รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาการต้านเชื้อมาลาเรียของสารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ

Anti-malarial study of the crude extracts from the shoot and root of *Chromolaena odorata*

ดร. นิวัฒน์ กังวานรังสรรค์

ดร. สุชาดา โทผล

ดร. ปิยาภรณ์ วรานุสันติกูล

และคณะ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาการต้านเชื้อมาลาเรียของสารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ

Anti-malarial study of the crude extracts from the shoot and root of *Chromolaena odorata*

ดร. นิวัฒน์ กังวานรังสรรค์

ดร. สุชาดา โทผล

ดร. ปิยาภรณ์ วรานุสันติกูล

และคณะ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัยปีงบประมาณ2556)

หัวข้อวิจัย การศึกษาการต้านเชื้อมาลาเรียของสารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ

ผู้ดำเนินการวิจัย นิวัฒน์ กังวานรังสรรค์[1], สุชาดา โทผล[2], ปิยาภรณ์ วรานุสันติกูล[2], ศรีสุดา หาญภาคภูมิ[2], ปิยะ โคสัย[1]

หน่วยงาน [1]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[2]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

ปี พ.ศ. 2557

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากต้นสาบเสือในการต่อต้านเชื้อมาลาเรียระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงและมีการแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศ เนื่องจากเป็นเชื้อระยะสำคัญที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ การทดลองเริ่มจากการเตรียมสกัดหยาบจากส่วนของสาบเสือ 3 ชนิดคือ ใบ ลำต้น และราก โดยใช้ตัวทำละลายคือ น้ำ เอธานอล เมธานอล และเฮกเซน จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารั่มในถาดเลี้ยงเชื้อเพื่อผ่านขั้นตอนการทำให้เชื้อทั้งหมดเติบโตสอดคล้องในระยะใกล้เคียงกัน แล้วจึงนำเชื้อมาลาเรียไปทดสอบในถาดหลุมชนิด 96 หลุม โดยสารสกัดจากสาบเสือเป็นส่วนผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 0.1 – 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงนับปริมาณเชื้อภายใช้กล้องจุลทัศน์เพื่อหาเชื้อที่สามารถไชเข้าสู่เม็ดเลือดแดง และเชื้อที่เจริญเป็นตัวแก่ในเม็ดเลือดแดง เพื่อนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อและค่าความเข้มข้นมรณะ50 ผลการวิจัยบ่งบอกว่าสารสกัดจากใบสาบเสือมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อมาลาเรียได้ดีที่สุด ในขณะที่ตัวทำละลายที่ให้ผลดีที่สุดคือ เอธานอลและเมธานอล โดยการยับยั้งการไชเข้าเม็ดเลือดแดงมีค่าครึ่งความเข้มข้นมรณะ ที่ 179.46 และ 175.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การยับยั้งการเจริญไปเป็นตัวแก่ในเม็ดเลือดแดงพบว่าเชื้อมาลาเรียมีความบกพร่องอย่างรุนแรงเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากใบที่ใช้เอธานอลและเมธานอลเป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสรุปประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบสาบเสือมีฤทธิ์การต่อต้านเชื้อมาลาเรียได้ในระดับปานกลาง มีความน่าสนใจในการนำไปทดสอบกับเชื้อมาลาเรียระยะอื่น เช่น ระยะในตับ หรือระยะในยุง อีกทั้งการศึกษาหาสารออกฤทธิ์หลักที่ยับยั้งเชื้อมาลาเรียได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อการพัฒนายาฆ่าเชื้อมาลาเรียชนิดใหม่ต่อไป

Research Title Anti-malarial study of the crude extracts from the shoot and root of *Chromolaena odorata*

Researcher Niwat Kangwanrangsan[1], Suchada Thophon[2], Piyaporn Waranusantigul[2], Srisuda Hanphakphoom[2], Piya Kosai[1]

Organization [1]Faculty of Science, Mahidol University
[2]Faculty of Science and Technology, Suan Dusit Rajabhat University

Year 2014

The propose of this experiment is to test the efficiencies of crude extracts from Siam weed, *Chromolaena odorata*, against asexual blood stage *Plasmodium falciparum*, which could lead to human morbidity and mortality. Each part from the plant, leaf, stem, and root, were extracted with different solvents that were water, ethanol, methanol, and hexane. The parasites were maintained in the culture flask, and then performed the synchronization for tightening their developmental stage. The synchronous stage parasites were tested with the extracts (10% in culture medium) in the 96-well plates. After treatment, the numbers of parasites were counted under the microscope for the ability in invasion and maturation, and then calculated for the % inhibition and 50% lethal concentration (LC_{50}). The results showed that the extract from leaf obtained the highest inhibitory effect when compare to that of stem and root. Lc_{50} of invasion inhibition was detected at 179.46 and 175.31 μg/mL in ethanol and methanol extracts, respectively. The growth inhibitory test demonstrated the severe damage of parasites when exposed to the ethanol or methanol extracts from leaf at 1,000 μg/mL. In summary the extracts from Siam weed showed the moderate anti-malarial effect against asexual blood stage malaria parasites. This plant extracts are very interesting to further test with other stages of malaria parasites such as liver stage or mosquito stage. Moreover the study on the active component in this plant would improve their efficiency in killing of malaria parasites and subsequently benefit for anti-malarial drug development.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ประหยัด โภคฐิติยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ ดร. เจตสุมน ประจำศรี หน่วยวิจัยมหิดลไวแวกซ์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อนุญาตให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ทำให้งานวิจัยดำเนินไปอย่างราบรื่นจนประสบความสำเร็จ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. รัชนีย์พร เจนวิถีสุข สำหรับความช่วยเหลือด้วยความชำนาญในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย ซึ่งเป็นเทคนิคจำเพาะที่สำคัญอย่างยิ่งในการทดลองนี้ ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต และบุคคลทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องซึ่งทำให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

2557

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	**1**
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตการวิจัย	2
สมมติฐานการวิจัย	2
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**4**
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสาบเสือ	4
องค์ประกอบทางเคมี และสารออกฤทธิ์ของสาบเสือ	**8**
การสกัดสารสำคัญจากพืช	9
มาลาเรีย	14
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
กรอบแนวคิดในการวิจัย	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	**21**
อุปกรณ์และสารเคมี	21
การเก็บตัวอย่างต้นสาบเสือ	22
การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร	23

หน้า

การเตรียมสารสกัดหยาบ 24
การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย 28

บทที่ 4 ผลการวิจัย 31
การเก็บพืชและการเตรียมสารสกัดหยาบ 31
การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย 32
การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย 36

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ 46
สรุปผลการวิจัย 46
อภิปรายผล 46
ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ 46
ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป 47

บรรณานุกรม 48
บรรณานุกรมภาษาไทย 48
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ 48

ภาคผนวก 51
ภาคผนวก ก ส่วนผสมสารเคมีและสารละลาย 52
ภาคผนวก ข ข้อมูลดิบการทดสอบสารสกัด 53

ประวัติผู้วิจัย 57

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ของสาบเสือ	9
4.1	การสกัดเย็นของพืช 3 ส่วน โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด	31
4.2	ค่า % parasitemia เมื่อผ่านการทดสอบ invasion inhibition ด้วยสารสกัดจากใบโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ	37
4.3	ค่า % parasitemia เมื่อผ่านการทดสอบ invasion inhibition ด้วยสารสกัดจากรากโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ	38
4.4	ค่า % parasitemia เมื่อผ่านการทดสอบ invasion inhibition ด้วยสารสกัดจากลำต้นโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ	39
4.5	ค่า % invasion inhibition เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดแต่ละชนิดที่ปริมาณต่างๆ	40
4.6	ค่าครึ่งความเข้มข้นมรณะ (LC_{50})	42
4.7	ค่าความรุนแรงของสารสกัดที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในทดสอบ growth inhibitory test	45
ข-1	จำนวนเชื้อมาลาเรียในกลุ่มควบคุมที่นับต่อจำนวนเม็ดเลือดแดง 20,000 เซลล์ ในการทดลองการยับยั้งการไซเข้าเม็ดเลือดแดง (invasion inhibition test)	52
ข-2	จำนวนเชื้อมาลาเรียในกลุ่มทดลองที่นับต่อจำนวนเม็ดเลือดแดง 20,000 เซลล์ ในการทดลองการยับยั้งการไซเข้าเม็ดเลือดแดง (invasion inhibition test)	52

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.1	แผนผังแสดงขอบเขตการวิจัย	2
2.1	ลักษณะใบของต้นสาบเสือ	5
2.2	ลักษณะดอกของต้นสาบเสือ	6
2.3	ลักษณะดอกแก่และเมล็ดของต้นสาบเสือ	6
2.4	ลักษณะของต้นสาบเสือเมื่อโตเต็มที่แล้ว	7
2.5	ลักษณะของรากสาบเสือเมื่อโตเต็มที่แล้ว	7
2.6	วงจรชีวิตของมาลาเรียในระยะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง	15
3.1	สถานที่ออกเก็บตัวอย่างต้นสาบเสือเพื่อใช้ในงานวิจัย	22
3.2	คัดเลือกเก็บต้นสาบเสือที่เจริญเติบโตเต็มที่เหมาะสมในการทำวิจัย	23
3.3	ส่วนลำต้น ใบ และรากของต้นสาบเสือหลังจากการล้างและตากแห้ง	24
3.4	ชั่งผงละเอียด 10 กรัม เพื่อละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร	25
3.5	เทผสมตัวทำละลายกับผงพืชในขวดแก้ว	25
3.6	การเขย่าส่วนผสมโดยเครื่อง orbital shaker	26
3.7	การกรองเพื่อแยกกากพืชออกเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ	26
3.8	การละเหยตัวทำละลายออกโดยวิธี evaporation	27
3.9	ขั้นตอนการทำให้เป็นผงแห้งโดยวิธี lyophilization	27
4.1	การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในตู้ปลอดเชื้อ	34
4.2	ตู้บ่มเชื้อมาลาเรีย; ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C	34
4.3	ตรวจสอบเชื้อมาลาเรียภายได้กล้องจุลทัศน์	35
4.4	ภาพถ่ายเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุที่กำลังขยาย 100 เท่า	35
4.5	กราฟเส้นแสดงการเจริญเติมโตของเชื้อมาลาเรียระยะ blood stage	36
4.6	กราฟแสดง % invasion inhibition ของสารสกัดจากใบ	41
4.7	กราฟแสดง % invasion inhibition ของสารสกัดจากราก	41
4.8	กราฟแสดง % invasion inhibition ของสารสกัดจากลำต้น	42
4.9	ภาพถ่ายเชื้อมาลาเรียจากกลุ่มควบคุมในการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโต	44
4.10	ภาพถ่ายเชื้อมาลาเรียจากกลุ่มทดลองต่างๆในการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโต	44

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่ยังคงเป็นปัญหาสำคัญในระดับโลก โดยพบในแถบประเทศเขตร้อนซึ่งรวมถึงประเทศไทย ซึ่งพบได้ตามแนวชายแดนไทย-พม่า และไทย-กัมพูชา โดยโรคนี้มีการระบาดอย่างต่อเนื่องตลอดทั้งปี โดยเกิดได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ทำให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณะสุขรวมทั้งเศรษฐกิจและสังคม โดยในแต่ละปีภาครัฐต้องเสียงบประมาณ ในการแจกจ่ายยารักษาโรคเป็นจำนวนมาก แต่ปัญหาโรคมาลาเรียก็ยังไม่หมดไปรวมทั้งยังเกิดปัญหาการดื้อยาของผู้ป่วยมากขึ้นและยังไม่มีแนวโน้มที่เชื้อเหล่านี้จะหมดไป ดังนั้นการคิดค้นหาตัวยาใหม่ๆรวมถึงการกำจัดโรคมาลาเรียให้หมดสิ้นไป จึงเป็นเรื่องที่สำคัญและเร่งด่วน

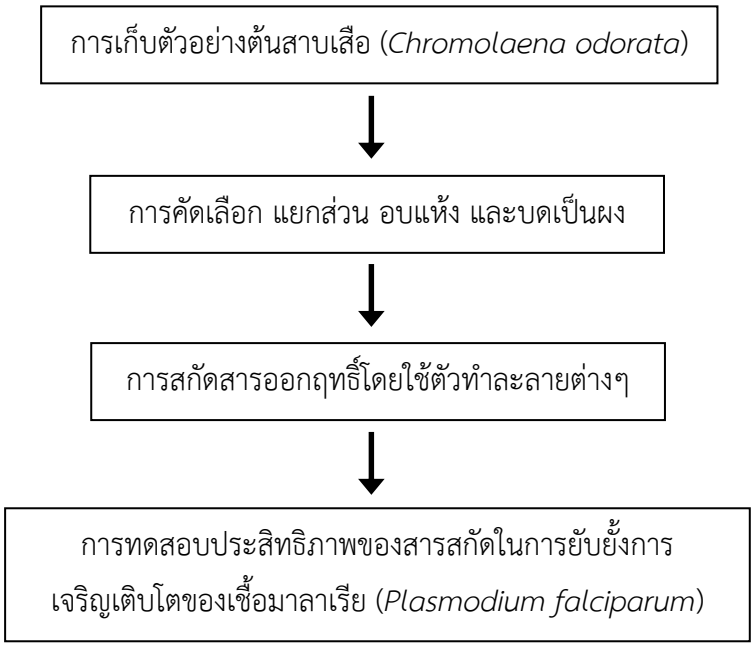
ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับพืชสมุนไพรในการรักษาโรคมากขึ้น โดยนำเอาความรู้ที่เป็นภูมิปัญญาชาวบ้านมาผ่านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ เพื่อพัฒนาองค์ความรู้และสร้างสรรค์ตัวยาใหม่ๆขึ้นมาได้ ตัวอย่าง เช่น หลังจากเกิดการดื้อยา Chloroquine อย่างมากทวีปแอฟริกา ได้มีการคิดค้นและพัฒนาตัวยาใหม่ๆจนทำให้ในปัจจุบันมียารักษาโรคมาลาเรียชนิดใหม่คือ Artemisin ซึ่งยาตัวนี้มาจากการพัฒนาสมุนไพรของประเทศจีน ซึ่งยาตัวใหม่นี้สามารถใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีเชื้อดื้อยาตัวเดิมได้ นอกจากสมุนไพรจีนดังกล่าวที่ถูกนำมาพัฒนาจนได้เป็นยาตัวใหม่แล้วยังพบว่า ในทวีปแอฟริกาซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรียอย่างหนักนั้น มีกลุ่มคนพื้นเมืองที่อาศัยภูมิปัญญาท้องถิ่นในการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคมาลาเรีย โดยมีวารสารท้องถิ่นแสดงข้อมูลการใช้สมุนไพรต่างๆของคนพื้นเมืองในการนำมารักษาไข้ป่า โดยในรายชื่อสมุนไพรที่ใช้ในแอฟริกานั้นมีหนึ่งชนิดซึ่งสามารถพบได้โดยทั่วไปในประเทศไทยคือ ต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) จากข้อมูลเหล่านี้ ทำคณะผู้วิจัยมีความสนใจอย่างยิ่ง ในการทดสอบประสิทธิภาพของต้นสาบเสือ ซึ่งนับเป็นพืชท้องถิ่นของไทยในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียซึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญของประเทศไทยและของโลก

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์การต่อต้านเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) โดยใช้สารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson)

1.3 ขอบเขตการวิจัย

การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากต้นสาบเสือในการต่อต้านเชื้อมาลาเรียระยะที่พบในกระแสเลือด โดยนำต้นสาบเสือที่เก็บจากชายป่าในจังหวัดอำนาจเจริญมาเตรียมตัวอย่างสารสกีดโดยแยกเป็นส่วนใบ ลำต้น และราก เมื่ออบแห้งและบดเป็นผงแล้วนำมาสกัดสารโดยใช้น้ำ เอธานอล เมธานอล หรือเฮกเซน เป็นตัวทำละลาย แล้วจึงนำสารสกัดดังกล่าวมาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในถาดเพาะเลี้ยง ภาพที่ 1.1



ภาพที่ 1.1 แผนผังแสดงขอบเขตการวิจัย เริ่มจากการเก็บตัวอย่าง การคัดแยกส่วน อบแห้ง บดเป็นผง การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ และการนำสารสกัดไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย

1.4 สมมติฐานการวิจัย

เนื่องจากในทวีปแอฟริกาซึ่งเป็นแหล่งระบาดที่มากที่สุดและรุนแรงแห่งหนึ่งของโรคมาลาเรีย ได้มีคนพื้นเมืองบางกลุ่มนำต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) มาใช้ในการรักษาไข้ป่า ซึ่งถือ

เป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นของคนพื้นเมืองในทวีปแอฟริกา ส่วนในประเทศไทยก็มีข้อมูลการใช้ต้นสาบเสือในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เช่นกัน แต่ยังไม่มีรายงานแน่ชัดในการใช้ต้นสาบเสือเพื่อรักษาโรคมาลาเรีย ด้วยข้อมูลเหล่านี้จึงทำให้คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า สารสกัดจากต้นสาบเสือซึ่งเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทยจะสามารถออกฤทธิ์ในการต่อต้านโรคมาลาเรียที่พบในประเทศไทยได้

1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

ต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) คือ วัชพืชที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกากลาง สามารถพบได้ทั่วไปในเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทย

โรคมาลาเรีย (Malaria) คือ โรคติดต่อในประเทศเขตร้อนโดยมียุงก้นปล่องเป็นพาหะโดยเชื้อชนิดหลักที่พบติดต่อเข้าสู่คนได้มี 5 species คือ 1) *Plasmodium falciparum* 2) *Plasmodium vivax* 3) *Plasmodium ovale* 4) *Plasmodium malariae* และ 5) *Plasmodium knowlesi*

Invasion inhibition test คือ วิธีการทดสอบการยับยั้งเชื้อมาลาเรียในการไชเข้าเม็ดเลือดแดงของโฮสต์ โดยการนำเชื้อระยะ schizont ที่แก่ตัวเต็มที่มาเป็นเชื้อตั้งต้น จากนั้นใส่สารสกัดที่ต้องการทดสอบลงไปในอาหารเลี้ยงเพื่อให้ออกฤทธิ์ยับยั้งการไชเข้าสู่เม็ดเลือดแดงไปเป็นระยะ ring

Growth inhibition test คือ วิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงจากระยะ ring จากนั้นใส่สารสกัดที่ต้องการทดสอบลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตไปเป็นระยะ schizont

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้ความรู้ความเข้าใจในสมุนไพรต้านเชื้อมาลาเรียมากขึ้น
2) ได้เข้าสู่กระบวนการคิดค้นและพัฒนายารักษาโรคมาลาเรีย
3) ได้ผลงานเผยแพร่ในวารสารระดับประเทศหรือระดับนานาชาติ

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสาบเสือ (siam weed; *Chromolaena odorata*)

2.1.1 ชื่อ

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Chromolaena odorata* (L.) King & Robins

ชื่อภาษาไทย: สาบเสือ

ชื่ออื่นๆ: สาบเสือ (สิงห์บุรี) บ้านร้าง ผักคราด (ราชบุรี) รำ เคย (ระนอง) เสือหมอบ (สุพรรณบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี) ยี่สุ่นเถื่อน (สุราษฎร์ธานี) ฝรั่งเหาะ ฝรั่งรุกที่ (สุพรรณบุรี) รำ เคย หญ้าเมืองวาย (ระนอง) หญ้าดอกขาว (สุโขทัย ระนอง) หญ้าดงรั้ง หญ้าสิริไอสวรรค์ (สระบุรี) หญ้าลืมเมือง (หนองคาย) มุ้งกะต่าย (อุดรธานี) หญ้าเลาฮ้าง (ขอนแก่น) หมาหลง (ศรีราชา-ชลบุรี) สะพัง (เลย) นองเส้งเปรง (กะเหรี่ยง–เชียงใหม่) ไช้ปู่กุย (กะเหรี่ยง–แม่ฮ่องสอน) หญ้าเมืองฮ้าง หญ้าเหม็น (อีสาน) เซโพกวย (กะเหรี่ยง-เชียงใหม่) เบญจมาศ (ตราด) มนหน (เพชรบูรณ์) หญ้าฝรั่งเศส หญ้าเครื่องบิน ปวยกีเช่า เฮียงเจกลั้ง (วิทย์, 2531; กรมส่งเสริมการเกษตร, 2537)

การจัดลำดับอนุกรมวิธานของสาบเสือ (Suwaibah *et al*., 2012)

Kingdom – Plantae (Plants)
Subkingdom – Tracheobionta (Vascular plants) Superdivision–Spermatophyta
Division – Magnoliophyta (Flowering plants)
Class – Magnoliopsida (Dicotyledons)
Subclass - Asteridae
Order - Asterales
Family – Asteraceae (Aster family)
Genus – Chromolaena DC. (thoroughwort)
Species– *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson

2.1.2 ถิ่นกำเนิด

สาบเสือ (siam weed) เป็นวัชพืชที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกากลาง มีเขตแพร่กระจายตั้งแต่ทางตอนใต้ของฟลอริดา จนถึงพื้นที่ตอนเหนือของอาร์เจนตินา กระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อนของโลกทุก

ทวีป ยกเว้นการกระจายเข้าไปในทวีปออสเตรเลีย ซึ่งเพิ่งจะพบเพียงเล็กน้อยในช่วงเวลาภายใน10ปีที่ผ่านมา (http://en.wikipedia.org/wiki/Chromolaena_odorata)

2.1.3 ลักษณะของพืช

สาบเสือ เป็นไม้ล้มลุก แตกกิ่งก้านสาขามากมายจนดูเป็นทรงพุ่ม ลำต้นและกิ่งก้านปกคลุมด้วยขนอ่อนนุ่ม ก้านและใบเมื่อขยี้จะมีกลิ่นแรงคล้ายสาบเสือ (Qeensland government, 2011; Land protection, 2006)

ใบ (leaves) ใบเดี่ยวออกจากลำต้นที่ข้อแบบตรงกันข้าม รูปรีค่อนข้างเป็นสามเหลี่ยม ขอบใบหยัก ปลายใบแหลม ฐานใบกว้างเรียวสอบเข้าหากัน ใบนุ่ม สีเขียวอ่อน เส้นใบเห็นชัดเจน 3 เส้น มีขนปกคลุม ยอดอ่อนจะมีสีม่วง ผิวใบทั้งสองด้าน (ภาพที่ 2.1)

ภาพที่ 2.1 ลักษณะของใบต้นสาบเสือ
ที่มา: Qeensland government (2011)

ดอก (flower) เป็นช่อ สีขาวหรือฟ้าอมม่วง ดอกย่อย 10-35 ดอก ดอกวงนอกบานก่อน กลีบดอกหลอมรวมกันเป็นหลอด ผลมีขนาดเล็กรูปร่างเป็นห้าเหลี่ยมสีน้ำตาลหรือดำ มีหนามแข็งบนเส้นของผล ส่วนปลายผลมีขนสีขาว ช่วยพยุงให้ผลและเมล็ดปลิวตามลมได้ไกลๆ จึงทำให้สามารถแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว ต้นสาบเสือมักออกดอกในเดือนกรกฎาคม และมักจะออกดอกอีกครั้งในเดือนกันยายนถึงตุลาคม (ภาพที่ 2.2)

ภาพที่ 2.2 ลักษณะของดอกต้นสาบเสือ
ที่มา: Qeensland government . (2011)

เมล็ด (seeds) เมล็ดของต้นสาบเสือจะถูกสร้างขึ้นภายใน 8-10 สัปดาห์หลังจากออกดอกแล้ว เมล็ดจะมีทั้งหมดประมาณ 80,000 เมล็ดต่อต้นต่อฤดูกาล แต่ละเมล็ดจะมีขนสีขาวติดอยู่ทำให้แพร่กระจายไปยังแหล่งอื่นได้ง่ายโดยมีลมและน้ำเป็นตัวนำพา เมล็ดจะงอกหลังจากฝนตกโดยเมล็ดสามารถอยู่รอดทนทานได้หลายปี (ภาพที่ 2.3)

ภาพที่ 2.3 ลักษณะของดอกแก่และเมล็ดของต้นสาบเสือ
ที่มา: Land protection (2006)

ลำต้น (stem) ลำต้น สูง 1-2 เมตร เรียบไม่ขรุขระ มีสีเขียว เมื่อแก่จะออกสีน้ำตาล (ภาพที่ 2.4)

ภาพที่ 2.4 ลักษณะของลำต้นสาบเสือเมื่อโตเต็มที่แล้ว
ที่มา: Land protection (2006)

ราก (root) ระบบรากจะมีทั้งรากแล้วและรากฝอยอยู่ใต้ดิน ส่วนที่เชื่อมต่อกับลำต้นจะมีลักษณะเป็น basal ball (ภาพที่ 2.5)

ภาพที่ 2.5 ลักษณะของรากสาบเสือเมื่อโตเต็มที่แล้ว
ที่มา: Land protection (2006)

2.1.4 การแพร่กระจาย

ต้นสาบเสือขึ้นได้ทั่วไปทั้งในสภาพดินชื้นหรือ แห้ง แพร่กระจายในแหล่งปลูกพืชยืนต้นและที่รกร้างว่างเปล่าและตามที่มีแสงแดดมากๆ โดยสามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้ด้วยเมล็ด

2.2 องค์ประกอบทางเคมี และสารออกฤทธิ์ของสาบเสือ

2.2.1 องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ

สารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอธานอลจะประกอบด้วยสารต่าง ได้แก่ สารกลุ่ม phenolic acids เช่น protocatechuic, *p*-hydroxybenzoic, *p*-coumaric, ferulic and vanillic acids และสารกลุ่มอื่นๆ เช่น complex mixtures of lipophilic flavonoid aglycones (flavanones,flavonols, flavones and chalcones) Pisutthanan *et al*. (2005) หากทำการแยกสารสกัดหยาบจากต้นสาบเสือ จะพบสารชนิดต่างๆ เช่น 3,5,4-trihydroxy-7-methoxyflavanone; 5,7,3-trihydroxy-5-methoxyflavanone และ 3,5,7-trihydroxy-4-methoxyflavanone (Phan *et al*., 2001) สารสกัดหยาบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำและเมธานอลจะพบสารพวก tannins, steroids, terpenoids, flavonoids และ cardiac glycosides แต่สาร alkaloids จะพบเมื่อสกัดสารสกัดหยาบด้วยเมธานอลเท่านั้น (Akinmoladun *et al*., 2007)

จากการศึกษาการสกัดและจำแนกสารจากส่วนต่าง ๆ ของสาบเสือ ได้แก่ลำ ต้น และใบพบสารประกอบหลายชนิด เช่น polysaccharides, fat, oil, terpenoids, phenolics, alkaloids, n-oxides (อุดมลักษณ์ และคณะ, 2535) ในส่วนที่เป็น alkaloids จะมีสาร napthoquinone, tannin และ saponin ในส่วนน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) ในใบมีสาร alpha-pinene 19.32 เปอร์เซ็นต์ cadinene 19.09 เปอร์เซ็นต์ camphor 15.46 เปอร์เซ็นต์ limonene 10.22 เปอร์เซ็นต์ beta-caryophyllene 7.05 เปอร์เซ็นต์ และ cadinol 6.36 เปอร์เซ็นต์ และส่วนที่เป็น terpenoids ของสาบเสือมีสาร triterpene epoxide, savigenin, lupeol, beta-amyrin(Inya-Agha *et al*., 1987)

ลำต้นสาบเสือมีสารประกอบ eupatol, coumarin, 1-eupatene,lupeol, beta-amyrin, flavone, salvigenin ในใบสาบเสือมีสารประกอบ ceryl algohol, betasitosterol, p-anisic acid, trihydric algohol, isosa kuranetin และ odaratin (พเยาว์, 2530; กรมส่งเสริมการเกษตร, 2537) terpenoids ที่สกัดได้จากสาบเสือพบสารออกฤทธิ์ epoxy lupeol , 13-epoxy lupeol ซึ่งเป็นสาร triterpene epoxide ตัวใหม่ออกฤทธิ์ฆ่าแมลง เมื่อนำ สารสกัดจากสาบเสือมาทดสอบกับหนอนใยผักได้ผลดีโดยเฉพาะส่วนที่เป็นalkaloids (อุดมลักษณ์ และคณะ, 2535)

2.2.2 องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย

Prabhu *et al*. (2011) ได้ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบเสือสด (*Chromolaena odorata (Asteraceae)* (L.) R.M. King & H. Rob.) โดยกลั่นด้วยน้ำร้อน (hydro-distillation)

และทำการแยกชนิดของสารโดยใช้ GC-MS สารที่พบเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ 5, 6-diethenyl-1-methyl- cyclohexene (44.7%), β-guiane (11.9%), elemol (8.5%) และ patchoulene (8.6%) Suwaibah *et al*. (2012) รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบและลำต้นสาบเสือที่ทำการสกัดโดยกลั่นด้วยน้ำร้อน (hydro-distillation) และทำการแยกชนิดของสารโดยใช้ GC-MS ควบคู่กับ retention indices (IR) พบว่า สารที่พบมากที่สุดทั้งในใบและลำต้นสาบเสือ คือ **β**–cubebene (32%) และรองลงมา คือ δ-cadinene (18%) และ carypphyllene (11%) ในน้ำมันหอมระเหยจากใบยังมีสารประกอบ alpha-pinene, cadinene, camphor, limonene, beta-caryophyllene และ cadinol (Inya-Agha *et al*., 1987)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ของสาบเสือ

Phytochemical	Status
Alkaloids	+
Cyanogenic glycosides	+
Flavonoids	
Aurone	+
Chalcone	+
Flavone	+
Flavone	+
Phytates	++
Saponins	+++
Tannins	++

+ = slightly present, ++ = moderately present, +++ = highly present

ที่มา: Ngozi *et al*. (2009)

2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืช

2.3.1 วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืช

การสกัดสาระสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัด วิธีเหล่านี้ได้แก่

1) Maceration เป็นวิธีการสกัดสาระสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิดเช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถ เป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อ

ครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆรินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (marc) ให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง การสกัดถ้าจะสกัดให้หมดจด (exhausted) อาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลายๆครั้ง วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

เนื่องจากกระบวนการสกัดด้วยวิธี Maceration ช้า จึงมีผู้ดัดแปลงใช้ mixer หรือ homogenizer มาช่วยทำให้เซลล์พืชแตกออก การสกัดจึงเร็วขึ้น เรียกวิธีการสกัดนี้ว่า Vortical (turbo) extraction ซึ่งต่อมาได้พัฒนาใช้ Ultrasound extraction โดยใช้เสียงที่มีความถี่สูงเกิน 20,000 Hz แต่การใช้เสียงช่วยในการสกัดอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของน้ำไปเป็น peroxide ซึ่งอาจมีผลต่อสารที่สกัด และยังอาจทำให้เกิดการ oxidation ต่อสารโดยตรง เพราะขณะที่ใช้ ultrasound จะเกิดช่องว่าง และมีอากาศเข้าไปแทรกในตัวทำละลาย นอกจากนี้ยังอาจเพิ่มความเร็วในการสกัด โดยเพิ่มอุณหภูมิ แต่ต้องระวังการสลายตัวของสาระสำคัญเช่นกันและยังมีผู้พัฒนาใช้ Electrical discharge ในการช่วยทำให้เนื้อเยื่อแตก และการสกัดเร็วขึ้น โดยกระแสไฟฟ้าจะทำให้ช่องว่าง & energy ซึ่งเคลื่อนที่ด้วยความเร็วและแรงพอที่ทำให้เนื้อเยื่อแตกออก

เมื่อกรองเอาสารสกัดออกแล้ว จะพบว่ายังมีสารสกัดตกค้างอยู่ในกากจำนวนหนึ่ง จึงควรบีบเอาสารออก ซึ่งทำได้โดยใช้

- Basket Presses หรือ Wine Presses ซึ่งบีบสารสกัดโดยเอากากใส่ในตะกร้า ซึ่งมีรูข้างๆ แล้วบีบด้วย piston

- Filter หรือ Strainer Presses เป็นเครื่องมือที่ประกอบด้วยแผ่นเหล็กมีรู ใส่ไว้ใน Chamber แล้วใช้ hydraulic pressure บีบลงมา

- Willmers presses เป็นเครื่องมือบีบที่ทำเป็นรูปนอน ผนังมีรู ภายในมีถุงยาง เมื่อปล่อยลมเข้าไปถุงลมก็จะดัน & บีบ ในสารสกัดออกมา

- Screw presses โดยมี screw ซึ่งค่อยๆหมุนไปบีบเอาสารสกัดออกมาดังภาพ

- Sieve belt presses เป็นเครื่องมือที่ประหยัด โดยเอากากใส่ลงบนสายพานซึ่งจะหมุนไประหว่างลูกกลิ้ง และถูกบีบเป็นแผ่นบางๆ

2) Percolation เป็นวิธีการสกัดสาระสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า percolator นำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชม. เพื่อให้พองตัวเต็มที่ แล้วค่อยๆ บรรจุผงยาทีละน้อยเป็นชั้นลงใน percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (solvent head) ประมาณ 0.5 ชม. ทิ้งไว้ 24 ชม. จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออกโดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้งเก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์ บีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันนำไปกรอง

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารในชั้นอุตสาหกรรม ใช้ percolator ต่อกันหลายตัว เรียกว่า Countercurrent-operated percolator battery และมีการดัดแปลงวิธีการสกัดให้มีการเคลื่อนที่ของสารที่จะสกัด และตัวทำละลายเข้าหากัน เรียกว่า Counter current extraction

3) การสกัดด้วย Soxhlet Extractor เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำการสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน flask ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาใน thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปใน flask ด้วยวิธีการกาลักน้ำ Flask นี้ได้รับความร้อนจาก heating mantle หรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไป ทิ้งสารสกัดไว้ใน flask ตัวทำละลายเมื่อกระทบ condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งกระสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วยจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว

4) Liquid-liquid Extraction เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรกแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

- Extractant lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร
- Raffinate lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

5) การสกัดน้ำมันหอมระเหย (Extraction of volatile oil)

