

ความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจาก  
สารสกัดหยาบใบสัก (*Tectona grandis*)

CYTOTOXIC ACTIVITY AND ANTIOXIDANT OF CRUDE  
EXTRACTS FROM *Tectona grandis* LEAVES



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2558

ความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจาก  
สารสกัดหยาบใบสัก (*Tectona grandis*)

CYTOTOXIC ACTIVITY AND ANTIOXIDANT OF CRUDE  
EXTRACTS FROM *Tectona grandis* LEAVES



T149217



เขมรินทร์ วรณฤทธิ์อนัน  
ปริมปรารงค์ แสงสว่าง  
ศศิณา มาสุข

ข.พ.  
๗๖๔๙๐  
๒๕๖๘

เลขหมู่..... T 149217  
เลขทะเบียน.....  
วัน,เดือน,ปี..... 29 ส.ค. 2561

b. 12 881 661  
i. ....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CYTOTOXIC ACTIVITY AND ANTIOXIDANT OF CRUDE  
EXTRACTS FROM *Tectona grandis* LEAVES



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

ความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัด  
หยาบใบสัก (*Tectona grandis*)

Cytotoxic Activity and Antioxidant of Crude Extracts  
from *Tectona grandis* Leaves

ชื่อนักศึกษา

นางสาวเขมรินทร์ วรรณฤทธิ์อนันต์ รหัสนักศึกษา 55051064

นางสาวปริมปรารค์ แสงสว่าง รหัสนักศึกษา 55051129

นางสาวศศิณา มาสุข รหัสนักศึกษา 55051175

ปริญญา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา


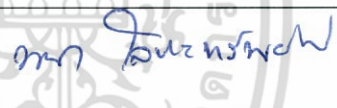
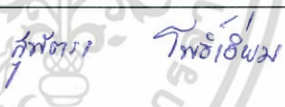
ปีการศึกษา

2558

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้  
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
(เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเท่านั้น ไม่สามารถนำออกนอกไปเผยแพร่ได้  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบใบสัก ( <i>Tectona grandis</i> )
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเขมรินทร์ วรรณฤทธิ์อนันต์ รหัสนักศึกษา 55051064 นางสาวปริมปรารค์ แสงสว่าง รหัสนักศึกษา 55051129 นางสาวศศิณา มาสุข รหัสนักศึกษา 55051175
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

### บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสัก (*Tectona grandis*) การเตรียมสารสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล และสกัดสารโดยใช้ตัวทำละลายเรียงตามขั้ว คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดใช้วิธี Folin-Ciocalteu พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสูงสุด (260.85 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) และสารสกัดหยาบชั้นน้ำมีปริมาณต่ำที่สุด (50.57 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) และเมื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) และ ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) พบว่าให้ผลเหมือนกันทั้งวิธี DPPH และ ABTS ที่สารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ค่า  $IC_{50}$  (50% Inhibitory Concentration) เท่ากับ 46.00 และ 154.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 3 ชนิด คือ human colon adenocarcinoma cell line (HT-29), human immortalized keratinocyte cell line (HaCat) และ oral human epidermal carcinoma cell line (KB) ด้วยวิธี MTT Colorimetric พบว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ โดยมีความเข้มข้นที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ร้อยละ 50 (50% Cytotoxic Concentration) ต่อเซลล์ไลน์ชนิด HaCat, KB และ HT-29 เท่ากับ 599.22, 603.55 และ 609.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

**คำสำคัญ :** ความเป็นพิษต่อเซลล์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารต้านอนุมูลอิสระ สัก

<b>Title</b>	Cytotoxic Activity and Antioxidant of Crude Extracts from <i>Tectona grandis</i> Leaves
<b>Students</b>	Miss Keamarin Waronritanun Student ID 55051064 Miss Primprang Sangsawang Student ID 55051129 Miss Sasina Masuk Student ID 55051175
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Biotechnology)
<b>Department</b>	Biology
<b>Faculty</b>	Science
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
<b>Academic Year</b>	2015
<b>Advisor</b>	Asst.Prof.Dr.Supattra Poeaim

### Abstract

The purpose of this study was to evaluate the total phenolic, antioxidant and cytotoxicity of crude extracts from *Tectona grandis* leaves. The methanol extract of *T. grandis* leaves was partitioned with solvents of increasing polarities: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and water. Total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu assay. The highest amount of total phenolic was in ethyl acetate crude extract (260.85 mg GAE / g extract) and the aqueous extract was lowest (50.57 mg GAE / g extract). The antioxidant activity of crude extracts were evaluated using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) assays. Similarly, the ethyl acetate crude extract had the highest antioxidant activity with IC<sub>50</sub> (50% Inhibitory Concentration) 46.00 and 154.24 mg/ml for DPPH and ABTS assay, respectively. The cytotoxicity was evaluated in three cell lines: human colon adenocarcinoma cell line (HT-29), human immortalized keratinocyte cell line (HaCat) and oral human epidermal carcinoma cell line (KB) using MTT colorimetric assay. The results found the strong cytotoxic activity was obtained from the ethyl acetate crude extract which against to HaCat, KB and HT-29 cell lines with CC<sub>50</sub> (50% Cytotoxic Concentration) at 599.22, 603.55 and 609.62 mg/ml, respectively.

**Keywords** : antioxidant, cytotoxicity, *Tectona grandis*, total phenolic content

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาโครงการพิเศษในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษนี้ที่คอยให้คำแนะนำ คำปรึกษา อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน เพื่อให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงอย่างมีประสิทธิภาพ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ และ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี คณะกรรมการที่ให้ข้อคิดเห็น และคำแนะนำช่วยเหลือในการจัดทำโครงการครั้งนี้ คณะผู้จัดทำได้ตระหนักถึงความห่มเทาของอาจารย์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ซึ่งเปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนคอยเลี้ยงดู อบรมสั่งสอน และเป็นกำลังใจเป็นแรงผลักดันในการทำโครงการพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา คณะผู้จัดทำโครงการขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

เชมรินทร์ วรรณฤทธิอันัน  
 ปริมปรางค์ แสงสว่าง  
 ศศิณา มาสุข

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 สັก.....	3
2.1.1 คุณสมบัติด้านสมุนไพรรของสັก.....	4
2.1.2 องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสັก.....	5
2.1.3 การศึกษาทางเภสัชวิทยาของสັก.....	6
2.1.3.1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย.....	6
2.1.3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	7
2.1.3.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา.....	7
2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	8
2.2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	9
2.2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS.....	9
2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	10
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>12</b>
3.1 ตัวอย่างพืช.....	12
3.2 อุปกรณ์.....	12
3.3 สารเคมี.....	13
3.4 เซลล์ไลน์.....	13
3.5 การดำเนินงาน.....	14
3.5.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากใบสັก.....	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	14
3.5.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	14
3.5.3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	14
3.5.3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS.....	15
3.5.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	15
3.5.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์.....	15
3.5.4.2 การเตรียมสารสกัด.....	16
3.5.4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT.....	16
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>18</b>
4.1 ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากใบสัก.....	18
4.2 ผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบสัก.....	19
4.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบสัก.....	20
4.3.1 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	20
4.3.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS.....	23
4.4 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสัก.....	28
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>33</b>
เอกสารอ้างอิง.....	35
ภาคผนวก.....	39
ภาคผนวก ก.....	40
ภาคผนวก ข.....	44

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ชื่อสามัญของ <i>Tectona grandis</i> Linn.....	4
2.2 องค์ประกอบของสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิจากส่วนต่างๆ ของสัก.....	6
4.1 ลักษณะของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายต่างๆ จากใบสัก และร้อยละของสารสกัด จากตัวทำละลายต่างๆ ต่อสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอล 10 กรัม.....	18
4.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบสักจากทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ.....	19
4.3 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานโทรลอคซ์.....	20
4.4 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากใบสักจากตัวทำละลาย ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ.....	22
4.5 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารมาตรฐานโทรลอคซ์.....	24
4.6 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากใบสักจากตัวทำละลาย ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ.....	26
4.7 ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากใบสักจากตัวทำละลาย 5 ชนิด ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	28
4.8 ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ของสารสกัดหยาบ จากใบสักจากเอทิลอะซิเตทและบิวทานอล ที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 250, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	30
4.9 ความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ร้อยละ 50 ของสารสกัดหยาบจากใบสักจาก เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล.....	32

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะต้นสัก ( <i>Tectona grandis</i> ).....	3
2.2 โครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT Colorimetric assay.....	10
3.1 แผนผังการใส่สารสกัดใส่สารสกัดหยาบบน 96 well-plate สำหรับการทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดจากตัวทำละลายทดสอบกับสารสกัดความเข้มข้นเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	17
4.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH.....	21
4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสักจากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH.....	23
4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS.....	24
4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสักจากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS.....	27
4.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสักจากเอทิลอะซิเตท กับร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat .....	31
4.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสักจากบิวทานอล กับร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat .....	31

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งกำลังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย มะเร็งเป็นโรคที่คุกคามชีวิตมนุษย์ เพราะเป็นโรคที่ต้องอาศัยการดูแลรักษาเป็นระยะเวลายาวนาน และผลข้างเคียงของการรักษาค่อนข้างรุนแรง รวมทั้งไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดมะเร็ง ถึงแม้ว่ามะเร็งบางชนิดมีบทบาททางพันธุกรรมเป็นส่วนสำคัญในการเกิดโรค แต่สาเหตุของการเกิดมะเร็งร้อยละ 80 เกิดจากวิถีการดำรงชีวิตและสภาพแวดล้อม เช่น พฤติกรรมการบริโภค โภชนาการที่ไม่เหมาะสม สิ่งแวดล้อมที่เต็มไปด้วยสารพิษ อากาศที่ไร้หายใจ ตำแหน่งที่อยู่อาศัย และการประกอบอาชีพ รวมทั้งการขาดการออกกำลังกาย (จันทรา, 2540) เนื่องจากจำนวนผู้ป่วยมะเร็งที่เพิ่มขึ้นทุกปี ส่งผลให้มีการศึกษาค้นคว้าวิจัย รวมถึงวิธีการใหม่ๆ การรักษาโรคมะเร็งด้วยเคมีบำบัดหรือรังสีรักษามีส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติของร่างกาย ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าการส่งเสริมสุขภาพ และการป้องกันการเกิดมะเร็งมีความสำคัญยิ่งกว่าการรักษา ดังนั้นการให้ความรู้หรือแนวทางด้านการส่งเสริมสุขภาพการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมด้านการบริโภค การปฏิบัติตัว ทั้งหมดนี้เป็นสิ่งที่ช่วยให้เกิดพฤติกรรมด้านสุขภาพที่ถูกต้องเหมาะสม เช่น เลือกรับประทานผัก ผลไม้ อาหารสมุนไพร ที่ปลอดสารพิษ เพราะพืชผักสมุนไพรหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ (antioxidant) และมีสารสำคัญที่ทำลายเซลล์มะเร็งได้

สารแอนติออกซิแดนซ์ คือ สารป้องกันปฏิกิริยาออกซิแดนซ์หรือด้านฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ (free-radicals) ที่มีอยู่ในธรรมชาติในรูปของวิตามิน และแร่ธาตุ ได้แก่ วิตามินเอ ซี อี แร่ธาตุสังกะสี ซีลีเนียม และที่ไม่ใช่วิตามิน ส่วนใหญ่เป็นสารรสฝาดพบในยอดผัก และเมล็ดพืช ได้แก่ สารพอลิฟีนอล (polyphenols) เป็นสารในกลุ่มไบโอฟลาโวนอยด์ (bioflavonoids) ไลโคปีน (lycopenes) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) ไอโซฟลาโวน (isoflavone coumarin derivative) และเบต้าแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) เป็นต้น (Percival, 1998) สารจากธรรมชาติจึงเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจ ถ้าสารนั้นมีประสิทธิภาพเฉพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็งและมีพิษน้อยต่อเซลล์ปกติ ซึ่งสามารถใช้ป้องกันหรือชะลอการเกิดมะเร็ง ตลอดจนยับยั้งหรือทำลายเซลล์มะเร็งบางชนิดได้ ซึ่งปัจจุบันมีการใช้สมุนไพรรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง ดังเห็นได้จากบันทึก คัมภีร์ ตำราพื้นบ้านต่างๆ (นินนาท และคณะ, 2555) นอกจากสมุนไพรแล้ว ประเทศไทยยังมีพรรณไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจหลากหลายชนิด เป็นไม้ชนิดที่มีค่าหายากหรือมีคุณค่าพิเศษอย่างอื่น เช่น เปลือกไม้หรือเนื้อไม้ที่มีกลิ่นหอมเป็นสมุนไพรที่หายากหรือสมุนไพรที่มีผลในการแก้โรคติดต่อร้ายแรงบางโรคได้เช่น สนสามใบ สนสองใบ สนเขา สัก และยาง เป็นต้น (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ 15, 2534)

โครงการพิเศษนี้จึงมีความสนใจนำใบสักมาศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็ง โดยสักมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Tectona grandis* อยู่ในวงศ์ Labiatae มีลักษณะเป็นไม้ผลัดใบขนาดใหญ่ มีลำต้นตรง กิ่งอ่อนเป็นรูปเหลี่ยม เรือนยอดเป็นทรงพุ่มทรงกลมค่อนข้างทึบ ลำต้นมีความสูง ตั้งแต่ 20 เมตรขึ้นไป เปลือกหนา ใบเป็นแบบใบเดี่ยว แตกออกจากกิ่งเป็นคู่ๆ ยาว 30-60 เซนติเมตร พื้นใบด้านบน และด้านล่างสาบมือ ท้องใบสีเขียว ที่ท้องใบของใบอ่อนเมื่อขยี้แล้วจะมีสีแดงคล้ายเลือด (กรมป่าไม้, 2553) ซึ่งส่วนต่างๆ ของสักมีคุณสมบัติเป็นยาที่สำคัญ โดยมีรายงานจำนวนมากที่ได้อ้างอิงใช้ในการรักษาโรคได้หลากหลายไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งในหนังสือ ตำรา โบราณของอินเดีย ที่มีการรวบรวมไว้และขนบธรรมเนียมความเชื่อของชาวอินเดีย ในประเทศอินเดียที่มีการใช้ประโยชน์จากสีกเป็นสมุนไพรที่สืบเนื่องกันมาตามธรรมเนียม เช่น จาก เนื้อไม้ ใช้ในการระงับประสาท กำจัดนอนพยาธิ โรคเรื้อรังผิวหนัง รักษาสมดุลในหญิงตั้งครรภ์ ผิด ต่างขาว โรคบิด ยาฆ่าพยาธิ ทั้งนี้ใบสีกยังสามารถใช้ในการมุงหลังคา ท้ามเลือด ยาแก้ไอเสบ โรคผิวหนัง โรคเรื้อรัง ปากอักเสบ อาการเลือดไหลไม่หยุด และการไอเป็นเลือด เป็นต้น (Aradhana *et al.*, 2010)

