นสารละลายมาตรฐาน ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ได้นำมาคำนวณหาค่า % DPPH scavenging activity นอกจากนี้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยังคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Inhibitory concentration of 50% ; IC₅₀) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8 และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant capacity) โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานโทรลอคซ์ ซึ่งแสดงในหน่วย มิลลิกรัมโทรลอคซ์ต่อกรัมสารสกัด (mg trolox/g extract)

$$\%DPPH \text{ scavenging activity} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

โดย A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอลที่ผสมกับอนุมูลอิสระ DPPH - ค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลาย

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ผสมกับอนุมูลอิสระ DPPH - ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากส่วนต่างๆ (ใบ ดอก และผล)

3.7.2.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธี ABTS ดัดแปลงจากวิธีของ Natungnuy, K. and Poeaim, S. (2018)

เตรียมสารละลายเอบีทีเอส (ABTS reagent) ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ละลายในเมทานอล จากนั้นทำให้เป็นอนุมูลอิสระ (ABTS⁺) โดยการเติมสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ และบ่มเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงในที่มืดเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นนำสารละลายเอบีทีเอสมาเจือจางกับเมทานอลให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.68 - 0.72 ทำการทดสอบกับสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยผสมสารละลายเอบีทีเอส 180 ไมโครลิตร กับสารละลายตัวอย่างตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 9 : 1) ในจานขนาด 96 หลุม และบ่มเป็นเวลา 15 นาที ในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็น Blank control และโทรลอคซ์ (Trolox) เป็นสารละลายมาตรฐาน ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ได้นำมาคำนวณหาค่า % ABTS scavenging activity นอกจากนี้ยังคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Inhibitory concentration of 50% ; IC₅₀) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8 และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant capacity) โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานโทรลอคซ์ ซึ่งแสดงในหน่วยมิลลิกรัมโทรลอคซ์ต่อกรัมสารสกัด (mg trolox/g extract)

$$\% ABTS \text{ scavenging activity} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดย A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอลที่ผสมกับอนุภาคลิโธส ABTS - ค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลาย

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ผสมกับอนุภาคลิโธส ABTS - ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากส่วนต่างๆ (ใบ ดอก และผล)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการระบุชนิดของผักอินทรีย์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ในนิวเคลียส และบริเวณ *trnL-trnF* ในคลอโรพลาสต์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

4.1.1 ผลการตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบสดของจังหวัดกำแพงเพชร นครราชสีมา และอุทัยธานี ด้วยวิธี CTAB และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดค่าความเข้มข้นจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณ และคุณภาพดีเพียงพอ โดยดูจากค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 1.6 - 1.8 (ตารางที่ 4.1) จึงเหมาะสำหรับนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

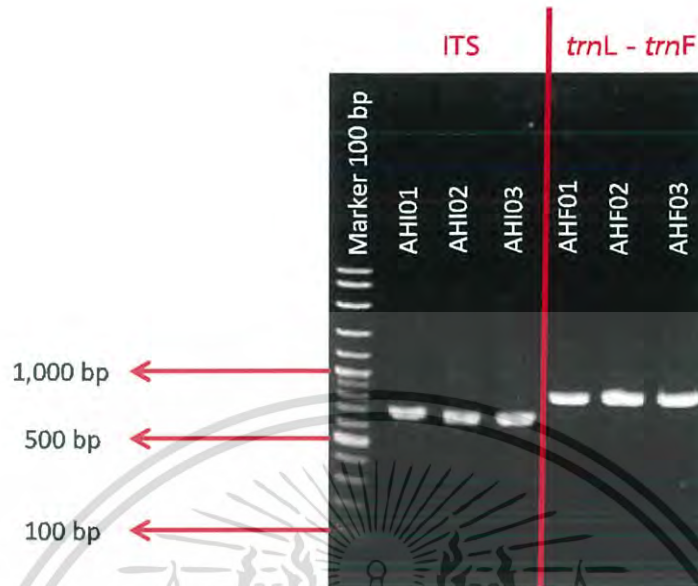
ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบของตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

แหล่งที่มาของตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (OD 260/OD 280)
กำแพงเพชร	1003.9	1.67
นครราชสีมา	1043.3	1.82
อุทัยธานี	951.17	1.66

4.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ในนิวเคลียส และบริเวณ *trnL-trnF* ในคลอโรพลาสต์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ในนิวเคลียสด้วยไพรเมอร์ ITS1Passiflora/ITS2Passiflora และบริเวณ *trnL-trnF* ในคลอโรพลาสต์ด้วยไพรเมอร์ F/C จำนวนสามตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ในนิวเคลียส และบริเวณ *trnL-trnF* ในคลอโรพลาสต์มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 700 และ 800 คู่เบส ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.1 โดย AHIO1 AHIO2 และ AHIO3 คือ ตัวอย่างใบอินทรีย์จากกำแพงเพชร นครราชสีมา และอุทัยธานี บริเวณ ITS ตามลำดับ และ AHF01 AHF02 AHF03 คือ ตัวอย่างใบอินทรีย์จากกำแพงเพชร นครราชสีมา และอุทัยธานี บริเวณ *trnL-trnF* ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์มา Alingment โดยใช้โปรแกรม BioEdit Version 7.2 และผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ในนิวเคลียส พบว่ามีขนาดประมาณ 718 คู่เบส และบริเวณ *trnL-trnF* ในคลอโรพลาสต์มีขนาด 889 คู่เบส

