สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของสารสกัดไพลที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (KMITL-HA-E1)

ภัควรัท กุลวานิช
ศิริภรณ์ มธุรส
ณภัสรพี ตันรัตนสกุล

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72599
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550
.b 11764889
.i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cytotoxic Effect of *Zingiber cassumunar* Roxb. Extract on *Helicoverpa armigera* (Hübner) Cell Line (KMITL-HA-E1)

Bhakkawarat Kulwanich

Siriporn Mathuros

Napasrapee Tunruttanasakul

A Special Project Submitted in Partial of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	**ผลของสารสกัดไพลที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (KMITL-HA-E1)**
นักศึกษา	**นางสาวภัควรัท กุลวานิช** **นางสาวศิริภรณ์ มธุรส** **นางสาวณภัสรพี ตันรัตนสกุล**
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. อุ่นเรือน เพชรวัลย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รศ. ดวงใจ โอชัยกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ	ผศ. ดร. อุ่นเรือน เพชรวัลย์	
กรรมการ	รศ. ดวงใจ โอชัยกุล	

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง ผลของสารสกัดไพลที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน KMITL-HA-E1)

นักศึกษา นางสาวภัควรัท กุลวานิช

นางสาวศิริภรณ์ มธุรส

นางสาวณภัสรพี ตันรัตนสกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2549

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. อุ่นเรือน เพชรวาลย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ. ดวงใจ โอชัยกุล

บทคัดย่อ

จุดมุ่งหมายของโครงการวิจัยนี้ เพื่อทำการศึกษาผลของสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (KMITL-HA-E1) โดยวิธีการย้อมสีเซลล์มีชีวิตด้วยนิวทรัลเรด โดยทำการทดสอบเซลล์ HA-E1 ในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (1,000-5,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งกรองผ่านแผ่นกรองขนาดช่องผ่าน 0.22 และ 0.45 ไมโครเมตร หลังจากบ่มเซลล์ HA-E1 ในสารสกัดไพลที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ (1,000-4,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ผลที่ได้คือสารสกัดไพลไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารสกัดไพล

จากการทดสอบเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และทำการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 1,250-5,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลที่ได้คือสารสกัดไพลที่ระดับความเข้มข้น 2,500 3,000 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารสกัดไพล และมีร้อยละของความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 6.40 6.40 12.05 และ 18.64 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Cytotoxic Effect of *Zingiber cassumunar* Roxb.Extract on *Helicoverpa armigera* (Hübner) Cell Line (KMITL-HA-E1)
Name	Miss Bhakkawarat Kulwanich Miss Siriporn Mathuros Miss Napasrepee Thunruttanasakul
Major	Biotechnology
Department	Applied Biology
Academic year	2006
Special Project advisor	Asst. Prof. Dr. Ounruan Petcharawan
Special Project co-advisor	Assoc. Prof. Duangjai O-chaikul

Abstract

The objective of this research project is to investigate the cytotoxic effect of the methanolic extract of plai on *Helicoverpa armigera* (Hübner) cell Line (KMITL-HA-E1) by using the neutral red assay for cell viability. The HA-E1 cells were treated with various concentrations (1,000-5,000 µg/ml) of plai extract which were sterilized by 0.22 and 0.45 µm membrane filters. After 48 h incubation of HA-E1 cell cultured with various concentrations of plai extract (1,000-4,000 µg/ml) which were sterilized by 0.22 µm membrane filters, the results showed that there were not cytotoxic effect in treated cells as compared with untreated cells.

Treatment of cells in plai extract which was filtrated by 0.45 µm membrane filter for 48 h with the concentrations of 1,250-5,000 µg/ml, the results showed that the plai extract at the concentrations of 2,500, 3,000, 4,000 and 5,000 µg/ml exhibited low cytotoxic effect when compared with the untreated cells, and the percentage of cytotoxicity were 6.40, 6.40, 12.05 and 18.64, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสามารถลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น ทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์ เป็นอย่างสูง ที่คอยช่วยเหลือโครงงานพิเศษจนเสร็จสมบูรณ์ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้กรุณาให้ความรู้และให้ความอนุเคราะห์ที่ได้บริจาคสารสกัดไพลในชั้นเมทานอล เพื่อใช้ในการศึกษาโครงงานพิเศษนี้ และผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณ คุณ พยอม เกียรติกำจร และคุณ อนิทัศน์ ทองจันทร์ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับใช้ในการทดลองโครงงานพิเศษครั้งนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ตลอดจนเพื่อนๆทุกคน ที่มีส่วนในการช่วยสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษนี้จนสำเร็จไปได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทที่	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb)	3
2.1.1 คุณลักษณะทางพฤกษศาสตร์และวิทยาศาสตร์	3
2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	4
2.1.3 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยา	4
2.1.4 ถิ่นกำเนิด	4
2.1.5 การศึกษาทางด้านคุณสมบัติทางเคมีของสารสำคัญในไพล	4
2.2 หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน	5
2.2.1 รูปร่างลักษณะ	5
2.2.2 การแพร่กระจายและฤดูกาลระบาด	5
2.2.3 ความสำคัญและลักษณะการทำลาย	7
2.2.4 พืชภัณฑ์และอาหาร	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	2.2.5 ศัตรูธรรมชาติ	8
	2.2.6 การป้องกันกำจัด	8
	2.3 การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของสารสกัดไพลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยใช้วิธีการย้อมสีเซลล์ด้วย Neutral Red	8
	2.3.1 หลักการของวิธี Neutral Red	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย		
	3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย	11
	3.1.1 เซลล์แมลง	11
	3.1.2 สารสกัดไพล	11
	3.1.3 อุปกรณ์	11
	3.1.4 สารเคมี	12
	3.2 สารสกัดไพล	12
	3.3 เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน KMITL-HA-E1 ในที่นี้ใช้อาหาร TNM-FH	12
	3.4 การเพิ่มปริมาณเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ในขวดทดลอง	13
	3.5 ศึกษากราฟการเจริญ(growth curve) ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1	14
	3.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไพลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1	15
	3.6.1 การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้น (preliminary test)	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.6.2 ทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxic test) ของสารสกัดไพล ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยใช้วิธีการ Neutral Red (NR) assay (The National Toxicology Program (NTP) Intergency Center for the Evalution of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), 2003 ; Shirazi และคณะ, 2004)	16
	3.6.2.1 เตรียมเซลล์ปลูกลงใน 96-well plate	16
	3.6.2.2 เตรียมสารละลายไพลความเจือจางเป็น 2 เท่า	16
	3.6.2.3 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	16
	3.6.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล	18
	3.6.2.5 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง		
	4.1 การศึกษากราฟการเจริญ (growth curve) ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1	19
	4.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไพลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1	21
	4.2.1 การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้น (preliminary test)	21
	4.2.2 การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของสารสกัดไพล ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยการย้อมสีด้วย นิวทรัลเรด (Neutral Red (NR) assay)	23
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ		
	5.1 สรุปผลการทดลอง	28
	5.2 ข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง		32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.	34
ภาคผนวก ข.	36
ภาคผนวก ค.	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่4.1 จำนวนเซลล์จากการวัดการเจริญเติบโต (growth curve)	19
ตารางที่4.2 ผลของสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกับร้อยละอัตราการตายของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1	21
ตารางที่4.3 ร้อยละของเซลล์ตาย KMITL-HA-E1เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง	22
ตารางที่4.4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลซึ่งกรองด้วยแผ่นกรองที่มีช่องผ่านขนาด 0.22 ไมโครเมตร	25
ตารางที่4.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลซึ่งกรองด้วยแผ่นกรองที่มีช่องผ่านขนาด 0.45 ไมโครเมตร	27
ตารางผนวก ข-1 ผลอัตราการวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1	36
ตารางผนวก ข-2 ผลอัตราการตายของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์(DMSO) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	37
ตารางผนวก ข-3 ผลอัตราการตายของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อสารสกัดไพลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	39
ตารางผนวก ข-4 ผลการทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการใส่สารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร)	40
ตารางผนวก ข-5 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22ไมโครเมตร)	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ตารางผนวก ข-6	ผลการทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการใส่สารสกัดไพล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร)	41
ตารางผนวก ข-7	ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2 (กระดาษกรองเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 0.22ไมโครเมตร)	41
ตารางผนวก ข-8	ผลการทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการใส่สารสกัดไพล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3(กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร)	42
ตารางผนวก ข-9	ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22ไมโครเมตร)	42
ตารางผนวก ข-10	ผลการทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการใส่สารสกัดไพล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1(กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร)	43
ตารางผนวก ข-11	ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45ไมโครเมตร)	43
ตารางผนวก ข-12	ผลการทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการใส่สารสกัดไพล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร)	44
ตารางผนวก ข-13	ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45ไมโครเมตร)	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ตารางผนวก ข-14 ผลการทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการใส่สารสกัดไพล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร) 45

ตารางผนวก ข-15 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45ไมโครเมตร) 45

ตารางผนวก ข-16 ผลการทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการใส่สารสกัดไพล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร) 46

ตารางผนวก ข-17 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22ไมโครเมตร) 46

ตารางผนวก ข-18 ผลการทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการใส่สารสกัดไพล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร) 47

ตารางผนวก ข-19 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22ไมโครเมตร) 47

ตารางผนวก ข-20 ผลการทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการใส่สารสกัดไพล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร) 48

ตารางผนวก ข-21 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22ไมโครเมตร) 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ตารางผนวก ข-22 ผลการทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการใส่สารสกัดไพล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร) 49

ตารางผนวก ข-23 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45ไมโครเมตร) 49

ตารางผนวก ข-24 ผลการทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการใส่สารสกัดไพล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร) 50

ตารางผนวก ข-25 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45ไมโครเมตร) 50

ตารางผนวก ข-26 ผลการทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการใส่สารสกัดไพล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร) 5I

ตารางผนวก ข-27 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3 (กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45ไมโครเมตร) 51

ตารางผนวก ค-1 ร้อยละของเซลล์ตาย เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ในอาหารที่ผสมสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ 56

ตารางผนวก ค-2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของเซลล์ตาย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสม DMSO ความเข้มข้นต่างๆ 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ตารางผนวก ค-3 แสดงค่า least significant range (LSR) เปรียบเทียบความแตกต่าง ของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test 60

ตารางผนวก ค-4 ร้อยละการตายของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อสารสกัดไพล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ปรับค่าให้ถูกต้อง 61

ตารางผนวก ค-5 ร้อยละของเซลล์ตายเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลที่ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และผลการเปรียบเทียบ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test 64

ตารางผนวก ค-6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆ 66

ตารางผนวก ค-7 แสดงค่า least significant range (LSR) เปรียบเทียบ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test 67

ตารางผนวก ค-8 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร) เวลา 24 ชั่วโมง และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test 69

ตารางผนวก ค-9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยง ในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆ 71

ตารางผนวก ค-10 แสดงค่า least significant range (LSR) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test 73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ตารางผนวก ค-11 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร) เวลา 48 ชั่วโมง และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test 76

ตารางผนวก ค-12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆ 78

ตารางผนวก ค-13 แสดงค่า least significant range (LSR) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test 80

ตารางผนวก ค-14 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร) เวลา 24 ชั่วโมง และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test 83

ตารางผนวก ค-15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆ 85

ตารางผนวก ค-16 แสดงค่า least significant range (LSR) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test 87

ตารางผนวก ค-17 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร) เวลา 48 ชั่วโมง และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test 91

ตารางผนวก ค-18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆ 93

ตารางผนวก ค-19 แสดงค่า least significant range (LSR) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

รูปที่ 2.1 เหง้าไพล 3
รูปที่ 2.2 วัฏจักรของหนอนเจาะสมอฝ้าย 6
รูปที่ 2.3 ไข่ของหนอนเจาะสมอฝ้าย และหนอนเจาะสมอฝ้าย 6
รูปที่ 2.4 ตัวเต็มวัยหนอนเจาะสมอฝ้าย 7
รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะการทำลายรูปแบบต่างๆ 7
รูปที่ 2.6 โครงสร้างโมเลกุลของ Neutral Red 9
รูปที่ 3.1 แผนผังแสดงการใส่สารความเข้มข้นต่างๆใน 96-well plate 17
รูปที่ 4.1 กราฟการเจริญของเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้าย KMITL-HA-E1 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน 20
รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ กับอัตราการตาย ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 23
รูปที่ 4.3 เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ก่อนใส่สารสกัดไพล เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 หลังใส่สารสกัดไพล เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 หลังย้อมด้วยนิวทรัลเรด และ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 หลังสกัดสีย้อมออกด้วยสารละลายผสมระหว่าง เอทานอลและกรดอะซิติก 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์สมุนไพรเป็นที่นิยมเพิ่มมากขึ้นทั้งภายใน และภายนอกประเทศ ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้อยู่ในรูปของยา อาหารเสริม เครื่องสำอาง รวมถึงการใช้เป็นสารควบคุมศัตรูพืช สำหรับประเทศไทยมีการใช้สารสกัดจากพืชหลากหลายชนิดในการควบคุมโรคพืช แมลงศัตรูพืช และวัชพืชในแปลงเพาะปลูกมากขึ้น ทั้งนี้เพราะคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้ใช้ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม พืชที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืช ได้แก่ สะเดา ข่า ตะไคร้หอม และพญายอ เป็นต้น (สุภาณี และคณะ. 2546)

สำหรับโครงงานพิเศษนี้เน้นการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากไพลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน ซึ่งไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) เป็นพืชสมุนไพรที่จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีเหง้าใต้ดิน ส่วนใหญ่ใช้เหง้าสดเป็นยาทาภายนอก ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากไพลใช้เป็นสารไล่ยุงได้ (Dechatiwongse. 1979) (สำอาง. 2541) ทดสอบฤทธิ์ฆ่าหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* F.) ของพืชในวงศ์ Zingiberaceae บางชนิด ได้แก่ กระทือ 2 ใบ (*Amomum sp.*) ไพลดำ (*Zindiber ottensii*) และปุดสิงห์ (*Eletariopsis curtisii*) โดยใช้ลำต้นใต้ดินและก้านมาสกัดด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เมทานอล ผลที่ได้คือ ฤทธิ์จากการกินดีกว่าการสัมผัส และสารสกัดหยาบในส่วนของเหง้าจากต้นกระทือ 2 ใบ ที่สกัดด้วยเฮกเซน มีฤทธิ์ในการฆ่าหนอนกระทู้ผักได้ดีกว่าสารสกัดหยาบในส่วนของก้าน สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดไพลที่มีผลต่อเซลล์สัตว์นั้น พบว่าสารละลายไพลมีผลต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของเม็ดเลือดขาวและเป็นสารที่ก่อให้เกิดการหักของโครโมโซม (จุฑาธิป และคณะ. 2547)

สารสกัดไพลที่ใช้ศึกษาในโครงงานพิเศษนี้ เป็นสารสกัดหยาบ (เชษฐ. 2548) ซึ่งได้ทำการสกัดไว้เพื่อทดสอบผลของสารสกัดไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ส่วนเซลล์ไลน์ของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกันเป็นเซลล์ไลน์ที่สร้างมาจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน *Helicoverpa armigera* (Hübner) และตั้งชื่อไว้ดังนี้ KMITL-HA-E1 (Petcharawan และคณะ. 2005) โดยผลการทดลองที่ได้นี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน KMITL-HA-E1

1.2.2 ศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxic effect) ของสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลต่อเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน KMITL-HA-E1

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1.3.1 สารสกัดหยาบไพลในชั้นเมทานอลที่ใช้ในการทดลอง ได้มาจากสารสกัดของเชษฐ (2548)

1.3.2 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน KMITL-HA-E1

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถทราบถึงความเข้มข้นของสารสกัดหยาบไพลในชั้นเมทานอลที่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน KMITL-HA-E1 ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการผลิตสารชีวภาพเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป

1.4.2 สามารถนำความรู้จากการทดลองระดับเซลล์ไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในแปลงเพาะปลูก

1.4.3 เป็นแนวทางในการควบคุมแมลงศัตรูพืชแบบผสมผสานระหว่างการใช้พืชสมุนไพรกับสารเคมีฆ่าแมลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb)

ต้นไพล เป็นพืชสมุนไพรที่มีชื่อของไทย คนสมัยก่อนนำมาใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านทำการรักษาตามภูมิปัญญาชาวบ้านมานานโดยมีสรรพคุณในการรักษาที่หลากหลาย เช่น ยับยั้งอาการอักเสบของบาดแผล แก้ปวดบวม เป็นต้น

รูปที่ 2.1 เหง้าไพล

ที่มา : (www.tistr.or.th/phama/Zingber%20cassumunar.htm)

2.1.1 คุณลักษณะทางพฤกษศาสตร์และวิทยาศาสตร์

ไพล	(Phlai) , Cassumunar
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Zingiber cassumunar* Roxb
ชื่อสามัญ	ปูลอย ปูเลย (ภาคเหนือ) มิ้นสะล่าง (เงี้ยว แม่ฮ่องสอน) ว่านไฟ ไพล (ภาคกลาง)
ชื่อวงศ์	Zingiberaceae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้ล้มลุกที่มีความสูงอยู่ที่ 0.7–1.5 เมตร มีเหง้าอยู่ใต้ดินเปลือกนอกสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในสีเหลืองแกมเขียว มีกลิ่นเฉพาะค่อนข้างแรง แทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นเป็นกอใบยาว 20-30 เซนติเมตร ความกว้างประมาณ 2-8 เซนติเมตร ใบออกตรงข้ามกัน มีลักษณะยาวเรียว ดอกช่อ แทงจากเหง้าใต้ดิน กลีบดอกสีนวลประดับซ้อนเรียงกันแน่น เจริญงอกงามในฤดูฝน ใบประดับสีม่วง ผลเป็นผลแห้ง รูปกลม ส่วนที่นำไปใช้ประโยชน์คือ เหง้า

2.1.3 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยา

ส่วนที่นำมาใช้เป็นยาคือส่วนหัวหรือเหง้าที่แก่จัดโดยใช้เหง้าสดเป็นยาภายนอก โดยฝนทาแก้เคล็ดยอก ฟกช้ำบวม เส้นตึง เมื่อยขบ เหน็บชา สมานแผล จากการวิจัยพบว่า ในเหง้ามีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีคุณสมบัติลดอาการอักเสบ และบวม จึงมีการผลิตยาขี้ผึ้งผสมน้ำมันไพล เพื่อใช้เป็นยาทาแก้อาการเคล็ดขัดยอก น้ำมันไพลผสมแอลกอฮอล์ สามารถทากันยุงได้ ใช้เหง้ากินเป็นยาขับลม ขับประจำเดือน มีฤทธิ์ระบายอ่อน ๆ แก้บิด สมานลำไส้ นอกจากนี้พบว่าในเหง้ามีสาร 4-(4-hydroxy-1-buteny)veratrole ซึ่งมีฤทธิ์ขยายหลอดลม ได้ทดลองใช้ผงไพลกับผู้ป่วยเด็กที่เป็นหืด สรุปว่าให้ผลดี ทั้งในรายที่มีอาการหอบอืดแบบเฉียบพลัน และเรื้อรัง

2.1.4 ถิ่นกำเนิด

ถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียแถบประเทศอินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทย สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม คือพื้นที่ที่ปลูกควรเป็นดินเหนียวปนทรายที่มีอินทรียวัตถุสูง มีการระบายน้ำดี ปลูกได้ทั้งที่แจ้งและที่ร่ม ไม่ควรปลูกในที่ดินลูกรังหรือมีน้ำขัง แหล่งปลูกที่พบมากในประเทศไทยคือ จังหวัดฉะเชิงเทรา

2.1.5 การศึกษาทางด้านคุณสมบัติทางเคมีของสารสำคัญในไพล

ได้มีการทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญในไพลพบว่าในไพลมีสาระสำคัญหลายตัว ดังนี้

1. sabinene	27-34%
2. γ-Terpinene	6-8%
3. Terpimeme-4-ol	30-35%
4. (E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-butadiene	12-19%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Helicoverpa armigera* (Hübner)

ชื่อวงศ์ Noctuidae

ชื่อลำดับ Lepidoptera

ชื่ออื่นๆ หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนเจาะฝักข้าวโพด หนอนเจาะผลมะเขือเทศ