- Resorption เป็นวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีดูดซับ โดยมากใช้สกัดกลีบดอก อาจทำได้โดย Enfleurage ซึ่งเป็นวิธีการดูดซับ Liquid-liquid extractor โดยเรียงกลีบดอกลงไปบนขี้ผึ้งซึ่งเคลือบไว้บนแผ่นแก้ว เมื่อน้ำมันหอมระเหยถูกดูดซับแล้วรีบเปลี่ยนกลีบดอกแล้วจึงนำขี้ผึ้งไปสกัดน้ำมันหอมระเหยอีกครั้งหนึ่ง นำกลีบดอกไปต้มกับไขมันที่อุณหภูมิต่ำๆ แล้วกรองเอากลีบดอกออก นำไขมันไปสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ผ่านอากาศซึ่งอุ่นเข้าไปพร้อมกับละอองของไขมันเหนือกลีบดอกเพื่อดูดซับน้ำมันหอมระเหยไว้

- Solvent Extraction เป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหย โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น สกัดน้ำมันกานพลูโดยใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์

- Mechanical Expression เป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีบีบ เช่น นำเปลือกผลส้มไปบีบจะได้ water-in-oil emulsion ซึ่งแยกน้ำมันหอมระเหยออก โดยวิธี centrifugation

- Steam Distillation เป็นการกลั่นโดยใช้ไอน้ำ โดยผ่านไอน้ำไปบนสมุนไพรซึ่งบรรจุไว้ใน flask พร้อมกับน้ำ ไอน้ำจะพาเอาน้ำมันหอมระเหยไปยัง condenser แล้วกลั่นตัวเป็นของเหลว เมื่อทิ้งไว้น้ำมันจะแยกตัวออกจากน้ำ

- Water distillation เป็นวิธีการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรโดยต้มกับน้ำ เมื่อน้ำและน้ำมันหอมระเหยระเหยขึ้นไปถึง condenser จะกลั่นตัว แล้วจึงนำของเหลวที่ได้ไปแยกน้ำมัน

หอมระเหยจากชั้นน้ำ เครื่องมือที่ใช้คือ Cleveneaur's apparatus ซึ่งมีชนิดสำหรับน้ำมันหอมระเหยซึ่งหนักกว่าน้ำและสำหรับน้ำมันหอมระเหยที่เบากว่าน้ำ

- การสกัดน้ำมันพืช การสกัดน้ำมันพืชจากเมล็ดพืชอาจทำได้โดยใช้ความร้อนหรือไม่ใช้ความร้อนก็ได้การบีบโดยใช้ความร้อนจะได้น้ำมันออกมามากกว่า แต่จะบริสุทธิ์น้อยกว่า เครื่องมือ ที่ใช้บีบน้ำมันทางอุตสาหกรรมที่นิยมกันคือเครื่องบีบชนิดเกลียว (Screw press หรือ expeller) เมื่อหมุนเกลียวเข้าไปจะเกิดแรงกดทำให้เมล็ดพืชแตกออก ให้น้ำมันไหลออกมาทางหนึ่ง ส่วนกากจะไหลออกอีกทางหนึ่ง กากที่ได้จากการบีบนี้มักจะยังมีน้ำมันค้างอยู่ 2-4% ในทางอุตสาหกรรมจึงมักจะนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน อีกครั้งหนึ่ง

- Extraction by Thermo micro-distillation เป็นการสกัดสารโดยใช้เครื่องมือ Thermomicro-ฤnalysis and Separation Ovens (TAS oven) เป็นการสกัดสารขนาดน้อยมาก นำสารใส่ลงใน car-Tridge ซึ่งข้างหนึ่ง seal อีกข้างหนึ่งเป็น capillaries เมื่อใส่เข้าใน oven ความร้อนจะทำให้สารระเหยหรือระเหิดออกมาด้วยแผ่น TLC แล้วนำไปตรวจสอบอีกทีหนึ่ง

2.3.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสาระสำคัญจากพืช

การเลือกใช้ตัวทำละลายในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ อยู่ที่การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่ดี ควรมีคุณสมบัติ เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่เราต้องการสกัดได้ดีพอ ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด ไม่เป็นพิษ ราคาพอสมควร ในการเลือกใช้ตัวทำละลายเราอาศัยหลักเกณฑ์ต่อไปนี้ คือ

1) สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน

2) ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุดในขณะที่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด

3) แรง (force) แรงซึ่งเกี่ยวข้องในการละลายที่สำคัญคือ

- Dispersion force เป็นแรงที่เกิดมาก Transient charger induced ในโมเลกุล พวกตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจะประกอบด้วยโมเลกุลซึ่งเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ทำให้พวกสารที่ไม่มีขั้วเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างโมเลกุลได้ง่าย

- Dipole-dipole force เป็นแรงที่พบในตัวทำละลายที่มีขั้วเกิดการเหนี่ยวนำในโมเลกุลเกิดเป็นขั้วบวก และขั้วลบ ทำให้โมเลกุลของตัวทำละลายที่มีขั้วจับกันแน่น พวกสารซึ่งไม่มีขั้วจะแทรกตัวเข้าไปได้ยาก

- H-bonding สารที่สามารถสร้าง H-bonding กับตัวทำละลายได้ดีก็จะละลายได้ดี สารซึ่งสามารถสร้าง H-bonding ได้แบ่งออกเป็น สารที่ active hydrogen แต่ ไม่มี donor atom เช่น CHCl สารที่มี donor atom แต่ไม่มี active hydrogen สารที่มีทั้ง donor และ active hydrogen สารซึ่งสามารถจับตัวต่อเนื่องกันเป็นร่างแห เกิดเป็นโมเลกุลใหม่ (network of bonding) ได้แก่น้ำ polyphenols และ hydroxyl acids

ตัวทำละลายที่มีขั้วเหมาะกับสารที่มีขั้วและตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เหมาะกับสารที่ไม่มีขั้ว การผสมระหว่างตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้วอาจทำให้การละลายดีขึ้น เช่นกรดสามารถละลายได้ทั้งในเอธานอล อะซิโตน และส่วนผสมของตัวทำละลายทั้ง 2 บางครั้งการเลือกใช้ตัวทำละลายอาจจะอาศัยการพิจารณาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารเช่น β-amyrene, β-amyrin และ oleanolic acid มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกัน แต่การละลายจะแตกต่างกันคือ β-amyrene จะละลายดีในเฮกเซน เพราะเป็นสารที่ไม่มีขั้ว β-amyrin ซึ่งมี –OH เพิ่มขึ้นจะละลายได้ดีในคลอโรฟอร์มและอีเธอร์เพราะมีขั้วเพิ่มขึ้น ส่วน oleanolic acid มีทั้ง –COOH และ –OH จึงต้องใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วมากขึ้น เช่น แอทธิลอะซีเตท และอะซิโซน

ตัวทำละลายอาจจะจัดเรียงตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปมากได้ดังนี้ cyclohexane , carbontetrachloride, benzene, ether, chloroform, acetone, ethyl acetate, Ethanol, methanol, water, acids & bases

ตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่

1) คลอโรฟอร์ม เป็นตัวทำละลายที่ดี แต่มี selectivity น้อย เกิด emulsion ง่าย ถ้าใช้สกัดสารซึ่งเป็นด่างแก่อาจจะสลายตัวให้กรดเกลือ

2) อีเธอร์ มีอำนาจในการละลายน้อยกว่าคลอโรฟอร์ม แต่มี selectivity ดีกว่าคอลโรฟอร์ม ข้อเสียคือระเหยง่าย เกิด oxide ได้ง่ายและดูดน้ำได้มาก

3) เฮกเซน เหมาะสำหรับพวกสารที่ไม่มีขั้ว มักใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับกำจัดไขมันจากสมุนไพร ข้อดีคือราคาถูก

4) แอลกอฮอล์ ที่ใช้มากคือเมธานอล และเอธานอล เป็น solvent ยอดนิยมที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีอำนาจในการละลายกว้างมาก และยังใช้ทำลายเอนไซม์ในได้พืชด้วย

2.3.3 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักจะมีปริมาตรโตและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อน ซึ่งอาจทำได้หลายวิธีคือ

1) Free Evaporation คือการระเหยให้แห้ง โดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือ hot plate บางครั้งอาจจะเป่าอากาศร้อนลงไปในสารสกัดด้วยเพื่อให้ระเหยได้เร็วขึ้น

2) Distillation in vacuum เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยการกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ vacuum pump เครื่องมือนี้เรียกว่า Rotary evaporator ประกอบด้วย 3ส่วน คือ distillation flask , condenser และ receiving flask , Distillation flask จะหมุนอยู่ตลอดเวลาที่ทำงาน และแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำ เพื่อให้การ

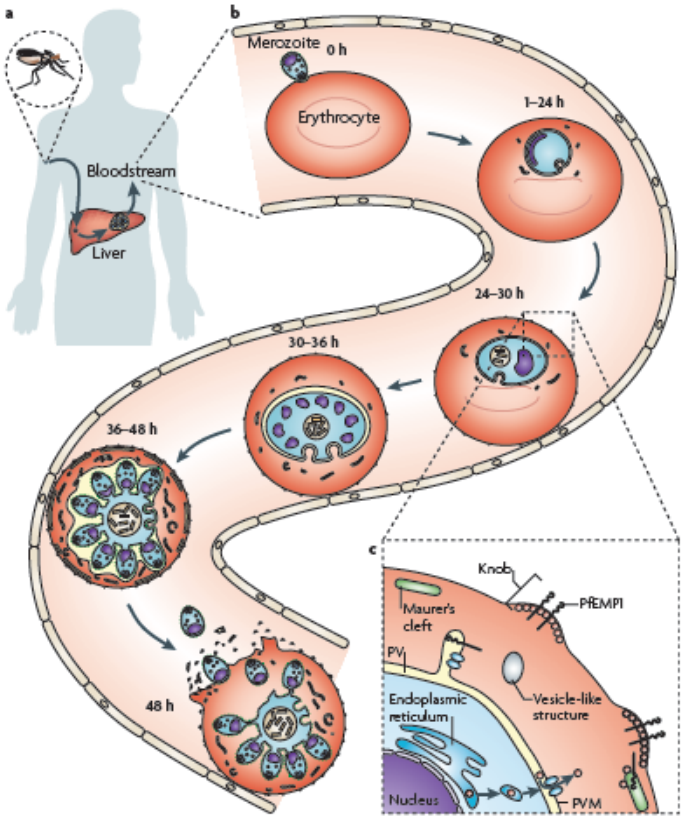
กระจายของความร้อนทั่วถึงและสม่ำเสมอ เครื่องมือที่ดีจะต้องมีระบบการทำสุญญากาศที่ดี ระยะระหว่าง distillation flask และ condenser สั้นและมีระบบทำความเย็นของ condenser ที่ดี

3) การแช่แข็ง (Freezing) ถ้าเป็นสารสกัดด้วยน้ำใช้ lyophilizer หรือ freeze dryer แต่ถ้าเป็นตัวทำละลายอื่นที่เฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่แข็ง เราสามารถแยกจากสารสกัดเข้มข้นโดยใช้การปั่นเหวี่ยง (centrifugation)

4) Ultrafiltration เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้ membrane ใช้กับสารที่มี molecular weight สูงกว่า 5,000

2.4 มาลาเรีย (Malaria)

มาลาเรีย คือ โรคติดเชื้อที่มียุงเป็นพาหะ สาเหตุของโรคได้แก่เชื้อโปรโตซัวใน Genus Plasmodium โดยเมื่อแมลงพาหะคือยุงก้นปล่อง (Genus Anopheles) ที่มีเชื้อในระยะติดต่อซึ่งจะอาศัยอยู่ในต่อมน้ำลายของยุงมากัดคน เชื้อจะถูกปล่อยเข้าสู่ชั้นผิวหนังและเดินทางสู่กระแสเลือด จากนั้นจะเข้าสู่ตับและเข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์ตับ เรียกระยะนี้ว่า pre-erythrocytic stage เมื่อแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นก็จะออกเข้ามาสู่กระแสเลือดอีกครั้ง จากนั้นจะใช้เม็ดเลือดแดงเป็นที่อยู่อาศัยต่อไป (ภาพที่ 2.6) จึงเรียกระยะนี้ว่า erythrocytic stage ในระยะนี้เองที่ผู้ติดเชื้อจะแสดงอาการของโรคเช่น มีไข้ ปวดศีรษะ และต่อมาอาจรุนแรงมากขึ้นจนถึงขั้นเสียชีวิตได้



ภาพที่ 2.6 วงจรชีวิตของมาลาเรียในระยะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง
จาก Fig.1 Goldberg DE and Cowman AF. 2010 “Moving in and renovating: exporting proteins from Plasmodium into host erythrocytes” Nature Reviews; Microbiology 8: 617-21

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.5.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาบเสือ

Akinmoladun *et al*. (2007) ศึกษาสารสกัดสาบเสือด้วยตัวทำละลายที่เป็นน้ำและเมธานอลมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า มี total phenolic content, มีการลดฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ (Reducing power) และมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ได้เท่ากับ 0.01± 0.00 mg/g GAE, 0.22 ± 0.01 and 28.85 ± 0.99% ตามลำดับ แต่มีในปริมาณต่ำมาก

2.5.2 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสาบเสือ

Suksamrarn *et al*. (2004) รายงานว่า ในดอกของสาบเสือ (*Chromolaena odorata* หรือ *Eupatorium odoratum*) จะพบ สารประกอบต่างๆ ได้แก่ สารประกอบ flavonoids 4 ชนิด คือ isosakuranetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavanone), persicogenin (5,3'-dihydroxy-

7,4'-dimethoxyflavanone), 5,6,7,4'-tetramethoxyflavanone และ 4'-hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavanone สารประกอบ flavones 2 ชนิด คือ acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone) และ luteolin (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone) และสารประกอบ chalcones 2 ชนิด คือ 2'-hydroxy-4,4',5',6'-tetramethoxychalcone และ 4,2'-dihydroxy-4',5',6'-trimethoxychalcone จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดวัณโรค *(Mycobacterium tuberculosis)* พบว่า สาร isosakuranetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavanone) มีความสามรถยับยั้งเชื้อได้ในระดับปานกลาง (MIC= 174.8 μmol) สำหรับสาร 4'-hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavanone, acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxy flavone) และ luteolin (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone)มีความสามรถยับยั้งเชื้อได้น้อย ที่ค่า MIC เท่ากับ 606.0, 704.2 และ 699.3 μmol ตามลำดับ

Vital and Rivera (2009) รายงานว่า สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอธานอล พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, และ *Salmonella typhimutium* ให้ค่าโซนใสในการยังยั้งแบคทีเรียเท่ากับ 8.33±0.58, 10.00±0.00 และ 9.00±0.00 ตามลำดับ Sukanya *et al*. (2009) รายงานว่า สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเมธานอล สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* ที่ให้ค่าโซนใสของการยับยั้งเท่ากับ10 และ 9 มิลลิเมตร ตามลำดับ และใบสาบเสือที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* ที่ให้ค่าโซนใสของการยับยั้งเท่ากับ 8 และ 4 มิลลิเมตรตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เมธานอล เอธานอล เอทิลอะซิเตท และคลอโรฟอร์มจะให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิด (MIC) อยู่ในช่วง 0.35 ถึง 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Mondal *et al*. (2010) รายงานว่า สารสกัดหยาบจากใบของต้นสาบเสือมีความสามารถในการต้านเชื้อที่ทำให้เกิดโรคหนองใน (gorrhorrhea)ได้ โดยพบว่า สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอธานอลจะให้ค่าการยับยั้งเชื้อก่อโรคนี้ได้ดีที่สุด (12.5±0.5 mm) ให้ค่า MIC เท่ากับ 90 μg/mL รองลงมาคือสารสกัดจาก เมธานอล (8.8±0.3mm) 300 ให้ค่า MIC เท่ากับ องค์ประกอบทางสารเคมี ได้แก่ quercitin 64.2%, kaempferol8.5%, isoquercitin 4.2%, rutin 3.4 % และ marringenin 4/-methyl ether 3% Pisutthanan *et al*. (2005) ทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากต้นสาบเสือ *Chromolaena odorata* ที่ทำการสกัดด้วยน้ำ พบว่า มีฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*

Naidoo *et al*. (2011) รายงานว่าสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเมธานอลจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Staphylococcus aereus,* และ *Staphylococcus epidermidis*) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ สำหรับแบคทีเรียแกรม

ลบสามารถยับยั้งได้เพียงชนิดเดียว คือ *E. coli* ในส่วนของลำต้นที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตรทและเมธานอลจะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus epidermis*

Sukanya *et al*. (2011) ศึกษาสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) ที่สกัดด้วยเมธานอล พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli, S. aureus, Xanthomonas vesicatoria* และ *R. solanaccearum* ที่ให้โซนใสเท่ากับ 8, 7, 5 และ 7 mm ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตรตต่อเฮกเซน ในอัตราส่วน 5:5 จะสามารถยับยั้ง *E. coli, S. aureus, X. vesicatoria* และ *Ralstonia solanaccearum* ให้ค่าโซนใสเท่ากับ 11, 10, 9 และ 7mm ตามลำดับ และให้ค่า MIC ของ *Xanthomonas vesicatoria* และ *Ralstonia solanaccearum* เท่ากับ 0.35 to 4.0 mg/mL และ 0.25 to 4.0 mg/mL ตามลำดับ

Prabhu *et al.* (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบเสือสด *(Chromolaena odorata (Asteraceae)* (L.) R.M. King & H. Rob.) พบว่า มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus, B. subtili, B. megaterium,* และ *Staphylococous aureus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli, Shigella boydii, Salmonella typhi*, *Aeromonas hydrophila* และ *Pseudomonas aurogonisa* ยับยั้งเชื้อรา ได้แก่ *Asperigillus niger, Asperigillus flavus, Asperigillus terreus,* และ *Penicillium notatum* ยับยั้งยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* รวมทั้งยับยั้งสายพันธุ์ MRSA

