บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดอินทนิลน้ำเป็นสารที่ถูกนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน รวมทั้งด้านสุขภาพและความงาม ดังนั้นจึงมีความสำคัญในการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดก่อนนำไปใช้ เพื่อความปลอดภัยต่อผู้ใช้ การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นวิธีทดสอบที่ปฏิบัติได้ไม่ยุ่งยาก โดยประยุกต์การทดสอบในจานหลุม 96 หลุม ซึ่งใช้จำนวนเซลล์น้อย แต่สามารถทดสอบตัวอย่างสารเพิ่มขึ้น และการใช้สีคริสทอล ไวโอเลต (crystal violet) ย้อมโปรตีนของเซลล์ ซึ่งมีราคาถูกและไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้

ในการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำและเลือดมังกรต่อเซลล์เมลาโนมาของคน จาการศึกษาได้ทำการทดลองหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม เพื่อที่จะนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสาร โดยในการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆในเวลาที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลที่ได้จาการทดลองหาความเข้มข้นของสารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษโดยวิเคราะห์จากค่า EC_{50} หรือมีฤทธิ์ที่ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ลดลง 50% จากการศึกษาพบว่า สารสกัดอินทนิลน้ำมีค่า EC_{50} เท่ากับ 400, 230, 130 µg/ml ที่เวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่สาร ดีเอ็มเอสโอ (DMSO) ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดอินทนิลน้ำ ได้ถูกนำมาทดสอบเช่นกัน พบว่า ดีเอ็มเอสโอ ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1% มีฤทธิ์ที่ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลง ที่เวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง แต่ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 1% ดีเอ็มเอสโอ ไม่มีฤทธิ์ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ความเข้มข้นของดีเอ็มเอสโอน้อยกว่า 1% ดังนั้นฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดที่มีผลต่อเซลล์เมลาโนมา เกิดจากฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำ ไม่ได้เกิดจากดีเอ็มเอสโอ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเลือดมังกรโดยวิธีนี้ พบว่า เลือดมังกรที่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ลดลง 50 % หรือ ค่า EC_{50} เท่ากับ 700, 800 และ 860 µg/ml และที่ช่วงความเข้มข้นนี้สารสกัดเลือดมังกรถูกละลายอยู่ในสารละลายโพรพานิดิออลที่ความเข้มข้นระหว่าง 1.6 – 3.2 % ซึ่งที่ความเข้มข้นนี้ของโพรพานิดิออลมีผลลดค่าความมีชีวิตของเซลล์ได้เช่นกัน ทั้งสารสกัดเลือดมังกรและสารละลายโพรพานิดิออล มีฤทธิ์หรือผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์เมลาโนมา

อภิปรายผล

ในการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมา ในครั้งนี้ได้ใช้วิธีการทดสอบ แบบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity assay) ซึ่งวิธีนี้เป็นการทดลองโดย

ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ศึกษา หลักการทำงานของ cytotoxicity assay คือเซลล์ซึ่งยังมีชีวิตอยู่ หรือ metabolically active เท่านั้นที่สามารถใช้ ติดสีของ สีคริสทอลไวโอเลต (crystal violet) มีสีม่วงน้ำเงินและมีความสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 560 nm (Tengchaisri et al., 1998) ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของสีม่วงน้ำเงิน อันแปรผันโดยตรงกับปริมาณของ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้น จึงสามารถวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ ข้อดีของวิธีนี้ สามารถทำได้ง่ายและสะดวก ไม่มีสารที่ก่อให้เกิดพิษ เช่น สารกัมมันตภาพรังสี ราคาไม่สูง สี crystal violet สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน สามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาในเซลล์ชนิดอื่นๆ ได้ เมื่อเทียบกับวิธีการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษของสารด้วยวิธีอื่น เช่น MTT MTS เป็นต้น มีข้อจำกัด คือ ขั้นตอนมีหลายขั้นตอน สารที่ใช้มีฤทธิ์ก่อมะเร็งซึ่งเป็นอันตราย ราคาแพง (Mosmann, 1983; Denizot and Lang,1986; Cory et al., 1991) การทดสอบความเป็นพิษ ในปี ค.ศ. 2012 ได้มีการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำทดสอบกับเซลล์ 3T3-L1 adipocytes พบว่าสารมีฤทธิ์ความเป็นพิษทำให้เซลล์ 50 % ที่ความเข้มข้น 2154 microg/ml (Kesavanarayanan et al., 2012) มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของคนค่อนข้างน้อย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการทดสอบความฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมา โดยประยุกต์การเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานหลุม 96 หลุม (96-well tissue culture plate) เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารได้จำนวนมากแต่ใช้เซลล์จำนวนน้อย เป็นการเพิ่มศักยภาพการทดสอบและใช้ทรัพยากรน้อยลง

