รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ *Jatropha curcas* L. ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เซลล์ไลน์มะเร็งตับ และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน

Cytotoxic effect of *Jatropha curcas* L. leaf extract on Human colon adenocarcinoma, Hepatocellular carcinoma and African green monkey kidney fibroblast

นายเมธิณ ใจเกื้อ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ *Jatropha curcas* L. ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เซลล์ไลน์มะเร็งตับ และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน

Cytotoxic effect of *Jatropha curcas* L. leaf extract on Human colon adenocarcinoma, Hepatocellular carcinoma and African green monkey kidney fibroblast

นายเมธิณ ใจเกื้อ

1273651X

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ *Jatropha curcas* L. ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เซลล์ไลน์มะเร็งตับ และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน

แหล่งเงิน ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ 2557 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2556 ถึง 31 กันยายน 2557

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ นายเมธิณ ใจเกื้อ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศสตร์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ *Jatropha curcus* L. ในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เซลล์ไลน์มะเร็งตับ และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน โดยเทคนิคการย้อมสี MTT เซลล์ถูกบ่มในสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ไลน์จะถูกบ่มในสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ (31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นาน 24 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มควบคุมเชิงบวกคือ Vinblastine sulfate salt ซึ่งเซลล์ไลน์ถูกบ่มที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.0024, 0.0097, 0.039, 0.156, 0.625, 2.5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ผลการวิจัยแสดงค่าเป็น CC50 (ความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50) ของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล โดยเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นดังนี้ 646.241 1,134.058 และ 1,573.781 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เซลล์ไลน์มะเร็งตับ ดังนี้ >2,000 1,220.979 และ >2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน ดังนี้ 1,150.619 808.963 และ >2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีสาร Vinblastine sulfate salf เป็นสารเปรียบเทียบ (CC50 ของเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เซลล์ไลน์มะเร็งตับ และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน ดังนี้ 1.157 0.594 และ 1.645 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ซึ่งสารสกัดหยาบทั้งหมดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็วลำไส้ใหญ่สูง ส่วนสารต้านมะเร็งมีความเป็นพิษสูงที่สุดต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับโดยเปรียบเทียบกับสารทั้งหมด ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาด้านเภสัชวิทยาต่อไป

คำสำคัญ : สบู่ดำ, เซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่, เซลล์ไลน์มะเร็งตับ, เซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Cytotoxic effect of Jatropha curcas L. leaf extract on Human colon adenocarcinoma, Hepatocellular carcinoma and African green monkey kidney fibroblast

Researcher: Mathin Jaikua

Faculty: Faculty of science

Department: Scientific instruments centre

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the Cytotoxic effect of *Jatropha curcas* L. leaf extract on Human colon adenocarcinoma, Hepatocellular carcinoma and African green monkey kidney fibroblast by MTT assay, after 24 h of incubation. Cell line were treated with different concentrations of these extracts (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 and 2,000 µg/ml) for 24 h of exposure. Vinblastine sulfate salt was used as positive control and was treated with the different concentrations (0.0024, 0.0097, 0.039, 0.156, 0.625, 2.5 and 10 µg/ml) against cell line. The results showed that the CC_{50} values (50% cytotoxicity concentration) of crude hexane, dichloromethane and ethanol extracts of *Jatropha curcas* L., Human colon Adenocarcinoma cell line were 646.241, 1,134.058 and 1,573.781 µg/ml, respectively, Hepatocellular carcinoma cell line were >2,000, 1,220.979 and >2,000 µg/ml, respectively, and African green monkey kidney fibroblast cell line were 1,150.619, 808.963 and >2,000 µg/ml, respectively, with reference to Vinblastine sulfate salt (CC_{50} of Human colon adenocarcinoma, Hepatocellular carcinoma and African green monkey kidney fibroblast were 1.157, 0.594 and 1.645 µg/ml, respectively). Effect of *Jatropha curcas* L. leaf extract were highest on Human colon adenocarcinoma. And Vinblastine sulfate salt were highest toxic on Hepatocellular carcinoma. This study will be basis for further studies in pharmacology.

Keywords : *Jatropha curcas* L., HT-29, HepG2, Vero

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ซึ่งทางผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาประจำห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณกีรติ ภัทรโชคชัย คุณบุญส่ง พูนสกุล และคุณพงศกร ลีลาวรวุฒิ ที่มีส่วนช่วยในการเตรียมวัตถุดิบ การสกัดสาร และข้อมูลของวัตถุดิบต่างๆ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ฝ่ายต่างๆ ของคณะวิทยาศาสตร์ ที่มีส่วนช่วยในการสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เมธิณ ใจเกื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญภาพ ..... ช

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นสบู่ดำ 3

2.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสบู่ดำ 5

2.3 เซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) 7

2.4 เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) 8

2.5 เซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) 8

2.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 9

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 10

3.1 วัตถุดิบ 10

3.2 อุปกรณ์ 10

3.3 สารเคมี 11

3.4 การเตรียมสารสกัดหยาบ 12

3.5 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ 13

3.6 การเพิ่มปริมาณเซลล์ไลน์ HT-29,HepG2 และ Vero 14

3.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ 14

3.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ของสารต้านมะเร็ง 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัย 17

4.1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ 17

4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ
ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) 17

4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ
ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) 20

4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ
ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) 23

4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt)
ร้อยละ 50 ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29)
เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) 26

บทที่ 5 สรุปผลวิจัย 30

5.1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ 30

5.2 ความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (CC_{50}) 30

เอกสารอ้างอิง 32

ภาคผนวก 33

ข้อมูลดิบและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 33

ประวัตินักวิจัย 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 สารสกัดจากส่วนต่างๆ ของสบู่ดำที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรค 5

4.1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล 17

4.2 ผลการเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำหลังจากบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง 19

4.3 ผลการเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำหลังจากบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง 22

4.4 ผลการเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำหลังจากบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง 25

4.5 ผลการเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) หลังจากบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง 28

4.6 ผลการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษร้อยละ 50 ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) 29

ก-1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ 33

ก-2 ร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำลำลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่(HT-29) หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมง 33

ก-3 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบกันระหว่างร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 35

ก-4 การเปรียบเทียบค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ แต่ละความเข้มข้นต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี Ducan's new multiple range test และใช้โปรแกรม SPSS 16.0 36

ก-5 ร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมง 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ก-6 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบกันระหว่างร้อยละความเป็นพิษ ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 39

ก-7 การเปรียบเทียบค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ ในตัวทำละลายต่างๆ แต่ละความเข้มข้นต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี Ducan's new multiple range test และใช้โปรแกรม SPSS 16.0 40

ก-8 ร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมง 41

ก-9 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบกันระหว่างร้อยละความเป็นพิษ ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์ไตของ ลิงแอฟริกัน (Vero) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 43

ก-10 การเปรียบเทียบค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ ในตัวทำละลายต่างๆ แต่ละความเข้มข้นต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี Ducan's new multiple range test และใช้โปรแกรม SPSS 16.0 44

ก-11 ร้อยละความเป็นพิษของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) ต่อเซลล์ไลน์ มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมง 45

ก-12 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบกันระหว่างร้อยละความเป็นพิษของ สารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 47

ก-13 การเปรียบเทียบค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) แต่ละความเข้มข้นต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ต้นสบู่ดำ 3
2.2 เซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) 7
2.3 เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) 8
2.4 เซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันในสังคมไทยและสังคมโลกมีประชากรอาศัยอยู่จำนวนมาก และมีแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เศรษฐกิจ และสังคม ตลอดจนพฤติกรรมและค่านิยมของการบริโภคสินค้าที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ผู้ผลิตมีการคิดพัฒนาเทคโนโลยีให้มีความก้าวหน้าทันสมัยเพื่อตอบสนองความต้องการของมนุษย์ แต่การพัฒนาเหล่านั้นไม่ได้ก่อให้เกิดผลในด้านดีเพียงอย่างเดียว แต่ยังส่งผลต่อการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างกว้างขวาง ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมขึ้นอาทิ มลพิษในสิ่งแวดล้อม อาหาร อากาศ แหล่งน้ำ การปนเปื้อนสารเคมีและเชื้อโรค ซึ่งปัญหาเหล่านี้ได้เพิ่มโอกาสให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพและเกิดโรคต่างๆ ร้ายแรง และที่พบเห็นเด่นชัดคือ โรคมะเร็ง ซึ่งโรงมะเร็งเป็นปัญหาที่สำคัญมากทั้งระดับประเทศและระดับโลก เนื่องจากเป็นโรคที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ การค้นคว้าหายาต้านมะเร็งใหม่ๆ จึงได้รับความสนใจจากนักวิจัยมากมาย เนื่องจากยาต้านมะเร็งที่มีอยู่ในขณะนี้มีฤทธิ์ข้างเคียงรุนแรง คือมีการทำลายเซลล์ปกติด้วย ซึ่งในระยะหลังๆ งานวิจัยจึงได้ให้ความสนใจสารสกัดจากธรรมชาติโดยเฉพาะพืชในตระกูลต่างๆ ที่พบว่าสามารถนำมาใช้ฆ่าเซลล์มะเร็งได้และมีผลกระทบต่อเซลล์ปกติน้อยมาก เช่น ใบสบู่ดำ ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติทางเคมีและสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของใบสบู่ดำที่สกัดมาจากเมทานอล พบว่ามีสาร flavonoid phenolic และ saponin ในระดับที่แตกต่างกัน โดยที่น้ำยางและสารสกัดที่ได้จากใบสบู่ดำจะมีสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