ก่อนหน้านี้มีรายงานการศึกษาสารแอนทราควิโนน โกลโคไซด์ ที่สกัดได้จากใบ *T. grandis* ซึ่ง สารทั้ง 2 ได้จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม จากการศึกษาแสดงให้เห็นความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด human embryonic kidney (HEK293), human intestinal colon cancer (HCT119) และ mouse subcutaneous connective tissue (L929) (Mahesh and Jayakumaran, 2011) ทั้งยังมี การศึกษาลักษณะเฉพาะของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และทดสอบความ เป็นพิษของสารสกัดเมทานอลที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และ บิวทานอล) พบว่าสารสกัดจาก *T. grandis* มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ และยัง พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์อีกด้วย (Mosad *et al.*, 2014) ดังนั้นหากใบสีกมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ได้จริง อาจเป็นทางเลือกที่ดีในการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้านอนุมูลอิสระหรือยาต้านมะเร็ง และเพื่อ เป็นองค์ความรู้ต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบสีก
- 2) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบสีก
- 3) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบสีก

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) สกัดสารโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล และสกัดสารโดยใช้ตัวทำละลายเรียงตามขั้ว คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ
- 2) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบสีก เปรียบเทียบกับกรด แกลลิก โดยวิธี Folin-Ciocalteu
- 3) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบสีก โดยวิธี DPPH และวิธี ABTS
- 4) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสีกโดยใช้เซลล์ไลน์ 3 ชนิด ได้แก่ human colon adenocarcinoma cell line (HT-29), human immortalized keratinocyte cell line (HaCat) และ oral human epidermal carcinoma cell line (KB) โดยวิธี MTT Colorimetric

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบสีก
- 2) เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบสีก
- 3) เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสีก

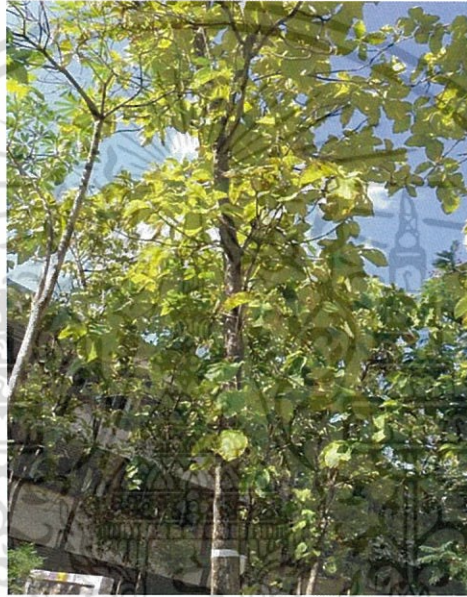
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 สัก

สัก (*Tectona grandis* Linn.) เป็นไม้ยืนต้นผลัดใบขนาดใหญ่ที่มีการผลัดใบปีละครั้ง เปลือกมีสีน้ำตาลอ่อน ขนาดความสูง 20 เมตรขึ้นไป ลำต้นตรง รูปใบรีมนหรือรูปไข่กลับ แตกจากกิ่งเป็นคู่ๆ ท้องใบสากหลังใบสีเขียวแกมเทาเป็นขน ดอกสีขาวนวล ออกเป็นช่อใหญ่ๆ ตามปลายกิ่ง (คนิติน และคณะ, 2555) ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ลักษณะต้นสัก (*Tectona grandis*)  
(ที่มา : ถ่ายภาพโดย ปริมปรางค์ แสงสว่าง, 2559)

มีการจัดอนุกรมวิธานของ *Tectona grandis* Linn. ดังนี้

Kingdom	Plantae
Super division	Angiosperms
Division	Eudicots
Class	Asterids
Order	Lamiales
Family	Verbenaceae
Genus	<i>Tectona</i>
Species	<i>Tectona grandis</i>

(ที่มา : Ramesh and Mahalakshim, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ชื่อสามัญของ *Tectona grandis* Linn.

ภาษา	ชื่อสามัญตามภาษาต่างๆ
Bengali	segun
Burmese	kyun
English	Indian oak, teak tree, teak wood
Filipino	dalanang, djati
French	teck
German	tiek
Hindi	sagun, sagwan, saigun
Indonesian	deleg, jati, kulidawa
Javanese	deleg, kulidawa
Kannada	sagavani
Lao (Sino-Tibetan)	sak
Malayalam	jati
Malaysia	jati
Myanmar	kyun
Nepali	saguan, teak
Sanskrit	saka
Spanish	teca
Tamil	tek, tekku, tekkumaram
Thai	mai-sak, sak

(ที่มา : ดัดแปลงจาก Ramesh and Mahalakshim, 2014)

### 2.1.1 คุณสมบัติด้านสมุนไพรของสัก

Aradhana *et al.* (2010) ได้กล่าวโดยสรุปไว้ดังนี้

ส่วนต่างๆ ของต้นสักมีคุณสมบัติเป็นยาที่สำคัญ ใช้ในการรักษาโรคได้หลากหลาย รวมทั้งในหนังสือ ตำราโบราณของฮินดูที่มีการรวบรวมไว้ และขนบธรรมเนียมความเชื่อของชาวอินเดีย ในประเทศอินเดียมีการใช้ประโยชน์จากสักเป็นสมุนไพรที่สืบเนื่องกันมาตามธรรมเนียม ดังนี้

2.1.1.1 เนื้อไม้ : ระบุประสาท กำจัดหนองพยาธิ โรคริดสีดวงทวาร รักษาเมล็ดลูกในหญิง ตั้งครรภ์ ผิดต่างขา โรคบิด อาการปวดหัว ยาแก้ปวด ยาฆ่าหนองพยาธิ ยาเกี่ยวกับตา ยาระบาย อาการปวดประสาท ข้ออักเสบ อาหารไม่ย่อย อาการท้องอืด ไอ โรคผิวหนัง โรคเรื้อน ภาวะกรดมาก อาการปวดระดู ระดูขาว แห้งลูก ริดสีดวงทวาร ยาขับปัสสาวะ ยาบำรุง บรรเทาอาการปวดฟัน และ น้ำมันที่ได้จากเศษไม้ใช้รักษาโรคเรื้อนทาง

2.1.1.2 ราก : ใช้ในการรักษาภาวะไร้ปัสสาวะ และกลิ่นปัสสาวะ

2.1.1.3 ใบ : ห้ามเลือด ยาแก้อักเสบ โรคผิวหนัง โรคเรื้อน ปากอักเสบ อาการเลือดไหล

ไม่หยุด และการไอเป็นเลือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.4 เมล็ด : ขับปัสสาวะ สารทำให้อ่อนนุ่มและชุ่มชื้น ยาบรรเทาอาการระคาย โรคผิวหนัง น้ำมันจากเมล็ดใช้ในการปลูกผม และใช้รักษาโรคเรื้อนกวาง ซักกลาก และโรคหิด

2.1.1.5 เปลือก : โรคหลอดลมอักเสบ อาการท้องผูก กรดมาก โรคบิด การติดนอน-พยาธิ โรคเบาหวาน โรคเรื้อน โรคผิวหนัง อาการปวดหัว โรคจิตสีดวงทวาร ยาระบาย ยาขับเสมหะ ยาแก้ไออักเสบ ไฟธาตุพิการ และยาขับพยาธิ

2.1.1.6 ดอก : โรคหลอดลมอักเสบ ยาขับปัสสาวะ ยาแก้ไออักเสบ โรคเรื้อน โรคผิวหนัง อาการปวดขัดเบา โรคเบาหวาน โรคเรื้อนกวาง และน้ำมันจากดอกใช้ในการปลูกผม และรักษาโรคหิด

2.1.1.7 ผล : ยาขับปัสสาวะ อาการปวดขัดเบา นิ่ว อาการคัน และปากอักเสบ

## 2.1.2 องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสัก

จากรายงานของ Ramesh and Mahalakshim (2014) พบว่าองค์ประกอบของสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิที่ได้ทำการแยกจากสักมีหลากหลายชนิด รายละเอียดโดยสรุปของสารประกอบทางพฤกษเคมี ได้แสดงไว้ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิจากส่วนต่างๆ ของสัก

สารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ	องค์ประกอบของสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ	ส่วนของพืช
ฟีนอล และกรดฟีนอลิก	TG1, 2, 3 และ 4, Gallic acid Ellagic acid, Acetovanillone, E-isofuraldehyde, 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)propan-1-one, evofolin A, และ syringaresinol	ใบ
ลิกแนน	Tectonoelin A (or 7Z)-9' nor-3',4,4'-trihydroxy-3-methoxylign-7-ene-9,7'-lactone), Tectonoelin B (or 7Z)-9' nor-3',4,4'-trihydroxy-3,5-dimethoxylign-7-ene-9,7'-lactone), medioresinol, 1-hydroxypinoresinol, lariciresinol, balaphonin และ zhebeiresinol	ราก ใบ เมล็ด และ เนื้อไม้
ฟลาโวนอยด์	Rutin และ quercetin	ใบ
แอนทราควิโนน	Possible anthraquinone moieties for dyeing property	ใบ
ไกลโคไซด์	Apocarotenoids: tectoionols A และ B Steroidal glycoside: beta-sitosterol-beta-D-[4'-linolenyl-6'-(tridecan-4"-one-1"-oxy)] glucuranopyranoside	เมล็ด และใบ ราก และเปลือกไม้
อัลคาลอยด์	Quinones: 9,10-dimethoxy-2-methyl anthra-1,4-quinone. 1,4-anthraquinone, tectoquinone, lapachol, dehydro-a-lapachone, tecomaquinone 1.Naphthoquinone และ	แก่นราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับงานวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

สารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ	องค์ประกอบของสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ	ส่วนของพืช
	anthraquinone derivatives	
	Naphthotectone และ anthratrectone	
สเตียรอยด์	Steroidal compounds, squalene, polyisoprene, cr-tolylmethyl ether, betulinic acid	แก่นราก
เอสเทอร์ของกรดไขมัน	7'-hydroxy-n-octacosanoyl n-decanoate, 20'-hydroxy eicosanyl linolenate and 18'-hydroxy n-hexacosanyl n-decanoate	ราก และ เปลือกไม้

(ที่มา : Ramesh and Mahalakshim, 2014)

Khana and Mlungwanab (1999) ได้มีการศึกษาสารสกัดจากแก่นราก *T. grandis* พบว่ามี 5-hydroxylapachol และสารประกอบอื่นๆ เช่น lapachol, dehydro-a-lapachone, methyl quinizarin และ squalene และยังมีการศึกษาของ Thomson *et al.* (1971) พบว่าใน *T. grandis* มีสาร 1-hydroxy-2-methylantraquinone, tectoquinone, pachy-basin, dehydrotectol, tectol, lapachol, dehydro-a- $\alpha$ -chone, 2-methylquinizarin, deoxylapachol,  $\beta$ -sitosterol, obtusifolin, squalene และ betulinic acid

Singh *et al.* (2010) มีการรายงานว่า สามารถแยกสารสกัดจากใบ *T. grandis* ซึ่งเป็นตัวกลางที่ช่วยในการป้องกันแผลกระเพาะอาหารในหนู จากการสกัดสารสกัดหยาบด้วยเอทานอล และสกัดด้วยวิธี Partition ด้วยบิวทานอล สารสกัดจากบิวทานอลมีองค์ประกอบทางเคมีของ terpenoids เช่น betulinic acid, ursolic acid,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-D-glucoside และ phenolic glycoside verbascoside ซึ่งสาร glycosides และ terpenoids มีประโยชน์ในการรักษาโรคเรื้อรัง

Nayeem and Karvekar (2010) ได้ทำการสกัดสารจากใบอ่อน และใบแก่ของ *T. grandis* ด้วยวิธี Soxhlet โดยใช้เมทานอล จากการศึกษาพบว่าในใบอ่อน และใบแก่ มีปริมาณของสารพิษเคมีที่แตกต่างกัน คือ ในใบอ่อนมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่าในใบแก่ เมื่อวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในใบอ่อนพบ gallic acid, cinnamic acid และ tannic acid

### 2.1.3 การศึกษาทางเภสัชวิทยา

#### 2.1.3.1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ *T. grandis* มีรายงานวิจัยของ Mahesh and Jayakumar (2010) ที่ศึกษาสารสกัดจากส่วนใบ เปลือกไม้ และเนื้อไม้ของ *T. grandis* โดยตรวจสอบกับเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella paratyphi* และ *Proteus mirabilis* ด้วยวิธี disc diffusion ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขนาดของแผ่นดิสก์มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 5 มิลลิเมตร เทียบกับ ciprofloxacin พบว่าสารสกัดจากใบที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มให้ผลอย่างเห็นได้ชัดแตกต่างจากส่วนอื่นๆ ของ *T. grandis* จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีกับเชื้อ *S. aureus* (14 มิลลิเมตร) และ *K. pneumonia* (8 มิลลิเมตร) ที่ความเข้มข้นสูงสุด (500

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมา คือ สารที่สกัดด้วยเมทานอล และสารสกัดจากเนื้อไม้ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Purushotham *et al.* (2010) ศึกษาฤทธิ์การทำงานร่วมกันในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบอ่อนของ *T. grandis* กับเตตราไซคลิน โดยสารสกัดจากใบอ่อนของ *T. grandis* ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับเตตราไซคลินความเข้มข้น 62.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบของสารสกัดจากใบอ่อนของ *T. grandis* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (minimum inhibition concentration: MIC) มีค่าประมาณ 62.50 ถึง 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผลการทดสอบฤทธิ์การทำงานร่วมกันของสารสกัดจากใบอ่อนของ *T. grandis* กับเตตราไซคลินด้วยวิธีของ Kirby-Bauer พบว่ามีฤทธิ์สูงต่อการต้านแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ โดยมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงสุดต่อ *S. typhimurium* (MTCC 98) และ *K. pneumonia* (MTCC 432) (36 มิลลิเมตร) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่ำสุดต่อ *Pichia pastoris* (MTCC 34) และ *Escherichia coli* (MTCC 729) (22 มิลลิเมตร) และไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อ *Citrobacter freundii* (MTCC 1658)

### 2.1.3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตามรายงานวิจัยของ Mahesh and Jayakumaran (2010) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนใบ เปลือกไม้ และเนื้อไม้ของ *T. grandis* ทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ด้วยวิธี DPPH และ ABTS เมื่อวิเคราะห์สารสกัดจากส่วนเนื้อไม้ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท พบว่ามีฤทธิ์สูงสุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS ที่ร้อยละ 98.60 มีค่าสูงกว่าเควอซิทิน (ร้อยละ 93.10) และโทรลอคซ์ (ร้อยละ 98.07) ซึ่งเป็นมาตรฐานอีกด้วย และมีการศึกษาของ Ranaa *et al.* (2014) ศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของโพลีแซคคาไรด์จากใบของ *D. sissoo* เปลือกไม้ของ *T. grandis* และเมล็ดของไมยราบไร้หนาม ด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าเปลือกไม้ของ *T. grandis* มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าใบของ *D. sissoo* และเมล็ดของไมยราบไร้หนาม และยังพบว่าเปลือกไม้ของ *T. grandis* มีน้ำตาลยูโรนิกและโปรตีนเป็นองค์ประกอบ

