บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในรูปแบบเครื่องสำอางมีการนำพืชสมุนไพรหลากหลายชนิดมาใช้เป็นส่วนประกอบ โดยมุ่งหวังว่าจะมีประสิทธิภาพช่วยบำรุงให้ผิวพรรณให้ดูดีขึ้น ทำให้การตรวจสอบความปลอดภัยของสารสกัดสมุนไพรที่ใช้มีความสำคัญ จึงต้องมีการกำหนดกฎเกณฑ์ในการตรวจสอบ กระบวนการตรวจสอบความปลอดภัยในการใช้ของสารเหล่านั้น การนำเซลล์ของคนมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดสมุนไพรจึงเป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ จึงศึกษาการเจริญของเซลล์เมลาโนมาในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองสารสกัดสมุนไพร 2 ชนิด ที่ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและเครื่องสำอาง ได้แก่ สารสกัดจากอินทนิลน้ำ (*Lagestroemia - speciosa* (L.) Per.) และยางเลือดมังกร (*Croton Lechleri* Muell. Arg)

ในการศึกษาการเจริญของเซลล์เมลาโนมาในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดจากอินทนิลน้ำและยางเลือดมังกร มีการหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการนำมาทดสอบในหลอดทดลอง เวลาที่เซลล์สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่าของจำนวนเซลล์ตั้งต้น โดยที่เซลล์เริ่มต้นจำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อหลุม มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นเท่าตัว (Doubling Time) ในเวลา 76.27 ชั่วโมง จำนวน 3×10^5 เซลล์ต่อหลุม มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นเท่าตัวในเวลา 73.15 ชั่วโมง และจำนวน 4×10^5 เซลล์ต่อหลุม มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นเท่าตัวในเวลา 60.66 ชั่วโมง ค่าเฉลี่ยของ Doubling Time มีค่าเท่ากับ 70.03±8.26 ชั่วโมง ปริมาณของเซลล์เริ่มต้น 2×10^5 เซลล์ต่อหลุม เหมาะสมในการนำมาทดสอบในหลอดทดลองเนื่องจากเซลล์กระจายตัวบนหลุมได้เหมาะสม ไม่หนาแน่นหรือน้อยจนเกินไป มีพื้นที่ที่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ดี มีอัตราการเจริญของเซลล์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้นอื่น

ผลที่ได้จากการศึกษาสารสกัดอินทนิลน้ำที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมาในหลอดทดลอง โดยเลี้ยงเซลล์เมลาโนมาในอาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเนื่องจากอิลทนิลน้ำที่นำมาศึกษามีลักษณะเป็นผงต้องนำมาละลายด้วย DMSO ก่อน จึงมีการเลี้ยงเซลล์เมลาโนมาในอาหารที่มีส่วนผสมของ DMSO ด้วย จากการศึกษาพบว่าสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์มีการเจริญลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม และสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์มีอัตราการเจริญลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเริ่มมีจำนวนเซลล์ลดลงในวันที่ 3 และลดจำนวนลงจนเท่ากับจำนวนเซลล์เริ่มต้นในวันที่ 6 และน้อยกว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นในวันที่ 7 ในขณะที่สาร DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดอินทนิลน้ำ ได้ถูกนำมาทดสอบเช่นกัน พบว่า DMSO ที่ความเข้มข้น 0002%, 0.002%, 0.02% ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ ดังนั้นการเจริญของเซลล์หรือการลดลงของจำนวนเซลล์ไม่ได้มีผลมาจาก DMSO

ผลที่ได้จากการศึกษายางเลือดมังกรที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมาในหลอดทดลอง พบว่าเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียางเลือดมังกรที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร มีผลการเจริญที่ไม่แตกต่างจากการเจริญของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ไม่มีสารสกัด จากผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 1 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของยางเลือดมังกรไม่มีผลรบกวนการเจริญของเซลล์เมลาโนมา นอกจากนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ของตัวทำละลาย Propanediol : Water ในอัตราส่วน 1:1 ต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมาพบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เช่นกัน