สบู่ดำจัดเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับมันสำปะหลัง ยางพารา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha Curcas* L. และมีชื่อสามัญคือ Physic nut เป็นพืชพื้นเมืองแถบทวีปอเมริกากลาง อเมริกาใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทย สบู่ดำจัดเป็นพืชที่มีศักยภาพสูงที่มีคุณสมบัติเป็นพืชน้ำมันที่สามารถใช้เป็นพลังงานทดแทนประเภทไบโอดีเซลได้ นอกจากนี้ส่วนประกอบต่างๆ ของต้นสบู่ดำมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคได้หลายชนิดดังเช่น ใช้ห้ามเลือด แก้ปวดฟัน ใช้รักษาโรคปากนกกระจอก แก้เหงือกบวมอักเสบ แผลในปาก สมานแผล ลดไข้ แก้ไอ เป็นต้น แต่เมล็ดสบู่ดำมีสารที่เป็นพิษรุนแรงซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ เช่น curcin curcasin phytosterol resin และสารกลุ่ม phorbol esters ที่มีผลต่อระบบทางเดินอาหารและระบบหายใจ (Amaugo and Emosairue, 2003) นอกจากนี้ สบู่ดำยังเป็นแหล่งของสารชีวโมเลกุลที่มีฤทธิ์ที่สำคัญต่อการรักษามะเร็ง อาทิ อัลคาลอยด์ saponin เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับโครงการวิจัยนี้ จะทำการสกัดใบสบู่ดำด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) และเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็ และเซลล์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ ผลการทดลองที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาด้านเภสัชวิทยาต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบสบู่ดำที่มีผลต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29), เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ซึ่งเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง

1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29), เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ของสารสกัดจากใบสบู่ดำ กับสารต้านมะเร็ง (Vinblastine)

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 เตรียมสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน (Hexane) ไดคลอโรมีเทน (Dichlorometane) และเอทานอล (Ethanol) ตามลำดับ

1.3.2 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29), เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ตามลำดับ

1.3.3 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine) ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29), เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษะทางพฤกษศาสตร์ของต้นสบู่ดำ (*Jatropha Curcas* L.)

สบู่ดำจัดเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับมันสำปะหลัง ยางพารา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha Curcas* L.และมีชื่อสามัญคือ Physic nut เป็นพืชพื้นเมืองแถบทวีปอเมริกากลาง อเมริกาใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งรวมถึงประเทศไทย รายงานว่า กรมวิชาการเกษตรได้รวบรวมพันธุ์สบู่ดำจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ เพื่อทำการคัดเลือกพันธุ์และผสมพันธุ์ โดยมีแปลงรวบรวมพันธุ์อยู่ที่สถานีทดลองพืชไร่ขอนแก่น และสถานีทดลองพืชไร่ร้อยเอ็ด จากการรวบรวมพันธุ์สบู่ดำที่พบในประเทศไทยมี 3 พันธุ์ คือ 1) พันธุ์สบู่ดำที่มีผลทรงกลม ขนาดของผลปานกลาง มีเปลือกหนาปานกลาง ปลูกกันโดยทั่วไปทั้ง 3 ภาค 2) พันธุ์สบู่ดำที่มีผลทรงกลม หรือทรงผลยาวกว่าชนิดแรกเล็กน้อยแต่มีเปลือกหนากว่า นิยมปลูกกันมากในภาคเหนือ3) พันธุ์สบู่ดำที่มีผลทรงกลม แต่มีขนาดเล็กกว่า 2 ชนิดแรกปลูกในภาคเหนือและภาคใต้

ภาพที่ 2.1 ต้นสบู่ดำ (*Jatropha Curcas* L.)
ก. ลักษณะของใบ ข. ลักษณะของเมล็ด ค. ลักษณะของต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้ประโยชน์ของสบู่ดำ (นวลฉวี และคณะ, 2553)

1. ยารักษาโรค

ส่วนต่างๆ ของต้นสบู่ดำมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคได้หลายชนิด มีฤทธิ์เป็นยาปฏิชีวนะและฆ่าเชื้อโรค เช่น น้ำยางจากก้านใบ รักษาโรคปากนกกระจอก ห้ามเลือด แก้ปวดฟัน แก้ลิ้นเป็นฝ้าขาว กระตุ้นการสร้างน้ำนมมารดา หรือนำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่น เช่น เบื่อปลา หรือเป็นของเล่น โดยเป่าน้ำยางสีขาวให้หลายเป็นฟองคล้ายสบู่ ส่วนลำต้นรักษาโรคซาง ตาลขโมย โรคพุพอง รากใช้เป็นยาขับถ่ายพยาธิ ขณะที่เมล็ดสามารถสกัดน้ำมัน มีสรรพคุณบำรุงรากผมให้แข็งแรง ปัจจุบันจึงใช้เป็นยาทาภายนอกแก้โรคผิวหนังและปวดตามข้อ และทาแผลของสัตว์เลี้ยง

2. การปลูกต้นสบู่ดำเพื่อนำไปใช้ประโยชน์

ปลูกต้นสบู่ดำเป็นรั้วล้อมรอบพื้นที่ปลูกพืชเศรษฐกิจหลักๆ เพื่อป้องกันวัว ควาย เข้ามาทำความเสียหายต่อพืชชนิดนั้น เนื่องจากวัว ควาย จะไม่กินใบหรือยอดอ่อนของสบู่ดำ นอกจากนี้อินเดียปลูกเป็นรั้วป้องกันลมร้อนในฤดูร้อนที่ทำให้มีการระเหยของน้ำอย่างรวดเร็ว ส่วนลูกสบู่ดำป้องกันการชะล้างของดิน (soil erosion) ในฤดูฝนของเขตพื้นที่แห้งแล้งซึ่งพบที่ Cape Verde เป็นพืชสบู่ดำ 14.6% ของจำนวนพื้นที่ทั้งหมด 4,462 เฮกแตร์ ส่วนในประเทศมาดากัสการ์พบว่าปลูกสบู่ดำสำหรับเป็นเสาค้างของพืชวนิลา

3. สารกำจัดแมลง

ในเมล็ดสบู่ดำมีสารพิษรุนแรงและเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์คือ curcin, curcasin, phytosterols, resin และสารในกลุ่ม phorbol esters ทำให้มีผลต่อระบบทางเดินอาหารและการหายใจ จึงมีการสกัดสารจากเมล็ดไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นสารชีวภาพกำจัดแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ลดการเข้าทำลายของหนอนเจาะต้นข้าว นอกจากนี้ยังพบว่าในลำต้นสบู่ดำมีสารพิษ หรือกรด Hydrocyanic ส่วนใบมีสารที่สามารถฆ่าแมลงได้เช่นกัน ในบางพื้นที่ของประเทอินเดียปลูกพืชสมุนไพร ได้แก่ Asgandh (*Withania somnifera*) แซมในระหว่างต้นสบู่ดำ สารเคมีจากต้นสบู่ดำจะปล่อยออกมาขับไล่แมลงศัตรูพืชของพืชสมุนไพร

4. อุตสาหกรรมน้ำมันและอื่นๆ

น้ำยางในเปลือกของลำต้น ใบ และต้นอ่อน สามารถนำมาสกัดเป็นหมึก สีย้อมผ้า ในอุตสาหรรมกรรมทอผ้า แห และด้าย ส่วนน้ำมันในเมล็ดมีคุณสมบัติในการติดไฟ จึงสามารถใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมันได้ ปัจจุบันพบว่านอกจากจะนำมาใช้ทำสบู่แล้ว สามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนกากที่เหลือจากการหีบน้ำมันใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ได้ เพราะมีอินทรียวัตถุสูงถึง 80% และมีธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืชสูงหลายชนิด ในบางประเทศใช้น้ำมันสบู่ดำในอุตสาหกรรม ผ้าขน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัตว์ ส่วนที่จังหวัดแพร่ใช้น้ำมันสบู่ดำหลังจากย้อมสีเส้นด้ายไม่ให้ติดกันอีกด้วย ต้นสบู่ดำสามารถนำมาทำกระดาษและไม้อัดได้ ใบสบู่ดำสามารถนำมาทำเชื้อเพลิงเขียว หมักเป็นปุ๋ย เลี้ยงไหม นอกจากนี้เมล็ดสบู่ดำบดเป็นผงสำหรับใช้เคลือบเครื่องหนังเป็นสีน้ำตาล (tanning) เปลือกของลำต้นและรากของสบู่ดำสามารถเป็นวัตถุดิบในการผลิตสีธรรมชาติได้ โดยส่วนเปลือกจะให้สีน้ำเงินเข้ม ส่วนรากจะให้สีเหลือง

5. การใช้เป็นอาหารของคน

มีรายงานว่าส่วนของใบอ่อนหรือยอดอ่อนเมื่อนำไปนึ่งด้วยไอน้ำร้อนแล้วสามารถนำมารับประทานได้อย่างปลอดภัย เมล็ดสบู่ดำจากบางพื้นที่ของประเทศแม็กซิโกเมื่อนำมาต้มและคั่วด้วยความร้อนสามารถนำไปรับประทานได้

6. การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์

สารสกัดจากส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ โดยภูมิปัญญาพื้นบ้านนำมาใช้เป็นยารักษาโรคของคนได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สารสกัดจากส่วนต่างๆ ของสบู่ดำที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรค

ส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ	สรรพคุณทางเภสัช
ต้น	ยาถ่าย
เปลือก	ย่าถ่าย ขับพยาธิ แก้ปวดท้อง
ใบและเนื้อไม้	แก้พิษตานซาน ถอนพิษที่ทำให้ตัวร้อน แก้ปากและลิ้นเปื่อยพุพอง แก้ลิ้นเป็นฝ้าละออง
เมล็ด	แก้ปวดตามข้อ แก้โรคผิวหนัง เป็นยาระบาย ยาถ่ายอย่างแรง
ยาง	แก้ปากเปื่อย พุพอง และแก้ลิ้นเป็นฝ้า

2.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสบู่ดำ (*Jatropha Curcas* L.)