2.5.3 ความเป็นพิษของสาบเสือ

ต้นสาบเสือเมื่อยังอ่อนจะมีสาร nitrate ในปริมาณสูงถ้าลูกวัวกินก็อาจทำให้เสียชีวิตได้ (land protection, 2006) Suksamrarn *et al*. (2004) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity)ในคนของสารประกอบจากดอกสาบเสือ พบว่า สาร acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone) แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (NCl-H187) ในระดับปานกลางที่ค่า MIC เท่ากับ 24.6 ในขณะที่สาร luteolin (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone) แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ NCl-H187 ในระดับปานกลาง (MIC= 19.2 μmol) และ แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระบบหายใจ (Breast cancer, BC) ในระดับต่ำ (MIC= 38.4 μmol)

2.5.4 ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

Prabhu *et al*. (2011) ได้ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบเสือสด *(Chromolaena odorata (Asteraceae)* (L.) R.M. King & H. Rob.) มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง HeLa, HEp-2 and NIH 3T3 ได้ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 60.3, 67.5 และ 72.00 μg/mL ได้อย่างมีนัยสำคัญ ตามลำดับ

Hung *et al*. (2011) ได้ทำการแยกชนิดของสารที่ได้จากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอธานอล 70% พบ สารกลุ่มใหม่ของ flavonoid glycosides จำนวน 2 ชนิด โดยใช้ NMR spectroscopic interpretation เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง LLC และ HL-60 พบว่า สารชนิดที่ 1 แสดงการยับยั้งเซลล์มะเร็ง LLC และ HL-60 ได้ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 28.2 และ 11.6 mM ตามลำดับ สำหรับสารชนิดที่ 2 พบว่า แสดงการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ชนิดเดียว คือ HL-60 ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 10.8 mM อย่างมีนัยสำคัญ

Prabhu and Ravi (2012) ได้ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบเสือ (*Chromalaena odorata* (L.) R.M. King & Rob. โดยการกลั่นด้วยน้ำร้อน จากนั้นทำการแยกสารสกัดที่ได้โดยใช้คอลัมน์โครมาโตรกราฟฟีและศึกษาคุณลักษณะของสารสกัดโดยใช้ IR, H-NMR และ MS พบว่า สารที่แยกได้เป็นอนุพันธ์ของ tritrepene เมื่อทำการทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับของคนชนิด HepG2 (human hepatoma cells) โดยเทคนิค MTT assay พบว่า สามารถยับยั้งหรือต้านเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ได้ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 206.7 μg/m

2.5.5 ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

Pisutthanan *et al*. (2005) ทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากต้นสาบเสือ *Chromolaena odorata* ที่ทำการสกัดด้วยน้ำ พบว่า มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* K1 ให้ค่า EC_{50} เท่ากับ 9.39 ¼g/mL

2.5.6 ฤทธิ์ต้านโปรโตซัว

โปรโตซัว *Trichomonas vaginalis* เป็นปรสิตที่เป็นปัญหาเป็นอย่างมากในประเทศไทยซึ่งเรียกว่า พยาธิหนวดที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการอักเสบของช่องคลอดในสตรีและเกิดการระคายเคืองในท่อปัสสาวะอักเสบหรือต่อมลูกหมากอักเสบในผู้ชายได้ (จิตต์ภักดี, 2011) *Blastocystis hominis* เป็นโปรโตซัวที่อาศัยอยู่ในลำไส้ สามารถทำให้เกิดอาการได้ทั้งในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติและภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยเอดส์ เบาหวาน และมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น อาการที่เกิดจากการติดเชื้อ *Blatocystis hominis* เป็นอาการที่ไม่เฉพาะเจาะจง คือ ท้องร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้ เบื่ออาหาร ท้องอืด และอ่อนล้า เป็นต้น(นิมมานนท์และคณะ, 2010)

Vital and Rivera (2009) รายงานว่า สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอธานอล พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 0.1, 0.5 และ 1.0 % สามารถลดจำนวนโปรโตซัว *Trichomonas vaginalis* ได้ 84.9, 92.8 และ 90.9 % เมื่อเวลาผ่านไป 72, 72 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับการยับยั้งการเจริญของโปรโตซัว *Blastocystis hominis* พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 0.1, 0.5 และ 1.0 % สามารถลดจำนวนโปรโตซัว *Blastocystis hominis* ได้ 90.1 และ 93.6 % เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง

2.5.7 ฤทธิ์ต้านไวรัส HIV

Pisutthanan *et al*. (2005) ทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากต้นสาบเสือ ที่ทำการสกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์ต้าน HSV-1 ที่ค่า IC50 เท่ากับ 1.74 ¼g/mL

2.5.8 ฤทธิ์ในการควบคุมโรคพืชของสารสกัดจากพืช

Sukanya *et al*. (2009) รายงานว่า สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเมธานอล สามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืช *Xanthomonas vesicatoria* และ *Ralstonia solanacearum* ที่ให้ค่าโซนใสของการยับยั้งเท่ากับ12 มิลลิเมตร และใบสาบเสือที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม สามารถยับยั้ง ที่ให้ค่าโซนใสของการยับยั้งเชื้อราโรคพืช *Xanthomonas vesicatoria* และ *Ralstonia solanacearum* เท่ากับ 4มิลลิเมตร สำหรับสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เมธานอล เอธานอล เอทิลอะซิเตท และคลอโรฟอร์มจะให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิด (MIC) อยู่ในช่วง 0.25 ถึง 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สุธามาศ และ ศศิธร (2553) ได้ศึกษาสารสกัดจากต้นสาบเสือ พบว่า ที่ความเข้มข้น 1000 ppm สามารถยับยั้งเชื้อรา *Phyllosticta citricarpa* ที่เป็นสาเหตุโรคจุดดำของส้มโอได้เท่ากับ 68.2% Okigbo *et al*. (2010) รายงานว่า สารสกัดจากใบสาบเสือ *Chromolaena odorata* ที่สกัดด้วยเอธานอลและน้ำ พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งรา *Fusarium oxysporum, Asperigillus niger* และ *Botryodiploidia theobromae* ที่เป็นเป็นสาเหตุโรคหัวเน่าของมันเทศในช่วงหลังการเก็บเกี่ยว หรือในช่วงเก็บรักษาหัวมันเทศได้

2.5.9 ฤทธิ์ในการกำจัดศัตรูพืชของสารสกัดจากพืช

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากใบสาบเสือที่มีต่อการตายของหนอนใยผัก พบว่าสารสกัดจากใบสาบเสือโดยวิธีการหมักซึ่งมีน้ำเป็นตัวทำละลายและวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ มีผลต่อการตายของหนอนใยผักน้อยมาก สำหรับสารสกัดจากใบสารเสือที่สกัดโดยวิธีการสกัด Soxhlet ซึ่งมี ethanol และ hexane เป็นตัวทำละลายมีผลต่อการตายของหนอนใยผัก 100% ที่ความเข้มข้น 1.50 และ 2.00% (w/v) ในการศึกษาผลของสารสกัดจากใบสาบเสือต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ขจัดพิษของหนอนใยผัก เลือกสารสกัดจากใบสาบเสือโดยวิธีการสกัดซอกซ์เลตซึ่งมี ethanol เป็นตัวทำละลาย ผลของสารสกัดใบสาบเสือ *Chromolaena odorata* (L.) ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ขจัดพิษของหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L. โดยเลี้ยงด้วยคะน้าชุบสารสกัดจากใบสาบเสือความเข้มข้น 0.05, 0.25 และ 0.50% (w/v) จากใบสาบเสือในกรณีที่หนอนใยผักต้านทานต่อสารสกัดจากใบสาบเสือในอนาคต (เพียรเจริญ, 1996**)** Thoden *et al*. (2007) รายงานว่า สาร1,2-dehydropyrrholizidine alkaloids (PAs) ซึ่งเป็น secondary plant compound จากรากสาบเสือ จะมีความสามารถลดการการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* ที่ทำให้เกิดโรครากปม (root-knot)ในผักกาดขาวที่ความเข้มข้น 70-350 ppm ได้

2.6 กรอบแนวคิดในการวิจัย

งานวิจัยในหัวข้อวิจัยนี้มีกรอบแนวคิดในการริเริ่มทดสอบสารสกัดจากพืชท้องถิ่น ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในประเทศ เพื่อทดสอบยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียอันเป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญของประเทศไทยและของโลก เมื่องานวิจัยเสร็จสมบูรณ์นอกจากจะทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากต้นสาบเสือแล้ว ก็จะสามารถใช้ระเบียบวิธีวิจัยในการทดสอบสารสกัดจากพืชท้องถิ่นอื่นๆในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียได้ นับเป็นการเริ่มต้นค้นหาพืชเป้าหมายในการพัฒนายาตัวใหม่ๆจากวัตถุดิบในท้องถิ่นของไทยเพื่อใช้ในการรักษาโรค

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

ในโครงการวิจัยมีการใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่สำคัญดังนี้

3.1.1 ตู้อบแห้ง (hot air oven)

3.1.2 เครื่องบด Wiley Mill

3.1.3 เครื่องเขย่าสาร (orbital shaker)

3.1.4 เครื่องระเหยตัวทำละลาย (evaporator)

3.1.5 ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –80 $^{\circ}$C

3.1.6 เครื่องทำตัวอย่างให้แห้งในที่เย็น (freeze dryer)

3.1.7 เครื่องชั่งสารเคมี

3.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน (centrifuge)

3.1.9 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

3.1.10 กล้องจุลทรรศน์

3.1.11 ขวดแก้วมีฝาปิดขนาดความจุ 200-300 มิลลิลิตร

3.1.12 กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร

3.1.13 กรวย (funnel)

3.1.14 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

3.1.15 หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร

3.1.16 ตู้ปลอดเชื้อ (biosafety cabinet)

3.1.17 ตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 $^{\circ}$C

3.1.18 หลอดดูดสารละลาย (seropipette)

3.1.19 pipettes

3.1.20 tissue culture flasks

3.1.21 96-well plates

3.1.22 กระจกสไลด์

3.1.23 น้ำกลั่น

3.1.24 เอธานอล

3.1.25 เมธานอล

3.1.26 เฮกเซน

3.1.27 dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.1.28 อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI1640

3.1.29 heat-inactivated human serum

3.1.30 Gentamycin

3.1.31 สีย้อมเซลล์ (Giemsa)

3.2 การเก็บตัวอย่างต้นสาบเสือ

ต้นสาบเสือที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เก็บมาจากบริเวณป่าสวนยาง ต.นาวัง อ.เมือง จ. อำนาจเจริญ (ภาพที่ 3.1) ดำเนินการจัดเก็บตัวอย่างพืชทุกเดือนในช่วงเดือน พฤศจิกายน 2555 – เมษายน 2556 โดยคัดเลือกต้นสาบเสือที่เจริญเติบโตมากที่สุด โดยสูงตั้งแต่ 100 เซนติเมตรขึ้นไป (ภาพที่ 3.2) เก็บรวบรวมต้นสาบเสือ 4 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 ในช่วงเดือน พฤศจิกายน-ธันวาคม 2555 ครั้งที่ 2 ช่วงมกราคม-กุมภาพันธ์ 2556 ครั้งที่ 3 ในช่วงเดือน มีนาคม-เมษายน 2556 และครั้งที่ 4 ในช่วงเดือน พฤษภาคม-มิถุนายน 2556

ภาพที่ 3.1 สถานที่ออกเก็บตัวอย่างต้นสาบเสือเพื่อใช้ในงานวิจัย

ภาพที่ 3.2 คัดเลือกเก็บต้นสาบเสือที่เจริญเติบโตเต็มที่เหมาะสมในการทำวิจัย

3.3 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

นำต้นสาบเสือที่เก็บมาล้างน้ำทำความสะอาด ชั่งน้ำหนักสด ตัดเป็นชิ้นแยกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนใบ ลำต้น และ ราก ชั่งน้ำหนัก ตากแดดให้แห้ง (sun drying) เป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 3.3) จากนั้นนำพืชตัวอย่างทั้ง 3 ส่วนที่ตากแดดแห้งสนิทแล้วมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 50° C เป็นเวลา 2 วัน นำพืชตัวอย่างออกจากตู้อบชั่งน้ำหนัก โดยน้ำหนักสดลำต้น ใบ และราก รวม

1 กิโลกรัม อบแล้วเหลือน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 415 กรัม นำส่วนใบ ลำต้น และรากของสาบเสือที่อบเสร็จแล้วมาผ่านการบด ด้วยเครื่องบด Wiley Mill เพื่อให้ได้ผงละเอียด

ภาพที่ 3.3 ส่วนลำต้น ใบ และรากของต้นสาบเสือหลังจากการล้างและตากแห้ง

3.4 การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำพืชตัวอย่างทั้ง 3 ส่วน มาผ่านเข้าสู่กระบวนการสกัดเย็น โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ตัวทำละลาย คือ น้ำ เอธานอล เมธานอล และเฮกเซน **ตามขั้นตอนดังนี้**

3.4.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

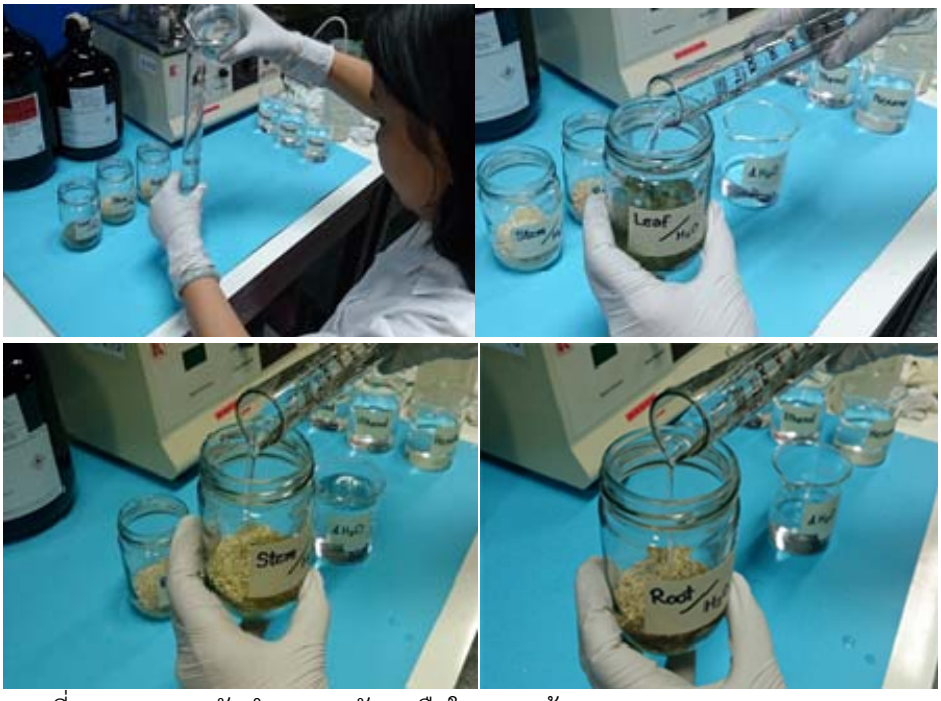
นำพืชส่วนต่างๆมาผสมกับตัวทำละลายแต่ละชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น 80%เอธานอล 80%เมธานอล หรือเฮกเซน ในปริมาณผงพืช 10 กรัม ต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร (ภาพที่ 3.4 และ 3.5) จากนั้นจึงนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.6) จากนั้นจึงนำสารละลายทั้งที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์1 (ภาพที่ 3.7) เพื่อให้ได้เฉพาะแต่สารละลายที่ไม่มีกากผงพืช (ดัดแปลงจาก Jing and Giusti, 2007)

3.4.2 การทำให้สารสกัดเป็นผงแห้งที่อุณหภูมิต่ำ

นำสารละลายที่ผ่านการกรองไปทำการระเหยตัวทำละลายออกโดยวิธี evaporation ด้วย Rotary evaporator (Buchi R-200, USA.) (ภาพที่ 3.8) จากนั้นจึงแบ่งสารสกัดใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ในปริมาตรหลอดละ 5-10 มิลลิลิตรและใช้กระดาษชำระที่สะอาดหุ้มบริเวณปาก

หลอด และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำออกมาเข้าสู่กระบวนการทำให้แห้งในที่เย็นโดยเครื่อง Ultra-low freezer (Coolsafe, USA.) (ภาพที่ 3.9) เพื่อให้ได้สารสกัดแห้งที่สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานโดยยังคงคุณภาพสารออกฤทธิ์ไว้ได้นาน

ภาพที่ 3.4 ชั่งผงละเอียด 10 กรัม เพื่อละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร



ภาพที่ 3.5 เทผสมตัวทำละลายกับผงพืชในขวดแก้ว

ภาพที่ 3.6 การเขย่าส่วนผสมโดยเครื่อง orbital shaker

ภาพที่ 3.7 การกรองเพื่อแยกกากพืชออกเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ

ภาพที่ 3.9 การระเหยตัวทำละลายออกโดยวิธี evaporation

ภาพที่ 3.9 ขั้นตอนการทำให้เป็นผงแห้งโดยวิธี lyophilization

3.5 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย

3.5.1 การเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*)

