

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีการปลูกพืชไร่ พืชสวน และทำนาเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีวัชพืชที่เกิดแทรกอยู่กับพืชผลที่ปลูก เกษตรกรต้องมีการกำจัดวัชพืช ซึ่งการกำจัดวัชพืชอาจมีการใช้สารเคมีหรือการฝัง ซึ่งการใช้สารเคมีที่ใช้อาจทำให้เกิดสารพิษตกค้างในพืชผลทางการเกษตร

ปัจจุบันเริ่มมีการสนใจศึกษาการใช้ประโยชน์จากวัชพืชหลายชนิด เช่น ต้นโทงเทง ซึ่งเป็นวัชพืชชนิดหนึ่งที่เป็นสมุนไพร พบได้มากในสวน ทุ่งนาหรือหน้าดินเปิดใหม่ก่อนที่จะมีการเพาะปลูก มีการนำส่วนต่างๆ ของต้นโทงเทงมาต้มใช้เป็นยารักษาโรค ผลอ่อนและยอดอ่อน ใช้ต้มเป็นผักจิ้ม น้ำพริก หรือใส่ในแกงอ่อม และแกงเลียง มีรสขม แก้ท้องน้ำลายอักเสบ คออักเสบ ร้อนใน กระจายน้ำ ทาแก้แผลเปื่อย ผลโทงเทงสามารถนำมารับประทานได้ โทงเทงสายพันธุ์ต่างประเทศที่มีผลขนาดใหญ่ มีรสหวานและหอม เป็นที่นิยมบริโภค จากการวิจัยพบว่าต้นโทงเทง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ช่วยป้องกันสารกันเลือดและเสริมภูมิคุ้มกันได้ สารสกัดของต้นโทงเทงมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง สารเคมี physalin F ที่พบเป็นองค์ประกอบในต้นโทงเทงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่หน้าอก T-47d ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งในมนุษย์ [1] และสารสกัดจากต้นโทงเทง โดยใช้สารเอทานอล เมทานอล และ คลอโรฟอร์ม จากใบและแคลลัส ของต้นโทงเทงยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *Bacillus pumillus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* และยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium solani* และ *Fusarium oxysporum* ได้อีกด้วย [2] และพบว่าใบของโทงเทงมีฤทธิ์ในการรักษาโรคเบาหวานในหนูทดลอง [3]

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นโทงเทงแล้วยังสามารถช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับวัชพืชที่มีการเจริญเติบโตมากในพืชสวนไร่นาของเกษตรกร อาจช่วยลดการใช้สารเคมีที่ทำให้ต้นทุนการผลิตผลทางการเกษตรสูง และอาจมีสารพิษตกค้างได้อีกด้วย และในปัจจุบันยังพบว่ายังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นโทงเทงได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรตีโอไลติกและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอีกหลายชนิด ซึ่งเป็นเหตุจูงใจในการศึกษานี้ เพื่อช่วยส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากต้นโทงเทงทางเภสัชวิทยา

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ช่วยส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากวัชพืช
2. เพิ่มคุณค่าทางเภสัชวิทยาของวัชพืช

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

นำส่วนต่าง ๆ ของต้นโทงเทง ได้แก่ ใบ ลำต้น ผล และราก มาสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน ด้วยเครื่องอัลตราโซนิก แล้วนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช และฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง เป็นต้น

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากวัชพืช
2. ส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากต้นโทงเทง มาใช้ให้เป็นประโยชน์ทางเภสัชวิทยา

## บทที่ 2

### แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แนวคิด ทฤษฎี

ต้นโทงเทงมีชื่อสามัญว่า cutleaf groundcherry หรือ husk potato มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Physalis angulata* L. พืชชนิดนี้ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae โทงเทงเป็นพืชในตระกูลเดียวกับมะเขือเทศ มีชื่อท้องถิ่นหลายชื่อ ได้แก่ โคมจีน, โคมญี่ปุ่น, มะก่องข้าม, ปิงเป้ง (หนองคาย), ปุงปิง (ปัตตานี), หน้ำถงแดง, หน้ำต้มตอก, บาดอมตอก, บาด้อมตอก (เชียงใหม่), ชาพ่อเหมาะ (กะเหรี่ยงแดง) อนุกรมวิธาน (taxonomy) ของต้นโทงเทง แสดงได้ดังนี้

Domain: Eukaryota

Kingdom: Plantae

Phylum: Spermatophyta

Subphylum: Angiospermae

Class: Dicotyledonae

Order: Solanales

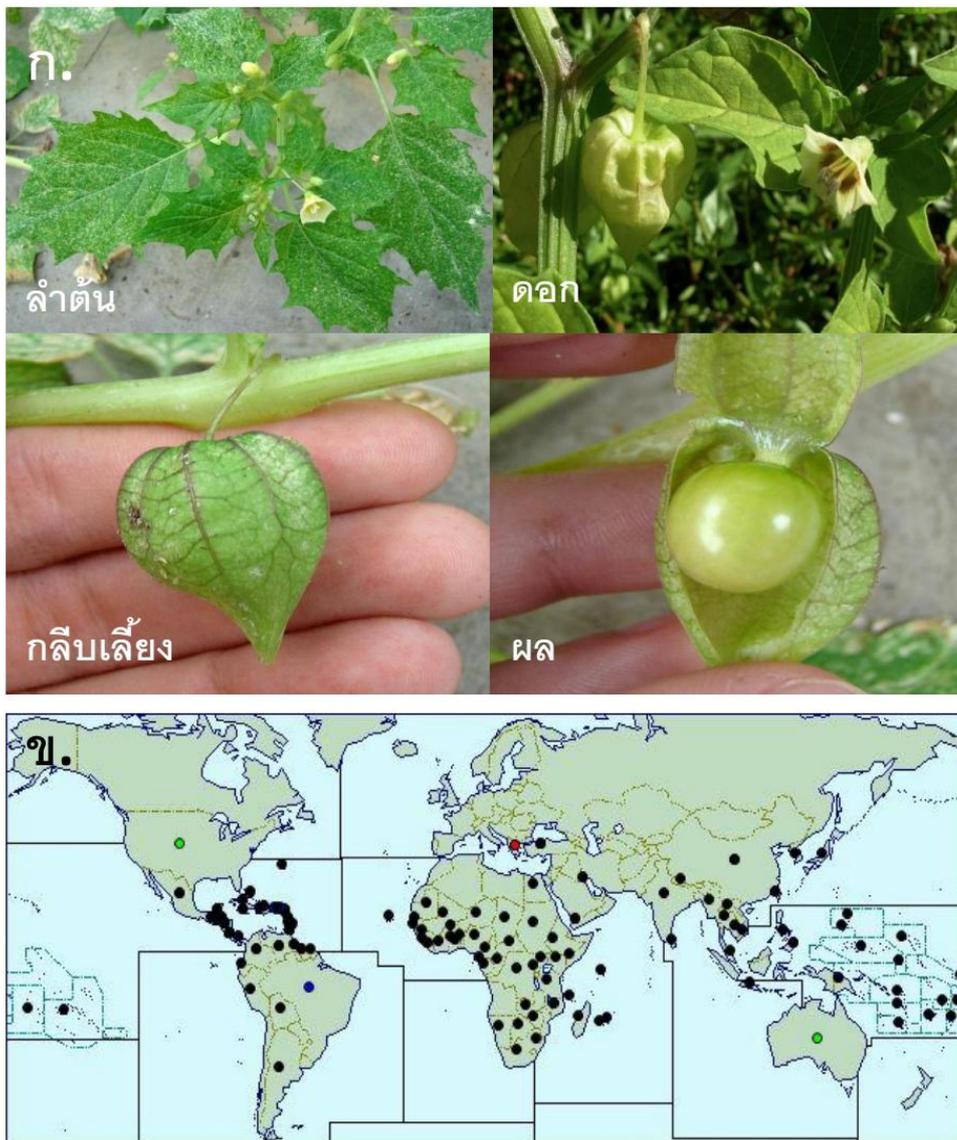
Family: Solanaceae

Genus: *Physalis*

Species: *Physalis angulata*

โทงเทงเป็นพืชล้มลุก มีความสูงประมาณ 30-50 ซม. กิ่งอ่อนสีเขียว มีสันเป็นเหลี่ยมต้นๆ ใบเป็นใบเดี่ยว รูปไข่ถึงรูปรี มีความกว้าง 2-4 ซม. ยาวประมาณ 3-6 ซม. โคนใบมน ปลายใบแหลมหรือเป็นติ่ง ขอบใบเรียบหรือจักเล็กน้อย ดอกสีเหลืองอ่อน ตรงกลางสีน้ำตาลแกมเหลือง ออกเป็นช่อสั้นตามซอกใบ ดอกบาน

ขนาด 4-6 มม. กลีบดอกเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็น 5 แฉก เกสรผู้ 5 อัน ผลทรงกลมคล้ายผลมะเขือเทศ ผิวเรียบมัน ขนาด 12 มม. มีกลีบรองดอกแผ่ขยายหุ้มผล ลักษณะเป็นแผ่นบางเชื่อมกันเป็นมูมตามกลีบ เมล็ดจำนวนมากรูปกลมแบน ขนาด 2 มม. พบในจีน ไต้หวัน ประเทศไทยพบทางภาคเหนือ บริเวณป่าเปิดและที่ชุ่มชื้นทั่วไป ที่ระดับความสูงไม่เกิน 1,000 ม. ออกดอกและติดผลช่วงเดือนพฤษภาคม-สิงหาคม ผลสุกรับประทานได้ มีรสหวาน



ภาพที่ 2.1 ก. ลักษณะลำต้น, ดอกและผล, และกลีบเลี้ยงและผลของต้นโงะเทง

ข. การกระจายพันธุ์ของต้นโงะเทงบริเวณภูมิภาคต่าง ๆ [4]



ภาพที่ 2.2 ลักษณะผลโทงเทงตากแห้ง เก็บมาจาก อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ

## 2.2 สรรพคุณทางยา

สามารถใช้ประโยชน์จากต้นโทงเทงได้ทุกส่วน ได้แก่ ต้น, ผล, ราก, ใบ และเมล็ด ต้นโทงเทงเมื่อนำมาโขลกกับเหล้าจะช่วยรักษาแผลมีหนอง แผล ไอมีเสมหะ หอบหืด รักษาอาการอักเสบของไขข้อ หลอดลม รักษาอาการฟกช้ำ แก้กษะหายน้ำ เป็นยาระบายและช่วยขับปัสสาวะ ส่วนของผลโทงเทง ช่วยรักษาอาการ คออักเสบ ร้อนใน กระหายน้ำ แผลเน่าเปื่อย ส่วนของเมล็ด ช่วยบรรเทาอาการไข้ ร้อนใน ขับปัสสาวะ รักษาอาการบวมน้ำและเป็นยาระบาย

ส่วนของใบ ช่วยรักษาอาการปวดศีรษะ การอักเสบของกระเพาะปัสสาวะอักเสบและตับ ส่วนของราก ใช้ขับพยาธิและรักษาโรคเบาหวาน โดยต้มส่วนของรากกับน้ำรับประทาน ส่วนของเมล็ด ใช้แก้ไข้ ร้อนใน ปัสสาวะเป็นเลือด ส่วนของต้น จะช่วยขับปัสสาวะ แก้เจ็บคอ แก้ไอ แก้ต่อมทอนซิลอักเสบ แก้ไข้ แก้ร้อนใน และแก้พิษ

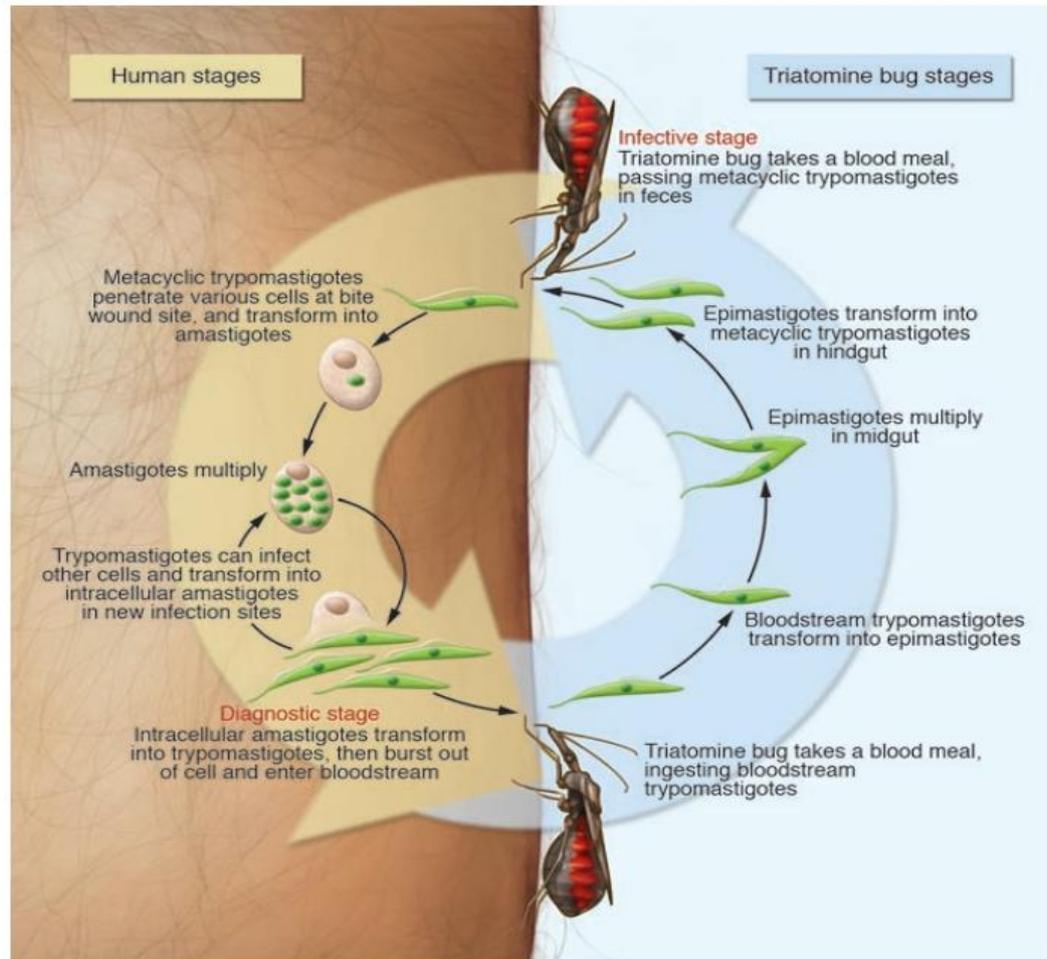
## 2.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นโงเทง