กัลยาณี (2551) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากกากเมล็ดสบู่ดำ (*jatropha curcas* L.) โดยสกัดกากเมล็ดสบู่ดำด้วยตัวทำละลายเมธานอลบริสุทธิ์ (สารสกัด I), 80% เมธานอล (สารสกัด II), และ 60% เมธานอล (สารสกัด III) แล้วนำมาทำให้แห้งแล้วพบว่า ได้ร้อยละของสารสกัดเป็นร้อยละ 4.8, 2.1 และ 1.5 ตามลำดับ ทำการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Reagent (FCR) และหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และวิธี 1,10-phenanthroline พบว่า สารสกัด II ให้ค่า IC_{50} ต่ำสุด คือ 65 mg/l และจะให้ค่าใกล้เคียงกันกับสารสกัด I เป็น 67 และคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้าน DPPH พบว่า สารสกัด II จะมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์การต้านเท่ากับ 78, 82 และ 92 mg/l ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากกากเมล็ดสบู่ดำและเมื่อทดสอบการทำปฏิกิริยากับ 1,10-phenanthroline พบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเป็น 123, 78 และ 94 ppm Fe^{2+} ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากกากเมล็ดสบู่ดำ เช่นเดียวกับวิธี DPPH

สุวิมล และคณะ (2552) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสบู่ดำที่มีต่อหนอนเจาะสมอฝ้าย*Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) ทำการสกัดสารจากส่วนของเนื้อเมล็ดและกากสบู่ดำด้วยวิธีการสกัดหยาบ 2 วิธีคือ การแช่และกวนด้วยเครื่อง magnetic stirrer และการสกัดด้วยเครื่อง soxhlet extractor โดยใช้ ethanol และ petroleum ether เป็นตัวทำละลาย จะได้สารสกัดหยาบในรูปของน้ำมัน ไม่ละลายน้ำ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่มีต่อหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera* (Hübner)) วัย 2 โดยวิธี leaf-dipping method พบว่า สารสกัดหยาบจากทุกกรรมวิธีมีฤทธิ์ในการฆ่าหนอนเจาะสมอฝ้ายได้ค่อนข้างต่ำ คือสามารถฆ่าหนอนได้เพียง 0-58% แต่สารสกัดทั้งหมดสามารถยับยั้งการกินอาหารของหนอนเจาะสมอฝ้ายได้สูง โดยสารสกัดจากเนื้อเมล็ด ด้วยวิธีแช่และกวนใน petroleum ether และสารสกัดจากกากด้วยเครื่อง soxhlet extractor โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 5% สามารถยับยั้งการกินได้สูงถึง 95.6 และ 92.2% ตามลำดับ ส่วนสารสกัดวิธีอื่นสามารถยับยั้งได้77.8 - 89.7% นอกจากนั้นการทดสอบผลของการให้หนอนกินใบฝ้ายที่ผ่านการจุ่มสารสกัดที่มีต่อการวางไข่ของผีเสื้อยังพบว่า สารสกัดมีผลทำให้ผีเสื้อวางไข่ได้ลดน้อยลง และไข่มีอัตราการฟักต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

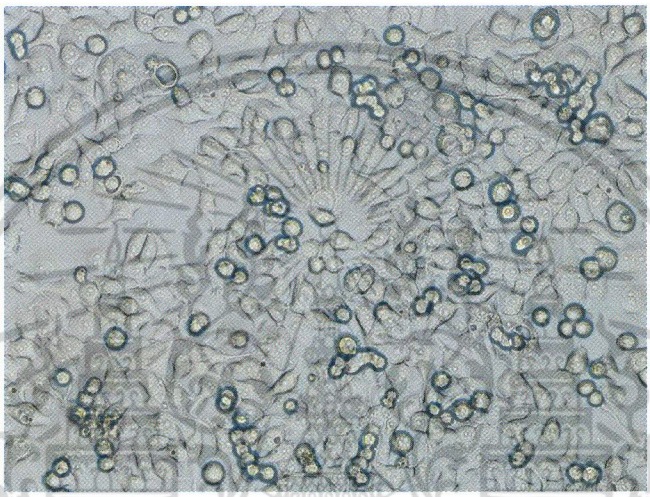
Igbinosa และคณะ (2009) ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของสารสกัดจากใบสบู่ดำมาใช้เป็นยา พบว่าสามารถนำสารสกัดมาใช้เป็นยาแก้อักเสบกับคนได้ซึ่งมีองค์ประกอบของเมนทอล นอกจากนี้สารสกัดจากเปลือกและต้นสบู่ดำ พบสาร Sponin, Steroid, Tannin, Glycoside, Alkaroid และ Flavonoid ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกลไกที่แตกต่างกัน

นวลฉวี และคณะ (2553) ศึกษาการโคลนและผลิตโปรตีนเคอร์ซินจากใบสบู่ดำ (*jatropha curcas*) เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในระดับโมเลกุล โดยทำการสกัดแยก RNA ทั้งหมดจากใบสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP78 และเปลี่ยนให้เป็น cDNA ที่สร้างเคอร์ซินโดยวิธี RT-PCR พบว่าโปรตีนเคอร์ซินที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเมมเบรนคัดกรองโมเลกุลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ที่ความเข้มข้นต่ำมาก และสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน Caspase 7 และ 9 ได้ตั้งแต่วันที่ 1 จนกระทั่งสูงสุดในวันที่ 3 และ 5 ตามลำดับ และพบว่ามีการกระตุ้นการแสดงออกของยีน Caspase 3 ได้ค่อนข้างช้าในวันที่ 3 แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน Caspase 8 จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเคอร์ซินสามารถกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ผ่าน caspase dependent pathway

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gawri และ Upadhyay (2012) ได้ศึกษาพฤกษเคมีของสบู่ดำพบว่ายางของใบสบู่ดำมีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งเต้านม ซึ่งมีสารประกอบ Alkaroid ที่เรียกว่า Jatrophine โดยยาง ใบ และผลมีองค์ประกอบของไกลโคไซด์ (Glycosides) หลายชนิด เช่น tannin, Phytosteroid, Flavanoid และ Sterodial ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติทางยาที่หลากหลายชนิด

2.3 เซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29)

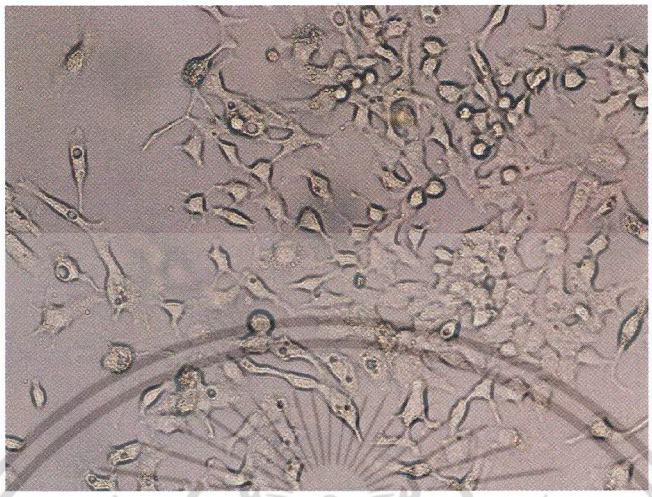


ภาพที่ 2.2 เซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29)

เซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (Human colon adenocarcinoma : HT-29) เกิดจากเนื้องอกชนิดรุนแรง (Malignant tumor) บริเวณเยื่อบุผิว (Epithelial cell) ที่เป็นเนื้อเยื่อต่อม (Glandular tissue) ซึ่งเกิดบริเวณรอยต่อของโคล่อน (Colon) และลำไส้ตรง (Rectum) และยังเป็นบริเวณที่เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2)



ภาพที่ 2.3 เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2)

เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (Hepatocellular carcinoma) เป็นเซลล์ที่ติดพื้นผิว (monolayer cell) มีลักษณะเป็นเซลล์ที่เป็นแผ่นชั้นเดียวบนภาชนะที่ใช้เลี้ยงและต้องอาศัยที่เกาะจึงจะสามารถเจริญแบ่งเซลล์ไปชนกับเซลล์ข้างๆ ได้ เมื่อชนแล้วจะไม่มีการแบ่งตัวอีก

2.5 เซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero)

ภาพที่ 2.4 เซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็น continuous cell line ที่ได้มาจากลิงแอฟริกัน สายพันธุ์ *Cercophithecus aetiops* โดย ยาซามุระ ในปี 1963 และชื่อ Vero นั้นมาจาก Verde (ภาษาฝรั่งเศสที่แปลว่า "เขียว") และ Reno (ภาษา ฝรั่งเศสที่แปลว่า "ไต") โดย Vero cell line มีลักษณะเป็นเซลล์เยื่อบุผิว และไม่ก่อเป็นเนื้องอก เป็นเซลล์ยึด เกาะพื้นผิว ไวต่อการติดเชื้อจากไวรัส

