ฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดของสารสกัดจาก *Pleurotus giganteus* และ *Calocybe indica*

SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Pleurotus giganteus* AND *Calocybe indica* EXTRACTS

วรรณวิษา ศรีอยู่พุ่ม
สรนันท์ ชวลิตนิติธรรม
อัมภัสชา รังสิพราหมณกุล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดของสารสกัดจาก *Pleurotus giganteus* และ *Calocybe indica*

SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Pleurotus giganteus* AND *Calocybe indica* EXTRACTS

T149222

วรรณวิษา ศรีอยู่พุ่ม
สรนันท์ ชวลิตนิติธรรม
อัมภัสชา รังสิพราหมณกุล

วพ. วว2627 2558
ฉบหมู่.....
เลขทะเบียน 149222
วัน,เดือน,ปี 29 มี.ค. 2561
b002 6621
b 12882157
1.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Pleurotus giganteus* AND *Calocybe indica* EXTRACTS

WANVISA SRIAUPOOM
SORANUN CHAWALITNITITHUM
AMBHASAJA RANSIBRAHMANAKUL

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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดของสารสกัดจาก *Pleurotus giganteus* และ *Calocybe indica* Some Biological Activities of *Pleurotus giganteus* and *Calocybe indica* Extracts			
ชื่อนักศึกษา	นางสาววรรณวิษา	ศรีอยู่พุ่ม	รหัสนักศึกษา	55051159
	นายสรนันท์	ชวลิตนิติธรรม	รหัสนักศึกษา	55051187
	นางสาวอัมภัสชา	รังสิพราหมณกุล	รหัสนักศึกษา	55051218
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)			
ภาควิชา	ชีววิทยา			
ปีการศึกษา	2558			
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม			

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2558

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดของสารสกัดจาก *Pleurotus giganteus* และ *Calocybe indica*			
ชื่อนักศึกษา	นางสาววรรณวิษา	ศรีอยู่พุ่ม	รหัสนักศึกษา	55051159
	นายสรนันท์	ชวลิตนิติธรรม	รหัสนักศึกษา	55051187
	นางสาวอัมภัสชา	รังสิพราหมณกุล	รหัสนักศึกษา	55051218
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)			
ภาควิชา	ชีววิทยา			
คณะ	วิทยาศาสตร์			
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)			
ปีการศึกษา	2558			
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม			

บทคัดย่อ

สารสกัดหยาบเมทานอลจากเส้นใยเห็ด *Pleurotus giganteus* (PM) และ *Calocybe indica* (CM) สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำ (PPA, CPA) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (PPS, CPS) นำมาทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน สำหรับ *P. giganteus* พบว่าสารสกัด PM, PPS และ PPA มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 13.08, 8.70 และ 5.11 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ สำหรับ *C. indica* พบว่าสารสกัด CM, CPS และ CPA มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 5.99, 2.61 และ 8.02 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) และ ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) พบว่าสารสกัด PM และ PPS มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ดีที่สุด (IC_{50} เท่ากับ 2.77 และ 1.91 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ในส่วนฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome พบว่าสารสกัด CPS มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด (IC_{50} เท่ากับ 2.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด PM, CM, PPS และ CPS ทดสอบกับ normal african green monkey kidney epithelial cell line (Vero) human keratinocyte cell line (HaCat) และ mouse fibroblast cell line (L929) พบว่าไม่แสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 3 ชนิด ดังนั้นเห็ดทั้งสองชนิดนี้จึงเหมาะแก่การนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวที่ช่วยลดฝ้า กระ และทำให้ผิวกระจ่างใสต่อไป

คำสำคัญ : *Pleurotus giganteus*, *Calocybe indica*, ฤทธิ์ทางชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Some Biological Activities of *Pleurotus giganteus* and *Calocybe indica* Extracts		
Student	Miss Wanvisa	Sriaupoom	Student ID 55051159
	Mr. Soranun	Chawalitnitithum	Student ID 55051187
	Miss Ambhasaja	Ransibrahmanakul	Student ID 55051218
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2015		
Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim		

Abstract

The methanolic crude from dried mycelia of *Pleurotus giganteus* (PM) and *Calocybe indica* (CM) and crude polysaccharide extracts with water (PPA, CPA) and sodium hydroxide (PPS, CPS) were evaluated for their total phenolic compounds, antioxidant, antityrosinase and cytotoxicity activity. For *P. giganteus*, the total phenolic contents were 13.08, 8.70 and 5.11 mg (GAE)/g Extract for PM, PPS and PPA, respectively. For *C. indica,* the total phenolic contents were 5.99, 2.61 and 8.02 mg (GAE)/g Extract for CM, CPS and CPA, respectively. Antioxidant activity, in both DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) assays show PM and PPS are the highest (IC_{50} = 2.77 and 1.91 mg/ml). Including, CPS had the highest antityrosinase activity with Dopachrome method (IC_{50} = 2.13 mg/ml). MTT assay, the cytotoxicity of PM, CM, PPS and CPS were carried out in normal african green monkey kidney epithelial cell line (Vero), human keratinocyte cell line (HaCat) and mouse fibroblast cell line (L929). None of them showed any adverse toxic effects in three cell lines. Therefore, these mushrooms are suitable for development as the skin care products, which help in reducing freckles and lightening skin.

Keywords : *Pleurotus giganteus*, *Calocybe indica*, Biological activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ข้อคิดเห็นต่างๆ และให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน ตลอดจนชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างมากในการทำงานโครงงานพิเศษเล่มนี้ ทางคณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง ที่ให้ความอนุเคราะห์ หัวเชื้อเห็ดทั้ง 2 ชนิด คือ *Pleurotus giganteus* และ *Calocybe indica* รวมไปถึงคำแนะนำ และข้อมูลอันเป็นประโยชน์ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี และ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการ และกรรมการ อีกทั้งยังคอยให้คำแนะนำ ปรับปรุง แก้ไขในการทำโครงงานพิเศษรวมไปถึงการทำเล่มโครงงานพิเศษจนประสบผลสำเร็จ

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา นักศึกษาปริญญาโท และเพื่อนๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพประจำห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ จนโครงงานพิเศษสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณพ่อ แม่ ผู้ปกครอง ที่สนับสนุน คอยรับฟังปัญหา และให้กำลังใจคณะผู้จัดทำเสมอมาจนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

วรรณวิษา ศรีอยู่พุ่ม
สรนันท์ ชวลิตนิติธรรม
อัมภัสชา รังสิพราหมณกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ก
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 เห็ด 3
2.1.1 เห็ด *Calocybe indica* 3
2.1.2 เห็ด *Pleurotus giganteus* 4
2.2 สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ 5
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ 7
2.4 กลไกการสังเคราะห์เมลานิน และเอนไซม์ไทโรซิเนส 9
2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 11
2.5.1 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดลอง 11
2.5.2 การวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT 12
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 14
3.1 วัสดุอุปกรณ์ 14
3.1.1 ชนิดของเห็ด 14
3.1.2 ตัวอย่างเซลไลน์ที่ใช้ในการทดลอง 14
3.1.3 อุปกรณ์ 14
3.1.4 สารเคมี 15
3.2 การเพิ่มปริมาณเส้นใยของเห็ด *P. giganteus* และ *C. indica* และการเตรียมเส้นใยเห็ดสำหรับสกัดสาร 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 การสกัดสารสกัดหยาบด้วยเมทานอล 16
3.4 การสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ด 17
3.5 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 17
3.6 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ 18
3.6.1 ทดสอบด้วยวิธี DPPH 18
3.6.2 ทดสอยด้วยวิธี ABTS 19
3.7 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด 20
3.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารสกัดจากเห็ด 21
3.8.1 การปลูกเซลล์ 21
3.8.2 การเตรียมสารสกัด 22
3.8.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT 22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 24
4.1 ผลการเพิ่มปริมาณเส้นใยของเห็ด *P. giganteus* และ *C. indica* และการเตรียมเส้นใยสำหรับการสกัดสาร 24
4.2 ผลการสกัดสารสกัดหยาบ และสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ด 25
4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 26
4.4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ 28
4.4.1 ผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH 28
4.4.2 ผลการทดสอบด้วยวิธี ABTS 30
4.5 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 34
4.6 ผลการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT 37
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 38
เอกสารอ้างอิง 40
ภาคผนวก 47
ภาคผนวก ก 48
ภาคผนวก ข 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 ชนิดและปริมาณสารที่ใส่ลงในแต่ละกลุ่มการทดลอง 21
3.2 ชนิดและปริมาณสารต่างๆที่ใส่ลงในแต่ละหลุมการทดลอง 22
4.1 ชนิดของสารสกัด ปริมาณเส้นใยและกากที่ใช้ในการสกัดสาร ปริมาณสารที่สกัดได้และเปอร์เซ็นต์ที่ได้ของสารสกัดแต่ละชนิด 25
4.2 ชนิดของสารสกัดหยาบ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอล และสารสกัดโพลี-แซคคาไรด์จากเห็ด *P. giganteus* และ *C. indica* 27
4.3 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบ PM และ CM 29
4.4 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดจากเห็ดทั้ง 6 ชนิด 33
4.5 ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ 36
4.6 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จากสารสกัดทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะของเห็ด *Calocybe indica*	3
2.2	ลักษณะเห็ด *Pleurotus giganteus*	5
2.3	กลไกการสังเคราะห์เมลานิน	10
2.4	ลักษณะการเปลี่ยนโครงสร้างของวิธีการ MTT assay	13
4.1	ลักษณะของเส้นใยของ *P. giganteus* และ *C. indica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA	24
4.2	ลักษณะของเส้นใยของ *P. giganteus* และ *C. indica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB	24
4.3	กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก	26
4.4	กราฟมาตรฐาน Trolox สำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	28
4.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด PM และ CM กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH	29
4.6	กราฟมาตรฐาน Trolox สำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS	30
4.7	กราฟเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดทั้ง 6 ชนิด	31
4.8	กราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid สำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

จากแนวโน้มของผู้บริโภคในปัจจุบันมีความสนใจ และนิยมเลือกใช้เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากธรรมชาติเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากสารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิดมีประสิทธิภาพเทียบเคียงกับสารสังเคราะห์ที่ได้จากห้องทดลอง และมีผลข้างเคียงน้อยกว่า เช่น ความสามารถในการบำรุง และปกป้องผิวพรรณ ความสามารถในการลดเม็ดสีหรือฝ้ากระ และความสามารถในการช่วยชะลอความชรา ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจ และเป็นความต้องการที่สำคัญของผู้บริโภค ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลให้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากธรรมชาตินั้นมีแนวโน้มในการเลือกซื้อจากผู้บริโภคเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (รัตนา, 2550) ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ทำให้ผิวขาวนั้น ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในคนไทยส่วนใหญ่โดยเฉพาะกลุ่มวัยรุ่น สารทำให้ผิวขาวที่ใช้ในเครื่องสำอางมีหลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibitor) เช่น วิตามินซี กรดโคจิก (Kojic acid) กลุ่มที่ทำให้เซลล์ผิวชั้นนอกสุดหลุดออก (exfoliation) เช่น Alpha Hydroxyl Acid (AHA) และกลุ่มอื่นๆ ซึ่งผลิตภัณฑ์เพื่อผิวขาวที่ขายอยู่เป็นกลุ่มสารเคมีสังเคราะห์หากใช้ไม่ถูกต้อง และไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดการระคายเคือง และก่ออันตรายได้ (ผดุงเกียรติ, 2556) การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Dopachrome ทดสอบได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสกับ L-3,4-diphenylphenylalanine (L-DOPA) ปกติเอนไซม์ไทโรซิเนสจะเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็น o-diphenol และ o-quinone ตามลำดับ ทำให้เกิดกระบวนการสร้างสี ถ้ามีสารสำคัญชนิดหนึ่งมายับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจะทำให้ไม่เกิดการสร้างสีขึ้นได้ (ขวัญจิต, 2558)

เห็ดเป็นอาหารที่หาได้ง่าย นอกจากจะใช้บริโภคเป็นอาหารแล้วยังเป็นแหล่งทรัพยากรขนาดใหญ่สำหรับการผลิตเภสัชภัณฑ์ เนื่องจากเห็ดมีสารต้านอนุมูลอิสระ มีส่วนช่วยในการชะลอความชรา และยังมีสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่มีส่วนช่วยในการลดเม็ดสีที่ผิวหนัง (บุปผาชาติ และมณีรัตน์, 2554) เห็ดมากกว่า 200 สายพันธุ์ มีสารพวก polysaccharide เช่น hetero-beta-glucans ซึ่งพบมากในเห็ดนั้นสามารถต้านมะเร็งได้ ทั้งยังมี fiber, lectin, terpenoids, phenolic เป็นต้น โดยสามารถสกัดได้จากเห็ดที่มีคุณสมบัติเป็นยา เช่น *Pleurotus giganteus* และ *Ganoderma lucidum* เป็นต้น (ชนะ, 2553) *Pleurotus giganteus* หรือเห็ดถ้วยยักษ์ (Giant-Cup Mushroom) จัดอยู่ในวงศ์ Pleurotaceae มีลักษณะดอกเห็ดเกิดเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม รูปทรงของดอกคล้ายพัด ดอกเห็ดมีการสร้างสปอร์บริเวณครีบใต้หมวกดอก ดอกของเห็ดจะมีสีขาวหรือสีครีม เห็ดในสกุลนี้เป็นเห็ดที่มีคุณสมบัติเป็นยา กินได้ เช่น เห็ดนางรมหลวง (*Pleurotus eryngii*) เห็ดออเรนจิ (*Pleurotus erygii*) เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajorcaju*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ostreatus) เป็นต้น (Wong *et al.*, 2012) สำหรับ *Calocybe indica* หรือเห็ดมิลค์กี้ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดียจัดอยู่ในวงศ์ Lyophyllaceae มีลักษณะคล้ายเห็ดตีนแรด (*Tricholoma crussum*) แต่เห็ดมิลค์กี้มีขนาดใหญ่กว่า ลักษณะหมวกเห็ดมีขนาดใหญ่ รูปกระทะคว่ำ สีขาวนวล ครีบดอกเป็นแผ่นบางสีขาว ก้านดอกมีลักษณะใหญ่จากโคนขึ้นไปมีขนาดเล็กลง เห็ดที่อยู่ในวงศ์นี้ เช่น เห็ดโคน (*Termitomyces clypeatus*) (Subbiah and Balan, 2015)

มีงานวิจัยเกี่ยวกับเห็ด *Pleurotus florida* และ *Calocybe indica* ว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง มีการศึกษาเกี่ยวกับสารโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ซึ่งพบว่าสามารถต้านเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะของมนุษย์ได้ (Selvi *et al.*, 2011) เห็ด *Pleurotus nebrodensis* มีผลในการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ช่วยในการป้องกันการเกิดสีที่ผิวหนัง ฝ้า กระ โดยสกัดจากอะซีโตน เมทานอล และน้ำร้อน (Alam *et al.*, 2011) แต่งานวิจัยที่เกี่ยวกับเห็ด *C. indica* และ *P. giganteus* มีน้อยมาก จึงมีความสนใจในสารสกัดจากเห็ดทั้ง 2 สายพันธุ์ เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อเป็นข้อมูลในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเครื่องสำอาง เพื่อประโยชน์ในด้านการค้า ด้านเภสัช และเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับเห็ดอีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1) เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ด *Calocybe indica* และ *Pleurotus giganteus*

2) เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเห็ด *Calocybe indica* และ *Pleurotus giganteus*

3) เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ด *Calocybe indica* และ *Pleurotus giganteus* ต่อเซลล์ไลน์ในหลอดทดลอง

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1) สกัดสารจากเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด Potato Dextrose Broth

2) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ดเฉพาะวิธี DPPH และ ABTS

3) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเห็ดเฉพาะวิธี Dopachrome

4) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดต่อเซลล์ไลน์ 3 ชนิด คือ normal african green monkey kidney epithelial cell line (Vero), human keratinocyte cell line (HaCat) และ mouse fibroblast cell line (L929) ในการทดสอบกับสารสกัดเฉพาะวิธี MTT

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ช่วยลดเมลานินของเซลล์ผิวได้

2) เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดทั้ง 2 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เห็ด

2.1.1 เห็ด *Calocybe indica*

เห็ด *Calocybe indica* จัดอยู่ในสกุล *Calocybe* โดยพบครั้งแรกที่ประเทศอินเดีย และเป็นที่รู้จักกันในชื่อ เห็ดมิลค์กี้ (Milky mushroom) เป็นเห็ดที่ปลูกได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ลักษณะดอกมีขนาดใหญ่ เนื้ออร่อย และนอกจากนำไปประกอบอาหารได้แล้ว ยังสามารถนำไปแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่าได้อีกด้วย เนื่องจากเป็นเห็ดที่ออกดอกง่าย การเจริญเหมาะกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทย จึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภค (บุญเลิศ, 2557)

เห็ด *C. indica* นั้นเป็นเห็ดที่เพาะปลูกกันทั่วไปในเขตร้อน ซึ่งเป็นเห็ดที่มีการตอบสนองที่ดีต่อความหลากหลายของพื้นผิว โดยจะเจริญได้ดีบนฟางพาสเจอร์ไรซ์ และเก็บรักษาได้ดีที่บล็อกขี้เลื้อย ข้อสำคัญคือ เส้นใยมีความไวต่ออากาศหนาวเย็น และจะตายหากเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญไปเป็นดอก คือ 30-35 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการเจริญที่สมบูรณ์ ใช้ระยะเวลาในการเจริญเป็นดอก 24-28 วัน โดยดอกมีลักษณะนูน ผิวเรียบ ไม่มีขน เนื้อละเอียด มีสีขาว ลักษณะเกือบกลม และมีขนาดใหญ่มาก ก้านมีลักษณะใหญ่ หนา มีสีขาว ลักษณะของเนื้อค่อนข้างแน่น (รูปที่ 2.1) และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย คือ 30-38 องศาเซลเซียส โดนแสงสว่างเล็กน้อย และจะใช้ระยะเวลาในการเจริญประมาณ 57-60 วัน (Subbiah and Balan, 2015 ; Dinesh, 2012)

รูปที่ 2.1 ลักษณะของเห็ด *Calocybe indica*
(ที่มา : รูปถ่ายโดยเกษรา คงกล้า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุกรมวิธาน

Kingdom	:	Fungi
Division	:	Basidiomycota
Class	:	Agaricomycetes
Order	:	Agaricales
Family	:	Lyophyllaceae
Genus	:	Calocybe

2.1.2 เห็ด *Pleurotus giganteus*

เห็ด *Pleurotus giganteus* เป็นเห็ดที่นิยมนำมารับประทานเป็นอาหาร เนื่องจากมีรสชาติดี จนนำมาสู่การศึกษาเพื่อการเพาะปลูกเชิงพาณิชย์ โดยจุดเริ่มต้นของการบริโภคเห็ดนั้นเป็นเพียงประเพณีของชาวมาเลเซียพื้นเมืองในคาบสมุทรมาเลเซีย ในการหาอาหารป่ามารับประทานเท่านั้น เดิมมีชื่อว่า cendawan perut lembu (เห็ดท้องวัว) แล้วเปลี่ยนชื่อมาเป็น morning glory mushroom แต่เมื่อเข้าสู่ประเทศไทยก็เป็นที่รู้จักกันในชื่อเห็ดถ้วยยักษ์ (Giant cup) เนื่องจากเป็นเห็ดที่เพาะได้ง่าย สามารถเจริญเติบโตได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย จึงได้มีการเพาะเห็ดนี้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน โดยมีลักษณะของดอกดังรูปที่ 2.2 คือ หมวกดอกมีลักษณะคล้ายพัด มีผิวเรียบ ตรงกลางเว้าเป็นแอ่ง มีสีขาวนวล หรือสีครีม เจริญซ้อนกันเปนชั้นๆ ส่วนของก้านดอกจะยาวปานกลาง และเจริญเข้าหาแสงสว่าง และครีบดอกมีลักษณะเป็นแผ่นบางๆ สีขาวนวล บริเวณครีบดอกเป็นแหล่งสร้างสปอร์ มีลักษณะการเจริญของดอกเป็นเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม (Phan *et al.*, 2014 ; Karunarathana *et al.*, 2011)

การเพาะเลี้ยงเห็ด *P. giganteus* นั้น นิยมเลี้ยงในอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการเพาะเลี้ยง โดยในการเพาะเลี้ยงจะใช้ขี้เลื่อยไม้ยางพารา 89-94 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ผสมรำข้าว 5-10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และแคลเซียมคาร์บอเนต 1 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และใช้ถุงโพรพิลีน (Polypropylene) ในการบรรจุ จากนั้นเก็บไว้ให้มีความชื้นอยู่ที่ประมาณ 60-65 เปอร์เซ็นต์ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย และการสร้างดอกเห็ดคือ 26-32 องศาเซลเซียส มีความชื้นสัมพัทธ์อยู่ที่ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 80-90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเจริญในช่วงของเส้นใย และหลีกเลี่ยงการโดนแสงส่องโดยตรง ซึ่งระยะเวลาของการเจริญของดอกเห็ดนั้น จะใช้เวลา 20 วัน หลังจากสร้างเส้นใยครอบคลุมทั่วพื้นที่แล้ว (Phan *et al.*, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.2 ลักษณะเห็ด *Pleurotus giganteus*
(ที่มา : Kumla *et al.*, 2012)

อนุกรมวิธาน

Kingdom	:	Fungi
Phylum	:	Basidiomycota
Class	:	Agaricomycetes
Order	:	Agaricales
Family	:	Pleurotaceae
Genus	:	Pleurotus

2.2 สารสกัดโพลีแซคคาไรด์

โพลีแซคคาไรด์เป็นสารที่มีโมเลกุลของน้ำตาลมาเรียงตัวต่อกันเป็นสายยาว ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิต้านทาน เสริมสร้างภูมิต้านทานของร่างกาย (จตุรงค์, 2552) งานวิจัยของ Yang (1999) พบว่าส่วนประกอบโพลีแซคคาไรด์ของเห็ดที่ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์อย่างเห็ดหลิงจือส่วนใหญ่จะเป็นกรดอะมิโน และโพลีแซคคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุลน้ำหนักเบา จึงช่วยให้เม็ดเลือดขาวd กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกในช่องท้องของหนูทดลองได้ดีขึ้น

ราในคลาส Basidiomycete หรือเห็ดนั้นเป็นแหล่งของสารที่มีคุณสมบัติต้านมะเร็ง ซึ่งคุณสมบัตินี้จะจะเกี่ยวข้องกับโพลีแซคคาไรด์ และอนุพันธ์ต่างๆของโพลีแซคคาไรด์ โดยโพลีแซคคา-ไรด์เหล่านี้จะเชื่อมกับองค์ประกอบทางเคมี โครงสร้างการละลาย และวิธีการแยก ซึ่งสารสามารถเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญโดยการปรับเปลี่ยนทางเคมี โดยคุณสมบัติการต้านมะเร็งของสารโพลีแซคคา-ไรด์สามารถแสดงออกได้ทั้งทางอ้อม (immunostimulation) หรือโดยตรง (การยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ และการเหนี่ยวนำ apoptosis) (Lemieszek and Rzeski, 2012)

Mizuno (1996) กล่าวว่าในปี 1968 ที่ประเทศญี่ปุ่นมีรายงานว่า สารสกัดจากน้ำร้อนของเห็ดที่กินได้บางส่วนมีสารโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งสามารถต้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง ตั้งแต่นั้นมาจึงมีการแยกสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดเป็นจำนวนมาก และในงานวิจัยของ Mizuno *et al.* (1986) ได้ทำศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยวกับสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจาก fruiting body ของเห็ด *Grifola frondosa* ในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งเนื้อเยื่ออ่อน (Sarcoma 180) ในหนูเพศเมียอายุ 7 สัปดาห์ โดยแบ่งสารสกัดโพลี-แซคคาไรด์ออกเป็น 3 กลุ่มคือ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำร้อน (100 องศาเซลเซียส) สกัดด้วย NH_4-oxalate 3 เปอร์เซ็นต์ (100 องศาเซลเซียส) และสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (30 องศาเซลเซียส) โดยให้สัญลักษณ์เป็น FI, FII และ FIII ตามลำดับ ฉีดให้หนูทุกวันด้วยความเข้มข้น 1-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 15 วัน พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ FI มีค่าการยับยั้งการเจริญของมะเร็ง 50 เปอร์เซ็นต์ดีที่สุด (the dose level, mg/kg in mice, inhibiting tumor growth in 50% of animal controls, ID_{50}) เท่ากับ 5.80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ FII มีค่า ID_{50} เท่ากับ 23.80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสารสกัดโพลีแซค-คาไรด์ FIII มีค่า ID_{50} เท่ากับ 38.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ยิ่งไปกว่านั้น ยังพบว่าโพลีแซคคาไรด์นั้นไม่มีพิษต่อหนูทดลอง แต่จะส่งผลทางอ้อมต่อการต้านมะเร็ง Sarcoma 180 ของหนู

นอกจากนี้ยังมีงานศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดในประเทศไทยอีกจำนวนมาก เช่น อัจฉรา และจริเวท (2552) ศึกษาการทดสอบสายพันธุ์เห็ดตีนแรด (*Tricholoma crassum*) ที่ผลิตสารโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นประโยชน์ จำนวน 7 สายพันธุ์ (DOA-1, DOA-3, DOA-4, DOA-5, DOA-7, DOA-8 และ DOA-10) จากการสกัดด้วยน้ำร้อนผสมเอทิลแอลกอฮอล์ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส และจำแนกชนิดของน้ำตาลด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า การสกัดและจำแนกโพลีแซคคาไรด์ของดอกเห็ดตีนแรด 7 สายพันธุ์ จากดอกเห็ดสด ได้น้ำตาลหลักเป็นทรีฮาโรส ในปริมาณ 64-350 มิลลิกรัมต่อ10 กรัมเห็ดสด แมนโนส 165-370 มิลลิกรัมต่อ 10 กรัมเห็ดสด และจากดอกเห็ดแห้ง ได้น้ำตาลทรีฮาโรส 64-158 มิลลิกรัมต่อกรัมเห็ดแห้ง กลูโคส 4-35 มิลลิกรัมต่อกรัมเห็ดแห้ง ไซโลส 5-22.40 มิลลิกรัมต่อกรัมเห็ดแห้ง จากสายพันธุ์ DOA-3, DOA-5, DOA-7 และกาแลคโตส 8.50 มิลลิกรัมต่อกรัมเห็ดแห้ง จากสายพันธุ์ DOA-10

กิตติศักดิ์ และคณะ (2554) พัฒนาวิธีการผลิตสารสกัดโพลีแซคคาโรด์จากเส้นใย และดอกเห็ดกระด้าง (*Lentinus polychrous* Lev.) โดยศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ ในการต่อต้านเซลล์มะเร็งตับ ระบบภูมิคุ้มกันไวรัส Herpes simplex-1 และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากเส้นใยและดอกเห็ดกระด้างในหนู และพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดกระด้าง ผลการศึกษาพบว่าการนำวัตถุดิบที่เป็นดอกเห็ดอ่อน ดอกเห็ดแก่ และเส้นใยเห็ดมาสกัดทำให้แห้งโดยวิธีแช่แข็งเย็น และพ่นด้วยความร้อนสามารถให้สารสกัดที่มีร้อยละของผลได้ (%yield) ที่แตกต่างกัน โดยเส้นใยเห็ดให้ %yield สูงกว่าดอกเห็ด และพบว่า %yield ของเส้นใยเห็ดที่มีอายุน้อยคือเส้นใยเห็ดอายุ 18 วัน ให้ %yield สูงสุด (44.04 และ 37.77 เปอร์เซ็นต์ สำหรับวิธีแช่แข็งเย็น และพ่นด้วยความร้อน ตามลำดับ) สารสกัดที่ได้นี้มีค่าคาร์โบไฮเดรตสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ มีโปรตีน และไขมันเล็กน้อย น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์คือ กลูโคส สารสกัดจากดอกเห็ดอ่อนมีค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด รองลงมาคือ สารสกัดดอกเห็ดแก่ และเส้นใยเห็ดซึ่งเท่ากับ 9.18±1.88, 6.71±0.44 และ 0.35±0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับ tannic acid แต่ไม่พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากดอก และเส้นใยเห็ด

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

อนุมูลอิสระ (free radical หรือ oxidant) คือ โมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยจะรับอิเล็กตรอนจากสารอื่นๆ ข้างเคียงเพื่อให้ตนเองเสถียร ในขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปนั้นมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ ในลักษณะเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ซึ่งสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย เช่น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) การเปลี่ยนสภาพโปรตีน และไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือการสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) กับโปรตีน หรือเอนไซม์บางชนิดจนทำให้การทำงานของโปรตีน หรือเอนไซม์เหล่านั้นผิดปกติ (Ames *et al.*, 1993) ความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ ในภาวะที่ความต้องการของอนุมูลอิสระมีมากเกินไปอาจนำไปสู่ความเสียหายที่เรียกว่า “oxidative stress” (Sies, 1997)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้สารอนุมูลอิสระก่อตัวขึ้น โดยจะทำการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ และหยุดการก่อตัวใหม่ของอนุมูลอิสระ รวมทั้งช่วยกำจัด และแทนที่โมเลกุลที่ถูกทำลาย โดยสารที่เป็นพื้นฐานในงานวิจัยทั่วไปคือสารบีตาแคโรทีน (β-carotene) และ ascorbic acid (vitamin C) (Halliwell, 1999) สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นเอนไซม์ และไม่ใช่เอนไซม์ เช่น วิตามินซี วิตามินอี และบีตาแคโรทีน เป็นต้น tocopherols, tocotrienols (vitamin E) บีตาแคโรทีน และ ascorbic acid มีปฏิกิริยาต่ออนุมูลอิสระ เกี่ยวข้องกับการลดการเสียหายของดีเอ็นเอ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็ง เช่นเดียวกับการลดลงของโรคมะเร็งบางประเภท รวมไปถึงโรคความเสื่อม เช่นโรคหัวใจขาดเลือด และโรคต้อกระจก นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในกระบวนการลดริ้วรอยของผิวหนังอีกด้วย (Sies, 1992)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีทั้งเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ โดยการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง วิธีที่นิยมได้แก่ โครมาโตกราฟแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ส่วนการวิเคราะห์เชิงปริมาณเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในสารตัวอย่าง วิธีที่นิยมได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระคงตัว และมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ข้อดีของวิธีนี้คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ข้อเสียคือ อนุมูลอิสระ DPPH ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระอื่นๆ ในร่างกายจริง และวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน ดูดกลืนแสงที่ความยาว 734

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาโนเมตร ข้อดีคือ ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว ข้อเสีย คือ อนุมูลอิสระ ABTS ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบได้ในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จึงต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ และทั้ง 2 วิธีนี้นิยมเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เช่น Trolox และ vitamin C (บุหรัน, 2556)

มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระในเห็ดด้วยวิธีวิเคราะห์บีตาแคโรทีน และกรดไลโนเลอิก และ DPPH เช่น Cheung *et al.* (2003) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากเห็ดหอม (*Lentinus edodes*) และเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) ที่สกัดด้วยน้ำ และเมทานอล ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงของหนูที่เกิดจากอนุมูลเปอร์ออกซิล พบว่าในบรรดา 4 สารสกัดจากเห็ดทั้ง 2 ชนิด สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำจากเห็ดหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดในแต่ละการทดสอบ (วิธีฟอกขาวด้วยบีตาแคโรทีน มีเปอร์เซ็นต์ต้านอนุมูลอิสระ 75.90 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิธี DPPH มีเปอร์เซ็นต์ต้านอนุมูลอิสระ 55.40 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงของหนู 94.90 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากน้ำสูงกว่าที่สกัดจากเมทานอล)

ในการศึกษาวิจัยของไทยมักศึกษาทั้งด้านการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังเช่น จันทิมา และคณะ (2541) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากผลมะขามป้อมทั้ง 4 แหล่งในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี บุรีรัมย์ ประจวบคีรีขันธ์ และมหาสารคาม พบว่าสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตของผลมะขามป้อมที่ได้จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี มหาสารคาม และบุรีรัมย์ คือ 2.32, 1.87, 1.28 และ 0.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตของผลมะขามป้อม มีค่า 50% Scavenging activity (SC_{50}) หรือความสามารถในการจับอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.03±0.00, 0.04±0.00, 0.03±0.00 และ 0.03±0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% Inhibitory Concentration, IC_{50}) เท่ากับ 0.40±0.06, 0.29±0.05, 0.71±0.03 และ 0.15±0.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

อรวัสสา และคณะ (2555) ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) เพื่อทดสอบหาประสิทธิภาพของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH free radical scavenging activity) และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้วิธี Dopachrome พบว่าสารสกัดเห็ดฟางด้วยเอทานอล แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด 82.08±3.17 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด 57.66±0.90 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้กรดโคจิกเป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 77.30±0.84 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พรพรรณ (2557) ทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งนำสารสกัดจากส่วนของลำต้นตูมตัง (*Naringi crenulata* (Roxb.) Nicolson.) คือ กิ่งใหญ่ กิ่งกลาง กิ่งเล็ก สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ คือ ไดคลอโรมีเทน เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ พบว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สารสกัดตูมตังกิ่งใหญ่ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดที่ IC_{50} เท่ากับ 8.09±0.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.25±0.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome พบว่าสารสกัดตูมตังกิ่งใหญ่ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 5.53±0.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดโคจิก ซึ่งให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.38±0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัยการต้านอนุมูลอิสระควบคู่กับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์-ไลน์ ดังเช่น Samchai *et al.* (2009) ได้ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB, MCF-7, NCI-H187 และ Vero ของสารสกัดหยาบจากเห็ด *Phellinus linteus* พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต มีผลในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดที่ IC_{50} เท่ากับ 17.73±0.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน (IC_{50} เท่ากับ 16.56±0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และพบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไลน์ MCF-7 และ NCl-H187 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.36 และ 19.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Finimundya *et al.* (2013) ศึกษาสารสกัดของเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajorcaju*) ในการต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 และ HeLa พบว่าสารสกัดจากเห็ดนางฟ้ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 และเซลล์ HeLa สูงกว่าสารสกัดจากเห็ดหอม โดยที่สารสกัดจากเห็ดหอมจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดเห็ดจากนางฟ้า

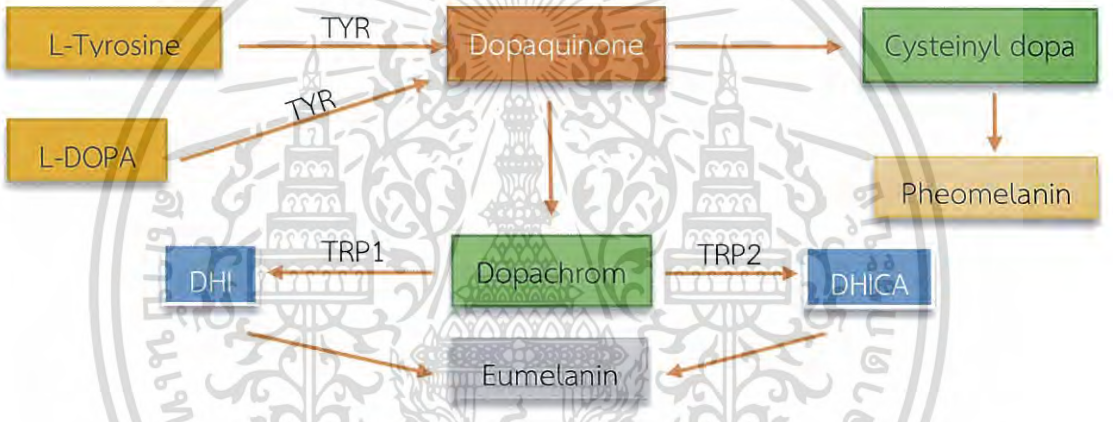
2.4 กลไกการสังเคราะห์เมลานิน และเอนไซม์ไทโรซิเนส

เมลานินเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการปกป้องผิวของมนุษย์จากรังสี แต่การสะสมของเมลานินที่ผิดปกติจะก่อให้เกิดเม็ดสีผิดปกติ เช่นฝ้า กระ และยังเป็นการเร่งให้เกิดการชราของชั้นผิวหนัง การสังเคราะห์เมลานินจะเกิดขึ้นภายในชั้นผิวหนังเมลาโนไซท์ ที่อยู่ชั้นล่างของหนังกำพร้า และถูกควบคุมโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส (Uchida *et al.*, 2014) ความหลากหลายทางฟีโนไทป์ของผิวคล้ำไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงในจำนวนของเมลาโนไซท์ แต่ขึ้นอยู่กับขนาด ปริมาณ และชนิดของเมลานิน ซึ่งส่งผลในการสร้างเม็ดสีที่มองเห็นได้ (สีผิวคล้ำ) เพิ่มขึ้น ความแตกต่างเหล่านี้ในปัจจุบันยังหาข้อกำหนดไม่ได้ โดยสันนิษฐานว่ามีผลมาจากปัจจัยภายนอก เช่นรังสี Ultraviolet Radiation (UV) โดยสามารถแบ่งประเภทของเมลานินได้ 2 ประเภทคือ Eumelanin จะมีน้ำตาลดำหรือสีเข้ม และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pheomelanin มีสีแดง-สีเหลืองที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยน Cysteine หรือกลูตาไธโอน แสดงดังรูปที่ 2.3 (Videira, 2013)

กระบวนการสังเคราะห์เมลานินแสดงดังรูปที่ 2.3 โดยเริ่มต้นด้วยการเกิดออกซิเดชัน catalyzed เพื่อเปลี่ยนเป็น Dopaquinone จาก L-Tyrosine และ L-DOPA เร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนส (TYR) หลังจากนั้นสารประกอบ Dopaquinone จะถูกแปลงเป็น Dopachrome ผ่านกระบวนการออกซิเดชัน และจะเปลี่ยนเป็น Dihydroxyindole (DHI) และ Dihydroxyindole-2-Carboxylic Acid (DHICA) เร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ Tyrosinase-Related Protein 1 และ 2 (TRP1, TRP2) ตามลำดับ และเปลี่ยนเป็น Eumelanin ในขั้นตอนสุดท้าย ในการเกิดของ Cysteine หรือกลูตาไธโอนนั้นเกิดจาก Dopaquinone ถูกแปลี่ยนเป็น Cysteinyl dopa หรือ Glutathionyl dopa ต่อมาเปลี่ยนเป็น Pheomelanin ในขั้นตอนสุดท้าย (Chang, 2012)



รูปที่ 2.3 กลไกการสังเคราะห์เมลานิน

หมายเหตุ TYR คือ เอนไซม์ไทโรซิเนส, DHI คือ dihydroxyphenylalanine, DHICA คือ dihydroxyindole-2-carboxylic acid และ TRP1, TRP2 คือ Tyrosinase Relate Protein ชนิด 1 และ 2 ตามลำดับ

(ที่มา: Chang, 2012; Videira, 2013)

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase enzyme; EC 1.14.18.1) รู้จักกันในชื่อ Polyphenol Oxidase (PPO) เป็นเอนไซม์ที่มีทองแดงเป็นส่วนประกอบ และพบอย่างแพร่หลายในเชื้อรา พืช และสัตว์มีกระดูกสันหลัง และมีส่วนร่วมในขบวนการสังเคราะห์เมลานิน (Melanogenesis) สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น อาร์บูติน กรดโคจิก และ ไฮโดรคิวโนนถูกนำมาใช้เป็นสารให้ความขาว (Whitening) หรือ Antihyperpigment เพราะมีความสามารถระงับการผลิตเมลานินได้ อย่างไรก็ตามอาร์บูติน กรดโคจิก และไฮโดรคิวโนนแสดงความเป็นพิษต่อเมลาโนไซท์ และอาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ไปยังเซลล์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสใหม่ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่มีผลข้างเคียง (Uchida *et al.*, 2014) เอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดจากเห็ดแชมปิญองมีความคล้ายคลึงกันอย่างมากกับเอนไซม์ไทโรซิเนสของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้นเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดจึงเหมาะสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์เมลานิน ในการศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งเอนไซม์ไท-โรซิเนสส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดจากเห็ด เพื่อให้มีความใกล้เคียงในมนุษย์ และยังเป็นเอนไซม์ที่สามารถใช้ได้ในเชิงพาณิชย์ และนอกเหนือจากการสังเคราะห์เมลานิน ยังพบการล้างพิษฟีนอลที่ใช้เพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรียชีวภาพ (symbiotic bacteria) ในพืช นอกจากนี้เอนไซม์ไทโรซิเนสอาจจะนำไปใช้ในการกำจัดฟีนอลจากน้ำเสีย รวมไปถึงใช้ในกระบวนการทางชีวภาพของ L-Tyrosine ไปเป็น L-DOPA ต่อไป (Chang, 2012)

มีการศึกษาวิจัยหาสารที่ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังเช่น Chien *et al.* (2008) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารสกัดจากเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) พบว่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสารสกัดจากเห็ดวงศ์ Basidiomycetes เปรียบเทียบกับเห็ด 4 ชนิดได้แก่ *Ganoderma lucidum*, *Antrodia camphorate*, *Agaricus brasilliensis* และ *Cordyceps militaris* พบว่า *Ganoderma lucidum* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารที่เตรียมจากเห็ดวงศ์ Basidiomycetes สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อผิวขาว ซึ่งในปัจจุบันมีการนำเห็ดหลินจือมาเป็นสารผสมในผลิตภัณฑ์มาร์กหน้าที่ขายในท้องตลาดทั่วไป

มนสิชา และคณะ (2555) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบจากส่วนเถาชะเอมไทย (*Albizia myriophylla* Benth.) ที่สกัดด้วยเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ IC_{50} เท่ากับ 11.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สุพัตรา (2555) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบจากพญายา (*Naringi crenulata* (Roxb.) Nicolson.) และลูกเดือย (*Coix lachryma-jobi* Lam.) พบว่าสารสกัดหยาบพญายา และลูกเดือยมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่า IC_{50} คือ 0.28 และ 0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

2.5.1 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดลอง

ประกอบไปด้วยเซลล์ไลน์ 3 ชนิด ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ชนิดเกาะพื้นผิว (epithelial cell line) ได้แก่ เซลล์ไตลิงแอฟริกันปกติ (Normal african green monkey kidney epithelial cell line ; Vero) คือ เซลล์ไลน์ที่แยกได้จากไตของลิง มีรูปร่างคล้ายกระสวย (ATCC, 2016) เซลล์ผิวหนังชั้นบนของมนุษย์ (Human keratinocytes cell line ; HaCat) เป็นเซลล์ไลน์ที่แยกได้จากเซลล์ผิวหนัง keratinocytes ของมนุษย์ในวัยผู้ใหญ่ เซลล์มีขนาดเล็ก เจริญยึดติดกันเป็นกลุ่ม เป็นแพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

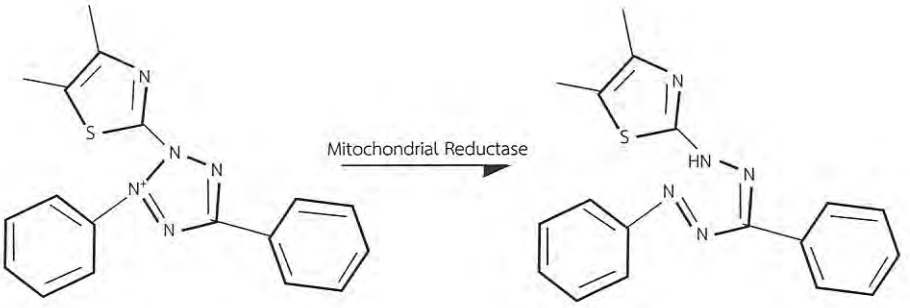
ขนาดใหญ่ (Wilson, 2013) และเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (Mouse subcutaneous connective tissue ; L929 หรือ NCTC clone 929) คือ เซลล์ไลน์ที่แยกได้จากเซลล์ผิวหนัง fibroblast ของหนู มีระดับความปลอดภัยทางชีวภาพ หรือ Biosafety อยู่ที่ระดับ 1 เป็นเซลล์ที่สามารถนำไปใช้งานในด้านการทดสอบสารพิษ และเป็น Host ในการ Transfection ได้ (ATCC, 2016)

2.5.2 การวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT

โดยทั่วไปการทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity test) สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ และการนำไปใช้ประโยชน์ โดยสามารถจำแนกวิธีการทดสอบตามผลของการนำไปใช้ประโยชน์ได้ 2 ประเภท คือ การทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย (Bioassays) และการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย หรือการใช้สัตว์ทดลอง เช่น หนู กระต่าย และสุนัข เป็นต้น การใช้สัตว์ทดลองนั้นจะสามารถทดสอบได้หลายวิธี เช่น การกิน การสัมผัสโดยผิวหนัง การหายใจ และการฉีดสารเคมีเข้าลำตัว เป็นต้น ซึ่งเมื่อทำการทดลอง สัตว์จะแสดงอาการตอบสนองต่อสารเคมีที่ได้รับในลักษณะต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการอักเสบของเนื้อเยื่อ การระคายเคือง การเกิดเนื้องอก อัมพาต หรือแม้กระทั่งตาย ซึ่งอาการเหล่านี้ล้วนแล้วแต่สร้างความเจ็บปวดและทุกข์ทรมานแก่สัตว์ทดลองทั้งสิ้น อีกทั้งยังสิ้นเปลืองงบประมาณในการทดสอบแต่ละครั้ง ดังนั้นเพื่อเหตุผลทางเศรษฐศาสตร์ และศีลธรรม นักพิษวิทยาจึงคิดหาวิธีการอื่นๆ เพื่อลดการใช้สัตว์ในการทดสอบสารพิษ จึงได้มีการพัฒนานำเนื้อเยื่อ และเซลล์จากส่วนต่างๆของสัตว์ และมนุษย์มาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมี เช่น การนำเอาเซลล์เม็ดเลือดแดง (Red Blood Cells : RBCs) มาใช้ในการการทดสอบความเป็นพิษของสารที่ก่อให้เกิดการระคายเคือง (Irritant) (Reubel *et al.*, 1987) แต่วิธีการดังกล่าวก็ยังคงมีข้อบกพร่อง เช่นการเตรียมอาหารในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และเนื้อเยื่อ (Culture media) นั้นมีความยุ่งยาก ซับซ้อน และที่สำคัญคือยากต่อการดูแลรักษาเซลล์และเนื้อเยื่อสำหรับทดสอบเป็นเวลานานๆ (Liu *et al.*, 1997)

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็นสีสังเคราะห์ประเภท tetrazolium salt ที่ในปัจจุบันนิยมใช้ในการทดสอบทางชีวภาพในงานด้านต่างๆ เพื่อหลีกเลี่ยงวิธีทดสอบที่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี หลักการทำงานของ MTT คือ เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ หรือ metabolically active เท่านั้นที่สามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase เปลี่ยน MTT ให้เป็น formazan ดังรูปที่ 2.4 โดยปฏิกิริยา reduction ผลึกของ formazan ที่ได้มีสีม่วงน้ำเงิน และมีความสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 550-600 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของสีม่วงน้ำเงิน หรือปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นแปรผันตรงกับปริมาณของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ซึ่งขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้นจึงสามารถวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยการวัดปริมาณ formazan ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง MTT ภายในเซลล์ (เบ็ญจมาศ, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 ลักษณะการเปลี่ยนโครงสร้างของวิธีการ MTT assay
(ที่มา : https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/de/MTT_reaction.png)

มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังเช่น Wu *et al.* (2012) ได้ศึกษาสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ด *Agaricus blazei* ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ และทำให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งกระดูกของมนุษย์ (HOS) และเซลล์กระดูกปกติของมนุษย์ (NHOst.) โดยทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระดูก (HOS) มากที่สุด

จุฑามาศ และคณะ (2557) ศึกษาการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (HT29) และเซลล์ไตลิงแอฟริกันปกติ (Vero) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกแก้วมังกรพันธุ์เนื้อขาวเปลือกแดง (*Hylocercus undatus* (Haw) Brit. & Rose.) โดยทำการสกัดเปลือกแก้วมังกรเนื้อขาวเปลือกแดงด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ตามลำดับ และศึกษาความเข้มข้นของสารที่ระดับ 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกแก้วมังกรพันธุ์เนื้อขาวเปลือกแดงในทุกตัวทำละลายไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero แต่พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกแก้วมังกรพันธุ์เนื้อขาวเปลือกแดงในตัวทำละลายเฮกเซนที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ HT29 มากที่สุด

Kim *et al.* (2015) ทำการศึกษาการเกิด apoptosis ของมะเร็งปอดของมนุษย์ (carcinoma A549) ของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจาก fruiting bodies ของเห็ด *Fomes fomentarius* พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ที่ระดับความเข้มข้น 25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีการชักนำให้เกิด apoptosis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

3.1.1 ชนิดของเห็ด

3.1.1.1 *Calocybe indica*

3.1.1.2 *Pleurotus giganteus*

หัวเชื้อเห็ดทั้ง 2 ชนิด ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. เกษม สร้อยทอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.2 ตัวอย่างเซลไลน์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.2.1 Normal african green monkey kidney epithelial cell line (Vero) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. พรทิพา พิชา งานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

3.1.2.2 Human keratinocyte cell line (HaCat) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. นพ. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ ห้องปฏิบัติการนาโนชีวเวชศาสตร์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2.3 Mouse fibroblast cell line (L929) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.3 อุปกรณ์

3.1.3.1 Cork borer ขนาด 8 มิลลิเมตร

3.1.3.2 กล้องจุลทรรศน์อินเวิร์ต (inverted light microscope)

3.1.3.3 ขวดขนาด 8 ออนซ์ (glass bottles)

3.1.3.4 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 25 มิลลิลิตร (tissue culture bottle)

3.1.3.5 ขวดบรรจุสารขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (laboratory bottle)

3.1.3.6 คิวเวตพลาสติกขนาด 3.5 มิลลิลิตร (plastic cuvette)

3.1.3.7 เครื่องกรองสารแบบลดความดัน (vacuum filter)

3.1.3.8 เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (shaker)

3.1.3.9 เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (analytical balance)

3.1.3.10 เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (auto pipette)

3.1.3.11 เครื่องบด (mortar and pestle)

3.1.3.12 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

3.1.3.13 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

3.1.3.14 เครื่องสกัดยี่ห้อ Garhardt รุ่น KB 8S (polyseccaride extractor)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3.15 เครื่องอบลมร้อน (hot air oven)

3.1.3.16 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader)

3.1.3.17 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish)

3.1.3.18 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate)

3.1.3.19 ชุดกรองสารและแผ่นกรอง (filter) ขนาด 0.22 และ 0.45 ไมโครเมตร

3.1.3.20 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)

3.1.3.21 ตู้ดูดควัน (fume hood)

3.1.3.22 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator)

3.1.3.23 ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (laminar airflow)

3.1.3.24 ตู้เย็น (refrigerator)

3.1.3.25 โถดูดความชื้น (desiccator)

3.1.3.26 ทิป (pipette tip)

3.1.3.27 ปิเปตแก้วขนาด 5, 10 มิลลิลิตร (pipette)

3.1.3.28 ผ้าขาวบาง (sieve through cheesecloth)

3.1.3.30 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

3.1.3.31 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave)

3.1.3.32 หลอดฉีดยา (syringe)

3.1.3.33 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)

3.1.4 สารเคมี

3.1.4.1 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) (ABTS)

3.1.4.2 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

3.1.4.3 Dimethylsulfoxide (DMSO)

3.1.4.4 Dipotassium peroxodisulphate ($K_2S_2O_8$)

3.1.4.5 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

3.1.4.6 Fetal Bovine Serum (FBS)

3.1.4.7 Folin-ciocalteu

3.1.4.8 Gallic acid

3.1.4.9 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

3.1.4.10 L-ascorbic acid

3.1.4.10 Mitomycin C

3.1.4.11 Phosphate Buffer Saline (PBS)

3.1.4.12 Sodium carbonate ($NaCO_3$)

3.1.4.13 Sodium hydroxide (NaOH)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.14 Trolox

3.1.4.15 Trypsin

3.1.4.16 ตัวทำละลายเมทานอล

3.1.4.17 ตัวทำละลายเอทานอล

3.1.4.18 สารละลาย MTT

3.1.4.19 สีย้อมทริปแพนบลู (Trypan blue)

3.1.4.20 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640

3.1.4.21 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

3.1.4.23 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)

3.1.4.24 เอนไซม์ไทโรซิเนส

3.2 การเพิ่มปริมาณเส้นใย และการเตรียมเส้นใยเห็ดสำหรับสกัด

3.2.1 เพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ดทั้ง 2 ชนิด คือ *Pleurotus giganteus* และ *Calocybe indica* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. เกษม สร้อยทอง โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.2.2 ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร จุ่มแอลกอฮอล์เผาไฟทิ้งไว้ให้เย็น มาเจาะวุ้นที่มีเส้นใยแล้วเขี่ยเชื้อลงในอาหารเหลวชนิด Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรบรรจุในขวดขนาด 8 ออนซ์ เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในสภาวะนิ่ง เป็นระยะเวลาประมาณ 60 วัน

3.2.3 นำเส้นใยที่ได้ไปอบให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หรือจนกว่าเส้นใยจะแห้งสนิท โดยมีน้ำหนักคงที่

3.2.4 นำเส้นใยที่อบแห้งแล้วมาบดให้ละเอียด เพื่อใช้ในการสกัดสารต่อไป

3.3 การสกัดสารสกัดหยาบด้วยเมทานอล

3.3.1 นำเส้นใยที่บดละเอียดในข้อ 3.2 น้ำหนักประมาณ 30 กรัม มาสกัดโดยห่อด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปใส่ในขวดโหล เทตัวทำละลายเมทานอลให้ท่วม ปิดฝาให้เรียบร้อย และห่อขวดโหลด้วยกระดาษเพื่อป้องกันไม่ให้โดนแสง นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

3.3.2 เมื่อครบ 3 วัน ทำการเก็บตัวทำละลายเมทานอลไว้ในขวดโหลอีกใบ และทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยตัวละลายเมทานอลเช่นเดิม

3.3.3 นำตัวทำละลายเมทานอลที่ได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองสารแบบลดความดัน โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1 จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ส่วนเส้นใยที่ผ่านการสกัดด้วยเมทานอลแล้วจะนำไปทำให้แห้ง เพื่อใช้ในการสกัดโพลีแซคคาไรด์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.4 เก็บสารสกัดหยาบที่ได้จากการระเหยตัวทำละลายออกไว้ในขวดขนาดเล็ก ที่ชั่งน้ำหนักขวด และฝาเรียบร้อยแล้ว ทำการชั่งน้ำหนัก และจดบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ จากนั้นนำฟอยด์ปิดปากขวด และเจาะรูรวมทั้งห่อรอบขวดให้มิดชิด เพื่อป้องกันไม่ให้โดนแสง หลังจากนั้นจึงนำไปวางไว้ในเดซิกเคเตอร์ เพื่อให้ตัวทำละลายที่เหลือระเหยออกหมด

3.3.5 หลังจากสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลแล้ว จะได้สารสกัด 2 ชนิด คือ สารสกัดหยาบเมทานอลของ *P. giganteus* (PM) และสารสกัดหยาบเมทานอลของ *C. indica* (CM)

3.4 การสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ด

3.4.1 นำเส้นใยเห็ดที่ผ่านการสกัดด้วยเมทานอลในข้อ 3.3 มาวางทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ดูดควัน นำเส้นใยประมาณ 15 กรัม ใส่ในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่างขนาด 300 มิลลิลิตร และใส่ในเครื่องสกัดยี่ห้อ Garhardt รุ่น KB 8S

3.4.2 ในการทดลองนี้จะสกัดสารโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำกลั่น และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยจะใส่น้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเป็น 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

3.4.3 หลังจากสกัดครบ 4 ชั่วโมง นำมากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนใสกับส่วนกากออกจากกัน นำส่วนใสที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

3.4.4 นำสารละลายที่ได้ไปตกตะกอนด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 เท่า ของสารละลายที่ได้ เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที และเก็บตะกอนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อไป

3.4.6 ทำการสกัดตามข้อ 3.4.2 แต่ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แทนการสกัดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อไป

3.4.7 จะได้สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ทั้งหมด 4 ชนิด คือ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์หยาบจาก *P. giganteus* ที่สกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (PPS) และสกัดด้วยน้ำกลั่น (PPA) และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์หยาบจาก *C. indica* ที่สกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (CPS) และน้ำกลั่น (CPA)

3.5 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-ciocalteu (ดัดแปลงจากวิธีของถนอมนวล และคณะ, 2013)

3.5.1 เตรียมสารสกัดหยาบเมทานอล (PM และ CM) และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ของเห็ดทั้ง 2 ชนิด (PPS, PPA, CPS และ CPA) ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในน้ำกลั่น ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตรหลอดละ 500 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

149222

3.5.2 เติมสารละลาย Folin-ciocalteu 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ $NaCO_3$ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที

3.5.3 เมื่อครบเวลานำไปใส่คิวเวต ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

3.5.4 สารมาตรฐานจะใช้สารละลายกรดแกลลิกที่ละลายในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับสารสกัด แล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้กราฟเส้นตรงที่มีสมการดังนี้ คือ

$$y = mx$$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสง

m คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

x คือ ปริมาณฟีนอลิกของตัวอย่างที่ความเข้มข้นนั้นๆ

3.5.5 นำค่าการดูดกลืนแสงของสารที่วัดได้แทนในสมการ เพื่อคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดต่อไป

3.6 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

3.6.1 ทดสอบด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงจากวิธีของ Seephonkai *et al*, 2011)

3.6.1.1 เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยละลายใน Absolute methanol

3.6.1.2 เตรียมสารสกัดจากเห็ดที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายด้วย Absolute methanol

3.6.1.3 จะใช้ Trolox ที่ละลายใน Absolute methanol เป็นสารมาตรฐาน โดยใช้ที่ความเข้มข้น 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.6.1.4 เติมสารสกัดเห็ดที่เตรียมไว้ลงใน 96-well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.6.1.5 เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.6.1.6 เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

3.6.1.7 นำค่าที่ได้ของทุกความเข้มข้นในแต่ละสารสกัด รวมทั้งสารมาตรฐานมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH (% DPPH Inhibition) และนำเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้ของสารมาตรฐานไปสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่า IC_{50} ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\% \text{ DPPH Inhibition} = \frac{A_{Control} - A_{Sample}}{A_{Control}} \times 100$$

$A_{Control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

A_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มตัวอย่าง

<u>หมายเหตุ</u>	กลุ่มตัวอย่าง	คือ	สารสกัดเห็ด + DPPH
	กลุ่มควบคุม	คือ	Absolute methanol + DPPH
	กลุ่ม Blank ของกลุ่มควบคุม	คือ	Absolute methanol
	กลุ่ม Blank ของกลุ่มตัวอย่าง	คือ	สารสกัดเห็ด
	กลุ่มมาตรฐาน Trolox	คือ	สาร Trolox + DPPH

3.6.2 ทดสอบด้วยวิธี ABTS (ดัดแปลงจากวิธีของ Lee *et al.*, 2014; Thaipong *et al.*, 2006)

3.6.2.1 เตรียม ABTS โดยผสมระหว่าง ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ด้วยอัตราส่วน 1:1 ผสมทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ในที่มืด จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน ABTS: น้ำกลั่น เป็น 1:45 และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.7 ± 0.02)

3.6.2.2 เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.6.2.3 ใส่สารสกัดในอัตราส่วน 70 ไมโครลิตรต่อสาร ABTS 930 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 6 นาที

3.6.2.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้ Trolox ที่ละลายใน Absolute methanol ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน

3.6.2.5 นำค่าที่ได้ของทุกความเข้มข้นในแต่ละสารสกัด รวมทั้งสารมาตรฐานมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ABTS (% ABTS Inhibition) และนำเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้ของสารมาตรฐานไปสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่า IC_{50} ต่อไป

$$\% \text{ ABTS Inhibition} = \frac{A_{Control} - A_{Sample}}{A_{Control}} \times 100$$

$A_{Control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

A_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ กลุ่มตัวอย่าง คือ สารสกัดเห็ด + ABTS
กลุ่มควบคุม คือ น้ำกลั่น + ABTS
กลุ่ม Blank ของกลุ่มตัวอย่าง คือ สารสกัดเห็ด + น้ำกลั่น
กลุ่มมาตรฐาน Trolox คือ สาร Trolox + ABTS
กลุ่มควบคุมของ Trolox คือ น้ำกลั่น + ABTS
(ที่ละลายใน Absolute methanol)

3.6.2.6 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± SE (Standard error of mean) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ SPSS version 23 วิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และแต่ละความเข้มข้นด้วยวิธี Duncan multiple range test ที่ค่า P-value<0.05

3.7 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี Dopachrome (ดัดแปลงจากวิธีของพรพรรณ, 2557)

3.7.1 เตรียมสารสกัดที่ต้องการทดสอบโดยละลายด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมเป็น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.7.2 เตรียมสารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8

3.7.3 เตรียมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาเท่ากับ 24.047 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8

3.7.4 เตรียมสารละลาย L-ascorbic acid ให้ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมเป็น 7.62, 15.24, 22.86, 30.47 และ 38.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน

3.7.5 แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม A, B, C และ D และเติมสารต่างๆ ลงไปตามตารางที่ 3.1 ทำการทดสอบกับสารสกัดทั้ง 5 ความเข้มข้น รวมทั้ง L-ascorbic acid โดยทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่ใช้ L-ascorbic acid แทนสารสกัดที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ชนิดและปริมาณสารที่ใส่ลงในแต่ละกลุ่มการทดลอง