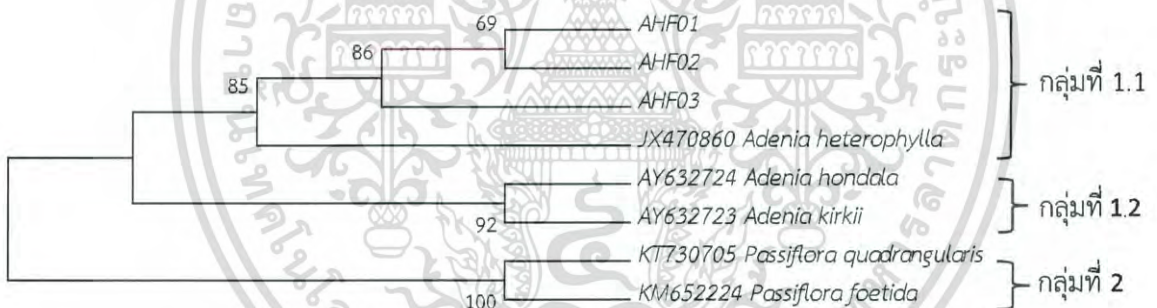
4.1.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ในนิวเคลียส และบริเวณ *trnL-trnF* ในคลอโรพลาสต์ ทั้งสามตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank บน NCBI พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (Identity) กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ในนิวเคลียสของ *A. heterophylla* (DQ521297) สูงสุดที่ 93.06 เปอร์เซ็นต์ และบริเวณ *trnL-trnF* ในคลอโรพลาสต์ของ *A. heterophylla* (JX470860) สูงสุดที่ 98.33 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ของพืชสกุล *Adenia* และพืชสกุล *Passiflora* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Passifloraceae มาวิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่างที่ศึกษา แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์สร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และแสดงค่า Bootstrapping ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชุดข้อมูลซ้ำเป็นจำนวน 1,000 ครั้ง ดังรูปที่ 4.2 พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 คือพืชสกุล *Adenia* และกลุ่มที่ 2 คือพืชสกุล *Passiflora* ซึ่งกลุ่มที่ 1 สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย และตัวอย่างพืชที่ศึกษาทั้ง 3 ตัวอย่างถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1.1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *A. heterophylla* (DQ521297) ซึ่งผลเป็นไปในทางเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnL-trnF* ในคลอโรพลาสต์ (รูปที่ 4.3) ที่พบว่าสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 คือพืชสกุล *Adenia* กลุ่มที่ 2 เป็นพืชสกุล *Passiflora* และตัวอย่างที่ศึกษาทั้งสามตัวอย่างถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *A. heterophylla* (JX470860) ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.2 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิคที่ซีอาร์บริเวณ ITS ในนิวเคลียสของตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา ด้วยวิธี Neighbor-Joining โปรแกรม MEGA6 Version 6.0



รูปที่ 4.3 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิคที่ซีอาร์บริเวณ *trnL-trnF* ในคลอโรพลาสต์ของตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา ด้วยวิธี Neighbor-Joining โปรแกรม MEGA6 Version 6.0

จากผลที่กล่าวมามีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Krosnick และคณะ (2013) ซึ่งทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Passifloraceae จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnL-trnF* พบว่ามีความคล้ายคลึงในกลุ่มที่เป็นสกุลเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Passifloraceae โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบว่ามีความหลากหลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางพันธุกรรมสูงในระดับชนิด (อนุรักษ และคณะ, 2556) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถระบุได้ว่าอินูนเป็นสปีชีส์ *A. heterophylla* เพราะในฐานข้อมูลไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. viridiflora*