2.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด ใช้วิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) assay โดย MTT สามารถเข้าสู่เซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น โดยปกติ สารละลาย MTT มีสีเหลือง แต่เมื่อเข้าไปในเซลล์จะถูก reduce โดย mitochondrial dehydrogenase (succinate dehydrogenase) เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นผลึก formazan มีสีม่วง ต่อมาใส่สารละลายลงในเซลล์ เซลล์จะแตก ผลึก formazan ละลายออกมาเป็นสีม่วง ความเข้มของสีม่วงจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวน เซลล์มีชีวิต จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่นระหว่าง 550-600 nm ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ filter ที่มีในห้องทดลอง และควรจะมีค่า reference wavelength มากกว่า 600 nm (Buckberry, 2005; Edziri *et al*., 2011) นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่า % cytotoxicity จากสูตร ต่อไปนี้ (Valdivieso-Garcia และคณะ, 1993; Lamein *et al*., 2005)

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

A = ค่าการดูดกลืนแสงในหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงในหลุมที่มีเซลล์ในสารสกัดหยาบใบสบู่ดำแต่ละความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 สบู่ดำสายพันธุ์ *Jatropha Curcas* L.

3.1.2 เซลล์ไลน์

3.1.2.1 เซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) นำจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.2.2 เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) นำจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.2.3 เซลล์ไลน์ของไตลิงแอฟริกัน (Vero cell) นำจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ (incubator) ยี่ห้อ Contherm รุ่น 4150T

3.2.2 ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (laminar air flow hood) ยี่ห้อ Telstar รุ่น Bio II Advance 4

3.2.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HVE-50

3.2.4 เครื่องอบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ Contherm รุ่น 8150

3.2.5 ตู้เย็น (Refrigerator)

3.2.6 เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง

3.2.7 ชุดกรองสุญญากาศ

3.2.8 เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator)

3.2.9 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์พลาสติก (TC flask) ขนาดพื้นผิว 25 ตารางเซนติเมตร

3.2.10 กระดาษกรอง Whatman Grade No. 5

3.2.11 ปากคีบ (forceps)

3.2.12 ทิป (tip)

3.2.13 ไมโครปิเปต (micropipette)

3.2.14 ถังล้างปิเปต ยี่ห้อ Nalgene

3.2.15 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-wells plate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.16 ไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) ยี่ห้อ Anthos รุ่น MultiRead 400

3.2.17 ปิเปตแก้วขนาด 1, 5, 10 มิลลิลิตร

3.2.18 เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (automatic pipette) ยี่ห้อ Biohit

3.2.19 ช้อนตักสาร

3.2.20 ขวดสำหรับบรรจุสารขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.21 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)

3.2.22 กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์ตเตต (inverted light microscope) ยี่ห้อ Nikon รุ่น TS100

3.2.23 กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) ยี่ห้อ Nikon รุ่น E200

3.2.24 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)

3.2.25 ฟอยล์ (Foil)

3.3 สารเคมี

3.3.1 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็ง Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

3.3.2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer saline, PBS)

3.3.3 เอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย EDTA

3.3.4 สารละลาย MTT

3.3.5 สีย้อมทริปแพน บลู (trypan blue)

3.3.6 เฮกเซน

3.3.7 ไดคลอโรมีเทน

3.3.8 เอทานอล

3.3.9 ซีรัม (fetal bovine serum)

3.3.10 เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

3.3.11 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO)

3.3.12 สารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การเตรียมสารสกัดหยาบ

3.4.1 นำใบสบู่ดำมาทำแห้งโดยนำใบสบู่ดำมาล้างให้สะอาด จากนั้นนำใบสบู่ดำหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด และเก็บรักษาไว้ในถุงสุญญากาศ

3.4.2 เตรียมขวดโหลขนาด 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวดและผ้าขาวบางที่ซักและตากแห้งแล้ว นำไปทำการปลอดเชื้อโดยหม้อนึ่งอัดความดันไอ (Autoclave)

3.4.3 ทำการสกัดสารโดยชั่งใบสบู่ดำในอัตราส่วน 1 ส่วนต่อตัวทำละลาย 15 ส่วน นำใบสบู่ดำน้ำหนัก 30 กรัม มาห่อด้วยผ้าขาวบางที่ปลอกเชื้อแล้วมัดให้แน่น ใส่ลงในขวดโหลที่มีตัวทำละลายเฮกเซนอยู่ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ปิดฝาให้เรียบร้อยจากนั้นทำการห่อฟอล์ยให้เรียบร้อยและแช่ในสารละลายเฮกเซนเป็นเวลา 7 วันในที่มืด และขณะทำการแช่ให้นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบ 7 วัน นำผ้าขาวบางที่ห่อใบสบู่ดำออกมา ทำการบีบตัวละลายเฮกเซนออกและตั้งทิ้งไว้จนแห้ง จากนั้นนำไปแช่ในขวดโหลต่อไปซึ่งมีตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนอยู่เป็นเวลา 7 วัน ส่วนสารสกัดของเฮกเซนที่ได้นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมนำไปทำแห้งต่อไป การสกัดในตัวละลายไดคลอโรมีเทนและเอทานอลกระทำเช่นเดียวกันกับการสกัดในตัวทำละลายเฮกเซน

3.4.4 นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลายไปทำการกรองเพื่อแยกเศษใบสบู่ดำออกโดยใช้กระดาษกรอง Whatman Grade No. 5 จากนั้นจึงนำไปเข้าเครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศ (Evaporator rotary) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 335, 440 และ 50 บรรยากาศ ในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ตามลำดับ

3.4.5 จากนั้นเมื่อได้สารสกัดหยาบจากการระเหยภายใต้สูญญากาศในแต่ละตัวทำละลายต่างๆ ออกมา ให้ทำการนำสารสกัดหยาบที่ได้จากแต่ละตัวทำละลายไปใส่ในขวด vial ที่ทราบน้ำหนักของขวดและฝามาก่อนแล้ว

3.4.6 นำฟอยล์มาปิดให้มิดชิดโดยปิดที่ปากขวดเอาไว้ด้วยและทำการเจาะรูไว้ ซึ่งไม่ต้องปิดฝาขวด vial และไปใส่ไว้ในเดซิกเคเตอร์ (Desiccator) เพื่อทำให้ตัวทำละลายในสารสกัดหยาบที่เหลืออยู่ระเหยออกให้หมด เมื่อสารสกัดหยาบแห้งสนิท นำขวด vial ที่มีสารสกัดหยาบอยู่ไปชั่งน้ำหนักแล้วนำมาคำนวณหาน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้จากแต่ละตัวทำละลายและบันทึกค่าน้ำหนักของสารสกัดหยาบนั้นไว้ตามชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ HT-29, HepG2 และ Vero cell

3.5.1 อาหาร DMEM เป็นอาหารสำเร็จรูป ลักษณะเป็นผงซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ Gibco Invitrogen Corporation อาหาร 1 ซอง สามารถเตรียมเป็นอาหารเหลวได้ปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร ทำการละลายอาหารสำเร็จรูป 1 ซองในน้ำปราศจากอิออน และปราศจากเชื้อปริมาตร 1 ลิตรโดยใช้บีกเกอร์ขนาดปริมาตร 2 ลิตร

3.5.2 เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) จำนวน 3.7 กรัมลงในอาหารปริมาตร 1 ลิตร

3.5.3 ใส่แท่งแม่เหล็ก (magnetic stirring bar) ลงในบีกเกอร์ที่ใช้เตรียมอาหาร จากนั้นวางบีกเกอร์บนเครื่องกวนสารที่ไม่ต้องเปิดความร้อน แท่งแม่เหล็กจะช่วยกวนอาหารให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.5.4 เตรียมชุดกรองสารที่ประกอบไปด้วยแผ่นกรองขนาดช่องผ่านเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร ที่ทำการปราศจากเชื้อเรียบร้อยแล้ว วางในตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า จากนั้นนำอาหารเหลวกรองผ่านชุดกรองสาร แบ่งอาหารที่กรองแล้วใส่ขวดแก้วดูแลนขนาด 1 ลิตร ขวดละ 500 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด

3.5.5 ทดสอบการปนเปื้อนของอาหารทั้ง 2 ขวด โดยการดูดอาหารปริมาตร 2 มิลลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอดต่ออาหาร 1 ขวด จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.5.6 เตรียมซีรัม (fetal bovine serum, FBS) สำหรับเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง ต้องทำการ heat inactivate ซีรัมโดยแช่ขวดซีรัมลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นทำการกรองซีรัมดังกล่าวด้วยแผ่นกรองขนาดช่องผ่าน 0.22 ไมโครเมตร แบ่งซีรัมใส่ขวดที่ปราศจากเชื้อขวดละ 10-20 มิลลิลิตร เก็บขวดวีรัมที่กรองแล้วในตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.7 นำอาหารที่เตรียมไว้ออกมาจากตู้เย็น จากนั้นเติม FBS ที่ผ่านการกรองแล้วใส่ลงในอาหารเท่ากับร้อยละ 10 ของปริมาณอาหารทั้งหมด รวมทั้งเติมสารปฏิชีวนะ ในที่นี้ใช้ Penicillin-Streptomycin solution (10,000 units penicillin-G and 10,000 micrograms streptomycin per ml) โดยให้มีปริมาณของ Penicillin-Streptomycin สุดท้ายในอาหารเท่ากับ 100 units และ 100 micrograms ตามลำดับ จากนั้นนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การเพิ่มปริมาณเซลล์ไลน์ HT-29, HepG2 และ Vero