กลุ่มทดลอง	น้ำกลั่น	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH6.8)	เอนไซม์ไทโรซิเนส 24.047 ยูนิตต่อมิลลิลิตร	สารสกัดตัวอย่าง
กลุ่ม A	40 ไมโครลิตร	80 ไมโครลิตร	40 ไมโครลิตร	
กลุ่ม B	40 ไมโครลิตร	120 ไมโครลิตร		
กลุ่ม C		80 ไมโครลิตร	40 ไมโครลิตร	40 ไมโครลิตร
กลุ่ม D		120 ไมโครลิตร		40 ไมโครลิตร

หมายเหตุ กลุ่ม A คือ กลุ่มควบคุม
กลุ่ม B คือ กลุ่ม Blank ของกลุ่มควบคุม
กลุ่ม C คือ กลุ่มสารที่ต้องการทดสอบ
กลุ่ม D คือ กลุ่ม Blank ของกลุ่มสารที่ต้องการทดสอบ

3.7.6 เมื่อเติมสารตามตารางข้างต้นแล้ว ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3.7.7 ใส่ L-DOPA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที

3.7.8 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสูตร

$$\% \text{ Tyrosinase inhibition} = \frac{(A-B) - (C-D)}{(A-B)} \times 100$$

เมื่อ A, B, C และ D เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากกลุ่ม A, B, C และ D ตามลำดับ พร้อมทั้งคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารทั้ง 6 ชนิด (PM, PPS, PPA, CM, CPS และCPA) และสารมาตรฐาน

3.7.9 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SE (Standard error of mean) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ SPSS version 23 วิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และแต่ละความเข้มข้นด้วยวิธี Duncan multiple range test ที่ค่า P-value<0.05

3.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากเห็ด

3.8.1 การปลูกเซลล์

3.8.1.1 เลี้ยงเซลล์ในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ และนับจำนวนเซลล์ด้วยการย้อมด้วยสี Trypan blue เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณเซลล์ที่ปลูกลงใน 96-well plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.1.2 ทำการปลูกเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นดังนี้ คือ เซลล์ L929 จำนวน $1.6x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เซลล์ HaCat จำนวน $1.5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์ Vero จำนวน $2.0x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.8.1.3 หยอดเซลล์ลงใน 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร เซลล์ละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.8.2 การเตรียมสารสกัด

3.8.2.1 นำสารสกัดหยาบที่แห้งแล้วมาชั่งปริมาณ 200 มิลลิกรัม ละลายด้วย DMSO 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ PBS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยแผ่นกรอง Whatman ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ในขวดบรรจุสาร ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น stock สารสกัด

3.8.2.2 ทำการเจือจางสารสกัดจาก stock เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางสารสกัดด้วยอาหาร RPMI 1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์

3.8.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT (ดัดแปลงจากวิธีของ เบ็ญจมาศ, 2553)

3.8.3.1 เติมสารต่างๆ ดังตารางที่ 3.2 โดย Positive control เป็น Mitomycin C ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน Negative control เป็น DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละหลุม และหลุมที่เป็น Blank ใส่อาหารเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 3.2 ชนิดและปริมาณสารต่างๆที่ใส่ลงในแต่ละหลุมการทดลอง

หลุมที่	สารสกัด	Mitomycin C ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	DMSO ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์	อาหาร RPMI 1640 + FBS 5 เปอร์เซ็นต์
Control				100 ไมโครลิตร
Positive		100 ไมโครลิตร		
Negative			100 ไมโครลิตร	
Sample	100 ไมโครลิตร			
Blank				100 ไมโครลิตร

3.8.3.2 บ่มเซลล์กับสารสกัดเป็นเวลา 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง

3.8.3.3 เมื่อครบ 4 ชั่วโมงแล้ว ให้ดูดสารละลายในแต่ละหลุมออก ละลายผลึกด้วย DMSO 100 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1:1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.3.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้คำนวณร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ จากสูตร ดังนี้

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม Control

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ทดสอบกับสารสกัด

โดยค่า A และ B ก่อนนำไปคำนวณในสูตรต้องนำค่า blank มาลบออกก่อน

3.8.3.5 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± SE (Standard error of mean) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ SPSS version 23 วิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และแต่ละความเข้มข้นด้วยวิธี Duncan multiple range test ที่ค่า P-value<0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

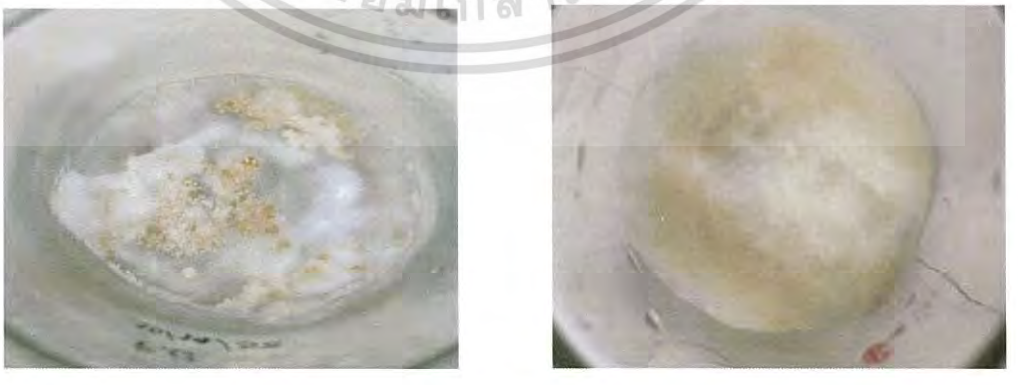
บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการเพิ่มปริมาณเส้นใยของเห็ด *P. giganteus* และ *C. indica* และการเตรียมเส้นใยสำหรับการสกัดสาร

ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดทั้ง 2 ชนิด คือ *P. giganteus* และ *C. indica* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง โดยเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เกิดเป็นเส้นใยที่มีลักษณะเป็นสีขาว เจริญบนผิวหน้าอาหาร แสดงดังรูปที่ 4.1 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการเพิ่มปริมาณเส้นใยในอาหารเหลว จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้เขี่ยลงในอาหารเหลวชนิด PDB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 60 วัน จะได้เส้นใยสีขาว แสดงดังรูปที่ 4.2

Pleurotus giganteus *Calocybe indica*

รูปที่ 4.1 ลักษณะของเส้นใยของ *P. giganteus* และ *C. indica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA



Pleurotus giganteus *Calocybe indica*

รูปที่ 4.2 ลักษณะของเส้นใยของ *P. giganteus* และ *C. indica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการสกัดสารสกัดหยาบ และสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ด

จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด *P. giganteus* และ *C. indica* ในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 60 วัน ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำเส้นใยเห็ดไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปสกัดสารด้วยตัวทำละลายเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบเมทานอลของ *P. giganteus* (PM) และสารสกัดหยาบเมทานอลของ *C. indica* (CM) จำนวน 10.58 และ 6.32 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดด้วยใช้เครื่อง Garhardt รุ่น KB 8S โดยสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดโพลีแซคคาไรด์หยาบของ *P. giganteus* ที่สกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (PPS) และน้ำกลั่น (PPA) จำนวน 4.76 และ 4.61 กรัม และได้สารสกัดโพลีแซคคาไรด์หยาบของ *C. indica* ที่สกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (CPS) และน้ำกลั่น (CPA) จำนวน 2.58 และ 5.20 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และทั้งนี้สารสกัดที่ได้มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ ดังนั้นถ้าต้องการใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางควรมีการปรับปรุงเรื่องกลิ่น

ตารางที่ 4.1 ชนิดของสารสกัด ปริมาณเส้นใยและกากที่ใช้ในการสกัดสาร ปริมาณสารที่สกัดได้ และเปอร์เซ็นต์ที่ได้ของสารสกัดแต่ละชนิด

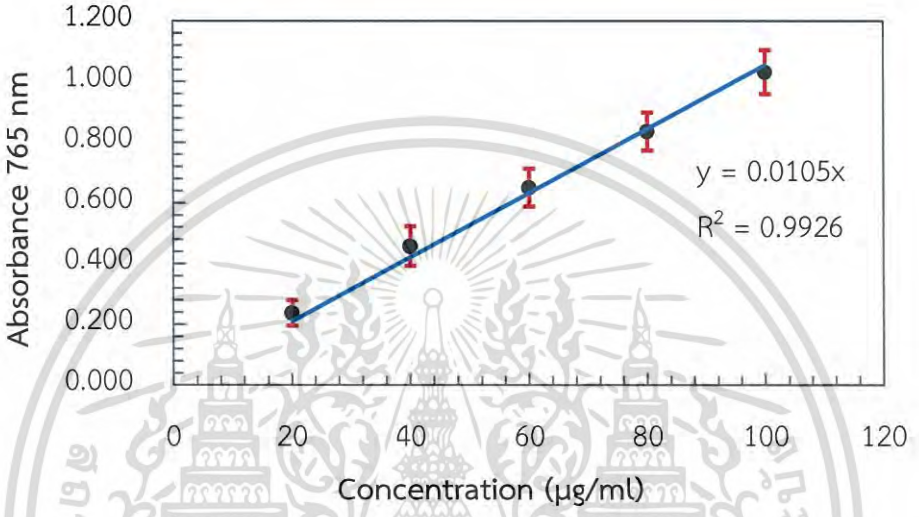
ชนิดสารสกัด	ปริมาณเส้นใยที่ใช้ในการสกัด (กรัม)	ปริมาณกากที่ใช้ในการสกัด (กรัม)	ปริมาณสารที่สกัดได้ (กรัม)	สารสกัดที่ได้ (เปอร์เซ็นต์)
PM	30		10.58	35.25
PPS		15	4.76	31.71
PPA		15	4.61	30.71
CM	30		6.32	21.07
CPS		15	6.02	40.15
CPA		15	3.31	22.07

จากการศึกษารายงานการวิจัยของนภัสสร และคณะ (2553) เกี่ยวกับการสกัดสารโพลีแซคคาไรด์จาก *Enteromorpha intestinalis* โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำร้อนที่ความเข้มข้น และอุณหภูมิต่างๆ พบว่าเมื่อสกัดด้วยน้ำร้อน ให้ค่าร้อยละของสารสกัดเท่ากับ 30.10 น้อยกว่าการสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ให้ค่าร้อยละของสารสกัดเท่ากับ 35.83 ซึ่งเมื่อดูจากผลการทดลองนี้เห็นได้ว่าไปในทิศทางเดียวกัน คือร้อยละของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำน้อยกว่าการสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-ciocalteau 10 เปอร์เซ็นต์ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร แล้วนำไปสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน จะได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

จากกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.3 ได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ 0.0105 และมีค่า R^2 (สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ; Coefficient of Determination) ซึ่งเป็นค่าที่บอกได้ว่าผลของ y ที่ได้เป็นผลมาจากตัวแปร x เท่ากับ 0.9926 หรือ 99.26 เปอร์เซ็นต์ หมายความว่าค่า R^2 ยิ่งสูงเท่าใดสมการนั้นก็ยิ่งมีความแม่นยำในการนำไปใช้คาดคะเนผลลัพธ์มากยิ่งขึ้น เมื่อทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารทั้ง 6 ชนิด คือ PM, CM, PPS, PPA, CPS และ CPA โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดมาแทนค่า y ในสมการเพื่อหาค่า x ซึ่งคือค่าปริมาณฟีนอลิกเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานในหน่วยไมโครกรัมแกลลิก ได้ค่าดังตารางที่ 4.2 และเมื่อนำมาหารด้วยค่าความเข้มข้นของสารสกัดได้เป็นค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด สำหรับเห็ด *P. giganteus* พบว่าสารสกัดหยาบ PM มีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุดคือ 65.38 ไมโครกรัมแกลลิก และสารสกัดหยาบ PPA มีปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดน้อยที่สุดคือ 25.57 ไมโครกรัมแกลลิก และเห็ด *C. indica* พบว่าสารสกัด CPA มีปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดมากที่สุดคือ 40.09 ไมโครกรัมแกลลิก และสารสกัด CPS มีปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดน้อยที่สุดคือ 26.05 ไมโครกรัมแกลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษานี้เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสาร PM กับเห็ดออริจิน และเห็ดนางฟ้าซึ่งเป็นเห็ดในสกุล *Pleurotus* ที่สกัดด้วยเมทานอลเหมือนกับงานวิจัยของภาวดี และคณะ (2558) พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดของเห็ดออริจิน เท่ากับ 97 ไมโครกรัมแกลลิก และเห็ดนางฟ้าเท่ากับ 88 ไมโครกรัมแกลลิก ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารสกัด PM ที่มีค่าเท่ากับ 65.38 ไมโครกรัมแกลลิก และเมื่อทำการเปรียบเทียบในเห็ด *C. indica* พบว่าในการศึกษาของ Rajoriya. *et al.* (2015) มีปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดจากเส้นใยเห็ด C. *indica* เท่ากับ 0.9±0.16 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด ซึ่งสารสกัดทั้งสามชนิดในการศึกษานี้ คือ CM, CPS และ CPA มีปริมาณฟีนอลิกมากกว่า แต่ในส่วนของ *P. giganteus* ปริมาณฟีนอลิกที่ลดน้อยลงอาจเป็นเพราะในขั้นตอนการสกัดโพลีแซคคาไรด์นั้นมีการใช้อุณหภูมิที่สูงถึง 80 องศาเซลเซียส และใช้เครื่องในการสกัดซึ่งเป็นภาชนะปิด จากการรายงานของอรวัสสา และคณะ (2555) พบว่าในขั้นตอนการสกัดเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจาก 25 เป็น 50 องศาเซลเซียส ทำให้ปริมาณฟีนอลิกรวมที่ได้ลดลง

ตารางที่ 4.2 ชนิดของสารสกัดหยาบ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอล และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ด *P. giganteus* และ *C. indica*

ชนิดสารสกัดหยาบ	ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ± SE	Total Phenolic µg(GAE)	Total Phenolic mg(GAE)/g Extract
PM	5	0.69 ± 0.02	65.38	13.08
PPS	5	0.48 ± 0.02	43.51	8.70
PPA	5	0.29 ± 0.01	25.57	5.11
CM	5	0.31 ± 0.01	29.95	5.99
CPS	10	0.27 ± 0.01	26.05	2.61
CPA	5	0.42 ± 0.01	40.09	8.02

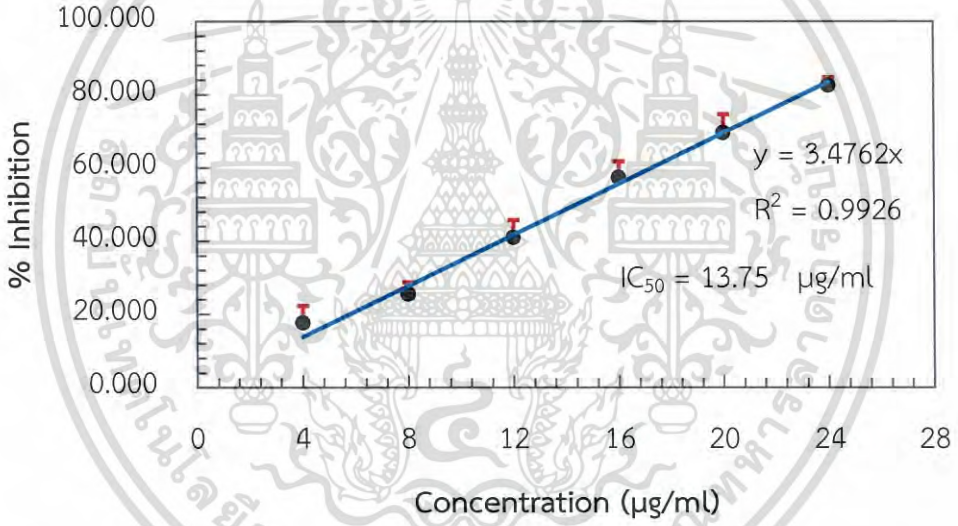
หมายเหตุ ± SE คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

4.4.1 ผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH

ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรที่อยู่ในสารละลาย โดย DPPH คือ อนุภาคอิสระที่เสถียร และสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ โดยในการวิเคราะห์จะนิยมรายงานผลเป็นค่า 50 percent inhibitory concentration (IC_{50}) ซึ่งคือค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพิจารณาได้จากสารที่มีค่า IC_{50} น้อยที่สุดแสดงว่าสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (Yim *et al.*, 2010) โดยในการศึกษานี้ใช้ Trolox เป็นสารละลายมาตรฐาน จะได้กราฟมาตรฐานที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง แสดงดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 กราฟมาตรฐาน Trolox สำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เมื่อสร้างกราฟมาตรฐาน Trolox ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) กับความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้กราฟเส้นตรง มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9926 (หมายความว่าผลของ y ที่ได้เป็นผลมาจากตัวแปร x เท่ากับ 99.26 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Trolox จะได้ค่าเท่ากับ 13.75 ดังรูปที่ 4.4

จากการทดลองที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดหยาบ PM และ CM พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ในการต้านอนุมูลอิสระ 89.27±0.91 และ 76.32±2.26 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.77 และ 5.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสารที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

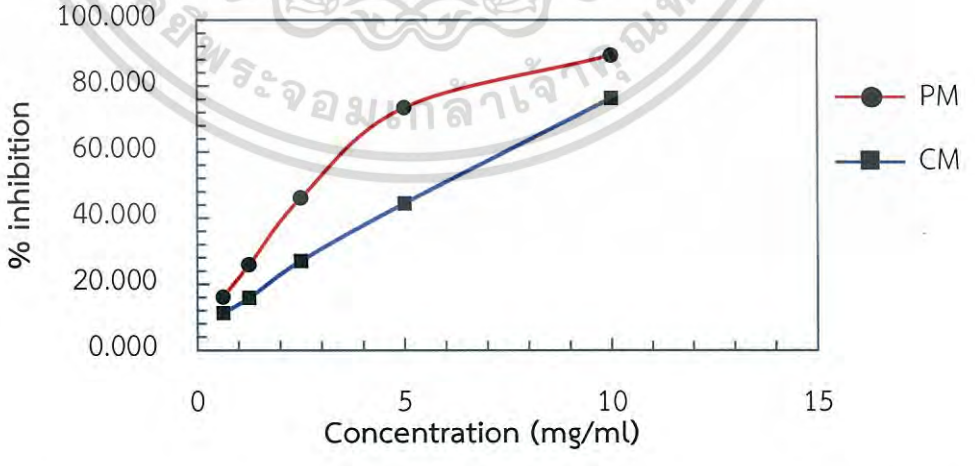
มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าคือ สารสกัด PM โดยดูได้จากค่า IC_{50} ที่มีค่าน้อยกว่า ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบ PM และ CM

ความเข้มข้น (mg/ml)	เปอร์เซ็นต์ DPPH Inhibition		
	ชนิดของสารสกัด ± SE		
	PM	CM	Trolox
10	89.27 ± 0.91	76.32 ± 2.26	
5	73.43 ± 3.61	44.45 ± 1.31	
2.5	46.12 ± 0.89	27.06 ± 1.55	
1.25	25.89 ± 1.33	15.87 ± 1.58	
0.625	16.12 ± 2.77	11.28 ± 2.41	
IC_{50} (mg/ml)	2.77	5.89	0.01

หมายเหตุ ±SE คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

และจากค่าในตารางที่ 4.3 สามารถนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองชนิดคือ PM และ CM กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังแสดงในรูปที่ 4.5



