รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลในเซลล์เพาะเลี้ยงและการพัฒนาผลิตภัณฑ์ของสารสกัดแกแล

In vitro wound healing activity and product development of *Maclura cochinchinensis* extract

หัวหน้าโครงการ

ภก.ผศ.ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์

โครงการวิจัยประเภททุนอุดหนุนงานวิจัย งบประมาณเงินรายได้

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๓

สัญญาเลขที่RX 03/2563

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลในเซลล์เพาะเลี้ยงและการพัฒนาผลิตภัณฑ์ของสารสกัดแกแล

In vitro wound healing activity and product development of *Maclura cochinchinensis* extract

หัวหน้าโครงการ

ภก.ผศ.ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ทั้งในด้านการเก็บตัวอย่างการใช้เครื่องมือวิจัยได้แก่ คุณกนกพร ก้อนทรัพย์ คุณณัฐสุดา อินสอน และได้รับความอนุเคราะห์ของห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณรายได้ส่วนงาน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 เลขที่สัญญา RX 03/2563

จึงขอขอบคุณทุกท่านมา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ประเทศไทยถือเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง พืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ประโยชน์จึงมีหลากหลายชนิด แกแล หรือ *Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner วงศ์ Moraceae พบตามป่าโปร่งทางภาคกลาง ภาคตะวันออกและภาคใต้ของไทย เป็นสมุนไพรที่มีใช้อย่างแพร่หลายในภูมิปัญญาพื้นบ้าน เช่น ใช้แก่น แก้ไข้รากสาด ท้องร่วง บำรุงเลือด รักษาบาดแผลและเป็นยาขับปัสสาวะ สารสำคัญที่พบในแก่นแกแล ได้แก่ สารกลุ่ม flavonoids, steroid และ triterpene ฤทธิ์ทางชีวภาพของแกแลที่มีการรายงาน ได้แก่ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ลดไข้ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ในการทดลองครั้งนี้จึงทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลในเซลล์เพาะเลี้ยง พร้อมทั้งพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดแกแลความเข้มข้น 0.1 mg/ml เซลล์ไม่สามารถเคลื่อนที่ติดกันได้ จึงแสดงว่าสารสกัดแกไม่มีฤทธิ์สมานแผล แต่พบว่าสารสกัดแกแลสามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml โดยมีเปอร์เซ็นต์การเจริญของเซลล์เท่ากับ 49.02±5.51% ในขณะที่วิตามินซีความเข้มข้น 0.1 mg/ml มีเปอร์เซ็นต์การเจริญของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 13.00±3.60% และเมื่อศึกษาสารสำคัญในสกัดด้วยวิธีรงคเลขผิวบางพบสารหลักอยู่สองชนิดคือ oxyresveratrol และ morin หลังจากนั้นนำสารสกัดไปพัฒนาเป็นตำรับเจลพบว่า เจลผสมสารสกัดจากแกแลมีลักษณะเป็นเจลใสสีเหลืองไม่ขุ่น แต่หลังการทดสอบความคงตัวสีจางลงเล็กน้อย และสารสกัดแกแลยังละลายน้ำได้ไม่ดีนัก ดังนั้นควรต้องเพิ่มการละลายของสารสกัดก่อนแล้วจึงพัฒนาสูตรตำรับเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้กว้างมากขึ้น รวมทั้งจะช่วยให้ใส่ในตำรับได้ปริมาณมากขึ้น ซึ่งอาจส่งผลให้ตำรับมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจต่อไป

Abstract

Thailand is one of the countries with high biodiversity. *Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner (Moraceae) found in sparse forests in the central, Eastern and Southern of Thailand. It is a herb that has been widely used in folk wisdom such as the treatment of typhoid fever, anti-diarrhea, wound healing and as a diuretic. The main substances found in the heartwood are flavonoids, steroid and triterpene. The biological activities of *Maclura cochinchinensis* were reported to treat peptic ulcer, antipyretic and anti-inflammatory effects. In this experiment, wound healing activity was tested in cell cultures along with developing into a product. The results showed that *M. cochinchinensis* extract at a concentration of 0.1 mg / ml unable to heal the wound in cell media. Therefore, the extract has no wound healing effect. Nevertheless, it was found that *M. cochinchinensis* extract was able to stimulate cell growth at a concentration of 0.1 mg / ml with cell growth percentage of 49.02 ± 5.51 while vitamin C at a concentration of 0.1 mg / ml was 13.00 ± 3.60%. The main substances in the extract were found to be oxyresveratrol and morin analyzing by TLC method. After that, the extract was developed into a gel formulation. Gel with extract from *M. cochinchinensis* express a clear, yellow, not cloudy gel. However, after the stability test, the color slightly faded. Additionally, the water-solubility of the extract should be increased for helping to add more quantities in the formulation. This may result in an interesting pharmacological effect of the formulation in the further use.

สารบัญ

บทที่ 1 3

บทนำ 3

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา 3

2. ขอบเขตของโครงการวิจัย 4

3. กรอบแนวทางความคิดของโครงการวิจัย 4

4. ทฤษฎีและแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัยฯ 4

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 7

บทที่ 2 8

วิธีดำเนินการวิจัย 8

1. ตัวอย่างพืชสมุนไพร 8

2. แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 8

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ 8

4. ยาปฏิชีวนะ 8

5. สารเคมี 8

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ 9

7. วิธีการดำเนินการวิจัย 10

7.1 การเตรียมสารสกัดจากแกแล 10

7.2 การวัดค่าความเข้มสีของสารสกัดแกแลโดยการเตรียมเป็นแผ่นฟิล์ม 10

7.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 10

7.5 การเตรียมตำรับ 12
7.6 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 14
บทที่ 3 16
ผลการวิจัยและอภิปราย 16
1. การสกัดแก่นแกแล 16
2. การวัดความเข้มสีของแกแล 16
3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 16
3.1 การทดสอบฤทธิ์เพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation activity) ในเซลล์เพาะเลี้ยง 16
3.2 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลโดยใช้แบบจำลองการหายของบาดแผล (*in vitro* wound healing model) ด้วยวิธี Scratch assay 17
4. วิเคราะห์สารสำคัญโดยวิธี HPTLC 19
5. การพัฒนาตำรับเจลผสมสารสกัดจากแกแล 21
6. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของตำรับเจลผสมสารสกัดจากแกแลด้วยวิธี Disc diffusion 23
บทที่ 4 25
สรุปผลการวิจัย 25
บทที่ 5 26
ข้อเสนอแนะ 26
เอกสารอ้างอิง 27
ภาคผนวก 29

