

คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก
สารสกัดใบต้นเนียมหูเสือ

Antioxidant and Biological properties in Mexican mint (*Plectranthus
amboinicus* (Lour.) Spreng.) extracts.

ปานทิพย์ รัตนศิลป์กุลชาญ
กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2565

ชื่อเรื่อง	คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดใบต้นเนียมหูเสือ
ผู้วิจัย	ปานทิพย์ รัตนศิลป์กุลชาญ (ปร.ด. ชีวเคมี), ผู้ช่วยศาสตราจารย์ กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ (ปร.ด. ชีวเคมี), ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สถาบัน	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีที่พิมพ์	2567
สถานที่พิมพ์	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
จำนวนหน้างานวิจัย	37 หน้า
คำสำคัญ	<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng. ต้นเนียมหูเสือ การออกฤทธิ์สมานแผล สารต้านอนุมูลอิสระ การต้านเชื้อจุลชีพ
ลิขสิทธิ์	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

ต้นเนียมหูเสือ (Mexican mint) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng เป็นพืชพันธุ์ไม้พุ่มที่มีการกระจายพันธุ์ในสภาพอากาศแบบเขตร้อนชื้น และกึ่งร้อนชื้นพบได้ทั่วไปในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีสรรพคุณทางยาที่ได้รับการบันทึกไว้ในตำรายาสมุนไพรพื้นบ้านของไทย การเตรียมสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือใช้วิธีการแช่ในตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นลำดับขั้น คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มีค่าร้อยละการสกัดเท่ากับ 5.28, 3.77 และ 5.86 ตามลำดับ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแต่ละชั้นของตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน มีค่าการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้ปริมาณของอนุมูลอิสระเหลือครึ่งหนึ่ง (IC₅₀) ด้วยวิธีทดสอบ DPPH และ ABTS scavenging เท่ากับ 1.58 ± 0.10 และ 0.021 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รวมทั้งมีค่าการต้านอนุมูลอิสระต่อวิธี FRAP เท่ากับ 2.133 ± 0.053 ไมโครโมลของ FeSO₄·7H₂O ต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัมที่ใช้ในการสกัด ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่มากที่สุด พบในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน มีค่าเท่ากับ 0.500 ± 0.008 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัมที่ใช้ในการสกัด และ 0.773 ± 0.018 มิลลิกรัมของเคออสตินต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัมที่ใช้ในการสกัด ตามลำดับ สารสกัดจากชั้นตัวทำละลายทั้งสามชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ

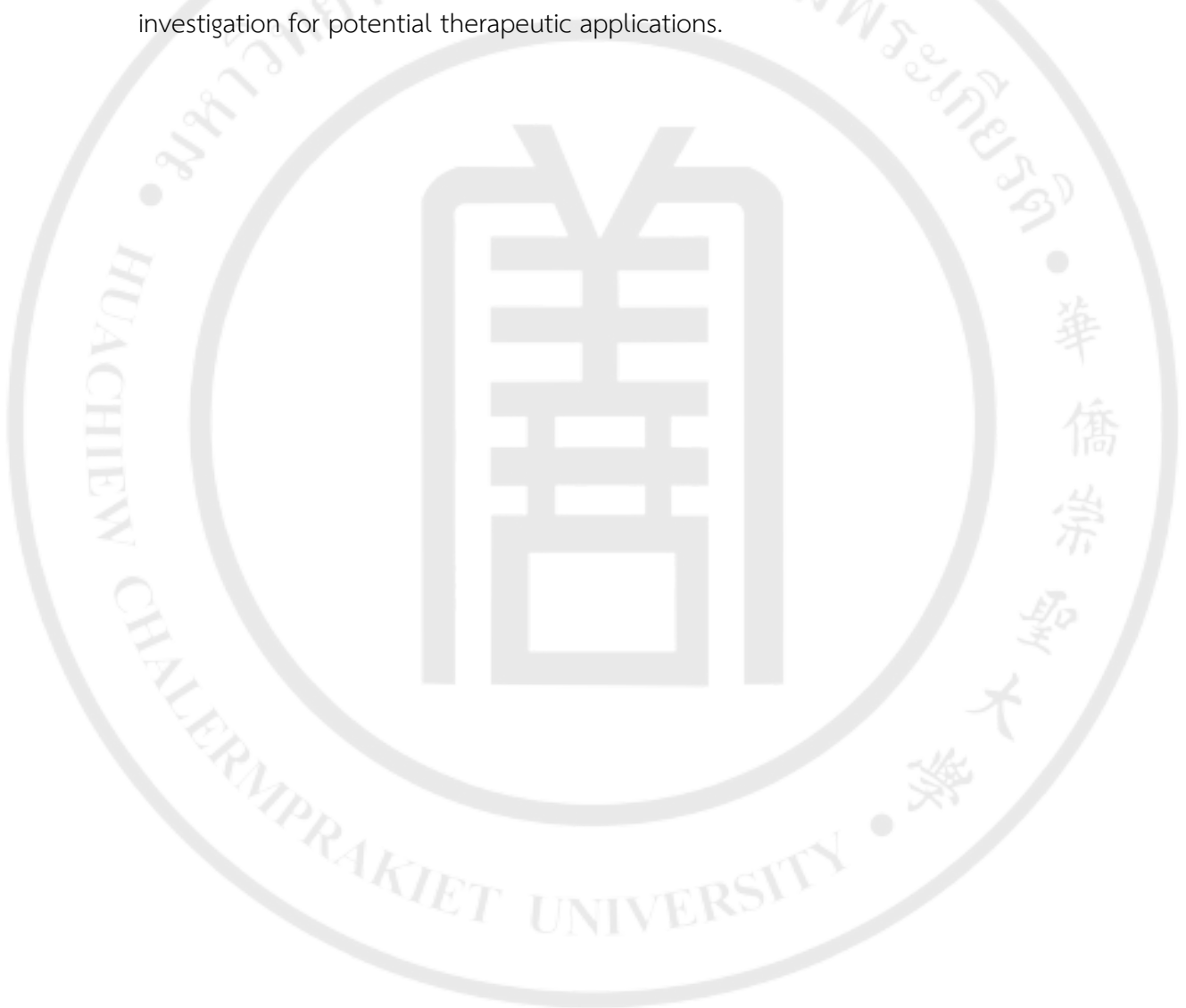
แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในมนุษย์ และเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Escherichia coli* (ATCC 25922) และ *Plesiomonas shigelloides* การทดสอบกับความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT ไม่พบความเป็นพิษจากผลของสารสกัดที่ได้จากชั้นตัวทำละลายทั้งสามชนิด มีอัตราการรอดของเซลล์ทดสอบมากกว่า ร้อยละ 80 เมื่อใช้ช่วงความเข้มข้นของสารสกัดที่ 6.25-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากที่ได้จากชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีประสิทธิภาพในการสมานแผลของเซลล์ทดสอบดีที่สุด โดยความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสังเกตเห็นกลุ่มเซลล์เชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์ในวันที่สองของการทดลอง ทางกลุ่มผู้วิจัยคาดหวังว่างานวิจัยนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อพัฒนาความรู้ทางด้านเภสัชวิทยา และสามารถประยุกต์ใช้ในทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ต่อไปได้

Research title	Antioxidant and Biological properties in Mexican mint (<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.) extracts.
Researchers	Asst. Prof. Panthip Rattanasinganchan, Ph.D. (Biochemistry) Asst. Prof. Kittipat Sophithammakhun, Ph.D. (Biochemistry)
Institution	Huachiew Chalermprakiet University
Year of Publication	2024
Publisher	Huachiew Chalermprakiet University
Sources	Huachiew Chalermprakiet University
No. of Pages	37 pages
Keywords	<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng. Mexican mint, wound healing activity, antioxidant agent, Antimicrobial activity
Copyright	Huachiew Chalermprakiet University

Abstract

Mexican mint, scientifically known as *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (PA), is a shrub-like plant that thrives in tropical and semi-tropical climates, widely found in Southeast Asia. It has medicinal properties documented in traditional Thai herbal remedies. The PA leave extract is prepared by sequential maceration techniques using the varying solvent polarities, including hexane, ethyl acetate, and methanol. The percentage of extraction yield can calculate to be 5.28, 3.77, and 5.86 respectively. The hexane extract exhibited the highest antioxidant activity, with half-maximum inhibitory concentration at 50% (IC₅₀) values of 1.58 ± 0.10 and 0.021 ± 0.001 mg/mL in DPPH and ABTS scavenging assay, respectively. The FRAP value can calculate to be $2.133 \pm 0.053 \mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O gram}^{-1}$ dry material. The highest total phenolic and flavonoid contents were determined in the hexane extract with 0.500 ± 0.008 mg of gallic acid gram⁻¹ dry material and 0.773 ± 0.018 mg of quercetin per gram⁻¹ dry material, respectively. The PA leave extracts prepared using various solvents exhibited potent antibacterial activity against antibiotic-resistant strains of *Acinetobacter*

baumannii (ATCC 19606), *Escherichia coli* (ATCC 25922), and *Plesiomonas shigelloides*. *In vitro* cytotoxicity assays, HaCaT cells revealed non-significant toxicity at concentrations ranging from 6.25 to 200 ng/mL. Furthermore, the ethyl acetate extract demonstrated promising wound-healing properties, promoting cell migration, and complete closure at a concentration of 25 ng/mL. These findings suggest that *P.amboinicus* possesses valuable pharmacological properties and warrants further investigation for potential therapeutic applications.



กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สำหรับการใช้เครื่องระเหยสารให้แห้ง rotary evaporator

บริษัทซัมมอร์ พรินซ์ชั่น จำกัด ในการสนับสนุนกล้อง zeiss ในการถ่ายรูป wound healing

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติพัฒน์ ไสภิตธรรมคุณ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ	3
1.6 สมมติฐานของการวิจัย	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	10
3.1 ตัวอย่างใบต้นเนียมหูเสือ	10
3.2 ขั้นตอนการสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน	10
3.3 การทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ	10
3.4 การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์	12
3.5 การทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย	12
3.6 การทดสอบคุณสมบัติการสมานแผลด้วยวิธีการ wound healing assay	13
3.7 การทดสอบค่าทางสถิติ	14

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	15
4.1 สารสกัดจากใบต้นเนียมหูลือที่ได้จากการแช่ในตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นต่างกัน	15
4.2 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยระบบ DPPH, ABTS scavenging และ FRAP assay	16
4.3 ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์	16
4.4 คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย	17
4.5 ผลการสแกนแผลในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT	24
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	30
บรรณานุกรม	34
ภาคผนวก	35
ประวัติผู้วิจัยโดยย่อ	36
ความคิดเห็นของผู้บังคับบัญชา	38
การพิสูจน์อักษรวิธี	39

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล และคุณสมบัติในการละลายในตัวทำละลายเมทานอล	15
ตารางที่ 2 ค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีทดสอบ DPPH, ABTS scavenging และ FRAP assay ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือด้วยการใช้ตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล	17
ตารางที่ 3 ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone diameter, IZD) จากการใช้สารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือในตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันด้วยวิธีการทดสอบ “agar well diffusion”	19

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 4.1 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากตัวทำละลาย “เฮกเซน”	21
รูปที่ 4.2 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากตัวทำละลาย “เอทิลอะซิเตท”	22
รูปที่ 4.3 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากตัวทำละลาย “เมทานอล”	23
รูปที่ 4.4 การกระจายตัวของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด HaCaT รูปแบบ monolayer ทำการบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ	24
รูปที่ 4.5 ร้อยละของการอยู่รอดของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด HaCaT จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay	25
รูปที่ 4.6 แสดงพื้นที่รอยแผลบนเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT ที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน	27
รูปที่ 4.7 แสดงค่าร้อยละพื้นที่รอยแผลของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด HaCaT ด้วยการทดสอบด้วยสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน	27
รูปที่ 4.8 แสดงพื้นที่รอยแผลบนเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT ที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท	28
รูปที่ 4.9 แสดงค่าร้อยละพื้นที่รอยแผลของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด HaCaT ด้วยการทดสอบด้วยสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท	28
รูปที่ 4.10 แสดงพื้นที่รอยแผลบนเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT ที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเมทานอล	29
รูปที่ 4.11 แสดงค่าร้อยละพื้นที่รอยแผลของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด HaCaT ด้วยการทดสอบด้วยสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเมทานอล	29

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มา และความสำคัญของปัญหาการวิจัย

“สมุนไพร” มีความเชื่อมโยงกับวิถีชีวิตของคนไทยเป็นระยะเวลายาวนานแล้ว ไม่ว่าจะเป็นการนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเพื่อการบริโภคในครัวเรือน ส่วนประกอบของตำรับยารักษาโรคแผนโบราณ ซึ่งเป็นอีกหนึ่งภูมิปัญญาที่ส่งผ่านจากรุ่นสู่รุ่น การใช้สมุนไพรเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เกี่ยวข้องกับความสวยงาม เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีการนำไปใช้ในธุรกิจสปา และการนวดแผนไทย ถึงแม้ว่าประเทศไทยจะมีข้อได้เปรียบทางด้านภูมิศาสตร์ที่มีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรธรรมชาติ มีความหลากหลายของชนิดพันธุ์พืช แต่ทว่าในการศึกษาวิจัยเชิงลึก และการนำเอาองค์ความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์สมัยใหม่ ยังคงอยู่ในสัดส่วนที่น้อย หากอ้างอิงตามข้อมูลแผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยเรื่องการพัฒนาสมุนไพร พ.ศ. 2560-2564 จำนวนชนิดพันธุ์พืชของสมุนไพรที่สำรวจพบในประเทศไทย 11,625 ชนิด มีเพียง 1,800 ชนิด หรือคิดเป็นสัดส่วนเพียงร้อยละ 15.5 ของการศึกษาและวิจัยทางด้านวิชาการที่เกี่ยวกับพืชสมุนไพรไทย [1] จะเห็นได้ว่าการวิจัยเชิงลึกเกี่ยวกับสมุนไพร ทั้งทางคุณสมบัติทางเคมี และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการนำไปใช้ และประยุกต์กับแนวทางเภสัชวิทยา และการแพทย์สมัยใหม่ ยังคงเป็นเรื่องที่มีความน่าสนใจ และมีอีกหลายแง่มุมสำหรับการศึกษาค้นคว้า รวมทั้งยังมีพื้นที่ให้วิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เภสัชศาสตร์ และประยุกต์ใช้ทางวิทยาศาสตร์การแพทย์

