



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์ องค์ประกอบทางเคมี และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพังกาดอกช่อ (*Bruguiera hainesii*) และหลุมพอทะเล (*Intsia bijuga*) ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

Investigation of anti-free radical and cytotoxicity activity, chemical constituent and DNA fingerprint of *Bruguiera hainesii*, and *Intsia bijuga* from Kung Krabaen bay royal development study center

หัวหน้าโครงการ

ภก.ผศ.ดร.บุญติศย์ วงศ์ศักดิ์

โครงการวิจัยประเภท งบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐ มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์ องค์ประกอบทางเคมี และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพังกาดอกช่อ (*Bruguiera hainesii*) และหลุมพอทะเล (*Intsia bijuga*) ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

Investigation of anti-free radical and cytotoxicity activity, chemical constituent and DNA fingerprint of *Bruguiera hainesii*, and *Intsia bijuga* from Kung Krabaen bay royal development study center

หัวหน้าโครงการ

ภก.ผศ.ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ตุลาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ทั้งในด้านการเก็บตัวอย่างคือ คุณวัชรี ศรีทองคำ เจ้าหน้าที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ และการใช้เครื่องมือวิจัยได้แก่ คุณกนกพร ก้อนทรัพย์ คุณณัฐสุดา อินสอน ดร. สุนันต์ ใจสมุทร และได้รับความอนุเคราะห์ของห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้การประสานงานอย่างดี จนได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย ซึ่งงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก งบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) (อพ.สธ.) ประจำปีงบประมาณ 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 184/2560 จึงขอขอบคุณทุกท่านมา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

ภก.ผศ.ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์

ดร.ศศิภาวรรณ มาชะนา

ดร. จีราพร จรอนันต์

ดร. นภัสสร ฉันทธารังศิริ

ดร. บัลลังก์ เนื่องแสง

บทคัดย่อ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการศึกษารสชาติจากพืชหายากในบริเวณศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จ.จันทบุรี ได้แก่ หลุมพอทะเล (*Intsia bijuga*) และพังกาดอกช่อ (*Bruguiera hainesii*) โดยเลือกศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS, FRAP และ Lipid peroxidation (TBARS) องค์กรประกอบประกอบทางพฤกษเคมี รวมทั้งศึกษาดูความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค ISSR จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดใบจากพืชทั้ง 2 มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลได้ดี โดย *I. bijuga* มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลดีกว่า *B. hainesii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ ต่อมาทำการทดสอบหาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นพบว่า พืชทั้ง 2 มีชนิดมีสารพฤกษเคมี คือ tannins, flavonoids, phenolics, cardiacglycoside, anthraquinone, alkaloid และ coumarins สำหรับการสกัดดีเอ็นเอของ *I. bijuga* และ *B. hainesii* มาทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR แล้วพบว่า ดีเอ็นเอของพืชทั้งสองมีขนาดประมาณ 500 bp. จากนั้น PCR product ไปตรวจหาลำดับเบสดีเอ็นเอและนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในธนาคารพันธุกรรมโลก (Genbank) เพื่อยืนยันความเหมือนหรือความแตกต่างของลำดับเบสดีเอ็นเอ พบว่า สารสกัดดีเอ็นเอของ *I. bijuga* และ *B. hainesii* นี้มีเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลจากการใช้โปรแกรม BLAST อยู่ที่ 99% และ 100% ตามลำดับ จึงทำการฝากข้อมูลไว้เพื่อเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมของสมุนไพรไทย และจากการทดสอบดูความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย ISSR พบว่า ไพโรมอร์ที่ใช้ในการทดลองสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ได้แตกต่างกัน จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการอนุรักษ์สายพันธุ์พืชทั้งสองชนิดนี้ได้

Abstract

In this study, the rare medicinal plants (*Intsia bijuga* and *Bruguiera hainesii*) were collected from Kung Krabaen bay royal development study center, Chanthaburi and investigated anti-free radical activity, cytotoxicity activity, chemical constituent and DNA fingerprint. Based on DPPH, ABTS, FRAP assay, both leaf extracts indicated strong anti-free radical activity, but *I. bijuga* expressed higher activity than *B. hainesii*. For cytotoxicity test, *I. bijuga* and *B. hainesii* showed slightly activity. In phytochemical tests, several chemicals were examined and pointed that tannins, flavonoids, phenolics, cardiac glycoside, anthaquinone, alkaloid and coumarins were detected in both leaf extracts. DNA sequences and DNA fingerprints of *I. bijuga* and *B. hainesii* were also evaluated. The size of PCR products were around 500 bp and percent identity were 99% and 100%, respectively. The data of these ITS regions were registered and deposited in GenBank for conservation benefit. DNA fingerprints of these plants were demonstrated in different pattern using ISSR technique. Thus this method could be used for identification of *I. bijuga* and *B. hainesii* and applied as a marker for plant preservation benefit.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	iii
สารบัญ.....	iv
บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	2
ทบทวนวรรณกรรม และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
วิธีดำเนินการวิจัย.....	9
ผลการวิจัย.....	18
อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	27
เอกสารอ้างอิง.....	30
ภาคผนวก.....	33
ผลผลิต.....	34
ประวัติผู้วิจัยและคณะ.....	39

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำกรวิจัย

ปัจจุบันประชาชนทั่วโลกมีความตื่นตัว ให้ความสนใจ และตระหนักถึงคุณค่าของพืชสมุนไพรในการรักษาโรคมามากขึ้นรวมถึงประเทศไทย โดยองค์การอนามัยโลก (WHO) รายงานว่า ในปี ค.ศ. 2050 ยารักษาโรค อาหาร เครื่องดื่ม และเครื่องสำอาง จากพืชสมุนไพรมีแนวโน้มความต้องการทั่วโลกเพิ่มขึ้นถึง 14 พันล้านเหรียญ ถึง 5 ล้านล้านเหรียญสหรัฐ โดยผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรรักษาโรคหลายชนิดเตรียมได้จากสารสกัดจากพืช ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาสุขภาพภายใต้การอนุรักษ์และพัฒนาการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างยั่งยืน ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายของพืชสมุนไพรมากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก แต่ยังคงนำเข้ายาจากต่างประเทศเกือบทั้งหมดนับเป็นมูลค่ามหาศาล เนื่องจากยังขาดข้อมูลที่เป็นผลวิจัยทางวิทยาศาสตร์ในด้านการวินิจฉัยโรคและฤทธิ์ที่จะสนับสนุนพืชสมุนไพรให้เป็นที่ยอมรับ รวมถึงการแยกสกัด การหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ และการศึกษากลไกของสารในระดับโมเลกุล ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาองค์ความรู้ดังกล่าวในการวิจัยสมุนไพร และนำไปสู่การพัฒนาผลผลิตทางเภสัชภัณฑ์จากพืชสมุนไพรเพื่อช่วยลดการนำเข้าจากต่างประเทศ และอาจนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้เนื่องจากความต้องการสมุนไพรไทยในปัจจุบันมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทั้งในและต่างประเทศ

พื้นที่ป่าในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่สำคัญแห่งหนึ่งคือพื้นที่ป่าอ่าวคุ้งกระเบน ซึ่งตั้งอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของจังหวัดจันทบุรี เป็นพื้นที่ป่าอนุรักษ์ภายใต้โครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ประกอบด้วยความหลากหลายทางชีวภาพทั้งสภาพป่าบกและป่าชายเลนที่มีความหลากหลายของระบบนิเวศน์ และพันธุ์ไม้ต่างๆ จากรายงานการศึกษาและสำรวจความหลากหลายของพืชในป่าอ่าวคุ้งกระเบนพบว่า ประกอบด้วยสภาพป่าที่มีความแตกต่างกัน ได้แก่ ป่าดิบแล้ง ป่าเบญจพรรณ ป่าชายหาด ป่าชายเลนและป่าพรุเสม็ด และพบพรรณพืชกว่า 150 ชนิด จาก 98 วงศ์ ล้วนเป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยานับสนุนภูมิปัญญาการใช้สมุนไพรของแพทย์พื้นบ้าน ในการใช้สมุนไพรป่าชายเลนเพื่อการรักษาอาการอักเสบในตำราของหมอยาพื้นบ้าน เช่น ต้นโพลทะเล (*Thespesia populnea*) แพทย์พื้นบ้านนำมาใช้เป็น ยาสมานแผล ฆ่าเชื้อในแผล ต้นเหงือกปลาหมอดอกขาว (*Acanthus ebracteatus* Vahl) เหงือกปลาหมอดอกม่วง (*Acanthus ilicifolius* L.) ใบสำมะง่า (*Clerodendrum inerme*) และใบเบญจมาศน้ำเค็ม (*Wedelia biflora*) ใช้รักษาแผลเรื้อรัง แก้อักเสบ แผลติดเชื้อ เปลือกต้นโกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) ใช้แก้ท้องเสีย รักษาแผลเรื้อรัง เป็นต้น และยังมีพืชอีกหลายชนิดในพื้นที่ป่าอ่าวคุ้งกระเบนที่มีการใช้ทางสมุนไพร แต่ยังไม่มีการสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์ที่น่าเชื่อถือ

จากสภาพภูมิประเทศของพื้นที่ป่าในอ่าวคุ้งกระเบนที่แตกต่างจากสภาพป่าอื่นๆ ในประเทศไทย และ ยังไม่มีการเข้าไปศึกษาศักยภาพทางเภสัชวิทยาของพืชในป่าอ่าวคุ้งกระเบนมากนัก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ ต้องทำการศึกษาศักยภาพทางสมุนไพรของพืชและพันธุ์ไม้ในพื้นที่อ่าวคุ้งกระเบน เพื่อที่จะสนับสนุนให้มีการ นำพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพไปใช้ประโยชน์ให้เป็นที่ยอมรับ ตลอดจนเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อนำไปใช้ อ้างอิงได้ในอนาคต จากการสำรวจพันธุ์พืชป่าชายเลนโดยคณะผู้วิจัยพบว่าบริเวณอ่าวคุ้งกระเบนมีพืชทั้งสิ้น จำนวน 27 วงศ์ 49 ชนิด พบว่ามีจำนวน 2 ชนิดคือพังกาดอกช่อ (*Bruguiera hainesii*) และหลุมพอทะเล (*Intsia bijuga*) ที่มีรายงานการศึกษาทางเภสัชวิทยาน้อยมาก เมื่อคณะผู้วิจัยนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระเบื้องต้นพบว่าสารสกัดแสดงฤทธิ์ที่ดีและมีการนำมาใช้ในทางพื้นบ้านอีกด้วย

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและ เซลล์ปกติ เนื่องจากฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเกี่ยวข้องกับกระบวนการยับยั้งการเกิดโรครวมทั้งกระบวนการ เสื่อมต่างๆและมีรายงานการใช้พืชสกุล *Bruguiera* ในการรักษาเนื้องอกอีกด้วย นอกจากนี้คณะผู้วิจัยจะศึกษา องค์กรประกอบทางเคมีและข้อมูลทางพันธุกรรมของพืชเหล่านี้ไว้เพื่อเป็นแนวทางการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จาก พืชท้องถิ่นให้มีมูลค่าเพิ่มขึ้นได้ ตลอดจนจะได้ช่วยส่งเสริมให้เห็นคุณค่าและช่วยอนุรักษ์พืชสมุนไพรให้คงอยู่ ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์ องค์กรประกอบทางเคมี และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพังกาดอกช่อและหลุมพอทะเล
2. เพื่อสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพ รัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

2. ทบทวนวรรณกรรม และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทบทวนวรรณกรรม

2.1.1 ต้นหลุมพอทะเล (*Intsia bijuga*) (1)

หลุมพอทะเล เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Leguminosae-Fabaceae มีชื่อเรียกอื่น ๆ เช่น ภาคกลางเรียก ประดู่ทะเล ถ้าแถบมลายู-นราธิวาส เรียกว่า จือบาลาโอะ ต้นหลุมพอทะเลเป็นพืชป่าชายเลนที่ไม่แท้จริง กระจายพันธุ์แถบชายฝั่งทะเลและหมู่เกาะในมหาสมุทรอินเดียตลอดถึงมหาสมุทรแปซิฟิก ตามริมแม่น้ำ-ลำคลอง หรือบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึง แนวหลังป่าชายเลนที่ติดกับป่าชายหาดหรือป่าพรุ ลักษณะโดยทั่วไปคือ มีลำต้นขนาดกลางถึงใหญ่และอาจสูงถึง 25 เมตร เป็นไม้ต้นผลัดใบ เปลือกต้นเรียบมีสีเทาถึงสีชมพูแกมเทา มีใบประกอบแบบขนนกปลายคู่ แผ่นใบเป็นรูปไข่กว้างถึงรี ใบด้านบนจะมีสีเขียวเข้มกว่าด้านล่างและผิวใบเกลี้ยงทั้งสองด้าน ดอกมีสีขาวและจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือสีแดง ออกดอกที่ปลายกิ่ง ก้านช่อ แกนกลางและก้านดอกย่อย ดอกจะออกช่วงระหว่างเดือน ธันวาคม – เมษายน ส่วนผลเป็นแบบฝักถั่ว แข็งและแบน ฝักอ่อนมีสีเขียวและบางคล้ายใบแต่เมื่อฝักแก่ขึ้นจะหนาและมีสีน้ำตาล ฝักแก่ช่วงเดือนกรกฎาคม – กันยายน

2.1.2 ต้นพังกาดอกช่อ (*Bruguiera hainesii*) (1)