3.6.1 นำเซลล์ไลน์มาเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยง ที่มีพื้นผิว 25 ตารางเซนติเมตร โดยพิจารณาเซลล์ที่เจริญในขวดประมาณร้อยละ 80-90 ของพื้นผิวทั้งหมด โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ต

3.6.2 จากนั้นให้ทำการดูดอาหารเดิมออกจากขวดเพาะเลี้ยงแล้วเติม PBS (Phosphate buffer saline) ลงไป 3 มิลลิลิตร เพื่อทำการล้างซีรัม แล้วทำการดูด PBS ออกให้หมด

3.6.3 เติมทริปซินร้อยละ 0.25 ลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 นาที เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวขวดเพาะเลี้ยง โดยสังเกตการหลุดของเซลล์ออกจากพื้นผิวภาชนะโดยส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ต

3.6.4 เติมอาหาร DMEM ที่เสริมด้วย FBS ร้อยละ 10 ลงไปปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อทำให้เซลล์อยู่ในรูปของเซลล์แขวนลอยและกระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ทำการดูดเซลล์แขวนลอยมาปริมาตร 0.4 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นแยกสารขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมทริปแพนบลู ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดเซลล์แขวนลอยออกมาใส่ลงในแอ่งฮีมาไซโตมิเตอร์ ที่ทำความสะอาดแล้ว ทำการตรวจสอบเซลล์มีชีวิตด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound ซึ่งเซลล์มีชีวิตจะไม่ติดสีทริปแพนบลู ส่วนเซลล์ตายจะติดสีมีลักษณะเป็นสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน ทำการนับเซลล์ทั้งหมด 5 ช่องใหญ่ต่อ 1 chamber บันทึกผลการนับจำนวนเซลล์

3.6.5 ปลูกเซลล์ไลน์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในอาหาร DMEM ต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง โดยเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เซลล์ไลน์มะเร็งตับปลูกเซลล์มีชีวิตจำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์ไตของลิงแอฟริกันปลูกเซลล์มีชีวิตจำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เซลล์จะเจริญเต็มพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยง แต่ถ้าเซลล์เจริญไม่เต็มพื้นที่ผิว ต้องทำการเปลี่ยนอาหารใหม่และเก็บไว้ประมาณ 4 วัน จึงสามารถทำการถ่ายเซลล์ต่อไป

3.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ

3.7.1 ปลูกเซลล์ไลน์ลงไปในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-wells plate) โดยเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เซลล์ไลน์มะเร็งตับปลูกเซลล์มีชีวิตจำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์ไตของลิงแอฟริกันปลูกเซลล์มีชีวิตจำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มเซลล์ในตู้บ่ม (incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.2 เตรียม stock สารสกัดที่ใช้ทดสอบ โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ความเข้มข้นตั้งต้นประมาณ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร ทำการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีช่องผ่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และใส่ขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อ หุ้มขวดแก้วด้วยฟอยล์ เพื่อป้องกันแสง จากนั้นเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.7.3 เตรียมสารสกัดหยาบที่ต้องการทดสอบ ทำการเจือจางเป็นสองเท่าแบบต่อเนื่อง (two-fold dillution) ด้วยอาหาร DMEM เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.7.4 เมื่อบ่มเซลล์นาน 24 ชั่วโมง ทำการดูดอาหารออกทุกหลุม จากนั้นใส่สารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้นลงไปในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-wells plate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยที่ 2 แถวสุดท้ายเป็นแถวควบคุม ซึ่งแถวแรก ทำการใส่ DMSO ที่เจือจางในอาหารเท่ากับความเข้มข้นที่มีอยู่ในสารสกัดความเข้มข้น 2,000 ไม่โครกรัมต่อมิลลิตร และแถวสุดท้ายทำการใส่อาหาร DMEM ลงไป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มนาน 24 และ 48 ชั่วโมง

3.7.5 เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดครบ 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบโดยใช้เทคนิค MTT (MTT assay) ดูดสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง

3.7.6 เมื่อบ่มเซลล์ในสารละลาย MTT ครบ 4 ชั่วโมง ทำการดูดสารละลาย MTT ทิ้งและเตรียมสารละลายที่มีส่วนผสมระหว่าง 100% DMSO : 10% SDS (อัตราส่วน 9:1) เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ซึ่งมีสีม่วง และจะอยู่ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น

3.7.7 ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงทุกหลุมโดยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้คำนวณร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้สูตร ดังนี้

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

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารสกัดแต่ละความเข้มข้น

โดยค่า A และ B ก่อนนำไปแทนค่าในสูตรต้องนำค่า blank มาลบออก ในที่นี้ blank คือ สารละลาย 100% DMSO : 10% SDS (อัตราส่วน 9:1)

3.7.8 คำนวณค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5.0

3.7.9 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt)

3.8.1 ปลูกเซลล์ไลน์ลงไปในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-wells plate) โดยเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เซลล์ไลน์มะเร็งตับปลูกเซลล์มีชีวิตจำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์ไตของลิงแอฟริกันปลูกเซลล์มีชีวิตจำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มเซลล์ในตู้บ่ม (incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.8.2 เตรียมสารต้านมะเร็งที่ต้องการทดสอบ ทำการเจือจางเป็นสี่เท่าแบบต่อเนื่อง (four-fold dillution) ด้วยอาหาร DMEM เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 10, 2.5, 0.625, 0.156, 0.039, 0.0097 และ 0.0024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.8.3 เมื่อบ่มเซลล์นาน 24 ชั่วโมง ทำการดูดอาหารออกทุกหลุม จากนั้นใส่สารต้านมะเร็งที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้นลงไปในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-wells plate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยที่ 2 แถวสุดท้ายเป็นแถวควบคุม ซึ่งแถวแรก ทำการใส่ DMSO ที่เจือจางในอาหารเท่ากับความเข้มข้นที่มีอยู่ในสารต้านมะเร็งความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแถวสุดท้ายทำการใส่อาหาร DMEM ลงไป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มนาน 24 และ 48 ชั่วโมง

3.8.4 เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดครบ 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบความเป็นพิษของสารต้านมะเร็งโดยใช้เทคนิค MTT (MTT assay) ดูดสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง

3.8.5 เมื่อบ่มเซลล์ในสารละลาย MTT ครบ 4 ชั่วโมง ทำการดูดสารละลาย MTT ทิ้งและเตรียมสารละลายที่มีส่วนผสมระหว่าง 100% DMSO : 10% SDS (อัตราส่วน 9:1) เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ซึ่งมีสีม่วง และจะอยู่ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น

3.8.6 ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงทุกหลุมโดยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้คำนวณร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้สูตร ดังนี้

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

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารสกัดแต่ละความเข้มข้น

โดยค่า A และ B ก่อนนำไปแทนค่าในสูตรต้องนำค่า blank มาลบออก ในที่นี้ blank คือ สารละลาย 100% DMSO : 10% SDS (อัตราส่วน 9:1)

3.8.7 คำนวณค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5.0

3.8.8 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS 16.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ

เมื่อนำใบสบู่ดำมำทำการสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ตามลำดับ โดยใช้ใบสบู่ดำ 30 กรัมในตัวทำละลาย 450 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 ส่วนต่อตัวทำละลาย 15 ส่วน) และสามารถคำนวณหาร้อยละของน้ำหนักสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล

ชนิดของตัวทำละลาย	น้ำหนักของสารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละของสารสกัดหยาบ
เฮกเซน	0.5692	1.90
ไดคลอโรมีเทน	0.5128	1.71
เอทานอล	0.4574	1.52

4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำที่มีต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29)

4.2.1 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ

4.2.1.1 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล (ตารางที่ 4.2)

4.2.1.2 เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.45%DMSO, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0, 5.01, 3.58, 7.51, 11.12, 26.10, 43.10, 67.31 และ 85.59 ตามลำดับ

4.2.1.3 เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทนจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.35%DMSO, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0, 6.91, 3.93, 5.73, 16.75, 21.07, 26.90, 46.03 และ 66.33 ตามลำดับ

4.2.1.4 เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.40%DMSO, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0, 5.57, 1.70, 4.55, 8.57, 18.71, 31.63, 40.94 และ 56.73 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1.5 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล หลังจากบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง โดยวิธีของดันแคน (ตารางที่ 4.2) สรุปได้ดังนี้ ที่ความเข้มข้น 31.25-2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์จะเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล

4.2.2 ค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ร้อยละ 50 ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ (ตารางที่ 4.6)

4.2.2.1 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ในสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ร้อยละ 50 เท่ากับ 646.241 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.2.2 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ในสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทนจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ร้อยละ 50 เท่ากับ 1,134.058 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.2.3 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ในสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ร้อยละ 50 เท่ากับ 1,573.781 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำหลังจากบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง

ชนิดของตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษ
เฮกเซน	0	0^{l}
	0.35%DMSO	5.01^{jkl}
	31.25	3.58^{kl}
	62.50	7.51^{jk}
	125	11.12^{hi}
	250	26.10^{ef}
	500	43.10^{d}
	1,000	67.31^{b}
	2,000	85.59^{a}
ไดคลอโรมีเทน	0	0^{l}
	0.5%DMSO	6.91^{jkl}
	31.25	3.93^{kl}
	62.50	5.73^{jkl}
	125	16.75^{gh}
	250	21.07^{fg}
	500	26.90^{ef}
	1,000	46.03^{d}
	2,000	66.33^{b}
เอทานอล	0	0^{l}
	0.3%DMSO	5.57^{jkl}
	31.25	1.70^{kl}
	62.50	4.55^{jkl}
	125	8.57^{jk}
	250	18.71^{g}
	500	31.63^{e}
	1,000	40.94^{d}
	2,000	56.73^{c}

* ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ร้อยละ 50 ของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับคววามเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำที่มีต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2)

4.3.1 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ

4.3.1.1 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล (ตารางที่ 4.3)

4.3.1.2 เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.45%DMSO, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0, 7.45, 3.35, 6.00, 6.71, 9.69, 15.40, 25.03 และ 47.29 ตามลำดับ

4.3.1.3 เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทนจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.35%DMSO, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0, 8.97, 3.85, 6.09, 11.14, 18.23, 35.38, 46.72 และ 72.49 ตามลำดับ

4.3.1.4 เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.40%DMSO, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0, 2.85, 2.16, 6.08, 9.53, 12.84, 18.68, 24.49 และ 36.98 ตามลำดับ

4.3.1.5 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยะความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล หลังจากบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง โดยวิธีของดันแคน (ตารางที่ 4.3) สรุปได้ดังนี้ ที่ความเข้มข้น 31.25-2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์จะเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล

4.3.2 ค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ร้อยละ 50 ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ (ตารางที่ 4.6)

4.3.2.1 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ในสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ร้อยละ 50 เท่ากับ > 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3.2.2 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ในสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทนจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ร้อยละ 50 เท่ากับ 1,220.979 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.3 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ในสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ร้อยละ 50 เท่ากับ > 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำหลังจากบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง

ชนิดของตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษ
เฮกเซน	0	0^{l}
	0.35%DMSO	7.45^{hij}
	31.25	3.35^{jkl}
	62.50	6.00^{ijk}
	125	6.71^{hijk}
	250	9.69^{ghi}
	500	15.40^{ef}
	1,000	25.03^{d}
	2,000	47.29^{b}
ไดคลอโรมีเทน	0	0^{l}
	0.5%DMSO	8.97^{ghi}
	31.25	3.85^{jkl}
	62.50	6.09^{ijk}
	125	11.14^{gh}
	250	18.23^{e}
	500	35.38^{c}
	1,000	46.72^{b}
	2,000	72.49^{a}
เอทานอล	0	0^{l}
	0.3%DMSO	2.85^{kl}
	31.25	2.16^{kl}
	62.50	6.08^{ijk}
	125	9.53^{ghi}
	250	12.84^{fg}
	500	18.68^{e}
	1,000	24.49^{d}
	2,000	36.98^{c}

* ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ร้อยละ 50 ของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำที่มีต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero)

4.4.1 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ

4.4.1.1 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล (ตารางที่ 4.4)

4.4.1.2 เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.45%DMSO, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0, 4.36, 3.47, 10.15, 13.46, 24.87, 32.46, 45.70 และ 63.23 ตามลำดับ

4.4.1.3 เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทนจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.35%DMSO, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0,5.30, 5.86, 13.20, 18.78, 22.94, 30.10, 63.60 และ 81.04 ตามลำดับ

4.4.1.4 เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.40%DMSO, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0, 4.11, 2.50, 3.17, 11.14, 17.39, 24.89, 32.95 และ 43.22 ตามลำดับ

4.4.1.5 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยะความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล หลังจากบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง โดยวิธีของดันแคน (ตารางที่ 4.4) สรุปได้ดังนี้ ที่ความเข้มข้น 31.25-2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์จะเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล

4.4.2 ค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ร้อยละ 50 ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ (ตารางที่ 4.6)

4.4.2.1 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ในสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ร้อยละ 50 เท่ากับ 1,150.619 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4.2.2 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ในสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทนจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ร้อยละ 50 เท่ากับ 808.963 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2.3 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ในสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากใบสบู่ดำนาน 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ร้อยละ 50 เท่ากับ > 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำหลังจากบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง

ชนิดของตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษ
เฮกเซน	0	0^{l}
	0.35%DMSO	4.36^{jkl}
	31.25	3.47^{kl}
	62.50	10.15^{ijk}
	125	13.46^{hi}
	250	24.87^{ef}
	500	32.46^{d}
	1,000	45.70^{c}
	2,000	63.23^{b}
ไดคลอโรมีเทน	0	0^{l}
	0.5%DMSO	5.30^{jkl}
	31.25	5.86^{jkl}
	62.50	13.20^{hi}
	125	18.78^{fgh}
	250	22.94^{efg}
	500	30.10^{de}
	1,000	63.60^{b}
	2,000	81.04^{a}
เอทานอล	0	0^{l}
	0.3%DMSO	4.11^{jkl}
	31.25	2.50^{kl}
	62.50	3.17^{kl}
	125	11.14^{ij}
	250	17.39^{ghi}
	500	24.89^{ef}
	1,000	32.95^{d}
	2,000	43.22^{c}

* ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ร้อยละ 50 ของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับคววามเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) ร้อยละ 50 ที่มีต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero)

4.5.1 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt)

4.5.1.1 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) (ตารางที่ 4.5)

4.5.1.2 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ในสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) นาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.0024, 0.0097, 0.039, 0.156, 0.625, 2.5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0, 4.92, 7.93, 15.49, 26.81, 47.07, 57.40 และ 68.94 ตามลำดับ

4.5.1.3 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ในสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) นาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.0024, 0.0097, 0.039, 0.156, 0.625, 2.5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0, 26.99, 29.60, 38.25, 43.05, 50.49, 55.49 และ 59.74 ตามลำดับ

4.5.1.4 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ในสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) นาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.0024, 0.0097, 0.039, 0.156, 0.625, 2.5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0, 23.60, 33.57, 38.52, 43.37, 45.22, 54.01 และ 62.36 ตามลำดับ

4.5.1.5 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) หลังจากบ่มเซลล์ในสารนาน 24 ชั่วโมง โดยวิธีของดันแคน (ตารางที่ 4.5) สรุปได้ดังนี้ ที่ความเข้มข้น 0.0024-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์จะเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt)

4.5.2 ค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ร้อยละ 50 ของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) (ตารางที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2.1 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ในสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) นาน 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ร้อยละ 50 เท่ากับ 1.157 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.5.2.2 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ในสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) นาน 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ร้อยละ 50 เท่ากับ 0.594 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.5.2.3 เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ในสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) นาน 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ร้อยละ 50 เท่ากับ 1.645 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) หลังจากบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง

ชนิดของเซลล์	ความเข้มข้นของสารต้านมะเร็ง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษ
HT-29	0	0^{m}
	0.0024	4.92^{lm}
	0.0097	7.93^{l}
	0.039	15.49^{k}
	0.156	26.81^{ij}
	0.625	47.07^{ef}
	2.5	57.40^{bc}
	10	68.94^{a}
HepG2	0	0^{m}
	0.0024	26.99^{ij}
	0.0097	29.60^{ij}
	0.039	38.25^{gh}
	0.156	43.05^{fg}
	0.625	50.49^{de}
	2.5	55.49^{cd}
	10	59.74^{bc}
Vero	0	0^{m}
	0.0024	23.60^{j}
	0.0097	33.57^{hi}
	0.039	38.52^{gh}
	0.156	43.37^{fg}
	0.625	45.22^{efg}
	2.5	54.01^{cd}
	10	62.36^{b}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษร้อยละ 50 ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero)

ชนิดของเซลล์	สารทดลอง	ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่เป็นพิษร้อยละ 50
HT-29	เฮกเซน	646.241
	ไดคลอโรมีเทน	1,134.058
	เอทานอล	1,573.781
	สารต้านมะเร็ง	1.157
HepG2	เฮกเซน	>2,000
	ไดคลอโรมีเทน	1,220.979
	เอทานอล	>2,000
	สารต้านมะเร็ง	0.594
Vero	เฮกเซน	1,150.619
	ไดคลอโรมีเทน	808.963
	เอทานอล	>2,000
	สารต้านมะเร็ง	1.645

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลวิจัย

5.1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำ

ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล พบว่าผลผลิตสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำที่ได้มากที่สุดคือ สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน (ร้อยละ 1.90) รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นไดคลอโรมีเทน (ร้อยละ 1.71) และสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเอทานอล (ร้อยละ 1.52) ตามลำดับ

5.2 ความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (CC_{50})

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ที่ความเข้มข้น 0, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยบ่มนาน 24 ชั่วโมง ผลที่ได้คือ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ร้อยละ 50 คือ 646.241, 1,134.058 และ 1,573.781 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ร้อยละ 50 คือ >2,000, 1,220.979 และ >2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ร้อยละ 50 คือ 1,150.619, 808.963 และ >2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และความเป็นพิษของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ที่ความเข้มข้น 0, 0.0024, 0.0097, 0.039, 0.156, 0.625, 2.5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยบ่มนาน 24 ชั่วโมง ผลที่ได้คือ ความเข้มข้นของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ร้อยละ 50 คือ 1.157, 0.594 และ 1.645 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซนมีความเป็นพิษมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ตามลำดับ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นไดคลอโรมีเทนมีความเป็นพิษมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน และเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทานอล ตามลำดับ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นไดคลอโรมีเทนมีความเป็นพิษมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้น เฮกเซน และเอทานอล ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 กับสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) พบว่ามีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี วัฒนธีรางกูร. 2551. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากกากเมล็ดสบู่ดำ (*jatropha curcas* L.). การศึกษาอิสระปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นวลฉวี เวชประสิทธิ์ และคณะ. 2553. การโคลนและผลิตโปรตีนเคอร์ซินจากใบสบู่ดำ (*jatropha curcas*) เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในระดับโมเลกุล. รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยรามคำแหง

พัชราภรณ์ แสงโยจารย์ และณัฐพงษ์ พร้อมจิตรม, **2553**. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการเจริญเติบโตของสบู่ดำ *(Botanical and Growth of Physic Nut, Jatropha curcas Linn)*. คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์.