การศึกษาวิจัย และการประยุกต์ใช้ความรู้จากสมุนไพรไทยในปัจจุบันนั้น ได้ถูกนำมาใช้เป็นอีกหนึ่งทางเลือกเพื่อเสริมสร้าง และดูแลสุขภาพมากขึ้น เช่น การนำสมุนไพรมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเสริม การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เกี่ยวข้องกับความสวยงาม ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในทางธุรกิจสปา และการนวดแผนไทย เป็นต้น ทั้งนี้ไม่จะเป็นการนำเอาสมุนไพรไปประยุกต์ใช้ในลักษณะทางใดก็ตาม มีความจำเป็นต้องมีการศึกษาสรรพคุณทางยา และคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งเรื่องความปลอดภัยต่อผู้บริโภค องค์ความรู้เหล่านี้ล้วนมาจากการศึกษาด้วยหลักการทางวิทยาศาสตร์ การทดลอง วิจัย เพื่อสร้างให้เกิดงานวิจัยพื้นฐานเพื่อนำไปสู่การต่อยอดองค์ความรู้ หรือนวัตกรรมต่อไปในอนาคต แต่การที่จะได้มาซึ่งความรู้เหล่านี้ ย่อมต้องมีการศึกษาวิจัยอย่างเป็นระบบ เช่น ชนิดพันธุ์ของสมุนไพรที่สนใจศึกษา วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ และการพัฒนาวิธีการเพาะปลูกให้ได้สมุนไพรที่มีคุณภาพ วิธีการเก็บเกี่ยวเพื่อนำไปแปรรูป อีกสิ่งหนึ่งที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับพืชสมุนไพร คือ การวิจัยพื้นฐานที่สามารถอธิบายถึงสรรพคุณ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งในเรื่องข้อจำกัดของการนำไปใช้ ซึ่งก็รวมถึงความปลอดภัยของสมุนไพรที่นำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่กล่าวไปแล้วข้างต้น จะเห็นได้ว่าเมื่อมีข้อมูลงานวิจัยพื้นฐานที่เกิดจากการวิจัยศึกษาเหล่านี้ ย่อมนำไปสู่การต่อยอดเชิงธุรกิจ ไม่ว่าจะเป็น

การผลิตในระดับครัวเรือน ธุรกิจขนาดเล็ก ธุรกิจขนาดกลาง อีกทั้งยังสามารถพัฒนาต่อยอดผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรในระดับอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

ต้นเนียมหูเสือ หรือ *Plectranthus amboinicus* (Lour.) spreng. เป็นพืชล้มลุกยืนต้น ใบของต้นเนียมหูเสือนิยมกินดิบ เนื่องจากมีกลิ่นที่นิยมในการประกอบอาหาร และเป็นส่วนประกอบของอาหารแบบดั้งเดิม ต้นเนียมหูเสื่อมีคุณสมบัติในการนำมารักษาโรคและมีคุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากโครงสร้างสารไฟโตเคมีคอลจากธรรมชาติซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการ และมีคุณค่าสำหรับอุตสาหกรรมเภสัช ต้นเนียมหูเสือถูกนำมาใช้ในการรักษาพื้นบ้านโดยรักษาอาการที่ในกลุ่มโรคหวัด หอบหืด ลมบ้าหมู ปวดศีรษะ ไอ เป็นไข้ และโรคผิวหนัง ต้นเนียมหูเสื่อมีสารระเหยถึง 76 ชนิด และสารที่ไม่ระเหยถึง 30 ชนิด ที่อยู่ในกลุ่มของ ไฟโตเคมีคอล เช่น monoterpenoids, diterpenoids, triterpenoids, sesquiterpenoids, phenolics, flavonoids, esters, alcohols, และ aldehydes ต้นเนียมหูเสื่อยังมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น antimicrobial, antiinflammatory, antitumor, wound healing, anti-epileptic, larvicidal, antioxidant และ analgesic activities [2]

งานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือ การศึกษาคุณสมบัติทางเคมี ใช้วิธีการเตรียมสารสกัดด้วยการแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้วแตกต่างกัน คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล เรียงลำดับจากความมีขั้วจากน้อยไปหามาก ตามลำดับ สารสกัดในแต่ละชั้นของตัวทำละลาย จะนำไปทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH, ABTS scavenging และ FRAP assay ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้สำหรับการประเมินค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในห้องปฏิบัติการ การหาปริมาณรวมสารออกฤทธิ์สำคัญที่ได้มีการรายงานว่าเป็นสารที่มีความน่าสนใจในเรื่องการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเน้นไปที่สารประกอบสองกลุ่มสำคัญ คือ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ในส่วนของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น สารสกัดในแต่ละชั้นตัวทำละลายที่มีขั้วที่ต่างกัน จะนำไปทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ และคุณสมบัติการสมานแผล ใช้วิธีการทดสอบกับเซลล์ผิวหนัง โดยเป็นการทดสอบแบบ *in vitro* assay ทั้งนี้ทางกลุ่มผู้วิจัยคาดหวังว่างานวิจัยนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการต่อยอด และพัฒนาองค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับทางเภสัชวิทยา รวมทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ในทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อตรวจวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบต้นเนียมหูเสือ ด้วยวิธี DPPH, ABTS scavenging และวิธีการวัดค่า FRAP รวมทั้งการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในแต่ละชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด

1.2.2 เพื่อตรวจวัดปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์

1.2.3 เพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี agar well diffusion

1.2.4 เพื่อทดสอบความสามารถในการสมานบาดแผลในระดับเซลล์โดยทำทดสอบกับเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (human keratinocyte cell)

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

สารสกัดจากใบต้นเนียมหูลือจะใช้ส่วนที่เป็นใบ และบริเวณก้านที่ติดกับใบ โดยจะนำไปอบให้แห้ง แล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นจากน้อยไปมาก คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ สารสกัดที่ได้ในแต่ละชั้นของตัวทำละลาย จะนำไปประเมินคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS scavenging และ FRAP assay ด้วยการเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ สำหรับการวัดปริมาณรวมของสารออกฤทธิ์ในงานวิจัยนี้ จะวัดหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ โดยสารทั้งสองกลุ่มนี้มีการรายงาน และศึกษาวิจัยในพืชหลายชนิด พบว่ามีคุณสมบัติทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายอย่าง เช่น คุณสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรค การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (รายงานผลการทดสอบแบบ *in vitro* assay) เป็นต้น สารสกัดที่ได้จากชั้นตัวทำละลายเหล่านี้ จะนำไปทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ ด้วยวิธี agar well diffusion การทดสอบคุณสมบัติการสมานแผล จะทดสอบด้วยวิธี *in vitro* assay โดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงของมนุษย์ (HaCAT cell, keratinocyte cell) โดยจะประเมินคุณสมบัติในการสมานแผลของกลุ่มเซลล์ด้วยการวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูลือ ด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรวมของสารออกฤทธิ์ในกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ และคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค รวมทั้งคุณสมบัติในการสมานแผลที่ทดสอบด้วยการใช้ตัวอย่างเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ ทางกลุ่มผู้วิจัยมีความคาดหวังว่าข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ จะได้ต่อยอดสู่การทำงานวิจัยเชิงลึก เช่น การแยกสารให้บริสุทธิ์

1.5. นิยามศัพท์เฉพาะ (Definition of Terms)

Maceration

วิธีการสกัดสารด้วยการแช่ในตัวทำละลาย โดยจะใช้การแช่ตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นที่ต่างกัน สำหรับตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เมทานอล เอทานอล รวมทั้งการใช้น้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นสูง ในบางการศึกษาอาจเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดด้วยการเพิ่มอุณหภูมิในระหว่างการแช่ในตัวทำ

ละลาย แต่เพื่อความสะดวกในเรื่องการจัดการ และการเตรียมอุปกรณ์สำหรับการสกัดนั้นโดยมากจะใช้วิธีการแช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยนิยมใช้เวลาในการแช่ในตัวทำละลายประมาณ 5-7 วัน

DPPH scavenging assay

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) คือ อนุมูลอิสระที่มีโครงสร้างทางเคมีที่เสถียรภายใต้สภาวะที่ใช้ในการตรวจวัดในห้องปฏิบัติการ สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงด้วยการใช้เทคนิควัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่มีในห้องปฏิบัติการเคมีทั่วไป DPPH จึงใช้เป็นสารอนุมูลอิสระ ในการเปรียบเทียบ และวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสารที่เราสนใจ โดยใช้หลักการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร สำหรับข้อดีของระบบการทดสอบที่ใช้อนุมูลอิสระ DPPH คือ คุณสมบัติในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเคมี เช่น เอทานอล และ เมทานอล ทั้งนี้โดยทั่วไปแล้วระบบตัวทำละลายเหล่านี้ ส่วนใหญ่จะใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับการสกัดสารตัวอย่างที่เราสนใจศึกษา

ABTS scavenging assay

2,2-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) คือ อนุมูลอิสระอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจวัดในห้องปฏิบัติการ เป็นสารอนุมูลอิสระที่มีเสถียรเมื่ออยู่ในรูป “cation radical” ($ABTS^{+}$) สำหรับ $ABTS^{+}$ ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ค่อนข้างจะมีขี้ เช่น เอทานอล เมทานอล รวมทั้งตัวทำละลายที่มีขี้มาก นั่นคือ น้ำ สำหรับการเปรียบเทียบ และวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสารที่เราสนใจ โดยใช้หลักการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร สำหรับข้อดีของระบบการทดสอบที่ใช้อนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ คือ คุณสมบัติในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเคมี เช่น เอทานอล และ เมทานอล ทั้งนี้โดยทั่วไปแล้วระบบตัวทำละลายเหล่านี้ ส่วนใหญ่จะใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับการสกัดสารตัวอย่างที่เราสนใจศึกษา

FRAP assay

Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay คือ วิธีการวิเคราะห์ และประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่เราสนใจศึกษา ด้วยหลักการของปฏิกิริยา oxidation-reduction ด้วยหลักการเปลี่ยนแปลงค่า oxidation number ของธาตุเหล็กที่อยู่ในรูป Fe^{3+} หรือ “Ferric ion” ให้เปลี่ยนอยู่ในรูปของ Fe^{2+} หรือ “Ferrous ion” ทั้งนี้ Fe^{2+} ที่เกิดขึ้นจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเมื่อทำปฏิกิริยากับ 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) โดยสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าว สามารถวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงในช่วงความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ความรวดเร็วในการตรวจวัดในห้องปฏิบัติการ ใช้เวลาในการบ่มปฏิกิริยาที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับวิธี DPPH และ ABTS scavenging assay แต่วิธีการนี้อาจจะมีข้อจำกัด ในเรื่อง

ของการละลายของสารสกัดในขั้นตอนการทดสอบ สารสกัดควรจะต้องเตรียมได้จากตัวทำละลายที่มีขี้้ว จึงจะเหมาะสมกับวิธีการทดสอบด้วย FRAP assay

UV-VIS spectrophotometer

เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ เรียกว่า “เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์” นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการเคมีทั่วไป ตัวเครื่องจะมีแหล่งกำเนิดแสงที่ให้ความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน ในห้องปฏิบัติการจะนิยมใช้สองประเภท คือ Deuterium lamp ให้ช่วงความยาวคลื่น 190-385 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่มนุษย์มองไม่เห็น เรียกว่า “ultraviolet” (UV) และแหล่งกำเนิดแสงที่ใช้ tungsten lamp ให้ช่วงความยาวคลื่น 400-735 นาโนเมตร เรียกว่า “visible light” เป็นช่วงความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าของมนุษย์

Half-maximum inhibitory concentration (IC₅₀)

ค่าที่ใช้สำหรับการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งของสารทดสอบที่เราสนใจ มีนิยามความหมายคือ ค่าการยับยั้งในวิธีการตรวจวัด เช่น ค่าการดูดกลืนแสง ปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต ที่ใช้ในการทดสอบ เป็นต้น โดยรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารทดสอบ (หน่วยวัดที่ใช้ เช่น ร้อยละ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นต้น) ที่ทำให้เหลือสิ่งที่เรากำลังตรวจวัด ไม่ว่าจะเป็นปริมาณ หรือ ความเข้มข้น เหลืออยู่เพียงครึ่งหนึ่ง

Total phenolic content

สารออกฤทธิ์สำคัญในกลุ่มของ secondary metabolite ที่พบในสัดส่วนที่สูงในพืชทั่วไป สำหรับสารประกอบฟีนอลิกมีการรายงานว่าเป็นสารที่มีความน่าสนใจเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากรายงานการวิจัยพบว่าสารในกลุ่มนี้ มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค คุณสมบัติในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (โดยมากเป็นการรายงานผลที่อ้างอิงการทดลองแบบ *in vitro* assay)

Total flavonoid content

สารที่จัดอยู่ในกลุ่มของ secondary metabolite ในพืชเป็นกลุ่มที่พบได้มากเป็นอันดับต้นๆ ของสารออกฤทธิ์สำคัญที่พบได้ในพืช ปริมาณรวมของสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถพบได้ในสมุนไพรที่มีสีส้มแดง สำหรับการวิจัยพบว่าสารในกลุ่มนี้ มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค คุณสมบัติในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (โดยมากเป็นการรายงานผลที่อ้างอิงการทดลองแบบ *in vitro* assay)

Agar well diffusion

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา วิธีการดังกล่าวนี้ใช้ในการทดสอบสารที่เราสนใจ เช่น ยาปฏิชีวนะ สารสกัดจากสมุนไพร วิธีการทดสอบจะทำโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่เราสนใจบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (agar plate) การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งจะใช้วิธีการเจาะรูปเป็นวงกลมที่มีขนาดที่แน่นอน แล้วเติมสารที่ต้องทดสอบลงไปในรูที่เจาะไว้แล้ว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 วัน แล้วสังเกตว่าหากบริเวณพื้นที่รอบๆ รูที่เจาะไว้ มีลักษณะใส ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งเรียกลักษณะนี้ว่า “clear zone” แสดงให้เห็นได้ว่าสารทดสอบมีคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโต โดยถ้าพบว่ามี clear zone ที่กว้างแสดงว่ายับยั้งได้ดี แต่ในทางตรงข้ามหากไม่เกิด clear zone แสดงว่าสารทดสอบไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่เราทดสอบ

Wound healing assay

การทดสอบคุณสมบัติการสมานแผล โดยเป็นเทคนิค “*in vitro* assay” เช่นกัน วิธีการทดสอบคุณสมบัติดังกล่าว เริ่มต้นด้วยการเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการทดสอบ โดยมากจะใช้เซลล์ผิวหนัง เช่น keratinocyte ให้มีลักษณะการเจริญเติบโตโดยมีการเรียงตัวของชั้นเซลล์เป็นชั้นเดียว (monolayer) จากนั้นจะใช้วิธีการขีดให้เป็นรอยแยกออกจากกันของเซลล์ที่เรียงต่อกัน (สร้างสภาวะการทดสอบแบบวิธีการทำให้เกิดบาดแผล) ทำให้เกิดระยะห่างระหว่างชั้นของตัวเซลล์ที่ทดสอบ ในการทดสอบคุณสมบัติการสมานแผล จะเติมสารสกัด หรือ สารที่สนใจว่าจะมีฤทธิ์การสมานแผล แล้วปล่อยให้เกิดกลไกการเชื่อมต่อกันของชั้นเซลล์ที่เกิดบาดแผล การทดลองจะเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการเชื่อมต่อของกลุ่มเซลล์ที่แยกออกจากกัน (wound healing activity) โดยถ้าหากอัตราการสมานแผลเกิดขึ้นได้เร็ว ก็จะเป็นการชี้ให้เห็นถึงคุณสมบัติในการช่วยให้เกิด หรือ เร่งอัตราการสมานแผลนั่นเอง

1.6 สมมติฐานของการวิจัย (Hypothesis)

สารสกัดจากใบต้นเนียมหูกึ่งที่เตรียมด้วยวิธีการสกัดในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกัน จะมีความแตกต่างเรื่องคุณสมบัติการต้านสารอนุมูลอิสระ ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ รวมทั้งเรื่องคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และคุณสมบัติในการช่วยสมานแผลที่ทำการทดสอบในระดับเซลล์ (*in vitro* assay หรือ cell-based assay)