อภิปรายผล

การศึกษานี้พบว่าสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยางเลือดมังกรที่ความเข้มข้น 1 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมา แต่พบว่าอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อการเจริญของเซลล์ คือทำให้เซลล์ตายในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์และพบว่าเซลล์มีการเจริญน้อยกว่าโดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในหลุมที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารอินทนิลน้ำซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ทัศนีย์ พาณิชย์กุล, ปิยานุช พรมภมร, ณัฐพร บู๊ฮวด, สมพรทิพย์ ศรีแย้ม, อารดี กาญจนประชาชัย และมลิวัลย์ เอมแย้ม (ระหว่างตีพิมพ์) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมาของคน: ศึกษาในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้เซลล์ตายตั้งแต่ 24 ชั่วโมงในขณะที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลทำให้เซลล์ตายหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 48 ชั่วโมงแต่ที่เวลา 72 ชั่วโมงพบว่าเซลล์มีการเจริญน้อยกว่าโดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในหลุมที่ถูกเลี้ยงในอาหาร (DMEM, 10 % FBS) ที่ไม่มีสารอินทนิลน้ำ และพบว่าเซลล์ตายแบบอะพอพโตซิส (apoptosis) และ Nutan et al. (2013) ยังพบว่าสารสกัดจากใบและต้นของอินทนิลน้ำด้วยเอธานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV-1 NL 4.3 ในเซลล์ไลน์ชนิด TZM-bl และ CEM-GFP มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่จะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ 50% (IC_{50}) ตั้งแต่ 1 ถึง 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การเลือกสารที่ใช้สกัดและส่วนของพืชอินทนิลน้ำมาทำการศึกษา เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อองค์ประกอบที่สำคัญในสารสกัดอินทนิลน้ำ เนื่องมาจาก Ambujakshi, H.R., Surendra, V., Haribabu, T. & Divakar, G. (2009) พบว่าการสกัดใบของอินทนิลน้ำด้วยน้ำจะให้ฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ดีกว่าการสกัดด้วยเอทานอล เนื่องจากได้สารแทนนินออกมา นอกจากนี้การศึกษาของ Rahman, S.M., Pervin, S., Quader, Md. and Hossain, M. (2009) พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของใบอินทนิลน้ำที่ถูกสกัดด้วยปิโตรเลียม อีเธอร์ พบสารสำคัญใหม่สองตัว ซึ่งเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ ในขณะที่ Patel, N., Shah, V., & Mesariya, P. (2011) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรากอินทนิลน้ำ พบว่าการสกัดด้วยปิโตรเลียม อีเธอร์และสารเบนซีน จะไม่พบสารสำคัญพวก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และซาโปนิน แต่ถ้าสกัดด้วยเอธานอลจะพบสารฟลาโวนอยด์และแทนนิน และถ้าสกัดด้วยน้ำจะพบสารฟลาโวนอยด์ แทนนิน และซาโปนิน ดังนั้นในการเลือกสารที่นำมาศึกษาจะต้องทราบว่ามาจากส่วนใดของพืชและสกัดด้วยวิธีใด ในการศึกษานี้เป็นการนำอินทนิลน้ำที่อยู่ในรูปผงสกัดได้จากส่วนใบ นำมาละลายด้วยตัวทำละลายแทนการสกัด เนื่องจากไม่ทราบปริมาณสารออกฤทธิ์ เมื่อละลายด้วยน้ำและเอธานอลพบว่าไม่สามารถละลายได้หมดจึงนำมาละลายด้วยสารดีเอ็มเอส

โอซึ่งเป็นเป็นตัวทำละลายที่ดีมากแต่เป็นสารเคมีที่อาจก่อให้เกิดอันตรายและสามารถซึมเข้าสู่เซลล์ได้ดี จึงต้องมีการทดสอบฤทธิ์ของดีเอ็มเอสโอต่อการเจริญของเซลล์ก่อน เพื่อป้องกันการรบกวนต่อผลการเจริญของเซลล์ในอินทนิลน้ำ

จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาการทดสอบเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารจะออกฤทธิ์แรงมากขึ้นและเมื่อทดสอบเซลล์นานขึ้นพบว่าการเจริญของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งสามารถประเมินระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบจากผลการศึกษาการเจริญของเซลล์ (growth curve) เพื่อหาค่าการเจริญเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของเซลล์ (doubling time) ก่อน

ข้อเสนอแนะ

1.ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้สารสกัดสมุนไพรในผลิตภัณฑ์ให้มีความปลอดภัยต้องคำนึงถึงชนิดและความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาใช้เป็นสำคัญ ซึ่งข้อมูลพื้นฐานนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์และพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

2.ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

การศึกษาการเจริญของเซลล์เมลาโนมาในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดจากอินทนิลน้ำและยางเลือดมังกร มีข้อเสนอแนะดังนี้

2.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในด้านอื่น ๆ

2.2 การทดสอบของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์หลายชนิดเพิ่มขึ้น เช่น ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางควรมีการใช้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับผิวหนัง ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast) เซลล์คีราติโนไซต์ (Keratinocyte) เซลล์เมลาโนไซต์ (Melanocyte) เป็นต้น

2.3 ในการทำการทดลองควรระวังการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองอุปกรณ์ในการทดลอง

2.4 ใช้สารสกัดสมุนไพรชนิดผงจะสามารถปรับระดับความเข้มข้นได้โดยไม่มีฤทธิ์ของตัวทำละลายมารบกวนในการทดสอบ

2.5 ควรส่งเสริมความพร้อมของอุปกรณ์และห้องปฏิบัติการสำหรับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร