ความเป็นพิษต่อเซลล์และการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบพืชอังกาบ (*Barleria cristata*) และสังกรณี (*Barleria strigosa*)

CYTOTOXICITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LEAVE EXTRACTS FROM *Barleria cristata* AND *Barleria strigosa*

ณัฐพร มานะประดิษฐ์
NUTTAPORN MANAPRADIT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2558
KMITL-2015-SC-M-020-019

ความเป็นพิษต่อเซลล์และการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบพืชอังกาบ (*Barleria cristata*) และสังกรณี (*Barleria strigosa*)

CYTOTOXICITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LEAVE EXTRACTS FROM *Barleria cristata* AND *Barleria strigosa*

ณัฐพร มานะประดิษฐ์
NUTTAPORN MANAPRADIT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2558
KMITL-2015-SC-M-020-019

CYTOTOXICITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LEAVE EXTRACTS FROM *Barleria cristata* AND *Barleria strigosa*

NUTTAPORN MANAPRADIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG 2015
KMITL-2015-SC-M-020-019

COPYRIGHT 2015
FACUALY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ “ความเป็นพิษต่อเซลล์และการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบพืชอังกาบ (*Barleria cristata*) และสังกรณี (*Barleria strigosa*)”
“CYTOTOXICITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LEAVE EXTRACTS FROM *Barleria cristata* AND *Barleria strigosa*”

ชื่อนักศึกษา นางสาวณัฐพร มานะประดิษฐ์
รหัสประจำตัว 55651606
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ถ้ามี) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชนี เจริญยิ่ง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	**ลายมือชื่อ**
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ	พนา โลหะทรัพย์ทวี
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง)	
ผศ.ดร.โองการ วณิชาชีวะ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ	
ผศ. ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	พัชนี เจริญยิ่ง

วัน/ เดือน/ ปี ที่สอบ 10 มิถุนายน พ.ศ.2558 เวลา 09.00-12.00 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 439 อาคารจุฬาภรณ์วลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
วันที่....6....**เดือน**....กค....**พ.ศ**....58.......

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความเป็นพิษต่อเซลล์และการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบพืชอังกาบ (*Barleria cristata*) และสังกรณี (*Barleria strigosa*)
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐพร มานะประดิษฐ์
รหัสประจำตัว	55651606
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2558
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง

บทคัดย่อ

ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ (*Barleria cristata*) และสังกรณี (*Barleria strigosa*) ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (human colon adenocarcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (human breast carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (human hepatocellular carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (oral human epidermal carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนูชนิด P388 (murine leukemia cell line) เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa (cervical cancer cell line) และเซลล์ไตลิงชนิด Vero (african green monkey kidney cell line) ด้วยวิธี MTT colorimetric พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ HT-29 และ P388 สูงสุด โดยมีความเข้มข้นที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50}) เท่ากับ 39.74 และ 48.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 สูงสุด มีค่า CC_{50} เท่ากับ 216.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Micrococcus luteus, Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 21.81 และ 17.92 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ 9 และ 8 ส่วนย่อย ตามลำดับ ซึ่งสารส่วนย่อยที่ 3 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 และ KB สูงสุด มีค่า CC_{50} เท่ากับ 8.71 และ 23.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารส่วนย่อยที่ 4 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 สูงสุด มีค่า CC_{50} เท่ากับ 9.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

คำสำคัญ : สังกรณี อังกาบ เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี วิธี MTT colorimetric วิธี paper disc diffusion

Thesis Title	Cytotoxicity and antimicrobial activity of leave extracts from *Barleria cristata* and *Barleria strigosa*
Student Name	Miss. Nuttaporn Manapradit
Student ID	55651606
Degree	Master of Science
Department	Biotechnology
Year	2015
Thesis Advisor	Assist. Prof. Supattra Poeaim
Thesis Co-advisor	Assist. Prof. Patchanee Charoenying

Abstract

This study was performed to screen the cytotoxic activity of leave extracts from *Barleria cristata* and *Barleria strigosa*. The human colon adenocarcinoma cell line (HT-29), human breast carcinoma cell line (MCF-7), human hepatocellular carcinoma cell line (HepG-2), oral human epidermal carcinoma cell line (KB), murine leukemia cell line (P388), cervical cancer cell line (HeLa) and african green monkey kidney cell line (Vero) were evaluated using MTT colorimetric assay. The strongest cytotoxic activity was obtained from the butanol extract. The butanol extract of *B. cristata* showed the strongest cytotoxic activity against HT-29 and P388 cell lines with cytotoxic concentration (CC_{50}) amount 39.74 and 48.33 µg/ml, respectively. The butanol extract of *B. strigosa* showed the strongest cytotoxic activity against P388 cell line (CC_{50} = 216.50 µg/ml). The antimicrobial activity was investigated in *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* using paper disc diffusion method. The butanol extract of *B. cristata* and *B. strigosa* showed the strong exhibited against *S. aureus*. The diameter of the inhibition zones was 21.81 and 17.92 mm for butanol extract from *B. cristata* and *B. strigosa*, respectively. So, the butanol extract of *B. cristata* and *B. strigosa* were then isolated by column chromatography that had 9 and 8 fractions, respectively. The fraction 3 from the butanol extract of *B. cristata* showed strongest cytotoxic against P388 (CC_{50} = 8.71 µg/ml) and KB (CC_{50} = 23.13 µg/ml) cell lines and fraction 4 from the butanol extract of *B. strigosa* showed strongest cytotoxic against P388 (CC_{50} = 9.45 µg/ml). However, the antimicrobial activity was not found in the assayed column fractions.

Keywords : *Barleria cistata*, *Barleria strigosa*, column chromatography,
MTT colorimetric assay, paper disc diffusion method

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่าน ซึ่งไม่อาจนำมากล่าวได้หมด ผู้มีพระคุณท่านแรกที่ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้คอยสอนสั่ง ให้คำแนะนำ ตรวจทาน และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิจัยทั้งหมดด้วยความเอาใจใส่ทุกขั้นตอน เพื่อให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงอย่างมีประสิทธิภาพ ท่านที่สอง คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัชนี เจริญยิ่ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยให้คำแนะนำในการทำวิจัยในด้านการสกัดสารสำคัญจากพืช การแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และการตรวจสอบสารด้วยเทคนิคทิลเลเยอร์-โครมาโตกราฟี และขอขอบพระคุณ รศ. สายชล สินสมบูรณ์ทอง รวมถึงอาจารย์ภาควิชาสถิติทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ เกี่ยวกับการออกแบบการทดลอง และการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ขอขอบพระคุณกรรมการสอบทุกท่าน ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี (ประธานกรรมการ) ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม (อาจารย์บัณฑิตประจำภาควิชา) และ ผศ.ดร.โองการ วณิชาชีวะ (ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบัน) ที่ให้คำแนะนำและสละเวลาตรวจทานรูปเล่มวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านภายในภาควิชาชีววิทยา ที่คอยให้คำชี้แนะ ขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ต่างๆ และสารเคมีในการทำงานวิจัย รวมถึงขอบคุณมิตรภาพดีๆ ของเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ปริญญาโทและปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยา และภาควิชาเคมี ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีให้เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อมานะ คุณแม่รัตนา มานะประดิษฐ์ และทุกคนในครอบครัวที่อยู่เบื้องหลังความสำเร็จในครั้งนี้ คอยให้ความช่วยเหลือ ให้ความสนับสนุนในทุกๆ เรื่อง และเป็นกำลังใจที่ดีให้ผู้วิจัยตลอดมา

นางสาวณัฐพร มานะประดิษฐ์
มิถุนายน 2558

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... ข
กิตติกรรมประกาศ .... ค
สารบัญ .... ง
สารบัญตาราง .... ซ
สารบัญรูป .... ฌ

บทที่ 1 บทนำ 1
  1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
  1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
  1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
  1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
  2.1 พืชสมุนไพร 4
    2.1.1 อังกาบ 4
    2.1.2 สังกรณี 5
  2.2 การสกัดสารจากพืช 6
    2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช 6
    2.2.2 วิธีการสกัด 7
      2.2.2.1 วิธีการหมัก (maceration) 7
      2.2.2.2 วิธีเพอร์โคเลชัน (percolation) 8
      2.2.2.3 วิธีซอกเลตเอกซ์แทรกเตอร์ (soxhlet extractor) 8
      2.2.2.4 วิธีการสกัดโดยเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย (liquid-liquid partitioning extraction) 8
      2.2.2.5 การใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ 9
    2.2.3 การแยกส่วนผสม (separation) 9
      2.2.3.1 เทคนิคทิลเลเยอร์โครมาโตกราฟี 9
      2.2.3.2 เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี 9
    2.2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการตรวจสอบและแยกสารสำคัญจากพืช..... 10
  2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 12
    2.3.1 วิธี MTT colorimetric 12
    2.3.2 วิธี XTT colorimetric 13
    2.3.3 วิธีการย้อมด้วยสีทริปแพนบลู (trypan blue) 13
    2.3.4 วิธีการย้อมด้วยสีนิวทรัลเรด (neutral red) 13
    2.3.5 วิธี SRB 14

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์...... 14

2.4 การทดสอบความเป็นพิษของสาร mitomycin C ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ... 15

2.5 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์............................. 16

2.5.1 วิธี paper disc diffusion... 17

2.5.2 วิธี agar well diffusion.. 17

2.5.3 วิธี broth dilution.. 17

2.5.4 วิธี agar dilution.. 18

2.5.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์.. 18

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.. 21

3.1 วัสดุอุปกรณ์.. 21

3.1.1 สารเคมี... 21

3.1.2 อุปกรณ์... 21

3.2 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัย.. 22

3.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในงานวิจัย.. 22

3.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.. 22

3.5 วิธีการทดลอง... 22

3.5.1 สารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี...................................... 22

3.5.1.1 การเตรียมตัวอย่างใบอังกาบและสังกรณี.......................... 22

3.5.1.2 การสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี........................ 23

3.5.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี... 23

3.5.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์.. 23

3.5.2.2 การปลูกเซลล์... 24

3.5.2.3 การเตรียมสารละลาย mitomycin C (MMC).............. 24

3.5.2.4 การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณีสำหรับใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์.................. 24

3.5.2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ด้วยวิธี MTT colorimetric.. 26

3.5.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์............... 26

3.5.3.1 การเตรียมจุลินทรีย์.. 26

3.5.3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณีสำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์.. 26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.3.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion.......... 26
3.5.4 การหาระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี.......... 27
3.5.5 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี.......... 28

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.......... 29
4.1 ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี.......... 29
4.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์.......... 30
4.2.1 การทดสอบความเป็นพิษของสาร mitomycin C.......... 31
4.2.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ.......... 31
4.2.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี.......... 35
4.2.4 ผลการเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี.......... 39
4.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี.......... 40
4.3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบอังกาบ.......... 40
4.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบสังกรณี.......... 42
4.3.3 ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี.......... 43
4.4 การแยกสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี.......... 45
4.4.1 ทดสอบหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณี.......... 45
4.4.2 ผลการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี.......... 47
4.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณี.......... 48
4.5.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบ.......... 49
4.5.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณี.......... 53

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.6 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณี.................. 59

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.. 60

บรรณานุกรม.. 62
ภาคผนวก.. 68
ภาคผนวก ก 69
ภาคผนวก ข 70
ภาคผนวก ค 72
ภาคผนวก ง 74
ประวัติผู้เขียน.. 85
ผลงานวิจัยตีพิมพ์... 86

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 แสดงปริมาณน้ำหนักแห้ง ปริมาณผลผลิตร้อยละเทียบกับน้ำหนักแห้ง และลักษณะของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณีทั้ง 5 ชนิด........................... 29
4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสาร mitomycin C ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ.......... 31
4.3 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด... 33
4.4 แสดงระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบทั้ง 5 ชนิด ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์.. 34
4.5 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด... 37
4.6 แสดงระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีทั้ง 5 ชนิด ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์.. 38
4.7 แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบ.. 41
4.8 แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณี.. 42
4.9 แสดงระบบตัวทำละลายและจำนวนสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบด้วยเทคนิคคอลัมโครมาโตกราฟี...................................... 48
4.10 แสดงระบบตัวทำละลายและจำนวนสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีด้วยเทคนิคคอลัมโครมาโตกราฟี..................................... 48
4.11 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารส่วนย่อยต่างๆ ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบที่ความเข้มข้น 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด... 51
4.12 แสดงระดับความเข้มข้นของสารส่วนย่อยต่างๆ ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์................. 52
4.13 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีที่ความเข้มข้น 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด.. 56
4.14 แสดงระดับความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์........................ 57

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 แสดงลักษณะดอกของพืชอังกาบ.. 5
2.2 แสดงลักษณะดอกของพืชสังกรณี.. 6
2.3 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้างของสาร MTT ไปเป็นผลึกฟอร์มาซาน............ 13
2.4 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผิวหนังมนุษย์ชนิด HaCat เมื่อได้รับสาร MMC ที่ความเข้มข้น 0.40 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1, 3, 5, 7 และ 10 วัน เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร MMC.................................. 16
3.1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี.................... 25
3.2 แสดงการวางแผ่น TLC ที่หยดสารทดสอบแล้ว ในแทงค์ของระบบตัวทำละลาย..... 27
3.3 แสดงขั้นตอนการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี ก) การปรับผิวหน้าผิวของ ซิลิกาเจลด้วยทรายทะเล ข) บรรจุสารสกัดที่คลุกซิลิกาเจลลงคอลัมน์ ค) เก็บสารส่วน ย่อยใส่หลอดทดลอง ง) ปริมาณสารส่วนย่อยในหลอดทดลอง จ) สารส่วนย่อยต่างๆ.. 28
4.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบทั้ง 5 ชนิด ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด.................................. 35
4.2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีทั้ง 5 ชนิด ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด.................................. 39
4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด ที่ความเข้มข้นสูงสุด 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.. 40
4.4 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบต่อเชื้อ ก) *S. aureus* ข) *B. subtilis* และ ค) *M. luteus* หมายเลข 1, 2, 3, 4, 5 คือ ความเข้มข้นของสารสกัด 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ตามลำดับ P) positive control และ N) negative control...... 42
4.5 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีต่อเชื้อ ก) *S. aureus* ข) *M. luteus* หมายเลข 1, 2, 3, 4, 5 คือ ความเข้มข้นของสารสกัด 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ตามลำดับ P) positive control และ N) negative control................................ 43
4.6 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีต่อเชื้อ *S. aureus*.. 44
4.7 แสดงลักษณะสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบ (1) และสังกรณี (2) เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และเมื่อย้อมด้วยสาร anisaldehyde reagent.................... 46
4.8 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด ของสารส่วนย่อยต่างๆ ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบ.. 53

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

4.9 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด ของสารส่วนย่อยต่างๆ ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณี...... 58

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายของทรัพยากรทางชีวภาพ (biological diversity resources) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับชีวิตความเป็นอยู่ของมนุษย์มาเป็นเวลานาน โดยมีการลองผิดลองถูกนำสมุนไพรมาปรุงอาหาร และใช้ในการรักษาโรค สืบทอดต่อกันมา แต่ความนิยมในการใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคได้ลดน้อยลง ในช่วงที่อุตสาหกรรมการผลิตยาเคมีสังเคราะห์เจริญขึ้นอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งผู้บริโภคตระหนักถึงอันตรายจากฤทธิ์ข้างเคียงและความเป็นพิษจากยาเคมีสังเคราะห์กันมากขึ้น รวมทั้งมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการค้นคว้าตัวยาใหม่ๆ จากพืชสมุนไพรทำให้ทั่วโลกได้หันมาให้ความสนใจกับพืชสมุนไพรเป็นอย่างมาก ทั้งด้านอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องสำอาง เช่น ต้นชิงเฮา (*Artemisia annua*) มีสารอาเทซูเนต (artesunate) และอาเทมีเทอร์ (artemether) เป็นสารจำพวกแล็กโทน (lactone) ใช้เป็นยาต้านมาเลเรียที่ออกฤทธิ์รวดเร็วและมีความเป็นพิษต่ำ โดยออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium* sp.) ในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดได้มากกว่าร้อยละ 95 (รัตนา, 2550) แม้ว่าปัจจุบันยังคงมีการสังเคราะห์สารเคมีขึ้นมาเพื่อใช้เป็นยาจำนวนมาก แต่ตัวยาสำคัญๆ หลายชนิดก็ยังคงได้มาจากพืชสมุนไพร เช่น จิงโกไลด์ บี (ginkgolide B) เป็นสารจากใบแปะก๊วย ช่วยป้องกันและรักษาความสมบูรณ์ของผนังเส้นเลือดฝอย ปรับระบบหมุนเวียนเลือดและต่อต้านการอักเสบ การบวม ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันมากในแพทย์ทั่วโลก (รัตนา, 2550) และวงการแพทย์ในปัจจุบันใช้ผลิตภัณฑ์ยาจากธรรมชาติ เพื่อเป็นแหล่งผลิตยาในการบำบัดรักษาโรค ประมาณร้อยละ 40 ของตำรับยา รวมทั้งยาสามัญประจำบ้านล้วนมาจากธรรมชาติ และยังมีสมุนไพรในรูปอาหารเสริมสุขภาพ (health foods) หรือชา (teas) ประเภทต่างๆ ที่มาจากธรรมชาติก็กำลังเป็นที่นิยมในขณะนี้ นอกจากนี้พืชในวงศ์ Acanthaceae จัดเป็นพืชที่มีการนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และการสกัดหาสารสำคัญ เช่น รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) เสลดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina*) และทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) เป็นต้น ซึ่งพืชในสกุล *Barleria* อยู่ในวงศ์นี้เช่นกันและมีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*) มีฤทธิ์ในการลดน้ำตาลในเลือดและมีความสามารถในการต้านอาการอักเสบ (Suba และคณะ, 2004) อังกาบหนู (*B. prionitis*) ทำให้เกิดความเป็นหมันในหนูหรือนำมาใช้เป็นสารคุมกำเนิด (Verma และคณะ, 2005) และสารสกัดเอทานอลจากเมล็ดอังกาบ (*B. cristata*) มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดหนู (Singh และคณะ, 2012) รวมทั้งแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบอังกาบหนู (*B. prionitis*) ใบ *B. greenii* และ *B. albostellata* (Amoo และคณะ, 2009) และสารสกัดจากใบและแคลลัสของอังกาบหนู (*B. prionitis*) (Shukla และคณะ, 2011) เป็นต้น

การนำสมุนไพรมาใช้เป็นยาเพื่อรักษาโรคนั้น แต่เดิมนำมาใช้ในรูปของพืชสดหรือนำมาตากแห้งใช้ในรูปของยาต้ม พอก หรือประคบ เป็นต้น ต่อมาได้มีการนำเอาสมุนไพรมาเตรียมเป็นสารสกัดหยาบ เพื่อให้สะดวกต่อการนำมารักษาโรคโดยไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (รัตนา, 2550) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเน้นการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ (*B. cristata*) และสังกรณี (*B. strigosa*) ที่สกัดด้วยวิธีการ

หมัก (maceration) ใบพืชกับตัวทำละลายเมทานอล แล้วนำไปประเหยแห้งจะได้เป็นสารสกัดหยาบเมทานอล นำมาละลายกับน้ำ และสกัดต่อด้วยวิธี liquid-liquid partitioning extraction โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ตามความมีขั้วของตัวทำละลาย คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท และบิวทานอล จะได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 5 ชนิด คือ สารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตท บิวทานอล และน้ำ จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ให้ผลการทดสอบดีที่สุด มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพื่อนำผลการทดลองที่ได้มาใช้เป็นแนวทางในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ และการหาสารสำคัญต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบและสารส่วนย่อยที่แยกได้จากใบอังกาบ และสังกรณี

1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบและสารส่วนย่อยที่แยกได้จากใบอังกาบ และสังกรณี

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณีที่สกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration) ใบพืชกับตัวทำละลายเมทานอล แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และนำสารสกัดหยาบที่ได้มาละลายกับน้ำ สกัดต่อด้วยวิธี liquid-liquid partitioning extraction โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท และบิวทานอล ตามลำดับ จะได้สารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบอังกาบและสังกรณี แล้วนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 7 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (human colon adenocarcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (human breast carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (human hepatocellular carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (oral human epidermal carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนูชนิด P388 (murine leukemia cell line) เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa (cervical cancer cell line) และเซลล์ไตลิงชนิด Vero (african green monkey kidney cell line) ด้วยวิธี MTT colorimetric และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี paper disc diffusion จากนั้นเลือกสารสกัดหยาบที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด มาทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี จะได้เป็นส่วนย่อย (fraction) ต่างๆ แล้วนำมาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกครั้ง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารสกัดต่างๆ จากใบอังกาบและสังกรณีที่นำมาทดสอบที่มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และทราบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพื่อเป็นตัวชี้วัดระดับความปลอดภัยในการนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้ต่อไป

ซึ่งนำไปสู่การแยกสารสำคัญให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น รวมถึงใช้เป็นแนวทางในการศึกษาโครงสร้างของสารสำคัญในอนาคต

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พืชสมุนไพร

สมุนไพร ตามพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 หมายถึงยาที่ได้จากพืช สัตว์ หรือแร่ ซึ่งยังไม่ได้ผสม ปรุง หรือเปลี่ยนสภาพ พืชสมุนไพร หมายถึงพันธุ์ไม้ต่างๆ ที่สามารถนำมาปรุงหรือประกอบเป็นยารักษาโรค เครื่องสำอาง อาหาร ตลอดจนใช้ในการส่งเสริมสุขภาพร่างกาย ซึ่งมีประโยชน์ในด้านการช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันโรค และช่วยลดอันตรายจากการใช้ยาแผนปัจจุบัน (ประสาทพร, 2551) เช่น ใบเครือพัดสาม (*Cayratia trifolia*) ใบเพกา (*Oroxylum indicum*) และว่านตะขาบ (*Muehlenbeckia platyclada*) มีความสามารถในการต้านการอักเสบในหนู ใบทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) และใบ *Pouzolzia indica* มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa (Siriwatanametanon และคณะ, 2010) ใบเขียวสุรัตน์มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MDA-MB-231 และมะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 และ DU-145 (Yaacob และคณะ, 2010) ใบ *Justicia spicigera* มีฤทธิ์ในการลดน้ำตาลในเลือดหนู และมีสรรพคุณเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Ortiz-Andrade และคณะ, 2012) เป็นต้น ซึ่งพืชสมุนไพรทั้งหมดดังที่ยกตัวอย่างมา ล้วนเป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Acanthaceae ที่มีการนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ มากมาย โดยพืชในสกุล *Barleria* ก็มีความน่าสนใจ ยกตัวอย่างเช่น ใบอังกาบหนู (*B. prionitis*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *Candida albicans* (Amoo และคณะ, 2010) *Klebsiella pneumonia* (Chavan และคณะ, 2010) *Lactobacillus rhamnosus*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* และ *Streptococcus mutans* (Diwan และคณะ, 2012) และยังช่วงป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารหนู (Manjusha และคณะ, 2013) รากของต้นอังกาบหนู (*B. prionitis*) มีฤทธิ์ต่อระบบสืบพันธุ์ในหนูเพศผู้โดยทำให้หนูเป็นหมัน (Verma และคณะ, 2005) เปลือกของต้นอังกาบ (*B. cristata*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *S. mutans* (Salib และคณะ, 2013) เสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *Propionibacterium acnes* และ *S. epidermidis* (Chomnawang และคณะ, 2005) และยังมีฤทธิ์ในการลดน้ำตาลในเลือดหนู (Suba และคณะ, 2004) ใบ *B. montana* ช่วยลดปริมาณไขมันในตับหนู (Banu และคณะ, 2012) และมีฤทธิ์ในการต้านไวรัสตับอักเสบในหนู (Basini และคณะ, 2013) เป็นต้น ดังนั้นพืชสมุนไพรที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้จึงเป็นพืชในวงศ์ Acanthaceae ที่สามารถพบได้ทั่วไปทุกภูมิภาคของประเทศไทยและมีการนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน คือ อังกาบ (*B. cristata*) และสังกรณี (*B. strigosa*) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.1.1 อังกาบ

อังกาบมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Barleria cristata* Linn. อยู่ในวงศ์ Acanthaceae ชื่อสามัญ Philippine Violet และมีชื่ออื่นๆ อีก เช่น ทองระอา คันชั่ง ก้านชั่ง หอมป่า และอังกาลเมือง เป็นต้น ลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ลำต้นสูงประมาณ 3 เมตร กิ่งก้านและใบจะมีขนอ่อนสีเหลือง และมีใบเป็นคู่ตรงข้ามกัน ใบหนา ริมใบจะแข็งและมีหนาม จะออกดอกเป็นช่อและมีขน ดอกจะมีสีฟ้าอมม่วง หรือสีเหลืองออกขาว บางทีเป็นสีชมพู กลีบรองกลีบดอกมีอยู่ 4 กลีบ ส่วนโคนของดอกจะเป็นหลอดยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร และตรงปลายจะแยกเป็น 5 กลีบ ด้านนอกจะมีขน มี

เกสรตัวผู้ 4 อัน (รูปที่ 2.1) ผลจะออกเป็นฝัก มีลักษณะเป็นรูปรี ภายในฝักจะมีเมล็ดอยู่ 4 เมล็ด ทำการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด รากและใบจะมีการนำมาใช้เป็นยา โดยมีคุณสมบัติคือ ขับปัสสาวะ รักษาประจำเดือนคั่งค้างเป็นลิ่มก้อน ฟอกเลือดประจำเดือน และรักษาอาการเจ็บปวดเมื่อยบั้นเอว มักพบขึ้นอยู่ทั่วๆ ไปตามไร่ ป่าดงดิบ ป่าละเมาะ ป่าก่อ และป่าเต็งรัง (สำนักวิทยบริการ สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา, 2552) นอกจากนี้ยังพบว่าอังกาบมีสารประกอบจำพวกฟลาโวนอยด์อยู่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะสารจำพวก apigenin, quercetin, quercetin-3-O-ß-D-glucoside, naringenin และ apigenin glucuronide เป็นต้น (Khare และคณะ, 2009) ในประเทศอินเดียมีการนำชิ้นส่วนต่างๆ จากต้นอังกาบมาใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านในการรักษาโรคโลหิตจาง แก้อาการปวดฟัน ลดน้ำตาลในเลือด และลดการบวมอักเสบ (Khare และคณะ, 2009) ซึ่งมีงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากใบอังกาบมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในหนู (Gambhire และคณะ, 2008 และ Karan และคณะ, 2013) และยังพบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Charoenchai และคณะ, 2010) เป็นต้น

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะดอกของพืชอังกาบ
ที่มา: รูปภาพโดย ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