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

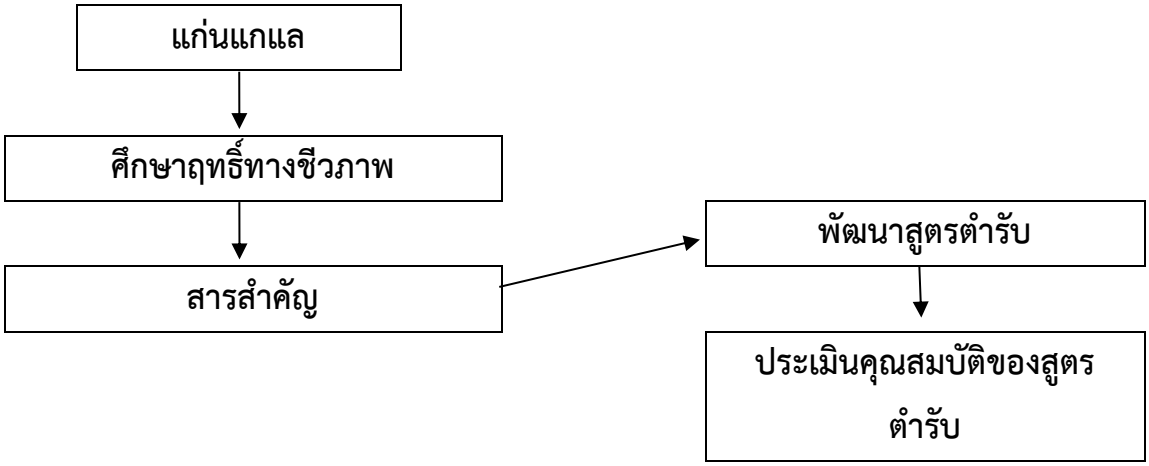
ในอดีตการติดเชื้อของบาดแผลเป็นสาเหตุการตายของผู้ป่วยจำนวนมากแต่ในปัจจุบันมียาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ปัญหาใหญ่จึงกลายเป็นความผิดปกติในการหายของบาดแผลซึ่งมีกระบวนการที่ซับซ้อนซึ่งสรุปได้ 4 ขั้นตอนคือ hemostasis, inflammation, proliferation, และ remodeling[1] หากกระบวนการเหล่านี้ดำเนินการได้ไม่สมบูรณ์จะทำให้บาดแผลไม่หายสนิทและอาจเป็นสาเหตุสำคัญของความพิการ ทุพลภาพ รวมทั้งการเสียชีวิตของผู้ป่วยได้ โดยปัจจุบันมีการค้นหาสมุนไพรจำนวนมากเพื่อช่วยรักษาบาดแผลให้หายได้เร็วขึ้น ประเทศไทยถือเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง พืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ประโยชน์จึงมีหลากหลายชนิด บางชนิดมีหลักฐานการใช้ประโยชน์ในเชิงพื้นบ้านมาอย่างยาวนาน แกแล หรือ *Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner วงศ์ Moraceae พบตามป่าโปร่งทางภาคกลาง ภาคตะวันออกและภาคใต้ เป็นสมุนไพรที่มีใช้อย่างแพร่หลายในภูมิปัญญาพื้นบ้าน เช่น ใช้แก่นแก้ไข้รากสาด ท้องร่วง บำรุงเลือด รักษาบาดแผลและเป็นยาขับปัสสาวะ สารสำคัญที่พบในแก่นแกแล ได้แก่ สารกลุ่ม flavonoids, steroid และ triterpene ฤทธิ์ทางชีวภาพของแกแลที่มีการรายงาน ได้แก่ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ลดไข้ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการทดลองของผู้วิจัยพบว่าสารสกัดจากแก่นแกแลมีฤทธิ์ลดอักเสบได้ดีเทียบเท่า dexamethasone[2] จึงต้องการทำการทดลองฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยจะหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว พร้อมทั้งวิเคราะห์ปริมาณและการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในโครงการนี้

2. ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. เก็บแก่นแกแลมาสกัด แล้วระเหยแห้งสารสกัดแล้วนำสารสกัดหยาบ มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2. พัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดแกแล

3. กรอบแนวทางความคิดของโครงการวิจัย



4. ทฤษฎีและแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัยฯ

แกแล หรือ *Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner วงศ์ Moraceae จัดเป็นไม้พุ่มรอเลื้อย ชอบขึ้นตามชายน้ำ ตามเถามีหนามตลอดเถา เนื้อไม้สีค่อนข้างขาว มียางขาว แก่นเป็นสีเหลือง ใบเดี่ยวเรียงสลับ เวียนรอบกิ่งรูปวงรี กว้าง 1 - 3.5 ซม. ยาว 2 - 9 ซม. มีหนามแหลมออกตรงซอกใบ 1 อัน ยาวประมาณ 1 ซม. ดอกช่อ ออกที่ซอกใบ แยกเพศ อยู่คนละต้น รูปกลม ผลเป็นผลรวม มีเกิดตามป่าโปร่งทางภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคใต้ ใช้แก่นซึ่งให้สีเป็นสีเหลืองสด เหมาะแก่การย้อมไหมเป็นสีเหลือง แกแลเป็นสมุนไพรที่มีใช้อย่างแพร่หลายในภูมิปัญญาพื้นบ้านของประเทศในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน ตำรายาไทยโบราณ ใช้แก่น แก้ไข้รากสาด ท้องร่วง บำรุงเลือด รักษาแผลและเป็นยาขับปัสสาวะ

สารสำคัญที่พบในแก่นแกแล ได้แก่ สารกลุ่ม flavonoids, steroid และ triterpene เช่น campesterol steroid, resveratrol, stilbene, 2-3'-4-5'-tetrahydroxy:stilbene, stigmasterol steroid, morin, prenylated benzophenones และ prenylated xanthones [3-5]

ฤทธิ์ทางชีวภาพของแกแลที่มีการรายงาน ได้แก่ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร, ฤทธิ์ลดไข้, ลดการอักเสบของตับ, ฤทธิ์ต้านไวรัส, ฤทธิ์ต้านเชื้อรา และฤทธิ์ต้านการอักเสบ[6-10]

กระบวนการสมานแผลเปนกระบวนการของรางกายที่มีความซับซ่อน เปนกระบวนการที่มีความเกี่ยวข่องกับระบบทางชีวภาพและภูมิคุ่มกัน กระบวนการสมานแผลประกอบด่วย 4 ระยะที่ตอเนื่อง ทับซ่อน และเปนระบบที่แมนยำ ดังนั้นการขัดขวาง การเกิดความผิดปกติ หรือการยืดระยะเวลาของกระบวนการสมานแผลจะสงผลโดยตรงให่การสมานแผลช่าลงหรือไมเกิดการสมานของแผลเรื้อรัง การสมานแผลประกอบด่วย 4 ระยะหลัก ไดแก hemostasis, inflammation, proliferation, และ remodeling[1,11]

1. Hemostasis กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นทันทีหลังจากเกิดบาดแผล หลอดเลือดจะเกิดการหดตัวจากผลของ vasoactive mediators (epinephrine, norepinephrine, prostaglandins,serotonin, และ thromboxane) เพื่อลดการสูญเสียเลือด เกล็ดเลือดจะเกาะกลุมกัน และสร่างไฟบรินเพื่อห่ามเลือด ก่อนไฟบรินและเนื้อเยื่อรอบข้าง จะหลั่ง pro-inflammatory cytokines และ growth factors เชนtransforming growth factor (TGF)-ß, platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), และ epidermal growth factor (EGF) เมื่อสามารถห่ามเลือดไดแล่ว เซลลที่เกี่ยวข่องกับกระบวนการอักเสบจะเคลื่อนตัวมายังแผล (chemotaxis) และกระตุนเขาสูระยะตอไป นั่นคือระยะ inflammation

2. Inflammation ระยะนี้จะเริ่มต่นเมื่อเกิดการแทรกซึมของ neutrophils, macrophages และlymphocytes เขาสูบริเวณแผล หนาที่หลักของ neutrophils คือ การกำจัดเชื้อโรค ตลอดจนเศษของเซลล์ ที่อยูบริเวณแผล ซึ่งจะพบ neutrophils ไดภายใน 48 ชั่วโมงแรกของการเกิดแผล สวนmacrophage มีหน่าที่ในการสมานแผลหลายประการ ในชวงแรกของการเกิดแผล macrophage จะหลั่งcytokines เพื่อกระตุ่นให่เกิดกระบวนการอักเสบโดยการกระตุ่น leukocytes อื่นๆ และ macrophages ยังเหนี่ยวนำและกำจัด apoptotic cells (รวมทั้ง neutrophils) เมื่อ macrophages ทำลาย apoptotic cells แล่ว จะเกิดการเปลี่ยนแปลงหนาที่ไปกระตุน keratinocytes, fibroblasts, และ angiogenesis เพื่อกระตุนการสรางเนื้อเยื่อใหม ซึ่ง