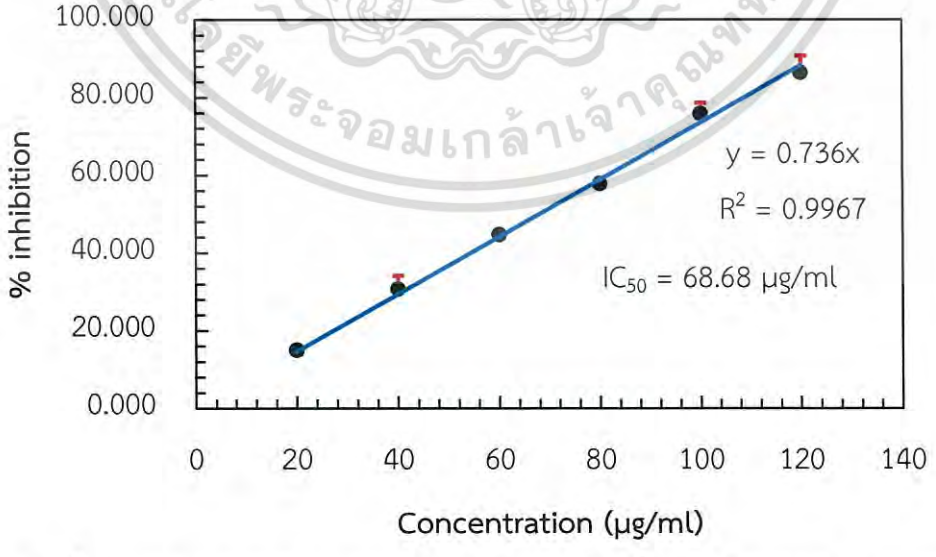
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด PM และ CM กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด PM กับงานวิจัยของ Pal *et al.* (2010) ที่ได้ทดสอบสารสกัดจากเห็ด *Pleurotus squarrosulus* โดยสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้นสูงสุดในการทดลอง คือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 38 เปอร์เซ็นต์ เห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด PM ที่ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 25.89 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสารสกัดจากเมทานอลของเห็ด *P. squarrosulus* จึงมีแนวโน้มการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าสารสกัด PM ส่วนสารสกัด CM ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Mowsumi*et et al.* (2015) ที่ทำการทดสอบสารสกัดเมทานอลจากเห็ด *C. indica* โดยใช้ส่วนของ fruiting body ในการสกัด พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.9±1.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นได้ว่าสารสกัด CM มีแนวโน้มการต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าสารสกัดเมทานอลจากเห็ด *C. indica* ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดเมทานอลจากเห็ด *C.indica* มีการสกัดจากส่วนของ Fruiting body ซึ่งมีส่วนประกอบของกลูแคน และมีสารประกอบฟีนอลิกที่มากกว่าอาจจะทำให้มีแนวโน้มในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า (Bak *et al.*, 2014)

4.4.2 ผลการทดสอบด้วยวิธี ABTS

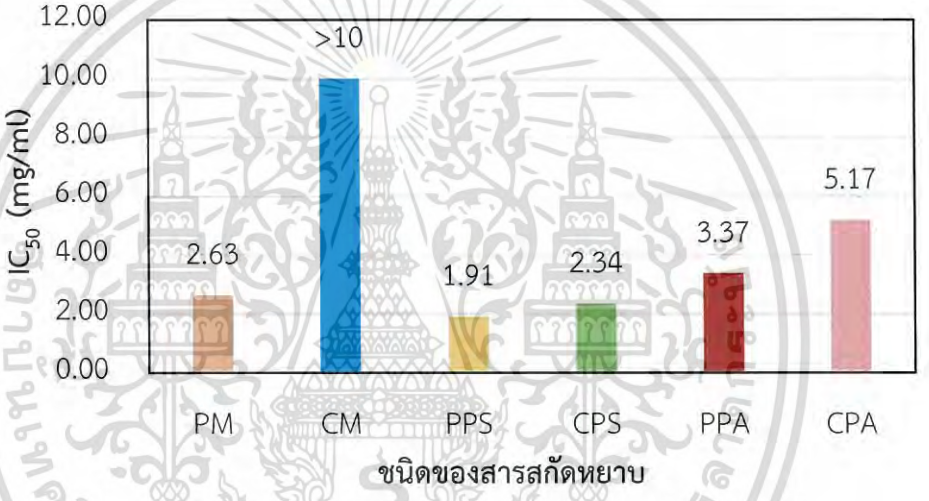
เป็นการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดย 3-ethylbenzothaizoline-6-sulfonic acid (ABTS) จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระด้วยการเติม Potassium persulfate และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ในการศึกษานี้ได้วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้ Trolox เป็นสารละลายมาตรฐาน ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐาน Trolox สำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้กราฟเส้นตรง ที่มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9967 และเมื่อหาค่า IC_{50} จากกราฟจะได้ค่าเท่ากับ 68.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และจากการทดสอบหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดทั้ง 6 ชนิดคือ PM, PPS, PPA, CM, CPS และ CPA ที่ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีค่า IC_{50} ของสารสกัดทั้ง 6 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 4.4 โดยเห็นได้ว่าสารสกัด PPS มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ซึ่งดูได้จากค่า IC_{50} ที่มีค่าต่ำที่สุดคือ 1.91 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วยสารสกัด CPS, PM, PPA, CPA และ CM ตามลำดับ และเมื่อนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสารสกัดกับค่า IC_{50} จะสามารถแสดงได้ดังรูป 4.7



รูปที่ 4.7 กราฟเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดทั้ง 6 ชนิด

จากการรายงานของ Mishra *et al.* (2015) ในการนำ fruiting body ของเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) มาสกัดด้วยเมทานอลพบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุด 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 39.84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับสารสกัด PM และ CM ที่ความเข้มข้นสูงสุดในการทดลองคือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 76.44 และ 42.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารสกัด PM มีแนวโน้มในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดเมทานอลของเห็ดหอม และสารสกัด CM มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับสารสกัดเมทานอลของเห็ดหอม นอกจากนี้ได้มีรายงานของ Vamanu *et al.* (2012) ที่ได้ทำการสกัดสารโพลีแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *Pleurotus ostreatus* ด้วยน้ำ พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.42±0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด PPA และ CPA ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.37 และ 5.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารสกัด PPA มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แนวโน้มการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ด *P. ostreatus* และสารสกัด CPA

จากการศึกษาการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS เมื่อนำสารสกัด PM และ CM มาเปรียบเทียบกันของทั้ง 2 วิธี พบว่าสารสกัด PM มี IC_{50} ที่ใกล้เคียงกัน โดยสารสกัด PM ที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH มีค่า 2.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธี ABTS มีค่า 2.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัด CM ของทั้ง 2 วิธี พบว่ามีค่าไปในทิศทางเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

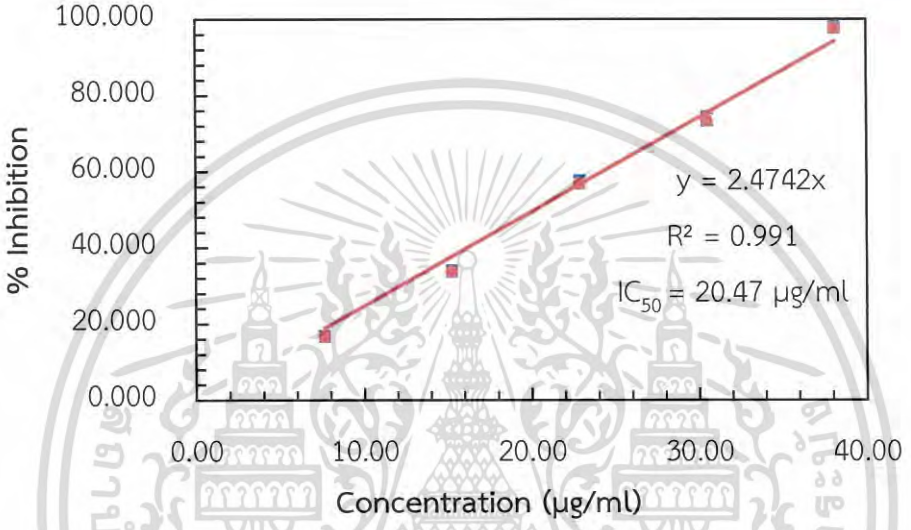
ตารางที่ 4.4 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดจากเห็ดทั้ง 6 ชนิด

ชนิดของสารสกัดหยาบ	เปอร์เซ็นต์ ABTS inhibition ± SE ความเข้มข้น (mg/ml)					IC_{50} (mg/ml)
	10	5	2.5	1.25	0.625	
PM	$76.44^{b} \pm 3.17$	$56.68^{d} \pm 3.81$	$48.66^{c} \pm 0.11$	$30.93^{b} \pm 1.44$	$19.10^{a} \pm 1.18$	2.63
PPS	$100.00^{a} \pm 1.00$	$99.96^{a} \pm 0.48$	$78.26^{a} \pm 3.27$	$41.82^{a} \pm 2.98$	$19.61^{a} \pm 1.07$	1.91
PPA	$99.49^{a} \pm 6.08$	$75.68^{c} \pm 5.12$	$40.51^{d} \pm 5.57$	$28.58^{c} \pm 3.53$	$11.66^{b} \pm 0.39$	3.37
CM	$42.58^{d} \pm 4.28$	$33.71^{f} \pm 4.28$	$29.74^{e} \pm 2.58$	$17.79^{e} \pm 2.31$	$10.74^{bc} \pm 1.95$	>10
CPS	$99.03^{a} \pm 1.76$	$89.81^{b} \pm 1.38$	$53.05^{b} \pm 3.56$	$22.65^{d} \pm 2.66$	$10.07^{c} \pm 1.38$	2.34
CPA	$73.78^{c} \pm 7.54$	$49.03^{e} \pm 7.78$	$30.88^{e} \pm 5.45$	$16.69^{e} \pm 2.39$	$8.49^{d} \pm 0.36$	5.17
สารมาตรฐาน Trolox						0.07

หมายเหตุ ± SE คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตัวอักษร a, b, c และ d คือ ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยสนใจแต่ละแถวในแนวตั้ง

4.5 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Dopachrome method)

จากการนำสารสกัดหยาบทั้ง 6 ชนิด ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี Dopachrome ซึ่งเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยจะเปลี่ยนสารตั้งต้นคือ L-DOPA ไปเป็นรงควัตถุเม็ดสี Phenomelanin และ Eumelanin โดยมี L-ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.8 ซึ่งรายงานเป็นค่าความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50} : 50 percent inhibitory concentration)



รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid สำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.8 ได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ 2.4742 และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.991 (หมายความว่าผลของ y ที่ได้เป็นผลมาจากตัวแปร x เท่ากับ 99.1 เปอร์เซ็นต์) เมื่อหาค่า IC_{50} ของ L-ascorbic acid ได้เท่ากับ 20.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเส้นใยเห็ดทั้ง 6 ชนิด พบว่าสารสกัด CPS มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยที่สุดคือ PPA และ CPA โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการรายงานของ Nguyen *et al.* (2014) ได้มีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจาก fruiting body ของเห็ด *C. indica* พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง คือ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 55.39 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารสกัด CM ได้เท่ากับ 38.82 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้ว่าสารสกัด CM มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยกว่า และมีรายงานของ Alam *et al.* (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ด *Pleurotus ferulae* โดยใช้เมทานอลในการสกัด ที่ความเข้มข้น 0.125 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ 13.12 ถึง 59.87 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปรียบเทียบกับสารสกัด PM ได้เท่ากับ 19.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร พบว่าสารสกัด PM มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยกว่าสารสกัดจากเห็ด *Pleurotus ferulae*

การศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัด PM มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดคือ 13.08 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ตามด้วยสารสกัด PPS มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 8.70 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS มากที่สุดคือ 1.91 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 2.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัด CPS มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดน้อยที่สุดคือ 2.61 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด แต่มีการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 2.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดคือ 2.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดไม่มีความสัมพันธ์กับการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เนื่องจากสารที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่ได้มีเพียงสารประกอบฟีนอล แต่ยังมีสารทุติยภูมิอื่นๆอีกหลายกลุ่มที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ด้วย (Fujimoto, 1990) ในขณะที่การต้านอนุมูลอิสระกับการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด PPS และ CPS มีความสอดคล้องกันเนื่องจากถ้ามีสารประกอบฟีนอลิกหรือสารประกอบอื่นๆ ที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้มากจะส่งผลให้มีทั้งการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากด้วยเช่นกัน (อรวัสสา, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดของสารสกัด	เปอร์เซ็นต์ Tyrosinase inhibition ±SE ความเข้มข้น (mg/ml)					IC_{50} (mg/ml)
	10	5	2.5	1.25	0.625	
PM	$96.46^{a} \pm 0.76$	$53.46^{b} \pm 1.42$	$30.72^{d} \pm 0.87$	$19.67^{c} \pm 1.20$	$13.78^{ab} \pm 0.39$	4.61
PPS	$98.18^{a} \pm 0.62$	$82.66^{a} \pm 1.03$	$52.74^{b} \pm 0.88$	$25.58^{a} \pm 0.72$	$9.76^{c} \pm 0.78$	2.35
PPA	$48.72^{c} \pm 1.45$	$28.36^{c} \pm 0.52$	$21.03^{e} \pm 0.72$	$18.48^{c} \pm 0.67$	$13.67^{b} \pm 1.03$	>10
CM	$93.18^{b} \pm 1.21$	$82.18^{a} \pm 0.79$	$38.82^{c} \pm 0.82$	$17.32^{c} \pm 1.20$	$15.85^{a} \pm 2.01$	3.01
CPS	$97.66^{a} \pm 0.66$	$82.76^{a} \pm 0.81$	$59.09^{a} \pm 1.01$	$24.03^{b} \pm 2.58$	$8.73^{c} \pm 1.21$	2.13
CPA	$29.28^{d} \pm 1.50$	$24.53^{d} \pm 1.27$	$20.04^{f} \pm 1.37$	$15.72^{d} \pm 1.43$	$12.75^{b} \pm 1.40$	>10
L-ascobic acid						0.02

หมายเหตุ ± SE คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตัวอักษร a, b, c, d, และ e คือ ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยสนใจแต่ละแถวในแนวตั้ง

4.6 ผลการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบ และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *P. giganteus* และ *C. indica* ที่มีต่อเซลล์ไลน์ L929, Vero และ HaCat ที่เลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้mitomycin C ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นตัวควบคุมเชิงบวก และ DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุมเชิงลบ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารสกัด PM มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero มากที่สุด คือ 45.81 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ HaCat พบว่าสารสกัด PPS มีความเป็นพิษมากที่สุดคือ 37.45 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ L929 พบว่าสารสกัด PPS และ CPS มีความเป็นพิษมากที่สุดคือ 32.74 และ 30.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่าที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.6 ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดนั้นแม้ใช้ความเข้มข้นสูงถึง 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดไม่แสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ รวมทั้งเซลล์ผิวหนัง จึงเหมาะแก่การนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในอนาคตได้

ตารางที่ 4.6 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จากสารสกัดทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชนิดของสารสกัดหยาบ	เปอร์เซ็นต์ Cytotoxicity ± SE		
	เซลล์ไลน์		
	Vero	HaCat	L929
PM	$45.82^{a} \pm 0.87$	$28.77^{b} \pm 0.72$	$14.58^{b} \pm 2.42$
PPS	$42.75^{b} \pm 2.76$	$37.45^{a} \pm 0.56$	$32.74^{a} \pm 3.41$
CM	30.91 ± 2.24	$15.14^{c} \pm 0.44$	$13.65^{b} \pm 1.66$
CPS	$40.96^{b} \pm 1.47$	$29.48^{b} \pm 0.75$	$30.84^{a} \pm 2.34$

หมายเหตุ ± SE คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตัวอักษร a, b, c และ d คือ ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยสนใจแต่ละแถวในแนวตั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เมื่อเพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ด *P. giganteus* และ *C. indica* บนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว PDB และเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 วัน เพื่อใช้ในการสกัดสาร โดยจะได้สารสกัด 6 ชนิด คือสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลจากเส้นใยเห็ด *P. giganteus* (PM) สารสกัดหยาบด้วยเมทานอลจากเส้นใยเห็ด *C. indica* (CM) สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยด่างจากเส้นใยเห็ด *P. giganteus* (PPS) และน้ำ (PPA) และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยด่างจากเส้นใยเห็ด *C. indica* (CPS) และน้ำ (CPA) ซึ่งในการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดทั้ง 2 ชนิดนี้ควรมีการศึกษาถึงสภาวะในการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด เพื่อเพิ่มความสามารถในการเพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ดให้มีปริมาณมากขึ้น และรวดเร็ว อีกทั้งยังประหยัดเวลาที่ใช้ในการทดลอง

ในการศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดพบว่าสารสกัด PM มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดคือ 65.38 ไมโครกรัมแกลลิก และสารสกัด PPA มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดต่ำที่สุดคือ 25.57 ไมโครกรัมแกลลิก ดังนั้นจากการศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด อาจนำไปวิเคราะห์ศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคอื่นๆ เช่น high performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อจะได้ทราบถึงชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในเห็ดทั้ง 2 ชนิดต่อไป

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยทดสอบที่ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH นั้น สารสกัด PM มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด โดยมี IC_{50} เท่ากับ 2.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าสารสกัด PPS มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} 1.91 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด CM มีฤทธิ์ต่ำที่สุดโดยต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการต้านอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี DPPH และ ABTS เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันในสารสกัด PM กับ CM พบว่าสารสกัด PM มี IC_{50} ใกล้เคียงกัน ส่วนสารสกัด CM จากวิธี DPPH มีค่า 5.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธี ABTS มีค่า IC_{50} มากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจำเป็นต้องทำการทดสอบหลายวิธีควบคู่กัน เช่นอาจทดสอบเพิ่มเติมด้วยการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอรริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) เป็นต้น

การศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัด CPS มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} ที่ 2.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด PPA และ CPA มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำที่สุดโดยต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิดคือ Vero, HaCat และ L929 พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดที่นำมาทดสอบไม่แสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อใช้ในการลดฝ้ากระ และทำให้ผิวกระจ่างใสได้ แต่ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของการตรวจสอบกับเซลล์ไลน์ชนิดอื่น รวมทั้งเรื่องการศึกษาวิธีการกำจัดกลิ่นไม่พึงประสงค์ เนื่องจากสารสกัดที่ได้มีกลิ่นค่อนข้างแรง เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาและใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ ศรีพานิชกุลชัย และคณะ. 2554. “การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพจากสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ของเส้นใยและดอกเห็ดกระด้าง.” รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 82.

ขวัญจิต อิสระสุข. 2558. “ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบลองกอง.” รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยสานดุสิต. 81-96.

จตุรงค์ สุภาพพร้อม. 2559. **บทเรียนเรื่อง สารชีวโมเลกุล ตอนสมบัติและปฏิกิริยาของคาร์โบไฮเดรต 3–พอลิแซกคาไรด์**. [Online]. Available : http://www.phukhieo.ac.th/obec-media/2555/manual

จันทิมา หอมแกลบ, สุพนิดา วินิจฉัย, หทัยรัตน์ ริมคิริ, นคร เหลืองประเสริฐ และวิชัย หฤทัยธนาสันติ์. 2553. “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทิลอะซีเตดจากผลมะขามป้อมจากแหล่งในประเทศไทย.” รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 1-9.

จุฑามาศ ธรรมกิจจา, ธนพร ชาวแสนแสบ, สุพรรษา โรจน์บุญถึง และสุภาพ แป้นดี. 2557. “การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเปลือกแก้วมังกรพันธุ์เนื้อขาวเปลือกแดงที่มีต่อเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้มนุษย์ (HT29) และเซลล์ไลน์ไตของลิงแอฟริกัน (Vero cell).” *Science Project Database*. 9 : 20-39.

ชนะ พรหมทอง. 2553. **ครีมเห็ดแครง นวัตกรรมชะลอแก่จากธรรมชาติ พร้อมต่อยอดสู่เชิงพาณิชย์**. [Online]. Available : http://www.manager.co.th/Science/ViewNews.aspx?NewsID=9530000087812.

ถนอมนวล พรหมบุญ และน้ำฝน เบ้าทองคำ. 2556. “ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเห็ดป่ากินได้ 5 ชนิดจากป่าชุมชนบ้านน้ำจางในเขตพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์.” สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.

นภัสสร เพียสุระ, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์, อรพิน เกิดชูชื่น และโศรดา วัลภา. 2553. “การเปรียบเทียบพอลิแซคคาไรด์ของ *Enteromorpha intestinalis* โดยการสกัดด้วยด่างและน้ำร้อน.” *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 41 : 677-680.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

บุญเลิศ ไทยทัตกุล. 2559. **เห็ดมิลค์กี้ เกษตรกรก้าวหน้า.** [Online]. Available : https://web.facebook.com/agriculturemag/photos/a.410935172277415.81424.327080917329508/771104326260496/?_rdr.

บุปผาชาติ พดด้วง และมณีรัตน์ มีพลอย. 2554. "การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเถาสิรินธรวัลลี (สามสิบสองประดง)." *วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 21, 3(กรกฎาคม-กันยายน) : 69-78.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. "อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ." *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 21, 3(กรกฎาคม – กันยายน) : 275-286.

เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์. 2553. "การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน." รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 1-9.