2.2.1 รูปร่างลักษณะ

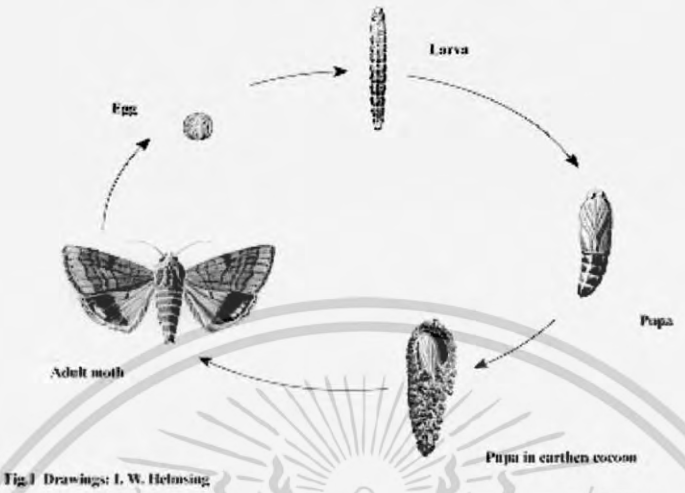
ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นฟองเดี่ยว ๆ ตามส่วนอ่อนของพืช เช่น ใบ ก้านใบ ไข่มีลักษณะกลมคล้ายฝาชี ไข่ที่วางใหม่ๆ มีสีขาวนวลเป็นมัน ระยะไข่ 2-3 วัน จึงฟักออกเป็นตัวหนอน หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน ลำตัวมีขนขึ้นประปราย ลายที่พาดยาวตามลำตัวเห็นได้ชัดเจนมีสีต่าง ๆ จากสีเขียวอ่อนไปจนถึงสีค่อนข้างดำ ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและอายุ และการลอกคราบ ตัวหนอนเมื่อยังเล็กอยู่รวมกัน โตขึ้นจะกัดกินกันเอง อยู่รวมกันไม่ได้ ขนาดโตเต็มที่มีด้วยกันทั้งหมด 5 วัย โดยวัยแรกมีสีขาวนวล เมื่อเข้าสู่วัยสองสีลายของลำตัวเข้มขึ้นเป็นสีน้ำตาลอ่อน มีตุ่มขนสีน้ำตาลเข้มเส้นขนดำ หนอนวัย ที่สามลำตัวมีสี น้ำตาลปนเขียว เมื่อข้าสู่วัยที่สี่ ลำตัวเปลี่ยนเป็นสีดำปนเขียว หนอนวัยที่ห้า ลำตัวเปลี่ยนเป็นสีส้มแก่ หนอนโตเต็มที่มีขนาด 3.5 เซนติเมตร ระยะหนอนประมาณ 16-22 วัน ดักแด้ มีสีน้ำตาลไหม้ ขนาด1.8 เซนติเมตร อายุดักแด้ประมาณ 10-12 วัน จึงออกเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งเป็นผีเสื้อกลางคืน วัดเมื่อกางปีกยาว 3-4 เซนติเมตร

ตัวเมียปีกคู่หน้าสีน้ำตาลปนแดง ส่วนตัวผู้สีน้ำตาลอมเขียว เลยกึ่งกลางปีกคู่หน้าไปทางหน้าเล็กน้อยมีจุดสีน้ำตาลเข้ม ขนาดโตกว่าหัวเข็มหมุดปีกละจุด ถัดจากจุดนี้ไปทางปลายปีกเล็กน้อยมีแถบสีน้ำตาลเข้มพาดตามขวางและมีจุด สีดำเรียงรายตามแถบนี้ ปีกคู่หลังมีแถบสีน้ำตาลที่ปลายปีกพาดต่อกับปีกคู่หน้าสีของปีกคู่หน้าเข้มกว่าปีกคู่หลัง อายุตัวเต็มวัยประมาณ 7-18 วัน รวมวงจรชีวิตประมาณ 29-38 วัน

2.2.2 การแพร่กระจายและฤดูกาลระบาด

หนอนเจาะสมอฝ้ายพบระบาดในแอฟริกา และเอเชีย ในเมืองไทยหนอนชนิดนี้ระบาดรุนแรงทั่วทุกแห่ง เนื่องจากหนอนเจาะสมอฝ้ายมีพืชอาหารมากมายที่เป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจเกือบทุกชนิด ทำให้มีอาหารตลอดปี สามารถแพร่พันธุ์ได้อย่างต่อเนื่องและกว้างขวาง จึงพบการทำลายเสมอในแปลงพืชเศรษฐกิจดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 วัฏจักรของหนอนเจาะสมอฝ้าย

ที่มา : ปิยรัตน์, 2547

รูปที่ 2.3 a. ไข่ของหนอนเจาะสมอฝ้าย b.หนอนเจาะสมอฝ้าย

ที่มา : www.plantpro.doae.go.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.4 ตัวเต็มวัยหนอนเจาะสมอฝ้าย
ที่มา : www.plantpro.doae.go.th

2.2.3 ความสำคัญและลักษณะการทำลาย

หนอนเจาะสมอฝ้ายเป็นแมลงศัตรูสำคัญอีกชนิดหนึ่งในการปลูกผักและเป็นศัตรูที่สำคัญของผักหลายชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ ถั่วฝักยาว กระเจี๊ยบเขียว และหน่อไม้ฝรั่ง เป็นต้น หนอนชนิดนี้เป็นที่รู้จักกันดีในหมู่เกษตรกรผู้ปลูกฝ้ายโดยหนอนเจาะสมอฝ้าย กัดกินใบ ดอก และสมอฝ้ายทุกขนาด ทำให้ดอกร่วง หนอนเจาะฐาน ของสมอเข้าไปกินภายใน ถ่ายมูลไว้บนสมอและริ้วประดับดอก ทำให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรง หนอนชนิดนี้สามารถทำลายพืชผักโดยการกัดกินส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ เจาะกัดกินภายในลำต้น ฝักและหน่อ

รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะการทำลายรูปแบบต่างๆ
ที่มา : www.giswebr12.ldd.go.th

2.2.4 พืชภัณฑ์และอาหาร

หนอนเจาะสมอฝ้าย มีพืชอาหารมากมายทั้งพืชผัก ไม้ผล ไม้ดอกและพืชไร่ ได้แก่ ถั่วลันเตา ถั่วฝักยาว พริก มะเขือเทศ หน่อไม้ฝรั่ง กระเจี๊ยบเขียว ส้มเขียวหวาน มะม่วงหิมพานต์ สตอร์เบอรี่ กุหลาบ เบญจมาศ คาร์เนชั่น เยอบีร่า ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ข้าวโพด ยาสูบ ฝ้าย และปอกระเจา เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 ศัตรูธรรมชาติ

ศัตรูธรรมชาติที่สำคัญที่พบทำลายหนอนเจาะสมอฝ้าย ได้แก่ โรคทำลายแมลง เช่น โรคไวรัส NPV ของหนอนเจาะสมอฝ้าย ซึ่งเป็นไวรัสที่พบระบาดอยู่ตามธรรมชาติในแหล่งที่มีหนอนเจาะสมอฝ้ายระบาด ไวรัสชนิดนี้พบว่ามีประสิทธิภาพสูงมากในการทำลายหนอนเจาะสมอฝ้าย ลักษณะอาการของโรค NPV กับหนอนเจาะสมอฝ้ายจะมีลักษณะอาการทั่วๆ ไปคล้ายกับหนอนกระทู้หอม อาการโรคจะเห็นชัดในวันที่ 3 ภายหลังจากหนอนได้รับเชื้อ

2.2.6 การป้องกันกำจัด

1. เชื้อจุลินทรีย์ ไวรัส NPV ของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตรา 30 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร พ่นทุก 5 วัน เมื่อพบแมลงระบาดในช่วงเวลาเย็นโดยผสมกับสารจับใบเป็นวิธีที่พบว่าให้ผลดีในการป้องกันกำจัด

2. สารฆ่าแมลงประเภทกลุ่มไพรีทรอยด์ อัตรา 20 ซีซี. ต่อน้ำ 20 ลิตร เช่น แลมบ์ดาไซฮาโลทริน(คาราเต้ร้อยละ 2.5 อีซี), ไซเพอร์เมทริน (ริพคอร์ดร้อยละ 25 อีซี), เดลทาเมทริน (เดซิสร้อยละ 2.5 อีซี), ไซฟลูทริ (ไบทรอย์ดร้อยละ 10 อีซี) และไบเฟนทริน (เทลสตาร์ร้อยละ 10 อีซี) หรือ กลุ่มเมทโธมิลร้อยละ 18 แอลซี อัตรา 50 ซีซี. ต่อน้ำ 20 ลิตร หรือสารระงับการลอกคราบคลอฟลูอะซูลอน (อาทาบรอนร้อยละ 5 อีซี) อัตรา 20 ซีซี. ต่อน้ำ 20 ลิตร หรือสารกลุ่มอื่นๆ คือ ไซเพอร์เมทรินต่อฟอสซาโลน(พาร์ซอนร้อยละ 6.25 ต่อ 22.5 อีซี) อย่างใดอย่างหนึ่ง ในระยะที่มี การระบาดสูงควรฉีดพ่นทุก 4 วันครั้งติดต่อกัน 4-5 ครั้ง

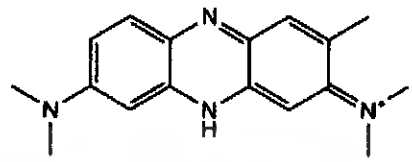
3. กำจัดวัชพืชที่เป็นพืชอาศัยบริเวณรอบแปลงฝ้าย เช่น สาบแร้งสาบกา หญ้าละออง ลำโพง และโทงเทง เป็นต้น

2.3 การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของสารสกัดไพลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยใช้วิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยนิวทรัลเรด

วิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยนิวทรัลเรดเป็นวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษสารพิษที่ใช้กับเซลล์สิ่งมีชีวิต โดยข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประเมินหาความเข้มข้นของสารพิษเริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษา โดยนิวทรัลเรด (3-amino-7-dimethyl-2-methylphenazine hydrochloride) เป็นสีย้อมสีแดงที่ใช้สำหรับย้อมเนื้อเยื่อ และยังสามารถใช้เป็นตัววัดความเป็นกรด-ด่างของสารต่างๆได้ โดยการเปลี่ยนสีของนิวทรัลเรดจากสีแดงเป็นสีเหลือง ซึ่งแสดงค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.8-8.0 สูตรโครงสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของนิวทรัลเรด คือ $C_{15}H_{17}ClN_4$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 288.78 มีจุดหลอมเหลวที่ 290 องศาเซลเซียส ในตัวของนิวทรัลเรดสามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 539-544 นาเมตร



รูปที่ 2.6 โครงสร้างโมเลกุลของนิวทรัลเรด

ที่มา : www.wikipedia.com

วิธีการวิเคราะห์ด้วยนิวทรัลเรดเป็นการตรวจสอบความไวต่อสารเคมีหรือสารพิษของเซลล์ที่มีชีวิต โดยอาศัยความสามารถในการรวมตัวระหว่างเซลล์ที่มีชีวิต หรือเซลล์ที่รอดชีวิตกับนิวทรัลเรด ซึ่ง นิวทรัลเรดเป็นสีย้อมที่มีประจุบวกอย่างอ่อน คือสามารถแตกตัวได้ง่าย ด้วยคุณสมบัตินี้ทำให้ นิวทรัลเรดสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งไม่มีประจุเข้าไปได้ และเกิดการสะสมภายในไลโซโซม (lysosome) เนื่องจากไลโซโซมมีความเป็นกรด-ด่างที่น้อยกว่าในไซโตพลาสซึม ซึ่งในไลโซโซม นิวทรัลเรดจับกับประจุลบที่ไลโซโซม แมทริกซ์ (lysosomal matrix) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าของเซลล์ หรือที่เยื่อหุ้มไลโซโซม ทำให้ไลโซโซมมีความเปราะบาง โดยการเปลี่ยนแปลงของเซลล์นี้เกิดจากผลของการได้รับสารพิษแปลกปลอมที่ใช้ในการศึกษาและการรวมตัวกับนิวทรัลเรด ด้วยเหตุนี้จึงเป็นผลที่ทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่รอดชีวิต กับเซลล์ที่ตายหรือเซลล์ที่เสียหาย เพราะในเซลล์ที่เสียหายหรือตายแล้ว นิวทรัลเรดไม่สามารถเกิดการสะสมในไซโตพลาสมิคแวคคิวโอล (cytoplasmic vacuole) และในเยื่อหุ้มเซลล์ได้ โดยปริมาณสีย้อมที่เกิดขึ้นสามารถวัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่วัดได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

2.3.1 หลักการของวิธีย้อมสีเซลล์ด้วย นิวทรัลเรด

นำเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมาใส่ใน 96-well-microplate ในแต่ละช่องที่มีอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นๆเตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่โดยการเทอาหารเก่าทิ้ง และเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารพิษที่ต้องการทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งการเติมในขั้นนี้จะเติมลงในหลุม 4-8 หลุมต่อหนึ่งความเข้มข้น จากนั้นนำไปบ่มที่สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับเซลล์แต่ละชนิด (โดยทั่วไป 1-6 วัน) เมื่อครบตามเวลาที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำหนดให้เทอาหารเก่าทิ้ง และเติมอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ที่ผสมนิวทรัลเรด แทน นำไปบ่มต่อนานประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นเทนิวทรัลเรดทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1 และฟอร์มอลดีไฮด์ร้อยละ 0.5 อย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นขั้นตอนการล้างและการตรึงเซลล์ จากนั้นทำการสกัดสีย้อมออกจากเซลล์ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วย กรดอะซิติกร้อยละ 1 เอทานอล ร้อยละ 50 และ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที ต่อมานำ 96-well plate วางลงในเครื่อง microtiter plate reader ตั้งโปรแกรมการเขย่าความเร็วรอบ 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ความยาวคลื่นที่ 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

3.1.1 เซลล์แมลง

เซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน KMITL-HA-E1

3.1.2 สารสกัดไพล

สารสกัดไพลในชั้นเมทานอล จากการสกัดของเชษฐ (2548)

3.1.3 อุปกรณ์

3.1.3.1 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (low temperature incubator)

3.1.3.2 ตู้ปลอดเชื้อชนิดเป่าลม (larmina air flow hood)

3.1.3.3 กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เตต (inverted light microscope)

3.1.3.4 กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)

3.1.3.5 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)

3.1.3.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

3.1.3.7 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave)

3.1.3.8 เครื่องอบลมร้อน (hot air oven)

3.1.3.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

3.1.3.10 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 และ - 70 องศาเซลเซียส

3.1.3.11 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.3.12 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.1.3.13 ชุดกรองสารและแผ่นกรองขนาด 0.2 และ0.45 ไมโครเมตร

3.1.3.14 เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (automatic pipettor)

3.1.3.15 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดพลาสติกขนาด 25 ลูกบาศก์เมตร (tissue culture flask)

3.1.3.16 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร

3.1.3.17 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well microplate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3.18 ขวดสำหรับบรรจุสารขนาด 50 100 500 และ1,000 มิลลิลิตร

3.1.3.19 ปิเปตต์แก้วขนาด 1 5 10 และ25 มิลลิลิตร

3.1.3.20 ไมโครไตเตอร์เพลทรีดเดอร์ (microtiter plate reader) และตัวกรอง (filter) 540 นาโน เมตร

3.1.4 สารเคมี

3.1.4.1 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซ (Grace's medium)

3.1.4.2 แลคทาลบูมิน ไฮโดรไลเสท (Lactalbumin hydrolysate)

3.1.4.3 ยีสต์โตเลท (Yeastolate)

3.1.4.4 ซีรัม (Fetal bovine serum ,FBS)

3.1.4.5 พลูโรนิค (Pluronic polyol F-68)

3.1.4.6 ทริปแพน บลู (Trypan blue)

3.1.4.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)

3.1.4.8 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)

3.1.4.9 เอทธานอลร้อยละ 70 และ 95

3.1.4.10 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide,DMSO)

3.1.4.11 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปราศจากแคลเซี่ยมไอออนและแมกนีเซียมไอออน

3.1.4.12 นิวทรัลเรด (neutral red)

3.1.4.13 กรดอะซิติก (acetic acid)

3.2 สารสกัดไพล

สารสกัดไพลในชั้นเมทานอล ที่ได้จากการสกัดของเชษฐ (2548)

3.3 เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน KMITL-HA-E1 ในที่นี้ใช้อาหาร TNM-FH

เตรียมอาหาร TNM-FH โดยใช้อาหารชนิดเกรซ (Grace powder) ละลายในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ใช้แท่งแม่เหล็กกวนจนกระทั่ง Grace powder ละลายจนหมด เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 0.35 กรัมต่อลิตร จากนั้นเติมยีสต์โตเลท 3.33 กรัมต่อลิตร และเติมแลคทาลบูมิน ไฮโดรไลเสท 3.33 กรัมต่อลิตร จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรครบ 1,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร ทำการวัดและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ 1N HCl หรือ 1 N NaOH ให้ได้ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6.0 ต่อจากนั้นทำการกรองด้วยชุดกรอง และใช้แผ่นกรองที่มีช่องผ่านขนาด 0.22 ไมโครเมตร ที่ปลอดเชื้อแล้ว ทำการเตรียมอาหารที่พร้อมเลี้ยงเซลล์โดยการเติมซีรัม (FBS ,fetal bovine serum) ที่ผ่านการกรองแล้ว ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารทั้งหมด และทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างครั้งสุดท้ายโดย 1N HCl หรือ 1 N NaOH ให้ได้ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6.2 นำอาหารที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างแล้วแบ่งเก็บใส่ขวด ทำการเขียนฉลากติดไว้ที่ขวดและทำการเก็บรักษาในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4 การเพิ่มปริมาณเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ในขวดทดลอง

นำเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน HA-E1 ที่เพาะเลี้ยงในขวดพลาสติกขนาด 25 ลูกบาศก์เมตร โดยพิจารณาเซลล์ที่เจริญบนพื้นผิวของขวดให้ได้ประมาณร้อยละ 80–90 ของพื้นผิวทั้งหมดสามารถตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ต เซลล์ที่สมบูรณ์จะมีลักษณะกลมมองเห็นขอบเซลล์และนิวเคลียสชัดเจน นอกจากนี้ต้องไม่ปรากฏแกรนูล (granule) และต้องไม่พบการปนเปื้อน จากนั้นใช้ปิเปตต์ดูดอาหารเดิมออกจากขวดเพาะเลี้ยงทั้งหมด จากนั้นเติมอาหารใหม่ลงไป 5 มิลลิลิตร และใช้ปิเปตต์ดูด และปล่อยอาหารให้กระแทกบริเวณที่มีเซลล์เกาะอยู่ ทำเช่นนี้จนกระทั่งเซลล์หลุดออกจากพื้นผิวทั้งหมด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท แต่ถ้าเซลล์เกาะติดแน่นกับพื้นผิวอาจจะต้องใช้ที่ขูดเซลล์ (rubber policeman) ทำการดูดเซลล์ที่แขวนลอยออกมาปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นแยกสาร (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมทริปแพนบลูร้อยละ 0.25 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันดูดเซลล์ที่ย้อมสีแล้วลงในแอ่ง (chamber) 1แอ่งของ haemacytometer ตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้วจากกล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะสีใสไม่ติดสีฟ้า ส่วนเซลล์ตายจะติดสีฟ้าของทริปแพนบลู ทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตายจากช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ (primary square) ทั้งหมด 5 ช่องใหญ่ และบันทึกจำนวนลงในตารางเพื่อนำไปใช้ในการคำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตรต่อไป เมื่อคำนวณจำนวนเซลล์ทีมีชีวิตต่อมิลลิลิตรได้แล้วจะทำการถ่ายเซลล์ลงในเพาะเลี้ยงขวดใหม่ โดยปลูกเซลล์ที่มีชีวิตจำนวน 2 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรทั้งหมด 5 มิลลิลิตร ต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง นำขวดเพาะเลี้ยงที่ทำการปลูกเซลล์แล้วเก็บไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เซลล์จะเจริญเต็มพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ถ้าเซลล์เจริญไม่เต็มพื้นที่ผิว ต้องทำการเปลี่ยนอาหารใหม่และเก็บไว้ประมาณ 4 วัน จึงสามารถทำการถ่ายเซลล์ (subculture) ต่อไป

การเขียนรายละเอียดบนขวดเพาะเลี้ยง

HA-E1 = *Helicoverpa armigera* cell line number 1

12/01/48 = วันที่ที่ทำการปลูกเซลล์

G = Grace's medium

10% FBS = เติมซีรัม Fetal Bovine Serum ลงในอาหารเพาะเลี้ยงร้อยละ 10

2×10^5 cell/ml,5 ml = จำนวนเซลล์ที่ปลูกตั้งต้นเท่ากับ 200,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และปริมาตรของอาหารทั้งหมดใน 1 flask เท่ากับ 5 มิลลิลิตร

Gr. 1 = กลุ่มที่ 1

3.5 ศึกษากราฟการเจริญ(growth curve) ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1

นำเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน HA-E1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH เสริมด้วย FBS ร้อยละ 10 ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ลูกบาศก์เมตร จากข้อ 3.4 ทำการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เตต สังเกตการณ์เจริญของเซลล์และการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ ใช้ปิเปตต์ดูดอาหารเดิมออกจากขวดเพาะเลี้ยงทั้งหมด จากนั้นเติมอาหารใหม่ลงไป 5 มิลลิลิตร และใช้ที่ขูดเซลล์ขูดให้เซลล์หลุดออกจากพื้นที่ผิวทั้งหมด จากนั้นนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เตต ถ้ายังมีเซลล์เกาะอยู่จำนวนมาก จะต้องทำการขูดเซลล์ต่อไป ดูดเซลล์ที่แขวนลอยออกมาปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นแยกสารขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมทริปแพนบลูปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันดูดเซลล์ที่ย้อมสีแล้วลงในแอ่ง (chamber) 1 แอ่งของฮีมาไซโตมิเตอร์ทั้ง 2 ด้านๆละ 10 ไมโครลิตร ตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้วจากกล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะสีใสไม่ติดสีฟ้า ส่วนเซลล์ตายจะติดสีฟ้าของทริปแพนบลู นับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 5 ช่องใหญ่ต่อ 1 chamber โดยนับทั้ง 2 ด้าน บันทึกจำนวนลงในตารางเพื่อนำไปใช้ในการคำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อไป จากนั้นปลูกเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร จำนวน 30 จานเพาะเลี้ยง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตั้งต้นเท่ากับ 1.8×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรทั้งหมด 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง นำเซลล์ทั้งหมดเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการนับจำนวนเซลล์หลังจากปลูกเซลล์ทุกวันเป็นเวลา 10 วัน โดยนับจำนวน 3 จานเพาะเลี้ยงต่อ 1 วัน วิธีการนับจำนวนเซลล์เริ่มจากดูดอาหารเก่าออกจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จานเพาะเลี้ยงแล้วเติมอาหารใหม่ลงไป 2 มิลลิลิตร จากนั้นขูดเซลล์และนับจำนวนเซลล์ บันทึกจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตายทั้งหมดในแต่ละจานเพาะเลี้ยง นำข้อมูลที่ได้มาแสดงในรูปของกราฟการเจริญของเซลล์ โดยใช้โปรแกรม Mirosoft Excel ทำให้เราทราบช่วงเวลาการเจริญของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 และสามารถคำนวณหาค่าของจำนวนเซลล์ที่เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (population doubling time, PDT) จากสูตรต่อไปนี้

$$PDT = (t-t_0)\ log2 / (logN - log\ N_0)$$

t_0 หมายถึง เวลาเริ่มต้นที่นับเซลล์หรือปลูกเซลล์ (ชั่วโมงหรือวัน)

t หมายถึง เวลาที่เก็บเกี่ยวเซลล์ ช่วงที่เซลล์มีการเจริญสูงสุด (ชั่วโมงหรือวัน)

N_0 หมายถึง จำนวนเซลล์ที่ปลูก (ต่อมิลลิลิตร หรือตารางเซนติเมตร) ณ เวลา t_0

N หมายถึง จำนวนเซลล์ที่เก็บเกี่ยว (ต่อมิลลิลิตร หรือตารางเซนติเมตร) ณ เวลา t

3.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไพลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1

3.6.1 การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้น (preliminary test)

3.6.1.1 เตรียมสารสกัดไพลที่ระดับความเจือจางเป็น 2 เท่าอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ 500 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารละลายของสารสกัดไพลมี DMSO เป็นส่วนผสมน้อยกว่าร้อยละ 1 เพื่อใช้ทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นต่อเซลล์

3.6.1.2 ปลูกเซลล์ HA-E1 ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง ทดลอง 4 ซ้ำทุกความเจือจาง และกลุ่มควบคุม บ่มเซลล์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

3.6.1.3 ดูดอาหารออกจากจานเพาะเลี้ยง แล้วเติมสารละลายไพลแต่ละความเข้มข้นลงในจานเพาะเลี้ยงปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง ส่วนกลุ่มควบคุมเติมอาหารลงไปจานละ 2 มิลลิลิตร บ่มเซลล์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (อายุของเซลล์เท่ากับ 3 วัน)

3.6.1.4 เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการขูดเซลล์แต่ละจานเพาะเลี้ยง เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตาย โดยย้อมด้วยสีทริปแพน บลู และนับโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.1.5 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น โดยบ่มเซลล์ในสารละลายไพลเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

3.6.2 การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของสารสกัดไพลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยการย้อมเซลล์ด้วยนิวทรัลเรด (Neutral Red (NR) assay)

The National Toxicology Program (NTP) Intergency Center for the Evalution of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), 2003 ; Shirazi และคณะ, 2004 ; ANIARA CORPORATION, 2006)

3.6.2.1 เตรียมเซลล์ปลูกลงใน 96-well plate

ปลูกเซลล์ HA-E1 จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร (2×10^4 เซลล์ต่อหลุม) บ่มเซลล์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (2 วัน)

3.6.2.2 เตรียมสารละลายไพลความเข้มข้นต่างๆ

3.6.2.2.1 เตรียมสารสกัดไพลใน DMSO ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.6.2.2.2 ผสมสารละลายไพลลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 10 อัตราส่วน 1 : 100 (ความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 20,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิ ลิตร) กรองสารละลายด้วยแผ่นกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของช่องผ่านขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3.6.2.2.3 เตรียมสารสกัดไพลที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน ดังนี้ 1,000 1,500 2,000 2,500 3,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุมของ 96-well plate

3.6.2.3 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

3.6.2.3.1 นำเซลล์ที่ปลูกไว้ในข้อ 3.6.2.1 มาเติมด้วยสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ ในข้อ 3.6.2.2.3 โดยมีกลุ่มควบคุมที่มีเซลล์เพาะเลี้ยงผสมกับอาหาร (ซีรัมร้อยละ 10) และกลุ่มที่เติมสารละลาย DMSO ร้อยละ 50 ดังแสดงในรูปรายละเอียดการทดลอง ดังรูปที่ 3.1

3.6.2.3.2 นำเซลล์ที่ทดสอบในข้อ 3.6.2.3.1 ไปบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้ว เทอาหารทิ้งด้วยการคว่ำ 96-well plate ลงบนกระดาษซับที่ปลอดเชื้อ ค่อยๆเติมสารละลายนิวทรัลเรดที่ผสมกับอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	N		B	GC				C_4	C_5	C_6	GC	B
C	N		B	GC				C_4	C_5	C_6	GC	B
D	N		B	GC				C_4	C_5	C_6	GC	B
E	N		B	GC				C_4	C_5	C_6	GC	B
F	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
G	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

รูปที่ 3.1 แผนผังแสดงการใส่สารความเข้มข้นต่างๆใน 96-well plate

B : Blank (ไม่เติมสารใดๆ)

N : Culture medium + cells + 50% DMSO (negative control)

NR : containing no cells but treated with NR medium

GC : Culture medium + cells (cell growth control)

C_1-C_6 : Culture medium + cells + different concentrations of Plai extract

(C_1=highest ,C_6=lowest)

(50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเทอาหารทิ้งด้วยการคว่ำ 96-well plate ลงบนกระดาษซับที่ปลอดเชื้อ แล้วทำการล้างสารละลายนิวทรัลเรด ด้วยสารละลายฟอร์มอล แคลเซียม (40% Formal dehyde 10 มิลลิลิตร ผสมกับ 10% Anhydrous calcium chloride 10 มิลลิลิตร และผสมกับน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร (Valdivieso-Garcia *et al.*, 1993) ใส่สารละลายนี้ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม แล้วเททิ้งด้วยการคว่ำ 96-well plate ลงบนกระดาษซับที่ปลอดเชื้อ เติมส่วนผสมของ NR desorb (สารละลายเอทานอลและกรดอะซิติก) (1% glacial acetic acid ใน 50% ethanol) ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม เพื่อสกัดสีออกจากเซลล์ จากนั้นนำ 96-well plate ใส่ในเครื่อง microtiter plate reader ทำการเขย่าเป็นเวลา 10 นาที (กรณีที่เครื่อง microtiter plate reader ไม่มีโปรแกรมการเขย่า สามารถนำ 96-well plate วางบนเครื่องเขย่าแบบ platform นาน 2 ชั่วโมง) จนกระทั่งสีของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

72599

นิวทรัลเรดถูกสกัดออกจากเซลล์ทั้งหมด และสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 540 นาโนเมตร ใช้ค่าของ blank เป็นค่าอ้างอิง

3.6.2.4 การวิเคราะห์ผลของสารสกัดไพลที่มีผลต่อการเจริญต่อเซลล์ไลน์

1. คำนวณหาค่าร้อยละเซลล์มีชีวิต (% cell viability)

$$\text{ร้อยละเซลล์มีชีวิต} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงในสิ่งทดลอง}}{\text{ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

3.6.2.5 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.6.2.5.1 แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD)

แผนการทดลองแบบนี้เป็นแบบที่ง่ายที่สุด ซึ่งใช้ได้ดีเมื่อหน่วยทดลองที่ใช้ในการทดลองมีความสม่ำเสมอกันหรือเหมือนกัน สามารถใช้กับการทดลองที่มีสิ่งทดลองจำนวนมากๆ ได้ และแต่ละสิ่งทดลองไม่จำเป็นต้องใช้จำนวนหน่วยทดลองเท่ากัน หรือจำนวนซ้ำเท่ากัน ทั้งนี้การกำหนดสิ่งทดลองให้แก่หน่วยทดลองไม่มีข้อจำกัดหรือเงื่อนไขใดๆ ในการสุ่มทั้งสิ้น จึงเรียกว่าเป็นการสุ่มแบบสมบูรณ์ และความน่าจะเป็นในการที่หน่วยทดลองได้รับสิ่งทดลองใดๆ ซึ่งวิธีแสดงดังในภาคผนวก ค.

3.6.2.5.2 วิธีเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่างด้วยพิสัยดันแคน (Duncan's New Multiple Range Procedure)

วิธีการของดันแคนวิธีนี้ เป็นวิธีการเปรียบเทียบเชิงซ้อน ที่มีวิธีการทดสอบคล้ายๆ กับวิธีการของ SNK แต่ต่างกันที่ค่าพิสัยของวิธีการนี้จะได้มาจากตารางของดันแคน ไม่ได้นำมาจากตาราง Upper Studentized Range จึงทำให้ได้ค่านัยสำคัญที่ไม่เหมือนกันแต่ยังคำนึงถึงช่วงห่าง (Steps) เหมือนกัน ซึ่งสูตรของดันแคนแทนค่าพิสัยจากตารางดันแคนเป็น q^* ซึ่งขั้นตอนการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของดันแคนมีขั้นตอนการทดสอบดังแสดงในภาคผนวก ค.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

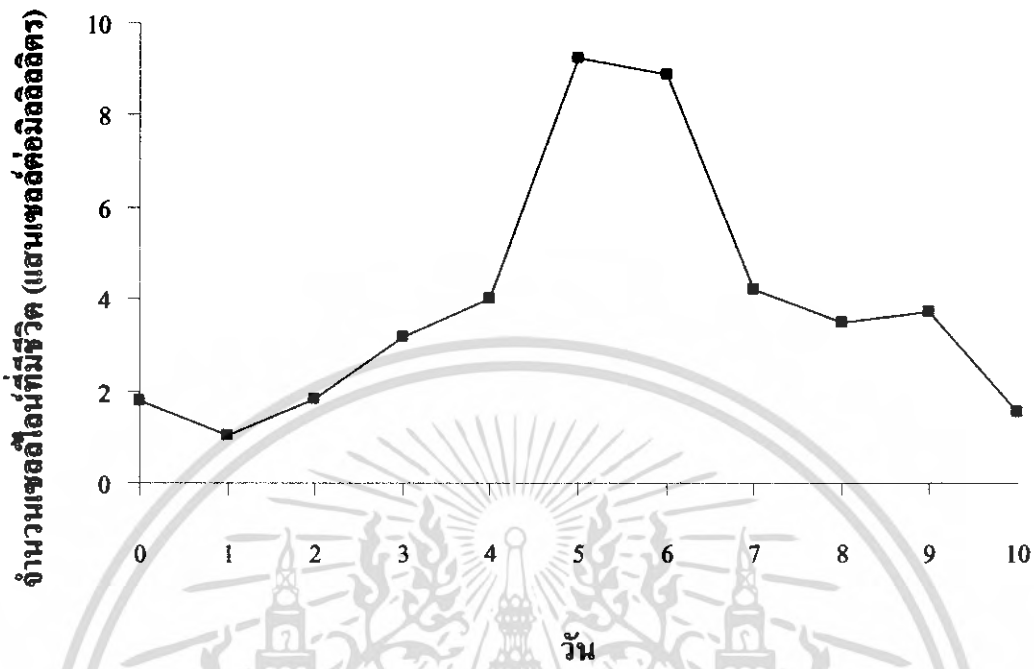
4.1 การศึกษากราฟการเจริญ (growth curve) ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1

พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 157 ด้วยอาหาร TNM-FH เสริมด้วยซีรัมร้อยละ 10 โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.8×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ซึ่งใช้ปริมาตรเซลล์แขวนลอยเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน โดยทำการนับจำนวนเซลล์ทุกวัน วันละ 3 ซ้ำ โดยใช้สีย้อมทริปแพนบลูแสดงดังตารางภาคผนวกที่ ข-1 และตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนเซลล์ไลน์ HA-E1 ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ในแต่ละวันตั้งแต่วันที่เริ่มปลูกเซลล์จนกระทั่งถึงวันที่ 10

วันที่นับจำนวนเซลล์	จำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตร (x 10^5)			ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตร (แสนเซลล์)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
0	1.800	1.800	1.800	1.800
1	1.200	1.100	0.775	1.025
2	2.675	2.025	0.800	1.833
3	2.775	3.700	3.100	3.192
4	3.925	4.225	3.900	4.017
5	8.275	5.900	13.575	9.250
6	8.825	9.575	8.275	8.892
7	5.900	0.975	5.750	4.208
8	3.050	4.550	2.850	3.483
9	3.425	2.300	8.600	4.775
10	1.575	1.475	1.600	1.550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 กราฟการเจริญของเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน KMITL-HA-E1 passage ที่ 157 ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะ เวลา 10 วัน

จากตารางที่ 4.1 สามารถคำนวณหาค่าจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (population doubling time, PDT) จากสูตรต่อไปนี้ (Mitsuhashi, 2002)

$$PDT = (t-t_0)\ \log 2 / (\log N - \log N_0)$$

โดย t_0 = วันที่ 0

t = วันที่ 5 (120 ชั่วโมง)

N_0 = 1.8×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ($\log N_0 = 5.255$)

N = 9.25×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ($\log N = 5.966$)

แทนค่า PDT = $(5-0)\times 0.301 / (5.966-5.255)$

= 2.117 วัน หรือ 50.736 ชั่วโมงต่อการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า

แสดงว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 157 มีจำนวนเซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 2.117 วัน หรือประมาณ 2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไพลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1

4.2.1 การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้น (preliminary test)

4.2.1.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการเจริญของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1

พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ด้วยอาหารที่เติมสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2.0×10^{5} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ซึ่งใช้ปริมาตรเซลล์แขวนลอยเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยใช้สีย้อมทริปแพนบลู ผลแสดงดังตารางภาคผนวกที่ ข-2 และตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลของสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกับร้อยละอัตราการตายของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1

ร้อยละความเข้มข้นของDMSO	ร้อยละอัตราการตาย		ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	
0	25.44	25.50	25.47[b]
1	26.24	24.11	25.18[b]
2	28.73	23.40	26.07[b]
3	35.37	36.67	36.02[a]
5	35.02	33.45	34.24[a]

แสดงว่าในการใช้สารไดเมทิลซัลฟอกไซด์เป็นตัวทำละลายสารสกัดไพล เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 นั้น ความเข้มข้นสุดท้ายของสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ในอาหารที่ใช้ทดสอบไม่ควรมีความเข้มข้นเกินร้อยละ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการเจริญของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยการย้อมสีทริปแพนบลู

พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 157 ด้วยอาหารที่เติมสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2.00×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ซึ่งใช้ปริมาตรเซลล์แขวนลอยเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ต่อมาทำการเติมสารสกัดไพลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และทำการเพาะเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยใช้สีย้อมทริปแพนบลู ผลแสดงดังตารางภาคผนวกที่ ข-2 และตารางที่ 4.3

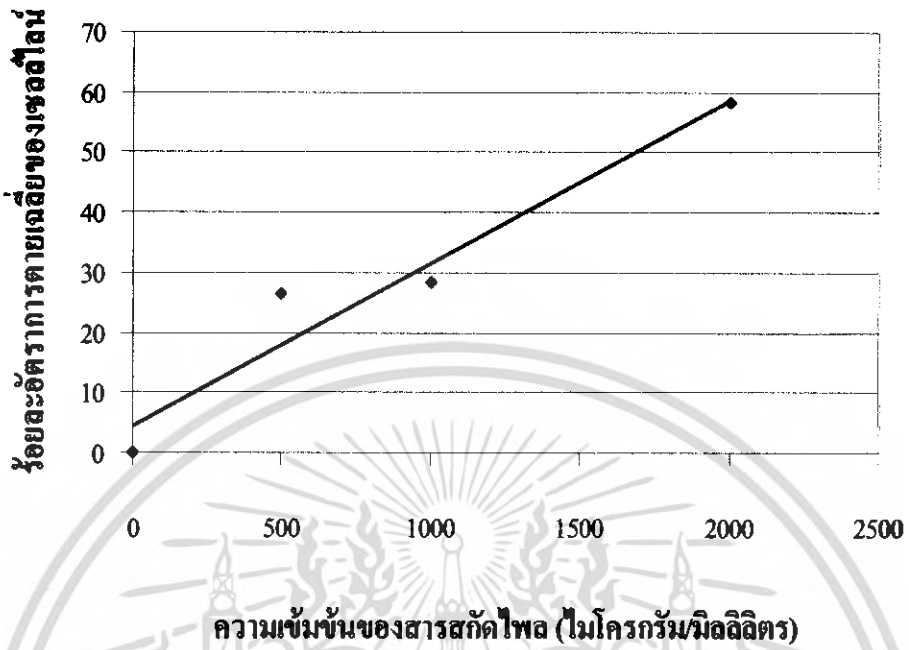
ตารางที่ 4.3 ร้อยละของเซลล์ตาย (% cell mortality) KMITL-HA-E1 passage ที่ 157 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดไพล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละของเซลล์ตาย			ผลรวม	ค่าเฉลี่ย[1]
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
กลุ่มควบคุม	0	0	0	0	0^a
500	16.96	28.24	28.47	73.67	24.56^b
1000	29.07	15.94	40.51	85.52	28.50^b
2000	41.15	51.42	82.66	175.23	58.41^b
				334.42	111.47

[1] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

โดยจากการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ตายนั้นสามารถนำมาประเมินค่าความเป็นพิษร้อยละ 50 ของสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลได้ โดยความเข้มข้นของสารสกัดไพลควรอยู่ในช่วง 1,000-2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปควรเตรียมสารสกัดไพลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆให้ครอบคลุมกับความเข้มข้นที่กล่าวมาด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆกับอัตราการตาย ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1

4.2.2 การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของสารสกัดไพลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยการย้อมสีด้วยนิวทรัลเรด (Neutral Red (NR) assay)

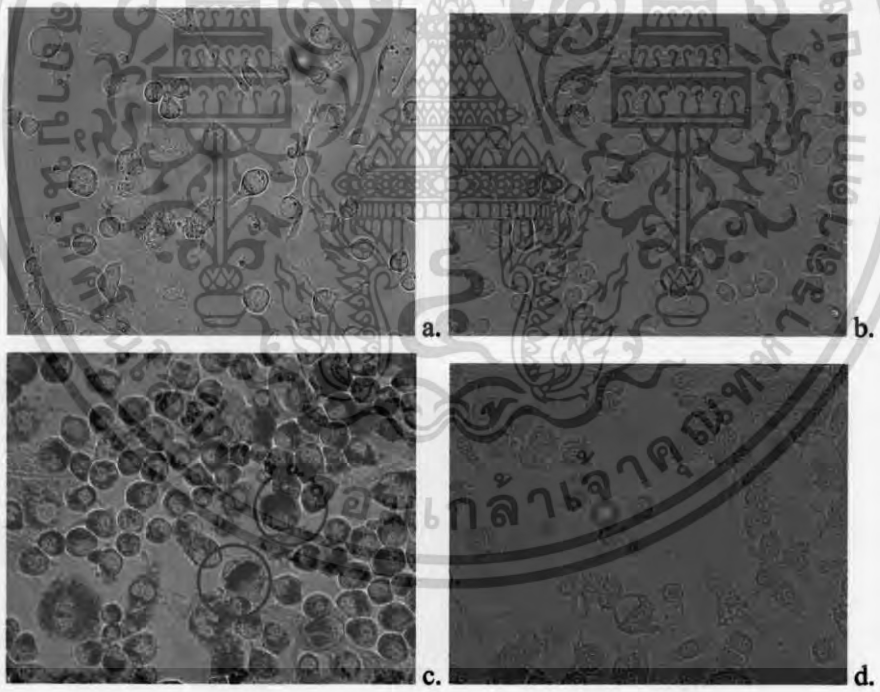
(The National Toxicology Program (NTP) Intergency Center for the Evalution of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), 2003 ; Shirazi และคณะ, 2004 ; ANIARA CORPORATION, 2006)

จากการศึกษาผลของสารสกัดไพลที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พบว่าหลังจากการเลี้ยงเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ใน 96-well plate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ และกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดไพล) ลงไป แล้วทำการบ่มต่อเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้อมสีด้วยนิวทรัลเรด และทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ต่อมาทำการล้างและตรึงด้วยสารละลายฟอร์มอล-แคลเซียม ต่อมาทำการสกัดสีนิวทรัลเรดด้วย NR desorb แล้วนำไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และนำผลที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตและร้อยละความเป็นพิษของสารสกัดไพล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2.1 การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่ทำการกรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยการย้อมเซลล์ด้วยนิวทรัล เรด (Neutral Red (NR) assay)

โดยเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ได้รับสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดไพลที่กรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 1,500 2,000 2,500 3,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 พบว่าสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1,000 1,500 2,000 2,500 3,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งจากกลุ่มควบคุม โดยสารสกัดไพลทุกความเข้มข้นมีร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นสารสกัดไพลในทุกความเข้มข้นไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 แสดงดังภาคผนวก ค. และตารางที่ 4.4



รูปที่ 4.3 a. เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ก่อนใส่สารสกัดไพล b. เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 หลังใส่สารสกัดไพล c. เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 หลังย้อมด้วยนิวทรัลเรด (วงกลมสีน้ำเงินคือเซลล์มีชีวิตที่ติดสีนิวทรัลเรด และวงกลมสีเขียวคือเซลล์ตายที่ไม่ติดสีนิวทรัลเรด) d. เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 หลังสกัดสีย้อมออกด้วยสารละลายผสมระหว่างเอทานอลและกรดอะซิติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ได้รับสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลได้รับสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดไพลที่กรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 1,500 2,000 2,500 3,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ 99 พบว่าสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1,000 1,500 2,000 2,500 3,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ดังนั้นสารสกัดไพลทุกความเข้มข้นไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 แสดงดังภาคผนวก ค.