พังกาดอกช่อ จัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Rhizophoraceae มีชื่อเรียกตามท้องถิ่น เช่น พังกา-ถั่วขาว ถั่วจัน ถั่วขาว ต้นพังกาดอกช่อจัดอยู่ในประเภทพืชป่าชายเลนที่แท้จริงและยังเป็นพรรณไม้ป่าชายเลนที่ค่อนข้างหายาก ในประเทศไทยพบได้ที่ จ. จันทบุรี สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และกระบี่ ลักษณะทั่วไปของพืชชนิดนี้เป็นไม้ต้นขนาดกลางถึงใหญ่ มีเปลือกเรียบสีน้ำตาลอมเทาถึงสีน้ำตาลเข้ม มีรากหายใจโค้งคล้ายรูปเข่า เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวแบบเรียงตรงข้ามสลับตั้งฉากเป็นกระจุกตามปลายกิ่ง แผ่นใบเป็นรูปรีถึงรูปรีแกมขอบขนาน ดอกแบบช่อกระจุกสองด้านออกตามซอกใบใกล้ปลายกิ่ง บางครั้งออกดอกเดี่ยวและมีกลีบเลี้ยงที่เชื่อมติดกันเป็นรูปประฆังสีเหลืองอมเขียวถึงสีเขียว ปลายแฉกจะงุ้มเข้าหาตัวผลที่เป็นทรงกระบอก มีผิวเรียบและมีสีเขียวอมเหลืองไปจนถึงสีแดงระเรื่อ ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงอมเทาเมื่อแก่

2.1.3 อนุมูลอิสระ (Free radicals) (2)

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) ในอะตอมหรือโมเลกุล สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อม สิ่งมีชีวิตและเซลล์ โดยเฉพาะในกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือกระบวนการเมตาบอลิซึมที่มีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในออกซิเจนไม่สมดุล เกิดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี เนื่องจากสามารถดึงอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลอื่นเข้ามาแทนที่อิเล็กตรอนที่หายไป เพื่อให้ตัวเองเกิดการสมดุลหรือเสถียร เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain

reaction) และเกิดขึ้นภายในเซลล์ตลอดเวลา อนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม (Ghareeb DA และ Sarhan EM, 2014) ตามโมเลกุลที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในกระบวนการเมตาบอลิซึมได้ดังนี้ 1. Reactive Oxygen Species (ROS) เช่น $O_2\cdot$ (oxygen radical), $O_2^{\cdot-}$ (superoxide radical) หรือ $OH\cdot$ (hydroxyl radical) 2. Reactive Nitrogen Species (RNS) ได้แก่ $NO\cdot$ (nitric oxide radicals) และ $NO_2\cdot$ (nitrogen dioxide radical)

2.1.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) (3)

สารต้านอนุมูลอิสระหมายถึง โมเลกุลหรือสารต่าง ๆ ที่สามารถรักษาความเสถียรภาพ ความสมดุล หรือช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระก่อนที่จะเข้าไปทำลายเซลล์ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้ดังนี้ 1. สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ 2. สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่เป็นเอนไซม์ 3. กลุ่มอื่น ๆ

1. สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ (enzymatic antioxidants) ยกตัวอย่างเช่น
 - Superoxide dismutase (SOD) ได้แก่ CuZnSOD, MnSOD, FeSOD และ NiSOD
 - Catalase
 - Glutathione peroxidase
2. สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น
 - Vitamin E
 - Ascorbic acid
 - Polyphenols
 - Carotenoids
3. กลุ่มอื่น ๆ ได้แก่
 - Thiol antioxidants
 - Bilirubin
 - Melatonin
 - Coenzyme Q หรือ Ubiquinone

2.1.5 สารพฤกษเคมี (Phytochemicals) (4)

สารพฤกษเคมี คือสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่พบในพืชจำนวนมากหลายชนิด สามารถแบ่งกลุ่มสารเคมีเหล่านี้ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามสารตั้งต้น (biosynthesis) คือ 1. สารปฐมภูมิ (primary metabolite) และ 2. สารทุติยภูมิ (secondary metabolite)

1. สารปฐมภูมิ (primary metabolite) เป็นสารเคมีพื้นฐานที่พบได้ในพืชชั้นสูงทั่วไปเกือบทุกชนิด ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมที่จำเป็นต่อเซลล์ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ไขมัน (lipids) กรดอะมิโน (amino acid) และเอนไซม์ (enzymes) ส่วนใหญ่ สารเหล่านี้มักจะได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชและกระบวนการชีวสังเคราะห์ของกรดอะมิโนบางชนิด
2. สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เป็นสารประกอบที่พบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิดที่เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ของพืช และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา สารทุติยภูมิแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ดังต่อไปนี้
 - 2.1 อัลคาลอยด์ (alkaloids)
 - 2.2 สารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) สามารถแบ่งสารออกเป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้
 - 2.2.1 ฟีนอล และฟีนอลิกไกลโคไซด์ (phenol and phenolic glycosides)
 - 2.2.2 คูมาริน (coumarins)
 - 2.2.3 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)
 - 2.2.4 แทนนิน (tannins)
 - 2.2.5 ควิโนน (quinones)
 - 2.3 เทอร์พีนอยด์ และสเตอรอยด์ (terpenoids and steroids) แบ่งเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือ
 - 2.3.1 กลุ่มเทอร์พีนอยด์
 - โมโนเทอร์พีน (monoterpenes)
 - เซสควิเทอร์พีน (sesquiterpenes)
 - ไดเทอร์พีน (diterpenes)
 - ไตรเทอร์พีน (triterpenes)
 - เตตราเทอร์พีน (tetraterpenes)
 - น้ำมันหอมระเหย (volatile oils)
 - เรซิน และโอเลโอเรซิน (resins and oleoresins)
 - 2.3.2 กลุ่มสเตอรอยด์
 - ซาโปนิน (saponins) และ คาร์ดีแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides)
 - 2.4 ไกลโคไซด์ชนิดอื่น ๆ (other glycosides) ได้แก่
 - 2.4.1 ไฮยาโนจีนตคไกลโคไซด์ (Cyanogenetic glycosides)

2.4.2 สารกลุ่มกลูโคซิโนเลท (glucosinolate compounds)

2.1.6 หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) (5)

Polymerase Chain Reaction หรือ PCR หมายถึงปฏิกิริยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชนิดใดชนิดหนึ่งในหลอดทดลอง เป็นเทคนิคที่ง่าย เรียนรู้ได้เร็วและทำได้ในระยะเวลาสั้น ๆ หลักการของเทคนิคนี้คือเลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอช่วงใดช่วงหนึ่งอยู่ระหว่างส่วนของด้านที่ทราบลำดับเบสแล้ว โดยเรียกส่วนที่ทราบลำดับเบสแล้วว่า primer และเรียกดีเอ็นเอต้นแบบว่า DNA template ซึ่งเทคนิค PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. Denaturing เป็นขั้นตอนที่เพิ่มอุณหภูมิขึ้นสูงถึง 91-95 °C ทำให้ DNA template 2 สายที่เกี่ยวข้องพันกันเป็นเกลียว (double helix) แยกออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และสายนี้จะกลายเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
2. Annealing ขั้นตอนนี้จะลดอุณหภูมิในหลอดทดลองลงเพื่อให้ primer จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งปฏิกิริยานี้เรียกว่า primer annealing โดยที่ primer จะจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วยเบสคู่สมกันคือ adenine (A) จับกับ thymine (T) และ guanine (G) จับกับ cytosine (C)
3. Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมาที่มีดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นต้นแบบ แล้วสร้างต่อจาก primer ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม มีเอ็นไซม์ taq DNA polymerase ที่ทนความร้อนมาช่วยในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่และมี dNTP สำหรับสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ primer จะถูกสร้างในทิศ 5' ไป 3' และลำดับเบสของดีเอ็นเอสายใหม่จะเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ดังนั้นดีเอ็นเอสายใหม่จึงเป็น anti-parallel กับดีเอ็นเอต้นแบบ

2.1.7 หลักการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค inter-simple sequence repeat (ISSR) (6)

เทคนิคไอเอสเอสอาร์ หรือ inter-simple sequence repeat เป็นเทคนิคที่เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) 2 ตำแหน่ง ไมโครแซทเทลไลท์คือ ชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ (repetitive DNA) เรียงต่อกันเป็นจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วย 1-6 นิวคลีโอไทด์ พบได้ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงและส่วนใหญ่พบในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน (non-coding region) ซึ่งความผันแปรจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ในจีโนมสามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต เทคนิค ISSR นี้ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบส หลักการคือ ใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์เป็นไมโครแซทเทลไลท์และเติมนิวคลีโอไทด์คัดเลือก โดยไพรเมอร์จะจับเข้ากับไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่งใกล้ ๆ กัน แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่งนั้น ซึ่งเรียกชิ้นดีเอ็นเอนี้ว่า ไอเอสเอสอาร์ ข้อดี

ของเทคนิคนี้คือ ทำได้ง่าย รวดเร็วและราคาไม่สูงมาก ส่วนข้อเสียคือ เป็นเครื่องหมายที่แสดงถึงการข้ามแบบ สมบูรณ์ (complete dominant)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หลุมพองทะเล (*I. bijuga*) และ พังกาดอกช่อ (*B. hainesii*) เป็นพืชป่าชายเลนที่มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ บริเวณแถบมหาสมุทรอินเดียไปจนถึงมหาสมุทรแปซิฟิก พืชทั้ง 2 สายพันธุ์จัดเป็นพืชหายากจัดอยู่ในภาวะ เสี่ยงต้องเฝ้าระวังตามบัญชี IUCN Red List (9,10) ซึ่งประเทศไทยจะพบได้ใน จ. จันทบุรี สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และกระบี่ (1)

โดยส่วนใหญ่ *I. bijuga* และ *B. hainesii* มักถูกนำไปใช้เกี่ยวกับงานก่อสร้าง เพราะเนื้อไม้มีความ ทนทานสูง หรือนำมาใช้เป็นฟืน ถ่าน (11, 13) ซึ่งมีการนำมาใช้งานที่น้อยกว่าพืชชนิดอื่นเนื่องด้วยถูกจัดเป็น พืชหายาก แต่ก็ได้มีการวิจัยที่นำ *I. bijuga* มาทำการทดสอบฤทธิ์ด้วย เช่นในการทดลองนี้นำเอาสารสกัดเมทา นอลจากใบ *I. bijuga* มาทดสอบฤทธิ์ anti – ulcer ในหนู mice พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1000 mg/kg สามารถยับยั้งการเกิด ulcer ได้ถึง 58.3% อีกทั้งยังพบสารพฤกษเคมีอีก 8 ชนิด ได้แก่ flavonoids, tannins, terpenoids, alkaloid, cardiac glycoside, phenolics, saponin และ steroids (14) อีกทั้งยังมีการศึกษาพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน โดย Batubara I. และคณะ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ไลเปสจากสารสกัดเมทานอลและ 50% เอทานอลของแก่นหลุมพอง (*Intsia palembanica*) ซึ่งเป็น พืชที่อยู่วงศ์เดียวกันกับ *I. bijuga* พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้โดยที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 4.1 $\mu\text{g/ml}$ และ 83.0 $\mu\text{g/ml}$ เรียงตามลำดับ รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 3.87 $\mu\text{g/ml}$ และ 6.63 $\mu\text{g/ml}$ เรียงไปตามลำดับเช่นเดียวกัน (15) ต่อมาในปี 2014 Batubara I. และคณะ ก็ได้ทำ การแยกหาสารสำคัญจากสารสกัดของเนื้อไม้ *I. palembanica* ที่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไล เปส จากการทดลองพบว่า มีสารสำคัญ 7 ชนิด ที่แยกออกมาได้ คือ (-)-robidanol, 4'-dehydroxyrobidanol, ampelopsin, fustin, myricetin, quercetin และ 3,7,3'-tetrahydroxyflavones ซึ่งสารเหล่านี้ก็มีฤทธิ์ ต้านการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยเฉพาะ fustin ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยน้ำ ซึ่งผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นสารสำคัญมีค่าเท่ากับ 3.95 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไปได้ 50% (16) สำหรับงานวิจัยที่ทำการศึกษเกี่ยวกับประสิทธิภาพต่าง ๆ รวมทั้งสารสำคัญใน *B. hainesii* พบว่ายังไม่มีการทำ วิจัย แต่มีอีกงานวิจัยอื่น ๆ ได้ทำการศึกษา *Bruguiera cylindrica* เป็นพืชจากวงศ์ Rhizophoraceae ซึ่ง เป็นวงศ์เดียวกันกับ *B. hainesii* นี้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS, OH^{\cdot} และ Anti-hemolytic วิเคราะห์ผลออกมาเป็นค่า EC_{50} เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT ผลที่ได้คือสารสกัดเมทานอล จากเปลือก *B. cylindrica* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทุกวิธีที่ใช้ทดสอบ มีค่า EC_{50} เท่ากับ $5.5 \pm 0.58 \mu\text{g/ml}$,

10±0.02 µg/ml, 4±0.02 µg/ml และ 24.4±0.04 µg/ml เรียงตามลำดับ (17) และอีกหนึ่งงานวิจัยที่ทำการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ต้านการเกิด lipid peroxidation ของพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกันกับ *B. hainesii* แต่ต่างสปีชีส์กัน ได้แก่ *B. cylindrica*, *B. gymnorhiza*, *B. parviflora* และ *B. sexangular* โดยทำการสกัดส่วนต่าง ๆ ของพืชเหล่านี้และนำมาทดสอบฤทธิ์ จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ใช้ทดสอบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และต้านการเกิด lipid peroxidation ได้ดีโดยเฉพาะสารสกัดจากฝักอ่อนของ *B. parviflora* ที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด มีค่า EC₅₀ ในการยับยั้งอนุมูล DPPH เท่ากับ 5.00 µg/ml และค่า IC₅₀ สำหรับฤทธิ์ต้านการเกิด lipid peroxidation เท่ากับ 0.375 µg/ml (18)

จะเห็นได้ว่างานวิจัยที่ทำการทดสอบฤทธิ์ ทหารสารสำคัญหรือทดสอบหาประสิทธิภาพต่าง ๆ ของ *I. bijuga* และ *B. hainesii* ยังไม่พบภายในประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่น่าเอาพืชหายาก ทั้ง 2 ชนิดนี้มาทำการทดลอง