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยในปัจจุบันนั้น เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการดูแล และรักษาสุขภาพของคนในยุคปัจจุบัน ไม่ว่าจะเป็นการนำสมุนไพรมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเสริมสุขภาพ ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับความสวยงาม ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในทางธุรกิจสปา รวมทั้งการนวดแผนไทย เป็นต้น แต่ไม่ถือว่าเป็นการนำเอาสมุนไพรไปประยุกต์ในลักษณะทางใดก็ตาม ต้องมีการศึกษาการออกฤทธิ์ทางเภสัชศาสตร์ เช่น คุณสมบัติทางเคมี และคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งเรื่องความปลอดภัยต่อผู้ใช้ ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร การศึกษาเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่สำคัญเกี่ยวกับคุณสมบัติดังกล่าวนี้ ต้องอาศัยหลักการทางวิทยาศาสตร์ ในการทำการทดลอง วิจัย และการวิเคราะห์คุณสมบัติเหล่านี้ เพื่อสร้างให้เกิดเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่จะนำไปสู่การต่อยอดองค์ความรู้เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ และนวัตกรรมต่อไปในอนาคต การที่จะได้มาซึ่งความรู้เหล่านี้ ย่อมต้องมีการศึกษาวิจัยอย่างเป็นระบบ เช่น ชนิดพันธุ์ของสมุนไพรที่สนใจศึกษา การศึกษาคัดเลือกสายพันธุ์ การพัฒนา และปรับปรุงวิธีการปลูกให้ได้สมุนไพรที่มีคุณภาพ รวมทั้งวิธีการเก็บเกี่ยวเพื่อนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป สิ่งสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับพืชสมุนไพร คือ การวิจัยพื้นฐานที่สามารถอธิบายถึงสรรพคุณ การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และข้อจำกัดของการนำเอาไปใช้ทางเภสัชวิทยา รวมถึงความปลอดภัยของสมุนไพรที่นำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ข้อมูลงานวิจัยพื้นฐานเป็นแหล่งทรัพยากรสำคัญที่จะนำไปสู่การพัฒนาต่อยอดเพื่อสร้างเป็นผลิตภัณฑ์ และเป็นสิ่งที่ช่วยเพิ่มความมั่นใจในของผู้บริโภค เมื่อได้ใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของสมุนไพรเหล่านี้ สำหรับการเลือกชนิดพันธุ์ของสมุนไพรเพื่อการศึกษา จะเลือกชนิดพันธุ์ที่พบได้ในท้องถิ่น เป็นพืชที่ปลูกได้ง่าย โตเร็ว และการดูแลรักษาที่ไม่ได้ยุ่งยากมากนัก ซึ่งประเด็นสำคัญสำหรับการตัดสินใจเลือกชนิดของสมุนไพรในการวิจัยครั้งนี้ โดยทางผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาสารสกัดที่ได้จากใบของต้นเนียมหูเสือ

ต้นเนียมหูเสือ (ชื่อทั่วไปในภาษาอังกฤษ คือ “Mexican mint”) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng) เป็นพืชพันธุ์ไม้พุ่มมีอายุประมาณ 2-3 ปี เรียกว่า “Perennial herb” อยู่ในตระกูล “Lamiaceae” พบการกระจายพันธุ์ในสภาพอากาศแบบเขตร้อนชื้น และกึ่งร้อนชื้น ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย พม่า ลาว และกัมพูชา และลักษณะภูมิอากาศแบบเขตร้อน ได้แก่ ประเทศอินเดีย ทางตอนใต้ของประเทศจีน และบางประเทศแถบทวีปแอฟริกา [3] ความน่าสนใจของต้นเนียมหูเสือ คือ เป็นพืชโตเร็ว ขยายพันธุ์ได้ง่าย ด้วยวิธีปักชำส่วนของกิ่ง หรือ ส่วนของลำต้น พืชชนิดนี้สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมชนิดต่างๆ ได้ดี จนนำไปเพาะเลี้ยงได้ทุกสภาพอากาศ แต่จะเจริญเติบโตได้ในลักษณะอากาศร้อนชื้น ต้นเนียมหูเสือเป็นพืชที่ไม่ค่อยพบว่ามีโรค และแมลงศัตรูพืชรบกวน ไม่ได้ต้องการน้ำในปริมาณมาก จึงทำให้เหมาะสมต่อการปลูกในเรือนเพาะเลี้ยง และลานเปิดโล่งที่ไม่ได้ต้องการการดูแลมากนัก สำหรับการใช้ในทางยา

สมุนไพรพื้นบ้านของต้นเนียมหูลือ อ้างอิงตามฐานข้อมูลสมุนไพรออนไลน์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ส่วนของใบ และก้านมีกลิ่นหอมเย็น การแช่ในน้ำแล้วนำมาคั้นเอาน้ำไปใช้หยอดหู มีสรรพคุณแก้โรคฝีในหู บรรเทาอาการปวดหู อาการหูน้ำหนวก การสกัดด้วยน้ำแล้วใช้ดื่มมีสรรพคุณลดอาการท้องอืดในเด็ก ช่วยลดอาการไอเรื้อรัง ช่วยเจริญอาหาร การสกัดด้วยวิธีการต้มในน้ำร้อนมีฤทธิ์บรรเทาอาการทางเดินปัสสาวะอักเสบ ใบต้นเนียมหูลือมีกลิ่นหอมเย็น นำมาสกัดใช้ทำเป็นยาไล่แมลงบางชนิด นอกจากนี้ยังนิยมนำใบส่วนที่เป็นยอดอ่อน โดยบริโภคร่วมกับน้ำพริก ลาบ ใส่ใบสดที่ล้างสะอาดเป็นทั้งเครื่องเคียง หรือเป็นส่วนประกอบของแกง ซึ่งเป็นอาหารพื้นถิ่นที่พบได้ในแถบจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ [4, 5, 6] สำหรับเรื่องการศึกษาการคุณสมบัติทางชีวภาพ มีรายงานการศึกษาสารสกัดจากใบเนียมต้นหูลือ ด้วยการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากส่วนของใบด้วยระบบตัวทำละลายเมทานอล และเอทานอล พบว่ามีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรคในกลุ่มแบคทีเรีย และยีสต์ [7-] คุณสมบัติในการสมานบาดแผล ด้วยการนำสารสกัดจากใบต้นหูลือรักษาแผลที่เท้าของผู้ป่วยโรคเบาหวาน ด้วยการเตรียมเป็นเนื้อครีมสำหรับทา โดยพบว่ามีคุณสมบัติการสมานแผลใกล้เคียงกับการใช้วิธี hydrocolloid fiber wound dressing โดยที่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อผู้ป่วยน้อยมาก [8] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูลือในหนูทดลองที่ทำให้เกิดบาดแผล พบว่าสารสกัดมีคุณสมบัติลดการอักเสบ โดยหนูที่ได้รับสารสกัดตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของระดับไซโตไคน์ ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกลไกการอักเสบ [9]

การนำเอาสารสกัดจากพืชสมุนไพรไปทำการวิเคราะห์ ในแง่ปริมาณ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดของพืช เพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในทางเภสัชศาสตร์นั้น ยังคงมีปัญหาเกี่ยวกับปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สกัดจากส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพร ปัญหาเหล่านี้มีสาเหตุจากหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็น สภาพพื้นที่เพาะปลูก ภูมิอากาศ ปริมาณน้ำที่ได้รับในแต่ละวัน และระยะเวลาที่ใช้เก็บเกี่ยวเพื่อนำมาตัวอย่างมาศึกษา ตลอดจนกระบวนการสกัดสารเพื่อให้ได้ทั้งปริมาณ และคุณภาพเพียงพอต่อการศึกษาเชิงลึก [10] วิธีที่ทางกลุ่มผู้วิจัยได้ใช้ในการศึกษาศารสกัดจากพืชสมุนไพรครั้งนี้ คือ การสกัดด้วยวิธีแช่ ในตัวทำละลาย (maceration) โดยได้ปรับปรุงวิธีการสกัดให้มีประสิทธิภาพ ด้วยการใช้ตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในการสกัดเป็นลำดับขั้น ภายใต้สมมติฐานของการวิจัยว่าการสกัดสารที่เป็นส่วนประกอบในพืชสมุนไพรนั้น คุณสมบัติของสารสกัดแต่ละส่วนที่ได้นั้น มีการกระจายตัวของสารสกัดในชั้นของตัวทำละลายที่มีสภาพความเข้มข้นที่แตกต่างกัน วิธีการสกัดจะเริ่มต้นด้วยการใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วมากที่สุด ไปจนถึงตัวทำละลายมีขั้วมากที่สุด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับวิธีการดังกล่าวยังเป็นวิธีการแยกให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) ที่จะนำไปสู่การศึกษาในขั้นตอนการเตรียมให้บริสุทธิ์ในอนาคตต่อไป สำหรับในการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของงานวิจัยครั้งนี้ ทางกลุ่มผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาคุณสมบัติ “การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดในแต่ละชั้นตัวทำละลาย” และปริมาณรวมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในพืช ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ทั้งนี้เนื่องจากอนุมูลอิสระ คือ สาเหตุสำคัญของการเกิดโรคร้ายแรงในมนุษย์ ตัวอย่างเช่น โรคหลอดเลือดและหัวใจ อัล

ไซเมอร์ พาร์กินสัน เบาหวาน ไต การอักเสบ ความชรา และโรคมะเร็ง เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่ช่วยชะลอ และป้องกันความเสียหายที่จะเกิดกับเซลล์จากปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นตั้งแต่ระดับเซลล์ไปจนถึงระดับเนื้อเยื่อ และอวัยวะสำคัญ สำหรับสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้มากในพืชผัก และผลไม้ รวมทั้งพืชสมุนไพร [11] คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคมะเร็งที่มาจากปัญหาแบคทีเรียดื้อยาที่พบได้ในสถานประกอบการพยาบาล และโรงพยาบาลนั้น พบว่ามีอัตราเพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทยด้วยเช่นกัน ปัญหาการดื้อยาที่ใช้ในการรักษาของเชื้อโรคเหล่านี้ ปัญหาการลดลงของประสิทธิภาพตัวยาที่ใช้รักษา และการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด อีกทั้งยังเชื่อมโยงกับการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วทั้งในโรงพยาบาล และชุมชน ถือเป็นอีกหนึ่งปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขทั่วโลก [12] เพราะฉะนั้นอีกหนึ่งแนวทางการพัฒนาด้วยทางเลือกจากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพร ซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรที่มีอยู่มากมายในประเทศไทย จึงเป็นอีกหนึ่งประเด็นที่มีความน่าสนใจ และมีความท้าทายในด้านการวิจัยเชิงลึกที่จะพัฒนาต่อยอดเป็นนวัตกรรมที่ใช้ได้จริง ผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาเกี่ยวกับการทดสอบทั้งคุณสมบัติทางเคมี และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับในประเด็นสุดท้ายเกี่ยวกับการพัฒนาสารสกัดเพื่อนำไปใช้รักษาบาดแผลเรื้อรัง ที่เป็นปัญหาสำคัญในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยพบว่าเป็นปัญหาการรักษาที่มีความซับซ้อน มีภาวะเสี่ยงในเรื่องการติดเชื้อจากภาวะแผลกดทับ และในหลายกรณีก็ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยต้องสูญเสียอวัยวะในระหว่างที่มีการรักษา

สารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือ ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันนั้น จะนำไปศึกษาคุณสมบัติทางเคมีในห้องปฏิบัติการ โดยการตรวจวัด และประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่พบในพืชส่วนใหญ่ คือ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ในส่วนการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จะทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้ในมนุษย์ และความสามารถในการสมานแผล โดยทดสอบในระดับเซลล์ ด้วยการใช้เซลล์ผิวหนังของมนุษย์เป็นแบบจำลอง (model) ทดสอบกับสารสกัดที่ได้แต่ละชนิด ผู้วิจัยมีความคาดหวังว่าความรู้พื้นฐานเหล่านี้ จะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการศึกษาเชิงลึก การต่อยอดความรู้ทั้งทางด้านเภสัชวิทยา โดยเฉพาะการพัฒนาด้วยทางเลือกจากสมุนไพรไทย ซึ่งจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการรักษาทางการแพทย์สมัยใหม่ต่อไปในอนาคต

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 ตัวอย่างใบต้นเนียมหูเสือ

นำต้นเนียมหูเสือไปยีนชันชนิดพันธุ์ไม้กับ “สำนักงานคุ้มครองพันธุ์พืช กรมการเกษตร กรุงเทพมหานคร” โดยมีหมายเลขอ้างอิง SN267033 การเตรียมตัวอย่างใบต้นเนียมหูเสือสำหรับการสกัดสารเพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพ จะใช้ส่วนของใบที่ติดก้านเล็กน้อย ต้นเนียมหูเสือปลูกในพื้นที่เปิดโล่ง แสงแดดส่องถึงตลอดเวลา และรดน้ำสม่ำเสมอ

3.2 ขั้นตอนการสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน

นำใบต้นเนียมหูเสือมาล้างน้ำให้สะอาด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ซึ่งน้ำหนักแห้งที่เตรียมได้ แล้วนำส่วนที่แห้งไปแช่ในตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน ใช้ตัวทำละลายแรก คือ เฮกเซน ด้วยสัดส่วนน้ำหนักของของใบต้นเนียมหูเสือ (กรัม) ต่อปริมาตรตัวทำละลาย (มิลลิลิตร) คือ 1:3 (w/v) แช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน กรองส่วนของกากที่เป็นของแข็งด้วยกระดาษกรอง Whatman™ no.1 นำสารสกัดที่กรองได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator (BUCHI Rotavapor® R-210, Switzerland) แบ่งตัวอย่างที่ระเหยแห้งใส่ใน microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งอย่างสมบูรณ์ด้วยเครื่อง speed vacuum concentrator (Savant SC210A, Thermo Fisher Scientific, USA) เก็บส่วนที่แห้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป ในส่วนของกากที่เหลือจากการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน นำไปผึ่งให้แห้งในตู้ดูดควัน แล้วนำไปแช่ในตัวทำละลายถัดไป คือ เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ โดยจะใช้ระยะเวลาในการแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อการสกัด รวมทั้งการระเหยแห้งตัวทำละลายเหมือนกับในกรณีของการใช้เฮกเซน สำหรับขั้นตอนการสกัดนี้ จะได้สารสกัดจากตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล สำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพในขั้นตอนต่อไป

3.3 การทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

3.3.1) DPPH scavenging assay

สารละลาย DPPH สำหรับการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ เตรียมด้วยการชั่งของแข็ง DPPH ละลายใน 95% เมทานอล คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยการใช้ค่าคงที่ของการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 515 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ $10,900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [13] การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ ascorbic acid, BHT และ Trolox กับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ วิธีการวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะใช้เครื่อง

spectrophotometer (GENESYS 10S Thermo Fisher Scientific, USA) ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 515 นาโนเมตร การรายงานค่าการยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระ DPPH คำนวณจากค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้เหลือความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ DPPH ที่ค่าร้อยละ 50 เรียกว่า half-inhibitory concentration at 50% หรือ IC_{50}

3.3.2) ABTS scavenging assay

อ้างอิง และดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จากรายงานวิจัยของ Re R, *et al.* 1999 สรุปโดยย่อ คือเตรียมสารละลายที่มีอนุมูลอิสระให้อยู่ในรูป $ABTS^+$ (cation radical) ด้วยการผสมสารละลาย 10 mM ABTS และ 2.45 mM potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) ในสัดส่วน 1:1 (โดยปริมาตร) จากนั้นบ่มปฏิกิริยาทิ้งไว้ในที่มืดและเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง [14] การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ จะเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ ascorbic acid, BHT และ Trolox กับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ สำหรับวิธีการวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระชนิด $ABTS^+$ จะใช้เครื่อง spectrophotometer (GENESYS 10S Thermo Fisher Scientific, USA) ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 734 นาโนเมตร การรายงานค่าการยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ คำนวณจากค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้เหลือความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ ที่ค่าร้อยละ 50 (IC_{50})

