การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย

วิทยานิพนธ์

ของ

นิศารัตน์ สังคะรัมย์

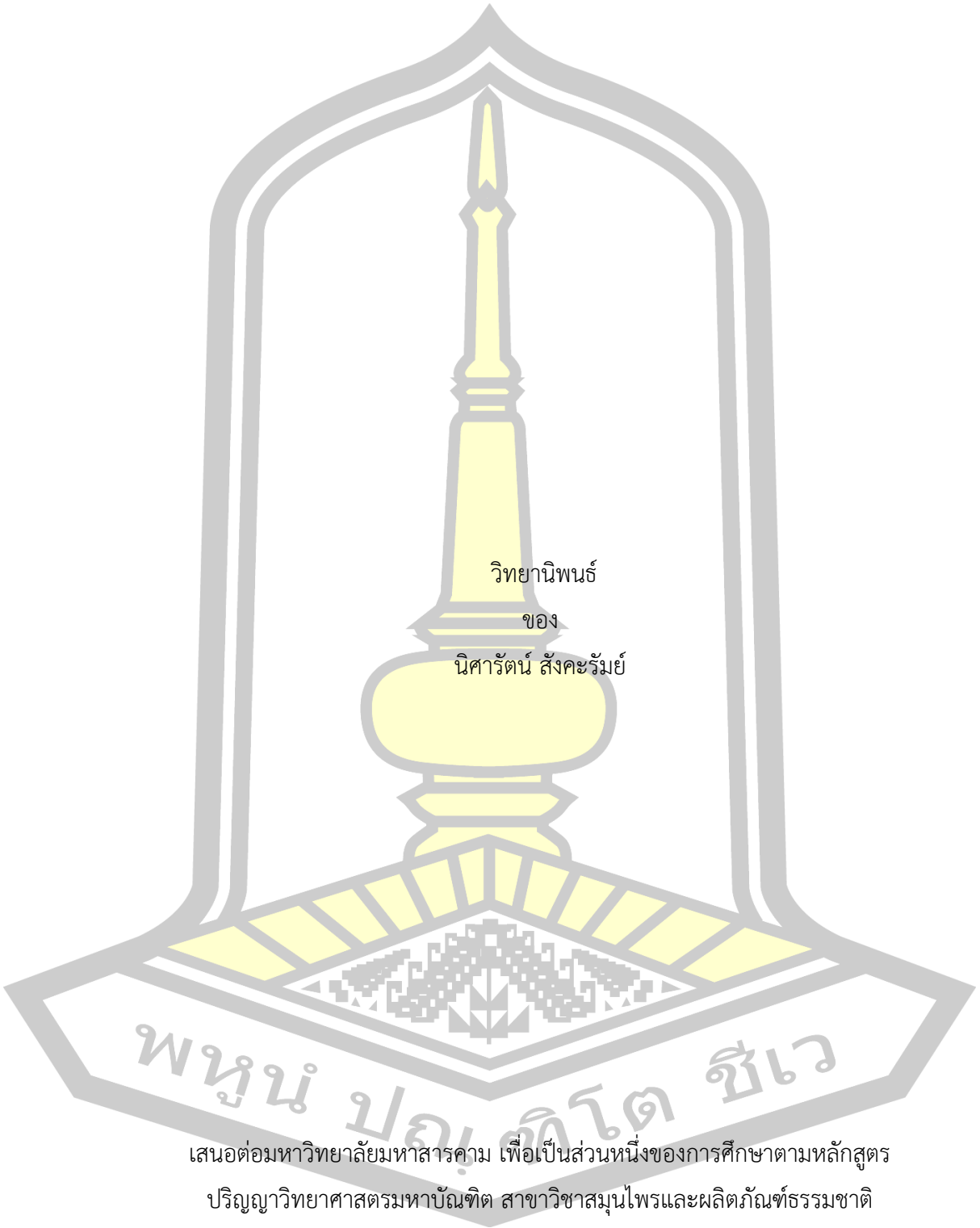
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

มิถุนายน 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย



วิทยานิพนธ์

ของ

นิศารัตน์ สังคะรัมย์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

มิถุนายน 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Biological activities of *Eclipta prostrata* (L.) L., *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski and *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

Nisarat Sangkaram

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (Medicinal Plants and Natural Products)

June 2021

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวนิศารัตน์ สังคะรัมย์ แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผศ. ดร. วนิดา ไทรชมภู)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผศ. ดร. รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผศ. ดร. บรรลือ สังข์ทอง)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. สกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ์)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผศ. ดร. นาฏศจี นวลแก้ว)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พหูน ปญฺ ฑิโต ชีเว

.....
(ผศ. ดร. ชนัตถา พลอยเลื่อมแสง)
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย
ผู้วิจัย นิศารัตน์ สังคะรัมย์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บรรลือ สังข์ทอง
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** สมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2564

บทคัดย่อ

กะเม็งตัวเมีย (*Eclipta prostrata* (L.) L.) กะเม็งตัวผู้ (*Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski) และกระดุมทองเลื้อย (*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski) เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae พืชทั้งสามมีชื่อไทยและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายคลึงกัน ข้อมูลการศึกษาเบื้องต้นมีแนวโน้มว่าไม่สามารถพบกะเม็งตัวผู้ได้ทั่วไป ประกอบกับการเผยแพร่ข้อมูลรูปภาพกระดุมทองเลื้อยในชื่อกะเม็งตัวผู้ อาจทำให้เกิดความเข้าใจผิดโดยนำกระดุมทองเลื้อยมาใช้แทนกะเม็งตัวผู้ อันจะนำไปสู่การใช้สมุนไพรไม่ถูกต้น ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการใช้สมุนไพรได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพ ปริมาณฟินอลิกรวม และศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย โดยวิธีการดำเนินการวิจัยได้แก่ ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี broth dilution method ฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง nitric oxide ในเซลล์ RAW 264.7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และปริมาณฟินอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay ของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของพืชทั้งสามชนิด และศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี TLC ผลการศึกษาพบว่าทั้งสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของพืชทั้งสาม มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ได้ และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. aureus* โดยสารสกัดน้ำของกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้มีฤทธิ์ดีที่สุด สารสกัดส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA แต่มีเพียงสารสกัดน้ำของกะเม็งตัวเมียที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ MRSA ฤทธิ์ต้านการอักเสบพบว่า สารสกัด ethanol ของพืชทั้งสามมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดน้ำ รวมถึงยามาตรฐาน diclofenac อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกระดุมทองเลื้อยมีฤทธิ์ดีที่สุด รองลงมาคือกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 33.43±4.76, 56.64±1.82 และ 62.21±2.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า มีเพียงกะเม็งตัวผู้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยสารสกัด ethanol มีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่า EC_{50} เท่ากับ 43.48±1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณฟินอลิกรวมพบว่าสารสกัด ethanol ของพืชทั้งสามมีปริมาณฟินอลิกรวมมากกว่าสารสกัดน้ำ สารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวผู้มีปริมาณฟินอลิกรวมมากกว่าสารสกัด

ของพืชอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีปริมาณเท่ากับ 55.46±7.18 มิลลิกรัม GAE ต่อสารสกัด 1 กรัม การทำรอยพิมพ์โครมาโตกราฟี (TLC fingerprint) พบว่าพืชทั้ง 3 ชนิด มีรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีที่แตกต่างกัน สรุปได้ว่ากะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย มีความแตกต่างกันทั้งเอกลักษณ์ทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ

คำสำคัญ : กะเม็งตัวเมีย, กะเม็งตัวผู้, กระดุมทองเลื้อย, ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ปริมาณฟีนอลิกรวม, รอยพิมพ์โครมาโตกราฟี

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

TITLE Biological activities of *Eclipta prostrata* (L.) L., *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski and *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

AUTHOR Nisarat Sangkaram

ADVISORS Assistant Professor Ruchilak Rattarom , Ph.D.
Assistant Professor Bunlue Sungthong , Dr.rer.nat.

DEGREE Master of Science **MAJOR** Medicinal Plants and Natural Products

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2021

ABSTRACT

Eclipta prostrata (L.) L., *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski and *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski are the member of Asteraceae family. They have similar Thai name “Ka-meng” between *E. prostrata* and *S. calendulacea* and similar botanical characteristics between *S. calendulacea* and *S. trilobata* Lead to confused to use in traditional medicine. This study aimed to investigate biological activities such as antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant and total phenolic compound and TLC fingerprint of three plants. The ethanolic extract and the water extract of these plant were evaluated for their antimicrobial activity using broth dilution method, anti-inflammatory activity using lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages, antioxidant activity using DPPH and the total phenolic contents using Folin-Ciocalteu reagent. Chemical constituents were investigated by TLC fingerprint. .

The results of antimicrobial activity showed that all of cruse extracts were active on *S. aureus, P. aeruginosa* at MIC 12.50-100 mg/ml, whereas only the ethanolic extract of *S. calendulacea* had an antimicrobial effect on MRSA. The ethanolic extract of all plants showed higher inhibitory effect on the nitric oxide production than water extract, while *S. trilobata* exhibited significant inhibitory effect with IC_{50} value 33.43±4.76 µg/ml. The extract of *S. calendulacea* had the second highest activity with IC_{50} values of 56.64±1.82 µg/ml, followed by *E. prostrata* in both

methods of antioxidant assay and Folin-Ciocalteu method, ethanolic extract of *S. calendulacea* exhibited significant inhibitory effects against DPPH and the most phenolic content EC_{50}= 43.48±1.00 µg/ml and 55.46±7.18 mg GAE/g crude extract respectively. TLC fingerprint of the ethanolic extracts of three plants were identify. In conclusion, *E. prostrata*, *S. calendulacea* and *S. trilobata* are different both of biological activities and chemical identification by TLC.

Keyword : Eclipta prostrata, Sphagneticola calendulacea, Sphagneticola trilobata, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity, antioxidant activity, total phenolic, TLC fingerprint

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนระดับบัณฑิตศึกษาจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บรรลือ สังข์ทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา ไทรชมภู ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ์ กรรมการบัณฑิตศึกษาประจำคณะผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นาฏศจี นวลแก้ว กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำแนะนำข้อเสนอแนะ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ นายหอม หะทัยทาระ หมอพื้นบ้านอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ ที่ช่วยตรวจสอบชนิดของพืช

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้การสนับสนุน วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี สำหรับดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ได้ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

คุณค่าอันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้เป็นเครื่องบูชาแด่บิดา มารดา ครูอาจารย์ ผู้ประสาทวิชาความรู้ ดูแลเอาใจใส่วางรากฐานแห่งการศึกษาแก่ผู้วิจัย

นิศารัตน์ สังคะรัมย์

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฏ

สารบัญรูปภาพ ..... ฑ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย 4

1.4 ขอบเขตของการวิจัย 4

1.5 กรอบแนวคิด 4

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

1.7 นิยามคำศัพท์เฉพาะ 5

1.8 คำสำคัญ (keyword) 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

2.1 การจัดจำแนกหมวดหมู่พืช (Plant Classification) และการระบุชนิดพืช (Plant Identification) 6

2.2 ข้อมูลสมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย 8

2.3 พฤกษเคมี (Phytochemistry) 15

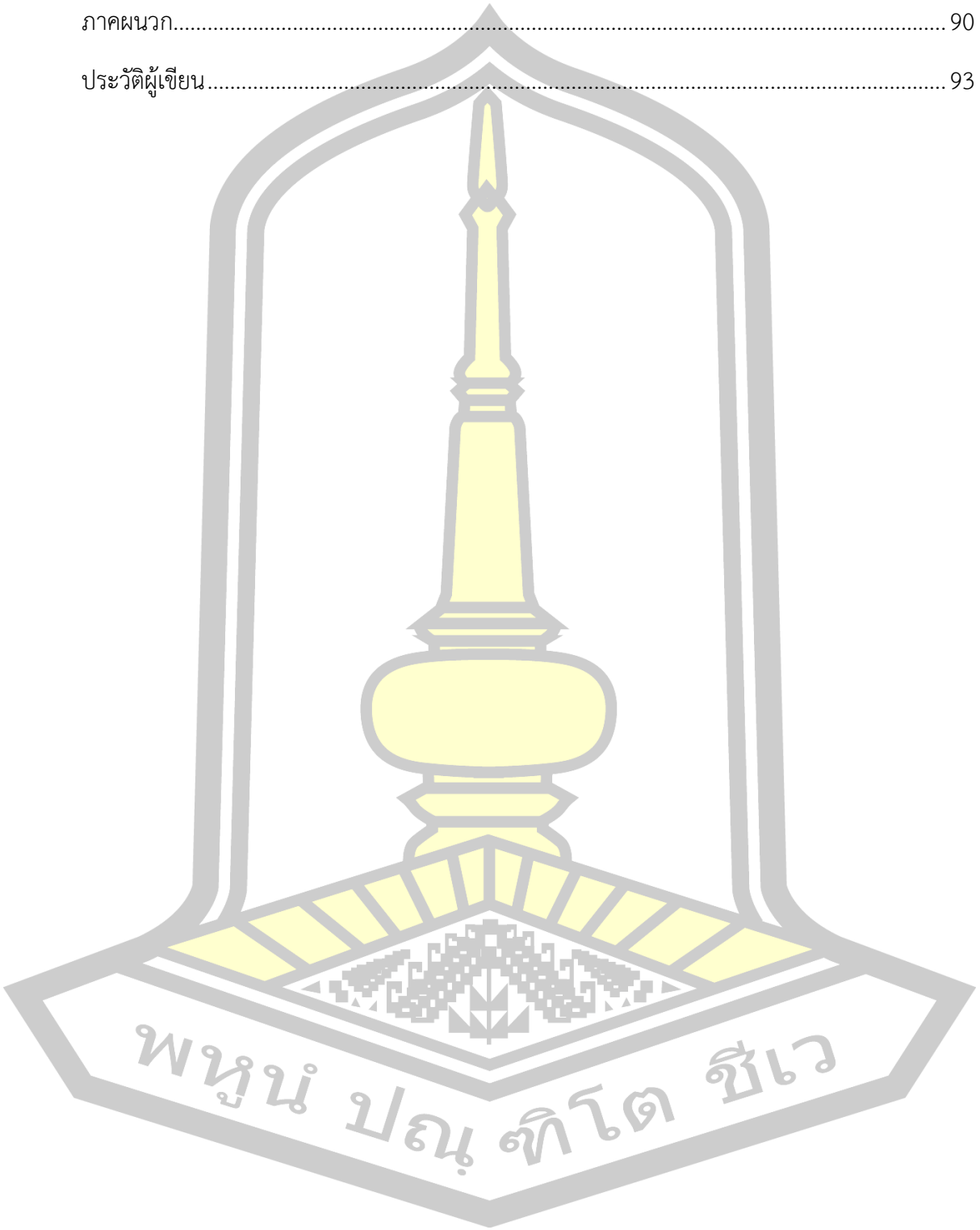
2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacology) 22