ในขั้นตอนนี้ macrophages จะสงเสริมให้กระบวนการสมานแผลเข้าสู่ระยะ proliferation T-lymphocytes เคลื่อนตัวมายังบริเวณแผล ตามด้วย inflammatory cells และ macrophages ซึ่งจะพบได้สูงสุดในช่วงท้ายของระยะ proliferation และช่วงต้นของระยะ remodeling จะพบ T-lymphocytes ได้ประมาณ 72 ชั่วโมงหลังจากการเกิดบาดแผล บทบาทของ T-lymphocytes ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่การชะลอการแทรกซึมมายังบริเวณแผลของ T-lymphocytes ส่งผลให้การสมานแผลเกิดได้ไม่ดี นอกจากนี้ gamma-delta T-5cell ของผิวหนัง เกี่ยวข้องกับการสมานแผล ได้แก่ การรักษาบูรณภาพของเนื้อเยื่อ การป้องกันเชื้อโรค และการควบคุมการอักเสบ กรณีที่ไม่มี gamma-delta T-cell หรือมีน้อย จะส่งผลให้แผลปิดได้ช้าลงและลดการproliferation ของ keratinocytes บริเวณแผล โดย lymphocytes มีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันเป็นหลัก

3. Proliferation ระยะนี้จะเกิดขึ้นตามหลัง หรือเหลื่อมล้ำกับระยะ inflammation การสมานแผลจะเข้าสู่ระยะนี้เมื่อเกิดการสร้างเยื่อบุผิวใหม่ (re-epithelialization) ในชั้นหนังแท้ที่ซ่อมแซมตัวเองแล้วจะพบfibroblasts และเซลล์เยื่อบุผิวได้มาก โดยจะช่วยส่งเสริมการสร้างเส้นเลือดฝอยใหม่ การสร้าง collagen และgranulation tissue ในขณะที่บริเวณพื้นของแผล (wound bed) fibroblasts จะสร้างคอลลาเจน glycosaminoglycans และ proteoglycans ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของ extracellular matrix (ECM) โดยที่ผิวหนังมีองค์ประกอบหลักของ ECM เป็น type I และ type III collagen เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการproliferation และการสร้าง ECM แล้ว กระบวนการสมานแผลจะเข้าสู่ระยะที่ 4 นั่นคือระยะ remodeling

4. Remodeling ในระยะนี้จะเกิดการถดถอย (regression) ของเส้นเลือดฝอยที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ ทำให้ความหนาแน่นของหลอดเลือดบริเวณแผลกลับสู่ภาวะปกติ ลักษณะที่สำคัญของระยะนี้คือ ECM remodelingเพื่อให้มีสภาวะใกล้เคียงเนื้อเยื่อปกติ นอกจากนี้ stem cells ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสมานแผล กรณีของ epidermal stem cells ที่อยู่บริเวณรูขุมขน (hair follicles) และฐานของชั้นหนังกำพร้า เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของ keratinocytes ที่เคลื่อนตัวสู่ด้านบนของชั้นหนังกำพร้าและการสร้างเยื่อบุผิวใหม่ของแผล ส่วน bone marrow-derived cells มีอวัยวะเป้าหมายอยู่ที่ผิวหนังปกติ และไขกระดูกจะพบ hematopoietic stem cells และ mesenchymal stem cells โดย bone marrow-derived cells สามารถเปลี่ยนแปลงตัวเองไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิด ได้แก่ adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, fibroblasts, และ keratinocytes ซึ่ง endothelial progenitor cells ที่มาจาก hematopoietic stem cells เป็นเซลล์หลักที่สนับสนุนการสร้างหลอดเลือดใหม่ ทั้ง bone marrow-derived cells และ

endothelial progenitor cells เกี่ยวของกับกระบวนการสมานแผล การที่เกิดภาวะออกซิเจนต่ำ (hypoxia) เมื่อเกิดแผลแล้วจะเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ endothelial progenitor cells เขาสูกระแสเลือด ซึ่งเปนสวนสำคัญของกระบวนการสรางหลอดเลือดใหม่

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสารสกัดจากพืชวงศ์ Moraceae เช่น พืชสกุลหม่อนและมะเดื่อมีรายงานผลทางวิทยาศาสตร์ในการสมานบาดแผลได้[12,13] ดังนั้นในการวิจัยชิ้นนี้จึงทำการศึกษาแกแลซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกันและมีรายงานการใช้ในการรักษาแผลและลดอาการอักเสบของแผล

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ได้ข้อมูลองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์เช่น สารสำคัญจากแกแลที่มีฤทธิ์รักษาบาดแผลเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดสารควบคุม (Marker) ได้สูตรตำรับที่มีคุณภาพ

2. สามารถเผยแพร่ผลงานในวารสารวิชาการอย่างน้อย 1 เรื่อง

3. สามารถถ่ายทอดความรู้ เทคนิคการแยกสาร ทดสอบฤทธิ์ การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์และเสริมสร้างนักศึกษาให้เป็นนักวิจัย

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างพืชสมุนไพร

แก่นแกแลจากจังหวัดนครปฐม

2. แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

- *S. aureus* ATCC 25923
- *S. aureus* ATCC 43300 (สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ methicillin หรือ MRSA)
- *S. epidermidis*

จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ ฝ่ายทรัพยากรกลางทางห้องปฏิบัติการ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Mueller-Hinton agar (MHA) + 2%NaCl
- Trypticase soy agar (TSA) + 2%NaCl
- Trypticase soy broth (TSB) + 2%NaCl

4. ยาปฏิชีวนะ

- Oxacillin
- Cefoxitin ขนาด 30 µg/disc

5. สารเคมี

- เอทานอล 95%
- NaCl
- น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ
- Sodium carboxymethylcellulose (low viscosity grade)

6. เครื่องมือและอุปกรณ์

- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
- เครื่องปั่นไฟฟ้า
- ชุดสกัดด้วยวิธี Soxhlet
- เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)
- เครื่องชั่งหยาบทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- ตู้อบ (Incubator)
- ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (Sterile Swab)
- Autopipette P1000, P200, P20
- Microcentrifuge tube
- Pipette tip ขนาด 0.1-10 µl, 1-200 µl, 100-1000 µl
- จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- Antibiotic Assay disk (AA-disk)
- Vortex
- Forceps

7. วิธีการดำเนินการวิจัย

7.1 การเตรียมสารสกัดจากแกแล

1) นำแก่นของแกแลที่ตากแห้งมาทำให้เป็นผง ชั่งน้ำหนักพร้อมทั้งบันทึกผล
2) นำแก่นของแกแลที่เป็นผงละเอียดสกัดด้วยวิธีต้มในน้ำและสกัดด้วยวิธี Sonicationโดยใช้ 80% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย
3) กรองสารสกัดที่ได้ผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
4) นำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary evaporator และชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ จากนั้นเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำมาทดสอบ

7.2 การวัดค่าความเข้มสีของสารสกัดแกแลโดยการเตรียมเป็นแผ่นฟิล์ม

เตรียมแผ่นฟิล์มแกแลโดยใช้ SCMC ความเข้มข้น 2% ผสมสารสกัดแกแลความเข้มข้น 0.2 mg/ml เทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อแบบแก้ว 10 ml อบให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน (hot air oven; Memmert, Germany) อุณหภูมิ 45 ° C แล้ววัดค่าความเข้มสีด้วยเครื่อง (DermaLab Combo, Denmark)

7.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

7.3.1 การทดสอบฤทธิ์เพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation activity) ในเซลล์เพาะเลี้ยง

การทดสอบฤทธิ์เพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation activity) ด้วยวิธี WST-1 cell proliferation assay เป็นการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด L929 (mouse subcutaneous connective tissue) และเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HeLa cell (human cervical carcinoma) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเติบโต และเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมบาดแผล รวมถึงการหายของบาดแผลใน in vitro wound healing model