เชื้อมาลาเรียที่ใช้ในการทดลองนี้คือ *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ NF54 ซึ่งเป็น isolate ของไทย สามารถเลี้ยงได้ง่ายในถาดเพาะเลี้ยง (culture flask; T75) ในสภาวะที่เหมาสม ได้แก่ 2-5% hematocrit (ปริมาณเม็ดเลือดแดงต่อปริมาตรของอาหารเหลว) โดยอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิดนี้คือ RPMI1640, pH 7.4 ผสมด้วย 20% human serum และยาปฏิชีวนะคือ 1 μg/mL Gentamycin (อาหารเหลวต้องผ่านการกรองแบบละเอียดโดยกระดาษกรองที่มี pore size = 0.22 μm) จากนั้นให้ mix gas (5% CO_2, 3% O_2 and 92% N_2) ลงไปใน flask ก่อนปิดฝาสนิท และนำไปเลี้ยงแบบปลอดเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิในร่างกายของคน จากนั้นจึงปล่อยให้เชื้อมาลาเรียเติบโตในเม็ดเลือดแดง ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมง และควบคุมให้ %infection ต่ำกว่า 8% หากเชื้อมาลาเรียมีปริมาณสูงกว่า 1-2% parasitemia จะทำการ sub-culture ให้เชื้อลดลงมาอยู่ที่ 0.1-0.2% parasitemia โดยการดูดเชื้อมาลาเรียที่อยู่ออกจากนั้นจึงเติมเม็ดเลือดแดงใหม่ (ผ่านการปั่นล้างด้วย RPMI1640 เพื่อแยกเอาเม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือดออกก่อน) และเติมอาหารเหลวในปริมาตรที่กำหนดแล้วจึงดูแลตามสภาวะปกติตามข้างต้น เพื่อรักษาเชื้อไว้เป็นแหล่งตั้งต้นสำหรับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของต้นสาบเสือต่อไป

3.5.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรียในถาดเพาะเลี้ยง

จากเชื้อตั้งต้นทำการแบ่งเชื้อออกมาส่วนหนึ่ง จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่กำหนด จนวัดปริมาณเชื้อได้ 1-2% parasitemia ในปริมาณนี้หากตรวจเชื้อโดยวิธีการ smear และย้อมด้วยสี Giemsa แล้วนำไปดูโดยกล้องจุลทัศน์ จะพบว่าเชื้อมาลาเรียที่เติบโตอยู่นั้นมีหลายระยะปะปนกัน เพื่อให้การทดลองได้ผลดีจึงต้องทำการคัดกรองให้เชื้อทั้งหมดอยู่ในระยะเดียวกันเสียก่อน โดยนำเชื้อมาลาเรียมาแช่ในสารละลาย 5% Sorbitol ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที หลังจากนำไปปั่นให้ตกตะกอนแล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วจึงเติมสารละลาย RPMI1640 อย่างทันที เพื่อให้เกิดสภาวะการเปลี่ยนแปลง osmotic pressure ของเซลล์อย่างรวดเร็ว เมื่อผ่านกระบวนการนี้แล้ว เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อในระยะ schizont จะแตกและเชื้อระยะนี้จะตายลง ทำให้เหลือแต่เชื้อในระยะ ring และ trophozoite จากนั้นจึงเลี้ยงเชื้อต่อไปในสภาวะปกติอีก 1 รอบวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียคือ 48 ชั่วโมง จึงพร้อมที่จะทำการทดลองต่อไป โดยทำการ คำนวณและปรับให้เชื้อมีปริมาณ 0.4% parasitemia และ 2% hematocrit เมื่อเชื้อโตจนถึงระยะ schizont จึงแบ่งใส่ในถาดหลุม (96 well-plate) และนำสารสกัดสมุนไพรที่ได้จากการเตรียมในขั้นต้น มาทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านการไชเข้าเม็ดเลือดแดง (invasion inhibition test) การทดลองนี้มุ่งเน้นทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพร

ว่ามีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อมาลาเรียที่ออกมาจากเม็ดเลือดแดงก่อนที่จะไชเข้าเม็ดเลือดแดงตัวใหม่ (anti-invasion) ดังนั้นจึงใช้เชื้อมาลาเรียในระยะ schizont เป็นระยะตั้งต้น โดยแบ่งกลุ่มทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 – ชุดควบคุม 1 (negative control)
กลุ่มที่ 2 – ชุดควบคุม 2 (positive control; Artemisinin at 0.1 – 1,000 ng/mL)
กลุ่มที่ 3 – ชุดทดลอง ที่มีความเข้มข้นของสารสกัด = 1,000 μg/mL
กลุ่มที่ 4 – ชุดทดลอง ที่มีความเข้มข้นของสารสกัด = 100 μg/mL
กลุ่มที่ 5 – ชุดทดลอง ที่มีความเข้มข้นของสารสกัด = 10 μg/mL
กลุ่มที่ 6 – ชุดทดลอง ที่มีความเข้มข้นของสารสกัด = 1 μg/mL
กลุ่มที่ 7 – ชุดทดลอง ที่มีความเข้มข้นของสารสกัด = 0.1 μg/mL

เมื่อผสมเชื้อมาลาเรียกับสมุนไพรเข้าด้วยกันแล้ว จึงนำไปเลี้ยงต่อในสภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำเชื้อแต่ละหลุมมาตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ โดยวิธี Giemsa smear โดยตรวจสอบเชื้อมาลาเรียซึ่งปกติควรอยู่ในระยะ ring ไปจนถึงระยะ trophozoite เปรียบเทียบกับจำนวนที่นับได้ในชุดควบคุม จากนั้นเปรียบเทียบกับจำนวนที่ได้จากกลุ่มทดลองต่างๆ แล้วจึงนำค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อที่นับได้ในแต่ละกลุ่มมาคำนวณหาค่า LC_{50} ต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ (growth inhibition test) การทดลองนี้ทำการทดสอบผลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังนั้นจึงเริ่มใช้เชื้อในระยะ ring ในปริมาณ 1-2% parasitemia มาเริ่มทำการทดลอง โดยแบ่งกลุ่มทดลองให้สอดคล้องตามกันกับการทดลองแรก โดยเมื่อผสมเชื้อมาลาเรียกับสมุนไพรเข้าด้วยกันแล้ว จึงนำไปเลี้ยงต่อในสภาวะปกติเป็นเวลา 24-30 ชั่วโมง แล้วจึงนำเชื้อแต่ละหลุมมาตรวจสอบการเจริญเติบโตโดยวิธี Giemsa smear เพื่อตรวจสอบสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อมาลาเรียว่าสามารถพัฒนาไปจนถึงระยะที่สมบูรณ์เต็มที่ในเม็ดเลือดแดง คือระยะ schizont ได้หรือไม่ โดยลักษณะทางกายภาพของเชื้อที่ได้ในแต่ละกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับที่พบในกลุ่มควบคุม

3.5.3 การคำนวณหา %parasitemia

%parasitemia เป็นการนับปริมาณเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง โดยเทียบกับจำนวนเม็ดเลือดแดงปรกติ (non-infected red blood cells) เพื่อให้ค่าที่ได้มีความน่าเชื่อถือจึงนับปริมาณเชื้อต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงปรกติ 10,000-20,000 เซลล์ จากนั้นจึงนำมาคำนวณคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อไป

3.5.4 การคำนวณทางสถิติ

นำ %parasitemia ที่นับได้ในแต่ละการทดลองมาหาค่าเฉลี่ย (average) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม โดยคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่มีเม็ดเลือดแดงติดเชื้อลดลงครึ่งหนึ่งจะถือเป็นค่า 50% lethal concentration (LC_{50})

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การเก็บพืชและการเตรียมสารสกัดหยาบ

ในการออกเก็บตัวอย่างพืชในบริเวณป่าสวนยาง ต.นาวัง อ.เมือง จ. อำนาจเจริญ นั้นพบว่าแม้ว่าจะอยู่ค่อนข้างไกลจากกรุงเทพมหานครทำให้ใช้เวลามากในการเดินทาง แต่การเดินทางค่อนข้างสะดวก และในบริเวณป่าสวนยางสามารถเข้าถึงแหล่งเก็บต้นสาบเสือได้ง่าย มีต้นสาบเสือขนาดความสูงมากกว่า 100 เซนติเมตร อยู่ในปริมาณที่มากพอเพียงต่อการใช้ในการทดลอง หลังการล้างทำความสะอาด ตัดแยกพืชเป็นส่วนต่างๆได้แก่ ลำต้น ราก และใบ และตากแห้งแล้วพบว่า มีน้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยคิดเป็น 40% ของน้ำหนักพืชสด เมื่อนำไปบดละเอียดและผ่านกระบวนการสกัดเย็นจากส่วนของพืช 3 ส่วน คือ ส่วนของใบ ต้น และราก โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ เอธานอล เมธานอล และเฮกเซน พบว่าหลังผ่านการทำให้แห้งโดยวิธี lyophilization แล้ว การสกัดด้วยน้ำให้ปริมาณสารสกัดมากว่าตัวทำละลายอื่นๆ สารสกัดจากส่วนใบของพืชให้ปริมาณสารมากที่สุด โดยมี %yield เท่ากับ 15.54±0.99 % รองลงมาคือ ลำต้น (7.61±0.22%) และราก (6.02±45%) ในทุกส่วนของพืชจะให้ปริมาณสารสกัดไปในแนวทางเดียวกัน คือ น้ำให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากที่สุด รองลงมาคือ เอธานอล เมธานอล และ เฮกเซน สำหรับส่วนของพืชจะ พบว่า ส่วนของใบและลำต้นจะให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าส่วนของรากจากการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ดังตารางที่ 4.1 สารสกัดหยาบจะมีลักษณะคล้ายกัน คือ จะมีลักษณะที่เป็นน้ำมันถูกสกัดออกมาด้วย นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากส่วนของพืชและต้นพบว่าจะมีสีเข้มหรืออาจมีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ แต่สารสกัดหยาบจากส่วนของรากจะให้สีน้ำตาลแดงเนื่องจากบริเวณรากจะไม่มีคลอโรฟิลล์อยู่

ตารางที่ 4.1 การสกัดเย็นส่วนของพืช 3 ส่วน โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด

Plant parts	Solvents	Yield extractive value (%)
Leaf	Water	15.54 ± 0.99^{i}
	Ethanol	10.41 ± 0.48^{h}
	Methanol	9.51 ± 0.95^{g}
	Hexane	2.35 ± 0.20^{bc}
Root	Water	6.02 ± 45^{e}
	Ethanol	3.96 ± 0.11^{d}
	Methanol	2.96 ± 0.45^{c}

	Hexane	0.20±0.04[a]
Stem	Water	7.61±0.22[f]
	Ethanol	1.76±0.09[b]
	Methanol	1.80±0.07[b]
	Hexane	0.20±0.02[a]

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กยกกำลังที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (alpha = 0.05) โดยใช้สถิติ Duncan's multiple range tests (DMRT)

4.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียในการทดลองนี้คือ *Plasmodium falciparum*, NF54 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั่วไป อาหารที่ได้เลี้ยงเชื้อมีส่วนผสมของ RPMI1640 medium, 20% Human serum โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.4 เนื่องจากเชื้อมาลาเรียในระยะ erythrocytic stage จำเป็นต้องอาศัยและเจริญเติบโตอยู่ในเม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงผสมเม็ดเลือดแดง (แหล่งที่มา: สภากาชาดไทย) ลงไปในอาหารเลี้ยงที่อัตราส่วน 2-5% hematocrit ในการเตรียมเชื้อตั้งต้นนั้น เชื้อมาลาเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อและเม็ดเลือดแดง จะผสมกันอยู่ใน culture flask โดยทำการเติม mix gas (5% CO_2, 3% O_2 and 92% N_2) เพื่อช่วยในการรักษาความเป็นกรด-ด่างของส่วนผสมให้อยู่ในระดับปรกติ ขั้นตอนทั้งหมดนี้ต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ (biosafety cabinet; class II) (ภาพที่ 4.1) ทั้งนี้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา จากนั้นจึงปิดฝาให้สนิทและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C (ภาพที่ 4.2) จากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมง และ subculture เชื้อโดยการดึงเชื้อมาลาเรียออกส่วนหนึ่งและเติมเม็ดเลือดแดงใหม่เข้าไปเพื่อให้มีปริมาณเชื้อที่เหมาะสมและมีการเจริญเติบโตที่ดี การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียสามารถทำได้โดยการทำ blood smear และย้อมด้วยสี Giemsa จากนั้นตรวจสอบความสมบูรณ์ของเชื้อรวมทั้งจำนวนเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 4.3) เชื้อมาลาเรียที่เป็นที่สนใจในการทดลองนี้คือระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงซึ่งมีการเจริญเติบโตแบบไม่อาศัยเพศ (asexual blood stage) ซึ่งสามารถแบ่งระยะที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงนี้ออกเป็นระยะต่างๆได้ คือ 1) ระยะ ring ซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นหลังจากที่ merozoite ไชเข้าสู่เม็ดเลือดแดง มีรูปร่างคล้ายวงแหวนอยู่ภายในเม็ดเลือดแดง ในระยะนี้สามารถเห็นนิวเคลียสย้อมติดสี Giemsa โดยเห็นเป็นจุดเล็กๆคล้ายหัวแหวน ในขณะที่ซัยโตพลาสมยังไม่ติดสี 2) ระยะ trophozoite เป็นระยะที่เชื้อเจริญเติบโตขึ้น เห็นนิวเคลียสใหญ่ขึ้นติดสีชัดขึ้น

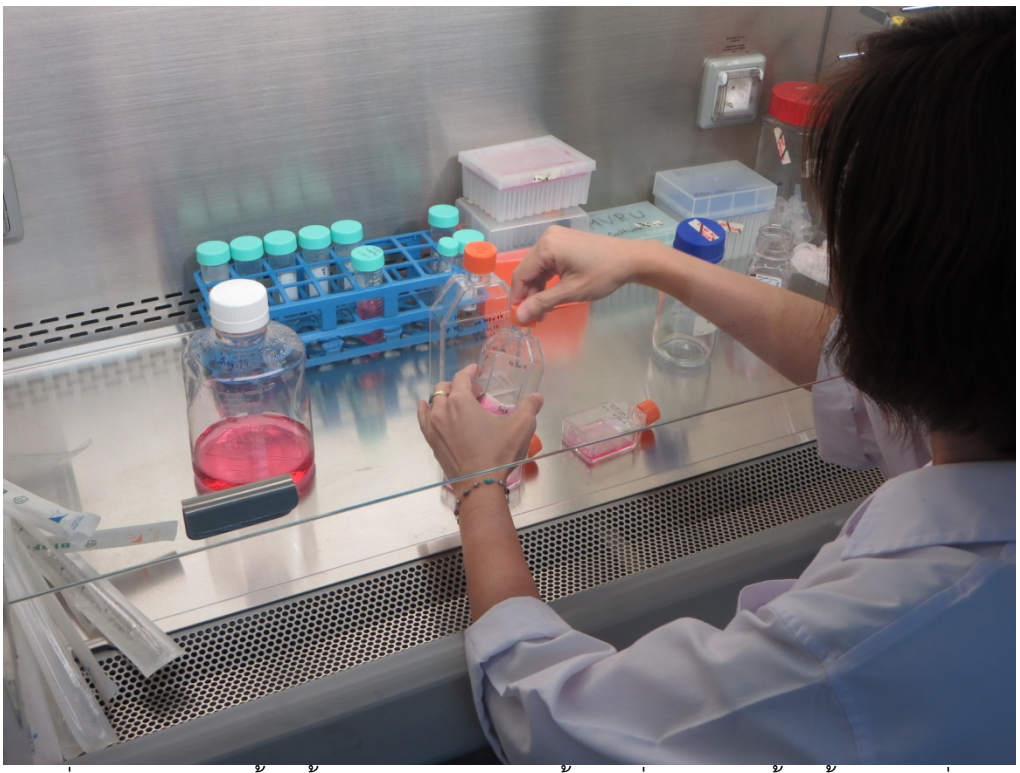
และเห็นซัยโตพลาสมติดสีน้ำเงินชัดเจน 3) ระยะ schizont เป็นระยะที่เชื้อมาลาเรียมีการแบ่งนิวเคลียสแบบ mitosis ในกระบวนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยเห็นนิวเคลียสเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2, 4, 8 ไปจนถึง 16 หรือ 32 นิวเคลียส (ภาพที่ 4.4 A, B, และ C ตามลำดับ) โดยการคิดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงนั้น คิดเป็น %parasitemia (ร้อยละของจำนวนเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือด) คำนวณโดย

%parasitemia = [จำนวนเม็ดเลือดที่มีเชื้อ ÷ จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด*] x 100

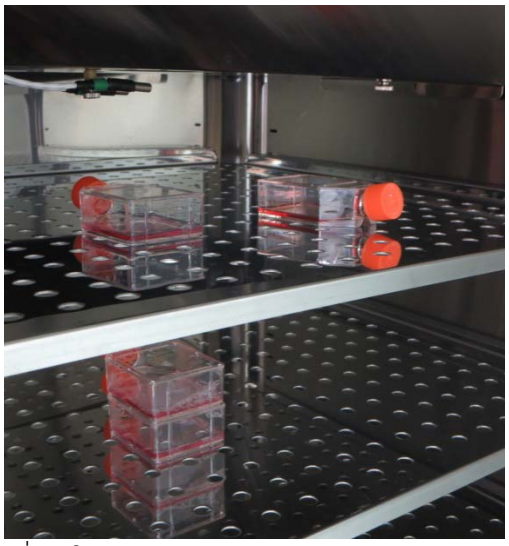
(*นับจำนวนทั้งสิ้น 10,000 – 20,000 เซลล์)

