

อาเจียน ปวดศีรษะ และขับปัสสาวะ ทั้งต้นนำมาต้มหรือแช่น้ำอาบแก้ผื่นคัน มีวิตามินเอสูงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ใบใช้แก้ไข้ตัวร้อน แก้พิษอักเสบ บำรุงสายตา บำรุงโลหิต แก้โรคโลหิตจาง ป้องกันเลือดออกตามไรฟัน (โชติอนันต์ และคณะ, ๒๕๕๐) โดยมีรายงานการพบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระในพื้นที่บ้านสามชนิดนี้ (เกตุศิณี และ คณะ, ๒๕๕๔) ดังนั้นทั้งผักกูด พอคำดีเมียและมะกอกป่าจึงถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของงานสมุนไพรไทย สำหรับการดำเนินงานวิจัยเพื่อให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยได้แก่ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การกระจายพันธุ์ และการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักกูด พอคำดีเมีย และมะกอกป่า และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี คุณค่าทางอาหารและโภชนาการของผักกูด พอคำดีเมีย และมะกอกป่า รวมทั้งทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตและความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งให้เกิด apoptosis เพื่อนำผลวิจัยที่ได้ไปพัฒนางานทางการแพทย์ ซึ่งข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะเป็นการช่วยส่งเสริมและเพิ่มคุณค่าผักพื้นบ้านทั้งสามชนิดให้สามารถพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจได้อีกทางหนึ่ง

ระเบียบวิธีการวิจัย

๑. การเก็บตัวอย่างผักพื้นบ้านและเก็บข้อมูลเบื้องต้น

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่าง ผักกูด พอคำดีเมีย และมะกอกป่า ในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน ในช่วงระหว่างเดือนพฤศจิกายน ๒๕๕๓ ถึง เดือนกรกฎาคม ๒๕๕๔ โดยเก็บรวบรวมต้นพันธุ์ กิ่งพันธุ์ ส่วนของใบ ยอด และผล โดยบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐาน ได้แก่ ลักษณะ สี ขนาด รูปทรงของใบและผล การกระจายพันธุ์ และนิเวศวิทยา โดยมะกอกได้สำรวจและเก็บตัวอย่างในพื้นที่เชียงใหม่ ลำพูน และลำปาง พอคำดีเมียได้สำรวจและเก็บตัวอย่างในพื้นที่เชียงใหม่ ลำพูนและแม่ฮ่องสอน ขณะที่ผักกูดสำรวจและเก็บตัวอย่างในพื้นที่เชียงใหม่ และแม่ฮ่องสอน โดยที่ต้นพันธุ์ผักพื้นบ้านทั้งสามชนิดที่เก็บรวบรวมมาได้มีรหัสต้นพันธุ์คือ แหล่งเก็บ (สถานที่เก็บหรืออำเภอ) ลำดับต้นที่เก็บ/พื้นที่เก็บ (จังหวัด) ดังตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ รหัสต้นพันธุ์ผักพื้นบ้านที่รวบรวมมาจาก ๓ จังหวัดภาคเหนือตอนบน

พื้นที่	สัญลักษณ์พื้นที่	สัญลักษณ์แหล่งที่เก็บ	รหัสต้นพันธุ์
จ. เชียงใหม่ อ. เมือง อ. สาราณี อ. สันกำแพง อ. ดอยสะเก็ด	CM	M SP SK DS	M No. /CM or CM No. SP No. /CM SK No. /CM DS No. /CM
จ. ลำปาง	LP	LP	LP No.
จ. ลำพูน อ. บ้านธิ อ. แม่ทา อ. ป่าซาง	L	BT MT PS	BT No. /L or L No. MT No. /L or L No. PS No. /L or L No.
จ. แม่ฮ่องสอน อ. ปาย อ. เมือง อ. ขุนยวม อ. แม่ลาน้อย อ. แม่สะเรียง	MH	P M KY ML MS	P No. /MH M No. / MH KY No. /MH ML No. /MH MS No. /MH

๒. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและเคมี คุณค่าทางอาหารและโภชนาการของผักพื้นบ้านทั้งสามชนิด เช่น ปริมาณวิตามินต่างๆ ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินบี วิตามินอี ธาตุอาหารต่างๆ และปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด โดยมะกอกวิเคราะห์จากส่วนของผล และยอดอ่อน ผักกูดใช้ส่วนของพرونดและใบ ขณะที่พ้อคำดีเมียใช้ส่วนของต้นและยอดอ่อน ซึ่งงานวิจัยนี้นำตัวอย่างผักทั้งสามชนิดส่งไปตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการสาขาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA) จังหวัดเชียงใหม่