Cell proliferation assay เป็นวิธีการศึกษาผลของสารทดสอบต่อการเจริญเติบโต และการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยง เทคนิคการทดสอบด้วยวิธี WST-1 cell proliferation assay อาศัยหลักการที่เซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถย่อย WST-1 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-

nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) ให้เป็นสารสีเหลือง ซึ่งละลายในน้ำได้ดี เมื่อใส่สารนี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ และบ่มเพาะกับเซลล์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสารตั้งต้น คือ WST-1 ไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลือง เมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นไปวัดการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer หากเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน จะเกิดสารสีเหลืองปริมาณมาก ทำให้การดูดกลืนแสงมีค่ามาก แต่หากเซลล์ไม่เจริญเติบโต หรือตายที่อาจมาจากความเป็นพิษของสารทดสอบ ค่าดูดกลืนแสงจะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

วิธีการทดสอบด้วย WST-1 cell proliferation assay

เจือจางเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย completed medium ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 1 X 105 cell/ml ด้วยวิธี trypan blue assay และนับเซลล์ด้วยเครื่อง Hemocytometer เติมเซลล์เพาะเลี้ยงที่ปรับความเข้มข้นแล้วลงใน 96 -well plate หลุมละ 100 μl บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 ºC สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ใน CO2 incubator เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับภาชนะ หลังจากนั้น เติมสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณหลุมละ 100 μl แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง และใช้ Doxorubicin ความเข้มข้น 2 μg/ml เป็น positive control บ่มเซลล์และสารทดสอบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเติม 5% WST-1 ทุกหลุม หลุมละ 50 μl บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยใช้ความยาวคลื่น 630 nm เป็น reference wavelength

7.3.2 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลโดยใช้แบบจำลองการหายของบาดแผล (*in vitro* wound healing model) ด้วยวิธี Scratch assay

หลังจากเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง ให้เติมเซลล์เพาะเลี้ยง ปริมาตร 500 µl และอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 500 µl ลงใน 6-well plate บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 ºC สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ pipette tip ขนาดปริมาตร 200 µl ขีดเส้นพาดขวางผ่านกลางหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เป็นแนวยาวตามที่กำหนดเพื่อให้เกิดช่องว่าง (artificial wound) ล้างเอาเซลล์ที่หลุดออกจากการขีดออกไป แล้วนำเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นไปบ่มกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1,000 µl บันทึกภาพเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เวลา 0, 2, 4, 8, และ 16 ชั่วโมง ฤทธิ์กระตุ้นการหายของแผลของสารสกัดสมุนไพร ประเมินจากการลดลงของพื้นที่ซึ่งเป็นที่ว่างตามรอยขีดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

7.5 การเตรียมตำรับ

7.5.1 วิธีการเตรียมตำรับเจล

เตรียมเจลเบสโดยละลาย SCMC ในน้ำ และกระจายผงแกแลด้วย Tween 80 แล้วผสมสารทั้งสองเข้าด้วยกันจากนั้นผสมสารอื่น ๆ ดังตารางที่ 1 ปรับปริมาตรด้วยน้ำ สำหรับสูตรควบคุมไม่ใส่แกแล แต่ละลาย SCMC ในน้ำแล้วผสมสารอื่น ๆ และปรับปริมาตร

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบในตำรับเจล

ส่วนประกอบ	หน้าที่ในตำรับ	เจลเบส (%w/w)	เจลแกแล (%w/w)
แกแล	active ingredient	-	0.4
SCMC	gelling agent	2	2
PG	humectant	5	5
Tween 80	surfactant	2	2
Disodium EDTA	chelating agent	1	1
conc. paraben	preservative	1	1
water qs to	vehicle	100	100

7.5.2 การประเมินคุณสมบัติของตำรับ

7.5.2.1 การประเมินลักษณะทางกายภาพของตำรับ

การประเมินลักษณะทางกายภาพเป็นการสังเกตลักษณะของเจล ค่าความเป็นกรดด่าง รัศมีการกระจายตัว และความหนืด โดยมีวิธีทำดังนี้

- สังเกตลักษณะความขุ่นใสของเนื้อเจล สี แล้วบันทึกผล

- ประเมินความเป็นกรดด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter (Mettler Toledo, USA) ทดสอบ 3 ครั้ง บันทึกผล หาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- วัดรัศมีการกระจายตัวของเจลโดยการใช้กระจก

เตรียมแผ่นกระจกขนาด 15x15 cm จำนวน 2 แผ่น ให้ปิเปตเจล 1 ml ลงที่จุดกึ่งกลางที่ระบุไว้ใต้กระจกแล้วปิดทับด้วยแผ่นกระจกอีกแผ่น วัดรัศมีของเจลที่กระจายตัวออกจากจุดกึ่งกลางจำนวน 6 จุด ทดสอบ 3 ครั้ง บันทึกผล หาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

-วัดความหนืดโดยใช้เครื่องวัดความหนืด (Kinexus, Malvern, UK) ด้วย shear rate 0-100 /secทดสอบที่ 25 °C

7.5.2.2 ประเมินความคงตัวของตำรับ (stability test)

การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ทำเพื่อประเมินความคงตัวของยาและตำรับยา การศึกษาความคงตัวทำตามแนวทางของ ICH การศึกษาความคงตัวโดยบรรจุตำรับในขวดแก้วสีชา ทดสอบโดยการเก็บตำรับในตู้เย็น 4 ° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเข้าเครื่องอบลมร้อน (hot air oven; Memmert, Germany) 45 ° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบรวมทั้งสิ้น 6 รอบแล้วนำมาประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ (ตะกอน สี) ค่าความเป็นกรดด่าง รัศมีการกระจายตัว และความหนืด เปรียบเทียบกับก่อนการทดสอบ โดยทำตามวิธีเดียวกับการทดสอบข้างต้น

7.6 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

7.6.1 การเตรียม Disc จากสารสกัดแกแลและตำรับเจลผสมแกแล

1) ชั่งสารสกัดจากแกแลจำนวน 0.1 g ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ml จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 mg/ml
2) เก็บ Stock. ของสารสกัดที่ได้โดยปิเปตสารสกัดบรรจุลงใน microcentrifuge tube ที่ปราศจากเชื้อ หลอดละ 1 ml จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C
3) ปิเปตสารสกัดจากแกแลที่ความเข้มข้น 100 mg/ml ปริมาตร 20 µl หยดลงบนแผ่น Antibiotic assay disk (AA-disc) ที่ปราศจากเชื้อ จะได้ Disc บรรจุสารสกัดที่ความเข้มข้น 2 mg/ml
4) สำหรับ disc จากตำรับเจลผสมแกแลแช่แผ่น Antibiotic assay disk (AA-disc) ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีตำรับเจลแกแล

7.6.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของตำรับเจลผสมแกแลด้วยวิธี Disc diffusion (วิธี Kirby-Bauer disc diffusion ตามมาตรฐานของ NCCLS)

1) นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *S. epidermidis* จาก Stock. เชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิ -80°C ประมาณ 1 loopful เพาะลงบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) + 2% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง
2) ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่ขึ้นบนผิวหน้าอาหาร TSA+2%NaCl ประมาณ 5-7 โคโลนี เพาะลงในอาหาร Trypticase soy broth (TSB) + 2% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 4 ชั่วโมง
3) ปรับปริมาณเชื้อด้วย 0.85%NaCl โดยให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อประมาณ $1.5x10^8$ CFU/ml
4) ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารแขวนลอยของเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3) บิดพอหมาด ๆ และนำมาป้ายบนผิวหน้าอาหาร Muller Hinton agar + 2% NaCl ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยป้ายเป็นแนวระนาบ 3 ระนาบทำมุมกันประมาณ 60 องศา
5) นำ Disc เจลผสมสารสกัดแกแลที่เตรียมวางบนผิวหน้าของอาหาร Muller Hinton agar + 2% NaCl ที่ป้ายแบคทีเรียทดสอบและกดเบา ๆ เพื่อให้ Disc ติดสนิทกับผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง

6) ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นพร้อมทั้งบันทึกผล
7) สำหรับชุดควบคุมการทดสอบลบ (Negative control) คือแผ่น AA-Disc ที่บรรจุเจลที่ไม่ได้ผสมสารสกัดแกแล (Gel-based formulation) และชุดควบคุมการทดสอบบวก (Positive control) คือยาปฏิชีวนะ Cefoxitin เข้มข้น 30 ไมโครกรัม

บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปราย

1. การสกัดแก่นแกแล

นำผงแก่นแกแลมาสกัดด้วยวิธี sonication ที่อุณหภูมิ 40 ° C นาน 30 นาที โดยใช้ 80% เอทานอล เป็นตัวทำละลายโดยใช้สัดส่วน 1:20 กรองด้วยกระดาษกรองนำส่วนที่เป็นของเหลวไประเหยเอาตัวทำละลายออก และส่วนที่เป็นตะกอนเอาไปสกัดซ้ำอีกครั้ง เมื่อได้สารสกัดหยาบแล้วให้เก็บในที่มืดอุณหภูมิ -20 ° C

2. การวัดความเข้มสีของแกแล

หน่วยสีระบบ L*a*b* นิยมกันมากในการนำมาใช้วัดค่าสีและใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุดในหลาย ๆ วงการ โดยหน่วยสีนี้เป็นประเภทที่มีสเกลสม่ำเสมอ ค่า L* จะหมายถึงความสว่าง ส่วน a* และ b* จะเป็นค่าสัมประสิทธิ์สี โดยมีรายละเอียดดังนี้

L* บ่งบอกถึงความสว่างมีค่าตั้งแต่ 0 (สีดำ) - 100 (สีขาว)

a* บรรยายแกนสีจากสีเขียว (-a*) จนถึงสีแดง (+a*)

b* บรรยายแกนสีจากสีน้ำเงิน (-b*) จนถึงสีเหลือง (+b*)

เมื่อนำแผ่นฟิล์มแกแลที่เตรียมไว้ไปวิเคราะห์ลักษณะสี พบว่ามีค่า L* 73.3 ± 0.80, a* 1.8 ± 0.47 และ b* 31.6 ± 0.86 ซึ่งบ่งบอกว่าเป็นสารสีเหลือง สว่าง

3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.1 การทดสอบฤทธิ์เพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation activity) ในเซลล์เพาะเลี้ยง

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ด้วยสารสกัดแกแลความเข้มข้น 0.0001 - 0.1 mg/ml พบว่าสารสกัดแกแลสามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml โดยมีเปอร์เซ็นต์การเจริญของเซลล์เท่ากับ 49.02±5.51% ในขณะที่วิตามินซีความเข้มข้น 0.1 mg/ml มีเปอร์เซ็นต์การเจริญของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 13.00±3.60%

3.2 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลโดยใช้แบบจำลองการหายของบาดแผล (*in vitro* wound healing model) ด้วยวิธี Scratch assay

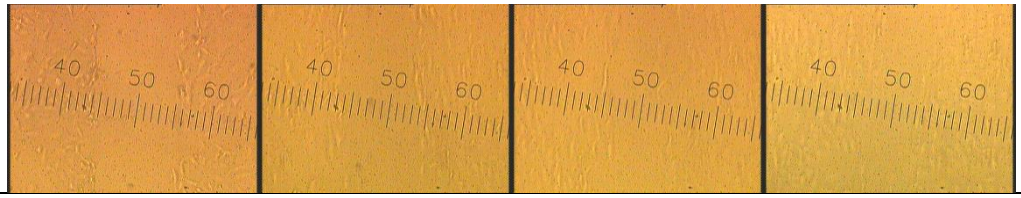
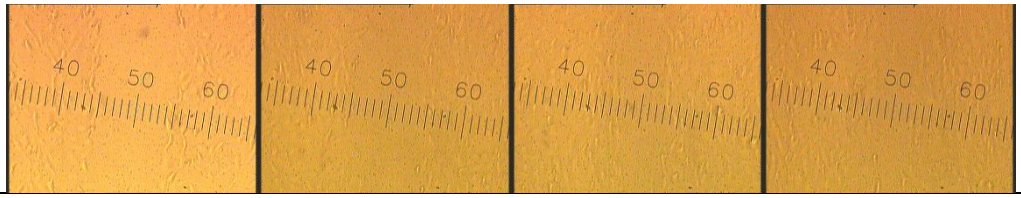
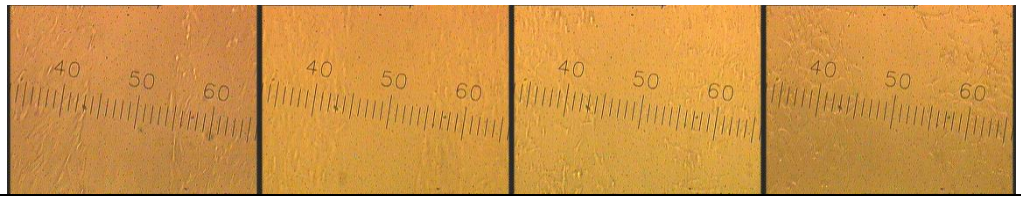
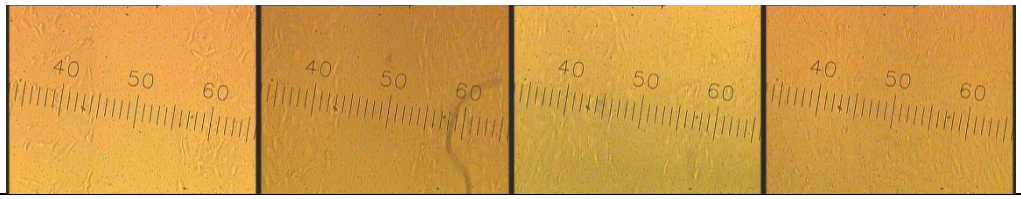
ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เมื่อได้รับตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (mg/ml) / ตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% ± SD)				
	0.0001	0.001	0.01	0.1	1
สารสกัดแกแล	104.94±1.82	107.34±2.18	100.06±3.25	78.82±1.82	61.64±2.53
วิตามินซี	101.67±2.22	102.65±1.19	100.33±3.29	96.58±3.02	83.20±1.29

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ที่ความเข้มข้น 0.0001 - 1 mg/ml พบว่าสารสกัดแกแลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 61.64 ± 2.53 % แต่ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml มีการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 75 ดังนั้นจากผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จึงใช้วิตามินซีความเข้มข้น 1 mg/ml และใช้สารสกัดแกแลความเข้มข้น 0.1 mg/ml ในการทดสอบฤทธิ์สมานแผล

จากการทดสอบฤทธิ์สมานแผลโดยใช้เซลล์ผิวหนังของมนุษย์ด้วยวิธี Scratch assay พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เซลล์ที่ได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 1 mg/ml มีการเคลื่อนที่ชิดติดกัน ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับสารสกัดแกแลความเข้มข้น 0.1 mg/ml เซลล์ไม่สามารถเคลื่อนที่ติดกันได้ จึงแสดงว่าวิตามินซีมีฤทธิ์สมานแผล แต่สารสกัดแกไม่มีฤทธิ์สมานแผล