2.5 การใช้ในทางแพทย์พื้นบ้าน (Traditional use) 36
2.6 ความสัมพันธ์ของอนุมูลอิสระ/total phenolic/ฤทธิ์ต้านอักเสบ 43
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 45
3.1 รูปแบบการวิจัย 45
3.2 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 45
3.3 การเตรียมพืชตัวอย่าง 47
3.4 การเตรียมสารสกัดพืช 48
3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี Broth dilution 48
3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้วิธียับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) 50
3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay 53
3.8 การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay 53
3.9 การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) 54
3.10 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล 55
บทที่ 4 ผลการวิจัย 56
4.1 การเตรียมตัวอย่างพืช 56
4.2 การเตรียมสารสกัด 59
4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี Broth dilution 60
4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) 61
4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay 63
4.6 การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay 65
4.7 การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) 67
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 73
5.1 สรุปผลการทดลอง 73
5.2 อภิปรายผลการทดลอง 74

บรรณานุกรม..... 79

ภาคผนวก..... 90

ประวัติผู้เขียน..... 93



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ข้อมูลสมุนไพร กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย 8

ตาราง 2 พฤกษเคมีของกะเม็งตัวเมีย, กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย 16

ตาราง 3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย 22

ตาราง 4 การใช้ในทางแพทย์พื้นบ้าน (Traditional use) 36

ตาราง 5 ปริมาณสารสกัดและร้อยละผลผลิตของสารสกัดกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย 59

ตาราง 6 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC และMinimal bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดน้ำและ ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ต่อเชื้อ S. aureus, P. aeruginosa และ MRSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)..... 60

ตาราง 7 ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการหลั่ง NO ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) และร้อยละการยับยั้งการหลั่ง NO (% inhibition) ของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ในเซลล์ RAW 264.7 และค่าการอยู่รอดของเซลล์ (% cell viability)..... 62

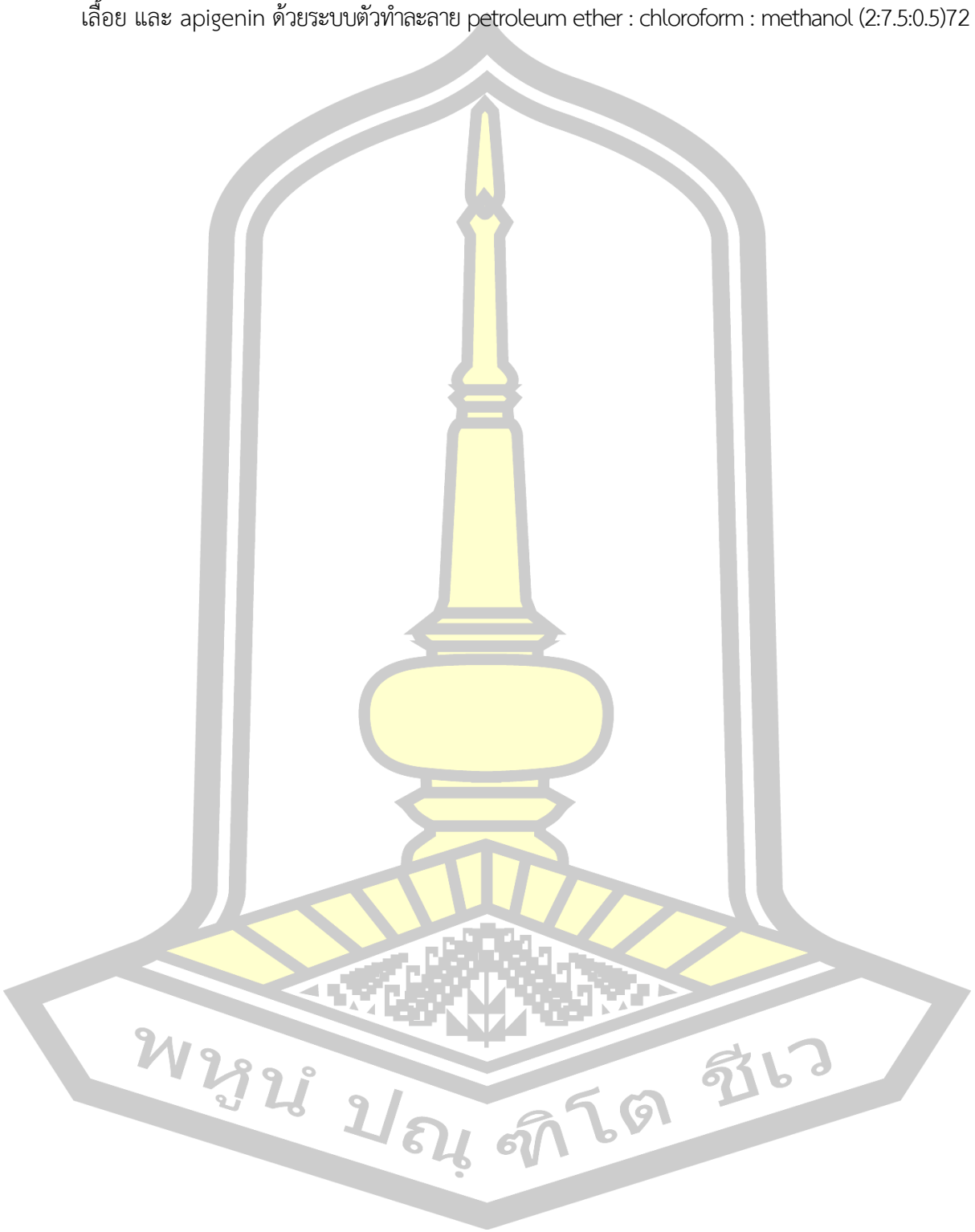
ตาราง 8 ค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (EC_{50}) และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% inhibition) ของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay 64

ตาราง 9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย..... 66

ตาราง 10 ค่า hR_f และลักษณะ spot ของสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ กระดุมทองเลื้อย และ apigenin ด้วยระบบตัวทำละลาย chloroform : hexane : ethanol (6:3:1) 69

ตาราง 11 ค่า hR_f และลักษณะ spot ของสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ กระดุมทองเลื้อย และ apigenin ด้วยระบบตัวทำละลาย chloroform : benzene : ethanol : methanol (5:3:1.5:0.5) 70

ตาราง 12 ค่า hR_f และลักษณะ spot ของสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ กระดุมทองเลื้อย และ apigenin ด้วยระบบตัวทำละลาย petroleum ether : chloroform : methanol (2:7.5:0.5)72



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิด 4

ภาพประกอบ 2 กะตัวเม็งเมีย *(Eclipta prostrata)* 12

ภาพประกอบ 3 กะเม็งตัวผู้ *(Sphagneticola calendulacea)* 13

ภาพประกอบ 4 กระดุมทองเลื้อย *(Sphagneticola trilobata)* 14

ภาพประกอบ 5 สารที่พบในสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด 21

ภาพประกอบ 6 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (Minimal inhibitory concentration, MIC) 50

ภาพประกอบ 7 รูปแบบการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้วิธียับยั้ง NO 52

ภาพประกอบ 8 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และของกะเม็งตัวเมีย 57

ภาพประกอบ 9 เครื่องยาแห้งส่วน ลำต้น ใบ และดอก ของกะเม็งตัวเมีย 57

ภาพประกอบ 10 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกะเม็งตัวผู้ 58

ภาพประกอบ 11 เครื่องยาแห้งส่วน ลำต้น ใบ และดอก ของกะเม็งตัวผู้ 58

ภาพประกอบ 12 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกระดุมทองเลื้อย 59

ภาพประกอบ 13 ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการหลั่ง NO ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ในเซลล์ RAW 264.7 .. 63

ภาพประกอบ 14 ค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (EC_{50}) ของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay 65

ภาพประกอบ 15 กราฟมาตรฐานของสาร gallic acid 66

ภาพประกอบ 16 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย 67

ภาพประกอบ 17 เปรียบเทียบรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารสกัดกะเม็งตัวเมีย authentic 68

ภาพประกอบ 18 เปรียบเทียบรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารสกัดกะเม็งตัวเมีย authentic (1) , กะเม็งตัวเมียจากร้านขายเครื่องยา (2) ,กะเม็งตัวผู้ authentic (3), กะเม็งตัวผู้จากร้านขายเครื่องยา (4), กระดุมทองเลื้อย (5) และ apigenin (6) ด้วยระบบตัวทำละลาย chloroform : benzene : ethanol : methanol (5:3:1.5:0.5) ตรวจสอบภายใต้ UV 254 นาโนเมตร (A), 366 นาโนเมตร (B) และสเปรย์ anisaldehyde/H_2SO_4 (C)..... 70

ภาพประกอบ 19 เปรียบเทียบรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารสกัดกะเม็งตัวเมีย authentic (1) , กะเม็งตัวเมียจากร้านขายเครื่องยา (2) ,กะเม็งตัวผู้ authentic (3), กะเม็งตัวผู้จากร้านขายเครื่องยา (4), กระดุมทองเลื้อย (5) และ apigenin (6) ด้วยระบบตัวทำละลาย petroleum ether : chloroform : methanol (2:7.5:0.5) ตรวจสอบภายใต้ UV 254 นาโนเมตร (A), 366 นาโนเมตร (B) และสเปรย์ anisaldehyde/H_2SO_4 (C)..... 71

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

สมุนไพรไทยมีบทบาทสำคัญในการดูแลสุขภาพและรักษาอาการเจ็บป่วยมาแต่ครั้งโบราณผ่านภูมิปัญญาและองค์ความรู้ทางการแพทย์พื้นบ้านที่สั่งสมมานาน และรวบรวมไว้เป็นเอกสารเชิงประจักษ์ เช่น ชุดตำราภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทยฉบับอนุรักษ์ หรือตำราพระโอสถพระนารายณ์ เป็นต้น (พิมพ์พรรณ และคณะ, 2555) การใช้สมุนไพรจึงมีวิวัฒนาการและพัฒนาการองค์ความรู้มาอย่างต่อเนื่อง ความนิยมใช้สมุนไพรที่เพิ่มขึ้น ทั้งในลักษณะการบริโภคเป็นอาหารเพื่อการสร้างเสริมสุขภาพหรือป้องกันโรค การใช้เป็นยาเพื่อบำบัดอาการเจ็บป่วย และการใช้เป็นเครื่องสำอางเพื่อความงาม นำไปสู่การจัดทำแผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย เพื่อส่งเสริมการพัฒนาสมุนไพรไทยทั้งในเชิงนโยบายสาธารณสุข และความสำคัญต่อเศรษฐกิจ เพื่อให้เกิดการพัฒนาที่เป็นระบบอย่างยั่งยืน (โสภณ และคณะ, 2559) นอกจากนี้ยังมีการส่งเสริมการใช้สมุนไพรเพื่อเป็นยารักษาโรค โดยคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติได้ประกาศรายการยาสมุนไพรที่ใช้ในบัญชียาหลักแห่งชาติหลายรายการ ทั้งยาแผนไทยหรือยาแผนโบราณ และยาพัฒนาจากสมุนไพร (คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ, 2561) อย่างไรก็ตามยังคงมีสมุนไพรอีกหลายชนิดที่ยังมีความสับสนในการนำมาใช้ ทั้งเนื่องจากชื่อเรียกหรือลักษณะทางกายภาพที่คล้ายคลึงกัน และจากการรับรู้ข้อมูลที่ไม่ถูกต้อง ดังนั้นหากต้องการใช้สมุนไพรให้ได้ผลดีที่สุดต้องยึดหลักการใช้ให้ถูกต้น ถูกส่วน ถูกขนาด ถูกวิธี และใช้ให้ถูกกับโรค หากขาดความเชี่ยวชาญในการจำแนกชนิดของพืชสมุนไพรก็อาจนำมาซึ่งอันตรายต่อร่างกายได้จากการใช้สมุนไพรไม่ถูกชนิดได้ (ยุวดี และวสุ, 2558)

“กะเม็ง” เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีการนำไปใช้ประโยชน์ทางยา ซึ่งสมุนไพรในชื่อกะเม็งที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางมี 2 ชนิด คือกะเม็งตัวเมียหรือกะเม็ง ชื่อวิทยาศาสตร์ *Eclipta prostrata* (L.) L. (ราชันย์ และสมราน, 2557; The plant list, 2010) และกะเม็งตัวผู้ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski (วุฒิ, 2540; วิทยา, 2554; The plant list, 2010) พืชทั้งสองอยู่ในวงศ์ Asteraceae แม้การเรียกชื่อของกะเม็งทั้ง 2 ชนิด จะใกล้เคียงกัน แต่ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างกันชัดเจน โดยกะเม็งจะมีกลีบดอกสีขาว ส่วนกะเม็งตัวผู้จะมีกลีบดอกสีเหลือง อย่างไรก็ตามเมื่อสืบค้นข้อมูลทั้งจากหนังสืออ้างอิงและจากเวปไซต์ต่างๆ ด้วยชื่อกะเม็งตัวผู้ มักจะพบการแสดงภาพของพืชอีกชนิด คือ กระดุมทองเลื้อย ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski วงศ์ Asteraceae (ราชันย์ และสมราน, 2557; The plant list, 2010) เนื่องจากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั้งลำต้น ใบ และดอกที่ใกล้เคียงกันมาก โดยรูปวิธานจาก Flora of China (Zhu et al., 2011) ระบุความแตกต่างของพืชทั้ง 2 ชนิด

นี้ที่ลักษณะรอยหยักที่ขอบใบ คือ กะเม็งตัวผู้จะมีขอบใบจักรฟันเลื่อยถี่เล็กน้อย (sparsely serrulate) ส่วนกระดุมทองเลื้อยจะมีขอบใบเว้าเป็น 3 พู (usually 3-lobed) ความคล้ายคลึงนี้จึงเป็นที่มาของการนำภาพของพืชทั้ง 2 มาใช้เผยแพร่โดยไม่ถูกต้น และอาจนำไปสู่ความเข้าใจผิดทำให้ใช้พืชผิดชนิดได้