3.วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1. กระบอกตวง ขนาด 1000 มิลลิลิตร บริษัท Isolab สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
2. กรวยแก้ว
3. ขวดดูแรนแบบมีฝาปิดขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Isolab สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
4. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บริษัท Isolab สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
5. ขวดสำหรับกลั่นระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) ขนาด 250 มิลลิลิตร บริษัท Duran สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน)
6. เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน บริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
8. เครื่อง Microplate reader รุ่น M965+ บริษัท gibthai ประเทศไทย
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง บริษัท Thermo Fisher scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. ไมโครปิเปต บริษัท Thermo scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. ซ้อนตักสาร
12. ถาดอะลูมิเนียม
13. ทิปพลาสติก บริษัท Quality Scientific Plastic ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. หลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร บริษัท SPL Life Science สาธารณรัฐเกาหลี
15. หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
16. ปีกเกอร์ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร
17. ที่คืบ
18. พาราฟิล์ม บริษัท Bemis flexible packaging ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. Microtiter plate 96 well บริษัท Thermo scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
20. LED Transilluminator for DNA gels บริษัท Genedirex สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน)
21. UV lamp รุ่น UV Cabinet 4 บริษัท CAMAG ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 สารเคมี

1. 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) เกรด Analytical บริษัท Sigma – Aldrich สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
2. 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) เกรด Analytical บริษัท ACROS organics ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. 6X DND Loading buffer เกรด molecular – biology บริษัท Genedirex สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน)
4. ABTS chromophore diamonium salt เกรด Analytical บริษัท Sigma – Aldrich สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
5. Agarose เกรด molecular – biology บริษัท Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. Aluminum chloride เกรด Analytical บริษัท Sigma – Aldrich สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
7. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) เกรด Analytical บริษัท VWR prolabo chemical สาธารณรัฐฝรั่งเศส
8. DNA Ladder 100 bp. เกรด molecular – biology บริษัท Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. Egg yolks from chicken เกรด Analytical บริษัท Sigma – Aldrich สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
10. Folin-ciocalteu's phenol เกรด Analytical บริษัท Merck สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
11. Gallic acid เกรด Analytical บริษัท Merck สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
12. Iron (III) chloride เกรด Analytical บริษัท Sigma – Aldrich สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
13. L-ascorbic acid เกรด เกรด Analytical บริษัท Fisher chemical สหราชอาณาจักร
14. Methyl alcohol (CH₃OH) เกรด Analytical บริษัท Scharlau ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. ONE mark B 100 – 3000 bp. เกรด molecular – biology บริษัท Genedirex ไต้หวัน
16. Potassium persulfate (K₂S₂O₈) เกรด Analytical บริษัท Sigma – Aldrich สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
17. Quercetin เกรด HPLC บริษัท Sigma – Aldrich สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
18. Sodium bicarbonate (Na₂CO₃) เกรด Analytical บริษัท Merck สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
19. Sodium acetate เกรด Analytical บริษัท Lobachemic ประเทศอินเดีย
20. Sodium phosphate monobasic เกรด Analytical บริษัท Sigma – Aldrich สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
21. Sodium phosphate diabolic เกรด Analytical บริษัท Millipore สหรัฐอเมริกา
22. SYBR Safe DNA gel stain เกรด molecular–biology บริษัท Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา
23. 2 – Thiobarbituric acid เกรด Analytical บริษัท TCI ประเทศญี่ปุ่น
24. TLC Silica gel plate 60 F₂₅₄ บริษัท Merck สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
25. Trichoroacetic acid เกรด Analytical บริษัท Merck สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
26. ชุดสกัดจีโนมคิตีเอ็นเอสำเร็จรูป บริษัท Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา
27. ชุด PCR reaction เกรด molecular–biology บริษัท Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การสกัดสารสำคัญ

ตัวอย่างพืชที่บดเป็นผง 10 g ละลายด้วยเมทานอล 200 ml จากนั้นสกัดด้วยวิธี sonication ที่อุณหภูมิ 40 ° C นาน 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองนำส่วนที่เป็นของเหลวไประเหยเอาตัวทำละลายออก และส่วนที่เป็นตะกอนเอาไปสกัดซ้ำอีกครั้ง เมื่อได้สารสกัดหยาบแล้วให้เก็บในที่มืดอุณหภูมิ -20 ° C

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิก (22, 23)

3.3.2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH radical (3 mg/50 ml เมทานอล) และเจือจางสารละลายตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ เติมสารละลาย DPPH ลงไป 100 µl ผสมกับสารละลายตัวอย่าง 100 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm เปรียบเทียบกับ ascorbic acid ที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก จากนั้นคำนวณ %inhibition และค่า IC₅₀ จากสมการ %inhibition = [(A₀-A₁)/A₀] × 100] เมื่อ A₀ = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH และ A₁ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

3.3.2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

เตรียมสารละลาย ABTS⁺ radical ด้วยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย ABTS เข้มข้น 4 mM และสารละลาย 4.9 mM K₂S₂O₈ ในปริมาตรที่เท่า ๆ กัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 16-20 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ หลังจากนั้นเจือจางสารละลาย ABTS ด้วยเมทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7±0.2 ที่ความยาวคลื่น 734 nm เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ใช้ทดสอบปิเปตมา 100 µl เติมสารละลาย ABTS 100 µl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm คำนวณ %inhibition เปรียบเทียบกับ ascorbic acid ที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวกและหาค่า IC₅₀ จากสมการในข้อ 2.2

3.3.2.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

เตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสม 300 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ ใน HCl และ 20 mM FeCl₃.6H₂O ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ เตรียมสารตัวอย่าง 50 µl ผสมกับ FRAP reagent 150 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 8 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm คำนวณความสามารถในการให้ e⁻ (FRAP value) โดยเปรียบเทียบกับค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ FeSO₄ แสดงค่าในรูปของ g. Fe²⁺ /100 g extract ในการทดลองนี้ใช้ ascorbic acid เป็นตัวควบคุมผลบวก

3.3.2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS ทำได้โดยเตรียมสารสกัดหรือ positive control (Quercetin) ปริมาตร 100 µl จากนั้นเติม 10 mg/ml lectin solution ปริมาตร 900 µl ตามมาด้วย 400 mM Ferric chloride และ 200 mM Ascorbic acid อย่างละ 40 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C

นาน 1 ชั่วโมง เติม 0.25 N HCl (15% TCA และ 0.375% TBA) 2 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยาและนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °C 15 นาที รอจนเย็นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm 20 °C เป็นเวลา 5 นาที นำเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตรและคำนวณ %inhibition และค่า IC₅₀ จากสมการ %inhibition = [(A₀-A₁)/A₀] × 100] เมื่อ A₀ = ค่าการดูดกลืนแสงของ TARS และ A₁ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

3.3.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยเตรียมสารตัวอย่างปริมาตร 20 µl เติมน้ำละลาย Folin-Ciocalteu reagent (1:10 dH₂O) 50 µl จากนั้นเติมน้ำละลาย Na₂CO₃ เข้มข้น 7.5% (w/v) ลงไป 80 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm คำนวณค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกรายงานผลเป็น g GAE/100 g extract

3.3.2.6 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทำได้โดยเตรียมสารตัวอย่าง ปริมาตร 100 µl เติม 2% AlCl₃ 100 µl ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm คำนวณค่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเคอซีติน แสดงในหน่วย g QE/100 g extract

3.3.3 การทดสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น (21)

3.3.3.1 การทดสอบแทนนินด้วย 2% Gelatin solution Lime water และ Vanillin reagent

การตรวจสอบด้วย 2% Gelatin solution ละลายสารสกัดด้วยเมทานอลปริมาตร 5 มล. จากนั้นเติมน้ำ 10% NaCl solution ประมาณ 2-3 หยด ถ้าเกิดตะกอนให้ทำการกรองตะกอนทิ้งหลังจากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นจนครบ 10 มล. แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด โดยให้หลอดที่ 1 เป็นหลอดเปรียบเทียบ หลอดที่ 2 เติม 2% Gelatin solution ประมาณ 1 มล. และหลอดที่ 3 เติมน้ำละลาย gelatin salt solution ประมาณ 1 มล. แล้วสังเกตผลที่เกิดขึ้น ถ้าเกิดตะกอนคงที่แสดงว่าเป็น true tannin ส่วนถ้าไม่เกิดตะกอนคงที่แสดงว่าเป็น pseudo tannin

การตรวจสอบด้วย Lime water ละลายสารสกัดด้วยเมทานอลปริมาตร 2 มล. จากนั้นเติมน้ำยา lime water ประมาณ 1 มล. ถ้าสารละลายเกิดตะกอนสีเหลืองเหลืองน้ำเงินเทาแสดงว่ามีสารกลุ่ม hydrolysable tannin อยู่ในสารสกัด

การตรวจสอบด้วย Vanillin reagent นำสารสกัดมาระเหยให้แห้งแล้วหยด vanillin reagent ลงไป 2-3 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น

3.3.3.2 การทดสอบซาโปนิน ด้วยวิธี Foam test

นำสารสกัดมาแช่ในน้ำ 20 มล. ที่อุณหภูมิ 50-60 °C นาน 10 นาที จากนั้นกรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวแล้วนำไปแบ่งใส่หลอดจำนวนทดลอง 2 หลอด กำหนดให้หลอดที่ 1 ใส่สารสกัด 5 มล. ในหลอดที่มีฝาปิดและทำการเขย่าหลอดแรง ๆ ติดต่อกันนาน 3-5 นาที ตั้งหลอดทิ้งไว้ 30 นาที พร้อมกับสังเกตฟองที่เกิดขึ้น ถ้าเป็น saponin glycoside จะเกิดฟองรูป 6 เหลี่ยมที่คงตัว ส่วนหลอดที่ 2 ใส่สารสกัดที่กรองแล้ว 15 มล. เติม $\text{di.H}_2\text{O}_4$ 5 มล. แล้วต้มประมาณ 10 นาที จากนั้นแบ่งมาใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิด 5 มล. เขย่าแล้วสังเกตฟอง ถ้ามีสารกลุ่ม saponin glycoside จะไม่เกิดฟองหรือเกิดฟองน้อยกว่าหลอดที่ 1

3.3.3.3 การทดสอบฟลาโวนอยด์

- การตรวจสอบด้วยวิธี Cyaniding test เป็นการตรวจสอบโครงสร้าง gamma-benzopyrone ring ของสารประกอบ โดยจะใส่ชิ้น magnesium ribbon 1-2 ชิ้นลงในหลอดทดลองที่มีสารสกัด จากนั้นค่อย ๆ หยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2-3 หยด และตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีพร้อมกับสังเกตผลเปลี่ยนแปลง

- การทดสอบด้วยการพ่นแอมโมเนีย การตรวจสอบสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยวิธีนี้จะเป็นการนำเอาเทคนิค TLC มาใช้ร่วมด้วย โดยทำการตัด TLC plate ให้มีขนาด 3 x 5 ซม. ต้มจุดสารสกัดลงไปแล้วจึงนำไปวางลงในภาชนะที่มี mobile phase เป็น CHCl_3 : EtoAc: Acetic acid ในอัตราส่วน 4:5:1 ที่มีไอของ mobile phase อิ่มตัวแล้ว เมื่อ mobile phase ถึงระยะที่กำหนดแล้วให้นำออกมาจาก tank และทำให้แผ่น TLC แห้ง นำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ถ้ามีฟลาโวนอยด์จะเกิดสารเรืองแสงขึ้นมาและบันทึกผลที่ได้ จากนั้นนำสำลีสมาชุบแอมโมเนียพอหมาดแล้วป้ายลงบนหน้าแผ่น TLC นี้ให้ไปในทิศทางเดียวกัน รอให้แห้งแล้วนำมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร อีกครั้งถ้าเป็นกลุ่มฟลาโวน (flavone) หรือฟลาโวนอล (flavonol) จะเกิดสารเรืองแสงสีเหลือง ถ้าเป็นกลุ่มคาทีชิน (catechin) จะเกิดสารเรืองแสงสีฟ้า

3.3.3.4 การทดสอบหาฟีนอลิกด้วย FeCl_3

ละลายสารสกัดด้วยเมทานอลในหลอดทดลองจากนั้นค่อย ๆ หยดสารละลาย FeCl_3 T.S. 1-2 หยด ให้ไหลลงตามข้างหลอดทดลองที่มีสารสกัด สังเกตผลการทดลองโดยไม่ต้องเขย่าหลอดทดลอง

3.3.3.5 การทดสอบ Cardiac glycoside

- การทดสอบ unsaturated lactone ring ด้วย Kedde's test

นำสารสกัดหยาบที่ระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้วมาเติม Kedde's A reagent (2% 3,5-dinitrobenzoic acid in MeOH) 3-5 หยด ตามด้วย Kedde's B reagent (5% alcoholic KOH) 3-5 หยด แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้าผลการทดลองที่ได้เป็นผลบวกจะเกิดสีม่วงแดงทันทีและจะจางลงใน 2-3 นาที

- การทดสอบ deoxy sugar ด้วยวิธี Keller – kiliani test

นำสารสกัดตัวอย่างมาละลายด้วย CHCl_3 ปริมาตร 2 มล. ผสมกับ FeCl_3 (10% FeCl_3 ใน glacial acetic acid) ให้เข้ากันในหลอดทดลองจากนั้นค่อย ๆ หยดกรด H_2O_4 เข้มข้นลงข้าง ๆ ผนังหลอดทดลองแล้ว

สังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้าผลเป็น positive จะเกิดวงแหวนสีน้ำเงิน – เขียวหรือสีน้ำตาลบริเวณรอยต่อของของเหลวทั้งสอง

- การทดสอบ steroidal nucleus ด้วยวิธี Liebermann-burcard test

นำสารสกัดหยาบใส่ใน evaporating disk แล้วเติม acetic anhydride ลงไปจำนวน 10 หยด ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นค่อย ๆ หยดกรด H_2O_4 เข้มข้นลงข้าง evaporating disk สังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้าผลที่ได้เป็น positive จะเกิดเป็นสีน้ำเงินเขียวหรือสีแดง