สุวิมล วงศ์พลัง และคณะ. 2552. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสบู่ดำที่มีต่อหนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 562-570

อุ่นเรือน เพชราวัลย์, **2554**. วิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Amaugo, G.O., and Emosairue, S.O. 2003.The efficacy of some indigenous medical plant extracts for the control of upland rice stem borers in Nigeria. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 2:121-127

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

Gawri, S. and Upadhyay, A., 2012. A Comparative study on the antimicrobial activity and the presence of phytochemicals in the petioles and callus of *J. curcas*. Journal of phytology, 4(3), 18-20

Lgbinosa, O.O., Lgbinosa, E.O. and Aiyegoro, O.A., 2009. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 3(2), 058-062

Oyi, A.R., Onanlapo, J.A., Haruna, A.K. and Morah, C.O. 2007. Antimicrobial screening and stability studies of the crude extract of *Jatropha curcas* Linn latex (Euphorbiaceae). Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences, 6(2), 14-20

Valdivieso-Garcia, 1993. R.C. Clarke, k.fahn, A. Durette, D.L. MACLeod and C.L. Gyles. 1993, Neutral Red Assay for Measurement of Guantita tive Vero cell; 59(6): 1981-1983

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ข้อมูลดิบและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ โดยใช้ใบสบู่ดำ 30 กรัม ในตัวทำละลาย 450 มิลลิลิตร (อัตราใบสบู่ดำ 1 ส่วนต่อตัวทำละลาย 15 ส่วน)

ชนิดของตัวทำละลาย	น้ำหนักของสารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละของสารสกัดหยาบ
เฮกเซน	0.5692	1.90
ไดคลอโรมีเทน	0.5128	1.71
เอทานอล	0.4574	1.52

ตารางภาคผนวกที่ 2 ร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมง

ชนิดของตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ HT29			เฉลี่ย
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
เฮกเซน	0	0	0	0	0
	0.35%DMSO	5.46	3.67	5.91	5.01
	31.25	3.57	3.31	3.86	3.58
	62.50	8.65	4.51	9.36	7.51
	125	11.08	10.30	11.99	11.12
	250	26.40	31.59	20.30	26.10
	500	39.76	44.06	45.48	43.10
	1,000	62.14	67.63	72.17	67.31
	2,000	84.60	81.45	90.72	85.59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

ชนิดของตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ HT29			เฉลี่ย
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
ไดคลอโรมีเทน	0	0	0	0	0
	0.5%DMSO	1.65	9.92	9.16	6.91
	31.25	1.47	1.34	8.97	3.93
	62.50	3.30	3.03	10.84	5.73
	125	8.53	16.22	25.51	16.75
	250	18.99	17.39	26.82	21.07
	500	24.95	22.86	32.90	26.90
	1,000	47.43	43.45	47.20	46.03
	2,000	68.44	62.69	67.85	66.33
เอทานอล	0	0	0	0	0
	0.3%DMSO	6.01	5.54	5.15	5.57
	31.25	2.67	0.15	2.29	1.70
	62.50	2.34	2.16	9.15	4.55
	125	6.67	6.16	12.87	8.57
	250	14.85	21.40	19.87	18.71
	500	26.77	30.87	37.24	31.63
	1,000	39.95	41.49	41.39	40.94
	2,000	55.88	59.28	55.04	56.73

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อพิจารณาร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

H_0 : ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

H_1 : ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 3 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบกันระหว่างร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	45618.406	26	1754.554	125.940	.000
Within Groups	752.308	54	13.932		
Total	46370.714	80			

จากตารางภาคผนวกที่ 3 เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำพบว่า F = 125.940 และมีค่า Sig. = 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงปฏิเสธ H_0 แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ในสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน จะทำให้ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ในตัวทำละลายต่างๆ แตกต่างกันอย่างน้อย 1 ค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 การเปรียบเทียบค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ แต่ละความเข้มข้นต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี Ducan's new multiple range test และใช้โปรแกรม SPSS 16.0

		Subset for alpha = 0.05										
Concentration	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0conHex	3	.0000										
0conDi	3	.0000										
0conEth	3	.0000										
31.25Eth	3	1.7033	1.7033									
31.25Hex	3	3.5800	3.5800									
31.25Di	3	3.9267	3.9267									
62.50Eth	3	4.5500	4.5500	4.5500								
0.35%DHex	3	5.0133	5.0133	5.0133								
0.3%DEth	3	5.5667	5.5667	5.5667								
62.50Di	3	5.7233	5.7233	5.7233								
0.5%DDi	3	6.9100	6.9100	6.9100								
62.50Hex	3		7.5067	7.5067								
125Eth	3		8.5667	8.5667								
125Hex	3			11.1233	11.1233							
125Di	3				16.7533	16.7533						
250Eth	3					18.7067						
250Di	3					21.0667	21.0667					
250Hex	3						25.4300	25.4300				
500Di	3						26.9033	26.9033				
500Eth	3							31.6267				
1000Eth	3								40.9433			
500Hex	3								43.1000			
1000Di	3								46.1267			
2000Eth	3									56.7333		
2000Di	3										66.3267	
1000Hex	3										67.3133	
2000Hex	3											85.5900
Sig.		.062	.062	.069	.070	.188	.075	.059	.114	1.000	.747	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ Hex แทน สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน

Di แทน สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นไดคลอโรมีเทน

Eth แทน สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเอทานอล

Con แทน ชุดควบคุม (Control)

D แทน ชุดควบคุมความเข้มข้มของสารละลาย DMSO

ตารางภาคผนวกที่ 5 ร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมง

ชนิดของตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ HepG2			เฉลี่ย
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
เฮกเซน	0	0	0	0	0
	0.35%DMSO	3.09	7.49	2.49	4.36
	31.25	2.04	6.49	1.88	3.47
	62.50	13.31	12.70	4.43	10.15
	125	16.49	15.74	8.15	13.46
	250	32.46	26.45	15.69	24.87
	500	38.31	36.57	22.51	32.46
	1,000	47.48	45.33	44.29	45.70
	2,000	66.11	63.11	60.48	63.23
ไดคลอโรมีเทน	0	0	0	0	0
	0.5%DMSO	1.21	7.12	7.56	5.30
	31.25	3.69	9.74	4.15	5.86
	62.50	14.39	15.23	9.98	13.20
	125	23.43	18.96	13.94	18.78
	250	25.52	27.01	16.29	22.94
	500	33.63	35.59	21.07	30.10
	1,000	63.95	65.34	61.52	63.60
	2,000	80.98	82.21	79.93	81.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

ชนิดของตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ HepG2			เฉลี่ย
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
เอทานอล	0	0	0	0	0
	0.3%DMSO	5.24	5.99	1.09	4.11
	31.25	2.51	1.92	3.06	2.50
	62.50	3.64	2.49	3.37	3.17
	125	10.98	10.11	12.33	11.14
	250	20.95	11.98	19.24	17.39
	500	26.43	20.65	27.59	24.89
	1,000	35.94	31.53	31.39	32.95
	2,000	42.31	38.81	48.54	43.22

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อพิจารณาร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

H_0 : ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

H_1 : ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 6 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบกันระหว่างร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	24502.093	26	942.388	162.161	.000
Within Groups	313.818	54	5.811		
Total	24815.911	80			

จากตารางภาคผนวกที่ 6 เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำพบว่า F = 162.161 และมีค่า Sig. = 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกวว่าระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงปฏิเสธ H_0 แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ในสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน จะทำให้ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) ในตัวทำละลายต่างๆ แตกต่างกันอย่างน้อย 1 ค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 7 การเปรียบเทียบค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ แต่ละความเข้มข้นต่อเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี Ducan's new multiple range test และใช้โปรแกรม SPSS 16.0