ทั้งกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย มีการใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์พื้นบ้าน โดยพบว่าในประเทศจีน อินเดีย ไต้หวัน อินโดนีเซีย มีการนำพืชทั้ง 3 ชนิดไปใช้ในโรคทางผิวหนังรวมถึงการรักษาแผล (Jahan et al., 2014; Karthikumar et al., 2014; Nomani et al., 2013) ในพระคัมภีร์สรรพคุณ (แลมมหาพิกัต) กล่าวถึงสรรพคุณของกะเม็งหรือกะเม็งตัวเมียว่าต้นขับลมให้กระจาย แก้โลหิตอันกระทำให้ร้อน ดอกแก้ดีอันฟุ้งซ่านให้บริบูรณ์ ผลแก้ลมอันเป็นพิษให้ถอย รากแก้ลมวิงเวียนแก้ปวดในท้อง (แพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ เล่ม 1, 2452) ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์ของกะเม็งตัวเมีย โดยอยู่ในตำรับยาผสมเพชรสังฆาตสูตรที่ 2 ซึ่งมีสรรพคุณบรรเทาอาการริดสีดวงทวารหนัก เป็นตำรับที่อยู่ในบัญชียาจากสมุนไพรบัญชียาหลักแห่งชาติ (สำนักยากลุ่มพัฒนาระบบงานระบบยาแห่งชาติและสารสนเทศ, 2556) และในจังหวัดบุรีรัมย์มีการนำกะเม็งมาพัฒนาเป็นตำรับยาสมุนไพรครีมกะเม็งเพื่อใช้ในการรักษาแผลเรื้อรัง กะเม็งตัวผู้มีสรรพคุณแก้ไอ แก้อาเจียนเป็นโลหิต บำรุงโลหิต ใบมีรสเอียน ต้มหรือชงกินแก้ไอ แก้ปวดศีรษะ แก้โรคผิวหนัง แก้ผมร่วง บำรุงร่างกาย ใช้ทั้งต้นทำเป็นผงชงกินแก้ไอ แก้อาเจียนเป็นโลหิต บำรุงโลหิต แก้กระเพาะอักเสบ กระเพาะคราก ตำผสมข้าวพอกแก้บวม (พรทิพย์ และคณะ, 2555) ส่วนกระดุมทองเลื้อยใช้ในตำรับแก้มุตตังพิการและโลหิตตังพิการในบัญชียาแผนไทยสำหรับโรงพยาบาลและหน่วยบริการสาธารณสุขปี 2553 (กรมพัฒนาแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 2553) นอกจากการใช้ในการการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์แผนไทยแล้ว พืชทั้ง 3 ยังมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใกล้เคียงกัน โดยกะเม็งตัวเมียมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแบบ broad spectrum (Karthikumar et al., 2007) และฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูทดลอง (Jahan et al., 2014) กะเม็งตัวผู้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด (Darah et al., 2013) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Yuan et al., 2013) ส่วนกระดุมทองเลื้อยมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด (Taddei et al., 1999)

ผู้วิจัยได้ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของพืชทั้งสามชนิด โดยการสอบถามหมอพื้นบ้านในจังหวัดบุรีรัมย์ 2 ราย คือนายเอกสิทธิ์ วิวาห์สุข หมอพื้นบ้านอำเภอพลับพลาชัย และนายหอม หะทัยทาระ หมอพื้นบ้านอำเภอเมือง ให้ข้อมูลว่ารู้จักพืชทั้ง 3 ชนิด โดยพบกะเม็งตัวเมียขึ้นอยู่ทั่วไปตามท้องนา กระดุมทองเลื้อยพบปลูกเป็นไม้ประดับ แต่ไม่พบกะเม็งตัวผู้ในพื้นที่ และจากงานวิจัยของวิภัสราและคณะ, 2561 รายงานผลการสอบถามร้านขายเครื่องยาสมุนไพรทั่วประเทศ จำนวน 25 ร้าน พบว่ามีกะเม็งตัวเมียจำหน่ายทุกร้าน แต่ไม่พบการจำหน่ายกะเม็งตัวผู้แม้แต่ร้านเดียว ดังนั้น จากชื่อไทยรวมถึงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายคลึงกันของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย

รวมถึงข้อมูลการศึกษาเบื้องต้นที่มีแนวโน้มว่าไม่สามารถพบกะเม็งตัวผู้ได้ทั่วไป ประกอบกับการเผยแพร่ข้อมูลรูปภาพกระดุมทองเลื้อยในชื่อกะเม็งตัวผู้ อาจทำให้เกิดความเข้าใจผิดโดยนำกระดุมทองเลื้อยมาใช้แทนกะเม็งตัวผู้ ซึ่งจะนำไปสู่การใช้สมุนไพรไม่ถูกต้น อันจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการใช้สมุนไพรได้ในที่สุด ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์การต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม และศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ซึ่งเป็นฤทธิ์ที่สอดคล้องกับการใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้านที่ใช้ในการรักษาแผล ที่อาจทำให้เกิดการอักเสบและติดเชื้อ เพื่อให้ได้ข้อมูลในการพิสูจน์ความแตกต่างระหว่างพืชทั้ง 3 ชนิด ที่จะนำไปสู่การใช้สมุนไพรทั้ง 3 ชนิดอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์ทั่วไป: เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม และเอกลักษณ์ทางเคมี ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย

วัตถุประสงค์เฉพาะ:

วัตถุประสงค์ทั่วไป: เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิก และเอกลักษณ์ทางเคมี ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย

วัตถุประสงค์เฉพาะ:

1.2.1 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย โดยทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration: MIC) ด้วยวิธี broth dilution method และทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

1.2.2 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย โดยใช้วิธียับยั้งการหลั่ง nitric oxide

1.2.3 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย โดยวิธี DPPH radical scavenging assay

1.2.4 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu assay

1.2.5 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อยด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

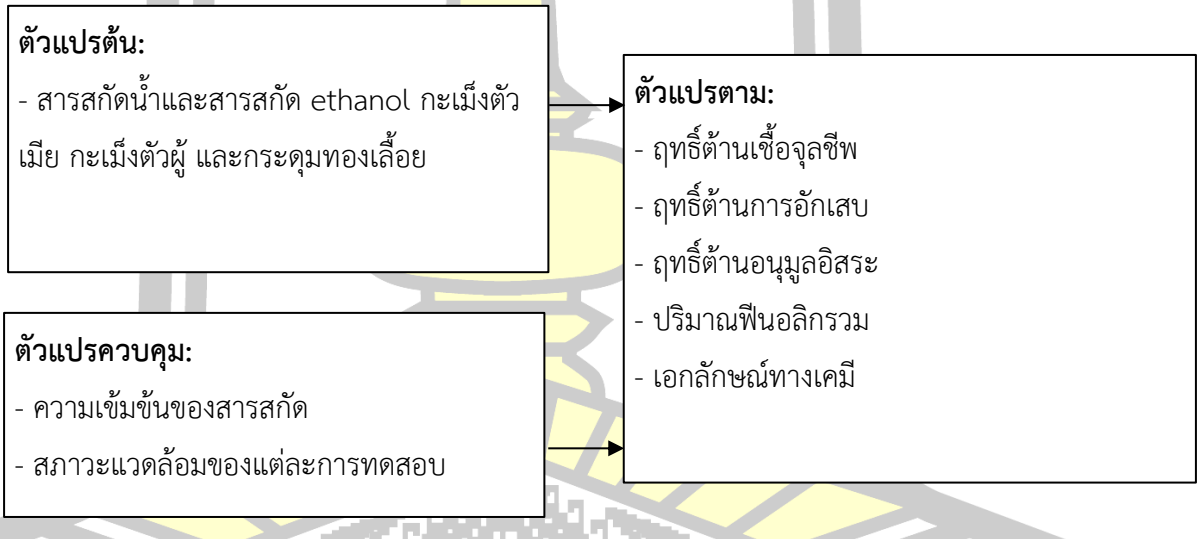
สารสกัดกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิก และเอกลักษณ์ทางเคมี ไม่แตกต่างกัน

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองที่ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม เอกลักษณ์ทางเคมี ของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol จากส่วนทั้งต้นของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ทำในห้องปฏิบัติการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.5 กรอบแนวคิด

งานวิจัยครั้งนี้ มีกรอบแนวคิดโดยรวมดังแสดงในภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิด

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้ข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพ ปริมาณฟีนอลิกรวม และเอกลักษณ์ทางเคมี ของสารสกัดกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย เพื่อพิสูจน์ความแตกต่างระหว่างพืชทั้ง 3 ชนิด

1.6.2 ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ไปใช้ในการสนับสนุนการเลือกใช้สมุนไพรทั้ง 3 ชนิดอย่างถูกต้น และมีประสิทธิภาพต่อไป

1.7 นิยามคำศัพท์เฉพาะ

เอกลักษณ์ทางเคมี หมายถึง การตรวจเอกลักษณ์ของสารสกัดด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) โดยใช้การเปรียบเทียบลักษณะแถบสารที่แยกได้บนแผ่น TLC ของสารสกัด

ฤทธิ์ทางชีวภาพ หมายถึง ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารสกัดน้ำ หมายถึง สารสกัดพืชที่สกัดด้วยน้ำด้วยวิธีการต้ม

สารสกัด ethanol หมายถึง สารสกัดพืชที่สกัดด้วย 95% ethanol ด้วยวิธี soxhlet apparatus

1.8 คำสำคัญ (keyword)

กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ กระดุมทองเลื้อย ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม รอยพิมพ์โครมาโตกราฟี

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การทบทวนวรรณกรรมในงานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาการจัดจำแนกหมวดหมู่พืช ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ พฤกษเคมี ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และการใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้านของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย เพื่อเป็นแนวทางและข้อมูลสนับสนุนในการทำการวิจัย โดยแบ่งหัวข้อการศึกษา ดังนี้

2.1 การจัดจำแนกหมวดหมู่พืช (Plant classification) และการระบุชนิดพืช (Plant identification)

2.2 ข้อมูลสมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย

2.3 พฤกษเคมี (Phytochemistry)

2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacology)

2.5 การใช้ในทางแพทย์พื้นบ้าน (Traditional use)

2.6 ความสัมพันธ์ของอนุมูลอิสระ/total phenolic/ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

2.1 การจัดจำแนกหมวดหมู่พืช (Plant Classification) และการระบุชนิดพืช (Plant Identification)

การจัดจำแนกหมวดหมู่พืช เป็นการจัดพืชให้เป็นกลุ่มหรือหมวดหมู่โดยอาศัยลักษณะความคล้ายคลึง (similarities) และความแตกต่าง (differences) ของลักษณะต่าง ๆ ที่ศึกษากลุ่มพืชที่ถูกจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานนี้เรียกหน่วยอนุกรมวิธาน (taxon) ซึ่งมีการจัดระดับเป็นหมวดหมู่ที่มีขนาดใหญ่เล็กลดหลั่นกันไปตามลำดับ กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae การจำแนกพืชวงศ์ Asteraceae ใน Flora of China มีดังนี้ (Zhu et al., 2011)

Kingdom; Plantae

Subkingdom; Tracheobionta

Super division; Spermatophyta

Division; Magnoliophyta

Class; Magnoliopsida

Subclass; Asteridae

Order; Asterales

Family; Asteraceae / Compositae

Tribe; Heliantheae

Genus; *Eclipta*

Species; *Eclipta prostrata* (L.) L.

Genus; *Sphagneticola*

Species; *Sphagneticola calenduraceae* Pruski

Sphagneticola trilobata (L.) Pruski

การระบุชนิดพืช สามารถใช้เครื่องมือรูปวิธาน ซึ่งเป็นการจัดเรียงหรือการวิเคราะห์ชนิดพืชในรูปของทางเลือกลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ปรากฏของพืชที่มีความหมายตรงข้ามกัน 2 ทาง (dichotomous) ลักษณะใดลักษณะหนึ่งจะได้รับเลือกไว้ กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae รูปวิธานที่ระบุชนิดของพืชทั้ง 3 ใน Flora of China แสดงดังนี้ (Zhu *et al.*, 2011)

1a. Achenes enclosed by inner phyllaries or outer paleae.

1b. Achenes not enclosed by inner phyllaries.

2a. Paleae narrow, long, flat; ray florets 2-seriate, lamina small; pappus absent or of 2 short awns.

3a. Ray floret lamina white; achene body tuberculate ..... Eclipta

4a. Ray florets bisexual, mostly fertile, lamina minutely 2-lobed, white to yellowish, disk florets bisexual, corolla tubular, greenish white to yellowish, 4-or rarely 5 lobed; anthers entire or very shortly bifid at base; style branches obtuse, mammillate at apex..... *Eclipta prostrata*

3b. Ray floret lamina yellow; achene body striate .....Guizotia

2b. Paleae concave or folded, ± enclosing florets.

3a. Ray florets sterile.

3b. Ray florets fertile.

4a. Pappus elements 2–5, unequal, spinelike or squamalike, persistent, base connate; ray florets female, ray floret, lamina short or very short, apex 2–4-dentate; capitula small ..... Blainvillea

4b. Pappus absent, or scalelike, cyathiform, coroniform, or of 1 or 2 setae; capitula relatively large.

5a. Corollas orange to yellow; outer phyllaries herbaceous and larger than inner; leaves sessile or very shortly petiolate; plants mainly prostrate; achenes triangular (ray) or compressed (disk); capitula always solitary, terminal (but appearing axillary) on erect peduncles; achene beak and pappus obscured at maturity by corky collar ..... Sphagneticola

6a. Leaves usually 3-lobed.....*Sphagneticola trilobata*

6b. Leaves sparsely serrulate.....*Sphagneticola calendulacea*

2.2 ข้อมูลสมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย

ตาราง *1* ข้อมูลสมุนไพร กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย (พรทิพย์ และคณะ, 2555),(ราชบัณฑิตยสถาน, 2557) ,(วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540)

ข้อมูลพืช	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Eclipta prostrata* (L.) L.	*Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski	*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski
ชื่อพ้อง	- *E. alba (L.) Hassk* - *E. angustifolia C.Presl.* - *E. electa L.* - *E. marginata Steud.* - *E. punctate L.* - *E. zippeliana Blume* - *Acmella lanceolate Link ex Spreng* - *Amellus carolinianus Walter* - *Anthemis abyssinica var. abyssinica*	- *Complaya chinensis* (Osbeck) Strother - *Jaegeria calendulacea* (L.) Spreng. - *Seruneum calendulaceum* (L.) Spreng - *Solidago chinensis* Osbeck - *Thelechitonia chinensis* (Osbeck) H. Rob. & Cuatrec.	- *Wedelia trilobata* L. - *Silphium trilobatum* L. - *Wedelia carnosa* Pers. - *Silphium trilobatum* L. - *Thelechitonia trilobata* (L.) - *Wedelia trilobata* (L.) Hitchcock.

ข้อมูลพืช	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
	- *A. cotula Blanco* *Bellis ramose* Steud. - *Chamaemelum foetidum* Baumg. - *Cotula alba* (L.) L - *C. protrara* (L.) L. - *Eleutheranthera protrata* (L.) Sch. Bip. - *Grangea lanceolate* Poir. - *Paleista brachypoda* (Michx.) Raf. - *Verbesina alba* L. - *V. prostrata* L. - *Wedelia psammophila* Poepp.	- *Verbesina calendulacea* L. - *Wedelia calendulacea* (L.) Less. - *W. chinensis* (Osbeck) Merr.	
วงศ์	Compositae (Asteraceae)	Compositae (Asteraceae)	Compositae (Asteraceae)
ชื่ออื่นๆ	กะเม็งตัวเมีย,คัดเม็ง(กลาง), หญ้าสับ,ฮ่อมเกี่ยว(เหนือ)	ฮ่อมเกี่ยวคำ (ภาคเหนือ), อึ้งปั้วกีเซา (จีน)	เบญจมาศเลื้อย
ชื่อสามัญ	False daisy, White head		-Climbing wedelia -Singapore daisy
ลำต้น	-ไม้ล้มลุก -ลำต้นแตกกิ่ง ทอดไปตามพื้นหรือตั้งสูง 10-60 ซม. -มีขน	-ไม้ล้มลุก -ทอดเลื้อยไปตามพื้นดิน ชูยอดตั้งขึ้น -ลำต้นมีขน มีรากตามข้อ	-ไม้ล้มลุก -ลำต้นแตกแขนงทอดราบไปตามพื้นดิน -มีขนประปราย ปลายกิ่งมักชูตั้งขึ้น สูงถึง 50 ซม.

