

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

พืชสกุลอังกาบ (*Barleria* L.) อยู่ในวงศ์ Acanthaceae พืชในสกุลนี้สามารถนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพร เช่น เสดดพังพอน (*B. lupulina*) และอังกาบหนู (*B. prionitis*) แต่ข้อมูลการวิจัยของอังกาบ (*B. cristata*) ยังไม่มีรายงาน ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อบ่งชี้สายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลอังกาบ (*Barleria* sp.) โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล และศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบของอังกาบ (*B. cristata* L.) ที่มีผลต่อความอยู่รอดของเซลล์ในหลอดทดลอง รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้ จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 16 ตัวอย่าง และพืชนอกสกุล *Baleria* จำนวน 2 ตัวอย่าง คือทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง trnL-trnF ของคลอโรพลาสต์ โดยใช้ไพรเมอร์ C และ F พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 930-967 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลาย สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 6 กลุ่ม ตามสปิชีส์ได้อย่างชัดเจน คือ เสดดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*) อังกาบหนู (*B. prionitis*) สังกกรณี (*B. strigosa*) และอังกาบ (*B. cristata*) หล้าหัวนาค (*B. strigosa* var. *polytricha*) และระงับพิษ (*Barleria siamensis*) ที่แสดงความใกล้ชิดกับพืชนอกสกุล และเมื่อศึกษาความหลากหลายของพืชสกุล *Barleria* จำนวน 15 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี (Randomly Amplified Polymorphic DNA: RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์จำนวน 74 ชนิด มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม พบว่าไพรเมอร์จำนวน 23 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชัดเจนจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ OPA-01, OPA-12, OPA-16, OPA-18, OPA-20, OPC-02, OPC-04, OPC-05, OPH-08 และ OPH-12 มาวิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Jaccard ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.01e มีค่าระหว่าง 0.14-0.70 และเมื่อสร้างเดนโดรแกรมโดยวิธี UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ 3 กลุ่มใหญ่ คือ เสดดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*) อังกาบหนู (*B. prionitis*) และตัวอย่างอังกาบ (*B. cristata*) และสังกรณี (*B. strigosa*) รวมทั้งหล้าหัวนาค (*B. strigosa* var. *polytricha*) และตัวอย่างพืชที่ไม่สามารถระบุกลุ่มแน่ชัดมีแนวโน้มที่จะอยู่ในกลุ่มเดียวกับอังกาบและสังกรณี โดยสังกรณี (*B. strigosa*) และอังกาบ (*B. cristata*) แสดงความใกล้ชิดกัน จึงควรมีการทบทวนเรื่องการจัดจำแนกของพืชสกุล *Barleria* นี้ต่อไป แต่อย่างไรก็ตามควรศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นด้วย

ในการทดลองเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ (*B. cristata*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบที่ได้มาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 6 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 (murine lymphocytic leukemic) เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF7 (human breast cancer) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT29 (human colon adenocarcinoma) เซลล์ไตลิงชนิด Vero cell (African green monkey kidney) เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 (human hepatoma) และเซลล์มะเร็งช่องปากของมนุษย์ชนิด KB (human mouth epidermal adenocarcinoma) ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในหลอดทดลองด้วย

วิธี Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) พบว่าสารสกัดหยาบแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด และเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด P388 ซึ่งเป็นเซลล์ประเภท Lymphocyte มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์เป็นพิษ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50}) ในเซลล์ P388, MCF7, HT29 และ KB เท่ากับ 1447.52, 866.36, 1907.56 และ 1236.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์เฉพาะเซลล์ P388 โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 966.22 และ 1742.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยก่อนการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด ได้ทดสอบสารละลาย mitomycinC ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 200, 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์จำนวน 4 เซลล์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารละลาย mitomycinC ในระดับความเข้มข้นต่างๆ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด ทำให้มีอัตราการมีชีวิตรอดลดลงแตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์ โดยเป็นพิษต่อเซลล์ P388 มากที่สุด โดยเซลล์ไลน์ชนิด P388, MCF7, HT29 และ Vero cell มีค่า CC_{50} เท่ากับ 51.20, 118.97, 61.65 และ 78.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารละลาย mitomycinC ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control)

เมื่อนำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion ต่อเชื้อแกรมบวก 3 ชนิด (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341) และแกรมลบ 2 ชนิด (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* ATCC 25922) ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเฉพาะสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีฤทธิ์ในการยับยั้งต่อ *S. aureus* และ *E. coli* ในระดับต่ำ และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS) พบสารที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่จากสารสกัดหยาบที่วิเคราะห์โดย GC-MS คือ 9,12,15-Octadecatrien-1-ol หรือ Linoleyl alcohol หรือ Linolenic alcohol ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ไขมัน (fatty alcohol) สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับสารลดแรงตึงที่เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางค์ อาหาร และเป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงอาจนำสารสกัดจากใบอังกาบที่มีแอลกอฮอล์ไขมันจำนวนมากมาใช้ในเชิงพาณิชย์ เนื่องจากเป็นสารธรรมชาติ แอลกอฮอล์ชนิดนี้ไม่ทำให้เกิดอาการระคายเคือง มีคุณสมบัติช่วยให้เครื่องสำอางติดผิวดี ทำความสะอาดผิว ชะล้างสิ่งสกปรกและไขมัน รวมทั้งมีคุณสมบัติทำให้ผิวชุ่มชื้น