### 2.1.3.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

ตามรายงานวิจัยของ Bhat *et al.* (2010) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราจากแก่นไม้ *T. grandis* ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน เอทานอล และโทลูอินเอทานอล พบสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* คือ 2-methyl anthraquinone, 1,4-naphthoquinone และ lapachol และพบว่าสารสกัดจากไดคลอโรมีเทนแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดเอทานอลและโทลูอินเอทานอล นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Astiti and Suprapta (2012) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากใบ *T. grandis* ทดสอบกับ *Arthrinium phaeospermum* ซึ่งเป็นสาเหตุของการสลายตัวของไม้ โดยนำใบแห้งของ *T. grandis* มาสกัดด้วยเมทานอล และระเหยในเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากใบด้วยวิธี spread บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) การทดสอบในครั้งนี้นี้ศึกษาสารสกัดจากใบที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.50, 1, 2 และ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มี Tween-80 ร้อยละ 0.2 เป็นตัวทำละลายและตัวควบคุม พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นต่ำเท่ากับร้อยละ 0.50 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของ *A. phaeospermum* อย่างมีนัยสำคัญที่ร้อยละ 81.40 สารสกัดจากใบมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ชีวมวล และสร้างสปอร์อย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

บุหรัน (2556) ได้กล่าวไว้โดยสรุป ดังนี้ อนุมูลอิสระ คือ โมเลกุลหรืออนุภาคอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่อยู่เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากการรับหรือขาดอิเล็กตรอนไปหนึ่งตัว โดยปกติธาตุต่างๆ ที่อยู่ในโมเลกุลที่เสถียรจะต้องมีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนคู่ ปัจจุบันสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปมาก ร่างกายได้รับตัวกระตุ้นที่ทำให้มีโอกาสเกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น เอนไซม์ที่สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase และ peroxidase ไม่สามารถควบคุมการเกิดอนุมูลอิสระได้ทั่วถึงจึงทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ ขึ้นดังนั้นการศึกษาหาสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระจึงมีความสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์

สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือหยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ไม่ให้เกิดต่อไป อย่างไรก็ดีตามสารต้านอนุมูลอิสระในอุดมคติ ควรจะมีสมบัติที่สำคัญดังนี้คือ มีความจำเพาะสูงในการเข้าจับอนุมูลอิสระโดยตรง และกำจัดอนุมูลให้หมดไป รวมถึงไม่มีผลกระทบบต่อการแสดงออกของยีน สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งสารที่มาจากธรรมชาติและสารสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติได้แก่ สารโพลีฟีนอลที่พบในพืชทั่วไป ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีส่วนประกอบฟีนอลิกที่ทราบโครงสร้างที่แน่นอนจำนวนมากกว่า 8,000 ชนิด สารที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ ฟลาโวน กรดแกลลิก ลิกนิน แทนนิน แอนโทไซยานิน แครโทีนอยด์ และอนุพันธ์ของกรดซินนามิก โดยสามารถพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เมล็ด ผล ใบ และดอก นอกจากนี้มีรายงานวิจัยของวิลพร (2551) ศึกษาบทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระต่อโรคมะเร็งกล่าวว่าไว้ว่า สารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดอัตราการเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งได้หลายชนิด โดยมีฤทธิ์แตกต่างกันไป เช่น ยับยั้งการเกิดสารก่อมะเร็ง ป้องกันสิ่งต่างๆ ที่ส่งเสริมให้เกิดมะเร็ง หยุดการเจริญ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และเซลล์ที่กำลังจะกลายเป็นเซลล์มะเร็ง ลดอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์ และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีรายงานจำนวนมากที่สนับสนุนว่าการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากพืชผัก และผลไม้สามารถลดอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งได้เช่น จากรายงานการศึกษาแบบติดตามคนไข้ใน 14 ประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 11,546 คน เป็นเวลา 25 ปี พบว่าพืชผักและผลไม้ช่วยลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้ถึง 5.5 เท่า บางรายงานตรวจสอบชี้ชัดลงไปถึงชนิดของผักด้วย เช่น ผักที่มีสีเหลืองหรือส้ม เช่น แครอท มันฝรั่ง พบว่าสามารถลดอัตราการเสี่ยงของการเป็นมะเร็งปอดได้มากกว่าผักชนิดอื่น การรับประทานผักและผลไม้ที่มีเบต้าแคโรทีน วิตามินอี และวิตามินซีสูง สามารถลดการเกิดมะเร็งเต้านมได้จริงในสตรีวัยเจริญพันธุ์ ซึ่งผลดังกล่าวได้จากการติดตามคนไข้ 83,234 คน เป็นเวลา 14 ปี นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกมากที่ไม่ได้ยกตัวอย่างมาให้เห็น แต่โดยสรุป แล้วสารต้านอนุมูลอิสระน่าจะส่งผลดีต่อร่างกาย และลดอัตราการเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งชนิดต่างๆ ได้จริง แต่ส่วนใหญ่พบว่าฤทธิ์เด่นชัดอยู่ในรูปของพืชผักสดและผลไม้มากกว่าสารสกัดหรือตัววิตามินโดยตรง ดังนั้นการรับประทานผักและผลไม้จึงเป็นสิ่งที่ทำได้ไม่ยาก และมีผลดีต่อสุขภาพอย่างแท้จริง

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ วิธีที่นิยม ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้นมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจโดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น DPPH และ ABTS การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหาได้จากอัตราส่วนของการลดลง

ของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน (เช่น โทรลอกซ์ วิตามินซี และเฟอรูลิกแอซิด) หน่วยของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงได้ 2 แบบ คือ (1) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูงก็แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงและ (2) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ทั้งสองแบบสามารถแสดงหน่วยได้หลากหลายได้แก่ ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัม มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิลิตร และมิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตร เป็นต้น

### 2.2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สาร DPPH ที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล ทั้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร จากการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้ โดยคำนวณที่จำลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง จากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังนี้

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

โดย  $A_0$  = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

$A_s$  = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ โทรลอกซ์ (trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) แสดงค่าเป็น TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัมหรือไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัม ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ DPPH ค่อนข้างเสถียร ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อน และโลหะสามารถเกิดการรบกวน (ซึ่งเป็นตัวรบกวน) แล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้เช่นกัน (ประภัสสร และวัชรวิ, 2554)

### 2.2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

เป็นวิธีวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS ปกติมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้น ABTS จะทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจาง ซึ่งทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาจึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณที่จำลงของการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ซึ่งวิธีการคำนวณ และการเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH ดังนี้ ร้อยละในการต้านอนุมูลอิสระ

$$\text{ABTS radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

โดย  $A_0$  = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

$A_s$  = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

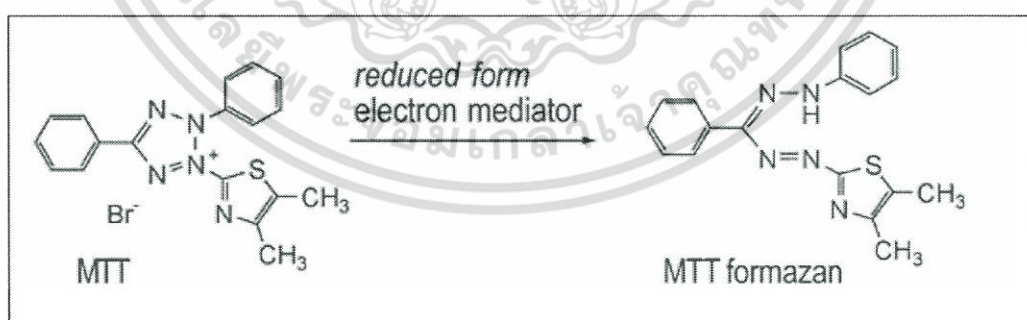
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ABTS ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างกว้าง ส่วนข้อเสีย คือ ABTS เป็นสารสังเคราะห์ที่ไม่พบในธรรมชาติของร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (บุหรัน, 2556)

## 2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ได้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อสารทดสอบ ซึ่งส่วนใหญ่จะดูความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) ปัจจุบันมีหลากหลายวิธีที่ใช้วัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เช่น การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต วัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น และ metabolic activity ของเซลล์ ซึ่งการวัด metabolic activity เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและเป็นที่ยอมรับมากที่สุด

การวัด metabolic activity ภายในเซลล์นั้น สามารถบ่งบอกว่าเซลล์นี้ยังมีพลังงานที่จะใช้ในการเพิ่มจำนวนอยู่หรือไม่ กลุ่มเซลล์ใดที่แสดงให้เห็นว่ามี metabolic activity มาก นั้นหมายถึงว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ในการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยการวัด metabolism มีอยู่หลายวิธีด้วยกัน ยกตัวอย่างเช่น 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) หลักการทำงานของ MTT คือเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่หรือ metabolically active เท่านั้นที่สามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase เปลี่ยน MTT ให้เป็นผลึก formazan โดยปฏิกิริยา reduction ผลึกของ formazan ที่ได้มีสีม่วงน้ำเงิน (รูปที่ 2.2) และมีความสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 550-600 นาโนเมตร (Mosmann, 1983) ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสีม่วงน้ำเงินหรือปริมาณผลึก formazan ที่เกิดขึ้นแปรผันโดยตรงกับปริมาณของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ซึ่งขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้นจึงสามารถวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยการวัดปริมาณผลึก formazan ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง MTT ภายในเซลล์ (เบ็ญจมาศ, 2553)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT Colorimetric assay

(ที่มา : [www.dojindo.com/products/category/dsp\\_detail.cfm?requesttimeout=500&ProdName=MTT](http://www.dojindo.com/products/category/dsp_detail.cfm?requesttimeout=500&ProdName=MTT))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mahesh and Jayakumaran (2010) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากใบเปลือกไม้ และเนื้อไม้ของ *T. grandis* ที่สกัดด้วยเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.50, 5, 12.50 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบด้วยวิธี MTT พบว่า สารสกัดจากเปลือกไม้ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์สูงมากกับ chick embryo fibroblast (CEF) และ HEK293 ที่ร้อยละ 87 และ 95.30 ตามลำดับ

Mosad *et al.* (2014) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จากใบของ *T. grandis* โดยสกัดสารสกัดหยาบด้วยเมทานอล (ร้อยละ 90) และสกัดสารด้วยเอทิลอะซิเตทและบิวทานอล จากนั้นทดสอบความเป็นพิษต่อ liver carcinoma cell line (HepG2) ด้วยวิธี sulforhodamine B (SRB) ดัดแปลงจาก Skehan *et al.* (1990) กับสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 1, 2.50, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากบิวทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด HepG2 สูงสุด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 11.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ สารสกัดจากเมทานอล (ร้อยละ 90) และเอทิลอะซิเตทมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 19.70 และ 22.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ doxorubicin ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน ( $IC_{50}$  เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร )

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT กับพืชชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น Manosroi *et al.* (2005) ศึกษาพบว่าน้ำมันโหระพาสามารถเพิ่มฤทธิ์ของเอนไซม์ glutathione-S-transferase มากกว่าร้อยละ 78 ในกระเพาะ ตับ และหลอดอาหารของหนูทดลอง และสามารถต้านการก่อมะเร็งในหนูทดลองได้ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของสารซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิด squamous cell carcinoma ในกระเพาะอาหารของหนูทดลอง พบว่าน้ำมันโหระพามีพิษต่อเซลล์มะเร็งเมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT ต่อ mouth epidermal carcinoma cell line (KB) และ murine leukaemia cell line (P388)

รัชฎาพร และคณะ (2554) ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดย่านาง (*Tiliacora triandra*) เครือหมาน้อย (*Cissampelos pareira*) และรางจืด (*Thunbergia laurifolia*) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยเตรียมสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำ เอทานอล และอะซิโตน จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดรางจืดชั้นเอทานอลมีความสามารถต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดเครือหมาน้อย และสารสกัดย่านาง โดยมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 100 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดจึงจัดอยู่ในประเภทของสารที่มีความเป็นพิษต่ำ

ฉัตรทาริกา และคณะ (2558) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นตะไคร้ (*Litsea cubeba*) ต่อเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562, Molt4, THP1 และ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดต้นตะไคร้ชั้นเฮกเซน แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 และ Molt4 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 175.70 และ 151.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 และ Molt4 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 155 และ 187.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากต้นตะไคร้ชั้นเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด THP1 และเซลล์ชนิด PBMCs ดังนั้นสารสกัดต้นตะไคร้ชั้นเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และมีความจำเพาะต่อการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 ตัวอย่างพืช

ใบสัก จากบริเวณโรงเรียนพรตพิทยพยัต เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ

#### 3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 96-well plate
- 3.2.2 Aluminium foil
- 3.2.3 Autopipette
- 3.2.4 Balance
- 3.2.5 Beaker
- 3.2.6 Buchner flask, Buchner funnel
- 3.2.7 Carrel flask
- 3.2.8 Centrifuge
- 3.2.9 Cuvette
- 3.2.10 Duran
- 3.2.11 Erlenmeyer flask
- 3.2.12 Filter cloth
- 3.2.13 Freeze dryer
- 3.2.14 Incubator
- 3.2.15 Inverted microscope
- 3.2.16 Lamina air flow
- 3.2.17 Magnetic bar
- 3.2.18 Microplate reader
- 3.2.19 Pipette
- 3.2.20 Pipette boy
- 3.2.21 Pipette tip
- 3.2.22 Rotary evaporator
- 3.2.23 Separating funnel
- 3.2.24 Shaker
- 3.2.25 Spectrophotometer
- 3.2.26 Stirrer
- 3.2.27 Volumetric flask
- 3.2.28 Vortex mixture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 สารเคมี

- 3.3.1 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)
- 3.3.2 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- 3.3.3 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)
- 3.3.4 Butanol
- 3.3.5 Dichloromethane
- 3.3.6 Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 3.3.7 Ethanol
- 3.3.8 Ethyl acetate
- 3.3.9 Fetal Bovine Serum (FBS)
- 3.3.10 Folin-Ciocalteu reagent
- 3.3.11 Gallic acid
- 3.3.12 Gentamicin
- 3.3.13 Hexane
- 3.3.14 Methanol
- 3.3.15 Mitomycin C
- 3.3.16 Phosphate Buffer Solution (PBS)
- 3.3.17 Potassium persulphate
- 3.3.18 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium
- 3.3.19 Sodium carbonate
- 3.3.20 Sodium sulphate anhydrous
- 3.3.21 Trolox
- 3.3.22 Trypan blue stain
- 3.3.23 Trypsin

### 3.4 เซลล์ไลน์

- 3.4.1 Human colon adenocarcinoma cell line (HT-29) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.พรทิพา พิชา งานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ
- 3.4.2 Human immortalized keratinocyte cell line (HaCat) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.นพ.อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ ห้องปฏิบัติการนาโนชีวเวชศาสตร์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 3.4.3 Oral human epidermal carcinoma cell line (KB) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### 3.5 การดำเนินงาน