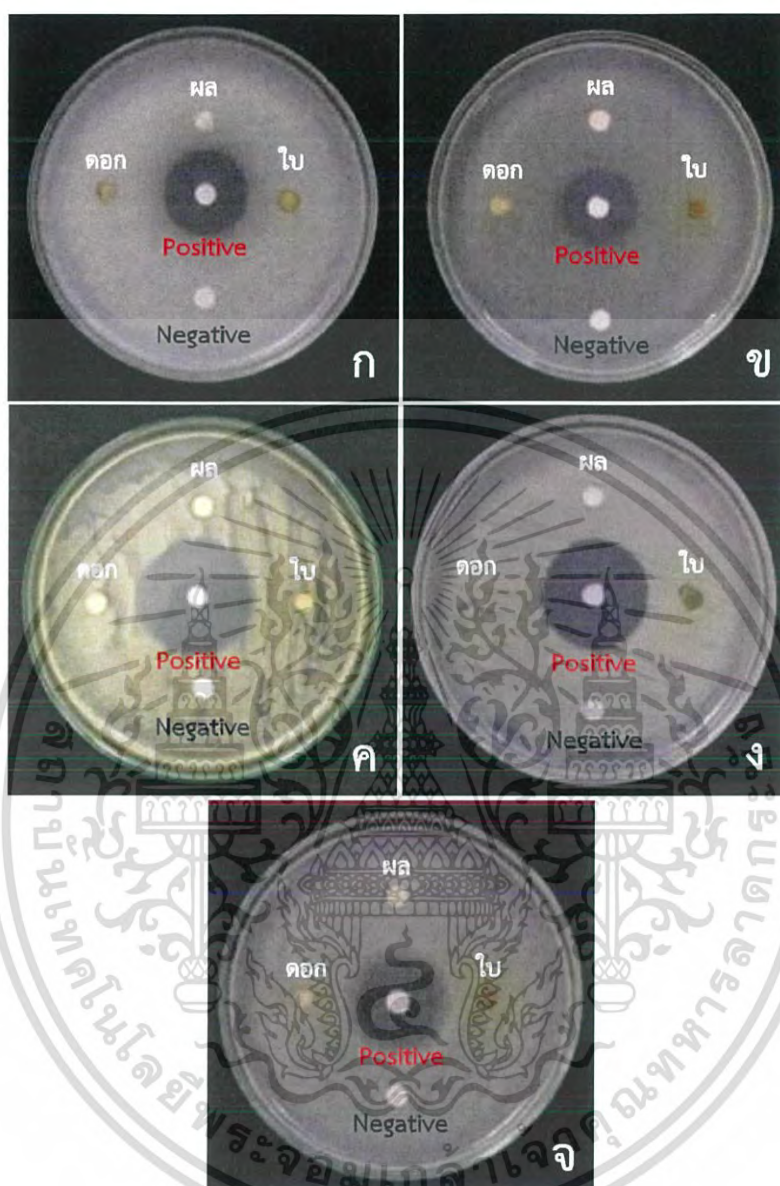
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการสกัดสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลส่วนใบ ดอก และผลของผักอินูนจากจังหวัดนครสวรรค์ ด้วยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายเมทานอล ผลที่ได้เมื่อนำไปทำการกลั่นระเหยตัวทำละลายออก พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบของผักอินูนมีลักษณะเป็นสีเขียวอมน้ำตาล ในขณะที่สารสกัดจากผลของผักอินูนมีสีน้ำตาลเข้ม และสารสกัดจากดอกของผักอินูนมีสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งลักษณะของสารสกัดจากใบ ดอก และผลของผักอินูนมีความหนืดเหมือนกัน สารสกัดที่ได้จะถูกนำไปทำการทดสอบหาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลส่วนใบ ดอก และผลของผักอินูนจากจังหวัดนครสวรรค์ โดยเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *M. luteus* ATCC 9341, *S. typhimurium* DMST 0562 และ *S. epidermidis* ATCC 12228 ด้วยวิธี Disc diffusion โดยสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก และผล ของผักอินูนที่มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมียาปฏิชีวนะ Gentamicin 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) และมีตัวทำละลายเมทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก ผล ของผักอินูน และตัวควบคุมเชิงลบไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย มีเพียงตัวควบคุมเชิงบวกที่พบบริเวณวงใสเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ก - จ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติความมีขี้ของตัวทำละลายเมทานอล เนื่องจากเป็นสารกลุ่มที่มีขี้ปานกลาง สามารถสกัดได้ทั้งสารที่มีขี้และสารที่ไม่มีขี้ออกมาได้ โดยสารสำคัญที่มีอยู่ในผักอินูนอาจจะเป็นสารที่มีคุณสมบัติความมีขี้ที่สูงกว่าตัวทำละลายเมทานอล ส่งผลให้ไม่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียออกมาได้ (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

