รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากลำต้นและราก ของต้นสาบเสือ

Biological activities study of the crude extracts from the shoot and root of *Chromolaena odoratum*

ดร.สุชาดา โทผล

ดร.ปิยาภรณ์ วรานุสันติกูล

ดร.ศรีสุดา หาญภาคภูมิ

และคณะ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากลำต้นและราก ของต้นสาบเสือ

Biological activities study of the crude extracts from the shoot and root of *Chromolaena odoratum*

ดร.สุชาดา โทผล

ดร.ปิยาภรณ์ วรานุสันติกูล

ดร.ศรีสุดา หาญภาคภูมิ

และคณะ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัยปีงบประมาณ 2556)

หัวข้อวิจัย การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากลำต้นและราก ของต้นสาบเสือ

ผู้ดำเนินการวิจัย สุชาดา โทผล[1], ปิยาภรณ์ วรานุสันติกู[1], ศรีสุดา หาญภาคภูม[1], นิวัฒน์ กังวานรังสรรค์[2]

หน่วยงาน [1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
[2]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตพญาไท

ปี พ.ศ. 2557

สารสกัดหยาบจากส่วนใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ (*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson) โดยการสกัดแบบเย็นด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ น้ำ เมทานอล เอทานอล และ เฮกเซน พบว่า ปริมาณสารสกัดหยาบจากใบที่สกัดด้วย น้ำ(12.16±0.13%) เมทานอล (10.45±0.012%) เอทานอล (8.42±0.115%) และ เฮกเซน (2.37±0.215%) มีปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าส่วนลำต้นและรากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ สารที่สกัดจากใบด้วยเอทานอลให้ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในหลายการทดสอบ (2.3 mM TEAC/mg of extract สำหรับวิธี DPPH assay, 269 μM TEAC/mg of extract สำหรับวิธี hydroxyl radical scavenging activity**,** 110.65 μM TEAC/mg of extract สำหรับวิธี ORAC assay, และ 7.24 mM TEAC/mg of extract สำหรับวิธี FRAP assay) ความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา C32 พบว่า ค่า IC_{50} < 500 μg/ml ได้แก่ สารสกัดจากใบ สกัดด้วยเอทานอล ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 428.77±6.19 μg/ml และ 381.40± 8.70 μg/ml ตามลำดับ สารที่สกัดจากใบด้วยเฮกเซน ที่ 48, 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 447.45±22.82 μg/m และ 436.65±3.46 μg/ml ตามลำดับ ในการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เมลาโนมา พบการจับกันแน่นของโครมาติน และการแตกหักของดีเอ็นเอ การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังในคน พบว่าสารสกัดหยาบจากใบที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง เอทานอล และ เฮกเซน ให้ค่า MIC ที่เท่ากับ 1.56 mg/mLต่อ *B. subtilis* TISTR 008 สารสกัดหยาบส่วนใบที่สกัดด้วย เอทานอล มีผลยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466*, P.* acnes DMST 14916 and *E. coli* TISTR 378 สารสกัดหยาบจากส่วนใบที่สกัดด้วยเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/mL จะมีผลลดสัดส่วนการเจริญของเส้นใยรา *Fusarium solani* TISTR 3436 และ *Aspergillus niger* TISTR 3245 ลดลงได้เท่ากับ 66 and 70 % ตามลำดับ ภายในเวลา 2 วัน การต้านมาลาเรียชนิดฟัลซิพารั่ม พบว่าสารสกัดจากใบสาบเสือสกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล มีฤทธิ์การยับยั้งการไซเข้าเม็ดเลือดแดง โดยมีค่า LC_{50} ที่ 179.46 และ 175.31 μg/ml ตามลำดับ และมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญไปเป็นตัวแก่ของพยาธิในเม็ดเลือดแดง ที่ความเข้มข้น 1,000 μg/ml

Research Title Biological activities study of the crude extracts from the shoot and root of *Chromolaena odoratum*

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

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

[2]Faculty of Science, Mahidol University, Phayathai Campus

Year 2014

Leaf, stem and root of *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson were extracted by maceration extraction method with aqueous, ethanol, methanol and hexane solvents. The concentrations of crude leaf extracts with aqueous (12.16±0.13%), methanol (10.45±0.012%), ethanol (8.42±0.115%) and hexane (2.37±0.215%) solvents showed significantly higher average percentage yield than crude stem and root extracts with the same solvents**.** The ethanol extract of leaves showed the highest antioxidant activity in several assays (2.3 mM TEAC/mg of extract for DPPH assay, 269 µM TEAC/mg of extract for hydroxyl radical scavenging activity**,** 111 µM TEAC/mg of extract for ORAC assay, and 7.24 mM TEAC/mg of extract for FRAP assay). For cytotoxicity on melanoma cell C32, it was found that IC_{50} values less than 500 µg/ml were the leaf extracts with ethanol at 48 (428.77±6.19 µg/ml) and 72 hours (381.40±8.70 µg/ml). The IC_{50} values for leaf extracts with hexane at 48 and 72 hours were 447.45±22.82 and 436.65±3.46 µg/ml, respectively. Apoptosis of melanoma cell showed chromatin condensation and DNA fragmentation. Antimicrobial activities against seven human skin pathogens were investigated. It was found that minimal microbial concentrations (MIC) of the ethanol and hexane leaf extract against *B. subtilis* TISTR 008 was 1.56 mg/ml. The ethanol leaf extract exhibited antibacterial activity against *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466*, P.* acnes DMST 14916 and *E. coli* TISTR 378. The mycelial ratio reduction on *Fusarium solani* TISTR 3436 and *Aspergillus niger* TISTR 3245 in two days at the concentration of 2.5 mg/mL of hexane leaf extract was 66 and 70 %, respectively. Anti-malarial, *Plasmodium falciparum*, activity found that LC_{50} of invasion inhibition as 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.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ประหยัด โภคฐิติยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่, อุปกรณ์, และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ซึ่งทำให้งานวิจัยดำเนินไปอย่างราบรื่นจนประสบความสำเร็จ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต และบุคคลทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องซึ่งทำให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย
2557

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตการวิจัย	2
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสาบเสือ	3
องค์ประกอบทางเคมี และสารออกฤทธิ์ของสาบเสือ	5
อนุมูลอิสระ	6
การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษ (Cytotoxic test)	6
การทดสอบฤทธิ์จุลินทรีย์	7
มาลาเรีย	8
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	11
การเก็บตัวอย่างสาบเสือ	11
การเตรียมตัวอย่างสาบเสือ	12
การสกัดสารสกัดหยาบ (Crude extraction)	12
การศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ	13
การเพาะเลี้ยงเซลล์เมลาโนมา C32 ในจานหลุม 96 หลุม	14
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา C32	14
การศึกษาลักษณะรูปร่างเซลล์ตายแบบApoptosis	14
การตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) โดยวิธีแยกสารชีวโมเลกุลด้วยไฟฟ้า	15

สารบัญ

	หน้า
การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ	15
การทดสอบฤทธิ์เบื้องของพฤกษเคมีสาบเสือต่อจุลินทรีย์	17
การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย	18
บทที่ 4 ผลการวิจัย	20
ปริมาณผลผลิตที่ได้ (% yield) ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และราก ของสาบเสือ(Chromolaena odorata)	20
ความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ	21
ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบ	26
การเลี้ยงเซลล์เมลาโนมา C32	28
ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา IC50 ของสารสกัดหยาบจากสาบเสือ	28
การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis)	29
การตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ วิธีแยกสารชีวโมเลกุลด้วยไฟฟ้า	31
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	32
ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรค	37
การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย	37
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	
สรุปผลการวิจัย	41
อภิปรายผล	47
บรรณานุกรม	
บรรณานุกรมภาษาไทย	56
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ	56
ภาคผนวก	
ประวัติผู้วิจัย	62

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ปริมาณผลผลิตที่ได้ (% yield) ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล น้ำ และเฮกเซน	20
4.2	แสดงเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เป็น % Radical scavenging ของสารสกัดหยาบ	22
4.3	แสดงเปอร์เซ็นต์ % Hydroxyl radicals inhibition ของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือ (Chromolaena odorata)	24
4.4	แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ peroxyl ด้วยค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ของสารสกัดหยาบ	25
4.5	แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ของสารสกัดหยาบ	26
4.6	ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (Chromolaena odorata)	27
4.7	ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา IC50 ของสารสกัดหยาบจาก ใบ ลำต้น และรากสาบเสือ	29
4.8	บริเวณยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบสาบเสือเข้มข้น 100 mg/ml ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด แบบสกัดเย็น	33
4.9	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย	34
4.10	ค่า% invasion inhibitionเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดแต่ละชนิดที่ปริมาณต่างๆ	38
4.11	ค่าครึ่งความเข้มข้นมรณะ (LC50)	39
4.12	ค่าความรุนแรงของสารสกัดที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในทดสอบgrowth inhibitory test	40

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ดอก ใบ และลำต้นของสาบเสือ (Chromolaena odorata)	4
2.2	รากสาบเสือ(Chromolaena odorata)	5
3.1	สถานที่เก็บตัวอย่างสาบเสือบริเวณป่าสวนยาง ต.นาวัง อ.เมือง จ. อำนาจเจริญ	11
3.2	ตัวอย่างสาบเสือที่เก็บจาก บริเวณป่าสวนยาง ต.นาวัง อ.เมือง จ. อำนาจเจริญ	11
4.1	ปริมาณผลผลิตที่ได้ (% yield) ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ (Chromolaena odorata)	20
4.2	แสดงเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เป็น % Radical scavenging ของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (Chromolaena odorata)	22
4.3	แสดงเปอร์เซ็นต์ % Hydroxyl radicals inhibition ของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือ (Chromolaena odorata)	24
4.4	แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ peroxyl ด้วยค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือ (Chromolaena odorata)	25
4.5	แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือ (Chromolaena odorata)	26
4.6	ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือ (Chromolaena odorata) เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (EtOH), เมทานอล (MeOH), น้ำ (H2O), และเฮกเซน (Hexane)	27
4.7	ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา IC50 ของสารสกัดหยาบจาก ใบ ลำต้น และรากสาบเสือ สกัดด้วย น้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน ที่ 24, 48 และ72 ชั่วโมง	29
4.8	บริเวณยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบสาบเสือเข้มข้น 100 mg/ml ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด แบบสกัดเย็น	33
4.9	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย	34
4.10	ค่า % invasion inhibition เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดแต่ละชนิดที่ปริมาณต่างๆ	38
4.11	ค่าครึ่งความเข้มข้นมรณะ (LC50)	39
4.12	ค่าความรุนแรงของสารสกัดที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในทดสอบ growth inhibitory test	40

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

สารประกอบทางชีวภาพที่ได้จากพืชจะเป็นแหล่งของสารเคมีธรรมชาติที่ปลอดภัย หาได้ง่าย และมีสารที่สำคัญออกฤทธิ์หลายชนิดที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน สาบเสือ (*Chromolaena odorata*) เป็นวัชพืชที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกากลาง ขึ้นทั่วไปเขตร้อนของโลกทุกทวีป (ธารธรรมแก้ว เชื้อแก้ว, 2537; สุรศักดิ์ ราตรี, 2554) มีการศึกษาวิจัยองค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล พบสารกลุ่ม phenolic acids และสารกลุ่ม flavonoid (Pisutthanan et al., 2005) สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำและเมทานอลจะพบสารพวก tannins, steroids, terpenoids, flavonoids และ cardiac glycosides (Akinmoladun et al., 2007) ได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารสกัดจากใบสาบเสือด้วยตัวทำละลายที่เป็นน้ำและเมทานอลมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (Akinmoladun et al. ,2007) สารสกัดหยาบจาก ดอก ใบ ลำต้น และราก ที่สกัดด้วยน้ำและสารอินทรีย์ ได้แก่ ethyl alcohol methanol, chroroform และ methanol: chloroform: water พบว่า ส่วนใบและรากจะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Venkata *et al*., 2012 ; Anitndehou *et al.*, 2013 ; Eze *et al.*, 2013) ใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล พบ flavonoid glycosides สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง LLC และ HL-60 ได้ (Hung et al., 2011) ดอกสาบเสือ พบสาร acacetin และสาร luteolin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (NCl-H187) น้ำมันหอมระเหยจากใบสาบเสือ ยังพบสารที่เป็นอนุพันธ์ของ tritrepene สามารถต้านเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 (Prabhu and Ravi, 2012) นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือ ที่สกัดด้วยน้ำ พบว่ามีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* K1 (Pisutthanan et al., 2005)

สารสกัดจากส่วนต่างๆของสาบเสือ มีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างกว้างขวาง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสุขภาพและทางการแพทย์ได้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากลำต้น และรากของต้นสาบเสือ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ

1.2.2 เพื่อศึกษาความเป็นพิษและการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง โดยสารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ

1.2.3 เพื่อศึกษาการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ

1.2.4 เพื่อศึกษาการต้านเชื้อมาลาเรียของสารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 เก็บสาบเสือในป่าจังหวัดอำนาจเจริญ

1.3.2 สกัดตัวอย่าง ใบ ลำต้น และ ราก ของสาบเสือด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดได้แก่ น้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน

1.3.3 ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ

1.3.4 ศึกษาความเป็นพิษและการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง โดยสารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ

1.3.5 ศึกษาการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ

1.3.6 ศึกษาการต้านเชื้อมาลาเรียของสารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สาบเสือ (*Chromolaena odorata*) วัชพืชตระกูล Asteraceae ที่พบในเมืองไทย สารสกัดหยาบจากลำต้น และรากของต้นสาบเสือมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.5 คำสำคัญ (keywords)

สาบเสือ (*Chromolaena odorata*
อนุมูลอิสระ (Free radicle)
สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)
ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotxicity)
การตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis)
สารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity)
โรคมาลาเรีย (Malaria)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยที่ได้สามารถนำไปใช้เพื่อต่อยอดในการพัฒนายาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสารสกัดของต้นสาบเสือต่อไป

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสาบเสือ (siam weed; *Chromolaena odorata*)

2.1.1 ชื่อ

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

ชื่อภาษาไทย: สาบเสือ

ชื่ออื่นๆ: สาบเสือ (สิงห์บุรี) บ้านร้าง ผักคราด (ราชบุรี) รำเคย หญ้าเมืองวาย หญ้าดอกขาว (ระนอง) เสือหมอบ (สุพรรณบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี) ชาผักครดา ยี่สุ่นเถื่อน (สุราษฎร์ธานี) ฝรั่งเหาะ ฝรั่งรุกที่ (สุพรรณบุรี) รำเคย หญ้าเมืองวาย (ระนอง) หญ้าดอกขาว (สุโขทัย ระนอง) หญ้าดงรั้ง หญ้าสิริไอสวรรค์ (สระบุรี) หญ้าลืมเมือง (หนองคาย) มุ้งกะต่าย (อุดรธานี) หญ้าเลาฮ้าง (ขอนแก่น) หมาหลง (ศรีราชา-ชลบุรี) สะพัง (เลย) นองเส้งเปรง เซโพกวย (กะเหรี่ยง–เชียงใหม่) ไช้ปู่กุย (กะเหรี่ยง–แม่ฮ่องสอน) เบญจมาศ (ตราด) ฝรั่งรุกที่ฝรั่งเหาะ มนทน (เพชรบูรณ์) หญ้าเมืองฮ้าง หญ้าเหม็น (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ชื่ออื่นๆ ได้แก่ หญ้าฝรั่งเศส หญ้าเครื่องบิน ปวยกีเช่า เฮียงเจกลั้ง (ธารธรรมแก้ว เชื้อเมือง, 2537; พิสุทธิพร ฉ่ำใจ, 2550)

การจัดลำดับอนุกรมวิธานของสาบเสือ (Chakraborty *et al.,* 2011; 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 ขึ้นทั่วไปเขตร้อนของโลกทุกทวีป ยกเว้น ในทวีปออสเตรเลีย ซึ่งเพิ่งจะพบเพียงเล็กน้อยในช่วงเวลาภายใน10ปี ที่ผ่านมา สาบเสือจึงเป็นวัชพืชที่ขึ้นโดยทั่วไป ที่เรียกสาบเสือเนื่องจากก้านและใบเมื่อขยี้จะมีกลิ่นแรงคล้ายสาบเสือ (ธารธรรมแก้ว เชื้อแก้ว, 2537; สุรศักดิ์ ราตรี, 2554)

2.1.3 ลักษณะของพืช

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

ใบ (leaves) ใบเดี่ยวออกจากลำต้น ที่ข้อ แบบตรงกันข้าม รูปรีค่อนข้างเป็นสามเหลี่ยม ขอบใบหยัก ปลายใบแหลม ฐานใบกว้าง เรียวสอบเข้าหากัน ใบนุ่ม สีเขียวอ่อน เส้นใบเห็นชัดเจน 3 เส้น มีขนปกคลุม ยอดอ่อนจะมีสีม่วง ผิวใบทั้งสองด้าน (ภาพที่ 2.1)

ดอก (flower) เป็นช่อสีขาวหรือฟ้าอมม่วง ดอกย่อย 10-35 ดอก ดอกวงนอกบานก่อน กลีบดอกหลอมรวมกันเป็นหลอด ผลขนาดเล็ก รูปร่างห้าเหลี่ยมสีน้ำตาลหรือดำ มีหนามแข็งบนเส้นของผล ส่วนปลายผลมีขนสีขาว ช่วยพยุงให้ผลและเมล็ดปลิวตามลมได้ไกลจึงแพร่พันธุ์อย่างรวดเร็ว ออกดอกในเดือนกรกฎาคมและออกดอกอีกครั้งเดือนกันยายนถึงตุลาคม (ภาพที่ 2.1)

ลำต้น (stem) ลำต้น สูง 1-2 เมตร เรียบไม่ขรุขระ มีสีเขียว เมื่อแก่จะออกสีน้ำตาล (ภาพที่ 2.1)

ราก (root) ระบบรากจะมีทั้งรากแล้วและรากฝอยอยู่ใต้ดิน ส่วนที่เชื่อมต่อกับลำต้นจะมีลักษณะเป็น basal ball (ภาพที่ 2.2)

เมล็ด (seeds) เมล็ดสร้างขึ้นภายใน 8-10 สัปดาห์หลังจากออกดอก เมล็ดมีทั้งหมดประมาณ 80,000 เมล็ดต่อต้นต่อฤดูกาล แต่ละเมล็ดจะมีขนสีขาวติดอยู่ทำให้ถูกกระจายไปยังแหล่งอื่นได้ง่ายโดยลมและน้ำ เมล็ดจะงอกหลังฝนตกและสามารถอยู่รอดได้หลายปี

ภาพที่ 2.1 ดอก ใบ และลำต้นของสาบเสือ (*Chromolaena odorata*)
ที่มา : ป่าสวนยาง ต.นาวัง อ.เมือง จ. อำนาจเจริญ

ภาพที่ 2.2 รากสาบเสือ(*Chromolaena odorata*)
ที่มา : ป่าสวนยาง ต.นาวัง อ.เมือง จ. อำนาจเจริญ

2.1.4 การแพร่กระจาย

สาบเสือขึ้นทั่วไปทั้งในสภาพดินชื้นหรือ แห้ง แพร่กระจายในแหล่งปลูกพืชยืนต้นและที่รกร้าง ว่างเปล่า และตามที่มีแสงแดดมากๆขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด

2.1.6 สรรพคุณ (ธารธรรมแก้ว เชื้อเมือง, 2537; สุรศักดิ์ ราตรี, 2554; พิสุทธิพร ฉ่ำใจ, 2550)

ใบ ใช้ตำให้ละเอียดพอกบาดแผลสด ช่วยห้ามเลือดได้เป็นอย่างดี (ชาวเขานิยมใช้) แก้ตาฟาง ตาแฉะ รักษาริดสีดวงทวาร

ลำต้น แก้ปวดท้อง ท้องเฟ้อ แก้นมคัด แก้ปวด ดูดหนอง

ดอก แก้ร้อนในกระหายน้ำ แก้อ่อนเพลีย บำรุงหัวใจ แก้ไข้

อื่นๆ ใบมีกลิ่นฉุน มีสารยับยั้งการงอกและชะลอการเจริญเติบโตของพืชอื่น

2.2 องค์ประกอบทางเคมี และสารออกฤทธิ์ของสาบเสือ

2.2.1 องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ

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

2.2.2 องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย (volatile oil) ที่ได้จากใบสาบเสือพบว่ามีสารหลายชนิด ได้แก่ alpha-pinene (19.32%) cadinene (19.09%) camphor (15.46%) limonene (10.22%) beta-caryophyllene (7.05%) และ cadinol (6.36%) ส่วนที่เป็น terpenoids ของสาบเสือมีสาร triterpene epoxide, savigenin, lupeol, beta-amyrin (Inya-Agha et al., 1987) Prabhu et al. (2011) ได้สกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบเสือสด โดยกลั่นด้วยน้ำร้อนและทำการแยกชนิดของสาร โดยใช้ GC-MS สารที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ 5, 6-diethenyl-1-methyl- cyclohexene (44.7%), β-guiane (11.9%), elemol (8.5%) และ patchoulene (8.6%)

2.3 อนุมูลอิสระ (Free radicals)

เป็นสารที่มีอิเล็คตรอนอิสระ (Unpaired electron) อยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล (ภาพที่ 2.1, ตารางที่ 2.1) จึงมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาโดยรับอิเล็คตรอนจากสารอื่นๆใกล้เคียง ยังผลให้ตนเองเสถียรขึ้น ในขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็คตรอนไปนั้นมีอิเล็คตรอนไม่ครบคู่จน อาจกลายเป็นสารที่มีความรุนแรง ซึ่งถ้าเกิดขึ้นในระบบสิ่งมีชีวิตอาจทำอันตรายกับส่วนประกอบสำคัญ ของเซลล์รอบๆบริเวณนั้น ไม่ว่าจะเป็นโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือดีเอ็นเอ ทำให้สารชีวโมเลกุล เหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเสียหน้าที่การทำงาน ดังนั้นในสภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระ เป็นจำนวนมากจะก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ ได้เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรค Parkinson (Banerjee et al., 2005) โรค Alzheimer ไขข้ออักเสบ และต้อกระจก (Ames et al., 1993)