### 2.3.1 การยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรโตซัว

ต้นโงเทง (*Physalis angulata*) มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของโปรโตซัวลิสมาเนีย (*Leishmania amazonensis*) เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากรากที่สกัดด้วยน้ำ มีผลต่อการเจริญทั้งระยะ promastigotes และระยะ amastigote ของโปรโตซัวชนิดนี้ และสารสกัดยังทำให้ปริมาณสารอนุมูลอิสระชนิดที่มีธาตุออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) มีปริมาณมากขึ้น ทำให้เซลล์ถูกทำลายได้ง่ายขึ้น ทำให้ปริมาณของไฮโดรพลาสซึมเพิ่มปริมาณมากขึ้น ปริมาณแควิวโกลเพิ่มปริมาณมากขึ้น และเซลล์มีระบบเส้นใยภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป [5]

สารสกัดด้วยเอทานอลจากต้นโงเทง ที่สกัดด้วยเอทานอล อุณหภูมิ 50°C-60°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของโปรโตซัว *Trypanosoma cruzi* ในระยะต่าง ๆ ได้ เมื่อทดสอบ ด้วยวิธี mouse peritoneal macrophages ทดสอบการเป็นพิษต่อโปรโตซัวในระยะต่าง ๆ ได้แก่ epimastigote ระยะ trypomastigote และระยะ amastigote forms วัดการตายของเซลล์โดย flow cytometry ย้อมสีด้วย annexin V และ propidium iodide พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของโปรโตซัว ของเซลล์ *T. cruzi* สายพันธุ์ Y ในระยะ epimastigote มีค่า IC<sub>50</sub> ประมาณ 2.9 ± 0.1 µg/mL และลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระยะ trypomastigote ได้ มีค่า EC<sub>50</sub> ประมาณ 1.7 ± 0.5 µg/mL และยังสามารถได้ดีกับยาเบนนิดาโซล (benznidazole) กับสารสกัดพบว่าการยับยั้งเกิดได้ดีขึ้นโดยมีค่า EC<sub>50</sub> ประมาณ 0.8 ± 0.07 µg/mL และมีค่า EC<sub>90</sub> ประมาณ 0.83 ± 0.1 µg/mL [6] การติดเชื้อโปรโตซัว *T. cruzi* มีความสำคัญที่ต้องระวัง เมื่อเข้าสู่ร่างกายคนโดยมีแมลง ที่พาหะของโปรโตซัว *T. cruzi* ชนิดนี้อาศัยอยู่ในลำไส้ของแมลง เมื่อแมลงกัดผู้ป่วยจะถ่ายของเสียลงบนผิวหนังของผู้ป่วย ตัวอ่อนระยะ metacyclic trypanosome เข้าสู่ผิวหนังตรง รอยกัดและเชื้อจะลามเข้าสู่บริเวณอื่น ๆ ก่อนจะเปลี่ยนเป็นระยะ amastigote มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ ต่อไป เมื่อแมลง

ชนิดนี้มากินเลือดคนที่มีโปรโตซัวอยู่ในกระแสเลือด จะทำให้แมลงติดเชื้อต่อไปอีก เมื่อแมลงนี้ไปกัดคนอื่นจะทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโปรโตซัว *T. cruzi* เพิ่มมากขึ้น ดังภาพที่ 2.3 [7]



ภาพที่ 2.3 การติดเชื้อ *T. cruzi* จากพาหะที่เป็นยุงใน วงศ์ย่อย Triatominae ระยะ trypanomastigotes-amastigotes ในคน และในระยะ trypanomastigotes-epimastigotes ในแมลง [7]

### 2.3.2 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ได้แก่ DPPH scavenging, superoxide, nitric oxide, hydrogen peroxide และ hydroxyl radical มีค่าแตกต่างกันไปแต่ละส่วนของพืชโดยพบว่าส่วนของผลและใบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด กว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากสารสกัดที่ได้จากลำต้นและราก โดยพบว่าส่วนผลและใบจะมีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากกว่าส่วนอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากส่วนต่าง ๆ ของต้นโงเทง [8]

	DPPH			Super Oxide			Nitric Oxide			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			Hydroxyl Radical		
	#100	#200	#300	#100	#200	#300	#100	#200	#300	#100	#200	#300	#100	#200	#300
Leaves	0.2 ± 0.11'	0.35 ± 0.20'	0.25 ± 0.14'	0.45 ± 0.26'	0.25 ± 0.14'	0.3 ± 0.17'	0.25 ± 0.14'	0.34 ± 0.2'	0.17 ± 0.1'	0.28 ± 0.16'	0.45 ± 0.26'	0.30 ± 0.17'	0.20 ± 0.12'	0.05 ± 0.03'	0.36 ± 0.20'
Stem	0.1 ± 0.08'	0.3 ± 0.2'	0.1 ± 0.06'	0.37 ± 0.21	0.51 ± 0.2'	0.47 ± 0.27'	0.20 ± 0.12'	0.28 ± 0.16'	0.32 ± 0.18'	0.15 ± 0.08'	0.1 ± 0.05'	0.43 ± 0.25'	0.47 ± 0.27'	0.51 ± 0.29'	0.56 ± 0.32'
Fruits	0.41 ± 0.24'	0.2 ± 0.1'	0.43 ± 0.25'	0.4 ± 0.23	0.15 ± 0.08'	0.36 ± 0.20'	0.1 ± 0.05'	0.45 ± 0.26'	0.50 ± 0.29'	0.17 ± 0.1'	0.37 ± 0.21'	0.11 ± 0.06'	0.20 ± 0.12'	0.23 ± 0.13'	0.34 ± 0.2'
Roots	0.40 ± 0.23'	0.1 ± 0.05'	0.49 ± 0.28'	0.51 ± 0.29'	0.1 ± 0.05'	0.2 ± 0.11'	0.26 ± 0.15'	0.23 ± 0.11'	0.35 ± 0.20'	0.05 ± 0.03'	0.20 ± 0.12'	0.1 ± 0.005'	0.41 ± 0.24'	0.52 ± 0.30'	0.55 ± 0.31'

Values are mean±S.E.M. n=3

\*significance is set at p>0.5.

# Conc µg/ml

สารสกัดจากดอกโงเทงช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด การทดลองป้อนสารสกัดของผลของพริกหาง (*Piper cubeba*) สารสกัดของดอกของต้นโงเทง (*Physalis angulate*) ดอกกุหลาบ (*Rosa hybrida*) นำมาทดสอบปฏิกิริยา lipid peroxidation ระดับความเข้มข้น 0.2 g/kg ของน้ำหนักตัว เมื่อใช้น้ำเกลือเป็นคอนโทรล ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD), กิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส, ปริมาณของ thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride, TG) และวัดระดับคลอเลสเทอรอลในพลาสมา พบว่าสารสกัดจากผลพริกหางกับดอกกุหลาบช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส ดีกว่าการใช้สารสกัดจากดอกของต้นโงเทง [9]

ปริมาณสารอาหารในส่วนผลของพืชตัวอย่างในจีนัส *Physalis* มีองค์ประกอบหลักสำคัญ ได้แก่ ไฟเบอร์ โปรตีน แร่ น้ำตาลที่ละลายได้ ปริมาณของแข็งทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบกับมะเขือเทศซึ่งเป็นพืชที่มีลักษณะของผลใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 2.4) จะพบว่าปริมาณแร่ โปรตีน และปริมาณน้ำตาล ไม่แตกต่างกับพืชในจีนัส *Physalis* มากนัก (ตารางที่ 2.2)



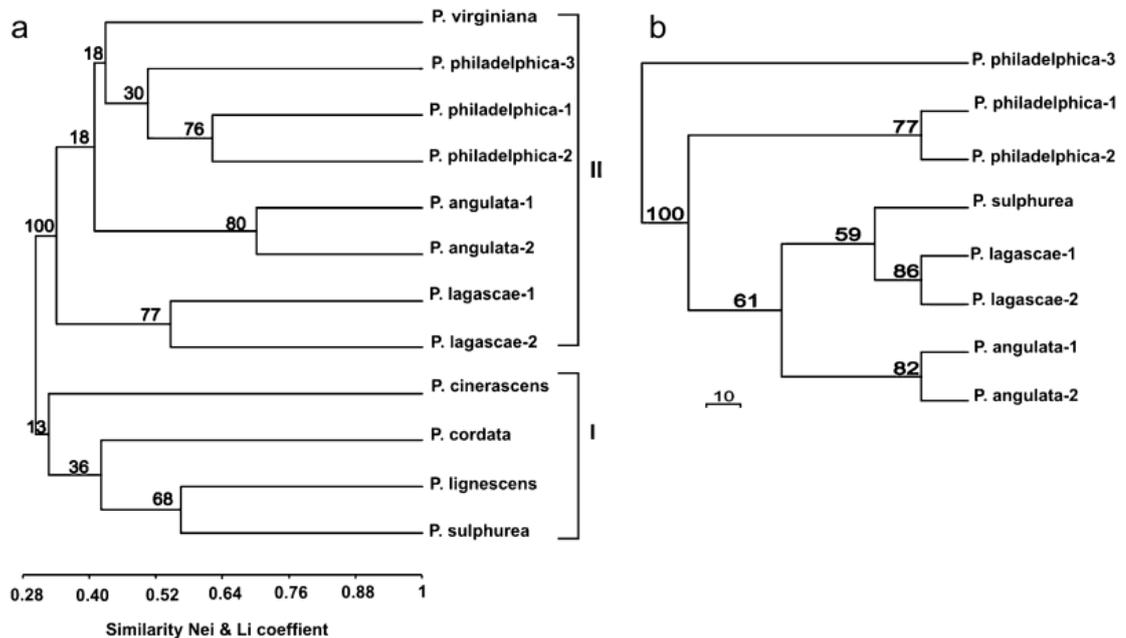
ภาพที่ 2.4 ลักษณะของลำต้นและผลของพืชในจีนัส *Physalis* ได้แก่ *P. pubescens* var *grisea* (A); *P. chenopodifolia* (B), *P. acutifolia* (C); *P. pubescens* var. *pubescens* (D) [10]

ตารางที่ 2.2 สมบัติทางเคมี สมบัติทางกายภาพและสารอาหารจากส่วนของผลของพืชตัวอย่างในจีนัส *Physalis* เปรียบเทียบกับมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) [10]

สปีชีส์	ชนิดย่อย (Vareity)	ไฟเบอร์ (%)	เถ้า (%)	โปรตีน (%)	แร่ธาตุ (%)	น้ำตาล (%)	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	ของแข็งที่ละลายได้	เอกสารอ้างอิง
<i>Physalis acutifolia</i>	ND	1.45	0.50	1.0	0.39	2.45	4.26	7.43	[10]
<i>Physalis chenopodifolia</i>	ND	1.60	0.44	0.93	0.42	2.41	4.11	10.88	
<i>Physalis pubescens</i>	grisea	1.12	0.35	0.52	0.19	3.62	ND	10.20	
	pubescens	1.38	0.35	0.28	0.28	3.07	4.8	7.48	
<i>Physalis angulata</i>	ND	1.74	0.45	0.96	0.23	2.42	4.22	8.50	
<i>Physalis philadelphica</i>	rendidora	ND	0.46–0.50	0.73–0.90	ND	2.68–3.31	3.90–4.01	ND	[11]
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.10–4.56	5.10–9.20	[12]
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.78–4.20	5.60–6.60	[13]
<i>Physalis pubescens</i>	grisea	ND	ND	1.02	ND	ND	3.60	7.50	[14]
<i>Physalis peruviana</i>	ND	0.15	0.24	0.49	0.23	4.68	3.6	14	[15]
	ND	0.11–1.34	0.19–0.28	0.08–0.52	0–0.14	3.02–5.39	3.39–3.67	13.73–14.30	[11]
	ND	1.35	0.28	0.04–0.08	0.04–0.06	1.35	3.80–3.90	*	[16]
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.10–4.90	11.60–13.50	[17]
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.41–3.85	10.86–15.30	[18]
มะเขือเทศ ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	N. Yorker	ND	0.56	0.69–0.85	ND	2.90–3.60	ND	ND	[19]

ND คือ not determine

การตรวจสอบสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจะช่วยยืนยันชนิดพันธุ์ที่ถูกต้องได้ เช่น การทดลองของ Vargas-Ponce และคณะ (2011)[20] ได้แสดงแผนผังสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืช *Physalis angulata* กับพืชในจีนัส *Physalis* สปีชีส์อื่น ๆ ที่มีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน เช่น *Physalis lagascae* และ ต้นโทมาทิลโล (*Physalis philadelphica*) เป็นต้น (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.5 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในจีนัส *Physalis* species (a); สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสปีชีส์ *angulata* (b) คำนวณความเชื่อมั่นด้วยวิธีทางบูตสเตรบ [20]

### 2.3.3 ฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง

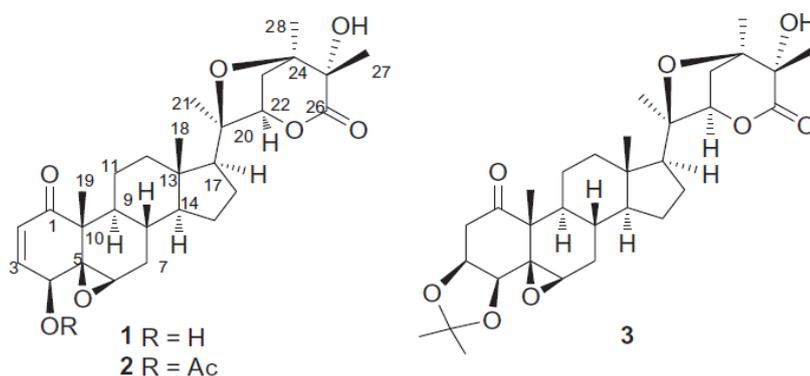
สารสกัดทั้งต้นของโทงเทงที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอธิลอะซิเตต เป็นพืชต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก ชนิดสคะความัส (human oral squamous carcinoma, HSC-3) ในระยะลุกลามแพร่กระจาย (metastatics) และในระยะการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenics) และเป็นพืชต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดสายสะดือในคน (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) เมื่อใช้สิ่งสกัดความเข้มข้นระหว่าง 5–15  $\mu\text{g/mL}$  สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ matrix metalloproteinase (MMP)-9 ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์

matrix metalloproteinase (MMP)-2 และยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urokinase plasminogen activator (u-PA) ของเซลล์มะเร็งช่องปาก HSC-3 ทำให้พบว่าปริมาณโปรตีน MMP-2 และ u-PA ในเซลล์มะเร็ง HSC-3 ลดลง การทดสอบด้วยวิธี Western blotting นอกจากนี้สารสกัดจากต้นโทงเทงความเข้มข้นประมาณ 5–15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ยังเป็นพิษต่อการเจริญของสารกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผิวเส้นเลือด (vascular endothelial growth factor, VEGF) ซึ่งสำคัญต่อเส้นเลือดหล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็งอีกด้วย [21]