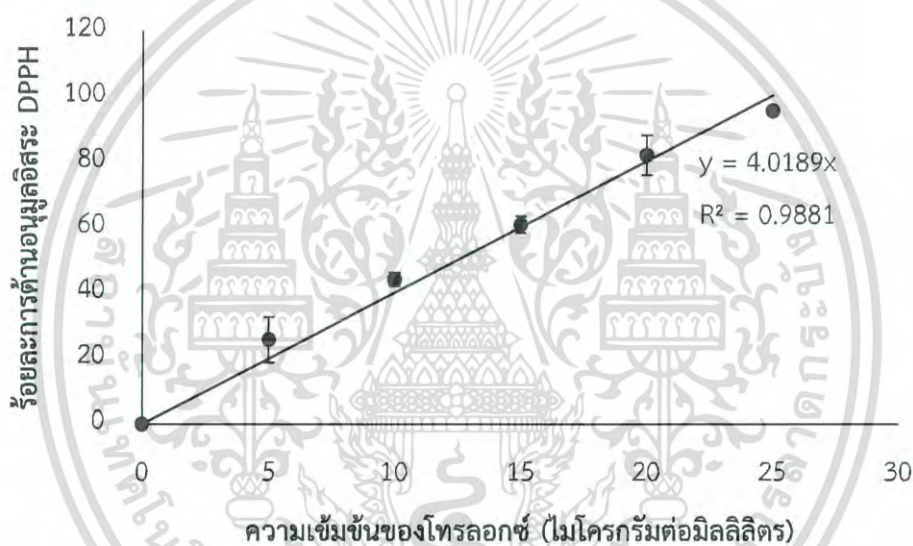


รูปที่ 4.4 ลักษณะวงใสของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis* (ก), *E. coli* (ข), *M. luteus* (ค), *S. epidermidis* (ง) และ *S. typhimurium* (จ) Positive คือ Gentamicin ที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม Negative คือ เมทานอล และ ใบ ดอก ผล คือ สารสกัดเมทานอลของผักอีนูนที่มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาสารสกัดเมทานอลส่วนใบ ดอก และผลของผักอินูนจากจังหวัด นครสวรรค์ ที่ความเข้มข้น 125, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยใช้สารโทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณเพื่อหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH วิเคราะห์โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นกราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9881 ทำให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นของสารละลายโทรลอกซ์ ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ที่ร้อยละ 50 โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์เท่ากับ 12.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ที่ร้อยละ 50 แสดงดังรูป 4.5



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์

หมายเหตุ : R^2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination : R Square)

คำนวณการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก และผลของผักอินูน แสดงดังตารางที่ 4.2 นำร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารสกัดจากใบ ดอก และผลของผักอินูน และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังรูปที่ 4.6 ทำให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ที่ร้อยละ 50 โดยค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลจากใบของผักอินูน ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8 อยู่ที่ 489.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดเมทานอลจากดอกและผลของผักอินูนมีค่า IC_{50} มากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งหมายความว่าสารสกัดเมทานอลจากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารสกัดเมทานอลจากดอก และผลของผักอีหนูน หรือกล่าวได้ว่าสารสกัดเมทานอลจากใบของผักอีหนูนที่ความเข้มข้น 489.42 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ที่ร้อยละ 50 ทั้งนี้ยัง พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก และผลของผักอีหนูนมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH เฉลี่ย เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอคซ์ เท่ากับ 26.10 ± 1.18 , 9.87 ± 3.01 และ 8.59 ± 2.25 มิลลิกรัมโทรลอคซ์ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานโทรลอคซ์ ($y = 4.0189x$) โดยจากตารางที่ 4.2 พบว่าสารสกัดจากดอก และผลของผักอีหนูนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในดอก และผลของผักอีหนูนมีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่มีปริมาณน้อยกว่าในใบของผักอีหนูน โดยเนตรนภา และคณะ (2557) ได้กล่าวว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืช และเป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้สารสกัดจากใบของผักอีหนูนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4.2 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก และผลของผักอีหนูน

ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/ml}$)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด \pm SE		
	ใบ	ดอก	ผล
125	13.07 ± 4.49	3.00 ± 0.36	2.82 ± 0.71
250	25.32 ± 3.18	9.04 ± 1.55	8.11 ± 1.57
500	51.02 ± 4.94	24.32 ± 1.80	20.75 ± 2.99
1,000	87.58 ± 4.49	49.87 ± 3.96	41.57 ± 4.59

หมายเหตุ : \pm SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

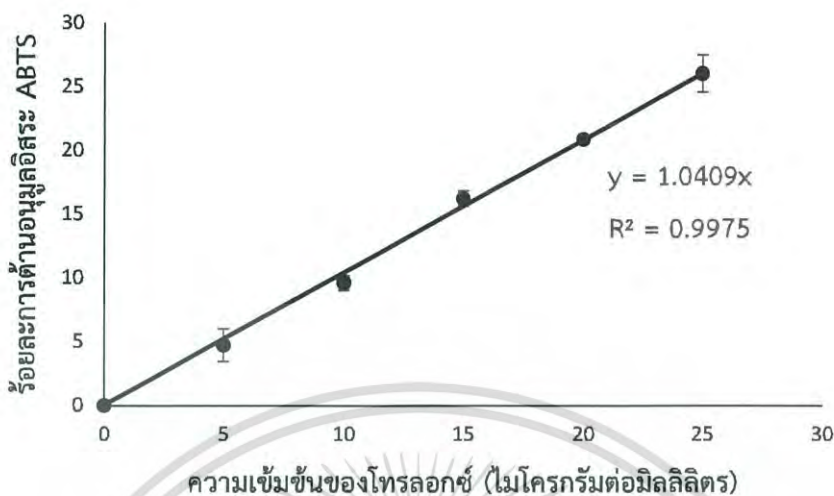


รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารสกัดจากใบ ดอก และผลของผักอีโนน และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

4.2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

จากการวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก และผลของผักอีโนน ที่ความเข้มข้น 125, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร สารมาตรฐานที่ใช้คือโทรลอคซ์ โดยนำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารมาตรฐานมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน โทรลอคซ์กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ซึ่งเป็นกราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9975 ทำให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นของสารละลายโทรลอคซ์ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ที่ร้อยละ 50 โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอคซ์เท่ากับ 48.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ที่ร้อยละ 50 แสดงดังรูปที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ต่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอคซ์

หมายเหตุ : R^2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination : R Square)

คำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก และผลของผักอีหนู แสดงดังตารางที่ 4.3 และนำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก และผลของผักอีหนูมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS แสดงดังรูป 4.8 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ ABTS ได้ที่ร้อยละ 50 โดยจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8 พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบของผักอีหนู มีค่า IC_{50} อยู่ที่ 778.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดเมทานอลจากดอก และผลของผักอีหนูมีค่า IC_{50} มากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก และผลของผักอีหนู มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS เฉลี่ยที่เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอคซ์ เท่ากับ 62.31 ± 1.31 , 29.66 ± 0.26 และ 28.34 ± 1.98 มิลลิกรัมโทรลอคซ์ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ โดยคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานโทรลอคซ์ ($y = 1.0409x$) จากตารางที่ 4.3 พบว่าสารสกัดจากดอก และผลของผักอีหนูมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในดอก และผลของผักอีหนูมีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่มีปริมาณน้อยกว่าในใบของผักอีหนู ส่งผลให้สารสกัดจากใบของผักอีหนูมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก และผลของผักอีหนู

ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/ml}$)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัด \pm SE		
	ใบ	ดอก	ผล
125	8.32 ± 1.23	3.83 ± 0.40	3.98 ± 0.69
250	16.13 ± 1.28	7.81 ± 1.70	6.73 ± 0.66
500	32.52 ± 2.37	15.44 ± 0.67	15.05 ± 0.94
1,000	63.27 ± 2.53	30.77 ± 1.15	29.11 ± 1.88

หมายเหตุ : \pm SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean)



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารสกัดจากใบ ดอก และผลของผักอีหนู และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการระบุชนิดของผักอินูนที่ศึกษาสามตัวอย่าง จากจังหวัด กำแพงเพชร นครราชสีมา และอุทัยธานี พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ในนิวเคลียส และบริเวณ *trnL-trnF* ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ จัดตัวอย่างที่ศึกษาทั้งสามตัวอย่าง อยู่กลุ่มเดียวกับพืชสกุล *Adenia* และแสดงความใกล้เคียงกับ *A. heterophylla* แต่ไม่สามารถสรุปได้ว่าผักอินูนเป็น *A. heterophylla* และจากผลการศึกษารสชาติเมทานอลส่วนใบ ดอก และผลของผักอินูนจากจังหวัดนครสวรรค์ เมื่อนำสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของผักอินูน มาศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบ ดอก และผลของผักอินูนไม่มีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* *M. luteus* และ *S. epidermidis* อีกทั้งยังไม่มีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *S. typhimurium* เพราะไม่มีสารสกัดจากส่วนใด ๆ ของผักอินูนที่สามารถให้บริเวณวงใสได้ เมื่อนำสารสกัดเมทานอลมาทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ IC_{50} จากใบของผักอินูนมีค่าเท่ากับ 489.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รวมทั้งทำการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ IC_{50} จากใบของผักอินูนมีค่าเท่ากับ 778.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยส่วนดอก และผลของผักอินูนนั้นไม่สามารถทำการวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ได้ทั้งวิธี DPPH และ ABTS ซึ่งสารสกัดเมทานอลจากใบของผักอินูนมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าดอก และผลของผักอินูน อาจจะเป็นผลมาจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในใบสูงกว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในดอก และผลของผักอินูน