๓. การขยายพันธุ์และปลูกรวบรวมต้นพันธุ์

ศึกษาการขยายพันธุ์มะกอกขยายพันธุ์โดยการปักชำกิ่ง ส่วนพ้อคำดีเมียขยายพันธุ์ด้วยการแยกเหง้า สำหรับผักกูดโดยการแยกกอ แยกไหล แล้วนำต้นพันธุ์ที่ได้มาปลูกรวบรวมไว้ในเรือน

เพาะชำเพื่อขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมาก แล้วเก็บใบอ่อนเพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ ขณะที่ส่วนยอดและใบนำไปใช้ในการสกัดสารสมุนไพร

๔. การศึกษาพันธุกรรมพืชในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล

การศึกษาทางด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

๑.๑ ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับผักทั้งสามชนิด

ขั้นตอนและวิธีการสกัดดีเอ็นเอสามารถทำได้หลายวิธีการ สำหรับงานวิจัยนี้ใช้ชุดสกัดจากโคเจนที่มีชื่อการค้าว่า DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากผักพื้นบ้านทั้งสามชนิดดังตารางที่ ๒ ตารางที่ ๓ และ ตารางที่ ๔

ตารางที่ ๒ มะกอกจำนวน ๑๘ ต้นพันธุ์ที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

มะกอก (No.)	รหัสต้นพันธุ์	แหล่งที่เก็บ (Location)	พื้นที่เก็บ (Area)
๑.	M๒/CM (CM๒)	วัดใหม่ห้วยทราย อ. เมือง	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๒.	MW๔/CM (CM๓)	สถานีวิจัยทุ่งหลวง อ.แม่วาง	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๓.	SP๑/CM	สวนลำไย อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๔.	SP๓/CM	สวนลำไย อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๕.	SP๑๐/CM	โรงงานยาสูบ อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๖.	L๑	ป่าบ้านธิ อ. บ้านธิ	ลำพูน (LAMPHUN)
๗.	L๖	สวนไผ่บ้านน้ำดิบ ป่าซาง	ลำพูน (LAMPHUN)
๘.	L๙	ป่าวัดพระพุทธรูปตากผ้า อ. ป่าซาง	ลำพูน (LAMPHUN)
๙.	L๑๑	สวนบ้านน้ำดิบหลวง อ. ป่าซาง	ลำพูน (LAMPHUN)
๑๐.	L๑๕	วัดสูงธรรมวาราราม อ. บ้านธิ	ลำพูน (LAMPHUN)
๑๑.	L๑๙	วัดสูงธรรมวาราราม อ. บ้านธิ	ลำพูน (LAMPHUN)
๑๒.	L๒๑	สวนห้วยนาบ้านป่าตาล อ. บ้านธิ	ลำพูน (LAMPHUN)
๑๓.	L๒๕	ป่าสุสานบ้านร่องหัวตุ้ง อ. บ้านธิ	ลำพูน (LAMPHUN)
๑๔.	LP๑	สวนห้วยนาหนองหล่ม อ. ห้างฉัตร	ลำปาง (LAMPANG)
๑๕.	LP๒	สวนป่าชุมชน อ. ห้างฉัตร	ลำปาง (LAMPANG)
๑๖.	LP๔	หน่วยจัดการป่าแม่ยาว อ. ห้างฉัตร	ลำปาง (LAMPANG)
๑๗.	LP๕	หน่วยจัดการป่าแม่ยาว อ. ห้างฉัตร	ลำปาง (LAMPANG)
๑๘.	LP๖	สวนป่าหลังอำเภอห้างฉัตร	ลำปาง (LAMPANG)

ตารางที่ ๓ ผักพ่อดำดีมีเยจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์ที่ใช้วิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผักกูด (No.)	รหัสต้นพันธุ์	แหล่งที่เก็บ (Location)	พื้นที่เก็บ (Area)
๑.	MT๑/L	ป่าชุมชนทาป่าเปา อ. แม่ทา	ลำพูน (LAMPHUN)
๒.	MT๒/L	ป่าชุมชนทาป่าเปา อ. แม่ทา	ลำพูน (LAMPHUN)
๓.	P๒/MH (MH๑-๒)	ป่าห้วยแม่ปิง อ. ปาย	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๔.	P๖/MH (MH๑-๖)	ป่าห้วยแม่ปิง อ. ปาย	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๕.	KY๑/MH (MH๒-๑)	ป่าห้วยแม่เจ้า อ. ขุนยวม	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๖.	KY๓/MH (MH๒-๓)	ป่าห้วยแม่เจ้า อ. ขุนยวม	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๗.	ML๓/MH (MH๓-๓)	ป่าบ้านทุ่งรวงทอง อ. แม่ลาน้อย	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๘.	ML๔/MH (MH๓-๔)	ป่าบ้านทุ่งรวงทอง อ. แม่ลาน้อย	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๙.	MS๑/MH (MH๔-๑)	ป่าแม่สะเรียง อ. แม่สะเรียง	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๑๐.	MS๒/MH (MH๔-๒)	ป่าแม่สะเรียง อ. แม่สะเรียง	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๑๑.	DS๑/CM	ป่าโป่งกุ่ม อ. ดอยสะเก็ด	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๑๒.	DS๒/CM	ป่าโป่งกุ่ม อ. ดอยสะเก็ด	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)