3.3.3.6 การทดสอบแอนทราควิโนนด้วยวิธี modified bontrager's test

ละลายสารสกัดหยาบด้วย 10% KOH ปริมาตร 15 มล. ในหลอดทดลองจากนั้นเติม 3% H_2O_2 ลงไป 2 มล. ปิดฝาและนำไปอังไอน้ำประมาณ 10 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วค่อยนำไปกรองให้ได้ประมาณ 8 มล. ทดสอบความเป็นกรดของสารละลายด้วย pH paper จากนั้นนำสารละลายที่เป็นกรดมาใส่กรวยแยก โดยใช้ CH_2Cl_2 ปริมาตร 8 มล. มาสกัดแยกแล้วนำชั้นที่ละลายด้วย CH_2Cl_2 แบ่งออกมาใส่หลอดทดลองประมาณ 2 มล. กำหนดให้เป็นตัวควบคุม ส่วนสารละลายชั้น CH_2Cl_2 ที่เหลือให้เติมสารละลายเจือจาง KOH 5 มล. เขย่าหลอดทดลองเพื่อให้เกิดการ partition และสังเกตผลที่เกิดขึ้น

3.3.3.7 การทดสอบอัลคาลอยด์ด้วย Dragendorff's reagent

นำสารสกัดที่ระเหยแห้งแล้วมาเติมกรด H_2SO_4 pH 4 ลงไปแล้วนำมาสกัดแยกด้วย $CHCl_3$ จำนวน 3 ครั้ง นำชั้น H_2SO_4 มาปรับให้เป็นด่างด้วยสารละลาย NH_4OH เข้มข้นนำชั้นนี้มาสกัดแยกส่วนด้วย $CHCl_3$ เช่นเดียวกันกับครั้งแรก จากนั้นแบ่งสารสกัดจากทุกชั้นประมาณ 1-2 หยดในจานหลุมแล้วเติม dragendorff's reagent 1 หยด ให้สังเกตปริมาณตะกอนสีแดงที่ได้ในแต่ละชั้นของสารสกัด ต่อมานำสารสกัดแต่ละชั้นตรวจสอบเพิ่มเติมด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ mobile phase เป็น $CHCl_3$: EtoAc: Acetic acid (4:5:1) แล้วสำลีสับ dragendorff's reagent ทำการป้ายลงบนแผ่น TLC ที่แห้ง แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้นถ้าหากสารสกัดมีสารประกอบ

3.3.3.8 การทดสอบไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ด้วยวิธี Grignard test

นำกระดาษกรองขนาด 1 x 1.5 ซม. มาชุบสารละลาย 1% picric acid in ethanol ทำให้แห้งในตู้ดูดควัน หลังจากนั้นนำมาชุบในสารละลาย 10% sodium carbonate in water รอให้แห้ง ต่อมาให้ใส่สารสกัดลงในหลอดทดลองแล้วเติม $CHCl_3$ 1-2 หยด แล้วรีบปิดปากหลอดด้วยจุกที่มีกระดาษกรองชุบสารละลาย sodium picrate ที่เตรียมไว้ใหม่แขวนอยู่และระวังอย่าให้กระดาษกรองสัมผัสสารสกัดโดยตรง ต่อมานำหลอดทดลองไปอุ่นบนไอน้ำและสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีกระดาษ โดยจับเวลาตั้งแต่กระดาษเริ่มเปลี่ยนสีจนถึงเวลาที่มีสีเข้มสุดและคงที่ ถ้าผลเป็นบวกจะเกิด isopurpuric acid ได้สีส้มแดงหรือน้ำตาลเข้ม

3.3.3.9 การทดสอบสารประกอบคูมารินด้วยวิธีภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

นำสารสกัดที่ขมาละลายด้วยเมทานอลเพียงเล็กน้อย จากนั้นนำมาหยดลงบนปลายแผ่นกระดาษกรองขนาด 1 x 10 ซม. จำนวน 2 หยด และตามด้วยสารละลายต่าง 10% NaOH จำนวน 2 หยด ต่อมานำแผ่น

กระดากกรองมาวางบนกระจกนาฬิกาที่สะอาดภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร สังเกตผลเปรียบเทียบกับ 10% NaOH ที่ใช้เป็น blank ในการทดลองนี้

3.3.4 การแยกสารด้วยวิธี Vacuum Liquid Chromatography (VLC) และการวิเคราะห์หาองค์ประกอบสารโดยใช้เทคนิค thin layer chromatography (TLC)

สารสกัดใบหูลุมพอทะเล 9.73 กรัมทำการแยกแบบหยาดด้วยวิธี Vacuum Liquid Chromatography (VLC) โดยชะสารตามสภาพขั้วของตัวทำละลาย โดยเริ่มจากตัวทำละลาย hexane, CH₂Cl₂, EtoAc, Acetone และ MeOH

3.3.5 การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของหูลุมพอทะเลด้วยเทคนิค PCR

นำยอดอ่อนของใบหูลุมพอทะเลและพักกาดอกข้อมาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด จากนั้นทำตามขั้นตอนของชุดสกัดสำเร็จรูปและตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis โดยกระแสไฟฟ้าตรงความต่างศักย์ 35 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำสารสกัดดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสม ได้แก่ ITS_p5/ITS_s2 และ ITS_p3/ITS_s4 ทำปฏิกิริยาในปริมาตร 50 µl ประกอบด้วย ONE PCR PLUS 25 µl, ultra-pure water 18 µl, genomic DNA 5 µl, 10 µM Forward primer (ITS_p3 และ ITS_p5) และ 10 µM reverse primer (ITS_s2 และ ITS_s4) อย่างละ 1 µl ในสภาวะที่เหมาะสม คือ 1. Pre - Denaturation 4 นาที 94 °C 2. Denaturation 30 วินาที 94 °C 3. Annealing 40 วินาที 54 °C สำหรับไพรเมอร์ ITS_p5/ITS_s2 และ 50 °C สำหรับไพรเมอร์ ITS_p3/ITS_s4 4. Extension 1 นาที 72 °C 5. Final extension 10 นาที 72 °C จำนวน 35 รอบ นำผลของปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบขนาดโดยเทคนิค gel electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้าตรงความต่างศักย์ 50 โวลต์ นาน 40 นาที

3.3.6 การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)

เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย ONE PCR PLUS buffer 12.5 µl, ultra-pure water 9 µl, genomic DNA 2.5 µl และ 10 µM ISSR primer 1 µl 1. Pre - Denaturation 3 นาที 94 °C 2. Denaturation 1 นาที 94 °C 3. Annealing 50 วินาที 56 °C สำหรับ ISSR₂, 3, 4 และ 8 และ 60 °C และ ISSR₁ 4. Extension 1 นาที 72 °C 5. Final extension 10 นาที 72 °C จำนวน 40 รอบ จากนั้นนำผลของปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบขนาดโดยเทคนิค gel electrophoresis (1% agarose) ผ่านกระแสไฟฟ้าตรงความต่างศักย์ 50 โวลต์ นาน 40 นาที ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตดูความแตกต่างของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น

3.3.7 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบไปด้วย colon adenocarcinoma Caco-2 (ATCC HTB-37), melanoma SK-MEL-28 (ATCC HTB-72), hepatocellular carcinoma Hep G2 (ATCC HB-8065), papilloma carcinoma KB (ATCC CCL-17) และ normal human fibroblast Hs68 (ATCC CRL-1635)

ซึ่งซื้อจาก American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ทุกชนิดในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium with a low glucose concentration (DMEM-LG; Gibco, Grand Island, NY, United States) ที่มี 10% fetal bovine serum (HyClone, Cramlington, UK) และยาปฏิชีวนะ 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco) เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้ CO₂ incubator ซึ่งเป็นตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ที่มี CO₂ 5% ระหว่างการเพาะเลี้ยงจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน เมื่อเซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนประมาณ 80% ของพื้นผิวของ flash T25 จะทำการ trypsinized โดยใช้ 0.25% trypsin-EDTA (Gibco) เพื่อนำเซลล์ไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการตายของเซลล์ต่อไป

3.3.8 ทดสอบการตายของเซลล์ด้วยเทคนิค Sulforhodamine B (SRB) assay

ล้างเซลล์ด้วย 1X PBS 3 ครั้ง แล้วเติม 0.25% trypsin-EDTA ปริมาตร 1 ml ลงไปเพื่อทำการ trypsinized ทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยสี Tryphan blue เพื่อเตรียมเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เป็น 5×10^4 cells/ml เมื่อเติม cell suspension ปริมาตร 100 µl ลงใน 96-well plate จะมีเซลล์ประมาณ 5,000 cells/1 หลุม บ่มเซลล์ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ลงไป 100 µl แล้วบ่มเซลล์กับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาตรวจวัดการตายของเซลล์ด้วยเทคนิค SRB

เตรียมสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์โดยละลายใน DMSO ก่อน จากนั้นจึงเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20, 100, 200, 1,000 และ 2,000 µg/ml ส่วนสารสกัดบริสุทธิ์จะเจือจางเป็นความเข้มข้นสุดท้าย 2, 10, 20, 100 และ 200 µg/ml เมื่อเติมสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ลงไปใน 96-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 100 µl ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดจะเป็น 10, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/ml ส่วนสารสกัดบริสุทธิ์จะมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1, 5, 10, 50 และ 100 µg/ml ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ยา Doxorubicin (Sigma-Aldrich, St Louis, United States) เป็น positive control และทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (triplicate) ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด

หลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงกับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ใน 96 well plates เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว นำ 96 well plates ออกมาจากตู้ CO₂ incubator เติม 10 % trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich) ปริมาตร 100 µl ในแต่ละหลุม จากนั้นนำ plate ไปบ่มที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 ชม. เมื่อครบเวลาล้าง 96 well plates ด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ plate แห้ง แล้วเติม 1% SRB (Sigma-Aldrich) ปริมาตร 100 µl ลงไปทุกหลุม บ่ม plate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาล้างสีส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย 1% acetic acid ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องรอให้ plate แห้ง จากนั้นเติม 10 mM Tris base pH 10.5 ปริมาตร 200 µl แล้ว rotate plate เบาๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากันดี

จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 510 nm ด้วยเครื่อง VersaMax plate reader (Molecular devices, United States)

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบอย่างละครั้งทำ 3 ซ้ำของการทดลองโดยใช้ one-way ANOVA สำหรับวิเคราะห์ค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างการทดลองที่เป็นกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองที่สัมพันธ์กัน 2 กลุ่มข้อมูลโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistic 21 version

4. ผลการทดลอง

4.1 การสกัดสารสำคัญ

จากการสกัดหาสารสำคัญที่ได้จาก *I. bijuga* และ *B. hainesii* ที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายด้วยวิธี sonication พบว่า สารสกัดจากใบ *I. bijuga* มี %yield เท่ากับ 17.8 และ สารสกัดจากใบ *B. hainesii* มี %yield เท่ากับ 26.54 ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 แสดงน้ำหนักสารและ %yield ของสารสกัด

พืชตัวอย่าง	น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (g)	% yield
<i>B. hainesii</i>	1.68	26.54
<i>I. bijuga</i>	1.78	17.8

4.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดใบ *I. bijuga* และ *B. hainesii* พบว่า สารสกัดใบ *I. bijuga* มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดจากใบ *B. hainesii* โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 49.57 ± 3.92 $\mu\text{g/ml}$ และ 177.70 ± 4.68 $\mu\text{g/ml}$ เรียงตามลำดับ

ตารางที่ 4-2 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

สารสกัด	DPPH Assay IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD
<i>B. hainesii</i>	177.70 ± 4.68^a
<i>I. bijuga</i>	49.57 ± 3.92^b
Ascorbic acid	4.19 ± 0.20^c

หมายเหตุ: ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งและทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้ สามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบ *I. bijuga* และ *B. hainesii* ได้โดยจากการคำนวณสีที่จางลงของอนุมูลอิสระ ABTS ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สารสกัดใบ *I. bijuga* มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบ *B. hainesii* โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.84 ± 2.79 $\mu\text{g/ml}$ และ 68.39 ± 5.06 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

ตารางที่ 4-3 แสดงค่า IC₅₀ ของสารสกัดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

สารสกัด	ABTS ⁺ assay IC ₅₀ (µg/ml) ±SD
<i>B. hainesii</i>	68.39±5.06 ^a
<i>I. bijuga</i>	23.84±2.79 ^b
Ascorbic acid	3.46±0.26 ^c

หมายเหตุ: ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งและทำการทดลอง 3 ซ้ำ

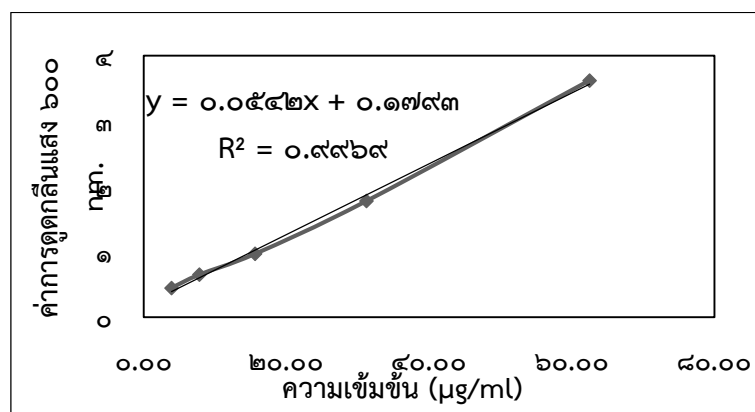
4.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารอนุมูลอิสระ FRAP

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารอนุมูลอิสระนี้ จะอาศัยหลักของความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลให้แก่สารประกอบเชิงซ้อน จะแสดงในรูป FRAP value คำนวรได้จากกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO₄) ที่มีสมการเส้นตรงเป็น $y = 0.0542x + 0.1793$ และมีค่า R² เท่ากับ 0.9969 จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดใบหลุมพอนมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่สารประกอบเชิงซ้อนได้มากกว่าสารสกัดจากใบ *I. bijuga* โดยมีค่า FRAP value เท่ากับ 16.20±1.30 g. Fe²⁺ ต่อสารสกัด 100 กรัม ส่วนสารสกัดใบ *B. hainesii* มีค่า FRAP value เท่ากับ 7.04±1.00 g. Fe²⁺ ต่อสารสกัด 100 กรัม