#### 3.5.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากใบสัก

ดัดแปลงจากวิธีของ Astiti and Suprpta (2015) โดยสกัดสารสกัดหยาบจากใบสัก ด้วยวิธีการหมักกับตัวทำละลายเมทานอล โดยแช่ใบสักในตัวทำละลายเมทานอลให้พอท่วมเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปกลั่นระเหยสารโดยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน จนได้สารสกัดหยาบจากเมทานอล และทำให้แห้งโดยเก็บไว้ในเดซิเคเตอร์ จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากเมทานอล 10 กรัม ไปละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร เพื่อนำไปสกัดด้วยวิธี Partition โดยใช้ตัวทำละลายเรียงตามขั้ว คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ตามลำดับ ในอัตราส่วนตัวทำละลายต่อสารสกัด 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กอย่างต่อเนื่อง เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวม 1,000 มิลลิลิตร โดยเก็บในที่มืด จากนั้นทำให้แห้งโดยเครื่องกลั่นระเหย จนได้สารสกัดหยาบในแต่ละชั้น ส่วนชั้นน้ำที่เหลือนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจนได้สารสกัดหยาบชั้นน้ำ

#### 3.5.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ดัดแปลงจากงานวิจัยของกรรณก และคณะ (2555) โดยซึ่งสารสกัดหยาบจากใบสักในแต่ละตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วดูดมา ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 5 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที ปิดสารละลายลงในคิวเวทท์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปหน่วยของมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม น้ำหนักแห้งสารสกัด โดยใช้สารมาตรฐาน คือ กรดแกลลิก นำมาสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 3.5.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

##### 3.5.3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ดัดแปลงจากงานวิจัยของประภัสสร และคณะ (2554) โดยละลายสารสกัดจากใบสักจากตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 15.625, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หยอดลงใน 96 well-plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น DPPH ที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ blank (ไม่เติมน้ำกลั่น DPPH) และค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมที่ไม่เติมน้ำกลั่นจากใบสัก ทำการทดลองแบบเดียวกัน (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย) สำหรับสารมาตรฐานโทรลอกซีใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทดสอบได้ตามขั้นตอนเดียวกัน จากนั้นนำผลที่ได้คำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสมการดังนี้

การใช้น้ำกลั่นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

โดย  $A_0$  = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

$A_s$  = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

นำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Tange Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ DPPH ลดลงร้อยละ 50 หรือ 50% Inhibitory Concentration ( $IC_{50}$ )

### 3.5.3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

ดัดแปลงจากวิธีของ Re *et al.* (1998) โดยใช้โพแทสเซียม เปอร์ซัลเฟตปริมาณ 6.62 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ กระตุ้นสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ โดยผสมเข้ากับโพแทสเซียม เปอร์ซัลเฟตในอัตราส่วน 1:1 จะได้ ABTS cation radical ที่มีสีเขียวอมฟ้าและสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลาย ABTS ที่ได้มาเจือจางในเมทานอล และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ  $0.70 \pm 0.02$  ก่อนใช้งานทุกครั้ง จากนั้นผสมสารมาตรฐานโทรลลอกซ์เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม และผสมสารสกัดจากใบสักที่ต้องการทดสอบปริมาตร 30 ไมโครลิตร กับสารละลาย ABTS ปริมาตร 970 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ blank (ที่ไม่เติมอนุมูลอิสระ ABTS) และค่าการดูดกลืนแสงของ control (ที่ไม่เติมสารสกัดจากใบสัก) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระในรูปของสมการดังนี้

$$\text{ABTS radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

โดย  $A_0$  = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

$A_s$  = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

นำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ให้ลดลงร้อยละ 50 หรือค่า  $IC_{50}$

### 3.5.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

#### 3.5.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทำการทดสอบในอาหาร Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 ที่มี Fetal Bovine Serum (FBS) ร้อยละ 8 ทำการถ่ายเซลล์และนับเซลล์โดยการย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue จากนั้นคำนวณจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นให้ในแต่ละเซลล์ดังนี้ เซลล์ไลน์ชนิด HaCat และ HT-29 จำนวน  $1.5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์ไลน์ชนิด KB จำนวน  $1.8 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หยอดเซลล์ลงใน 96 well-plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.5.4.2 การเตรียมสารสกัด

นำสารสกัดหยาบจากเฮกเซน ไคโคลโรวีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ปริมาณ 200 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ร้อยละ 100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ PBS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ได้สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารสกัดหยาบด้วยแผ่นกรอง whatman ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำ stock มาเจือจาง โดยดูดสารสกัดหยาบจาก stock ปริมาตร 0.80 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่มี FBS ร้อยละ 5 ปริมาตร 3.20 มิลลิลิตร ได้สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดสอบเบื้องต้นก่อนเพื่อทดสอบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายใดที่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยหยอดสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน 96-well plate โดยใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็น ตัวควบคุมผลบวก และสารละลาย DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 1 เป็นตัวควบคุมผลลบ ดังรูปที่ 3.1 เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT ต่อไป เมื่อทดสอบความเป็นพิษของ สารสกัดในตัวทำละลายแต่ละชั้นแล้ว จากนั้นเลือกสารสกัดจากตัวทำละลายที่เป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดจำนวน 2 ตัวทำละลาย โดยเจือจางสารสกัดหยาบด้วยอาหาร RPMI ที่มี FBS ร้อยละ 5 ให้ได้ ความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 2,000, 1,500, 1,000, 500 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทดสอบ ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT ต่อไป

### 3.5.4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

MTT เป็นสารละลาย tetrazolium มีสีเหลือง เมื่อถูกรีดิวซ์แล้วทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ succinate dehydrogenase ที่อยู่ในไมโตรคอนเดรียของเซลล์เกิดเป็นผลึก formazan (สีม่วง) ไม่ละลายน้ำ (Mosmann, 1983) โดยปริมาณผลึก formazan บ่งบอกถึงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเป็นส่วนโดยตรงกับค่าการดูดกลืนแสง โดยนำเซลล์ที่บ่มกับสารสกัดหยาบเป็นเวลา 20 ชั่วโมง มาเติมสารละลาย MTT (ที่มี PBS) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ต่ออีกเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเก่าทิ้ง และเติม สารละลาย DMSO ร้อยละ 100 ผสมกับสารละลายเอทานอลร้อยละ 95 ด้วยอัตราส่วน 1:1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึก formazan จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าดูด การกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) จากสมการ ดังนี้

$$\% \text{ Cytotoxicity} = [(A_0 - A_5) / A_0] \times 100$$

โดย  $A_0$  = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ตัวควบคุม)

$A_5$  = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

โดยเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และคำนวณระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ในร้อยละ 50 (CC<sub>50</sub>) ดัดแปลงจากวิธีของ Mahesh and Jayakumaran (2010)

เซลล์แต่ละชนิด ทำซ้ำ 3 ครั้ง

สารสกัด	เซลล์ 1 ชนิด			เซลล์ 1 ชนิด			เซลล์ 1 ชนิด			Blank		
เฮกเซน												
ไดคลอโรมีเทน												
เอทิลอะซิเตท												
บิวทานอล												
น้ำ												
ตัวควบคุม												
ตัวควบคุมผลบวก						+						
ตัวควบคุมผลลบ						-						

รูปที่ 3.1 แผนผังการใส่สารสกัดหยาบบน 96-well plate สำหรับการทดสอบเบื้องต้นของสารสกัด จากตัวทำละลาย ทดสอบกับสารสกัดความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

- หมายเหตุ
- ตัวควบคุม : เซลล์เลี้ยงกับอาหาร RPMI ที่มี FBS ร้อยละ 5
  - ตัวควบคุมผลบวก (+) : mitomycin C 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
  - ตัวควบคุมผลลบ (-) : DMSO ร้อยละ 1
  - Blank : อาหาร RPMI ที่มี FBS ร้อยละ 5

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากใบสัก

การสกัดสารสกัดหยาบจากใบสัก โดยนำใบสักจากบริเวณโรงเรียนพรตพิทยพยัต ที่มีน้ำหนักแห้ง 486.77 กรัม สกัดสารสกัดหยาบโดยวิธีการหมักใบสักกับตัวทำละลายเมทานอล ได้สารสกัดหยาบจากเมทานอลมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 48.90 กรัม เมื่อได้สารสกัดหยาบจากเมทานอลแล้ว นำสารสกัด 10 กรัม ไปสกัดต่อด้วยวิธี Partition โดยใช้ตัวทำละลายเรียงตามขั้ว คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ทำให้ได้สารสกัดที่ออกมาตามลำดับขั้วของตัวทำละลายที่ต่างกันโดยสารสกัดหยาบจากเฮกเซน มีลักษณะสีเขียวเข้ม และมีความหนืด สารสกัดหยาบจากไดคลอโรมีเทน มีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม และมีความหนืดน้อยกว่าสารสกัดหยาบจากเฮกเซนเล็กน้อย สารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตท มีลักษณะสีน้ำตาลแดงอิฐ และเป็นผง สารสกัดหยาบจากบิวทานอล มีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม และเป็นผง ส่วนสารสกัดหยาบจากชั้นน้ำ ทำแห้งโดยการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง ได้สารสกัดที่มีลักษณะสีน้ำตาลแดง และมีความหนืด โดยปริมาณสารที่สกัดได้ในแต่ละตัวทำละลาย แสดงในตารางที่ 4.1 เช่นเดียวกับ Mosad *et al.* (2014) ทำการสกัดสารจากใบสักที่มีน้ำหนักแห้ง 20 กรัม โดยหมักใบสักกับตัวทำละลายเมทานอลร้อยละ 100, 90, 85, 70 และ 50 ได้สารสกัดหยาบคิดเป็นร้อยละ 15.05, 17.22, 18.82, 21.44 และ 9.31 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากนั้นนำไปสกัดต่อด้วยวิธี Partition โดยใช้ตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตท ได้สารสกัดหยาบที่มีน้ำหนักแห้งคิดเป็นร้อยละ 1.97, 0.71 และ 0.27 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายต่างๆ จากใบสัก และร้อยละของสารสกัดจากตัวทำละลายต่างๆ ต่อสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอล 10 กรัม

สารสกัด	ปริมาณสารสกัดที่ได้ (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด	ลักษณะสารสกัดที่ได้
เฮกเซน	2.29	22.90	สารสีเขียวเข้ม หนืด
ไดคลอโรมีเทน	0.87	8.77	สารสีน้ำตาลเข้ม หนืด
เอทิลอะซิเตท	1.15	11.50	สารสีน้ำตาลแดงอิฐ แห้งเป็นผง
บิวทานอล	1.22	12.24	สีน้ำตาลเข้ม แห้งเป็นผง
น้ำ	2.36	23.56	สีน้ำตาลแดง หนืด

เห็นได้ว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายต่างกัน มีปริมาณที่สกัดได้ไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่ใช้และคุณสมบัติของสารในพืชที่ต้องการสกัด เพราะตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความสามารถในการสกัดสารได้แตกต่างกัน เนื่องจากตัวทำละลายที่นำมาใช้สกัดมีความเป็นขั้วที่ต่างกัน โดยเรียงลำดับจากความเป็นขั้วน้อยไปความเป็นขั้วมาก ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ การเลือกตัวทำละลายพิจารณาโดยใช้หลักที่ว่าสารที่มีสมบัติคล้ายคลึงกันย่อมละลายกันได้ (like dissolves like) หมายความว่า สารละลายในตัวทำละลายที่มีโครงสร้างหรือหมู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ลงนามในชื่อของโรงเรียนพรตพิทยพยัต เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นใบใช้ใบนี้หรือเอกสารนี้ในทางที่ไม่ถูกต้อง กรุณาแจ้งมาที่โรงเรียนพรตพิทยพยัต โทร. 0-2554-1111 หรือ 0-2554-1112 ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟังก์ชันคล้ายกัน เช่น ตัวทำละลายที่มีความเป็นขี้มูกละลายโมเลกุลที่มีความเป็นขี้มูกได้ดี ตัวทำละลายที่มีความเป็นขี้มูกน้อยละลายโมเลกุลที่มีความเป็นขี้มูกน้อยได้ ส่วนตัวทำละลายไม่มีขี้มูกละลายโมเลกุลที่ไม่มีขี้มูก (ศักดิ์ศรี, 2558) จากตารางที่ 4.1 เห็นได้ว่าสารสกัดในชั้นน้ำมีปริมาณที่ได้สารสกัดมากที่สุดเท่ากับ 2.36 กรัม คิดเป็นร้อยละ 23.56 อาจเนื่องมาจากใบสีกนั้นเป็นพืชที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารที่มีขี้มูกสูงเป็นจำนวนมาก จึงทำให้สารสกัดหยาบชั้นน้ำมีน้ำหนักมากที่สุด เมื่อได้สารสกัดหยาบจากใบสีกทั้ง 5 ชนิดแล้ว จึงนำไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ด้วยวิธี MTT colorimetric

#### 4.2 ผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบสีก

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบสีกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu จากสารสกัดที่สกัดได้ในแต่ละตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตท มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกรดแกลลิก (260.85 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) รองลงมา คือ สารสกัดหยาบจากบิวทานอล (182.61 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) ส่วนสารสกัดหยาบจากชั้นน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่ำที่สุด (50.57 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบสีกจากตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ

สารสกัด	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE / g extract) $\pm$ SE
เฮกเซน	55.75 $\pm$ 1.91
ไคคลอโรมีเทน	15.02 $\pm$ 1.43
เอทิลอะซิเตท	260.85 $\pm$ 3.96
บิวทานอล	182.61 $\pm$ 2.99
น้ำ	50.57 $\pm$ 1.61

หมายเหตุ :  $\pm$  SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เห็นได้ว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบสีกในการศึกษาครั้งนี้ สอดคล้องกับในรายงานของ Mosad *et al.* (2014) มีการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดหยาบจากใบสีกที่สกัดได้จากเมทานอล และสกัดต่อด้วยวิธี Partition ใช้ตัวทำละลายไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ตามลำดับ พบว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด (400.56 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) รองลงมา คือ บิวทานอล (295.67 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) และไคคลอโรมีเทน (208.32 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) ตามลำดับ และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Lacretetal *et al.* (2012) ทำการสกัดสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสีกด้วยน้ำ และสกัดต่อด้วยตัวทำละลายไคคลอโรมีเทนและไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอทิลอะซิเตท เมื่อทำการวิเคราะห์สารพฤกษเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีพบสารประกอบฟีนอลิก 4 ชนิด ได้แก่ acetovanillone, e-isofuraldehyde, 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) propan-1-one และ evofolin A นอกจากนี้ ยังพบสารใหม่ให้ชื่อว่า tectonoelin A และ tectonoelin B อีกด้วย ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวจับไล่อนุมูลอิสระที่สำคัญ โดยหน่วงเหนี่ยวหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร จึงสามารถป้องกันการเกิดขั้นตอน propagation ได้ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ เป็นตัวให้อิเล็กตรอน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแคทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป (วิไลพร, 2551)

### 4.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบสัก

#### 4.3.1 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบสักที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15.625, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารมาตรฐานที่ใช้คือ โทรลอกซ์ จากผลการทดลอง คำนวณร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ แสดงดังตารางที่ 4.3