5.2 ข้อเสนอแนะ

สำหรับการระบุชนิดของผักอินูน โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายังไม่สามารถระบุชนิดของผักอินูนได้อย่างชัดเจน เนื่องจากไม่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. viridiflora* ในฐานข้อมูล GenBank บน NCBI อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาข้อมูลด้วยเทคนิคโมเลกุลอื่น ๆ หรือศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นเพิ่มเติม เช่นบริเวณ *psbA-trnH* ด้านการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถนำผักอินูนไปทำการสกัดแบบแยกชั้น (partition) โดยใช้ตัวทำละลายอื่น ๆ ที่มีขั้วแตกต่างกัน เนื่องจากตัวทำละลายเมทานอลที่ใช้นั้นมีขั้วปานกลางอาจไม่สามารถสกัดสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาได้ และสามารถทำการวิเคราะห์หาสารอินทรีย์ประเภทต่าง ๆ ที่มีอยู่ในผักอินูน โดยการทำให้ Gas Chromatograph - Mass Spectrometer (GCMS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2556. **ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.qsbg.org/Database/plantdb/herbarium/herbarium-specimen>. (สืบค้นเมื่อ 8 มกราคม 2562)
- ขจิต ฝอยทอง. 2558. **ผักพื้นบ้าน: ผักอินูน**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <https://www.gotoknow.org/posts/244186>. (สืบค้นเมื่อ 23 มิถุนายน 2562)
- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2559. **สำนักงานข้อมูลสมุนไพร**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.http://medplant.mahidol.ac.th/user/reply.asp?id=6346>. (สืบค้นเมื่อ 23 มิถุนายน 2562)
- เต็ม สมิตินันท์. 2523. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง)**. กรุงเทพฯ ฯ : กรมป่าไม้
- ทักษิณ อาชวาคม และคณะ. 2551. **พืชกินได้ในป่าสะแกราช**. นครราชสีมา : สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช
ฝ่ายจัดการสถานีวิจัย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)
- เนตรนภา เมยกกลาง และ ดร.เฉลิม เรืองวิริยะชัย. 2557. “การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มน้ำผลไม้” *วารสารวิจัย มช. (บค.)* 14 (4) : 69-79.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. 2556 “อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 21(3) : 275-286.
- ปิยาภรณ์ วงศ์อักษร. 2558. “การประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดพืชวงศ์เหงือกปลาหมอ (Acanthaceae) ในประเทศไทย.” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการทางเภสัชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศิลปากร*
- ระบบฐานข้อมูลทรัพยากรชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่นของชุมชน. 2553. **ทรัพยากรชีวภาพพืชอินูน**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <https://goo.gl/AoPB1L>. (สืบค้นเมื่อ 8 มกราคม 2562)
- สุภัทรา โพธิ์เอี่ยม, วิจารณ์ ศิริพงษ์, ชัยวัฒน์ ฤทธิเตชากุล, ดวงทิพย์ อภิรัตน์มนตรี และ วินัย สมประสงค์. 2556. “ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุล *Barleria* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnL-trnF*.” *Thai Journal of Genetics*. 5(1) : 222-225.
- สำนักจัดการทรัพยากรป่าไม้ที่ 4 สาขานครสวรรค์ กรมป่าไม้. 2553. **รายงานการศึกษาภูมิปัญญาท้องถิ่นเรื่อง “ผักอินูน” ผักเศรษฐกิจจากป่าชุมชน**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <https://goo.gl/yFG4pi>. (ค้นเมื่อ 8 มกราคม 2562)
- อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม, สุภัทรา โพธิ์เอี่ยม และ ทศนารถ กระจ่างวุฒิ. 2556. “ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora*.” *Thai Journal of Genetics*. 5(1) : 214-217.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อมรรัตน์ สีสุกอง, กัลยาภรณ์ จันตรี และ ศรีสุดา หาญภาคภูมิ. 2559. “การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากวัชพืชบางชนิด.” *วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์*. 11(1) : 69-82.
- Bayer, R.J. and Starr, J.R. 1998. “Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two noncoding chloroplast sequences, the *trnL* intron and *trnL/trnF* intergenic spacer.” *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 85(2) : 242-256.
- Bortiria, E. Oha, S.H. Jiangb, J. Baggettac, S. Grangerd, A. Weekse, C. 2001. “Phylogeny and systematics of *Prunus* (Rosaceae) as determined by sequence analysis of ITS and the Chloroplast *trnL-trnF* spacer DNA.” *Systematic Botany*. 6(4) : 797-807.
- Chen, R. Jiang, L.Y. and Qiao, G.X. 2012a. “The effectiveness of three regions in mitochondrial genome for aphid dna barcoding: a case in Lachninae.” *Plos One*. 7(10) : 1-11.
- Chen, Q. Liu, Y. Liu, Z. Chen, S. and Chen, K. 2012b. “DNA bacording of Verbenaceae medicinal plant by using ITS2 and psbA-trnH region.” *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 37(8) : 1107-1113.
- Chen, S. Yao, H. Han, J. Liu, C. Song, J. Shi, L. 2010. “Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species.” *PLoS One*. 5(1) : 1-8.
- Desfeux C, and Lejeune B. 1996. “Systematics of Euromediterranean *Silene* (Caryophyllaceae): evidence from a phylogenetic analysis using ITS sequence.” *Comptes Renduts, Academie des Sciences, Paris*. 319 : 351-358.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. “Isolation of plant DNA from fresh tissue.” *Focus*. 12 : 13-15.
- Hebert, P.D.N. Cywinska, A. Ball, S.L. and de Waard, J.R. 2003. “Biological identifications through DNA barcodes.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 270 : 313-321.
- Hebert, P.D.N. Stoeckle, M.Y. Zemlak, T.S. and Francis, C.M. 2004. “Identification of birds through DNA barcodes.” *PLoS Biology*. 2 : 312.
- Kojoma M., Kurihara K., Yamada K., Sekita S. Satake M. and Iida O. 2002. “Genetic identification of cinnamon (*Cinnamomum* spp.) based on the *trnL-trnF* chloroplast DNA.” *Planta Medica*. 68(1) : 94-96.
- Krosnick S.E., Porter-Utley K.E., MacDougal J.M., Jørgensen P.M. and McDade L.A. 2013. “New insights into the evolution of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae): Phylogenetic relationships and morphological synapomorphies.” *Systematic Botany*. 38: 692-713.
- Lee, W. Kim, H. Lim, J. Choi, H.R. Kim, Y. Kim, Y.S. Ji, J.Y. Foottit, R.G. and Lee, S. 2011. “Barcoding aphids (Hemiptera: Aphididae) of the Korean Peninsula: updating the global data set.” *Molecular Ecology Resources*. 11 : 32-37.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- McDade, L.A. and Moody, M.L. 1999. "Phylogenetic relationships among Acanthaceae: evidence from noncoding *trnL-trnF* chloroplast DNA sequences." *American Journal of Botany*. 86(1) : 70-80.
- McDade, L.A. Daniel, T.F. Kiel, C.A. Vollesen, K. and Lavin, M. 2005. "Phylogenetic relationships among Acantheae (Acanthaceae): Major lineages present contrasting patterns of molecular evolution and morphological differentiation." *Systematic Botany*. 30(4) : 834-862.
- Natungny, K. and Poeaim, S. 2018. "Antioxidant and Cytotoxic Activities of Methanolic Extracts from *Mimusops elengi* Flowers." *International Journal of Agricultural Technology*. 14(5) : 731-740
- Nyffeler, R. 2001. "Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnK/matK* and *trnL-trnF* sequences." *American Journal of Botany*. 89(2) : 312-326.
- Pourmorad, F. Hosseinimehr, S.J. and Shahabimajid, N. 2006. "Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants." *African Journal of Biotechnology*. 5(11) : 1142-1145.
- Shaw J. Lickey E.B. Beck J.B. Farmer S.B. Liu W. Miller J. Siripun K.C. 2005. "The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis." *American Journal of Botany*. 92 : 142-166.
- Santisuk T., K. Larsen, M. Newman, and K. Chayamarit. 2010. **The Forest Herbarium Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation.** Bangkok.
- Saravanan S. and Parimelazhagan T. 2014. "In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp." *Food Science and Human Wellness*. 3 : 56-64.
- Taberlet, P. Gielly, L. Pautou, G. and Bouvet, J. 1991. "Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA." *Plant Molecular Biology*. 17 : 1105-1109.
- World Health Organization. 1998. **Quality control methods for medicinal plant materials World Health Organization Geneva.** Geneva : World Health Organization.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียม 0.85% Sodium chloride (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. Sodium chloride (NaCl) 4.25 กรัม
2. น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Sodium chloride (NaCl) ปริมาณ 4.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร

2. การเตรียม 0.5 M EDTA (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 93.06 กรัม
2. น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง EDTA 93.06 กรัม ใส่ลงในปิกรเกอร์ ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากันด้วย Magnetic bar จนสารละลายใส
2. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่าเท่ากับ 8
3. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

3. การเตรียม 1.7% Mueller Hinton Agar (ปริมาตร 250 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. Mueller Hinton Broth 5.25 กรัม
2. วุ้น 4.25 กรัม
3. น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Mueller Hinton Broth (21 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) ปริมาณ 5.25 กรัม บรรจุลงในขวด Duran ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
2. ชั่งวุ้นปริมาณ 4.25 กรัม บรรจุลงในขวด Duran ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
3. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตรลงไป ปิดฝา หุ้มด้วยพอยล์แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

4. การเตรียม 1.7% Nutrient Agar (ปริมาตร 250 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- | | | |
|-------------------|------|------|
| 1. Nutrient broth | 3.25 | กรัม |
| 2. วุ้น | 4.25 | กรัม |
| 3. น้ำกลั่น | | |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Nutrient broth (13 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) ปริมาณ 3.25 กรัม บรรจุลงในขวด Duran ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
2. ชั่งวุ้นปริมาณ 4.25 กรัม บรรจุลงในขวด Duran ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
4. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตรลงไป ปิดฝา หมั่นด้วยฟอยล์แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

5. การเตรียม Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- | | | |
|-------------|--------|------|
| 1. Tris-HCl | 121.14 | กรัม |
| 2. น้ำกลั่น | | |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Tris-HCl 121.14 กรัม ลงในปิ๊กเกอร์ ใส่น้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร
2. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าเท่ากับ 8
3. ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
5. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

6. การเตรียม 10X TBE Buffer (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- | | | |
|--|-----|------|
| 1. Tris-HCl | 108 | กรัม |
| 2. Boric acid | 55 | กรัม |
| 3. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ | 40 | กรัม |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

4. น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Tris-HCl 108 กรัม และ Boric acid 55 กรัม ผสมกัน
2. ปิเปตสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร
3. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าเท่ากับ 8
4. ผสมสารละลายเข้าด้วยกัน และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
5. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

7. การเตรียม 1X TBE Buffer (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- | | | |
|-------------------|-----|-----------|
| 1. 10X TBE Buffer | 50 | มิลลิลิตร |
| 2. น้ำกลั่น | 450 | มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ผสมสารละลายเข้าด้วยกัน
2. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

8. การเตรียม 2X CTAB Buffer (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- | | | |
|--|----|-----------|
| 1. Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) | 2 | กรัม |
| 2. NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ | 28 | มิลลิลิตร |
| 3. Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ | 10 | มิลลิลิตร |
| 4. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ | 4 | มิลลิลิตร |
| 5. Polyvinyl pyrrolidone (PVP) | 1 | กรัม |
| 6. Deionized water | 68 | มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง CTAB 2 กรัม และ PVP 1 กรัม ผสมกัน
2. ใส่ NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 28 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

3. ผสมสารทั้งหมดข้างต้นให้เข้ากันในบีกเกอร์ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย Deionized water

9. การเตรียม Ethidium bromide staining (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- | | | |
|--|-------|-----------|
| 1. Ethidium bromide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร | 0.5 | มิลลิลิตร |
| 2. 1X TBE buffer | 499.5 | มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ปิเปตสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
2. ผสมกับ 1X TBE buffer ปริมาตร 499.5 มิลลิลิตร