ข้อมูลพืช	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
ใบ	-ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม -รูปหอกหรือรูปรี กว้าง 0.6-2.5 ซม. ยาว 3-10 ซม. -โคนเรียวแหลม ขอบเรียบหรือจักห่างๆ 2-3 จักช่วงปลายใบ แผ่นใบทั้ง 2 ข้างมีขนสั้นสาก -ไม่มีก้านใบ หรือก้านสั้น	-ใบเดี่ยว เรียงตรงข้า -รูปใบหอก รูปขอบขนานแกมรูปใบหอก หรือรูปไข่กลับแคบ กว้าง 0.5 - 2.5 ซม. ยาว 1-7.5 ซม. -ปลายแหลมหรือมีติ่งแหลม โคนเรียวแหลม ขอบเรียบหรือจักซี่ฟัน มีขนราบทั้ง 2 ด้าน -ก้านใบสั้นมาก	-ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม -รูปรี กว้างประมาณ 2.5 ซม. ยาวประมาณ 5.5 ซม. -ปลายแหลม โคนสอบ ขอบจักเล็กน้อย มีจักเป็นรูปสามเหลี่ยมกลางแผ่นใบทั้ง 2 ข้าง เส้นโคนใบข้างละ 3 เส้น เหนือขึ้นไปมีเส้นแขนงใบข้างละ 4 เส้น -ก้านใบสั้นหรือไม่มี
ดอก	ดอกสมบูรณ์เพศ	ยาวประมา 6 - 8 มม. ดอกวงใน โคนกลีบติดกันเป็นหลอด ปลายแยกเป็น 5 แฉก ยาวประมาณ 4 มม.	จำนวนมากกว่า โคนกลีบดอกติดกันเป็นหลอด ปลายแยกเป็น 5 แฉก ที่ขอบแฉกมีขนรอบดอกวงใน มีใประดับบางใส่รูปเรือปลายแหลมแทรกอยู่
ผล	- <u>ผลแบบแห้ง</u> เมล็ดล่อน <u>ผลของดอกวงนอก</u> รูปสามเหลี่ยมสันมน <u>ผลของดอกวงใน</u> รูปสี่เหลี่ยมสันมน ยาว 2 - 8 มม. <u>ผลแก่</u> แห้งสีดำ ไม่แตก	- <u>ผลแบบแห้ง</u> เมล็ดล่อน กว้างประมาณ 3 มม. ยาว 4 - 5 มม. สีน้ำตาลเข้ม เรียบหรือขรุขระ <u>ผลของดอกวงนอก</u> เป็นรูปสามเหลี่ยมสันมน <u>ผลของดอกวงใน</u> แบน <u>ผลแก่</u> แห้งไม่แตก	- <u>ผลแบบผลแห้ง</u> เมล็ดล่อน <u>ผลของดอกวงนอก</u> ยาวประมาณ 5 มม. รูปไข่กลับ ปลายผลมีเยื่อสีขาว รูปถ้วยโคนที่ติดกันกับฐานเรียวแหลมเป็นรูปสามเหลี่ยม มีเนื้อนุ่มสีขาวหุ้มและขรุขระเมล็ดเล็ก สีดำ เป็นมัน รูปสามเหลี่ยมปลายแหลม ยาวประมาณ 4 ซม.

ข้อมูลพืช	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
การกระจายพันธุ์	พบขึ้นทั่วไปในประเทศเขตร้อนและเขตศูนย์สูตรโดยมีการกระจายอย่างกว้างขวางทั่วไป	พรรณไม้ต่างประเทศที่นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยทางภาคเหนือและภาคกลาง	ไม้พื้นเมืองของอเมริกาเขตร้อน
สรรพคุณ	ใบและราก เป็นยาถ่าย ทำให้อาเจียน ราก แก้เป็นลมหน้ามืดจากการคลอดบุตร แก้ท้องเฟ้อ บำรุงตับ ม้าม และบำรุงโลหิต ทั้งต้น แก้มะเร็ง (อาการแผลเรื้อรังเน่าลุกลาม รักษายาก) แก้หืด แก้หลอดลมอักเสบ แก้จุกเสียด แก้กลาก เกลื้อน เป็นยาฝาดสมาน น้ำคั้นจากต้น รักษาอาการดีซ่าน (นันทวัน, 2539)	ใบ แก้ปวดฟัน เหงือกอักเสบ แผลในปาก ลำต้น แก้อาเจียนเป็นเลือด (อุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ, 2010)	ใช้ในตำรับแก้มุตตังพิการและโลหิต (กรมพัฒนาแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 2553)

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ แสดงดังภาพที่ 2-4

Figure 701. 1–6. **Eclipta prostrata** (Linnaeus) Linnaeus, 鱧肠 li chang. —1. Habit. —2. Ray floret. —3. Disk floret. —4. Disk floret with corolla spread out. —5. Style and style branches. —6. Achene. (FOC 869. —Anonymous; reproduced from 李惠林 Li Hui-Lin in 李惠林 Li Hui-Lin (ed.), Fl. Taiwan 4: 849, pl. 1222. 1978).

ภาพประกอบ 2 กะตังเม็งเมีย *(Eclipta prostrata)*

(Shu et al., 2011)

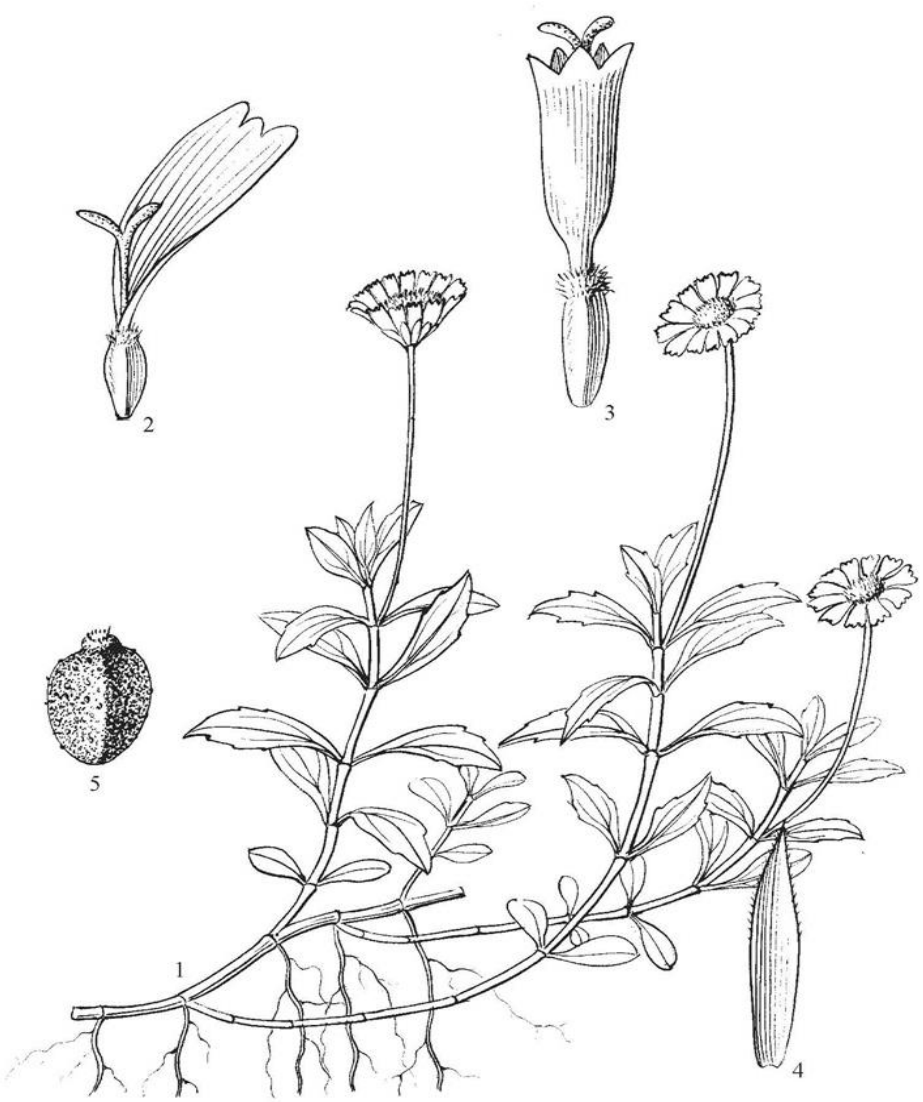
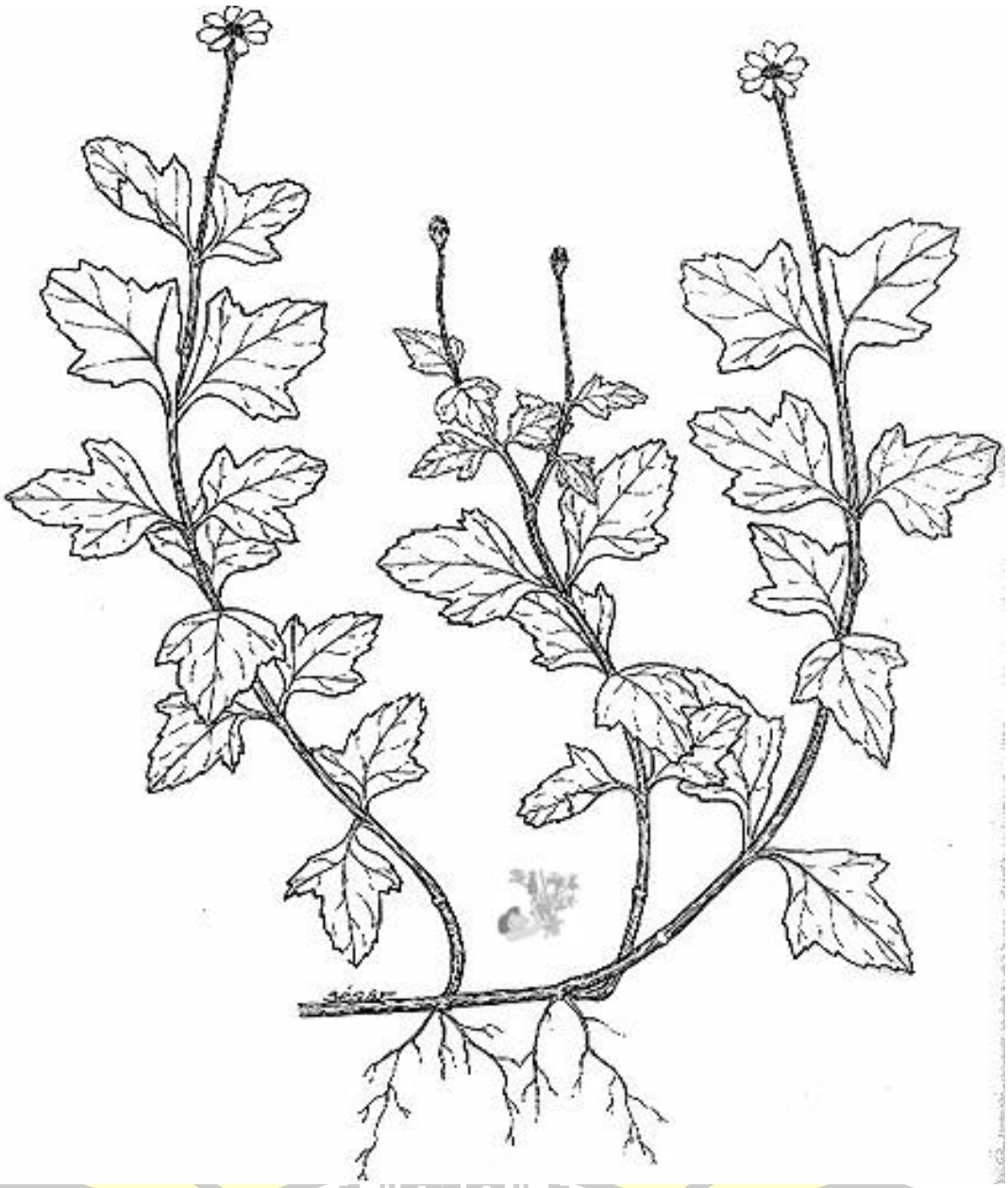


Figure 702. 1–5. **Sphagneticola calendulacea** (Linnaeus) Pruski [*Wedelia chinensis* (Osbeck) Merrill], 蟛蜞菊 peng qi ju. —1. Flowering branch. —2. Ray floret. —3. Bisexual floret. —4. Palea. —5. Achene. (FOC 871; FRPS 75: 354, pl. 60: 7–11. 1979. —余汉平 Yu Hanping).

ภาพประกอบ 3 กะเม็งตัวผู้ *(Sphagneticola calendulacea)*

(Shu et al., 2011)



ภาพประกอบ 4 กระดุมทองเลื้อย *(Sphagneticola trilobata)*

(Peng et al., 1998)

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

2.3 พฤกษเคมี (Phytochemistry)

พฤกษเคมี (Phytochemistry) คือ สารประกอบต่างๆที่พบได้ในพืช คำว่า “phyton" ในภาษากรีกโบราณ แปลว่าพืช (Kokate et al., 2006) ซึ่งใช้ในการอธิบายความหลากหลายทางชีวภาพของสารสำคัญที่พบในพืช โดยมากเป็นสารทุติยภูมิที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อจุดประสงค์บางอย่าง เช่น ป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคและแมลง ให้สีสันกับพืช (Kushad et al., 2003) ตัวอย่างของสารพฤกษเคมี เช่น แทนนิน สารประกอบพอลิฟีนอลิก แอนทราควิโนน ซาโปนิน อัลคาลอยด์ คูมาริน เป็นต้น สารพฤกษเคมีในพืชมีหลายชนิดแต่ละชนิดมีฤทธิ์ที่ต่างกันไป โดยข้อมูลพฤกษเคมีของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อยดังแสดงในตาราง 2

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

ตาราง *2* พฤกษเคมีของกะเม็งตัวเมีย, กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย

(Qi et al.,2012); (Zafar et al.,1999);(Rehana et al., 2013); (Balekar et al., 2014)

กลุ่มสาร	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
Sterol	- stigmasterol - stigmasterol-3-*O*-glucoside - daucosterol	- stigmasterol	- stigmasterol - (3β)-3-hydroxy stigmasta-5, 22-dien-7-one - (7α)-hydroxy-stigmasterol - sitosterol - daucosterol
Coumestan	- wedelolactone - demethylwedelolactone - demethylwedelolactone-7-glucoside	- wedelolactone - demethylwedelolactone	- wedelolactone
Flavonoids	- apigenin - luteolin - apigenin-7-O-glueoside - buddleosid - diosmetin, 7-O-methylorobol-4′-O-β-D-glucopyranoside	- apigenin - luteolin	- apigenin - luteolin - diosmetin - 3-hydroxy-6- methoxychromen-4-one