2.4 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษ (Cytotoxic test)

วิธีการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองมีหลายวิธี ดังนี้

2.4.1 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษโดยวิธี MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium romide test)

หลักการทำงานของ MTT คือเซลล์ซึ่งยังมีชีวิตอยู่ มี enzyme succinate dehydrogenase ซึ่งจะเปลี่ยน tetrazolium salt ให้เป็น formazan โดยปฏิกริยา reduction และผลึก formazan มีสีม่วงน้ำเงินที่ไม่ละลายในน้ำต้องละลายด้วย DMSO และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ formazan ซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต (Denizot &Lang., 1986)

2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษโดยใช้สาร MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)2 Htetrazolium)

หลักการทำงานของวิธีนี้คือ การวัดการทำงานของเอนไซม์ mitochondrial reductase ที่เปลี่ยนสาร tetrazolium เป็นผลึก formazan ที่สามารถถูกละลายในน้ำได้ absorption ที่ 490 nm

แปรผันตามปริมาณของเซลล์มีชีวิต (Cory et al., 1991) ใช้สี crystal violet ย้อมโปรตีนของเซลล์และวัดความเข้มของสีที่ความยาวคลื่น 560 nm ซึ่งจะแปรผันกับจำนวนเซลล์ (Tengchaisri et al., 1998)

2.4.3 วิธี Sulforhodamine B (SRB)

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดโดยการย้อมเซลล์ด้วยสี Sulforhodamine B ซึ่งเซลล์ถูกตรึงเซลล์ด้วย 40% trichloroacetic acid (TCA) และย้อมด้วยสี Sulforhodamine B ซึ่งเป็นสาร aminoxanthene dye สามารถจับกับ basic amino acid ของโปรตีนภายในเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ ความเข้มของสีจะแปรผันตามจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Vchai & Kirtikara, 2006)

2.4.4 วิธี Alamar Blue

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดโดยใช้สาร resazurinbased compound ที่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ (Cell-permeant) โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงสามารถวัดสีของสารแบบจับเวลา (kinetic assay) ได้ เมื่อสารเข้าสู่เซลล์จะถูก reduced เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีแดง สารมีความไวต่อสภาวะ reducing ภายในเซลล์มาก (high-sensitivity) ใช้เวลา 10 นาที สีถูกวัดเป็นความเข้มของแสงเรืองแสง (Fluorescent intensity) (Mao et al., 2012)

2.5 การทดสอบฤทธิ์จุลินทรีย์

2.5.1 การหาบริเวณยับยั้งด้วยวิธี disc diffusion method

การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เติมลงบนกระดาษกรอง(filter paper disk) ซึ่งวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรวจสอบไว้ จะแพร่จากจุดเริ่มต้นไปในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น เมื่อระยะทางที่สารแพร่ออกไปเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของสารนั้นจะลดลงทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสาร ณ จุดต่างๆกันรอบแผ่นกระดาษกรอง ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารออกฤทธิ์ ณ ความเข้มข้นของสารที่จุดใดๆ (ไกลจากกระดาษกรอง) ก็จะเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นจนเห็นได้ชัด แต่บริเวณใกล้กระดาษกรองซึ่งมีความเข้มข้นของสารมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้ จะไม่มีการเจริญของเชื้อให้เห็นจึงเกิดเป็นโซนใส (inhibition zone) ขึ้น ผลการยับยั้งจุลินทรีย์วัดได้จากขนาดของโซนใส โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration หรือ MIC)

2.5.2 Dilution method

เป็นการทำการเจือจางยา หรือสารสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้มีความเข้มข้นในระดับต่างๆกัน ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่ผสมยาหรือสารสกัด แล้วทำการวัดการเจริญของจุลินทรีย์ การเจือจางสามารถเจือจางในอาหารแข็ง (agar dilution method) ซึ่งเหมาะกับเชื้อราที่เจริญแผ่ไปบนผิวหน้าอาหาร และการเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) จะ

เหมาะกับเชื้อแบคทีเรียหรือยีสต์หรือเชื้อราที่ขยายพันธุ์และมีการเจริญคล้ายยีสต์ การทดสอบหาความไวของแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ละเอียดวิธีหนึ่ง ซึ่งได้จากการทดสอบวิธีนี้จะทำให้ทราบทั้ง MIC (Minimal inhibitory concentration) และ MLC (Minimal lethal concentration) ของยาปฏิชีวนะนั้นๆ กับแบคทีเรียซึ่งทำการทดสอบหลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้คือการเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในปริมาณต่างๆกันผสมอยู่ด้วย และสังเกตการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมียาปฏิชีวนะในปริมาณต่างๆกัน

2.6 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

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาบเสือ

Akinmoladun et al. (2007) ศึกษาสารสกัดจากใบสาบเสือด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล พบว่า มี total phenolic content เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าลดฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ (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

2.7.2 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสาบเสือ

Suksamrarn *et al*. (2004) พบว่าดอกของสาบเสือ (*Chromolaena odorata* หรือ *Eupatorium odoratum*) มีสารประกอบต่างๆ 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 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* พบว่าสารisosakuranetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavanone) มีความสามรถ

ยับยั้งเชื้อได้ในระดับปานกลาง (MIC=174.8 µmol) สาร4'-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

Sukanya et al. (2009) ศึกษาสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเมทานอล สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* ที่ให้ค่าโซนใสของการยับยั้งเท่ากับ 10 และ 9 มิลลิเมตร ตามลำดับ และใบสาบเสือที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* ที่ให้ค่าโซนใสของการยับยั้งเท่ากับ 8 และ 4 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตท และคลอโรฟอร์มจะให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิด (MIC) อยู่ในช่วง 0.35 ถึง 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Naidoo et al. (2011) รายงานว่าสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Staphylococcus aereus,* และ *Staphylococcus epidermidis*) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมลบสามารถยับยั้งได้เพียงชนิดเดียว คือ *E. coli* ในส่วนของลำต้นที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตรทและเมทานอลจะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus epidermis*

Sukanya et al (2011) ศึกษาสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือ ที่สกัดด้วยเมทานอล 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

2.7.3 ความเป็นพิษของสาบเสือ

Prabhu and Ravi (2012) ศึกษาความเป็นพิษของสาร triterpene ที่แยกออกมาจากสารสกัดจากใบสาบเสือ นำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยเทคนิค MTT assay พบว่า มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ ชนิด HepG2 (human hepatoma cells) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 206.7 µg/ml Hung et al. (2011) ศึกษาสารที่ได้จากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 70% พบ สารกลุ่มใหม่ของ flavonoid glycosides 2 ชนิด โดยใช้ NMR spectroscopic interpretation เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง LLC และ HL-60 พบว่า flavonoid glycosides ชนิดที่ 1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง LLC และ HL-60 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 28.2 และ 11.6 µg/ml ตามลำดับ flavonoid glycosides ชนิดที่ 2 แสดงการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ชนิดเดียว คือ HL-60 ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 10.8 µg/ml

Suksamrarn *et al*.l (2004) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง(cytotoxicity) ในคนของสารประกอบจากดอกสาบเสือ พบว่า สาร acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone) แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (NCl-H187) ในระดับปานกลาง สาร

luteolin (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone) แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ NCl-H187 ในระดับปานกลาง และ แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระบบหายใจ (Breast cancer, BC) ในระดับต่ำ

2.7.4 ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

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

2.7.5 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

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.2 การเก็บตัวอย่างสาบเสือ

เก็บตัวอย่างต้นสาบเสือบริเวณป่าสวนยาง ต.นาวัง อ.เมือง จ. อำนาจเจริญ ในช่วงเดือน พฤศจิกายน 2555 – มิถุนายน 2556 ลักษณะตัวอย่างสาบเสือที่เก็บ เป็นต้นสาบเสือที่สูงประมาณ 100-150 เซนติเมตร โดยทำการเก็บสาบเสือ 4 ครั้ง ครั้งที่ 1 ในช่วงเดือน พฤศจิกายน - ธันวาคม 2555 ครั้งที่ 2 มกราคม - กุมภาพันธ์ 2556 ครั้งที่ 3 มีนาคม - เมษายน 2556 และ ครั้งที่ 4 เดือน พฤษภาคม - มิถุนายน 2556 บริเวณป่าสวนยาง ต.นาวัง อ.เมือง จ. อำนาจเจริญ ตัวอย่างสาบเสือ ที่เก็บนำมาล้างเอาดินออก ตัดแยก 3 ส่วน ได้แก่ ใบ ต้น และราก และหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปตากแดดให้แห้งสนิท (sun drying) เป็นเวลา 3-5 วัน ดังภาพที่ 3.1 - 3.6

ภาพที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างสาบเสือบริเวณป่าสวนยาง ต.นาวัง อ.เมือง จ. อำนาจเจริญ

ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างสาบเสือที่เก็บจาก บริเวณป่าสวนยาง ต.นาวัง อ.เมือง จ. อำนาจเจริญ

3.2 การเตรียมตัวอย่างสาบเสือ

3.2.1 การอบ

นำส่วน ใบ ลำต้น และรากของสาบเสือที่ตากแดดแห้งสนิทแล้ว นำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำเข้าตู้อบ(Memmert) ที่อุณหภูมิ 50° C เป็นเวลา 2 วัน นำพืชตัวอย่างออกจากตู้อบชั่งน้ำหนัก โดยน้ำหนักสดใบ ลำต้น และราก รวม 1 กิโลกรัม หลังอบได้น้ำหนักแห้ง 415 กรัม

3.2.2 การบดละเอียด

นำส่วน ใบ ลำต้น และรากของสาบเสือที่อบแล้ว ไปทำให้ละเอียดโดยนำใบไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ ลำต้นและรากนำไปบดด้วย เครื่องบด Wiley Mill

3.3 การสกัดสารสกัดหยาบ (Crude extraction)

สกัด ใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ ด้วยการสกัดเย็น โดยใช้ตัวทำละลาย น้ำ เอทานอล เมทานอล และ เฮกเซน

3.3.1 ขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากสาบเสือ

1) นำผงบดละเอียดของใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ มาชั่งด้วยเครื่องชั่งน้ำหนัก (ZepperEPS-302, China) ในปริมาณ 10 กรัม เพื่อนำไปสกัดโดยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทธิลแอลกอฮอล์ (90%) เมทธิลแอลกอฮอล์ (90%) และเฮกเซน โดยใช้กระบอกตวงวัดปริมาตรตัวทำละลายแต่ละชนิดให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผสมกับผงพืชที่ชั่งไว้แล้วในขวดแก้ว คิดเป็นความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (อัตราส่วนน้ำหนักต่อปริมาตร)

2) หลังจากที่ผสมผงบดละเอียดสาบเสือกับตัวทำละลายในขวดแก้วแล้ว ปิดฝาให้สนิทและนำมาเขย่าด้วยเครื่อง Orbit Shaker (Gemmy VRN-480, Taiwan) ที่ความเร็ว150-200รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้สารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของพืชถูกชะล้างออกมากับตัวทำละลายสำหรับใช้ในขั้นตอนต่อไป

3) เมื่อเขย่าส่วนผสมครบตามเวลาแล้วจึงนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatmanเบอร์ 1 เพื่อแยกกากทิ้งไปให้ได้แต่ส่วนที่ต้องการคือสารละลายที่ผ่านกระดาษกรองออกมา ซึ่งได้แก่สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ

3.3.2 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

1) นำสารละลายที่ผ่านการกรองไปทำการระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ความดัน (evaporation) ด้วย Rotary evaporator (Buchi R-200, USA.) แบ่งสารละลายที่ทำการระเหยตัวทำละลายออกแล้วลงสู่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร ในปริมาตรหลอดละ 5-10 มิลลิลิตรและใช้กระดาษทิชชู่หุ้มบริเวณปากหลอดนำหลอดที่บรรจุสารละลายไปทำการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสด้วย Ultra-low freezer (Coolsafe, USA.)

2) นำหลอดที่บรรจุสารละลายที่ผ่านการแช่แข็งไปทำการระเหยแห้งด้วย Dryer freezer (CoolSafe DK-3450, Denmark) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างที่ผ่านการระเหยแห้ง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองถัดไป

3.4 ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ

3.4.1 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) Assay

ทดสอบตามวิธีการที่ระบุโดย Yen และ Chen (1995), Oueslati et. al. (2012), John et al. (2015) โดยนำสารสกัดแต่ละชนิดมาเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นต่างๆกันใน Ethanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย 0.05 mM DPPH ใน Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน หลังจากทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง นาน 30นาที ตามลำดับ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใส่ Ethanol แทนสารสกัด นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูล DPPH (% Radical scavenging) จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟระหว่าง % Radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัด

3.4.2 Hydroxyl (OH) radical scavenging activity (Tan และ Lim, 2015)

วัดประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ จากตัวอย่างโดยวัดจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (TBARS) จากปฏิกิริยาระหว่าง deoxyribose กับ ตัวอนุมูลอิสระ (hydroxyl radicals) ที่เกิดจาก Fe^{2+}ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 โดยปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระที่ได้กล่าวข้างต้นนั้นจะวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ในการวิเคราะห์ผล ถ้าหากสารสกัดจากตัวอย่างที่ทดสอบมีฤทธิ์ในการกำจัด อนุมูลอิสระ (hydroxyl radicals) ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะลดลงเมื่อเทียบกับตัวที่ไม่มีสารสกัดจากตัวอย่างผลไม้ และในการรายงานผลจะรายงานผลเป็น % hydroxyl radicals inhibition ซึ่งทำการคำนวณดังนี้

$$\% \text{ hydroxyl radicals inhibition} = 100 \times [(A_0-A_s)/ A_0)]$$

A_0 คือค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม ส่วน A_sคือค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากตัวอย่าง

3.4.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัด

วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method (Marksimovic´, 2008) โดยนำสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร มาเติมน้ำกลั่นจนครบ 3 มิลลิลิตร เติมสาร Folin-Ciocalteu reagent (ประกอบด้วย 10% (w/v) Sodium tungstate และ 0.002% (w/v) Phosphomolybdic acid) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร หลังจากวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที เติม 7% Na_2CO_3 1.25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 90 นาทีที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดสี จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร เทียบกับ blankซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด หาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกในสารสกัด โดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานซึ่งเตรียมจากสารละลาย Gallic acid ความเข้มข้น 20-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Krishnaiah *et al*., 2011)

3.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์เมลาโนมา C32 ในจานหลุม 96 หลุม

เซลล์เมลาโนมา C32 (ได้รับความกรุณาจาก ศ.ดร. รัชนีย์ อุดมแสงเพ็ชร ภาควิชา พยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) ทำการเพาะเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานหลุม 96 หลุม โดยนับเซลล์ ด้วย Heamatocytometer เพื่อคำนวณหาปริมาณเซลล์ $2.5x10^3$, $5x10^3$, $1x10^4$, $2x10^4$, $4x10^4$ และ $8x10^4$ เซลล์ต่อหลุม ปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงเซลล์ใน incubator ที่ 37°c และมีปริมาณของ CO_2 5% เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามเวลาที่กำหนด

3.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา C32 ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ

เซลล์เมลาโนมา C32 ในจานหลุม 96 หลุม จำนวนเซลล์ $4x10^4$ เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMSO ใน 10 % FBS นำเซลล์ที่ใช้สำหรับทดสอบมาล้าง โดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม 100 ไมโครลิตรต่อหลุมแล้วดูดทิ้ง จากนั้นใส่สารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ใส่ในหลุมที่ต้องการ นำไปเพาะเลี้ยงใน incubator ที่ 37 °c และมีปริมาณของ CO_2 5% เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตามกำหนดวัดปริมาณเซลล์ด้วยการทดสอบ MTT

การวิเคราะห์ ค่า OD (optical density) ที่วัดได้จากผลการทดลองนำมาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นของความมีชีวิตของเซลล์ (% of cell viability) โดยเปรียบเทียบกับหลุมที่เซลล์ถูกทดสอบกับสารสกัดกับเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัด นำผลของเปอร์เซ็นของความมีชีวิตของเซลล์มาสร้างกราฟเพื่อวิเคราะห์หาค่า IC_{50} หรือ 50 % Inhibitory concentration (ค่าที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์ตายหรือค่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลง50%)

สูตรการหา

เปอร์เซ็นของความมีชีวิตของเซลล์ = ค่า OD ของเซลล์ในหลุมที่ทดสอบกับสาร X 100
(% of cell viability) ค่า ODของเซลล์ในหลุมที่ไม่มีสาร

3.7 การศึกษาลักษณะรูปร่างเซลล์เซลล์เมลาโนมา C32 ตายแบบApoptosis

นำเซลล์เมลาโนมา C32 ที่ถูกทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วยสี DAPI, 4,6-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid เพื่อดูลักษณะนิวเคลียสของเซลล์ ที่มีชีวิตและเซลล์ตาย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงที่ความยาวคลื่น 430 nm (Tengchaisri et al., 1998)

เซลล์ในจานหลุม 96 หลุม จำนวนเซลล์ $4x10^4$ เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMSO ใน 10 % FBS นำมาบ่มใน incubator ที่ 37 °c และมีปริมาณของ CO_2 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมสารละลายของสารสกัดความเข้มข้นจากค่า IC_{50} ในปริมาตร 500 µl บ่มใน 37 °c และมีปริมาณของ CO_2 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเก็บเซลล์ที่ถูกทดสอบโดยถ่ายลงใน microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยง 500xg หลังจากล้างเซลล์ และตรึงเซลล์ โดยเติม 1X PBS และเมทานอลที่แช่เย็น เก็บที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย DAPI (1 µg/ml ในน้ำ)

ปริมาณ 100 µl ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 µg/ml เก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที นำมาปั่นล้างด้วย 1X PBS ที่ แล้วเติม 1X PBS: Glycerin (1:1) ปริมาณ 20 µl นำเซลล์ไปศึกษาการตายของเซลล์แบบApoptosis ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ชนิดหัวกลับ

3.8 การตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) เซลล์เมลาโนมา C32 โดยวิธีแยกสารชีวโมเลกุลด้วยไฟฟ้า (Gel electrophoresis technique)

นำเซลล์ใส่ลงใน 24-well plate หลุมละ 1x106 เซลล์ เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นจากค่า IC_{50} ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยให้มีปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มเพาะไว้ที่อุณหภูมิ 37 oC, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ในแต่ละหลุมแยกใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (1.5 mL centrifuge tube) นำตัวอย่างทั้งหมดมาปั่นเหวี่ยงที่ 500 xg นาน 3 นาที เมื่อดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้ว เติมสารละลายที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (DNAzol reagent, Invitrogen) เพื่อทำให้เซลล์แตกและเก็บรักษาสารพันธุกรรม

เตรียมสารละลาย agarose ที่ความเข้มข้น 1.8% agarose gel ใน TBE (Tris, Borax, EDTA) buffer นำเจลไปประกอบในชุด electrophoresis จากนั้นหยอด DNA marker เพื่อใช้เป็นตัวบอกขนาดของดีเอ็นเอแต่ละแถบ แล้วจึงหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอทีละตัวอย่าง เสร็จแล้วจึงเปิดเครื่องกำเนิดการแสไฟฟ้าให้ไหลผ่านจากขั้วลบไปขั้วบวกเพื่อให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ ทั้งนี้ควบคุมให้มี voltage คงที่ที่ 80 V. โดยใช้เวลาประมาณ 60 นาที เมื่อครบเวลาจึงปิดเครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้า และนำเจลออกมาย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งเป็นสารเรืองแสง โดยสารนี้จะไปเกาะติดอยู่กับดีเอ็นเอ ทำให้แถบดีเอ็นเอสามารถเรืองแสงได้ นำเจลที่ย้อมสารเรืองแสงแล้วไปตรวจสอบผ่านเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต

3.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ

3.9.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเบื้องต้นด้วยวิธี agar well diffusion

สารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังมาเตรียมไว้ในรูป stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 200 mg/mL

การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

(1) เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุประมาณ 24 h มา 1 ลูปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบปริมาตรหลอดละ 5 mL

(2) นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ (1) ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h

(3) นำเชื้อจากข้อ (2) มาเจือจางให้ได้จำนวนแบคทีเรีย 10^7 – 10^8 CFU/mL โดยเทียบความขุ่นให้ได้เทียบกับความขุ่นของ McFarland Standard No.5 ในการเจือจางนี้ทำโดยการใช้ปิเปตที่ปราศจากเชื้อแล้ว หยดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ทีละหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ จนได้ความขุ่นที่ต้องการ

การทดสอบบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)

1) เทอาหารที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิดลงบนจานเพาะเชื้อ รอจนวุ้นแข็ง

2) เมื่ออาหารแข็งเจาะหลุมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 mm ด้วย Cork borer No. 3 จำนวน 3 หลุมต่อจานเพาะเชื้อ ประกอบด้วย สารสกัดหยาบ 2 หลุม และหลุมควบคุม (10% DMSO) 1 หลุม

3) ดูดเชื้อสำหรับทดสอบมา 0.1 ml ใส่ลงในจานเพาะเชื้อโดยใช้ไม้ swab ที่ปราศจากเชื้อทำการ swab เชื้อเริ่มต้นบนผิวหน้าอาหารให้ทั่วแบบ three-way ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง

4) เติมสารสกัดหยาบความเข้มข้น 100 mg/mL ปริมาตร 200 µl ลงในหลุม บ่มเลี้ยงเชื้อที่ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 24 h ตรวจวัดผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางฤทธิ์ยับยั้ง (Inhibition zone) การทดลองแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง

3.9.2 การหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบต่อการเจริญของแบคทีเรีย ด้วยวิธี macro broth dilution technique