ตารางที่ 4-4 แสดง FRAP value ของสารสกัดในการรีดิวซ์เฟอร์ริก

สารสกัด	FRAP assay (g Fe ²⁺ /100 g extract) ±SD
<i>B. hainesii</i>	7.04±1.00 ^a
<i>I. bijuga</i>	16.20±1.30 ^b
Ascorbic acid	301.60±33.07 ^c

หมายเหตุ: ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งและทำการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 4-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต

4.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS

ฤทธิ์การยับยั้งของปฏิกิริยา lipid peroxidation ของสารสกัดใบ *I. bijuga* พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 50% (IC₅₀) มีค่าเท่ากับ 39.00±4.82 µg/ml เทียบกับ Quercetin ที่ได้ถูกใช้เป็น positive control สำหรับการทดลองนี้ ดังแสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 แสดงค่า IC₅₀ ของสารสกัดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี TBARS

สารสกัด	Anti-lipid peroxidation assay IC ₅₀ (µg/ml) ±SD
<i>I. bijuga</i>	39.00±4.82 ^a
Quercetin	1.05±0.05 ^b

หมายเหตุ: ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งและทำการทดลอง 3 ซ้ำ

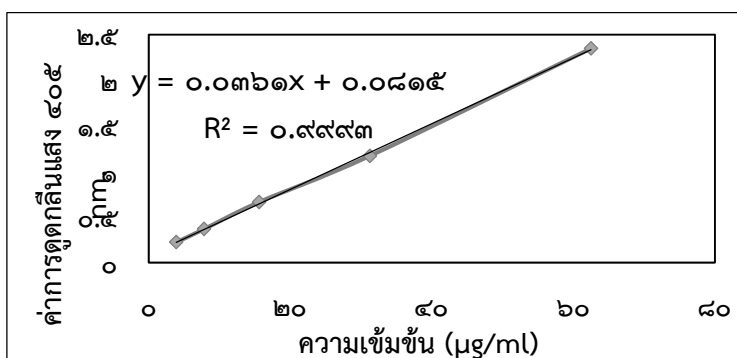
4.6 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid contents)

ผลการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดใบ *I. bijuga* และ *B. hainesii* ที่ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี aluminium chloride ได้แสดงในตารางที่ 4-6 ซึ่งค่าปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดทั้งสองนี้คำนวณได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารละลายเคอซีติน คือ $y = 0.0361X + 0.0815$ และมีค่า R² = 0.9993 พบว่า สารสกัดใบ *I. bijuga* มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด มีค่าเท่ากับ 2.83±0.08 กรัมสมมูลของเคอซีตินต่อสารสกัด 100 กรัม ขณะที่สารสกัดใบ *B. hainesii* มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 1.11±0.03 กรัมสมมูลของเคอซีตินต่อสารสกัด 100 กรัม

ตารางที่ 4-6 แสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดด้วยวิธี aluminium chloride

สารสกัด	Total Flavonoid Content (g QE/100 g extract)
<i>B. hainesii</i>	1.11±0.03 ^a
<i>I. bijuga</i>	2.83±0.08 ^b

หมายเหตุ: ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งและทำการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 4-2 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอซีติน

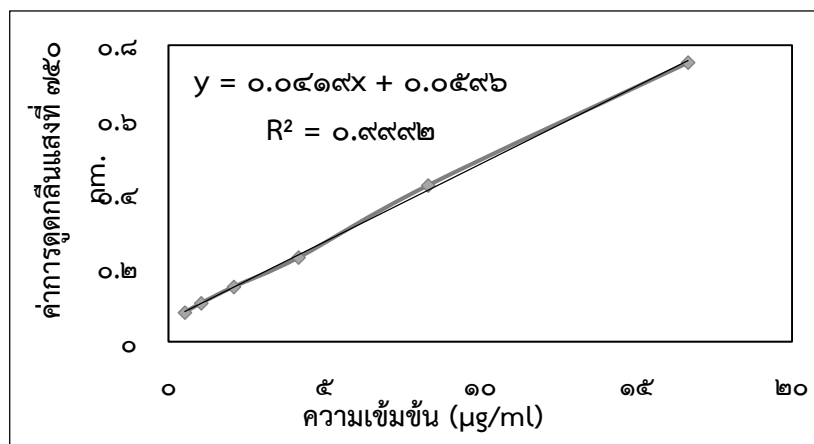
4.7 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents)

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบของพืชทั้งสองชนิด พบว่า สารสกัดใบ *I. bijuga* มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าสารสกัดใบ *B. hainesii* มีค่าเท่ากับ 4.28 ± 0.27 กรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 100 กรัม และ 2.26 ± 0.27 กรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 100 กรัม เรียงตามลำดับ โดยที่การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด คำนวณได้จากสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก คือ $y = 0.0419X + 0.0596$ มีค่า $R^2 = 0.9992$

ตารางที่ 4-7 แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

สารสกัด	Total Phenolic content (g GAE/100 g extract)
<i>B. hainesii</i>	2.26 ± 0.27^a
<i>I. bijuga</i>	4.28 ± 0.27^b

หมายเหตุ: ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งและทำการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 4-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก

4.8 การทดสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบหาสารพิษเคมีเบื้องต้นทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ แทนินิน ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก คาร์-
ดิแอกไกลโคไซด์ แอนทราควิโนน อัลคาลอยด์ ไชยานोजินิคไกลโคไซด์ และคูมาริน พบว่า สารสกัดใบหลุม
ทะเลและสารสกัดใบ *B. hainesii* มีสารพิษเคมี 6 ชนิดเหมือนกัน คือ แทนินิน ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก คาร์-
ดิแอกไกลโคไซด์ แอนทราควิโนน อัลคาลอยด์ และคูมาริน ดังแสดงในตารางที่ 4-8

ตารางที่ 4-8 แสดงผลการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัด

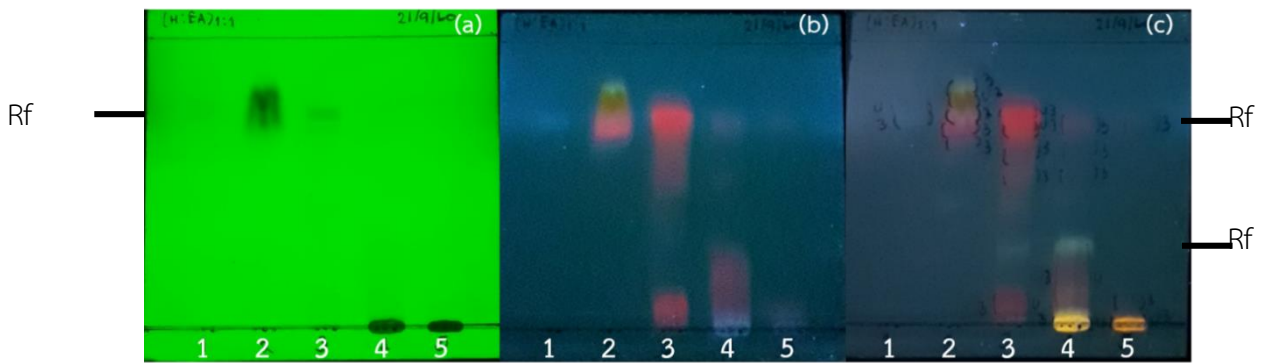
ลำดับที่	สารพิษเคมี	สารสกัดใบ <i>I. bijuga</i>	สารสกัดใบ <i>B. hainesii</i>
1	แทนนิน	+	+
2	ซาโปนิน	-	-
3	ฟลาโวนอยด์	+	+
4	ฟีนอลิก	+	+
5	คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	+	+
6	แอนทราควิโนน	-	-
7	อัลคาลอยด์	+	+
8	ไชยานोजินิคไกลโคไซด์	-	-
9	คูมาริน	+	+

หมายเหตุ: - หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ และ + หมายถึงตรวจสอบพบ

4.9 การแยกสารด้วยวิธี Vacuum Liquid Chromatography (VLC) และการวิเคราะห์หาองค์ประกอบ สารโดยใช้เทคนิค thin layer chromatography (TLC)

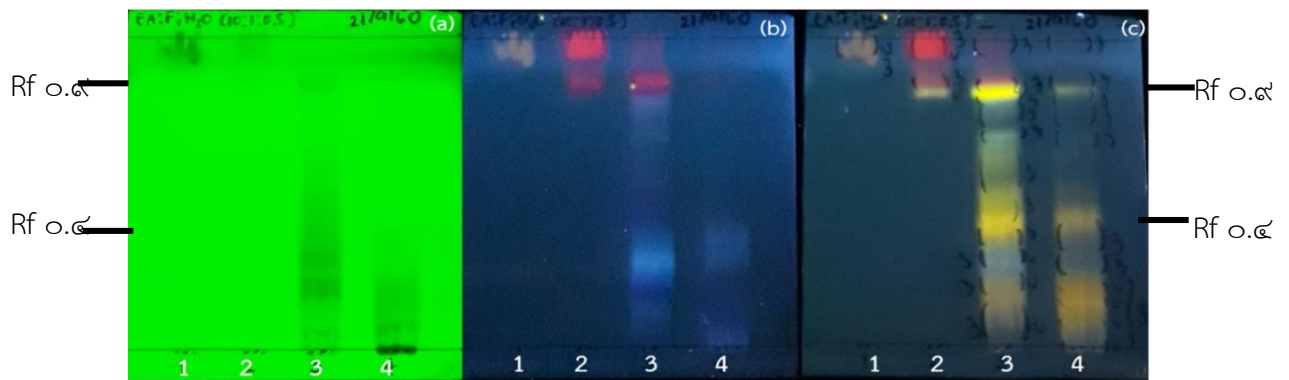
ตารางที่ 4-9 แสดงน้ำหนักที่ได้ของแต่ละ fractions

fractions	น้ำหนักที่ได้ (g)
ส่วนสกัดเฮกเซน	0.02
ส่วนสกัดไดโคโรมีเทน	0.32
ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท	0.81
ส่วนสกัดอะซิโตน	0.853
ส่วนสกัดเมทานอล	3.46



ภาพที่ 4-4 สารที่แยกได้นำมาส่องภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 nm (a) 366 nm (b) และฉีก 1% NP (c) โดยใช้ระบบ hexane: ethyl acetate (1:1)

Lane 1 คือ ส่วนสกัดเฮกเซน Lane 2 คือ ส่วนสกัดไดโคโรมีเทน
 Lane 3 คือ ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท Lane 4 คือ ส่วนสกัดอะซิโตน
 Lane 5 คือ ส่วนสกัดเมทานอล



ภาพที่ 4-5 สารที่แยกได้นำมาส่องภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 nm (a) 366 nm (b) และฉีก 1% NP (c) โดยใช้ระบบ EtoAc:Formic acid: water (10:1:0.5)

Lane 1 คือ ส่วนสกัดไดโคโรมีเทน Lane 2 คือ ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท
 Lane 3 คือ ส่วนสกัดอะซิโตน Lane 4 คือ ส่วนสกัดเมทานอล

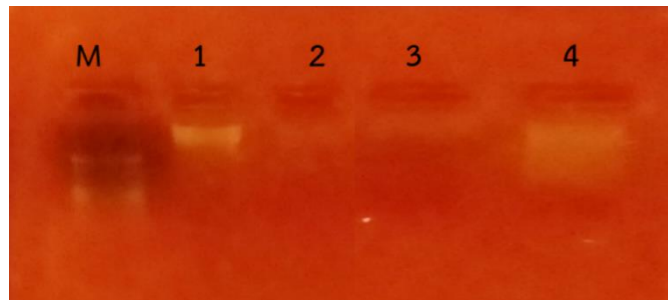
ตารางที่ 4-10 แสดงค่า IC₅₀ ของแต่ละ fraction

fractions	DPPH [•] Assay IC ₅₀ (µg/ml)
ส่วนสกัดไดโคโรมีเทน	62.32±2.39 ^a
ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท	46.98±1.73 ^b
ส่วนสกัดอะซิโตน	37.01±1.51 ^c
ส่วนสกัดเมทานอล	24.60±1.00 ^d
Ascorbic acid	4.69±0.08 ^e

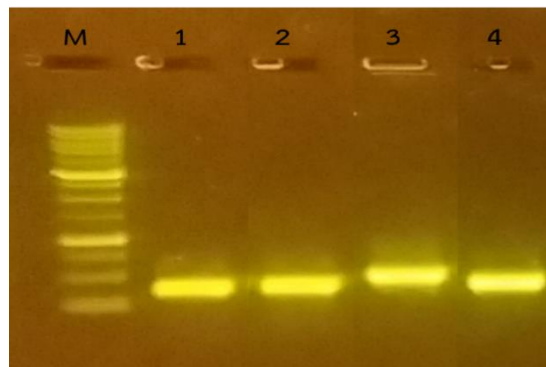
หมายเหตุ: ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งและทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.10 การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ *I. bijuga* และ *B. hainesii* ด้วยเทคนิค PCR

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้แล้วของ *I. bijuga* และ *B. hainesii* มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITSp5/ITSu2 และ ITSp3/ITSu4 และนำผลของปฏิกิริยามาตรวจสอบโดยวิธี 1% gel electrophoresis ภาพที่ 4-6 และ 4-7 จากนั้นนำส่งตัวอย่างเพื่อหาลำดับเบสดีเอ็นเอ (DNA sequence) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดังภาพที่ 4-8 ถึง 4-9



ภาพที่ 4-6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดใบ *I. bijuga* lane 1-2 และ ใบ *B. hainesii* lane 3-4 โดยที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน



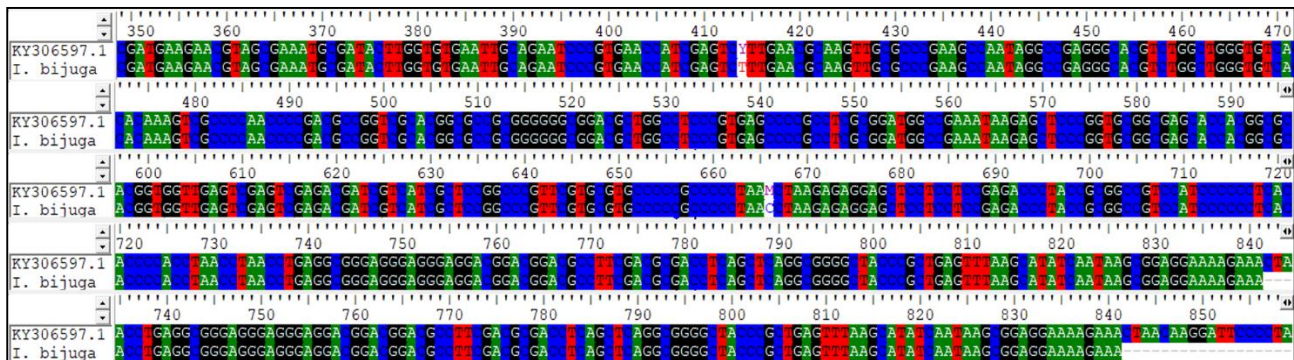
ภาพที่ 4-7 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ของ *I. bijuga* และ *B. hainesii*

Lane 1 คือ *I. bijuga* ไพรเมอร์ ITSp5/ITSu2 ขนาดประมาณ 500 bp

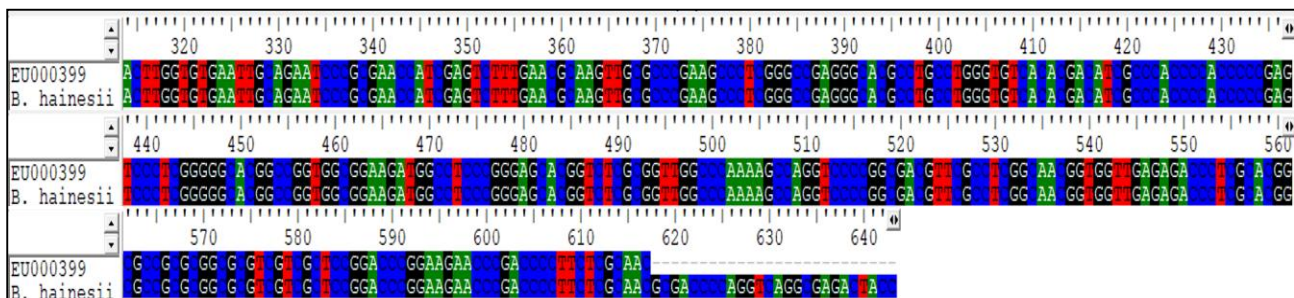
Lane 2 คือ *I. bijuga* ไพรเมอร์ ITSp3/ITSu4 ขนาดประมาณ 500 bp

Lane 3 คือ *B. hainesii* ไพรเมอร์ ITSp5/ITSu2 ขนาดประมาณ 500 bp

Lane 4 คือ *B. hainesii* ไพรเมอร์ ITSp3/ITSu4 ขนาดประมาณ 500 bp



ภาพที่ 4-8 ลำดับดีเอ็นเอของ *I. bijuga* เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล KY306597.1



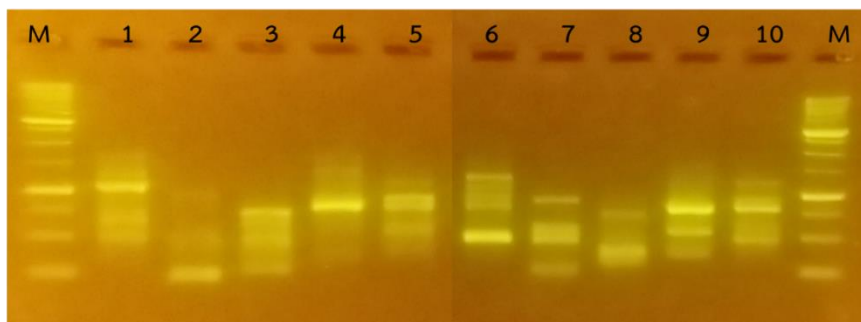
ภาพที่ 4-8 ลำดับดีเอ็นเอของ *B. hainesii* เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EU00039

ตารางที่ 4-11 แสดงผลการ blast ของลำดับเบสดีเอ็นเอจาก GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Name	Length (bp.)	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Database accession
<i>I. bijuga</i>	493	884	884	100%	0	99%	KY30657.1
<i>B. hainesii</i>	330	549	549	99%	2e-152	100%	EU00039

4.11 การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค ISSR

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *I. bijuga* และ *B. hainesii* ด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ 5 ชนิด ได้แก่ ISSR1 ISSR2 ISSR3 ISSR4 และ ISSR8 พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 5 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) 2 ตำแหน่งได้ และมีจำนวนแถบแบนดีเอ็นเอแตกต่างกันอีกด้วย ทำให้ระบุได้ว่าพืชทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม



ภาพที่ 4-9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR 1 2 3 4 และ 8 ใน lane ที่ 1-5 คือปริมาณดีเอ็นเอของ *I. bijuga* เรียงตามลำดับและ *B. hainesii* คือ lane ที่ 6-10 เรียงตามลำดับ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ตารางที่ 4-12 Accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ฝากเก็บในฐานข้อมูล (Genbank) ของ DDBJ

สายพันธุ์พืช	จังหวัดที่เก็บ	Accession number ของ 5.8s rRNA, internal transcribed spacer 2 และ 28s rRNA
<i>Bruguiera hainesii</i>	จันทบุรี	LC388689
<i>Intsia bijuga</i>	จันทบุรี	LC388690

4.12 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

พบว่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 - 1000 $\mu\text{g/ml}$ ของสารสกัด *Intsia bijuga* ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/ml}$ สามารถทำให้เซลล์ตายได้เพียงร้อยละ 30 ขณะที่ *Bruguiera hainesii* ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ สามารถทำให้เซลล์ตายได้เพียงร้อยละ 40 และที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดทั้งสองไม่สามารถทำให้เซลล์ทั้ง 5 ชนิด (colon adenocarcinoma Caco-2 (ATCC HTB-37), melanoma SK-MEL-28 (ATCC HTB-72), hepatocellular carcinoma Hep G2 (ATCC HB-8065), papilloma carcinoma KB (ATCC CCL-17) และ normal human fibroblast Hs68 (ATCC CRL-1635)) ในการทดลองนี้ตายได้มากกว่าร้อยละ 50 จึงถือว่าสารสกัดพืชทั้งสองชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

5. อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการศึกษาศาสตร์จากพืชหายากที่ปลูกอยู่ในบริเวณศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จ.จันทบุรี ซึ่งก็คือ หลุมพอทะเล (*Intsia bijuga*) และพังกาดอกช่อ (*Bruguiera hainesii*) โดยเลือกศึกษาส่วนที่เป็นใบที่สกัดด้วยเมทานอลมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS, FRAP และ Lipid peroxidation (TBARS) การทดสอบหาสารประกอบทางพฤกษเคมี การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ การหาองค์ประกอบสารโดยใช้เทคนิค TLC รวมทั้งศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค ISSR จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่า สารสกัดใบจากพืชทั้ง 2 มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลได้ดี แต่สารสกัดใบ *I. bijuga* มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลดีกว่า สารสกัดใบ *B. hainesii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ค่า IC_{50} ของสารสกัดใบ *I. bijuga* ต่อการยับยั้งอนุมูล DPPH และ ABTS เท่ากับ $49.57 \pm 3.92 \mu\text{g/ml}$ และ $23.84 \pm 2.79 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วนค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกเท่ากับ $16.20 \pm 1.30 \text{ g. Fe}^{2+}/100 \text{ g. extract}$ ในขณะที่สารสกัดใบ *B. hainesii* สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้ 50% ที่ความเข้มข้นเท่ากับ $177.70 \pm 4.68 \mu\text{g/ml}$ และ $68.39 \pm 5.06 \mu\text{g/ml}$ เรียงตามลำดับ และค่า FRAP value เท่ากับ $7.04 \pm 1.00 \text{ g. Fe}^{2+}/100 \text{ g. extract}$ สำหรับการทดลองด้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS ได้ทำการศึกษาเฉพาะสารสกัดใบ *I. bijuga* พบว่า สารสกัดมีประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชันของสารได้ มีค่า IC_{50} เท่ากับ $39.00 \pm 4.82 \mu\text{g/ml}$ ต่อมาการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดใบจากพืชทั้ง 2 สายพันธุ์จากการทดลองพบว่า มีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบจากพืชทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยที่สารสกัดใบ *I. bijuga* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ $4.28 \pm 0.27 \text{ g. GAE}/100 \text{ g. extract}$ และฟลาโวนอยด์เท่ากับ $2.83 \pm 0.08 \text{ g. QE}/100 \text{ g. extract}$ มากกว่าสารสกัดใบ *B. hainesii* ที่มีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เท่ากับ $2.26 \pm 0.27 \text{ g. GAE}/100 \text{ g. extract}$ และ $1.11 \pm 0.03 \text{ g. QE}/100 \text{ g. extract}$ ตามลำดับ ต่อมาคือการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นก็พบว่า พืชทั้ง 2 มีชนิดของสารพฤกษเคมีอยู่ 6 ชนิดที่เหมือนกัน คือ tannins, flavonoids, phenolics, cardiacglycoside, anthaquinone, alkaloid และ coumarins ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นั่นเป็นสาเหตุที่ทำให้สารสกัดใบ *I. bijuga* และ *B. hainesii* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่ใช้ทดสอบทั้งหมด (19) ในการนำสารสกัดใบ *I. bijuga* มาทำ TLC ในระบบ EtOAc:Formic acid: water ที่มีอัตราส่วน 10:1:0.5 จาก fingerprint ของสารสกัดจะเห็นแถบสีเหลือง 3 แถบหลังจากพ่นด้วย 1% NP (1% diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester in methanol) ซึ่งเป็นรีเอเจนต์จำเพาะที่สามารถตรวจจับสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ได้ และเมื่อนำมาส่องภายใต้แสงยูวีที่ 366 nm ก็ akan เห็นแถบสีเหลืองปรากฏขึ้นมา แสดงว่าสารองค์ประกอบในสารสกัดนี้น่าจะเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (20) สำหรับการสกัดดีเอ็นเอของ *I. bijuga* และ *B. hainesii* มาทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR

แล้วพบว่า ดีเอ็นเอของพืชทั้งสองมีขนาดประมาณ 500 bp. จากนั้น PCR product ไปตรวจหาลำดับเบสดีเอ็นเอและนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank (NCBI) เพื่อยืนยันความเหมือนหรือความแตกต่างของลำดับเบสดีเอ็นเอ พบว่า สารสกัดดีเอ็นเอของ *I. bijuga* และ *B. hainesii* นี้มี %ident หรือเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลจากการใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) อยู่ที่ 99% และ 100% ตามลำดับ และจากการทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย ISSR ก็พบว่า ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่งได้แตกต่างกันระหว่างพืชทั้ง 2 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้สามารถความแตกต่างระหว่างพืชต่างสายพันธุ์ได้และพืชแต่ละสายพันธุ์จะมีเอกลักษณ์ที่แตกต่างกัน

5.2 สรุปผลการทดลอง

5.2.1 จากการสกัดสารสำคัญจากใบ *I. bijuga* และ *B. hainesii* โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ได้ %yield จากการสกัดเป็น 17.8% และ 26.54% เรียงตามลำดับ

5.2.2 เมื่อนำสารสกัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดจากใบ *I. bijuga* มีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดจากใบ *B. hainesii* อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $49.57 \pm 3.92 \mu\text{g/ml}$ และ $177.70 \pm 4.68 \mu\text{g/ml}$ เรียงไปตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ยับยั้งอนุมูล ABTS พบว่า สารสกัดจากใบ *I. bijuga* มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดจากใบ *B. hainesii* เช่นเดียวกัน มีค่า IC_{50} เป็น $23.84 \pm 2.79 \mu\text{g/ml}$ และ $68.39 \pm 5.06 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ผลการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารสกัดทั้ง 2 พบว่า สารสกัดใบ *I. bijuga* มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกได้ดีกว่า *B. hainesii* อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า FRAP value เท่ากับ $16.20 \pm 1.30 \text{ g. Fe}^{2+}/100 \text{ g. extract}$ และ $7.04 \pm 1.00 \text{ g. Fe}^{2+}/100 \text{ g. extract}$ ในขณะที่ผลทดลองด้านการเกิด lipid peroxidation ด้วยวิธี TBARS พบว่า ฤทธิ์ของสารสกัดใบ *I. bijuga* ยับยั้งได้ดีที่ค่า IC_{50} เท่ากับ $39.00 \pm 4.82 \mu\text{g/ml}$

5.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด พบว่า สารสกัดใบ *I. bijuga* มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ $2.83 \pm 0.08 \text{ g. QE}/100 \text{ g. extract}$ ส่วนสารสกัดใบ *B. hainesii* มีเท่ากับ $1.11 \pm 0.03 \text{ g. QE}/100 \text{ g. extract}$ และผลของการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า สารสกัดใบ *I. bijuga* มีปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดเท่ากับ $4.28 \pm 0.27 \text{ g. GAE}/100 \text{ g. extract}$ ส่วนสารสกัดใบ *B. hainesii* มีสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดเท่ากับ $2.26 \pm 0.27 \text{ g. GAE}/100 \text{ g. extract}$

5.2.4 จากการทดสอบสารพิษทุกชนิดของสารสกัดใบ *I. bijuga* และ *B. hainesii* ผลการทดลองคือพบชนิดของสารพิษทุกชนิดอยู่ 6 ชนิดที่มีอยู่ในพืชทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ tannins, flavonoids phenolics, cardiacglycoside, anthaquinone, alkaloid และ coumarins