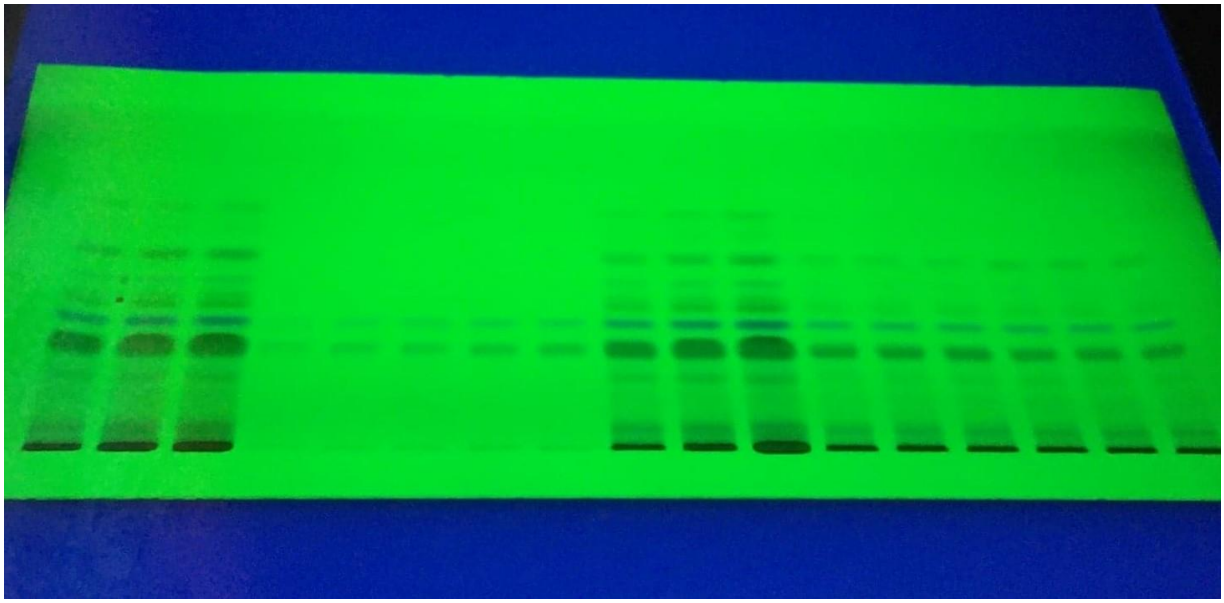
รูปภาพแสดงลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังของมนุษย์บริเวณรอยขีดเมื่อได้รับตัวอย่างทดสอบ

เวลา (ชั่วโมง)	0	8	24	48
กลุ่มควบคุม 10%DMSO				
กลุ่มควบคุม DMEM				
สารสกัด 0.1 mg/ml				
วิตามินซี 1 mg/ml				

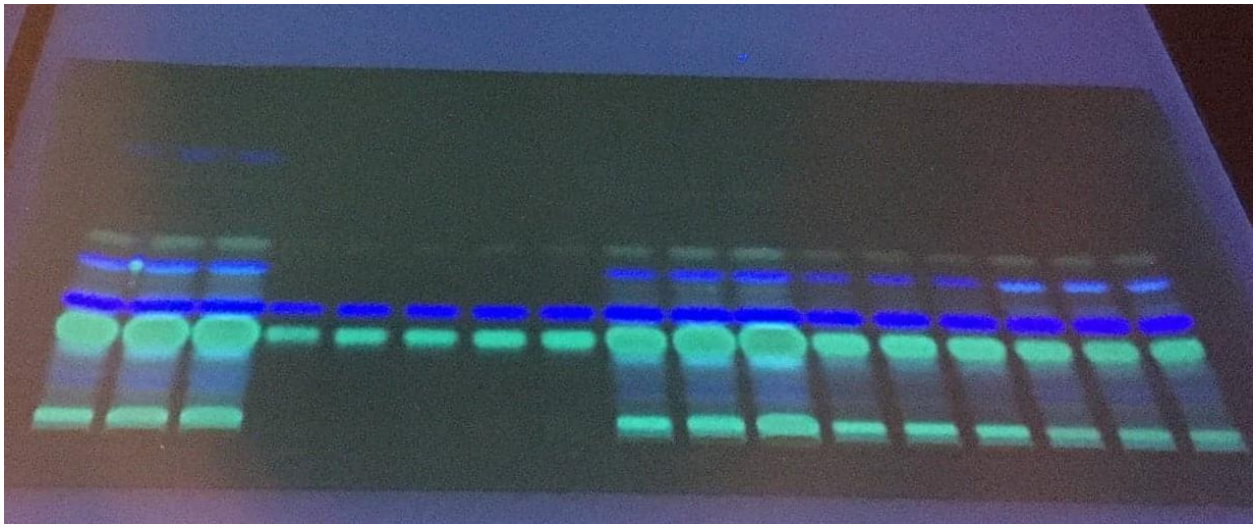
4. วิเคราะห์สารสำคัญโดยวิธี HPTLC

วิธีวิเคราะห์สารสำคัญของสารสกัดแกแลโดยเทคนิค HPTLC พบว่าเมื่อใช้ silica gel60 GF254 สามารถแยกสารได้ดังภาพด้านล่างเทียบกับสารมาตราฐาน โดยได้นำมาส่องภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 nm (a) 366 nm (b) โครมาโทแกรมของสารสกัด (c) โครมาโทแกรมของสารมาตราฐานที่นำมาเปรียบเทียบ (d)

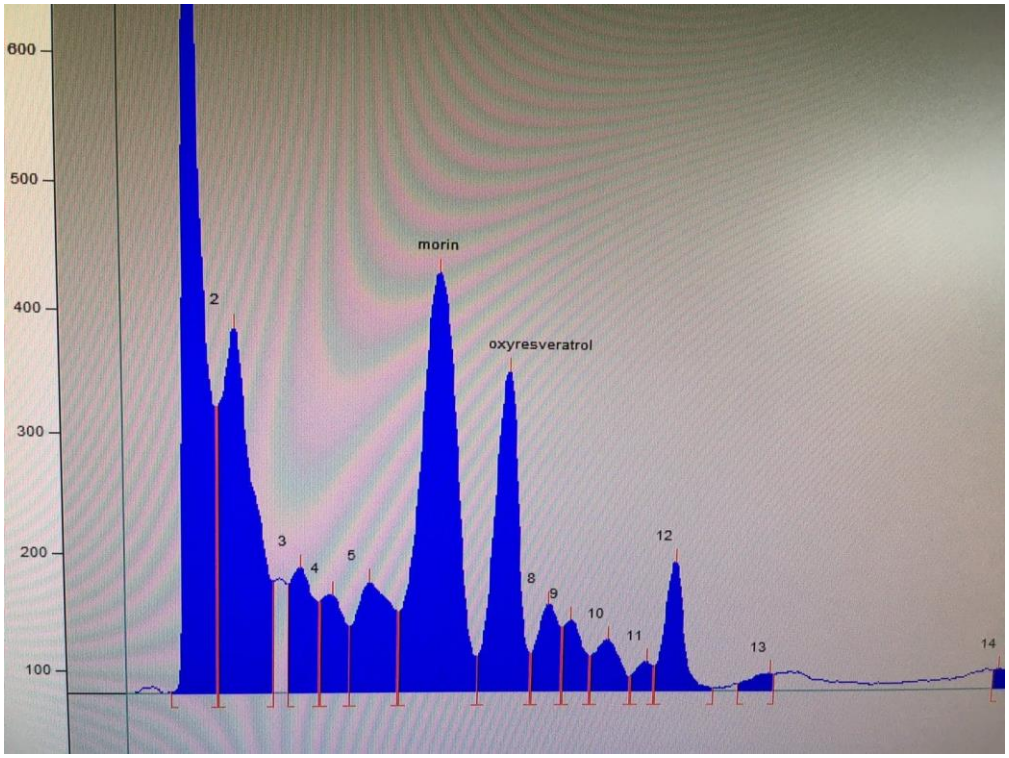
(a)



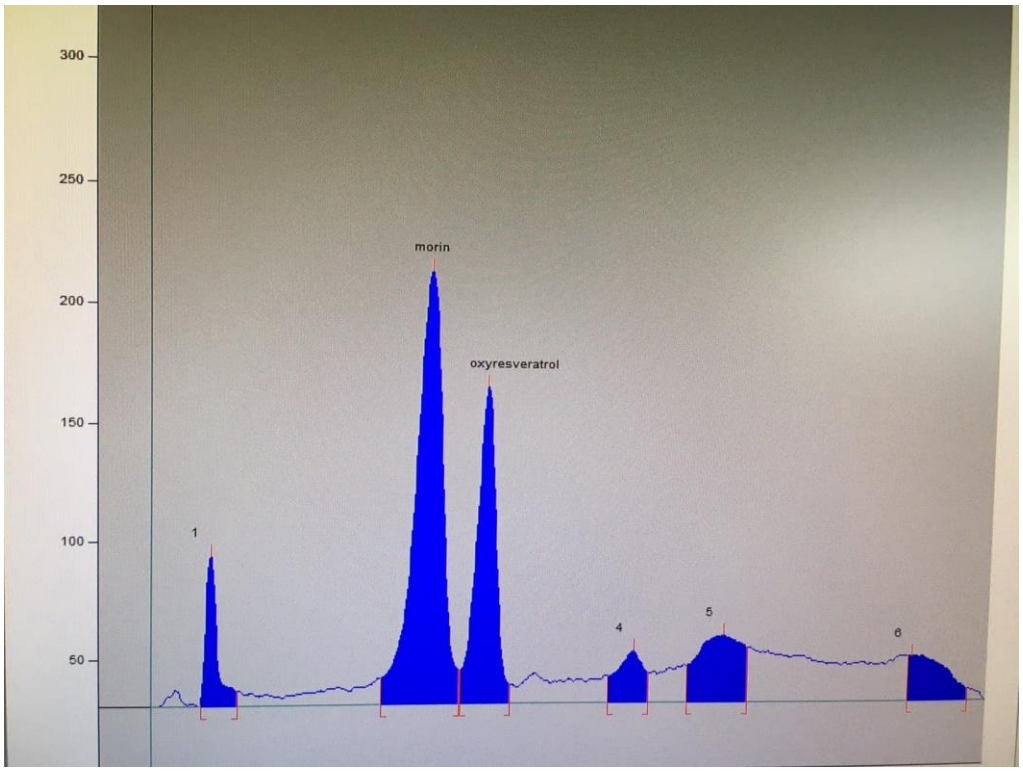
(b)



(c)


600
500
400
300
200
100
morin
oxyresveratrol
2
3
4
5
8
9
10
11
12
13
14

(d)


300
250
200
150
100
50
morin
oxyresveratrol
1
4
5
6

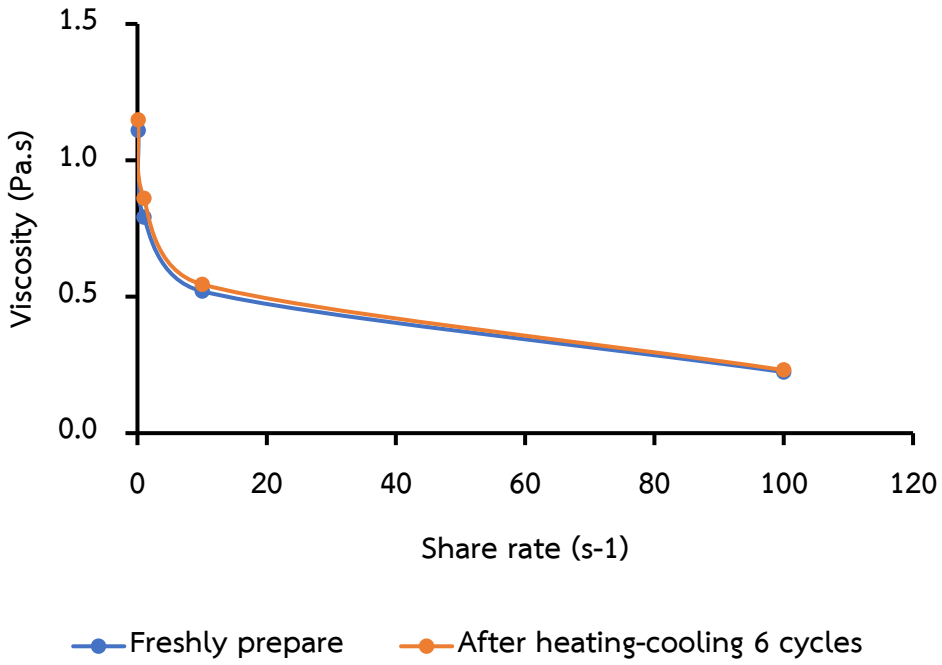
5. การพัฒนาตำรับเจลผสมสารสกัดจากแกแล

เจลผสมสารสกัดจากแกแลมีลักษณะเป็นเจลใสสีเหลืองไม่ขุ่น แต่หลังการทดสอบความคงตัวสีจางลงเล็กน้อย (รูปที่ 1) ซึ่งอาจเป็นผลจากความร้อนเนื่องจากโดยส่วนใหญ่สีในกลุ่มแคโรทีนอยด์มักถูกทำลายด้วยความร้อน การประเมินความคงตัวของตำรับพบว่าคุณสมบัติทางกายภาพก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (**Error! Reference source not found.Error! Reference source not found.**) ความเป็นกรดด่างลดลงเล็กน้อยหลังการทดสอบแต่ยังอยู่ในช่วง 5-6 ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมกับการใช้ที่ผิวหนัง รัศมีการกระจายตัวและความหนืดของผลิตภัณฑ์เมื่อวิเคราะด้วยเครื่องพบว่าหลังการทดสอบความคงตัวไม่มีผลเปลี่ยนแปลงรัศมีการกระจายตัวและความหนืดของผลิตภัณฑ์ หากเมื่อเพิ่มค่า Shear rate ความหนืดของตำรับจะมีค่าลดลงดังแสดงใน**Error! Reference source not found.**รูปที่ 3 จากผลการทดสอบที่กล่าวมาแสดงว่าผลิตภัณฑ์มีคุณสมบัติที่ดีและสามารถนำไปใช้ทดสอบต่อไปได้

รูปที่ 1 เจลผสมสารสกัดจากแกแลก่อนและหลังการทดสอบความคงตัว

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางกายภาพก่อนและหลังการทดสอบความคงตัว

คุณสมบัติทางกายภาพ	ก่อน	หลัง
รัศมีการกระจายตัว (cm ± SD)	3.10 ± 0.2	3.07 ± 0.15
pH (± SD)	5.53 ± 0.208	5.47 ± 0.153