การเตรียมสารสกัดเพื่อใช้ในการทดสอบ นำ stock solution ของสารสกัด ที่มีความเข้มข้น 200 mg/mL มาทำการเจือจาง ให้ได้ความเข้นข้นเท่ากับ 100 mg/mL

1) นำหลอดทดลองขนาด 13 x 100 mL ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อและทำให้แห้ง จำนวน 12 หลอด เขียนหมายเลขกำกับไว้ที่หลอด

2) ดูดอาหารเหลวใส่ลงในหลอดที่ 2 - 12 หลอดละ 1 mL

3) ดูดสารทดสอบลงในหลอดที่ 1 และ 2 หลอดละ1 mL ผสมสารในหลอดที่2 ให้เข้ากัน

4) ดูดสารในหลอดที่ 2 หลอด จำนวน 1 mL ใส่ลงในหลอดที่ 3

5) ทำซ้ำในข้อ (4) ไปจนถึงหลอดที่ 11 ดังแผนภาพที่ 3.13 เมื่อผสมสารละลายในหลอดที่ 11 ให้เข้ากันได้ดีแล้วให้ใช้ไปเปตดูดสารละลายทิ้งไป 1 mL หลอดที่ 12 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารทดสอบ จึงใช้เป็น positive control หลอดที่ใช้เป็น negative control มี 2 หลอดได้แก่ negative control หลอดที่ 1 เตรียมโดยเตรียมหลอดที่ 2 เพิ่ม 1หลอดโดยไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบลงไป negative control หลอดที่ 2 เตรียมโดยไปเปตอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 0.1 mL ลงในหลอดทดสอบซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ และทำการบ่มเชื้อพร้อมกับหลอดอื่นๆ

6) เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ลงไปในทุกหลอด จำนวนหลอดละ 0.1 mL

7) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C นาน 16 – 18 หรือ 24 h ขึ้นกับ จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

8) การอ่านผล การหา MIC เมื่อบ่มเชื้อจนครบเวลาที่ต้องการแล้ว ให้สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC ของ บันทึกหน่วยเป็น mg/mL

9) การหา Minimum Bactericidal Concentration (MBC) จากการทดสอบหาค่า MIC ในการทดลองข้างต้น สามารถนำมาหาค่า MBC โดยให้นำหลอดที่ไม่ขุ่นทุกหลอดไปเพาะเชื้อบนอาหารที่ไม่มีสารต้านจุลินทรีย์ จุลินทรียีทดสอบที่ไม่ตายจะกลับเจริญได้ใหม่เมื่อปราศจากสารต้านจุลทรีย์ อ่านค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่น้อยที่สุดที่ฆ่าเชื้อจะได้ 99.9 %

ค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งสามารถทำลายจุลินทรีย์ให้ลดลงได้ ≥ 80 ถึง 99.9 % หรือ มีชีวิตรอดมากกว่า 0.1 % หรือ ความเข้มข้นต่ำกว่าสารมาตรฐานยับยั้งแบคทีเรียหลังจากบ่มเป็นเวลา18-24 ชั่วโมง (Peterson & Shanholtzer, 1992; Schwalbe *et al.,* 2007) แต่ค่า MIC จะต้องสามารถยับยั้งการเจริญมากกว่า 90% ที่ทำการเจือจาง 2 เท่า เป็นเวลา 24 h ตาม Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Jorgensen and Ferraro, 2009)

ค่า MBC คือ ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารซึ่งสามารถทำลายจุลินทรีย์ให้ลดลงได้ไม่น้อยกว่า 99.9 % หรือมีชีวิตรอด ≤ 0.1 % (Schwalbe *et al.,* 2007)

3.10 การทดสอบฤทธิ์เบื้องของพฤกษเคมีสาบเสือต่อจุลินทรีย์

3.10.1 การแยกส่วนของสารสกัดด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

ทำการแยกสารเบื้องต้นด้วยวิธีพฤกษเคมี (phytochemical screening) โดยใช้วิธี Thin Layer Chromatography ตามวิธีของ Lavanya & Brahmaprakash (2011)

1) นำสารละลายสารสกัดหยาบเฉพาะชนิดที่ให้บริเวณยับยั้งดีจากข้อ 3.5 ปริมาตร 5 μL (200mg/mL) spot ลงบนแผ่น TLC (silica gel 60 F_{254}) ได้ความเข้มข้น 1,000 μg ต่อ spot

2) วางแผ่น TLC ลงใน chamber ที่เตรียมตัวทำละลายในอัตราส่วนตัวทำละลาย hexane: ethyl acetate เป็น 5:5 ใส่ใน chamber ไว้แล้วจนสารละลายอิ่มตัวไปด้วยสารระเหย (ภาพที่ 3.14) โดยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ระยะทาง 19 cm เพื่อทดสอบกลุ่มสารต่างๆ

3) ทำการวัดระยะทางของสารละลายที่เคลื่อนที่ ทั้งระยะทางที่สารเคลื่อนที่และระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ โดยเปรียบเทียบค่า R_f (R_f value) ของสารที่แยกได้โดยตรวจภายใต้แสง UV ที่มีความยาวคลื่น 254 หรือ 365 nm แล้วนำมาคำนวณค่า R_f ตามสูตรหรือ ตรวจสอบสารอินทรีย์ทั้งหมดโดยการฉีดพ่นด้วย iodine และการสเปรย์ด้วย sulfuric acid แล้วนำไปอบที่ 110 องศาเซลเซียส สำหรับสารที่จะฉีดพ่นด้วยน้ำ

4) นำแผ่น TLC ไปทำการขูด silica gel บริเวณที่มีแถบ(band) ของสารที่อยู่บนแผ่น TLC จำนวน 10 spot จากนั้นชะสารออกจาก silica gel ด้วย 80% ethanol ปริมาตร 500 μl ทำการปั่นแยกตะกอน silica gel แล้วนำสารละลายที่สกัดได้ (ส่วนใส) จากแต่ละแถบมาและชุดควบคุม (80%ethanol) มาระเหยให้ ethanol ออก ในตู้ปลอเชื้อ larmina flow นาน 1 คืน จากนั้นนำสารที่ได้มาทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี agar well diffusion method เพื่อคัดเลือกแถบที่แสดงผลบริเวณยับยั้งดีที่สุด

3.10.2 การทดสอบบริเวณยับยั้ง โดยวิธี agar well diffusion method

1) เทอาหารที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิดลงบนจานเพาะเชื้อ รอจนวุ้นแข็ง

2) เมื่ออาหารแข็งเจาะหลุมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm ด้วย Cork borer No. 1 จำนวน 8 หลุมต่อจานเพาะเชื้อ ประกอบด้วย สารสกัดหยาบ 9 หลุม และหลุมควบคุม (80% ethanol) 1 หลุม

3) ดูดเชื้อสำหรับทดสอบมา 0.1 ml และใช้เตรียมอาหารแข็งให้มีวุ้นเท่ากับ 1.5 % ในทุกสูตรอาหารแล้วใช้ไม้swab ที่ปราศจากเชื้อทำการ swab เชื้อเริ่มต้นบนผิวหน้าอาหารให้ทั่วแบบ three-way ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง

4) จากนั้นเติมสารที่ได้จากแถบ TLC แต่ละแถบ ปริมาณ 20 μl ลงในหลุม แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 h ตรวจวัดผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางฤทธิ์ยับยั้ง (Inhibition zone) ซึ่งการทดลองแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง

3.11 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย

3.11.1 การเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*)

เชื้อมาลาเรียที่ใช้ในการทดลองนี้คือ *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ NF54 ซึ่งเป็น isolate ของไทย สามารถเลี้ยงได้ง่ายในถาดเพาะเลี้ยง (culture flask; T75) ในสภาวะที่เหมาสม ได้แก่ 2-5% hematocrit 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_2นำไปเลี้ยงแบบปลอดเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C

3.11.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรียในถาดเพาะเลี้ยง

ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่กำหนด จนวัดปริมาณเชื้อได้ 1-2% parasitemia ในปริมาณนี้หากตรวจเชื้อโดยวิธีการ smear และย้อมด้วยสี Giemsa แล้วนำไปดูโดยกล้องจุลทัศน์ จะพบว่าเชื้อมาลาเรียที่เติบโตอยู่นั้นมีหลายระยะปะปนกัน เพื่อให้การทดลองได้ผลดีจึงต้องทำการคัดกรองให้เชื้อทั้งหมดอยู่ในระยะเดียวกันเสียก่อน โดยนำเชื้อมาลาเรียมาแช่ในสารละลาย 5% Sorbitol ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที หลังจากนำไปปั่นให้ตกตะกอนแล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วจึงเติมสารละลาย RPMI1640 เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อในระยะ schizont จะแดงและเชื้อระยะนี้จะตายลง ทำให้เหลือแต่เชื้อในระยะ ring และ trophozoite จากนั้นจึงเลี้ยงเชื้อต่อไปในสภาวะปกติอีก 1 รอบ วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียคือ 48 ชั่วโมง ปรับให้เชื้อมีปริมาณ 0.4% parasitemia และ 2% hematocrit เมื่อเชื้อโตจนถึงระยะ schizont จึงแบ่งใส่ในถาดหลุม (96 well-plate) และนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านการไชเข้าเม็ดเลือดแดง (invasion inhibition test)

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}

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

3.11.3 การคำนวณหา %parasitemia

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

3.11.4 การคำนวณทางสถิติ

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

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ปริมาณผลผลิตที่ได้ (% yield) ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และราก ของสาบเสือ (*Chromolaena odorata*)

ปริมาณผลผลิตที่ได้ (% yield) ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และราก ของสาบเสือ จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน พบว่า ปริมาณ % yield ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากของสาบเสือที่ได้จากการสกัด มีค่าเป็นไปตามลำดับคือ ใบ>ราก>ลำต้น ($p<0.05$) ในทุกตัวทำละลาย โดยการสกัดด้วยน้ำให้ปริมาณสารสกัดมากว่าตัวทำละลายอื่นๆ สารสกัดจากส่วนใบของพืชให้ปริมาณสารมากที่สุด โดยมี %yield เท่ากับ 15.54±0.99 % รองลงมา คือ ลำต้น (7.61±0.22%) และราก (6.02±45%) เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น ในทุกส่วนของพืชจะให้ปริมาณสารสกัดไปในแนวทางเดียวกัน คือ น้ำให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากที่สุด รองลงมา คือ เอธานอล เมธานอล และ เฮกเซน สำหรับส่วนของพืชจะ พบว่า ส่วนของใบและลำต้นจะให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าส่วนของรากจากการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณผลผลิตที่ได้ (% yield) ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล น้ำ และเฮกเซน

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 ความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*)

4.2.1 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) โดยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) Assay

ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ (% Radical scavenging) ของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, และ 25 mg/ml เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ (EtOH, MeOH, H_2O, และ Hexane) ติดตามโดยวิธี DPPH Assay (ตารางที่ 4.2) พบว่าสารสกัดหยาบจากทุกส่วน (ใบ, ลำต้น, และราก) ในทุกตัวทำละลาย มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (concentration dependence) แต่มีเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันไป สารสกัดหยาบจาก ใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือด้วยตัวทำละลายต่างๆ ที่ความเข้มข้น 25 mg/ml มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระแสดงเป็นเปอร์เซนต์การกำจัดอนุมูลอิสระจากสูงไปต่ำดังนี้ คือ เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล (EtOH) > เมทานอล (MeOH) >น้ำ (H_2O) > เฮกเซน (Hexane) ตามลำดับ ($p<0.05$) เฉพาะสารสกัดจากใบและราก ที่ความเข้มข้น 25 mg/ml พบว่า เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล (EtOH) และ เมทานอล (MeOH) ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) นอกจากนั้นพบว่าสารสกัดจากส่วนใบ มีเปอร์เซนต์การกำจัดอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดจากส่วนของรากและลำต้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเดียวกันและที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากัน อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ตามลำดับ โดยจากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจาก ใบ, ราก, และ ลำต้น ที่ความเข้มข้น 25 mg/ml มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้สูงสุดแสดงเป็นเปอร์เซนต์การกำจัดอนุมูลอิสระได้เท่ากับ 91.30, 86.03, และ 62.17 % ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อสกัดใบและลำต้นด้วยเอทานอลและรากด้วยเมทานอล (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เป็น % Radical scavenging ของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, และ 25 mg/ml ด้วยตัวทำละลายต่างๆ (EtOH, MeOH, H_2O, และ Hexane) ติดตามโดยวิธี DPPH Assay

Extract	Concentration of extract (mg/ml)	% Radical scavenging Solvent			
		EtOH	MeOH	H_2O	Hexane
Leaf	0.5	$32.58 \pm 1.40^{a,1,A}$	$22.90 \pm 2.14^{a,2,A}$	$30.65 \pm 0.63^{a,1,A}$	$4.78 \pm 0.33^{a,3,A}$
	1	$36.33 \pm 0.47^{b,1,A}$	$36.67 \pm 1.38^{b,1,A}$	$32.44 \pm 0.44^{a,2,A}$	$8.89 \pm 0.47^{b,3,A}$
	5	$59.93 \pm 0.45^{c,1,A}$	$63.82 \pm 1.96^{c,2,A}$	$36.33 \pm 1.06^{b,3,A}$	$19.49 \pm 0.89^{c,4,A}$
	10	$69.37 \pm 0.91^{d,1,A}$	$81.30 \pm 1.43^{d,2,A}$	$51.76 \pm 1.16^{c,3,A}$	$30.77 \pm 2.39^{d,4,A}$
	25	$91.30 \pm 0.82^{e,1,A}$	$90.00 \pm 0.14^{e,1,A}$	$69.95 \pm 1.94^{d,2,A}$	$53.60 \pm 1.52^{e,3,A}$
Stem	0.5	$13.28 \pm 0.12^{a,1,B}$	$12.86 \pm 0.36^{a,1,B}$	$10.69 \pm 0.09^{a,2,B}$	$8.98 \pm 0.31^{a,3,B}$
	1	$15.61 \pm 0.09^{b,1,B}$	$13.97 \pm 0.16^{b,2,B}$	$10.72 \pm 0.08^{a,3,B}$	$10.60 \pm 0.05^{b,3,B}$
	5	$20.93 \pm 0.30^{c,1,B}$	$18.36 \pm 0.24^{c,2,B}$	$15.89 \pm 0.12^{b,3,B}$	$15.35 \pm 0.16^{c,3,B}$
	10	$33.10 \pm 0.16^{d,1,B}$	$35.08 \pm 0.42^{d,2,B}$	$29.97 \pm 0.05^{c,3,B}$	$22.34 \pm 0.30^{d,4,B}$
	25	$62.17 \pm 0.80^{e,1,B}$	$60.16 \pm 0.14^{e,2,B}$	$49.44 \pm 0.14^{d,3,B}$	$27.24 \pm 0.16^{e,4,B}$
Root	0.5	$18.71 \pm 2.39^{a,1,C}$	$17.33 \pm 2.31^{a,1,C}$	$8.42 \pm 0.43^{a,2,C}$	$1.92 \pm 3.88^{a,3,C}$
	1	$26.72 \pm 0.30^{b,1,C}$	$26.47 \pm 1.30^{b,1,C}$	$16.93 \pm 0.61^{b,2,C}$	$6.28 \pm 0.23^{b,3,C}$
	5	$40.60 \pm 1.78^{c,1,C}$	$51.24 \pm 0.61^{c,2,C}$	$31.61 \pm 0.43^{c,3,C}$	$12.68 \pm 1.29^{c,4,C}$
	10	$56.44 \pm 0.22^{d,1,C}$	$68.48 \pm 1.80^{d,2,C}$	$47.36 \pm 0.18^{d,3,C}$	$25.93 \pm 0.41^{d,4,C}$
	25	$84.31 \pm 1.81^{e,1,C}$	$86.03 \pm 0.57^{e,1,C}$	$65.40 \pm 1.55^{e,2,C}$	$39.17 \pm 0.51^{e,3,C}$

หมายเหตุ1)ข้อมูลแสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2)อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กแตกต่างกันในแต่ละสดมภ์แสดงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของตัวทำละลายแต่ละชนิด และตัวเลขแตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ระหว่างตัวทำลายชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ในส่วนสกัดจากพืชประเภทเดียวกันด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธีLSD

3)อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่แตกต่างกันระหว่างสดมภ์ระหว่างส่วนสกัดต่างๆ (จากใบ, ลำต้น, และราก) ของตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ระหว่างส่วนสกัดต่างๆ (จากใบ, ลำต้น, และราก) ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี LSD

4.2.2 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) โดยวิธี Hydroxyl (OH) radical scavenging activity

ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัด Hydroxyl radical แสดงเป็น % Hydroxyl radicals inhibition ของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, และ 100 mg/ml เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ (EtOH, MeOH, H_2O, และ Hexane) ติดตามโดยวิธี Hydroxyl (OH) radical scavenging activity (ตารางที่ 4.5) พบว่า สารสกัดหยาบจากทุกส่วน (ใบ, ลำต้น, และราก) ในทุกตัวทำละลาย มีความสามารถในการกำจัด Hydroxyl radical และความสามารถในการกำจัด Hydroxyl radical จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (concentration dependence) แต่มีเปอร์เซ็นต์ในการกำจัด Hydroxyl radical ที่แตกต่างกันไป สารสกัดหยาบจากทุกส่วน (ใบ, ลำต้น, และราก) ของต้นสาบเสือที่ความเข้มข้น 100 mg/ml พบเปอร์เซนต์การกำจัด Hydroxyl radical จากสูงไปต่ำ เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล (EtOH) > เมทานอล (MeOH) > น้ำ (H_2O) > เฮกเซน (Hexane) ($p<0.05$) ตามลำดับ นอกจากนั้นพบว่าสารสกัดจากส่วนใบ มีเปอร์เซนต์การกำจัด Hydroxyl radical มากกว่าสารสกัดจากส่วนของรากและลำต้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเดียวกันและที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากัน อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ตามลำดับ โดยจากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจาก ใบ, ราก, และลำต้นที่ความเข้มข้น 100 mg/ml มีความสามารถกำจัด Hydroxyl radical ได้สูงสุดแสดงเป็นเปอร์เซนต์การกำจัด Hydroxyl radical ได้เท่ากับ 97.21, 91.90, และ 81.33 % ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อสกัดทั้งสามส่วนด้วยเอทานอล (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์ % Hydroxyl radicals inhibition ของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, และ 100 mg/ml ด้วยตัวทำละลายต่างๆ (EtOH, MeOH, H_2O, และ Hexane) ติดตามโดยวิธี Hydroxyl (OH) radical scavenging activity

Extract	Concentration of extract (mg/ml)	% Hydroxyl radicals inhibition Solvent			
		EtOH	MeOH	H_2O	Hexane
Leaf	1	$45.86 \pm 0.46^{a,1,A}$	$41.70 \pm 2.44^{a,2,A}$	$28.42 \pm 0.68^{a,3,A}$	$7.07 \pm 0.56^{a,4,A}$
	10	$79.15 \pm 0.41^{b,1,A}$	$57.69 \pm 2.31^{b,2,A}$	$51.61 \pm 0.23^{b,3,A}$	$36.63 \pm 0.12^{b,4,A}$
	25	$91.37 \pm 0.58^{c,1,A}$	$77.78 \pm 1.28^{c,2,A}$	$62.63 \pm 0.37^{c,3,A}$	$44.72 \pm 0.09^{c,4,A}$
	50	$95.00 \pm 0.37^{d,1,A}$	$92.52 \pm 0.75^{d,2,A}$	$75.73 \pm 0.35^{d,3,A}$	$52.12 \pm 0.12^{d,4,A}$
	100	$97.21 \pm 0.63^{e,1,A}$	$91.94 \pm 1.15^{d,2,A}$	$87.56 \pm 0.70^{e,3,A}$	$64.90 \pm 0.05^{e,4,A}$
Stem	1	$17.50 \pm 0.49^{a,1,B}$	$13.45 \pm 0.21^{a,2,B}$	$12.66 \pm 0.35^{a,2,B}$	$12.41 \pm 0.99^{a,2,B}$
	10	$34.40 \pm 0.70^{b,1,B}$	$31.84 \pm 0.74^{b,2,B}$	$27.02 \pm 0.31^{b,3,B}$	$21.22 \pm 0.24^{b,4,B}$
	25	$50.09 \pm 0.82^{c,1,B}$	$40.13 \pm 1.65^{c,2,B}$	$45.15 \pm 0.31^{c,3,B}$	$33.84 \pm 0.61^{c,4,B}$
	50	$72.30 \pm 0.95^{d,1,B}$	$71.00 \pm 0.21^{d,2,B}$	$57.47 \pm 0.77^{d,3,B}$	$45.85 \pm 0.20^{d,4,B}$
	100	$81.33 \pm 0.53^{e,1,B}$	$78.49 \pm 0.37^{e,2,B}$	$75.25 \pm 0.13^{e,3,B}$	$54.74 \pm 0.37^{e,4,B}$
Root	1	$35.68 \pm 0.44^{a,1,C}$	$34.24 \pm 0.51^{a,2,C}$	$28.30 \pm 1.07^{a,3,A}$	$13.74 \pm 0.56^{a,4,B}$
	10	$53.00 \pm 0.46^{b,1,C}$	$49.15 \pm 0.52^{b,2,C}$	$45.29 \pm 0.79^{b,3,C}$	$28.10 \pm 0.04^{b,4,C}$
	25	$69.93 \pm 0.30^{c,1,C}$	$61.67 \pm 0.40^{c,2,C}$	$61.71 \pm 0.92^{c,2,A}$	$36.75 \pm 0.16^{c,3,C}$
	50	$87.63 \pm 1.26^{d,1,C}$	$78.96 \pm 0.56^{d,2,C}$	$69.16 \pm 0.58^{d,3,C}$	$48.00 \pm 0.18^{d,4,C}$
	100	$91.90 \pm 0.47^{e,1,C}$	$87.14 \pm 0.57^{e,2,C}$	$78.77 \pm 0.49^{e,3,C}$	$57.83 \pm 0.24^{e,4,C}$

หมายเหตุ 1) ข้อมูลแสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2) อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กแตกต่างกันในแต่ละสดมภ์แสดงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของตัวทำละลายแต่ละชนิด และตัวเลขแตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ระหว่างตัวทำลายชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ในส่วนสกัดจากพืชประเภทเดียวกันด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี LSD

3) อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่แตกต่างกันระหว่างสดมภ์ระหว่างส่วนสกัดต่างๆ (ใบ, ลำต้น, และราก) ของตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ระหว่างส่วนสกัดต่างๆ (ใบ, ลำต้น, และราก) ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธีLSD

4.2.3 ความสามารถในการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) โดยวิธี ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) Assay

วัดความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) ในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระที่อุณหภูมิ 37^{O} C ของสาร peroxyl radical ซึ่งถูกกระตุ้นโดย สาร 2,2′-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) โดยใช้ fluorescein wavelength ที่ 485 nm excitation และ ที่ 540 nm emission โดยทำการเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ Trolox^{tm} แสดงผลการทดลองด้วยค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) จากการทดลองพบว่า สารสกัดจาก ใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล, เมทานอล, น้ำ, และเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล peroxyl แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 4.4) เมื่อพิจารณาค่า TEAC ของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ตัว (เอทานอล, เมทานอล, น้ำ, และเฮกเซน) พบว่า ค่า TEAC ของสารสกัดที่ได้จากการวิเคราะห์เป็นไปตามลำดับคือ ใบ>ราก> ลำต้น ($p<0.05$) ในทุกตัวทำละลาย และจากค่า TEAC พบว่าใบของสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล (110.65 μM/mg of extract) มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งอนุมูล peroxyl ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.4 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ peroxyl ด้วยค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) ด้วยตัวทำละลายต่างๆ (EtOH, MeOH, H_2O, และ Hexane) เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox^{tm} ติดตามโดยวิธี ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) Assay

Extract	TEAC (μM/mg of extract)			
	Solvent			
	EtOH	MeOH	H_2O	Hexane
Leaf	110.65 ± 3.29^{a,1}	88.96 ± 1.37^{b,1}	72.58 ± 0.88^{c,1}	13.63 ± 1.28^{d,1}
Stem	16.69 ± 1.14^{a,2}	13.28 ± 1.97^{a,2}	10.35 ± 0.82^{b,2}	4.98 ± 0.56^{c,2}
Root	32.41 ± 0.26^{a,3}	29.09 ± 1.03^{b,3}	21.08 ± 0.78^{c,3}	10.69 ± 4.56^{d,1}

หมายเหตุ 1) ข้อมูลแสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2) อักษรภาษาอังกฤษแต่ละแถวและตัวเลขแต่ละสดมภ์ที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี LSD

4.2.4 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) โดยวิธี FRAP (Ferric reducing/antioxidant potential) Assay

ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้ ศึกษาโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างในที่นี้คือสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) ในการรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} โดยดูการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 593 nm เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ Trolox^{tm} แสดงผลการทดลองด้วยค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) จากการทดลองชี้ให้เห็นว่า สารสกัดจาก ใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล, เมทานอล, น้ำ, และเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 4.5) เมื่อพิจารณาค่า TEAC พบว่า ค่า TEAC ของสารสกัดที่ได้จากการวิเคราะห์เป็นไปตามลำดับคือ ใบ>ราก>ลำต้น ($p<0.05$) ในทุกตัวทำละลาย นอกจากนั้นพบว่าสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากที่สกัดด้วยเอทานอลและเมทานอลมีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} โดยค่า TEAC ของสารสกัดหยาบของแต่ละส่วนที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยค่า TEAC สูงสุดจากวิธีนี้ของสารสกัดหยาบจากใบ, ราก, และลำต้นของต้นสาบเสือ มีค่าเท่ากับ 7.24, 2.99, และ 1.65 mM/mg of extract ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) ด้วยตัวทำละลายต่างๆ (EtOH, MeOH, H_2O, และ Hexane) เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox^{tm} ติดตามโดยวิธี FRAP (Ferric reducing/antioxidant potential) Assay

Extract	TEAC (mM/mg of extract)			
	Solvent			
	EtOH	MeOH	H_2O	Hexane
Leaf	$7.24 \pm 0.01^{a,1}$	$7.13 \pm 0.09^{a,1}$	$6.05 \pm 0.16^{b,1}$	$0.11 \pm 0.01^{c,1}$
Stem	$1.63 \pm 0.01^{a,2}$	$1.65 \pm 0.05^{a,2}$	$0.66 \pm 0.04^{b,2}$	$0.35 \pm 0.04^{c,2}$
Root	$2.99 \pm 0.05^{a,3}$	$2.99 \pm 0.01^{a,3}$	$0.84 \pm 0.04^{b,3}$	$0.35 \pm 0.02^{c,2}$

หมายเหตุ 1) ข้อมูลแสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2) อักษรภาษาอังกฤษแต่ละแถวและตัวเลขแต่ละสดมภ์ที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี LSD

4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (ตารางที่ 4.11 และ ภาพที่ 4.23) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้น จากการทำ

ปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-ciocalteu เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจาก ใบ, ลำต้น, และรากที่สกัดด้วยเอทานอล, เมทานอล, น้ำ, และเฮกเซนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสารสกัดจากใบ, ลำต้น, และรากที่สกัดด้วยเอทานอลจะมีค่าสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุด (12.13, 8.30, และ 11.20 mg GAE/ mg extract ตามลำดับ) รองลงมาคือค่าสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากใบ, ลำต้น, และรากที่สกัดด้วยเมทานอล, น้ำ, และ เฮกเซน ตามลำดับ ($p<0.05$) สำหรับสารสกัดจากใบด้วยเอทนานอลและเมทานอลพบว่าให้ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมที่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

เมื่อพิจารณาดูส่วนต่างๆของพืชที่ใช้สกัด (ใบ, ลำต้น, และราก) ด้วยตัวทำละลายเดียวกัน พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากใบ, ลำต้น, และรากมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสารสกัดจากใบจะให้ค่าสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุดในทุกตัวทำละลาย ($p<0.05$) (12.13, 11.98, 9.29, และ 0.14 mg GAE/ mg of extract เมื่อสกัดด้วย EtOH, MeOH, H_2O, และ Hexane ตามลำดับ) รองลงมาคือค่าสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากรากในทุกตัวทำละลาย (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (EtOH), เมทานอล (MeOH), น้ำ (H_2O), และเฮกเซน (Hexane)

Part of extract	Total phenolic content of extract (mg GAE/ mg of extract) Solvent			
	EtOH	MeOH	H_2O	Hexane
Leaf	$12.13 \pm 0.07^{a,1}$	$11.98 \pm 0.17^{a,1}$	$9.29 \pm 0.18^{b,1}$	$0.14 \pm 0.01^{c,1}$
Stem	$8.30 \pm 0.32^{a,2}$	$5.26 \pm 0.54^{b,2}$	$1.03 \pm 0.02^{c,2}$	$0.02 \pm 0.00^{d,2}$
Root	$11.20 \pm 0.16^{a,3}$	$10.46 \pm 0.26^{b,3}$	$8.62 \pm 0.16^{c,3}$	$0.12 \pm 0.01^{d,3}$

หมายเหตุ 1) ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2) อักษรภาษาอังกฤษแต่ละแถวและตัวเลขแต่ละสดมภ์ที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี LSD

3) GAE = Gallic acid equivalent

4.4 การเลี้ยงเซลล์เมลาโนมา C32

การเลี้ยงเซลล์เมลาโนมา C32 ในจานหลุม 96 หลุม ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $2.5x10^3$, $5x10^3$, $1x10^4$, $2x10^4$, $4x10^4$ และ $8x10^4$ เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ $2.5x10^3$, $5x10^3$, และ $1x10^4$ เซลล์ต่อหลุม มีการเจริญของเซลล์น้อย จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ $4x10^4$ เซลล์ต่อหลุม พบว่าเซลล์เจริญเติบโต 80-100 จำนวนเซลล์ เริ่มต้น $8x10^4$เซลล์ต่อหลุม มีการเจริญของเซลล์เกินพื้นที่และเซลล์บางส่วนตาย จากการเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเติบโตในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการย้อมเซลล์ด้วยสีคริสทอลไวเลต (crystal violet) วัดสีด้วยเครื่องไมโครเพลทรีเดอร์ (microplate reader) และวิเคราะห์หาการเจริญของเซลล์ที่แปรผันตามค่า OD (optical density) พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้น $4x10^4$ เซลล์ต่อหลุม มีเซลล์เพิ่มจำนวนโดยวัดค่า OD ที่ 24 ชั่วโมง 1.542 ± 0.056 ที่ 48 ชั่วโมง 1.874 ± 0.022 และ ที่ 72 ชั่วโมง 1.620 ± 0.037 เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้นแปรผันตามค่า OD ซึ่งจำนวนเซลล์ที่ $4x10^4$ เซลล์ต่อหลุม เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมเนื่องจากเซลล์เจริญได้พอเหมาะกับพื้นที่ในหลุม และไม่พบเซลล์ตาย จึงถูกเลือกนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อไป

4.5 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากจากใบ ลำต้น และรากสาบเสือ ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา IC_{50} ของสารสกัดหยาบจาก ใบ ลำต้น และรากสาบเสือ ที่สกัดด้วย น้ำ เอทานอล เมทานอล และ เฮกเซน ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า

ค่า IC_{50} < 500 µg/ml ได้แก่ สารสกัดหยาบจากใบ สกัดด้วยเอทานอล ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 428.77 ± 6.19 µg/ml และ 381.40 ± 8.70 µg/ml ตามลำดับ ใบสกัดด้วยเฮกเซน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 447.45 ± 22.82 µg/m และ 436.65 ± 3.46 µg/ml ตามลำดับ

ค่า IC_{50} ระหว่าง 500 - 1,000 µg/ml ได้แก่ ใบสกัดด้วยน้ำ ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 789.04 ± 18.86, 545.64 ± 9.24 และ 527.43 ± 7.30 ตามลำดับ ใบสกัดด้วยเมทานอล ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 827.03 ± 14.16, 708.80 ± 17.62 และ 594.60 ± 6.84 ตามลำดับ ใบสกัดด้วยเอทานอล และ เฮกเซน ที่ 24 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 655.59 ± 9.38 และ 862.48 ± 47.82 ตามลำดับ ลำต้นสกัดด้วยเอทานอล ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 950.97 ± 8.01, 948.50 ± 36.20 และ 858.99 ± 49.21 ตามลำดับ

ค่า IC_{50} < 2,000 µg/ml ได้แก่ ลำต้นสกัดด้วยน้ำ ที่ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1884.91 ± 20.01

ค่า IC_{50} > 2,000 µg/ml ได้แก่ ลำต้นสกัดด้วยน้ำ ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ลำต้นสกัดด้วยเมทานอล และเฮกเซน ที่ 24, 48 และ72 ชั่วโมง รากสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน ที่ 24, 48 และ72 ชั่วโมง

รายละเอียดตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา IC_{50} ของสารสกัดหยาบจาก ใบ ลำต้น และราก สาบเสือ สกัดด้วย น้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ส่วนของสาบเสือ	ตัวทำละลาย	IC50 (µg/ml, ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)		
		24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
ใบ	น้ำ	789.04 ± 18.86	545.64 ± 9.24	527.43 ± 7.30
	เอทานอล	655.59 ± 9.38	428.77 ± 6.19	381.40 ± 8.70
	เมทานอล	827.03 ± 14.16	708.80 ± 17.62	594.60 ± 6.84
	เฮกเซน	862.48 ± 47.82	447.45 ± 22.82	436.65 ± 3.46
ลำต้น	น้ำ	> 2,000	> 2,000	1884.91±20.01
	เอทานอล	950.97 ± 8.01	948.50 ± 36.20	858.99 ± 49.21
	เมทานอล	> 2,000	> 2,000	> 2,000
	เฮกเซน	> 2,000	> 2,000	> 2,000
ราก	น้ำ	> 2,000	> 2,000	> 2,000
	เอทานอล	> 2,000	> 2,000	> 2,000
	เมทานอล	> 2,000	> 2,000	> 2,000
	เฮกเซน	> 2,000	> 2,000	> 2,000

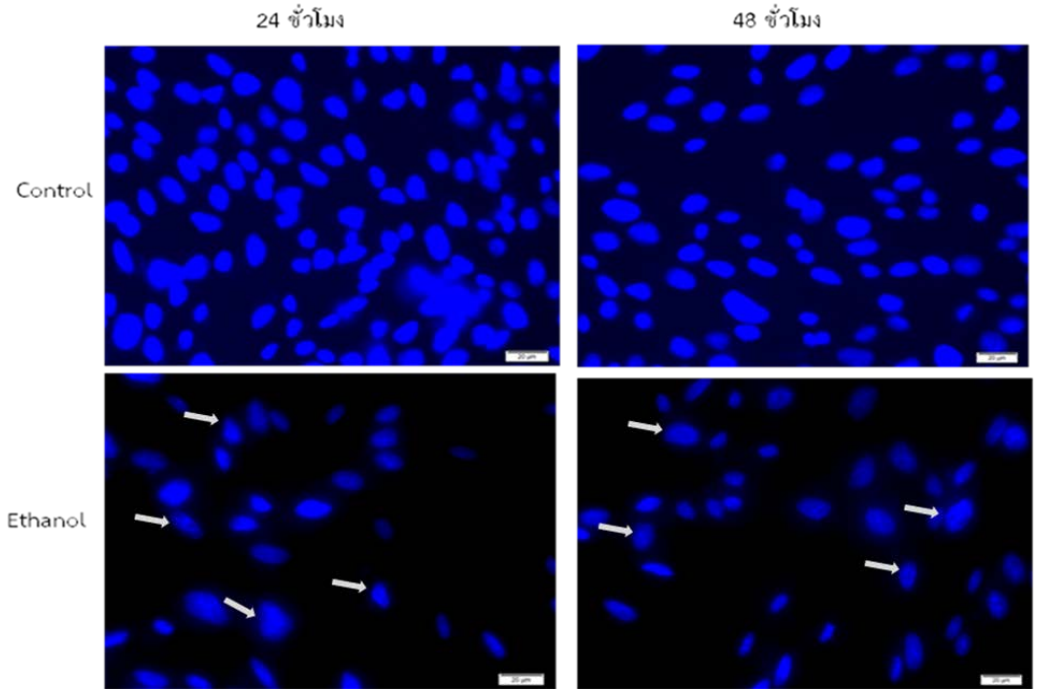
4.6 การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์เมลาโนมา C32 ตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis)

ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสาบเสือต่อเซลล์เมลาโนมา ที่ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ด้วยการย้อมเซลล์ด้วย DAPI สังเกตลักษณะจำเพาะของการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียสที่จะมีการจับกันแน่นของโครมาติน (chromatin condensation)

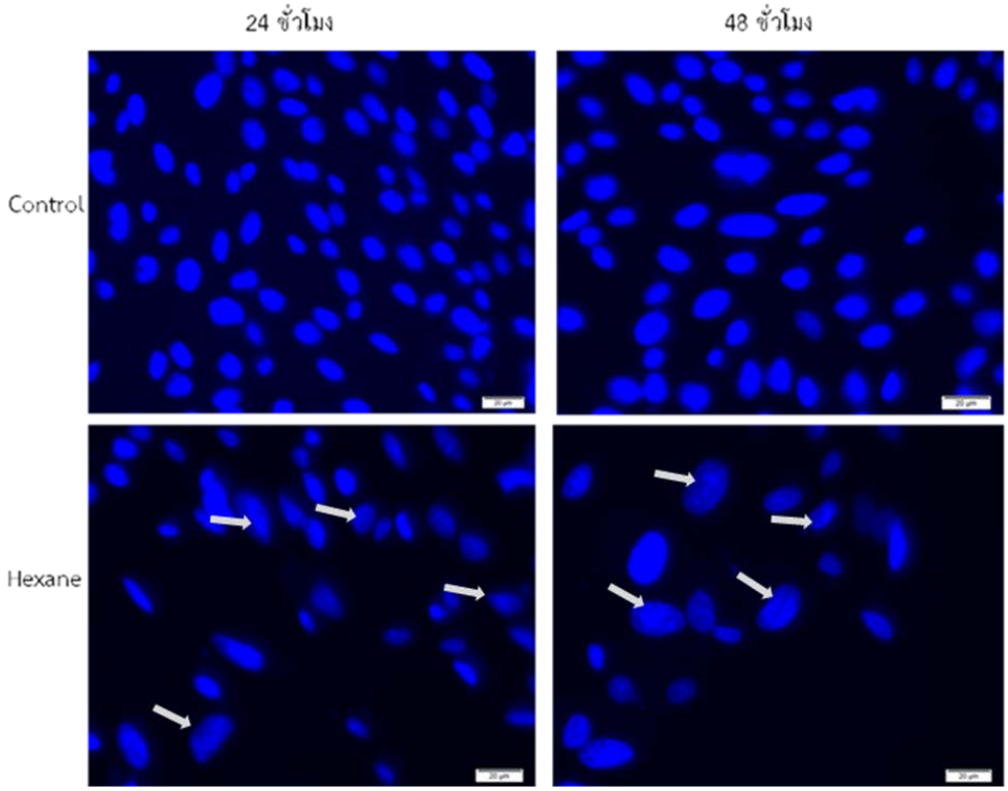
ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา ที่มีค่า IC_{50} < 500 µg/ml ได้แก่ สารสกัดหยาบจากใบที่สกัดด้วย เอทานอล ที่ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 381.40 ± 8.70 µg/ml และ ที่ 48 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 428.77 ± 6.19 µg/ml สกัดด้วยเฮกเซน ที่ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 436.65 ± 3.46 µg/ml และ ที่ 48 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 447.45 ± 22.82 µg/ml

การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) โดยการย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วยสี DAPI, 4,6-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid เพื่อดูลักษณะนิวเคลียสของเซลล์ ที่มีชีวิตและเซลล์ตาย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงที่ความยาวคลื่น 430 nm

(Tengchaisri et al., 1998) ใช้สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือ ที่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา ที่มีค่า IC_{50} <500 µg/ml ได้แก่ สารสกัดหยาบจากใบที่สกัดด้วยเอทานอล และเฮกเซน โดยใช้ความเข้มข้น 500 µg/ml บ่มนาน 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เมลาโนมา มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเซลล์มีลักษณะจำเพาะของการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น คือมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส มีการจับกันแน่นของโครมาติน โดยเซลล์ที่บ่มนาน 48 มีการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตและมีการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างของนิวเคลียสมากกว่า ที่บ่มนาน 24 ชั่วโมง รายละเอียดตามภาพที่ 4.1 - 4.2



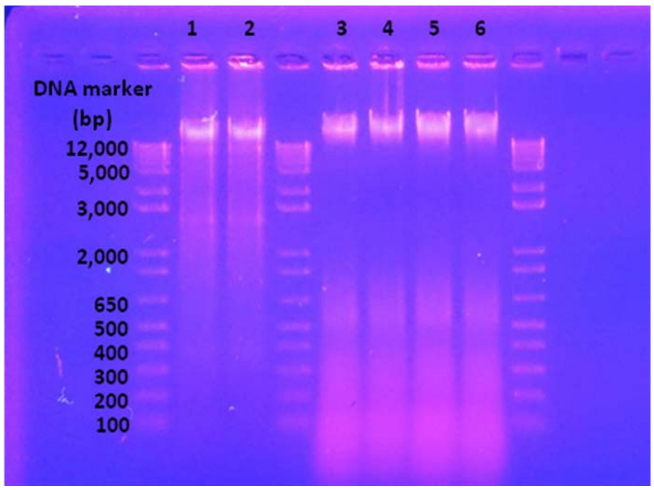
ภาพที่ 4.1 เซลล์เมลาโนมาที่ได้รับสารสกัดจากใบสาบเสือสกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 500 µg/ml ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ย้อมด้วย DAPI สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์หัวกลับ กำลังขยาย 40 เท่า พบการตายแบบอะพอพโทซิส (ลูกศร)



ภาพที่ 4.2 เซลล์เมลาโนมาที่ได้รับสารสกัดจากใบสาบเสือสกัดด้วยเฮกเซน ความเข้มข้น 500 µg/ml ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง พบการตายแบบอะพอพโทซิส (ลูกศร)

4.7 การตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) ของเซลล์เมลาโนมา C32 โดยวิธีแยกสารชีวโมเลกุลด้วยไฟฟ้า (Gel electrophoresis technique)

เซลล์เมลาโนมาที่ทดสอบความเป็นพิษด้วยสารสกัดหยาบจากใบที่สกัดด้วยเอทานอล และเฮกเซน ความเข้มข้น 500 µg/ml ที่ 24 นำมาผ่านการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า จากการทดสอบพบว่า ดีเอ็นเอมีการเคลื่อนที่ไปบนเจล โดยดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วจึงสามารถเห็นอยู่ไกลจากจุดเริ่มต้นมากกว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่ที่เคลื่อนที่ช้ากว่า แถบดีเอ็นเอย้อมด้วยสาร ethidium bromide นำมาตรวจสอบโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์เมลาโนมากลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือ (เลนที่ 1 และ 2) มีแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่มากกว่า 12,000 คู่เบส (base pairs; bp) และพบว่า แถบดีเอ็นเอจากเซลล์เมลาโนมาที่มีสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือสกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 500 µg/ml ที่ 24 ชั่วโมง (เลนที่ 3 และ 4) มีการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอขนาดเล็ก ตั้งแต่ประมาณ 500 bp ไปจนถึงเล็กมากคือ 100 bp เซลล์เมลาโนมาที่มีสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือสกัดด้วยเฮกเซน ความเข้มข้น 500 µg/ml ที่ 24 ชั่วโมง (เลนที่ 5 และ 6) พบแถบดีเอ็นเอขนาดเล็ก ซึ่งแสดงการแตกหักของดีเอ็นเอ เป็นตัวบ่งชี้การตายของเซลล์แบบ apoptosis