2.1.2 สังกรณี

สังกรณีมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Barleria strigosa* Willd. อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อท้องถิ่น คือ ขี้ไพนกคุ่ม (ปราจีนบุรี) จุกโรหินี (ชลบุรี) หญ้าหงอนไก่ หญ้าหัวนาค (ภาคเหนือ) เป็นต้น ลักษณะลำต้น เป็นพรรณไม้พุ่ม ที่ลำต้นไม่มีหนามแตกกิ่งก้านสาขารอบๆ ต้นมากมาย ตามกิ่งก้านจะมีขนสีน้ำตาลปกคลุมอยู่ ลำต้นสูงประมาณ 2-4 ฟุต เป็นไม้ใบเดี่ยว ออกเรียงกันเป็นคู่ๆ ไปตามข้อต้น ลักษณะของใบเป็นรูปรีแต่ก็ค่อนข้างจะยาว ปลายใบแหลมและมีติ่ง ส่วนโคนใบนั้นก็จะแหลมและค่อยๆ เรียวแหลมจนถึงก้านใบ ขอบใบมีหนาม พื้นใบเป็นสีเขียว ด้านล่างของใบมีขนยาวตามเส้นใบ ส่วนด้านบนมีบ้างประปราย ออกเป็นช่ออยู่ตามง่ามใบ ซึ่งจะมีใบประดับห่อหุ้มอยู่ 4 กลีบต่อหนึ่งดอก กลีบใหญ่ 2 เล็ก 2 ส่วนดอกนั้นมีสีฟ้ามีอยู่ 5 กลีบ โคนดอกเป็นหลอดยาว 1-1.5 นิ้ว ตรงปลายยอดแยกออกเป็น 5 กลีบยาว 0.5 นิ้ว กลางดอกมีเกสร 4 อันยาว 0.8 นิ้ว ผลเป็นฝักเกลี้ยง ภายในผลจะมีเมล็ดผลละ 4 เมล็ด (รูปที่ 2.2) สังกรณีพบกระจายพันธุ์ทั่วทุกภาคในประเทศไทย พบตามป่าดิบชื้นทั่วไป ตามป่าเต็งรัง และป่าไผ่ ต่างประเทศพบที่ประเทศจีน พม่า อินโดจีน และ

มาเลเซีย โดยมีคุณสมบัติ คือ ใช้ทั้งต้นต้มน้ำดื่มเป็นยาบำรุงร่างกาย ใช้รากต้มน้ำดื่มขับน้ำคาวปลาหลังคลอด แก้ไข้ กระหายน้ำ (สำนักวิทยบริการ สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา, 2552) และยังพบว่าใบสังกรณีเมื่อนำมาหมักกับแอลกอฮอล์แล้วนำไปทดสอบในหนูเพศผู้ โดยให้หนูได้รับสารสกัดทางการกินปริมาณ 0.5 กรัมต่อมิลลิลิตรต่อวัน เป็นเวลา 50 วัน พบว่า หนูที่ได้รับสารสกัดจากใบสังกรณีไม่ทำให้น้ำหนักตัว น้ำหนักอัณฑะ และถุงน้ำเชื้อเปลี่ยนแปลง แต่ทำให้จำนวนสเปิร์มลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นแทนสารสกัดจากใบสังกรณี นอกจากนี้ยังพบว่า ทำให้ฮอร์โมนเทสโทสเทอร์โรน (testosterone) ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศชายในเลือดลงลง แต่ในขณะเดียวกันพบระดับของฮอร์โมนโพรแลคติน (prolactin) ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศหญิงมีค่าสูงขึ้น ซึ่งขัดแย้งกับความเชื่อดั้งเดิมของชาวบ้านในภาคเหนือของประเทศไทยที่นิยมนำใบสังกรณีมาหมักกับแอลกอฮอล์เพื่อนำมาดื่มเป็นยาเสริมสมรรถภาพทางเพศในผู้สูงอายุ (Wanichacheewa และคณะ, 2001)

รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะดอกของพืชสังกรณี
ที่มา: รูปภาพโดย ณัฐพร มานะประดิษฐ์

2.2 การสกัดสารจากพืช

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

ปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพรขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ฤดูกาลเก็บเกี่ยว ระยะเวลาที่เก็บพืช สภาพดิน สภาพอากาศ ปริมาณน้ำ ชนิดและปริมาณสัดส่วนของปุ๋ย และอาหารเสริม เป็นต้น พืชสมุนไพรที่เก็บเกี่ยวได้ต้องทำการตรวจสอบว่าไม่มีพืชอื่นหรือสารอื่นปะปน ซึ่งอาจรบกวนการตรวจสอบ รวมถึงการสกัดแยกสารสำคัญ นอกจากนี้ใบพืชควรมีความสะอาด ปราศจากสิ่งปนเปื้อน ไม่มีเชื้อรา หรือโรคพืชติดมา เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชอาจให้สารที่ถูกสกัดออกมาพร้อมกับสารที่ต้องการ หรือจุลินทรีย์เหล่านี้อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ในพืช ทำให้ได้สารที่แตกต่างออกไปจากธรรมชาติ (รัตนา, 2550) โดยทั่วไปการสกัดจะได้ผลดีเมื่อสกัดจากพืชสด ซึ่งควรสกัดโดยเร็วที่สุด หรือเก็บรักษาตัวอย่างในสภาวะแช่แข็งหรือแช่ในแอลกอฮอล์ เพื่อเป็นการหยุดการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ในพืช (Sarker และ Nahar, 2012) แต่วิธีการสกัดจากพืชสดนี้ไม่ค่อยสะดวก จึงจำเป็นต้องเอาตัวอย่างมาอบให้แห้งก่อนโดยใช้ความร้อน

หรือจากพลังงานอื่นๆ เช่น การทำให้แห้งโดยการใช้ตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 20-40 องศาเซลเซียส สำหรับใบ ต้น และดอก ส่วนเปลือกและรากจะใช้อุณหภูมิประมาณ 30-65 องศาเซลเซียส (ทิพย์วรรณ, 2547) และควรหลีกเลี่ยงแสงแดดเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสารสำคัญ ป้องกันการสะสมของความร้อนและความชื้นอันเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดเชื้อรา (Sarker และ Nahar, 2012) ก่อนทำการสกัดต้องมีการย่อยขนาดให้เล็กลงเพื่อให้การสกัดสารสำคัญจากพืชได้ผลดี เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญจะอยู่ภายในเซลล์ ในสภาพผลึกหรือผงละเอียด เมื่อได้สัมผัสกับน้ำยาสกัดที่เหมาะสม องค์ประกอบเหล่านั้นจะละลายออกมา การสกัดจะสมบูรณ์ถ้าเซลล์แตกออกและน้ำยาสกัดเข้าไปสัมผัสองค์ประกอบสำคัญได้มากที่สุด ดังนั้นในการสกัดพืชสมุนไพรจึงจำเป็นต้องบดพืชสมุนไพรให้เป็นผงละเอียด เพื่อทำลายผนังเซลล์และเพิ่มพื้นที่ผิวของน้ำยาสมุนไพรที่จะสัมผัสกับน้ำยาสกัด การลดขนาดของพืชสมุนไพรให้เป็นผงละเอียดควรคำนึงถึงโครงสร้างของพืชสมุนไพรเป็นหลัก ถ้าเป็นโครงสร้างแข็งแรง ซึ่งน้ำยาสกัดแทรกซึมเข้าไปได้ยาก เช่น ราก เนื้อไม้ ควรบดให้มีขนาดเล็กกว่าส่วนที่มีโครงสร้างอ่อนนุ่ม ซึ่งน้ำยาสกัดแทรกซึมเข้าไปได้ง่าย เช่น ใบ ดอก การบดพืชสมุนไพรให้มีขนาดเล็กมากจนเกินไปจะเกิดผลเสียได้ คือ ทำให้เกิดปัญหาในการอุดตันเครื่องกรองในขบวนการสกัด และทำให้ได้องค์ประกอบที่ไม่ต้องการมากขึ้นอันเนื่องมาจากเซลล์แตกมากเกินไป ซึ่งบางครั้งทำให้สารสกัดขุ่น (รัตนา, 2550)

2.2.2 วิธีการสกัด

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปการสกัดเบื้องต้นไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีใดหรือใช้ตัวทำละลายใด ก็ได้องค์ประกอบเป็นของผสมหรือสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพร มีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มักเรียกว่า สารสำคัญ และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งเรียกว่า สารเฉื่อย ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร คือ เพื่อแยกเอาสารสำคัญออกจากพืชสมุนไพรให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสารสำคัญสูง และลดขนาดของการใช้สมุนไพรให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม (รัตนา, 2550) วิธีการสกัดสารสำคัญออกจากพืชสมุนไพร เช่น วิธีการการหมัก (maceration) วิธีเพอร์โคเลชัน (percolation) วิธีซอกเลตเอกซ์แทรกเตอร์ (soxhlet extractor) วิธีการสกัดโดยเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย (liquid-liquid partitioning extraction) เป็นต้น ในการเลือกใช้วิธีการสกัดนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการสกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ (วันดี, 2536) ซึ่งแต่ละวิธีก็มีขั้นตอนการสกัดที่แตกต่างกัน ดังนี้

2.2.2.1 วิธีการหมัก (maceration)

เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถ เป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน หรือจนกระทั่งเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่ม และตัวทำละลายสามารถเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในสมุนไพรออกมาได้ ในระหว่างที่หมักสมุนไพรอยู่นั้น ควรเขย่าหรือคนเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆ รินเอาสารสกัดออก แล้วนำไปกรอง หากต้องการสกัดให้ได้สารสกัดออกมามากที่สุดอาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลายๆ ครั้ง วิธีการสกัดนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย วิธีนี้มีข้อดี คือ เป็นวิธีการสกัดที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะกับการสกัดสารที่ไม่ทนต่อความร้อน ซึ่งช่วยลดปัญหาการเสียสภาพของสารได้ แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก และวิธีการสกัดนี้มักจะไม่สมบูรณ์ไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ของ

น้ำยาสกัด เมื่อสารในสมุนไพรละลายออกมาถึงระดับหนึ่งจะเกิดความสมดุลขององค์ประกอบภายในสมุนไพรและตัวทำละลายที่ใช้ทำให้อัตราเร็วของการสกัดชะงักลง (วันดี, 2536 และ รัตนา, 2550)

2.2.2.2 วิธีเพอร์โคเลชัน (percolation)

เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า percolator โดยนำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้สมุนไพรพองตัวเต็มที่ แล้วค่อยๆ นำสมุนไพรมาบรรจุลงเพอร์โคเลเตอร์ทีละน้อย แล้วเติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับของตัวทำละลายอยู่เหนือสมุนไพรประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วจึงเริ่มไขเอาสารสกัดออก โดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดที่ได้นำไปกรองแล้วระเหยแห้ง (วันดี, 2536) วิธีการนี้เป็นวิธีการสกัดสารที่มีประสิทธิภาพ ทำให้เกิดการสกัดสารจากสมุนไพรแบบสมบูรณ์และไม่ต้องใช้ความร้อน แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ เปลืองตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และใช้เวลาในการสกัดนาน (รัตนา, 2550) ดังนั้นจึงมีการดัดแปลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารโดยใช้เพอร์โคเลเตอร์ต่อกันหลายๆ ตัว มีการดัดแปลงวิธีการสกัดให้สมุนไพรและตัวทำละลายเคลื่อนที่เข้าหากัน เป็นต้น เพื่อนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Sarker และ Nahar, 2012)

2.2.2.3 วิธีซอกเลตเอกซ์แทรกเตอร์ (soxhlet extractor)

เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องคลายกับวิธีเพอร์โคเลชัน แต่ใช้ความร้อนและใช้เครื่องมือที่เรียกว่า ซอกเลตเอกซ์แทรกเตอร์ ซึ่งเป็นระบบปิด โดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เมื่อตัวทำละลายได้รับความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายในภาชนะจะระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (thimble) ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ น้ำยาสกัดจะผ่านสมุนไพรซ้ำไปเรื่อยๆ จนกระทั่งองค์ประกอบในสมุนไพรถูกสกัดออกมา เมื่อน้ำยาสกัดในเอกซ์แทรกติงแชมเบอร์ (extracting chamber) สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในภาชนะ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ วิธีการสกัดนี้เหมาะสำหรับการสกัดพืชสมุนไพรที่สารสำคัญทนต่อความร้อนและใช้น้ำยาสกัดน้อย ไม่สิ้นเปลือง แต่มีข้อเสีย คือ น้ำยาที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกของตัวทำละลายแต่ละชนิด เนื่องจากมีจุดเดือดต่างกัน จะส่งผลต่อการสกัดทำให้การสกัดเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ (รัตนา, 2550)

2.2.2.4 วิธีการสกัดโดยเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย (liquid-liquid partitioning extraction)

เป็นการสกัดสารสำคัญจากสารละลายที่เป็นของเหลวโดยใช้ตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับตัวทำละลายชนิดแรก (วันดี, 2536) โดยเริ่มจากสกัดสารด้วยแอลกอฮอล์หรือเมทานอลด้วยวิธีการหมัก จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้เข้มข้นก่อนโดยการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า โรตารีอีวาโพเรเตอร์ (rotary evaporator) แล้วนำมาพาร์ทิชัน (partition) กับตัวทำละลายที่มีขั้วต่างๆ กัน โดยเริ่มจากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (non-polar solvent) ไปถึงตัวทำละลายที่มีขั้ว (polar solvent) เช่น เฮกเซน (hexane), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), เอทิล แอซิเตท (ethyl acetate) และบิวทานอล (butanol) เป็นต้น (รัตนา, 2550) โดยใช้กรวยแยก (separatory funnel) เนื่องจากในสมุนไพรมักมีสารที่เป็น emulsifying agent ปนอยู่ในสารสกัด เมื่อมีการเขย่าจะทำให้น้ำและตัวทำละลายผสมกันมักเกิดเป็น emulsion ซึ่งเป็นผลเสีย เพราะ emulsion จะห่อหุ้มเอาสารสำคัญไว้ทำให้ได้สารสกัด

น้อยกว่าที่ควร สามารถแก้ไขการเกิด emulsion ได้โดย นำสารในส่วน emulsion ไปให้ความร้อนอ่อนๆ เติมเกลือลงไป เกลือจะไปดึงน้ำมาเพื่อละลายตัวเอง สารในส่วน emulsion ก็จะแยกออกจากกัน เติมตัวทำละลายส่วนใดส่วนหนึ่งลงไปเพื่อทำลายสมดุลของสารเคมี หรืออาจใช้สาร anhydrous sodium sulfate เพื่อดูดน้ำออก เป็นต้น (อ้อมบุญ, 2536)

2.2.2.5 การใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญ ควรมีความสามารถในการละลายสารสำคัญให้ได้มากที่สุด โดยมีกฎทั่วไปว่า สิ่งที่เหมือนกันย่อมละลายในกันและกัน เช่น สารที่มีขั้วก็จะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว และตัวทำละลายที่ใช้ควรมีความคงตัว หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ไม่ระเหยง่ายหรือยากจนเกินไป หากพืชสมุนไพรที่ใช้ในการสกัดมีปริมาณของไขมันอยู่มาก ควรขจัดไขมันออกก่อนโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทไม่มีขั้ว เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นต้น แล้วจึงนำไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม (รัตนา, 2550)

2.2.3 การแยกส่วนผสม (separation)

พืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการศึกษาส่วนใหญ่ที่ใช้วิธีการสกัดในเบื้องต้นเป็นสารผสมที่มีสารออกฤทธิ์หลายชนิดปนกันอยู่ หากต้องการสารสกัดที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น หรือแยกสารประกอบต่างๆ ก็สามารถใช้เทคนิคอื่นที่มีความเหมาะสมในการแยก เช่น เทคนิคทางโครมาโตกราฟี เพื่อให้สามารถแยกสารให้เป็นสารส่วนย่อยต่างๆ สำหรับนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป (ประสาทพร และคณะ, 2551) ยกตัวอย่างเช่น เทคนิคทิลเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin-layer chromatography: TLC) และเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.2.3.1 เทคนิคทิลเลเยอร์โครมาโตกราฟี

เทคนิคทิลเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin-layer chromatography: TLC) เป็นวิธีการตรวจเอกลักษณ์ที่สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ โดยประเมินค่า R_f (Relative front หรือ Retardation factor) หรือค่าอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่กับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ สี และความเข้มของสีเปรียบเทียบกับสารอ้างอิง (reference substance) หรือสารมาตรฐาน (standard substance) ในกรณีที่ไม่มีสารอ้างอิงหรือสารมาตรฐาน อาจใช้ลายพิมพ์นิ้วมือ (fingerprint) ของโครมาโตแกรม (chromatogram) ของพืชสมุนไพรนั้น เนื่องจากไม่มีพืชสมุนไพรใดที่มีองค์ประกอบและปริมาณที่เหมือนกันทุกอย่าง ทำให้ได้ลักษณะเฉพาะตัวของพืชสมุนไพรนั้น (รัตนา, 2550) การประยุกต์ใช้เทคนิคทิลเลเยอร์โครมาโตกราฟีในการศึกษาสารเคมีในสมุนไพร เพื่อใช้วิเคราะห์หาสารเบื้องต้นว่ามีกี่ชนิด และอาจบอกได้ว่าเป็นสารประเภทใด ใช้เป็นวิธีเบื้องต้นเพื่อหาระบบตัวทำละลายสำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตรวจสอบส่วนย่อยที่ได้มาจากคอลัมน์โครมาโตกราฟี เพื่อรวมสารที่เหมือนกัน ใช้ในการแยกสารที่มีปริมาณน้อย และใช้หาปริมาณสารในสารผสมทั้งหมด เป็นต้น (นรศิษฎ์ และคณะ, 2545)

2.2.3.2 เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) เป็นการใช้ของแข็งเป็นเฟสคงที่ (stationary phase) บรรจุลงในคอลัมน์แก้ว และให้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นของเหลวเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่ โดยอาศัยแรงโน้มถ่วง โดยเรียกหลักการแยกแบบนี้ว่า gravity column chromatography ถ้าหากของเหลวเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่ โดยอาศัยแรงดันอากาศ

จากภายนอก (external pressure) จะเรียกว่า flash column chromatography อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารที่ต้องการแยกออกจากคอลัมน์ขึ้นอยู่กับแรงยึดเหนี่ยวระหว่างตัวดูดซับกับสารที่ต้องการแยก โดยสารที่มีแรงยึดเหนี่ยวกับตัวดูดซับมากจะเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ช้า ในทางตรงกันข้ามสารที่มีแรงยึดเหนี่ยวกับตัวดูดซับน้อยจะเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์เร็ว นอกจากนี้ขนาดของคอลัมน์และปริมาณของตัวดูดซับที่เหมาะสมกับปริมาณของสารที่ต้องการแยก มีผลต่อความสามารถในการแยกสารให้บริสุทธิ์ (column efficiency) โดยทั่วไปปริมาณของตัวดูดซับควรมีปริมาณ 25-30 เท่าของปริมาณของสารที่ต้องการแยก และคอลัมน์ควรมีความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ประมาณ 8: 1 วัสดุที่ใช้บรรจุในคอลัมน์เป็นเฟสคงที่มีหลายชนิด ได้แก่ อะลูมินา (อะลูมิเนียมออกไซด์, Al_2O_3) แคลเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ซูโครส ซิลิกาเจล (ซิลิกอนออกไซด์, SiO_2) เป็นต้น แต่ที่นิยมใช้ในการแยกของผสมสองชนิด คือ อะลูมินาและซิลิกาเจล ของเหลวที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งทำหน้าที่พาสารตัวอย่างลงมาจากคอลัมน์ ได้แก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไป (รัตนา, 2550)

2.2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการตรวจสอบและแยกสารสำคัญจากพืช

รายงานการวิจัยเกี่ยวกับการตรวจสอบและแยกสารสำคัญจากพืชสกุล *Barleria* ได้แก่ Jaiswal และคณะ (2014) สกัดสารจากใบอังกาบหนู (*B. prionitis*) โดยการหมักกับตัวทำละลายเอทานอลเป็นเวลา 2 วัน ในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปประเหยแห้ง เมื่อนำมาตรวจสอบหาสารสำคัญเบื้องต้น พบสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ แทนนิน ซาโปนิน สเตียรอยด์ และไตรเทอร์ปีนอยด์ จากนั้นนำสารสกัดหยาบเอทานอลมาละลายในน้ำ แล้วสกัดต่อด้วยวิธีการสกัดโดยเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิล แอซิเตท และบิวทานอล ตามลำดับ ซึ่งได้สารสกัดหยาบเฮกเซน คลอโรฟอร์ม บิวทานอล และน้ำ ที่มีน้ำหนักแห้งคิดเป็น 7.50, 15.35, 29.20 และ 55.10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสารสกัดหยาบทั้งหมด (ไม่พบสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตท) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารในหนู ซึ่งผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบบิวทานอลมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารหนูดีที่สุด (ไม่รายงานผลการทดลอง) จึงเลือกสารสกัดหยาบบิวทานอลมาศึกษาต่อ โดยนำมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ ใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม 100 เปอร์เซ็นต์ ต่อเอทิล แอซิเตท 0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ แล้วเพิ่มตัวทำละลายเอทิล แอซิเตท ครั้งละ 25 เปอร์เซ็นต์ จนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นใช้ตัวทำละลายเอทิล แอซิเตต 98 เปอร์เซ็นต์ ต่อเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ แล้วเพิ่มตัวทำละลายเมทานอลเป็น 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคทิลเลเยอร์โครมาโตกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายเอทิล แอซิเตท ต่อโทลูอีน ต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 8: 1: 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งพบสารในกลุ่มไกลโคไซด์จำนวนมากที่สุดเท่ากับ 229 มิลลิกรัม ที่ $R_f = 0.44$ จึงนำไปตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนู โดยให้หนูได้รับสารโดยการกินที่ความเข้มข้น 50.00, 100.00 และ 200.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 2 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 5 วัน พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 200.00 มิลลิกรัม สามารถยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารหนูได้ เช่นเดียวกับ Ata และคณะ (2009) ได้พบสารประกอบในกลุ่มไกลโคไซด์ชนิดใหม่ 1 ชนิด เรียกว่า barlerinoside และพบสารประกอบในกลุ่มไกลโคไซด์ที่รู้จักแล้วอีก 6 ชนิด คือ shanzhiside methyl ester, 6-O-trans-p-coumaroyl-8-O-acetylshanzhiside methyl ester, barlerin, acetylbarlerin, 7-methoxy diderroside และ lupulinoside ซึ่งได้จากการสกัดสาร

จากใบอังกาบหนูด้วยตัวทำละลายเอทานอล นำไปทำการระเหยแห้ง แล้วแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และใช้ตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิล แอซิเตท (0-100 เปอร์เซ็นต์) และเอทิล แอซิเตทต่อเมทานอล (0-100 เปอร์เซ็นต์) เป็นเฟสเคลื่อนที่ นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบด้วยเทคนิคทิลเลเยอร์โครมาโตกราฟี (ไม่ระบุจำนวนสารส่วนย่อยที่ได้) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกิดเอนไซม์ glutathione S-transferases (GSTs) พบว่าสารส่วนย่อยที่ 35 และ 36 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดเอนไซม์ GSTs ดีที่สุด ซึ่งมีน้ำหนักของสารสกัดเท่ากับ 230.00 และ 30.00 มิลลิกรัม จากนั้นนำสารส่วนย่อยที่ 35 และ 36 มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายเอทิล แอซิเตท 80 เปอร์เซ็นต์ ต่อเมทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ พบว่า สารส่วนย่อยที่ 35 สามารถแยกได้ 3 ส่วน มีน้ำหนักเท่ากับ 55.00, 62.00 และ 47.00 มิลลิกรัม สารส่วนย่อยที่ 36 สามารถแยกได้ 4 ส่วน มีน้ำหนักเท่ากับ 4.50, 6.00, 4.30 และ 8.60 มิลลิกรัม และตรวจสอบด้วยเทคนิค NMR (Nuclear Magnetic Resonance) นอกจากนี้ Verma และคณะ (2005) ยังพบความสามารถในการลดจำนวนสเปิร์มและทำให้หนูเพศผู้เป็นหมันได้ เมื่อหนูได้รับสารสกัดหยาบเมทานอลจากรากของต้นอังกาบหนู โดยหนูจะได้รับสารสกัดหยาบ 8 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำไปแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล อัตราส่วน 3: 1 และคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล อัตราส่วน 1: 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้เป็นสารส่วนย่อยที่ 1 และ 2 ที่มีน้ำหนักแห้งคิดเป็น 19 และ 27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งหนูจะได้รับสารทางการกินปริมาณ 100.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 60 วัน เมื่อครบเวลานำหนูมาตรวจสอบ พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารส่วนย่อยที่ 1 และ 2 มีอัตราสูงขึ้น แต่มีความหนาแน่นของจำนวนสเปิร์มลดลง เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำเกลือ และเมื่อนำหนูเพศผู้ไปอยู่รวมกันหนูเพศเมียในอัตราส่วน 1: 2 ตัว เป็นเวลา 5 วัน (ทำการทดลองทั้งหมด 10 กลุ่ม) แล้วนำหนูเพศเมียมาตรวจสอบการตั้งครรภ์ พบว่าหนูเพศผู้ในกลุ่มควบคุมทำให้หนูเพศเมียตั้งครรภ์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่หนูที่ได้รับสารส่วนย่อยที่ 1 ทำให้หนูเพศเมียตั้งครรภ์ได้ 33.33 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการตั้งครรภ์ในหนูเพศเมียที่อยู่รวมกับหนูเพศผู้ที่ได้รับสารส่วนย่อยที่ 2

Karan และคณะ (2013) สกัดสารจากใบอังกาบหนู (*B. prionitis*) และใบอังกาบ (*B. cristata*) โดยการหมักกับตัวทำละลายเมทานอลเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปกรองและทำการระเหยแห้ง ได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 28.00 และ 31.00 กรัม ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดหยาบเมทานอลมาละลายในน้ำ แล้วสกัดต่อด้วยวิธีการสกัดโดยเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิล แอซิเตท และบิวทานอล แล้วนำไปทำการระเหยแห้ง ได้สารสกัดหยาบจากใบอังกาบหนูและใบอังกาบ ดังนี้ สารสกัดหยาบเฮกเซน (3.00 และ 5.00 กรัม) สารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม (3.00 และ 4.00 กรัม) สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตท (3.00 และ 3.00 กรัม) สารสกัดหยาบบิวทานอล (5.00 และ 6.00 กรัม) และสารสกัดหยาบน้ำ (5.00 และ 6.00 กรัม) ตามลำดับ แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบเฉพาะที่ (การบวมน้ำ) ในหนูเพศเมีย โดยให้หนูได้รับสารสกัดหยาบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 200.00 และ 400.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มจากใบอังกาบหนูที่ความเข้มข้น 200.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลการยับยั้งการอักเสบในหูหนูได้ดีที่สุด คิดเป็น 88.31 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มจากใบอังกาบ คิดเป็น 80.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาต้านการอักเสบ ibuprofen ซึ่งแสดงฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบเท่ากับ 62.95 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัด

หยาบบิวทานอลของพืชทั้ง 2 ชนิด แสดงฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบเท่ากับ 79.92 และ 79.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มของพืชทั้ง 2 ชนิด มีสารในกลุ่มสเตียรอยด์ และไตรเทอร์ปีนอยด์ เช่นเดียวกับ Gambhire และคณะ (2008) ได้พบสารในกลุ่มสเตียร์รอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอลคาลอยด์ และไกลโคไซด์ ในสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบอังกาบเช่นกัน

จากงานวิจัยทั้งหมด พบว่าการสกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธีการหมักใบพืชกับตัวทำละลายเมทานอลหรือเอทานอลก่อนนั้น จะสามารถสกัดเอาสารสำคัญออกมาได้มากที่สุด เนื่องจากตัวทำละลายดังกล่าวเป็นตัวทำละลายเอนกประสงค์ (all purpose solvent) ซึ่งมีอำนาจในการละลายกว้าง (วันดี, 2536) มีความจำเพาะในการละลายมากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น และการสกัดแบบหมักจะได้สารสกัดหยาบปริมาณมากและเจือจาง จึงควรนำไปกรองและระเหยแห้งก่อน การใช้ตัวทำละลายเมทานอลหรือเอทานอลจะทำการระเหยได้ง่าย (รัตนา, 2550) แล้วจึงนำมาสกัดแบบแบ่งส่วนโดยการเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายที่นิยมใช้ คือ ตัวทำละลายเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิล แอซิเตท และบิวทานอล ตามลำดับ (Jaiswal และคณะ, 2014 และ Karan และคณะ, 2013) ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้การหมักใบพืชกับตัวทำละลายเมทานอล แล้วจึงนำมาสกัดต่อโดยการเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท และบิวทานอล ตามลำดับ เนื่องจากการใช้ตัวทำละลายเฮกเซนสกัดสารในขั้นตอนแรกจะสามารถแยกสารที่ไม่มีขั้วออกจากตัวทำละลายได้ เหมาะสำหรับการกำจัดไขมันออกจากพืชสมุนไพร และไม่ใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์มในการสกัด เนื่องจากตัวทำละลายคลอโรฟอร์มมักทำให้เกิด emulsion ได้ง่าย และมีฤทธิ์เป็นด่างแก่ อาจสลายตัวให้กรดเกลือ (วันดี, 2536) จึงเลือกใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนแทน

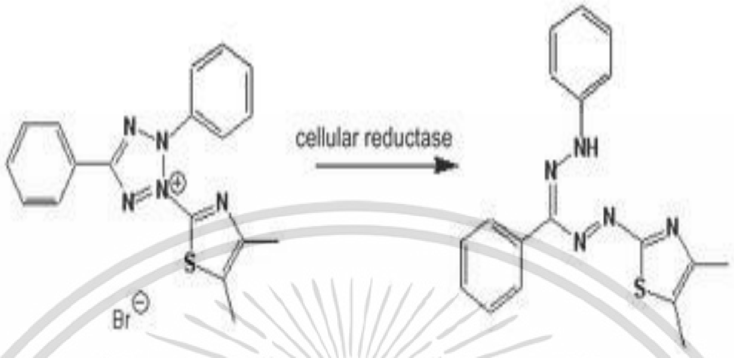
2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

ความมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) ถูกนำมาใช้ในการศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์ต่อสารทดสอบ ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการศึกษาทางด้านชีววิทยา โดยส่วนใหญ่จะทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ (cell cytotoxic) ทั้งการศึกษาความเป็นพิษของสารเคมี ยา เครื่องสำอาง หรือสารสกัดจากธรรมชาติ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยาชนิดใหม่ (Bopp และ Letteiri, 2008) ทั้งนี้การตรวจสอบผลการตอบสนองของสารทดสอบต่อเซลล์มีหลายวิธี เช่น การตรวจสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการยอมให้สารผ่าน เช่น การย้อมด้วยสีทริปแพนบลู (trypan blue) และนิวทรัลเรด (neutral red) และการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงทางกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism assay) เช่น วิธี MTT colorimetric (tetrazolium 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) และวิธี XTT colorimetric (tetrazolium hydroxide (sodium 3′-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis [4-methoxy-6-nitro] benzene sulfonic acid hydrate)) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบโดยการวัดปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ หรือวิธี SRB (Sulforhodamine B assay) เป็นต้น ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.3.1 วิธี MTT colorimetric

เป็นวิธีที่นิยมนำมาศึกษา เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และเชื่อถือได้ โดยใช้ความสามารถของกิจกรรมของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรีย

(mitochondria) ในการรีดิวซ์สีสังเคราะห์ tetrazolium 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ที่มีสีเหลืองไปเป็นผลึกฟอร์มาซานที่มีสีม่วงที่ไม่ละลายน้ำ (รูปที่ 2.3) จึงต้องละลายผลึกฟอร์มาซานด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ซึ่งสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 570 นาโนเมตร ได้ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Mosmann, 1983)



รูปที่ 2.3 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้างของสาร MTT ไปเป็นผลึกฟอร์มาซาน
ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay

2.3.2 วิธี XTT colorimetric

เป็นวิธีการตรวจสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยใช้ความสามารถของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรีย เช่นเดียวกับวิธี MTT colorimetric ในการรีดิวซ์สีสังเคราะห์ tetrazolium hydroxide (sodium 3′-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis [4-methoxy-6-nitro] benzene sulfonic acid hydrate) (XTT) ที่มีสีเหลือง ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของสาร MTT ไปเป็นผลึกฟอร์มาซานที่มีสีส้ม ซึ่งสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 450 นาโนเมตร ได้ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Amaral และคณะ, 2014)

2.3.3 วิธีการย้อมด้วยสีทริปแพนบลู (trypan blue)

การตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยการย้อมด้วยสีทริปแพนบลู อาศัยหลักการที่เซลล์ที่ตายแล้วจะย้อมติดสีน้ำเงินของทริปแพนบลู เนื่องจากสูญเสียคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน ทำให้สีทริปแพนบลูสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปได้ ทำให้ไซโตพลาซึมของเซลล์ติดสีน้ำเงิน ข้อควรระวังในการใช้สีย้อม คือ ถ้าใช้สีย้อมที่มีความเข้มข้นมากเกินไป เซลล์ที่มีชีวิตอาจจะค่อยๆ กลืนสีเข้าไปภายในเซลล์ทำให้เซลล์ตายได้ จึงควรทำภายในเวลาจำกัด และเซลล์ที่เพิ่งผ่านการ trypsinization หรือออกมาจากการแช่แข็งแล้วเอามาทำละลาย (thaw) เยื่อหุ้มเซลล์อาจมีการรั่ว ไม่แข็งแรง ทำให้เซลล์มีการดูดซึมสีผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (นวลฉวี, 2546)

2.3.4 วิธีการตรวจสอบด้วยสีนิวทรัลเรด (neutral red)

การตรวจสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์โดยการย้อมด้วยสีนิวทรัลเรด อาศัยหลักการที่สีย้อมมีประจุบวก และสามารถแตกตัวได้ง่าย จึงทำให้สีสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งไม่มีประจุเข้าไปได้ และเกิดการสะสมภายในไลโซโซม ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วสีนิวทรัลเรดจะไม่สามารถเข้าไปภายในไลโซโซมของเซลล์ได้ สามารถตรวจสอบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Tonder และคณะ, 2015)

2.3.5 วิธี SRB

วิธี Sulforhodamine B (SRB assay) เป็นการวัดปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ โดยตรึงเซลล์ด้วยสาร trichloroacetic acid (TCA) แล้วย้อมเซลล์ด้วยสี SRB ซึ่งเป็น amino protein stain สามารถเข้าจับกับกรดอะมิโนของโปรตีนภายในเซลล์ที่รอดชีวิตได้ ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นแสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด ละลายสีย้อมที่จับอยู่กับโปรตีนภายในเซลล์ด้วย 10 mM Tris base pH 10 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (Padron และคณะ, 2000)

2.3.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

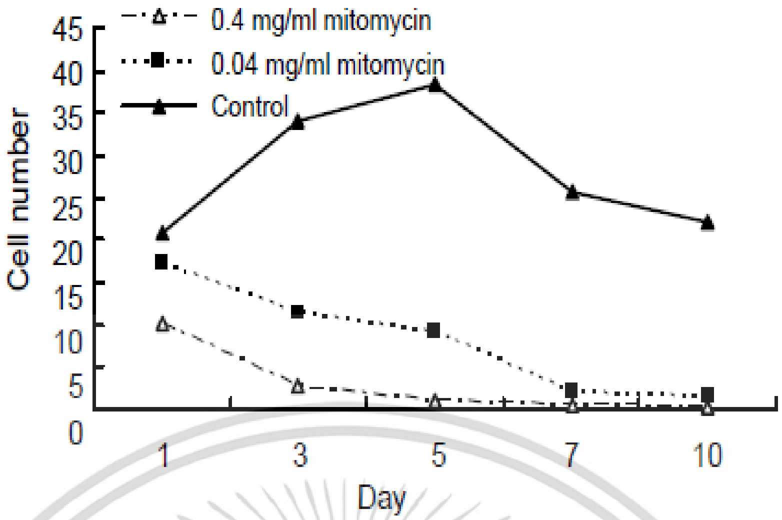
รายงานการวิจัยเกี่ยวกับการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดจากพืชโดยเฉพาะพืชในสกุล *Barleria* มักนิยมตรวจสอบด้วยวิธี MTT colorimetric ได้แก่ธนวุฒิ และคณะ (2552) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากใบอังกาบ (*B. cristata*) และสังกรณี (*B. strigosa*) ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนู (P388) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ไตลิง (Vero) ด้วยวิธี MTT colorimetric พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบอังกาบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388, MCF-7, Vero และ HT-29 โดยมีค่า CC_{50} (50% cytotoxicity concentration) เท่ากับ 323.90, 596.66, 622.97 และ 717.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 และ MCF-7 โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 2,175.04 และ 1,923.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388, Vero, HT-29, และ MCF-7 โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 250.58, 436.15, 2,385.04 และ 1,821.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบสังกรณีมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 เพียงชนิดเดียว โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 1,980.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากใบอังกาบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มากกว่าใบสังกรณี เช่นเดียวกับกฤษฎา และคณะ (2554) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิล แอซิเตท และเอทานอล จากใบอังกาบต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนู (P388) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งตับ (HepG-2) และเซลล์ไตลิง (Vero) ด้วยวิธี MTT colorimetric พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388, HepG-2, MCF-7 และ Vero โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 858.09, 3,923.53, 1,606.68 และ 1,689.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตท มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 1,007.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบเอทานอลมีผลต่อเซลล์ไลน์ P388 และ Vero โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 239.81 และ 2,336.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบอังกาบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์สูงที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบเอทานอลและเอทิล แอซิเตท นอกจากนี้ Siriwatanametanon และคณะ (2010) ได้ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบพืชในวงศ์ Acanthaceae ได้แก่ ใบทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิล แอซิเตท และเมทานอล ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ด้วยวิธี MTT colorimetric พบว่าสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตทจากใบทองพันชั่งที่ความเข้มข้น 10.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไลน์ลดลง 36.77 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ สารสกัดหยาบปิโตรเลียมอีเทอร์และเมทานอล ตามลำดับ

ในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารทดสอบ เช่น ยา สารเคมี หรือสารสกัดจากธรรมชาตินั้นนิยมตรวจสอบด้วยวิธี MTT colorimetric เนื่องจากเป็นการตรวจสอบ

ความสามารถในการทำงานของไมโตคอนเดรียที่มีเฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะไม่สามารถรีดิวซ์สาร MTT ให้กลายเป็นผลึกฟอร์มาซานได้ และเมื่อมีการบ่มเซลล์ไลน์ร่วมกับสารทดสอบที่อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส จะทำให้เซลล์ไลน์มีความไวต่อสารทดสอบ ซึ่งส่งผลให้การตรวจสอบด้วยวิธีนี้มีความแม่นยำ ให้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับ (Mosmann, 1983) นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้วิธี MTT colorimetric ในการวัดปริมาณเซลล์ไลน์ที่มีชีวิตแทนการย้อมสีทริปแพนพลูและนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Nomula และคณะ, 1996) และมีการประยุกต์ใช้สารอนุพันธ์ของสาร MTT ที่มีหลักการทำงานที่คล้ายกัน เช่นสาร MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) สาร XTT (sodium 3’-[1-[(phenylamino) carbo-nyl]-3, 4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate) สาร NR (neutral red) และ SRB (sulforhodamine B) เป็นต้น ซึ่งราคาของสารอนุพันธ์นั้นสูงกว่าราคาของสาร MTT มาก (เบ็ญจมาศ, 2553) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วิธี MTT colorimetric ในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

2.4 การทดสอบความเป็นพิษของสาร mitomycin C ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ

สาร mitomycin C (MMC) เป็นสารสังเคราะห์ที่ได้จากธรรมชาติ แยกครั้งแรกได้จากเชื้อ *Streptomyces caespitosus* ในปี ค.ศ. 1958 และในเวลาต่อมามีการสังเคราะห์สาร MMC จากเชื้อในสกุล *Streptomyces* อื่นๆ สาร MMC นิยมนำมาใช้เป็นยาเคมีบำบัดในการรักษาโรคมะเร็ง โดยสาร MMC ที่ความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาผสมในน้ำเกลือ 100 มิลลิลิตร ฉีดให้ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเนื้องอกในท่อปัสสาวะ พบว่าสามารถช่วยรักษาโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ (Bradner, 2001) และยังมีรายงานการวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสาร MMC ดังนี้ Heijden และคณะ (2004) ศึกษาผลของ MMC ที่ความเข้มข้น 0-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมนุษย์ 4 ชนิด ได้แก่ RT112, RT4, 253J และ T24 โดยปลูกเซลล์เริ่มต้นจำนวน $2x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มเซลล์ร่วมกับสาร MMC ที่อุณหภูมิ 37 และ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วตรวจสอบด้วยวิธี MTT colorimetric พบว่าที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส สาร MMC จะเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ทดสอบมากกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รวมถึงความเข้มข้นของสาร MMC ที่ใช้มีผลต่อเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดแตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น สาร MMC ที่ความเข้มข้น 12.50 และ 25.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ T24 และ 253J แต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ RT112 และ RT4 ซึ่งความเข้มข้นสูงสุดของสาร MMC ที่ใช้ทดสอบ คือ 400.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ RT112 และ RT4 ในระดับต่ำ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Cavaliere และคณะ (1967) ที่ใช้ความร้อนร่วมกับยาเคมีบำบัดในการรักษาโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ แต่อาจส่งผลกระทบต่อเซลล์กระเพาะปัสสาวะปกติด้วย นอกจากนี้ Wang และคณะ (2012) ได้ทดสอบผลของสาร MMC ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังมนุษย์ชนิด HaCat โดยปลูกเซลล์เริ่มต้นจำนวน $2x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มเซลล์ร่วมกับสาร MMC ที่ความเข้มข้น 0.40 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (400.00 และ 40.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ครั้ง บ่มเซลล์ต่ออีกเป็นเวลา 1, 3, 5, 7, 9 และ 10 วัน แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธี MTT colorimetric พบว่าสาร MMC ที่ความเข้มข้น 400.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มากกว่าที่ความเข้มข้น 40.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผิวหนังมนุษย์ชนิด HaCat เมื่อได้รับสาร MMC ที่ความเข้มข้น 0.40 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1, 3, 5, 7 และ 10 วัน เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร MMC (Wang และคณะ, 2012)

Kuo และคณะ (2014) ศึกษาผลของสาร MMC ต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารมนุษย์ชนิด MKN-74 พบว่าสาร MMC ที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์ไลน์ MKN-74 เท่ากับ 94.90 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น และยังมีงานวิจัยของกิตติพงษ์ และคณะ (2556) ได้ศึกษาความเป็นพิษของสาร MMC ที่ความเข้มข้น 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์ 5 ชนิด ได้แก่เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนูชนิด P388 และเซลล์ไตลิงชนิด Vero โดยบ่มเซลล์ไลน์ร่วมกับสาร MMC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบด้วยวิธี MTT colorimetric พบว่าที่ความเข้มข้นของสาร MMC เท่ากับ 20.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด MCF-7 และ P388 เท่ากับ 53.30 และ 85.29 เปอร์เซ็นต์ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สาร MMC เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control)

2.5 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

ในการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้น เพื่อเป็นการคัดกรองคุณสมบัติในการเป็นยาต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารที่ต้องการทดสอบ โดย The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดวิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารทดสอบเป็นวิธีมาตรฐานไว้ โดยมีขั้นตอนที่ชัดเจนตามชนิดของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ ความหนาแน่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมเชื้อในการทดสอบ อุณหภูมิ เวลา และสภาวะในการบ่มเพาะเชื้อ (ประสาทพร และคณะ, 2551) ซึ่งในปัจจุบันโรคติดเชื้อต่างๆ ล้วนเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย รา ไวรัส และปรสิตต่างๆ ที่เป็นภัยคุกคามต่อสุขภาพของมนุษย์ จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนายาต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่มากขึ้น (Rajesh และคณะ, 2012) โดยวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายอาศัยหลักการใหญ่ๆ 2 หลักการ คือ หลักการแพร่ โดยอาศัยการแพร่ของสารบนอาหารแข็ง เมื่อระยะเวลาที่สารแพร่ออกไปเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารทดสอบจะลดลงทำให้

เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสารทดสอบ ในขณะเดียวกันเชื้อจุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจะเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งบริเวณที่มีความเข้มข้นของสารทดสอบมากพอจะเกิดเป็นบริเวณใสหรือเป็นบริเวณยับยั้งที่เชื้อไม่มีการเจริญเติบโต (inhibition zone) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นจะบอกความสามารถของสารทดสอบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้มากน้อยเพียงใด เช่นวิธี paper disc diffusion และ agar well diffusion เป็นต้น และหลักการเจือจาง เป็นการทดสอบในเชิงปริมาณ เนื่องจากสามารถทราบความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ ซึ่งนิยมใช้ทดสอบกับเชื้อที่เจริญเติบโตช้า และเพื่อยืนยันผลของวิธี diffusion เช่นวิธี broth dilution และ agar dilution เป็นต้น (มาลัย และมาลิน, 2536) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.5.1 วิธี paper disc diffusion

เป็นวิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่แพร่หลายที่สุด ซึ่งมีความสะดวก ใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่นๆ และน่าเชื่อถือ เนื่องจากเป็นวิธีการทดสอบในเชิงคุณภาพ เป็นการหาผลของสารอย่างจำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ สามารถบอกได้ว่าเชื้อมีความไวต่อสารทดสอบหรือไม่ (ประสาทพร และคณะ, 2551) ทำได้โดยการหยดสารทดสอบลงบนแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ทิ้งไว้ให้แห้ง เพื่อระเหยตัวทำละลายออก นำแผ่นกระดาษกรองไปวางบนผิวหน้าอาหารแข็งที่มีเชื้อแบคทีเรียในจำนวนที่เหมาะสม (เทียบกับสารมาตรฐาน McFarland 0.5 หรือเท่ากับ 1x10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร) (Rajesh และคณะ, 2012) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งรอบๆ แผ่นกระดาษกรอง (มาลัย และมาลิน, 2536) วิธีการนี้ไม่เหมาะในการทดสอบกับเชื้อที่เจริญช้าและจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ และไม่สามารถหาค่า MIC (minimal inhibitory concentration) และค่า MBC (minimum bactericidal concentration) ของสารทดสอบได้ (ประสาทพร และคณะ, 2551)

2.5.2 วิธี agar well diffusion

เป็นวิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารแข็งในขณะที่ยังเหลวอยู่ ซึ่งเชื้อที่เติมลงไปต้องมีความขุ่นเท่ากับสารมาตรฐาน McFarland 0.5 หรือเท่ากับ 1x10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Rajesh และคณะ, 2012) เมื่ออาหารแข็งให้ทำการเจาะหลุมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร แล้วเติมสารที่ต้องการทดสอบลงไป นำจานเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งรอบๆ หลุมที่เจาะไว้ (Bhattacharjee และคณะ, 2011)

2.5.3 วิธี broth dilution

เป็นวิธีการทดสอบโดยการเจือจางสารทดสอบลงในอาหารเหลวให้ความเข้มข้นของสารลดลงทีละครึ่งจนมีความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการ แล้วเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลวที่มีสารทดสอบอยู่ นำไปบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จะสามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (minimal inhibitory concentration: MIC) หน่วยที่ใช้โดยทั่วไป คือ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือหน่วยสากล (international unit: IU) ต่อมิลลิลิตร โดยค่า MIC นี้สามารถนำไปเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่งๆ ต่อชนิดของสารทดสอบ ซึ่งในการทดสอบเพื่อ

หาค่า MIC สารทดสอบควรได้รับการเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลง 2 เท่า (2-fold serial dilution) (ประสาทพร และคณะ, 2551) และสามารถทราบความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ หรือสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ (minimum bactericidal concentration: MBC) (Adisai และคณะ, 2014)

2.5.4 วิธี agar dilution

เป็นวิธีการทดสอบความไวของเชื้อแบบปริมาณวิเคราะห์โดยมีหลักการคล้ายคลึงกับวิธี broth dilution ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการเจือจางสารทดสอบให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน แล้วนำไปผสมในอาหารแข็งที่อยู่ในสภาพหลอมเหลว อุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส เมื่ออาหารแข็งจึงเพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไป นำไปบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง วิธีนี้มีข้อดี คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกันได้ สามารถหาค่า MIC ได้ แต่ไม่สามารถหาค่า MBC ได้ (ประสาทพร และคณะ, 2551)

2.5.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

รายงานการวิจัยเกี่ยวกับการตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในพืชสกุล *Barleria* มีการใช้วิธีการตรวจสอบที่หลากหลาย ทั้งวิธี paper disc diffusion วิธี agar disc diffusion และวิธี broth dilution ดังนี้ การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion เพื่อหาขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และเพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับนำไปใช้ในการศึกษาต่อ ซึ่งมีการศึกษาสารสกัดหยาบจากใบเสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*) (ไม่ระบุตัวทำละลายและความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบ) ต่อเชื้อ *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* พบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งมากกว่า 15 มิลลิเมตร ซึ่งถือว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ดี (Chomnawang และคณะ, 2005) สารสกัดหยาบปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม อะซิโตน และน้ำ จากใบอังกาบหนู (*B. prionitis*) ต่อเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces viscoscus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* พบว่าสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 200.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *L. rhamnosus* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.00 มิลลิเมตร (Diwan และคณะ, 2012) สารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม เอทิล แอซิเตท และเอทานอล จากเปลือกของต้นอังกาบ (*B. cristata*) ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลที่ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 28.00 มิลลิเมตร (Salib และคณะ, 2013)

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar diffusion เพื่อหาขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ของสารสกัดหยาบปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เอทานอล และน้ำ จากใบอังกาบหนู (*B. prionitis*) ต่อเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. vulgaris*, *K. pneumonia*, *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าสารสกัดหยาบปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ สามารถยับยั้งการ

เจริญเติบโตต่อเชื้อ *K. pneumonia* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.00 มิลลิเมตร (Chavan และคณะ, 2010)

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth dilution เพื่อหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากใบเสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*) (ไม่ระบุตัวทำละลายที่ใช้) พบว่าสารสกัดหยาบมีค่า MIC ต่อเชื้อ *P. acnes* และ *S. epidermidis* เท่ากับ 1.25 และ 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC เท่ากับ 1.25 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Chomnawang และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารสกัดหยาบปิโตรเลียมอีเทอร์ ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล จากลำต้น ราก และใบของต้น *B. albostellata, B.greenii* และอังกาบหนู (*B. prionitis*) ต่อเชื้อ *Candida albicans* พบว่าสารสกัดหยาบปิโตรเลียมอีเทอร์และไดคลอโรมีเทน จากรากของต้น *B. albostellata* มีค่า MIC เท่ากับ 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน จากใบของต้น *B.greenii* มีค่า MIC เท่ากับ 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบจากทุกส่วนของต้นอังกาบหนู (*B. prionitis*) มีค่า MIC อยู่ในช่วง 2.34-6.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Amoo และคณะ, 2010)

จากรายงานการวิจัยทั้งหมด พบว่าในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion ป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ปฏิบัติได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และเป็นวิธีการตรวจสอบเพื่อใช้ในการประเมินผลของสารทดสอบเบื้องต้นว่าสารทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หรือไม่ ก่อนนำไปศึกษาในเบื้องลึกต่อไป ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วิธี paper disc diffusion ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

3.1.1.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Roswell Park Memorial Institue (RPMI-1640)
3.1.1.2 ซีรัม (fetal bovine serum: FBS)
3.1.1.3 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline: PBS)
3.1.1.4 เอนไซม์ทริปซิน (trypsin 0.25%)
3.1.1.5 ยาปฏิชีวนะ mitomycin C (2 มิลลิกรัมต่อขวด)
3.1.1.6 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide: DMSO): เกรดวิเคราะห์
3.1.1.7 สีย้อมทริปแพนบลู (trypan blue 0.4%)
3.1.1.8 สาร MTT (3-(4.5-Dimethylthaizolyl)-2.5-diphenyltetrazolium-bromide)
3.1.1.9 เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก แอซิด (ethylene diamine tetraactic acid: EDTA)
3.1.1.10 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (95% ethanol): เกรดวิเคราะห์
3.1.1.11 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hinton Broth (MHB)
3.1.1.12 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hinton Agar (MHA)
3.1.1.13 ยาปฏิชีวนะ gentamicin (80 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตรต่อขวด)
3.1.1.14 สารละลาย McFarland standard No. 0.5
3.1.1.15 สารละลายเฮกเซน (hexane): เกรดวิเคราะห์
3.1.1.16 สารละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane): เกรดวิเคราะห์
3.1.1.17 สารละลายเอทิล แอซิเตท (ethyl acetate): เกรดวิเคราะห์
3.1.1.18 สารละลายบิวทานอล (butanol): เกรดวิเคราะห์
3.1.1.19 สารละลายเมทานอล (methanol): เกรดการค้า
3.1.1.20 ซิลิกาเจล (silica gel)
3.1.1.21 ทรายทะเล (sea sand): เกรดวิเคราะห์
3.1.1.22 pre-coated TLC aluminium sheets of silica gel 60GF$_{254}$
3.1.1.23 สารละลาย anisaldehyde reagent (ภาคผนวก ข)