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลซึ่งกรองด้วยแผ่นกรองที่มีช่องผ่านขนาด 0.22 ไมโครเมตร โดยเพาะเลี้ยงนาน 24 และ 48 ชั่วโมง และย้อมเซลล์ด้วยสีนิวทรัลเรด

ความเข้มข้นของสารสกัดไพล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0	100.80[b]	100.05[a]
1,000	126.83[a]	126.34[a]
1,500	122.88[a]	125.57[a]
2,000	128.30[a]	118.04[a]
2,500	128.26[a]	122.36[a]
3,000	126.25[a]	123.77[a]
4,000	126.84[a]	123.11[a]
50% DMSO	21.70[c]	14.56[b]

[1] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2.2 การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่ทำการกรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยการย้อมเซลล์ด้วยนิวทรัล เรด (Neutral Red (NR) assay)

เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ได้รับสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลได้รับสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดไพลที่กรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตรที่ระดับความเข้มข้น 1,250 1,500 2,000 2,500 3,000 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ 99 พบว่าสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1,250 1,500 2,000 2,500 3,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดไพลที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 แสดงดังภาคผนวก ค. และตารางที่ 4.5

เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ได้รับสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลได้รับสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดไพลที่กรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตรที่ระดับความเข้มข้น 1,250 1,500 2,000 2,500 3,000 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 2,500 3,000 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 กับค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในสารสกัดไพลที่มีความเข้มข้น 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าสารสกัดไพลที่ระดับความเข้มข้น 2,500 3,000 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำลายเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ได้แสดงดังภาคผนวก ค. โดยมีความเป็นพิษร้อยละ 6.40 6.40 12.05 และ 18.64 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลซึ่งกรองด้วยแผ่นกรองที่มีช่องผ่านขนาด 0.45 ไมโครเมตร โดยเพาะเลี้ยงนาน 24 และ 48 ชั่วโมง และย้อมเซลล์ด้วยสีนิวทรัลเรด

ความเข้มข้นของสารสกัดไพล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0	99.99[ab]	99.99[a]
1,250	108.18[a]	98.68[a]
2,000	101.45[a]	97.63[ab]
2,500	101.89[a]	93.97[b]
3,000	95.08[abc]	93.91[b]
4,000	85.33[c]	87.77[c]
5,000	86.89[bc]	81.45[d]
1.65% DMSO	104.38[a]	99.58[a]
50% DMSO	12.21[d]	21.61[e]

[1] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยการปลูกเซลล์ที่ 1.8 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากปลูกเซลล์เป็นเวลา 5 วัน พบว่า เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด คือ 9.250 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และจำนวนเซลล์มีความคงที่จนถึงวันที่ 7 และเซลล์เริ่มมีการเจริญลดลงในวันที่ 8 และเมื่อคำนวณหาค่า PDT (อัตราการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า) ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ได้เท่ากับ 2.117 day/doubling นั่นคือเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าต้องใช้เวลาประมาณ 2 วัน ดังนั้นในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไพลที่มีต่อเซลล์ควรจะทำการปลูกเซลล์เป็นเวลา 2 คืน (48 ชั่วโมง) ก่อน ที่จะทำการเติมสารสกัดไพลลงไป เพื่อให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้เต็มที่

ในการทดลองเพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไพลที่มีต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ทำการละลายสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลโดยใช้ตัวทำละลาย DMSO เป็นตัวทำละลาย แต่เนื่องจากตัวทำละลาย DMSO มีผลในการทำลายเซลล์ได้ ดังนั้นจึงต้องทำการหาความเข้มข้นของ DMSO ที่ไม่ส่งผลในการทำลายเซลล์ จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 2 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ไม่มีตัวทำละลาย DMSO แต่เมื่อใช้ตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 5 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ไม่มีตัวทำละลาย DMSO ดังนั้นความเข้มข้นของ DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 2 ไม่ส่งผลในการทำลายเซลล์ จึงใช้ตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้นไม่เกินร้อยละ 2 ในการละลายสารสกัดไพลเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไพลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตรการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1

จากการศึกษาผลของสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์เบื้องต้น (Preliminary) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้สารสกัดไพลที่ระดับความเข้มข้นที่ 500 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 24.56 28.50 และ 58.41 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของสารสกัดไพลที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นต่างๆจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของดันแคนในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไพลเบื้องต้นพบว่า ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยของ growth control มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในสารสกัดไพลที่มีความเข้มข้น 500 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 กับค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในสารสกัดไพลที่มีความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ตายจากการทดลองขั้นต้น ทำให้สามารถประมาณค่า เฉลี่ยร้อยละ 50 ของเซลล์ตายควรอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรดังนั้นในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไพลโดยใช้วิธี การย้อมสีนิวทรัลเรด ควรเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดไพลที่ครอบคลุมส่วนนี้ด้วย

จากการศึกษาผลของสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์โดยการย้อมเซลล์ด้วยนิวทรัลเรด เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดไพลที่กรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 1,500 2,000 2,500 3,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าหลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1,000 1,500 2,000 2,500 3,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 126.83 122.88 128.30 128.26 126.25 และ 126.84 ตามลำดับ ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างจาก growth control และ 50% DMSO จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตในสารสกัดไพลทุกความเข้มข้นมีค่าสูงกว่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่พบในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ใส่สารสกัดไพล แสดงว่าสารสกัดไพลในทุกความเข้มข้นไม่มีฤทธิ์ในการทำ ลายเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดไพลที่กรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก growth control แต่แตกต่างย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับ 50% DMSO โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์มีชีวิตเท่ากับ 126.34 125.57 118.04 122.36 123.77 และ 123.11 ตามลำดับ เห็นได้ว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารสกัดไพล ค่าร้อยละของเซลล์ที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวิตมีค่าสูงกว่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพลทั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เนื่องจากในสารสกัดไพลมีสารประกอบที่ชื่อ beta sitosterol ซึ่งเป็นคลอเรสเตอรอลในพืช ช่วยควบคุมการผ่านเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โดยถ้ามีสารนี้ในปริมาณน้อยจะช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์ จึงทำให้ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลมีค่าสูงกว่า growth control ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารสกัดไพลที่ทำการกรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตรทำให้สารสกัดไพลบางส่วนที่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ที่ไม่สามารถละลายในตัวทำละลาย DMSO และมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 0.22 ไมโครเมตร ทำให้อนุภาคของสารติดอยู่กับตะกอนบนกระดาษกรอง จึงทำให้สารสกัดไพลที่กรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตรไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แต่คาดว่าสารสกัดไพลที่ทำการกรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตรมีสาร beta sitosterol บางส่วนผ่านกระดาษกรองออกมาได้ จึงทำให้ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลมีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพียงอย่างเดียว

จากการศึกษาผลของสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์โดยการย้อมเซลล์ด้วยนิวทรัลเรด เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดไพลที่กรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 1,250 2,000 2,500 3,000 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าหลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์มีชีวิดสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1,250 2,000 2,500 3,000 4,000 และ 5,000ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 108.18 101.45 101.89 95.08 85.33 และ 86.89 ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าสารสกัดไพลที่มีความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์มีชีวิตของ growth control แสดงว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 เมื่อคำนวณค่าความเป็นพิษพบว่ามีความเป็นพิษร้อยละ 14.62 และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์มีชีวิตมีค่าเท่ากับ 98.68 97.63 93.97 93.91 87.77 และ 81.45 ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดไพลที่ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 2,500 3,000 4,000 และ 5,000ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก growth control แสดงว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดไพลที่ความเข้มข้น 2,500 3,000 4,000 และ 5,000ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สารสกัดไพลที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยมีความเป็นพิษร้อยละ 6.40 6.40 12.05 และ 18.64 ตามลำดับ

ดังนั้นถ้าทำการกรองสารสกัดไพลโดยใช้กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.22 ไมโครเมตร อาจทำให้สารบางส่วนในสารสกัดไพลที่ไม่ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 0.22 ไมโครเมตรไม่สามารถผ่านกระดาษกรอง จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ติดอยู่บนกระดาษกรอง ส่งผลให้สารสกัดไพลที่กรองด้วยกระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.22 ไมโครเมตรไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ ส่วนสารสกัดไพลที่ทำการกรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร ทำให้สารสกัดไพลที่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์สามารถผ่านรูของกระดาษกรองออกมาได้ จึงส่งผลให้สารสกัดไพลที่กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ได้หลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์เพิ่มมากขึ้นที่เวลา 48 ชั่วโมง

จึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดไพลในชั้นเมทานอลแปรผกผันกับอัตราการเจริญของเซลล์นั่นคือ ถ้าใช้สารสกัดไพลที่มีความเข้มข้นสูงๆ ทำให้ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตลดลง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นสูงๆเป็นเวลานานมากขึ้นจะส่งผลให้ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตลดลงมากขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การสกัดผลของสารสกัดไพลที่มีต่อการเจริญของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ควรทำการทดลองโดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดไพลให้มากขึ้น

2. ควรเพิ่มเวลาในการศึกษาผลของสารสกัดไพลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1

3. ควรทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารสกัดไพลก่อนนำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ในสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จุฑาธิป เขียววงษ์จันทร์ ชนิดา สุ่มมาตย์ และนิศาชล เศรษฐไกลกุล. 2547. ผลของสารสกัดไพลต่อเซลล์เม็ดเลือดคนในหลอดทดลอง. วิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เชษฐ รัตนาจารย์. 2548. ผลของสารสกัดไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข. 2547. http://www.sut.ac.th/e-texts/Agri/Insectfinal2/Insects%20web/chapter5_cabbage4.htm

สิทธิชัย เจริญเศรษศิลป์ . 2546. การวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง หน้า 28-63.

สุชาดา เสกสรร และวิริยะ. 2545. http://www.oaep.go.th/agri/Insect%20Group/projectus/life_cotton.htm

สุภานี พิมพ์สมาน วิไลลักษณ์ ชินะจิตร ฉันทนา อารมณ์ดี สาธร พรตระกูลพิพัฒน์ จริยา หาญวจนวงศ์ พัชรีวัลย์ ปั้นเหน่งเพ็ชร และพิสมัย เหล่าภัทรเกษม. 2546. การศึกษาศักยภาพของพญายอเพื่อประโยชน์ทางเกษตรและคลินิก. *เอกสารประกอบการสัมมนา การเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพร* ระหว่างวันที่ 31 กรกฎาคม-1 สิงหาคม 2546 : สำนักงานคณะกรรมการแห่งชาติ

สุรพล อุปดิสสกุล. 2528. สถิติ การวางแผนการทดลอง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำอาง เนาวนิช. 2541. องค์ประกอบทางเคมีของคำม่อนหลวง *Gardenia sootepensis* และฤทธิ์ฆ่าหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* Fabr. ของพืชวงศ์ Zingiberaceae บางชนิด. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ (เคมีศึกษา) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ศิริภา วงศ์รุ่งโรจน์. 2534. ผลทางไซโตเจนิติกของไพลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ANIARA CORPORATION. 2006. IN CYTOTOX-NR Neutral Red KIT. Lysosomal activity and Membrane integrity.

Dechatiwongse,T. 1979. Preparation of Plai ointment (*Zinggiber cassumunar* Roxb.) as a mosquito repellent. *Bulletin of Department of Medical Science.*21(3), P.187-192.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Petcharawan,O., Chareonsak, S. and Bellonick, S. 2005. Establishment and characterization of cell line from embryonic tissue of the American cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae). In : Qian, Y. and Ziniu, Y. (eds) *Study on Plant Pest and Diseases Biological Control andBio-technology.* Heli ongjiang Science and Technology Press. Harbin.

Shirazi, F.H., Ahmadi, N. and Kamalinejad, M. 2004. Evalution of northen Iran *Mentha pulegium* L. cytotoxicity. *DARU* 12(3), P.106-110.

The National Toxicology Program (NTP) Interagrncy Center for the Evalution of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). 2003. Test Method Protocol for the BALB/c3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test. A Test for basal Cytotoxicity for an *In Vitro* Validation Study Phase III. Based on Standard Operation Procedure Recommendation from an International Workshop Organized by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) : National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS).

Undeen, A.H. and Vavra, J. 1997. Research methods for entomopathogenic protozoa. *In* Biological Techniques. Manual of Techniques in Insect Pathology (ed. L.A. Lacy), pp 116-151. Academic Press, New York.

http://www.giswebr12.ldd.go.th/knowledge/agrilib/plant/tomato/pto42.htm

http://www.plantpro.doae.go.th/plantclinic/clinic/plant/asparagus/enas1.html

http://www.mv.pi.csiro.au/insects.htm?page=H.%20armigera%20lifecycle

http://www.virusrama.org/Tissue%20Culture/Tissue%20culture.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

1. การเตรียมสารละลาย

1. Neutral Red (NR) Stock Solution

0.4 กรัม	NR Dye
100 มิลลิลิตร	น้ำกลั่น

ควรเตรียมก่อนใช้และเก็บในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง สามารถเก็บได้มากกว่า 2 เดือน และควรกรองตะกอนหรือผลึกก่อนนำมาผสมกับอาหาร

2. Neutral Red (NR) Medium

1 มิลลิลิตร	NR Stock Solution
79 มิลลิลิตร	TNM-FH Medium ที่เติมซีรัมร้อยละ 5

ถ้ามีผลึกต้องปั่นแยกที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3. Wash/Fix Solution

<u>สูตรที่ 1</u>

0.5%	Formaldehyde
1.0%	Calcium Chloride
98.5%	น้ำกลั่น

<u>สูตรที่ 2</u>

10 มิลลิลิตร	Formaldehyde ร้อยละ 40
10 มิลลิลิตร	Anhydrous Calcium Chloride
80 มิลลิลิตร	น้ำกลั่น

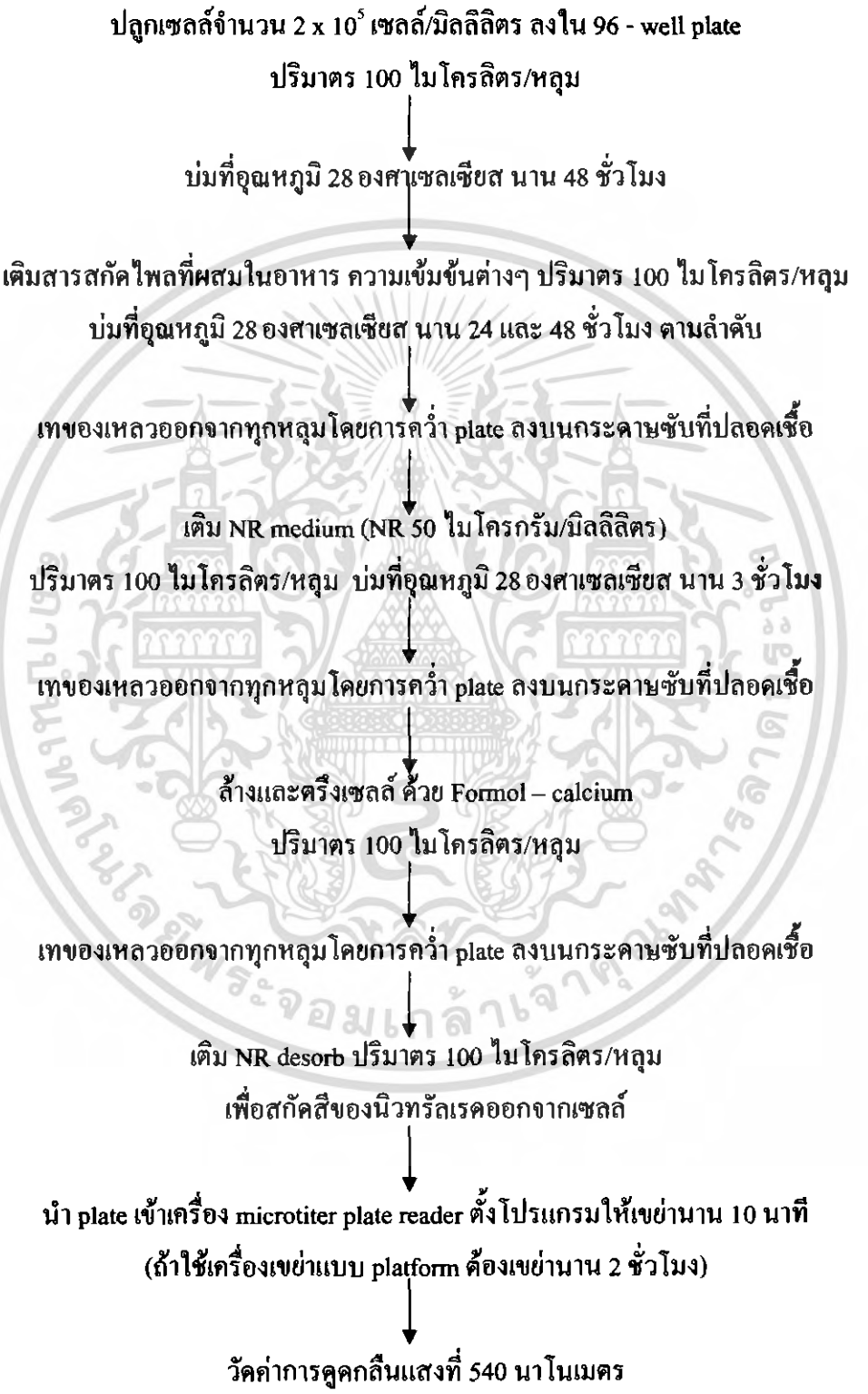
4. NR Desorb (Ethanol/Acetic acid solution)

1%	Glacial acetic acid solution
50%	Ethanol
49%	น้ำกลั่น

ในกรณีที่มี Absolute Ethanol ใช้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับ Glacial acetic acid 1 มิลลิลิตร และผสมกับน้ำกลั่น 49 มิลลิลิตร <u>ควรเตรียมทันทีก่อนใช้งาน อย่าเตรียมล่วงหน้านานเกิน 1 ชั่วโมง</u>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ขั้นตอนการย้อมสีนิวทรัลเรด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