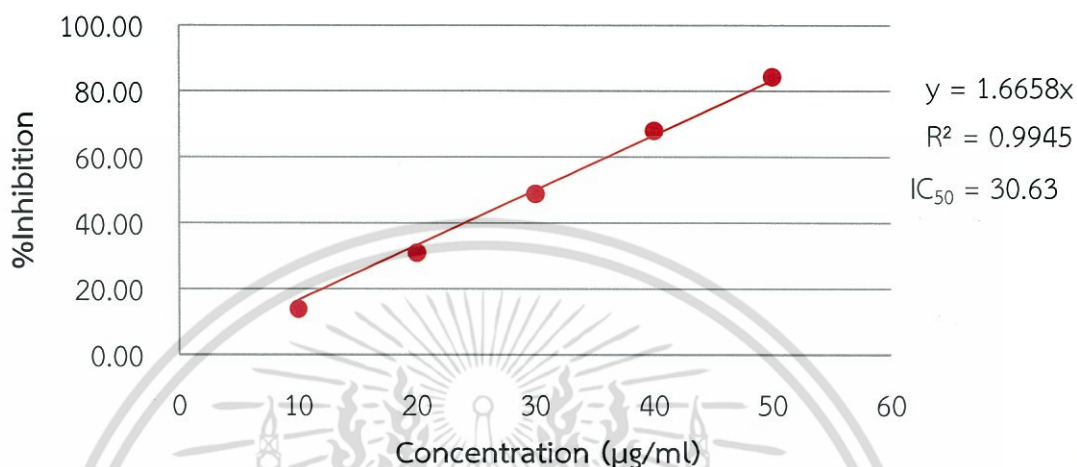
ตารางที่ 4.3 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ IC<sub>50</sub> ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์

ความเข้มข้นโทรลอกซ์ (µg/ml)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ± SE	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
10	13.94 ± 2.64	
20	30.96 ± 4.40	
30	48.81 ± 3.21	30.63
40	68.05 ± 3.51	
50	84.34 ± 1.64	

หมายเหตุ : ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

นำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ จากตารางที่ 4.3 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้โปรแกรม GraphPad 5.0 ได้กราฟแสดงดัง รูปที่ 4.1 เป็นกราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R<sup>2</sup>) ซึ่งเป็นความแปรผันที่เกิดขึ้นกับตัวแปร Y มีผลเนื่องมาจากตัวแปร X เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่มีการค่าเท่ากับ 0.9945 หรือร้อยละ 99.45 โดยค่า R<sup>2</sup> เป็นค่าการประมาณความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ได้มากไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือน้อย ในการคำนวณค่าที่ได้จะอยู่ในช่วงระหว่าง 0 ถึง 1 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลงร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) พบว่าสารมาตรฐานโทรลอกซ์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลงร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 30.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

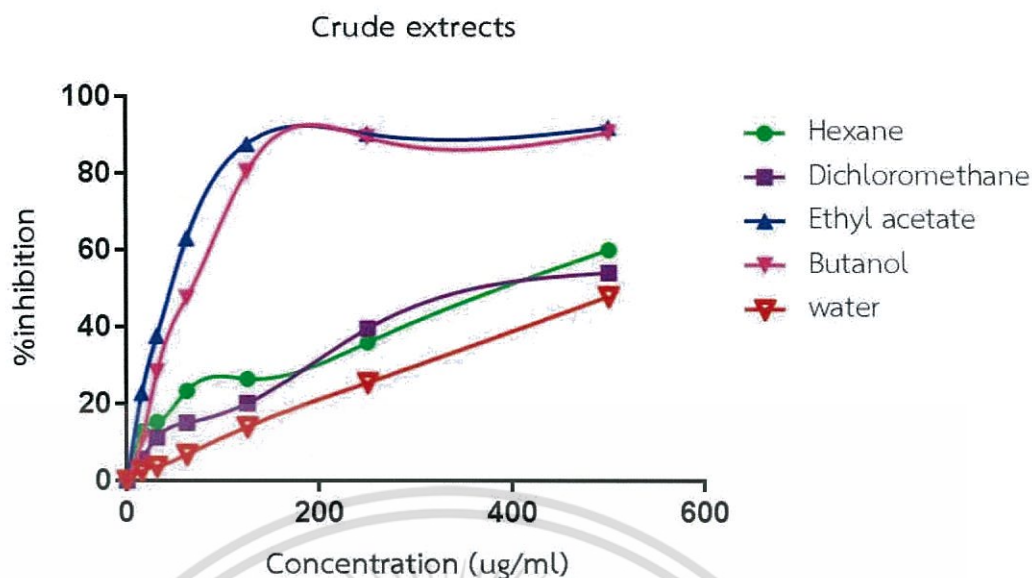
หมายเหตุ :  $R^2$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination)

คำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงในตารางที่ 4.4 นำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด จากตารางที่ 4.4 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสักจากตัวทำละลาย 5 ชนิดกับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังรูปที่ 4.2 โดยใช้โปรแกรม GraphPad 5.0 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลงร้อยละ 50 โดยสรุปได้ว่า สารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตท มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบจากบิวทานอล มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 46.00 และ 67.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นเพียง 46.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นสามารถทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ลดลงร้อยละ 50 ส่วนสารสกัดหยาบจากชั้นน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ซึ่งต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดมากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ลดลงร้อยละ 50

ตารางที่ 4.4 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ IC<sub>50</sub> ของสารสกัดหยาบจากใบสักจากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ

ความเข้มข้นสารสกัด (µg/ml)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด ± SE				
	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เอทิลอะซิเตท	บิวทานอล	น้ำ
15.625	12.83 <sup>d</sup> ± 2.17	5.56 <sup>e</sup> ± 2.50	22.72 <sup>d</sup> ± 3.56	10.53 <sup>e</sup> ± 0.78	2.62 <sup>e</sup> ± 1.20
31.25	15.24 <sup>d</sup> ± 2.34	11.16 <sup>d</sup> ± 1.48	37.55 <sup>c</sup> ± 3.72	28.23 <sup>d</sup> ± 1.33	3.63 <sup>de</sup> ± 2.06
62.50	23.32 <sup>c</sup> ± 3.27	14.97 <sup>d</sup> ± 2.16	62.92 <sup>b</sup> ± 3.76	47.43 <sup>c</sup> ± 0.85	6.70 <sup>d</sup> ± 1.55
125	26.39 <sup>c</sup> ± 3.51	20.05 <sup>c</sup> ± 3.43	87.58 <sup>a</sup> ± 2.66	80.35 <sup>b</sup> ± 2.08	13.92 <sup>c</sup> ± 2.18
250	35.84 <sup>b</sup> ± 1.10	39.47 <sup>b</sup> ± 2.39	90.20 <sup>a</sup> ± 0.77	89.25 <sup>a</sup> ± 2.03	25.43 <sup>b</sup> ± 1.03
500	60.95 <sup>a</sup> ± 1.03	53.95 <sup>a</sup> ± 2.73	91.87 <sup>a</sup> ± 0.75	90.52 <sup>a</sup> ± 1.21	47.86 <sup>a</sup> ± 2.36
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	387.85	362.20	46.00	67.83	> 500

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean)



รูปที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสักจากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นวิธีที่มีความนิยม สะดวก รวดเร็ว และเชื่อถือได้ เพราะอนุมูลอิสระ DPPH มีความเสถียร เหมาะกับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง (Koleva *et al.*, 2002) ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mahesh and Jayakumar (2010) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากส่วนต่างๆ ของสัก ได้แก่ ใบ เปลือกไม้ และเนื้อไม้ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล พบว่าสารสกัดจากเอทิลอะซิเตททั้งจากส่วนเนื้อไม้ และใบของสัก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 98 และ 95 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Sahay and Sharma (2015) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากส่วนเปลือกไม้ของสัก สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 15.20, 22.30, 84.20 และ 89 ตามลำดับ เห็นได้ว่าส่วนต่างๆ ของพืชที่ใช้สกัด และตัวทำละลายที่ใช้สกัดมีผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้แตกต่างกันออกไป

#### 4.3.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบสักที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารมาตรฐาน คือ โทรลอคซ์ จากนั้นนำผลที่ได้คำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานโทรลอคซ์ แสดงดังตารางที่ 4.5 นำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารมาตรฐานโทรลอคซ์ จากตารางที่ 4.5 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอคซ์กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยใช้โปรแกรม GraphPad 5.0 ได้กราฟแสดงดัง รูปที่ 4.3 เป็นกราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) ซึ่งเป็นความแปรผันที่เกิดขึ้นกับตัวแปร Y มีผลเนื่องมาจากตัวแปร X เท่ากับ 0.9966 หรือร้อยละ 99.66 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอคซ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

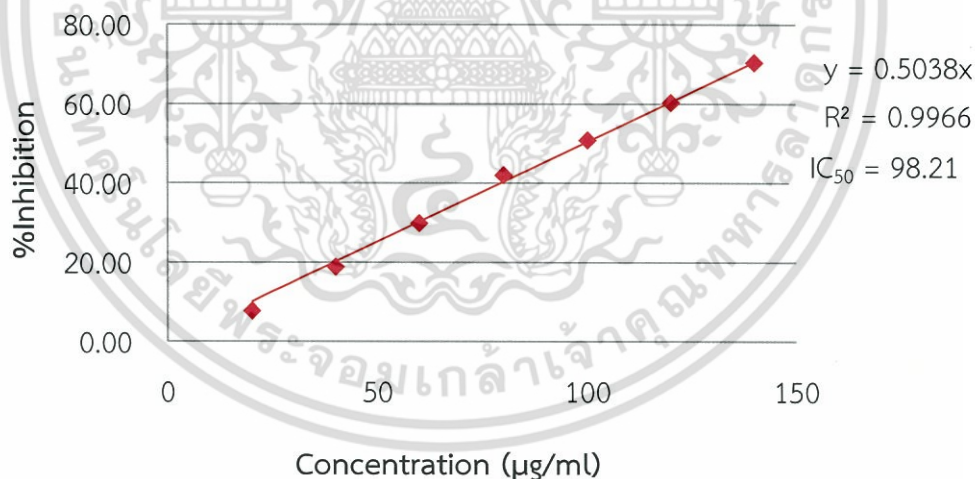
ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.66 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอคซ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.66 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอคซ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ABTS ให้ลดลงร้อยละ 50 โดยพบว่าสารมาตรฐานโทรลอคซ์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ให้ลดลงร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>) ที่ความเข้มข้น 98.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.5 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ IC<sub>50</sub> ของสารมาตรฐานโทรลอคซ์

ความเข้มข้นโทรลอคซ์ (µg/ml)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ± SE	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
20	7.75 ± 0.93	
40	18.79 ± 0.62	
60	29.79 ± 1.27	
80	41.95 ± 1.10	98.21
100	50.76 ± 1.44	
120	60.30 ± 1.08	
140	70.36 ± 0.76	

หมายเหตุ : ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอคซ์กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

หมายเหตุ : R<sup>2</sup> คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

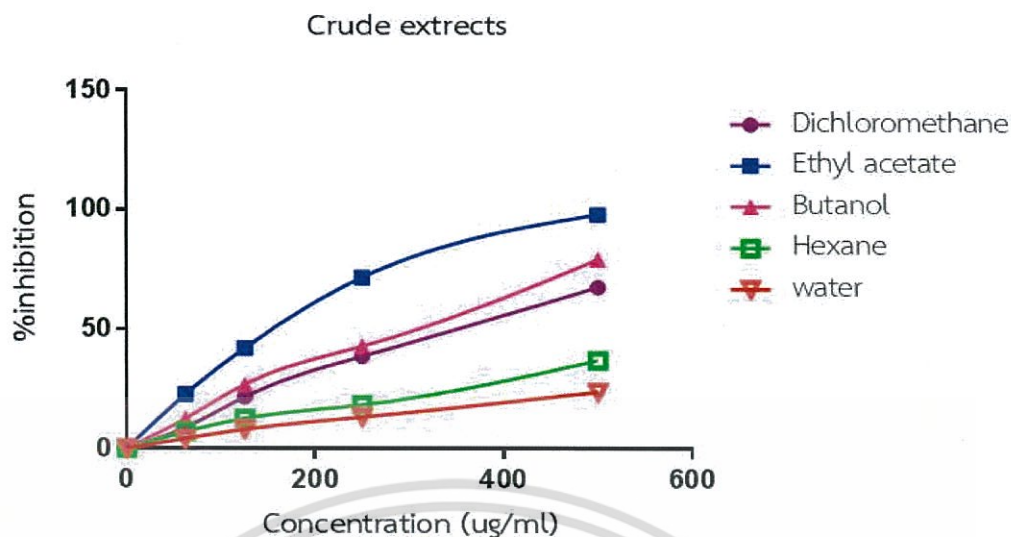
คำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.6 นำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด จากตารางที่ 4.6 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสักกับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ดังรูปที่ 4.4 โดยใช้โปรแกรม GraphPad 5.0 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ให้ลดลงร้อยละ 50 โดยสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบจากบิวทานอลมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 154.24 และ 309.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นเพียง 154.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นสามารถทำให้อนุมูลอิสระ ABTS ลดลงร้อยละ 50 ส่วนสารสกัดหยาบจากชั้นน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบจากเฮกเซน ซึ่งต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดมากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทำให้อนุมูลอิสระ ABTS ลดลงร้อยละ 50

ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mahesh and Jayakumar (2010) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากส่วนต่างๆ ของสัก ได้แก่ ใบ เปลือกไม้ และเนื้อไม้ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล พบว่าสารสกัดที่ได้จากเอทิลอะซิเตททั้งส่วนเนื้อไม้และใบสักมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุดที่ร้อยละ 98.60 และ 81.10 ตามลำดับ และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Ranaa *et al.* (2014) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำจากส่วนเปลือกไม้ของสัก ความเข้มข้น 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1, 1.20, 1.40, 1.60, 1.80 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี ABTS พบว่าสารประกอบโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกไม้ของสัก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพ มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับร้อยละ 67.62 และยังพบว่าเปลือกไม้ของสักมีน้ำตาลยูโรนิกและโปรตีน

ตารางที่ 4.6 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ IC<sub>50</sub> ของสารสกัดหยาบจากใบสักจากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ

ความเข้มข้นสารสกัด (µg/ml)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัด ± SE				
	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เอทิลอะซิเตท	บิวทานอล	น้ำ
62.50	7.06 <sup>d</sup> ± 4.74	8.84 <sup>d</sup> ± 3.97	23.75 <sup>d</sup> ± 2.43	12.57 <sup>d</sup> ± 3.28	4.19 <sup>c</sup> ± 1.79
125	12.60 <sup>bc</sup> ± 2.55	21.52 <sup>c</sup> ± 2.68	42.01 <sup>c</sup> ± 2.87	26.74 <sup>c</sup> ± 5.49	8.01 <sup>b</sup> ± 1.77
250	18.35 <sup>b</sup> ± 2.18	38.65 <sup>b</sup> ± 0.38	71.64 <sup>b</sup> ± 0.38	42.90 <sup>b</sup> ± 0.17	13.22 <sup>b</sup> ± 0.58
500	36.97 <sup>a</sup> ± 1.19	67.54 <sup>a</sup> ± 3.65	97.93 <sup>a</sup> ± 2.50	79.17 <sup>a</sup> ± 7.88	23.72 <sup>a</sup> ± 1.95
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	> 500	350.23	154.24	309.03	> 500

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean)