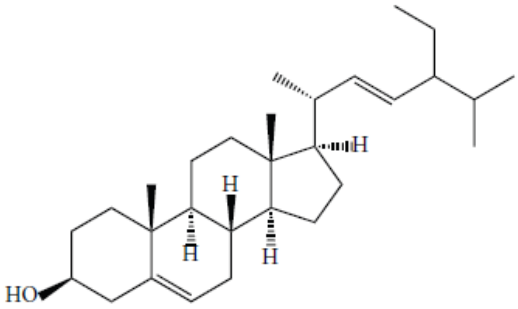
กลุ่มสาร	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
	- luteolin-7-o-glucoside - pratensein - pratensein-7-O-β-D-glucopyranoside - 3′-O-methylorobol - orobol - oroboside - orobol-5-O-β-D- glucopyranoside - 3′-O-methyl orobol-7-O-β-D-glucopyranoside - quercetin		
Terpenoids	- β-amyrin - β-amyrone - eclalbasaponins I–X - ecliptasaponins A - D - echinocystic acid - eclalbatin - silphioside B - silphioside E	- caryophyllene - germacrene - α-humulene - limonene - α-phellandrene - α-pinene - wedeliaseco-kaurenolide	- caryophyllene - germacrene - α-humulene - limonene - α-phellandrene - α-pinene - wedeliaseco-kaurenolide

กลุ่มสาร	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
	- ursolic acid	- (3α)-3-(cinnamoyloxy)-entkaur-16-en-19 oic acid - 3α-senecioyloxy-kaur-16-en-19-oic acid - 3α-triglinoyloxy - bisdesmodicosidic oleanolic acid - kauren diterpenes-(-) kaur-16-en-19-oic acid - eudesmanoids - squalene - p-cymene - stigmasteryl glucoside	- (3α)-3-(cinnamoyloxy)-entkaur-16-en-19 oic acid - (3α)- (cinnamoyloxy)-9β hydroxy-ent-kaur-16-en-19 oic acid - 15α-(cinnamoyloxy)- ent-kaur-16-en-19 oic acid - 3α- (senecioyloxy)-ent-kaur-16-en-19 oic acid - (3α)-3-(angeloyloxy)-ent-kaur-16-en-19 oic acid - 3α-(angeloyloxy) 9β-hydroxy-ent-kaur-16-en-19 oic acid - (3α)-3-(tiglinoyloxy)-ent-kaur-16-en-19 oic acid - ent-kaura-9(11), 16-dien-19 oic acid methyl ester - methyl-3α-(angeloyloxy) 9β-

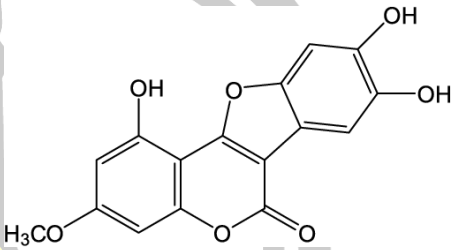
กลุ่มสาร	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
			hydroxy-entkaurenoate - 1β, 4α-dihydroxy-6β-isobutyryloxy-9α- (tigloyloxy) prostatolide - 9α-(angeloyloxy)-1β,4α-dihydroxy-6β- isobutyryloxy prostatolide -1β, 9α-diacetoxy-4α-hydroxy-6β-isobutyryloxy prostatolide -1β, 9α-diacetoxy-4α-hydroxy-6β-methacryloxy prostatolide - friedelin - friedelinol - grandiflorenic acid - ivalin - kaurenoic acid - oxidoisotrilobolide 6-O-isobutyrate - oxidoisotrilobolide 6-O-methacrylate - trilobolide 6-O-isobutyrate - trilobolide 6-O-methacrylate

กลุ่มสาร	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
			- wedeliatrilolactone B - wedelidin A - wedelidin B - wedelolide A - wedelolide B
Alkaloids	- ecliptalbine - [(20*R*)-4β-hydroxyverazine] - [4β-hydroxyverazine] - [(20*R*)-25β-hydroxyverazine] - [25β-hydroxyverazine] - verazine		
Aldehyde	- ecliptal		

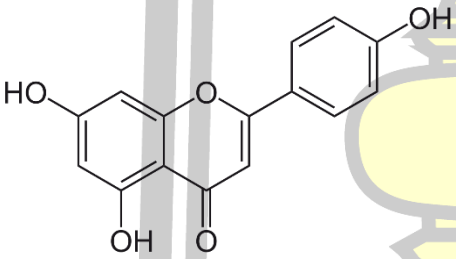
จากตาราง 2 พฤกษเคมีของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย มีสารพฤกษเคมีที่เหมือนกัน ได้แก่ สารกลุ่มสเตอรอล ได้แก่ stigmasterol สารกลุ่มคูเมสแตน ได้แก่ wedelolactone และสารสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ apigenin และ luteolin



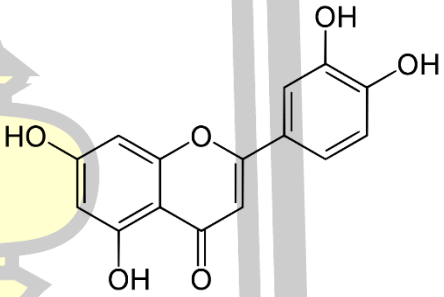
Stigmasterol



Wedelolactone



Apigenin



Luteolin

ภาพประกอบ 5 สารที่พบในสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacology)

ตาราง 3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
Antimicrobial and Antifungal	- Disc diffusion method - สารสกัด ethanol - สารสกัดความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/disc - ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *S. paratyphi, S. sonnei, P. species* (I and II), *S. typhi* และ *E. coli* ค่า inhibition zone เท่ากับ 18, 17, 15, 14 และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis, B. cereus, B. megaterim* และ *S. aureus* ค่า inhibition zone เท่ากับ 18, 17, 16 และ 16 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Uddin et al., 2010)	- Disc diffusion method - สารสกัด methanol ด้วยวิธี soxhlet apparatus - สารสกัดความเข้มข้น 150, 250, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร -ยับยั้งเชื้อรา *C. albicans, C. tropicalis, A. fumigatus , A. flavus และ A. niger* (Manjamalai et al., 2011)	- Agar dilution method - สารสกัด ethanol แยกด้วย bioassay-guided fractionation - Ethanol fraction แยกได้สารบริสุทธิ์ ent-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid - Ethanol fraction ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ค่า MIC เท่ากับ 15.62 และ 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Balekar et al., 2012)
	- Macro-dilution method - สารสกัดน้ำ	- Disc diffusion method - สารสกัด ethanol และ hexane	- Disc diffusion method

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
	- ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *S. paratyphi, S. sonnei, P. species* (I and II), *S. typhi, E. coli* และแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis, B. cereus, B megaterim* และ *S. aureus* ค่า MIC 2,500 ถึง 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Uddin et al., 2010)	- สารสกัด ethanol ให้ผลดีกว่า hexane ทั้งในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และเชื้อรา โดยยับยั้งเชื้อ *M. luteus*, *E. coli* และ *C. albicans* ได้มากที่สุด (Merina et al., 2013)	- สารสกัด methanol ส่วนของลำต้น ราก ใบ ดอก - ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ค่า inhibition zone เท่ากับ 8.66±0.43, 9.19±0.34, 8.99±0.46 และ 23.79±0.27 มิลลิเมตร ตามลำดับ - ใบ ดอก ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ค่า inhibition zone เท่ากับ 12.93±0.28 และ23.60±0.92 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Kumudini et al., 2013)
	- Well diffusion method - สารสกัด methanol, petroleum ether, น้ำ, dichloromethane, ethyl acetate และ butanol - สารสกัด butanol และ ethyl acetate ยับยั้งเชื้อ *B. cereus, B. subtilis, E. carotovora, E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, S.*	- Broth dilution method - สารสกัด methanol - ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ค่า MIC เท่ากับ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร -ยับยั้งเชื้อ *P. rettgeri* ค่า MIC เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Darah et al., 2013)	

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
	typhi และ *S. aureus* (Bakht et al., 2011)		
	- Agar dilution method - สารสกัด chloroform และ ethyl acetate - ยับยั้งเชื้อ *M. catarrhalis, C. diphtheriae* NCTC 10356 และ *S. pyogenes* ค่า MIC เท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งเชื้อ *S. cerevisiae* ATCC 2601 ค่า MIC เท่ากับ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Rungrot et al., 2015)	- Disc diffusion method - สารสกัด petroleum ether, chloroform, ethyl Acetate และ methanol - ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ค่า inhibition zone เท่ากับ 24.26±0.15 , 8.37±0.15 , 11.4±0.23 , 16.4±0.23 และ 22.47±4.20 มิลลิเมตร ตามลำดับ - ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ค่า inhibition zone เท่ากับ 22.33±1.45, 8.67±0.00, 13.33±0.33, 15.33±0.88 และ 23.67±0.88 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Rehana et al., 2012)	- Broth dilution method - สารสกัด ethanol - ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (ATCC 25923), *S. aureus* (MRSA 8536), *S. aureus* (MRSA 9606) ค่า MIC เท่ากับ 3, 125, และ 6,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Ana et al., 2019)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
	- Well diffusion - สารสกัด ethyl acetate - ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 24, 30 และ 36 ไมโครลิตร/หลุม ยับยั้งได้ 39, 45 และ 47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ - ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 24, 30 และ 36 ไมโครลิตร/หลุม ยับยั้งได้ 51, 53 และ 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Jahan et al., 2014)	- Disc diffusion method - สารสกัด petroleum ether, chloroform, ethyl acetate และ ethanol - ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ค่า inhibition zone เท่ากับ 10±0.9, 11±0.50, 13±1.1 และ 21±0.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ - ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ค่า inhibition zone เท่ากับ 9.1±20, 11.2±0.00, 17.2±0.35 และ 20.5±0.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Nithin et al., 2018)	
	- Disc diffusion method, broth dilution method - สารสกัด hexane, acetone, ethanol, methanol และน้ำ - สารสกัด hexane มีฤทธิ์ดีที่สุดต่อเชื้อ *S.aureus, S. pyogenes, B.cereus,*	- Disc diffusion method - สารสกัด petroleum ether, chloroform และ methanol -ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/disc -ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ค่า inhibition zone เท่ากับ 14, 11, และ 11 มิลลิเมตร	

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
	E.coli, S. typhi, K.Pneumoniae, P. aeruginosa, P. mirabilis ค่า MIC ระหว่าง 90 - 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pandy et al., 2011)	ตามลำดับ - ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ค่า inhibition zone เท่ากับ 12,10, และ 11 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Mottakin et al., 2004)	
	- Disc diffusion method, broth dilution method - สารสกัด hexane, ethyl acetate และ ethanol - สารสกัด ethanol มีฤทธิ์ดีที่สุดต่อเชื้อ *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. dysenteria*, *S. typhi, P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus* ค่า inhibition zone ระหว่าง 4.8 – 20.8 มิลลิเมตร ค่า MIC ระหว่าง 25 - 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Karthikumar et al., 2007)		

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
	- Disc diffusion method - สารสกัด ethanol - ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa, S. aureus* ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/disc ค่า inhibition zone เท่ากับ 15 และ 16 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Nazim et al., 2010)		
Anti-inflammation	-Carrageenan induced rat paw edema method - สารสกัด methanol - สารสกัดความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบร้อยละ 34.02 และ 38.80 ตามลำดับ - ยา indomethacin 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบร้อยละ 48.47	- Cotton pellets induced granuloma method - สารสกัด ethanol - สารสกัด 150, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบร้อยละ 34.57, 43.30 และ 55.23 ตามลำดับ - ยา Indomethacin 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบร้อยละ 56.69 (Sureshkumar et al., 2005)	- Albumin denaturation inhibition method - สารสกัด ethanol ส่วนใบ ลำต้น และดอก - ค่าการยับยั้ง albumin denaturation ร้อยละ 87.14, 86.76 และ 61.63 ตามลำดับ (Govindappa et al., 2011)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
	- ยา cyproheptadine 8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบร้อยละ 56.09 (Arunachalam et al., 2009)		
	- Nitric oxide inhibition method - สาร orobol compounds - ฤทธิ์ต้านการหลั่ง NO ในเซลล์ RAW 264.7 IC_{50} 4.6 ไมโครโมล -ฤทธิ์ต้านการหลั่ง PGE2 IC_{50} 49.6 ไมโครโมล -ฤทธิ์ต้าน tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) IC_{50} > 100 ไมโครโมล (Tewtrakul et al., 2011)	- Carrageenan induced paw edema method - สารสกัด methanol - สารสกัดความเข้มข้น 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์ลดการบวมลง 0.39, 0.36 มิลลิเมตร ตามลำดับ - ยา diclofenac 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์ลดการบวมลง 0.38 มิลลิเมตร (Manjamalai et al., 2011)	
Antioxidant	- DPPH method, superoxide radicals และ chelating ferrous ion - สารสกัดน้ำ - ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ IC_{50} 0.23, 0.48	- DPPH method - สารสกัดน้ำ - สารสกัดความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
	และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (Chin et al., 2014)	ร้อยละ 48.96 และ 65.91 ตามลำดับ (Manjamalai et al., 2012)	
	- Ferric thiocyanate method - สารสกัด ethyl acetate, hexane, ethanol และน้ำ - สารสกัด ethanol ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 77.62 (Karthikumar et al., 2007)		
Anti-virus	- สารสกัดแบบ fractionation - ยับยั้ง HCV replicase IC_{50} 11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร -สาร wedelolactone, luteolin และ apigenin ยับยั้ง HCV replicase IC_{50} 7.7, 11.3 และ 175.5 ไมโครโมล ตามลำดับ (Manvar et al., 2012)		

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
Hypolipidemic activity	- Atherogenic diet induced hyperlipidemic rats - สารสกัดน้ำ - สารสกัดความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม - หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดร่วมกับ atherogenic diet มีระดับ total cholesterol, triglyceride และโปรตีนในซีรั่มลดลง และมีระดับ high-density lipoprotein (HDL) ในซีรั่มเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ atherogenic diet เพียงอย่างเดียว (Dhandapani et al., 2007)		

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
	- High fat diet-induced obesity ใน albino rats - หนูทดลองได้รับสารสกัดขนาด 75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีระดับ total cholesterol, triglyceride ลดลง ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น น้ำตาลในเลือดลดลงและชะลอการเกิดเบาหวาน - ให้ silymarin ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมร่วมกับสารสกัดให้ผลลดน้ำตาลในเลือดมากกว่าการใช้สารสกัดเดี่ยว และดีกว่า metformin ขนาด 20, 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Ghada et al., 2005)		