ในการทดลองครั้งนี้ ได้ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อปรกติก่อนการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากต้นสาบเสือ โดยจัดเตรียมเชื้อมาลาเรียเริ่มต้นที่ 0.2% parasitemia และเลี้ยงเชื้อโดยวิธีปรกติคือเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมง เนื่องจากเชื้อมาลาเรียชนิดนี้มีระยะเวลาการเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงประมาณ 48 ชั่วโมง จึงจะโตเต็มที่และพร้อมออกมาจากเม็ดเลือดแดงเก่าในปริมาณที่เพิ่มขึ้นและไชเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ต่อไป ดังนั้นจึงเก็บตัวอย่างเชื้อมาทำ smear เพื่อตรวจสอบ %parasitemia ทุกๆ 2 วัน โดยพบว่าจากเชื้อเริ่มต้น (day0) ที่ 0.2% parasitemia เมื่อผ่านไป 2 วัน (day2) เชื้อเจริญเติบโตขึ้นเป็น 1.38, 1.52, และ 1.26 %parasitemia ใน flask ที่ 1, 2, และ 3 ตามลำดับ จากนั้นอีก 2 วัน (day4) เชื้อเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 7.78, 6.82, และ 7.24 %parasitemia ตามลำดับ (ภาพที่ 4.5) เนื่องจากเป็นแค่การทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อจึงจบการทดลองที่ day4 นี้

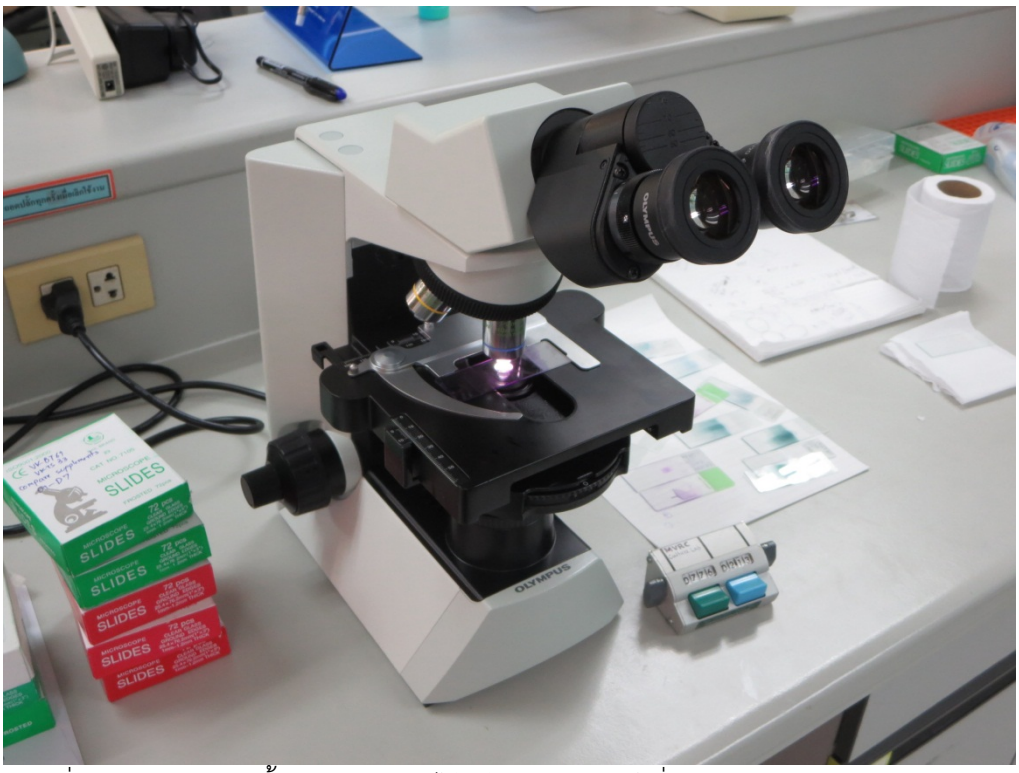
ขั้นตอนต่อไปคือการทดลองเลี้ยงเชื้อให้มีระยะการเจริญที่พร้อมกัน (synchronous stage) วิธีการนี้ทำได้โดยการนำเชื้อมาผ่านกระบวนการ synchronization ผลจากการทดลองทำให้สามารถได้เชื้อตั้งต้นตามที่ต้องการ จากนั้นจึงนำเชื้อมาลาเรียที่ได้มาเป็นเชื้อตั้งต้นในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อไป



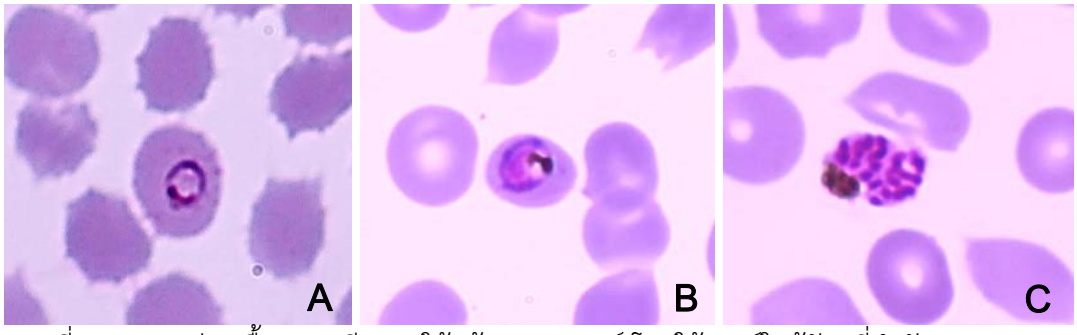
ภาพที่ 4.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในตู้ปลอดเชื้อ (เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง)



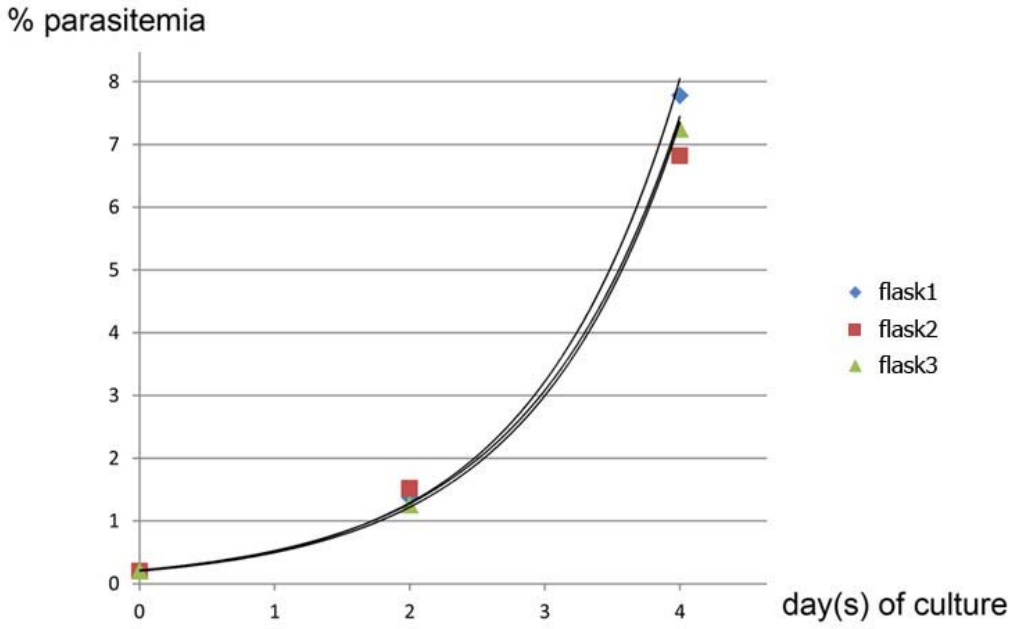
ภาพที่ 4.2 ตู้บ่มเชื้อมาลาเรีย; ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C



ภาพที่ 4.3 ตรวจสอบเชื้อมาลาเรียภายได้กล้องจุลทรรศน์เพื่อคำนวณ % parasitemia



ภาพที่ 4.4 ภาพถ่ายเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุที่กำลังขยาย 100 เท่า แสดงเชื้อมาลาเรียระยะ asexual blood stage ได้แก่ (A) ระยะ ring, (B) ระยะ trophozoite, และ (C) ระยะ schizont



ภาพที่ 4.5 กราฟเส้นแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียระยะ blood stage

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย

4.3.1 การยับยั้งการไชเข้าเม็ดเลือดแดง (invasion inhibition test)

เมื่อนำเชื้อมาลาเรียระยะ schizont มาทดสอบในถาดหลุม 96-well plate โดยใช้สารสกัดซึ่งผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วน 10% ที่ปริมาณสารสกัดความเข้มข้นต่างๆเจือจางลง 10 เท่า ตามลำดับ คือ 1,000, 100, 10, 1 และ 0.1 ไมโครกรับต่อมิลลิลิตร ตามลำดับแล้ว ผลการนับปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย (infected red blood cells, iRBC) โดยจะมีเชื้อในระยะ ring/trophozoite จากผลการนับจำนวนในชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัด พบว่ามี iRBC จำนวนเฉลี่ย 394.8 เซลล์ต่อ 20,000 เม็ดเลือดแดง (คำนวณจากข้อมูลดิบคือ 421, 386, 428, 347 และ 392 เซลล์) จากค่าที่ได้คิดเป็น 1.97% parasitemia ในขณะที่ชุดควบคุมที่นำมาทดสอบกับยา Artemisinin ที่ความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 1 และ 0.1 ng/mL พบมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0, 0.20, 0.48, 1.19 และ 1.81 %parasitemia ตามลำดับ ในกลุ่มทดลองหลังทำการทดสอบกับสารสกัดใบ โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดคือ น้ำ เอธานอล เมธานอล และเฮกเซน พบว่าสารสกัดใบสาบเสือโดยใช้น้ำในทุกๆความเข้มข้นมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.87-2.05 %parasitemia ซึ่งใกล้เคียงมากกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดใดๆ ในขณะที่สารสกัดใบโดยใช้ เอธานอล เมธานอล และเฮกเซน มีค่าเฉลี่ย %parasitemia ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นที่ระดับความเข้มข้น 1,000, 100, และ 10 μg/mL (ตารางที่ 4.2) ในการทดสอบกับสารสกัดราก พบมี %parasitemia ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ยังมี %parasitemia สูงกว่ากลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบ (ตารางที่

4.3) ในการทดสอบกับสารสกัดจากลำต้นพบว่าให้ผลคล้ายคลึงกันแต่ยังพบว่า %parasitemia ยังสูงกว่ากลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดจากราก (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.2 ค่า % parasitemia เมื่อผ่านการทดสอบ invasion inhibition ด้วยสารสกัดจากใบโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

conc. (μg)	test	% parasitemia after treated with leaf extracts			
		water	ethanol	methanol	hexane
1,000	1	1.84	0	0	0
	2	2.09	0	0	0.01
	3	2.20	0	0	0
	average	**2.04**	**0**	**0**	**0**
100	1	1.92	0.80	0.96	0.91
	2	2.10	0.88	0.99	0.89
	3	1.96	0.81	1.03	0.94
	average	**1.99**	**0.83**	**0.99**	**0.91**
10	1	2.06	1.21	1.14	1.37
	2	1.95	1.19	1.23	1.33
	3	2.03	1.31	1.06	1.36
	average	**2.01**	**1.24**	**1.14**	**1.35**
1	1	1.86	1.30	1.25	1.69
	2	1.94	1.46	1.34	1.63
	3	1.81	1.44	1.39	1.76
	average	**1.87**	**1.40**	**1.32**	**1.69**
0.1	1	2.04	1.84	1.70	1.94
	2	2.13	2.04	1.64	1.95
	3	2.00	1.95	1.52	1.85
	average	**2.05**	**1.94**	**1.62**	**1.90**

<u>หมายเหตุ</u> %parasitemia คำนวณจากปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียระยะ ring/trophozoite หลังผ่านการทดสอบกับสารสกัดจากใบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.3 ค่า % parasitemia เมื่อผ่านการทดสอบ invasion inhibition ด้วยสารสกัดจากราก โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

conc. (μg)	test	% parasitemia after treated with root extracts			
		water	ethanol	methanol	hexane
1,000	1	1.10	0.97	0.92	0.33
	2	1.12	0.96	1.16	0.39
	3	1.22	1.02	1.01	0.37
	average	**1.14**	**0.98**	**1.03**	**0.36**
100	1	1.46	1.51	1.24	1.11
	2	1.76	1.49	1.13	1.23
	3	1.54	1.56	1.30	1.10
	average	**1.58**	**1.52**	**1.22**	**1.15**
10	1	1.72	1.83	1.72	1.77
	2	1.81	1.85	2.12	1.87
	3	1.84	1.95	1.85	1.84
	average	**1.79**	**1.88**	**1.90**	**1.83**
1	1	2.05	1.83	1.84	1.90
	2	1.82	2.12	1.81	1.93
	3	1.90	2.11	1.96	2.06
	average	**1.92**	**2.01**	**1.87**	**1.96**
0.1	1	1.94	1.98	2.08	2.09
	2	2.14	1.88	1.88	1.83
	3	1.89	1.84	51.84	1.96
	average	**1.99**	**1.90**	**1.93**	**1.96**

หมายเหตุ %parasitemia คำนวณจากปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียระยะ trophozoite/Schizont หลังผ่านการทดสอบกับสารสกัดจากรากเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.4 ค่า % parasitemia เมื่อผ่านการทดสอบ invasion inhibition ด้วยสารสกัดจากลำต้นโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

conc. (μg)	test	% parasitemia after treated with stem extracts			
		water	ethanol	methanol	hexane
1,000	1	1.36	1.40	0.93	0.34
	2	1.38	1.46	0.96	0.46
	3	1.47	1.49	0.97	0.44
	average	**1.40**	**1.45**	**0.95**	**0.41**
100	1	1.88	1.79	1.42	1.40
	2	1.70	1.75	1.48	1.36
	3	1.97	1.73	1.60	1.33
	average	**1.85**	**1.76**	**1.50**	**1.36**
10	1	1.72	1.93	1.99	1.62
	2	1.84	1.96	1.91	1.49
	3	1.80	1.95	2.07	1.59
	average	**1.79**	**1.94**	**1.99**	**1.56**
1	1	1.99	1.79	2.01	1.81
	2	1.91	2.02	1.84	1.84
	3	2.04	1.99	1.98	1.87
	average	**1.98**	**1.93**	**1.94**	**1.84**
0.1	1	1.91	1.97	1.92	1.96
	2	1.89	1.95	2.06	1.98
	3	2.08	2.10	2.02	2.09
	average	**1.96**	**2.01**	**2.00**	**2.01**

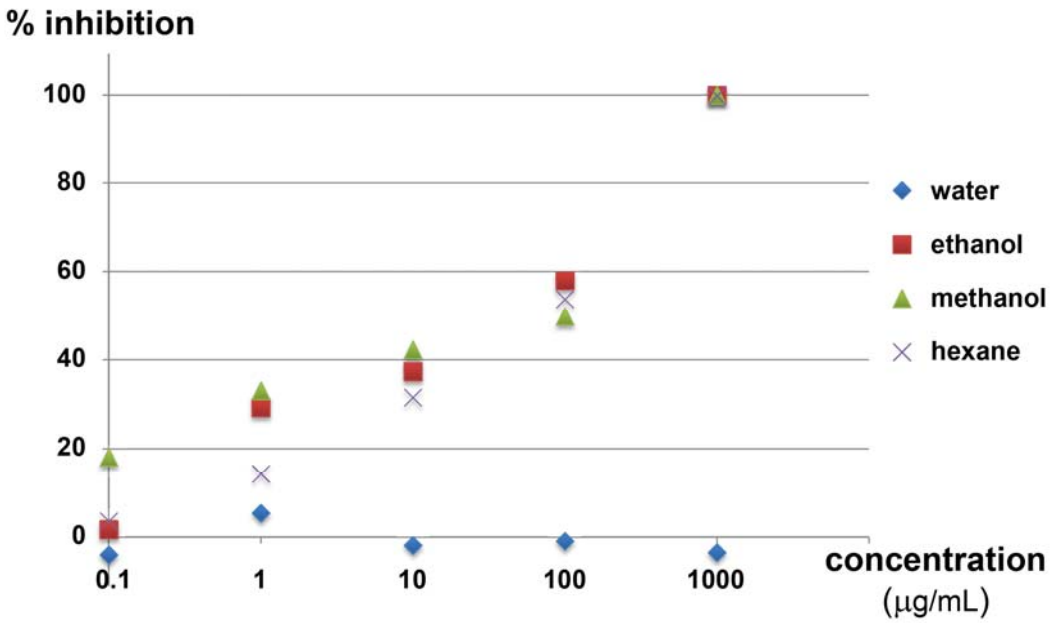
หมายเหตุ %parasitemia คำนวณจากปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียระยะ trophozoite หลังผ่านการทดสอบกับสารสกัดจากลำต้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาคำนวณหาค่า % invasion inhibition (ตารางที่ 4.5) ทำให้สามารถเปรียบเทียบได้อย่างชัดเจน คือ สารสกัดจากใบโดยมีเอธานอลและเมธานอลเป็นตัวทำละลายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการไชเข้าเม็ดเลือดแดงได้ดีที่สุด โดยมี % invasion inhibition สูงสุดคือ 100% ที่ความเข้มข้นของสารสกัด คือ 1,000 μg/mL โดย % invasion inhibition ลดลงเมื่อสารสกัดเจือจางลงตามลำดับ (ตารางที่ 4.5, leaf) ในขณะที่สารสกัดใบโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายไม่มีผลยับยั้งเชื้อมาลาเรีย ในส่วนสารสกัดจากรากและลำต้นให้ผลด้อยกว่าสารสกัดจากใบอย่างมาก โดยไม่พบค่า 100 % invasion inhibition เลยแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นสูงสุดของการทดลองแล้วก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบในตัวทำละลายแต่ละชนิดพบว่า สารสกัดจากรากและลำต้นจะให้ผลการยับยั้งการไชเข้าเม็ดเลือดแดงได้ดีเมื่อใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย โดยที่ความเข้มข้นสูงสุด 1,000 μg/mL คิดเป็น 81.76 และ 79.23 % invasion inhibition ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5, root และ stem ค่า % invasion inhibition เหล่านี้ได้ถูกนำมาแสดงในรูปแบบของกราฟเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบกลุ่มสานสกัดจากตัวทำละลายต่างๆได้ง่ายขึ้น (ภาพที่ 4.6-4.8)