รูปที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสักจากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบสักในครั้งนี้ เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจาก DPPH และ ABTS เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร (Ahmad *et al.*, 2005) ผลที่ได้จากการทดสอบนี้พบว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยสามารถเรียงลำดับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระตามชนิดของตัวทำละลายได้ดังนี้ เอทิลอะซิเตท บิวทานอล ไดคลอโรมีเทน เฮกเซน และน้ำ หากเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ ไทโรลอกซ์และกรดแกลลิก พบว่าสารสกัดหยาบจากใบสักทั้ง 5 ชนิด มีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารมาตรฐานและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่มีในสารสกัดทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท บิวทานอล ไดคลอโรมีเทน เฮกเซน และน้ำ (400.56, 295.67, 208.32, 55.75 และ 50.57 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) ตามลำดับ สัมพันธ์กับการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในอาหารของ Jacobo-Velazquez *et al.* (2009) ที่กล่าวไว้ว่าหากสารสกัดใดมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมาก ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระก็มากเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบสักมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี แต่การทดลองทั้ง 2 นี้ทำปฏิกิริยาในตุ๊กกลางที่เป็นสารอินทรีย์เพราะละลายสารทุกชนิดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล แต่ในความจริงแล้วเซลล์ในร่างกายของมนุษย์อยู่ในตุ๊กกลางที่เป็นน้ำหรือมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยน้ำ (Guan and Whiteman, 2002) เพราะฉะนั้นควรมีการศึกษาฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระในตุ๊กกลางที่เป็นน้ำด้วย

#### 4.4 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสัก

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบสัก ได้จากการสกัดด้วยวิธี Partition โดยใช้ตัวทำละลายเรียงตามข้อ 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ตามลำดับ จากนั้นนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 3 ชนิด ได้แก่ HT-29, KB และ HaCat โดยทำการทดสอบเบื้องต้นต่อสารสกัดหยาบ 5 ชนิดก่อน เพื่อทดสอบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายใดที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ โดยนำเซลล์ไลน์ 3 ชนิด ทดสอบกับสารสกัดที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร โดยใช้ mitomycin C ความเข้มข้นเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เป็นตัวควบคุมผลบวก และสารละลาย DMSO ร้อยละ 1 เป็นตัวควบคุมผลลบ ทดสอบด้วยวิธี MTT colorimetric คำนวณร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7

จากผลวิเคราะห์ทางสถิติความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 3 ชนิด ของสารสกัดในแต่ละตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คือสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตท (ร้อยละ 73.61, 56.48 และ 80.46 ตามลำดับ) และบิวทานอล (ร้อยละ 65.90, 51.76 และ 82.38 ตามลำดับ) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เห็นได้ว่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มากแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพความเป็นพิษต่อเซลล์มากเช่นกัน จึงคัดเลือกสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทและบิวทานอล มาทำการทดสอบต่อไปเพื่อหาความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 หรือ 50% Cytotoxic Concentration (CC<sub>50</sub>) โดยใช้เซลล์ไลน์ 3 ชนิด ได้แก่ HT-29, KB และ HaCat

ตารางที่ 4.7 ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบสักจากตัวทำละลาย 5 ชนิด ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร

เซลล์ไลน์	ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบสัก ± SE				
	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เอทิลอะซิเตท	บิวทานอล	น้ำ
HT-29	2.05 <sup>b</sup> ± 1.81	32.40 <sup>c</sup> ± 2.04	73.61 <sup>b</sup> ± 1.52	65.90 <sup>b</sup> ± 0.91	-6.86 <sup>b</sup> ± 2.85
KB	-4.99 <sup>b</sup> ± 5.58	49.55 <sup>b</sup> ± 1.79	56.48 <sup>c</sup> ± 6.19	51.76 <sup>b</sup> ± 2.70	-16.32 <sup>b</sup> ± 7.05
HaCat	48.53 <sup>a</sup> ± 3.83	67.92 <sup>a</sup> ± 1.72	80.46 <sup>a</sup> ± 0.38	82.38 <sup>a</sup> ± 2.82	23.05 <sup>a</sup> ± 1.22

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ เพื่อหาความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ของสารสกัดหยาบจากใบสักโดยใช้เซลล์ไลน์ 3 ชนิด ทดสอบกับสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทและบิวทานอลที่ความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆ ดังนี้ 250, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ mitomycin C ความเข้มข้นเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมผลบวกและสารละลาย DMSO ร้อยละ 1 เป็นตัวควบคุมผลลบ ทดสอบด้วยวิธี MTT colorimetric และคำนวณร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ในแต่ละความเข้มข้น แสดงดังตารางที่ 4.8 ได้ผลการทดลองดังนี้

สารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตท มีร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากที่สุด เท่ากับ 80.93 รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ชนิด HaCat และ KB มีร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ เท่ากับ 74.40 และ 60.83 ตามลำดับ สารสกัดเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29 เท่ากับ 70.49 และ 63.84 และต่อเซลล์ไลน์ชนิด HaCat เท่ากับ 61.91 และ 59.58 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,000, 1,500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อเซลล์ไลน์ชนิด KB เท่ากับ 60.83, 55.69 และ 52.45 ตามลำดับ สารสกัดเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นเท่ากับ 500 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.8)

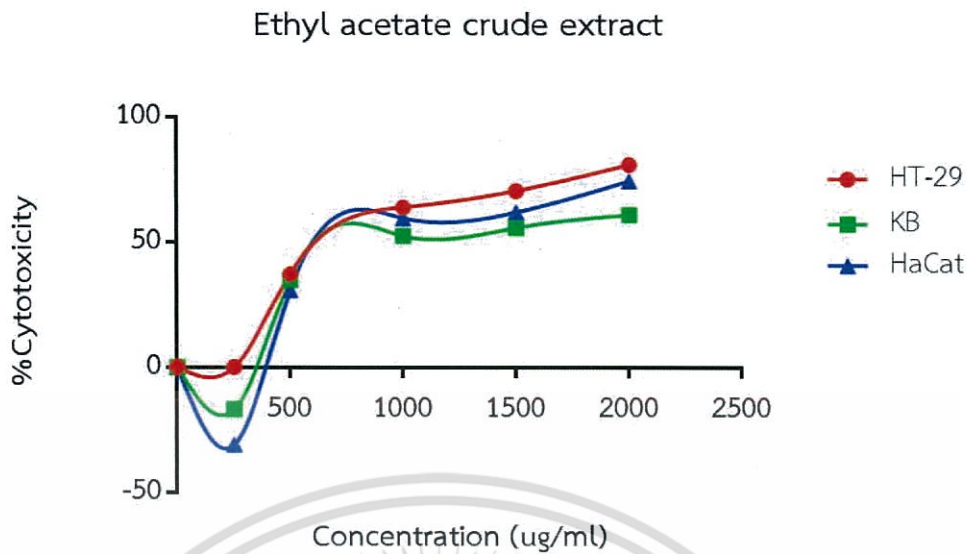
สารสกัดหยาบจากบิวทานอลมีร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29 มากที่สุด รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ชนิด HaCat และ KB สารสกัดบิวทานอลที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,000 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29 เท่ากับ 70.34 และ 66.72 ต่อเซลล์ไลน์ชนิด HaCat เท่ากับ 70.11 และ 65.50 และต่อเซลล์ไลน์ชนิด KB เท่ากับ 58.58 และ 53.46 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดบิวทานอลที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,000, 500 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.8)

นำร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จากตารางที่ 4.8 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสักจากเอทิลอะซิเตทและบิวทานอล กับร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์โดยใช้โปรแกรม GraphPad 5.0 ได้กราฟแสดงดังรูปที่ 4.5 และ 4.6 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสักจากเอทิลอะซิเตทและบิวทานอล กับร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกันโดยพบว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตท (รูปที่ 4.5) และสารสกัดหยาบจากบิวทานอล (รูปที่ 4.6) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29 มากที่สุด รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ชนิด HaCat และ KB และมีแนวโน้มความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เพิ่มมากขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ( $CC_{50}$ ) ของสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทและบิวทานอลต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat แสดงดังตารางที่ 4.9

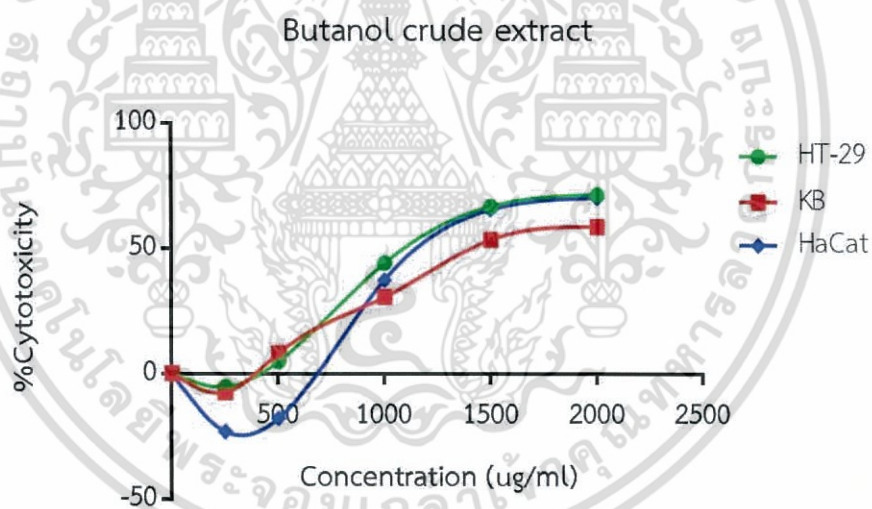
ตารางที่ 4.8 ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ของสารสกัดหยาบจากใบสักจากเอทิลอะซิเตทและบิวทานอล ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 250, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้น (µg/ml)	ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบสัก ± SE					
	เอทิลอะซิเตท			บิวทานอล		
	HT-29	KB	HaCat	HT-29	KB	HaCat
250	0.04 <sup>d</sup> ± 11.88	-16.85 <sup>c</sup> ± 6.81	-30.97 <sup>d</sup> ± 7.52	-5.24 <sup>d</sup> ± 3.38	-7.41 <sup>d</sup> ± 4.77	-23.02 <sup>c</sup> ± 0.82
500	47.69 <sup>c</sup> ± 7.71	43.50 <sup>b</sup> ± 4.28	51.64 <sup>c</sup> ± 3.35	4.93 <sup>c</sup> ± 3.52	8.17 <sup>c</sup> ± 5.22	-17.68 <sup>c</sup> ± 3.23
1,000	63.84 <sup>b</sup> ± 0.67	52.45 <sup>a</sup> ± 7.07	59.58 <sup>b</sup> ± 2.74	44.02 <sup>b</sup> ± 6.40	30.55 <sup>b</sup> ± 4.19	37.34 <sup>b</sup> ± 5.22
1,500	70.49 <sup>b</sup> ± 1.28	55.69 <sup>a</sup> ± 3.24	61.91 <sup>b</sup> ± 1.39	66.72 <sup>a</sup> ± 4.88	53.46 <sup>a</sup> ± 6.07	65.50 <sup>a</sup> ± 3.10
2,000	80.93 <sup>a</sup> ± 3.48	60.83 <sup>a</sup> ± 2.76	74.40 <sup>a</sup> ± 2.81	70.34 <sup>a</sup> ± 3.56	58.58 <sup>a</sup> ± 0.56	70.11 <sup>a</sup> ± 1.56

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean)



รูปที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสักจากเอทิลอะซิเตท กับ ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat



รูปที่ 4.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบสักจากบิวทานอล กับ ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ร้อยละ 50 ของสารสกัดหยาบจากใบสักจากเอทิลอะซิเตท และบิวทานอล

ชนิดเซลล์ไลน์	ความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (CC <sub>50</sub> ) (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	สารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตท	สารสกัดหยาบจากบิวทานอล
HT-29	609.62	1,091.67
KB	603.55	1,406.33
HaCat	599.22	1,149.07

จากตารางที่ 4.9 พบว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทและบิวทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อเซลล์ไลน์ชนิด HaCat, KB และ HT-29 โดยมีค่า CC<sub>50</sub> เท่ากับ 599.22, 603.55 และ 609.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากบิวทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, HaCat และ KB โดยมีค่า CC<sub>50</sub> เท่ากับ 1,091.67, 1,149.07 และ 1,406.33 ตามลำดับ ซึ่งก่อนหน้ามีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากใบ เปลือกไม้ และเนื้อไม้ของ *T. grandis* ที่สกัดด้วยเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ความเข้มข้นเท่ากับ 0.50, 5, 12.50 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดจากเปลือกไม้ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์สูงที่สุดกับ CEF และ HEK293 ที่ร้อยละ 87 และ 95.30 ตามลำดับ (Mahesh and Jayakumaran, 2010) และมีการศึกษาสารแอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ที่สกัดได้จากใบ *T. grandis* ซึ่งสารทั้ง 2 ได้จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HEK293, HCT119 และ L929 ต่อสารสกัดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.50, 5, 12.50 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี MTT พบว่าสารทั้ง 2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HEK293 มากที่สุด มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ เซลล์ไลน์ชนิด HCT119 และ L929 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mahesh and Jayakumaran, 2011) จากการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบสักต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29 และ KB ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และเซลล์ไลน์ชนิด HaCat ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ผิวหนังชั้นบนของมนุษย์ พบว่าสารสกัดหยาบทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากเอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ต่างก็เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HaCat ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ จากการทดลองเป็นการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองเท่านั้น เนื่องจากประหยัดเวลางบประมาณ สามารถทำการทดลองซ้ำได้มากกว่า และที่สำคัญไม่ต้องเผชิญกับองค์การเอกชนที่ต่อต้านการใช้สัตว์ทดลองอีกด้วย (Cetin *et al.*, 2005) อาจทำให้เซลล์ได้รับสารสกัดโดยตรง จึงทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์สูง ซึ่งควรมีการศึกษากับร่างกายของสิ่งมีชีวิตต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาการสกัดสารสกัดหยาบจากใบสัก โดยนำใบสักที่มีน้ำหนักแห้ง 486.77 กรัม แล้วสกัดด้วยวิธีการหมักกับตัวทำละลายเมทานอล ได้สารสกัดหยาบมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 48.90 กรัม เมื่อนำมาสกัดต่อด้วยวิธี Partition โดยใช้ตัวทำละลายเรียงตามขั้ว 5 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ พบว่าได้สารสกัดหยาบในชั้นน้ำปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 2.36 กรัม (ร้อยละ 23.56) รองลงมา คือ สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน บิวทานอล เอทิลอะซิเตท และไดคลอโรมีเทน เท่ากับ 2.29, 1.22, 1.15 และ 0.87 กรัม (ร้อยละ 22.90, 12.24, 11.50 และ 8.77) ตามลำดับ

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย 5 ชนิด มาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท เมื่อเทียบกับกรดแกลลิก (260.85 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) รองลงมา คือ สารสกัดหยาบจากบิวทานอล (182.61 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) และต่ำสุดในสารสกัดชั้นน้ำ (50.57 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด)

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย 5 ชนิด มาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยใช้สารมาตรฐาน คือ โทรลอคซ์ พบว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตท มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบจากบิวทานอล มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 46.00 และ 67.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตท มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบจากบิวทานอล มีค่า  $IC_{50}$  อยู่ที่ 154.24 และ 309.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบชั้นน้ำ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุดในทั้ง 2 วิธี จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบสักทั้ง 2 วิธี ได้แก่ DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบสักมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี และปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก สัมพันธ์กับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ กล่าวคือ หากสารสกัดใดมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมาก ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระก็มากเช่นกัน

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย 5 ชนิด มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ HT-29, HaCat และ KB ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด โดยสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตท มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HaCat, KB และ HT-29 มีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ 599.22, 603.55 และ 609.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เนื่องจากการทดลองครั้งนี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองเท่านั้น ซึ่งอาจทำให้เซลล์ได้รับสารสกัดโดยตรง จึงทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์สูง ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับร่างกายของสิ่งมีชีวิตถึงข้อดี ข้อด้อย และผลในระยะยาวต่อไปในอนาคต ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาสารสกัดจากส่วนใบเพียงอย่างเดียว ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเห็นว่าควรมีการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดในส่วนอื่นๆ ของสัก ต่อเซลล์ไลน์ชนิดอื่นๆ ต่อไป และควรนำสารสกัดจากใบสักไปใช้ในการศึกษาทางด้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เภสัชวิทยา การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี รวมถึงโครงสร้างของสารสำคัญที่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

กรกนก รุ่งเรืองบุรณะกุล, กรรณิการ์ เทพมงคล และชัชวรินทร์ เพชรเลิศ. 2555. “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพื้นบ้านจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี.” หน้า 307 ใน รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 5. วันที่ 4-5 มีนาคม 2556. ชลบุรี : มหาวิทยาลัยบูรพา.