5.2.5 นำสารสกัดใบ *I. bijuga* มาทำการแยกสารต่อด้วยด้วยวิธี VLC ด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เรียงลำดับจากชนิดที่มีสภาพขั้วต่ำ-สูง ได้แก่ เฮกเซน > ไดโคโรมีเทน > เอทิลอะซิเตท > อะซิโตน > เมทานอล แล้วนำส่วนสกัดทั้ง 5 มาทำ TLC พบว่ามีสารที่สนใจอยู่ในส่วนสกัดอะซิโตนและส่วนสกัดเมทานอลที่ให้แถบแบนสารสีเหลือง มีค่า Rf เท่ากับ 0.9 และ 0.4 เมื่อใช้ระบบ EtoAc: Formic acid: water (10:1:0.5) ฟันด้วยสเปรย์ 1%NP แล้วนำมาส่องภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 366 nm. จากนั้นจึงนำเอาส่วนสกัดย่อย

ยกเว้นส่วนสกัดเฮกเซนมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า ส่วนสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.60 ± 1.00 $\mu\text{g/ml}$ รองลงมาคือส่วนสกัดอะซิโตน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 37.01 ± 1.51 $\mu\text{g/ml}$ ตามมาด้วย เอทิลอะซิเตท และไดโครโรมีเทน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 46.98 ± 1.73 $\mu\text{g/ml}$ และ 62.32 ± 2.39 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

5.2.6 หลังจากนำสกัดดีเอ็นเอของ *I. bijuga* และ *B. hainesii* มาการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR แล้วพบว่า ดีเอ็นเอของพืชทั้งสองมีขนาดประมาณ 500 bp. และ PCR product ที่ถูกนำไปตรวจหาลำดับเบสดีเอ็นเอและนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank (NCBI) เพื่อยืนยันความเหมือนหรือความแตกต่างของลำดับเบสดีเอ็นเอ พบว่า สารสกัดดีเอ็นเอของ *I. bijuga* และ *B. hainesii* นี้มี %ident หรือเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลจากการใช้โปรแกรม BLAST อยู่ที่ 99% และ 100% ตามลำดับ

5.2.7 ผลการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ต่างกัน สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่งได้ รวมทั้งจำนวนแถบแบนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละไพรเมอร์นั้นสามารถระบุได้ว่าพืชทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม

5.2.8 สารสกัดทั้งสองไม่สามารถทำให้เซลล์ทั้ง 5 ชนิด (colon adenocarcinoma Caco-2 (ATCC HTB-37), melanoma SK-MEL-28 (ATCC HTB-72), hepatocellular carcinoma Hep G2 (ATCC HB-8065), papilloma carcinoma KB (ATCC CCL-17) และ normal human fibroblast Hs68 (ATCC CRL-1635)) ตายได้มากกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ จึงถือว่าสารสกัดพืชทั้งสองชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

เอกสารอ้างอิง

1. สรายุทธ บุญยะเวชชีวิน และรุ่งสุริยา บัวสาไล. (2554). ป่าชายเลน นิเวศวิทยาและพรรณไม้. บริษัท อมรินทร์-พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน), มูลนิธิกระต่ายในดวงจันทร์
2. บุหรีน พันธุ์สุวรรณค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. Thai Science and Technology Journal.; 21(3):275-86.
3. Sisein EA. (2014). Biochemistry of free radicals and antioxidants. Scholars Academic Journal of Biosciences. 2(2):110-8.
4. ผศ. ดร. นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2544). เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1. หจก. แสงเทียนการพิมพ์, ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
5. อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และ ธัญชัย สุระ. (2534). ความรู้พื้นฐานเรื่องเวชพันธุศาสตร์. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต.; 1(4): 469-477
6. วริศรา แทนสง่า, ธีระชัย ธนानันต์ และนฤมล ธนानันต์. (2557). การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (Aerides) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพี ดีและไอเอสเอสอาร์. Thai Journal of Science and Technology.; 3(2):102-12.
7. Ghareeb DA, Sarhan EM. (2014). Role of Oxidative Stress in Male Fertility and Idiopathic Infertility: Causes and Treatment. J Diagn Tech Biomed Anal.; 2(1):1-12.
8. Richard A. Noske. (1993). Bruguiera hainesii: Another Bird-Pollinated Mangrove. Biotropica.; 25(4): 481-483.
9. World Conservation Monitoring Centre. (1998). Intsia bijuga. The IUCN Red List of Threatened Species 1998: e.T32310A9694485. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T32310A9694485.en> (Assess on 19 July 2018)
10. Duke, N. et al. (2010). Bruguiera hainesii. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T178834A7621565. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T178834A7621565.en>

11. วิธนา หนูยิ้ม. (2556). โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพันธุ์พืชป่าชายเลนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ชุด พรรณไม้รอบบรั้ว ส่วนบริหารจัดการทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6. ส่วนบริหารจัดการทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จ. สงขลา, ส่วนบริหารจัดการทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
12. Norscia I, Borgognini-Tarli SM. (2016). Ethnobotanical reputation of plant species from two forests of Madagascar: A preliminary investigation. South African Journal of Botany. 72(4):656-60.
13. Flora & fauna web. (2013). *Bruguiera hainesii* C. G. Rogers. <https://florafaunaweb.nparks.gov.sg/special-pages/plant-detail.aspx?id=4002>, (Assess on 19 July 2018)
14. Paguigan ND, Castillo DH, Chichioco-hernandez CL. (2014). Anti-ulcer activity of leguminosae plants. Arquivos de gastroenterologia. 51(1):64-7.
15. Batubara I, Mitsunaga T, Ohashi H. (2009). Screening antiacne potency of Indonesian medicinal plants: antibacterial, lipase inhibition, and antioxidant activities. Journal of wood science. 55(3):230-5.
16. Batubara I, Kuspradini H, Muddathir AM, Mitsunaga T. (2014). *Intsia palembanica* wood extracts and its isolated compounds as Propionibacterium acnes lipase inhibitor. Journal of wood science. 60(2):169-74.
17. Krishnamoorthy M. et al. (2011). Antioxidant activities of bark extract from mangroves, *Bruguiera cylindrica* (L.) Blume and *Ceriops decandra* Perr. Indian journal of pharmacology. 43(5):557-62.
18. Bunyapraphatsara N. et al. (2003). Pharmacological studies of plants in the mangrove forest Thai Journal of Phytopharmacy. 10(2):1-12.
19. บังอร วงศ์รักษ์ และ ศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ. (2549). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน. โครงการพิเศษของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
20. Spray Reagents for the thin layer chromatography of drug extracts. Books on TLC Techniques and on the Constituents of Plant Drugs. (Assess on 8 August 2018)

21. นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และคณะ (2551). ทีแอลซี: วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์คุณภาพเครื่องยาไทย. สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. หน้า 16-19
22. Vongsak B. et al. (2015). In vitro alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. Revista Brasileira de Farmacognosia. 25(5):445-50.
23. Cottica SM. et al. (2011). Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. Journal of the Brazilian Chemical Society. 22(5):929-35.

ภาคผนวก

ผลผลิต (output) ที่ได้จากการรับทุน	
ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์	34-36
ข้อมูลลำดับเบสดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ <i>I. bijuga</i> และ <i>B. hainesii</i>	
ที่ลงบนฐานข้อมูลของ Genbank	37-38
ประวัตินักวิจัยและคณะ	39-46

ผลผลิต (output) ที่ได้จากการรับทุน

1. บทความวิจัยได้นำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการที่มีผู้ทรงคุณวุฒิร่วมกลั่นกรอง และบทความฉบับสมบูรณ์ (Full Paper) ได้รับการตีพิมพ์ในรายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (Proceedings)

Kanokporn Kornsap, Naphatson Chanthathamrongsiri, Sunan Jaisamut, Bunlung Nuangsaeng and **Boonyadist Vongsak**. The comparison of the leaf extracts from *Intsia bijuga* and *Intsia palembanica* to inhibit free radicals and lipid peroxidation with total flavonoid and total phenolic contents. The 5th Current Drug Development International Conference & The 3rd International Conference on Herbal and Traditional Medicine 2018 May 23 - 25, 2018 PSU Conference Hall, Songkhla, Thailand. 194-195.

The comparison of the leaf extracts from *Intsia bijuga* and *Intsia palembanica* to inhibit free radicals and lipid peroxidation with total flavonoid and total phenolic contents

Kanokporn Kornsap¹ Naphatson Chanthathamrongsiri¹ Sunan Jaisamut¹ Bunlung Nuangsaeng² and Boonyadist Vongsak^{1*}

¹Faculty of Pharmaceutical sciences, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

²Faculty of Marine technology sciences, Burapha University, Chanthaburi, 22170, Thailand

E-mail address: boonyadist@go.buu.ac.th

Abstract- Methanolic extracts of the leaf of *Intsia bijuga* and *Intsia palembanica* were analyzed for free radical scavenging effect, total phenolic and total flavonoid contents. The activities were determined using DPPH, ABTS, FRAP and lipid peroxidation assay. The results showed that total phenolic content of the leaf extract of *I. bijuga* was 20.59±0.19 g GAE/100 g extract and the leaf extract of *I. palembanica* was 19.74±0.45 g GAE/100 g extract. For the total flavonoids, the leaf extract of *I. bijuga* was found as 1.96±0.10 g QE/100 g extract and the leaf extract of *I. palembanica* was detected as 0.41±0.01 g QE/100 g extract. Both extracts had no significant difference in free radical scavenging ability determined by DPPH, ABTS and FRAP assays ($p < 0.05$). Conversely, in anti-lipid peroxidation assay, the leaf extract of *I. bijuga* was significantly stronger than *I. palembanica*, IC₅₀ 39.00±4.82 µg/ml and 131.30±16.05 µg/ml, respectively. Base on the overall finding, the leaf extracts of *I. bijuga* should be investigated for the bioactive constituents in anti-lipid peroxidation and free radical scavenging activity in further study.

Introduction

Intsia bijuga and *Intsia palembanica* (Fabaceae) have been used for treatment of diarrhoea¹ and inflammation². Besides, *I. bijuga* and *I. palembanica* also had the ability to inhibitory antioxidative effect, cytotoxicity activity³. The phytochemicals including as flavonoids, tannins, terpenoids, alkaloids, cardiac glycosides, saponins, steroids and phenolic compounds were revealed in phytochemical screening for the leaf extract of *I. bijuga*⁴. For *I. palembanica*, the wood extract had the presence of (-)-robidanol, 4'-dehydroxyrobidanol, ampelopsin, fustin, myricetin, quercetin and, 3,7,3'-tetrahydroxyflavones⁵. Therefore, the aim of this study was to compare free radical scavenging and anti-lipid peroxidation activities, total phenolic and flavonoid contents of *I. bijuga* and *I. palembanica* leaf extracts.

Materials and Methods

1) *Plant materials and extraction*: Fresh leaves of *I. bijuga* were collected from KKB Royal Development Study Center in Chantaburi province, Thailand and *I. palembanica* were collected from Surat Thani province, Thailand by Dr. Sunan jaisamut. The leaves were cleaned and cut into small pieces and air-dried. The dried samples were sonicated with methanol at 40 °C. The extracts were filtered by filter papers and the pellets were re-extracted with methanol again using the same procedure. The supernatants were pooled together and evaporated in a rotary evaporator.

2) *Total phenolic and total flavonoid contents*: Using Folin-Ciocalteu and aluminium chloride assay^{6,7}

3) *Free radical scavenging assay*: Using FRAP assay, ABTS⁻ assay and DPPH assay.⁶

4) *Lipid peroxidation assay*: Using TBARS assay.⁸

Result and Discussion

The leaf extracts of *I. bijuga* and *I. palembanica* were examined by FRAP assay, DPPH assay, ABTS assay, lipid peroxidation assay, total flavonoid and total phenolic contents (Table 1). The both extracts displayed the effective activities in all assays. However, *I. bijuga* leaf extracts showed the significantly highest activity in total phenolic, total flavonoid contents and anti-lipid peroxidation, 20.59±0.19 g GAE/100 g extract, 1.96±0.10 g QE/100 g extract and IC₅₀ value 39.00±4.82 µg/ml, respectively. Thus, the leaf extract of *I. bijuga* could be more active than *I. palembanica*.^{2,9} In summarize, the leaf extract of *I. bijuga* could be considered in isolation an identification of bioactive compounds for anti-lipid peroxidation and anti-inflammation agents that associated with ethnopharmacological data in further study.

Table 1. The total phenolic and total flavonoid contents, free radical scavenging activity, and anti-lipid peroxidation activity of *I. bijuga* and *I. palembanica* leaf extracts.

Extracts/ standards	Total Phenolic content (g GAE/100 g extract)	Total Flavonoid Content (g QE/100 g extract)	FRAP assay (g FeSO ₄ /100 g extract)	ABTS ⁺ assay IC ₅₀ (µg/ml)	DPPH assay IC ₅₀ (µg/ml)	Anti-lipid peroxidation assay IC ₅₀ (µg/ml)
<i>I. bijuga</i>	20.59±0.19 ^a	1.96±0.10 ^a	20.60±0.47 ^a	23.84±2.79 ^a	49.57±3.92 ^a	39.00±4.82 ^a
<i>I. palembanica</i>	19.74±0.45 ^b	0.41±0.01 ^b	22.82±0.43 ^a	25.82±0.63 ^a	49.44±1.59 ^a	131.30±16.05 ^b
Ascorbic acid	-	-	319.92±0.19 ^b	3.46±0.26 ^b	4.19±0.20 ^b	-
Quercetin	-	-	-	-	-	1.05±0.05 ^c

*Different superscript letters (a, b and c) in the same columns represent significant differences by one-way ANOVA (P<0.05)

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 184/2560). The authors also would like to thank Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University for providing laboratory facilities and KKB Royal Development Study Center in Chantaburi province, Thailand for plants collection.