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
Analgesics	-Tail clip method, tail flick method, acetic acid induced writhing methods - สารสกัด ethanol -สารสกัด 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และสาร total alkaloids ขนาด 150 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์ลดอาการปวด โดยทำให้ค่า mean latent period of biting เพิ่มขึ้น ซึ่งฤทธิ์ลดอาการปวด ของสารสกัดทั้งสองชนิดสูงกว่ายา codeine ขนาด 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม -สารสกัดทั้งสองชนิด มีผลลดจำนวนครั้งในการเกิด writhing ในเวลา 20 นาทีได้ โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับ total alkaloids มีจำนวนครั้งในการเกิด writhing ต่ำที่สุด (Sawant et al., 2004)	- Hot plate and acetic acid induced writhing methods - สารสกัด ethanol -สารสกัด 150, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้ระดับอาการปวดลดลงร้อยละ 19.23, 37.36 และ 51.92 ตามลำดับ -เทียบกับยา aspirin 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้ระดับอาการปวดลดลงร้อยละ 68.68 (Sureshkumar et al., 2005)	- สาร kaurenoic acid [ent-kaur-16-en-19-oic acid - ยับยั้งการปวดในหลาย model ได้แก่ writhing response induced by acetic acid and phenyl-*p*-benzoquinone, paw flinch and time spent licking the paw induced by formalin and complete freund's adjuvant, carrageenin- and CFA-induced mechanical hyperalgesia, TNF-α and IL-1β production induced by carrageenan, PGE_2-induced mechanical hyperalgesia (Mizokami et al., 2012)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
Antiulcer activity	-Cold restraint stress (CRS), pylorus ligation (PL) induced ulcers model - สารสกัด 50% ethanol - สารสกัด 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม - ยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารจากการเหนี่ยวนำด้วย cold resistant stress (CRS) และเชื้อ pylorus ผ่านการต้านการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ catalase นอกจากนี้ยังลดการหลั่งของเหลวในกระเพาะอาหาร ลดการหลั่งกรดและเพิ่ม pH ของกระเพาะอาหาร (Kumar et al., 2012)		

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
Hepatoprotective effect	- Paracetamol induced liver toxicity in rats - สารสกัด ethanol - หนูทดลองได้รับยา paracetamol ร่วมกับสารสกัดใบขนาด 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วันละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 7 วัน มีระดับเอนไซม์ aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transferase (GGT), lactate dehydro- genase (LDH) และ bilirubin ในซีรั่มต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับยา paracetamol (Prabu et al., 2011)	- CCl_4 induced acute hepatotoxicity in rats - สารสกัด ethanol - หนูทดลองได้รับ CCl_4 ร่วมกับสารสกัดขนาด100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), protein และ bilirubin อยู่ในระดับปกติ (Murugaian et al., 2008)	

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
Wound healing	- Wound healing activity (excision wound model) - สารสกัด methanol ด้วย soxhlet apparatus - สารสกัดกะเม็งผสมสารสกัดบัวบกและ/หรือสารสกัดพริกไทยสามารถเพิ่ม wound healing ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (Patel et al., 2009)	- Excision, incision, dead space wound models - สารสกัด ethanol - สารสกัดสามารถเพิ่ม wound healing ได้โดยลดระยะเวลาการสร้างผิวหนังชั้น epithelial เพิ่มอัตราเร็วในการหดตัวของแผล (Verma et al., 2008)	- Hydrogen peroxide induced oxidative stress, scratch assay -สารสกัด hexane, ethyl acetate - เพิ่มการรอดของ fibroblast L929 มากกว่าร้อยละ 90 ก่อนและมากกว่าร้อยละ 85 หลังสภาวะ hydrogen peroxide induced oxidative stress - เหนี่ยวนำให้เกิด migration rate เพิ่มขึ้นร้อยละ 70 และมีส่วนประกอบของ collagen เพิ่มขึ้น 261 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับ control 57.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Balekar et al., 2012)

2.5 การใช้ในทางแพทย์พื้นบ้าน (Traditional use)

ตาราง 4 การใช้ในทางแพทย์พื้นบ้าน (Traditional use)

ฤทธิ์	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
Anti-inflammatory	- Treat swellings (India) (Jahan et al., 2014)	- สารสกัดจากใบ ใช้เป็นทางเลือกในฤทธิ์ต้านอักเสบเช่นเดียวกันกับ piroxicam, Ibuprofen, diclofenac (India) - Treating swelling of abdomen (China - ตำกับข้าวสุก ใช้พอกบริเวณ ที่บวม (Thailand, Taiwan) (พรทิพย์ และคณะ, 2555; Lin, et al., 2015)	- Treat sores, swellings (Belize) (Balekar et al ., 2012)
Wound healing	- Treat wound (India) (Jahan et al., 2014)	- Treat wound (India) (Nomani, et al., 2013)	- Stubborn wounds (Belize) - Sores , swellings (Belize) - Stingray wounds (Eastern Nicaragua) (Balekar et al ., 2012)

ฤทธิ์	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
Hepatic disorders	- Hepatic disorders (India) - Jaundice (India) (Prabu, et al., 2011)	- Hepatoprotective (India, Taiwan) - Jaundice (India) (Nomani, et al., 2013)	- Treat hepatitis (Hong Kong) (Balekar et al ., 2012)
Gastrointestinal disorders	- รักษาอาการอาหารไม่ย่อย (Bangladesh) - รักษาโรคทางเดินอาหาร (India) (Jahan et al., 2014) - ใบและรากใช้เป็นยาถ่าย และทำให้อาเจียน (Thailand) - รากใช้เป็นยาขับลม (Thailand) (กรมพัฒนาแพทย์แผนไทย, 2553)	- รักษาอาการท้องเสีย (India, China) - ยาชงดื่มบำบัดอาการกระเพาะกาง (distended stomach) (Indonesia) (Nomani, et al., 2013) - แก้กระเพาะ (Thailand) (พรทิพย์ และคณะ, 2555)	- รักษาอาการปวดท้อง (Caribbean, Central America) - รักษาอาการอาหารไม่ย่อย (Hong Kong) - ยาถ่าย (Eastern Nicaragua) (Balekar et al ., 2012)
Hematology	- ต้น ใช้เป็นยาบำรุงเลือด (Thailand) - ใบใช้โขลกพอกแผลสด ห้ามเลือด (India) (Jahan et al., 2014)	- แก้อาเจียนเป็นโลหิต บำรุงโลหิต บำรุงร่างกาย (Thailand) (พรทิพย์ และคณะ, 2555)	- บัญชียาแผนไทย สำหรับโรงพยาบาลและหน่วยบริการสาธารณสุข ปี 2553 ใช้แก้โลหิตตังพิการ (Thailand) (กรมพัฒนาแพทย์แผนไทย, 2553)

ฤทธิ์	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
Reproductive system	- Ensure fetal development and facilitate childbirth. (Africa) - Urinary problem (India) - Menorrhagia (India) (Jahan et al., 2014) - ตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ พบในตำรับแก้ต้านทรวงทาท้องเด็ก, ตำรับอิทจรสุรามฤตย์ แก้โลหิตในหญิงหลังคลอด และพระตำราหลวง ใช้ใบกะเม็งผสมเกลือและน้ำผึ้ง ใส่ในทวารเบา ขับโลหิตร้ายในหญิงหลังคลอดที่อยู่ไฟไม่ได้ (Thailand) (มูลนิธิพื้นฟูส่งเสริมการแพทย์ไทยเดิม, 2452)	- Uterine hemorrhage (India) - Menorrhagia (India) - Amenorrhea (India) (Nomani, et al., 2013)	- Dysmenorrheal (Central America, Trinidad and Tobago) - Amenorrhea (Caribbean and Central America, Eastern Nicaragua, Trinidad and Tobago) - Fertility enhancer (Garifuna of eastern Nicaragua) (Balekar et al., 2012) - บัญชียาแผนไทยสำหรับ โรงพยาบาลและหน่วย บริการสาธารณสุข ปี 2553 ใช้แก้มุตตังพิการ (Thailand) (กรมพัฒนาแพทย์แผนไทย, 2553)

ฤทธิ์	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
Fever , cold and respiratory disorders	- รักษาหอบหืด (India) - รักษาอาการไอ (India) - รักษาอาการแพ้ (India , Pakistan) (Jahan et al., 2014)	- รักษา rheumatic fever (India) - รักษาอาการหวัด (India) - ทั้งต้น ทำเป็นผงหรือชง กินแก้ไอ (Thailand) (พรทิพย์ และคณะ, 2555) - ผล, ใบ และลำต้นใช้ในเด็กแรกเกิดเพื่อรักษาไข้และการติดเชื้อ (India) - ใบใช้รักษาอาการไอ (India) (Nomani, et al., 2013)	- รักษาหลอดลมอักเสบ (Caribbean and Central America) - รักษาอาการหวัด (Caribbean , Central America, Eastern Nicaragua, Hong Kong) - ลดไข้ รักษามาลาเรีย (Vietnam) (Balekar et al ., 2012)
รักษาพิษต่างๆ	- แก้พิษงู. พิษแมลงป่อง. (India) (Jahan et al., 2014)	- แก้แมลงสัตว์กัดต่อย (India) - ชาวเขาใช้แก้พิษของน้ำที่ไม่สะอาด (Indonesia) (Nomani, et al., 2013)	- แก้พิษงู. (Eastern Nicaragua) (Balekar et al ., 2012)
Pain management		- Cephalonia (ปวดศีรษะ) (India) (Nomani, et al., 2013)	- แก้ปวดหลัง ตะคริว (Belize) (Balekar et al ., 2012)

ฤทธิ์	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
Bone , Joints disorders		- Osteochonditis dissecans (India) - Juvenile arthritis (India) - Gouty arthritis (India) (Nomani, et al., 2013)	- Arthritic painful joints (Belize) - Rheumatism (Belize) (Balekar et al ., 2012)
Kidney disorders		- Kidney dysfunction (India) (Nomani, et al., 2013)	- Kidney dysfunction (Eastern Nicaragua) (Balekar et al ., 2012)
Skin disorders	- Skin diseases. (India) - น้ำคั้นจากลำต้น ทาแก้โรคกลาก (Indonesia) (Jahan et al., 2014)	- Treat skin disease (India) - แก้ปวดผิวหนัง (Thailand) - แก้โรคผิวหนังชนิดต่างๆ (Indonesia) (Nomani, et al., 2013)	
Promoting the growth of hair	- Rejuvenating hair (India) - Blacken gray hair น้ำคั้น จากต้นสด ย้อมผมให้ดำ (India) - Hair to promote growth (India) (Jahan et al., 2014)	- Alopecia (India) - Dyeing gray hair (India) - Promoting the growth of hair (India) - แก้ผมร่วง (Thailand) - แก้ศีรษะล้าน (Indonesia) (Nomani, et al., 2013)	

ฤทธิ์	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
CNS disorders		- Reduce mental tension (India) - Induce sleep (India) (Nomani, et al., 2013)	
อื่นๆ	- Athlete's foot and ringworm. (Pakistan) - Diabetes(ผสมกับพืชอื่น) (Bangladesh) (Jahan et al., 2014)	- Diphtheria (India, China) - Pertussive (China) - Cholagouge (India) - Multiple sclerosis (India) (Nomani, et al., 2013)	

ฤทธิ์	กะเม็งตัวเมีย	กะเม็งตัวผู้	กระดุมทองเลื้อย
ประเทศที่มีการใช้	- Thailand - India - Indonesia - Pakistan - Bangladesh - Africa	- Thailand - India - Indonesia - Taiwan - China	- Thailand - Indonesia - Caribbean, Central America - Garifuna of eastern Nicaragua - Belize - Hong Kong - Trinidad, Tobago - Vietnam

2.6 ความสัมพันธ์ของอนุมูลอิสระ/total phenolic/ฤทธิ์ต้านอักเสบ

อนุมูลอิสระ หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลใดๆ อยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล มีความว่องไวในการเขาทำปฏิกิริยา โดยรับอิเล็คตรอนจากสารอื่นๆ ส่งผลใหตนเองเสถียรขึ้น ในขณะเดียวกันก็ชักนำใหสารที่ใหอิเล็คตรอนไปนั้นมีอิเล็คตรอนไมครบ ทำให้อะตอมหรือโมเลกุลนั้นไม่อยู่ในสภาวะที่เสถียร จำเป็นต้องดึงอิเล็กตรอนมาจากโมเลกุลอื่นหรือถ่ายเทอิเลกตรอนที่ขาดคู่ออกไปเพื่อทำให้ตัวเองเสถียร แต่จะไปทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลอื่นขาดคู่หรือมีอิเล็กตรอนเกินมาเช่นเดียวกัน การเกิดอนุมูลอิสระจึงเกิดต่อเนื่องไปเรื่อยๆเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Halliwell, 2009)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) คือ สารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009) สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (chelate) กับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ (Sies et al., 1992) สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Chattopadhyay et al., 2008) โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) และแคโรทีนอยด์ (Velioglu et al., 1998) สารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญ คือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆในมนุษย์

สารประกอบฟีนอลิกหลายตัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน และสารต้านการกลายพันธุ์ มีผลดีต่อสุขภาพสามารถป้องกันโรคต่างๆโดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือดและมะเร็ง สารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ โดยใช้ตัวเองเป็นตัวรับอนุมูลอิสระทำหน้าที่ยับยังปฏิกิริยาลูกโซ่ที่มีอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุ แต่สารต้านอนุมูลอิสระก็ถูกำลายไปด้วย สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีหลายชนิดมีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบคือสารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (พินิจ, 2556)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกรวม สารจำพวกฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืช ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ได้แก่สารกลุ่ม flavonoids ที่มี catechol เป็นองค์ประกอบ stilbenes, tannins ซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วย aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxyl group โดยมากเป็นสารที่มีขั้วละลายในตัวทำละลายจำพวก alcohol ได้ดี กลไกของสารจำพวกฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือเมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงอิเล็กตรอนไปแต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (delocalization) ท้าให้โครงสร้างเสถียรไม่ เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป (Pietta et al.,2000)

การอักเสบเป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่เกิดกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อของร่างกายที่ได้รับบาดเจ็บ อาการที่ปรากฏของการอักเสบ คือ ปวด บวม แดง และร้อน (Mequanint et al., 2011) กระบวนการอักเสบประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด ทำให้เลือดมาเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นมีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังเนื้อเยื่อที่ถูกรุกรานเพิ่มมากขึ้น เพื่อกำจัดสิ่งเร้าที่ทำให้เกิดการอักเสบ (Kumar et al., 2007) ในขณะที่มีปฏิกิริยาการอักเสบเกิดขึ้นเซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวจะหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่างๆ เช่น nitric oxide และ prostaglandins E_2 และ cytokine เป็นต้น (Jung et al., 2009) เพื่อช่วยในการกำจัดสิ่งรุกราน การหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบในปริมาณที่มากเกินไปจะมีผลทำให้มีการทำลายเนื้อเยื่อ ปัจจุบันพบว่าการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบที่มากเกินไปหรือหลั่งเป็นระยะเวลาต่อเนื่องเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน ภาวะช็อคจากการติดเชื้อ โรคเบาหวาน และโรคอักเสบต่างๆ (Guzik et al., 2003) การยับยั้งการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ที่มากเกินไปนี้เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ ในปัจจุบันมีการศึกษาสมุนไพรจากธรรมชาติที่สามารถลดการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบเหล่านี้ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาผลิตยาต้านการอักเสบที่มีประสิทธิภาพสูง แต่มีผลข้างเคียงที่ต่ำ สมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารประกอบฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอักเสบ (Huang et al., 2006) และมีรายงานว่าพืชสมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอักเสบจากธรรมชาติ เช่น *Sanguisorba officinalis*, *Lophatherum gracite, Scutellaria baicalensis* และ *Crotoxylum formosum* เป็นต้น (Zhang et al., 2011)