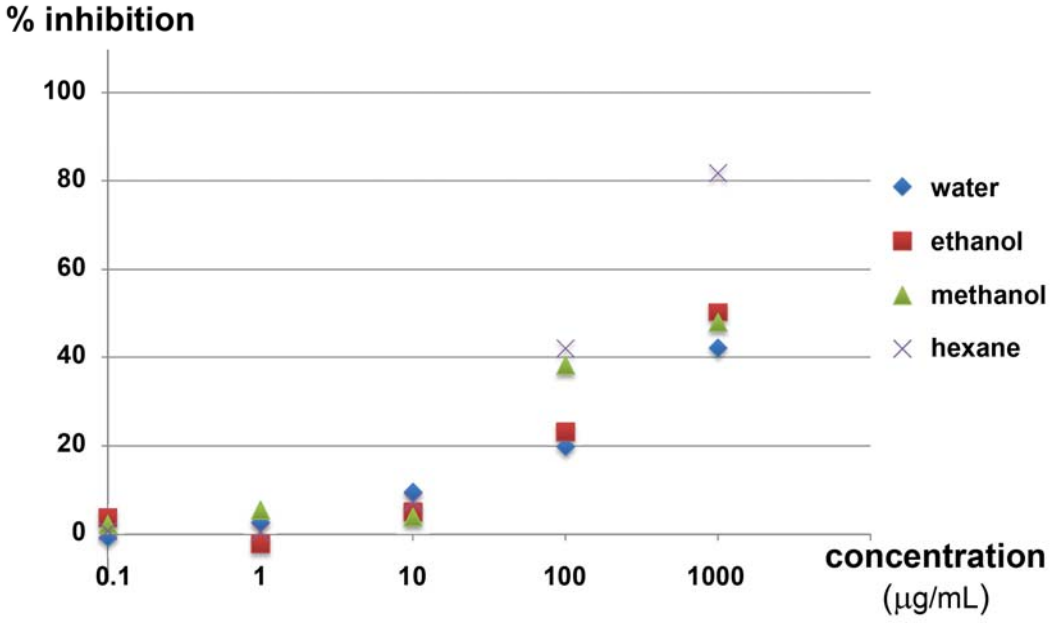
ตารางที่ 4.5 ค่า % invasion inhibition เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดแต่ละชนิดที่ปริมาณต่างๆ

conc. (μg/mL)	% invasion inhibition											
	leaf				root				stem			
	W	E	M	H	W	E	M	H	W	E	M	H
1,000	-3.43	100	100	99.83	42.08	50.27	47.91	81.76	28.99	26.71	51.87	79.23
100	-0.89	57.95	49.76	53.73	19.88	23.17	38.20	42.00	6.45	11.09	24.10	31.19
10	-1.82	37.35	42.25	31.53	9.41	5.02	3.92	7.29	9.49	1.55	-0.64	20.80
1	5.44	29.25	33.05	14.30	2.65	-2.08	5.44	0.62	-0.22	2.23	1.64	6.87
0.1	-4.02	1.72	18.10	3.58	-0.64	3.75	2.23	0.79	-1.57	-1.57	-1.15	-1.65

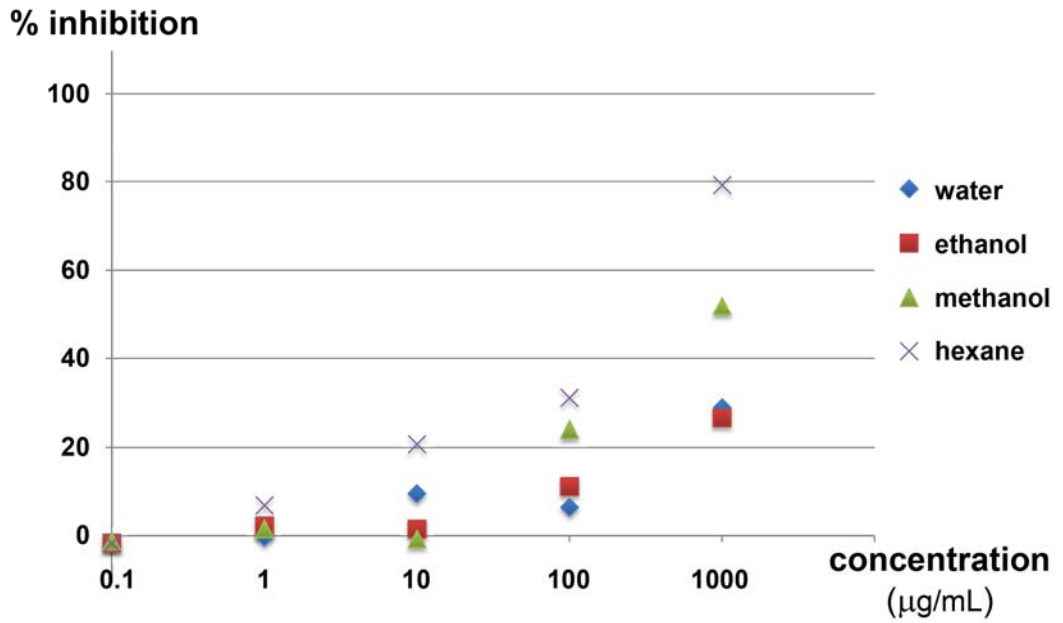
หมายเหตุ ค่า % invasion inhibition คำนวณจากปริมาณเชื้อมาลาเรียที่ลดลง หลังผ่านการทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับเชื้อมาลาเรียในชุดควบคุม ที่ความเข้มข้นของสารสกัดต่างๆ (conc.; concentration) (อักษรย่อแสดงถึงสารสกัดโดยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ W = Water, E = Ethanol, M = Methanol, H = Hexane)



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดง % invasion inhibition ของสารสกัดจากใบโดยใช้ตัวทำละลายคือ น้ำ (water), เอธานอล (ethanol), เมธานอล (methanol), และเฮกเซน (hexane) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 – 1,000 µg/mL



ภาพที่ 4.7 กราฟแสดง % invasion inhibition ของสารสกัดจากรากโดยใช้ตัวทำละลายคือ น้ำ (water), เอธานอล (ethanol), เมธานอล (methanol), และเฮกเซน (hexane) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 – 1,000 µg/mL



ภาพที่ 4.8 กราฟแสดง % invasion inhibition ของสารสกัดจากลำต้นโดยใช้ตัวทำละลายคือ น้ำ (water), เอธานอล (ethanol), เมธานอล (methanol), และเฮกเซน (hexane) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 – 1,000 µg/mL

ในการคำนวณหาค่าครึ่งความเข้มข้นมรณะ (lethal concentration; LC_{50}) ทำโดยการแทนค่าในสมการที่ได้จากกราฟแสดง % invasion inhibition เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ 50% invasion inhibition ดังแสดงในตารางที่ 4.6 โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบที่ใช้ตัวทำละลายคือ เอธานอล เมธานอล และเฮกเซน มีค่า LC_{50} อยู่ที่ 179.46, 175.31 และ 279.85 **µg/mL ตามลำดับ** ส่วนสารสกัดจากรากและลำต้นที่ใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายนั้นมีค่า LC_{50} อยู่ที่ 520.09 และ 523.51 **µg/mL ตามลำดับ**

ตารางที่ 4.6 ค่าครึ่งความเข้มข้นมรณะ (LC_{50})

extracting solvents	LC_{50} or 50% invasion inhibition (µg/mL)		
	leaf	root	stem
water	ND	ND	ND
ethanol	179.46	967.53	ND
methanol	175.31	1003.69	933.52
hexane	279.85	520.09	523.51

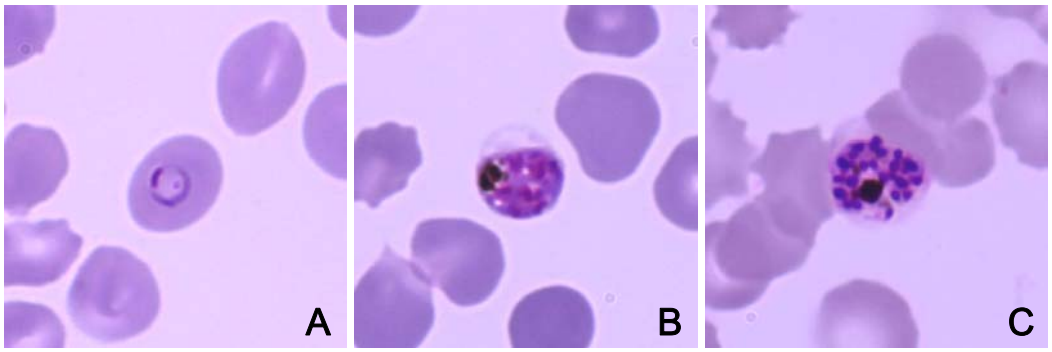
หมายเหตุ ค่าที่ได้คำนวณมาจากสมการของกราฟ % invasion inhibition (ND, not determined คือ ไม่สามารถนำมาคำนวณหาค่าได้เนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงสุดคือ 1,000 μg/mL นั้นมีค่า invasion inhibition ไม่เกิน 50%)

4.3.2 การยับยั้งการเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดง (growth inhibition test)

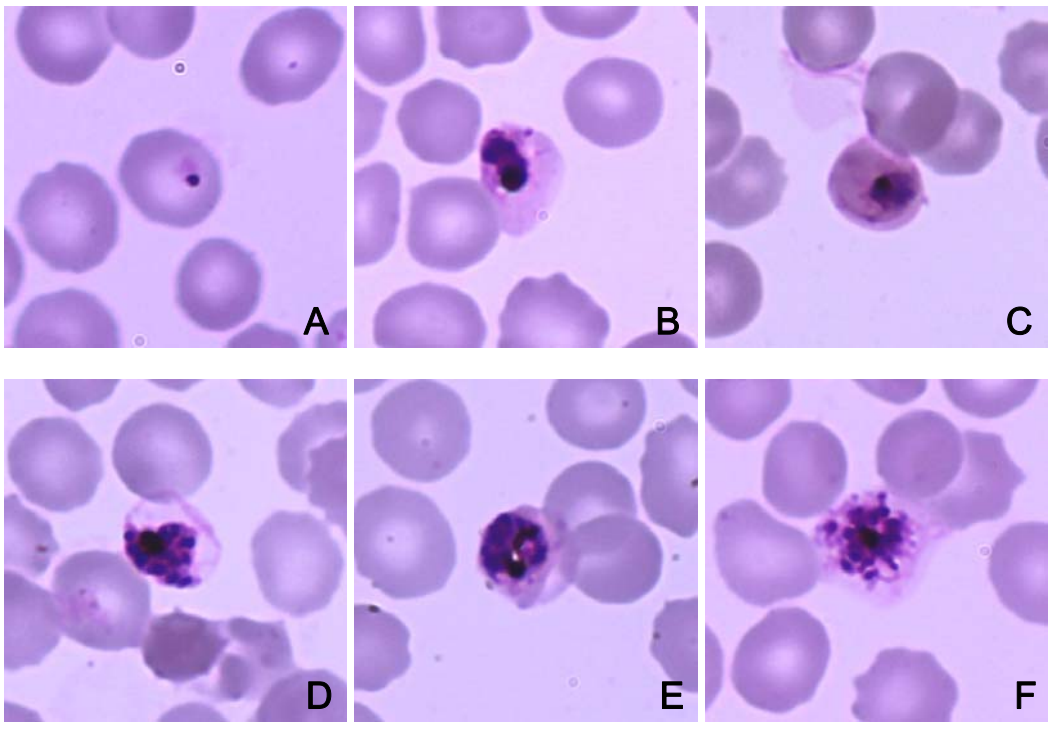
หลังจากนำเชื้อมาลาเรียระยะ ring มาทดสอบในถาดหลุม 96-well plate โดยผสมสารสกัดชนิดต่างๆลงไปในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดจึงนำเม็ดเลือดออกมาตรวจสอบโดยการ smear ลงบนกระจกสไลด์และย้อมด้วยสี Giemsa โดยสังเกตรูปร่างการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียอย่างละเอียดภายใต้กล้องจุลทัศน์โดยใช้กำลังขยายสูงสุด (100x objective lens) พบว่าเชื้อมาลาเรียในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดใดๆมีการเจริญเติบโตอย่างปรกติ จากเชื้อมาลาเรียตั้งต้นระยะ ring สามารถเจริญเติบโตไปอยู่ในระยะ schizont ได้ (ภาพที่ 4.9) เชื้อมาลาเรียในกลุ่มควบคุมที่นำมาทดสอบกับยา Artemisinin พบความมีการเจริญเติบโตผิดปรกติแบ่งออกได้หลายระดับความรุนแรงสอดคล้องกับความเข้มข้นของยาที่ผสมไปกับอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาสามารถแบ่งรูปแบบความผิดปรกติของการเจริญเติบโตได้ดังนี้

- <u>รุนแรงระดับ 3</u> ไม่พบเชื้อมาลาเรียที่มีชีวิต โดยพบลักษณะเป็นจุดสีน้ำเงินเข้มขนาดเล็กอยู่ในเม็ดเลือดแดง คาดว่ามาจากเชื้อในระยะ ring ที่ตายลง (ภาพที่ 4.10, A)
- <u>รุนแรงระดับ 2</u> ไม่พบเชื้อมาลาเรียที่มีชีวิต พบลักษณะการตายของเชื้อในระยะ ring ปะปนอยู่กับเชื้อมาลาเรียที่ตายในระยะ trophozoite (ภาพที่ 4.10, B, C)
- <u>รุนแรงระดับ 1</u> พบเชื้อมาลาเรียปรกติในระยะ schizont ปะปนอยู่กับเชื้อมาลาเรียที่ตายในระยะ schizont (ภาพที่ 4.10, E-F)
- <u>ไม่มีความรุนแรง</u> พบเชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตตามปรกติ

เมื่อนำระดับความรุนแรงข้างต้นมาสรุปเป็นค่าตัวเลข คือ 3, 2, 1, 0 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) จะเห็นว่ายา Artemisinin มีผลรุนแรงมากต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย โดยสารสกัดที่มีผลรุนแรงคือ สารสกัดจากใบโดยใช้เอธานอลและเมธานอลเป็นตัวทำละลาย โดยมีค่าความรุนแรงระดับ 3 ที่ความเข้มข้น 1,000 μg/mL และลดลงเป็นรุนแรงระดับ 2 ที่ความเข้มข้น 100 μg/mL ในขณะที่สารสกัดจากรากและลำต้นแสดงความรุนแรงปานกลางในกลุ่มที่สกัดโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย โดยพบความรุนแรงระดับ 2 ที่ความเข้มข้น 1,000 μg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดของการทดลอง



ภาพที่ 4.9 ภาพถ่ายเชื้อมาลาเรียจากกลุ่มควบคุมในการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโต โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุที่กำลังขยาย 100 เท่า แสดงเชื้อมาลาเรีย (A) ระยะ ring ซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นในการนำมาทดสอบการเจริญเติบโต (growth inhibition test), (B) ระยะ mid-schizont, และ (C) ระยะ late-schizont เมื่อสิ้นสุดการทดลอง



ภาพที่ 4.10 ภาพถ่ายเชื้อมาลาเรียจากกลุ่มทดลองต่างๆในการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโต โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุที่กำลังขยาย 100 เท่า แสดงเชื้อมาลาเรียที่มีการเจริญเติบโตผิดปรกติแบบต่างๆ หลังการทดสอบ growth inhibitory test (A) ระยะ ring ที่ตายลงเห็นเป็นจุดเล็กๆสีน้ำเงินเข้มอยู่ในเม็ดเลือดแดง (B, C) เชื้อมาลาเรียที่ตายลงในระยะ trophozoite (D, E) เชื้อมาลาเรียที่ตายลงในระยะ schizont โดยสังเกตเห็นนิวเคลียสภาพในเซลล์มีการหดตัวเข้าหากันจนเป็นกระจุกเข้ม (F) เชื้อมาลาเรียในระยะ schizont กำลังตายและกำลังสลายไป