Reference(s)

1. Norscia, I.; Borgognini-Tarli, S.M. *South African Journal of Botany* **2006**,72,656-60.
2. Gesine B, T. *Ethnobotanical Survey and Biological Screening of Medicinal Plants from Vanuatu* **2008**, Dissertation. zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften aus Frankfurt am Main.
3. Peterosj N.P.; Uy, M.M. *Journal of Medicinal Plants Research* **2010**,4,407-14.
4. Paguigan, N.D.; Castillo, D.H.; Chichioco-hernandez, C.L. *Arquivos de gastroenterologia*. **2014**,51, 64-7.
5. Batubara, I.; Kuspradini, H.; Muddathir, A.M.; Mitsunaga, T. *Journal of wood science* **2014**,60,169-74.
6. Vongsak, B.; Kongkiatpaiboon, S.; Jaisamut, S.; Machana, S.; Pattarapanich, C. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2015**,25,445-50.
7. Cottica, S.M, Sawaya, A.C.; Eberlin, M.N.; Franco, S.L.; Zeoula, L.M.; Visentainer, J.V. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2011**,22,929-35.
8. Srinivasan, R.M.; Chandrasekar, M.J.; Nanjan, M.J.; Suresh, B. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**,113,284-91.
9. Batubara, I.; Mitsunaga, T.; Ohashi, H. *Journal of wood science* **2009**,1,230-5.

2. ข้อมูลแสดงลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของยีน 5.8s rRNA, internal transcribed spacer 2 และ 28s rRNA ใน Genbank ของ *Bruguiera hainesii* และ *Intsia bijuga*

1. *Bruguiera hainesii*

```
LOCUS      LC388689          330 bp  DNA  linear  PLN 19-JUN-2018
DEFINITION Bruguiera hainesii genes for 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial
            and complete sequence.
ACCESSION  LC388689
VERSION    LC388689.1
KEYWORDS   .
SOURCE     Bruguiera hainesii
ORGANISM   Bruguiera hainesii
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;
            Pentapetalae; rosids; fabids; Malpighiales; Rhizophoraceae;
            Bruguiera.
REFERENCE  1 (bases 1 to 330)
AUTHORS    Kornsap,K. and Vongsak,B.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (14-JUN-2018) to the DDBJ/EMBL/GenBank databases.
            Contact:Kanokporn Kornsap
            Burapha university, Faculty of Pharmaceutical Sciences Burapha
            University; 169 Long-Hard Road, Saensook, Mueang Chonburi
            District, Chonburi 20131, Thailand
            URL :http://pharm.buu.ac.th/
REFERENCE  2
AUTHORS    Kornsap,K. and Vongsak,B.
TITLE      DNA fingerprint of Bruguiera hainesii, and Intsia bijuga from Kung
            Krabaen bay development study center.
JOURNAL    Unpublished (2018)
COMMENT
FEATURES   Location/Qualifiers
            source          1..330
                /collected_by="Boonyadist Vongsak"
                /collection_date="2016-10-12"
                /country="Thailand:Tha Mai District, Kung Krabaen Bay
                Royal Development Study Center"
                /db_xref="taxon:413958"
                /mol_type="genomic DNA"
                /organism="Bruguiera hainesii"
            misc\_RNA       <1..>330
                /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed
                spacer 2 and 28S ribosomal RNA"
BASE COUNT      57 a      123 c      105 g      45 t
ORIGIN
1  acttgggtgtg aattgcagaa tcccgcaaac catcgagtct ttgaacgcaa gttgcgcccc
61  aagccctcgg gccgagggca cgcctgcctg ggtgtcacac gacatgccc accccacccc
121 cgagtccctc gggggcacgg ccggtggcgg aagatggcct cccgggagca cggctctcgcg
181 gttggcccaa aagccaggtc cccggcgacg ttcgcctcgg caacggtggt tgagagaccc
241 tgcacggcg ccgcgcgggc cgtcgtcgtc ccgaccggg aagaaccgga ccccttctcg
301 caacgcgacc ccaggtcagg cgagactacc
//
```

2. *Intsia bijuga*

LOCUS LC388690 493 bp DNA linear PLN 19-JUN-2018
 DEFINITION *Intsia bijuga* genes for 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence.
 ACCESSION [LC388690](#)
 VERSION LC388690.1
 KEYWORDS .
 SOURCE *Intsia bijuga*
 ORGANISM [Intsia bijuga](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Detarioideae; Afzelieae; *Intsia*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 493)
 AUTHORS Kornsap,K. and Vongsak,B.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (14-JUN-2018) to the DDBJ/EMBL/GenBank databases.
 Contact:Kanokporn Kornsap
 Burapha university, Faculty of Pharmaceutical Sciences Burapha University; 169 Long-Hard Road, Saensook, Mueang Chonburi District, Chonburi 20131, Thailand
 URL :<http://pharm.buu.ac.th/>
 REFERENCE 2
 AUTHORS Kornsap,K. and Vongsak,B.
 TITLE DNA fingerprint of *Bruguiera hainesii*, and *Intsia bijuga* from Kung Krabaen bay development study center.
 JOURNAL Unpublished (2018)
 COMMENT
 FEATURES Location/Qualifiers
[source](#) 1..493
 /collected_by="Boonyadist Vongsak"
 /collection_date="2016-10-12"
 /country="Thailand:Tha Mai District, Kung Krabaen Bay Royal Development Study Center"
 /db_xref="taxon:162812"
 /mol_type="genomic DNA"
 /organism="*Intsia bijuga*"
[misc_RNA](#) <1..>493
 /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA"
 BASE COUNT 105 a 163 c 153 g 72 t
 ORIGIN
 1 cgatgaagaa cgtagcgaaa tgcgatactt ggtgtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc
 61 gagtctttga acgcaagttg cgcccgaagc caataggccc agggcacgtc tggctgggtg
 121 tcacacaaag tcgcccac cccgacgccc gtcgcacggc gccgcggggg gcggacgctg
 181 gctctccggtg agccccgct cgcgatggc cgaataaga gctcccgggtg cggcgagcac
 241 cagggcgac ggtggttgag tcgagtcgag acgatcgtca tcgctccggc ccgttcgtgc
 301 gtgccccgc ccctaacct aagagaggag ctctctctcc gagaccctac cgggcccgtc
 361 catccccct caccacact aacctaact gaggcgggag ggaggaggga cggacggagc
 421 ccttcgacgc gacctagct caggcggggc taccgctga gtttaagcat atcaataagc
 481 ggaggaaaag aaa
 //

3. ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Boonyadist Vongsak

- ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

- หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัด

ชลบุรี 20131 E-mail: kongletter@hotmail.com

- ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2556 ปริญญาเอก ปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิทยาการพิษเภสัชภัณฑ์
(Phytopharmaceutical Sciences) มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ. 2551 ปริญญาโท เภสัชศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเภสัชเวท (Pharmacognosy)
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2549 ปริญญาตรี เภสัชศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปกร

-

- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสมุนไพร สารเคมีจากสมุนไพร การควบคุมคุณภาพสมุนไพร การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร

- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย :

1.โครงการวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดชันโรงในสวนผลไม้ของไทย (ทุนอุดหนุนจากสกอ.ปีงบประมาณ 2558)

2. โครงการวิจัยเรื่อง ปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบขลู่ (ทุนอุดหนุนจากรัฐบาล ปีงบประมาณ 2558)

3. โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาสารสำคัญ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และต้านเชื้อจุลินทรีย์ของชันผึ้งจากชันโรงในจังหวัดจันทบุรี (ทุนอุดหนุนจากคณะเภสัชศาสตร์.ปีงบประมาณ 2557)

Selected publications:

Vongsak, B., Kongkiatpaiboon, S., Jaisamut, S., Machana, S., and Pattarapanich, C. (2015). *In vitro* alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(5), 445–450. (แหล่งทุน: สกอ.)

Kongkiatpaiboon, S., Vongsak, B., Machana, S., Weerakul, T., and Pattarapanich, C. (2015). Simultaneous HPLC quantitative analysis of mangostin derivatives in *Tetragonula pagdeni* propolis extracts. *Journal of King Saud University - Science*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2015.06.007>. (แหล่งทุน: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา)

Vongsak, B., Mangmool, S., and Gritsanapan, W. (2015). Antioxidant Activity and Induction of mRNA Expressions of Antioxidant Enzymes in HEK-293 Cells of *Moringa oleifera* Leaf Extract. *Planta Medica*. 81, 1084-1089. (แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

Vongsak, B., Sithisarn, P., and Gritsanapan, W. (2014). Simultaneous HPLC quantitative analysis of active compounds in leaves of *Moringa oleifera* Lam. *Journal of Chromatographic Science*, 52 (7):641-5. (แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

Vongsak, B., Gritsanapan, W., Wongkrajang, Y., and Jantan, I. (2013). *In vitro* inhibitory effects of *Moringa oleifera* leaf extract and its major components on chemiluminescence and chemotactic activity of phagocytes. *Natural Product Communications*, 11, 1559-1561. (แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

Vongsak, B., Sithisarn, P., and Gritsanapan, W. (2013). Bioactive contents and free radical scavenging activity of *Moringa oleifera* leaf extract under different storage conditions. *Industrial Crops and Products*, 49, 419-421. (แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ผู้ร่วมโครงการวิจัย 1

1. ชื่อ – สกุล (ภาษาไทย) นางสาวศศิภาวรรณมาชณะนา
Miss Sasipawan Machana
2. ตำแหน่ง อาจารย์
3. หน่วยงานที่สังกัด คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา
ถนนลงหาดบางแสนตำบลแสนสุขอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 086-370-6108 Email: sasipawan.machana@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2555 ปริญญาเอก ปรัชญาคุณวุฒิบัณฑิต สาขาวิจัยและพัฒนาเภสัชภัณฑ์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2550 ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

Cell culture, Pharmacognosy, Biological activity, Thai herbal medicinal plants, FTIR-microspectroscopy

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

Selected Publications:

Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux S. Anticancer effect of the extracts from *Polyalthia eveccta* against human hepatoma cell line (HepG2) cells. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2012. 5(2); 368-374

Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux S., Thumanu K., Tanthanuch W. Synergistic anticancer effect of the extracts from *Polyalthia eveccta* caused apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, (2)8, 2012; 589-596

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. Chonant C, Bambery K, Jearanaikoon N, Chio-Srichan S, Limpaboon T, Tobin M, et al. Discrimination of micromass-induced chondrocytes from human mesenchymal stem cells by focal plane array-Fourier transform infrared microspectroscopy. *Talanta*. 2014 Jun 130; 39–48.
2. Chonant C, Jearanaikoon N, Leelayuwat C, Limpaboon T, Tobin MJ, Jearanaikoon P, et al. Characterisation of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using synchrotron FTIR microspectroscopy. *Analyst*. 2011 Jun 21; 136(12): 2542-51.
3. Chonant C., Wongwattanakul M., Janan M., Limpaboon T., Leelayuwat C., Jearanaikoon N., Bunyaratvej A., Sila-asna M., Jearanaikoon P. Infrared spectral analysis of chondrocyte induction from human mesenchymal stem cell. *J Med Tech Phy Ther*. 2009 January-April; Vol 21, No.1 (Supplement).

ผู้ร่วมโครงการวิจัย 3

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว นภัสสร ฉันทธำรงศิริ
(English) Miss Naphatson Chanthathamrongsiri
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
3. หน่วยงานและสถานที่ที่ติดต่อได้สะดวก
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ถนนลงหาดบางแสน ต.แสนสุข
อ.เมือง จ.ชลบุรี 20130 Email: naphatson@buu.go.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2557 ปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
(Doctor of Philosophy in Pharmaceutical Sciences)
- พ.ศ. 2550 เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
(Master of Pharmacy in Pharmaceutical Sciences)
- พ.ศ. 2547 เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
(Bachelor of Pharmacy in Pharmaceutical Sciences)

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

การแยกสกัดสารและการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล
(Marine Natural Products)

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

-

8. ผลงานตีพิมพ์

Wattapiromsakul, C.; Chanthathamrongsiri, N.; Bussarawit, S.; Yuenyongsawad, S.; Plubrukarn, A.; Suwanborirux, K. **8-Isocyanoamphilecta-11(20),15-diene, a new antimalarial isonitrile diterpene from the sponge *Ciocalapata* sp. *Can. J. Chem.* 2009, 87, 612 - 618. (แหล่งทุน: ทุนวิจัยโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการสาขาเภสัชศาสตร์ และทุนวิจัยบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)**

Chanthathamrongsiri, N.; Yuenyongsawad, S.; Wattanapiromsakul, C.; Plubrukarn, A. Bifunctionalized amphilectane diterpenes from the sponge *Stylissa* cf. *massa*. *J. Nat. Prod.* 2012, 75, 789 - 792. (แหล่งทุน: ทุนวิจัยโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษกร่วมกับ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2550)

ผู้ร่วมโครงการวิจัย 4

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายบัลลังก์ เนื่องแสง

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr.Bunlung Niangsaeng

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงานที่สังกัด คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี
57 หมู่ 1 ถนนชลประทาน ต.โขมง อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 22170
โทรศัพท์ 0-3931-0000 ต่อ 3011

E-mail address: bunlung@buu.ac.th

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตบางแสน	วท.บ.	วาริชศาสตร์	2533
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	วท.ม.	วิทยาศาสตร์การประมง	2542
มหาวิทยาลัยมหิดล	ปร.ด.	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีศึกษา	2554

สาขาวิชาการที่มีเชี่ยวชาญ / ความชำนาญพิเศษ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เทคโนโลยีการเพาะขยายพันธุ์สัตว์น้ำ สรีรวิทยาของสัตว์น้ำ

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

Sirikharin, R. , Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Duong Chi, T., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Nuangsaeng, B., Thitamadee, S., Flegel, T.W. and Sritunyalucksana, K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLOS ONE*, 10 (5): 1-16. Impact Factor: 3.53.

Joshi, J., Srisala, J., Truong, V.H., Chen, I.T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Fang Lo, C., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S. (2014). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 428-429, 297-302. Impact Factor: 1.83.

Chen, X., Sonchaeng, P., Yuvanatemiya, V., Nuangsaeng, B., Ai, W. (2014). Complete mitochondrial genome of the whitetip reef shark *Triaenodon obesus* (Carcharhiniformes:Carcharhinidae). *Mitochondrial DNA*, DOI:10.3109/19401736.2014.926499. Impact Factor: 1.70.