คณิติน สมานมิตร, ต่อลาภ คำโย, ศุภชัย วรรณพงษ์ และวราญ เทียมไธสงค์. 2555. การประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์เพื่อการจำแนกศักยภาพดินที่ขึ้นของไม้สัก (*Tectona grandis* L.f.) ในธรรมชาติบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่ยม จังหวัดแพร่. [Online]. เข้าถึงได้จาก : [http://app.dnp.go.th/opac/multimedia/research/913\\_55.pdf](http://app.dnp.go.th/opac/multimedia/research/913_55.pdf).

จันทรา เจณณวาสน. 2540. โรคมะเร็งกับวิถีทางการดำรงชีวิตของคนเรา. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://medinfo2.psu.ac.th>.

ฉัตรทริกา อภิชาติวรจิ, ไอลดา กลั่นสุข, สุวรรณา เสมศรี และสุรีย์พร หอมวิเศษวงศา. 2558. “ความเป็นพิษของสารสกัดตะไคร้ต้นต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ*. 1(1) : 60-68.

นินนาท อินทฤทธิ์, ภาณุรัฐ เดชะยนต์, สุมาลี ปานทอง และอรุณพร อิฐรัตน์. 2555. “การเปรียบเทียบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของรงทอง และรงทองสด.” หน้า 1-8. ใน การประชุมเครือข่ายวิชาการบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. 2556. “อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ต้านอนุมูลอิสระ.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 12(3) : 275-280.

เบญจมาศ จิตรสมบุรณ. 2553. การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://203.158.6.11:8080/sutir/bitstream/123456789/3746/2/Fulltext.pdf>.

ประภัสสร วีระพันธ์ และวัชรีย์ คุณกิตติ. 2554. “คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยในหลอดทดลอง.” *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน*. 7(3) : 30-38.

รัชฎาพร อุ่นศิริไทย์, จิราวรรณ อุ่นเมตตาอารี และจิตรา สิงห์ทอง. 2554. ฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดย่านาง เครื่องหมายน้อย และรางจืด. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/3916/1/fulltextSUT3-305-53-12-24.pdf>.

วิไลพร ปองเพียร. 2551. การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในพริกเผ. [Online]. เข้าถึงได้จาก : [http://research.pcru.ac.th/rdb/pro\\_data/files/](http://research.pcru.ac.th/rdb/pro_data/files/).

ศักดิ์ศรี สุภาจร. 2558. ภาพเคลื่อนไหว เรื่อง สารละลาย สำหรับเคมี ม.ต้น. อุบลราชธานี. [Online]. เข้าถึงได้จาก : [www.chem.sci.ubu.ac.th/AcidBase2015](http://www.chem.sci.ubu.ac.th/AcidBase2015).

ส่วนปลูกป่าภาคเอกชน. 2553. สัก. กรุงเทพฯ : โครงการสารานุกรมไทยฯ.

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ. 2534. ไม้สัก. เล่มที่ 15. เรื่องที่ 5. กรุงเทพฯ : โครงการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารงานวิชาการสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Ahmad, R. Ali, A.M. Israf, D.A. Ismail, N.H. Shaari, K. and Lajis, N.H. 2005. "Antioxidant, Radical-Scavenging, Anti-Inflammatory, Cytotoxic and Anti-bacterial Activities of Methanolic Extracts of Some *Hedyotis* Species." *Life Science Journal*. 76(1) : 1953–1964.
- Aradhana, R. Rao, K.N.V. Banji, D. and Chaithanya, R.K. 2010. "A Review on *Tectona grandis*.Linn: Chemistry and Medicinal Uses (FAMILY: VERBENACEAE)." *Journal of Herbal Science and Technology*. (1) : 6-9
- Astiti, N.P.A. and Suprpta, N.D. 2012. "Antifungal Activity of Teak (*Tectona grandis* L.f) Leaf Extract Against *Arthrinium phaeospermum* (Corda) M.B. Ellis, The Cause of Wood Decay on *Albizia falcataria* (L.) Fosberg." *International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*. 18(1) : 62-69.
- Bhat, I.U.H. Abdul Khalil, H.P.H. Shuib, N.S. and Noor, A.M. 2010. "Abtifungal Activity of Heartwood Extracts and Their Constituens from Cultivated *Tectona grandis* Against *Phanerochaete chrysosporium*." *Wood Research*. 55 (4) : 59-66.
- Buttke, T.M. McCubrey, J.A. and Owen, T.C. 1993. "Use of an Aqueous Soluble Tetrazolium/Formazan Assay to Measure Viability and Proliferation of Lymphokine-Dependent Cell Lines." *Journal of Immunological Methods*. 157 : 233-240.
- Cetin, Y. and Bullerman, L.B. 2005. "Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins tomammalian Cell Cultures as Determined by The MTT Bioassay." *Food and Chemical Toxicology*. 43(5) : 755 – 764.
- Guan, T.T. and Whiteman, M. 2002. "Antioxidant Activity of Some Tropical Fruits." Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National University of Singapore.
- Jacobo, D.V.A. and Cisneros, Z.L. 2009. "Correlations of Antioxidant Activity Against Phenolic Content Revisited: a New Aproach In Data Analysis for Food and Medicinal Pants." *Journal of Food Science*. 74(1) : 107–113.
- Khana, R.M. and Mlungwanab, S.M. 1999 "5-Hydroxylapachol: a Cytotoxic Agent from *Tectona grandis*." *Phytochemistry*. 50(1) : 439-442.
- Koleva, I.I. BeeK, T. Linseen, J.P.H. Groot, A. and Evstatieva, L.N. 2002. "Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods." *Phytochemical Analysis*. 13(1) : 8-17.
- Lacret, R. Varela, R.M. Molinillo, J.M.G. Nogueiras, C. and Maci', F.A. 2012. "Tectonoelins, New Norlignans from A Bioactive Extract of *Tectona grandis*." *Phytochemistry Letters*. 5(1) : 382–386.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Mahesh, M.S. and Jayakumaran, N.A. 2010. "Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Potentials from Different Extracts of Leaves, Bark and Wood of *Tectona grandis*." *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2(2) : 155-158.
- Mahesh, M.S. and Jayakumaran, N.A. 2011. "Anthraquinones from Leaves of *Tectona grandis* : A Detailed Study on Its Antibacterial Activity and Other Biological Properties." *International Journal of Phytomedicine*. (3)1 : 50-58.
- Manosroi, J. Dhumtanom, P. and Manosroi, A. 2005. "Anti – Proliferative Activity of Essential Oil Estacted from Thai Medicinal Plants on KB and P388 Cell lines." *Cancer Letters*. 235(1) : 1-7.
- Mosad, A.G. Hussein, A.S. and Hassan, M.F.M. 2014. "Antioxidant and Cytotoxic Activity of *Tectona grandis* Linn. Leaves." *International Journal of Phytopharmacology*. 5(2) : 143-157.
- Mosmann, T. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods*. 65(1-2) : 55-63.
- Nayeem, N. and Karvekar, MD. 2010 "Isolation of Phenolic Compounds from The Methanolic Extract of *Tectona grandis*." *The Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2(1) : 221-225.
- Percival, M. 1998. "Antioxidants." *Clinical Nutrition Insights*. 10(1) : 1-2.
- Purushotham, K.G. Arun, P. Jayarani, J. Vasanthakumari, R. Sankar, L. and Reddy, B.R. 2010. "Synergistic in Vitro Antibacterial Activity of *Tectona grandis* Leaves with Tetracycline." *International Journal of PharmTech Research*. 2(1) : 519-523.
- Ramesh, B.N. and Mahalakshim, AM. 2014. "TEAK (*Tectona grandis* Linn.) A Renowned Timber Plant with Potential." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 1(6) : 48-49.
- Ranaa, V. Manuj, K.D. Gogoi, S. and Kumar, V. 2014. "Multifunctional Properties of Polysaccharides from *Dalbergia sissoo*, *Tectona grandis* and *Mimosa diplotricha*." *Carbohydrate Polymers*. 102 : 341-350.
- Re, R. Pellegrini, N. Protrggente, A. Pannala, A. Yang, M. and Rice-Evans, C. 1998. "Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay." *Original Contribution*. 26(9/10) : 1231-1237.
- Sahay, M. and Sharma, P. 2015. "Antioxidant Activity of *Tectona grandis* linn Stem Bark Extract." *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*. 2(1) : 906-907.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Singh, N. Maurya, R. Shukla, N. Palit, G. Singh, P. Sharma, R. and Rajendran, S.M. 2010. “Verbascoside Isolated from *Tectona grandis* Mediates Gastric Protection in Rats via Inhibiting Proton Pump Activity.” *Fitoterapia*. 81 755–761.
- Thomson, R. H. 1971. *Naturally Occurring Quinones*. 2<sup>nd</sup> ed. London and New York : Academic Press.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. อาหาร RPMI 1640 (ชนิดผง)	1	ซอง
2. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว	1,000	มิลลิลิตร
3. $\text{NaHCO}_3$	2	กรัม

ขั้นตอนการเตรียม

1. ผสมอาหาร RPMI 1640 กับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 900 มิลลิลิตร
2. เติม  $\text{NaHCO}_3$  2 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic stirrer
3. ปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร
4. ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0
5. กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ภายในตู้ laminar air flow
6. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 2. การเตรียม complete media

สารเคมีที่ใช้

1. อาหาร RPMI 1640 ที่เตรียมแล้ว	100	มิลลิลิตร
2. Fetal Bovine Serum (FBS)	8%	ปริมาตรต่อปริมาตร
3. Gentamicin	100	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ผสมอาหาร RPMI 1640 กับ FBS แล้วเติมยาปฏิชีวนะ gentamicin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
2. กรองโดยใช้แผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ภายในตู้ laminar air flow
3. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3. การเตรียม Fetal Bovine Serum (FBS)

ขั้นตอนการเตรียม

1. นำซีรัมมาทำการ inactivate ในอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
2. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

### 4. การนับเซลล์ และการคำนวณเซลล์มีชีวิตด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

- เตรียมเซลล์ที่ต้องการนับจำนวน กรณีที่เป็นเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว ต้องทำการย่อยเซลล์ให้หลุดออกจาก flask ก่อน โดยการใช้เอนไซม์ trypsin ในกรณีที่เป็นเซลล์แขวนลอยสามารถดูดเซลล์มานับได้เลย
- ทำการย้อมสีเซลล์โดยดูดเซลล์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ย้อมสีเซลล์ด้วย trypan blue ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- ดูดเซลล์ที่ย้อมสีใส่ลงใน chamber ของฮีมาไซโตมิเตอร์ทั้ง 2 ฝั่ง ฝั่งละ 10 ไมโครลิตร
- นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 และ 40 เท่า โดยที่เซลล์ที่มีชีวิตไม่ติดสีฟ้าของ trypan blue ในส่วนของเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีฟ้าของ trypan blue
- นับจำนวนเซลล์ใน 5 ช่องใหญ่ ทั้ง 2 chamber แล้วบันทึกเซลล์มีชีวิตและไม่มีชีวิต
- คำนวณเซลล์มีชีวิตต่อ 1 มิลลิลิตร จากสูตรต่อไปนี้  
จำนวนเซลล์มีชีวิต/มิลลิลิตร = จำนวนเซลล์มีชีวิตเฉลี่ย  $\times 10^4 \times$  ค่าความเจือจาง (dilution factor)

### 5. การเตรียมสารละลาย MTT เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ปริมาตร 25 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- |                     |    |           |
|---------------------|----|-----------|
| 1. สาร MTT (ชนิดผง) | 50 | มิลลิกรัม |
| 2. PBS (pH = 7.4)   | 25 | มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งสาร MTT ปริมาณ 50 มิลลิกรัม
- เติม PBS ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer

### 6. การเตรียม Phosphate Buffer Saline (PBS) (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- |             |     |           |
|-------------|-----|-----------|
| 1. PBS      | 1   | เม็ด      |
| 2. น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

- นำ PBS สำเร็จรูป จำนวน 1 เม็ด ใส่ลงในบีกเกอร์จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
- ทำให้ PBS ละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกับน้ำกลั่น โดยใช้เครื่อง Magnetic stirrer
- นำสารละลายที่เตรียมมาเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัตโนมัติที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

### 7. การเตรียมสารเพื่อทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ (ปริมาตร 25 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- |             |                |
|-------------|----------------|
| 1. สาร DPPH | 3.94 มิลลิกรัม |
| 2. เมทานอล  | 25 มิลลิลิตร   |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสาร DPPH ปริมาณ 3.94 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล (ทำในที่มืด)
2. ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 25 มิลลิลิตร
3. เก็บไว้ในที่มืด

### 8. การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอคซ์ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- |                            |              |
|----------------------------|--------------|
| 1. สารละลายมาตรฐานโทรลอคซ์ | 10 มิลลิกรัม |
| 2. เมทานอล                 | 10 มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสารละลายมาตรฐานโทรลอคซ์ ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
2. ทำให้ละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่อง Magnetic stirrer

### 9. การเตรียมสารเพื่อทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (ABTS) (ปริมาตร 20 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- |                           |                |
|---------------------------|----------------|
| 1. สาร Potassium sulphate | 6.62 มิลลิลิตร |
| 2. สาร ABTS               | 10 มิลลิลิตร   |
| 3. น้ำกลั่น               | 10 มิลลิลิตร   |

4. เมทานอล

ขั้นตอนการเตรียม

1. เตรียมสาร Potassium sulphate ความเข้มข้น 0.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร Potassium sulphate ปริมาณ 6.62 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร
2. เตรียมสาร ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร ABTS 38.14 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร
3. นำสาร Potassium sulphate ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับสาร ABTS ที่ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร
4. นำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลา ก่อนใช้งานให้นำมาเจือจางด้วยเมทานอล และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 734