สารสกัดจากต้นโทงเทงช่วยเพิ่มกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิสของมะเร็งช่องปาก (HSC-3) จากการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) สืบเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของนิวเคลียสของเซลล์, การบวมของเยื่อหุ้มเซลล์และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-9 ซึ่งสารสกัดจากต้นโทงเทงจะทำให้เกิดสมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีธาตุออกซิเจนเป็นองค์ประกอบและทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโตซิสและทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น เช่น เอนไซม์ และ caspase-4 เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การพรีทรีทเมนต์เซลล์มะเร็งช่องปากด้วยกลูต้าไทโอนหรือการพรีทรีทเมนต์ด้วย เอน-อะเซติลซิสเทอีน ยังช่วยเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นโทงเทงอย่างมีนัยสำคัญ [22]

สารสกัดทั้งต้นจากต้นโทงด้วยเอธิลอะซิเตตยับยั้งเซลล์มะเร็งตับได้ดีกว่าสารสกัดจากน้ำ ทดสอบในเซลล์ตัวอย่าง ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ Hep G2, เซลล์ตับ Hep 3B และ เซลล์ตับ PLC/PRF/5 ได้ดีกว่า การสกัดด้วยน้ำมีค่า  $\text{IC}_{50}$  การยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอธิลอะซิเตตมีค่าประมาณ  $10.67 \pm 0.20 \text{ ug}/\text{mL}$  ซึ่งมีค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ดีกว่าการยับยั้งเซลล์ PLC/PRF/5 และเซลล์ Hep 3B ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจากต้นโทงเทงด้วยตัวทำละลายที่เป็นน้ำจะมีค่าการ  $\text{IC}_{50}$  ของยับยั้งเซลล์มะเร็งตับประมาณ  $44.19 \pm 0.52 \text{ ug}/\text{mL}$  ซึ่งมีค่าการยับยั้ง ดีกว่าการยับยั้งเซลล์ PLC/PRF/5 และเซลล์ Hep 3B เช่นกัน [23]

Maldonado และคณะ (2015)[24] ได้แยกสารบริสุทธิ์จากส่วนเหนือดินจากต้นโง้งเหงได้หลายชนิด เช่น physangulide B, physangulide-acetonide และ 4-O-acetylphysangulide B ที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีใกล้เคียงกับการยับยั้งของยาต้านมะเร็งแคมปโทเธซิน (camptothecin) โดยสารบริสุทธิ์ physangulide B ที่แยกได้ มีค่า  $IC_{50}$  การยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (homosapiens prostate, PC-3) ประมาณ  $0.43 \pm 0.03 \mu\text{M}$  และ 4-O-acetylphysangulide B มีค่า  $IC_{50}$  การยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ประมาณ  $0.32 \pm 0.02 \mu\text{M}$  physangulide B มีค่า  $IC_{50}$  ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด SKLU-1 มีค่า  $IC_{50}$  ประมาณ  $0.35 \pm 0.01 \mu\text{M}$  และ 4-O-acetylphysangulide B มีค่า  $IC_{50}$  ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด SKLU-1 ประมาณ  $0.27 \pm 0.01 \mu\text{M}$  ขณะที่ยาต้านมะเร็งแคมปโทเธซิน (camptothecin) ที่มีค่า  $IC_{50}$  ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ประมาณ  $0.12 \pm 0.01 \mu\text{M}$  และค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด SKLU-1 ประมาณ  $0.15 \pm 0.009 \mu\text{M}$  ซึ่งพบว่า physangulide B กับ 4-O-acetylphysangulide B จะยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า physangulide-acetonide อาจเกี่ยวข้องกับจำนวนพันธะเอสเทอร์ในโครงสร้าง โดย physangulide-acetonide จะมีพันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 3 ขณะที่ physangulide B และ 4-O-acetylphysangulide B ไม่มีพันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 3 (ภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างสาร physangulide B (1); 4-O-acetylphysangulide B (2) และ physangulide-acetonide (3) [24]

### 2.3.4 ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ

การแยกสารบริสุทธิ์ physalin E ที่ได้จากส่วนเหนือดินของต้นโทงเทง ที่เป็นสารเคมีในกลุ่มเซโค-สเตอรอยด์ สามารถยับยั้งการอักเสบของผิวหนังอักเสบแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังได้ จากการชักนำหนูทดลองให้เกิดการอักเสบด้วยสาร 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) และ oxazolone โดยพบว่าปริมาณของ pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  และ IFN- $\gamma$ ) ลดลงและกิจกรรมของเอนไซม์ myeloperoxidase (MPO) ลดลงเมื่อใช้ Physalin E ความเข้มข้น 0.125 - 0.5 mg/ear [25]

สารสกัดจากต้นโทงเทงช่วยสร้างภูมิคุ้มกันได้ จากการทดสอบในหนูทดลองที่เป็นโรคมุมิแพ้วตัวเอง (lupus erythematosus) จากการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดยา pristane ปริมาตร 0.7 mL แล้วตรวจนับปริมาณลิวโคไซด์ทั้งหมด การจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและเนื้อเยื่อของไตและเนื้อเยื่อของม้ามและแยกโปรตีนด้วย Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เมื่อผ่านไป 4 - 8 สัปดาห์ พบว่าความเข้มข้นของสิ่งสกัดจากต้นโทงเทงที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 1,000 mg/kg-BW จะช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันใกล้เคียงกับยาเพรดนิโซน (Prednisone) ที่เป็นยาในกลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์ ที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 18.2 mg/kg โดยพบว่าการปริมาณลิวโคไซด์ที่นับได้จะมีปริมาณ  $21,500 \pm 1,759.98$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ขณะที่ปริมาณลิวโคไซด์ปกติมีค่า  $12,800 \pm 2,840.75$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร และยังพบว่าการใช้สิ่งสกัดจากต้นโทงเทงดังกล่าวจะช่วยเพิ่มปริมาณ antinuclear antibody (ANA) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 102-105 kDa ได้คล้ายกับปริมาณ ANA ที่เพิ่มขึ้นจากการใช้ยาเพรดนิโซน จากผลการทดสอบด้วย SDS-PAGE[26]

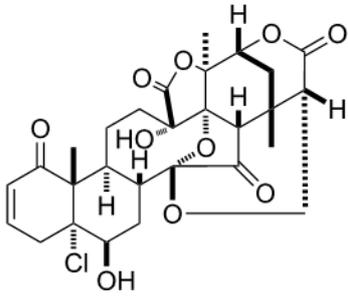
สารสกัดจากดอกจากต้นโทงเทง (*Physalis angula*) สารสกัดจากผลของต้นพริกหาง (*Piper cubeba*) และสารสกัดจากดอกกุหลาบ (*Rosa hybrida*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 80% มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี carrageenan-induced paw edema, arachidonic acid-induced ear edema, formaldehyde-induced arthritis และการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบจากสาร 2,4-

ไดไนโตรฟลูออโรเบนซีน (DNFB) พบว่าการบ่อนสารสกัดจากพืชตัวอย่างดังกล่าวปริมาณ 200 mg/kg เป็นเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จะช่วยยับยั้งการอักเสบจากการสังเกตการบวมที่อุ้งเท้าหนูทดลอง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกวิธีทดสอบ ( $P < 0.05$ ) [27]

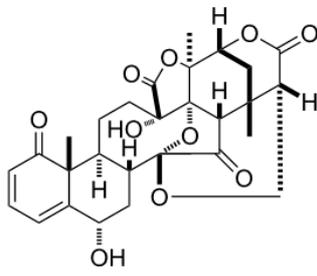
สารสกัดจากต้นโทงเทงที่สกัดด้วยน้ำมีลิลิว (Milli-Q) ช่วยยับยั้งการอักเสบและเป็นสารเสริมภูมิคุ้มกันได้ จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยคาร์ราจีแนน ความเข้มข้น 1% เข้าบริเวณด้านหลังของหนูทดลอง (carageenan subcutaneous rat's air pouches) แล้ววิเคราะห์การต้านการอักเสบจากกิจกรรมของเอนไซม์ adenosine deaminase (AD), ปริมาณไนไตรต์ และปริมาณพรอสตาแกลนดิน อี 2 (PGE<sub>2</sub>) ปริมาณ tumor growth factor จากการฉีดสารสกัดจากต้นโทงเทง และการฉีดยาเอนโดเมทาซินความเข้มข้น 0.5 mg/kg – 5 mg/kg ก่อนที่จะมีการฉีดคาร์ราจีแนน พบว่าการฉีดสารสกัดจากต้นโทงเทงความเข้มข้น 1 mg/kg และ 5 mg/kg จะช่วยป้องกันการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยสังเกตได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ AD ที่ลดลง ปริมาณ PGE<sub>2</sub> ที่ลดลง และปริมาณ TGF- $\beta$  ที่เพิ่มขึ้น [28]

## 2.4 สารเคมีที่ได้จากต้นโทงเทง

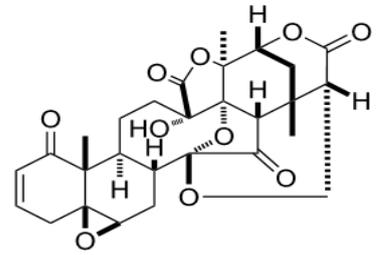
ต้นโทงเทงประกอบไปด้วยสารเคมีที่สำคัญหลายประเภท เช่น ส่วนของผลประกอบด้วย อัลคาลอยด์ ฟีนอล แทนนิน ไกลโคไซด์และคาร์โบไฮเดรต แต่ไม่พบซาโปนิน ในส่วนของผลที่สกัดด้วย เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เอธิลอะซิเตต, อะซิโตนและเมทานอล [29] ส่วนที่แยกได้จากลำต้นและใบของโทงเทงเป็นสารเคมีประเภทสเตอรอยด์ เช่น physalins E, physalins F, physalins G, physalins H และ physalins I [30] และยังพบฟลาโวนอยด์หลายชนิดจากส่วนของใบ เช่น quercetin, quercetin 3-O-methyl ether และ isoquercetrin [31] ตัวอย่างสารเคมีที่พบในต้นโทงเทงแสดงได้ดังภาพที่ 2.7



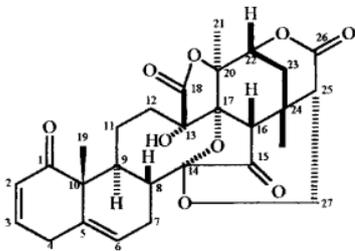
Physalin H



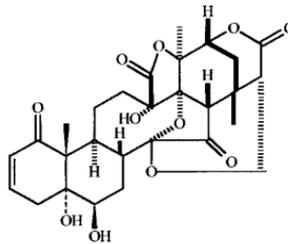
Physalin G



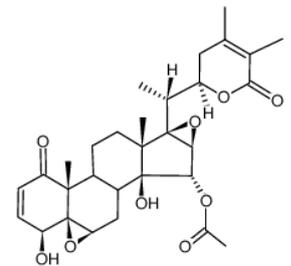
Physalin F



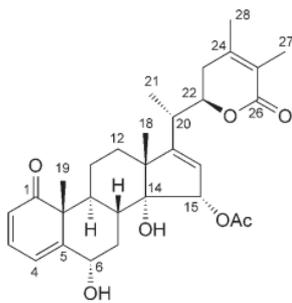
Physalin B



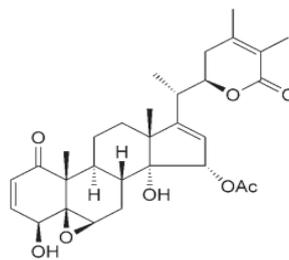
Physalin D



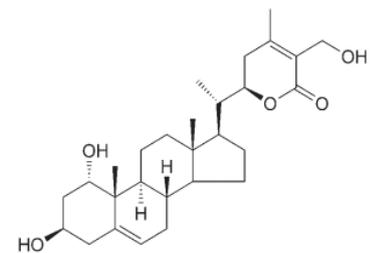
Physagulin C



Physagulin L



Physagulin A



Pubesenolide

ภาพที่ 2.7 ตัวอย่างสารเคมีที่ได้จากต้นโงนเทง

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การเก็บตัวอย่างพืชและการพิสูจน์พันธุ์พืช

เก็บตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของต้นโหงเทง ได้แก่ ผล, ใบ, ลำต้น และรากที่เก็บได้จากจังหวัดชัยภูมิ ในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2557 นำไปพิสูจน์พันธุ์พืช ที่พิพิธภัณฑสถานพืช ศ. กสิิน สุวตะพันธุ์ เขตพญาไท กรุงเทพฯ ชื่อวิทยาศาสตร์ และทำ voucher specimen ได้เลข Herbarium nuber A 015237 (BCU)

#### 3.2 การสกัดพืช

นำตัวอย่างพืชส่วนต่าง ๆ มาตากแห้ง บดให้มีขนาดเล็กลง นำมาสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิค อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน อะซิโตนและเมทานอล ตามลำดับ แยกส่วนสารละลายออกด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 แล้วนำส่วนของสารละลายมาระเหยตัวทำละลายออกตั้งวิธีการในภาพที่ 3.1 และได้ปริมาณสารสกัดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับตัวทำละลายแต่ละชนิด (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดสารสำคัญจากต้นโหงเทง

**ตารางที่ 3.1** ปริมาณสารสกัดจากต้นโหวงเหงที่สกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที

ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	น้ำหนักพืชแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)	ปริมาณสกัด (%)
ผล	เฮกเซน	132.40	1.55	1.17
	อะซีโตน		1.09	0.82
	เมทานอล		1.34	1.01
ใบ	เฮกเซน	495.61	1.25	0.25
	อะซีโตน		1.24	0.25
	เมทานอล		1.33	0.27
ลำต้น	เฮกเซน	725.53	1.16	0.16
	อะซีโตน		1.25	0.17
	เมทานอล		1.17	0.16
ราก	เฮกเซน	144.01	1.07	0.74
	อะซีโตน		1.08	0.75
	เมทานอล		1.30	0.87