ภาพที่ 4.3 เซลล์เมลาโนมาที่ได้รับสารสกัดจากใบสาบเสือสกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซน 500 µg/ml ที่ 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุม (เลนที่1และ2) มีแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ เอทานอล (เลนที่3และ4)และเฮกเซน (เลนที่5และ6) พบแถบดีเอ็นเอขนาดเล็ก พบมีการแตกหักของดีเอ็นเอ

4.8 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

4.8.1 การทดสอบหาบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone) โดยวิธี agar well diffusion

สารสกัดหยาบจากส่วนใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ethanol, methanol และ hexane จะมีฤทธิ์ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *Stap. aureus* TISTR 1466, *B. subtilis* TISTR 008, *P. acnes* DMST 14916 และ *E. coli* TISTR780 ได้ดีที่สุด ยกเว้น สารสกัดใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* TISTR780 (1.0±0.00) ได้เพียงชนิดเดียว สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol, methanol และ hexane จะให้ผลการยับยั้งเหมือนกัน คือ สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Stap. aureus* TISTR 1466 ได้ดีที่สุด (9.3±0.60, 9.3±0.60 และ12.7±0.58 mm) รองลงมา คือ *B. subtilis* TISTR 008 (8.3±0.60, 5.3±0.60 และ5.0±0.60mm) และ *P.acnes* DMST 14916 (5.3±0.60, 6.3±0.60 และ 10.7±0.58 mm) ให้ค่าบริเวณยับยั้งเท่ากับ รวมทั้งยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้เพียงชนิดเดียว คือ *E. coli* TISTR780 (1.0±0.00, 5.3±0.60 และ 1.0±0.00 mm)

สำหรับสารสกัดหยาบจากส่วนลำต้นและราก พบว่า ส่วนของลำต้นที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane จะให้ค่าการยับยั้ง *Stap. aureus* TISTR 1466 (12.7±0.58 mm) ดีที่สุด และรองลงมา คือ *B. subtilis* TISTR 008 (5.0±0.60 mm)

ในส่วนรากสาบเสือ พบว่า สารที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane จะมีให้ค่าการยับยั้ง *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *B. subtilis* TISTR 008 เท่ากันคือ 7.67±0.58 mm แต่ถ้าสกัดด้วยน้ำจะมีฤทธิ์ยับยั้งได้เฉพาะ *E. coli* TISTR780 (5.0±0.60 mm)เท่านั้น สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่

สกัดด้วย hexane จะให้ค่าการยับยั้ง *Stap. aureus* TISTR 1466 (12.7±0.58) ดีที่สุดกว่าสารสกัดอื่นๆและแบคทีเรียชนิดอื่นๆด้วย นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากทั้ง 3 ส่วนของสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane จะให้ค่าการยับยั้งดีที่สุด สารสกัดหยาบสาบเสือจากทั้ง 3 ส่วนและ 4 ชนิดของสารที่ใช้สกัด พบว่า ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Enterococcus aerogenes* ATCC 13048, *Pro. vulgaricus* ATCC 13315 และ *Sal.* Typhimurium ATCC13311 ตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 บริเวณยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบสาบเสือเข้มข้น 100 mg/ml ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด แบบสกัดเย็น

Tested Bacteria	Aqueous extracts			Solvent extracts								
	Water			Ethanol			Methanol			Hexane		
	L	S	R	L	S	R	L	S	R	L	S	R
Gram-positive bacteria												
B. subtilis TISTR 008	NI	NI	NI	8.3 ±0.6	NI	NI	5.3 ±0.6	NI	NI	9.7 ±0.58	5.0 ±0.6	7.67 ±0.58
Stap. aureus TISTR 1466	NI	NI	NI	9.3 ±0.6	NI	NI	9.3 ±0.6	NI	NI	12.7 ±0.58	9.0 ±0.6	7.67 ±0.58
Pro. acnes DMST 14916	NI	NI	NI	5.3 ±0.6	NI	NI	6.3 ±0.6	NI	NI	10.7 ±0.58	NI	NI
Gram-negative bacteria												
E. coli	1.0 ±0.0	NI	5.7 ±0.6	1.0 ±0.0	NI	NI	5.3 ±0.6	NI	NI	1.0 ±0.0	NI	NI
Enterococcus aerogenes ATCC 13048	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
P. vulgaricus ATCC 13315	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Salmonella Typhimurium ATCC13311	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

หมายเหตุ: บริเวณยับยั้งจะไม่รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ cork borer เท่ากับ 7 mm

L = Leaf, S= Stem, R = Root, NI = not inhibition

4.8.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี Broth dilution technique และหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ (minimal bactericidal concentration, MBC)

ผลของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol และ hexane จะให้ค่า MIC ดีที่สุดต่อ *B. subtilis* TISTR เท่ากัน คือ 1.56 mg/mL และค่าให้ MBC เท่ากับ 6.25 และ 3.12 mg/mL ตามลำดับ รองลงมา คือ สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol และ methanol ให้ค่า MIC เท่ากัน คือ 3.12 mg/mL และให้ค่า MBC เท่ากัน คือ 6.25 mg/mL ต่อ *P. acnes* DMST 14916 และ *B. subtilis* TISTR 008

ตามลำดับ ซึ่งค่า MIC ต่อแบคทีเรีย *B. subtilis* ของใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol และ methanol และสารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol มีฤทธิ์ยับยั้งน้อยต่อ *E. coli* TISTR780 (MIC = 12.5 mg/mL, MBC = 25 mg/mL) และ *Stap. aureus* TISTR 1466 (MIC = 12.5 mg/mL, MBC = 25 mg/mL)

ส่วนลำต้นสาบเสือที่สกัดด้วย hexane ให้ฤทธิ์ยับยั้งน้อยต่อ *Stap. aureus* TISTR 1466 โดยให้ MIC เท่ากับ 12.5 mg/mL และ MBC เท่ากับ คือ 25 mg/mL

ส่วนรากสาบเสือที่สกัดด้วย hexane ให้ค่า MIC เท่ากับ 3.12 mg/mL และให้ค่า MBC เท่ากับ 6.25 mg/mL ต่อ *B. subtilis* TISTR 008 และให้ฤทธิ์ยับยั้งน้อยต่อ *Stap. aureus* TISTR 1466 (MIC = 12.5 mg/mL, MBC = 25 mg/mL)

ตามตารางที่ 4.9

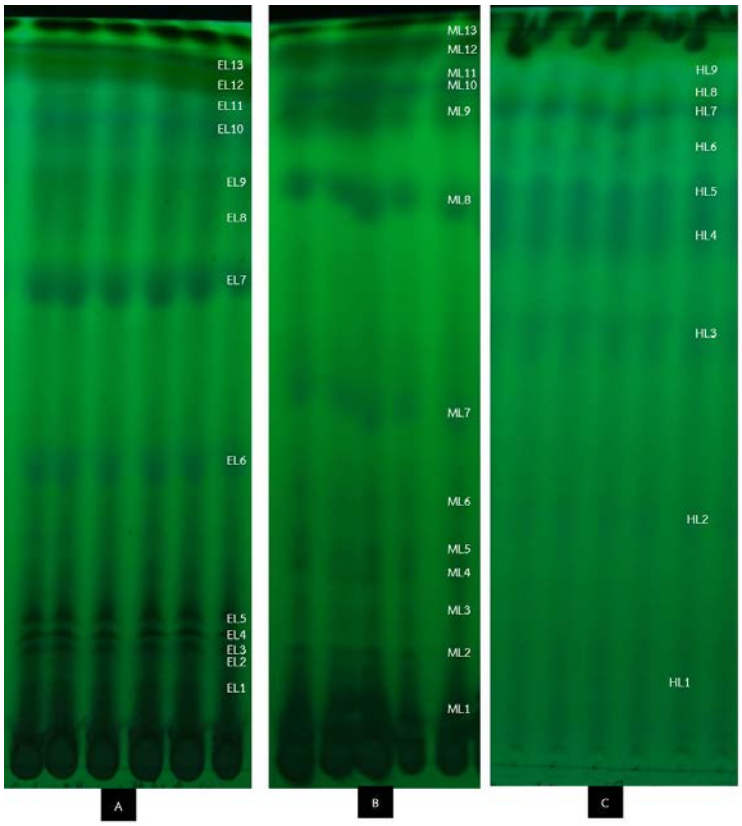
ตารางที่ 4.9 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

Part of plants	Solvent extracts	Tested microorganisms	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
Leaf	Ethanol	*E. coli* TISTR780	12.5	25
		B. subtilis TISTR 008	1.56	6.25
		Stap. aureus TISTR 1466	12.5	25
		P. acnes DMST 14916	3.12	6.5
	Methanol	*E. coli* TISTR780	25	50
		B. subtilis TISTR 008	3.12	6.25
		Stap. aureus TISTR 1466	12.5	50
		P. acnes DMST 14916	6.25	25
	Hexane	*E. coli* TISTR780	25	50
		B. subtilis TISTR 008	1.56	3.12
		Stap. aureus TISTR 1466	25	50
		P. acnes DMST 14916	25	50
Stem	Methanol	*E. coli* TISTR780	25	50
		B. subtilis TISTR 008	25	50
	Hexane	*B. subtilis* TISTR 008	12.5	25
		Stap. aureus TISTR 1466	12.5	25
Root	Water	*E. coli* TISTR780	25	50
	Methanol	*E. coli* TISTR780	25	50
	Hexane	*E. coli* TISTR780	12.5	25
		B. subtilis TISTR 008	3.12	6.25
		Stap. aureus TISTR 1466	12.5	50

4.8.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเบื้องต้นของพฤกษเคมีสาบเสือ

1) การแยกส่วนของสารสกัดด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

คัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยให้ค่า MBC ต่ำที่สุดหรือดีที่สุดของเชื้อแต่ละชนิด ได้แก่ สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 คือ ethanol, methanol และ hexane มาทำการแยกของพฤกษเคมีสาบเสือโดยวิธี TLC แบบ mono-dimetional chromatography และใช้ mobile phase คือ hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 เมื่อทำการตรวจสอบสารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol, methanol และ hexne ที่สังเกตุภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 mn พบว่า มีแถบเกิดขึ้น 13, 13 และ 10 แถบ ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.12 สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol และ methanol จะให้แถบใกล้เคียงกัน แต่จะแตกต่างจากรูปแบบของสารสกัดที่สกัดด้วย hexane แถบที่เหมือนกันระหว่างสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol `และ methanol คือ EL1 (R_f =0.105) และ ML1 (R_f = 0.074); EL6 (R_f =0.389) และ ML7 (R_f =0.458); EL7 (R_f =0.621) และ ML8 (R_f =0.763); EL10-11(R_f =0.853-0.874) และ ML10-11(R_f =0.0.879-0.905) ตามภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 รูปแบบ TLC ของสารสกัดหยาบใบสาบเสือ *Chromolaena odorata* ในตัวทำ ละลายต่างชนิดกัน (A) สกัดด้วย ethanol (B) สกัดด้วย methanol และ (C) สกัดด้วย hexane

4.8.4 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารที่ได้จากแถบ TLC ด้วย agar well diffusion

นำสารที่แยกได้จาก TLC ของสารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol methanol และ hexane มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 คือ *E. coli* TISTR780, *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *P. acnes* DMST 14916 ด้วยวิธี agar well diffusion

1) สารที่แยกจากใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol

เมื่อนำสารที่แยกได้จากใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol ด้วยวิธี TLC จำนวน 13 ชนิด คือ EL1-EL13 มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *E. coli* TISTR780, *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *P. acnes* DMST 14916 ด้วยวิธี agar well diffusion โดยเรียงจากค่า R_f จากน้อยไปหามาก พบว่า สารที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.200 สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุดและยับยั้งได้ทั้ง 3 ชนิด คือ *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *P. acnes* DMST 14916 มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 5.5, 6.0 และ 5.0 mm ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ ยกเว้น *E. coli* TISTR780 ที่มีค่า R_f 0.132 จะให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ 5.5 mm แถบสารที่มีความสามารถในการยับยั้งทั้ง *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *E. coli* คือ แถบสารที่ค่า R_f เท่ากับ 0.132, 0.911 และ 0.947

2) สารที่แยกจากใบสาบเสือที่สกัดด้วย methanol

เมื่อนำสารที่แยกได้จากใบสาบเสือที่สกัดด้วย methanol ด้วยวิธี TLC จำนวน 13 ชนิด คือ ML1-ML13 มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 คือ *E. coli* TISTR780, *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *P. acnes* DMST 14916 ด้วยวิธี agar well diffusion โดยเรียงจากค่า R_f จากน้อยไปหามาก พบว่า สารที่มีค่า R_f สูงเท่ากับ 0.905-0.963 จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ 2 ชนิด คือ *B. subtilis* TISTR 008 และ *Stap. aureus* TISTR 1466 แต่สารที่ค่า R_f น้อย (0.237) จะยับยั้งได้ทั้ง 3 ชนิด *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *P. acnes* DMST 14916 โดยให้ค่าการยับยั้งเท่ากัน คือ 2.0 mm

3) สารที่แยกจากใบสาบเสือที่สกัดด้วย hexane

เมื่อนำสารที่แยกได้จากใบสาบเสือที่สกัดด้วย hexane ด้วยวิธี TLC จำนวน 10 ชนิด คือ HL1-HL10 มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย 4 คือ *E. coli* TISTR780, *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *P. acnes* DMST 14916 ด้วยวิธี agar well diffusion โดยเรียงจากค่า R_f จากน้อยไปหามาก พบว่า สารที่แยกได้สามารถยับยั้งเฉพาะ *B. subtilis* TISTR 008 เท่านั้น ของแถบที่ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.111 (4.0mm), 0.853 (2.5 mm) และ 0.868 (2.0mm)

4.9 ฤทธิ์ยับยั้งรา่ก่อโรค

4.9.1 การทดสอบหาบริเวณยับยั้งยีสต์โดยวิธี agar well diffusion

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *C. albicans* TISTR 5779 ด้วยสารสกัดหยาบสาบเสือแบบเย็นจาก 3 ส่วนของพืช คือ ส่วนใบ ลำต้น และราก ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด น้ำ, ethanol, methanol และ hexane พบว่า สารสกัดหยาบทุกชนิดไม่สามารถยับยั้ง *C. albican* TISTR 5779

4.9.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการยับยั้งรา *Fusarium solani* TISTR 3436 และ *Aspergillus niger* TISTR 3445

ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบสาบเสือต่อการยับยั้งรา จาก 3 ส่วนของพืช คือ ส่วนใบ ลำต้น และราก ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ, ethanol, methanol และ hexane รวมสารสกัดหยาบทั้งหมด 12 ชนิด จากผลการทดลองการยับยั้งราจากสารสกัดหยาบ 12 ชนิด พบว่า มีเพียงสารสกัดหยาบเพียง 4 ชนิด คือ สารสกัดหยาบรากสาบเสือที่สกัดน้ำ, สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol, methanol และ hexane ที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งราทั้งสองชนิดได้ สารสกัดหยาบที่ให้ค่าสัดส่วนการลดลงของการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุด คือ สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane โดยพบว่า ทั้ง 3 ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ คือ 1.25 mg/mL จะให้ค่าสัดส่วนการลดลงของการเจริญของเส้นใย *F. solani* TISTR 3436 ได้เท่ากับ 61.11% ภายในวันที่ 2 ของการยับยั้งเท่านั้น รองลงมา คือ สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย methanol จะให้ค่าสัดส่วนการลดลงของการเจริญของเส้นใย *F. solani* TISTR 3436 ได้ 75 % ในวันที่ 4 ของการยับยั้งที่ความเข้มข้น 5 mg/mL ในขณะที่ความเข้มข้น 2.5 และ 1.25 mg/mL จะให้ค่าสัดส่วนการลดลงของการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 50.0 และ 42.5 % ในวันที่ 4 ของการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราเหมือนกัน ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane นั้น จะมีความสามารถในการยับยั้งเส้นใยราได้อย่างรวดเร็วที่สุด

จากผลการทดสอบการยับยั้งราของสารสกัดหยาบสาบเสือแบบเย็นจาก 3 ส่วนของพืช คือ ส่วนใบ ลำต้น และราก ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ, ethanol, methanol และ hexane รวมสารสกัดหยาบทั้งหมด 12 ชนิด พบว่า สัดส่วนการลดลงของเส้นใยรา *A. niger* TISTR 3445 สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/mL จะให้ค่าสัดส่วนการลดลงของการเจริญของเส้นใยดีที่สุด เท่ากับ 70 % ในวันที่ 2 ของการยับยั้ง

4.10 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย

4.10.1 การยับยั้งการไซเข้าเม็ดเลือดแดง (invasion inhibition test)

เมื่อนำเชื้อมาลาเรียระยะ schizont มาทดสอบในถาดหลุม 96-well plate โดยใช้สารสกัดซึ่งผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วน 10% ที่ปริมาณสารสกัดความเข้มข้นต่างๆเจือจางลง 10 เท่าตามลำดับ 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 ซึ่งใกล้เคียงมากกับกลุ่มควบคุมที่

ไม่มีสารสกัดใดๆ ในขณะที่สารสกัดใบโดยใช้ เอธานอล เมธานอล และเฮกเซน มีค่าเฉลี่ย %parasitemia ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นที่ระดับความเข้มข้น 1,000, 100, และ 10 μg/mL ในการทดสอบกับสารสกัดราก พบมี %parasitemia ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ยังมี %parasitemia สูงกว่ากลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบ (ตารางที่ 4.3) ในการทดสอบกับสารสกัดจากลำต้นพบว่าให้ผลคล้ายคลึงกันแต่ยังพบว่า %parasitemia ยังสูงกว่ากลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดจากราก

เมื่อนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาคำนวณหาค่า % invasion inhibition (ตารางที่ 4.10) ทำให้สามารถเปรียบเทียบได้อย่างชัดเจน คือ สารสกัดจากใบโดยมีเอธานอลและเมธานอลเป็นตัวทำละลายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการไชเข้าเม็ดเลือดแดงได้ดีที่สุด โดยมี % invasion inhibition สูงสุดคือ 100% ที่ความเข้มข้นของสารสกัด คือ 1,000 μg/mL โดย % invasion inhibition ลดลงเมื่อสารสกัดเจือจางลงตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดใบโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายไม่มีผลยับยั้งเชื้อมาลาเรีย ในส่วนสารสกัดจากรากและลำต้นให้ผลด้อยกว่าสารสกัดจากใบอย่างมาก โดยไม่พบค่า 100 % invasion inhibition เลยแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นสูงสุดของการทดลองแล้วก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบในตัวทำละลายแต่ละชนิดพบว่า สารสกัดจากรากและลำต้นจะให้ผลการยับยั้งการไชเข้าเม็ดเลือดแดงได้ดีเมื่อใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย โดยที่ความเข้มข้นสูงสุด 1,000 μg/mL คิดเป็น 81.76 และ 79.23 % invasion inhibition ตามลำดับ

ตารางที่ 4.10 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

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

การคำนวณหาค่าครึ่งความเข้มข้นมรณะ (lethal concentration; LC_{50}) ทำโดยการแทนค่าในสมการที่ได้จากกราฟแสดง % invasion inhibition เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ 50% invasion inhibition ดังแสดงในตารางที่ 4.11 โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบที่ใช้

ตัวทำละลายคือ 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 4.11 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%)

4.10.2 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

- รุนแรงระดับ 3 ไม่พบเชื้อมาลาเรียที่มีชีวิต โดยพบลักษณะเป็นจุดสีน้ำเงินเข้มขนาดเล็กอยู่ในเม็ดเลือดแดง คาดว่ามาจากเชื้อในระยะ ring ที่ตายลง
- รุนแรงระดับ 2 ไม่พบเชื้อมาลาเรียที่มีชีวิต พบลักษณะการตายของเชื้อในระยะ ring ปะปนอยู่กับเชื้อมาลาเรียที่ตายในระยะ trophozoite
- รุนแรงระดับ 1 พบเชื้อมาลาเรียปรกติในระยะ schizont ปะปนอยู่กับเชื้อมาลาเรียที่ตายในระยะ schizont
- ไม่มีความรุนแรง 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

ตารางที่ 4.12 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

จากการศึกษาความเป็นพิษและการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง โดยสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ(*Chromolaena odorata)* สามารถสรุปผลการวิจัยได้ ดังต่อไปนี้

5.1.1 ปริมาณผลผลิตที่ได้ (% yield) ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และราก ของสาบเสือ(*Chromolaena odorata*)

การสกัดสารสกัดหยาบจากพืชสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) ได้แก่ ใบ ลำต้น และราก ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เอทานอล (EtOH), เมทานอล (MeOH), น้ำ (H_2O), และเฮกเซน (Hexane) พบว่าปริมาณผลผลิตที่ได้ (% yield) ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากของสาบเสือมีความแตกต่างกัน ($p<0.05$) โดยปริมาณ % yield ของสารสกัดหยาบจาก ใบ>ราก>ลำต้น ($p<0.05$) ตามลำดับ โดยพบว่าปริมาณ % yield สูงสุดของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือได้จากการสกัดด้วยน้ำ เท่ากับ 12.16 % ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ กับ ปริมาณ % yield ของใบสาบเสือที่สกัดด้วยเมทานอล ซึ่งเท่ากับ 10.45 % ($p>0.05$)

5.1.2 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) โดยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) Assay