ตารางที่ 4.7 ค่าความรุนแรงของสารสกัดที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในทดสอบ growth inhibitory test

conc. (μg/mL)	level of severity in parasite damage												
	A	leaf				root				stem			
		W	E	M	H	W	E	M	H	W	E	M	H
1,000	3	1	3	3	2	1	1	1	2	1	1	1	2
100	3	0	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	1
10	3	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ ค่าระดับความรุนแรง (level of severity) เป็นตัวเลขที่ได้มาจากการตรวจสอบการมีชีวิต ความสมบูรณ์ รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อมาลาเรีย โดยการตรวจสอบภาพใต้กล้องจุลทัศน์โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุที่กำลังขยาย 100 เท่า ความรุนแรงมีค่าจากมากไปหาน้อย คือ 3, 2, 1, และ 0 ตามลำดับ (conc. = concentration, A = Artemisinin, และอักษรย่อแสดงถึงสารสกัดส่วนต่างๆที่สกัดโดยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ W = Water, E = Ethanol, M = Methanol, H = Hexane)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการสกัดสารจากส่วนของใบ ต้น และราก สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 คือ เอธานอล เมธานอล และเฮกเซน พบว่า ส่วนของใบจะให้ปริมาณ (% yield) มากกว่าส่วนต้นและรากของพืช นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากส่วนใบและลำต้นมีสีเข้มจากการมีคลอโรฟิลล์เป็นส่วนประกอบ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากส่วนของรากจะให้สีน้ำตาลแดงเนื่องจากบริเวณรากไม่มีคลอโรฟิลล์อยู่ ลักษณะของสารที่สกัดได้จากน้ำมีลักษณะเป็นผงแห้งกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อมาลาเรียพบว่าสารสกัดจากใบให้ผลดีที่สุด โดยสารสกัดใบในตัวทำละลาย เอธานอล เมธานอล และเฮกเซน สามารถยับยั้งการไชเข้าเม็ดเลือดแดงที่ค่า LC_{50} = 179.46, 175.31 และ 279.85 μg/mL ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดใบโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายแม้จะใช้ความเข้มข้นสูงสุดก็ยังไม่แสดงผลในการเชื้อมาลาเรียในการไชเข้าสู่เม็ดเลือดแดง สอดคล้องกับการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibition test) พบว่ารูปร่างของเชื้อมาลาเรียมีความผิดปรกติรุนแรงระดับ 3 ในกลุ่มทดลองที่ใช้สารสกัดจากใบโดยมีเอธานอลและเมธานอลเป็นตัวทำละลาย

5.2 อภิปรายผล

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบจากสาบเสือได้ผลเป็นที่น่าพอใจ แม้ว่าหลังจากผ่านการทำให้แห้งแล้วจะเหลือปริมาณน้อยแต่ก็พอเพียงต่อการทดสอบการออกฤทธิ์ต่อเชื้อมาลาเรีย การออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียสามารถพบได้เมื่อใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณสารออกฤทธิ์มีอยู่ค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่าสารออกฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียมีมากในส่วนใบของสาบเสือ และควรสกัดด้วยเอธานอลหรือเมธานอลจึงจะเหมาะสมที่สุด

5.3 ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

จากผลการทดลองพบว่าต้องใช้สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นค่อนข้างสูงมากจึงสามารถยับยั้งเชื้อมาลาเรียได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นผลการทดลองจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการหาสารออกฤทธิ์หลัก หรือสารสกัดบริสุทธิ์ที่จะมีผลโดยตรงในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย รวมทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อวิเคราะห์หรือเปรียบเทียบกับสารสกัดชนิดอื่นๆ จากสมุนไพรหรือพืชชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิค วิธีการ ไปประยุกต์ใช้ในการทดสอบการต่อต้านเชื้อมาลาเรียในระยะอื่นๆได้

5.4 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบในงานวิจัยนี้ สามารถนำไปวิเคราะห์ผลเพื่อมุ่งเน้นไปที่กลุ่มสารจำเพาะ หรือการสกัดสารบริสุทธิ์เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อมาลาเรียในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง หรือระยะอื่นๆต่อไป และอาจใช้เทคนิคอื่นๆ เช่น เทคนิคทางชีวโมเลกุล เข้ามาช่วยในการประเมินปริมาณเชื้อมาลาเรียร่วมกับการนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทัศน์

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

นภาพันธุ์ เรืองสเถียรทนต์. มารู้จักพืชสมุนไพร 13 ชนิดที่ประกาศว่าอันตรายตอนที่ 1. Website: http://biology.ipst.ac.th/index.php/2009-12-21-05-12-28/202--13-1-52.html.

มนัญญา เพียรเจริญ 1996. ผลของสารสกัดจากใบสาบเสือ *Chromolaena odorata* (L.) ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ขจัดพิษของหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สาขาวิชาสัตววิทยา.

ภัทราพร ผูกคล้าย ธัญญรัตน์ เชื้อสะอาด. (2553). การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระในพรอพอลิส. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

สุธามาศ ณ น่าน และ ศศิธร วรปิติรังสี. (2553). ผลของสารสกัดสมุนไพรบางชนิดในการป้องกันกำจัดโรคจุดดาของส้มโอ. ว. วิทย์. กษ. 41(3/1)(พิเศษ), 81-84.

บรรณานุกรมภาษาอังกฤษ

Akinmoladun, A. C., E.O. lbukun and I. A. Dan-Ologe. (2007). Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of *Chromolaena odorata*. Scientific Research and Essay. 2(6), 191-194.

Alisi, C. S., G. O. C. Onyeze, O. A. Ojiako and C. G. Osuagwu. (2011). Evaluation of the Protective Potential of *Chromolaena odorata* Linn. Extract on Carbon Tetrachloride-Induced Oxidative Liver Damage. International Journal of Biochemistry Research and Review. 1(3), 69-81.

Dash, G. H. and P. N. Murthy. (2011). Antimicrobial activity of few selected medical plants. International Research Journal of Pharmacy. 2(1), 146-152.

Fong, H. N. S.; Tin-Wa, M.; Fransworth, N. R.; and Dobberstein, R. H. (1981) Phytochemical Screening Methods. Department of Pharmacognosy and Pharmacology, College of Pharmacy, University of Illinois at the Medicinal Center, U.S.A.

Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. J. Nat. Prod. 59: 205-215.

Kamboj, A. and A. K. Saluja. 2008. Ageratum conyzoides L.:Areview on its phytochemical and pharmacological profile. 2(2): 59-68.

Land protect. (2006). Siam weed *Chromolaena odorata* Declared class1. Natural Resources and Water. Website: http://www.nqccs.com.au/library/weeds/siam_weed.pdf

Man, N. B. C. (2010). Phytochemical analysis of the leaves of *Chromolaena odorata (Asteraceae)*. Bacheleo of science(Hons.) Chemistry Faculty of applied sciences University Teknologi Mara.

Mathur, V., S. Vats, M. Jaya, J. Bhojak and R. Kamal. (2007). Antimicrobial activity of bioactive metabolites isolated from selected medicinal plants. Asian J. Exp. Sci. 21(2), p64.

Naidoo, K. K., R. M. Coopoosamy and G. Naidoo. (2011). Screening of *Chromolaeana odorata* (L.) King and Robinson for antibacterial and antifungal properties. Journal of Medicinal Plants Research. 5(19), 4859-4862.

Ngozi, I. M., I. C. Jude and I. C. Catherine. (2009). Chemical Profile of *Chromolaena odorata* L. (King and Robinson) Leaves. Pakistan Journal of Nutrition. 8(5), 521-524.

Oladejo, O. W., I. O. Imosemi, F. C. Osuagwu, O. O. Oluwadara, A. Aiku, A. Adewoyin, O. E. Ekpo, O. O. Oyedele and E. E. U... Akang. (2003). Enhancement of cutaneous wound healing by methanolic extracts of *Ageratum conyzoides* in wistar rat. African Journal of Biomedical Research. 6(1), 27-31.

Omobuwajo, O. R., A.Adbu, O. A. Igbenghu, L. O. Agboola and G. O. Alade. (2011). Preliminary investigation of a herbal soap incorporating Cassia senna (L.) Roxb leaves and Ageratum conyzoides Linn whole plantpowders. Continental J. Pharmaceutical Sciences. 5, 1-10.

Prabhu, V., I. Sujina, H. Hemlal and S. Ravi. (2011). Essential oil composition, antimicrobial, MRSA and *in-vitro* cytotoxic activity of fresh leaves of *Chromolaena odorata*. Journal of Pharmacy Research. 4(12), 4609-4611.

Prabhu, V. and S. Ravi. (2012). Isolation of a novel triterpene from the Essential oil of fresh leaves of *Chromolaena odorata* and its in-vitro cytotoxic activity against HepG2 cancer cell line. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2(9), 132-136.

Pisutthana, N., S. Liawruangrath, J. B. Bremner and B. Liawruangrath. (2005). Chemical Constituents and Biological Activities of *Chromolaena odorata*. Chiang Mai Journal Science. 32(2), 139-148.

Qeensland government . (2011). Siam weed Chromolaena odorata. Fact sheet DECLARED CLASS 1 PEST PLANT. Website:http://www.daff.qld.gov.au/documents/ Biosecurity_EnvironmentalPests/IPA-Siam-Weed-PP49.pdf

Sukanya, S. L., J. Sudisha, H.S. Prakash and S. K. Fathima. (2011). Isolation and characterization of antimicrobial compound from *Chromolaena Odorata*. Journal of Phytology. 3(10), 26-32.

Suksamrarn, A., A. Chotipong, T. Suavansri, S. Boongird, P. Timsuksai, S. Vimuttipong, A. Chuaynugul. (2004). Antimycobaterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*. Arch Pharm Res. 27(5), 507-511.

Suwaibah, M., R. Zatilfarihiah, M. A. Aslizah and S. N. Baharum. (2012). Chemical Composition of Local *Eupatorium odoratum* Essential Oil using GC-MS. UMT 11th International Annual Symposium on Sustainability Science and Management. 1383-1388.

Thoden, T. C., M. Boppré and J. Hallmann. (2007). Pyrolizidine alkaloids of *Chromolaena odorata* act as nematicidal agents and reduce infection of lettuce roots by *Meloidogyne incognita*. Nematology. 9(3), 343-349.

Vital, P. G. and W. L. Rivera. (2009). Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chrolaena odorata* (L. f.) Kind and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr. extract. Journal of Medicinal Plants Research. 3(7), 511

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ส่วนผสมสารเคมีและละลาย

RPMI1640, incomplete medium, pH 7.4

-	RPMI1640 ชนิดผง	1	ซอง
-	Glucose	2	กรัม
-	Hypoxanthrine	1	มิลลิลิตร
-	น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum*, NF54

-	RPMI1640, incomplete medium	450	มิลลิลิตร
-	heat-inactivated human serum	50	มิลลิลิตร
-	Gentamycin (1 mg/mL)	0.5	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ข้อมูลดิบการทดสอบสารสกัด

ตารางที่ ข-1 จำนวนเชื้อมาลาเรียในกลุ่มควบคุมที่นับต่อจำนวนเม็ดเลือดแดง 20,000 เซลล์ ในการทดลองการยับยั้งการไชเข้าเม็ดเลือดแดง (invasion inhibition test)

Group	concentration (ng/mL)	number of infected red blood cells (iRBC)		
		rep.1	rep.2	rep.3
Artemisinin	1,000	**0**	**0**	**0**
	100	**42**	**34**	**46**
	10	**98**	**103**	**89**
	1	**248**	**227**	**243**
	0.1	**362**	**388**	**337**
negative control	0	**421**		
	0	**386**		
	0	**428**		
	0	**347**		
	0	**392**		

ตารางที่ ข-2 จำนวนเชื้อมาลาเรียในกลุ่มทดลองที่นับต่อจำนวนเม็ดเลือดแดง 20,000 เซลล์ ในการทดลองการยับยั้งการไชเข้าเม็ดเลือดแดง (invasion inhibition test)

Group	concentration (ng/mL)	number of infected red blood cells (iRBC)		
		rep.1	rep.2	rep.3
Leaf -water	1,000	367	418	440
	100	384	420	391
	10	411	389	406
	1	372	387	361
	0.1	407	426	399
Leaf -ethanol	1,000	0	0	0
	100	160	176	162

	10	242	238	262
	1	259	291	288
	0.1	367	408	389
Leaf - methanol	1,000	0	0	0
	100	192	197	206
	10	228	245	211
	1	249	267	277
	0.1	340	327	303
Leaf - hexane	1,000	0	2	0
	100	182	178	188
	10	274	266	271
	1	338	326	361
	0.1	388	390	364
Root - water	1,000	219	224	243
	100	291	351	307
	10	343	362	368
	1	409	364	380
	0.1	388	427	377
Root - ethanol	1,000	194	191	204
	100	302	297	311
	10	366	370	389
	1	365	423	421
	0.1	396	376	368
Root - methanol	1,000	184	232	201
	100	247	225	260
	10	344	424	370
	1	367	362	291
	0.1	416	375	367
Root - hexane	1,000	65	78	73
	100	222	245	220
	10	354	371	368

	1	380	386	368
	0.1	418	366	391
Stem - water	1,000	272	276	293
	100	376	339	393
	10	344	368	360
	1	398	381	408
	0.1	382	377	415
Stem - ethanol	1,000	280	291	297
	100	358	349	341
	10	385	392	390
	1	357	403	398
	0.1	394	390	419
Stem - methanol	1,000	186	191	193
	100	284	295	320
	10	397	382	413
	1	402	367	392
	0.1	383	412	403
Stem - hexane	1,000	67	92	87
	100	279	271	265
	10	323	298	317
	1	361	368	374
	0.1	391	418	

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย นิวัฒน์ กังวานรังสรรค์
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Niwat Kangwanrangsan
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3102001200335
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพระรามหก แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-2015563 โทรศัพท์มือถือ 081-9280701
e-mail niwat.kan@mahidol.ac.th

5. ประวัติการศึกษา
   - วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล
   - วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล
   - Doctor of Medical Sciences, Ehime University
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   - Cell Biology
   - Molecular Parasitology
   - Pathobiology
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

   หัวหน้าโครงการวิจัย

   “Expression of Plasmepsin in sexual stage *Plasmodium spp.*”

   ผู้ร่วมวิจัย

   “A Mouse Model for Human Malaria Infection”
8. งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ

Kangwanrangsan N, Tachibana M, Jenwithisuk R, Tsuboi T, Riengrojpitak S, Torii M, Ishino T. A member of the CPW-WPC protein family is expressed in and localized to the surface of developing ookinetes. 2013. *Malar J*; 12(1):129.

Bullen HE, Charnaud SC, Kalanon M, Riglar DT, Dekiwadia C, **Kangwanrangsan** N, Torii M, Tsuboi T, Baum J, Ralph SA, Cowman AF, de Koning-Ward TF, Crabb BS, Gilson PR. Biosynthesis, localization, and macromolecular arrangement of the *Plasmodium falciparum* translocon of exported proteins (PTEX). 2012. *J Biol Chem;* 9;287 (11):7871-84.

VanBuskirk KM, O'Neill MT, De La Vega P, Maier AG, Krzych U, Williams J, Dowler MG, Sacci JB Jr, **Kangwanrangsan N**, Tsuboi T, Kneteman NM, Heppner DG Jr, Murdock BA, Mikolajczak SA, Aly AS, Cowman AF, Kappe SH. Preerythrocytic, live-attenuated *Plasmodium falciparum* vaccine candidates by design. 2009. *Proc Natl Acad Sci U S A;* 106(31):13004-9.

Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, **Kangwanrangsan N**, Zakaria S. The protective influence of ascorbic acid against the genotoxicity of waterborne lead exposure in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). 2008. *J Fish Biol*. 73(2):355-366

Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, **Kangwanrangsan N**. Toxicity of copper in Butterfish (*Poronotus triacanthus*): tissues accumulation and ultrastructural changes. 2007. *EnvironToxicol*; 22(1): 92-100.

Pankao V, Sirisriro A, Grams R, Vichasri-Grams S, Meepool A, **Kangwanrangsan N**, Wanichanon C, Ardseungneon P, Viyanant V, Upatham ES, Sobhon P. Classification of the parenchymal cells in *Fasciola gigantica* based on ultrastructure and their expression of fatty acid binding proteins (FABPs). 2006. *Vet Parasitol* ; 142: 281-292.

Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Sobhon P, Riengrojpitak S, **Kangwanrangsan N**. *Schistosoma mekongi*: the *in vitro* effect of praziquantel and artesunate on the adult fluke. 2006. *Exp Parasitol*; 113(1): 16-23

Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Tansatit T, **Kangwanrangsan N**, Pipatshukiat S. *Eurytrema pancreaticum*: the *in vitro* effect of praziquantel and triclabendazole on the adult fluke. 2005. *Exp Parasitol*; 111(3):172-7.

Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Sobhon P, Riengrojpitak S, **Kangwanrangsan N**. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. 2005. *Parasitol Int*; 54(3):177-83.

Sahaphong S, Linthong V, Wanichanon C, Riengrojpitak S, **Kangwanrangsan N**, Viyanant V, Upatham ES, Chansue N, Sobhon P. Morphofunctional study of the hemocytes of *Haliotis asinina*. 2001. *J Shellfish Res*; 20(2): 711-6