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเลือดมังกรต่อเซลล์เมลาโนมา โดยวิธี cytotoxicity assay นั้น ผลทดสอบพบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเลือดมังกรที่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ลดลง 50 % หรือ ค่า EC_{50} เท่ากับ 700, 800 และ 860 µg/ml ที่ช่วงความเข้มข้นนี้ถูกละลายอยู่ในสารละลายโพรพานิดิออลที่ความเข้มข้นระหว่าง 1.6 – 3.2 % ที่ความเข้มข้นช่วงระดับนี้ของสารโพรพานิดิออลสามารถลดความมีชีวิตของเซลล์ได้ ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการทดสอบครั้งนี้ เนื่องจากสารสกัดเลือดมังกรที่นำมาทดสอบอยู่ในลักษณะเป็นของเหลวหรือถูกละลายด้วยสารละลายโพรพานิดิออลที่เตรียมมาเรียบร้อยแล้ว จึงไม่สามารถปรับหรือเลือกใช้สารโพรพานิดิออลที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1.6 % ซึ่งไม่มีฤทธิ์ต่อความมีชีวิตของเซลล์ อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดเลือดมังกรระดับความเข้มข้น 1 – 100 µg/ml และมีโพรพานิดิออลที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1.6 % ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นนี้ไม่มีฤทธิ์ทำให้เซลล์ตายหรือค่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลง ซึ่งผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ของสารเลือดมังกรต่อเซลล์ชนิดอื่น ๆ (Fujiwara et al., 1997; Oates et al., 2001) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมา พบว่า ค่า EC_{50} เท่ากับ 400, 230, 130 µg/ml ที่เวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการทดสอบ เมื่อเพิ่มเวลาการทดสอบฤทธิ์ของสารจะมาก

ขึ้น นั้นหมายถึงระดับความเข้มข้นของสารที่จะใช้จะต้องลดลง นอกจากนี้ฤทธิ์ความเป็นพิษของสารยังขึ้นกับชนิดของเซลล์ เช่น การทดสอบกับเซลล์ไขมัน (3T3-L1 adipocytes) พบว่า สารสกัดอินทนิลน้ำ 2154 µg/ml มีฤทธิ์ความเป็นพิษทำให้เซลล์ไขมันตาย 50 % (Kesavanarayanan et al., 2012) ซึ่งข้อมูลพื้นฐานนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์และพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

ผลงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นบรรทัดฐานในการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดก่อนที่จะนำสารสกัดสมุนไพรมาใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ความปลอดภัย และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำวิจัยต่อไป

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

1. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในด้านอื่นๆ
2. การทดสอบของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์หลายชนิดเพิ่มขึ้น
3. ในการทำการทดลองควรระวังการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองอุปกรณ์ในการทดลอง
4. สารที่จะถูกนำมาทดสอบเป็นชนิดผงจะสามารถปรับระดับความเข้มข้นได้โดยไม่มีฤทธิ์ของตัวทำละลายมารบกวนในการทดสอบ
5. ควรส่งเสริมความพร้อมของอุปกรณ์และห้องปฏิบัติการสำหรับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร
6. ควรให้การสนับสนุนในการทำวิจัยต่อไป