Nitric oxide (NO) จัดเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นสารตัวกลางในกระบวนการอักเสบ NO สังเคราะห์ขึ้นจาก L-arginine และโมเลกุลของออกซิเจนโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) โดย NO ที่สร้างขึ้นจากกระบวนการดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของการอักเสบ เช่น การขยายตัวของหลอดเลือดเมื่อเกิดการบาดเจ็บ ภาวะหัวใจขาดเลือด เกิดการอักเสบแบบฉับพลันและเรื้อรัง (Zedler et al., 2006) โดย NO ที่เพิ่มมากกว่าปกติจะทำปฏิกริยากับ superoxide anion radical ($O^{\bullet-}_2$) เกิดเป็น peroxynitrite ($ONOO^-$) ที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลชีพได้และยังสามารถทำลายเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บทำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการยับยั้ง NO เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยประกอบด้วยการศึกษาสารสกัดกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย โดยศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมี ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ เพื่อเป็นการเปรียบเทียบคุณสมบัติดังกล่าวของพืชทั้ง 3 ชนิด

3.1 รูปแบบการวิจัย

เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental study)

3.2 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 Hot plate และ water bath (Scientific Thailand)

3.2.2 เครื่องอบลมร้อน (Contherm scientific, New Zealand)

3.2.3 ตู้เพาะเชื้อ (Contherm scientific, New Zealand

3.2.4 เครื่องบดหยาบ (Yuan Li electric, Taiwan)

3.2.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius LE 2445, Germany)

3.2.6 เครื่อง centrifuge (Hettich, Germany)

3.2.7 เครื่อง vortex (VM-300, USA)

3.2.8 เครื่อง ultrasonic bath

3.2.9 Autoclave (Hirayama, Japan)

3.2.10 เครื่อง spot TLC รุ่น LINOMAT 5 (CAMAG)

3.2.11 UV-VIS Spectrophotometer (Analytical lab science, Thailand)

3.2.12 UV cabinet (CAMAG)

3.2.13 Microplate reader (PowerWave Microplate Spectrophotometer, Bio Tek Instruments, USA)

3.2.14 Micropipette

3.2.15 Evaporating disc

3.2.16 Soxhlet apparatus

3.2.17 Funnel

3.2.18 Buchner funnel

3.2.19 Round bottom

3.2.20 TLC tank

3.2.21 จานเพาะเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 mm.

3.2.22 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.23 Conical centrifuge tube

3.2.24 96 well-plate

3.2.25 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

3.2.25 กระบอกฉีดยา

3.2.26 ตัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน

3.2.27 แผ่น TLC silica gel 60 F254

3.2.28 Forceps

3.2.29 Spreader

3.2.20 95% ethanol (Ministry of Finance, Thailand)

3.2.21 น้ำปราศจากไอออน

3.2.22 Chloroform (PanReac Applichem, USA)

3.2.23 Hexane (Merck, Germany)

3.2.24 Methanol (Merck, Germany)

3.2.25 Tween 80 (C.P. drug center)

3.2.26 Anisaldehyde (Merck, Germany)

3.2.27 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) (Emsure, Germany)

3.2.28 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (PanReac Applichem, USA)

3.2.29 McFarland standard no.0.5

3.2.30 เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (DMST®8440™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™), *Staphylococcus aureus* (MRSA) (DMST®20645™)

3.2.31 Ceftriaxone (MONOTAX® Ceftriaxone 1g/vial Batch No. BFU1271)

3.2.32 Tryptic soy broth (TSB) (Himedia Laboratories, India)

3.2.33 Mueller Hinton agar (MHA) (Himedia Laboratories, India)

3.2.34 RAW 264.7 cell line (*ATCC*® TIB-71™)

3.2.35 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA)

3.2.36 Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Brazil)

3.2.37 Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich, USA)

3.2.38 Griess reagent (Promega, USA)

3.2.39 Phosphate buffered saline (PBS) (Merck, Germany)

3.2.40 Hydrochloric acid (Carlo Erba, Italy)

3.2.41 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, USA)

3.2.42 Gallic acid (Sigma-Aldrich, USA)

3.2.43 Na_2CO_3 solution (Dasitgroup-Calo Erba Reagent, USA)

3.2.44 Folin-Ciocalteu phenol reagent (Loba chemic, Mumbai)

3.2.45 Isopropanol (PanReac Applichem, USA)

3.2.46 Ascorbic acid (vitamin C) (Sigma-Aldrich, Germany)

3.2.47 Diclofenac (Sigma-Aldrich, Germany)

3.2.48 Apigenin (Sigma-Aldrich, Germany)

3.3 การเตรียมพืชตัวอย่าง

3.3.1 เก็บตัวอย่างกระดุมทองเลื้อยส่วนเหนือดิน จากบริเวณมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตรวจสอบยืนยันชนิดโดย ผศ.ดร.รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์ อาจารย์ประจำกลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ทางเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ด้วยการเปรียบเทียบรูปวิธานกับ Flora of China (Shu et al., 2011) และเปรียบเทียบรูปภาพกับข้อมูลจากเวปไซต์อุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จัดซื้อเครื่องยากะเม็งตัวเมียจากร้านขายเครื่องยาสมุนไพรเวชพงศ์โอสถ แขวงจักรวรรดิ์ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร จัดซื้อเครื่องยากะเม็งตัวผู้ ภายใต้ชื่อภาษาจีนว่า “peng qi ju” (Shu et al., 2011) จากร้านขายเครื่องยาสมุนไพรเถียนเกิ่งซ้างซีหลิวหลี่ เมืองเซียะเหมินมณฑลฝูเจี้ยน ประเทศจีน นำเครื่องยาสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดให้ นายหอม หะทัยทาระ หมอพื้นบ้านจากอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ตรวจสอบชนิดของพืชอีกครั้ง จากนั้นนำพืชมาล้างด้วยน้ำสะอาด อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ลดขนาดด้วยการบดหยาบ ก่อนนำไปสกัด

3.3.2 เก็บตัวอย่างพืชสดกะเม็งตัวเมียจากหมู่บ้านชิดชล อ.เมือง จ.มหาสารคาม และพืชสดกะเม็งตัวผู้จากอุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จ.นครปฐม ตรวจสอบยืนยันชนิดโดย ผศ.ดร.รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์ อาจารย์ประจำกลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ทางเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ด้วยการเปรียบเทียบรูปวิธานกับ Flora of China (Shu et al., 2011) และเปรียบเทียบรูปภาพกับข้อมูลจากเวปไซต์อุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำพืชมาล้างด้วยน้ำสะอาด อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ลดขนาดด้วยการบดหยาบ ก่อนนำไปสกัดเพื่อเป็นตัวอย่างอ้างอิง (authentic) ในการ

เปรียบเทียบเอกลักษณ์ทางเคมี เนื่องจากตัวอย่างมีจำนวนน้อย จึงไม่สามารถนำมาสกัดเพื่อทดสอบฤทธิ์ต่างๆ ได้

3.4 การเตรียมสารสกัดพืช

3.4.1 เตรียมสารสกัดน้ำ โดยชั่งน้ำหนักพืชแต่ละชนิดที่บดหยาบแล้ว 50 กรัม ใส่ในหม้อสแตนเลส เติมน้ำ 500 มิลลิลิตร ต้มบนเตาให้ความร้อน เริ่มจับเวลาเมื่อน้ำเดือดจนครบ 15 นาที แล้วรินน้ำออกผ่านผ้าขาวบางลงในบีกเกอร์ จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ด้วยชุดกรองสูญญากาศ นำสารสกัดไปทำแห้งด้วยเครื่อง Lyophilization

3.4.2 เตรียมสารสกัด ethanol โดยชั่งน้ำหนักพืชแต่ละชนิดที่บดหยาบแล้ว 50 กรัม สกัดด้วยเครื่อง soxhlet apparatus โดยใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ด้วยชุดกรองสูญญากาศ ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator จากนั้นนำไประเหยแห้งต่อด้วย evaporating disc อังบนอ่างน้ำร้อน

3.4.3 บันทึกน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ คำนวณเป็นร้อยละปริมาณสารสกัด (% yield)

% yield = (น้ำหนักสารสกัดที่ได้/น้ำหนักพืชก่อนสกัด) x 100%

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี Broth dilution

เชื้อจุลชีพที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ได้มาจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มีทั้งหมด 3 ชนิด คือ

1. *S. aureus* สายพันธุ์ DMST 8440 เพื่อเป็นตัวแทนของการทดสอบเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก aerobe หรือ facultative anaerobe และเป็นตัวแทนของเชื้อที่ทำให้เกิดการติดเชื้อบนผิวหนัง

2. *P. aeruginosa* สายพันธุ์ ATCC 27853 เพื่อเป็นตัวแทนของการทดสอบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ aerobe และเป็นตัวแทนของเชื้อที่ทำให้เกิดแผล

3. MRSA สายพันธุ์ DMST 20645 เพื่อเป็นตัวแทนของการทดสอบเชื้อดื้อยา

3.5.1 ทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (Minimal inhibitory concentration, MIC) (ดัดแปลงจาก Uthairung et al, 2020)

3.5.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB) ปริมาณ 250 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แบ่ง TSB ลงในหลอดทดลองจำนวน 3 หลอด ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขี่ยเชื้อ *S. aureus* จาก slant agar มา 1 โคโลนี จุ่มเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร TSB แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ทำเช่นเดียวกันในการเตรียมเชื้อ *P. aeruginosa* และ MRSA นำเชื้อที่บ่มครบเวลาแล้วมาวัดค่า

ดูดกลืนแสง แล้วปรับความเข้มข้น ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ความขุ่นเท่ากับ McFarland no. 0.5) หลังจากนั้นเจือจางเชื้อแบคทีเรียด้วยอาหาร TSB ให้มีความเข้มข้นของปริมาณเชื้อประมาณ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.5.1.2 เตรียมสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อยในตัวทำละลายคือ Broth และระบบตัวทำละลายร่วม (DMSO ร้อยละ 60, tween 80 ร้อยละ 40) ตามลำดับ โดยเติมแบบ order of mixing สลับกับการเขย่าด้วยเครื่อง vortex ให้ได้สารสกัดความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมยามาตรฐาน ceftriaxone ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

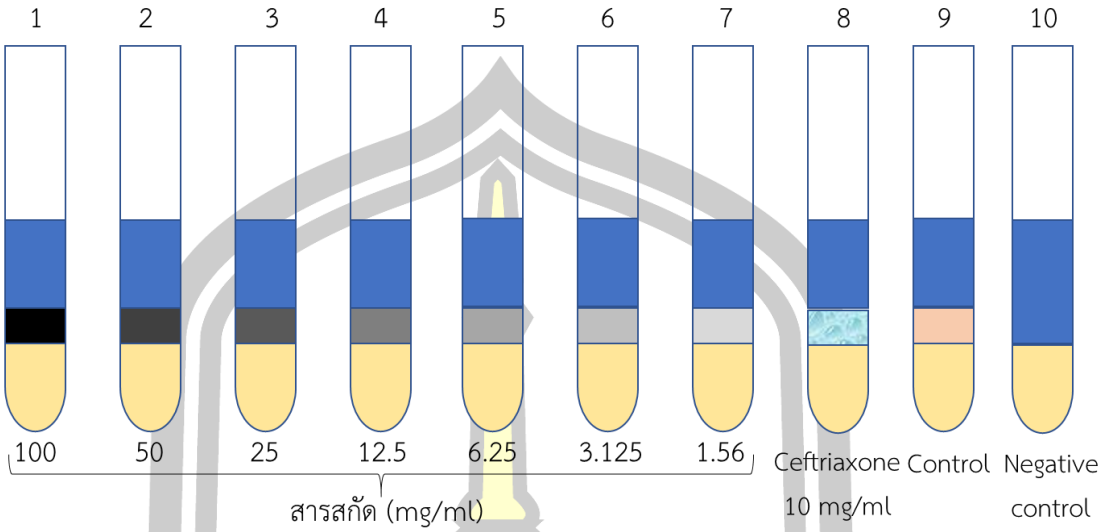
3.5.1.3 ปิเปตอาหาร TSB ใส่ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด เป็นหลอดทดลอง 7 หลอด หลอด positive control และ negative control และ solvent control อย่างละ 1 หลอด

3.5.1.4 ปิเปตสารสกัดความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองหลอดที่ 1 แล้วทำการเจือจางแบบสองเท่าลำดับส่วน (serial two-fold dilution) จากหลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 7

3.5.1.5 เตรียมหลอด positive control ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เชื้อจุลชีพที่ทดสอบ และยาปฏิชีวนะ negative control ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และเชื้อจุลชีพที่ทดสอบ และ control ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ตัวทำละลายสารสกัด และเชื้อจุลชีพที่ทดสอบ

3.5.1.6 ปิเปตเชื้อแบคทีเรียลงไปในหลอดทดลองทุกหลอด ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นสารสกัดในหลอดทดลองเท่ากับ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดลองเมื่อบ่มครบตามเวลาที่กำหนด โดยสังเกตหลอดสุดท้าย ที่ไม่มีจุลชีพเจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านความเข้มข้นของสารทดสอบในหลอดทดลองนี้เป็นค่า MIC บันทึกผล รูปแบบการทดสอบดังแสดงในภาพประกอบ 6

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว



ภาพประกอบ 6 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (Minimal inhibitory concentration, MIC)

3.5.2 ทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลชีพได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) (ดัดแปลงจาก Uthairung et al, 2020)

3.5.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ปริมาณ 250 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาตรจานละ 20 มิลลิลิตร รอจนอาหารแข็งตัว ทิ้งไว้ข้ามคืน

3.5.2.2 ปิเปตเชื้อจากหลอดที่ทำการทดสอบหาค่า MIC แล้วไม่มีความขุ่น ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA แล้วเกลี่ยให้ทั่วจานเพาะเลี้ยงด้วย spreader นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดลองเมื่อบ่มครบตามเวลาที่กำหนด สังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย บันทึกผล

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้วิธียับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO)

นำสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อยไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ macrophage (RAW 264.7) โดยวัดความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการสร้าง NO ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย lipopolysaccharide (LPS) (ดัดแปลงจาก Makchuchit, et al., 2017)

3.6.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin และ 1% streptomycin ใน flask เลี้ยงเซลล์ (T75) เมื่อ

ต้องการทำการทดลอง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer solution (PBS) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ดูด PBS ออก เติม 0.1% trypsin ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่ม CO_2 incubator (5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม DMEM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ขูดเซลล์จาก flask ด้วย scrapper ดูด suspension ใส่ในหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูด supernatant ออก เติม DMEM ปริมาตรแน่นอน ผสมให้เซลล์กระจายตัวเป็น suspension