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่ให้ค่าเท่ากับ  $0.70 \pm 0.02$  เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

### 10. การเตรียมสาร Folin-Ciocalteu ร้อยละ 10 (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- |                                    |    |           |
|------------------------------------|----|-----------|
| 1. สาร Folin-Ciocalteu (สำเร็จรูป) | 10 | มิลลิลิตร |
| 2. น้ำกลั่น                        | 90 | มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

- นำ Folin-Ciocalteu (สำเร็จรูป) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
- ใส่ขวดแก้วที่ห่อฟอยล์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 11. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ร้อยละ 7.5 (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- |                     |      |           |
|---------------------|------|-----------|
| 1. โซเดียมคาร์บอเนต | 7.50 | กรัม      |
| 2. น้ำกลั่น         | 100  | มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งสารโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาณ 7.50 กรัม จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
- ทำให้ละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่อง Magnetic stirrer
- เก็บใส่ขวดแก้ว

## ภาคผนวก ข

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

#### 1. การวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ ข-1.1 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 15.625, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2984.135	5	596.827	57.052	.000
Within Groups	62.767	6	10.461		
Total	3046.902	11			

ตารางเปรียบเทียบร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 15.625, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
15.6	2	12.8310			
31.3	2	15.2395			
62.5	2		23.3223		
125	2		26.3945		
250	2			35.4508	
500	2				59.9958
Sig.		.485	.379	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-1.2 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากไคคโลโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 15.625, 31.25, 62.50, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3389.292	5	677.858	170.683	.000
Within Groups	23.829	6	3.971		
Total	3413.120	11			

ตารางเปรียบเทียบร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากไคคโลโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 15.625, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
15.6	2	4.6870				
31.3	2		12.0475			
62.5	2		14.9745			
125	2			20.7848		
250	2				39.8450	
500	2					52.9170
Sig.		1.000	.192	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-1.3 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 15.625, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9690.019	5	1938.004	263.610	.000
Within Groups	44.111	6	7.352		
Total	9734.130	11			

ตารางเปรียบเทียบร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 15.6, 31.1, 62.5, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
15.6	2	19.4890			
31.3	2		34.9810		
62.5	2			65.0195	
125	2				88.8275
250	2				89.8410
500	2				91.2270
Sig.		1.000	1.000	1.000	.424

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-1.4 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากบิวทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 15.625, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12074.586	5	2414.917	1105.616	.000
Within Groups	13.105	6	2.184		
Total	12087.692	11			

ตารางเปรียบเทียบร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากบิวทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 15.625, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
15.6	2	10.0940				
31.3	2		28.2249			
62.5	2			47.4308		
125	2				80.3458	
250	2					91.2841
500	2					91.7207
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.778

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-1.5 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบ  
ชั้นน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 15.625, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500  
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3685.552	5	737.110	311.753	.000
Within Groups	14.186	6	2.364		
Total	3699.738	11			

ตารางเปรียบเทียบร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ  
ดังนี้ 15.625, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
15.6	2	2.1640				
31.3	2	3.8570	3.8570			
62.5	2		7.2940			
125	2			15.9380		
250	2				27.8120	
500	2					52.3095
Sig.		.313	.067	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-1.6 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบข จากเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 62.50, 125, 250, และ 500 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	851.779	3	283.926	50.386	.001
Within Groups	22.540	4	5.635		
Total	874.319	7			

ตารางเปรียบเทียบร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบขจากเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
62.5	2	8.8962		
125	2	13.4423	13.4423	
250	2		17.2856	
500	2			36.0296
Sig.		.128	.181	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-1.7 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากไคคโลโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3502.874	3	1167.625	264.451	.000
Within Groups	17.661	4	4.415		
Total	3520.536	7			

ตารางเปรียบเทียบร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากไคคโลโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
62.5	2	10.5111			
125	2		21.5247		
250	2			38.6486	
500	2				65.9777
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-1.8 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6400.788	3	2133.596	636.373	.000
Within Groups	13.411	4	3.353		
Total	6414.199	7			

ตารางเปรียบเทียบร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
62.5	2	23.7861			
125	2		40.7975		
250	2			71.6390	
500	2				97.3507
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-1.9 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากบิวทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4477.071	3	1492.357	322.639	.000
Within Groups	18.502	4	4.625		
Total	4495.573	7			

ตารางเปรียบเทียบร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากบิวทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
62.5	2	12.5687			
125	2		24.0971		
250	2			39.1322	
500	2				75.3816
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-1.10 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบ  
ชั้นน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อ  
มิลลิลิตร

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	367.442	3	122.481	125.793	.000
Within Groups	3.895	4	.974		
Total	371.337	7			

ตารางเปรียบเทียบร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบชั้นน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ  
ดังนี้ 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
62.5	2	4.1857		
250	2		9.4192	
125	2		11.3870	
500	2			22.7535
Sig.		1.000	.117	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

### 2. การวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

ตารางที่ ข-2.1 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละความเป็นพิษของของสารสกัดหยาบแต่ละชั้นต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	29832.434 <sup>a</sup>	14	2130.888	288.445	.000
Intercept	46242.312	1	46242.312	6259.537	.000
cell	6783.270	2	3391.635	459.105	.000
crude	21814.148	4	5453.537	738.212	.000
cell * crude	1235.016	8	154.377	20.897	.000
Error	110.812	15	7.387		
Total	76185.559	30			
Corrected Total	29943.246	29			

a. R Squared = .996 (Adjusted R Squared = .993)

ตารางเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบแต่ละชั้นที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี DMRT

crude	N	Subset				
		1	2	3	4	5
Water	6	-.0438				
Hexane	6		15.1965			
Dichloromethane	6			49.9567		
Butanol	6				63.3480	
Ethyl acetate	6					67.8467
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b. Alpha = .05.

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-2.2 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละความเป็นพิษจากสารสกัดหยาบจากเฮกเซนต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3382.006 <sup>a</sup>	2	1691.003	206.671	.001
Intercept	1385.602	1	1385.602	169.346	.001
cell	3382.006	2	1691.003	206.671	.001
crude	.000	0	.	.	.
cell * crude	.000	0	.	.	.
Error	24.546	3	8.182		
Total	4792.154	6			
Corrected Total	3406.552	5			

a. R Squared = .993 (Adjusted R Squared = .988)

ตารางเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ของสารสกัดหยาบจากเฮกเซนด้วยวิธี DMRT

cell	Subset	
	N	
	1	2
KB	2	-4.9905
HT-29	2	2.0550
HaCat	2	48.5250
Sig.		.091
		1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-2.3 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละความเป็นพิษจากสารสกัดหยาบจากไคคโลโร-มีเทน ต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1262.510 <sup>a</sup>	2	631.255	365.415	.000
Intercept	14974.011	1	14974.011	8668.024	.000
cell	1262.510	2	631.255	365.415	.000
crude	.000	0	.	.	.
cell * crude	.000	0	.	.	.
Error	5.183	3	1.728		
Total	16241.703	6			
Corrected Total	1267.692	5			

a. R Squared = .996 (Adjusted R Squared = .993)

ตารางเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ของสารสกัดหยาบจากไคคโลโรมีเทนด้วยวิธี DMRT

cell	N	Subset		
		1	2	3
HT-29	2	32.3950		
KB	2		49.5550	
HaCat	2			67.9200
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-2.4 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละความเป็นพิษจากสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตท ต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	579.905 <sup>a</sup>	2	289.953	42.702	.006
Intercept	27619.021	1	27619.021	4067.543	.000
cell	579.905	2	289.953	42.702	.006
crude	.000	0	.	.	.
cell * crude	.000	0	.	.	.
Error	20.370	3	6.790		
Total	28219.297	6			
Corrected Total	600.276	5			

a. R Squared = .966 (Adjusted R Squared = .943)

ตารางเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ของสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทด้วยวิธี DMRT

cell	N	Subset		
		1	2	3
KB	2	56.4750		
HT-29	2		66.6050	
HaCat	2			80.4600
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-2.5 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละความเป็นพิษจากสารสกัดหยาบจากบิวทานอลต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1104.370 <sup>a</sup>	2	552.185	87.545	.002
Intercept	24077.815	1	24077.815	3817.381	.000
cell	1104.370	2	552.185	87.545	.002
crude	.000	0	.	.	.
cell * crude	.000	0	.	.	.
Error	18.922	3	6.307		
Total	25201.107	6			
Corrected Total	1123.292	5			

a. R Squared = .983 (Adjusted R Squared = .972)

ตารางเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ของสารสกัดหยาบจากบิวทานอลด้วยวิธี DMRT

cell	N	Subset	
		1	2
KB	2	51.7590	
HT-29	2	55.9000	
HaCat	2		82.3850
Sig.		.198	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-2.6 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละความเป็นพิษจากสารสกัดหยาดชั้นน้ำต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1689.495 <sup>a</sup>	2	844.748	60.641	.004
Intercept	.012	1	.012	.001	.979
cell	1689.495	2	844.748	60.641	.004
crude	.000	0	.	.	.
cell * crude	.000	0	.	.	.
Error	41.791	3	13.930		
Total	1731.298	6			
Corrected Total	1731.287	5			

a. R Squared = .976 (Adjusted R Squared = .960)

ตารางเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ของสารสกัดหยาดชั้นน้ำด้วยวิธี DMRT

cell	N	Subset
		1
		2
KB	2	-16.3215
HT-29	2	-6.8600
HaCat	2	23.0500
Sig.		.085
		1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-2.7 วิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 250, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	68676.539 <sup>a</sup>	29	2368.157	191.278	.000
Intercept	81718.003	1	81718.003	6600.421	.000
Cell	1699.348	2	849.674	68.629	.000
Crude	2466.183	1	2466.183	199.195	.000
Concentration	58858.976	4	14714.744	1188.520	.000
Cell * Crude	142.607	2	71.303	5.759	.008
Cell * Concentration	1567.284	8	195.910	15.824	.000
Crude * Concentration	3353.561	4	838.390	67.717	.000
Cell * Crude * Concentration	588.581	8	73.573	5.943	.000
Error	371.422	30	12.381		
Total	150765.964	60			
Corrected Total	69047.960	59			

a. R Squared = .995 (Adjusted R Squared = .989)

ตารางเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29, KB และ HaCat ของสารสกัดหยาบ แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset				
		1	2	3	4	5
250	12	-13.9075				
500	12		17.1342			
1000	12			47.9625		
1500	12				62.2950	
2000	12					71.0400
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-2.8 วิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9833.866 <sup>a</sup>	4	2458.466	138.595	.000
Intercept	27565.650	1	27565.650	1554.002	.000
crude	.000	0	.	.	.
cell	.000	0	.	.	.
Concentration	9833.866	4	2458.466	138.595	.000
Error	88.692	5	17.738		
Total	37488.208	10			
Corrected Total	9922.558	9			

a. R Squared = .991 (Adjusted R Squared = .984)

ตารางเปรียบเทียบสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29 โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset			
		1	2	3	4
250	2	.0400			
500	2		37.1950		
1000	2			63.8400	
1500	2			70.4900	
2000	2				90.9500
Sig.		1.000	1.000	.175	1.000

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-2.9 วิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด KB

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8118.033 <sup>a</sup>	4	2029.508	138.736	.000
Intercept	13978.625	1	13978.625	955.570	.000
crude	.000	0	.	.	.
cell	.000	0	.	.	.
Concentration	8118.033	4	2029.508	138.736	.000
Error	73.143	5	14.629		
Total	22169.802	10			
Corrected Total	8191.176	9			

a. R Squared = .991 (Adjusted R Squared = .984)

ตารางเปรียบเทียบสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด KB โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset		
		1	2	3
250	2	-16.8450		
500	2		34.8200	
1000	2			52.4450
1500	2			55.6900
2000	2			60.8300
Sig.		1.000	1.000	.087

Means for groups in homogeneous subsets are displayed..

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-2.10 วิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HaCat

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	14210.235 <sup>a</sup>	4	3552.559	223.839	.000
Intercept	16045.632	1	16045.632	1011.001	.000
crude	.000	0	.	.	.
cell	.000	0	.	.	.
Concentration	14210.235	4	3552.559	223.839	.000
Error	79.355	5	15.871		
Total	30335.222	10			
Corrected Total	14289.590	9			

a. R Squared = .994 (Adjusted R Squared = .990)

ตารางเปรียบเทียบสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HaCat โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset			
		1	2	3	4
250	2	-30.9700			
500	2		35.3650		
1000	2			59.5800	
1500	2			61.9050	
2000	2				74.4050
Sig.		1.000	1.000	.585	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-2.11 วิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดหยาบจากบิวทานอลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9846.920 <sup>a</sup>	4	2461.730	233.744	.000
Intercept	13218.314	1	13218.314	1255.094	.000
crude	.000	0	.	.	.
cell	.000	0	.	.	.
Concentration	9846.920	4	2461.730	233.744	.000
Error	52.659	5	10.532		
Total	23117.893	10			
Corrected Total	9899.579	9			

a. R Squared = .995 (Adjusted R Squared = .990)

ตารางเปรียบเทียบสารสกัดหยาบจากบิวทานอลที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HT-29 โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset			
		1	2	3	4
250	2	-5.2400			
500	2		4.9300		
1000	2			44.0200	
1500	2				66.7200
2000	2				71.3550
Sig.		1.000	1.000	1.000	.213

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-2.12 วิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดหยาบจากบิวทานอลที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด KB

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6470.500 <sup>a</sup>	4	1617.625	154.476	.000
Intercept	8220.836	1	8220.836	785.056	.000
crude	.000	0	.	.	.
cell	.000	0	.	.	.
Concentration	6470.500	4	1617.625	154.476	.000
Error	52.358	5	10.472		
Total	14743.694	10			
Corrected Total	6522.858	9			

a. R Squared = .992 (Adjusted R Squared = .986)

ตารางเปรียบเทียบสารสกัดหยาบจากบิวทานอลที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด KB โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset			
		1	2	3	4
250	2	-7.4100			
500	2		8.1700		
1000	2			30.5500	
1500	2				53.4650
2000	2				58.5850
Sig.		1.000	1.000	1.000	.174

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางที่ ข-2.13 วิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดหยาบจากบิวทานอลที่ความเข้มข้นที่แตกต่าง  
กันต่อร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HaCat

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15888.847 <sup>a</sup>	4	3972.212	787.690	.000
Intercept	6997.083	1	6997.083	1387.523	.000
crude	.000	0	.	.	.
cell	.000	0	.	.	.
Concentration	15888.847	4	3972.212	787.690	.000
Error	25.214	5	5.043		
Total	22911.144	10			
Corrected Total	15914.061	9			

a. R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .997)

ตารางเปรียบเทียบสารสกัดหยาบจากบิวทานอลที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด HaCat โดยทดสอบด้วยวิธี DMRT

Concentration	N	Subset		
		1	2	3
250	2	-23.0200		
500	2	-17.6750		
1000	2		37.3400	
1500	2			65.5000
2000	2			70.1150
Sig.		.063	1.000	.095

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