พบว่า สารสกัดหยาบจากทุกส่วน (ใบ, ลำต้น, และราก) ในทุกตัวทำละลาย มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (concentration dependence) แต่มีเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันไป สารสกัดหยาบจาก ใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือด้วยตัวทำละลายต่างๆ ที่ความเข้มข้น 25 mg/ml มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระแสดงเป็นเปอร์เซนต์การกำจัดอนุมูลอิสระจากสูงไปต่ำดังนี้ คือ เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล (EtOH) > เมทานอล (MeOH) >น้ำ (H_2O) > เฮกเซน (Hexane) ตามลำดับ ($p<0.05$) เฉพาะสารสกัดจากใบและราก ที่ความเข้มข้น 25 mg/ml พบว่า เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล (EtOH) และ เมทานอล (MeOH) ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) นอกจากนั้นพบว่าสารสกัดจากส่วนใบมีเปอร์เซนต์การกำจัดอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดจากส่วนของรากและลำต้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเดียวกันและที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากัน อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ตามลำดับ โดยค่า IC_{50} (mg/ml) ที่ดีที่สุดที่ได้จากวิธี DPPH Assay นี้ คือ ค่า IC_{50} (mg/ml) ที่ได้จากสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นสาบเสือ ที่สกัดด้วยเมทานอลซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.60 แต่จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ค่า IC_{50} (mg/ml) ของสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นสาบเสือด้วยเมทานอล (4.60) มีค่า IC_{50} (mg/ml) ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสารสกัดจากส่วนใบของต้นสาบเสือด้วยเอ

ทานอล (4.83) ($p>0.05$) ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ Trolox ^{tm} แสดงผลการทดลองด้วยค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) พบว่า สารสกัดหยาบจาก ใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล, เมทานอล, น้ำ, และเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ค่า TEAC ของสารสกัดที่ได้จากการวิเคราะห์เป็นไปตามลำดับคือ ใบ>ราก>ลำต้น ($p<0.05$) ในทุกตัวทำละลาย โดยค่า TEAC สูงสุดของสารสกัดหยาบจากใบสกัดด้วยเมทานอลนั้นพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่า TEAC ของสารสกัดหยาบจากใบสกัดด้วยเอทานอล

5.1.3 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) โดยวิธี Hydroxyl (OH) radical scavenging activity

พบว่า สารสกัดหยาบจากทุกส่วน (ใบ, ลำต้น, และราก) ในทุกตัวทำละลาย มีความสามารถในการกำจัด Hydroxyl radical และความสามารถในการกำจัด Hydroxyl radical จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (concentration dependence) แต่มีเปอร์เซ็นต์ในการกำจัด Hydroxyl radical ที่แตกต่างกันไป สารสกัดหยาบจากทุกส่วน (ใบ, ลำต้น, และราก) ของต้นสาบเสือที่ความเข้มข้น 100 mg/ml พบเปอร์เซนต์การกำจัด Hydroxyl radical จากสูงไปต่ำ เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล (EtOH) > เมทานอล (MeOH) > น้ำ (H_2O) > เฮกเซน (Hexane) ($p<0.05$) ตามลำดับ นอกจากนั้นพบว่าสารสกัดจากส่วนใบ มีเปอร์เซนต์การกำจัด Hydroxyl radical มากกว่าสารสกัดจากส่วนของรากและลำต้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเดียวกันและที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากัน อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ตามลำดับ โดยค่า IC_{50} (mg/ml) ที่ดีที่สุดที่ได้จากวิธี Hydroxyl (OH) radical scavenging activity นี้คือ ค่า IC_{50} (mg/ml) ที่ได้จากสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอลซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.09 ประสิทธิภาพในการกำจัด Hydroxyl radical เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ Trolox ^{tm} แสดงผลการทดลองด้วยค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ค่า TEAC ของสารสกัดที่ได้จากการวิเคราะห์เป็นไปตามลำดับคือ ใบ>ราก>ลำต้น ($p<0.05$) ในทุกตัวทำละลาย โดยค่า TEAC สูงสุดที่ได้มาจากของสารสกัดหยาบจากใบสกัดด้วยเอทานอล

5.1.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) โดยวิธี ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) Assay

พบว่า สารสกัดจาก ใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล, เมทานอล, น้ำ, และเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล peroxyl แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ค่า TEAC ของสารสกัดที่ได้จากการวิเคราะห์เป็นไปตามลำดับคือ ใบ>ราก>ลำต้น ($p<0.05$) ในทุกตัวทำละลาย และจากค่า TEAC พบว่าใบของสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล (110.65 μM/mg of extract) มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งอนุมูล peroxyl ($p<0.05$)

5.1.5 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และราก ของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) โดยวิธี FRAP (Ferric reducing/antioxidant potential)

พบว่า สารสกัดจาก ใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล, เมทานอล, น้ำ, และเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ค่า TEAC ของสารสกัดที่ได้จากการวิเคราะห์เป็นไปตามลำดับคือ ใบ>ราก>ลำต้น ($p<0.05$) ในทุกตัวทำละลาย นอกจากนั้นพบว่าสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากที่สกัดด้วยเอทานอลและเมทานอลมีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} โดยค่า TEAC ของสารสกัดหยาบของแต่ละส่วนที่ได้จากตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

5.1.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้น สาบเสือ (*Chromolaena odorata*)

พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจาก ใบ, ลำต้น, และรากที่สกัดด้วยเอทานอล, เมทานอล, น้ำ, และเฮกเซนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสารสกัดจากใบ, ลำต้น, และรากที่สกัดด้วยเอทานอลจะมีค่าสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุด รองลงมาคือค่าสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากใบ, ลำต้น, และรากที่สกัดด้วยเมทานอล, น้ำ, และ เฮกเซน ตามลำดับ ($p<0.05$) สำหรับสารสกัดจากใบด้วยเอทานอลและเมทานอลพบว่าให้ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมที่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาเฉพาะส่วนพบว่าสารสกัดจากใบจะให้ค่าสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุดในทุกตัวทำละลาย ($p<0.05$) รองลงมาคือสารสกัดจากรากและลำต้นตามลำดับ

5.1.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมาของสารสกัดจากใบ ลำต้น และราก ของสาบเสือ

ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา IC_{50} ของสารสกัดหยาบจาก ใบ ลำต้น และรากสาบเสือที่สกัดด้วย น้ำ เอทานอล เมทานอล และ เฮกเซน ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ค่า IC_{50} < 500 µg/ml ได้แก่ สารสกัดหยาบจากใบ สกัดด้วยเอทานอล ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 428.77 ± 6.19 µg/ml และ 381.40 ± 8.70 µg/ml ตามลำดับ ใบสกัดด้วยเฮกเซน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 447.45 ± 22.82 µg/m และ 436.65 ± 3.46 µg/ml ตามลำดับ

ค่า IC_{50} ระหว่าง 500 - 1,000 µg/ml ได้แก่ ใบสกัดด้วยน้ำ ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 789.04 ± 18.86, 545.64 ± 9.24 และ 527.43 ± 7.30 ตามลำดับ ใบสกัดด้วยเมทานอล ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 827.03 ± 14.16, 708.80 ± 17.62 และ 594.60 ± 6.84 ตามลำดับ ใบสกัดด้วยเอทานอล และ เฮกเซน ที่ 24 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 655.59 ± 9.38 และ 862.48 ± 47.82 ตามลำดับ ลำต้นสกัดด้วยเอทานอล ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 950.97 ± 8.01, 948.50 ± 36.20 และ 858.99 ± 49.21 ตามลำดับ

ค่า IC_{50} < 2,000 µg/ml ได้แก่ ลำต้นสกัดด้วยน้ำ ที่ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1884.91±20.01 และ ที่มีค่า IC_{50} > 2,000 µg/ml ได้แก่ ลำต้นสกัดด้วยน้ำ ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

ลำต้นสกัดด้วยเมทานอล และเฮกเซน ที่ 24, 48 และ72 ชั่วโมง รากสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน ที่ 24, 48 และ72 ชั่วโมง

5.1.8 การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์เซลล์เมลาโนมาตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis)

ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสาบเสือต่อเซลล์เมลาโนมา ที่ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ด้วยการย้อมเซลล์ด้วย DAPI ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงที่ความยาวคลื่น 430 nm สังเกตลักษณะจำเพาะของการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส ที่จะมีการจับกันแน่นของโครมาติน (chromatin condensation)

การศึกษาใช้สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา IC_{50} <500 µg/ml ได้แก่ สารสกัดหยาบจากใบที่สกัดด้วยเอทานอล ที่ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 381.40 ± 8.70 µg/ml และ ที่ 48 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 428.77 ± 6.19 µg/ml และเฮกเซน ที่ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 436.65 ± 3.46 µg/ml และ ที่ 48 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 447.45 ± 22.82 µg/ml โดยใช้สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล และเฮกเซนความเข้มข้น 500 µg/ml บ่มนาน 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เมลาโนมา มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเซลล์มีลักษณะจำเพาะของการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น คือมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส มีการจับกันแน่นของโครมาติน โดยเซลล์ที่บ่มนาน 48 มีการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตและมีการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างของนิวเคลียสมากกว่า ที่บ่มนาน 24 ชั่วโมง

5.1.9 การตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) ของเซลล์เมลาโนมา โดยวิธีแยกสารชีวโมเลกุลด้วยไฟฟ้า (Gel electrophoresis technique)

เซลล์เมลาโนมาที่ทดสอบความเป็นพิษด้วยสารสกัดหยาบจากใบที่สกัดด้วยเอทานอล และเฮกเซน ความเข้มข้น 500 µg/ml ที่ 24 ชั่วโมง นำมาแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยกระแสไฟฟ้าเพื่อตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) พบว่า ดีเอ็นเอ ที่สกัดจากเซลล์เมลาโนมากลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดสาบเสือ มีแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่มากกว่า 12,000 คู่เบส (base pairs; bp) แถบดีเอ็นเอจากเซลล์เมลาโนมา ที่มีสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือสกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 500 µg/ml ที่ 24 ชั่วโมง พบมีการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอขนาดเล็ก ตั้งแต่ขนาดประมาณ 500 bp ไปจนถึงเล็กมากคือ 100 bp และ เซลล์เมลาโนมาที่มีสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือสกัดด้วยเฮกเซน ความเข้มข้น 500 µg/ml ที่ 24 ชั่วโมง พบแถบดีเอ็นเอขนาดเล็กเช่นเดียวกัน ซึ่งการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) เป็นตัวบ่งชี้การตายของเซลล์แบบ apoptosis

5.1.10 ฤทธิ์สารสกัดหยาบต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

1) การทดสอบหาบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone) โดยวิธี agar well diffusion

ผลของสารสกัดหยาบจากส่วนใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ethanol, methanol และ hexane ต่อการยับยั้งแบคทีเรียจะให้ผลเหมือนกัน คือ มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย

แกรมบวกได้ 3 ชนิดได้ดีที่สุด คือ *Stap. aureus* TISTR 1466, *B. subtilis* TISTR 008, *P. acnes* DMST 14916 และ ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้เพียงชนิดเดียว คือ *E. coli* TISTR780 ในขณะที่สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำจะมีฤทธิ์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* TISTR780 (1.0±0.00) ได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ซึ่งผลจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดหยาบสาบเสือจะมีฤทธิ์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

ผลของสารสกัดหยาบจากส่วนลำต้นสาบเสือ พบว่า ลำต้นที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane จะให้ค่าการยับยั้ง *Stap. aureus* TISTR 1466 (19.7±0.58 mm) ดีที่สุด และรองลงมา คือ *B. subtilis* TISTR 008 (12.0±0.60 mm) อย่างไรก็ตามผลของสารสกัดหยาบสาบเสือจากส่วนลำต้นที่สกัดด้วยน้ำ, ethanol และ methanol พบว่า ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466, และ *P. acnes* DMST 14916 และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Enterococcus aerogenes* ATCC 13048, *Pro. vulgaricus* ATCC 13315 และ *Sal.* Typhimurium ATCC13311)

ผลการทดลองในส่วนของรากสาบเสือ พบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *B. subtilis* TISTR 008 ให้ค่าการยับยั้งเท่ากัน คือ 7.67±0.58 mm (50 mg/mL) และเฉพาะส่วนของรากที่สกัดด้วยน้ำเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* (12.0±0.60 mm) อย่างไรก็ตามจากการทดลองยังพบว่าสารสกัดหยาบสาบเสือจากส่วนรากที่สกัดด้วยน้ำ, ethanol และ methanol ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบบวก *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466, และ *Pro. acnes* DMST 14916 และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Enterococcus aerogenes* ATCC 13048, *Pro. vulgaricus* ATCC 13315 และ *Sal.* Typhimurium ATCC13311) แต่จากรายงานของ Venkata *et al*. (2012) พบว่า ส่วนของรากสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำและสารอินทรีย์ ได้แก่ ethyl alcohol, methanol, chroroform, และ methanol: chloroform: water (MCW) ในอัตราส่วน 12:5:3 จะมีฤทธิ์ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย 9 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* (MTCC763), *Stap. aureus* (MTCC1771), *Strep. thermophilus* (MTCC1938) และ *C. glutamicum* (MTCC2807) และ แบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* (MTCC1572), *K. pneumonia* (MTCC7028), *Pro. vulgaris* (MTCC1771) *Sal. typhi* (MTCC733) และ *Vibrio parahaemolyticus* (MTCC451) อย่างมีนัยสำคัญ

2) การหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบต่อการเจริญของแบคทีเรีย ด้วยวิธี macro broth dilution technique

สารสกัดหยาบสาบเสือที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมาทดสอบหาค่า MIC และ MBC พบว่า สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol และ hexane จะให้ค่า MIC ดีที่สุดต่อ *B. subtilis* TISTR เท่ากัน คือ 1.56 mg/mL และค่าให้ MBC เท่ากับ 6.25 และ 3.12 mg/mL ตามลำดับ รองลงมา คือ สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol และ methanol ให้ค่า MIC เท่ากัน คือ 3.12 mg/mL และให้ค่า MBC เท่ากัน คือ 6.25 mg/mL ต่อ *P. acnes* DMST 14916 และ *B. subtilis* TISTR 008 ตามลำดับ ซึ่งค่า MIC ต่อแบคทีเรีย *B. subtilis* ของใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol และ methanol จะให้ค่าดีกว่าที่มีรายงานมารายงานของ Naidoo *et al.* (2011) ที่พบว่า สารสกัดใบสาบเสือจากไนจีเรียที่สกัดด้วย methanol ให้ค่า MIC ต่อ *B. subtilis* และ *B. cereus* เท่ากับ 8.0 และ 7.5

mg/mL ตามลำดับ และจากรายงานของ Eze *et al.* (2013) ที่พบว่าสารสกัดใบสาบเสือจากประเทศไนจีเรียที่สกัดด้วย ethanol จะให้ค่า MIC ต่อ *B. cereus* เท่ากับ 3.125 mg/mL นอกจากนี้ผลของเชื้อสิว *P. acnes* ในการทดลองนี้จะได้ค่า MIC และ MBC ไม่ดีเท่ากับที่เคยมีรายงานจากสารกัดหยาบทั้งต้นสาบเสือที่เก็บในประเทศไทย ซึ่งให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.625 mg/mL และ 1.25 mg/mL ตามลำดับ เนื่องจากที่เคยมีรายงานเป็นการสกัดทั้งต้นของสาบเสือ ทำให้ได้องค์ประกอบของสารที่มีฤทธิ์ดีกว่า (Chomnawange *et al.,* 2005) ผลของสารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งน้อยต่อ *E. coli* (MIC = 12.5 mg/mL, MBC = 25 mg/mL) และ *Stap. aureus* TISTR 1466 (MIC = 12.5 mg/mL, MBC = 25 mg/mL) ซึ่งให้ค่าการยับยั้งสูงกว่าที่มีรายงานจากสารสกัดใบสาบเสือของประเทศไนจีเรียที่สกัดด้วย ethanol ให้ค่า MIC ต่อ *E. coli* เท่ากับ 0.25 mg/mL (Stanley *et al.*, 2014) และ 6.25 mg/mL (Eze *et al.,* 2013)

ส่วนลำต้นสาบเสือที่สกัดด้วย hexane พบว่าจะให้ฤทธิ์ยับยั้งน้อยต่อ *Stap. aureus* TISTR 1466 โดยให้ MIC เท่ากับ 12.5 mg/mL และ MBC เท่ากับ คือ 25 mg/mL ซึ่งให้ค่า MIC ดีกว่า จากรายงานของ Naidoo *et al.* (2011) ที่รายงานว่า ลำต้นสาบเสือที่สกัดด้วย methanol จะไม่ให้ค่า MIC ต่อ *Stap. aureus*

ส่วนรากสาบเสือที่สกัดด้วย hexane ให้ค่า MIC เท่ากับ 3.12 mg/mL และให้ค่า MBC เท่ากับ 6.25 mg/mL ต่อ *B. subtilis* TISTR 008 และให้ฤทธิ์ยับยั้งน้อยต่อ *Stap. aureus* TISTR 1466 (MIC = 12.5 mg/mL, MBC = 25 mg/mL) ซึ่งจากราบงานการวิจัยที่ผ่านมา พบว่ารากสาบเสือมีก็ฤทธิ์ยับยั้งน้อยต่อ *C. glutamicum, E. coli* และ *V. parahaemolyticus* (Venkata *et al*., 2012)

5.1.11 ฤทธิ์สารสกัดที่แยกด้วย TLC ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol, methanol และ hexane ซึ่งแถบสารที่มีปริมาณมากจะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้มากด้วย ดังนั้นจึงสอดคล้องนี้จะพบเฉพาะสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethanol และ methanol เท่านั้น แต่สารสกัดหยาบที่สกัดด้วย hexane จะไม่มีความสอดคล้องกันในเรื่องของปริมาณสาร เนื่องจากแถบที่มีปริมาณสารน้อย คือ แถบที่ HL1, HL8 และ HL9 จะมีฤทธ์ต้านแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 008 ได้ดีโดยให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ 4.0, 2.5 และ 2.0 mm ตามลำดับ รูปแบบแถบของสารที่สัดด้วยตัวทำละลาย ethanol และ methanol จะมีรูปแบบเหมือนกัน ยกเว้น แถบสารที่สกัดด้วย hexane สำหรับแถบของสารที่ค่า R_f เท่ากับ 0.200 จากสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethanol และ ค่า R_f เท่ากับ 0.237 จากสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารชนิดเดียวกัน เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ 3 ชนิดเหมือนกัน คือ *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *P. acnes* DMST 14916 แต่ค่าการยับยั้งของสารสกัดจาก ethanol จะให้ค่าการยับยั้งมากกว่า methanol

จากการแยกสารสกัดใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol, methanol และ hexane พบว่า สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียจะมีค่า R_f ในช่วง 0.089-0.237 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารประกอบ terpenes และ phenolic acids และ ค่า R_f ในช่วง 0.853-0.963

สรุปผลฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งจากสารสกัดหยาบและสารที่แยกด้วย TLC จาก *Chromolaena odorata* พบว่า สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิดได้ดีที่สุด คือ *Stap. aureus* TISTR 1466, *B. subtilis* TISTR 008, *P. acnes* DMST 14916 และ ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* TISTR780 ได้เพียงชนิดเดียว คือสารสักดหยาบจากส่วนใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol และรองลงม คือใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย methanol และ hexane ตามลำดับ ซึ่งผลจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดหยาบสาบเสือจะมีฤทธิ์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

5.1.12 ฤทธิ์สารสกัดหยาบต่อการยับยั้งราก่อโรค

การทดสอบหาบริเวณยับยั้งรา ด้วยวิธี agar well diffusion จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *Candida albicans* TISTR 5779 ด้วยสารสกัดหยาบสาบเสือแบบเย็นจาก 3 ส่วนของพืช คือ ส่วนใบ ลำต้น และราก ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด น้ำ, ethanol, methanol และ hexane ที่ความเข้มข้น 100 mg/ml พบว่า สารสกัดหยาบทุกชนิดไม่สามารถยับยั้ง *C. albican* TISTR 5779 ได้

ผลการทดสอบการยับยั้งรา 2 ชนิด คือ *Fusarium solani* TISTR 3436 และ*Aspergillus niger* TISTR 3445 พบว่า สารสกัดหยาบที่ให้ค่าสัดส่วนการลดลงของการเจริญของเส้นใยดีที่สุดและรวดเร็วที่สุดต่อเชื้อราทั้ง 2 ชนิด คือ สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ที่ทั้ง 3 ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ คือ 5.0, 2.5 และ 1.25 mg/mL จะให้ค่าสัดส่วนการลดลงของการเจริญของเส้นใย *Fusarium solani* TISTR 3436 ใกล้เคียงกัน คือ 66.67, 66.67, และ 61.11 mg/ml ภายในวันที่ 2 ของการยับยั้งเท่านั้น และที่ความเข้มข้น 5 และ 2.5 mg/mL จะให้ค่าสัดส่วนการลดลงของการเจริญของเส้นใยรา *Aspergillus niger* TISTR 3445 ดีที่สุด เท่ากับ 70 % ภายในวันที่ 2

5.1.13 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย

สารสกัดจากใบให้ผลดีที่สุด 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

5.2.1 ปริมาณผลผลิตที่ได้ (% yield) ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และราก ของสาบเสือ(*Chromolaena odorata*)

สาบเสือที่นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด พบว่า ส่วนใบของสาบเสือจะให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าส่วนอื่นๆของพืชในทั้ง 4 ชนิดของตัวทำละลาย และถ้าเปรียบเทียบตัวทำละลาย

พบว่า น้ำและ methanol จะสามารถสกัดสารออกมาได้มากที่สุดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่รองลงมา คือ ethanol และ ได้ปริมาณน้อยที่สุด คือ สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Stanley *et al*. (2014) ที่สกัดใบสาบเสือด้วยน้ำและตัวทำละลาย alcohol ชนิดเดียว คือ ethanol พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของปริมาณสารสกัดที่ได้ เท่ากับ3.5 และ 3.8 % ตามลำดับ ปริมาณ % yield มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความแรงของขั้วของตัวทำละลาย สอดคล้องกับงานวิจัยนี้น้ำมีความแรงของขั้วสูงสุดจึงให้ปริมาณ % yield สูงสุด เช่นเดียวกันกับ Vidović และคณะ (2014) แต่อย่างไรก็ตาม Mondal *et al.* (2012) พบว่าสารสกัดใบสาบเสือที่สกัดด้วยสารกลุ่ม alcohol ได้แก่ 95% ethanol (29.08±0.65%) และ methanol (24.74±0.79%) จะให้ปริมาณสารสกัดมากกว่าน้ำ (20.25±0.54%)