		Subset for alpha = 0.05											
Concentration	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0ConHex	3	.0000											
0ConDi	3	.0000											
0ConEth	3	.0000											
31.25Eth	3	2.1567	2.1567										
0.3%DEth	3	2.8500	2.8500										
31.25Hex	3	3.3500	3.3500	3.3500									
31.25Di	3	3.8467	3.8467	3.8467									
62.50Hex	3		6.0000	6.0000	6.0000								
62.50Eth	3		6.0833	6.0833	6.0833								
62.50Di	3		6.0933	6.0933	6.0933								
125Hex	3		6.7067	6.7067	6.7067	6.7067							
0.35%DHex	3			7.4467	7.4467	7.4467							
0.5%DDi	3				8.9733	8.9733	8.9733						
125Eth	3				9.5333	9.5333	9.5333						
250Hex	3				9.6933	9.6933	9.6933						
125Di	3					11.1433	11.1433						
250Eth	3						12.8433	12.8433					
500Hex	3							15.3967	15.3967				
250Di	3								18.2300				
500Eth	3								18.6800				
1000Eth	3									24.4933			
1000Hex	3									25.0333			
500Di	3										35.3800		
2000Eth	3										37.2467		
1000Di	3											46.7200	
2000Hex	3											47.2933	
2000Di	3												72.4933
Sig.		.096	.051	.076	.114	.051	.084	.200	.121	.785	.347	.772	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ Hex แทน สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน

Di แทน สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นไดคลอโรมีเทน

Eth แทน สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเอทานอล

Con แทน ชุดควบคุม (Control)

D แทน ชุดควบคุมความเข้มข้มของสารละลาย DMSO

ตารางภาคผนวกที่ 8 ร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมง

ชนิดของตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero			เฉลี่ย
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
เฮกเซน	0	0	0	0	0
	0.35%DMSO	3.09	7.49	2.49	4.36
	31.25	2.04	6.49	1.88	3.47
	62.50	13.31	12.70	4.43	10.15
	125	16.49	15.74	8.15	13.46
	250	32.46	26.45	15.69	24.87
	500	38.31	36.57	22.51	32.46
	1,000	47.48	45.33	44.29	45.70
	2,000	66.11	63.11	60.48	63.23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 8 (ต่อ)

ชนิดของตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบสบู่ดำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero			เฉลี่ย
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
ไดคลอโรมีเทน	0	0	0	0	0
	0.5%DMSO	1.21	7.12	7.56	5.30
	31.25	3.69	9.74	4.15	5.86
	62.50	14.39	15.23	9.98	13.20
	125	23.43	18.96	13.94	18.78
	250	25.52	27.01	16.29	22.94
	500	33.63	35.59	21.07	30.10
	1,000	63.95	65.34	61.52	63.60
	2,000	80.98	82.21	79.93	81.04
เอทานอล	0	0	0	0	0
	0.3%DMSO	5.24	5.99	1.09	4.11
	31.25	2.51	1.92	3.06	2.50
	62.50	3.64	2.49	3.37	3.17
	125	10.98	10.11	12.33	11.14
	250	20.95	11.98	19.24	17.39
	500	26.43	20.65	27.59	24.89
	1,000	35.94	31.53	31.39	32.95
	2,000	42.31	38.81	48.54	43.22

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อพิจารณาร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

H_0 : ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

H_1 : ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 9 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบกันระหว่างร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37120.227	26	1427.701	85.728	.000
Within Groups	899.308	54	16.654		
Total	38019.535	80			

จากตารางภาคผนวกที่ 9 เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำพบว่า F = 85.728 และมีค่า Sig. = 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงปฏิเสธ H_0 แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ในสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน จะทำให้ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ในตัวทำละลายต่างๆ แตกต่างกันอย่างน้อย 1 ค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 10 การเปรียบเทียบค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในตัวทำละลายต่างๆ แต่ละความเข้มข้นต่อเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี Ducan's new multiple range test และใช้โปรแกรม SPSS 16.0

		Subset for alpha = 0.05											
Concentration	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0ConHex	3	.0000											
0ConDi	3	.0000											
0ConEth	3	.0000											
31.25Eth	3	2.4967	2.4967										
62.50Eth	3	3.1667	3.1667										
31.25Hex	3	3.4700	3.4700										
0.3%DEth	3	4.1067	4.1067	4.1067									
0.35%DHex	3	4.3567	4.3567	4.3567									
0.5%DDi	3	5.2967	5.2967	5.2967									
31.25Di	3	5.8600	5.8600	5.8600									
62.50Hex	3		10.1467	10.1467	10.1467								
125Eth	3			11.1400	11.1400								
62.50Di	3				13.2000	13.2000							
125Hex	3				13.4600	13.4600							
250Eth	3				17.3900	17.3900	17.3900						
125Di	3					18.7767	18.7767	18.7767					
250Di	3						22.9400	22.9400	22.9400				
250Hex	3							24.8667	24.8667				
500Eth	3							24.8900	24.8900				
500Di	3								30.0967	30.0967			
500Hex	3									32.4633			
1000Eth	3									32.9533			
2000Eth	3										43.2200		
1000Hex	3										45.7000		
2000Hex	3											63.2333	
1000Di	3											63.6033	
2000Di	3												81.0400
Sig.		.145	.053	.068	.056	.133	.121	.099	.053	.425	.460	.912	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ Hex แทน สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเฮกเซน

Di แทน สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นไดคลอโรมีเทน

Eth แทน สารสกัดหยาบจากใบสบู่ดำในชั้นเอทานอล

Con แทน ชุดควบคุม (Control)

D แทน ชุดควบคุมความเข้มข้มของสารละลาย DMSO

ตารางภาคผนวกที่ 11 ร้อยละความเป็นพิษของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมง

ชนิดของเซลล์	ความเข้มข้นของ Vimblastine (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละความเป็นพิษ			เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
HT29	0	0	0	0	0
	0.0024	9.76	3.35	1.66	4.92
	0.0097	9.32	11.84	2.64	7.93
	0.039	17.06	17.67	11.74	15.49
	0.156	18.52	32.55	29.35	26.81
	0.625	49.91	43.55	47.75	47.07
	2.5	58.92	52.92	60.37	57.40
	10	70.82	63.78	72.21	68.94
HepG2	0	0	0	0	0
	0.0024	32.05	21.19	27.72	26.99
	0.0097	33.17	29.56	26.06	29.60
	0.039	44.99	35.70	34.07	38.25
	0.156	48.62	41.31	39.22	43.05
	0.625	50.27	50.12	51.09	50.49
	2.5	59.19	54.56	52.73	55.49
	10	63.09	59.70	56.44	59.74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 11 (ต่อ)

ชนิดของเซลล์	ความเข้มข้นของ Vimblastine (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละความเป็นพิษ			เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
Vero	0	0	0	0	0
	0.0024	23.65	24.96	22.19	23.6
	0.0097	33.75	36.14	30.83	33.57
	0.039	34.95	43.97	36.64	38.52
	0.156	46.14	46.32	37.66	43.37
	0.625	48.01	47.19	40.47	45.22
	2.5	55.06	56.13	50.83	54.01
	10	61.33	64.29	61.47	62.36

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อพิจารณาร้อยละความเป็นพิษของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

H_0 : ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

H_1 : ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 12 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบกันระหว่างร้อยละความเป็นพิษของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31227.166	23	1357.703	91.659	.000
Within Groups	711.003	48	14.813		
Total	31938.169	71			

จากตารางภาคผนวกที่ 12 เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นต่างๆ ของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) พบว่า F = 91.659 และมีค่า Sig. = 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงปฏิเสธ H_0 แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) ในสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน จะทำให้ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แตกต่างกันอย่างน้อย 1 ค่า

ตารางภาคผนวกที่ 13 การเปรียบเทียบค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารต้านมะเร็ง (Vinblastine sulfate salt) แต่ละความเข้มข้นต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero) เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี Ducan's new multiple range test และใช้โปรแกรม SPSS 16.0

		Subset for alpha = 0.05												
Concentration	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0ConHT29	3	.0000												
0ConHepG2	3	.0000												
0ConVero	3	.0000												
0.0024HT29	3	4.9233	4.9233											
0.0097HT29	3		8.2667											
0.039HT29	3			15.4900										
0.0024Vero	3				23.6000									
0.156HT29	3				26.8067	26.8067								
0.0024HepG2	3				26.9867	26.9867								
0.0097HepG2	3				29.5967	29.5967								

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 13 (ต่อ)

Concentration	N	Subset for alpha = 0.05												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0.0097Vero	3					33.5733	33.5733							
0.039HepG2	3						38.2533	38.2533						
0.039Vero	3						38.5200	38.5200						
0.156HepG2	3							43.0500	43.0500					
0.156Vero	3							43.3733	43.3733					
0.625Vero	3							45.2233	45.2233	45.2233				
0.625HT29	3								47.0533	47.0533				
0.625HepG2	3									50.4933	50.4933			
2.5Vero	3										54.0067	54.0067		
2.5HepG2	3										55.4933	55.4933		
2.5HT29	3											57.4033	57.4033	
10HepG2	3											59.7433	59.7433	
10Vero	3												62.3633	
10HT29	3													68.9367
Sig.		.160	.293	1.000	.087	.053	.144	.052	.253	.119	.139	.101	.143	1.000

หมายเหตุ HT29 แทน เซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่

HepG2 แทน เซลล์ไลน์มะเร็งตับ

Vero แทน เซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน

Con แทน ชุดควบคุม (Control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล นายเมธิณ ใจเกื้อ

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.ม	**พลังงานทดแทน**	**มหาวิทยาลัยนเรศวร**	**2554**
วท.บ	**เทคโนโลยีชีวภาพ**	**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า**	**2552**
		เจ้าคุณทหารลาดกระบัง	

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2557	**ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้**	**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ**
		ทหารลาดกระบัง

การเสนอผลงานวิชาการ

จัดแสดงผลงานแบบโปสเตอร์ ในงานวันสัปดาห์วิทยาศาสตร์ ประจำปี 2557 ณ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้