3.3.2) FRAP value

การวัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี “ferric reducing antioxidant power” (FRAP) ใช้หลักการรับอิเล็กตรอนของ Fe^{3+} (ferric ion) เปลี่ยนไปเป็น Fe^{2+} (ferrous) แล้วจึงจะทำปฏิกิริยากับ 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร [15] สารละลาย FRAP reagent สำหรับทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระประกอบไปด้วย 300 mM acetate buffer, pH 3.6, 20 mM ferric chloride และ 10 mM TPTZ ผสมกันโดยใช้สัดส่วน 70:15:15 (โดยปริมาตร) การรายงานค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP จะเปรียบเทียบโดยการสร้างมาตรฐานด้วยการใช้สารละลายมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ที่รู้ความเข้มข้นที่แน่นอน (เตรียมด้วยวิธีการละลายใน 40 mM HCl) การวัดค่าการดูดกลืนแสงใช้เครื่อง spectrophotometer (GENESYS 10S Thermo Fisher Scientific, USA) โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 593 นาโนเมตร สำหรับค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือในชั้นตัวทำละลายต่างๆ จะรายงานค่าในหน่วย $\mu\text{mol } FeSO_4 \cdot 7H_2O \text{ equivalents } g^{-1} \text{ of sample}$ ซึ่งได้จากการคำนวณด้วยกราฟมาตรฐานของสารละลาย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

3.4 การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์

3.4.1) การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก

การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu [16] เพื่อคำนวณหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือที่ได้จากชั้นตัวทำละลายต่างๆ วิธีการคำนวณจะใช้การเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยการใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐานฟีนอลิก ปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์จะใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่นที่ 765 นาโนเมตร โดยการผสมสารมาตรฐาน Gallic acid หรือ สารสกัดจากในชั้นตัวทำละลายต่างๆ ของใบต้นเนียมหูเสือ กับสารละลาย Folin-Ciocalteu บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลาย 1 M sodium carbonate (Na_2CO_3) และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วย 95% เมทานอล จากนั้นบ่มปฏิกิริยาดังกล่าวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (GENESYS 10S Thermo Fisher Scientific, USA) ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก รายงานในหน่วย mg Gallic acid Equivalents g^{-1} per Dry plant material (GAE g^{-1} DM).

3.4.2) การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์

การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ใช้หลักการทดสอบ aluminium chloride (AlCl_3) colorimetric [17] เพื่อคำนวณปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ในสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือที่ได้จากชั้นตัวทำละลายต่างๆ วิธีการคำนวณจะใช้การเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยการใช้ Quercetin เป็นสารมาตรฐานฟลาโวนอยด์ ปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์จะใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่นที่ 510 นาโนเมตร ด้วยการผสมสารมาตรฐาน Quercetin หรือ สารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือกับ 5% w/v sodium nitrite (NaNO_2) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติม 10% w/v AlCl_3 และ 1 M sodium hydroxide ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยการเติม 95% เมทานอลให้ได้เท่ากับ 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (GENESYS 10S Thermo Fisher Scientific, USA) สำหรับปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ รายงานในหน่วย mg Quercetin Equivalents per 100 g^{-1} of dry plant material (mg QE 100 g^{-1} DM).

3.5 การทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี “agar well diffusion” [18] ทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แบ่งออกเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 สายพันธุ์มาตรฐานสำหรับการทดสอบในห้องปฏิบัติการ คือ “American Type Culture Collection” (ATCC) และกลุ่มที่ 2 สายพันธุ์ที่มีการรายงานว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในมนุษย์ “Clinical strains containing various kinds of pathogenic” เริ่มต้นจากการ

เตรียมเชื้อแบคทีเรียให้ได้จำนวนโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5×10^8 CFU/mL ปรับความขุ่นของเชื้อ (cell suspension) ด้วย sterile normal saline ให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard แล้วทำการ spread เชื้อที่ได้ปรับความขุ่นแล้ว ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Agar (MHA) ใช้จานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร เจาะรูบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว โดยให้แต่ละรูมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เติมสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, เอทิลอะซิเตท หรือ เมทานอล ในช่วงความเข้มข้นของสารสกัดในแต่ละตัวทำละลายระหว่าง 20-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วจึงวัดค่าการยับยั้ง “inhibition zone diameter” (IZD) หรือ “clear zone” โดยวัดค่าเส้นผ่าศูนย์กลางใช้หน่วยวัดเป็นมิลลิเมตร ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สำหรับในการทดลองนี้ จะทดสอบความเป็นพิษของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดด้วยการใช้ตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลที่ไม่มีสารสกัดซึ่งกำหนดให้เป็นตัวแปรควบคุม (control) ร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin (oxoid) ขนาด 10 µg เป็น positive control

3.6 การทดสอบคุณสมบัติการสมานแผลด้วยวิธีการ wound healing assay

3.6.1) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay

วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) กับสารทดสอบที่เราสนใจ ใช้วิธีการ MTT assay ด้วยหลักการ คือ เซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์ “mitochondria oxidoreductase” เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide เป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน มีสีม่วง ไม่ละลายน้ำ ปริมาณผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าว จะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต [19] การทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT กับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือในชั้นตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 6.25-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ขั้นตอนเริ่มต้นจาก เตรียมจำนวนเซลล์ปริมาณ 5×10^3 cells/ml นำไปเลี้ยงใน 96-well plate นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ดูดเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ซึ่งมีสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือในแต่ละความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่ผสม MTT (ที่อยู่ในรูป tetrazone โดยจะมีสีเหลือง) ในเซลล์ที่มีชีวิต จะเปลี่ยนผลิตภัณฑ์ดังกล่าวให้เป็นสีม่วง นำเอาผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปละลายใน DMSO แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อทดสอบหาช่วงที่สารสกัดหูเสือไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อนำไปทดสอบหาฤทธิ์ในการสมานแผล

3.6.2) การทดสอบคุณสมบัติการสมานแผลของเซลล์ HaCaT ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

คุณสมบัติการสมานแผลของเซลล์ (wound healing property) เป็นเทคนิคการสร้างตัวอย่างหรือแบบจำลองการสมานแผลที่พบในเนื้อเยื่อ หรือ อวัยวะ ใช้หลักการเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์เยื่อที่หุ้มผิว และการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์ โดยการทดสอบจะขูดเซลล์ให้เกิดเป็นรอยแยกออกจากกัน (scatching) ของกลุ่มเซลล์ที่มีการจัดเรียงตัวแบบ monolayer สำหรับวัตถุประสงค์ของการสร้างรอยแผลลักษณะนี้ คือ การสร้างพื้นที่ปลอดเซลล์ แล้วตรวจวัดความสามารถในการสมานรอยแผลจากการเพิ่มจำนวน และการเคลื่อนที่เข้าหากันของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ [20] วิธีการทดลองเริ่มต้นด้วยการเตรียมเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด HaCaT ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (cell suspension) ที่มีจำนวนเซลล์ 1×10^5 cells/ml บ่มเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35x10 mm (35x10 mm culture dish, Thermo scientific, China) เป็นเวลา 1 วัน ทำการสร้างรอยแผลด้วยการขูดผิวเซลล์ที่มีการจับตัวเป็น monolayer ให้เกิดเป็นช่องว่างด้วยการใช้ปลาย tip ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการล้างชิ้นส่วนของเซลล์ที่หลุดออกด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดจากใบต้นเนียมหูลือ โดยเลือกช่วงความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (6.25-200 ng/ml) (โดยใช้ข้อมูลจากการทดลอง 3.6.1) สำหรับชุดการทดลองควบคุม (control) คือ ขูดเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้ใส่สารสกัดที่จะทดสอบ แต่จะใช้ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจากใบต้นเนียมหูลือ (เฮกเซน เอทิลอะซิเตท หรือเมทานอล) การเปรียบเทียบผลของการสมานแผลของเซลล์ จะสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted Light Microscope) รุ่น CKX31 (Olympus, Japan) สำหรับการบันทึกภาพนิ่งด้วยกล้อง Zeiss (Primostar, ZEISS, Germany) ร่วมกับการใช้โปรแกรม Zen 3.6 (blue edition) โดยใช้ระยะเวลาสองวัน บันทึกภาพการสมานแผลของเซลล์ทดสอบในวันที่เริ่มการทดลอง วันที่ 0 1 และวันที่ 2

3.7 การทดสอบค่าทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองด้วยการทำซ้ำ หาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน คำนวณค่าเหล่านี้ด้วยการใช้โปรแกรม Microsoft 365 (Excel) การพิจารณาค่าความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ค่า *p-value* ใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Packages for Social Sciences) version 15 software วิธีการเปรียบเทียบใช้หลักการ One-way ANOVA analysis โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นของ *p-value* < 0.05 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 สารสกัดจากใบต้นเนียมหูลือที่ได้จากการแช่ในตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นต่างกัน

ด้วยข้อจำกัดเกี่ยวกับปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สะสมในส่วนต่างๆ ของพืชเป้าหมายนั้น มีทั้งปริมาณ และความเข้มข้นน้อยเกินกว่าจะนำไปศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพ จึงต้องมีวิธีการสกัดสารเหล่านั้นออกมาเพื่อให้ทั้ง ความเข้มข้น และปริมาณที่มากเพียงพอต่อการศึกษา การสกัดสารจากส่วนของใบต้นหูลือ ใช้วิธีการแช่ในตัวทำละลายด้วยระบบตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เริ่มต้นจากตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุด ไปยัง ความเข้มข้นมากที่สุด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ ข้อมูลในตารางที่ 1 แสดงค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และร้อยละของน้ำหนักแห้งที่นำไปใช้ในการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ สำหรับค่าร้อยละการสกัด (% yield) ของสารสกัดจากชิ้นตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล เท่ากับร้อยละ 5.28, 3.77 และ 5.86 ตามลำดับ การทดสอบความสามารถในการละลายของสารสกัดในเมทานอลมีความสำคัญ เนื่องจากการละลายสารสกัดในการทดลองนี้ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายหลักสำหรับการทดสอบ ค่าการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ สารสกัดที่ได้จากการใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายใน ขั้นตอนการสกัด มีค่าการละลายได้มากที่สุด คือ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตทในการสกัดที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอลได้สูงสุดที่ 20 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้ในการออกแบบการทดลองเพื่อแยกสารให้บริสุทธิ์ ด้วยพื้นฐานของคุณสมบัติความ มีขั้ว หรือ ไม่มีขั้วของสารที่เป็นส่วนประกอบเหล่านี้ต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักของส่วนประกอบต่าง ๆ ของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูลือที่ได้จากการใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล และคุณสมบัติในการละลายในตัวทำละลายเมทานอล

ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	เฮกเซน	เอทิลอะซิเตท	เมทานอล
น้ำหนักแห้งของสารสกัดในตัวทำละลาย	2.38 กรัม	1.70 กรัม	2.64 กรัม
ร้อยละการสกัด (% yield)	5.28 %	3.77 %	5.86 %
ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ละลาย ในเมทานอล (mg/ml)	2	20	50

ใช้ใบต้นเนียมหูลือ น้ำหนักแห้ง 45 กรัม (จากน้ำหนักสด 710 กรัม)

4.2 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยระบบ DPPH, ABTS scavenging และ FRAP assay

คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือ ซึ่งเตรียมด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล การประเมินคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะใช้ค่า IC_{50} ในการพิจารณาเปรียบเทียบ ข้อมูลในตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.580 ± 0.101 และ 1.638 ± 0.341 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีค่าใกล้เคียงกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT (0.0227 ± 0.010 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในส่วนของคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS สารสกัดในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน ก็ยังคงมีค่าการต้านอนุมูลอิสระต่อ ABTS ที่ดีที่สุด มีค่าการยับยั้งของ IC_{50} เท่ากับ 0.021 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่าใกล้เคียงกับการต้านอนุมูลอิสระ ascorbic acid ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0076 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ก็มีค่าการต้านอนุมูลอิสระในชั้นตัวทำละลายเฮกเซนเช่นกัน โดยมีค่าการต้านจากการวัดด้วยวิธี FRAP assay เท่ากับ 2.133 ± 0.053 ไมโครโมล ของ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ต่อน้ำหนักแห้ง (กรัม) ของตัวอย่างแห้งที่นำมาสกัด โดยภาพรวมของการสกัดสารจากใบต้นเนียมหูเสือ พบว่าในชั้นตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยที่สุด มีปริมาณสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่มีขั้วมากกว่า คือ เอทิลอะซิเตท และเมทานอล

4.3 ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์

การรายงานค่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ใช้วิธีทดสอบด้วยสารละลาย Folin-Ciocalteu จะใช้สารมาตรฐานฟีนอลิก คือ gallic acid ส่วนปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ใช้วิธี $AlCl_3$ colorimetric ข้อมูลในตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูง มีค่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท เท่ากับ 0.500 ± 0.008 และ 0.116 ± 0.001 มิลลิกรัมของ Gallic Acid Equivalent (GAE) g^{-1} น้ำหนักแห้งตัวอย่าง ตามลำดับ สำหรับปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ก็ยังคงพบในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท โดยปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท เท่ากับ 0.773 ± 0.018 และ 0.581 ± 0.034 มิลลิกรัมของ Quercetin Equivalent (QE) g^{-1} น้ำหนักแห้งตัวอย่าง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตทนั้น มีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับชั้นตัวทำละลายเมทานอล ผลที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของการทดสอบด้วยระบบ DPPH, ABTS scavenging และวิธี FRAP assay จากผลการทดสอบทั้งเรื่องคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ นำไปสู่ข้อสมมติฐานที่ว่า สารที่เป็นส่วนประกอบที่สกัดได้จากใบต้นเนียมหูเสือด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว น่าจะมีโครงสร้างทางเคมีของสารที่น่าสนใจ

อีกทั้งยังมีแนวโน้มที่โครงสร้างของสารที่น่าสนใจเหล่านั้น น่าจะอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ข้อมูลเหล่านี้เป็นข้อมูลที่จะช่วยในการออกแบบการทดลอง ในขั้นตอนการแยกให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาในเชิงลึกในอนาคตต่อไป

ตารางที่ 2 ค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีทดสอบ DPPH, ABTS scavenging และ FRAP assay ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูลือด้วยการใช้ตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล

ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ IC ₅₀ , mg/ml		ค่าการต้านอนุมูลอิสระ FRAP assay [#]	ปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิก [§]	ปริมาณรวมสารประกอบฟลาโวนอยด์ [*]
	DPPH scavenging	ABTS scavenging			
เฮกเซน	1.580 ± 0.101	0.021 ± 0.001	2.133 ± 0.053	0.500 ± 0.008	0.773 ± 0.018
เอทิลอะซิเตท	4.149 ± 0.796	2.738 ± 0.181	0.659 ± 0.079	0.116 ± 0.001	0.581 ± 0.034
เมทานอล	1.638 ± 0.341	0.314 ± 0.014	0.223 ± 0.011	0.011 ± 0.001	0.120 ± 0.012
สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน					
Ascorbic acid	0.0038 ± 0.001	0.0042 ± 0.001	10,188 ± 158		
BHT	0.0227 ± 0.010	0.0061 ± 0.010	385.81 ± 61.67		
Trolox	0.0054 ± 0.001	0.0076 ± 0.001	801.46 ± 10.65		