ผดุงเกียรติ เทพกรณ์. 2556. **กลไกการสร้างเมลานิน.** [Online]. Available : http://www.student.chula.ac.th/~56370586/melaninwork.html

พรพรรณ เหล่าชิระสุวรรณ. 2557. "การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากต้นตูมตัง." รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ภาวดี ช่วยเจริญ, กนกวรรณ นนทะวงษ์, พิชชาพร ดวงจันทร์, กฤษณา แต่งสวน, เวฬุรีย์ ทับทิมหอม, ชมพูนุท สินธุพิบูลยกิจ และคณะ. 2015. "ผลของการต้มต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเห็ดออรินจิ เห็ดหูหนูดำ เห็ดนางฟ้า และเห็ดหอม." หน้า 382-390. **การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 6.**

มนสิชา ขวัญเอกพันธุ์, อำภา จิมไธสง และไฉน น้อยแสง. 2555. "ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากส่วนเถาชะเอมไทย." รายงานการวิจัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2550. **เครื่องสำอางเพื่อความงามและสุขภาพ.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพัตรา ม่วงงาม, ศศมล ผาสุก และปัณณ์รภัส ถกลภักดี. 2555. "ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพญายาและลูกเดือยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานขอเอนไซม์ไทโรซิเนส." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์.

อรวัสสา เผือกสุข, ชัยศักดิ์ จันศรีนิยม และมยุรี กัลยาวัฒนกุล. 2555. "ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเห็ดฟางเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง." รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

อัจฉรา พยัพพานนท์ และจริเวท เจตน์จนัทร์. 2552. "ทดสอบสายพันธุ์เห็ดตีนแรดที่ผลิตสารโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นประโยชน์." รายงานการวิจัย กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Alam, N. Yoon, K.N. and Lee, T.S. 2011. "Evaluation of The Antioxidant and Antityrosinase Activities of Three Extracts from *Pleurotus nebrodensis* Fruiting Bodies." *African Journal of Biotechnology*. 10, 11(April) : 2978-2986.

Alam, N. Yoon, K.N. Lee, J.S. Cho, H.J. and Lee, T.S. 2011. "Consequence of The Antioxidant Activities and Tyrosinase Inhibitory Effects of Various Extracts from The Fruiting Bodies of *Pleurotus ferulae*." *Saudi Journal of Biological Sciences*. 19 : 111–118.

American Type Culture Collection (ATCC). 2016. **NCTC clone 929 cell**. [Online]. Available : http://www.atcc.org/products/all/CCL-1.aspx.

American Type Culture Collection (ATCC). 2016. **Vero cell**. [Online]. Available : http://www.atcc.org/Products/All/CCL-81.aspx.

Ames, B.N. Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. 1993. "Oxidants, Antioxidants, and The Degenerative Disease of Aging." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 : 7915-7922.

Bak, W.C. Park, J.H. Park, Y.A. and Ka, K.H. 2014. "Determination of Glucan Contents in The Fruiting Bodies and Mycelia of *Lentinula edodes* Cultivars." *Mycobiology* 42, 3 : 301-304.

Chang, T.M. 2012. "Tyrosinase and Tyrosinase Inhibitors." *Journal of Biocatalysis & Biotransformation*. 1, 2(September) : 1-2.

Chang, T.S. 2012. "Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity." *Materials*. 5 : 1661-1685

Cheung, L.M. Cheung, P.C.K. 2003. "Antioxidant Activity and Total Phenolics of Edible Mushroom Extracts." *Food Chemistry*. 81, 2(May) : 249–255.

Chien, C.C. Tsai, M.L. Chen, C.C. Chang, S.J.and Tseng. C.H. 2008. "Effects on Tyrosinase Activity by The Extracts of *Ganoderma lucidum* and Related Mushrooms." *Mycopathologia*. 166 : 117-120.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Dinesh, M.R. **Milky mushroom (*Calocybe indica*).** [Online]. Available : http:// iihr.res.in/content/milky-mushroom-calocybe-indica.

Finimundya, T.C. Gambatoa, .G. Fontanab, R. Camassolab, M. Salvadorc, M. Mourad, S. Hesse, J. *et al.,* 2013. "Aqueous Extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* Exhibit High Antioxidant Capability and Promising in vitro Antitumor Activity." *Nutrition Research*. 33, 1(January) : 76–84.

Fujimoto, K. 1990. "Antioxidant Activity of Algal Extracts", *Introduction to Applied Phycology*. SPB Academic Publishing, The Hague : 199–208.

Halliwell, B. 1999. "Antioxidant Defense Mechanism: from The Beginning to The End (of The Beginning)." *Society for Free Radical Biology and Medicine* 31 : 261-272.

Karunarathna, S.C. and Hyde, K.D. 2011. "*Pleurotus giganteus* (Berk.)." *Lentinus giganteus Revisited Following New Collections in Thailand and Sri Lanka. Mycotaxon*. 118 : 2-4.

Kim, S.H. Jakharb, R. Kangb, S.C. 2015. "Apoptotic Properties of Polysaccharide Isolated from Fruiting Bodies of Medicinal Mushroom *Fomes fomentarius* in Human Lung Carcinoma Cell Line." *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22, 4(July) : 484–490.

Lemieszek, M. and Rzeski, W. 2012. "Anticancer Properties of Polysaccharides Isolated from Fungi of The Basidiomycetes Class." *Wspolczesna Onkol*. 16, 4 : 285–289.

Lee, B.W. Lee, J.H. Gal, S.W. Moon, Y.H. and Park, K.H. 2014. "Selective ABTS Radical-Scavenging Activity of Prenylated Flavonoids from *Cudrania tricuspidata*." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70, 2 : 427–432.

Liu, Y. Peterson, D.A. Kimura, H. and Schubert, D. 1997. "Mechanism of Cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Reduction." *Journal of Neurochemistry.* 69, 2(August) : 81-93.

Mirunalini, S. Dhamodharan, G. and Deepalakshmi, K. 2011. "Antioxidant Potential and Current Cultivation Aspects of An Edible Milky Mushroom *Calocybe indica*." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 4, 1 : 137-143.

Mishra, K.K. Pal, S.R. and Bhatt, J.C. 2015. "Comparison of Antioxidant Properties in Cap and Stip of *Lentinula edodes*-A Medicinal Mushroom." *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 27, 7(July) : 562-569.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Mizuno, T. 1996. **A Development of Antitumor Polysaccharides from Mushroom Fungi.** [Online]. Available : http://www.ffcr.or.jp/zaidan/ffcrhome.nsf/7bd44c20b0dc562649256502001b65e9/616003350c4ba7df492568c4001deebf/$FILE/167-8.pdf

Mizuno, T. Ohsawa, K. Hagiwara, N. and Kuboyama, R. 1986. "Fractionation and Characterization of Antitumor Polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*." *Agricultural and Biological Chemistry*. 50, 7 : 1679-1688.

Mowsumi, F.R. Rahaman, A. Sarker, N.C. Choudhury, B.K. and Hossain, S. 2015. "*In vitro* Relative Free Radical Scavenging Effects of *Calocybe indica* (Milky Oyster) and *Pleurotus djamor* (Pink oyster)." *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4, 7(June) : 186-195.

Navathe, S. Borkar, P.G. and Kadam, J.J. 2014. "Cultivation of *Calocybe indica* (P&C) in Konkan Region of Maharashtra, India." *World Journal of Agricultural Research*. 2, 4 : 187-191.

Nguyen, T.K. Lee, M.W. Yoon, K.N. Kim, H.Y. Jin, G.H. Choi, J.H. Im, K.H. and Lee, T.S. 2014. "*In vitro* Antioxidant, Anti-diabetic, Anti-cholinesterase, Tyrosinase and Nitric Oxide Inhibitory Potential of Fruiting Bodies of *Coprinellus micaceus*." *Journal of Mushrooms*. 12, 4(December) : 330-340.

Pal, J. Ganguly, S. Tahsin, K.S. and Acharya, K. 2010. "*In vitro* Free Radical Scavenging Activity of Wild Edible Mushroom, *Pleurotus squarrosulus* (Mont.) Singer." *Indian Journal of Experimental Biology*. 47 : 1210-1218.

Phan, C.W. David, P. Tan, Y.S. Naidu, M. Wong, K.H. Kuppusamy, U.R. and Sabaratnam, V. 2014. "Intrastrain Comparison of The Chemical Composition and Antioxidant Activity of An Edible Mushroom, *Pleurotus giganteus*, and Its Potent Neuritogenic Properties." *Scientific World Journal*. 2014, (July) : 1-10.

Phan, C.W. Wong, W.L. David, P. Naidu, M. and Sabaratnam, V. 2012. "*Pleurotus giganteus* (Berk.) Karunarathna & K.D. Hyde: Nutritional Value and in vitro Neurite Outgrowth Activity in Rat Pheochromocytoma Cells" *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12, 102 : 1-11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Prabu, M. and Kumuthakalavalli, R. 2014. "*In vitro* and *in vivo* Antinflammatory Activity of The Methanolic Extract of *Calocybe indica* P.&C." *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3, 5(April) : 776-783.

Rahim, A. Rocca, E. Steinmetz, J. Kassim, M. Ibrahim, M. and Osman, H. 2008. " Antioxidant Activities of Mangrove Rhizophora Apiculata Bark Extracts." *Food Chemistry*. 107, 1(March) : 200-207.

Rajoriya, A. and Gupta, N. 2015. "Cultural, Nutritional and Biochemical Characterization of *Lentinus tuberregium* and *Calocybe indica* Under Submerged Culture Condition." *Advance in Agriculture and Biology*. 4, 2(October) : 87-94.

Ramkumar, L. Ramanathan, T. Thirunavukkarasu, P. and Arivuselvan, N. 2010. "Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Nine Edible Mushrooms Extract." *International Journal of Pharmacology*. 6, 6 : 950-953.

Reubel, G.H. Gareis, M. and Amselgruber, W.M. 1987. "Cytotoxicity Evaluation of Mycotoxins by An MTT-Bioassay." *Mycotoxin Research*. 3, 2(September) : 85-96.

Subbiah, K.A. and Balan, V. 2015. "A Comprehensive Review of Tropical Milky White Mushroom *(Calocybe indica* P&C)." *Mycobiology*. 43, 3(September) : 184-194.

Samchai, S. Seephonkai, P. Sangdee, A.Puntumchai, A. and Klinhom, U. 2009. "Antioxidant, Cytotoxic and Antimalarial Activities from Crude Extracts of Mushroom *Phellinus linteus*." *Journal of Biological Sciences*. 9 : 778-783.

Seephonkai, P. Samchai, S. Thongsom, A. Sunaart, S. Kiemsanmuang, B. Chakuton, K. 2011. "DPPH Radical Scavenging Activity and Total Phenolicsof *Phellinus* Mushroom Extracts Collected from Northeast of Thailand." *Chinese Journal of Natural Medicines*. 9, 6 : 0441–0445.

Selvi, S. Umadevi, P. Murugan, S. and Senapathy, J.G. 2011. "Anticancer Potential Evoked by *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* Using T24 Urinary Bladder Cancer Cell line." *African Journal of Biotechnology*. 10, 37(July) : 7279-7285.

Sies, H. 1997. "Oxidative Stress : Oxidants and Antioxidants." *Experimental Physiology*. 82 : 291-295.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Sies, H. Stahl, W. and Sundquist, A.R. 1992. "Antioxidant Functions of Vitamins, Vitamin E and C, Beta-carotene and Other Carotenoids." *Annals of the New York Academy of Sciences.* 30, 669(September) : 7-20.

Suganya, M. and Suriyavathana, M. 2012. "Antioxidant Profile of *Agaricus bisporus* and *Calocybe indica*." *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*. 3, 6(June) : 1780-1783.

Thaipong, K. Boonprakob, U. Crosby, K. Cisneros-Zevallos, L. Byrne, D.H. 2006. "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts." *Journal of Food Composition and Analysis*. 19 : 669–675

Uchida, R. Ishikawa, S. and Tomoda, H. 2014. "Inhibition of Tyrosinase Activity and Melanine Pigmentation by 2-hydroxytyrosol." *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 4, 2(April) : 141-145.

Uddin, M.J. Nasiruddin, K.M. Haque, M.E. Biswas, A.K. and Islam, M.S. 2012. "Influence of Different Media Variety and Growth Regulator on Mycelial Colony Proliferation of Mushroom." *Journal of Environmental Science and Natural Resources*. 5, 1 : 223-227.

Vamanu, E. 1012. "Biological Activities of The Polysaccharides Produced in Submerged Culture of Two Edible *Pleurotus Ostreatus* Mushrooms." *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 12 : 1-8.

Videira, I.F.S. Moura, D.F.L. and Magina, S. 2013. "Mechanisms Regulating Melanogenesis." *An Bras Dermatol.* 88, 1 : 76-83.

Wong, W.L. Abdulla, M.A. Chua, K.H. Kuppusamy, U.R. Tan, Y.S. and Sabaratnam, V. 2012. "Hepatoprotective Effects of *Panus giganteus* (Berk.) Corner Against Thioacetamide- (TAA-) Induced Liver Injury in Rats." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, (May) : 10.

Wu, B. Cui, J. Zhang, C. Li, Z. 2012. "A Polysaccharide from *Agaricus blazei* Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis of Osteosarcoma Cells." *International Journal of Biological Macromolecules.* 50, 4(May) : 1116-1120.

Yang, Q.Y. 1999. "Yun Zhi Polysaccharopeptide (PSP) and The General Aspects of Its Research." *The Hong Kong Assocation for Health Care Ltd.,* : 29-38.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

1.1 สารเคมีที่ใช้

1.1.1 อาหาร RPMI 1640 (ชนิดผง)		
1.1.2 น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1000	มิลลิลิตร
1.1.3 $NaHCO_3$	2.4	กรัม

1.2 ขั้นตอนการเตรียม

1.2.1 ผสมอาหาร RPMI 1640 กับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

1.2.2 เติม $NaHCO_3$ 2.4 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วย magnetic bar

1.2.3 ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0

1.2.4 ฆ่าเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

1.2.5 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

2.1 สารเคมีที่ใช้

2.1.1 เอนไซม์ทริปซิน	0.25	กรัม
2.1.2 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	3.71	กรัม
2.1.3 PBS	100	มิลลิลิตร

2.2 ขั้นตอนการเตรียม

2.2.1 นำผงเอนไซม์ทริปซิน 0.25 กรัม และ EDTA 3.71 กรัม ละลายในสารละลาย PBS 100 มิลลิลิตร

2.2.2 ทำการฆ่าเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3. การเตรียม Fetal Bovine Serum (FBS)

3.1.1 ขั้นตอนการเตรียมนำซีรัมมาทำการ inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.1.2 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การนับเซลล์ และการคำนวณเซลล์มีชีวิตด้วย Haemacytometer

4.1 เตรียมเซลล์ที่ต้องการนับจำนวน กรณีเป็นเซลล์ชนิดเกาะพื้นผิวจะต้องทำการย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากฟลาสก์ก่อนโดยการใช้เอนไซม์ทริปซิน แต่ถ้าเป็นเซลล์แขวนลอยสามารถดูดเซลล์ไปนับได้เลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ดูดเซลล์ที่ต้องย้อมปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาทำการย้อมสี Trypan blue ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

4.3 ดูดเซลล์ที่ย้อมปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาโหลด Haemacytometer ทั้งสองด้าน

4.4 นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 และ 40 เท่าโดยที่เซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีฟ้าของ Trypanblue ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีฟ้าของ Trypanblue

4.5 นับจำนวนเซลล์ใน 5 ช่องใหญ่ จากนั้นก็บันทึกเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต

4.6 คำนวณเซลล์ที่มีชีวิตต่อ 1 มิลลิลิตร จากสูตรต่อไปนี้

จำนวนเซลล์มีชีวิต/มิลลิลิตร = จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ย x 10^4 x ค่าความเจือจาง (dilution factor)

5. การเตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

5.1 สารเคมีที่ใช้

5.1.1 สาร MTT (ชนิดผง)

5.1.2 PBS (pH = 7.4)

5.2 ขั้นตอนการเตรียม

5.2.1 เตรียม MTT ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2.2 เติม PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

6. การเตรียมสารละลาย Stock DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ เตรียม 25 มิลลิลิตรละลายในเมทานอลด้วย magnetic bar

6.1 สารเคมีที่ใช้

6.1.1 สาร DPPH (ชนิดผง)

6.1.2 เมทานอล

6.2 ขั้นตอนการเตรียม

6.2.1 ชั่ง DPPH เพื่อเตรียมความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ชั่งมา 1.9716 มิลลิกรัมเตรียม 25 มิลลิลิตร

6.2.2 ละลายใน เมทานอลด้วย magnetic bar ให้ละลายให้หมดและปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร

7. การเตรียมอาหาร PDB ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

7.1 สารเคมีที่ใช้

7.1.1 มันฝรั่ง	200	กรัม
7.1.2 กลูโคส	20	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.1.3 น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

7.2 ขั้นตอนการเตรียม

7.2.1 ปลอกเปลือก หั่นเป็นลูกเต๋า

7.2.2 ต้มน้ำกลั่น และใส่มันฝรั่งลงไป

7.2.3 ต้มจนกระทั่งมันฝรั่งนิ่ม

7.2.4 กรองแยก มันฝรั่งออกให้เหลือแต่ส่วนน้ำ

7.2.5 เติมกลูโคสลงไปในน้ำต้มมันฝรั่งให้ละลายจนหมด

7.2.6 นำไป autoclave เพื่อฆ่าเชื้อ

8. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox Stock 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียม (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

8.1 สารเคมีที่ใช้

8.1.1 Trolox (ชนิดผง) 100 มิลลิกรัม

8.1.2 Methanol 100 มิลลิลิตร

8.2 ขั้นตอนการเตรียม

8.2.1 ชั่ง Trolox (ชนิดผง) 100 มิลลิกรัมละลายด้วย methanol โดยใช้ magnetic bar

8.2.2 ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

8.2.3 จะได้สารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8.2.4 นำไปเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

9. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

9.1 สารเคมีที่ใช้

9.1.1 Gallic acid (ชนิดผง) 10 มิลลิกรัม

9.1.2 น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

9.2 ขั้นตอนการเตรียม

9.2.1 ชั่ง Gallic acid ชนิดผง 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน

9.2.2 ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

9.2.3 จะได้สารละลายมาตรฐาน Galic acid ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

9.2.4 นำไปเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. การเตรียม Stock ABTS

10.1 สารเคมีที่ใช้

10.1.1 ABTS ชนิดผง	38.41	มิลลิกรัม
10.1.2 Potassium persulfate	6.62	มิลลิกรัม

10.2 ขั้นตอนการเตรียม

10.2.1 ชั่ง ABTS ชนิดผง 38.41 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรจะได้ ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

10.2.2 ชั่ง Potassium persulfate 6.62 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรจะได้ Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์

10.2.3 นำ ABTS และ Potassium persulfate มาผสมกัน

10.2.4 บ่มในที่มืด 24 ชั่วโมง

10.2.5 เจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนที่ 734 นาโนเมตรให้ได้ประมาณ 0.7±0.2 ก่อนนำไปใช้งาน

11. การเตรียม Phosphate buffer pH 6.8

11.1 ขั้นตอนการเตรียม

สาร ก. ชั่ง $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 7.8 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.05 โมลาร์

สาร ข. ชั่ง $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 8.9 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.05 โมลาร์

11.1.1 นำสาร ก.ปริมาตร 24.5 มิลลิลิตรมาผสมกับ สาร ข.ปริมาตร 25.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

11.1.2 ปรับ pH ให้ได้ 6.8

12. การเตรียมเอนไซม์ไทโรซิเนส (sigma) 5771 ยูนิตต่อมิลลิกรัมมี 4.3 มิลลิกรัม

12.1 ขั้นตอนการเตรียม

12.1.1 ใส่ Phosphate buffer ลงในหลอดเอนไซม์ไทโรซิเนส (sigma) 4 มิลลิลิตร

12.1.2 ผสมให้เข้ากันจะได้เอนไซม์ไทโรซิเนส ที่มีความเข้มข้น 5771 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

12.1.3 นำไปเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ต้องการ

13. การเตรียม L-DOPA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง L-DOPA 50 มิลลิกรัมละลายด้วย Phosphate buffer pH 6.8 50 มิลลิลิตรจะได้ L-DOPA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. เตรียม Folin-ciocalteu 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

นำ Folin-Ciocalteu สำเร็จรูป ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร

15. การเตรียม $NaCO_3$ 7.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

ชั่ง $NaCO_3$ 7.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

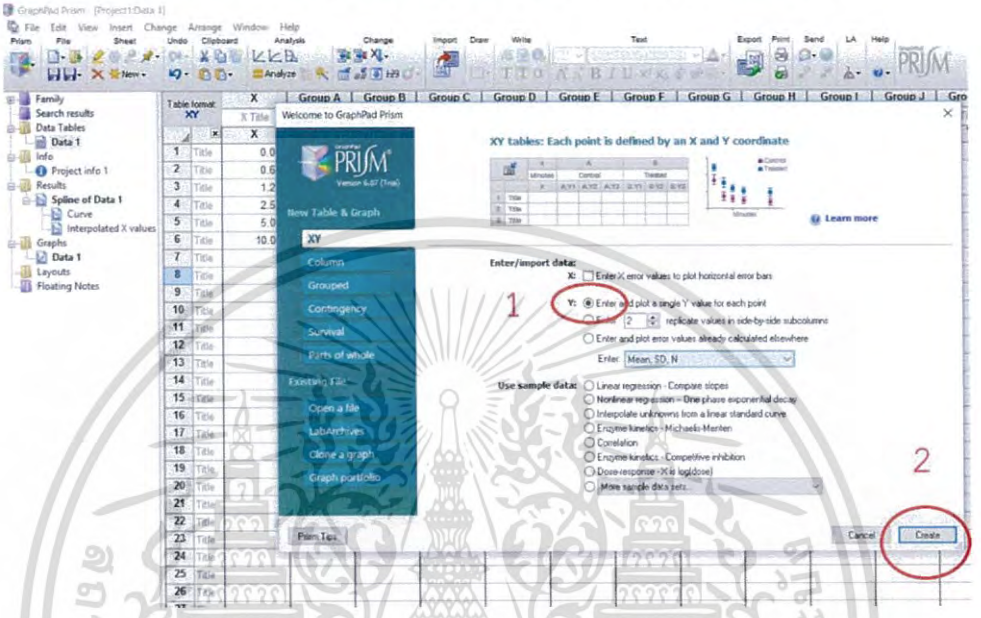
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

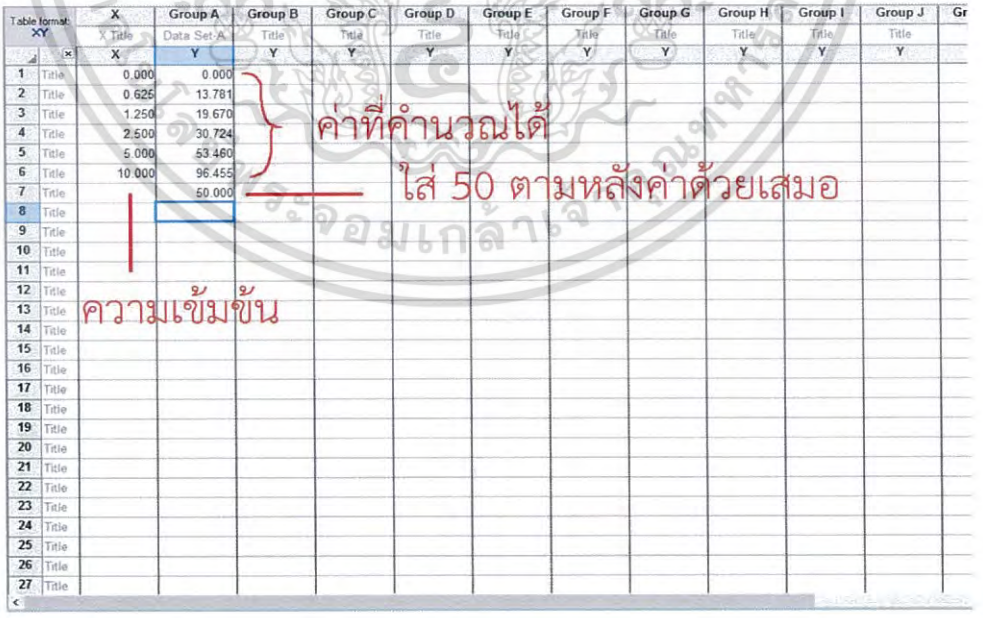
วิธีการใช้โปรแกรม

1. วิธีการใช้โปรแกรม GraphPad Prism 6.07

1.1 เมื่อเข้าโปรแกรมจะพบภาพนี้ เลือกหมายเลข 1 และกด Create ที่หมายเลข 2

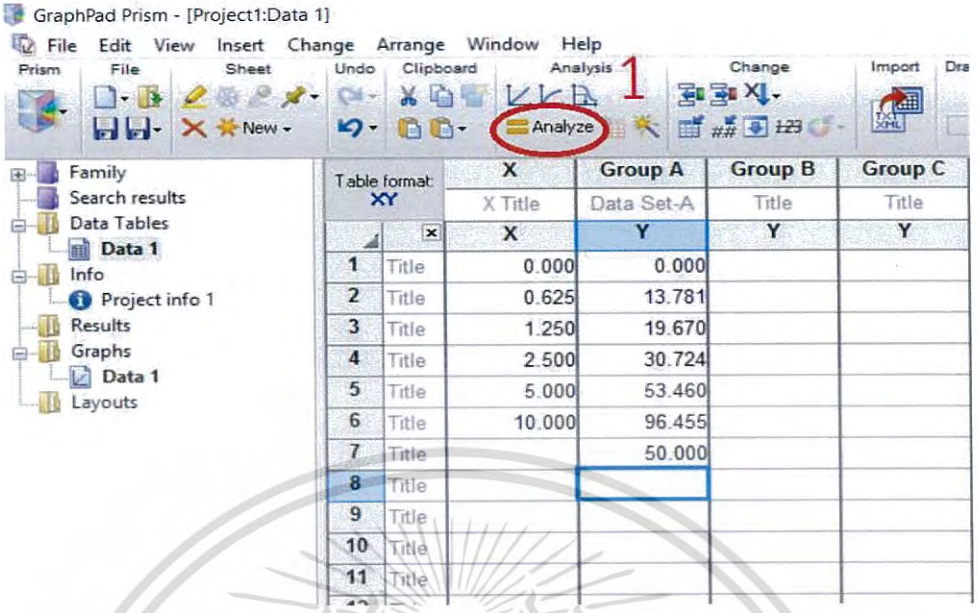


1.2 เมื่อกด Create จะปรากฏภาพดังนี้ ให้พิมพ์ข้อมูล โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้น และ แกน Y เป็นค่าเปอร์เซ็นต์ที่คำนวณได้ จากนั้นให้พิมพ์ 50 ต่อท้ายค่าของแกน Y

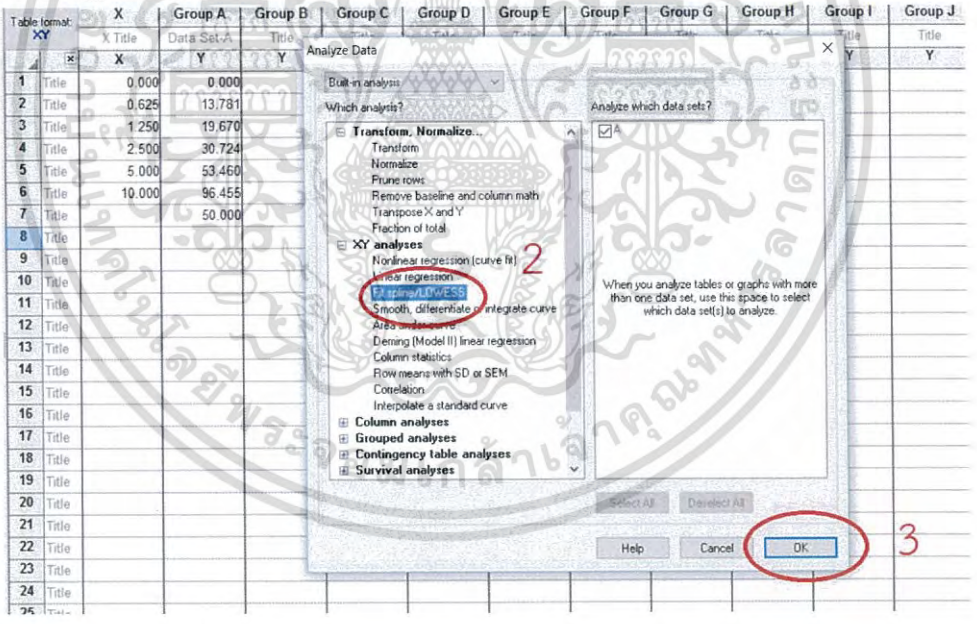


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 คลิกที่ Analyze ตามหมายเลข 1

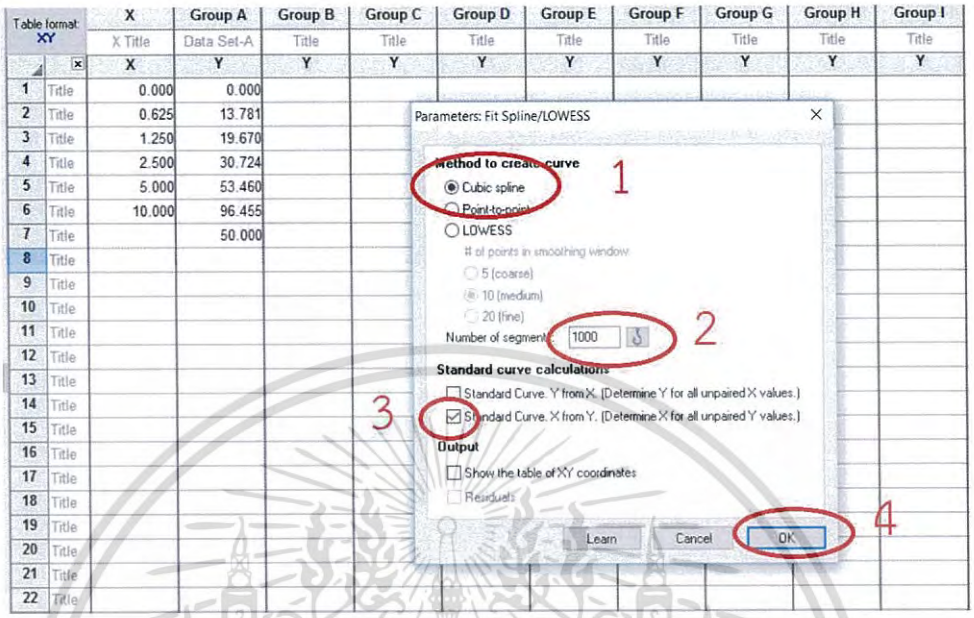


1.4 จะปรากฏดังภาพ ให้เลือกที่หมายเลข 2 และเลือก OK ที่หมายเลข 3

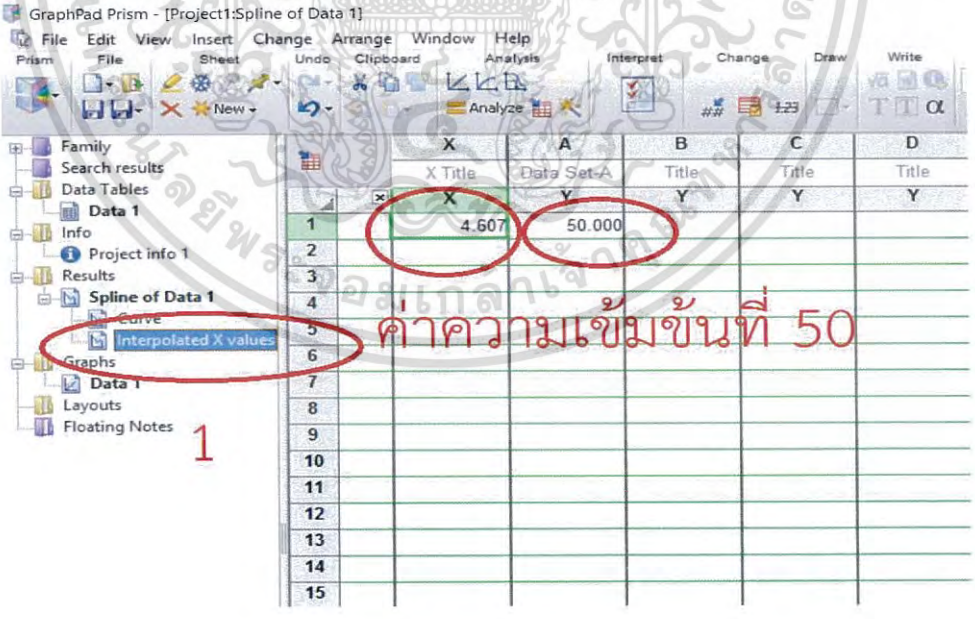


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 จากนั้นใช้เลือก Cubic spline ตามหมายเลข 1 ที่หมายเลข 2 ให้เลือก Number of segment ให้เท่ากับ 1000 และที่หมายเลข 3 เลือก Standard Curve X from Y เลือก OK ที่หมายเลข 4

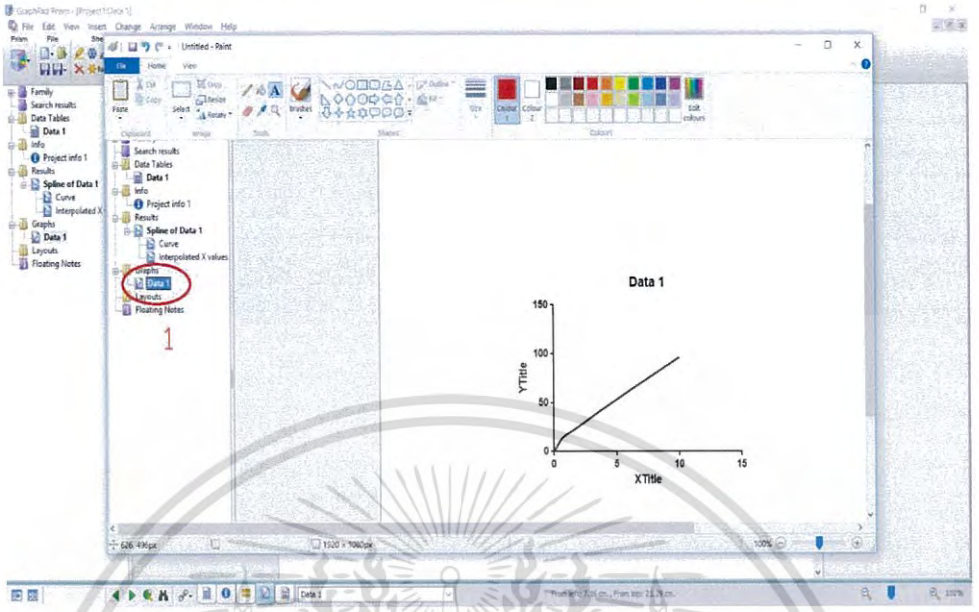


1.6 เลือก Interpolated X values ตามหมายเลข 1 จะปรากฏค่าความเข้มข้นที่เป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50} = 4.607 mg/ml)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

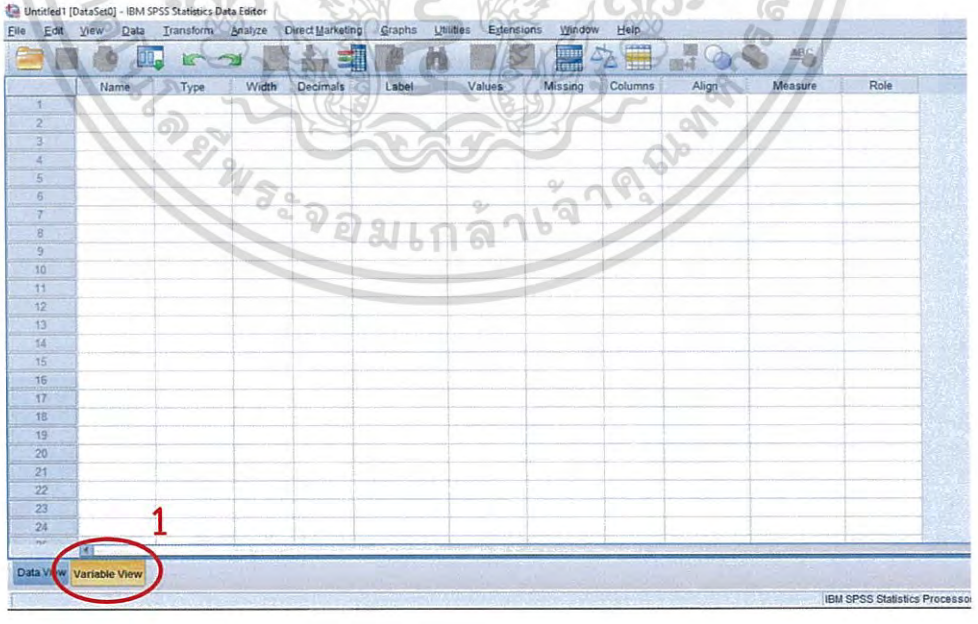
1.7 เลือกหมายเลข 1 จะปรากฏกราฟ สามารถที่จะเลือกปรับสีของเส้นได้ และสามารถลงรายละเอียดชื่อแกน X และ แกน Y ได้



2. วิธีการใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 24

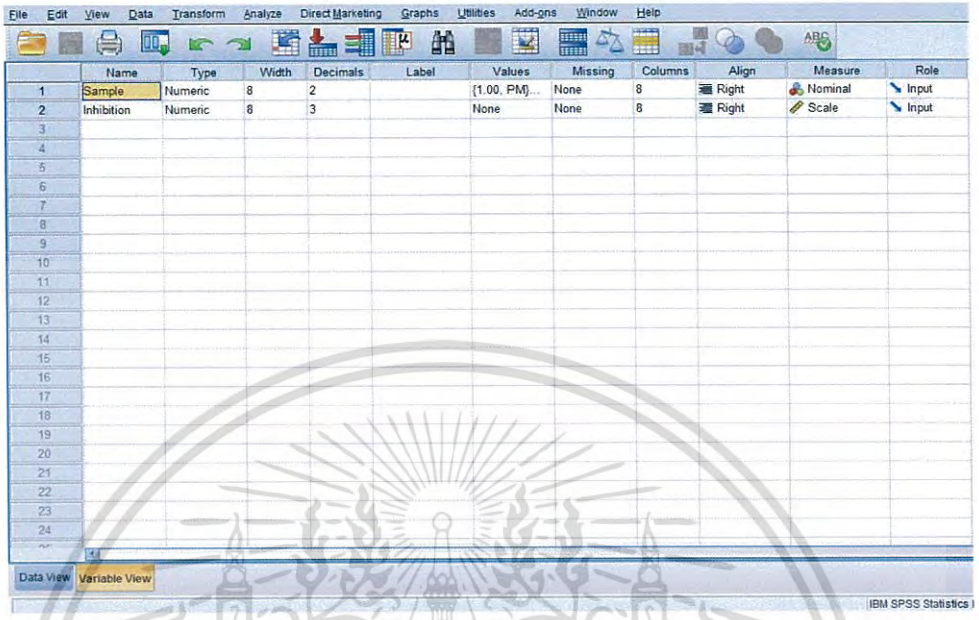
2.1 เมื่อเปิดโปรแกรม SPSS ขึ้นมา จะพบกับTab ด้านล่าง 2 อันคือ Data View และ Variable View

2.2 กดไปที่ Tab ของ Variable View (หมายเลข 1) เป็นหน้าจอเพื่อใช้สร้างหรือแก้ไขตัวแปร

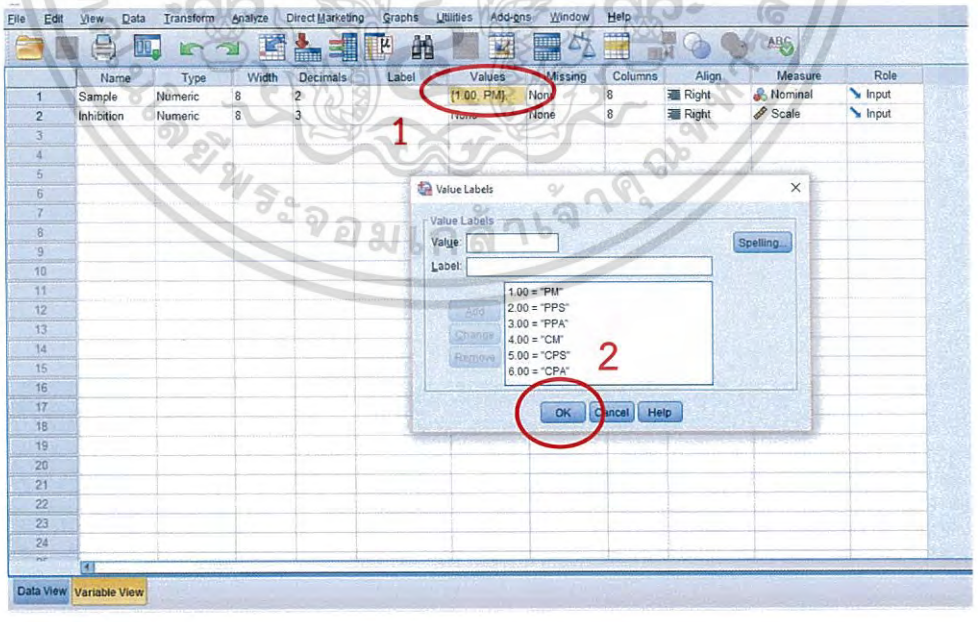


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 โดยในหน้าต่าง Variable View มีไว้เพื่อกำหนดตัวแปรที่เราต้องการศึกษาลงไป ในภาพเป็นตัวอย่างการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดทั้ง 6 ชนิด ว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติหรือไม่