ข้อมูลดิบ

ตารางผนวก ข-1 ผลอัตราการวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 157ซึ่งในการนับ 1 ครั้ง นับทั้งหมด 5 ช่องใหญ่ของฮีมาไซโตมิเตอร์

วันที่	ซ้ำที่	ผลรวมของเซลล์		จำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตร	ค่าเฉลี่ยของเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตร
		เซลล์มีชีวิต	เซลล์ตาย		
1	1	48	8	1.20×10^5	1.025×10^5
	2	44	16	1.10×10^5	
	3	31	11	0.775×10^5	
2	1	107	34	2.675×10^5	1.830×10^5
	2	81	21	2.025×10^5	
	3	32	11	0.80×10^4	
3	1	111	39	2.775×10^5	3.192×10^5
	2	148	49	3.70×10^5	
	3	124	42	3.10×10^5	
4	1	157	77	3.93×10^5	4.017×10^5
	2	169	44	4.22×10^5	
	3	156	61	3.90×10^5	
5	1	331	78	8.275×10^5	9.25×10^5
	2	236	30	5.90×10^5	
	3	543	104	13.575×10^5	
6	1	353	68	8.83×10^5	8.89×10^5
	2	383	64	9.52×10^5	
	3	331	66	8.28×10^5	
7	1	236	43	5.90×10^5	4.208×10^5
	2	39	13	9.75×10^5	
	3	230	69	5.75×10^5	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข-1 (ต่อ) ผลอัตราการวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1

วันที่	ซ้ำที่	ชนิดของเซลล์		จำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตร	ค่าเฉลี่ยของเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตร
		เซลล์มีชีวิต	เซลล์ตาย		
8	1	122	36	3.05×10^5	3.483×10^5
	2	182	77	4.55×10^5	
	3	114	39	2.85×10^5	
9	1	137	49	3.425×10^5	4.775×10^5
	2	92	32	2.30×10^5	
	3	344	75	8.60×10^5	
10	1	63	30	1.575×10^5	1.55×10^5
	2	59	36	1.48×10^5	
	3	64	31	1.60×10^5	

ตารางผนวก ข-2 ผลอัตราการตายของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ DMSO (%)	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2	
	เซลล์มีชีวิต	เซลล์ตาย	เซลล์มีชีวิต	เซลล์ตาย
Control (0%)	26	2	26	9
	23	12	30	7
	27	10	24	10
	26	11	23	6
	24	8	25	12
1%	28	7	20	8
	21	2	19	4
	17	10	25	5
	18	8	26	10
	20	10	17	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข-2 (ต่อ) ผลอัตราการตายของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

2%	18	1	26	5
	16	5	22	10
	14	7	20	8
	17	7	23	7
	10	10	17	3
3%	33	22	22	13
	26	20	37	20
	35	17	35	17
	37	14	30	16
	28	14	28	24
5%	53	15	42	16
	44	21	29	21
	23	17	46	19
	30	23	34	24
	30	21	40	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข-3 ผลอัตราการตายของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อสารสกัดไพลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารสกัดไพล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	เซลล์มีชีวิต	เซลล์ตาย	เซลล์มีชีวิต	เซลล์ตาย	เซลล์มีชีวิต	เซลล์ตาย
Control	21	3	28	3	44	4
	17	3	34	4	44	4
	17	4	16	5	34	4
	26	0	26	3	32	6
	19	3	37	3	28	5
500	10	3	13	6	14	9
	10	6	12	5	13	9
	13	6	15	4	16	4
	15	4	9	3	15	10
	13	3	15	4	12	8
1,000	7	8	11	11	13	13
	12	7	19	4	16	14
	16	4	8	5	15	12
	9	7	8	5	10	10
	15	9	12	4	13	11
2,000	19	10	9	12	7	12
	19	15	10	16	3	16
	14	14	5	17	2	20
	10	14	8	11	1	25
	13	16	1	11	3	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 กับสารสกัดไพลที่กรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ตารางผนวก ข-4 ผลการทดสอบ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 166 (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่สารสกัดไพลหลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1

50%	สารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
DMSO	0	0	0	4,000	3,000	2,500	2,000	1,500	1,000	0
0.091	0.276	0.281	0.282	0.334	0.31	0.324	0.320	0.323	0.366	0.298
0.100	0.273	0.267	0.280	0.329	0.319	0.315	0.328	0.327	0.322	0.268
0.105	0.289	0.261	0.266	0.318	0.304	0.339	0.333	0.294	0.306	0.257
0.099	0.273	0.241	0.293	0.310	0.322	0.293	0.331	0.316	0.337	0.258

ค่า blank เฉลี่ย = 0.047

ค่า GC เฉลี่ย = 0.226

ตารางผนวก ข-5 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1

50%	ร้อยละการมีชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
DMSO	0	0	0	4,000	3,000	2,500	2,000	1,500	1,000	0
19.47	101.33	103.54	103.98	126.99	116.37	122.57	120.80	122.12	141.15	111.06
23.45	100.00	97.35	103.10	124.78	120.35	118.58	124.34	123.89	121.68	97.79
25.66	107.08	94.69	96.90	119.91	113.72	129.20	126.55	109.29	114.60	92.92
23.01	100.00	85.84	108.85	116.37	121.68	108.85	125.66	119.03	128.32	93.36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข-6 ผลการทดสอบ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 166 (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่สารสกัดไพลหลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2

50%	สารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
DMSO	0	0	0	4,000	3,000	2,500	2,000	1,500	I,000	0
0.086	0.241	0.234	0.245	0.304	0.311	0.315	0.325	0.257	0.277	0.269
0.076	0.242	0.254	0.261	0.311	0.334	0.308	0.354	0.307	0.329	0.269
0.076	0.276	0.248	0.257	0.319	0.29	0.315	0.335	0.303	0.316	0.269
0.076	0.227	0.244	0.241	0.284	0.328	0.305	0.272	0.288	0.317	0.25

ค่า blank เฉลี่ย = 0.048

ค่า GC เฉลี่ย = 0.204

ตารางผนวก ข-7 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2

50%	ร้อยละการมีชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
DMSO	0	0	0	4,000	3,000	2,500	2,000	1,500	1,000	0
18.35	94.61	91.18	96.57	125.9	128.92	130.88	135.78	102.45	112.25	108.33
13.73	95.10	100.98	104.41	128.92	140.20	127.45	150.00	126.96	137.75	108.33
13.73	111.76	98.04	102.45	132.84	118.63	130.88	140.69	125.00	131.37	108.33
13.73	87.75	96.08	94.61	115.69	137.25	125.98	109.80	117.65	131.86	99.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข-8 ผลการทดสอบ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 167 (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่สารสกัดไพลหลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3

50%	สารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
DMSO	0	4,000	3,000	2,500	2,000	1,500	1,000	0
0.103	0.352	0.443	0.428	0.511	0.463	0.449	0.450	0.343
0.128	0.354	0.418	0.463	0.441	0.391	0.460	0.456	0.362
0.136	0.374	0.446	0.444	0.440	0.437	0.469	0.412	0.344
0.123	0.328	0.485	0.417	0.441	0.425	0.405	0.389	0.336

ค่า blank เฉลี่ย = 0.047

ค่า GC เฉลี่ย = 0.302

ตารางผนวก ข-9 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3

50%	ร้อยละการมีชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
DMSO	0	4,000	3,000	2,500	2,000	1,500	1,000	0
27.48	100.99	131.13	126.16	153.64	137.75	133.11	133.44	98.01
26.82	122.85	122.85	137.75	130.46	113.91	136.75	135.43	104.30
29.47	108.28	132.12	131.46	130.13	129.14	139.74	120.86	98.34
25.17	93.05	145.03	122.52	130.46	125.17	118.54	113.25	95.70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข-10 ผลการทดสอบ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 166 (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่สารสกัดไพลหลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1

50%	สารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
DMSO	0	0	0	4,000	3,000	2,500	2,000	1,500	1,000	0
0.11	0.674	0.589	0.544	0.626	0.645	0.628	0.621	0.598	0.567	0.6
0.099	0.67	0.613	0.585	0.665	0.663	0.615	0.624	0.64	0.592	0.53
0.104	0.695	0.634	0.639	0.653	0.634	0.664	0.648	0.631	0.612	0.593
0.087	0.652	0.606	0.609	0.657	0.621	0.64	0.628	0.636	0.651	0.511

ค่า blank เฉลี่ย = 0.047

ค่า GC เฉลี่ย = 0.562

ตารางผนวก ข-11 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1

50%	ร้อยละการมีชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
DMSO	0	0	0	4,000	3,000	2,500	2,000	1,500	1,000	0
11.21	111.57	96.44	88.43	103.02	106.41	103.38	102.14	98.04	92.53	98.40
9.25	110.85	100.71	95.73	109.96	109.61	101.07	102.67	105.52	96.97	85.94
10.14	115.30	104.45	105.34	107.83	104.45	109.79	106.94	103.91	100.53	97.15
7.12	107.65	99.47	100.00	108.54	102.14	105.52	103.38	104.80	107.47	82.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข-12 ผลการทดสอบ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 166 (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่สารสกัดไพลหลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2

50%	สารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
DMSO	0	0	0	4,000	3,000	2,500	2,000	1,500	1,000	0
0.104	0.623	0.613	0.547	0.657	0.588	0.600	0.587	0.656	0.666	0.576
0.125	0.516	0.629	0.585	0.588	0.600	0.605	0.550	0.654	0.610	0.521
0.107	0.537	0.555	0.539	0.549	0.521	0.626	0.594	0.583	0.613	0.489
0.103	0.526	0.572	0.546	0.550	0.585	0.547	0.624	0.595	0.600	0.541

ค่า blank เฉลี่ย = 0.046

ค่า GC เฉลี่ย = 0.511

ตารางผนวก ข-13 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2

50%	ร้อยละการมีชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
DMSO	0	0	0	4,000	3,000	2,500	2,000	1,500	1,000	0
11.35	112.91	110.96	98.04	119.57	106.07	108.41	105.87	119.37	121.33	103.72
15.46	91.98	114.09	105.48	106.07	108.41	109.39	98.63	118.98	110.37	92.95
11.94	96.09	99.61	96.48	98.43	92.95	113.50	107.24	105.09	110.96	86.69
11.15	93.93	102.94	97.85	98.63	105.48	98.04	113.11	107.44	108.41	96.87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข-14 ผลการทดสอบ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 166 (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่สารสกัดไพลหลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3

50%	สารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
DMSO	0	4,000	3,000	2,500	2,000	1,500	1,000	0
0.109	0.384	0.502	0.512	0.509	0.349	0.511	0.524	0.337
0.105	0.345	0.485	0.513	0.502	0.465	0.499	0.518	0.317
0.115	0.354	0.501	0.509	0.493	0.500	0.518	0.558	0.223
0.100	0.338	0.480	0.504	0.447	0.515	0.493	0.489	0.349

ค่า blank เฉลี่ย = 0.045

ค่า GC เฉลี่ย = 0.286

ตารางผนวก ข-15 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3

50%	ร้อยละการมีชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
DMSO	0	4,000	3,000	2,500	2,000	1,500	1,000	0
22.38	118.53	159.79	163.29	162.24	106.29	162.94	167.48	102.10
20.98	104.89	153.85	163.64	159.79	146.85	158.74	165.38	95.10
24.48	108.04	159.44	162.24	156.64	159.09	165.38	179.37	63.29
19.23	102.45	152.10	160.49	140.56	164.34	156.64	155.24	106.29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 กับสารสกัดไพลที่กรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมโครเมตร

ตารางผนวก ข-16 ผลการทดสอบ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 167 (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่สารสกัดไพลหลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1

1.65%	50%	สารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
DMSO	DMSO	5,000	4,000	3,000	2,500	2,000	1,250	0	0
0.580	0.148	0.529	0.557	0.624	0.695	0.559	0.802	0.571	0.621
0.672	0.119	0.561	0.699	0.509	0.746	0.657	0.702	0.626	0.845
0.828	0.139	0.509	0.705	0.665	0.807	0.645	0.762	0.619	0.806
0.715	0.117	0.608	0.509	0.490	0.808	0.713	0.861	0.655	0.816
0.747*	0.588*	0.681*	0.658*	0.676*	0.829*	0.784*	0.834*	0.744	0.717
0.625*	0.707*	0.671*	0.863*	0.565*	0.832*	0.772*	0.627*	0.652	0.753

หมายเหตุ * คือข้อมูลของ growth control

ค่า blank เฉลี่ย = 0.046

ค่า GC เฉลี่ย = 0.665

ตารางผนวก ข-17 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1

1.65%	50%	ร้อยละการมีชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
DMSO	DMSO	5,000	4,000	3,000	2,500	2,000	1,250	0	0
80.30	15.34	72.63	76.84	86.92	97.59	77.14	150.37	78.95	86.47
94.13	10.98	77.44	98.19	69.62	105.26	98.80	98.65	87.22	121.98
117.59	13.98	69.62	99.10	91.58	114.44	90.07	107.67	86.16	106.16
100.60	10.68	84.51	69.62	66.77	114.59	100.30	122.56	91.58	115.79
105.41*	81.50*	95.49*	92.03*	94.74*	117.74*	110.98*	118.50*	104.96	100.90
87.07*	99.40*	93.98*	122.86*	91.73*	118.19*	109.17*	87.37*	91.13	106.31

หมายเหตุ * คือข้อมูลของ growth control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข-18 ผลการทดสอบ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 167 (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่สารสกัดไพลหลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2

1.65%	50%	สารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
DMSO	DMSO	5,000	4,000	3,000	2,500	2,000	1,250	0	0
0.629	0.118	0.529	0.498	0.620	0.556	0.624	0.617	0.584	0.559
0.596	0.110	0.485	0.457	0.508	0.559	0.592	0.587	0.621	0.574
0.608	0.098	0.416	0.517	0.553	0.542	0.603	0.554	0.625	0.571
0.587	0.093	0.539	0.422	0.580	0.529	0.588	0.557	0.629	0.551
0.534*	0.578*	0.623*	0.589*	0.563*	0.586*	0.496*	0.511*	0.634	0.561
0.532*	0.571*	0.574*	0.582*	0.572*	0.538*	0.355*	0.531*	0.638	0.461

หมายเหตุ * คือข้อมูลของ growth control

ค่า blank เฉลี่ย = 0.048

ค่า GC เฉลี่ย = 0.511

ตารางผนวก ข-19 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2

1.65%	50%	ร้อยละการมีชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
DMSO	DMSO	5,000	4,000	3,000	2,500	2,000	1,250	0	0
113.70	13.70	94.13	88.06	111.94	99.41	112.72	111.35	104.89	100.00
107.24	107.24	85.52	80.04	90.02	100.00	106.46	105.48	112.13	102.93
109.59	109.59	72.01	91.78	98.87	96.67	108.61	99.02	112.91	91.17
105.48	105.48	96.09	73.19	104.11	94.13	105.67	99.61	113.70	107.82
90.52*	90.61*	103.72*	112.52*	105.87*	100.78*	105.28*	87.67*	114.68	100.39
94.52*	94.52*	102.35*	102.93*	104.50*	102.54*	95.89*	56.16*	115.46	80.82

หมายเหตุ * คือข้อมูลของ growth control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข-20 ผลการทดสอบ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 167 (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่สารสกัดไพลหลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3

1.65%	50%	สารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)							
DMSO	DMSO	5,000	4,000	3,000	2,500	2,000	1,250	0	0
0.508	0.113	0.504	0.426	0.566	0.527	0.576	0.591	0.569	0.483
0.562	0.103	0.552	0.452	0.564	0.556	0.639	0.528	0.623	0.439
0.606	0.100	0.555	0.487	0.594	0.507	0.493	0.573	0.594	0.513
0.591	0.118	0.491	0.523	0.522	0.560	0.562	0.652	0.629	0.446
0.537*	0.589*	0.588*	0.524*	0.566*	0.525*	0.521*	0.459*	0.652	0.470
0.531*	0.520*	0.508*	0.549*	0.521*	0.388*	0.576*	0.509*	0.595	0.524

หมายเหตุ * คือข้อมูลของ growth control

ค่า blank เฉลี่ย = 0.047

ค่า GC เฉลี่ย = 0.487

ตารางผนวก ข-21 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3

1.65%	50%	ร้อยละการมีชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
DMSO	DMSO	5,000	4,000	3,000	2,500	2,000	1,250	0	0
95.71	13.47	93.26	77.35	117.55	97.96	107.96	111.02	106.53	88.97
105.10	11.43	103.06	82.65	105.92	103.88	120.82	98.16	117.55	80.00
114.08	10.82	103.67	89.79	15.51	93.88	91.02	107.35	111.63	98.77
111.02	14.69	90.61	97.14	96.94	14.69	105.10	123.47	118.77	81.42
100.20*	110.61*	110.61*	106.94*	105.92*	97.55*	96.73*	84.08*	123.47	86.32*
98.98*	96.53*	94.08*	112.04*	96.73*	69.73*	107.96*	94.29*	111.84	97.34*

หมายเหตุ * คือข้อมูลของ growth control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข-22 ผลการทดสอบ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 167 (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่สารสกัดไพลหลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1

1.65%	50%	สารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
DMSO	DMSO	5,000	4,000	3,000	2,500	2,000	1,250	0	0
0.585	0.163	0.493	0.512	0.570	0.570	0.553	0.571	0.676	0.632
0.553	0.148	0.476	0.512	0.531	0.528	0.562	0.587	0.632	0.530
0.568	0.142	0.509	0.520	0.561	0.537	0.553	0.577	0.620	0.564
0.652	0.142	0.536	0.519	0.571	0.478	0.583	0.561	0.639	0.530
0.532*	0.608*	0.590*	0.573*	0.631*	0.590*	0.572*	0.557*	0.672	0.590
0.555*	0.602*	0.566*	0.623*	0.588*	0.580*	0.580*	0.576*	0.615	0.520

หมายเหตุ * คือข้อมูลของ growth control

ค่า blank เฉลี่ย = 0.046

ค่า GC เฉลี่ย = 0.549

ตารางผนวก ข-23 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1

1.65%	50%	ร้อยละการมีชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
DMSO	DMSO	5,000	4,000	3,000	2,500	2,000	1,250	0	0
98.17	21.31	81.42	84.88	95.44	95.44	92.34	95.62	114.7	106.73
92.34	26.95	78.83	84.88	88.34	87.79	93.98	98.54	106.7	96.53
95.08	25.86	84.33	86.33	93.80	89.43	92.34	96.72	104.5	102.73
110.38	17.48	89.25	94.35	95.62	78.68	97.81	93.72	108.01	88.16
88.52*	102.36*	99.63*	95.99*	106.55*	99.08*	95.81*	96.72*	114.02	99.08
92.71*	101.27*	94.71*	105.10*	98.72*	97.26*	97.26*	96.53*	103.64	86.33

หมายเหตุ * คือข้อมูลของ growth control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข-24 ผลการทดสอบ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 167 (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่สารสกัดไพลหลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2

1.65%	50%	สารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
DMSO	DMSO	5,000	4,000	3,000	2,500	2,000	1,250	0	0
0.598	0.191	0.456	0.489	0.507	0.534	0.547	0.574	0.576	0.539
0.577	0.161	0.499	0.542	0.549	0.560	0.568	0.556	0.601	0.572
0.560	0.208	0.478	0.545	0.556	0.587	0.574	0.583	0.588	0.612
0.560	0.142	0.432	0.497	0.492	0.525	0.563	0.544	0.613	0.565
0.596*	0.587*	0.581*	0.570*	0.564*	0.592*	0.583*	0.522*	0.602	0.573
0.534*	0.579*	0.568*	0.510*	0.515*	0.561*	0.532*	0.537*	0.533	0.542

หมายเหตุ * คือข้อมูลของ growth control

ค่า blank เฉลี่ย = 0.046

ค่า GC เฉลี่ย = 0.519

ตารางผนวก ข-25 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2

1.65%	50%	ร้อยละการมีชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
DMSO	DMSO	5,000	4,000	3,000	2,500	2,000	1,250	0	0
106.35	27.93	78.99	85.35	88.82	94.02	96.53	101.35	102.11	94.99
102.31	22.15	87.28	95.56	96.91	99.03	100.57	102.31	106.93	101.34
99.03	31.21	83.23	96.46	98.26	104.23	101.73	99.03	104.43	109.05
99.03	105.97	74.37	86.89	85.93	92.29	99.61	99.03	109.24	100.00
105.97*	104.23*	103.08*	100.96*	99.80*	105.20*	103.46*	91.71*	107.12	101.54
64.02*	102.69*	100.57*	89.40*	90.36*	99.22*	93.64*	94.60*	93.83	95.56

หมายเหตุ * คือข้อมูลของ growth control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข-26 ผลการทดสอบ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 passage ที่ 167 (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่สารสกัดไพลหลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3

1.65% DMSO	50% DMSO	สารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
		5,000	4,000	3,000	2,500	2,000	1,250	0	0
0.516	0.178	0.460	0.479	0.530	0.573	0.552	0.564	0.555	0.543
0.570	0.163	0.427	0.552	0.504	0.567	0.568	0.569	0.530	0.563
0.540	0.151	0.476	0.486	0.538	0.517	0.563	0.559	0.602	0.570
0.602	0.134	0.487	0.506	0.612	0.543	0.569	0.577	0.565	0.564
0.564*	0.586*	0.577*	0.627*	0.632*	0.581*	0.536*	0.607*	0.594	0.549
0.543*	0.589*	0.568*	0.594*	0.574*	0.628*	0.526*	0.605*	0.528	0.521

หมายเหตุ * คือข้อมูลของ growth control

ค่า blank เฉลี่ย = 0.046

ค่า GC เฉลี่ย = 0.498

ตารางผนวก ข-27 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารสกัดไพลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 3

1.65% DMSO	50% DMSO	ร้อยละการมีชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
		5,000	4,000	3,000	2,500	2,000	1,250	0	0
94.37	26.50	83.13	88.95	97.18	105.82	101.60	104.01	102.20	99.79
105.22	23.49	76.50	101.60	91.96	104.61	104.81	105.02	97.18	103.81
99.19	21.08	86.34	88.35	98.79	94.57	103.81	103.01	111.64	105.22
111.64	17.67	88.55	108.43	113.65	99.79	105.02	106.62	104.21	104.01
104.01*	108.43*	106.62*	116.66*	117.69*	107.42*	98.39*	112.66*	110.04	101.00
81.72*	109.03*	104.8*	110.04*	106.03*	116.86*	96.38*	112.24*	96.78	95.38

หมายเหตุ * คือข้อมูลของ growth control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

แผนการทดลองที่ใช้ในการวิจัย คือแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test ดังรายละเอียดต่อไปนี้ (สุรพล, 2528)

1. ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของ CRD

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F-ratio
Treatment	t-1	$\frac{T_1^2+.....+T_t^2}{r}$ - C.F.	$\frac{\text{Treatment SS}}{(t-1)} = M_2$	$\frac{M_2}{M_1}$
Error	t(r-1)	Total SS-Treatment SS	$\frac{\text{Error SS}}{t(r-1)} = M_1$	
Total	tr-1	$\sum$ (each value)^2 - C.F.		