### 3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน [32]

ซึ่งสารตัวอย่างมา 0.02 กรัม ละลายในเมทานอล เข้มข้น 100% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดเข้มข้น 20 mg/ml และเจือจางสิ่งสกัดต่อ ให้มีความเข้มข้นระหว่าง 0.2 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยซึ่งสาร DPPH ปริมาณ 0.0078 กรัม ละลายใน เมทานอลความเข้มข้น 99.8% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย L-ascorbic ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยซึ่งสาร ascorbic 0.001 g ละลายในเมทานอล 99.8% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ระหว่าง 1 ถึง 100 µg/ml เพื่อเป็นสารมาตรฐาน

ดูดสารละลายของตัวอย่างที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้นใส่หลอดทดลองสีชาปริมาตร 40 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 760 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ใช้ ascorbic acid เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้เมทานอล 100% เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (ทดลอง 3 ซ้ำ) คำนวณหาค่าร้อยละของปฏิกิริยาดักจับอนุมูลอิสระจากสมการ

$$\% \text{ DPPH Reduction} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

โดยที่  $A_{\text{control}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

$A_{\text{sample}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

### 3.4 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของรา *Magnaporthe grisea* Mat 1-1 THL1156 (BCC 10261) [34]

เตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 10 mg/mL ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 100% เมื่อจะใช้งาน เจือจางตัวอย่างด้วย DMSO ความเข้มข้น 10% ให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.1 mg/mL เพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของราเบื้องต้น ก่อนที่จะมีการเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นระหว่าง 3.12-100  $\mu\text{g/mL}$  ด้วย DMSO ความเข้มข้น 10%

เลี้ยงรา *Magnaporthe grisea* ในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วัน การเกิดสปอร์เกิดภายใต้อากาศที่ไม่มีแสง เก็บเกี่ยวสปอร์ราด้วยสารละลาย tween 20 ความเข้มข้น 0.8 % v/v เหยียงแยกสปอร์ราออกด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเตรียมสปอร์ให้แขวนลอยในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ นำสารแขวนลอยของสปอร์มาเจือจางให้ได้จำนวนสปอร์  $1.2 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหาร minimum salt medium (MM) เข้มข้น 20% (อาหาร MM ประกอบด้วย แอมโมเนียมไนเตรตเข้มข้น 3 g/L, กลูโคสเข้มข้น 20 g/L, โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) เข้มข้น 0.5 g/L, โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต ( $\text{NaHPO}_4\text{H}_2\text{O}$ ) เข้มข้น 0.5 g/L, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตเข้มข้น 0.5 g/L, แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 g/L และสารสกัดจากยีสต์เข้มข้น 1 g/L)

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของรา *Magnaporthe grisea* โดยดูดสารแขวนลอยของสปอร์รา ปริมาตร 25  $\mu\text{L}$  ลงในไมโครเพลตที่มี 384 well ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-2.5 ชั่วโมงเพื่อให้สปอร์ของราติดอยู่ที่ไมโครเพลต เมื่อครบระยะเวลาเติมสารละลายของสิ่งสกัดลงไปปริมาตร 25  $\mu\text{L}$  นำเพลตไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาให้เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงไป และเติมสาร

5,6-carboxy fluorescence diacetate (CFDA) ความเข้มข้น 0.9 mg/mL ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 70 % ปริมาตร 2  $\mu$ L นำไปตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 5-10 นาที ล้างเพลทด้วยน้ำประปาแล้วซับน้ำให้แห้งก่อนที่จะเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงไป ปริมาตร 25  $\mu$ L นำมาวัดการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่นการถูกกระตุ้น 485 nm และที่ความยาวคลื่นแสงเปล่งออก 535 nm โดยใช้ยาปฏิชีวนะแอมโฟเทอริซิน-บี เป็นสารมาตรฐาน และใช้อาหารและ DMSO เข้มข้น 10 % อย่างละ 25  $\mu$ L เป็นแบล็ก และใช้ DMSO เข้มข้น 0.5 % เป็นคอนโทรล (ทดลอง 3 ซ้ำ) นำมาคำนวณปริมาณการยับยั้งการเจริญของราได้จากสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100$$

เมื่อ  $FU_T$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของตัวอย่าง

$FU_C$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของคอนโทรล

### 3.5 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra

[35, 36]

เตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 10 mg/mL ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 100% เมื่อจะใช้งานเจือจางตัวอย่างด้วย DMSO ความเข้มข้น 5% ให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.5 mg/mL เพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของราเบื้องต้น ก่อนที่จะมีการเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นระหว่าง 3.12-100.00  $\mu$ g/mL ด้วย DMSO ความเข้มข้น 5%

เลี้ยงแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ในอาหาร 7H10 ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30  $\mu$ g/mL เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำมาเตรียมสแตรต์เตอร์โดยการเขี่ยโคลนแบคทีเรีย 2-3 โคลนลงในอาหารเหลว 7H9 ที่มีปริมาตร 10 mL (อาหาร 7H9 จะมีการเติมกลีเซอรอลเข้มข้น 2% v/v, คาซิโตนเข้มข้น 0.1% w/v, tween80 เข้มข้น 0.05% v/v, middlebrook OADC เข้มข้น 10% v/v และกานา

มัยซินเข้มข้น 30 µg/mL) เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร 7H9 แบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C กระทั่งวัดค่าความขุ่นของเซลล์ให้ได้ประมาณ 0.5-1.0 ที่ความยาวคลื่น 550 nm แล้วดูดสตาร์เตอร์ของแบคทีเรียถ่ายลงในอาหาร 7H9 ใหม่ อัตราส่วน 1:10 แล้วหมักต่อจนกระทั่งวัดค่าความขุ่นของเซลล์ได้ประมาณ 0.5-1.0 นำน้ำหมักมาเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียออกด้วยความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยบัฟเฟอร์ PBS สองครั้ง นำเซลล์แบคทีเรียที่ตกตะกอนมาล้างทำให้ออกฤทธิ์ด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 15 วินาที ทั้งหมด 8 ครั้ง แล้วนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียให้ได้ประมาณ  $1 \times 10^6$  CFU/mL เพื่อใช้ทดสอบ

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Mycobacterium tuberculosis* ได้โดยดูดสารตัวอย่างปริมาตร 5 µL ลงในไมโครเพลตขนาด 384-well เติมสารแขวนลอยของแบคทีเรียลงไปปริมาตร 45 µL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 วัน นำมาวัดการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่นแสงถูกกระตุ้น 485 nm และที่ความยาวคลื่นแสงเปล่งออก 535 nm และใช้ DMSO เข้มข้น 0.5 % เป็นคอนโทรล (ทดลอง 3 ซ้ำ) นำมาคำนวณปริมาณการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้จากสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100$$

เมื่อ  $FU_T$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของตัวอย่าง

$FU_C$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของคอนโทรล

### 3.6 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603

[37]

เตรียมตัวอย่างสารสกัดจากพืชความเข้มข้น 10 mg/mL ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 100% เมื่อจะใช้งานเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้สารสกัดมีความเข้มข้นประมาณ 0.5 mg/mL เพื่อ

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเบื้องต้น ก่อนที่จะมีการเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นระหว่าง 15.6-500.00  $\mu\text{g/mL}$  ด้วย DMSO ความเข้มข้น 5%

เลี้ยงแบคทีเรีย *Klebsiella pneumonia* ในอาหาร tryptic soy agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 37°C ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน เชื้อโคลนเดี่ยวของแบคทีเรียลงในอาหารเหลว Mueller hinton (MB) แล้วนำบ่มมีการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ให้ได้ความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) ประมาณ 0.20 หรือมีจำนวนเซลล์  $1 \times 10^8$  CFU/mL แล้วนำมาเจือจางต่อด้วยอาหารเหลว MB ให้ได้จำนวนเซลล์  $1 \times 10^4$  CFU/mL เพื่อใช้ทดสอบ

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Klebsiella pneumonia* ได้โดยดูดสารตัวอย่างปริมาตร 5  $\mu\text{L}$  ลงในไมโครเพลตขนาด 384-well เติมสารแขวนลอยของแบคทีเรียลงไปปริมาตร 45  $\mu\text{L}$  แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 ชั่วโมง นำมาวัดค่าความขุ่นของการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ความยาวคลื่น 600 nm (ทดลอง 3 ซ้ำ) นำมาคำนวณปริมาณการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้จากสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = [1 - (\text{OD}_T / \text{OD}_C)] \times 100$$

เมื่อ  $\text{OD}_T$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

$\text{OD}_C$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของคอนโทรล

### 3.7 การทดสอบการทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก KB ATCC-CCL-17 [38]

เตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 10  $\text{mg/mL}$  ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 100% แล้วเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 0.5  $\text{mg/mL}$  แล้วนำมาเจือจางตามลำดับด้วย DMSO ความเข้มข้น 5% ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นระหว่าง 2.58-625.00  $\mu\text{g/mL}$  ก่อนนำไปทดสอบ

เตรียมสารแขวนลอยของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB ATCC-CCL-17) ด้วยอาหาร minimal essential medium (MEM) (อาหาร MEM ประกอบด้วย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น

10%, โซเดียมโพรเวท ความเข้มข้น 1 mM, อินซูลินความเข้มข้น 0.01 mg/mL, กรดอะมิโนไม่จำเป็น 1 เท่า และโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 1.5 g/L) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% แล้วนับจำนวนเซลล์ให้ได้จำนวนเซลล์  $2.2 \times 10^4$  cell/mL เพื่อใช้ทดสอบ

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยดูตัวอย่างของสิ่งสกัดปริมาณ 5  $\mu$ L ลงในไมโครเพลตที่มี 384-well แล้วเติมสารแขวนลอยของเซลล์มะเร็งปริมาณ 45  $\mu$ L นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้อากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 3 วัน เมื่อบ่มครบระยะเวลา เติมสารละลายเรซาซูรินความเข้มข้น 0.0625 mg/mL ปริมาตร 12.5  $\mu$ L นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจวัดเซลล์มะเร็งด้วยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่นถูกกระตุ้น 530 nm และที่ความยาวคลื่นแสงเปล่งออก 590 nm เปรียบเทียบกับคอนโทรลที่เป็นเซลล์มะเร็งที่แขวนลอยในสารละลาย DMSO เข้มข้น 0.5% โดยใช้ยา doxorubicin เป็นสารมาตรฐาน (ทดลอง 3 ซ้ำ) นำมาคำนวณปริมาณการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้จากสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100$$

เมื่อ  $FU_T$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของตัวอย่าง

$FU_C$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของคอนโทรล

### 3.8 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187 ATCC-CRL-5804) [38]

เตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 10 mg/mL ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 100% แล้วนำตัวอย่างมาเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้มีตัวอย่างความเข้มข้น 0.5 mg/mL ด้วยน้ำกลั่น แล้วเจือจางตามลำดับด้วย ตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้น 5% ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 2.63-625.00  $\mu$ g/mL

เตรียมสารแขวนลอยของเซลล์มะเร็งช่องปาก (NCI-H187 ATCC CRL-5804) ด้วยอาหาร Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) (อาหาร RPMI-1640 ประกอบด้วย bovine serum

albumin (BSA) ความเข้มข้น 15%, โซเดียมไพรูเวท ความเข้มข้น 1 mM, กลูโคสความเข้มข้น 2.5 g/L และ โซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 2.2 g/L นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้อากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นับจำนวนเซลล์ในช่วงล็อกเฟสให้ได้จำนวนเซลล์  $6.7 \times 10^4$  cell/mL เพื่อใช้ทดสอบ

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยดูตัวอย่างสารสกัดความเข้มข้นละ 5  $\mu$ L ลงในไมโครเพลทขนาด 384-well แล้วเติมสารแขวนลอยของเซลล์มะเร็ง ที่มีจำนวนเซลล์  $6.7 \times 10^4$  cell/mL ปริมาตร 45  $\mu$ L นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้อากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 5 วัน เมื่อบ่มครบระยะเวลาเติมสารละลายเรซาซูรินความเข้มข้น 0.0625 mg/mL ปริมาตร 12.5  $\mu$ L นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์มะเร็งด้วยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่นการถูกกระตุ้น 530 nm และที่ความยาวคลื่นแสงเปล่งออก 590 nm เปรียบเทียบกับคอนโทรลที่เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งด้วย DMSO เข้มข้น 0.5% โดยใช้ยา ellipticine เป็นสารมาตรฐาน (ทดลอง 3 ซ้ำ) นำมาคำนวณปริมาณการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100$$

เมื่อ  $FU_T$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของตัวอย่าง

$FU_C$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของคอนโทรล

### 3.9 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ATCC HB-8065 [38]

เตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 10 mg/mL ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 100% แล้วเจือจางตัวอย่างด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นลดลงเป็น 100  $\mu$ g/mL แล้วเจือจางตามลำดับด้วย DMSO ความเข้มข้น 1% ที่ละลายอยู่ในอาหาร ให้มีความเข้มข้นระหว่าง 3.91-125.00  $\mu$ g/mL เพื่อใช้ทดสอบ

เตรียมสารแขวนลอยของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2 ATCC HB-8065) ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Minimal Essential Medium (MEM) (อาหาร MEM ประกอบด้วย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น

10%, แอลกลูตามีน ความเข้มข้น 2 mM, กรดอะมิโนไม่จำเป็นความเข้มข้น 0.1 mM, โซเดียมไพโรเวทความเข้มข้น 1.0 mM, โซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 1.5 g/L, เพนนิซิลินความเข้มข้น 100 U/mL และสเตรปโตมัยซินความเข้มข้น 100 ug/mL) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้อากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นับจำนวนเซลล์ให้ได้จำนวนเซลล์  $2.0 \times 10^4$  cell/mL เพื่อใช้ทดสอบ

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยดูดสารแขวนลอยของเซลล์มะเร็งในอาหาร MEM ปริมาตร 200 uL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้อากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2 วัน ดูดอาหารเก่าออกแล้วเติมอาหารใหม่ ปริมาตร 200 uL ที่ประกอบด้วยสารสกัดความเข้มข้นสารสกัดต่าง ๆ นำไปบ่มต่อ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน เมื่อบ่มครบระยะเวลาเติมสารละลายเรซาซูรินความเข้มข้น 125 ug/mL ปริมาตร 50  $\mu$ L นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์มะเร็งด้วยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่นการถูกกระตุ้น 530 nm และที่ความยาวคลื่นแสงเปล่งออก 590 nm เปรียบเทียบกับคอนโทรลที่เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งกับ DMSO เข้มข้น 1.0% โดยใช้ยา ellipticin เป็นสารมาตรฐาน (ทดลอง 3 ซ้ำ) นำมาคำนวณปริมาณการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้จากสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100$$

เมื่อ  $FU_T$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของตัวอย่าง

$FU_C$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของคอนโทรล

### 3.10 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ Caco2 ATCC HBT-37 [38]

เตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 10 mg/mL ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 100% นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้น 100 ug/mL แล้วเจือจางตามลำดับด้วย DMSO ความเข้มข้น 1% ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีความเข้มข้นระหว่าง 3.91-125.00 ug/mL เพื่อใช้ทดสอบ

เตรียมสารแขวนลอยของเซลล์มะเร็ง Caco2 ATCC HTB-37 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Minimal Essential Medium (MEM) (ประกอบด้วย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 10%, แอลกลูตามีน ความเข้มข้น 2 mM, กรดอะมิโนไม่จำเป็นความเข้มข้น 0.1 mM, อินซูลิน-ทรานสเฟอร์ลิน-ซีลีเนียม เอ็กส์ ความเข้มข้น 0.1 IU/mL, โซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 1.5 g/L, เพนนิซิลินความเข้มข้น 100 U/mL และสเตรปโตมัยซินความเข้มข้น 100 ug/mL) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้อากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นับจำนวนเซลล์ในช่วงล็อกเฟสให้ได้จำนวนเซลล์  $2.0 \times 10^4$  cell/mL เพื่อใช้ทดสอบ

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยดูการแขวนลอยของเซลล์มะเร็งปริมาตร 200  $\mu$ L ลงในไมโครเพลตที่มี 96-well นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้อากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2 วัน ดูอาหารเก่าออกแล้วเติมอาหารใหม่ที่ประกอบด้วยสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 1% ปริมาตร ปริมาตร 200  $\mu$ L นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้อากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 1 วัน เมื่อบ่มครบระยะเวลาเติมสารละลายเรซาซูรินความเข้มข้น 125  $\mu$ g/mL ปริมาตร 50  $\mu$ L นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์มะเร็งจากการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่นการถูกกระตุ้น 530 nm และที่ความยาวคลื่นแสงเปล่งออก 590 nm เปรียบเทียบกับคอนโทรลที่เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งกับ DMSO เข้มข้น 1.0% โดยใช้ยา ellipticin เป็นสารมาตรฐาน (ทดลอง 3 ซ้ำ) นำมาคำนวณปริมาณการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้จากสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100$$

เมื่อ  $FU_T$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของตัวอย่าง

$FU_C$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของคอนโทรล

### 3.11 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดส (Neuraminidase, NA) [39]

เตรียมสารละลายของตัวอย่างเริ่มต้นให้มีความเข้มข้น 10 mg/mL ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 100 % แล้วเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นลดลงเป็น 0.2 mg/mL ด้วย DMSO ความเข้มข้น 2%

แล้วเจือจางตัวอย่างต่อให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นอยู่ในช่วง 31.3 mg/mL-1,000 ug/mL ด้วย DMSO ความเข้มข้น 2%

ในการวิเคราะห์ให้ดูตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 5 ul เติมเอนไซม์นิวรามินิเดสความเข้มข้น 0.2 ยูนิต ปริมาตร 5 uL ที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES) ความเข้มข้น 0.1 M (pH=6.5) (ที่ประกอบด้วย CaCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 100 mM) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมสับสเตรต 2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminidic acid (MUNANA) ความเข้มข้น 1,500 uM ปริมาตร 10 uL แล้วนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 60 นาที แล้วหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยสารละลายไกลซีนเข้มข้น 100 uM ที่ละลายในเอทานอลความเข้มข้น 25% (pH = 10.7) ปริมาตร 30 ul (เอนไซม์ NA ปริมาณ 1 ยูนิต แสดงถึงปริมาณ 4-methylumbelliferone (4-MU) ที่เกิดขึ้นในเวลาหนึ่งนาที) วัดปริมาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ของ 4-MU ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นถูกกระตุ้น 365 nm ที่ความยาวคลื่นแสงเปล่งออกที่ความยาวคลื่น 450 nm เปรียบเทียบการเรืองแสงของคอนโทรลที่ทดสอบด้วย DMSO เข้มข้น 1% คำนวณค่าการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดส จากสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = [1-(FU_T/FU_C)] \times 100$$

เมื่อ  $FU_T$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ของตัวอย่าง

$FU_C$  คือ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ของคอนโทรล

### 3.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลอง 3 ซ้ำ มาคำนวณความแปรปรวนของข้อมูลด้วยด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 15 วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย ONE WAY ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

### 3.13 การคำนวณค่า IC<sub>50</sub>

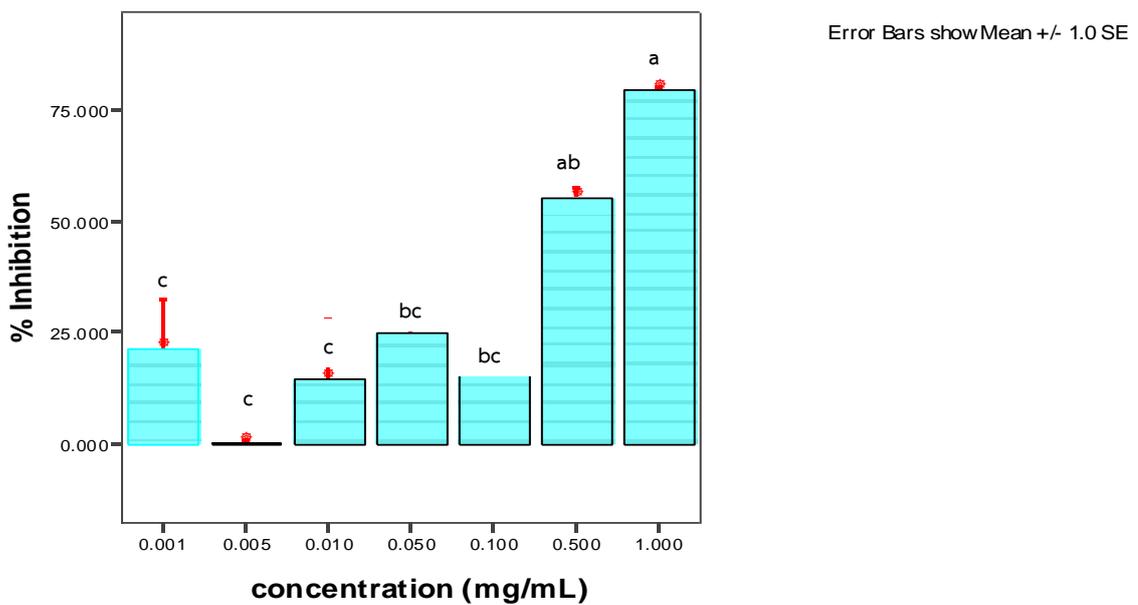
นำผลการทดลอง 3 ซ้ำ มาคำนวณ ค่า IC<sub>50</sub> ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism เวอร์ชัน 7.

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

สารสกัดจากผลของโทงเทงที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน ความเข้มข้นสุดท้ายระหว่าง 0.001 – 1.000 mg/mL เมื่อมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM ได้ดี ค่าการดักจับอนุมูลอิสระแปรไปตามความเข้มข้นของสิ่งสกัด (ภาพที่ 4.1)

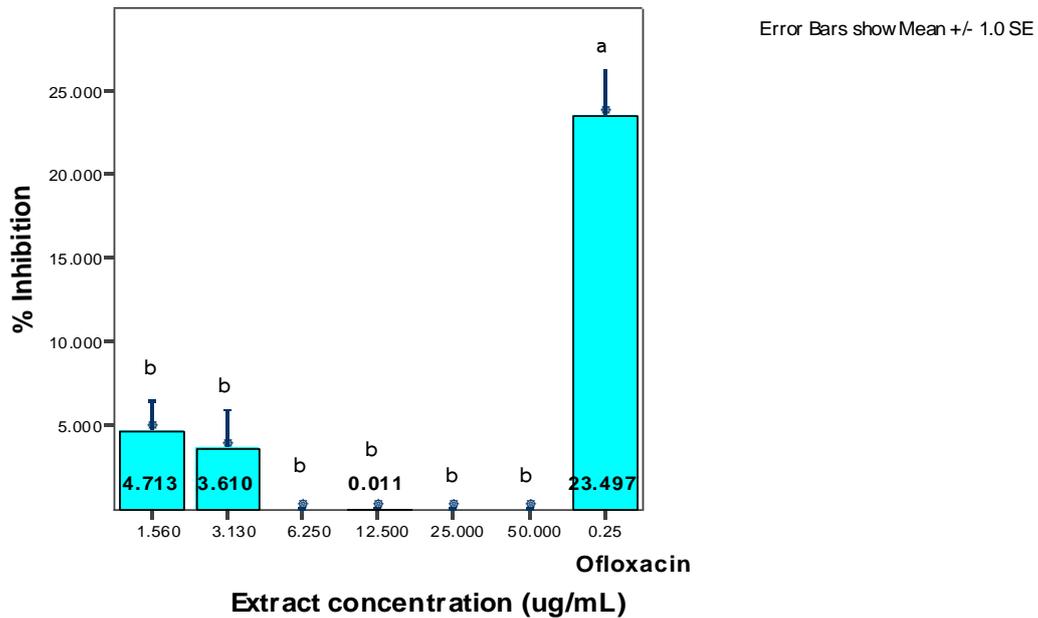


ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระที่เป็น DPPH ของสิ่งสกัดจากผลของโทงเทงที่สกัดด้วยอะซิโตน ความเข้มข้น 0.001 – 1.00 ug/mL (ตัวอักษรแตกต่างกันที่กราฟ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ))

การที่โหงมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง อาจมีสาเหตุมาจากมีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบอยู่ในผลและใบ ในปริมาณที่สูงกว่าสารอื่นที่พบในใบและผล เช่น อัลคาลอยด์ ไพเตท แทนนินและซาโปนินที่พบในใบและผล ของโหงที่สกัดด้วยเอทานอล [40] จากการทดลองของ Choi และคณะ [41] พบว่าสารสกัดจากดอกโหงที่สกัดด้วยเมทานอล ความเข้มข้นของสารสกัดประมาณ 0.5 ug/mL สามารถการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH (ความเข้มข้น 10 mM) มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระประมาณ  $42.9 \pm 0.1\%$  ซึ่งสารสกัดจากดอกโหงที่สกัดด้วยเมทานอล มีค่าการดักจับ DPPH สูงกว่าสารสกัดจากผลขิง (*Zingiber officinale*) ที่มีค่าการดักจับ DPPH ประมาณ  $22.3 \pm 0.3\%$  และสารสกัดจากดอกโหงที่สกัดด้วยเอทานอล (ที่มีค่าการดักจับ DPPH สูงกว่าการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดพริกไทย (*Piper nigrum*) ที่ยับยั้งได้  $16.7 \pm 0.1\%$  แต่สามารถดักจับอนุมูลอิสระที่เป็น DPPH ได้น้อยกว่า สารสกัดจากขมิ้นชัน ที่มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ประมาณ  $15.30 \pm 0.2\%$

#### 4.2 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603

การยับยั้งการเจริญของ *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 ของสารสกัดผลโหงที่สกัดด้วย ตัวทำละลายอะซิโตน ความเข้มข้นระหว่าง 1.560-50 ug/mL ได้เมื่อใช้สารสกัดเข้มข้นปริมาณน้อย 1.56 ug/mL ยับยั้งได้ประมาณ 4.173% ส่วนการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจะสามารถยับยั้งได้ต่ำกว่าการยับยั้งของยา Ofloxacin ที่ความเข้มข้น 0.25 ug/mL ยับยั้งได้ประมาณ 23.497% อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.01$ ) มีค่า  $IC_{50} \pm SE$  ประมาณ  $0.65 \pm 0.33$  ug/mL (ภาพที่ 4.2)

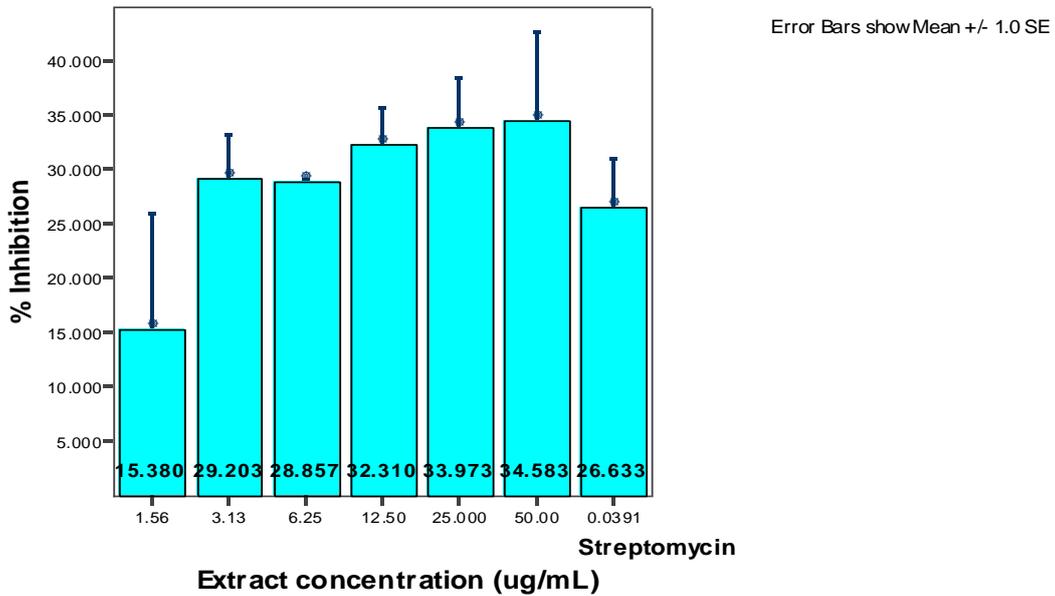


ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 ของสารสกัดจากผลด้วยตัวทำละลายอะซิโตน ที่ระดับความเข้มข้น 1.560-50.00 ug/mL เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ Ofloxacin (ตัวอักษรแตกต่างกันที่กราฟ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ))

ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rivera และคณะ (2015) ที่พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 500 ug/mL จะยับยั้งการเจริญของ *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883 ได้สูงถึง  $94.05 \pm 1.94$  % และมีค่าการยับยั้งสูงกว่าการยับยั้งของสารสกัดจากปิโตรเลียมอีเทอร์และสารสกัดด้วยเมทานอลที่ยับยั้งได้ประมาณ  $18.28 \pm 5.49\%$  และ  $10.25 \pm 0.97\%$  ตามลำดับ [42] ขณะที่ Osho และคณะ (2010) ได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Klebsiella pneumonia* ของสารสกัดจากส่วนเหนือดินของต้นโงเทง ด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่ามีค่า MIC ของการยับยั้งการเจริญของ *Klebsiella pneumonia* ประมาณ  $4.0 \pm 0.2$  mg/mL [43]

#### 4.3 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra

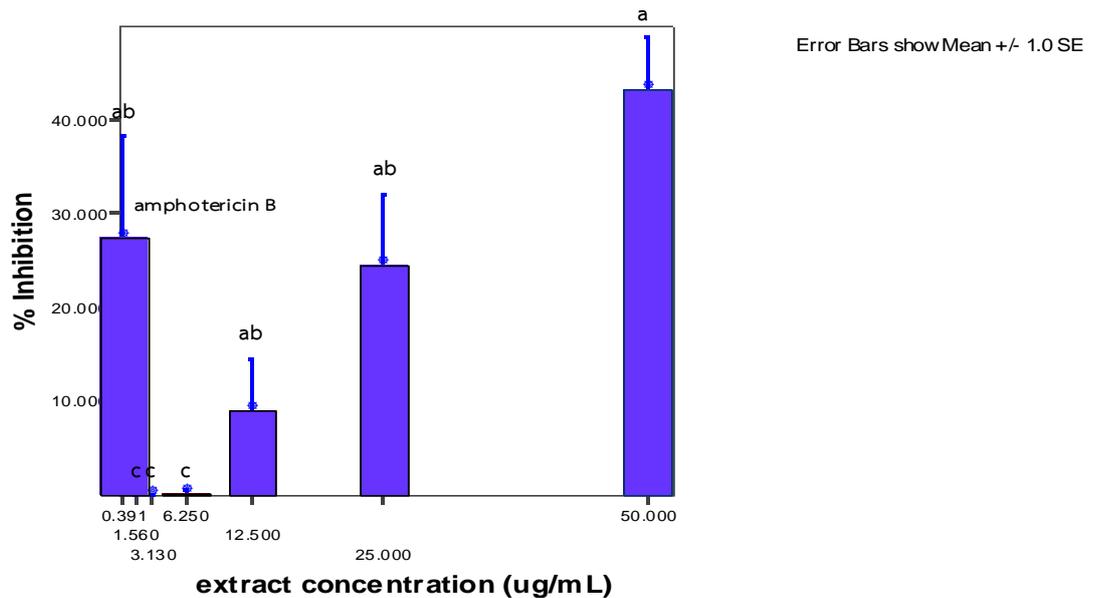
สารสกัดผลโงเทงด้วยตัวทำละลายอะซิโตน ความเข้มข้นระหว่าง 1.560-50.0 ug/mL สามารถยับยั้งการเจริญของ *My cobacterium tuberculosis* ได้ดีกว่าการยับยั้งของยาสเตรปโตมัยซิน ที่ระดับความเข้มข้น 0.0391 ug/mL ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.01$ ) มีค่า  $IC_{50} \pm SE$  ประมาณ  $3.28 \pm 0.85$  ug/mL (ภาพที่ 4.3) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Pietro และคณะ (2000) ที่ได้ศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *My cobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 ของสารสกัดจากส่วนเหนือดินของต้นโงเทงด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มแฟรกชันที่ A1-29-12 มีค่า ปริมาณยาต่ำสุดที่ป้องกันไม่ให้เกิดการเจริญของแบคทีเรีย ในหลอดทดลอง (MIC) ประมาณ 32 ug/mL แต่ยังไม่ได้ระบุว่า เป็นสารเคมีชนิดใด [44] ต่อมา Januarion และคณะ (2002) ได้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra ของสารสกัดจากส่วนเหนือดินของต้นโงเทง มีการทำสให้สารสกัดบริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจล ที่มีการชะด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มผสมกับเมทานอล สารบริสุทธิ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ATCC 27294 ได้สูง physalin B ที่แยกได้มีค่า MIC ของการยับยั้งการเจริญของ *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv สูงกว่า 128 ug/mL และ physalin D มีค่า MIC ของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ประมาณ 32 ug/mL ตามลำดับ [45]



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra strain ของสารสกัดจากผลด้วยตัวทำละลายอะซิโตน ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 1.56-50.00 ug/mL เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ Streptomycin ( $p < 0.01$ )

#### 4.4 การยับยั้งการเจริญของรา *Magnaporthe grisea* Mat 1-1 THL1156

สารสกัดของผลโทงเทงด้วยตัวทำละลายอะซิโตนยับยั้งการเจริญของราก่อโรค *Alternaria brassicicola* และ *Curvularia lunata* ได้น้อยกว่าการยับยั้งการเจริญของรา *Magnaporthe grisea* ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 50 ug/mL ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของรา *M. grisea* ได้ประมาณ  $43.25 \pm 9.73\%$  และสารสกัดความเข้มข้นดังกล่าวมีค่าการยับยั้งการเจริญของรา *M. grisea* สูงกว่าการยับยั้งของยาปฏิชีวนะ Amphotericin B ความเข้มข้น 0.390 ug/mL มีค่าการยับยั้งการเจริญของราประมาณ  $15.68 \pm 1.010\%$  (ภาพที่ 4.4)



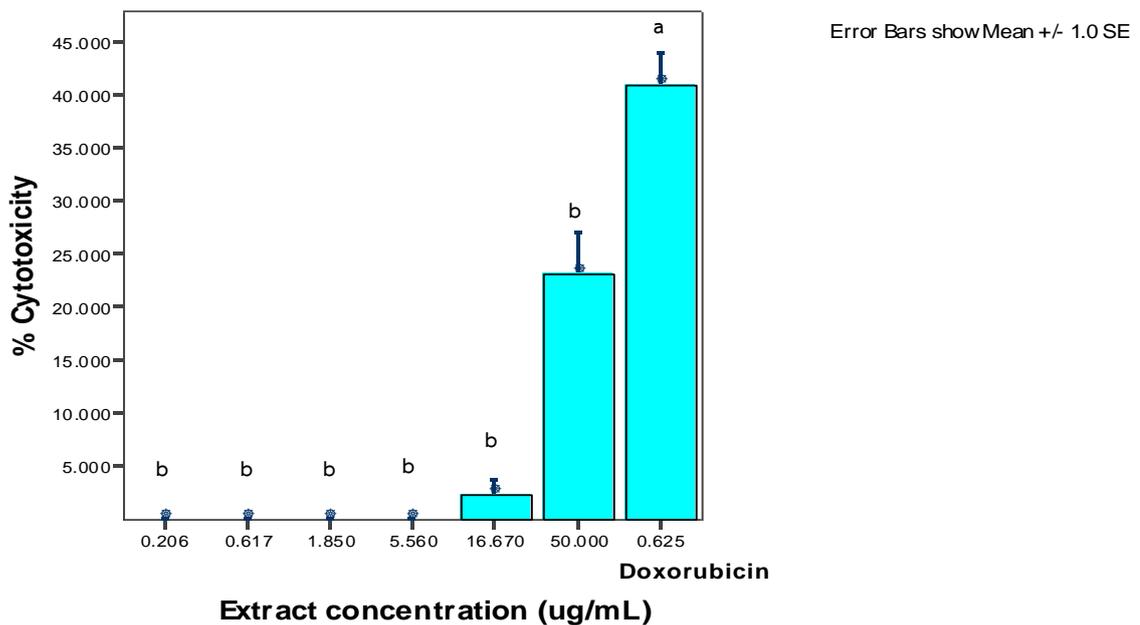
ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงการยับยั้งการเจริญของรา *Magnaporthe grisea* ของสารสกัดจากผลด้วยตัวทำละลายอะซิโตน ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 1.56-50.00 ug/mL ( $p < 0.01$ ) เปรียบเทียบกับยาแอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.391 mg/mL (ตัวอักษรแตกต่างกันที่กราฟ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ))

ในปัจจุบันยังไม่พบรายงานการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคทั้ง 3 ชนิดนี้ (*A. brassicicola*, *C. lunata* และ *M. grisea*) แม้ว่าปัจจุบันมีใช้พืชสมุนไพรควบคุมการเจริญเติบโตของราก่อโรคพืชหลายชนิดแพร่หลายในทางการเกษตร

#### 4.5 การเป็นพืชต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB-oral cavity)

สารสกัดของผลโทงเทงด้วยตัวทำละลายอะซิโตนยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดระหว่าง 0.206-50.00  $\mu\text{g/mL}$  ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.01$ ) พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากได้ เมื่อใช้ความเข้มข้นสารสกัดมากกว่า 16.67  $\mu\text{g/mL}$  ซึ่งสารสกัดความเข้มข้น 50.00  $\mu\text{g/mL}$  สามารถยับยั้งได้การเจริญของมะเร็งช่องปากได้ประมาณ 23.19 %

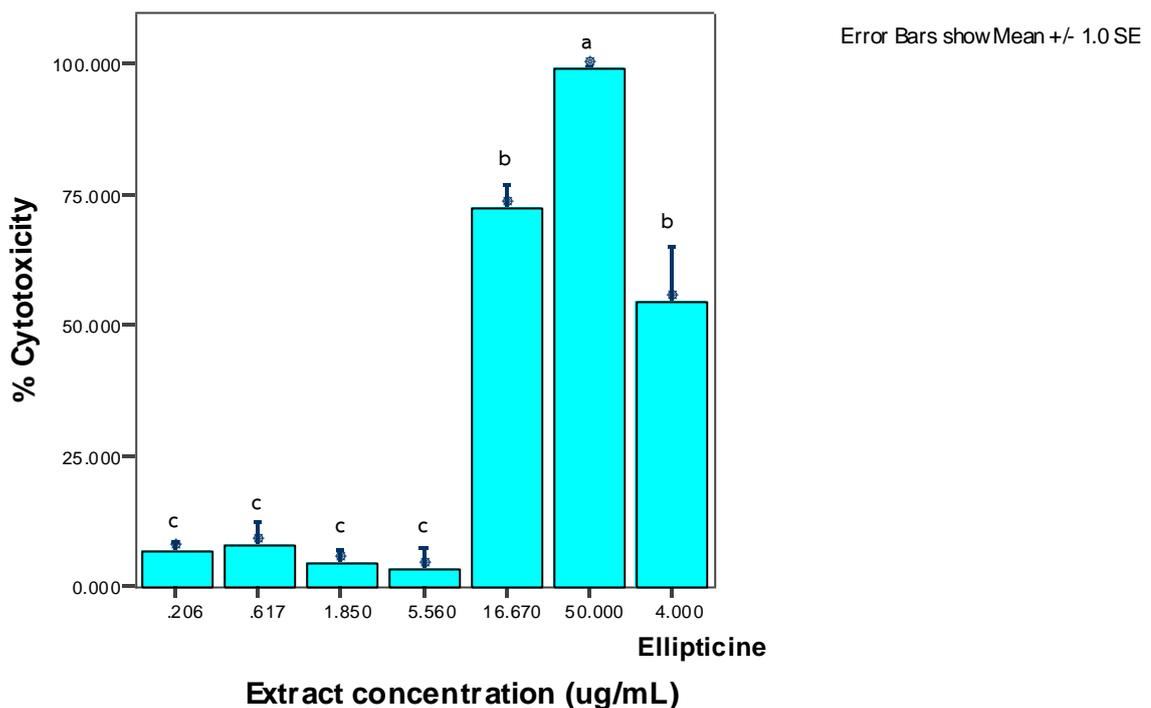
ขณะที่ยา Doxorubicin ความเข้มข้น 0.625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ประมาณ 41.01 % (ภาพที่ 4.5) ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของ Ismail และ Alam (2001) ที่ได้สกัดสารสกัดจากใบของโทงเทง ด้วยตัวทำละลายที่เป็นเมทานอล พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก (nasopharynx KB-16) ที่มีค่า  $\text{ED}_{50}$  การยับยั้งประมาณ 3.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [46] และยังใกล้เคียงกับการศึกษาการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิดสความัส (human oral squamous cell carcinoma, HSC3 cell) เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากต้นโทงเทงที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอธิลอะซิเตต โดยสารสกัดนี้จะไปเร่งกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโตซิส สืบเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส การบวมของเมมเบรน และปฏิกิริยาของโปรตีน caspase-9 โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  ของการยับยั้งประมาณ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เมื่อทดสอบด้วย MTT cytotoxicity assay [47]



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB-oral cavity) ของสารสกัดจากผลด้วยตัวทำละลายอะซิโตน ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.206-50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เปรียบเทียบกับยา Doxorubicin (ตัวอักษรแตกต่างกันที่กราฟ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ))

#### 4.6 การเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187)

สารสกัดของผลโทงเทงด้วยตัวทำละลายอะซิโตนยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปอดเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ยับยั้งได้  $99.33 \pm 0.09\%$ ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) กับการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดทุกความเข้มข้นที่ทดสอบการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปอดเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) กับการยับยั้งการเจริญของยา Ellipticin ความเข้มข้น 4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ยับยั้งได้  $54.80 \pm 10.04\%$ ) โดยมีค่า  $\text{IC}_{50} \pm \text{SE}$  ประมาณ  $15.06 \pm 0.49 \mu\text{g}/\text{mL}$  (ภาพที่ 4.6)