[#]FRAP value แสดงค่าหน่วยวัด micro mol FeSO₄ · 7H₂O g⁻¹ DM

[§]ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกแสดงค่าหน่วยวัด mg Gallic Acid Equivalent (GAE) g⁻¹ DM

^{*}ปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ แสดงค่าหน่วยวัด mg Quercetin Equivalent (QE) g⁻¹ DM

4.4 คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพบว่าตัวทำละลายของสารสกัดเป็นพิษต่อแบคทีเรียแกรมบวก จึงทำการทดสอบได้เพียงคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งทำการทดสอบกับแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก แต่จากการศึกษาพบว่า diluent ที่ใช้ละลายสารมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้ไม่สามารถใช้ทดสอบในแบคทีเรียแกรมบวกได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้แบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) โดยใช้แบคทีเรียสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่นิยมใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา (American Type Culture Collection, ATCC) และกลุ่มที่ 2

แบคทีเรียสายพันธุ์ที่พบในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ที่มีการรายงานว่าเป็นสาเหตุการเกิดโรคในมนุษย์ (clinical strains containing various kinds of pathogenic) คุณสมบัติในการยับยั้งสำหรับการทดลองนี้จะใช้ค่า “inhibition zone diameter” (IZD) เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยจะรายงานที่ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือที่สกัดด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ข้อมูลจากตารางที่ 3 การทดสอบกับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด หรือ ตัวแปรควบคุม (control) คือ เฮกเซน หรือ เอทิลอะซิเตท หรือ เมทานอล พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ครั้งนี้ สารสกัดจากชิ้นตัวทำละลายเฮกเซน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียได้ 3 ชนิด (รูปที่ 4.1) คือ แบคทีเรียกลุ่มที่ 2 จำนวน 1 ชนิด คือ *Plesiomonas shigelloides* (IZD = 16.7 ± 0.6 มิลลิเมตร) และแบคทีเรียกลุ่มที่ 1 จำนวน 2 ชนิด คือ *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) และ *Escherichia coli* (ATCC 25922) (IZD = 10.0 ± 0.0 และ 8.3 ± 0.6 มิลลิเมตร ตามลำดับ) สารสกัดจากชิ้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้หลากหลายชนิด สำหรับค่าการยับยั้งดีที่สุดสามอันดับแรก ที่พบในสารสกัดจากชิ้นตัวทำละลายนี้ (รูปที่ 4.2) คือ *Aeromonas veronii* bv sobria (IZD = 23.3 ± 6.4 มิลลิเมตร), *Vibrio cholerae* (IZD = 20.7 ± 0.6 มิลลิเมตร) และ *V. parahaemolyticus* (IZD = 19.0 ± 1.0 มิลลิเมตร) ตามลำดับ โดยเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มที่ 2 ทั้งหมด ในส่วนของสารสกัดจากชิ้นตัวทำละลายเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้หลากหลายชนิด คล้ายคลึงกับผลที่ทดสอบด้วยการใช้สารสกัดจากชิ้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ค่าการยับยั้งดีที่สุดสามอันดับแรก ที่พบในสารสกัดจากชิ้นตัวทำละลายเมทานอล (รูปที่ 4.3) คือ *P. shigelloides* (IZD = 21.3 ± 0.6 มิลลิเมตร), *V. parahaemolyticus* (IZD = 12.7 ± 0.6 มิลลิเมตร) และ *V. cholerae* (IZD = 12.3 ± 0.6 มิลลิเมตร) ตามลำดับ ซึ่งก็เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 คล้ายกับผลทดสอบด้วยการใช้สารสกัดจากชิ้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท โดยภาพรวมแล้วจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากชิ้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีความมีขี้ผึ้งมากกว่าเฮกเซน มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 (สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุในการเกิดโรคในมนุษย์) หากพิจารณาจากค่า IZD ในตารางที่ 3 มีข้อสังเกตที่น่าสนใจ คือ สารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชิ้นตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล พบว่ามีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* ATCC 19606 และ *E. coli* ATCC 25922 (กลุ่มที่ 1 ATCC) และ *P. shigelloides* (กลุ่มที่ 2 clinical strains containing various kinds of pathogenic organisms)

ตารางที่ 3 ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone diameter, IZD) จากการใช้สารสกัดจากใบต้นเนียมหูลือในตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันด้วยวิธีการทดสอบ “agar well diffusion”

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ	Gentamicin 10 µg (IZD, mm)	ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด (ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ)					
		เฮกเซน (50 mg/ml)		เอทิลอะซิเตท (50 mg/ml)		เมทานอล (50 mg/ml)	
		Control (IZD, mm)	สารสกัด (IZD, mm)	Control (IZD, mm)	สารสกัด (IZD, mm)	Control (IZD, mm)	สารสกัด (IZD, mm)
กลุ่มที่ 1 American Type Culture Collection (ATCC) bacterial strains							
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	13.3 ± 0.6	ND	10.0 ± 0.0	ND	11.7 ± 0.6	ND	12.0 ± 0.0
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	23.3 ± 2.1	ND	ND	ND	10.3 ± 0.6	ND	6.0 ± 0.0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	21.6 ± 0.6	ND	8.3 ± 0.6	ND	13.0 ± 0.0	ND	6.8 ± 1.5
<i>Klebsiella aerogenes</i> ATCC 13048	21.0 ± 1.0	ND	ND	ND	11.3 ± 2.3	ND	ND
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	35.3 ± 1.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
กลุ่มที่ 2 Clinical strains containing various kinds of pathogenic organisms							
<i>Aeromonas hydrophila</i>	25.3 ± 1.2	ND	ND	ND	15.3 ± 0.6	ND	11.3 ± 0.6
<i>A. veronii</i> bv sobria	22.5 ± 2.1	ND	ND	ND	23.3 ± 6.4	ND	12.0 ± 0.0
<i>E. cloacae</i>	25.7 ± 0.7	ND	ND	ND	9.7 ± 0.6	ND	8.7 ± 0.6
<i>E. coli</i>	25.0 ± 1.4	ND	ND	ND	10.7 ± 0.6	ND	7.7 ± 0.6
<i>K. pneumoniae</i>	24.5 ± 0.7	ND	ND	ND	9.7 ± 0.6	ND	6.7 ± 1.2
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	17.3 ± 1.2	ND	16.7 ± 0.6	ND	17.7 ± 0.6	ND	21.3 ± 0.6
<i>Proteus mirabilis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25.3 ± 2.5	ND	ND	ND	12.0 ± 0.0	ND	ND

ตารางที่ 3 ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone diameter, IZD) จากการใช้สารสกัดจากใบต้นเนียมหูลือในตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันด้วยวิธีการทดสอบ “agar well diffusion” (ต่อ)

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ	Gentamicin 10 µg (IZD, mm)	ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด (ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ)					
		เฮกเซน (50 mg/ml)		เอทิลอะซิเตท (50 mg/ml)		เมทานอล (50 mg/ml)	
		Control (IZD, mm)	สารสกัด (IZD, mm)	Control (IZD, mm)	สารสกัด (IZD, mm)	Control (IZD, mm)	สารสกัด (IZD, mm)
กลุ่มที่ 2 Clinical strains containing various kinds of pathogenic organisms							
<i>Salmonella paratyphi A</i>	25.0 ± 1.4	ND	ND	ND	7.0 ± 1.4	ND	ND
<i>Vibrio cholerae</i>	25.7 ± 1.5	ND	ND	ND	20.7 ± 0.6	ND	12.3 ± 0.6
<i>V. parahemolyticus</i>	21.0 ± 1.0	ND	ND	ND	19.0 ± 1.0	ND	12.7 ± 0.6

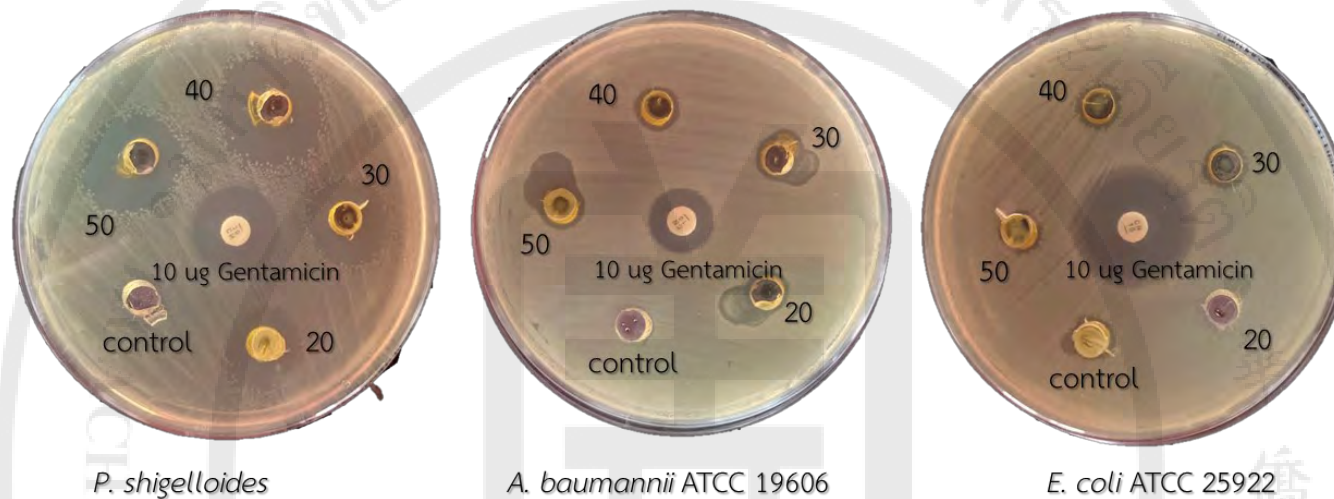
ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทำซ้ำสามครั้ง (triplicated experiment) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD)

ND = Not detected, ไม่มีการยับยั้งภายใต้การใช้ความเข้มข้นที่ระบุในตาราง

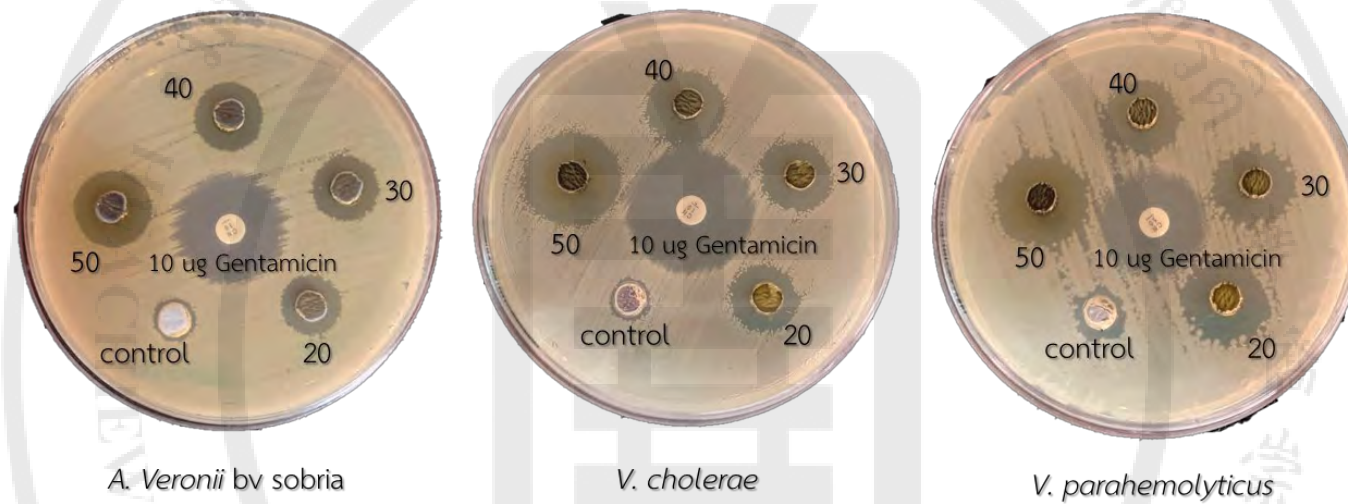
IZD = การเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone diameter), ใช้หน่วยวัดเป็น มิลลิเมตร (millimeter, mm)

Control = ตัวแปรควบคุมที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดสารจากใบต้นเนียมหูลือ (เฮกเซน หรือ เอทิลอะซิเตท หรือ เมทานอล)

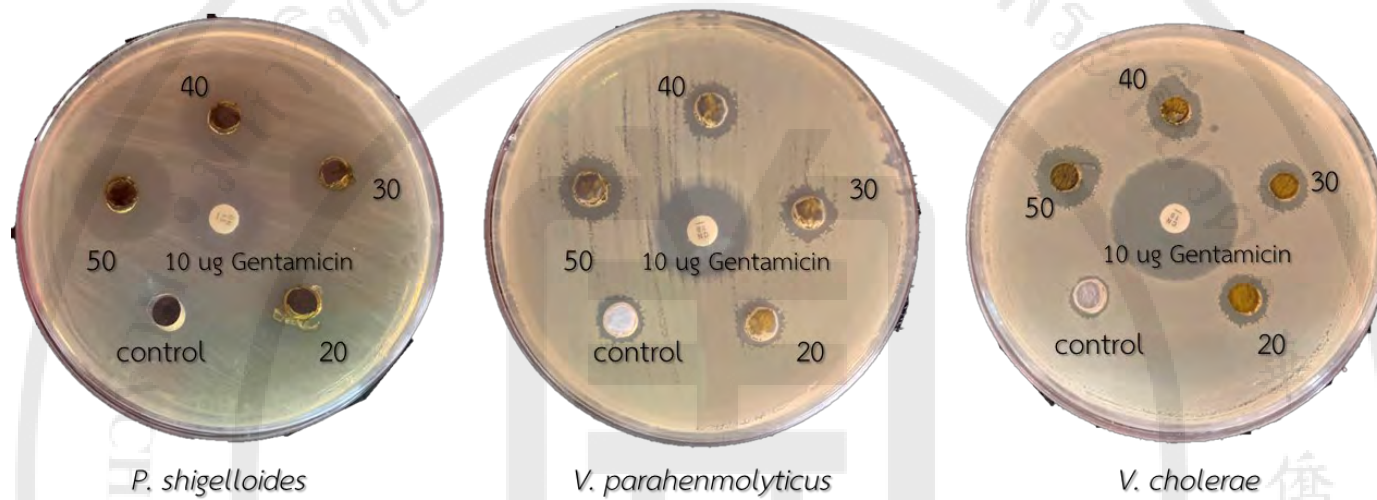
Gentamicin = ยาปฏิชีวนะที่ใช้เป็นตัวแปรควบคุมชนิด Positive control โดยใช้ปริมาณ 10 ไมโครกรัม



รูปที่ 4.1 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากตัวทำละลาย “เฮกเซน” โดยใช้ความเข้มข้น 20-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตัวเลขที่อยู่ในรูป) การทดสอบใช้ตัวทำละลายที่ใช้สกัดเป็นตัวแปรควบคุม (control, เฮกเซน) และใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin 10 ไมโครกรัม เป็นตัวแปรควบคุมเปรียบเทียบ (positive control) การยับยั้งการเจริญเติบโตพบในแบคทีเรีย *P. shigelloides* (IZD = 16.7 ± 0.6 มิลลิเมตร), *A. baumannii* (ATCC 19606) (IZD = 10.0 ± 0.0 มิลลิเมตร) และ *E. coli* (ATCC 25922) (IZD = 8.3 ± 0.6 มิลลิเมตร)