10. การเตรียม TE Buffer (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- | | | |
|--|-----|-----------|
| 1. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ | 0.2 | มิลลิลิตร |
| 2. Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ | 1 | มิลลิลิตร |
| 3. น้ำกลั่น | | |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ผสมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และ Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน
2. ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
3. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

11. การเตรียมสารอนุมูลอิสระ ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ (10 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- | | | |
|--|-------|-----------|
| 1. 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic-acid) (ABTS) | 36.02 | มิลลิกรัม |
| 2. Potassium Persulfate ($K_2S_2O_8$) | 6.62 | มิลลิกรัม |
| 3. Methanol | | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ขั้นตอนการเตรียม

1. เตรียมสาร ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร ABTS 36.02 มิลลิกรัม แล้วละลายด้วย Methanol 10 มิลลิลิตร
2. เตรียมสาร Potassium Persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร Potassium Persulfate 6.62 มิลลิกรัม แล้วละลายด้วย Methanol 10 มิลลิลิตร
3. ผสมสารทั้งสองให้เข้ากัน
4. เทใส่ขวด Duran ปิดฝา ห่อฟอยล์ แล้วบ่มในที่มืด 12 - 16 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลา ก่อนใช้งานนำมาเจือจางด้วย Methanol และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.68 - 0.72

12. การเตรียมสารอนุมูลอิสระ DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (100 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- | | | |
|---|------|-----------|
| 1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) | 7.89 | มิลลิกรัม |
| 2. Methanol | | |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง DPPH ปริมาณ 7.89 มิลลิกรัม ใส่ขวดยาหม่องขนาดเล็กแล้วละลายด้วย Methanol
2. ดูดสารละลาย DPPH ใส่ขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย Methanol จนครบ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. เทใส่ขวด Duran ปิดฝา ห่อฟอยล์ แล้วเก็บในที่มืด

13. การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทโรลอกซ์ (Trolox) ความเข้มข้น 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (1 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- | | | |
|--|---|-----------|
| 1. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) | 3 | มิลลิกรัม |
| 2. Methanol | 1 | มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Trolox ปริมาณ 3 มิลลิกรัม
2. เติมน้ำ Methanol 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. การวัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่สกัดได้

การวัดค่าการดูดกลืนแสงจะวัดที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยการวัดที่ 260 นาโนเมตร จะเป็นการวัดเพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอ และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จะเป็นการวัดเพื่อหาปริมาณโปรตีน โดยที่โครงสร้างในส่วนของเบสพิวรีน และเบสไพริมิดีนเป็นส่วนที่จะทำหน้าที่ในการดูดกลืนแสง โดยมีขั้นตอนการดูดกลืนแสงดังนี้

- 1.1 ทำการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอ 100 เท่า ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 495 ไมโครลิตร และใส่ดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไป vortex และ spindown
- 1.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นค่ามาตรฐาน
- 1.3 คำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้สูตร ปริมาณดีเอ็นเอ = OD 260 นาโนเมตร \times 50 \times Dilution factor

2. การแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม BioEdit Version 7.2

- 2.1 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริษัท ใส่นโปรแกรม BioEdit แล้วทำการกลับเส้น Reverse ให้เป็นด้านเดียวกับเส้น Forward โดยเลือกเส้น Reverse => กด Sequence => กด Nucleic acid => กด Reverse Complement
- 2.2 ทำการหาตำแหน่งจับของไพรเมอร์ แล้วลบลำดับนิวคลีโอไทด์หลังตำแหน่งจับไพรเมอร์ออก โดยเลือกทุกเส้นแล้วกด Accessory Application => กด ClustalW Multiple alignment จากนั้นให้เลือก output Clustal format with Clustal consensus sequence generation => กด Run ClustalW
- 2.3 เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่อจากตำแหน่งไพรเมอร์ แล้วกด Edit => กด Select to end จากนั้นให้เลือก Mode เป็น Edit แล้วกด Edit => กด Delete

3. การนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แก้ไขแล้วเข้าโปรแกรม BLAST

- 3.1 เปิด <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> แล้วเลือก Nucleotide BLAST
- 3.2 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ใส่ในช่อง Enter accession number (s), gi (s), or FASTA sequence (s) แล้วเลื่อนลงด้านล่างเพื่อกด BLAST
- 3.3 เปรียบเทียบค่า Identity แล้วกด Accession ของข้อมูลที่จะนำมาเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่จะศึกษา
- 3.4 กด FASTA แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

4. การสร้าง Phylogenetic Tree ด้วยโปรแกรม MEGA 6

- 4.1 เปิดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นไฟล์ .fas แล้วกด Data => กด Phylogenetic Analysis
- 4.2 กด Analysis => กด Phylogeny => กด Construct/Test Neighbor-Joining Tree
- 4.3 เลือก option ที่ต้องการ แล้วกด Compute
- 4.4 จะได้ Tree ออกมา จากนั้นทำการแก้ไขตามต้องการ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้