3.1.2 อุปกรณ์

3.1.2.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dishes)
3.1.2.2 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate)
3.1.2.3 ปากคีบ (forcep)
3.1.2.4 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
3.1.2.5 ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (sterile cotton swab)
3.1.2.6 เครื่องเขย่าอัติโนมัติ (shaker)

3.1.2.7 เครื่องกรองสารแบบลดความดัน (vaccum filter)
3.1.2.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectophotometer)
3.1.2.9 กระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 1
3.1.2.10 แผ่นดิสก์ (paper disc) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร
3.1.2.11 เครื่องระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator)
3.1.2.12 เครื่องดูดสารอัติโนมัติ (micro pipette)
3.1.2.13 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted light microscope)
3.1.2.14 กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
3.1.2.15 เครื่องให้ความร้อน (hot plate)
3.1.2.16 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (balance)
3.1.2.17 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge)
3.1.2.18 เครื่องผสมสาร (votex mixer)
3.1.2.19 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37 องศาเซลเซียส
3.1.2.20 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิและคาร์บอนไดออกไซด์ (incubator)
3.1.2.21 ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (laminar air flow)
3.1.2.22 ตู้ดูดควัน (potector laboratory hood)
3.1.2.23 ตู้เย็น (refrigerator)
3.1.2.24 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
3.1.2.25 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)
3.1.2.26 เครื่องดูด (suction)
3.1.2.27 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave)
3.1.2.28 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
3.1.2.29 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)
3.1.2.30 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (burner)
3.1.2.31 ชุดกรองสารและแผ่นกรอง (filter) ขนาด 0.22 และ 0.45 ไมโครเมตร
3.1.2.32 ฟลาสก์เพาะเลี้ยงเซลล์ (flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร
3.1.2.33 เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microtiter plate reader)
3.1.2.34 ขวด Duran ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
3.1.2.35 บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
3.1.2.36 กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
3.1.2.37 กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 10 มิลลิลิตร
3.1.2.38 ปิเปตแก้ว (pipette) ขนาด 5 มิลลิลิตร
3.1.2.39 หลอดทดลอง (test tube)
3.1.2.40 คอลัมน์แก้ว (column)
3.1.2.41 UV box ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร
3.1.2.42 ขาตั้งคอลัมน์ (stand) และที่จับ (clamp)
3.1.2.43 ขวดระเหย (evaporation flask)

3.2 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.1 ใบสังกรณีได้รับความอนุเคราะห์จากสวนพฤกษศาสตร์ภาคตะวันออก (เขาหินซ้อน) จังหวัดฉะเชิงเทรา

3.2.2 ใบอังกาบได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ที่มีแหล่งปลูกในจังหวัดกรุงเทพมหานคร

3.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (human colon adenocarcinoma cell line)

3.3.2 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (human breast carcinoma cell line)

3.3.3 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (human hepatocellular carcinoma cell line)

3.3.4 เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (oral human epidermal carcinoma cell line)

3.3.5 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนูชนิด P388 (murine leukemia cell line)

3.3.6 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa (cervical cancer cell line)

3.3.7 เซลล์ไตลิงชนิด Vero (african green monkey kidney cell line)

เซลล์ไลน์ชนิด HT-29, MCF-7, P388 และ Vero ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.พรทิพา พิชา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ และเซลล์ไลน์ HepG-2, KB และ HeLa ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.4.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

3.4.2 *Micrococcus luteus* ATCC 9341

3.4.3 *Staphylococcus aureus* TISTR 1466

3.4.4 *Escherichia coli* DMST 4212

3.4.5 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 สารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี

3.5.1.1 การเตรียมตัวอย่างใบอังกาบและสังกรณี

นำตัวอย่างใบอังกาบและสังกรณีมาล้างน้ำให้สะอาดเพื่อกำจัดเศษดินและแมลง รวมทั้งใบที่เน่าเสียออก แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน หรือจนกว่าใบพืชจะแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างใบพืชที่อบแห้งแล้วมาบดหยาบ และบันทึกน้ำหนักแห้ง

3.5.1.2 การสกัดสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี

นำตัวอย่างใบอังกาบและสังกรณีที่อบแห้งและบดหยาบแล้ว จำนวน 1 กิโลกรัม มาห่อด้วยผ้าขาวบาง ใส่ในขวดโหล สกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration) ดัดแปลงจากวิธีของ Beedessee และคณะ (2012) โดยหมักใบพืชด้วยตัวทำละลายเมทานอลในสภาวะเขย่าครั้งละ 7 วัน (ทำการสกัด 3 ครั้ง) เมื่อครบกำหนดนำสารละลายมากรองและระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ วิธีนี้จะเป็นการระเหยแห้งโดยการกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำและลดความดันจนเกือบเป็นสุญญากาศ จะได้เป็นสารสกัดหยาบเมทานอล จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ แล้วนำสารสกัดหยาบจำนวน 60 กรัม มาละลายน้ำแล้วสกัดต่อด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (liquid-liquid partitioning extraction) ดัดแปลงจากวิธีของ Beedessee และคณะ (2012) โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท และบิวทานอล ตามลำดับ จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (สารสกัดหยาบน้ำจะใช้วิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง) จะได้สารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท บิวทานอล และน้ำ ดังรูปที่ 3.1 นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

3.5.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี

3.5.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (human colon adenocarcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (human breast carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (human hepatocellular carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (oral human epidermal carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa (cervical cancer cell line) เซลล์ไตลิงชนิด Vero (african green monkey kidney cell line) ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ชนิดเกาะพื้นผิว (monolayer culture) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูชนิด P388 (murine leukemia cell line) ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ชนิดแขวนลอย (suspension culture) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ในอาหาร RPMI-1640 ที่มี fetal bovine serum (FBS) 8 เปอร์เซ็นต์ และยาปฏิชีวนะ gentamicin 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเซลล์ไลน์มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นจะต้องทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเพื่อการคงอยู่ของเซลล์ไลน์ หรือทำการถ่ายเซลล์ (subculture) เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์ โดยมีวิธีดังนี้ เซลล์ไลน์ชนิดเกาะพื้นผิว จะทำการถ่ายเซลล์ไลน์ โดยดูดอาหารเก่าออก แล้วล้างฟลาสก์เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ด้วยสารละลาย PBS ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเป็นกลาง ปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร โดยการกลั้ว ฟลาสก์เพาะเลี้ยงเซลล์ไปมา เพื่อล้างเศษเซลล์และอาหารเก่าออก ดูด PBS ทิ้ง เติมเอนไซม์ทริปซินที่มีความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 0.30-2 นาที ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ไลน์ นำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเซลล์ไลน์เริ่มหลุดออกจากพื้นผิวที่ยึดเกาะสังเกตได้จากเซลล์ไลน์จะมีลักษณะกลมขึ้น ให้ดูดทริปซินออก แล้วเติมอาหาร RPMI-1640 ที่มี FBS 8 เปอร์เซ็นต์ แล้วกลั้วฟลาสก์เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ไปมาเพื่อเป็นการหยุดการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน จากนั้นเคาะ ฟลาสก์เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์เบาๆ หรือใช้ปิเปตดูดพ่นเบาๆ ให้เซลล์ไลน์หลุดลอยออกจากการยึดเกาะกับผิวฟลาสก์เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ แล้วดูดอาหารออกโดยเหลือเซลล์ไลน์ไว้ในฟลาสก์เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ประมาณ 0.50 มิลลิลิตร หรือดูจากความหนาแน่นของเซลล์ไลน์ที่เหลืออยู่ แล้วเติมอาหาร RPMI-1640 ปริมาตร 4.50 มิลลิลิตร สำหรับเซลล์ไลน์ชนิดแขวนลอยจะทำ

การเปลี่ยนถ่ายอาหารโดยการดูดอาหารเก่าออก โดยให้เหลือเซลล์ไลน์ไว้ในฟลาสก์เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ประมาณ 0.50 มิลลิลิตร หรือดูจากความหนาแน่นของเซลล์ไลน์ แล้วเติมอาหาร RPMI-1640 ปริมาตร 4.50 มิลลิลิตร

3.5.2.2 การปลูกเซลล์

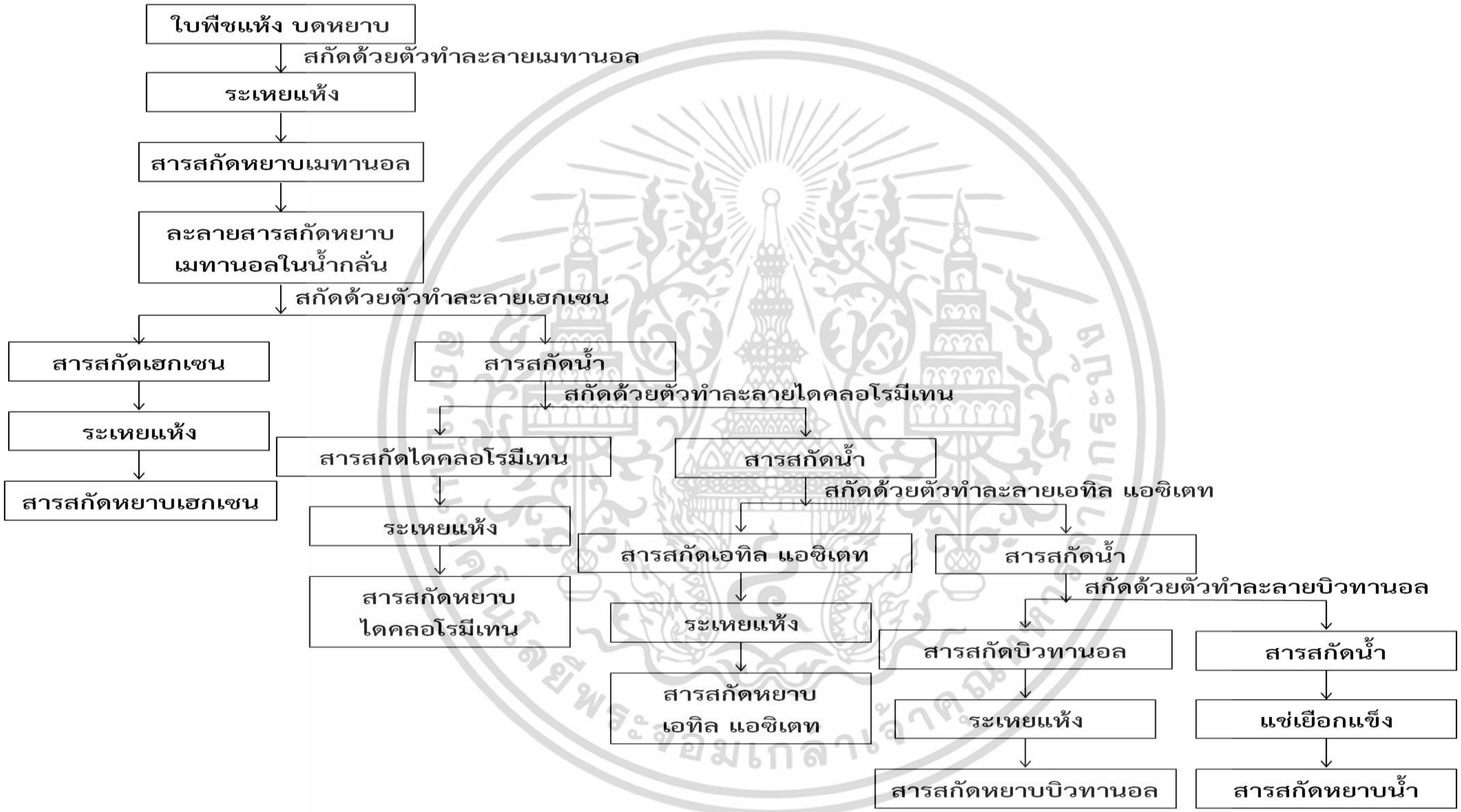
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี ด้วยวิธี MTT colorimetric ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Mosmann (1983) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ในอาหาร RPMI-1640 ที่มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการถ่ายเซลล์ไลน์ตามวิธีในข้อ 3.5.2.1 แล้วนับเซลล์ไลน์ด้วยวิธีทริปแพนบลู (ภาคผนวก ข) เริ่มต้นปลูกเซลล์ไลน์ P388, HT-29, MCF-7 และ HeLa จำนวน 1x10^{5} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์ไลน์ HepG-2, KB และ Vero จำนวน 1.5 x10^{5} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.2.3 การเตรียมสารละลาย mitomycin C (MMC)

เตรียมสารละลาย MMC เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 25.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำมาใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) โดยนำสาร MMC ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 400.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วยอาหาร RPMI-1640 ที่มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปหยอดใส่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมที่ได้ปลูกเซลล์ไว้แล้วจนครบ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ) หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

3.5.2.4 การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณีสำหรับใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

ชั่งสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท บิวทานอล และน้ำ ปริมาณ 200.00 มิลลิกรัม ละลายใน DMSO 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 20.00 มิลลิกรัม-ต่อมิลลิลิตร ที่มี DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ และเจือจางด้วยอาหาร RPMI-1640 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารในหลุมทดสอบ เท่ากับ 25.00, 62.50, 125.00, 250.00, 500.00 และ 1.000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สาร MMC ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบ เท่ากับ 25.00 ไมโครกรัม-ต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) และใช้ DMSO ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) นำสารสกัดในแต่ละความเข้มข้น ชุดควบคุมเชิงบวกและชุดควบคุมเชิงลบ หยอดใส่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่ได้ปลูกเซลล์ไว้แล้วจนครบ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง


ใบพืชแห้ง บดหยาบ
สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล
ระเหยแห้ง
สารสกัดหยาบเมทานอล
ละลายสารสกัดหยาบเมทานอลในน้ำกลั่น
สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน
สารสกัดเฮกเซน
สารสกัดน้ำ
ระเหยแห้ง
สารสกัดหยาบเฮกเซน
สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน
สารสกัดไดคลอโรมีเทน
สารสกัดน้ำ
ระเหยแห้ง
สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน
สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล แอซิเตท
สารสกัดเอทิล แอซิเตท
สารสกัดน้ำ
ระเหยแห้ง
สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตท
สกัดด้วยตัวทำละลายบิวทานอล
สารสกัดบิวทานอล
สารสกัดน้ำ
ระเหยแห้ง
แช่เยือกแข็ง
สารสกัดหยาบบิวทานอล
สารสกัดหยาบน้ำ

รูปที่ 3.1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี

3.5.2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ด้วยวิธี MTT

นำเซลล์ไลน์ที่บ่มร่วมกับสารทดสอบในข้อ 3.5.2.4 จนครบเวลา 20 ชั่วโมง มาเติมสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ดูดเอาสารละลายทั้งหมดในหลุมทดสอบออก เติมสารละลาย DMSO ต่อเอทานอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ (% cytotoxicity) และหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50}) ด้วยโปรแกรม Graphpad prism 5

3.5.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

3.5.3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด คือ *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* TISTR 1466 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *E. coli* DMST 4212 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 นำแบคทีเรียมาขีด (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) เพื่อแยกเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปเปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.5 McFarland standard (ภาคผนวก ข)

3.5.3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณีสำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

เตรียมสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท บิวทานอล และน้ำ โดยละลายในตัวทำละลายเมทานอล และเจือจางทีละสองเท่า (2-fold dilution) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ หยอดสารสกัดที่ได้ลงบนแผ่นดิสก์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6.00 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้สารละลายเมทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง

3.5.3.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Ansari และคณะ (2005) โดยใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มในแบคทีเรียที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 3.5.3.1 แล้วป้าย (swab) ให้ทั่วบนผิวอาหารแข็ง MHA ให้เชื้อแบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง จากนั้นนำแผ่นดิสก์ที่หยอดสารแล้วในข้อ 3.5.3.2 วางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยให้สารสกัดที่ต้องการทดสอบ ตัวควบคุมเชิงบวก และตัวควบคุมเชิงลบอยู่ในจานเดียวกัน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยวัดจากขนาดของเส้นผ่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลองโดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

3.5.4 การหาระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography: TLC) บนแผ่น aluminium sheet silica gel F_{254} หรือแผ่น TLC ดัดแปลงจากวิธีของ Meyer และคณะ (2007) โดยตัดแผ่น TLC ให้มีขนาด 2x5 เซนติเมตร ขีดเส้นจากปลายขอบบนและขอบล่างของแผ่น TLC ด้วยดินสอ เพื่อหาระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ จากนั้นหยดสารที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น TLC ด้วยหลอด capillary ทดสอบอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มจากใช้สารละลายที่มีขั้วต่างกัน 2 ชนิด ในอัตราส่วน 50: 50 แล้วจึงลดหรือเพิ่มสารละลายชนิดต่างๆ ขึ้นอยู่กับการแยกสารในแผ่น TLC ยกตัวอย่างเช่น หากต้องแยกสารสกัดหยาบเฮกเซน ซึ่งสารนี้ส่วนใหญ่จะไม่มีขั้วหรือมีขั้วต่ำมาก ดังนั้นตัวทำละลายที่ใช้จึงควรมีขั้วต่ำ เช่น ตัวทำละลายเฮกเซนกับเอทิล แอซิเตท เป็นต้น และเตรียม TLC แทงค์ โดยวางกระดาษกรองไว้ด้านในและปิดให้สนิทเพื่อให้แทงค์อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายที่เตรียมไว้ แล้วจึงจุ่มแผ่น TLC ที่จุดสารที่ต้องการทดสอบแล้วลงในแทงค์ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่มาถึงเส้นที่กำหนดไว้ (รูปที่ 3.2)

รูปที่ 3.2 แสดงการวางแผ่น TLC ที่หยดสารทดสอบแล้ว ในแทงค์ของระบบตัวทำละลาย

ในกรณีที่สารปรากฏเป็นทางยาวจะใช้บิวทานอล 2-3 หยด ผสมในตัวทำละลายเพื่อช่วยให้เกิดการแยกสารดียิ่งขึ้น หรือทำการเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลาย (นรศิษฐ์ และคณะ, 2545) ผลการทดลองที่เกิดขึ้นจะแสดงว่าสารที่แยกได้เป็นอย่างไร ถ้าสามารถแยกเห็นเป็นจุดอย่างชัดเจน แสดงว่าอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ผสมใน TLC แทงค์ เป็นระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยตรวจสอบได้จากการนำแผ่น TLC มาทดสอบการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร บันทึกผลการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต แล้วนำแผ่น TLC มาย้อมด้วยสารที่ทำให้เกิดสีเฉพาะตัว ในที่นี้ใช้สาร anisaldehyde reagent (ภาคผนวก ข) โดยวางแผ่น TLC ไว้บนกระจก แล้วใช้สำลีชุบสาร anisaldehyde reagent มาป้ายให้ทั่วแผ่น TLC แล้วนำไปวางในแผ่นให้ความร้อน (hot plate) ที่อุณหภูมิประมาณ 110 องศาเซลเซียส (อุทัย และคณะ, 2556) สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี แล้วบันทึกผลการเกิดสี เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วก็สามารถ

นำมาใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ต่อไป

3.5.5 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Smyth และคณะ (2012) เตรียมคอลัมน์โดยใช้ขาตั้ง และที่จับยึดคอลัมน์ให้ตั้งฉากกับพื้น แล้วบรรจุคอลัมน์แบบ slurry โดยทำซิลิกาเจลให้เป็นของเหลวข้นในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำสุดในระบบตัวทำละลาย ใช้สำลีที่ชุ่มด้วยตัวทำละลายอุดที่ปลายคอลัมน์ แล้วเทซิลิกาเจลเหลวข้นที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์ (ในขั้นตอนนี้ควรระวังไม่ให้เกิดรอยแตกหรือฟองอากาศเกิดขึ้นภายในคอลัมน์) ทำการปรับผิวหน้าของซิลิกาเจลให้เรียบและแน่นโดยใส่ทรายทะเล (sea sand) ลงไป (รูปที่ 3.3ก) จากนั้นชั่งน้ำหนักสารที่ต้องการแยก นำมาละลายในตัวทำละลายเมทานอลเพียงเล็กน้อย เติมซิลิกาเจลลงไปคลุกให้เข้ากัน รอให้ตัวทำละลายระเหย โดยตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เมื่อสารละลายระเหยออกหมดแล้วให้เทซิลิกาเจลที่คลุกสารสกัดแล้วลงในคอลัมน์ ใช้ตัวทำละลายชะข้างๆ คอลัมน์ให้สะอาด โดยให้เหลือสารละลายอยู่เหนือสารสกัดให้น้อยที่สุด (รูปที่ 3.3ข) เริ่มทำการเก็บสารส่วนย่อยใส่หลอดทดลอง (รูปที่ 3.3ค) โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยที่สุด ประมาณ 100 มิลลิลิตร เป็นตัวชะคอลัมน์ก่อนแล้วเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายทีละน้อยอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้สารที่ต้องการออกจากคอลัมน์ประมาณครึ่งหลอดทดลอง (รูปที่ 3.3ง) พร้อมจดหมายเลขและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้ เพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี แล้วรวบรวมสารส่วนย่อยที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันไว้ด้วยกัน จะได้เป็นสารส่วนย่อยต่างๆ (รูปที่ 3.3จ) แล้วทำการระเหยแห้ง เพื่อนำมาทดสอบทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ตามวิธีในข้อ 3.5.2 และ 3.5.3 ซึ่งการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จะใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบ เท่ากับ 62.50, 25.00, 50.00, 100.00 และ 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะทำการทดสอบที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์

รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี ก) การปรับผิวหน้าผิวของซิลิกาเจลด้วยทรายทะเล ข) บรรจุสารสกัดที่คลุกซิลิกาเจลลงคอลัมน์ ค) เก็บสารส่วนย่อยใส่หลอดทดลอง ง) ปริมาณสารส่วนย่อยในหลอดทดลอง จ) สารส่วนย่อยต่างๆ

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี

นำใบอังกาบ (*B. cristata*) และสังกรณี (*B. strigosa*) ที่มีน้ำหนักแห้ง 1.00 กิโลกรัม มาสกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration) กับตัวทำละลายเมทานอล นำไปประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ สารสกัดหยาบจากพืชทั้งสองชนิดมีลักษณะเป็นสารสีเขียว หนืด คล้ายไขมัน และมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 67.10 และ 82.35 กรัม ซึ่งคิดเป็นปริมาณผลผลิตร้อยละ 6.71 และ 8.24 ของน้ำหนักใบพืชแห้ง ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Ata และคณะ (2008) ทำการสกัดสารจากใบอังกาบหนู (*B. prionitis*) ที่มีน้ำหนักแห้ง 2.20 กิโลกรัม โดยหมักใบพืชกับตัวทำละลายเอทานอล ได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเป็นสารหนืด และมีน้ำหนัก 72.50 กรัม คิดเป็นปริมาณผลผลิตร้อยละ 3.30 ของน้ำหนักแห้ง และยังมีงานวิจัยของ Yadav และคณะ (2012) ทำการสกัดสารจากใบ *B. noctiflora* ที่มีน้ำหนักแห้ง 100 กรัม โดยการหมักใบพืชกับตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบที่มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 12.00 และ 8.00 กรัม คิดเป็นปริมาณผลผลิตร้อยละ 12.00 และ 8.00 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าพืชต่างชนิดกัน ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่างกัน ทำให้ได้ปริมาณสารสกัดหยาบในปริมาณที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่ใช้และคุณสมบัติของสารในพืชที่ต้องการสกัด เพราะตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความสามารถในการสกัดสารได้แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า วิธีการหมัก เป็นวิธีที่มักนิยมนำมาใช้ในการสกัดสารสำคัญจากพืช เนื่องจากเป็นวิธีการสกัดที่ง่าย ประหยัด และไม่มีการใช้ความร้อน จึงเหมาะสมในการนำมาสกัดพืชที่ไม่ทนต่อความร้อน (ยุวดี, 2548) จากนั้นนำสารสกัดหยาบของพืชทั้งสองชนิด จำนวน 60 กรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วสกัดต่อด้วยวิธี liquid-liquid partitioning extraction โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท และบิวทานอล ตามลำดับ นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ส่วนสารสกัดน้ำจะทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็ง จะได้สารสกัดหยาบจำนวน 5 ชนิด ที่มีปริมาณน้ำหนักแห้ง ปริมาณผลผลิตร้อยละเทียบกับน้ำหนักแห้ง และลักษณะของสารสกัดหยาบ ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณน้ำหนักแห้ง ปริมาณผลผลิตร้อยละเทียบกับน้ำหนักแห้ง และลักษณะของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณีทั้ง 5 ชนิด

สารสกัดหยาบ	น้ำหนักแห้ง (กรัม)		ปริมาณผลผลิตร้อยละ		ลักษณะ
	ใบอังกาบ	ใบสังกรณี	ใบอังกาบ	ใบสังกรณี	
เฮกเซน	40.06	43.55	66.68	72.58	สารสีเขียว หนืด คล้ายไขมัน
ไดคลอโรมีเทน	0.24	0.34	0.40	0.57	สารสีเขียว หนืด
เอทิล แอซิเตท	0.25	0.35	0.42	0.58	สารสีเขียว หนืด
บิวทานอล	15.08	13.04	25.13	21.73	สารสีน้ำตาลเข้ม หนืด
น้ำ	3.36	2.00	5.60	3.33	สารสีน้ำตาลอ่อน แห้งเป็นผง