รูปที่ 4.2 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากตัวทำละลาย “เอทิลอะซิเตท” โดยใช้ความเข้มข้น 20-50 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร (ตัวเลขที่อยู่ในรูป) การทดสอบใช้ตัวทำละลายที่ใช้สกัดเป็นตัวแปรควบคุม (control, เอทิลอะซิเตท) และใช้ยาปฏิชีวนะ 10 ไมโครกรัม Gentamicin เป็นตัวแปรควบคุมเปรียบเทียบ (positive control) ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงสุด สามอันดับแรก คือ *A. veronii* bv *sobria* ($IZD = 23.3 \pm 6.4$ มิลลิเมตร) *V. cholerae* ($IZD = 20.7 \pm 0.6$ มิลลิเมตร) และ *V. parahemolyticus* ($IZD = 19.0 \pm 1.0$ มิลลิเมตร) ตามลำดับ

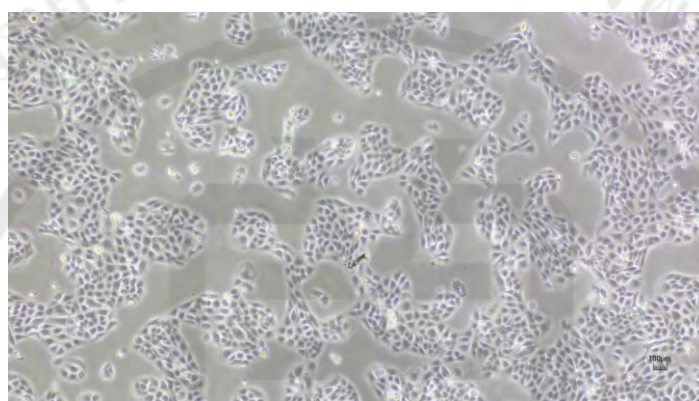


รูปที่ 4.3 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากตัวทำละลาย “เมทานอล” โดยใช้ความเข้มข้น 20-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตัวเลขที่อยู่ในรูป) การทดสอบใช้ตัวทำละลายที่ใช้สกัดเป็นตัวแปรควบคุม (control, เมทานอล) และใช้ยาปฏิชีวนะ 10 ไมโครกรัม Gentamicin เป็นตัวแปรควบคุมเปรียบเทียบ (positive control) ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงสุด สามอันดับแรก คือ *P. shigelloides* (IZD = 21.3 ± 0.6 มิลลิเมตร), *V. parahemolyticus* (IZD = 12.7 ± 0.6 มิลลิเมตร) และ *V. cholerae* (IZD = 12.3 ± 0.6 มิลลิเมตร) ตามลำดับ

4.5 ผลการสมานแผลในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT

4.5.1 ลักษณะของเซลล์ HaCaT ที่บันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ

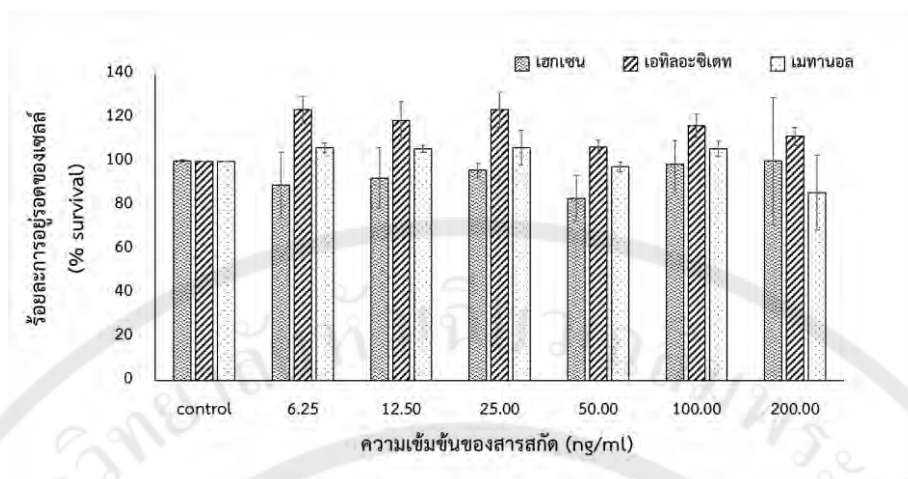
เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT ที่เลี้ยงด้วยอาหาร DMEM-HG ที่มี 10% Fetal bovine serum (FBS) เพาะเลี้ยงในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ลักษณะการกระจายตัวของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง (keratinocyte) ชนิด HaCaT มีรูปแบบการเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer) ลักษณะเซลล์ที่บันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ ด้วยกำลังขยาย 4X แสดงดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 การกระจายตัวของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด HaCaT รูปแบบ monolayer ทำการบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (รุ่น CKX31 Olympus, Japan, Zeiss lens (Prismostar, ZEISS, Germany) สำหรับภาพนิ่งจัดการไฟล์ภาพด้วยโปรแกรม Zen 3.6 (blue edition), ใช้กำลังขยายในการบันทึกภาพ 4X

4.5.2 ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูลือต่อเซลล์ HaCaT

สารสกัดจากใบต้นเนียมหูลือจากการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล นำไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT ในช่วงความเข้มข้น 6.25-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) ใช้วิธี MTT assay ภายหลังจากบ่มเซลล์ที่ใช้ทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ผลการทดลองพบว่ามีร้อยละของการอยู่รอดของเซลล์ (% survival) มีค่ามากกว่าร้อยละ 80 ทุกช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 4.5) (control, กลุ่มการทดลองที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากใบต้นเนียมหูลือ แต่ใช้ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล) โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, independent T-test) ค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ จะนำไปใช้อ้างอิง และทดสอบคุณสมบัติในการสมานแผลของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT ต่อไป

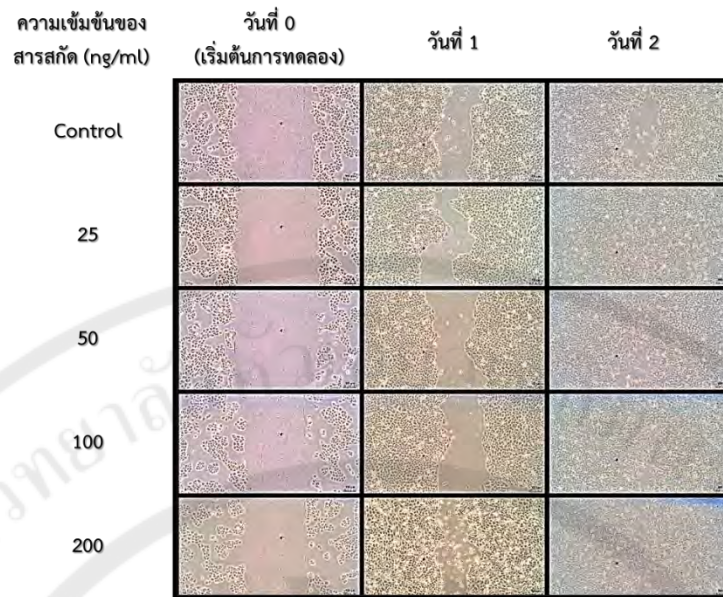


รูปที่ 4.5 ร้อยละของการอยู่รอดของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด HaCaT จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay การทดสอบด้วยสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดในช่วง 6.25-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับชุดทดสอบที่เป็นตัวแปรควบคุม (control) ได้แก่ ตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารละลาย

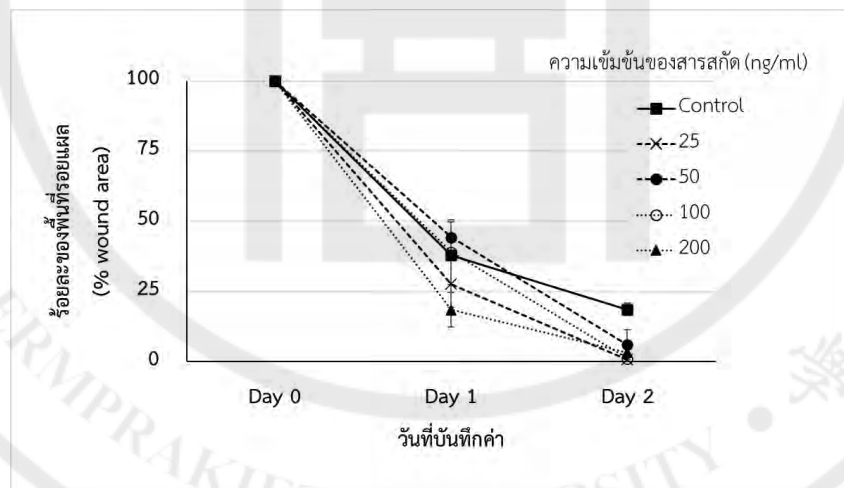
4.5.3 คุณสมบัติการสมานแผลของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือ

ผลการทดสอบคุณสมบัติการสมานแผลของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT โดยเลือกใช้ช่วงความเข้มข้นของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ซึ่งอ้างอิงตามข้อมูลผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (ตอนที่ 4.5.2) เลือกใช้ช่วงความเข้มข้นของสารสกัดเริ่มต้นที่ 25-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (การทดสอบเบื้องต้นไม่เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเข้มข้น 6.25 และ 12.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นในช่วง 25-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ติดตามการสมานแผลของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ ภายในระยะเวลา 2 วัน ด้วยการคำนวณการลดลงของพื้นที่รอยแผลบนชั้นเซลล์ที่เรียงตัวแบบ monolayer ที่เกิดจากการเพิ่มจำนวน และการเคลื่อนที่เข้าหากันของเซลล์ (wound healing activity) กำหนดค่าร้อยละของพื้นที่รอยแผล (% wound area) ของวันที่เริ่มต้นการทดสอบ (Day 0) เท่ากับร้อยละ 100 คำนวณ และบันทึกค่าร้อยละของพื้นที่รอยแผลในวันที่ 1 (Day 1) และ 2 (Day 2) ผลการทดสอบการสมานแผลของเซลล์ เมื่อใช้สารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน พบว่าที่ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละของพื้นที่รอยแผลลดลงมากที่สุด (รูปที่ 4.6) ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดสอบ (ร้อยละพื้นที่รอยแผลเท่ากับ 18.54 ± 6.13) โดยมีค่าการสมานแผลที่ดีที่สุด เมื่อเทียบกับความเข้มข้นในช่วงต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบ และสังเกตเห็นกลุ่มเซลล์มีการเชื่อมต่อกันเกือบสมบูรณ์ในวันที่ 2 ของการทดลอง (รูปที่ 4.6 และ 4.7) ผลของการสมานแผลของเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดจากชั้นเอทิลอะซิเตท

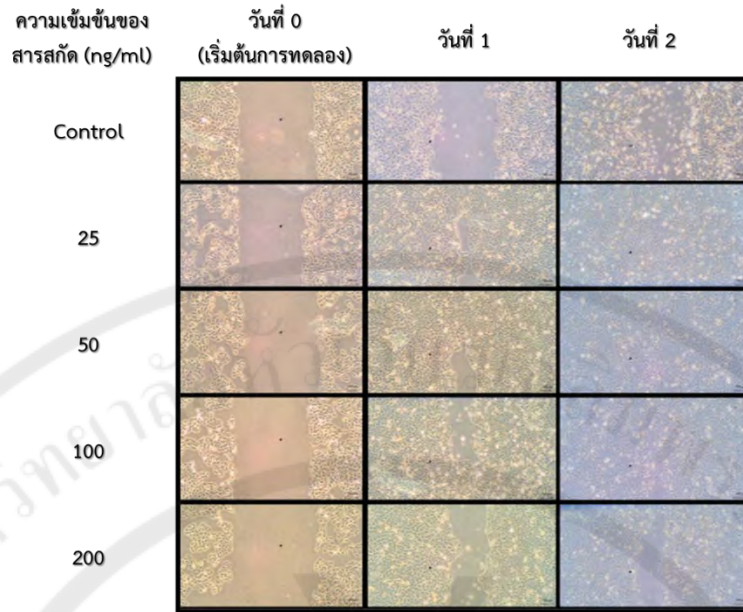
พบว่าประสิทธิภาพที่ดีกว่าที่พบในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน โดยที่ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละของพื้นรอยแผลเหลือเพียงร้อยละ 1.753 ± 3.026 (รูปที่ 4.8) แต่ว่าในช่วงความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงกว่าค่านี้ (รูปที่ 4.9) พบว่าประสิทธิภาพการสมานแผลของเซลล์นั้น มีค่าลดลง (ค่าความเข้มข้นในช่วง 50-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) คาดว่าสารที่เป็นส่วนประกอบในชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ถึงแม้ว่าจะไม่มีความเป็นพิษต่อตัวเซลล์โดยตรง แต่อาจจะมีสารบางอย่างที่ยับยั้งการสมานแผลของเซลล์ที่ใช้ทดสอบ ซึ่งผลการทดสอบที่ได้นี้มีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาด้วยการแยกวิเคราะห์ และเตรียมสารให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาเชิงลึกในอนาคตต่อไป สุดท้ายการทดสอบกับสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเมทานอล พบว่าประสิทธิภาพในการสมานแผลของเซลล์ทดสอบนี้ มีค่าใกล้เคียงกันกับความเข้มข้นของสารสกัด 25 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.10) โดยมีค่าร้อยละของพื้นที่รอยแผลเท่ากับ 32.05 ± 6.63 และ 35.57 ± 6.46 ตามลำดับ จากการสังเกต และบันทึกภาพผลการทดลองในวันที่ 1 (รูปที่ 4.11) หากพิจารณาจากลักษณะการกระจายตัวของกลุ่มเซลล์ ในวันที่ 1 เปรียบเทียบกันระหว่างความเข้มข้นที่ 25 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า คือ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร การเชื่อมต่อกัน และการเคลื่อนที่เข้าหากันของกลุ่มเซลล์ไม่ดีเท่าเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นที่สูงกว่า (200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และจากผลการทดสอบในวันที่สอง การเชื่อมต่อกันของกลุ่มเซลล์ที่ความเข้มข้นที่สูงนี้ ก็มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันมากกว่าเมื่อพิจารณาจากผลการทดลองในรูปที่ 4.11 ดังนั้นความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดการสมานแผลของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT เมื่อใช้สารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเมทานอล จึงควรจะเป็นที่ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากภาพรวมของผลการทดลองที่ได้นี้ สารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท มีคุณสมบัติที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่น โดยที่ความเข้มข้นที่ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ก็มีประสิทธิภาพในการเกิดการสมานแผลได้เร็ว และเห็นผลชัดเจนตั้งแต่วันที่ 1 ที่ทำการทดลอง (รูปที่ 4.8)