รูปที่ 2 ความหนืดก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์

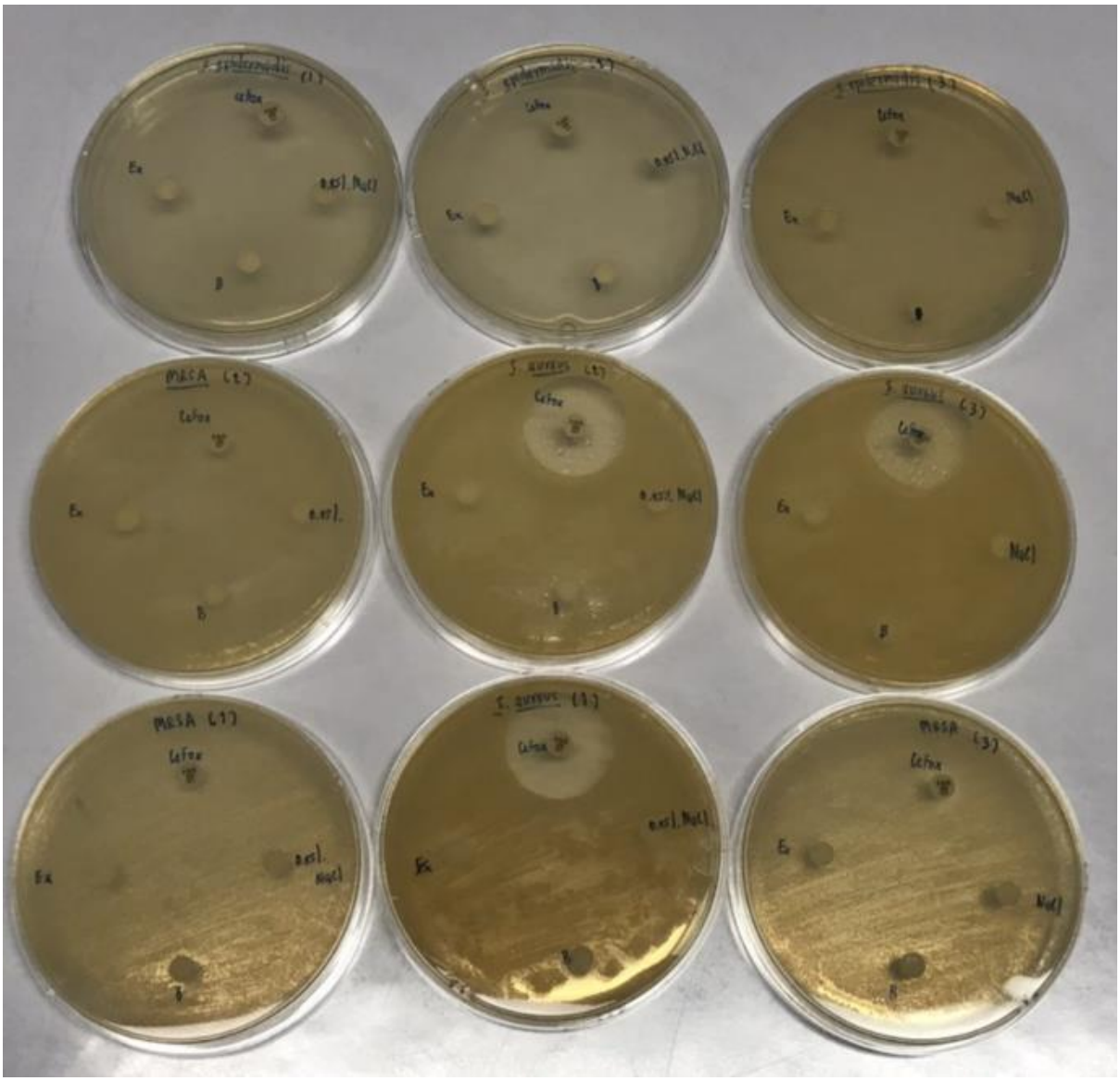
6. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของตำรับเจลผสมสารสกัดจากแกแลด้วยวิธี Disc diffusion

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดแกแลด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าตำรับเจลที่มีสารสกัดแกแลที่ความเข้มข้น 2 mg/ml (Gel formulation) และตำรับเจลที่ไม่มีสารสกัด (Gel-based formulation) ไม่เกิด Inhibition zone แสดงว่าตำรับสารสกัดจากแกแลที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิด (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) และ *S. epidermidis*) ดังแสดงใน**Error! Reference source not found.**รูปที่ 3

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากเจลสารสกัดจากแกแลที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ด้วย วิธี Disc diffusion

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone (mm) ± SD		
	S. aureus ATCC 25923	*S. aureus* ATCC 43300 (MRSA)	*S. epidermidis*
ชุดทดสอบ			
Gel formulation/1	-	-	-
Gel formulation/2	-	-	-
Gel formulation/3	-	-	-
ชุดควบคุม			
Cefoxitin 30 ug/disc	29 ±1.15	16 ±1.00	40 ±0.58
0.85% NaCl disc	-	-	-
Gel-based formulation	-	-	-

หมายเหตุ **(-)** ไม่มี Inhibition zone (ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ), Disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm



รูปที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากเจลผสมสารสกัดจากแกแลที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ด้วยวิธี Disc diffusion

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดแกแลสามารถเตรียมเป็นรูปแบบเจลได้มีความคงตัวดี แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย อาจเนื่องมาจากการเตรียมตำรับทำโดยใช้ความเข้มข้นเทียบเท่ากับที่ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยสารสกัด ซึ่งอาจต้องมีการเตรียมหลายความเข้มข้นเพื่อเปรียบเทียบผล

บทที่ 5

ข้อเสนอแนะ

สารสกัดแกแลยังละลายน้ำได้ไม่ดีนัก ควรต้องเพิ่มการละลายของสารสกัดก่อนแล้วจึงพัฒนาสูตรตำรับเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้กว้างมากขึ้น รวมทั้งจะช่วยให้ใส่ในตำรับได้ปริมาณมากขึ้น ซึ่งอาจส่งผลให้ตำรับมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Guo, S., DiPietro, LA. 2010. Factors affecting wound healing. Journal of Dental Research; 89(3): 219-29.

2. Sato, V. H., Chewchinda, S., Parichatikanond, W., & Vongsak, B. 2019. *In vitro* and *in vivo* evidence of hypouricemic and anti-inflammatory activities of *Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner heartwood extract. Journal of Traditional and Complementary Medicine. doi: https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2019.03.003.

3. Bunyapraphatsara, N., Dechsree, S., Yoosook, C., Herunsalee, A. and Panpisutchai, Y. 2000. Anti-Herpes Simplex virus component isolated from *Maclura cochinchinensis*. Phytomedicine., 6:421-424.

4. Kanchanapee, P. and Natori, S. 1966. Studies of *Cudrania javanensis* Trec. (Moraceae). The Bulletin of the Department of Medical Sciences., 8 : 96-106.

5. Hou, A.J., Fukai, T., Shimazaki, M., Sakagami, H., Sun, H.D. and Nomura, T. 2001. Benzophenones and xanthones with isoprenoid groups from *Cudrania cochinchinenis*. Journal of Natural Products., 64 : 65-70.

6. Manandhar, N.P. 1995. In Inventory of some herbal drugs of Myagdi District, Napal. Economic Botany., 49: 371-379.

7. Lin, C.C, Yee, H.Y., Chang, C.H. and Yang, J.J. 1999. The anti-inflammatory and hepatoprotective effects of fractions from *Cudrania cochinchinensis* Var. Gerontogea. American Journal of Chinese Medicine., 27 : 227-239.

8. Lin, C.C. and Kan, W.S. 1990. Medicinal plants used for the treatment of hepatitis in Taiwan. American Journal of Chinese Medicine., 18: 35-43.

9. Yoosook, C., Bunyapraphatsara, N., Boonyakiat, Y. and Kantasuk, C. 2000. Anti-herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants. Phytomedicine., 6 : 411-419.

10. Shirata, A. and Takahashi., K. 1982. Production of antifungal substances in the root of Mulberry. Bulletin of the Sericultural Experiment Station, 28 : 691-705.

11. Simon, PE., Moutran, HA., Romo, T. Skin wound healing (online). Available at http://emedicine.medscape.com/article/884594-overview (26 July 2019).

12. Umeh, V. N., Ilodigwe, E. E., Ajaghaku, D. L., Erhirhie, E. O., Moke, G. E., & Akah, P. A. (2014). Wound-healing Activity of the Aqueous Leaf Extract and Fractions of *Ficus exasperata* (Moraceae) and its Safety Evaluation on Albino Rats. Journal of traditional and complementary medicine, 4(4), 246–252.

13. Kim, K. H., Chung, W. S., Kim, Y., Kim, K. S., Lee, I. S., Park, J. Y. ,Jang, H. J. (2015). Transcriptomic Analysis Reveals Wound Healing of *Morus alba* Root Extract by Up-Regulating Keratin Filament and CXCL12/CXCR4 Signaling. Phytother Res, 29(8), 1251-1258.

14 Kearney, E. M.; Messaraa, C.; Grennan, G.; Koeller, G.; Mavon, A.; Merinville, E., Evaluation of Skin Firmness by the DynaSKIN, a Novel Non-Contact Compression Device, and Its Use in Revealing the Efficacy of a Skincare Regimen Featuring a Novel Anti-Ageing Ingredient, Acetyl Aspartic Acid. Skin Research and Technology 2016, 23 (2), 155-168.

15 Moldovan, M.; Lahmar, A.; Bogdan, C.; Părăuan, S.; Tomuă, I.; Crişan, M., Formulation and Evaluation of A Water-In-Oil Cream Containing Herbal Active Ingredients and Ferulic Acid. Clujul Med 2017, 90 (2), 212-219.