จากตารางที่ 4.1 พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบอังกาบและสังกรณีมีปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 40.06 และ 43.55 กรัม คิดเป็นปริมาณผลผลิตร้อยละ 66.68 และ 72.58 ตามลำดับ ซึ่งมีลักษณะเป็นสารสีเขียว หนืด คล้ายไขมัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากใบอังกาบและสังกรณีเป็นพืชที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารที่มีขั้วต่ำเป็นจำนวนมาก จึงทำให้สารสกัดหยาบเฮกเซนมีน้ำหนักมากที่สุด เพราะตัวทำละลายเฮกเซนเป็นสารที่มีความเป็นขั้วต่ำ จะสามารถสกัดเอาสารที่ไม่มีขั้วหรือมีความเป็นขั้วต่ำเหมือนกันออกมาจากพืชได้ เช่นเดียวกันกับสารสกัดหยาบบิวทานอลที่มีความเป็นขั้วสูง มีลักษณะเป็นสารสีน้ำตาลเข้ม หนืด และมีปริมาณมากรองลงมาจากสารสกัดหยาบเฮกเซน ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 15.08 และ 13.04 กรัม คิดเป็นปริมาณผลผลิตร้อยละ 25.13 และ 21.73 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบอื่นๆ มีปริมาณของสารสกัดหยาบเพียงเล็กน้อย จึงอาจกล่าวได้ว่า ใบอังกาบและสังกรณีเป็นพืชที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารที่มีความเป็นขั้วต่ำและขั้วสูง โดยมีสารที่มีความเป็นขั้วปานกลางหรือสารกึ่งมีขั้วเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อได้สารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณีทั้ง 5 ชนิดแล้ว จึงนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ด้วยวิธี MTT colorimetric และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion ซึ่งได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณีทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท บิวทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 62.50, 125.00, 250.00, 500.00 และ 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์ 7 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (human colon adenocarcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (human breast carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (human hepatocellular carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (oral human epidermal carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนูชนิด P388 (murine leukemia cell line) เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa (cervical cancer cell line) และเซลล์ไตลิงชนิด Vero (african green monkey kidney cell line) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบกับสารสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ด้วยวิธี MTT colorimetric วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในแต่ละความเข้มข้น คำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50}) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Priam 5.0 หากสารสกัดหยาบที่ทำการทดสอบแสดงค่า CC_{50} ในระดับต่ำ หมายความว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์สูง แสดงว่าสารสกัดหยาบนั้นน่าจะมีสารสำคัญที่มีส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ได้ จึงนำสารสกัดหยาบในชั้นที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มากที่สุดไปทำการศึกษาต่อไป และในการศึกษาครั้งนี้ใช้สาร mitomycin C (MMC) ที่ความเข้มข้น 25.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวก จึงได้ทดสอบความเป็นพิษของสาร MMC ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิดก่อน เพื่อทดสอบว่าสาร MMC ที่ความเข้มข้น 25.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิดมากน้อยเพียงใด หากมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ คือมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ควรทำการศึกษาเพิ่มโดยเพิ่มความเข้มข้นของสาร MMC ที่ใช้ทดสอบ และใช้สารละลาย DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุมเชิงลบ เนื่องจากได้นำสารละลาย DMSO มาใช้ในการละลายสารสกัด

หยาบก่อนนำมาทำการทดลอง ซึ่งได้ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด ดังรายละเอียดต่อไปนี้

4.2.1 การทดสอบความเป็นพิษของสาร mitomycin C

งานวิจัยนี้เลือกใช้สาร MMC เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) จึงทำการทดสอบความเป็นพิษของสาร MMC ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบ เท่ากับ 25.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์ 7 ชนิด ได้แก่ เซลล์ไลน์ HT-29, MCF-7, HepG-2, KB, P388, HeLa และ Vero โดยทำการบ่มเซลล์ไลน์ร่วมกับสาร MMC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี MTT colorimetric เพื่อหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิด และนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดมาเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Tange Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่ามีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้สาร MMC ที่ความเข้มข้น 25.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวกในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสาร mitomycin C ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ

เซลล์ไลน์	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ (เปอร์เซ็นต์) ± SE
HT-29	59.54^{e} ±0.78
MCF-7	64.88^{d} ±0.70
HepG-2	77.28^{b} ±0.89
KB	83.63^{a} ±1.53
P388	75.92^{b} ±1.10
HeLa	71.69^{c} ±1.12
Vero	63.32^{d} ±0.81

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

SE = standard error

4.2.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท บิวทานอล และน้ำ จากใบอังกาบ ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 62.50, 125.00, 250.00, 500.00 และ 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยบ่มเซลล์ไลน์ร่วมกับสารสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้สาร MMC ที่ความเข้มข้น 25.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้สารละลาย DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุมเชิงลบ แล้วนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ คือ 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลการทดลองดังนี้

สารสกัดหยาบเฮกเซนมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบในระดับต่ำ สังเกตจากค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มีค่าไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์

(ตารางที่ 4.3) จึงทำให้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากกว่า 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4)

สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด เท่ากับ 66.62 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ KB และ Vero ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 58.50 และ 51.61 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ไลน์ MCF-7, HT-29 และ HeLa มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 56.21, 58.47 และ 53.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์ HepG-2 มีค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ เท่ากับ 45.87 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3) และมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ P388, KB, Vero, MCF-7, HT-29 และ HeLa เท่ากับ 462.38, 876.32, 974.31, 887.05, 927.83 และ 942.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ไลน์ HepG-2 มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4)

สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตทมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388, MCF-7 และ HT-29 มากที่สุดซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 73.02, 82.70 และ 88.28 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ HeLa และ Vero มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 58.64 และ 83.77 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์ไลน์ KB และ HepG-2 มีค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.3) และมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ P388, MCF-7, HT-29, HeLa และ Vero เท่ากับ 187.24, 224.87, 218.50, 771.47 และ 397.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ไลน์ KB และ HepG-2 มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4)

สารสกัดหยาบบิวทานอลมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 และ HT-29 มากที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 96.23 และ 94.28 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ KB, MCF-7, HeLa และ Vero มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 89.16, 79.59, 75.84 และ 78.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์ HepG-2 มีค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.3) และมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ P388, HT-29, KB, MCF-7, HeLa และ Vero เท่ากับ 48.33, 39.74, 70.74, 70.45, 111.68 และ 336.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ไลน์ HepG-2 มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4)

และสารสกัดหยาบน้ำมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบในระดับต่ำ สังเกตจากค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มีค่าไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3) จึงทำให้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากกว่า 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด

เซลล์ไลน์	**ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ± SE**				
	เฮกเซน	**ไดคลอโรมีเทน**	**เอทิล แอซิเตท**	**บิวทานอล**	**น้ำ**
HT-29	49.45^{a}±0.14	58.47^{cde}±0.59	88.28^{a}±1.50	94.28^{a}±2.27	18.94^{abc}±0.67
MCF-7	33.49^{a}±7.61	56.21^{abc}±14.02	82.70^{a}±2.10	79.59^{bc}±7.35	25.00^{a}±8.28
HepG-2	41.32^{a}±9.12	45.87^{e}±13.17	29.45^{c}±2.45	43.67^{e}±11.69	15.37^{cd}±2.23
KB	27.12^{a}±12.65	58.50^{ab}±2.40	44.63^{bc}±16.41	89.16^{ab}±2.89	24.68^{ab}±3.59
P388	26.24^{a}±13.34	66.62^{a}±10.38	73.02^{a}±7.88	96.23^{a}±1.48	20.93^{d}±8.34
HeLa	34.48^{a}±7.76	53.79^{de}±9.98	58.64^{b}±0.99	75.84^{cd}±5.19	26.85^{bcd}±3.02
Vero	34.48^{a}±9.17	51.61^{ab}±6.39	83.77^{b}±2.24	78.61^{d}±8.86	13.99^{bcd}±8.17

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

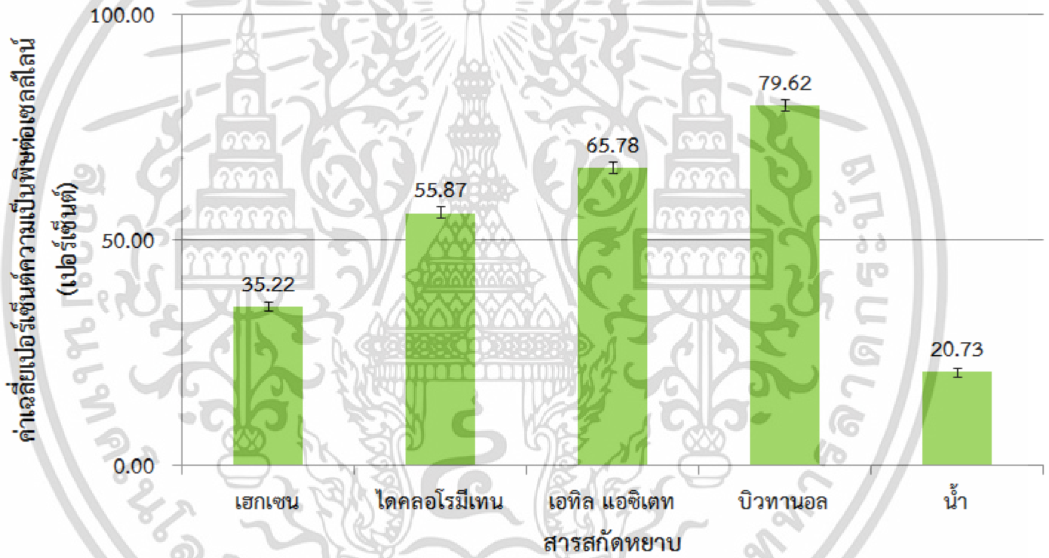
SE = standard error

ตารางที่ 4.4 แสดงระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบทั้ง 5 ชนิด ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์

เซลล์ไลน์	**ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**				
	เฮกเซน	**ไดคลอโรมีเทน**	**เอทิล แอซิเตท**	**บิวทานอล**	**น้ำ**
HT-29	>1,000.00.	927.83	218.50	39.74	>1,000.00
MCF-7	>1,000.00	887.05	224.87	70.45	>1,000.00
HepG-2	>1,000.00	>1,000.00	>1,000.00	>1,000.00	>1,000.00
KB	>1,000.00	876.32	>1,000.00	70.74	>1,000.00
P388	>1,000.00	462.38	187.24	48.33	>1,000.00
HeLa	>1,000.00	942.84	771.47	111.68	>1,000.00
Vero	>1,000.00	974.31	397.28	336.04	>1,000.00

หมายเหตุ >1,000.00 หมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดมีค่ามากกว่า 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบ 5 ชนิดจากใบอังกาบที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิดมาเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มากที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตท และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบเฮกเซนและน้ำ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4.1 และภาคผนวก ง) จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลอาจมีสารสำคัญที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งมีลักษณะเป็นสารสีน้ำตาลเข้ม หนืด และมีความเป็นขั้วสูง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดทั้ง 5 ชนิดจากใบอังกาบไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HepG-2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งตับอีกด้วย ดังนั้นหากต้องการนำสารสกัดจากใบอังกาบไปใช้ในการพัฒนาต่อเป็นยารักษามะเร็ง จะไม่สามารถใช้ในการรักษาโรคมะเร็งตับได้ แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นยังควรมีการทดลองในสัตว์ทดลองต่อไป และที่สำคัญสารสกัดหยาบจากใบอังกาบยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ปกติที่ใช้ในการทดสอบด้วย คือ เซลล์ไตลิงชนิด Vero



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบทั้ง 5 ชนิด ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด

4.2.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท บิวทานอล และน้ำ จากใบสังกรณี ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 62.50, 125.00, 250.00, 500.00 และ 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยบ่มเซลล์ไลน์ร่วมกับสารสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้สาร MMC ที่ความเข้มข้น 25.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้สารละลาย DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุมเชิงลบ แล้วนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ คือ 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลการทดลองดังนี้

สารสกัดหยาบเฮกเซนมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ HepG-2 และ MCF-7 มากที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 52.37 และ 41.24 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์ไลน์อื่นๆ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.5) และมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ HepG-2 เท่ากับ 937.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ไลน์อื่นๆ มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.6)

สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด เท่ากับ 89.74 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ MCF-7 และ Vero ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 51.27 และ 42.84 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ไลน์ HepG-2, KB, HT-29 และ HeLa มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.5) และมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ P388 และ MCF-7 เท่ากับ 686.32 และ 896.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ไลน์อื่นๆ มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.6)

สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตทมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด เท่ากับ 55.72 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ไลน์ MCF-7, Vero, HepG-2, KB, HeLa, HT-29 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.5) และมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ P388 เท่ากับ 900.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ไลน์อื่นๆ มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.6)

สารสกัดหยาบบิวทานอลมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด เท่ากับ 90.78 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ HT-29, MCF-7, KB และ HeLa มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 53.61, 60.85, 70.27 และ 62.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์ HepG-2 และ Vero มีค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.5) และมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ P388, HT-29, MCF-7, KB และ HeLa เท่ากับ 216.50, 906.25, 484.74, 588.61 และ 894.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ไลน์ HepG-2 และ Vero มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.6)

และสารสกัดหยาบน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด พบว่ามีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.5) จึงทำให้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากกว่า 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด

เซลล์ไลน์	**ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี± SE**				
	เฮกเซน	**ไดคลอโรมีเทน**	**เอทิล แอซิเตท**	**บิวทานอล**	**น้ำ**
HT-29	6.05^{d}±5.50	13.03^{d}±4.91	28.20^{c}±3.55	53.61^{b}±3.55	19.23^{ab}±5.30
MCF-7	41.24^{a}±7.60	51.27^{b}±5.39	37.40^{ab}±4.70	60.85^{b}±11.68	16.39^{c}±0.88
HepG-2	52.37^{a}±11.30	32.22^{c}±12.41	25.44^{bc}±10.46	18.59^{c}±3.64	17.83^{abc}±7.69
KB	23.03^{bc}±12.75	33.68^{c}±1.55	46.10^{bc}±8.07	70.27^{b}±0.25	19.57^{abc}±3.45
P388	28.81^{bc}±5.86	89.74^{a}±5.79	55.72^{a}±9.70	90.78^{a}±0.26	15.08^{bc}±2.50
HeLa	7.69^{cd}±3.58	11.65^{d}±3.90	17.12^{bc}±0.87	62.59^{b}±8.37	22.94^{ab}±5.29
Vero	29.09^{b}±7.29	42.84^{b}±4.56	21.59^{abc}±9.92	48.52^{c}±7.84	16.30^{a}±5.96

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

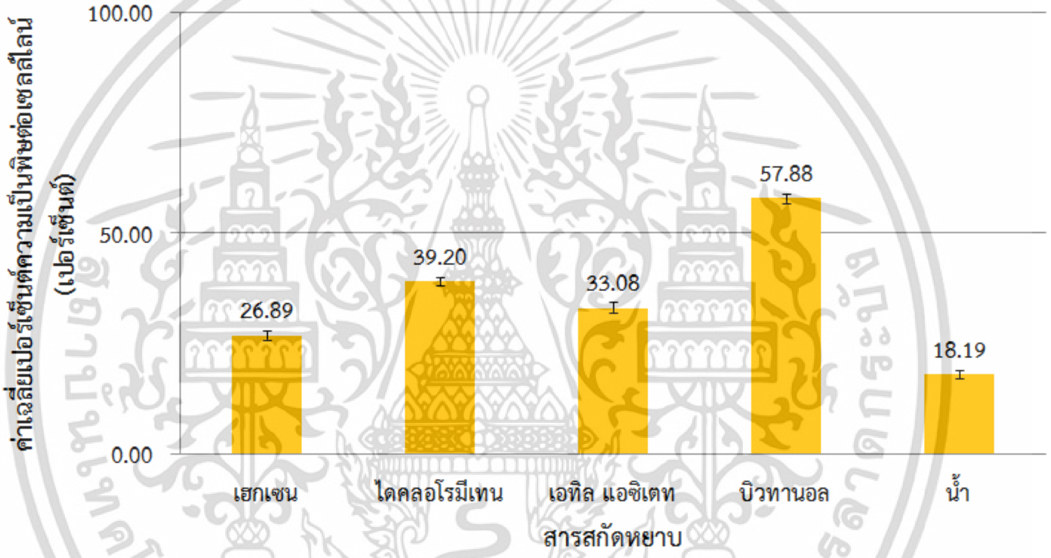
SE = standard error

ตารางที่ 4.6 แสดงระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีทั้ง 5 ชนิด ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์

เซลล์ไลน์	**ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**				
	เฮกเซน	**ไดคลอโรมีเทน**	**เอทิล แอซิเตท**	**บิวทานอล**	**น้ำ**
HT-29	>1,000.00	>1,000.00	>1,000.00	906.25	>1,000.00
MCF-7	>1,000.00	896.51	>1,000.00	484.74	>1,000.00
HepG-2	937.10	>1,000.00	>1,000.00	>1,000.00	>1,000.00
KB	>1,000.00	>1,000.00	>1,000.00	588.61	>1,000.00
P388	>1,000.00	686.32	900.63	216.50	>1,000.00
HeLa	>1,000.00	>1,000.00	>1,000.00	894.27	>1,000.00
Vero	>1,000.00	>1,000.00	>1,000.00	>1,000.00	>1,000.00

หมายเหตุ >1,000.00 หมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดมีค่ามากกว่า 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

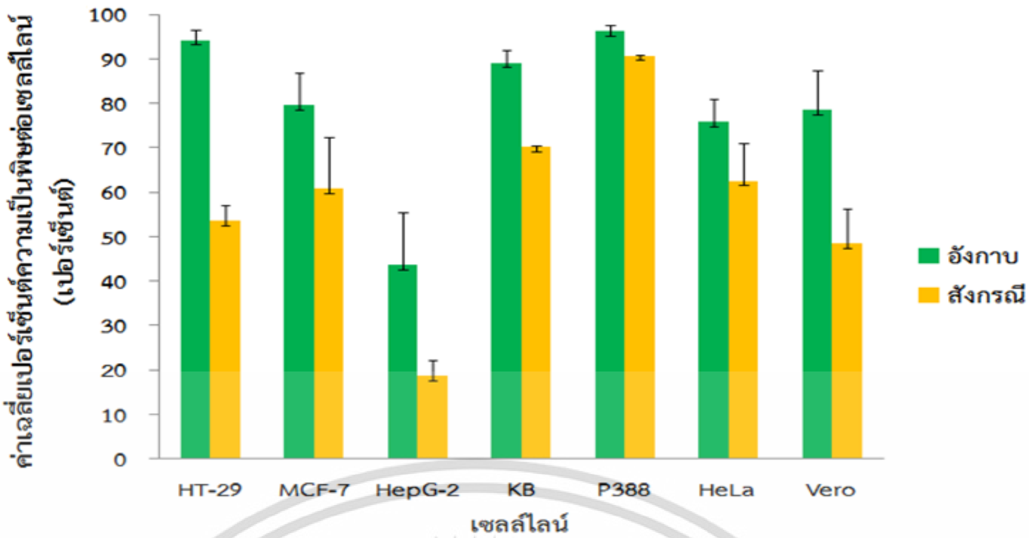
จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิดจากใบสังกรณีที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มาเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มากที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน และสารสกัดหยาบเอทิล-แอซิเตต และเฮกเซน มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสารสกัดหยาบน้ำมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยที่สุด (รูปที่ 4.2 และภาคผนวก ง) จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลอาจมีสารสำคัญที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ ซึ่งมีลักษณะเป็นสารหนืดสีน้ำตาลเข้มและมีความเป็นขั้วสูง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดทั้ง 5 ชนิดจากใบสังกรณีไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด Vero ซึ่งเป็นเซลล์ไตลิงปกติ ดังนั้นจึงอาจจะนำสารสกัดจากใบสังกรณีไปพัฒนาต่อเป็นยารักษามะเร็งได้ แต่อาจต้องใช้ในระดับความเข้มข้นที่สูงและต้องมีการทดลองในสัตว์ทดลองต่อไป



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีทั้ง 5 ชนิด ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด

4.2.4 ผลการเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท บิวทานอล และน้ำ จากใบอังกาบและสังกรณี พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลของพืชทั้ง 2 ชนิด มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ทดสอบมากกว่าสารสกัดหยาบชนิดอื่นๆ จึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ระดับความเข้มข้น 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณี ดังรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบมากกว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณี



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด ที่ความเข้มข้นสูงสุด 1,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าสารสำคัญจากใบอังกาบและสังกรณีที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ เป็นสารที่มีความเป็นขั้วสูง สามารถสกัดได้โดยใช้ตัวทำละลายบิวทานอล หรือตัวทำละลายอื่นที่มีความเป็นขั้วสูง และเพื่อให้ผลที่ครอบคลุมทั้งการรักษาโรคมะเร็งและการต้านเชื้อแบคทีเรีย งานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิด จากใบอังกาบและสังกรณีด้วย เนื่องจากผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งอาจมีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียต่ำ ดังนั้นการใช้ยาเพื่อรักษาโรคมะเร็งจึงควรมีสรรพคุณในการต้านทานต่อแบคทีเรียได้ด้วยเช่นกัน (ประสาทพร และคณะ, 2551) ดังผลการทดลองต่อไปนี้

4.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท บิวทานอล และน้ำ จากใบอังกาบและสังกรณีที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ 5 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่เป็นสาเหตุของโรคที่เกิดในมนุษย์ โดยใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin ที่ความเข้มข้น 1.00 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นชุดควบคุมเชิงบวก และเนื่องจากสารละลายเมทานอลถูกใช้เป็นตัวทำละลายของสารสกัดทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ จึงถูกใช้เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และทำการทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น ซึ่งผลการทดลองเป็นดังนี้

4.3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบอังกาบ

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ของสารสกัดหยาบ 5 ชนิดจากใบอังกาบที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 และ 20.00

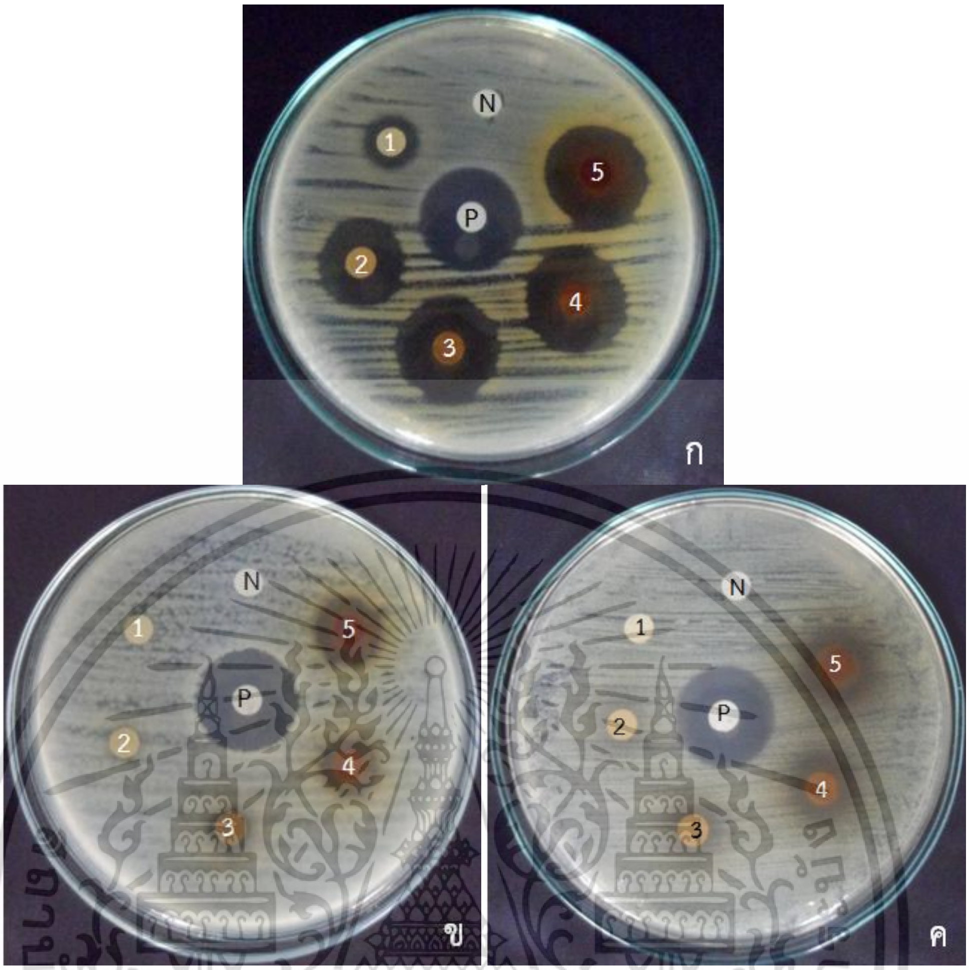
มิลลิกรัมต่อดิสก์ ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ คือ เชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *M. luteus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยผลของสารสกัดหยาบบิวทานอลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.48, 16.00, 18.50, 20.03 และ 21.81 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.4ก) ผลของสารสกัดหยาบบิวทานอลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 2.50, 5.00, 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 14.21, 11.31, 9.25 และ 7.66 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.4ข) และเชื้อ *M. luteus* ที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.00 และ 11.09 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.4ค) ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบแสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบ

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อดิสก์)	**ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (มิลลิเมตร) ± SE**		
	S. aureus	*M. luteus*	*B. subtilis*
1.25	10.48^{d} ±0.95	6.00^{b} ±0.00	6.00^{d} ±0.00
2.50	16.00^{c} ±1.32	6.00^{b} ±0.00	7.66^{c} ±0.23
5.00	18.50^{bc} ±0.76	6.00^{b} ±0.00	9.25^{bc} ±0.58
10.00	20.03^{ab} ±0.15	10.00^{a} ±0.90	11.31^{b} ±0.57
20.00	21.81^{a} ±0.89	11.09^{a} ±1.36	14.21^{a} ±1.31

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

SE = standard error

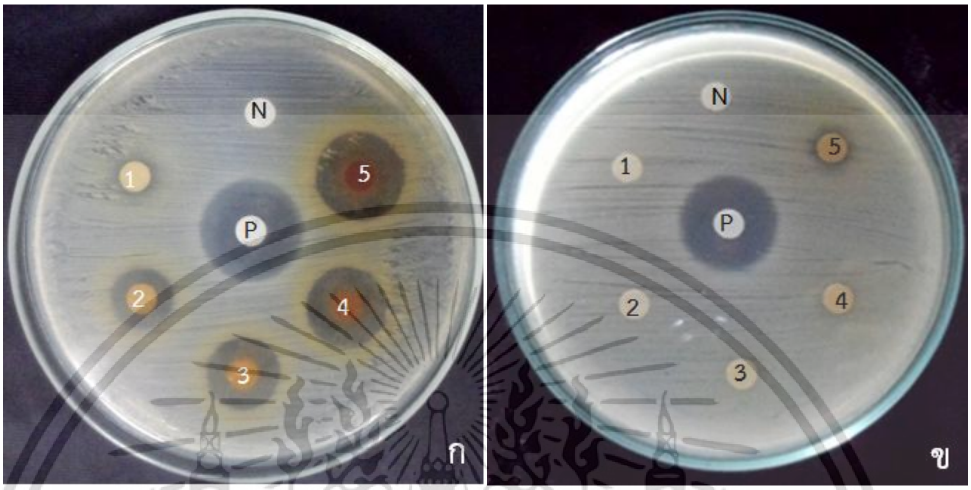


รูปที่ 4.4 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบต่อเชื้อ ก) *S. aureus* ข) *B. subtilis* และ ค) *M. luteus* หมายเลข 1, 2, 3, 4, 5 คือ ความเข้มข้นของสารสกัด 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ตามลำดับ P) positive control และ N) negative control

4.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบสังกรณี

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ของสารสกัดหยาบ 5 ชนิดจากใบสังกรณี ที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ คือ เชื้อ *S. aureus* และ *M. luteus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *B. subtilis* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกเช่นเดียวกัน อาจเนื่องมาจากเชื้อ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อสารเคมีได้ดี ส่งผลให้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่นำมาทดสอบไม่มีประสิทธิภาพมากพอในการทำลายผนังสปอร์ได้ และยังไม่มีผลต่อเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยผลของสารสกัดหยาบบิวทานอลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.42, 11.42, 15.00, 16.56 และ 17.92 มิลลิเมตร ตามลำดับ

(รูปที่ 4.5ก) และผลของสารสกัดหยาบบิวทานอลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *M. luteus* ที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 20.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 8.75 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.5ข) ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบแสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.5 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีต่อเชื้อ ก) *S. aureus* ข) *M. luteus* หมายเลข 1, 2, 3, 4, 5 คือความเข้มข้นของสารสกัด 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ตามลำดับ P) positive control และ N) negative control

ตารางที่ 4.8 แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณี

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อดิสก์)	**ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (มิลลิเมตร) ± SE**	
	S. aureus	***M. luteus***
1.25	7.42^{e} ±0.17	6.00^{b} ±0.00
2.50	11.42^{d} ±0.73	6.00^{b} ±0.00
5.00	15.00^{c} ±0.14	6.00^{b} ±0.00
10.00	16.56^{b} ±0.37	6.00^{b} ±0.00
20.00	17.92^{a} ±0.30	8.75^{a} ±0.14

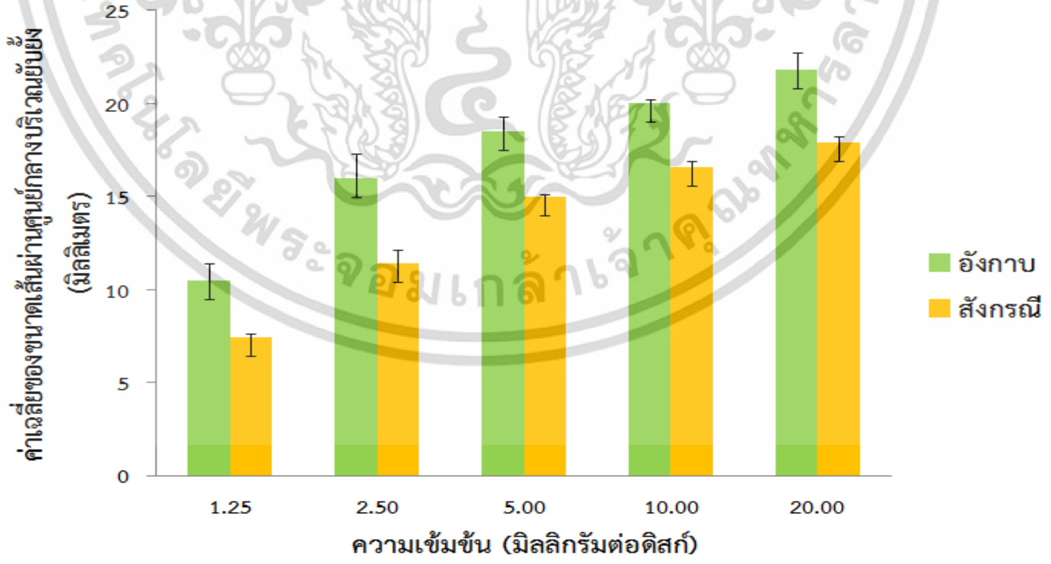
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

SE = standard error

4.3.3 ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณีทั้ง 5 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลของพืชทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดีที่สุด และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด จึงเปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีต่อเชื้อ *S. aureus* ดังรูปที่ 4.6 พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีในทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ซึ่งสารสกัดหยาบบิวทานอลเป็นสารที่มีความเป็นขั้วสูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Salib และคณะ (2013) ที่พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากเปลือกของต้นอังกาบ (*B. cristata*) ที่ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 28.00 มิลลิเมตร ส่วน Chomnawang และคณะ (2005) ได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวของสารสกัดหยาบจากใบเสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*) (ไม่ระบุตัวทำละลายที่ใช้) ต่อเชื้อ *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* พบว่าสารสกัดหยาบจากใบเสลดพังพอนตัวผู้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อทั้ง 2 ชนิด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งมากกว่า 15.00 มิลลิเมตร เช่นเดียวกับ Diwan และคณะ (2012) ที่พบว่าสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มจากใบอังกาบหนู (*B. prionitis*) ที่ความเข้มข้น 200.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. rhamnosus* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.00 มิลลิเมตร จากรายงานการวิจัยทั้งหมดจะพบว่าสารสำคัญในพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน และพบว่าสารสกัดจากต้นอังกาบทั้งในส่วนของใบและเปลือกของลำต้น เมื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูงจะสามารถละลายเอาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ออกมาได้ ดังรายงานการวิจัยของ Salib และคณะ (2013) แต่ยังไม่พบรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบสังกรณี



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีต่อเชื้อ *S. aureus*

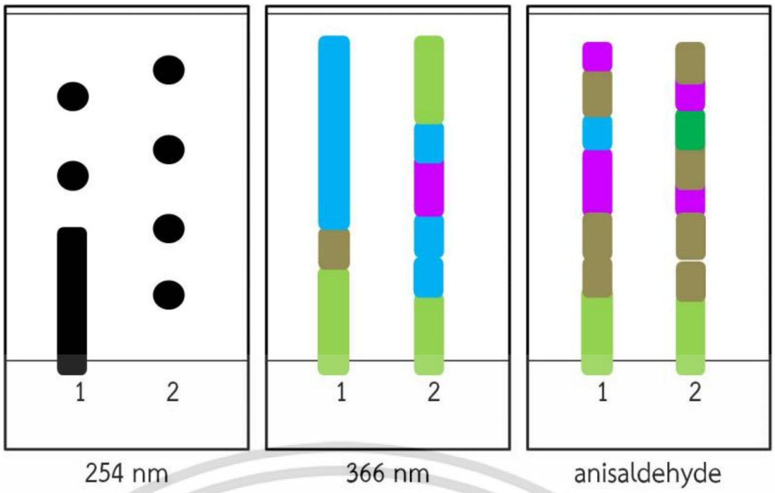
จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับสูงและมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดีที่สุด คล้ายกับงานวิจัยของ Jaiswal และคณะ (2014) ที่พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบหนู (*B. prionitis*) มีฤทธิ์ในการป้องกันแผลในกระเพาะอาหารหนูได้ดีกว่าสารสกัดหยาบอื่นๆ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำสารสกัดหยาบบิวทานอลของพืชทั้ง 2 ชนิด มาแยกให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (colum chromatography) เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป

4.4 การแยกสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท บิวทานอล และน้ำ จากใบอังกาบและสังกรณี พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด จึงนำสารสกัดหยาบบิวทานอลของพืชทั้ง 2 ชนิด มาทำการทดสอบเพื่อหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม (solvent system) ด้วยวิธีทิลเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin-layar chromatography: TLC) เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (colum chromatography) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

4.4.1 ทดสอบหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณี

เมื่อนำสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีมาทำการทดสอบเพื่อหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วยวิธีทิลเลเยอร์โครมาโตกราฟี โดยเริ่มจากเตรียมระบบตัวทำละลาย โดยเริ่มจากสุ่มความเป็นขั้วของตัวทำละลาย 2 ชนิดที่แตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น ตัวทำละลายเฮกเซนต่อตัวทำละลายเอทิล แอซิเตท หรือตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อตัวทำละลายเมทานอล เป็นต้น โดยเริ่มเตรียมระบบของตัวทำละลายจากความเป็นขั้วของตัวทำละลายที่เท่ากัน คือ 50: 50 จากนั้นจึงค่อยๆ เพิ่มหรือลดความเป็นขั้วของตัวทำละลาย แล้วนำแผ่น TLC ที่หยดสารทดสอบไว้มาจุ่มในระบบของตัวทำละลายที่เตรียมไว้ เมื่อสารเคลื่อนที่ขึ้นมาถึงด้านบนของแผ่น TLC ให้นำแผ่น TLC ไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร หากเกิดการเรืองแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นจุดสีดำ แสดงว่ามีสารที่เป็น double bond หรือ aromatic ring แต่จะไม่สามารถระบุชนิดของสารได้ แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลาย anisaldehyde reagent แล้วนำไปให้ความร้อน เพื่อให้แถบของสารทั้งหมดปรากฏขึ้น สังเกตผลของสารที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC หากสารที่เกิดขึ้นปรากฏเป็นจุดแยกอย่างชัดเจน แสดงว่าอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ผสมในระบบตัวทำละลายนั้นมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีต่อไปได้ หากยังไม่แยกเป็นจุดอย่างชัดเจนหรือสารเกิดเป็นทางยาวให้ใช้ตัวทำละลายบิวทานอลหยดลงไปในระบบของตัวทำละลาย 2-3 หยด เพื่อให้สารแยกจากกันได้ดียิ่งขึ้น หรือทำการเพิ่มหรือลดอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อไปเรื่อยๆ จนกว่าจะได้ระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งผลการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณี พบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของพืชทั้ง 2 ชนิด คือไดคลอโรมีเทน 80 เปอร์เซ็นต์ ต่อเมทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ และบิวทานอล 3 หยด แสดงลักษณะสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณี เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และย้อมด้วยสารละลาย anisaldehyde reagent (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบ (1) และสังกรณี (2) เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และเมื่อย้อมด้วยสาร anisaldehyde reagent

จากรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบเมื่อนำมาแยกด้วยเทคนิคทิลเลเยอร์โครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 80 เปอร์เซ็นต์ต่อเมทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ และบิวทานอล 3 หยด เมื่อนำมาส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ปรากฏเป็นแถบยาวสีดำเข้ม 1 จุดใหญ่ และ 2 จุดเล็ก เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เกิดการเรืองแสงสีเขียวเป็นกลุ่มสารอยู่ด้านล่าง แถบสีฟ้าอยู่ด้านบน คั่นด้วยแถบสีน้ำตาล 1 จุด และเมื่อนำมาย้อมด้วยสารละลาย anisaldehyde reagent ปรากฏเป็นแถบสารสีเขียวอ่อน 1 จุด สีน้ำตาล 3 จุด สีม่วง 2 จุด และสีฟ้า 1 จุด เช่นเดียวกันกับสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณี เมื่อนำมาส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ปรากฏเป็นกลุ่มสารสีดำเข้มจำนวน 4 จุด เมื่อนำมาส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เกิดการเรืองแสงสีเขียว 2 จุด สีฟ้า 3 จุด และสีม่วง 1 จุด และเมื่อนำมาย้อมด้วยสารละลาย anisaldehyde reagent ปรากฏเป็นแถบสีเขียวอ่อน 1 จุด สีน้ำตาล 4 จุด สีม่วง 2 จุด และสีเขียวเข้ม 1 จุด

จากลักษณะของสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของพืชทั้งสองชนิดแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบทางเคมีของพืชทั้ง 2 ชนิดที่ปรากฏบนแผ่น TLC มีลักษณะคล้ายคลึงกัน แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากพืชทั้ง 2 ชนิด อาจจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นสารสำคัญส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยให้ผลบวกที่เป็นสีม่วง สีน้ำตาลหรือสีเขียว และสีฟ้า กับสารละลาย anisaldehyde reagent หมายความว่าสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณีมีสารสำคัญในกลุ่มฟีนอล สเตียรอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ ซึ่งสารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากนิยมนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยาต่างๆ เช่น ยาต้านการอักเสบ (วันดี และคณะ, 2536) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของพืชในสกุล *Barleria* หลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการเป็นยาต้านการอักเสบ เช่น อังกาบหนู (*B. prionitis*)

4.4.2 ผลการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว นำสารสกัดหยาบบิวทานอลของพืชทั้ง 2 ชนิด มาทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี เริ่มจากการบรรจุคอลัมน์ด้วยซิลิกาเจล โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน เพื่อลดการเกิดปัญหาการเกิดฟองอากาศและการรอยแตกในคอลัมน์ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน โดยค่อยๆ เพิ่มความเป็นขั้วของตัวทำละลายจนครบ 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงเริ่มใช้ตัวทำละลายเมทานอลชะสารออกจากคอลัมน์ โดยเพิ่มความเป็นขั้วของตัวทำละลายครั้งละ 2 เปอร์เซ็นต์ ยกตัวอย่างเช่น ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 98 เปอร์เซ็นต์ ต่อตัวทำละลายเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ชะสารออกจากคอลัมน์ในรอบแรก เมื่อสารละลายใกล้หมดจากคอลัมน์ ให้ทำการเปลี่ยนระบบของตัวทำละลายเป็นไดคลอโรมีเทน 96 เปอร์เซ็นต์ ต่อตัวทำละลายเมทานอล 4 เปอร์เซ็นต์ ทำแบบนี้ไปเรื่อยๆ จนถึงระบบของตัวทำละลายที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 0 เปอร์เซ็นต์ ต่อตัวทำละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ เก็บสารที่ชะออกจากคอลัมน์ใส่ในหลอดทดลองและบันทึกระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการแยก รวมถึงลักษณะสีของสารละลาย และตรวจสอบสารด้วยเทคนิคทิลเลเยอร์โครมาโตกราฟี แล้วทำการรวมสารที่ปรากฏลักษณะบนแผ่น TLC เหมือนกันไว้ด้วยกัน จากนั้นนำสารที่ได้ไประเหยแห้ง บันทึกน้ำหนัก ดังตารางที่ 4.9 และ 4.10 ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Jaiswal และคณะ (2014) ทำการแยกสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบหนู (*B. prionitis*) ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยบรรจุคอลัมน์ด้วยซิลิกาเจล และใช้ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม 100 เปอร์เซ็นต์ ต่อตัวทำละลายเอทิล แอซิเตท 0 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงเพิ่มความเป็นขั้วของระบบตัวทำละลายภายในคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเอทิล แอซิเตท ครั้งละ 25 เปอร์เซ็นต์ จนครบ 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วเปลี่ยนมาใช้ตัวทำละลายเอทิล แอซิเตทต่อเมทานอล โดยเพิ่มความเป็นขั้วของตัวทำละลายเมทานอลครั้งละ 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นการชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้การเพิ่มความเป็นขั้วของระบบตัวทำละลายเช่นเดียวกัน

จากตารางที่ 4.9 และ 4.10 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณี เมื่อนำมาแยกให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบสามารถแยกสารส่วนย่อยได้ทั้งหมด 9 ส่วน และสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีสามารถแยกสารส่วนย่อยได้ทั้งหมด 8 ส่วน จากนั้นนำสารส่วนย่อยทั้งหมดที่ได้มาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อไป

ตารางที่ 4.9 แสดงระบบตัวทำละลายและจำนวนสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบด้วยเทคนิคคอลัมโครมาโตกราฟี

ส่วนย่อย	**หลอด**	**ระบบตัวทำละลาย**	**ลักษณะสารละลาย**	**น้ำหนัก (กรัม)**	**ผลผลิต ร้อยละ**
1	1-33	ตั้งแต่ D100%: M0% ถึง D84%: M16%	ใส ไม่มีสี	0.07	0.70
2	34-59	ตั้งแต่ D82%: M18% ถึง D78%: M22%	สีเหลืองอ่อน ใส	1.42	14.20
3	60-75	ตั้งแต่ D76%: M24% ถึง D74%: M26%	สีเหลืองเข้ม ใส	2.03	20.30
4	76-100	ตั้งแต่ D72%: M28% ถึง D70%: M30%	สีเหลืองเข้ม ใส	1.48	14.80
5	101-166	ตั้งแต่ D68%: M32% ถึง D56%: M44%	สีเหลืองเข้ม ใส	1.43	14.30
6	167-200	ตั้งแต่ D54%: M46% ถึง D48%: M58%	สีเหลืองอ่อน ใส	0.03	0.30
7	201-226	ตั้งแต่ D46%: M54% ถึง D42%: M58%	ใส ไม่มีสี	0.02	0.20
8	227-300	ตั้งแต่ D40%: M60% ถึง D24%: M76%	สีเหลืองอ่อน ใส	0.02	0.20
9	301-400	ตั้งแต่ D22%: M78% ถึง D0%: M100%	สีเหลืองอ่อน ใส	0.01	0.10

หมายเหตุ กำหนดให้ D คือ ไดคลอโรมีเทน และ M คือ เมทานอล

ตารางที่ 4.10 แสดงระบบตัวทำละลายและจำนวนสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีด้วยเทคนิคคอลัมโครมาโตกราฟี

ส่วนย่อย	**หลอด**	**ระบบตัวทำละลาย**	**ลักษณะสารละลาย**	**น้ำหนัก (กรัม)**	**ผลผลิต ร้อยละ**
1	1-20	ตั้งแต่ D100%: M0% ถึง D90%: M10%	ใส ไม่มีสี	0.01	0.10
2	21-45	ตั้งแต่ D88%: M12% ถึง D84%: M16%	สีเหลืองอ่อน ใส	1.15	11.50
3	46-68	ตั้งแต่ D82%: M18% ถึง D80%: M20%	สีเหลืองเข้ม ใส	1.22	12.20
4	69-108	ตั้งแต่ D78%: M22% ถึง D74%: M26%	สีเหลืองเข้ม ใส	1.48	14.80
5	109-130	ตั้งแต่ D72%: M28% ถึง D70%: M30%	สีเหลืองเข้ม ใส	1.45	14.50
6	131-232	ตั้งแต่ D68%: M32% ถึง D52%: M48%	สีเหลืองอ่อน ใส	1.06	10.60
7	233-304	ตั้งแต่ D50%: M50% ถึง D20%: M80%	สีเหลืองอ่อน ใส	0.05	0.50
8	305-355	ตั้งแต่ D18%: M82% ถึง D0%: M100%	ใสไม่มีสี	0.07	0.70

หมายเหตุ กำหนดให้ D คือ ไดคลอโรมีเทน และ M คือ เมทานอล

4.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณี

เมื่อได้สารส่วนย่อยทั้งหมดแล้วนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ HT-29, MCF-7, HepG-2, KB, P388, HeLa และ Vero ซึ่งสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัด-หยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีมีจำนวน 9 และ 8 ส่วน ตามลำดับ ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารส่วนย่อยในหลุมทดสอบ เท่ากับ 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 และ 200.00

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้สาร MMC ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบ เท่ากับ 25.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวกและใช้สารละลาย DMSO 1 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวควบคุมเชิงลบ แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 4.2 ดังรายละเอียดต่อไปนี้

4.5.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบ

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบ เท่ากับ 6.25, 25.00, 50.00, 100.00 และ 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยบ่มเซลล์ไลน์ร่วมกับสารส่วนย่อยทั้ง 9 ส่วนที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้สาร MMC ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบเท่ากับ 25.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้สารละลาย DMSO 1 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวควบคุมเชิงลบ เมื่อนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ คือ 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลการทดลองดังนี้

สารส่วนย่อยที่ 1 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุดเท่ากับ 96.17 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ MCF-7, HeLa และ Vero มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 80.23, 95.22 และ 76.47 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ไลน์ HT-29, HepG-2 และ KB มีค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 63.18, 70.13 และ 49.42 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.11) และมีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ P388, MCF-7, HeLa, Vero, HT-29 และ HepG-2 เท่ากับ 58.34, 144.49, 150.51, 159.63, 168.71 และ 171.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์ KB มีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.12)

สารส่วนย่อยที่ 2 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 และ KB มากที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 99.03 และ 91.85 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ MCF-7 เท่ากับ 85.09 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ไลน์ HT-29 และ HeLa มีค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ เท่ากับ 79.61 และ 73.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์ HepG-2 และ Vero มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.11) และมีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ P388, KB, MCF-7, HT-29 และ HeLa เท่ากับ 42.51, 52.53, 98.29, 133.66 และ 160.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์ HepG-2 และ Vero มีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.12)

สารส่วนย่อยที่ 3 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 และ KB มากที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 95.20 และ 94.02 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ MCF-7, HT-29 และ HeLa มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 96.31, 95.33 และ 90.51 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ไลน์ Vero และ HepG-2 มีค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ เท่ากับ 63.29 และ 56.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11) และมีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50

เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ P388, KB, MCF-7, HT-29, HeLa, Vero และ HepG-2 เท่ากับ 8.71, 9.45, 27.40, 25.40, 25.76, 58.92 และ 188.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.12)

สารส่วนย่อยที่ 4 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB มากที่สุด เท่ากับ 85.62 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ P388 และ HeLa เท่ากับ 78.42 และ 77.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เซลล์ไลน์ HT-29 และ MCF-7 มีค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 71.11 และ 63.50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์ไลน์ HepG-2 และ Vero มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.11) และมีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ KB, P388, HeLa, HT-29 และ MCF-7 เท่ากับ 50.94, 41.37, 53.97, 109.44 และ 112.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์ HepG-2 และ Vero มีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.12)

สารส่วนย่อยที่ 5 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด เท่ากับ 83.96 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ KB และ HeLa เท่ากับ 76.84 และ 74.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เซลล์ไลน์ HT-29 และ MCF-7 มีค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 76.98 และ 73.73 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์ไลน์ Vero และ HepG-2 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 55.48 และ 21.19 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.11) และมีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ P388, KB, HeLa, HT-29, MCF-7 และ Vero เท่ากับ 38.73, 63.65, 63.63, 85.45, 72.21 และ 185.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์ HepG-2 มีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.12)

สารส่วนย่อยที่ 6 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ HeLa มากที่สุด เท่ากับ 64.52 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ P388 เท่ากับ 69.25 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ไลน์ MCF-7, HepG-2 และ KB มีค่าเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 52.09, 38.59 และ 48.68 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ไลน์ HT-29 และ Vero มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.11) และมีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ HeLa, P388 และ MCF-7 เท่ากับ 176.11, 118.04 และ 195.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์อื่นๆ มีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.12)

และสารส่วนย่อยที่ 7-9 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.11) ทำให้มีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.11 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารส่วนย่อยต่างๆ ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบที่ความเข้มข้น 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด

เซลล์ไลน์	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ± SE								
	F1	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**	**F6**	**F7**	**F8**	**F9**
HT-29	63.18^{c}±5.05	79.61^{bc}±15.61	95.33^{b}±2.36	71.11^{c}±4.18	76.98^{c}±5.41	45.66^{bc}±7.79	36.55^{a}±5.34	18.27^{bc}±3.47	15.42^{a}±2.89
MCF-7	80.23^{b}±6.53	85.09^{b}±2.36	96.31^{b}±0.54	63.50^{c}±5.06	73.73^{c}±0.80	52.09^{abc}±11.34	39.70^{a}±11.79	32.77^{a}±11.13	24.45^{a}±13.87
HepG-2	70.13^{c}±2.25	16.04^{e}±1.14	56.80^{d}±2.56	14.65^{d}±3.33	21.19^{d}±1.72	38.59^{abc}±13.25	29.70^{a}±2.01	19.62^{bc}±5.08	22.60^{a}±10.07
KB	49.42^{c}±1.96	91.85^{a}±3.86	94.02^{a}±0.31	85.62^{a}±5.19	76.84^{ab}±0.01	48.68^{abc}±9.01	16.54^{b}±5.03	21.10^{bc}±9.38	23.99^{a}±10.15
P388	96.17^{a}±0.69	99.03^{a}±0.24	95.20^{a}±2.38	78.42^{ab}±2.00	83.96^{a}±3.82	69.25^{ab}±16.01	15.01^{b}±3.24	10.22^{c}±1.81	15.60^{a}±0.58
HeLa	95.22^{b}±1.56	73.04^{cd}±11.27	90.51^{b}±4.95	77.25^{b}±0.96	74.90^{b}±2.93	64.52^{a}±14.45	17.01^{b}±3.05	23.45^{ab}±0.58	26.16^{a}±2.66
Vero	76.47^{b}±4.41	40.45^{de}±15.42	63.29^{c}±4.91	28.38^{d}±1.79	55.48^{d}±8.46	20.95^{c}±5.35	24.19^{b}±1.08	23.42^{ab}±16.81	30.88^{a}±5.53

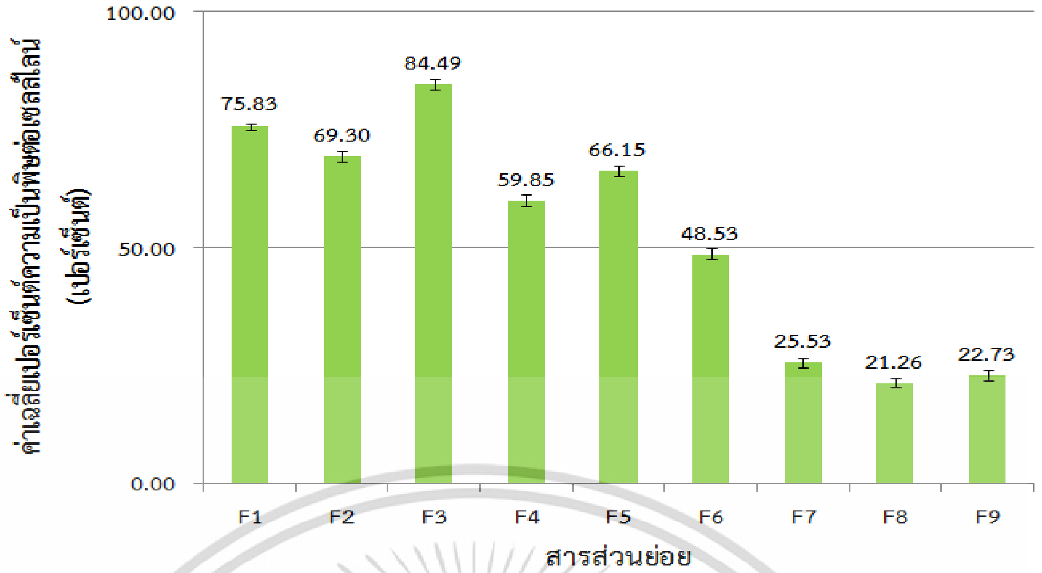
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

SE = standard error

ตารางที่ 4.12 แสดงระดับความเข้มข้นของสารส่วนย่อยต่างๆ ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์

เซลล์ไลน์	**ความเข้มข้นของสารสกัดที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**								
	F1	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**	**F6**	**F7**	**F8**	**F9**
HT-29	168.71	133.66	25.40	109.44	85.45	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00
MCF-7	144.49	98.29	27.40	112.67	72.21	195.02	>200.00	>200.00	>200.00
HepG-2	171.13	>200.00	188.08	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00
KB	>200.00	52.53	9.45	50.94	63.65	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00
P388	58.34	42.51	8.71	41.37	38.73	118.04	>200.00	>200.00	>200.00
HeLa	150.51	160.62	25.76	53.97	63.63	176.11	>200.00	>200.00	>200.00
Vero	159.63	>200.00	58.92	>200.00	185.03	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00

หมายเหตุ >200.00 หมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดมีค่ามากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด ของสารส่วนย่อยต่างๆ ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบ

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด เมื่อนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดในแต่ละส่วนย่อยมาทำการเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารส่วนย่อยที่ 3 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบมากที่สุด ยกเว้นเซลล์ไลน์ HepG-2 (รูปที่ 4.8 และภาคผนวก ง) ซึ่งสามารถแยกได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี ที่ใช้ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 74-76 เปอร์เซ็นต์ต่อตัวทำละลายเมทานอล 24-26 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ สารส่วนย่อยที่ 1, 2, 4 และ 5 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสุดท้าย คือ สารส่วนย่อยที่ 6 ส่วนสารส่วนย่อยที่ 7-9 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบในระดับต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าสารส่วนย่อยที่ 3 นอกจากจะมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบในระดับสูงแล้ว ยังพบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ปกติที่ใช้ในการทดสอบ คือ เซลล์ไตลิงชนิด Vero จึงไม่น่าจะมีความเหมาะสมที่จะนำสารส่วนย่อยที่ 3 ไปพัฒนาต่อไปเป็นยารักษาโรคมะเร็ง แต่อาจจะใช้สารส่วนย่อยที่ 2 และ 4 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์รองลงมาจากสารส่วนย่อยที่ 3 และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ใช้ในการทดสอบ จึงควรนำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเพื่อหาสารสำคัญที่มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นในการนำไปพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งต่อไปในอนาคต ซึ่งอาจจะสามารถใช้ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก มะเร็งเต้านม มะเร็งเยื่อบุช่องปาก มะเร็งเม็ดเลือดขาว และมะเร็งปากมดลูกได้ แต่ไม่มีผลในการรักษามะเร็งตับ และควรมีการทดลองทางด้านเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองต่อไป

4.5.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณี

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบ เท่ากับ 6.25, 25.00, 50.00, 100.00 และ 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยบ่มเซลล์ร่วมกับสารส่วนย่อยทั้ง 8 ส่วน ที่

ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้สาร MMC ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบเท่ากับ 25.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้สารละลาย DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุมเชิงลบ เมื่อนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ คือ 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลการทดลองดังนี้

สารส่วนย่อยที่ 1 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.13) ทำให้มีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.14)

สารส่วนย่อยที่ 2 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388, HeLa และ MCF-7 มากที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 94.84, 73.75 และ 67.76 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์ไลน์ Vero, KB, HepG-2 และ HT-29 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.13) และมีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ P388, HeLa และ MCF-7 เท่ากับ 95.29, 102.47 และ 145.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์อื่นๆ มีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.14)

สารส่วนย่อยที่ 4 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด เท่ากับ 96.41 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ KB, HT-29 และ MCF-7 เท่ากับ 51.59, 81.48, 63.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เซลล์ไลน์ HeLa และ Vero มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 50.17 และ 35.06 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ไลน์ HepG-2 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.13) และมีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ P388, KB, HT-29, MCF-7 และ HeLa เท่ากับ 23.13, 58.51, 134.15, 162.87 และ 199.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์ HepG-2 และ Vero มีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.14)

สารส่วนย่อยที่ 5 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด เท่ากับ 94.93 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ KB เท่ากับ 75.81 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ไลน์ HT-29 และ MCF-7 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 57.26 และ 41.73 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ไลน์ HepG-2, HeLa และ Vero มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.13) และมีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ P388, KB และ HT-29 เท่ากับ 43.75, 79.60 และ 187.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์ MCF-7, HepG-2, HeLa และ Vero มีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.14)

สารส่วนย่อยที่ 6 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB มากที่สุดเพียงเซลล์เดียวเท่านั้น เท่ากับ 84.54 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์ไลน์อื่นๆ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.13) และมีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษ

ต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ KB เท่ากับ 55.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ไลน์อื่นๆ มีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.14)

สารส่วนย่อยที่ 7 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB และ P388 มากที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 64.02 และ 89.53 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์ไลน์อื่นๆ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.13) และมีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ KB และ P388 เท่ากับ 144.64 และ 152.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ไลน์อื่นๆ มีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.14)

สารส่วนย่อยที่ 8 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB มากที่สุดเพียงเซลล์เดียวเท่านั้น เท่ากับ 53.77 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์ไลน์อื่นๆ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.13) และมีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ไลน์ KB เท่ากับ 126.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ไลน์อื่นๆ มีค่าความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.14)

ตารางที่ 4.13 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีที่ความเข้มข้น 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด

เซลล์ไลน์	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี ± SE							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
HT-29	6.21^{ab}±4.73	9.04^{c}±3.72	17.44^{a}±0.60	81.48^{c}±2.05	57.26^{c}±5.72	16.16^{cd}±3.98	28.73^{bc}±8.23	25.55^{b}±2.56
MCF-7	26.23^{a}±2.78	67.76^{a}±22.88	14.95^{ab}±4.82	63.29^{d}±13.67	41.73^{c}±18.91	20.62^{cd}±8.41	15.03^{c}±4.52	31.01^{b}±0.75
HepG-2	21.46^{a}±3.40	18.39^{c}±0.23	5.84^{b}±0.40	24.37^{e}±1.62	10.21^{d}±7.76	14.69^{d}±10.31	21.91^{bc}±7.73	22.53^{b}±9.59
KB	13.62^{c}±4.24	43.50^{b}±2.07	10.71^{b}±3.47	51.59^{b}±0.55	75.18^{b}±12.88	84.54^{a}±2.41	64.02^{a}±18.04	53.77^{a}±0.52
P388	17.75^{bc}±0.63	94.89^{a}±0.95	7.53^{b}±6.59	96.41^{a}±1.19	94.93^{a}±2.25	33.53^{cd}±5.35	89.53^{a}±3.65	28.22^{b}±1.87
HeLa	25.67^{a}±9.36	73.75^{a}±9.86	8.59^{b}±0.10	50.17^{de}±4.40	22.37^{d}±5.73	47.46^{b}±11.05	18.02^{bc}±14.68	27.52^{b}±6.04
Vero	21.04^{a}±2.16	46.72^{b}±3.73	11.06^{b}±2.65	35.06^{de}±5.39	19.08^{cd}±11.62	21.52^{bc}±10.10	22.07^{b}±4.23	21.96^{b}±11.53

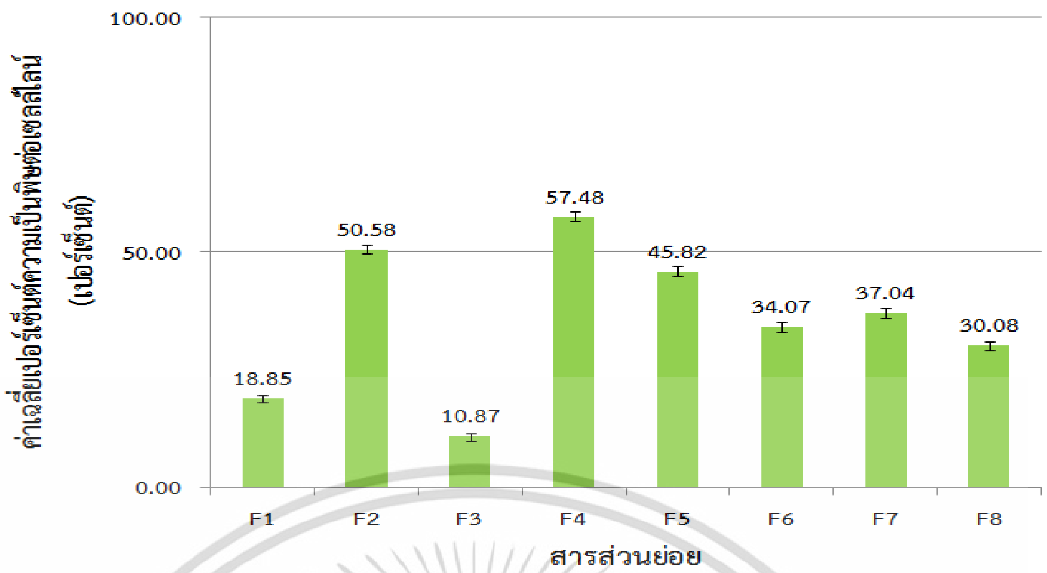
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

SE = standard error

ตารางที่ 4.14 แสดงระดับความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์

เซลล์ไลน์	**ความเข้มข้นของสารสกัดที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**							
	F1	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**	**F6**	**F7**	**F8**
HT-29	>200.00	>200.00	>200.00	134.15	187.75	>200.00	>200.00	>200.00
MCF-7	>200.00	145.14	>200.00	162.87	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00
HepG-2	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00
KB	>200.00	>200.00	>200.00	58.51	79.60	55.58	144.64	126.57
P388	>200.00	95.29	>200.00	23.13	43.75	>200.00	152.39	>200.00
HeLa	>200.00	102.47	>200.00	199.60	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00
Vero	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00

หมายเหตุ >200.00 หมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดมีค่ามากกว่า 200.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด ของสารส่วนย่อยต่างๆ ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณี

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิด ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณี เมื่อนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารในแต่ละส่วนย่อยมาทำการเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารส่วนย่อยที่ 4 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบมากที่สุด (รูปที่ 4.9 และภาคผนวก ง) ซึ่งสามารถแยกได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่ใช้ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 74-78 เปอร์เซ็นต์ ต่อตัวทำละลายเมทานอล 22-26 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ สารส่วนย่อยที่ 5, 2 และ 6 ตามลำดับ สารส่วนย่อยที่ 7 และ 8 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารส่วนย่อยที่ 1 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบในระดับต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าสารส่วนย่อยที่ 4 นอกจากจะมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบในระดับสูงแล้ว ยังพบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ปกติที่ใช้ในการทดสอบ คือ เซลล์ไตลิงชนิด Vero และเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 จึงน่าจะมีความเหมาะสมที่จะนำสารส่วนย่อยที่ 4 ไปพัฒนาต่อไปเป็นยารักษาโรคมะเร็ง และมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเพื่อหาสารสำคัญที่มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นในการนำไปพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งต่อไปในอนาคต ซึ่งอาจจะสามารถใช้ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก มะเร็งเต้านม มะเร็งเยื่อบุช่องปาก มะเร็งเม็ดเลือดขาว และมะเร็งปากมดลูกได้ แต่ไม่มีผลในการรักษามะเร็งตับ และควรมีการทดลองทางด้านเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองต่อไป

ดังนั้นจึงสามารถสรุปผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีได้ว่า สารสกัดในแต่ละส่วนย่อยนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยสารสำคัญที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบมากที่สุดของพืชทั้ง 2 ชนิด แยกได้จากเทคนิคทางคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่ใช้ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนในช่วงอัตราส่วนระหว่าง 74-78 เปอร์เซ็นต์ และตัวทำละลายเมทานอลในช่วงอัตราส่วนระหว่าง 22-26 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ata และคณะ

(2009) พบสารต้านอนุมูลอิสระที่แยกได้จากใบอังกาบหนู (*B. prionitis*) ที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่ใช้ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วยตัวทำละลายเอทิล แอซิเตท 80 เปอร์เซ็นต์ และเมทานอล 20 เปอร์เซ็นต์

4.6 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณี

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณี ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.12, 0.25, 0.50, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ 5 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* โดยใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin ที่ความเข้มข้น 1.00 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นชุดควบคุมเชิงบวก และใช้สารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และทำการทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น ซึ่งผลการทดลองพบว่า สารส่วนย่อยทั้งหมดที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณี ไม่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งหมด ที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบคือ 2.00 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ อาจไม่เพียงพอที่จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ ผลการทดลองนี้จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาการสกัดสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณี โดยใช้ใบพืชแห้งที่มีน้ำหนักแห้ง 1 กิโลกรัม แล้วสกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration) กับตัวทำละลายเมทานอล ได้สารสกัดหยาบเมทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีที่มีน้ำหนัก 67.10 และ 82.35 กรัม คิดเป็น 6.71 และ 8.24 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาสกัดต่อด้วยวิธี liquid-liquid partitioning extraction โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตท และบิวทานอล พบว่าได้สารสกัดหยาบเฮกเซนปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 40.06 และ 43.55 กรัม คิดเป็น 66.77 และ 72.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อนำสารสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิด จากใบอังกาบและสังกรณี มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 7 ชนิด และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ 5 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบมากที่สุด (ยกเว้นเซลล์ไลน์ HepG-2) โดยมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ HT-29 และ P388 สูงที่สุด และมีค่า CC_{50} เท่ากับ 39.74 และ 48.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 21.81 มิลลิเมตร และสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบมากที่สุดเช่นเดียวกัน (ยกเว้นเซลล์ไลน์ HepG-2 และ Vero) ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 สูงที่สุด และมีค่า CC_{50} เท่ากับ 216.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 17.92 มิลลิเมตร

จากการทดลองทั้งหมดพบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลจากพืชทั้ง 2 ชนิด มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดีที่สุด อาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบบิวทานอลมีสารสำคัญที่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นขั้วสูง และจากการตรวจสอบด้วยสาร anisaldehyde reagent พบว่าให้ผลบวกที่เป็นสีม่วง สีน้ำตาลหรือสีเขียว และสีฟ้า กับสาร anisaldehyde reagent หมายความว่าสารสกัดหยาบจากใบอังกาบและสังกรณีมีสารสำคัญในกลุ่มฟีนอล สเตียรอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ ซึ่งสารในกลุ่มนี้เป็นสารสำคัญที่ถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยาต่างๆ เช่น ยาต้านการอักเสบ เป็นต้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำสารสกัดหยาบบิวทานอลมาแยกให้มีความบริสุทธิ์มาขึ้นด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งสามารถแยกสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบและสังกรณีได้ทั้งหมด 9 และ 8 ส่วนย่อย ตามลำดับ

เมื่อนำสารส่วนย่อยทั้งหมดมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่าสารส่วนย่อยที่ 3 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบมากที่สุด (ยกเว้นเซลล์ไลน์ HepG-2) โดยมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 และ KB สูงที่สุด และมีค่า CC_{50} เท่ากับ 8.71 และ 9.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถแยกได้จากระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 74-76 เปอร์เซ็นต์ ต่อตัวทำละลายเมทานอล 24-26 เปอร์เซ็นต์ และสารส่วนย่อยที่ 4 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ใน

การทดสอบมากที่สุดเช่นเดียวกัน (ยกเว้นเซลล์ไลน์ HepG-2 และ Vero) โดยมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 และมีค่า CC_{50} เท่ากับ 23.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่พบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถแยกได้จากระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 74-78 เปอร์เซ็นต์ต่อตัวทำละลายเมทานอล 22-26 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองทั้งหมด พบว่าสารสกัดจากใบอังกาบทั้งในส่วนของสารสกัดหยาบและสารส่วนย่อย ล้วนมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ปกติที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยกันทั้งสิ้น และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่เป็นตัวแทนของโรคมะเร็งต่างๆ ในระดับสูง และมีความหลากหลาย เช่นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โรคมะเร็งเต้านม โรคมะเร็งตับ โรคมะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้ม โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว และโรคมะเร็งปากมดลูก เป็นต้น หากต้องการนำไปพัฒนาต่อไปเป็นยารักษามะเร็ง ควรคำนึงถึงผลกระทบต่อเซลล์ปกติของผู้ป่วยด้วย และสารสกัดหยาบบิวทานอลยังมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในคนได้อีกด้วย ส่วนสารสกัดจากใบสังกรณีทั้งในส่วนของสารสกัดหยาบและสารส่วนย่อยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ปกติที่ใช้ในการทดสอบ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่เป็นตัวแทนของโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ในระดับที่แตกต่างกัน เช่นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โรคมะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้ม และโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น ซึ่งมีความเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งต่อไปได้ในอนาคต และในส่วนของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีก็มีความสามารถในยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งจะมีภูมิต้านทานของร่างกายต่ำทำให้สามารถเกิดโรคติดเชื้อได้ง่าย จึงเป็นผลดีอย่างยิ่งหากในอนาคตจะมียาที่สามารถรักษาโรคมะเร็งและต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียได้ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าควรนำสารสกัดจากใบสังกรณีไปใช้ในการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยา การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีรวมถึงโครงสร้างของสารสำคัญที่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์และการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วย

งานวิจัยฉบับนี้ เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับการหาสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ทดสอบและการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เท่านั้น ซึ่งสามารถทราบได้เพียงว่า สารสำคัญที่น่าจะมีฤทธิ์ดังกล่าวอยู่ในสารสกัดหยาบชนิดใด และสามารถแยกได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายใด แต่ไม่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นสารสำคัญในกลุ่มไหน และมีโครงสร้างของสารสำคัญเป็นเช่นไร ดังนั้นเพื่อเป็นการต่อยอดงานวิจัย จึงควรมีการนำไปศึกษาเกี่ยวกับการหาองค์ประกอบทางเคมีและสูตรโครงสร้างของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์และยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ รวมทั้งทำการทดลองเพิ่มเติม โดยอาจเปลี่ยนวิธีการทดสอบ เช่น ในการตรวนสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ อาจใช้วิธีการหาค่า broth dilution ในการหาค่า MIC และ MBC เป็นต้น เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบ รวมถึงการทดลองทางด้านเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองด้วย

บรรณานุกรม

กิตติพงษ์ มิตรขุนทด. 2556. “การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae.*” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กฤษฎา แซ่อุย ญาณีพจน์ วรรณธนาเลิศ และวีร์สุดา เฉลยทิศ. 2554. “การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ.” โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ทิพย์วรรณ โกชุม. 2547. “การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากข่าต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราไตรโคไฟตอน รูบรัม (*Trichophyton rubrum*).” รายงานวิจัยคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

ธนวุฒิ วงษ์สวัสดิ์ มณัญญา เตชะปฏิภาณดี และนารีรัตน์ รุ่งเรือง. 2552. “การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารสกัดหยาบของใบอังกาบและสังกรณีในเซลล์ไลน์บางชนิด.” โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นรศิษฎ์ จันทรกูล และศรัณ แร่จั่น. 2545. “การหาองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกต้นกำลังเสือโคร่งในชั้นเฮกเซน.” โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นวลฉวี เวชประสิทธิ์. 2546. **เอกสารประกอบการสอนวิชาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ.** กรุงเทพฯ : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์ . 2553. “การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน.” โครงงานวิจัยสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร พิทัย กาญบุตร และสาธร พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. “การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ.” หน้า 91-101. ใน **การประชุมวิชาการสัตวแพทย์ศาสตร์ ครั้งที่ 9 "สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้”.** ขอนแก่น : คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มาลัย วรจิตร และมาลิน จุลศิริ. 2536. **สารต้านแบคทีเรียและการดื้อยา.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ศิริยอด.

ยุวดี เขียวโพธิ์. 2548. “การศึกษาสารสำคัญในไพลโดยวิธีทินเลเยอรโครมาโทกราฟี.” โครงงานวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2550. **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพรไทย.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บรรณานุกรม (ต่อ)

วันดี กฤษณพันธ์. 2536. **ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่มที่ 1.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

สำนักวิทยบริการ สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา. 2552. **เอกสารสมุนไพรไทย.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.

อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2536. **การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยมหิดล.

อุทัย โสธนะพันธุ์, ปนัดดา พัฒนวศิน, จันคนา บูรณะโอสถ, สุนันทา ศรีโสภณ, Kumar, A.P. และ Huang, B. 2556. “การพิสูจน์ชนิดทางพฤกษศาสตร์ของโกศจุฬาลัมพาที่ใช้ในปัจจุบันด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง.” *วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ*. 8(1) : 1-6.

Adisai, S.D. Meechai, I. Puripattanavong, J. and Kummee, S. 2014. “Antityrosinase and Antimicrobial Activities from Thai Medicinal Plants.” *Archives of Pharmacal Research*. 37(1) : 473-483.

Amaral, L.F.B., Moriel, P. Foglio, M.A. and Mazzola, P.G. 2014. “Evaluation of the Cytotoxicity and Phototoxicity of *Caryocar brasiliense* Supercritical Carbon Dioxide Extract.” *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*. 14(1) : 450-456.

Amoo, S.O. Finnie, J.F. and Van Staden, J. 2009. “*In Vitro* Pharmacological Evaluation of Three *Barleria* Species.” *Journal of Ethnopharmacology*. 121(2) : 274-277.

Amoo, S.O. Ndhalal, A.R. Finnie, J.F. and Staden J.V. 2010. “Antifungal, Acetylcholine Sterase Inhibition, Antioxidant and Phytochemical Properties of Three *Barleria* Species.” *South African Journal of Botany*. 77(2) : 435-445.

Ansari, M.A. Tirry L. and Moens, M. 2005. “Antagonism Between Entomopathogenic Fungi and Bacterial Symbions of Entomopathogenic Nematodes.” *Biological Control*. 50(3) : 465-475.

Ata, A. Kalhari, K.S. and Samarasekera, R. 2009. “Chemical Constituents of *Barleria prionitis* and Their Enzyme Inhibitory and Free Radical Scavenging Activities.” *Phytochemistry Letters*. 2(1) : 37-40.

Banu, S. Arunachalam, G. Jayaveera, K.N. Ashoka, B.V.L. and Kunar, V. 2012. “Hepatoprotective Activity of Methanolic Extract of *Barleria montana* Leaves in Ethanol Treated Rats.” *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2(2) : 748-752.

Basini, J. Iakshmi, M.S. and Anitha, K. 2013. “Antihepatotoxic Effect of *Barleria montana* Leaves Against Anti-TB Drugs Induced Hepatotoxicity.” *International research journal of pharmacy*. 4(6) : 97-101.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Beedessee, G. Ramanjooloo, A. Aubert, G. and Eloy, L. 2012. “Cytotoxic Activities of Hexane, Ethyl acetate and Butanol Extracts of Marine Sponges from Mauritian Waters on Human Cancer Cell Line.” *Environmental toxicology and pharmacology*. 34(2) : 397-408.

Bhattacharjee, I. Chatterjee, S.K. Ghosh, A. and Chandra, G. 2011. “Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Used in Indian Traditional Folk Medicine.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1(2) : 165-169.

Bopp, S.K. and Lettieri, T. 2008. “Comparison of Four Different Colorimetric and Fluorometric Cytotoxicity Assays in a Zebrafish Liver Cell Line.” *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*. 8(8) : 8-18.

Bradner, W.T. 2001. “Mitomycin C: a Clinical Update.” *Cancer Treat*. 27(1) : 25-50.

Cavaliere, R. Ciocatto, E.C. Giovanella, B.C. Heidelberger, C. Johnson, R.O. and Margottini, M. 1967. “Selective Heat Sensitivity of Cancer Cells: Biochemical and Clinical Studies.” *American Cancer Society*. 20(9) : 1351-1381.

Charoenchai, P. Vajrodaya, S. Somprasong, W. Mahidol, C., Ruchirawat, S. and Kittakoop, P. 2010. “Part 1: Antiplasmodial, Cytotoxic, Radical Scavenging and Antioxidant Activities of Thai Plants in the Family Acanthaceae.” *Planta Medical*. 76(16) : 1940-1943.

Chavan, C.B. Shinde, U.V. Hogade, M. and Bhinge, S. 2010. “Screening of *In-Vitro* Antibacterial Assay of *Barleria prionitis* Linn.” *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*. 4(2) : 197-200.

Chomnawang, M.T. Surassmo, S. Nukoolkarn, V.S. and Gritsanapan, W. 2005. “Anti Microbial Effects of Thai Medicinal Plants Against Acne-Inducing Bacteria.” *Journal of Ehtnophamacology*. 101(1) : 330-333.

Diwan, P.D. and Gadhikar, Y.A. 2012. “Assessment of Phytochemical Composition and Antibacterial Activity of Different Extracts of *Barleria prionitis* Leaves Against Oral to Improve Dental Hygiene.” *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 5(2) : 182-184.

Gambhire, M. Juvekar, A. and Wankhede, S. 2008. “*Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Methanol Extract of Barleria cristata Leaves by In-Vivo and In-Vitro Methods.”* [Online]. Available : https://ispub.com/IJPHARM/7/1/13438.

Herijden, A.G.V.D. Jansen, C.F.J. Verhageh, G. O’Donnell, M.A. Schalken, J.A. and Witjes, J.A. 2004. “The Effect of Hyperthermia on Mitomycin-C Induced Cytotoxicity in Four Human Bladder Cancer Cell Lines.” *European Urology*. 46(5) : 670-674.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Jaiswal, S.K. Kubey, M.K. Das, S. and Rao, C.V. 2014. “Gastroprotective Effect of the Iridoid Fraction from *Barleria prionitis* Leaves on Experimentally-Induced Gastric Ulceration.” *Chinese Journal of Natural Medicines*. 12(10) : 738-744.

Karan, M. Kawal, P. and Vasisht, K. 2013. “Topical Anti-Inflammatory Studies on *Barleria prionitis* and *B. cristata*.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 31(31) : 1164-1169.

Khare, C.P. 2009. **Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary**. New York : Springer Verlag.

Kuo, C.C. Chen, J.J. Tsai, J.Y. and Hsueh, C.T. 2014. “Effects of Chinese Herbal Medicine in Combination with Mitomycin C on Gastric Cancer Cells.” *Biomarker Research*. 2(1) : 26-31.

Manjusha. Kumar, V. and Singh, S. 2013. “Gastroprotective Activity of Methanol Leaves Extract of *Barleria prionitis* Linn. on Ethanol and Indonethacin Induced Ulcer in Rats.” *British Journal of Pharmaceutical Research*. 3(4) : 817-829.

Mosmann, T. 1983. “Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.” *Journal of Immunologocal Method*. 65(1) : 55-63.

Meyer, J.J.M. Kooy, F.V.D. and Joubert, A. 2007. “Identification of Plumbagin Epoxide as a Germination Inhibitory Compound Through a Rapid Bioassay on TLC.” *South African Journal of Botany*. 73 : 654-656.

Nomura, N. Saijo, K. Kato, M. Wang, P. Ohno, T. and Matsumura, M. 1996. “Improved MTT (3-(4,5-dimethylthizaol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) Assay for the Measurement of Viable Animal Cell Number in Porous Cellulose Carriers.” *Biotechnology Techniques*. 10(11) : 883-888.

Ortiz-Andrade, R. Cabanas-Wuan, A. Arana-Argaez, V.E. Alonso-Castro, A.J. Zapata-Bustos, R. Salazar-Olivo, L.A. Domınguez, F. Chavez, M. Carranza-A lvarez, C. and Garcıa-Carranca, A. 2012. “Antidiabetic Effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae).” *Journal of Ethnopharmacology*. 143(2) : 455-462.

Padron, J.M. Wilt, C.L. Smid, K. Wilms, E.S. Backus, H.H.J. Pizao, P.E. Giaccone, G. and Peters, G.J. 2000. “The Multilayered Postconfluent Cell Culture as a Model for Drug Screening.” *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 36(1) : 141-157.

Rajesh, S.V. Kumar, T.S. and Rao, V. 2012. “Phytochemical and Antibacterial Studies on *Leucas vestita* Wall ex Benth.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2(3) : 1707-1710.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Salib, J.Y. Shafik, N.H. Michael, H.N. and Eskander, E.F. 2013. "Antibacterial Activity of *Barleria cristata* Bark Extracts." *Journal of Applied Sciences Research*. 9(3) : 2156-2159.

Sarker, S.D. and Nahar, L. 2012. **Natural Products Isolation : Methods in Molecular Biology.** 3rd edition. Wolverhampton : Humana Press.

Shukla, P. Singh, A. Gawri, S. Alexande, A. and Sonwane, S. 2011. "*In Vitro* Propagation of *Barleria prionitis* Linn and its Antibacterial Activity." *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2(1) : 198-200.

Singh, R. Rajasree, P.H. and Sankar, C. 2012. "Screening for Anti-Diabetic Activity of the Ethanolic Extract of *Barleria cristata* Seeds." *International Journal of Pharmaceutical Life Science.* 3(10) : 2044-2047.

Siriwatanametanon, N. Fiebich, B.L. Efferth, T. Prieto, J.M. and Heinrich, M. 2010. "Traditionally used Thai Medicinal Plants: *In-Vitro* Anti-Inflammatory, Anticancer and Antioxidant Activities." *Journal of Ethnopharmacology*. 130(2) : 196–207.

Suba, V. Murugesan, T. Arunachalam, G. Mandal, S.C. and Saha, B.P. 2004. "Anti-Diabetic Potential of *Barleria lupulina* Extract in Rats." *Phytomedicine.* 11(2) : 202-205.

Smyth, W.F. Smyth, T.J.P. Ramachandran, V.N. O'Donnell, F. and Brooks, P. 2012. "Dereplication of Phytochemicals in Plants by LC-ESI-MS and ESI-MS^n." *Trends in Analytical Chemistry*, 33(1) : 46-54.

Tonder, A.V. Joubert, A.M. and Cromarty, A.D. 2015. "Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) Assay When Compared to Three Commonly Used Cell Enumeration Assays." *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*. 47(8) : 47-57.

Verma, P.K. Sharma, A. Joshi, S.C. Gupta, R.S. and Dixit, V.P. 2005. "Effect of Isolated Fractions of *Barleria prionitis* Root Methanolic Extract on Reproductive Function of Male Rats: Preliminary Study." *Fitoterapia*. 76(5) : 428–432.

Wang, Y.W. Ren, J.H. XIA, K. Wang, S.H. Yin, T.F. Ding-hua Xie, D.H. Li, L.H. 2012. "Effect of Mitomycin on Normal Dermal Fibroblast and HaCat Cell: an *In-Vitro* Study." *Journal of Zhejiang University-Science (Biomedicine & Biotechnology).* 13(12) : 997-1005.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Wanichacheewa, S. Singtripop, T. Sassa, S. Sakamoto, S. and Mori, T. 2001. "Decrease in the Number of Sperm Associated with Decreased Blood Testosterone Levels in Male Rats Treated with Extracts from Seven Plants Consumed by Natives of Northern Thailand." *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 10(1) : 1-4.

Yaacob, N.S. Hamzah, N. Nursyazni, N. Kamal, N.M. Abidin, S.A.Z. Lai, C.S. Navaratnam, V. and Norazmi, M.N. 2010. "Anticancer Activity of a Sub-Fraction of Dichloromethane Extract of *Strobilanthes crispus* on Human Breast and Prostate Cancer Cells *In-Vitro*." *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*. 10(42) : 42-56.

Yadav, S.A. Raj, A.J. and Sathishkumar, R. 2012. "*In-Vitro* Antioxidant Activity of *Barleria noctiflora* L.f." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 8(2) : 716-722.

[Online]. Available : http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์ไลน์

สูตรอาหาร Mueller-Hinton Agar (Himedia)

ใช้อาหารสูตรสำเร็จ Mueller-Hinton Broth (MHB) แล้วเติมวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายอาหารด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรอาหาร RPMI-1640 (GIBCO)

เติมอาหารผง RPMI-1640 ลงไปในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติม $NaHCO_3$ จำนวน 2 กรัม กวนอาหารให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน กรองโดยใช้แผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม complete media

อาหาร RPMI-1640 ที่เตรียมแล้ว	100	มิลลิลิตร
fetal bovine serum (FBS)	ร้อยละ 8	ปริมาตรต่อปริมาตร
gentamicin	50	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผสมอาหาร RPMI-1640 กับ FBS แล้วเติมยาปฏิชีวนะ gentamicin (ขนาดบรรจุ 80 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร) ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กรองโดยใช้แผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและการนับจำนวนเซลล์ไลน์

การเตรียมสารละลาย PBS (phosphate buffer saline)

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
KH_2HPO_2	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	2.9	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ค่อยๆ ละลายสารเคมีทั้งหมดทีละตัว แล้วจึงนำมารวมกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมเอนไซม์ทริปซิน 0.25 เปอร์เซ็นต์

Trypsin	0.25	กรัม
EDTA	3.74	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

นำ trypsin และ EDTA ละลายในสารละลาย PBS ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร กรองโดยใช้แผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งผง MTT 40 มิลลิกรัม ละลายใน PBS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย mitomycin C ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมโดยใช้ mitomycin C ชนิดผงที่มีขนาดบรรจุ 2 มิลลิกรัมต่อ 1 ขวด เติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยห้ามโดนแสง

การเตรียม McFarland Standard No.0.5

เตรียมสารละลายแบเรียมคลอไรด์	ความเข้มข้น	0.048	โมลต่อลิตร
เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอลิก	ความเข้มข้น	0.180	โมลต่อลิตร

นำสารละลายแบเรียมคลอไรด์ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดไฮโดรคลอลิก ปริมาณ 99.5 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดใส

การเตรียมสารละลาย anisaldehyde reagent

เตรียมสารผสมระหว่างสารละลาย ethanol : anisaldehyde : sulfuric acid : water ในอัตราส่วน 90 : 2 : 3 : 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บในขวดสีชา

ภาคผนวก ข (ต่อ)

การเตรียมสารเคมีและการนับจำนวนเซลล์ไลน์

การนับเซลล์ด้วยวิธีทริปแพนบลู (trypan blue exclusion)

1. ถ่ายเซลล์ไลน์ที่ต้องการนับออกจากขวดเพาะเลี้ยง นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
2. เจือจางเซลล์ไลน์ที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว ลงในอาหาร RPMI-1640 ที่มีปริมาตรประมาณ 2 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
3. แล้วดูดเซลล์ไลน์ในข้อ 2. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาย้อมด้วยสีทริปแพนบลู ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยผสมเซลล์ไลน์กับสีย้อมให้เข้ากัน
4. ดูดเซลล์ไลน์ที่ย้อมด้วยสีทริปแพนบลูแล้ว มาหยอดลงในแอ่งของฮีมาไซโตมิเตอร์ทั้ง 2 ด้าน ด้านละ 10 ไมโครลิตร

3. นับเซลล์ไลน์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเซลล์ไลน์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีฟ้าของทริปแพนบลู นับเซลล์ไลน์ที่อยู่ใน 5 ช่องใหญ่ของฮีมาไซโตมิเตอร์ในแต่ละด้าน แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยของเซลล์ไลน์ที่มีชีวิตที่นับได้

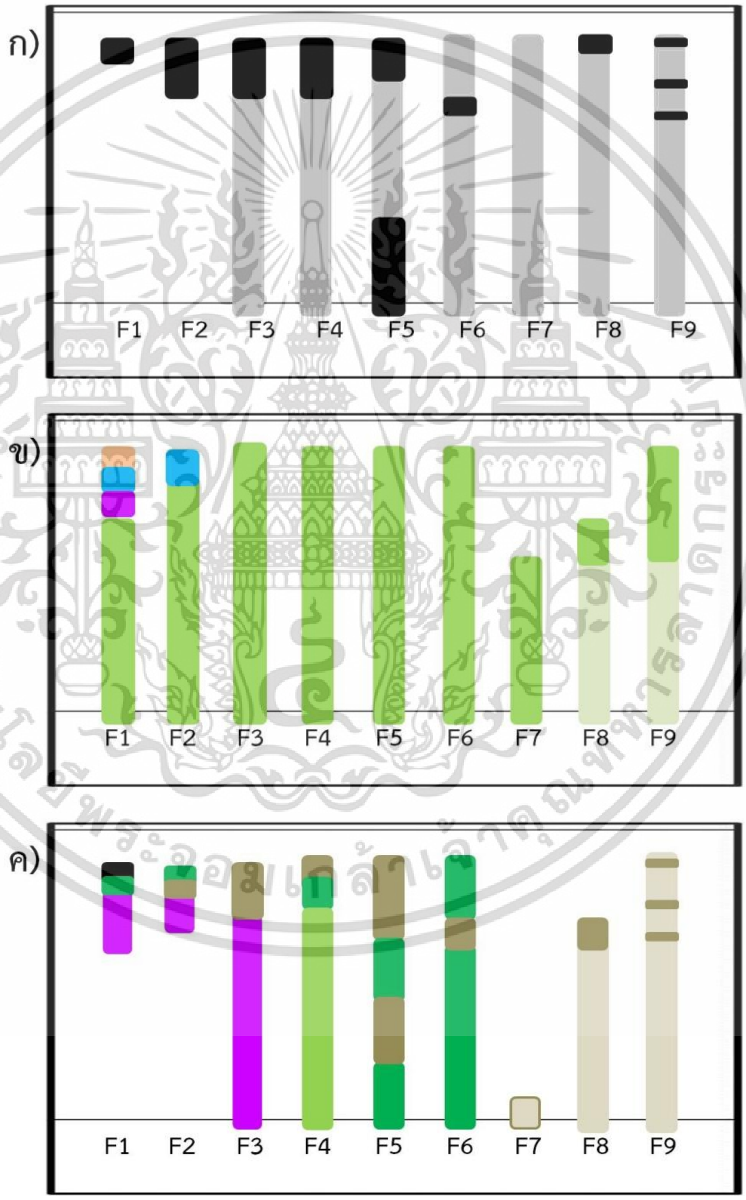
4. คำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ดังสูตรต่อไปนี้
จำนวนเซลล์ไลน์ที่มีชีวิต (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
= ค่าเฉลี่ยของเซลล์ไลน์ที่มีชีวิต x 10^4 x ค่าความเจือจาง (dilution factor)

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลอง

ลักษณะสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของสารส่วนย่อยต่างๆ

ผลการตรวจสอบสารส่วนย่อยที่ 1-9 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบด้วยเทคนิคทิลเลเยอร์โครมาโตกราฟี เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 (รูปที่ ค-1ก) และ 366 นาโนเมตร (รูปที่ ค-1ข) และเมื่อป้ายด้วยสาร anisaldehyde reagent (รูปที่ ค-1ค)

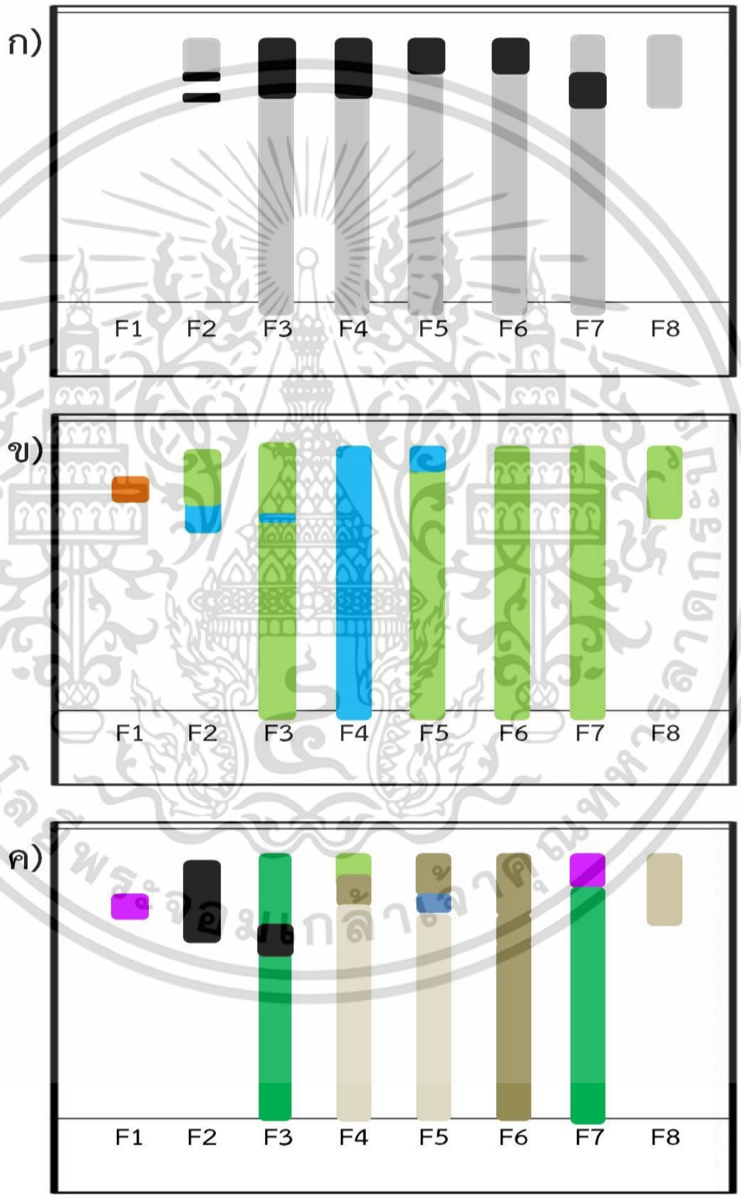

ก)
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9
ข)
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9
ค)
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9

รูปที่ ค-1 แสดงลักษณะสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของสารส่วนย่อยที่ 1-9 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบ

ภาคผนวก ค (ต่อ)

ข้อมูลผลการทดลอง

ผลการตรวจสอบสารส่วนย่อยที่ 1-8 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณี ด้วยเทคนิคทิลเลเยอร์โครมาโตกราฟี เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 (รูปที่ ค-2ก) และ 366 นาโนเมตร (รูปที่ ค-2ข) และเมื่อป้ายด้วยสาร anisaldehyde reagent (รูปที่ ค-2ค)


ก)
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
ข)
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
ค)
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8

รูปที่ ค-2 แสดงลักษณะสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของสารส่วนย่อยที่ 1-8 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณี

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ในการทดสอบ ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของประชากรที่มากกว่า 2 กลุ่มขึ้นไป ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัย คือ สารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบอังกาบ ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ และชนิดของเซลล์ไลน์ โดยมีสมมติฐานการทดลอง ดังนี้

H_0 : ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบอังกาบ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

H_1 : มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารสกัดหยาบจากใบอังกาบชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ตารางที่ ง-1 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบของสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบอังกาบ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	216513.69[a]	174	1244.33	9.75	0.00
Intercept	348537.28	1	348537.28	2729.87	0.00
crude * concentration	12532.84	16	783.30	6.14	0.00
crude * cell	27670.06	24	1152.92	9.03	0.00
concentration * cell	2216.79	24	92.37	0.72	0.82
crude * concentration * cell	11656.68	96	121.42	0.95	0.60
Error	22343.23	175	127.68		
Total	587394.21	350			
Corrected Total	238856.93	349			

a. R Squared = 0.91 (Adjusted R Squared = 0.81)

ภาคผนวก ง (ต่อ)
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

จากตารางที่ ง-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อพิจารณาจากอิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัย พบว่ามีค่าสถิติ F = 0.95 และมีค่า Sig. = 0.60 ซึ่งมากกว่า α = 0.05 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัยที่ทำการทดสอบ จึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบกับสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงต้องพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย ดังนี้

1.1 พิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดกับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยมีสมมติฐานการทดลองดังนี้

H_0 : ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารสกัดหยาบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

H_1 : มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารสกัดหยาบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

จากตารางที่ ง-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย พบว่ามีค่าสถิติ F = 6.14 และมีค่า Sig. = 0.00 ซึ่งน้อยกว่า α = 0.05 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารสกัดหยาบกับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์ทุกชนิดร่วมกับสารสกัดหยาบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์อย่างน้อย 1 คู่ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.2 พิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลายกับเซลล์ไลน์แต่ละชนิด โดยมีสมมติฐานการทดลองดังนี้

H_0 : ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารสกัดหยาบแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน

H_1 : มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารสกัดหยาบแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน

จากตารางที่ ง-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย พบว่ามีค่าสถิติ F = 9.03 และมีค่า Sig. 0.00 ซึ่งน้อยกว่า α = 0.05 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างสารสกัดหยาบแต่ละชนิดกับชนิดของเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบ จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์แต่ละชนิดร่วมกับสารสกัดหยาบในแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์อย่างน้อย 1 คู่ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาคผนวก ง (ต่อ)
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1.3 พิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นที่แตกต่างกันกับชนิดของเซลล์ไลน์ โดยมีสมมติฐานการทดลองดังนี้

H_0 : ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

H_1 : มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากตารางที่ ง-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย พบว่ามีค่าสถิติ F = 0.72 และมีค่า Sig. = 0.82 ซึ่งมากกว่า α = 0.05 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกับชนิดของเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบ จึงยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์แต่ละชนิดร่วมกับสารสกัดหยาบในแต่ละความเข้มข้น ไม่ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบแต่ละชนิดด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Tange Test (DMRT) (ตารางที่ ง-2) พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอลมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์สูงที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตท และไดคลอโรมีเทน ส่วนสารสกัดหยาบเฮกเซนและน้ำมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ ง-2 ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี DMRT

crude	N	Subset			
		1	2	3	4
water	70	15.81			
hexane	70	16.85			
dichloromethane	70		27.93		
ethyl acetate	70			38.03	
butanol	70				59.16
Sig.		0.59	1.00	1.00	1.00

ภาคผนวก ง (ต่อ)
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

2. วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัย คือ สารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบสังกรณี ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ และชนิดของเซลล์ไลน์ โดยมีสมมติฐานการทดลอง ดังนี้

H_0 : ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบสังกรณี ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

H_1 : มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบสังกรณี ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ตารางที่ ง-3 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบของสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบสังกรณี ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	87438.54[a]	174	502.52	5.55	0.00
Intercept	157611.98	1	157611.97	1740.41	0.00
crude * concentration	9326.17	16	582.89	6.44	0.00
crude * cell	17081.57	24	711.73	7.86	0.00
concentration * cell	6406.75	24	266.95	2.95	0.00
crude * concentration * cell	11988.84	96	124.88	1.38	0.03
Error	15848.04	175	90.56		
Total	260898.55	350			
Corrected Total	103286.58	349			

a. R Squared = 0.85 (Adjusted R Squared = 0.69)

ภาคผนวก ง (ต่อ)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

จากตารางที่ ง-3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อพิจารณาจากอิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัย พบว่า มีค่าสถิติ F = 1.38 และมีค่า Sig. = 0.03 ซึ่งน้อยกว่า α = 0.05 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัยที่ทำการทดสอบ จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่า เมื่อบ่มเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบกับสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบสังกรณี ในแต่ละความเข้มข้น ทำให้มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบอย่างน้อย 1 คู่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีแต่ละชนิดด้วยวิธี DMRT (ตารางที่ ง-4) พบว่าสารสกัดหยาบบิวทานอล มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์สูงที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน ส่วนสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตท และเฮกเซน มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดหยาบน้ำมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ

ตารางที่ ง-4 ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี DMRT

crude	N	Subset			
		1	2	3	4
water	70	13.96			
ethyl acetate	70		19.10		
hexane	70		19.89		
dichloromethane	70			23.47	
butanol	70				29.69
Sig.		1.00	0.62	1.00	1.00

3. วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้สารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัย คือ สารส่วนย่อยต่างๆ ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ และชนิดของเซลล์ไลน์ โดยมีสมมติฐานการทดลอง ดังนี้

ภาคผนวก ง (ต่อ)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

H_0 :ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบที่ความเข้มข้นต่างๆ

H_1 :มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ ง-5 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบของสารสกัดสกัดส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบที่ความเข้มข้นต่างๆ

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	420913.21[a]	314	1340.49	14.95	0.00
Intercept	497116.03	1	497116.03	5544.30	0.00
fracrion * concentration	46949.01	32	1467.16	16.36	0.00
fracrion * cell	57259.53	48	1192.91	13.30	0.00
concentration * cell	12814.17	24	533.92	5.96	0.00
fracrion * concentration * cell	32126.64	192	167.33	1.87	0.00
Error	28243.70	315	89.66		
Total	946272.95	630			
Corrected Total	449156.92	629			

a. R Squared = 0.94 (Adjusted R Squared = 0.87)

จากตารางที่ ง-5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อพิจารณาจากอิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัย พบว่ามีค่าสถิติ F = 1.87 และมีค่า Sig. = 0.00 ซึ่งน้อยกว่า α = 0.05 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัยที่ทำการทดสอบ จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบกับสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบในแต่ละความเข้มข้น ทำให้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบอย่างน้อย 1 คู่

เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบด้วยวิธี DMRT พบว่าสารส่วนย่อยที่ 3 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์สูงที่สุด (ตารางที่ ง-6)

ภาคผนวก ง (ต่อ)
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ง-6 ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบด้วยวิธี DMRT

fracrion	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
F8	70	13.03					
F9	70	15.07	15.07				
F7	70		16.57				
F6	70			21.61			
F1	70				30.74		
F2	70				32.21	32.21	
F4	70				32.38	32.38	
F5	70					35.04	
F3	70						56.16
Sig.		0.20	0.35	1.00	0.34	0.10	1.00

4. วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณี

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัย คือ สารส่วนย่อยต่างๆ ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ และชนิดของเซลล์ไลน์ โดยมีสมมติฐานการทดลอง ดังนี้

H_0 :ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีที่ความเข้มข้นต่างๆ

H_1 :มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ในสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาคผนวก ง (ต่อ)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ง-7 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีที่ความเข้มข้นต่างๆ

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	200253.45[a]	279	717.75	9.99	0.00
Intercept	205802.22	1	205802.22	2865.62	0.00
fraction * concentration	17376.42	28	620.59	8.64	0.00
fraction * cell	51766.50	42	1232.54	17.16	0.00
concentration * cell	10605.75	24	441.91	6.15	0.00
fraction * concentration * cell	25145.01	168	149.67	2.08	0.00
Error	20108.97	280	71.82		
Total	426164.64	560			
Corrected Total	220362.42	559			

a. R Squared = 0.91 (Adjusted R Squared = 0.82)

จากตารางที่ ง-7 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อพิจารณาจากอิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัย พบว่ามีค่าสถิติ F = 2.08 และมีค่า Sig. = 0.00 ซึ่งน้อยกว่า α = 0.05 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัยที่ทำการทดสอบ จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบกับสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำให้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบอย่างน้อย 1 คู่

เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อยจากใบสังกรณีด้วยวิธี DMRT พบว่าสารส่วนย่อยที่ 4 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์สูงที่สุด (ตารางที่ ง-8)

ภาคผนวก ง (ต่อ)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ง-8 ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีด้วยวิธี DMRT

fraction	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
F3	70	8.72					
F1	70		12.99				
F8	70			17.56			
F7	70			18.13			
F6	70			20.09	20.09		
F2	70				21.15	21.15	
F5	70					23.41	
F4	70						31.32
Sig.		1.00	1.00	0.10	0.46	0.11	1.00

5. วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ

เนื่องจากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบอังกาบ พบว่ามีเพียงสารสกัดหยาบบิวทานอลเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบ เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมของ 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบ และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ โดยมีสมมติฐานการทดลอง ดังนี้

H_0 :ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบที่ความเข้มข้นต่างๆ

H_1 :มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาคผนวก ง (ต่อ)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ง-9 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบที่ความเข้มข้นต่างๆ

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4041.90[a]	24	168.41	151.55	0.00
Intercept	3045.94	1	3045.94	2740.99	0.00
concentration	730.80	4	182.70	164.41	0.00
bacteria	2872.17	4	718.04	646.15	0.00
concentration * bacteria	438.93	16	27.43	24.69	0.00
Error	55.56	50	1.11		
Total	7143.41	75			
Corrected Total	4097.46	74			

a. R Squared = 0.99 (Adjusted R Squared = 0.98)

จากตารางที่ ง-9 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อพิจารณาจากอิทธิพลร่วมของ 2 ปัจจัย พบว่ามีค่าสถิติ F = 24.69 และมีค่า Sig. = 0.00 ซึ่งน้อยกว่า α = 0.05 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยที่ทำการทดสอบ จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่าเมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบอังกาบที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำให้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบอย่างน้อย 1 คู่

6. วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี

เนื่องจากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ จากใบสังกรณี พบว่ามีเพียงสารสกัดหยาบบิวทานอลเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณี เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมของ 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบ และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ โดยมีสมมติฐานการทดลอง ดังนี้

ภาคผนวก ง (ต่อ)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

H_0 :ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีที่ความเข้มข้นต่างๆ

H_1 :มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ ง-10 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบของสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีที่ความเข้มข้นต่างๆ

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2534.19[a]	24	105.59	1073.55	0.00
Intercept	712.65	1	712.65	7245.53	0.00
concentration	124.91	4	31.23	317.49	0.00
bacteria	2133.31	4	533.33	5422.36	0.00
concentration * bacteria	275.96	16	17.25	175.36	0.00
Error	4.92	50	0.10		
Total	3251.75	75			
Corrected Total	2539.10	74			

a. R Squared = 1.00 (Adjusted R Squared = 1.00)

จากตารางที่ ง-10 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อพิจารณาจากอิทธิพลร่วมของ 2 ปัจจัย พบว่ามีค่าสถิติ F = 175.36 และมีค่า Sig. = 0.00 ซึ่งน้อยกว่า α = 0.05 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยที่ทำการทดสอบ จึงปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แสดงว่าเมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยสารสกัดหยาบบิวทานอลจากใบสังกรณีที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำให้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบอย่างน้อย 1 คู่

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวณัฐพร มานะประดิษฐ์
วัน เดือน ปีเกิด	24 ธันวาคม พ.ศ. 2530
ที่อยู่	บ้านเลขที่ 20/4 หมู่ 2 ตำบลโคกเพลาะ อำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี รหัสไปรษณีย์ 20140
การศึกษา	2549 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เกรดเฉลี่ย 2.78 2555 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษา	ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ ครั้งที่ 2 ประจำปีงบประมาณ 2558
ผลงานวิจัยตีพิมพ์	1. ณัฐพร มานะประดิษฐ์ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และ พัชนี เจริญยิ่ง. 2556. “ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี.” หน้า 192-195. ใน **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18 “พันธุศาสตร์ก้าวหน้าสู่อาเซียน”** 2. Manapradit N., Poeaim S. and Charoenying P. 2014. “Cytotoxicity and antimicrobial activities of leaf extracts from *Barleria strigosa*.” The 3rd International Conference on Integration of Science and Technology. 27-28 November, pp. 40-50.