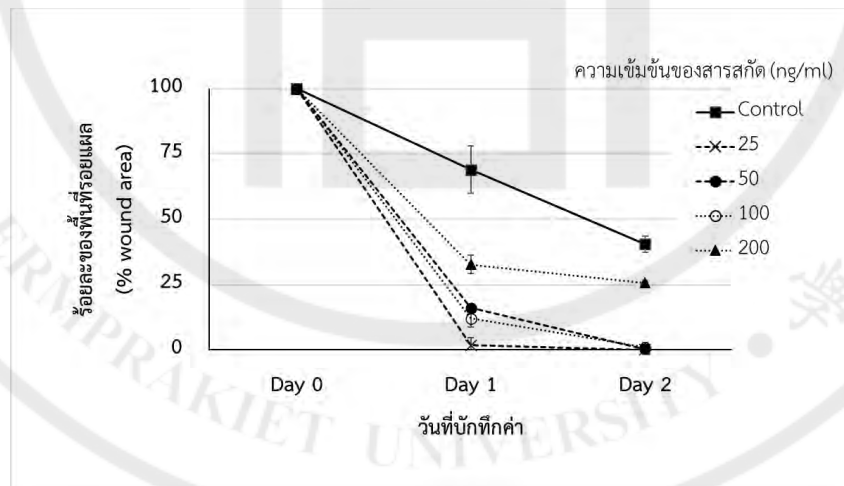
รูปที่ 4.6 แสดงพื้นที่รอยแผลบนเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT ที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 25-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ รุ่น CKX31 Olympus, Japan, Zeiss lens (ZEISS, Germany) สำหรับตัวแปรควบคุม (control) คือ การทดสอบด้วยการใช้ตัวทำละลายเฮกเซนที่ไม่มีสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือ



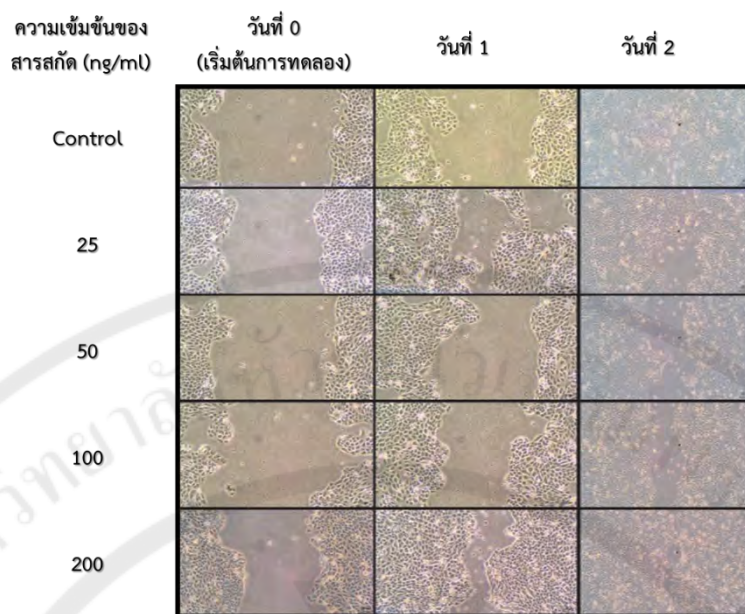
รูปที่ 4.7 แสดงค่าร้อยละพื้นที่รอยแผลของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด HaCaT ด้วยการทดสอบด้วยสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน ใช้ช่วงความเข้มข้น 25-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการบันทึก และคำนวณค่าร้อยละของพื้นที่รอยแผลเปรียบเทียบกันในวันที่เริ่มต้นการทดลอง (Day 0) วันที่ 1 (Day 1) และวันที่ 2 (Day 2) ด้วยโปรแกรม Zen 3.6 (blue edition) สำหรับตัวแปรควบคุม (control) คือ การทดสอบด้วยการใช้ตัวทำละลายเฮกเซนที่ไม่มีสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือ



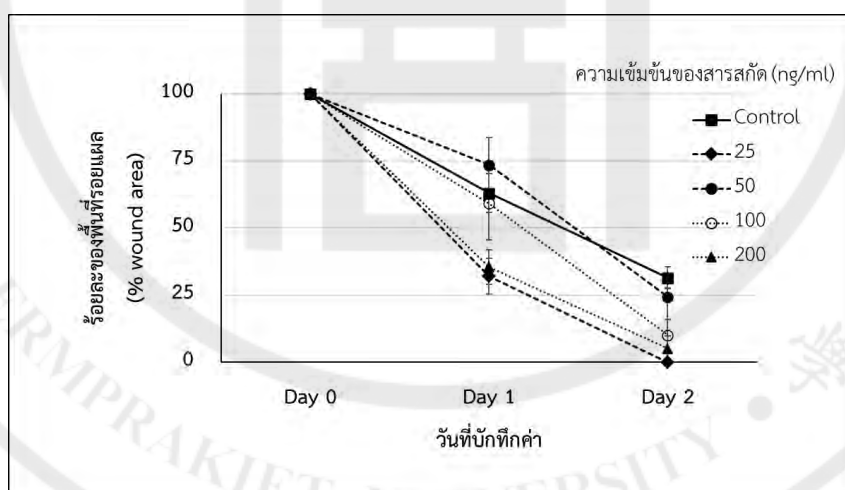
รูปที่ 4.8 แสดงพื้นที่รอยแผลบนเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT ที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 25-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ รุ่น CKX31 Olympus, Japan, Zeiss lens (ZEISS, Germany) สำหรับตัวแปรควบคุม (control) คือ การทดสอบด้วยการใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทที่ไม่มีสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือ



รูปที่ 4.9 แสดงค่าร้อยละพื้นที่รอยแผลของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด HaCaT ด้วยการทดสอบด้วยสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ในช่วงความเข้มข้น 25-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการบันทึก และคำนวณค่าร้อยละของพื้นที่รอยแผลเปรียบเทียบกับในวันที่เริ่มต้นการทดสอบ (Day 0) วันที่ 1 (Day 1) และวันที่ 2 (Day 2) ด้วยโปรแกรม Zen 3.6 (blue edition) สำหรับตัวแปรควบคุม (control) คือ การทดสอบด้วยการใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทที่ไม่มีสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือ



รูปที่ 4.10 แสดงพื้นที่รอยแผลบนเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT ที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเมทานอล โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 25-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ รุ่น CKX31 Olympus, Japan, Zeiss lens (ZEISS, Germany) สำหรับตัวแปรควบคุม (control) คือ การทดสอบด้วยการใช้ตัวทำละลายเมทานอลที่ไม่มีสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือ



รูปที่ 4.11 แสดงค่าร้อยละพื้นที่รอยแผลของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด HaCaT ด้วยการทดสอบด้วยสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเมทานอล ใช้ช่วงความเข้มข้น 25-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการบันทึก และคำนวณค่าร้อยละของพื้นที่รอยแผลเปรียบเทียบกับกันในวันที่เริ่มต้นการทดลอง (Day 0) วันที่ 1 (Day 1) และวันที่ 2 (Day 2) ด้วยโปรแกรม Zen 3.6 (blue edition) สำหรับตัวแปรควบคุม (control) คือ การทดสอบด้วยการใช้ตัวทำละลายเมทานอลที่ไม่มีสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือ

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

วิธีการเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่นิยมใช้นั้น มีใช้อยู่ด้วยกันหลายวิธี ตัวอย่างเช่น เทคนิคการแช่ในตัวทำละลาย (maceration) วิธีการแช่ในตัวทำละลายที่มีอุณหภูมิสูง (infusion) วิธีการสกัดด้วยการให้ตัวทำละลายไหลผ่าน (percolation) การต้มในน้ำร้อนในระยะเวลาสั้น (decoction) วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบต่อเนื่องร่วมกับการใช้ความร้อน (hot continuous extraction, Soxhlet) การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic) เพื่อช่วยในการสกัด ร่วมกับการใช้วิธีการแช่ในตัวทำละลาย (sonication) การสกัดด้วยการใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave-assisted extraction) เป็นต้น [10] วิธีการเหล่านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการสกัดสารออกฤทธิ์ที่น่าสนใจจากส่วนต่างๆ ของพืชเป้าหมายที่มีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณ และความเข้มข้นที่ไม่เพียงพอต่อการนำไปศึกษาคุณสมบัติทางเคมี และทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ สำหรับในงานวิจัยนี้ การสกัดสารจากใบต้นเนียมหูเสือ ใช้วิธีแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ได้มีการปรับปรุงวิธีการสกัดให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ด้วยการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันในการสกัดเป็นลำดับขั้น เริ่มต้นจากตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยที่สุดไปยังมากที่สุด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ สารตัวอย่างหลังจากผ่านขั้นตอนการระเหยแห้ง และ คำนวณเป็นค่าร้อยละของการสกัดสาร (% yield) ที่ได้จากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มีค่าเท่ากับ 5.28, 3.77 และ 5.86 กรัม ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าวิธีการดังกล่าวเป็นการแยกให้บริสุทธิ์เบื้องต้น (partial purification) สารที่มีคุณสมบัติที่ไม่มีขั้ว ก็จะมีการกระจายตัว และถูกแยกออกมาในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน รวมทั้งบางส่วนในชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ที่มีสภาพขั้วน้อยเมทานอล แต่ยังมีค่ามากกว่าเฮกเซน สัดส่วนของสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือที่ได้ส่วนมากจะกระจายตัวในชั้นตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้วมากกว่า (ค่าร้อยละของการสกัดสารในชั้นเฮกเซน รวมกับเอทิลอะซิเตทเท่ากับ 9.05 จากตารางที่ 1) นำไปสู่การทดสอบสารสกัดที่มีคุณสมบัติมีขั้ว และไม่มีขั้ว ส่วนใดที่มีคุณสมบัติทางเคมี และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่ากัน เริ่มต้นจากระบบการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสำหรับการทดสอบครั้งนี้ ได้แก่ วิธี DPPH, ABTS scavenging และ FRAP assay แต่ด้วยข้อจำกัดในการนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธีที่ได้กล่าวไปแล้วนี้ รวมทั้งคุณสมบัติในการละลายของสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มีความจำเป็นต้องเลือกใช้ระบบตัวทำละลายเหมาะสม สามารถละลายสารสกัด เพื่อนำไปทดสอบด้วยระบบวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ดังนั้นตัวทำละลาย “เมทานอล” จึงเป็นตัวทำละลายที่น่าจะเหมาะสมที่สุด เพราะมีคุณสมบัติกึ่งกลางในการที่ละลายสารส่วนใหญ่ได้ทั้งในกลุ่มที่มีคุณสมบัติที่มีขั้ว และไม่มีขั้ว ผลของการทดสอบการละลายของสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายต่างๆ มีความสอดคล้องกับคุณสมบัติความมีขั้วของสาร คือ สารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเมทานอลละลายได้ดีที่สุด มีค่าความเข้มข้นสูงสุดของละลายในตัวทำละลายเมทานอลเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1) และสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซนมีค่าน้อยที่สุด คือ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายต่างๆ เมื่อละลายด้วยเมทานอล ก็น่าจะมีความเข้มข้น

เพียงพอต่อการทดสอบคุณสมบัติทางเคมี และทางชีวภาพในขั้นตอนต่อไป แต่สิ่งที่ต้องระวังสำหรับขั้นตอนการทดลองต่อไป คือ ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ อาจเกิดปัญหาเรื่องการตกตะกอน และมีการแยกชั้นไม่เป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อต้องนำไปทดสอบในขั้นตอนการประเมินคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งคุณสมบัติการสมานแผลด้วยการใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด HaCaT

การวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยระบบ DPPH, ABTS scavenging และ FRAP assay เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางเคมี [21] ผลการวิเคราะห์ค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วยระบบต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ แสดงค่าในตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดจากใบต้นเนียมหูละลายเฮกเซนมีค่าการต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH, ABTS และ FRAP ที่ดีที่สุด (โดยมีค่า IC_{50} ต่อดัชนีอนุมูลอิสระชนิด DPPH และ ABTS น้อยที่สุด มีค่าต่อหน่วยวัดของ FRAP value มากที่สุด) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเมทานอล นอกจากนี้หากเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานทั้งสามชนิด ได้แก่ ascorbic acid, BHT และ Trolox ยังพบว่าสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซนนั้น มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT มากที่สุด จากผลการวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระข้างต้น พบว่ามีความสอดคล้องกับปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญทั้งสองกลุ่ม คือ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ โดยพบปริมาณรวมที่สูงที่สุดของสารทั้งสองกลุ่ม ในสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน (เมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเมทานอล) (ตารางที่ 2) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ จากการวิเคราะห์นี้อาจจะแสดงให้เห็นได้ว่าส่วนประกอบในสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน อาจจะมีลักษณะ และโครงสร้างทางเคมีในรูปแบบที่ไม่มีขั้ว และมีความเป็นไปได้อีกที่สารส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างอยู่ในสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ แต่ด้วยข้อสรุปดังกล่าวอาจยังไม่สามารถตอบประเด็นเหล่านี้ได้อย่างชัดเจน เพื่อที่จะนำไปสู่การตอบคำถามว่าสารสกัดที่ได้มีโครงสร้างในสารออกฤทธิ์สำคัญในกลุ่มเหล่านี้หรือไม่นั้น อาจจะต้องมีการศึกษาเชิงลึก ในแง่ของโครงสร้างทางเคมีของสารที่เราสนใจ เช่น เทคนิคการแยกส่วนประกอบที่เราสนใจจากสารสกัดให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น การวิเคราะห์ด้วยหลักการโครมาโทกราฟี ไม่ว่าจะเป็นวิธีการแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin layer chromatography, TLC) การใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีขั้นสูงสำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่เรียกว่า “High performance liquid chromatography” (HPLC) และในท้ายที่สุดวิธีการหาโครงสร้างทางเคมีด้วยหลักการ Nuclear magnetic resonance (NMR) หรือทั้งนี้อาจจะมีการใช้เทคนิคหาโครงสร้างทางเคมีด้วยหลักการของเครื่อง mass spectrophotometry ร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยการใช้ gas chromatography-mass spectrophotometry (GC-MS) ในกรณีที่สารมีคุณสมบัติในการระเหยได้ดี เป็นต้น

คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบกับแบคทีเรียสองกลุ่ม โดยทั้งสองกลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ คือ กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา (American Type Culture Collection, ATCC) กลุ่มที่ 2 แบคทีเรีย

สายพันธุ์ที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ที่มีการรายงานว่าเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการเกิดโรคในมนุษย์ (clinical strains containing various kinds of pathogenic) โดยทั้งสองกลุ่มนั้นเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีในห้องปฏิบัติการของกลุ่มผู้วิจัย สำหรับภาพรวมของผลการสอบ พบว่าสารสกัดจากไบตันเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายที่ค่อนข้างมีขี้ว คือ เอทิลอะซิเตท (ตัวทำละลายที่มีขี้วมากกว่าเฮกเซน) และจากชั้นตัวทำละลายที่มีขี้วมาก คือ เมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 และ 2 โดยมีจำนวนชนิดพันธุ์ของแบคทีเรียมากกว่าหากเทียบกับสารสกัดที่ได้จากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน (ข้อมูลจากตารางที่ 3) ข้อสังเกตที่น่าสนใจจากผลการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียนี้ คือ สารสกัดจากไบตันเนียมหูเสือจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจำนวน 3 ชนิด ประกอบด้วยแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 (ATCC) คือ *A. baumannii* (ATCC 19606) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ กลุ่มเชื้อที่เรียกว่า opportunistic pathogen (เชื้อที่ฉวยโอกาสติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ) และพบว่ามีการดื้อยาปฏิชีวนะบางชนิดที่ใช้ในการรักษา รวมทั้งยังเป็นเชื้อแบคทีเรียพบได้ในโรงพยาบาล ซึ่งยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญอีกด้วย [22] และ *E. coli* (ATCC 25922) คือ สายพันธุ์มาตรฐานที่มีจำหน่าย (หรือเรียกว่า commercial available) ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการในการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา [23] และสุดท้าย คือ แบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 คือ *P. shigelloides* (clinical strains containing various kinds of pathogenic organisms) ซึ่งเจือปนในสภาพแวดล้อม เช่น แหล่งน้ำจืด พบในสัตว์น้ำ เช่น ปลา หอย และเป็นเชื้อที่สามารถตรวจพบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์หลายชนิด เช่น สุนัข แมว ลิง เป็นต้น เชื่อดังกล่าวนี้นี้มีการรายงานว่าหากมีการปนเปื้อนในอาหาร จะเป็นอีกสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ในมนุษย์ จากรายงานการศึกษาปัจจุบัน เชื่อดังกล่าวนี้นี้มีสายพันธุ์ย่อยพบที่มีการดื้อยาต้านปฏิชีวนะ [24] ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การปรับปรุงวิธีการสกัดสารด้วยการใช้คุณสมบัติความขี้ว และไม่มีขี้วของตัวทำละลายที่ต่างกันั้น ทำให้ได้ข้อมูลในการออกแบบวิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการทางห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้การศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาเชิงลึกในอนาคต อาจจะต้องนำเอาสารสกัดที่มีผลการยับยั้งในสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายต่างๆไปทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการทางโครมาโทกราฟี เพื่อให้ได้ข้อมูลของสารที่เราสนใจอาจจะต้องไปหาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค และที่เป็นปัญหาเรื่องการดื้อยาต่อไปได้