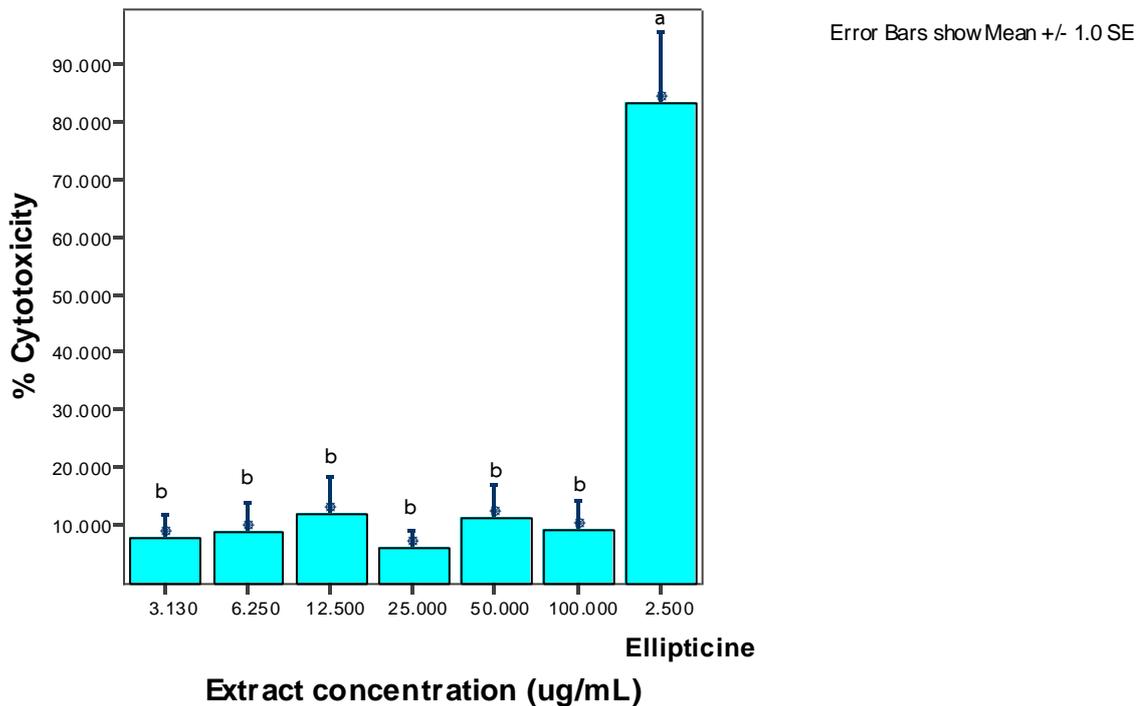


ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ของสารสกัดจากผลด้วยตัวทำละลายอะซิโตน ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.206-50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เปรียบเทียบกับยา Ellipticin (ตัวอักษรแตกต่างกันที่กราฟ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ))

การทดสอบนี้สอดคล้องกับการทดลองของ He และคณะ (2007) ที่ได้สกัดส่วนเหนือดินของโงเทงด้วยตัวทำละลายเมทานอล แยกสารบริสุทธิ์ได้ 11 สาร ได้แก่ physagulins L – O, withanolides ได้แก่ withagulatin A, physagulin K, withaminimin, physagulin J, physagulin B, pubesenolide และ physagulin D เมื่อทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยสารบริสุทธิ์นี้ทั้งหมด พบว่า physagulin B สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด NCI-H460 ได้สูงกว่าสารบริสุทธิ์ชนิดอื่นที่แยกได้ โดยมีค่า  $IC_{50}$  ประมาณ  $0.43 \pm 0.02 \mu\text{M}$  [48]

#### 4.7 การเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2 ATCC HB-8065)

การยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HepG2 ATCC HB-8065) ของสารสกัดจากผลของต้นโงเทงด้วยตัวทำละลายอะซิโตนความเข้มข้นระหว่าง 3.13-100.00  $\mu\text{g/mL}$  มีค่าการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับแตกต่างกับยา Ellipticine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ภาพที่ 4.7) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wu และคณะ (2004) ที่ได้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ด้วยสารสกัดจากต้นโงเทงด้วยตัวทำละลายเอทานอลและสกัดด้วยน้ำพบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับสูงกว่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับด้วยสารสกัดด้วยน้ำ โดยมีค่า  $IC_{50}$  ประมาณ  $10.67 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$  และ  $44.19 \pm 0.52 \mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ [49] โดยสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ประเภท Withanolides จากต้นโงเทงวาไรตี้ *villosa* สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งตับ HepG2, มะเร็งช่องอก MCF-7 และ มะเร็งกระดุก MG-63 มีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 0.06-6.73  $\mu\text{M}$  [50]

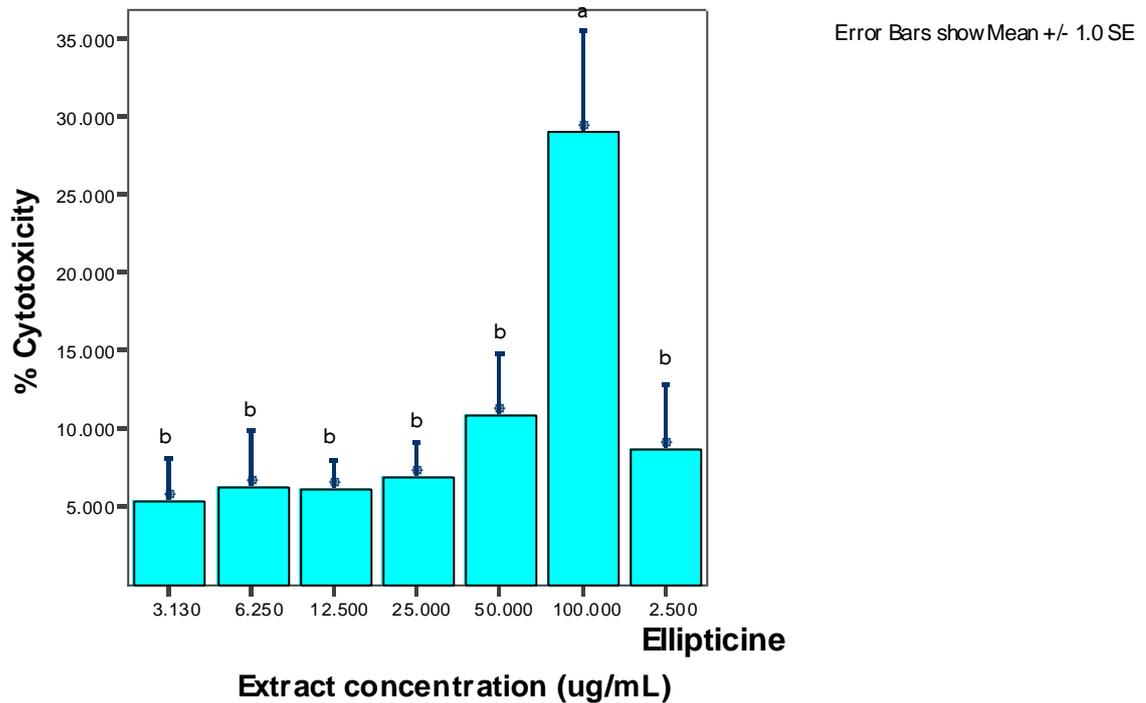


**ภาพที่ 4.7** กราฟแสดงการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2 ATCC HB-8065) ของสารสกัดจากผลด้วยตัวทำละลายอะซิโตน ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 3.130-100.00 ug/mL เปรียบเทียบกับยา Ellipticine (ตัวอักษรแตกต่างกันที่กราฟ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ))

#### 4.8 การเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco2 ATCC HTB-37)

การยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco2 ATCC HTB-37) ของสารสกัดจากผลของต้นโทงเทงด้วยตัวทำละลายอะซิโตนความเข้มข้นระหว่าง 3.13-50.00 ug/mL และการยับยั้งของยา Ellipticine ที่ระดับความเข้มข้น 2.50 ug/mL มีค่าการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 100.00 ug/mL ( $p < 0.01$ ) (ภาพที่ 4.8) แม้ว่าในปัจจุบัน ยังไม่พบการศึกษาการยับยั้งมะเร็งลำไส้ Caco2 จากต้นโทงเทง แต่การศึกษาสารสกัดจากจีนัสเดียวกันของต้นเคฟกูสเบอร์รี่ (*Physalis peruviana*) หรือมีชื่อท้องถิ่นว่า โทงเทงฝรั่ง หรือ ระฆังทอง ที่มีผลมีลักษณะใหญ่กว่าโทงเทงท้องถิ่น (*P.*

*angulata*) สารสกัดจากส่วนผลของต้นระฆังทอง ที่มีการด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 95% สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ มีค่า  $IC_{50}$  ประมาณ 145 ug/ml [16]

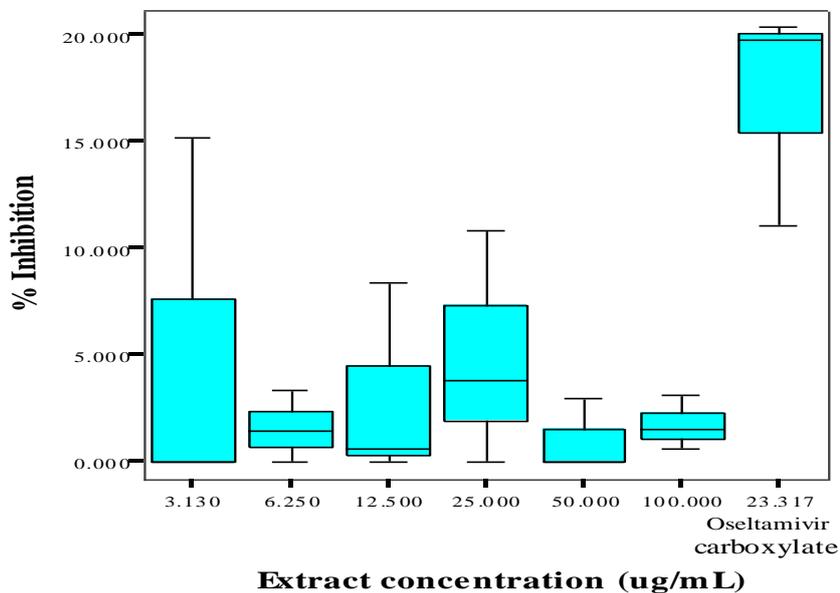


**ภาพที่ 4.8** กราฟแสดงการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco2 ATCC HTB-37) ของสารสกัดจากผลด้วยตัวทำละลายอะซิโตน ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 3.130-100.00 ug/mL เปรียบเทียบกับยา Ellipticine (ตัวอักษรแตกต่างกันที่กราฟ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ))

#### 4.9 การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดส (Neuraminidase, NA)

การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดส ของสารสกัดจากผลโหลงเทงด้วยตัวทำละลายอะซิโตน ความเข้มข้นระหว่าง 3.13-100.00  $\mu\text{g/mL}$  มีค่าการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์น้อยกว่า (ยับยั้งได้  $0.99 \pm 0.99\%$ - $5.05 \pm 5.05\%$ ) การยับยั้งของยา Osetamir carboxylate ความเข้มข้น 30  $\mu\text{g/mL}$  (ยับยั้งได้  $17.04 \pm 2.99\%$ ) มีค่า  $IC_{50} \pm SE$  ประมาณ  $78.00 \pm 30.02 \text{ ug/mL}$  (ภาพที่ 4.9)

แม้ว่าในปัจจุบันยังไม่พบการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ NA ที่สร้างจากอินฟลูเอนซา ไวรัสมาก่อนจากสารสกัดของพืชในจีนัส *Physalis* พบแต่การทดสอบในสมุนไพรบางชนิด เช่น สตอเบอร์รี่ป่า (*Duchesnea indica*) ส่วนของต้นมีค่า  $IC_{50}$  ประมาณ  $83.2 \pm 9.0 \text{ ug/mL}$  และส่วนผลของต้นแฮ็กโกวซ่า (*Prunlla vulgaris*) มีค่า  $IC_{50}$  ประมาณ  $40.4 \pm 2.8 \text{ ug/mL}$  เมื่อทดสอบด้วยวิธี Fluorometric determination (MUNANA-based enzyme inhibition assay) เหมือนกัน [51]



ภาพที่ 4.9 บอกระดับแสดงค่าการผันแปรของของค่ากิจกรรมการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ Neuraminidase ของสารสกัดจากตัวทำละลายอะซิโตนของผลโหลงเทงเปรียบเทียบกับยา Osetamir carboxylate ( $p < 0.01$ )

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การทดลองสกัดสารสำคัญจากส่วนของผลจากต้นโทงเทงด้วยเครื่องอัลตราโซนิกนี้ ได้ข้อมูลจากการคัดกรองฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากต้นโทงเทง ที่สกัดด้วยเครื่องซอกท์เลต จากโครงการพิเศษเรื่อง “ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรตีโอไลติกจากโทงเทง” ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ที่ดีหลายประการ

การทดสอบนี้ได้มุ่งเน้นทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามิดีเนสจากไวรัส H5N1 โดยใช้สารสกัดจากส่วนของผลของโทงเทงด้วยตัวทำละลายอะซิโตน สกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกที่จะช่วยลดเวลาการสกัดจากการสกัดด้วยเครื่องซอกท์เลตได้ พบว่าสารสกัดมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูง มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดได้ดี เช่น ในแบคทีเรียที่ก่อโรค โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 ได้ดีกว่าการยับยั้งการเจริญของรา *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra โดยค่าสารสกัดจากผลของโทงเทงมีค่าการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โรค *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 ที่มีค่า IC<sub>50</sub> ± SE ประมาณ 0.65 ± 0.33 ug/mL และมีค่าการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคชนิด *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra มีค่า IC<sub>50</sub> ± SE ประมาณ 3.28±0.85 ug/mL และยังพบว่าสารสกัดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรค *M. grisea* Mat 1-1 THL1156 ได้ เมื่อใช้สิ่งสกัดความเข้มข้น 50 ug/mL มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ได้ประมาณ 43.25 ± 9.73%

สารสกัดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งในช่องปาก มะเร็งตับและมะเร็งลำไส้ โดยพบว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด NCI-H187 ได้สูงกว่าความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดอื่นที่ถูกลำมาทดสอบ สารสกัดจากผลของโทงเทงนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดได้ โดยมีค่า IC<sub>50</sub> ± SE ประมาณ 15.06 ± 0.49 µg/mL นอกจากนี้สารสกัดยังสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามิดีเนสที่ได้จากไวรัส H5N1 ได้โดยมีค่า IC<sub>50</sub> ± SE ประมาณ 78.00 ± 30.02 ug/mL

## บทที่ 6

### สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

นำเสนอผลงานทางวิชาการแบบโปสเตอร์ งานประชุมวิชาการ “The 13<sup>th</sup> International Symposium on Biocontrol and Biotechnology (ISBB)” ระหว่างวันที่ 6-8 พฤศจิกายน พ.ศ. 2015 ณ เมืองเซินเจิ้น สาธารณรัฐประชาชนจีน ชื่อบทความทางวิชาการ “Antimicrobial, antioxidation and anti-proteolytic activities of *Physalis angulata* L.”