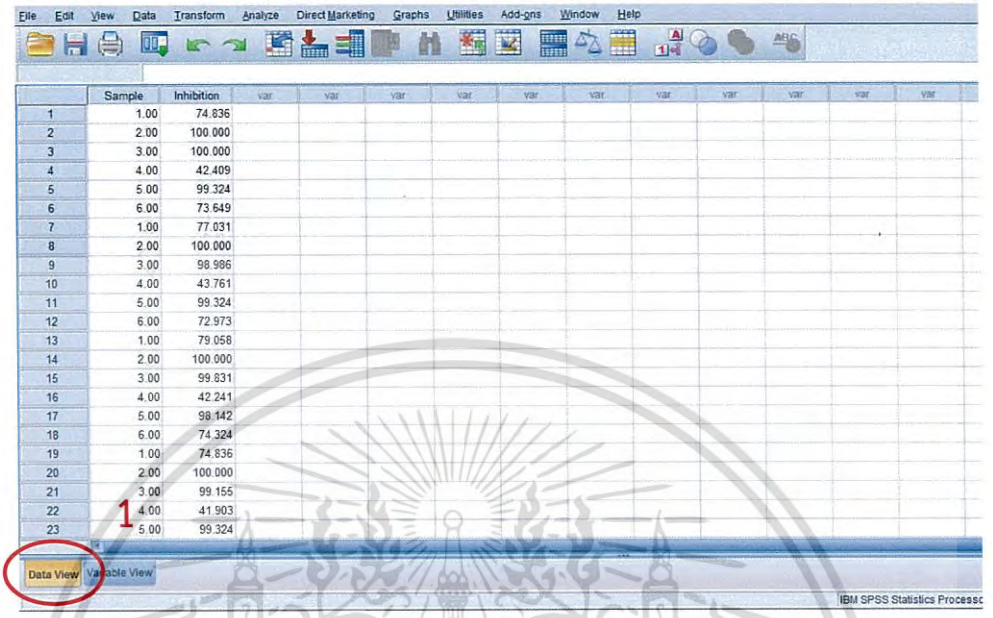


2.4 สามารถกำหนดค่าได้โดยในช่อง Value (ที่หมายเลข 1) อาจกำหนดเป็นหมายเลขเพื่อให้ง่ายต่อการกรอกข้อมูล ส่วนในช่อง Label เพื่ออธิบายว่าหมายเลขที่เรากำหนดในช่อง Value หมายถึงอะไร ในตัวอย่าง “1” หมายถึง สารสกัด PM ทำจนครบสารสกัดทั้ง 6 ชนิด หลังจากนั้นกด OK ที่หมายเลข 2

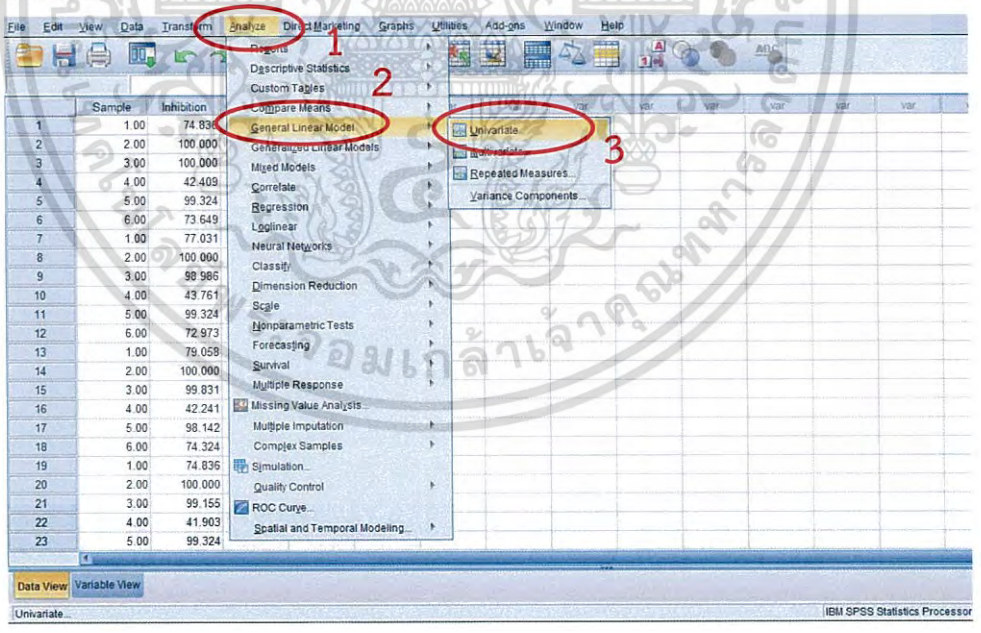


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 หลังจากนั้นเลือก Tab ของ Data View (หมายเลข 1) โดยหน้าต่างนี้ไว้สำหรับกรอกข้อมูลที่ต้องการศึกษาโดยกรอกในแนวตั้ง ดังภาพ เช่น ในช่องที่ 1 Sample “1” หมายถึง สารสกัด PM ส่วนช่อง Inhibition จะกรอกข้อมูลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS

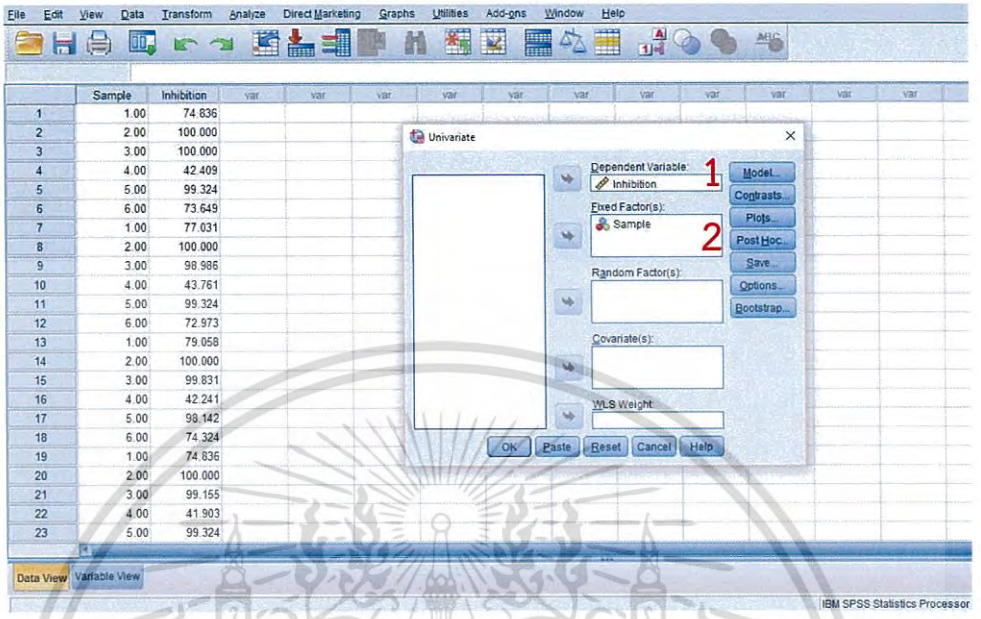


2.6 เมื่อกรอกข้อมูลเรียบร้อยแล้ว ให้เลือกที่แถบเครื่องมือ Analyze (หมายเลข 1) > General Linear Model (หมายเลข 2)> Univariate (หมายเลข 3)

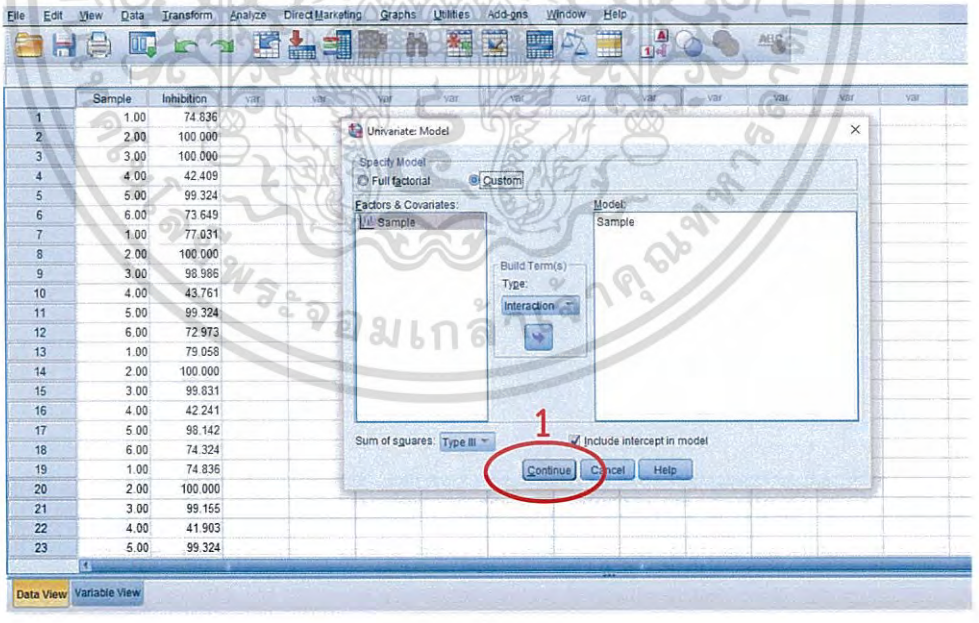


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 หลังจากนั้นจะปรากฏหน้าต่างดังภาพ ในช่อง Dependent Variable (หมายเลข 1) คือช่องของตัวแปรอิสระ ส่วนในช่อง Fixed Factors (หมายเลข 2) คือตัวแปรต้น หรือสิ่งที่เราสนใจจะศึกษา ในที่นี้คือสนใจศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

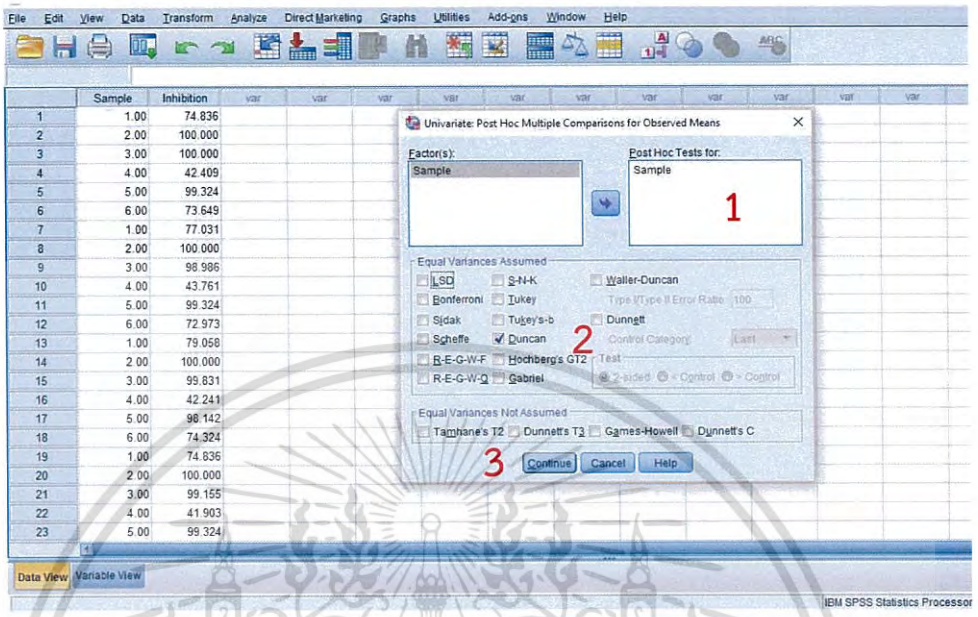


2.8 หลังจากนั้นเลือกคำว่า Model > Custom และทำตามภาพ และกด Continue (หมายเลข 1)

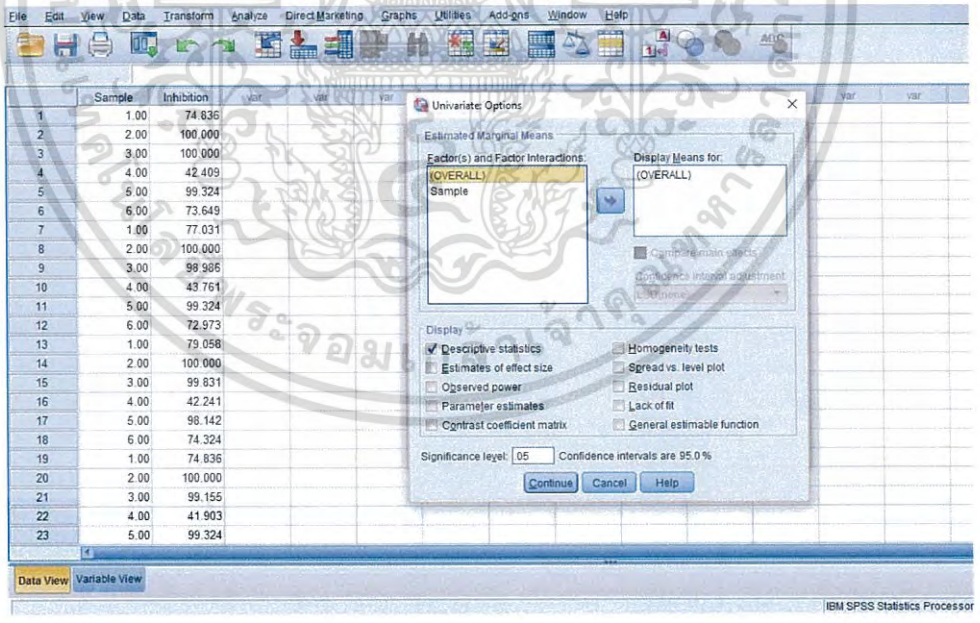


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 กลับมาที่หน้าต่าง Univariate เลือกคำว่า Post Hoc และเลือกตามหมายเลข 1 > หลังจากนั้นเลือกวิธีในการทดลอง ในตัวอย่างเลือก Duncan (หมายเลข 2) และกด Continue (หมายเลข 3)

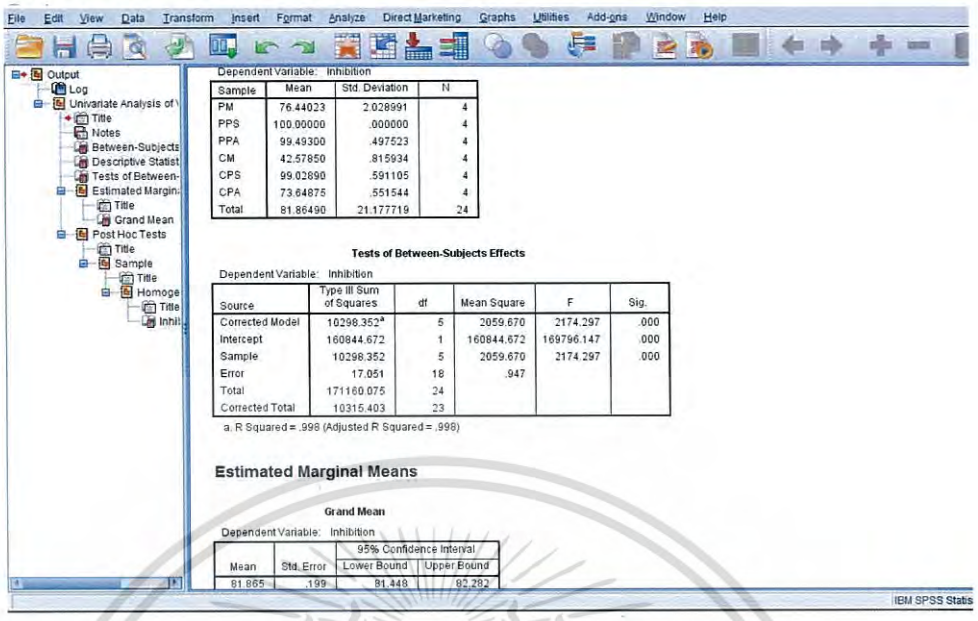


2.10 กลับมาที่หน้าต่าง Univariate เลือก Options และทำตามภาพ หลังจากนั้นกด Continue และกด OK



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 ผลการวิเคราะห์จะแสดงให้เห็นในหน้าต่าง Output



Dependent Variable: Inhibition

Sample	Mean	Std. Deviation	N
PM	76.44023	2.028991	4
PPS	100.00000	.000000	4
PPA	99.49300	.497523	4
CM	42.57850	.815934	4
CPS	99.02890	.591105	4
CPA	73.64875	.551544	4
Total	81.86490	21.177719	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Inhibition

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	10298.352[a]	5	2059.670	2174.297	.000
Intercept	160844.672	1	160844.672	169796.147	.000
Sample	10298.352	5	2059.670	2174.297	.000
Error	17.051	18	.947		
Total	171160.075	24			
Corrected Total	10315.403	23			

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

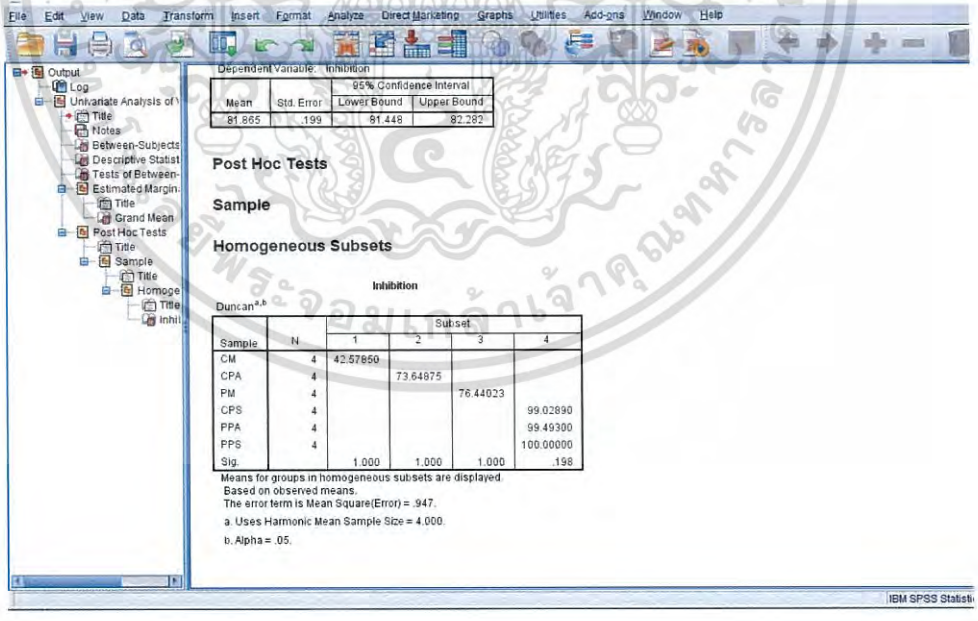
Estimated Marginal Means

Grand Mean

Dependent Variable: Inhibition

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
81.865	.199	81.448	82.282

จากตารางดูตัวแปรที่ทดสอบ ที่ค่า Sig. ถ้ามากกว่า 0.05 แสดงว่าตัวแปรที่ทดสอบนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ถ้า Sig. น้อยกว่า 0.05 แสดงว่าตัวแปรที่ทดสอบมีนั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หากตัวแปรที่ต้องการทดสอบนั้นมีความแตกต่างกันให้มาดูที่ตาราง Post HoC Test



Dependent Variable: Inhibition

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
81.865	.199	81.448	82.282

Post Hoc Tests

Sample

Homogeneous Subsets

Inhibition

Duncan[a,b]

Sample	N	Subset 1	2	3	4
CM	4	42.57850			
CPA	4		73.64875		
PM	4			76.44023	
CPS	4				99.02890
PPA	4				99.49300
PPS	4				100.00000
Sig.		1.000	1.000	1.000	.198

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .947.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12 จากตาราง Duncan จะสามารถกำหนดตัวอักษร a, b,..... ได้ โดยสังเกตค่าที่ดีที่สุด ในที่นี้คือการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระABTS ดังนั้นค่าที่สูงที่สุด ให้เป็น a จากภาพกำหนดได้ดังนี้PPS^{a} PPA^{a} CPS^{a} PM^{b} CPA^{c} และ CM^{d} หมายความว่า PPS, PPA และ CPS มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด และมีค่าไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 รองลงมาคือ PM, CPA และ CM ตามลำดับ

ส่วนที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 รวมทั้งการวิเคราะห์การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ก็ทำเช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนจากเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ เป็นเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ และเปลี่ยนจากสารสกัดเป็นเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆที่ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้