การวิเคราะห์คุณสมบัติการสมานแผลของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT เมื่อใช้สารสกัดจากไบตันเนียมหูเสือจากตัวทำละลายที่มีความขี้วแตกต่างกัน พบว่าสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด ในการสมานแผลของเซลล์ทดสอบ เมื่อติดตามภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ที่ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร บ่มทิ้งไว้กับเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ชนิด HaCaT เป็นระยะเวลา 1 วัน การสมานแผลที่สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีพื้นที่เหลือเพียงร้อยละ 18.54 ± 6.13 และเซลล์มีการเชื่อมต่อกันเป็นเนื้อเดียวกันภายในระยะเวลา 2 วัน แต่ก็มีข้อสังเกตจากการทดลองครั้งนี้ แม้ว่าผลการทดลองในการวิเคราะห์คุณสมบัติในการสมานแผลของเซลล์ทดสอบจะแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดี สามารถสังเกตและตรวจวัดการสมานแผลของเซลล์ทดสอบได้ในสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท แต่สิ่งที่ต้องระวัง

ในเรื่องการวิเคราะห์ผลการทดสอบครั้งนี้ คือ ความสามารถในการละลายของสารสกัด (solubility) ทั้งนี้เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัด คือ เมทานอล ยังคงพบปัญหาเรื่องการละลายสารสกัดที่ได้จากชั้นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วสูง คือ เฮกเซน และที่มีขั้วกึ่งกลางระหว่างเฮกเซน และเมทานอล คือ เอทิลอะซิเตท ในระหว่างการทดสอบพบว่าที่ความเข้มข้นสูงในช่วงประมาณ 100-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สังเกตเห็นสารละลายที่ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์ เมื่อผสมกับสารสกัดจากใบต้นเนียมหูเสือที่เตรียมไว้ มีลักษณะที่ขุ่น และมีการแยกชั้น คาดว่าน่าจะเป็นผลจากคุณสมบัติของสารทดสอบที่มีความไม่มีขั้วสูง แต่ไม่ว่าอย่างไรก็ดี ผลการทดลองที่ได้ครั้งนี้ ก็ทำให้ได้ข้อสรุปที่น่าสนใจเกี่ยวกับสารสกัดที่ได้จากชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ว่าน่าจะมีส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ช่วยให้เกิดการสมานแผลได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ด้วยการทดสอบในระดับเซลล์ *in vitro* assay) ซึ่งในอนาคตอาจจะต้องมีการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ใช้ในการสมานแผลของเซลล์ (สารที่สามารถซื้อมาใช้เพื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ หรือที่เรียกว่า “commercial available”) เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติในการสมานแผลต่อไปในอนาคต ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้สามารถนำไปออกแบบวิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการทางห้องปฏิบัติการต่อไป เพื่อในท้ายที่สุด ก็จะเป็นอีกหนึ่งข้อมูลสำคัญในการระบุสารที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในสารสกัดที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายต่างๆ ซึ่งมีผลต่อการช่วยในการสมานแผลในระดับเซลล์ กลุ่มของผู้วิจัยก็มีความคาดหวังว่า องค์ความรู้ และข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ จะสามารถต่อยอด และพัฒนาไปประยุกต์ใช้ในทางเภสัชวิทยา และวิทยาศาสตร์การแพทย์ในอนาคตต่อไปได้

บรรณานุกรม

- [1] กระทรวงสาธารณสุข และองค์การภาครัฐ - เอกชน แผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพร ฉบับที่ 1 ปี พ.ศ. 2560-2564 จำนวน 200 หน้า, ISBN 978-616-11-3143-2
- [2] Greetha A, Mallappa KS, Uma RS. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional significance. *Molecules* 2016, 21, 369, 1-26.
- [3] ราชนัย ภูมา และ สมราน สุดดี (บรรณาธิการ) 2557. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2557. กรุงเทพมหานคร สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้ และพันธุ์พืชกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (ออนไลน์) เข้าถึงได้จาก <https://medthai.com/เนียมหูเสือ/>
- [4] เนียมหูเสือ จากฐานข้อมูลสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (ออนไลน์) เข้าถึงได้จาก <http://www.phorgarden.com/main.php?action=viewpage&id=5439>
- [5] เนียมหูเสือ จากฐานข้อมูล PHARM Database สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล (ออนไลน์) เข้าถึงจาก <https://medplant.mahidol.ac.th/pharm/search.asp>
- [6] Annual plant reviews online. Online ISBN: 978119312994. DOI:10.1002/978119312994. Copyright © 2018 John Wiley & Sons, Ltd. All rights reserved. เข้าถึงได้จาก <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/978119312994>
- [7] Lukhoba CW, Simmonds MSJ, Paton AJ. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *J Ethnopharmacol* 2006;103: 1-24.
- [8] Kuo Y-S, Chien H-F, Lu W. *Plectranthus amboinicus* and *Centella asiatica* cream for the treatment of diabetic foot ulcers. *Evid. -Based Complementary Altern. Med.* 2021;1-9.
- [9] Chiu YJ, Huang TH, Chiu CS, Lu TC, Chen YW, Peng WH, Chen CY. Analgesic and anti-inflammatory activities of the aqueous extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. both in vitro and in vivo. *Evid Based Complement Altern Med* 2012; 2012:1-11.
- [10] Pandey A, Tripathi S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *J Pharmacogn Phytochem* 2014;2(5): 115-119.
- [11] Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 2008 Jun;4(2): 89-96.
- [12] Mehrad B, Clark NM, George G. Zhanel GG, Lynch JP. Antimicrobial Resistance in Hospital-Acquired Gram-Negative Bacterial Infections. *Chest.* 2015 May;147(5): 1413-1421.

- [13] Xie J, Schaich KM. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 2014;62(19): 4251-4260.
- [14] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9/10):1231-1237.
- [15] Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*. 1999;299: 15-27.
- [16] Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* 2000;73(4):3396-3402.
- [17] Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 1999;64(4):555-559.
- [18] Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016; Apr 6(2): 71-79.
- [19] Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A. *In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomater*. 1993; Apr 14(5): 359-364.
- [20] Liang CC., Park AY., Guan JL. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2007;2(2):329-333.
- [21] Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochem & Anal Biochem*. 2011;1(106): 1-10.
- [22] Sun C, Zhou D, He J, Liu H, Ying Fu, Zhou Z, Leptihn S, Yunsong Yu, Hua X. A panel of genotypically and phenotypically diverse clinical *Acinetobacter baumannii* strains for novel antibiotic development. *Microbiol Spectr* 2024; 12(8): 12:e00086-24.
- [23] Tian C, Na Z, Yang L, Fei L, Cai R, Zhang Y, Peng J, Guo G. The antibacterial activity and mechanism of a novel peptide MR-22 against multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;14(204): 1-13.
- [24] Janda JM, Abbott SL, McIve CJ. *Plesiomonas shigelloides* Revisited. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(2): doi.org/10.1128/cmr.00103-15.

ภาคผนวก
ประวัติย่อนักวิจัย

ชื่อ-สกุล ปานทิพย์ รัตนศิริกุลชาญ (Panthip Rattanasinganchan)

คุณวุฒิ	สาขาวิชาเอก	สถาบัน	พ.ศ.
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยมหิดล	2540
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยมหิดล	2544
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต	ชีวเคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล	2551

ตำแหน่งวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
18/18 ถนนเทพรัตน์ กม. 18 ตำบลบางโคลง อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ

E-mail r_panthip@hotmail.com

ผลงานวิจัยตีพิมพ์เผยแพร่ ย้อนหลัง 5 ปี (พ.ศ. 2560-2565)

1. ปานทิพย์ รัตนศิริกุลชาญ วรภัทร บุญเยี่ยม ธนวัฒน์ กษมาวุฒิ The Effect of Hemolytic Contamination in Sample on Clinical Chemistry Analysis. มฉก. วิชาการ. 2562; 23(1): 47-59.
2. ศรมน สุทิน พชร ภาคกษมา กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ ปานทิพย์ รัตนศิริกุลชาญ นพวัฒน์ เพ็งคำศรี คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปี จำปา ว. วิทย เทคโนโลยี. หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ 2562; 5(1): 30-40.
3. กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ วรวัฒน์ พรหมเด่น ปานทิพย์ รัตนศิริกุลชาญ คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรวมของสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจากสมุนไพรไทย J Med Tech Assoc Thailand. 2020; 48(3): 7519-7531.
4. Kittipat Sopitthummakhun, Panthip Rattanasinganchan, Panjaphorn Nimmanee, Porntip Paungmoung, Penpak Moolthiya, Veerachai Thitapakorn Antioxidant capacity, antibacterial activity, and cell cytotoxicity in cholangiocarcinoma CCA from *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Asia-Pacific Journal of Science and Technology 2021; 26(2); 1-15.
5. Chatchai Nensat, Worawat Songjang, Rutaiwan Tohtong, Tuangporn Suthiphongchai, Suchada Phimsen, Panthip Rattanasinganchan, Pornphimon Metheenukul, Sarawut Kumphune, Arunya Jiraviriyakul. Porcine placenta extract improves high glucose-induced angiogenesis impairment. BMC Complementary Medicine and Therapies. 2021; 21(66): 1-15.
6. Rattanasinganchan P, Phankoo P, Jaturonwanich T, Phetset R, Bangchang A, Kongweha K, Thidkliang T, Sopitthummakhun K. Journal of the Medical Technologist Association of Thailand. In press 2024; 52(3) Dec: XX-XX.

ชื่อ-สกุล

กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ

(Kittipat Sopitthummakhun)

คุณวุฒิ	สาขาวิชาเอก	สถาบัน	พ.ศ.
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	วิทยาศาสตร์ (ชีวเคมี)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2546
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	วิทยาศาสตร์ (ชีวเคมี)	มหาวิทยาลัยมหิดล	2550
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต	วิทยาศาสตร์ (ชีวเคมี)	มหาวิทยาลัยมหิดล	2555

ตำแหน่งวิชาการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

18/18 ถนนเทพรัตน์ กม. 18 ตำบลบางไผ่ อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ

E-mail

ksopittha@gmail.com

ผลงานวิจัยตีพิมพ์เผยแพร่ ย้อนหลัง 5 ปี (พ.ศ. 2560-2565)

1. Sutin S, Pakakatsama P, Sopitthummakhun K, Rattansiganchan P, Pengkumsri N. Antioxidant properties and the inhibition of cholangiocarcinoma cell proliferation from leaf extracts of *Michelia alba* and *M. champaca*. *Huachiew Chalermprakiet Science and Technology Journal* 2019. Vol 5(1) January-June: 30-35.

2. Sopitthummakhun K, Rattanasinganchan P, Promden W. Antioxidant properties, total phenolics and flavonoids and the inhibition of cell proliferation in cholangiocarcinoma from Thai herbals. *Journal of the Medical Technologist Association of Thailand* 2020; 48(3) Dec: 7519- 31.

3. Sopitthummakun K, Rattanasinganchan P, Nimmanee P, Paungmoung P, Moonthiya P, Thitapakorn V. Antioxidant capacity, antibacterial activity, and cell cytotoxicity in cholangiocarcinoma (CCA) from *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology* 2021; 48(3) Dec: 7519-31.

4. Promden W, Sangsila A., Sopitthummakhun K., Rattanasinganchan P. Identification and Molecular detection of enteropathogenic *Vibrio* contamination in street food restaurants in Buriram Province. *Journal of the Medical Technologist Association of Thailand* 2022; 50(2) Aug: 8199-211.

5. Worawut Y, Sopitthummakhun K, De-Eknamkul W, Duanglaor, P. Development of systems for determination of Nutrients in Thai Foods by Thin layer chromatography. *Rattanakosin Journal of Science and Technology* 2023; 5(1): 73-81.

6. Rattanasinganchan P, Phankoo P, Jaturonwanich T, Phetset R, Bangchang A, Kongweha K, Thidkliang T, Sopitthummakhun K. *Journal of the Medical Technologist Association of Thailand*. In press 2024; 52(3) Dec: XX-XX.

ความเห็นของผู้บังคับบัญชา

.....
.....
.....

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุชา จุลสำลี)

รายชื่อและลายมือชื่อของหัวหน้าโครงการ

.....
ปณ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปณทิพย์ รัตนศิลป์กุลชาญ)



การพิสูจน์อักษรวิจัย

Plagiarism Checking Report

Created on 2024-10-29 23:02:05 at 23:02 PM

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
3989539	Oct 29, 2024 at 22:59 PM	panthip.rat@hcu.ac.th	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ	บทที่ 2.pdf	Completed	0.00 %

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
No data available in table				

Plagiarism Checking Report

Created on 2024-10-29 23:02:05 at 23:02 PM

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
3989539	Oct 29, 2024 at 22:59 PM	panthip.rat@hcu.ac.th	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ	บทที่ 2.pdf	Completed	0.00 %

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
No data available in table				

Plagiarism Checking Report

Created on 2024-10-29 23:02:06 at 23:02 PM

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
3989541	Oct 29, 2024 at 22:59 PM	panthip.rat@hcu.ac.th	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ	บทที่ 3.pdf	Completed	1.92 %

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
1	Antibacterial and Antioxidant Capacities of Tanjong (Mimusops elengi L.) Leaf Extract	Piboonpol, Gornganok	วารสารมหาวิทยาลัย นราธิวาสราชนครินทร์	1.92 %

Plagiarism Checking Report

Created on 2024-10-29 23:02:07 at 23:02 PM

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
3989542	Oct 29, 2024 at 23:00 PM	panthip.rat@hcu.ac.th	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ	บทที่ 4.pdf	Completed	0.99 %

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
1	Antioxidant Activities of <i>Crateva adansonii</i> DC. subsp. <i>trifoliata</i> (Roxb) Jacobs	Maneechai, Suthira	วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร	0.99 %

Plagiarism Checking Report

Created on 2024-10-29 23:03:04 at 23:03 PM

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
3989543	Oct 29, 2024 at 23:00 PM	panthip.rat@hcu.ac.th	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ	บทที่ 5.pdf	Completed	0.00 %

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
No data available in table				