## เอกสารอ้างอิง

- [1] Ooi KL, Muhammad TST, Lim CH, Sulaiman SF. 2010. Apoptotic effects of *Physalis minima* L. chloroform extract in human breast carcinoma T-47D cells mediated by c-myc-, p53-, and caspase-3-dependent pathways. *Integrative cancer therapies* 9 (1): 73-83.
- [2] Shariff N, Sudarshana M, Umesha S, Hariprasad P. 2006. Antimicrobial activity of *Rauvolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callus extracts. *African Journal of Biotechnology* 5 (10): 946-50.
- [3] Kasali FM, Kadima JN, Mpiana PT, Ngbolua K-t-N, Tshibangu DS-T. 2013. Assessment of antidiabetic activity and acute toxicity of leaf extracts from *Physalis peruviana* L. in guinea-pig. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3 (11): 841-6.
- [4] <http://www.cabi.org/isc/datasheet/40711>. 2017. *Physalis angulata* (cutleaf groundcherry)
- [5] Da Silva BJM, Da Silva RRP, Rodrigues APD, Farias LHS, Do Nascimento JLM, Silva EO. 2016. *Physalis angulata* induces death of promastigotes and amastigotes of *Leishmania* (Leishmania) amazonensis via the generation of reactive oxygen species. *Micron* 82: 25-32.
- [6] Meira CS, Guimarães ET, dos Santos JAF, Moreira DRM, Nogueira RC, Tomassini TCB, et al. 2015. In vitro and in vivo antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine* 22 (11): 969-74.
- [7] Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, et al. 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 118 (4): 1301-10.
- [8] Murali T, Vadluri R, Kumar M. 2013. In vitro determination of antioxidant activity of *Physalis angulata*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4 (3): 541-9.
- [9] Choi EM, Hwang JK. 2005. Effect of some medicinal plants on plasma antioxidant system and lipid levels in rats. *Phytotherapy research : PTR* 19 (5): 382-6.
- [10] Valdivia-Mares LE, Zaragoza FAR, González JJS, Vargas-Ponce O. 2016. Phenology, agronomic and nutritional potential of three wild husk tomato species (*Physalis*, Solanaceae) from Mexico. *Scientia Horticulturae* 200: 83-94.
- [11] Puente LA, Pinto-Muñoz CA, Castro ES, Cortés M. 2011. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International* 44 (7): 1733-40.
- [12] Gonzalez-Mendoza D, Ascencio-Martinez D, Poox AH, Mendez-Trujillo V, Grimaldo-Juarez O, Hernandez JFS, et al. 2011. Phenolic compounds and physicochemical analysis of *Physalis ixocarpa* genotypes. *Scientific Research and Essays* 6 (17): 3808-14.
- [13] Jiménez-Santana E, Robledo-Torres V, Benavides-Mendoza A, Ramírez-Godina F, Ramírez-Rodríguez H, de La Cruz-Lázaro E. 2012. Calidad de fruto de genotipos tetraploides de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Universidad y ciencia* 28 (2): 153-61.
- [14] El Sheikh AF, Zaki MS, Bakr AA, El Habashy MM, Montet D. 2010. Biochemical and sensory quality of *Physalis* (*Physalis pubescens* L.) juice. *Journal of Food Processing and Preservation* 34 (3): 541-55.
- [15] Castro AM, Rodríguez L, Vargas EM. 2008. Dry gooseberry (*Physalis peruviana* L) with pretreatment of osmotic dehydration. *Vitae* 15 (2): 226-31.
- [16] Ramadan MF. 2011. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. *Food Research International* 44 (7): 1830-6.
- [17] Novoa R, Bojacá M, Galvis J, Fischer G. 2006. La madurez del fruto y el secado del cáliz influyen en el comportamiento poscosecha de la uchuva, almacenada a 12 C (*Physalis peruviana* L.). *Agronomía colombiana* 24 (1): 77-86.
- [18] Lima CSM, Severo J, Manica-Berto R, Silva JA, Rufato L, Rufato AdR. 2009. Chemical characteristics of cape-gooseberry fruits in different sepal colors and training systems. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31 (4): 1061-8.
- [19] Ostrzycka J, Horbowicz M, Dobrzański W, Jankiewicz LS, Borkowski J. 1988. Nutritive value of tomatillo fruit (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 57 (4): 507-21.
- [20] Vargas-Ponce O, Pérez-Álvarez LF, Zamora-Tavares P, Rodríguez A. 2011. Assessing genetic diversity in mexican husk tomato species. *Plant Molecular Biology Reporter* 29 (3): 733-8.
- [21] Hseu YC, Wu CR, Chang HW, Kumar KJS, Lin MK, Chen CS, et al. 2011. Inhibitory effects of *Physalis angulata* on tumor metastasis and angiogenesis. *Journal of Ethnopharmacology* 135 (3): 762-71.

- [22] Lee HZ, Liu WZ, Hsieh WT, Tang FY, Chung JG, Leung HWC. 2009. Oxidative stress involvement in *Physalis angulata*-induced apoptosis in human oral cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 47 (3): 561-70.
- [23] Wu SJ, Ng LT, Chen CH, Lin DL, Wang SS, Lin CC. 2004. Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. *Life Sciences* 74 (16): 2061-73.
- [24] Maldonado E, Hurtado NE, Pérez-Castorena AL, Martínez M. 2015. Cytotoxic 20,24-epoxywithanolides from *Physalis angulata*. *Steroids* 104: 72-8.
- [25] Pinto NB, Morais TC, Carvalho KMB, Silva CR, Andrade GM, Brito GAC, et al. 2010. Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. *Phytomedicine* 17 (10): 740-3.
- [26] Adnyana IK, Yulinah E, Maeistuti N, Setiawan F. 2014. Evaluation of ethanolic extracts of mullaca (*Physalis angulata* L.) herbs for treatment of lupus disease in mice induced pristane. *Procedia Chemistry* 13: 186-93.
- [27] Choi EM, Hwang JK. 2003. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. *Journal of Ethnopharmacol* 89 (1): 171-5.
- [28] Bastos GNT, Silveira AJA, Salgado CG, Picanço-Diniz DLW, do Nascimento JLM. 2008. *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. *Journal of Ethnopharmacology* 118 (2): 246-51.
- [29] Poojari S, Porika R, Mamidala E. 2014. Phytochemical analysis and in vitro antidiabetic activities of *Physalis angulata* fruit extracts. *National Journal of Integrated Research in Medicine* 5 (2): 34-8.
- [30] Row LR, Sarma NS, Matsuura T, Nakashima R. 1978. Physalins E and H, new physalins from *Physalis angulata* and *P. lancifolia*. *Phytochemistry* 17 (9): 1641-5.
- [31] Augustine A, Ufuoma O. 2013. Flavonoids from the leaves of *Physalis angulata* Linn. *Planta Medica* 79 (13): PJ5.
- [32] Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181 (4617): 1199-200.
- [33] Aremu EA, Furumai T, Igarashi Y, Sato Y, Akamatsu H, Kodama M, et al. 2003. Specific inhibition of spore germination of *Alternaria brassicicola* by fistupyronone from *Streptomyces* sp. TP-A0569. *Journal of General Plant Pathology* 69 (4): 211-7.
- [34] Guarro J, Pujol I, Aguilar C, Llop C, Fernandez-Ballart J. 1998. Inoculum preparation for in-vitro susceptibility testing of filamentous fungi. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 42 (3): 385-7.
- [35] Changsen C, Franzblau SG, Palittapongarnpim P. 2003. Improved green fluorescent protein reporter gene-based microplate screening for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (12): 3682-7.
- [36] Collins LA, Torrero MN, Franzblau SG. 1998. Green fluorescent protein reporter microplate assay for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 42 (2): 344-7.
- [37] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing : Sixteenth informational supplement M100-S16. Wayne, PA.
- [38] O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry* 267 (17): 5421-6.
- [39] Potier M, Mameli L, Bêlisle M, Dallaire L, Melançon SB. 1979. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic) substrate. *Analytical Biochemistry* 94 (2): 287-96.
- [40] Nnamani CV, Ani OC, Belunwu G. 2009. Larvicidal effects of ethanol extracts of leaves and fruits of *Physalis angulata* L. on the larvae of *Anopheles mosquitoes* from Ebonyi State, Nigeria. *Animal Research International* 6 (3): 1059-62.
- [41] Choi EM, Hwang JK. 2005. Screening of Indonesian medicinal plants for inhibitor activity on nitric oxide production of RAW264.7 cells and antioxidant activity. *Fitoterapia* 76 (2): 194-203.
- [42] Rivera DE, Ocampo YC, Castro JP, Caro D, Franco LA. 2015. Antibacterial activity of *Physalis angulata* L., *Merremia umbellata* L., and *Cryptostegia grandiflora* Roxb. Ex R.Br. - medicinal plants of the Colombian Northern Coast. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* 15 (1): 95-102.
- [43] Osho A, Adetunji T, Fayemi SO, Moronkola DO. 2010. Antimicrobial activity of essential oils of *Physalis angulata*. L. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines* 7 (4): 303-6.
- [44] Pietro RC, Kashima S, Sato DN, Januario AH, Franca SC. 2000. In vitro antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 7 (4): 335-8.

- [45] Januário AH, Filho ER, Pietro RCLR, Kashima S, Sato DN, França SC. 2002. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Phytotherapy Research* 16 (5): 445-8.
- [46] Ismail N, Alam M. 2001. A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia* 72 (6): 676-9.
- [47] Lee HZ, Liu WZ, Hsieh WT, Tang FY, Chung JG, Leung HW. 2009. Oxidative stress involvement in *Physalis angulata*-induced apoptosis in human oral cancer cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 47 (3): 561-70.
- [48] He QP, Ma L, Luo JY, He FY, Lou LG, Hu LH. 2007. Cytotoxic withanolides from *Physalis angulata* L. *Chemistry & biodiversity* 4 (3): 443-9.
- [49] Wu SJ, Ng LT, Chen CH, Lin DL, Wang SS, Lin CC. 2004. Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. *Life Science* 74 (16): 2061-73.
- [50] Ma T, Zhang W-N, Yang L, Zhang C, Lin R, Shan S-M, et al. 2016. Cytotoxic withanolides from *Physalis angulata* var. *villosa* and the apoptosis-inducing effect via ROS generation and the activation of MAPK in human osteosarcoma cells. *RSC Advances* 6 (58): 53089-100.
- [51] Tian L, Wang Z, Wu H, Wang S, Wang Y, Wang Y, et al. 2011. Evaluation of the anti-neuraminidase activity of the traditional Chinese medicines and determination of the anti-influenza A virus effects of the neuraminidase inhibitory TCMs in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology* 137 (1): 534-42.

## ภาคผนวก

## อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

1. อาหาร minimal salt medium (MM) ที่ใช้เลี้ยงรา *Curvularia lunata* ประกอบด้วย

● แอมโมเนียมไนเตรด	ความเข้มข้น	3 g/L
● กลูโคส	ความเข้มข้น	20 g/L
● โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	ความเข้มข้น	0.5 g/L
● โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต ( $\text{NaHPO}_4\text{H}_2\text{O}$ )	ความเข้มข้น	0.5 g/L
● แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	ความเข้มข้น	0.5 g/L
● แคลเซียมคลอไรด์	ความเข้มข้น	0.5 g/L
● สารสกัดจากยีสต์	ความเข้มข้น	1 g/L

2. อาหาร minimum salt medium (MM) ที่ใช้เพาะเลี้ยงรา *Magnaporthe grisea* Mat 1-1

## TH1156 (BCC 10261) ประกอบด้วย

● แอมโมเนียมไนเตรด	ความเข้มข้น	3 g/L
● กลูโคส	ความเข้มข้น	0.5 g/L
● โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	ความเข้มข้น	0.5 g/L
● โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต ( $\text{NaHPO}_4\text{H}_2\text{O}$ )	ความเข้มข้น	0.5 g/L
● แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	ความเข้มข้น	0.5 g/L
● แคลเซียมคลอไรด์ และสารสกัดจากยีสต์	ความเข้มข้นเท่ากัน	ความเข้มข้น 1 g/L



## 7. อาหาร Minimal Essential Medium (MEM) ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco2 ATCC

### HBT-37) ประกอบด้วย

▪ bovine serum albumin (BSA)	ความเข้มข้น	10%
▪ แอลกลูตามีน	ความเข้มข้น	2 mM
▪ กรดอะมิโนไม่จำเป็น	ความเข้มข้น	0.1 mM
▪ อินซูลิน-ทรานสเฟอริน-ซีลีเนียม เอ็กส์	ความเข้มข้น	0.1 IU/mL
▪ โซเดียมไบคาร์บอเนต	ความเข้มข้น	1.5 g/L
▪ เพนนิซิลิน	ความเข้มข้น	100 U/mL
▪ สเตربتอมัยซิน	ความเข้มข้น	100 ug/mL

## สรุปการใช้จ่ายเงิน

รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
<b>ค่าใช้จ่าย</b>	
▪ ค่าเบี้ยเลี้ยง	900
▪ ค่าที่พัก	2,500
▪ ค่าเดินทาง	1,600
▪ ค่าจ้างวิเคราะห์	20,000
▪ ค่าจ้างพิมพ์รายงาน	1,000
▪ ค่าจัดทำรูปเล่มรายงาน	1,000
<b>ค่าวัสดุ</b>	
▪ ค่ากระดาษ	1,000
▪ ค่าสารเคมี	21,000
▪ ค่าถ่ายเอกสาร	1,000
<b>รวมทั้งสิ้น</b>	<b>50,000</b>

## ประวัติผู้เขียน

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) ธนาวดี ก่ออานันต์
2. ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Thanavadee Kor-aranan
3. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3329900301503
4. การศึกษาระดับอุดมศึกษา (เรียงจากคุณวุฒิสูงสุด)
 

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษา
มัธยมศึกษา	พ.ศ. 2534	โรงเรียนสิรินธร (จ. สุรินทร์)
วทบ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	พ.ศ. 2539	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง
วศม. (เคมี)	พ.ศ. 2543	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
กำลังศึกษาระดับ ปริญญาเอก		
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ	พ.ศ. 2552-ปัจจุบัน	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. ตำแหน่ง อาจารย์พนักงานมหาวิทยาลัย
6. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ
 

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
 เลขที่ 1 ซอย ฉลองกรุง 1 แขวงลำปาทิว เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520  
 โทรศัพท์ 02-329-8400 ถึง 11 ต่อ 236 แฟกซ์ 02-329-8412  
 E-mail : [kschotir@kmitl.ac.th](mailto:kschotir@kmitl.ac.th); [thanavadee9@hotmail.com](mailto:thanavadee9@hotmail.com)