5.2.2 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบ, ลำต้น, และรากของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*)

ผลการวิจัยจากการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระทั้งสี่วิธีแสดงให้เห็นว่า ใบของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata)* ที่สกัดด้วยเอทานอล มีสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อเทียบกับส่วนอื่นๆ (ลำต้นและราก) ของต้นและเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ (Boudjou et al., 2013) ใบของต้นสาบเสือมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระนี้อาจจะเนื่องมาจากใบมีสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุดเมื่อเทียบกับส่วนอื่นๆพบว่าส่วนใบของต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) มีสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุดเมื่อเทียบกับส่วนของลำต้นและราก ทั้งนี้เมื่อสกัดด้วยเอทานอลและเมทานอล โดยให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเท่ากับ 12.13 และ 11.98 mg GAE/ mg of extract ตามลำดับ โดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลรวมจะเป็นตัวบ่งชี้ได้ถึงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืช (Lie et al., 2008) Yen และ Chen (1995) ก็รายงานว่าสารประกอบฟีนอลรวมในใบเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของพืช

สารประกอบฟีโนลิกหรือสารประกอบฟีนอลรวมเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สารนี้สามารถละลายน้ำได้ ที่พบในพืชส่วนใหญ่อยู่ในโมเลกุลของน้ำตาล ในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) และพบได้บริเวณของช่องว่างภายในเซลล์ (cell vacuole) สารประกอบฟีโนลิกหรือสารประกอบฟีนอลที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoids) นอกจากนั้นยังมีสารอื่นๆ เช่น simple phenol, phenyl propanoid, phenolic quinine และ polyphenolic ซึ่งได้แก่พวก lignin, tannin เป็นต้น และยังพบว่ามีสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น (Sowndhararajan และ Kang, 2013)

5.2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมาของสารสกัดจากใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ

ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา IC_{50} ของสารสกัดหยาบจาก ใบ ลำต้น และรากสาบเสือที่สกัดด้วย น้ำ เอทานอล เมทานอล และ เฮกเซน ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

จากการศึกษาที่ผ่านมามีการกำหนดเกณฑ์ความจำเพาะในการเกิดพิษของสารสกัด (Bezivin *et al*., 2003) และ เกณฑ์ระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากพืช (Shirazi *et al*., 2004) โดยได้แบ่งกลุ่มสารสกัดจากพืชที่มีค่าระดับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆดังนี้ กลุ่ม 1 potentially very toxic คือ สารสกัดที่มีความเป็นพิษรุนแรงมาก มีค่า IC_{50} < 10 µg/ml กลุ่ม 2 potentially toxic คือ สารสกัดที่มีความเป็นพิษรุนแรง มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 10 - 100 µg/ml กลุ่ม 3 potentially harmful คือ สารสกัดที่มีอันตรายหรือมีความเป็นพิษปานกลาง มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 100 - 500 µg/ml กลุ่ม 4 potentially non toxic คือ สารสกัดที่ไม่มีพิษ มีค่า IC_{50} > 500 µg/ml

จากผลการวิจัยจะพบว่าสารสกัดหยาบจาก ใบ ลำต้น และราก ที่สกัดด้วย น้ำ เอทานอล เมทานอล และ เฮกเซน ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่มีระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ อยู่ใน กลุ่ม 1 potentially very toxic คือ สารสกัดที่มีความเป็นพิษรุนแรงมาก มีค่า IC_{50} < 10 µg/ml และ กลุ่ม 2 potentially toxic คือ สารสกัดที่มีความเป็นพิษรุนแรง มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 10 - 100 µg/ml

โดยพบว่า ระดับความเป็นพิษ อยู่ในกลุ่ม 3 potentially harmful คือ สารสกัดที่มีอันตรายหรือมีความเป็นพิษปานกลาง มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 100 - 500 µg/ml เป็นสารกสัดจากใบ เท่านั้น โดยเรียงตามลำดับค่าความเป็นพิษจากมากไปน้อย ดังนี้ ใบสกัดด้วยเอทานอล ที่ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 381.40 ± 8.70 µg/ml ใบสกัดด้วยเอทานอล ที่ 48 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 428.77 ± 6.19 µg/ml ใบสกัดด้วยเฮกเซน ที่ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 436.65 ± 3.46 µg/ml ใบสกัดด้วยเฮกเซน ที่ 48 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 447.45 ± 22.82 µg/m

สารสกัดจาก ใบ ลำต้น และราก ที่สกัดด้วย น้ำ เอทานอล เมทานอล และ เฮกเซน ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ที่อยู่ในกลุ่ม 4 potentially non toxic คือ สารสกัดที่ไม่มีพิษ มีค่า IC_{50} > 500 µg/ml ได้แก่ ที่มีค่า 500 < IC_{50} < 1,000 µg/ml ได้แก่ ใบสกัดด้วยน้ำ และใบสกัดด้วย เมนอล ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ใบสกัดด้วยเอทานอล และใบสกัดด้วยเฮกเซน ที่ 24 ชั่วโมง ลำต้นสกัดด้วยเอทานอล ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ที่มีค่า 1,000 < IC_{50} < 2,000 µg/ml ได้แก่ ลำต้นสกัดด้วยน้ำ ที่ 72 ชั่วโมง ที่มีค่า IC_{50} > 2,000 µg/ml ได้แก่ ลำต้นสกัดด้วยน้ำ ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ลำต้นสกัดด้วยเมทานอล และเฮกเซน ที่ 24, 48 และ72 ชั่วโมง รากสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน ที่ 24, 48 และ72 ชั่วโมง

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

ผลการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับ Prabhu and Ravi (2012) ที่ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยเทคนิค MTT assay ของสาร triterpene ที่แยกออกมาจากสารสกัดใบสาบเสือ พบว่า มีความเป็นพิษ

ต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 206.7 µg/ml และ Hung et al. (2011) ศึกษาสารที่ได้จากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 70% พบ สารกลุ่มใหม่ของ flavonoid glycosides 2 ชนิด โดยใช้ NMR spectroscopic interpretation เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง LLC และ HL-60 พบว่า flavonoid glycosides ชนิดที่ 1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง LLC และ HL-60 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 28.2 และ 11.6 µg/ml ตามลำดับ flavonoid glycosides ชนิดที่ 2 แสดงการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ชนิดเดียว คือ HL-60 ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 10.8 µg/ml

5.2.4 การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์เมลาโนมา C32 ตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) และ การแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation)

ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสาบเสือต่อเซลล์เมลาโนมา ที่ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ใช้สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือ ที่มีค่า IC_{50} <500 µg/ml ได้แก่ สารสกัดหยาบจากใบที่สกัดด้วยเอทานอล และเฮกเซน โดยใช้ความเข้มข้น 500 µg/ml บ่มนาน 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เมลาโนมา มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเซลล์มีลักษณะจำเพาะของการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น คือมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส มีการจับกันแน่นของโครมาติน โดยเซลล์ที่บ่มนาน 48 มีการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตและมีการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างของนิวเคลียสมากกว่า ที่บ่มนาน 24 ชั่วโมง

เซลล์เมลาโนมาทดสอบความเป็นพิษด้วยสารสกัดหยาบจากใบสกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซน ความเข้มข้น 500 µg/mlที่ 24 นำมาผ่านการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า พบว่าดีเอ็นเอจากเซลล์เมลาโนมา มีการแตกหักของดีเอ็นเอ เป็นชิ้นส่วน ขนาดประมาณ 500 bp ไปจนถึงเล็กมากคือ 100 bp ซึ่งการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) เป็นตัวบ่งชี้การตายชองเซลล์แบบ apoptosis การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส จะพบลักษณะสำคัญที่บ่งชี้คือ มีการจับตัวกันแน่นของโครมาติน และมีการแยกตัวของเซลล์เป็นก้อนที่เรียกว่า อะพอพโทซิสบอดี และมีลักษระทางชีวเคมีที่สำคัญคือ การแตกหักของดีเอ็นเอ เป็นชิ้นส่วน ขนาดประมาณ 180-200 bp (Saraste and Pulkki, 2000)

5.2.5 ฤทธิ์สารสกัดหยาบต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

1) การทดสอบหาบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone) โดยวิธี agar well diffusion

ผลของสารสกัดหยาบจากส่วนใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ethanol, methanol และ hexane ต่อการยับยั้งแบคทีเรียจะให้ผลเหมือนกัน คือ มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ 3 ชนิดได้ดีที่สุด คือ *Stap. aureus* TISTR 1466, *B. subtilis* TISTR 008, *P. acnes* DMST 14916 และ ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้เพียงชนิดเดียว คือ *E. coli* TISTR780 ในขณะที่สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำจะมีฤทธิ์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* TISTR780 (1.0±0.00) ได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ซึ่งผลจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดหยาบสาบเสือจะมีฤทธิ์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่ผ่านของสารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำ, ethanol และ methanol นั้นส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์

ยับยั้งแบคทีเรียได้เหมือนกัน คือ มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *B. subtilis* และ *Stap. aureus* และยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ได้ดี (Stanley *et al.*, 2014; Eze *et al*., 2013; Naidoo *et al.,* 2011; Maji *et al.* 2010; Sukanya *et al*. 2009; Vital and Rivera., 2009) นอกจากนี้จากผลการทดลองยัง พบว่า สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำและสารอินทรีย์ ethanol และ methanol และ hexane ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Enterococcus aerogenes* ATCC 13048, *Pro. vulgaris* ATCC 13315 และ *Sal.* Typhimurium ATCC13311 ซึ่งผลนี้จะสอดคล้องกับรายงานของ Naidoo *et al.* (2011) ที่พบว่าสารสกัดหยาบใบสาบเสือจากประเทศดูไบที่สกัดด้วย methanol พบว่า ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Enterobacter aerogenes, Shigella sonnei,* และ *Pro. vulgaris* ได้ แม้ว่าผลการทดลองนี้จะมีความแตกต่างจากรายงานของEze *et al.* (2013) พบว่า สารสกัดหยาบใบสาบเสือจากประเทศไนจีเรียที่สกัดด้วย ethanol สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* และ *Salmonella* spp. ได้ และรายงานของ Vital and Rivera (2009) พบว่า สารสกัดหยาบใบสาบเสือจากประเทศฟิลิปปินส์ที่สกัดด้วย ethanol จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Sal. typhimutium*ได้ ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบของสารที่พบในพืชสมุนไพรมีความแตกต่างกันจะขึ้นกับฤดูกาล (season) สภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศ และปัจจัยอื่นๆ

ผลของสารสกัดหยาบจากส่วนลำต้นสาบเสือ พบว่า ลำต้นที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane จะให้ค่าการยับยั้ง *Stap. aureus* TISTR 1466 (19.7±0.58 mm) ดีที่สุด และรองลงมา คือ *B. subtilis* TISTR 008 (12.0±0.60 mm) อย่างไรก็ตามผลของสารสกัดหยาบสาบเสือจากส่วนลำต้นที่สกัดด้วยน้ำ, ethanol และ methanol พบว่า ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466, และ *P. acnes* DMST 14916 และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Enterococcus aerogenes* ATCC 13048, *Pro. vulgaricus* ATCC 13315 และ *Sal.* Typhimurium ATCC13311) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดหยาบจากลำต้นสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำไม่สามารถยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ ได้แก่ *B. cereus, B. subtilis*, *Stap. aureus,* และ *Stap. epidermis* และแบคทีเรียแกรมลบได้ ได้แก่ *E. coli, Enterobacter aerogenes, Shigella sonnei,* และ *Pro. vulgaris* และสารสกัดหยาบจากลำต้นสาบเสือที่สกัดด้วย methanol ก็ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli, Enterobacter aerogenes, Shigella sonnei* และ *Proteus vulgaris* ได้ (Mondal et al., 2012) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Venkata *et al*. (2012) ที่พบว่า ทั้งส่วนของลำต้นและดอกสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำและสารอินทรีย์ ได้แก่ ethyl alcohol methanol chroroform และ methanol: chloroform: water (MCW) ในอัตราส่วน 12:5:3 จะไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* (MTCC763), *Corynebacterium glutamicum* (MTCC2807), *Stap. aureus* (MTCC1771) และ *Strep. thermophilus* (MTCC1938) และแบคทีเรียแกรม *E. coli* (MTCC1572), *Klebsiella pneumonia* (MTCC7028), *Pro. vulgaris* (MTCC1771) *Sal. typhi* (MTCC733) และ *Vibrio parahaemolyticus* (MTCC451) อย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดลองในส่วนของรากสาบเสือ พบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *B. subtilis* TISTR 008 ให้ค่าการยับยั้งเท่ากัน คือ

7.67±0.58 mm (50 mg/mL) และเฉพาะส่วนของรากที่สกัดด้วยน้ำเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* (12.0±0.60 mm) อย่างไรก็ตามจากการทดลองยังพบว่าสารสกัดหยาบสาบเสือจากส่วนรากที่สกัดด้วยน้ำ, ethanol และ methanol ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบบวก *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466, และ *Pro. acnes* DMST 14916 และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Enterococcus aerogenes* ATCC 13048, *Pro. vulgaricus* ATCC 13315 และ *Sal.* Typhimurium ATCC13311) แต่จากรายงานของ Venkata *et al*. (2012) พบว่า ส่วนของรากสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำและสารอินทรีย์ ได้แก่ ethyl alcohol, methanol, chroroform, และ methanol: chloroform: water (MCW) ในอัตราส่วน 12:5:3 จะมีฤทธิ์ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย 9 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* (MTCC763), *Stap. aureus* (MTCC1771), *Strep. thermophilus* (MTCC1938) และ *C. glutamicum* (MTCC2807) และ แบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* (MTCC1572), *K. pneumonia* (MTCC7028), *Pro. vulgaris* (MTCC1771) *Sal. typhi* (MTCC733) และ *Vibrio parahaemolyticus* (MTCC451) อย่างมีนัยสำคัญ

2) การหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบต่อการเจริญของแบคทีเรีย ด้วยวิธี macro broth dilution technique

สารสกัดหยาบสาบเสือที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมาทดสอบหาค่า MIC และ MBC พบว่า สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol และ hexane จะให้ค่า MIC ดีที่สุดต่อ *B. subtilis* TISTR เท่ากัน คือ 1.56 mg/mL และค่าให้ MBC เท่ากับ 6.25 และ 3.12 mg/mL ตามลำดับ รองลงมา คือ สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol และ methanol ให้ค่า MIC เท่ากัน คือ 3.12 mg/mL และให้ค่า MBC เท่ากัน คือ 6.25 mg/mL ต่อ *P. acnes* DMST 14916 และ *B. subtilis* TISTR 008 ตามลำดับ ซึ่งค่า MIC ต่อแบคทีเรีย *B. subtilis* ของใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol และ methanol จะให้ค่าดีกว่าที่มีรายงานมารายงานของ Naidoo *et al.* (2011) ที่พบว่า สารสกัดใบสาบเสือจากไนจีเรียที่สกัดด้วย methanol ให้ค่า MIC ต่อ *B. subtilis* และ *B. cereus* เท่ากับ 8.0 และ 7.5 mg/mL ตามลำดับ และจากรายงานของ Eze *et al.* (2013) ที่พบว่าสารสกัดใบสาบเสือจากประเทศไนจีเรียที่สกัดด้วย ethanol จะให้ค่า MIC ต่อ *B. cereus* เท่ากับ 3.125 mg/mL นอกจากนี้ผลของเชื้อสิว *P. acnes* ในการทดลองนี้จะได้ค่า MIC และ MBC ไม่ดีเท่ากับที่เคยมีรายงานจากสารกัดหยาบทั้งต้นสาบเสือที่เก็บในประเทศไทย ซึ่งให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.625 mg/mL และ 1.25 mg/mL ตามลำดับ ผลของสารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งน้อยต่อ *E. coli* (MIC = 12.5 mg/mL, MBC = 25 mg/mL) และ *Stap. aureus* TISTR 1466 (MIC = 12.5 mg/mL, MBC = 25 mg/mL) ซึ่งให้ค่าการยับยั้งสูงกว่าที่มีรายงานจากสารสกัดใบสาบเสือของประเทศไนจีเรียที่สกัดด้วย ethanol ให้ค่า MIC ต่อ *E. coli* เท่ากับ 0.25 mg/mL (Stanley *et al.*, 2014) และ 6.25 mg/mL (Eze *et al.,* 2013)

ลำต้นสาบเสือที่สกัดด้วย hexane พบว่าจะให้ฤทธิ์ยับยั้งน้อยต่อ *Stap. aureus* TISTR 1466 โดยให้ MIC เท่ากับ 12.5 mg/mL และ MBC เท่ากับ คือ 25 mg/mL ซึ่งให้ค่า MIC ดีกว่า จากรายงานของ Naidoo *et al.* (2011) ที่รายงานว่า ลำต้นสาบเสือที่สกัดด้วย methanol จะไม่ให้ค่า MIC ต่อ *Stap. aureus*

รากสาบเสือที่สกัดด้วย hexane ให้ค่า MIC เท่ากับ 3.12 mg/mL และให้ค่า MBC เท่ากับ 6.25 mg/mL ต่อ *B. subtilis* TISTR 008 และให้ฤทธิ์ยับยั้งน้อยต่อ *Stap. aureus* TISTR 1466 (MIC = 12.5 mg/mL, MBC = 25 mg/mL) ซึ่งจากราบงานการวิจัยที่ผ่านมา พบว่ารากสาบเสือมีก็ฤทธิ์ยับยั้งน้อยต่อ *C. glutamicum, E. coli* และ *V. parahaemolyticus* (Venkata *et al*., 2012)

ส่วนใบของพืชที่สกัดด้วย ethanol, methanol และ hexane จะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคดีกว่า ส่วนอื่นๆของพืช และส่วนอื่นที่สกัดด้วยน้ำ ซึ่งสารในกลุ่มที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ ซึ่งสารกลุ่มนี้จะพบมากในตัวทำละลายที่ใชสกัดที่มีขั้วปานกลาง เช่น ethanol, methanol, ethyl acetate และ dichloromethane เป็นต้น มากกว่าตัวทำละลายที่ใช้สกัดแบบไม่มีขั้ว เช่น hexane จากรายงานการสกัดใบสาบเสือจากประเทศไนจีเรีย เนปาล และอินเดีย ethanol และ methanol ก็จะพบสารกลุ่ม flavonoids, flavone และ polyphenols (Akinmoladun *et al.,* 2007; Tiwari *et al.,* 2011; Mondal *et el.,* 2012; Vijayaraghavan *et al.,* 2013; Stanley *et al*., 2014) สำหรับสารกลุ่ม phenols และ polyphenols ได้แก่ catechol, epicatechin และ cinnamic acid เป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านจุลินทรีย์ ต้านหนอนตัวกลม และต้านเชื้อก่อโรคท้องร่วง และสารกลุ่ม flavonoids ได้แก่ chrysin, quercetin และ rutin เป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านจุลินทรีย์ และต้านเชื้อก่อโรคท้องร่วง เนื่องจากสารกลุ่ม flavonoids จะมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

5.2.6 ฤทธิ์สารสกัดที่แยกด้วย TLC ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol, methanol และ hexane ซึ่งแถบสารที่มีปริมาณมากจะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้มากด้วย ดังนั้นจึงสอดคล้องนี้จะพบเฉพาะสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethanol และ methanol เท่านั้น แต่สารสกัดหยาบที่สกัดด้วย hexane จะไม่มีความสอดคล้องกันในเรื่องของปริมาณสาร เนื่องจากแถบที่มีปริมาณสารน้อย คือ แถบที่ HL1, HL8 และ HL9 จะมีฤทธ์ต้านแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 008 ได้ดีโดยให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ 4.0, 2.5 และ 2.0 mm ตามลำดับ รูปแบบแถบของสารที่สัดด้วยตัวทำละลาย ethanol และ methanol จะมีรูปแบบเหมือนกัน ยกเว้น แถบสารที่สกัดด้วย hexane สำหรับแถบของสารที่ค่า R_f เท่ากับ 0.200 จากสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethanol และ ค่า R_f เท่ากับ 0.237 จากสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารชนิดเดียวกัน เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ 3 ชนิดเหมือนกัน คือ *B. subtilis* TISTR 008, *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *P. acnes* DMST 14916 แต่ค่าการยับยั้งของสารสกัดจาก ethanol จะให้ค่าการยับยั้งมากกว่า methanol ทั้งนี้เนื่องจากแถบสารที่ของสารสกัดที่สกัดจาก ethanol จะได้แถบสารที่มีความเข้มข้นมากกว่าสารที่สกัดด้วย methanol ซึ่งผลการทดลองจะสอดคล้องกับรายงานของ Sukanya *et al*. (2011) ที่พบว่าสารประกอบที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.21 จาก TLC ที่แยกด้วยสารละลาย ethyl acetate : hexane (5:5) จะมีฤทธิ์ยังยั้งทั้ง *E. coli* (11mm) และ *Stap. aureus* (10mm) ได้ดีที่สุด

สำหรับเชื้อสิว *P. acnes* เคยมีรายงานของ Chomnawange *et al.* (2005) พบว่า สารสกัดหยาบจากต้นสาบเสือสามารถยับยั้ง *P. acnes* ได้ (MIC=0.039 mg/mL) แต่เมื่อนำมาแยกสารด้วยเทคนิค TLC พบว่า ไม่มีแถบไหนเลยของสารประกอบที่แยกได้มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. acnes* ได้