ตารางที่ ๔ ผักกูดจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์ที่ใช้วิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผักกูด (No.)	รหัสต้นพันธุ์	แหล่งที่เก็บ (Location)	พื้นที่เก็บ (Area)
๑.	MT๑/CM	ปางลัน ป่าแป อ. แม่แตง	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๒.	DS๑/CM	โครงการหลวงป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๓.	DS๒/CM	โครงการหลวงป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๔.	MW๑/CM	ห้วยตอง อ. แม่วาง	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๕.	MW๒/CM	ห้วยตอง อ. แม่วาง	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๖.	M๑-๑/MH (MH๑-๑)	ห้วยน้ำกาด อ. เมือง	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๗.	M๑-๒/MH (MH๑-๒)	ห้วยน้ำกาด อ. เมือง	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๘.	M๒-๑/MH (MH๒-๑)	ถ้ำปลา อ. เมือง	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๙.	M๒-๓/MH (MH๒-๓)	ถ้ำปลา อ. เมือง	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๑๐.	KY๑-๑ (MH๓-๑)	ลำน้ำ อ. ขุนยวม	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๑๑.	KY๑-๒ (MH๓-๒)	ลำน้ำ อ. ขุนยวม	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)
๑๒.	KY๒-๑ (MH๔-๑)	เมืองปอน อ. ขุนยวม	แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son)

๓.๒ การใช้คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

การใช้คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอทำโดยใช้วิธีการอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยอะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น ๐.๘% ใน ๐.๕XTBE แล้วนำดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณที่ดีมา เจือจางความเข้มข้นให้เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

๓.๓ การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอของผักแต่ละชนิดจากแหล่งต่างๆที่สกัดได้ มาศึกษาความหลากหลายทาง พันธุกรรมด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ โดยเลือก Thermal Cycle ที่เหมาะสมแล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยหลักการ PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ PCR Master mix solution (*i*-Taq) สำเร็จรูป และคัดเลือก Primer ที่เหมาะสมจาก UBC Primer (The University of British Columbia) จำนวน ๑๐๐ ชนิด เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ลาย พิมพ์ดีเอ็นเอ โดยบันทึก จำนวนแถบ การเกิดแถบ การมี หรือไม่มีแถบ จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีการแทนค่า ไม่มีแถบ เท่ากับ ๐ และมีแถบ เท่ากับ ๑ วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม คอมพิวเตอร์ NTSYS pc ver. ๒.๒

๕. การทำสารสกัดสมุนไพรและการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต

เซลล์มะเร็งและความสามารถในการชักนำให้เกิด apoptosis

สกัดสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของผักกูด พอคำดีเมีย และมะกอกป่าด้วยกรรมวิธีที่ เหมาะสมได้แก่ การต้มด้วยน้ำร้อน และการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (เมทานอลเข้มข้น ๙๙.๙๙%) โดยนำส่วนของพืชใบหรือยอดอ่อน นำมาล้างทำความสะอาดและอบแห้งที่อุณหภูมิ ๕๐c จนกว่าจะแห้งกรอบและน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง (ประมาณ ๗ วัน) จากนั้นนำมาบดให้เป็น ผงละเอียด

การต้มด้วยน้ำร้อน ทำได้โดยนำผงละเอียดประมาณ ๑๐๐-๒๐๐ กรัม ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา ๓๐ นาที แล้วนำส่วนของน้ำมาทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหย (evaporation) และ สารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -๒๐๐c ตลอดการทดลอง

การสกัดด้วย methanol ทำโดยนำผงละเอียดประมาณ ๑๐๐-๒๐๐ กรัม มาบ่ม (incubate) กับสารละลายเมทานอลเข้มข้น ๙๙.๙๙% (๑๐๐% methanol) ปริมาณ ๑๐๐ มล. (ml) เป็นระยะเวลา ๒-๓ วัน แล้วนำส่วนของสารละลายเมทานอล มาทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่น ระเหย แล้วนำสายละลายเมทานอลที่ได้จากการกลั่นระเหยนำกลับไปยังบ่มกับผงหรือตะกอนของ สารสกัดอีกครั้ง จากนั้นนำกลับมากลั่นอีกครั้งหนึ่ง สารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -๒๐๐c ตลอดการทดลอง