ความหมายของแต่ละเทอมในตารางมีดังนี้

Source of variation = แสดงถึงแหล่งความแปรปรวนที่แยกออกมาวิเคราะห์

d.f. (degree of freedom) = ระดับหรือองศาของความเป็นอิสระ

SS (sum of squares) = ผลรวมกำลังสองของค่าเบี่ยงเบนไปจากค่าเฉลี่ย

MS (mean squares) = ผลเฉลี่ยของผลรวมกำลังสองของค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย

$$MS = \frac{SS}{d.f.}$$

MS นี้เป็นค่าประมาณของความแปรปรวน (variance) ในแต่ละแหล่งของความแปรปรวน

F = ค่า F ที่คำนวณจาก F-test หรืออัตราส่วนของ MS 2 ค่า Treatment MS หารด้วย Error MS

t = จำนวนสิ่งทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

r = จำนวนซ้ำ

Error = ความคลาดเคลื่อน

2. ขั้นตอนในการวิเคราะห์ความแปรปรวน

ก. C.F. (corrected factor) = ตัวปรับค่าสำหรับผลรวมกำลังสองของข้อมูล เพื่อจะแสดงในรูปผลรวมกำลังสองของค่าเบี่ยงเบนไปจากค่าเฉลี่ย

$$C.F. = \frac{(\text{ผลรวมทั้งหมดในการทดลอง})^2}{\text{จำนวนข้อมูลทั้งหมด}}$$

$$= \frac{(G.T.)^2}{(t)(r)}$$

ข. Sum of squares

Total SS = ผลบวกของ (ข้อมูลของแต่ละหน่วยทดลอง)^2 – C.F.

$$\text{Treatment SS} = \frac{\text{ผลบวกของ (ผลรวมของแต่ละสิ่งทดลอง)}^2}{\text{จำนวนซ้ำ}} - C.F.$$

$$= \frac{T_1^2 + \ldots + T_t^2}{r} - C.F.$$

Error SS = Total SS – Treatment SS

ค. Mean squares

$$\text{Treatment MS} = \frac{\text{Treatment SS}}{t-1}$$

$$\text{Error MS} = \frac{\text{Error SS}}{t(r-1)}$$

ง. F-value

$$F = \frac{\text{Treatment MS}}{\text{Error MS}}$$ ซึ่งมี d.f. ตามตัวตั้งและตัวหาร

จ. เปรียบเทียบค่า F ที่คำนวณได้กับค่า F ในตารางที่ d.f. ตัวตั้ง (n_1) และ d.f. ตัวหาร (n_2) โดยใช้ระดับความเป็นไปได้ 2 ระดับ คือ .05 และ .01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

F คำนวณ > $F_{.05}$ จากตาราง ปกติใช้สัญญลักษณ์ * เหนือค่าที่ทดสอบ (significant at .05 level of probability)

F คำนวณ > $F_{.01}$ จากตาราง แสดงโดยใช้สัญญลักษณ์ ** เหนือค่าที่ทดสอบ (significant at .01 level of probability)

F คำนวณ < $F_{.05}$ จากตาราง แสดงโดยใช้ NS (non significant) หรือไม่ต้องใส่เครื่องหมายใด

ฉ. การทดสอบค่า F ของสิ่งทดลอง ถ้าพบว่าค่า F แสดงความแตกต่างทางสถิติ แสดงว่ามีความแปรปรวนแตกต่างระหว่างสิ่งทดลองนั้นๆ ซึ่งต้องทำการทดสอบหาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองต่อไป

ช. คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation, C.V.) C.V. เป็นค่าแสดงถึงความแปรปรวนที่เกิดขึ้นในการทดลอง ซึ่งไม่สามารถทราบสาเหตุที่แน่นอน ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนนี้มีประโยชน์ในการวางแผนการทดลอง ตลอดจนการประเมินประสิทธิภาพของการทดลอง

C.V. คำนวณในรูปเปอร์เซ็นต์ของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, S) ต่อค่าเฉลี่ย (mean)

$$C.V. = \frac{\text{standard deviation}}{\text{Mean}} \times 100 \ \% = \frac{\sqrt{\text{error mean square}}}{\text{grand mean}} \times 100 \ \%$$

ซ. วิธีการวิเคราะห์เพื่อวัดความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ในที่นี้ใช้วิธี Duncan's new multiple range test วิธีการเปรียบเทียบแบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. จัดเรียงค่าเฉลี่ยตามลำดับ

อันดับที่	1	2	3	4	5	6	7	8
สิ่งทดลอง								
ค่าเฉลี่ย								

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. คำนวณค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{\text{error mean square}}{n}}$$

n คือ จำนวนข้อมูลที่ใช้ในการหาค่าเฉลี่ย สำหรับ CRD n ก็คือจำนวนซ้ำ

3. คำนวณค่า "Least Significant Ranges" (LSR) สำหรับช่วงการเปรียบเทียบต่างๆ โดยอาศัยตาราง "Significant Studentized Ranges" (SSR) ในหนังสือสถิติทั่วไป ซึ่งอยู่ในรูปแบบดังตัวอย่างต่อไปนี้

Error d.f.	Protection level	p = number of means for range being tested						
		2	3	4	5	6	7	8
16	.05	3.00	3.15	3.23	3.30	3.34	3.37	3.39
	.01	4.13	4.34	4.45	4.54	4.60	4.67	4.72

p คือ จำนวนของค่าเฉลี่ยในช่วงการเปรียบเทียบ ซึ่งเท่ากับ (ผลต่างของอันดับ + 1)

สูตรสำหรับหาค่า least significant range (LSR)

$$LSR_{\alpha,p} = (SSR_{\alpha,p})(S_{\bar{y}})$$

จากการทดลอง d.f. ของ error เท่ากับ 16 และ $S_{\bar{y}} = 2.095$

p	2	3	4	5	6	7	8
$SSR_{.05}$	3.00	3.15	3.23	3.30	3.34	3.37	3.39
$SSR_{.01}$	4.13	4.34	4.45	4.54	4.60	4.67	4.72
$LSR_{.05}$	6.29	6.60	6.77	6.91	6.99	7.06	7.10
$LSR_{.01}$	8.65	9.09	9.32	9.51	9.64	9.78	9.89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เปรียบเทียบ (ผลต่างของค่าเฉลี่ยสูงสุดกับต่ำสุด) กับค่า LSR ที่ p = (ผลต่างของอันดับ+1) ถ้าค่าที่ได้มากกว่า แสดงว่าสิ่งทดลองที่ทำการเปรียบเทียบนั้น แตกต่างกันทางสถิติ จากนั้นเปรียบเทียบผลต่างของค่าเฉลี่ยสูงสุดกับค่าเฉลี่ยรองต่ำสุด ในกรณีที่ผลต่างยังมากกว่าค่า LSR ก็ทำเช่นนี้ต่อไปอีก จะหยุดการเปรียบเทียบก็ต่อเมื่อผลต่างนั้นน้อยกว่าค่า LSR ที่เกี่ยวข้อง และสรุปได้ว่าค่าเฉลี่ยทั้งหมดที่อยู่ในช่วงนั้นไม่แตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสูงสุดกับค่าเฉลี่ยอื่นๆหมดแล้ว ให้เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรองสูงสุดกับค่าเฉลี่ยอื่นๆโดยวิธีการเดียวกันกับที่กล่าวข้างต้น จากนั้นทำการจัดกลุ่มค่าเฉลี่ยตามความแตกต่าง โดยใช้ตัวอักษรที่เหมือนกันใส่ลงเหนือค่าเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกัน

3. วิธีการคำนวณค่า Corrected % mortality

เป็นการปรับค่าเปอร์เซ็นต์ตายให้ถูกต้องโดยใช้สูตรของ Abbot (Abbot's formula) (Undeen and Vavra, 1997) มีสูตรในการคำนวณดังนี้

$$\text{Corrected \% mortality} = \frac{100\% \times (T\% - C\%)}{100\% - C\%}$$

โดย T% = ร้อยละของเซลล์ตายในสิ่งทดลอง

C% = ร้อยละของเซลล์ตายในกลุ่มควบคุม

ตารางผนวก ค-1 ร้อยละของเซลล์ตาย (% cell mortality) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ในอาหารที่ผสมสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ร้อยละความเข้มข้นของ (DMSO) ในอาหาร	ร้อยละของเซลล์ตาย		ผลรวมร้อยละของเซลล์ตาย	ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ตาย[1/]
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		
0	25.44	25.50	50.94	25.47[b]
1	26.24	24.11	50.35	25.18[b]
2	28.73	23.40	52.13	26.07[b]
3	35.37	36.67	72.04	36.02[a]
5	35.02	33.45	68.47	34.24[a]
			293.93	29.40

[1/] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก.) หาค่า Correction factor (C.F.)

$$C.F. = \frac{(G.T.)^2}{(t)(r)} = \frac{293.93^2}{10} = 8{,}639.48$$

(ข.) Sum of squares

Total SS = ผลบวกของ (ข้อมูลจากแต่ละหน่วยการทดลอง)^2 – C.F.

$= (25.44)^2+(25.50)^2+\ldots+(33.45)^2 - CT$

$= 8{,}881.2749 - 8{,}639.48$

$= 241.79$

Treatment SS $= \frac{50.94^2+50.35^2+\ldots+68.47^2}{2} - CT$

$= 8{,}862.72 - 8{,}639.48$

$= 223.24$

Error SS $= 241.79 - 223.24$

$= 18.55$

(ค.) Mean squares

Treatment MS $= \frac{\text{Treatment SS}}{(t-1)}$

$= \frac{223.24}{(5-1)}$

$= 55.81$

Error MS $= \frac{\text{Error SS}}{t(r-1)}$

$= \frac{18.51}{5}$

$= 3.70$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ง.) F-value

$$F = \frac{\text{Treatment MS}}{\text{Error MS}} = \frac{55.81}{3.70} = 15.08$$

, มี df เท่ากับตัวตั้งและตัวหาร

df - 4,5

$F_{4,5} = 15.08$ $F_{4,5}(0.01) = 11.39$

(จ.) คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of variation, C.V.)

$$C.V. = \frac{\sqrt{\text{error mean square}}}{\text{grand mean}} \times 100 \ \%$$

$$= \frac{\sqrt{3.70}}{29.40} \times 100$$

$$= 6.54\ \%$$

แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตาราง

ตารางผนวกที่ ค-2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของเซลล์ตายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสม DMSO ความเข้มข้นต่างๆ

Source of Variation	df	SS	MS	F_c
Concentration	4	223.24	55.81	15.08**
Error	5	18.55	3.70	
Total	9	241.79		

C.V. = 6.54 %

$F.05_{(4,5)}$ = 5.19 $F.01_{(4,5)}$ = 11.39

**ร้อยละของเซลล์ตายที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01 (ร้อยละ 99)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

(1) จัดเรียงค่าเฉลี่ยตามลำดับ

อันดับ (rank)	1	2	3	4	5
ความเข้มข้น ของ DMSO	T_4 (3%)	T_5 (5%)	T_3 (2%)	T_1 (0%)	T_2 (1%)
ค่าเฉลี่ย	36.02	34.24	26.07	25.47	25.18

(2) คำนวณค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error, $S_{\bar{y}}$)

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{error\ \ mean\ \ square}{r}}$$

$$= \sqrt{\frac{3.70}{2}}$$

$$= 1.36$$

(3) คำนวณค่า "Least significant ranges" (LSR) สำหรับช่วงการเปรียบเทียบต่างๆ โดยอาศัยตาราง "Singnificant Studentized Ranges" (SSR)

จากการทดลอง d.f. error = 5

p = (ผลต่างของอันดับ + 1)

จากการทดลอง d.f. ของ error เท่ากับ 5 และ $S_{\bar{y}}$ เท่ากับ 1.36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค-3 แสดงค่า least significant range (LSR) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

p	2	3	4	5
$SSR_{.05}$	3.64	3.74	3.79	3.83
$SSR_{.01}$	5.70	5.96	6.11	6.18
$LSR_{.05}$	4.95	5.09	5.15	5.21
$LSR_{.01}$	7.75	8.11	8.31	8.40

$LSR_{\alpha,p} = (SSR_{\alpha,p})(S_{\bar{y}})$, $S_{\bar{y}} = 1.36$

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's new multiple range test

$T_4(3\%)$ $T_1(1\%)$

$(36.02-25.18) = 10.84 > 8.44$ $(LSR_{.01,5})$

$T_4(3\%)$ $T_1(0\%)$

$(36.02-25.47) = 10.55 > 8.31$ $(LSR_{.01,4})$

$T_4(3\%)$ $T_3(2\%)$

$(36.02-26.07) = 9.95 > 8.11$ $(LSR_{.01,3})$

$T_4(3\%)$ $T_5(5\%)$

$(36.02-34.24) = 1.78 < 4.95$ $(LSR_{.01,2})$

$T_5(5\%)$ $T_2(1\%)$

$(34.24-25.18) = 9.06 > 8.31$ $(LSR_{.01,4})$

$T_5(5\%)$ $T_1(0\%)$

$(34.24-25.47) = 8.77 > 8.11$ $(LSR_{.01,3})$

$T_5(5\%)$ $T_3(2\%)$

$(34.24-26.07) = 8.17 > 7.75$ $(LSR_{.01,2})$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T_3(2%) T_2(1%)

(26.07-25.18) = 0.89 < 5.09 ($LSR_{.05,3}$)

T_1(0%) T_2(1%)

(25.47-25.18) = 0.29 < 4.95 ($LSR_{.05,2}$)

สรุป จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของดันแคนในการทดสอบความเป็นพิษของสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์พบว่า ร้อยละของเซลล์ตายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ร้อยละ 1 และ 2 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับร้อยละของเซลล์ตายในอาหารที่ไม่ผสมสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ แต่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 กับร้อยละของเซลล์ตายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ร้อยละ 3 และ 5 จึงสรุปได้ว่าในการใช้สารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ เป็นตัวทำละลายสารสกัดไพล เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 นั้น ความเข้มข้นสุดท้ายของสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ในอาหารที่ใช้ทดสอบไม่ควรมีความเข้มข้นเกินร้อยละ 2

ตารางผนวก ค-4 ร้อยละการตายของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อสารสกัดไพลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และร้อยละการตายของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ปรับค่าให้ถูกต้อง

ความเข้มข้นของสารสกัดไพล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละอัตราการตาย			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
Control	11.50 (0)	11.32 (0)	11.22 (0)	11.35 (0)
500	26.51(16.96)	37.21 (28.47)	36.36 (28.24)	29.48 (24.56)
1,000	37.23 (29.07)	33.33 (15.94)	47.24 (40.51)	39.27 (28.50)
2,000	47. 92 (41.15)	61. 47 (51.42)	84.62 (82.66)	64.67 (58.41)

: ข้อมูลในวงเล็บคือร้อยละการตายของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ปรับค่าให้ถูกต้อง (ภาคผนวก ค.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางข้างต้นสามารถคิดได้จากสูตรของ Abbot (Undeen et al, 1997) เพื่อปรับร้อยละของเซลล์ตายให้ถูกต้อง ดังนี้

$$\text{Corrected \% mortality} = \frac{100\% \times (T\% - C\%)}{100\% - C\%}$$

โดย T% = ร้อยละของเซลล์ตายในสิ่งทดลอง

C% = ร้อยละของเซลล์ตายในกลุ่มควบคุม

แทนค่า

ซ้ำที่ 1

สารสกัดไพลความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Corrected % mortality = 100%×(11.5%-11.5%) / (100%-11.5%)

= 0%

สารสกัดไพลความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Correeted % mortality = 100%×(26.51%-11.5%) / (100%-11.5%)

= 16.96%

สารสกัดไพลความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Correeted % mortality = 100%×(37.23%-11.5%) / (100%-11.5%)

= 29.07%

สารสกัดไพลความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Corrected % mortality = 100%×(47.92%-11.5%) / (100%-11.5%)

= 41.15%

ซ้ำที่ 2

สารสกัดไพลความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Corrected % mortality = 100%×(20.69%-20.69%) / (100%-20.69%)

= 0%

สารสกัดไพลความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Correeted % mortality = 100%×(25.58%-20.69%) / (100%-20.69%)

= 6.17%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดไพลความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Corrected % mortality = 100%×(33.33%-20.69%) / (100%-20.69%)

= 15.94%

สารสกัดไพลความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Corrected % mortality = 100%×(61.47%-20.69%) / (100%-20.69%)

= 51.42%

ซ้ำที่ 3

สารสกัดไพลความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Corrected % mortality = 100%×(11.32%-11.32%) / (100%-11.32%)

= 0%

สารสกัดไพลความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Corrected % mortality = 100%×(36.36%-11.32%) / (100%-11.32%)

= 28.24%

สารสกัดไพลความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Corrected % mortality = 100%×(47.24%-11.32%) / (100%-11.32%)

= 40.51%

สารสกัดไพลความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Corrected % mortality = 100%×(84.62%-11.32%) / (100%-11.32%)

= 82.66%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค-5 ร้อยละของเซลล์ตาย (% cell mortality) KMITL-HA-E1 passage ที่ 157 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ความเข้มข้นของสารสกัดไพล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละของเซลล์ตาย			ผลรวม	ค่าเฉลี่ย[1/]
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
กลุ่มควบคุม	0	0	0	0	0^{a}
500	16.96	28.24	28.47	73.67	24.56^{b}
1000	29.07	15.94	40.51	85.52	28.50^{b}
2000	41.15	51.42	82.66	175.23	58.41^{b}
				334.42	111.47

[1/] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

(ก.) Correction factor

$$C.F. = \frac{(G.T)^2}{(t)(r)}$$

$$= \frac{334.42^2}{12}$$

$$= 9{,}319.73$$

(ข.) Sum of squares

Total SS = ผลบวกของ (ข้อมูลจากแต่ละหน่วยการทดลอง)^2 – C.F.