(Chomnawange *et al.,* 2005) แต่จากการทดลองนี้ พบว่า สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่สกัดด้วย ethanol และ methanol พบแถบสารที่สามารถยับยั้ง *P. acnes* ได้เท่ากับ 5.0 mm (R_f=0.200) และ 2.0 mm (R_f=0.237) ตามลำดับ

จากการแยกสารสกัดใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol, methanol และ hexane พบว่า สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียจะมีค่า R_f ในช่วง 0.089-0.237 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารประกอบ terpenes และ phenolic acids และ ค่า R_f ในช่วง 0.853-0.963 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารประกอบ flavonoid ที่มี trepene, และ สารกลุ่ม phenolic ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lavanya & Brahmaprakash (2011) รายงานว่า ค่า R_f ของสารสกัดพืชที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol, chloroform และ ether นั้น จะสามารถใช้ทำนายกลุ่มของสารได้ดังนี้ คือ ค่า R_f เท่ากับ 0.3-0.9 จะเป็นสารประกอบ terpenes และ phenolic acids และที่ค่า R_f เท่ากับ 0.5-0.9 จะเป็นสารประกอบ flavonoid ที่มี trepene, และ สารกลุ่ม phenolic

5.2.7 ฤทธิ์สารสกัดหยาบต่อการยับยั้งราก่อโรค

การทดสอบหาบริเวณยับยั้งรา ด้วยวิธี agar well diffusion จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *Candida albicans* TISTR 5779 ด้วยสารสกัดหยาบสาบเสือแบบเย็นจาก 3 ส่วนของพืช คือ ส่วนใบ ลำต้น และราก ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด น้ำ, ethanol, methanol และ hexane ที่ความเข้มข้น 100 mg/ml พบว่า สารสกัดหยาบทุกชนิดไม่สามารถยับยั้ง *C. albican* TISTR 5779 ได้ ผลแตกต่างกับรายงานของ Stanley *et al*. (2014) ที่ได้ทำการสกัดสารจากใบสาบเสือจากประเทศไนจีเรียที่สกัดด้วยน้ำและethanol สามารถยับยั้งของรา *C. albicans* ให้ค่า MIC เท่ากับ 4.0 และ 2.0 mg/mL ตามลำดับ รวมทั้งสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือจากประเทศดูไบที่สกัดด้วย ethanol (1mg/mL) และน้ำ (10 mg/mL)และสารสกัดหยาบจากส่วนลำต้นที่ด้วยสกัดด้วย ethanol (1mg/mL) และน้ำ (1 mg/mL) จะสามารถยับยั้ง *C. albicans* (Naidoo *et al.,*2011)

จากผลการทดสอบการยับยั้งรา 2 ชนิด คือ *Fusarium solani* TISTR 3436 และ *Aspergillus niger* TISTR 3445 พบว่า สารสกัดหยาบที่ให้ค่าสัดส่วนการลดลงของการเจริญของเส้นใยดีที่สุดและรวดเร็วที่สุดต่อเชื้อราทั้ง 2 ชนิด คือ สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ที่ทั้ง 3 ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ คือ 5.0, 2.5 และ 1.25 mg/mL จะให้ค่าสัดส่วนการลดลงของการเจริญของเส้นใย *Fusarium solani* TISTR 3436 ใกล้เคียงกัน คือ 66.67, 66.67, และ 61.11 mg/ml ภายในวันที่ 2 ของการยับยั้งเท่านั้น และที่ความเข้มข้น 5 และ 2.5 mg/mL จะให้ค่าสัดส่วนการลดลงของการเจริญของเส้นใยรา *Aspergillus niger* TISTR 3445 ดีที่สุด เท่ากับ 70 % ภายในวันที่ 2 ของการยับยั้ง แสดงว่าสารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane จะสามารถซึมผ่านไขมัน ergosterol ที่อยู่ที่ชั้น membrane bilayer ของราได้อย่างรวดเร็วกว่าสารสกัดหยาบชนิดอื่นๆ แต่ภายหลังจากวันที่ 2 ของการยับยั้ง พบว่าความเข้มข้นของสารไม่เพียงพอที่จะทำลายชั้นไขมันที่ผนังราได้ ทำให้เส้นใยใหม่เจริญขึ้นมาได้ (Felicien *et al.,* 2012) ในขณะที่สารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย methanol จะค่อยซึมเข้าทำลายไขมันที่ผนังของราได้ และยังคงมีความเข้มข้นเพียงพอที่จะเข้าทำลายได้เรื่อยๆ แม้เวลาจะผ่านไปนาน 6 วันแล้วก็ตาม สำหรับสารสกัดหยาบรากสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำ และสารสกัดหยาบใบสาบเสือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย

ethanol นั้นจะให้ค่าสัดส่วนการลดลงของการเจริญของเส้นใยประมาณครึ่งหนึ่งเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Naidoo *et al.*(2011) ที่พบว่า สารสกัดสาบเสือจากส่วนใบที่สกัดด้วย ethanol สามารถยับยั้งรา *Aspergillus aglucus* ได้ดีกว่า *A. flavus* ได้ดีที่ความเข้มข้น 1mg/mL ในขณะที่สารสกัดจากลำต้นจะยับยั้งทั้งรา *A. aglucus* และ *A. flavus* ได้ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL

5.2.8 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย

สารสกัดจากใบให้ผลดีที่สุด 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

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบจากสาบเสือได้ผลเป็นที่น่าพอใจ แม้ว่าหลังจากผ่านการทำให้แห้งแล้วจะเหลือปริมาณน้อยแต่ก็พอเพียงต่อการทดสอบการออกฤทธิ์ต่อเชื้อมาลาเรีย การออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียสามารถพบได้เมื่อใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณสารออกฤทธิ์มีอยู่ค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่าสารออกฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียมีมากในส่วนใบของสาบเสือ และควรสกัดด้วยเอธานอลหรือเมธานอลจึงจะเหมาะสมที่สุด

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

ผลงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดก่อนที่จะนำสารสกัดสมุนไพรมาใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ความปลอดภัย และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำวิจัยต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

ธารธรรมแก้ว เชื้อเมือง. (2537). *สมุนไพรสำคัญที่ควรรู้*. สำนักพิมพ์กำแก้ว, 271 หน้า.

พิสุทธิพร ฉ่ำใจ. (2550). *สมุนไพรสรรพคุณและประโยชน์เพื่อการนำมาใช้*. ต้นธรรมสำนักพิมพ์, กรุงเทพฯ. 304 หน้า.

สุรศักดิ์ ราตรี. (2554). *พรรณไม้หนองระเวียง*. เอ็กซ์เดคคอร์, 231 หน้า.

บรรณานุกรมภาษาอังกฤษ

Akinmoladun, A. C., lbukun, E.O. and Dan-Ologe, I. A. (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., Onyeze, G. O. C., Ojiako O. A., Osuagwu, C. G. (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.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. & Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proceeding of the National Acadamy of Science of the United State of America*. 90, 7915-7922.

Antindehou, M., Lagnika, L., Guérold, B., Strub, J. M., Zhao, M., Dorsselaser, A. V., Marchioni, E., Prévost, G., Haikel, Y., Taddéi, C., Sanni, A., Metz-Boutigue, M.-H. (2013). Isolation and identification of two antibacterial agents from *Chromolaena odorata* L. activity against four diarrheal strains. *Advances in Microbiology*. 3, 115-121.

Anyasor, G. N., Aina, D. A., Olushola, M., & Aniyikaye, A. (2011). Phytochemical constituent, proximate analysis, antioxidant, antibacterial and wound healing properties of leaf extracts of *Chromolaena odorata*. *Annals of Biological Research*. 2(2): 441-451.

Banerjee, A., Dasgupta, N., & De, B. (2005). In vitro study of antioxidant activity of Syzygium cumini fruit. *Journal of Food Chemistry*. 90, 727-733.

Bezivin, C., Tomasi, S., Lohezic-Le Devehat, F., Boustie, J. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. Phytomedicine. 10(6-7), 499-503.

Chakraborty, A. K., Rambhade, S. & Patil, U. (2011). *Chromolaena odorata* (L.): an overview. *Journal of Pharmacy Research*. 4(3), 573-576.

Chomnawange, M. T., Surassmo, S., Nukoolkarn, V. S. & Gritsanapan, W. (2005). Antimicrobial effects of Thai medical plants against acne-inducing bacteria. *Journal of Ethnoparmacology*. 101: 330-333.

Danlami, U., Adebisi, F. A., David, B. M., Lawal, D. R. & Galadanchi, K. M. (2013). Proximate and phytochemical analyses of the hexane, ethyl acetate and ethanol extracts of *Chromolaena odoratum* (Linn.) leaves. *Asian J. Pharm Biol Res Short Communication*. 3(1): 34-35.

Das, K., Tiwari, R. K. S., & Shrivastava, D. K. (2010). Techniques for evaluation of medicine plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(2), 104-111.

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

Eze, E. A., N. E. Oruche, V.C. Onuora & C.N. Eze. (2013). Antibacterial screening of crude ethanolic leaf extracts of four medicinal plants. *Journal of Asian Scientific Research*. 3(5), 431-439.

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.

Gerhauser, C., Klimo, K., Heisis, E., Neumann, I., Gamal-Eldeen, A., Knauft, J. (2003). Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. Mutat Res. 523 : 163-172.

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

Hung, T. M., Cuong, T. D., Dang, N. H., Zhu, S., Long, P. Q., Komatsu, K. & Min, B. S. (2011). Flavonoid glycosides from *Chromolaena odorata* leaves and their *in vitro* cytotoxic activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 59(1), 129-131.

John, K.M.M., Ayyanar, M., Arumugam, T., Enkhtaivan, G., Jin, K., Kim, D.H. (2015). Phytochemical screening and antioxidant activity of different solvent extracts from *Strychnos minor* Dennst leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 5(3), 204-209.

Joshi, R. K. (2013). Chemical composition of the essential oil of *Chromolaena odorata* (L.) R. M. King & H. Rob. roots from India. Hindawi Publishing Corporation, *Journal of Chemistry*. 1-4. ID 195057, http://dx.doi.org/10.1155/203/195057.

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

Kigigha, L. & Zige, D. V. (2013). Activity of *Chromolaena odorata* on enteric and superficial etiologic bacterial agents. *American Journal of Research Communication*. 1(11): 266-276.

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*. 89(3), 217-233.

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

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.

Oueslati, S., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Legault, Jean., Abdelly, C., Ksouri, R., (2012). Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal *Suaeda* species and related phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*. 36(1), 513-518.

Panda, D., Dash, S. K., & Dash, G. K. (2012). Isolation and antimicrobial evaluation of various leaf extracts of *Chromolaena odorta* Linn. collection from nearby areas of Lathi village, Ganjam, Odisha. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Research*. 3(2), 25-33.

Peterson, L.R. & Shanholtzer, C. J. (1992). Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews*. 5(4), 420-432.

Phan, T.-T., Wang, L., See, P., Grayer, R. J., Chan, S.-Y. & Lee, S. T. (2001). Phenolic compound of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: implication for cutaneous wound healing. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 24(12), 1373-1379.

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

Saraste, A. and Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovasc Res. 45(3), 528-537.

Schwalbe, R., Steele-Moore, L. & Goodwin, A. C. (2007). Antimicrobial susceptibility testing protocols. CRC press, New york, 414 p.

Shirazi, F.H., Ahmadi, N., Kamalinejad, M. (2004). Evaluation of northern Iran. *Mentha Pulegium* L. cytotoxicity. DARU. 12(3), 106-110.

Sowndhararajan, K., Kang, S.C. (2013). Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 20(4), 319-325.

Stanley, M. C., Ifeanyi, O. E., Nwakaego, C. C. & Esther, I. O. (2014). Antimicrobial effects of *Chromolaena odorata* on some human pathogens. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(3), 1006-1012.

Stanley, M. C., Ifeanyi, O. E., Nwakaego, C. C. & Esther, I. O. (2014). Antimicrobial effects of *Chromolaena odorata* on some human pathogens. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(3), 1006-1012.

Sukanya, S. L., Sudisha, J., Prakash, H. S., & Fathima, S. K. (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.

Tan, J.B.L., Lim Y.Y. (2015). Evaluation of anti-oxidative activity and UV absorption potential of the extracts of *Aloe vera* L. gel from different growth periods of plants. *Food Chemistry*. 172, 814-822.

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.

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale Pharmaceutica Science.* 1(1): 98-106.

Touré, D., Kouamé, B. K. F. P., Bedi, G., Joseph, A., Guessennd, N., Oussou, R., Chalchat, J. C., Dosso, M. & Tonzibo, F. (2014). Effect of geographical location and antibacterial activities of essential oils from Ivoirian *Chromolaena odorata* (L.) R. M. King & Robinson (Asteraceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy.* 6(6): 70-78.

Vaisakh, M. N. & Pandey, A. (2012). The invasive weed with healing properties: a review on *Chromolaena odorata*. *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research*. 3(1), 80-83.

Venkata, R. B., L., Samuel, S. M. Pardha, R. B., Narashimha, V. K. A., Naga, M. Sudhakarm, & T. M. Radhak. (2012). Antibacterial, antioxidant activity and GC-MS analysis of *Eupatorium odoratum. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 5(2), 100-106.

Vidović, S., Zeković, Z., Marošanović, B., Todorović, M.P., Vladić J. (2014). Influence of pre-treatments on yield, chemical composition and antioxidant activity of Satureja montana extracts obtained by supercritical carbon dioxide. The Journal of Supercritical Fluids. 95: 468-473.

Vijayaraghavan, K., Mohamed, S. & Maruthi, R. (2013). Studies on phytochemical screening and antioxidant activity of *Chromolaena odorata* and *Annona*

squamosu. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology. 2(12), 7315-7321.

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

Yahya, M. F. Z. R., Ibrahim, M. S. A., Zawawi, W. H. A. W. M. & Hamid, U. M. A. (2014). Biofilm killing effects of *Chromolaena odorata* extracts against *Pseudomonas aeruginosa. Research Jounal of Phytochemistry*. 8(3): 64-73.

Yen, G., Chen, H.Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 27-37.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว สุชาดา โทผล
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss, Suchada Thophon
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3100200132095
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
   คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
   เลขที่ 295 ถนนราชสีมา เขตดุสิต กรุงทพฯ 11000
   โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-2445939 โทรศัพท์มือถือ 089-1240849
   e-mail suthophon@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา
   - วิทยาศาสตร์บัณฑิต (พยาบาล) วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนีนครราชสีมา (ทุนการศึกษาพยาบาลศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข)
   - วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สรีรวิทยา) คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล (ทุนการศึกษามหาวิทยาลัยมหิดล)
   - ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (ทุนเสริมสร้างนักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่ สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ)
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   พยาธิวิทยา
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
   7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย
   1) การตอบสนองของไตภายหลังได้รับอาหารโปรตีนสูงจากสัตว์และพืช
   2) ผลของการได้รับแคดเมียมแบบเฉียบพลันและแบบกึ่งเรื้อรังต่อพยาธิสภาพและองค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาว
   3) การศึกษาวิจัยน้ำมันมะพร้าวสกัดบริสุทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคที่ผิวหนัง
   7.2 ผู้ร่วมวิจัย
   1) ผลของโครงสร้างระบบนาโนและสารโด๊ปที่มีต่อกลไกการตรวจวัดแก๊สเอทิลีนในหัววัดแก๊สแบบสารกึ่งตัวนำทินออกไซด์
   2) การพัฒนาอุปกรณ์รับรู้แก๊สเอทิลีนจากสารเชิงประกอบระดับนาโนทังสเตนออกไซด์ทินออกไซด์
   3) การควบคุมและป้องกันโรคติดต่อมือเท้าปากในเด็กปฐมวัย และตรวจหาเชื้อไวรัส
   7.3 งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ

1) Lohsiriwat, S., Thophon, S ., 2000. Effects of Vegetable and Animal Protein Meals on Glomerular Filtration Rate. The Nephrology Society of Thailand . 6 (2), 217-223.
2) Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., Jaritkhuan. 2003. Histopathological alterations of white seabass, Lates calcarifer in acute and subchronic cadmium exposure. Environmental Pollution. 2, 307-320.
3) Suchada Thophon, Prayad Pokethitiyook, Kashane Chalermwat, E . Suchart Upatham, Somphong Sahaphong . 2004. Ultrastructural alterations in liver and kidney of white seabass, Lates calcarifer in acute and subchronic cadmium exposure. Environmental Toxicology. 19 (1), 11-19.
4) Panichakul T., Thophon S. Hand, foot and mouth disease in children. J Public Health. 2009, 39: 214-223.
5) Panichakul T., Thophon S., Kakhai C., Patumasut P., Somboon S., Sukasem C., Srichanrusami C. Surveillance and prevention of enterovirus spreading and hand-foot-mouth disease occurrence in young children. J Public Health & Develop. 2010, 8.

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 1

1. ชื่อ-นามสุกล (ภาษาไทย) นางสาว ปิยาภรณ์ วรานุสันติกูล
   ชื่อ-นามสุกล (ภาษาอังกฤษ) Miss Piyaporn Waranusantigul
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-8099-00258-689
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
   มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต โทรศัพท์: 089-4505409 โทรสาร: 024239419
   E-mail: wpiyaporn@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา
   ปี พ.ศ. 2539 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาธารณสุขศาสตร์) คณะสาธารณสุขศาสตร์ ม.มหิดล
   ปี พ.ศ. 2544 M.Sc. (Environmental Biology), Mahidol University
   ปี พ.ศ. 2552 Ph.D. (Biology), Mahidol University
   (ทุนโครงกาปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 7)
6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)
   Phytoremediation
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ผลงานตีพิมพ์วารสารต่างประเทศ

1) Waranusantigul P, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, Upatham E.S. 2003. Kinetics of basic dye (methylene blue) biosorption by giant duckweed (*Spirodela polyrrhiza*). *Environmental Pollution* 125 (3), pp. 385-392.

2) Waranusantigul P, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Auesukaree C. 2008. Evaluation of Pb phytoremediation potential in *Buddleja asiatica* and *B. paniculata*. *Water, Air, and Soil Pollution* 193 (1-4), pp. 79-90. (ทุน The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, the Thailand Research Fund and in part by The Center on Environmental Health, Toxicity and Management of Toxic Chemicals under Science & Technology Postgraduate Education and Research Development Office (PERDO) of the Ministry of Education)

3) Waranusantigul P, Lee H, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Auesukaree C. 2011. Isolation and characterization of lead-tolerant *Ochrobactrum intermedium* and its role in enhancing lead accumulation by *Eucalyptus camaldulensis*. *Chemosphere* 85(4), pp. 584-590.

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2

1. ชื่อ นาง ศรีสุดา หาญภาคภูมิ
   Mrs. Srisuda Hanphakphoom
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
3. สถานที่ทำงาน
   คณะวิทยาศาตร์และเทคโนโลยี
   มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
   295 ถนนราชสีมา แขวงดุสิต เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร 10300
4. ประวัติการศึกษา วท.บ. (สัตวศาสตร์) สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล (บางพระ)
   วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
5. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ
   จุลชีววิทยาทางอาหาร ชีวเคมีสิ่งแวดล้อม เอนไซม์เทคโนโลยี จุลชีววิทยาสาธารณสุข จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม และจุลชีววิทยาทางการเกษตร
6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและนอกประเทศ
   ผู้ร่วมวิจัย การผลิตไวน์บีทรูท
   1) ผู้ร่วมวิจัย: การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางผิวหนัง (ทุนสกอ.)

2) หัวหน้าโครงการ: การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมักพื้นเมืองและการสร้างสารแบคเทอริโอซินในเค็มหมากนัดจากผลิตภัณฑ์สินค้าโอทอป

7. งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์
   1) “Thermotorelant photosynthetic bacteria for the photosynthetic bacteria for lipopolysaccharide (LPS) production” Research collaboration under JSPS-NRCT Scientific Cooperation, August 01 to September 14, 2006 at Hiroshima Kokusai Gakuin University
   2) “ Purification and characteristics of PLA-degrading enzyme” Research collaboration under JENESYS program under Dr. Shinji TOKUYAMA Shizuoka University, Japan, 12 May -9 Aug, 2010

ประสบการณ์ทำวิจัยในต่างประเทศ

1) ปี 2550: ทำวิจัยที่ Hiroshima Kokusai Gakuin University เป็นเวลา 2 เดือน ภายใต้ทุน JSPS-NRCT
2) ปี 2553: ทำวิจัยที่ Shizuoka University เป็นเวลา 3 เดือน ภายใต้ทุน JENESYS

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 3

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย นิวัฒน์ กังวานรังสรรค์
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Niwat Kangwanrangsan
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3102001200335
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
   ถนนพระราม 6 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400
   โทรศัพท์ 02-2015563 โทรสาร 02-3547158
   E-mail: scnkw@mahidol.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

2549 – 2555	ระดับ ปริญญาเอก สาขา วิทยาศาสตร์การแพทย์ Department of Molecular Parasitology, Graduate School of Medicine, Ehime University, Ehime, Japan
2543 – 2547	ระดับ ปริญญาโท สาขา วิทยาศาสตร์ (กายวิภาคศาสตร์) ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2537 – 2541	ระดับ ปริญญาตรี สาขา วิทยาศาสตร์ (ชีววิทยา) ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   - ชีวโมเลกุลและเซลล์ในโรคติดเชื้อ
   - ชีววิทยาของเชื้อมาลาเรีย การพัฒนาวัคซีนของโรคมาลาเรีย
   - พยาธิสภาพในโรคติดเชื้อปรสิต เช่น มาลาเรีย พยาธิใบไม้
7. งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

   ผลงานตีพิมพ์วารสารต่างประเทศ

   1) Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Kangwanrangsan N. 2007. Toxicity of copper in Butterfish (*Poronotus triacanthus*): tissues accumulation and ultrastructural changes. Environmental Toxicology; 22(1): 92-100.
   2) 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. 2009. Preerythrocytic, live-attenuated *Plasmodium falciparum* vaccine candidates by design. Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 4;106(31):13004-9.