$$= 0^2+0^2+\ldots+(82.66)^2 - C.F.$$

$$= 15{,}805.90 - 9{,}319.73$$

$$= 6{,}486.17$$

$$\text{Treatment SS} = \frac{0^2+(73.67)^2+\ldots+(175.23)^2}{} - CT$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$= \frac{43,446.49}{3} - 9,319.73$$

$$= 5,162.43$$

$$\text{Error SS} = 6,486.17 - 5,162.43$$

$$= 1,323.74$$

(ค.) Mean squares

$$\text{Treatment MS} = \frac{\text{Treatment SS}}{(t-1)}$$

$$= \frac{5,162.43}{(4-1)}$$

$$= 1,720.81$$

$$\text{Error MS} = \frac{\text{Error SS}}{t(r-1)}$$

$$= \frac{1,323.74}{8}$$

$$= 165.47$$

(ง.) F-value

$$F = \frac{\text{Treatment MS}}{\text{Error MS}}$$, มี df เท่ากับตัวตั้งและตัวหาร

$$= \frac{1,720.81}{165.74}$$ df - 3,8

$F_{3,8}$ = 10.40 $F_{3,8}(0.01) = 7.59$

(จ.) คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of variation, C.V.)

$$\text{C.V.} = \frac{\sqrt{\text{error mean square}}}{\text{grand mean}} \times 100 \ \%$$

$$= \frac{\sqrt{165.47}}{111.47} \times 100$$

$$= 11.54 \ \%$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตาราง

ตารางผนวกที่ ค-6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆ

Source of Variation	df	SS	MS	F_c
Concentration	3	5,162.43	1,720.81	10.40**
Error	8	1,323.74	165.47	
Total	11	6,486.17		

C.V. = 11.54 %

$F.05_{(3,8)}$ = 4.07 $F.01_{(3,8)}$ = 7.59

**ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01 (ร้อยละ 99)

จากผลการคำนวณค่า F_c ที่ได้จากการทดลองมีค่าเท่ากับ 10.40 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่า $F.05_{(3,8)}$ และ $F.01_{(3,8)}$ ดังนั้นจึงสรุปว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอย่างน้อย 2 ชนิดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test (LSR = .05)

(1) จัดเรียงค่าเฉลี่ยตามลำดับ

อันดับ (rank)	1	2	3	4
ความเข้มข้นของสารสกัดไพล	T_4 (2,000)	T_3 (1,000)	T_2 (500)	T_1 (0)
ค่าเฉลี่ย	58.41	28.50	24.65	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) คำนวณค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error, $S_{\bar{y}}$)

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{error\ \ mean\ \ square}{r}}$$

$$= \sqrt{\frac{165.47}{3}}$$

$$= 7.43$$

(3) คำนวณค่า "Least significant ranges" (LSR) สำหรับช่วงการเปรียบเทียบต่างๆ โดยอาศัยตาราง "Singnificant Studentized Ranges" (SSR)

จากการทดลอง d.f. error = 8

p = (ผลต่างของอันดับ + 1)

จากการทดลอง d.f. ของ error เท่ากับ 8 และ $S_{\bar{y}}$ เท่ากับ 7.43

ตารางผนวก ค-7 แสดงค่า least significant range (LSR) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

p	2	3	4
$SSR_{.05}$	3.26	3.39	3.47
$SSR_{.01}$	4.74	5.00	5.14
$LSR_{.05}$	24.22	25.19	25.78
$LSR_{.01}$	35.22	37.15	38.19

$LSR_{\alpha,p} = (SSR_{\alpha,p})(S_{\bar{y}})$, $S_{\bar{y}} = 4.30$

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's new multiple range test

$T_4(2,000)$ $T_1(0)$

$(58.41-0) = 58.41 > 38.19$ $(LSR_{.01,4})$

$T_4(2,000)$ $T_1(500)$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$(58.41-24.56) = 33.85 > 25.19\ (LSR_{.05,3})$

$T_4(2,000)$ $T_3(1,000)$

$(58.41-28.50) = 29.91 > 24.22\ (LSR_{.05,2})$

$T_3(1,000)$ $T_1(0)$

$(28.50-0) = 28.50 > 25.19\ (LSR_{.05,3})$

$T_3(1,000)$ $T_2(500)$

$(28.50-24.56) = 3.94 < 24.22\ (LSR_{.05,2})$

$T_3(1,000)$ $T_1(0)$

$(24.56-0) = 24.56 > 24.22\ (LSR_{.05,2})$

สรุป จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของดันแคนในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไพลเบื้องต้นพบว่า ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในสารสกัดไพลที่มีความเข้มข้น 500 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 กับค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในสารสกัดไพลที่มีความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ตายจากการทดลองขั้นต้น ทำให้สามารถประมาณค่าเฉลี่ยร้อยละ 50 ของเซลล์ตาย ควรอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไพลโดยใช้วิธีการย้อมสีนิวทรัลเรดควรเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดไพลที่ครอบคลุมส่วนนี้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค-8 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) KMITL-HA-E1 p 166 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (กรองสารสกัดไพลโดยใช้กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร) เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ความเข้มข้นของสารสกัดไพล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต			ผลรวม	ค่าเฉลี่ย[1/]
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	99.86	99.85	102.69	302.40	100.80[b]
1000	126.44	128.31	125.75	380.50	126.83[a]
1500	118.58	118.02	132.04	368.64	122.88[a]
2000	124.34	134.07	126.49	384.90	128.30[a]
2500	119.80	128.80	136.17	384.77	128.26[a]
3000	118.03	131.25	129.47	378.75	126.25[a]
4000	122.01	125.74	132.78	380.53	126.84[a]
50% DMSO	22.90	14.96	27.24	65.10	21.70[c]
				2,645.59	110.23

[1/] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

(ก.) หาค่า Correction factor (C.F.)

$$C.F. = \frac{(G.T.)^2}{(t)(r)}$$

$$= \frac{2{,}645.59^2}{24}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

= 291,631.10

(ข.) หาค่า Sum of squares

Total SS = $(99.86)^2+(99.85)^2+\ldots+(27.24)^2$ - C.F.

= 320,831.91 - 291,631.10

= 29,200.81

Treatment SS = $\frac{T_1^2+\ldots+T_t^2}{r}$ – C.F.

= $\frac{(302.40)^2+(380.50)^2+\ldots+(65.10)^2}{3}$ - C.F.

= 320,270.03 - 291,631.10

= 28,638.93

Error SS = Total SS - Treatment SS

= 29,200.81 - 28,638.93

= 561.8

(ค.) หาค่า Mean squares

Treatment MS = $\frac{\text{Treatment SS}}{(t-1)}$

= $\frac{28,638.93}{(8-1)}$

= 4,091.28

Error MS = $\frac{\text{Error SS}}{t(r-1)}$

= $\frac{561.88}{8(3-1)}$

= 35.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ง.) หาค่า F- value

$F = \frac{\text{Treatment MS}}{\text{Error MS}}$, มี df เท่ากับตัวตั้งและตัวหาร

$= \frac{4,091.28}{35.12}$ df - 7,16

$F_{7,16} = 116.49$ $F_{7,16}(0.01) = 4.03$

(จ.) คำนวณหาค่าสัมประสิทธ์ของความแปรปรวน (Coefficient of variation, C.V.)

$C.V. = \frac{\sqrt{\text{error mean square}}}{\text{grand mean}} \times 100 \ \%$

$= \frac{\sqrt{35.12}}{100.23} \times 100$

$= 5.38\ \%$

แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตาราง

ตารางผนวก ค-9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆ

Source of Variation	df	SS	MS	F_c
Concentration (t - 1)	7	28,638.93	4,091.28	116.49**
Error t(r - 1)	16	561.88	35.12	
Total	23	29,200.81		

C.V. = 5.38 %

$F.05_{(7,16)}$ = 2.66 $F.01_{(7,16)}$ = 4.03

**มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง หรือที่ระดับความเป็นไปได้ .01 หรือมีความแปรปรวนในระหว่างความเข้มข้นที่ทดสอบอย่างแท้จริงที่ระดับความเป็นไปได้ .01 (ร้อยละ 99)

จากผลการคำนวณค่า F_c ที่ได้จากการทดลองมีค่าเท่ากับ 116.49 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่า $F.05_{(7,16)}$ และ $F.01_{(7,16)}$ ดังนั้นจึงสรุปว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอย่างน้อย 2 ชนิดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

(1) จัดเรียงค่าเฉลี่ยตามลำดับ

อันดับที่ (rank)	1	2	3	4	5	6	7	8
ความเข้มข้นของสารสกัดไพล	T_4 (2,000)	T_5 (2,500)	T_7 (4,000)	T_2 (1,000)	T_6 (3,000)	T_3 (1,500)	T_1 (0)	T_8 (50% DMSO)
ค่าเฉลี่ย	128.30	128.26	126.84	126.83	126.25	122.88	100.80	21.70

(2) คำนวณค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error, $S_{\bar{y}}$)

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{error\ \ mean\ \ square}{r}}$$

$$= \sqrt{\frac{35.12}{3}}$$

$$= 3.42$$

(3) คำนวณค่า "Least significant ranges" (LSR) สำหรับช่วงการเปรียบเทียบต่างๆ โดยอาศัยตาราง "Singnificant Studentized Ranges" (SSR)

จากการทดลอง d.f. error = 18

p = (ผลต่างของอันดับ + 1)

จากการทดลอง d.f. ของ error เท่ากับ 16 และ $S_{\bar{y}}$ เท่ากับ 3.42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค-10 แสดงค่า least significant range (LSR) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

p	2	3	4	5	6	7	8
$SSR_{.05}$	3.00	3.15	3.23	3.30	3.34	3.37	3.39
$SSR_{.01}$	4.13	4.34	4.45	4.54	4.60	4.67	4.72
$LSR_{.05}$	10.26	10.77	11.05	11.29	11.42	11.53	11.59
$SSR_{.01}$	14.12	14.84	15.22	15.53	15.73	15.97	16.14

$LSR\ \alpha_{,p}$ = $(SSR\ \alpha_{,p})\ (S_{\bar{y}})$, $S_{\bar{y}}$ = 3.42

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's new multiple range test

T_4(2,000) T_8(50% DMSO)

$(128.30 - 21.70) = 106.60 > 16.14\ (LSR_{.01,8})$

T_4(2,000) T_1 (0)

$(128.30 - 100.80) = 27.50 > 15.97\ (LSR_{.01,7})$

T_4(2,000) T_3 (1,500)

$(128.30 - 122.88) = 5.42 < 11.42\ (LSR_{.05,6})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO และในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพลที่ระดับความเป็นไปได้ .01 แต่มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

T_5(2,500) T_8(50% DMSO)

$(128.26 - 21.70) = 106.56 > 11.53\ (LSR_{.05,7})$

T_5(2,500) T_1(0)

$(128.26 - 100.80) = 27.46 > 11.42\ (LSR_{.05,6})$

T_5(2,500) T_3(1,500)

$(128.26 - 122.88) = 5.38 < 11.29\ (LSR_{.05,5})$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO และในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพลที่ระดับความเป็นไปได้ .05 แต่มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

T_7(4,000) T_8(50% DMSO)

$(126.84 - 21.70) = 105.14 > 11.42\ (LSR_{.05,6})$

T_7(4,000) T_1(0)

$(126.84 - 100.80) = 26.04 > 11.29\ (LSR_{.05,5})$

T_7(4,000) T_3(1,500)

$(126.84 - 122.88) = 3.96 < 11.05\ (LSR_{.05,4})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO และในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพลที่ระดับความเป็นไปได้ .05 แต่มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

T_2(1,000) T_8(50% DMSO)

$(126.83 - 21.70) = 105.13 > 11.29\ (LSR_{.05,5})$

T_2(1,000) T_1(0)

$(126.83 - 100.80) = 26.03 > 11.05\ (LSR_{.05,4})$

T_2(1,000) T_3(1,500)

$(126.83 - 122.88) = 3.95 < 10.77\ (LSR_{.05,3})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO และในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพลที่ระดับความเป็นไปได้ .05 แต่มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T_6(3,000) T_8(50% DMSO)

$(126.25 - 21.70) = 104.55 > 11.05\ (LSR_{.05,4})$

T_6(3,000) T_1(0)

$(126.25 - 100.80) = 25.45 > 10.77\ (LSR_{.05,3})$

T_6(3,000) T_3(1,500)

$(126.25 - 122.88) = 3.37 < 10.26\ (LSR_{.05,2})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO และในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพลที่ระดับความเป็นไปได้ .05 แต่มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

T_3(1,500) T_8(50% DMSO)

$(122.88 - 21.70) = 101.18 > 10.77\ (LSR_{.05,3})$

T_3(1,500) T_1(0)

$(122.88 - 100.80) = 22.08 > 10.26\ (LSR_{.05,2})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO และในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพลที่ระดับความเป็นไปได้ .05

T_1(0) T_8(50% DMSO)

$(100.80 - 21.70) = 79.10 > 10.26\ (LSR_{.05,2})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพลมีความแตก ต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .05

ดังนั้นเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดไพลไม่แตกต่างทางสถิติ แต่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและ 50%DMSO อย่างนัยสำคัญยิ่ง จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวิตในสารสกัดไพลทุกความเข้มข้นมีค่าสูงกว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตที่พบในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ใส่สารสกัดไพล เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารสกัดไพลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตในความเข้มข้นต่างๆไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างจาก Control และ 50%DMSO

ตารางผนวก ค-11 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) KMITL-HA-E1 p 167 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (กรองสารสกัดไพลโดยใช้กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร) เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ความเข้มข้นของสารสกัดไพล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต			ผลรวม	ค่าเฉลี่ย[1/]
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	100.00	100.05	100.09	300.14	100.05[a]
1,000	99.38	112.77	166.87	379.02	126.34[a]
1,500	103.07	112.72	160.93	376.72	125.57[a]
2,000	103.78	106.21	144.14	354.13	118.04[a]
2,500	104.94	107.34	154.81	367.09	122.36[b]
3,000	105.65	103.23	162.42	371.30	123.77[a]
4,000	107.34	105.68	156.30	369.32	123.11[a]
50% DMSO	9.43	12.48	21.77	43.68	14.56[b]
				2,561.40	106.73

[1/] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก.) หาค่า Correction factor (C.F.)

$$C.F. = \frac{(G.T.)^2}{(t)(r)} = \frac{(2{,}561.40)^2}{24} = 273{,}365.42$$

$$\text{Total SS} = (100.00)^2+(100.05)^2+\ldots+(21.77)^2 - C.F. = 315{,}059.41 - 273{,}365.42 = 41{,}693.99$$

(ข.) หาค่า Sum of squares

$$\text{Treatment SS} = \frac{T_1^2+\ldots+T_t^2}{r} - C.F. = \frac{(300.14)^2+(379.02)^2+\ldots+(43.68)^2}{3} - C.F. = 303{,}996.72 - 273{,}365.42 = 30{,}631.30$$

$$\text{Error SS} = \text{Total SS} - \text{Treatment SS} = 41{,}693.99 - 30{,}631.30 = 11{,}062.69$$

(ค.) หาค่า Mean squares

$$\text{Treatment MS} = \frac{\text{Treatment SS}}{(t-1)} = \frac{30{,}631.30}{(8-1)} = 4{,}375.9$$

$$\text{Error MS} = \frac{\text{Error SS}}{t(r-1)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$= \frac{11{,}062.69}{8(3-1)}$$

$$= 691.42$$

(ง.) หาค่า F- value

$$F = \frac{\text{Treatment MS}}{\text{Error MS}} = \frac{4{,}375.9}{35.12}$$, มี df เท่ากับตัวตั้งและตัวหาร

df - 7,16

$F_{7,16} = 6.33$ $F_{7,16}(0.01) = 4.03$

(จ.) คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of variation, C.V.)

$$C.V. = \frac{\sqrt{\text{error mean square}}}{\text{grand mean}} \times 100 \ \%$$

$$= \frac{\sqrt{691.42}}{106.73} \times 100$$

$$= 24.64\ \%$$

แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตาราง

ตารางผนวก ค-12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆ

Source of Variation	df	SS	MS	F_c
Concentration	7	30,631.30	4,375.90**	6.33**
Error	16	11,062.69	691.42	
Total	23	41,693.99		

C.V. = 24.64 %

$F.05_{(7,16)}$ = 2.66 $F.01_{(7,16)}$ = 4.03

**มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง หรือที่ระดับความเป็นไปได้ .01 หรือมีความแปรปรวนของ%เซลล์มีชีวิตในระหว่างความเข้มข้นที่ทดสอบอย่างแท้จริงที่ระดับความเป็นไปได้ .01 (ร้อยละ 99)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการคำนวณค่า F_c ที่ได้จากการทดลองมีค่าเท่ากับ 6.33 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่า $F.05_{(7,16)}$ และ $F.01_{(7,16)}$ ดังนั้นจึงสรุปว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอย่างน้อย 2 ชนิดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

(1) จัดเรียงค่าเฉลี่ยตามลำดับ

อันดับที่ (rank)	1	2	3	4	5	6	7	8
ความเข้มข้นของสารสกัดไพล	T_2 (1,000)	T_3 (1,500)	T_6 (3,000)	T_7 (4,000)	T_5 (2,500)	T_4 (2,000)	T_1 (0)	T_8 (50% DMSO)
ค่าเฉลี่ย	126.34	125.57	123.77	123.11	122.36	118.04	100.05	14.56

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{error\ \ mean\ \ square}{r}}$$

$$= \sqrt{\frac{691.42}{3}}$$

$$= 15.18$$

(3) คำนวณค่า "Least significant ranges" (LSR) สำหรับช่วงการเปรียบเทียบต่างๆ โดยอาศัยตาราง "Singnificant Studentized Ranges" (SSR)

จากการทดลอง d.f. error = 18

p = (ผลต่างของอันดับ + 1)

จากการทดลอง d.f. ของ error เท่ากับ 16 และ $S_{\bar{y}}$ เท่ากับ 15.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค-13 แสดงค่า least significant range (LSR) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

p	2	3	4	5	6	7	8
$SSR_{.05}$	3.00	3.15	3.23	3.30	3.34	3.37	3.39
$SSR_{.01}$	4.13	4.34	4.45	4.54	4.60	4.67	4.72
$LSR_{.05}$	45.54	47.82	49.03	50.09	50.70	51.16	51.46
$LSR_{.01}$	62.69	65.88	67.55	68.92	69.83	70.89	71.65

$LSR\ \alpha_{,p} = (SSR\ \alpha_{,p})(S_{\bar{y}})$, $S_{\bar{y}} = 3.42$

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's new multiple range test

T_2(1,000) T_8(50% DMSO)

(126.34 – 14.56) = 111.78 > 71.65 ($LSR_{.01,8}$)

T_2(1,000) T_1(0)

(126.34 – 100.05) = 26.29 < 51.16 ($LSR_{.05,7}$)

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01 แต่ไม่มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพล

T_3(1,500) T_8(50% DMSO)

(125.57 – 14.56) = 111.01 > 70.89 ($LSR_{.01,7}$)

T_3(1,500) T_1(0)

(125.57 – 100.05) = 25.52 < 50.70 ($LSR_{.05,6}$)

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01 แต่ไม่มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T_6(3,000) T_8(50% DMSO)

$(123.77 - 14.56) = 109.21 > 69.86$ $(LSR_{.01,6})$

T_6(3,000) T_1(0)

$(123.77 - 100.05) = 23.72 < 50.09$ $(LSR_{.05,5})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01 แต่ไม่มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพล

T_7(4,000) T_8(50% DMSO)

$(123.11 - 14.56) = 108.55 > 68.92$ $(LSR_{.01,5})$

T_7(4,000) T_1(0)

$(123.11 - 100.05) = 23.06 < 49.03$ $(LSR_{.05,4})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01 แต่ไม่มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพล

T_5(2,500) T_8(50% DMSO)

$(122.36 - 14.56) = 107.80 > 67.55$ $(LSR_{.01,4})$

T_5(2,500) T_1(0)

$(122.36 - 100.05) = 22.31 < 47.82$ $(LSR_{.05,3})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01 แต่ไม่มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T_4(2,000) T_8(50% DMSO)

$(118.04 - 14.56) = 103.48 > 65.88$ $(LSR_{.01,3})$

T_4(2,000) T_1(0)

$(118.04 - 100.05) = 17.99 < 45.54$ $(LSR_{.05,2})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01 แต่ไม่มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพล

T_1(0) T_8(50% DMSO)

$(100.05 - 14.56) = 85.49 > 62.69$ $(LSR_{.01,2})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในที่ไม่มีสารสกัดไพลมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01

ดังนั้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมงพบว่าร้อยละการมีชีวิตรอดในทุกความเข้มข้นและกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับ 50% DMSO

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค-14 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) KMITL-HA-E1 p 167 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (กรองสารสกัดไพลโดยใช้กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร) เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test

ความเข้มข้นของสารสกัดไพล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต			ผลรวม	ค่าเฉลี่ย[1/]
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	100.02	100.05	99.90	299.97	99.99^{ab}
1,250	110.82	103.25	110.46	324.53	108.18^{a}
2,000	89.97	107.71	106.66	304.34	101.45^{a}
2,500	108.15	97.00	100.51	305.66	101.89^{a}
3,000	79.19	100.63	105.43	285.25	95.08^{abc}
4,000	86.05	82.85	87.09	255.99	85.33^{c}
5,000	76.13	86.48	98.05	260.66	86.89^{bc}
1.65% DMSO	98.30	108.33	106.51	313.14	104.38^{a}
50% DMSO	12.63	11.39	12.60	36.62	12.21^{d}
				2,386.16	88.38

[1/] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

(ก.) Correction factor

$$C.F. = \frac{(G.T)^2}{(t)(r)}$$

$$= \frac{2{,}386.16^2}{27}$$

$$= 210{,}879.98$$

(ข.) Sum of squares

Total SS = ผลบวกของ (ข้อมูลจากแต่ละหน่วยการทดลอง)^2 – C.F.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$= (100.02)^2+(100.05)^2+\ldots+(12.60)^2 - C.F.$

$= 232,862.51 - 210,879.98$

$= 21,982.53$

Treatment SS $= \frac{T_1^2+\ldots T_t^2}{r}$

$= \frac{(299.97)^2+(324.53)^2+\ldots+(36.62)^2}{3} - C.F.$

$= 231,864.12 - 210,879.98$

$= 20,984.14$

Error SS $= 21,982.53 - 20,984.14$

$= 998.39$

(ค.) Mean squares

Treatment MS $= \frac{\text{Treatment SS}}{(t-1)}$

$= \frac{20,984.14}{(9-1)}$

$= 2,623.02$

Error MS $= \frac{\text{Error SS}}{t(r-1)}$

$= \frac{998.39}{18}$

$= 55.47$

(ง.) F-value

$F = \frac{\text{Treatment MS}}{\text{Error MS}}$, มี df เท่ากับตัวตั้งและตัวหาร

$= \frac{2,623.02}{55.47}$ df - 7,16

$F_{8,18} = 47.29$ $F_{7,16}(0.01) = 3.71$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(จ.) คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of variation, C.V.)

$$C.V. = \frac{\sqrt{\text{error mean square}}}{\text{grand mean}} \times 100 \ \%$$

$$= \frac{\sqrt{55.47}}{88.38} \times 100$$

$$= 8.43 \ \%$$

แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตาราง

ตารางผนวก ค- 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆ

Source of Variation	df	SS	MS	F_c
Concentration	8	20,984.14	2,623.02	47.29**
Error	18	998.39	55.47	
Total	26	21,982.53		

C.V. = 8.43 %

$F.05_{(8,18)}$ = 2.51 $F.01_{(8,18)}$ = 3.71

**ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01 (ร้อยละ 99)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

(1) จัดเรียงค่าเฉลี่ยตามลำดับ

อันดับ (rank)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ความเข้มข้นของสารสกัดไพล	T_2 (1,250)	T_8 (1.65% DMSO)	T_4 (2,500)	T_3 (2,000)	T_1 (0)	T_5 (3,000)	T_7 (5,000)	T_6 (4,000)	T_9 (50% DMSO)
ค่าเฉลี่ย	108.18	104.38	101.89	101.45	99.99	95.08	86.89	85.33	12.21

(2) คำนวณค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error, $S_{\bar{y}}$)

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{error\ \ mean\ \ square}{r}}$$

$$= \sqrt{\frac{55.47}{3}}$$

$$= 4.30$$

(3) คำนวณค่า "Least significant ranges" (LSR) สำหรับช่วงการเปรียบเทียบต่างๆ โดยอาศัยตาราง "Singnificant Studentized Ranges" (SSR)

จากการทดลอง d.f. error = 18

p = (ผลต่างของอันดับ + 1)

จากการทดลอง d.f. ของ error เท่ากับ 18 และ $S_{\bar{y}}$ เท่ากับ 4.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค-16 แสดงค่า least significant range (LSR) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

p	2	3	4	5	6	7	8	9
$SSR_{.05}$	2.97	3.12	3.21	3.27	3.32	3.35	3.37	3.39
$SSR_{.01}$	4.07	4.27	4.38	4.46	4.53	4.59	4.64	4.68
$LSR_{.05}$	12.77	13.42	13.80	14.06	14.28	14.41	14.49	14.58
$LSR_{.01}$	17.50	18.36	18.83	19.18	19.48	19.47	19.95	20.12

$LSR_{\alpha,p} = (SSR_{\alpha,p})(S_{\bar{y}})$, $S_{\bar{y}} = 4.30$

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's new multiple range test

$T_2(1,250)$ $T_9(50\%DMSO)$

$(108.18-12.21) = 95.97 > 20.12$ $(LSR_{.01,9})$

$T_2(1,250)$ $T_6(4,000)$

$(108.18-85.33) = 22.85 > 19.95$ $(LSR_{.01,8})$

$T_2(1,250)$ $T_7(5,000)$

$(108.18-86.89) = 21.29 > 19.74$ $(LSR_{.01,7})$

$T_2(1,250)$ $T_5(3,000)$

$(108.18-95.08) = 13.10 < 14.28$ $(LSR_{.01,6})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพล 1,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างกับร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50%DMSO และในสารสกัดไพลความเข้มข้น 4,000 และ 5,000 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเป็นไปได้ .01 และไม่แตกต่างกับร้อยละของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่สารสกัดไพล (0) เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้น 2,000 2,500 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารผสมที่มี 1.65%DMSO

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T_8(1.65%DMSO) T_9(50%DMSO)

(104.38-12.21) = 92.17 > 19.95 ($LSR_{.01,8}$)

T_8(1.65%DMSO) T_6(4,000)

(104.38-85.33) = 19.05 > 14.41 ($LSR_{.05,7}$)

T_8(1.65%DMSO) T_7(5,000)

(104.38-86.89) = 17.49 > 14.28 ($LSR_{.05,6}$)

T_8(1.65%DMSO) T_5(3,000)

(104.38-95.08) = 9.30 < 14.06 ($LSR_{.05,5}$)

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสม 1.65% DMSO มีความแตกต่างจากที่เพาะเลี้ยงใน 50% DMSO ในสารสกัดไพลความเข้มข้น 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเป็นไปได้ .05 แต่ไม่มีความแตกต่างกับร้อยละของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่สารสกัดไพล (0) ในอาหารที่ใส่ 1.65% DMSO ในสารสกัดไพลความเข้มข้น 1,250 2,000 2,500 และ 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

T_4(2,500) T_9(50%DMSO)

(101.89-12.21) = 89.68 > 19.74 ($LSR_{.01,7}$)

T_4(2,500) T_6(4,000)

(101.89-85.33) = 16.56 > 14.28 ($LSR_{.05,6}$)

T_4(2,500) T_7(5,000)

(101.89-86.89) = 15.00 > 14.06 ($LSR_{.05,5}$)

T_4(2,500) T_5(3,000)

(101.89-95.08) = 6.81 < 13.80 ($LSR_{.05,4}$)

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้น 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากที่เพาะเลี้ยงใน 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01 และในสารสกัดไพลความเข้มข้น 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเป็นไปได้ .05 แต่ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีความแตกต่างจากร้อยละของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่สารสกัดไพล (0) ในอาหารที่ใส่ 1.65% DMSO ในสารสกัดไพลความเข้มข้น 1,250 2,000 2,500 และ 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

T_3(2,000) T_9(50%DMSO)

(101.45-12.21) = 89.24 > 19.48 ($LSR_{.01,6}$)

T_3(2,000) T_9(50%DMSO)

(101.45-12.21) = 89.24 > 19.48 ($LSR_{.01,6}$)

T_3(2,000) T_6(4,000)

(101.45-85.33) = 16.12 > 14.06 ($LSR_{.05,5}$)

T_3(2,000) T_7(5,000)

(101.45-86.89) = 14.56 > 13.80 ($LSR_{.05,4}$)

T_3(2,000) T_5(3,000)

(101.45-95.08) = 6.37 < 13.42 ($LSR_{.05,3}$)

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01 และในสารสกัดไพลความเข้มข้น 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเป็นไปได้ .05 แต่ไม่มีความแตกต่างจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่สารสกัดไพล (0) ในอาหารที่เติม 1.65% DMSO ในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้น 1,250 2,000 2,500 และ 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

T_1(0) T_9(50% DMSO)

(99.99-12.21) = 87.78 > 19.18 ($LSR_{.01,5}$)

T_1(0) T_6(4,000)

(99.99-85.33) = 14.66 > 13.80 ($LSR_{.05,4}$)

T_1(0) T_7(5,000)

(99.99-86.89) = 13.10 < 13.42 ($LSR_{.05,3}$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีสารสกัดไพลมีความแตกต่างจากที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01 และในสารสกัดไพลความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ระดับความเป็นไปได้ .05 แต่ไม่มีความแตกต่างจากร้อยละของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสม 1.65% DMSO และในสารสกัดไพลความเข้มข้น 1,250 2,000 2,500 3,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

T_5(3,000) T_9(50% DMSO)

(95.08-12.21) = 82.87 > 18.83 ($LSR_{.01,4}$)

T_5(3,000) T_6(4,000)

(95.08-85.33) = 9.75 < 13.42 ($LSR_{.05,3}$)

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้น 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01 แต่ไม่มีความแตกต่างจากร้อยละของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 1.65% DMSO ในอาหารที่ไม่มีสารสกัดไพล และในอาหารที่มีสารสกัดไพลความเข้มข้น 1,250 2,000 2,500 3,000 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

T_7(5,000) T_9(50% DMSO)

(86.89-12.21) = 74.68 > 18.36 ($LSR_{.01,3}$)

T_7(5,000) T_6(4,000)

(86.89-85.33) = 1.56 < 12.77 ($LSR_{.05,2}$)

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01 แต่ไม่มีความแตกต่างจากร้อยละของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดไพลความเข้มข้น 3,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T_6(4,000) T_9(50% DMSO)

(85.33-12.21) = 73.12 > 17.50 ($LSR_{.01.2}$)

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01

ตารางผนวก ค-17 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) KMITL-HA-E1 p 167 เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นต่างๆ (กรองสารสกัดไพลโดยใช้กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร) เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test

ความเข้มข้นของสารสกัดไพล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต			ผลรวม	ค่าเฉลี่ย[1/]
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	99.97	99.99	100.01	299.97	99.99[a]
1,250	96.88	99.67	99.48	296.03	98.68[a]
2,000	94.82	99.42	98.66	292.90	97.63[ab]
2,500	88.49	97.22	96.19	281.90	93.97[b]
3,000	93.99	92.31	95.42	281.72	93.91[b]
4,000	86.19	90.82	86.31	263.32	87.77[c]
5,000	83.95	80.92	79.49	244.36	81.45[d]
1.65% DMSO	99.73	101.49	97.52	298.74	99.58[a]
50% DMSO	18.85	24.90	21.09	64.84	21.61[e]
				2,323.78	86.07

[1/] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก.) Correction factor

$$\text{C.F.} = \frac{(G.T)^2}{(t)(r)}$$

$$= \frac{2{,}323.78^2}{27}$$

$$= 199{,}998.28$$

(ข.) Sum of squares

Total SS = ผลบวกของ (ข้อมูลจากแต่ละหน่วยการทดลอง)^2 – C.F.

$$= (99.97)^2+(99.99)^2+\ldots+(21.09)^2 - \text{C.F.}$$

$$= 215{,}031.31 - 199{,}998.28$$

$$= 15{,}033.03$$

Treatment SS $= \frac{T_1^2+\ldots T_i^2}{r}$

$$= \frac{(299.97)^2+(296.03)^2+\ldots+(64.84)^2}{3} - \text{C.F.}$$

$$= 214{,}913.00 - 199{,}998.28$$

$$= 14{,}914.72$$

Error SS = 15,033.03 - 14,914.72

= 118.31

(ค.) Mean squares

Treatment MS $= \frac{\text{Treatment SS}}{(t - 1)}$

$$= \frac{14{,}914.72}{8}$$

$$= 1{,}864.34$$

Error MS $= \frac{\text{Error SS}}{t(r - 1)}$

$$= \frac{118.31}{18}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

= 6.57

(ง.) F-value

$F = \frac{\text{Treatment MS}}{\text{Error MS}}$, มี df เท่ากับตัวตั้งและตัวหาร

$= \frac{1,864.34}{6.57}$ df - 7,16

$F_{8,18} = 283.77$ $F.01_{(8,18)} = 3.71$

(จ.) คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of variation, C.V.)

$C.V. = \frac{\sqrt{\text{error mean square}}}{\text{grand mean}} \times 100 \ \%$

$= \frac{\sqrt{6.57}}{86.07} \times 100$

= 2.98 %

แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตาราง

ตารางผนวก ค-18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆ

Source of Variation	df	SS	MS	F_c
Concentration	8	14,914.72	1,864.34	283.77**
Error	18	118.31	6.57	
Total	26	15,033.03		

C.V. = 2.98 %

$F.05_{(8.18)}$ = 2.51 $F.01_{(8.18)}$ = 3.71

**ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลความเข้มข้นต่างๆมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01 (ร้อยละ 99)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการคำนวณค่า F_c ที่ได้จากการทดลองมีค่าเท่ากับ 283.77 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่า $F.05_{(8,18)}$ และ $F.01_{(8,18)}$ ดังนั้นจึงสรุปว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอย่างน้อย 2 ชนิดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

(1) จัดเรียงค่าเฉลี่ยตามลำดับ

อันดับ (rank)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ความเข้มข้นของสารสกัดไพล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	T_1 (0)	T_8 (1.65% DMSO)	T_2 (1,250)	T_3 (2,000)	T_4 (2,500)	T_5 (3,000)	T_6 (4,000)	T_7 (5,000)	T_9 (50% DMSO)
ค่าเฉลี่ย	99.99	99.58	98.68	97.63	93.97	93.91	87.77	81.45	21.61

(2) คำนวณค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error, $S_{\bar{y}}$)

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{error\ \ mean\ \ square}{r}}$$

$$= \sqrt{\frac{6.57}{3}}$$

$$= 1.48$$

(3) คำนวณค่า "Least significant ranges" (LSR) สำหรับช่วงการเปรียบเทียบต่างๆ โดยอาศัยตาราง "Singnificant Studentized Ranges" (SSR)

จากการทดลอง d.f. error = 18

p = (ผลต่างของอันดับ + 1)

จากการทดลอง d.f. ของ error เท่ากับ 18 และ $S_{\bar{y}}$ เท่ากับ 1.48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค-19 แสดงค่า least significant range (LSR) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test

p	2	3	4	5	6	7	8	9
$SSR_{.05}$	2.97	3.12	3.21	3.27	3.32	3.35	3.37	3.39
$SSR_{.01}$	4.07	4.27	4.38	4.46	4.53	4.59	4.64	4.68
$LSR_{.05}$	4.40	4.62	4.75	4.84	4.91	4.96	4.99	5.02
$LSR_{.01}$	6.02	6.32	6.48	6.60	6.70	6.79	6.87	6.93

$LSR_{\alpha,p} = (SSR_{\alpha,p})(S_{\bar{y}})$, $S_{\bar{y}} = 1.48$

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's new multiple range test

$T_1(0)$ $T_9(50\%DMSO)$

$(99.99-21.61) = 78.38 > 6.93$ $(LSR_{.01,9})$

$T_1(0)$ $T_7(5,000)$

$(99.99-81.45) = 18.54 > 6.87$ $(LSR_{.01,8})$

$T_1(0)$ $T_6(4,000)$

$(99.99-87.77) = 12.22 > 6.79$ $(LSR_{.01,7})$

$T_1(0)$ $T_5(3,000)$

$(99.99-93.91) = 6.08 > 4.91$ $(LSR_{.05,6})$

$T_1(0)$ $T_4(2,500)$

$(99.99-93.97) = 6.02 > 4.84$ $(LSR_{.05,5})$

$T_1(0)$ $T_3(2,000)$

$(99.99-97.63) = 2.36 < 4.75$ $(LSR_{.05,4})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่สารสกัดไพลมีความแตกต่างจากที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 50% DMSO และในสารสกัดไพลความเข้มข้น 2,500 3,000 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีความแตกต่างกับร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสม 1.65% DMSO และในสารสกัดไพลความเข้มข้น 1,250 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

T_8(1.65% DMSO) T_9(50%DMSO)

(99.58-21.61) = 77.97 > 6.87 ($LSR_{.01,8}$)

T_8(1.65% DMSO) T_7(5,000)

(99.58-81.45) = 18.13 > 6.79 ($LSR_{.01,7}$)

T_8(1.65% DMSO) T_6(4,000)

(99.58-87.77) = 11.81 > 6.70 ($LSR_{.01,6}$)

T_8(1.65% DMSO) T_5(3,000)

(99.58-93.91) = 5.67 > 4.84 ($LSR_{.05,5}$)

T_8(1.65% DMSO) T_4(2,500)

(99.58-93.97) = 5.61 > 4.75 ($LSR_{.05,4}$)

T_8(1.65% DMSO) T_3(2,000)

(99.58-97.63) = 1.95 < 4.62 ($LSR_{.05,3}$)

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสม 1.65% DMSO มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสม 50% DMSO และในสารสกัดไพลที่มีความเข้มข้น 2,500 3,000 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 1,250 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

T_2(1,250) T_9(50%DMSO)

(98.68-21.61) = 77.07 > 6.79 ($LSR_{.01,7}$)

T_2(1,250) T_7(5,000)

(98.68-81.45) = 17.23 > 6.70 ($LSR_{.01,6}$)

T_2(1,250) T_6(4,000)

(98.68-87.77) = 10.91 > 6.60 ($LSR_{.01,5}$)

T_2(1,250) T_5(3,000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$(98.68-93.91) = 4.77 > 4.75 \quad (LSR_{.05,4})$

$T_2(1,250) \qquad T_4(2,500)$

$(98.68-93.97) = 4.71 > 4.62 \quad (LSR_{.05,3})$

$T_2(1,250) \qquad T_3(2,000)$

$(98.68-97.63) = 1.05 < 4.40 \quad (LSR_{.05,2})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสมสารสกัดไพลเข้มข้น 1,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสม 50% DMSO และในสารสกัดไพลที่มีความเข้มข้น 2,500 3,000 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่แตกต่างจากร้อยละของเซลล์มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสม 1.65% DMSO และในสารสกัดไพลเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$T_3(2,000) \qquad T_9(50\%DMSO)$

$(97.63-21.61) = 76.02 > 6.70 \quad (LSR_{.01,6})$

$T_3(2,000) \qquad T_7(5,000)$

$(97.63-81.45) = 16.18 > 6.60 \quad (LSR_{.01,5})$

$T_3(2,000) \qquad T_6(4,000)$

$(97.63-87.77) = 9.86 > 6.48 \quad (LSR_{.01,4})$

$T_3(2,000) \qquad T_5(3,000)$

$(97.63-93.91) = 3.72 < 4.62 \quad (LSR_{.05,3})$

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO และในสารสกัดไพลความเข้มข้น 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีความแตกต่างจากร้อยละของเซลล์มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดไพลเข้มข้น 2,500 และ 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T_4(2,500) T_9(50%DMSO)

(93.97-21.61) = 72.36 > 6.60 ($LSR_{.01,5}$)

T_4(2,500) T_7(5,000)

(93.97-81.45) = 12.52 > 6.48 ($LSR_{.01,4}$)

T_4(2,500) T_6(4,000)

(93.97-87.77) = 6.20 > 4.62 ($LSR_{.05,3}$)

T_4(2,500) T_5(3,000)

(93.97-93.91) = 0.06 < 4.40 ($LSR_{.05,2}$)

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO และในสารสกัดไพลเข้มข้น 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีความแตกต่างจากที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

T_5(3,000) T_9(50%DMSO)

(93.91-21.61) = 72.30 > 6.48 ($LSR_{.01,4}$)

T_5(3,000) T_7(5,000)

(93.91-81.45) = 12.46 > 6.32 ($LSR_{.01,3}$)

T_5(3,000) T_6(4,000)

(93.91-87.77) = 6.14 < 6.02 ($LSR_{.01,2}$)

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดเข้มข้น 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสม 50% DMSO และในสารสกัดไพลเข้มข้น 4,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ระดับความเป็นไปได้ .01

T_6(4,000) T_9(50%DMSO)

(87.77-21.61) = 66.16 > 6.32 ($LSR_{.01,3}$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T_6(4,000) T_7(5,000)

(87.77-81.45) = 6.32 > 6.02 ($LSR_{.01,2}$)

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO และในสารสกัดไพลที่มีความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ระดับความเป็นไปได้ .01

T_7(5,000) T_9(50% DMSO)

(81.45-21.61) = 59.84 > 6.02 ($LSR_{.01,2}$)

สรุป ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดไพลเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสม 50% DMSO ที่ระดับความเป็นไปได้ .01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้