3.6.2 นับจำนวนเซลล์โดยปิเปตเซลล์ suspension ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ eppendorf ผสมกับสีย้อม trypan blue 100 ไมโครลิตร นับเซลล์โดยใช้ haematometer จากนั้นนำมาคำนวณและปรับปริมาตร suspension เพื่อให้มีเซลล์ใน 96 well plate จำนวน 1×10^5 cells/well ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปิเปตเซลล์ลง 96 well plate บ่มเซลล์ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6.3 เตรียมสารสกัดน้ำของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย โดยละลายใน DI water ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน เตรียมสารสกัด ethanol และยามาตรฐาน diclofenac โดยละลายใน DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางสารสกัดด้วย DMEM ให้ได้ความเข้มข้น 2, 20, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.6.4 นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากข้อ 3.6.2 มาปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก เติม LPS ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดลอง ที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO (+LPS) ส่วนหลุมควบคุม (-LPS) เติม DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.6.5 เติม DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม control media และเติม 2% DMSO ใน DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม control solvent ทั้งหลุมทดลอง (+LPS) และหลุมควบคุม (-LPS)

3.6.6 ปิเปตสารสกัดชั้นน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ กระดุมทองเลื้อย และยามาตรฐาน diclofenac ที่ความเข้มข้น 2, 20, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทั้งหลุมทดลอง (+LPS) และหลุมควบคุม (-LPS) ให้ได้ความเข้มข้นสารสกัดในหลุมเท่ากับ 1, 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6.7 ปิเปต supernatant แต่ละหลุมมา 50 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well plate ใหม่ เติม Griess reagent ประกอบด้วย sulfanilamide solution 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 10 นาที และ

NED solution 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร คำนวณค่าการยับยั้งการหลั่ง nitric oxide (% inhibition) จากสูตร

% inhibition = [(control – sample) / control] x 100

โดย control: ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม [+LPS control media (or control solvent)] - [-LPS control media (หรือ control solvent)]

sample: ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม [+LPS sample] - [-LPS sample]

คำนวณหาค่า IC_{50} โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 9.0

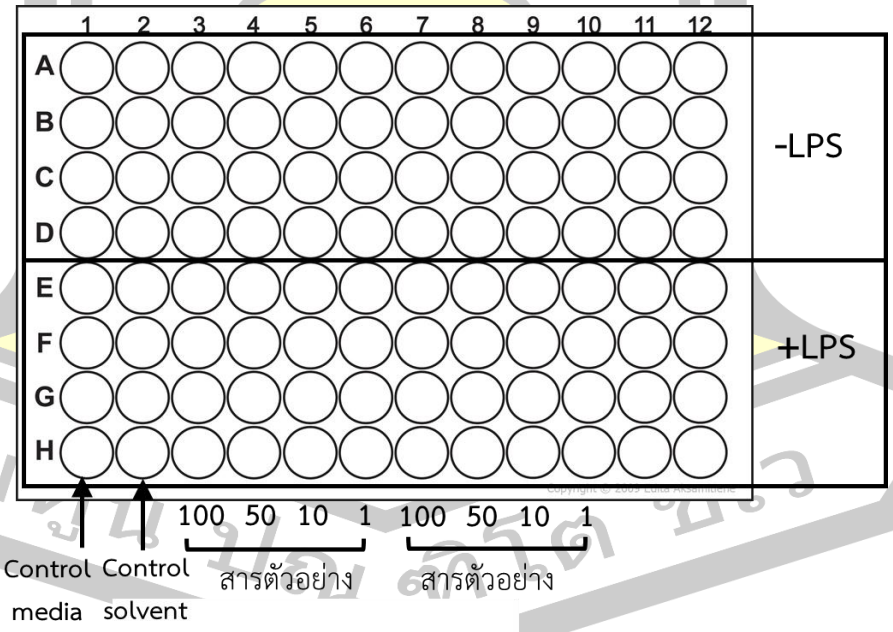
3.6.8 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยนำ 96 well plate ที่มีเซลล์อยู่เดิมจากข้อ 3.6.7 มาเติม MTT ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปิเปต supernatant ออกเติม 0.04 M HCl ใน isopropanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เคาะ plate เบาๆ จนสี MTT ละลายสม่ำเสมอ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร คำนวณค่าความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ (% cell viability) จากสูตร

% cell viability = (sample / control) x 100

โดย control: ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม -LPS control media (or control solvent)

sample: ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม -LPS sample

รูปแบบการทดสอบดังแสดงในภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 รูปแบบการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้วิธียับยั้ง NO

3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

นำสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อยไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay เป็นการทดสอบความสามารถของสารสกัดในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระของ DPPH (ดัดแปลงจาก Uthairung et al, 2020)

3.7.1 เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ที่ความเข้มข้น 0.1 mM ใน methanol

3.7.2 เตรียมสารสกัดน้ำของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย โดยละลายใน DI water ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที เตรียมสารสกัด ethanol โดยละลายใน DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางสารสกัดทั้งสองด้วยน้ำและ DMSO ตามลำดับ 2, 20, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารมาตรฐาน ascorbic acid ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น positive control

3.7.3 ปิเปตสารสกัดกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ กระดุมทองเลื้อย และสารมาตรฐาน ascorbic acid แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate เติม DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร คำนวณค่าการต้านอนุมูลอิสระ (%inhibition) จากสูตร

% inhibition = [(control – sample)/control] x 100

โดย control: ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

sample : ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

คำนวณหาค่า EC_{50} โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 9.0

3.8 การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay

นำสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อยไปทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกโดยใช้ Folin-Ciocalteu phenol reagent ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีเหลือง เมื่อทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิก สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือน้ำเงิน (ดัดแปลงจาก Zhang et al., 2006)

3.8.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ให้ได้ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน ethanol ปิเปตสารละลาย gallic acid แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate

3.8.2 เตรียมสารสกัดกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย โดยสารสกัดน้ำละลายใน DI water สารสกัด ethanol ละลายใน DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate

3.8.3 ปิเปตน้ำและ 95% ethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate เป็น blank

3.8.4 ปิเปต สารละลาย Na_2CO_3 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบและหลุม blank ผสมให้เข้ากัน เติม Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่ม 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร

3.8.5 สร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน gallic acid ระหว่างปริมาณสาร gallic acid กับค่าดูดกลืนแสง หาสมการเส้นตรงและค่า R^2

3.8.6 คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid โดย plot graph แกน x คือปริมาณเนื้อสาร gallic acid (ไมโครกรัม) และแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสง แสดงผลเป็นค่า มิลลิกรัม gallic acid สมมูลกับน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g crude extract)

3.9 การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC)

ศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) โดยจัดทำรอยพิมพ์โครมาโตกราฟี (TLC fingerprint) ของสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ที่เป็น authentic กะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ที่จัดซื้อจากร้านขายเครื่องยาสมุนไพร กระดุมทองเลื้อย และสารมาตรฐาน apigenin

3.9.1 นำสารสกัดพืชชั้น ethanol และสารมาตรฐาน apigenin มาละลายด้วย 95% ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.9.2 นำสารละลายที่ได้ spot ลงแผ่น TLC (Silica gel GF254) ซึ่งเป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ขนาด 6 x 10 เซนติเมตร โดยใช้เครื่อง Linomat 5 กำหนดให้มีความยาวของแถบสารแต่ละสารสกัด 0.8 เซนติเมตร ระยะห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร และให้เครื่องกำหนดระยะห่างระหว่างแถบสารอัตโนมัติ กำหนดให้ในแต่ละแถบสารมีปริมาตรสารสกัด 10 ไมโครลิตร โดยประกอบด้วย 6 แถบสาร คือ สารสกัดกะเม็งตัวเมีย authentic สารสกัดกะเม็งตัวเมียที่จัดซื้อจากร้านขายเครื่องยาสมุนไพร กะเม็งตัวผู้ authentic กะเม็งตัวผู้ที่จัดซื้อจากร้านขายเครื่องยาสมุนไพร กระดุมทองเลื้อย และสารมาตรฐาน apigenin

3.9.3 นำแผ่น TLC ไป develop ใน TLC tank ด้วยระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ระบบเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้แก่

Chloroform : hexane : ethanol (6:3:1)

Chloroform : benzene : ethanol : methanol (5:3:1.5:0.5)

Petroleum ether : chloroform : methanol (2:7.5:0.5)

3.9.4 นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร บันทึกภาพ จากนั้นนำไปพ่นสเปรย์ anisaldehyde/H_2SO_4 (สัดส่วน anisaldehyde 0.5 มิลลิลิตร: acetic acid 50 มิลลิลิตร : กรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตร) เมื่อแผ่น TLC แห้งแล้วนำไปอังความร้อน จนสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีบ่นแผ่น TLC บันทึกภาพ รายงานผลแถบสารที่แยกได้บนแผ่น TLC ด้วยค่า hR_f (ค่า $hR_f = 100\ R_f$)

R_f (retardation factor) = ระยะทางที่แถบสารเคลื่อนที่ไปได้/ระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนที่ไปได้

3.10 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.10.1 แสดงผลการทดลองด้วยค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD)

- ร้อยละปริมาณสารสกัด (% yield)
- ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC)
- ร้อยละการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์และค่า IC_{50}
- ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระและค่า EC_{50}
- ค่าปริมาณสารประกอบฟีโนลิกรวม

3.10.2 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติพื้นฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล one-way analysis of variance (ANOVA) และถ้าหากข้อมูลมีความแตกต่างกันทางสถิติจะใช้ Scheffe post-hoc test

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมและการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมี ของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol จากส่วนทั้งต้นของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ผลการวิจัยนำเสนอตามลำดับ ดังนี้

4.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

4.2 การเตรียมสารสกัด

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี broth dilution

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการสร้าง nitric oxide

4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

4.6 การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay

4.7 การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC)

4.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างพืชสดกะเม็งตัวเมียจากหมู่บ้านชิดชล อ.เมือง จ.มหาสารคาม เพื่อใช้เป็นพืชอ้างอิง (authentic) ในการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) จัดซื้อเครื่องยากะเม็งตัวเมียจากร้านขายเครื่องยาสมุนไพรเวชพงศ์โอสถ แขวงจักรวรรดิ์ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร และเก็บตัวอย่างกระดุมทองเลื้อย จากบริเวณมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ส่วนกะเม็งตัวผู้ ในช่วงแรกของงานวิจัยได้ทำการสืบค้นและสอบถามจากร้านขายเครื่องยาสมุนไพรต่างๆ รวมถึงการสอบถามจากหมอพื้นบ้านจากอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ ไม่พบสมุนไพรดังกล่าว จึงจัดซื้อเครื่องยากะเม็งตัวผู้ ภายใต้ชื่อภาษาจีนว่า “peng qi ju” (Shu *et al.,* 2011) จากร้านขายเครื่องยาสมุนไพรเถียนเกิ่งช้างซีหลิวหลี่ เมืองเซียะเหมิน มณฑลฝูเจี้ยน ประเทศจีน เพื่อนำมาเตรียมสารสกัด นำเครื่องยาสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดให้ นายหอม หะทัยทาระ หมอพื้นบ้านจากอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ตรวจสอบชนิดของพืชอีกครั้ง ก่อนนำไปทำการสกัดสารเพื่อทำทดลองต่อไป ต่อมามีการพบพืชสดกะเม็งตัวผู้ ที่อุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จ.นครปฐม จึงเก็บตัวอย่างจำนวนน้อยเพื่อใช้เป็นพืชอ้างอิง (authentic) ในการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) ตรวจสอบยืนยันชนิดโดย ผศ.ดร.รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์ อาจารย์ประจำกลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ทางเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ด้วยการเปรียบเทียบรูปวิธานกับ Flora of China (Shu *et al.,* 2011) และเปรียบเทียบรูปภาพกับข้อมูลจากเวปไซต์อุทยาน

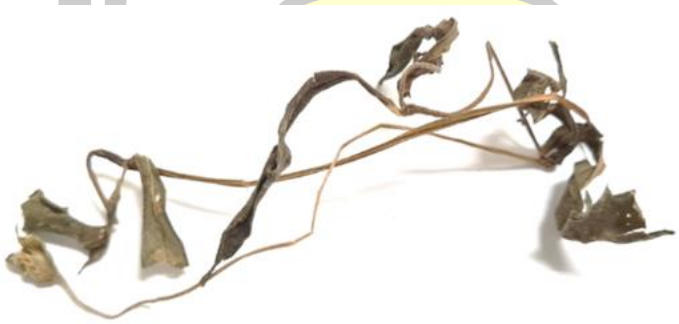
ธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และเนื่องจากตัวอย่างมีจำนวนน้อย จึงไม่สามารถนำสารสกัดมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต่างๆ ได้

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย และเครื่องยาสมุนไพรกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ ดังแสดงในภาพที่ 8-11

ภาพประกอบ 8 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และของกะเม็งตัวเมีย

ภาพประกอบ 9 เครื่องยาแห้งส่วน ลำต้น ใบ และดอก ของกะเม็งตัวเมีย

ภาพประกอบ 10 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกะเม็งตัวผู้



ภาพประกอบ 11 เครื่องยาแห้งส่วน ลำต้น ใบ และดอก ของกะเม็งตัวผู้

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

ภาพประกอบ 12 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกระดุมทองเลื้อย

4.2 การเตรียมสารสกัด

กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อยที่นำมาทำการสกัดน้ำด้วยวิธีการต้ม และสกัด ethanol ด้วย soxhlet apparatus ได้ปริมาณสารสกัดและร้อยละผลผลิตของสารสกัด (%W/W) ดังแสดงในตาราง 5

ตาราง *5* ปริมาณสารสกัดและร้อยละผลผลิตของสารสกัดกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย

สารสกัด	พืช	ปริมาณสารสกัด (กรัม)	ร้อยละ (%W/W)
น้ำ	กะเม็งตัวเมีย	14.42	7.21
	กะเม็งตัวผู้	12.98	6.49
	กระดุมทองเลื้อย	16.75	8.38
95% ethanol	กะเม็งตัวเมีย	5.77	1.44
	กะเม็งตัวผู้	8.02	2.01
	กระดุมทองเลื้อย	3.60	0.77

ผลการสกัดสารพบว่าสารสกัดน้ำด้วยวิธีการต้มของพืชทั้งสามให้ร้อยละสารสกัดสูงกว่าสารสกัด ethanol ด้วยวิธี soxhlet apparatus โดยกระดุมทองเลื้อยมีร้อยละสารสกัดสูงที่สุด รองลงมาคือ กะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ มีค่าเท่ากับ 8.38, 7.21, และ 6.49 ตามลำดับ ส่วนสารสกัด ethanol พบว่ากะเม็งตัวผู้มีร้อยละสารสกัดสูงที่สุด รองลงมาคือกะเม็งตัวเมียและกระดุมทองเลื้อย มีค่าเท่ากับ 2.01, 1.44 และ 0.77 ตามลำดับ

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี Broth dilution

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี broth dilution โดยทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC และ Minimal Microbicidal Concentration, MBC) ของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ต่อเชื้อ *S. aureus, P. aeruginosa* และ MRSA ผลการศึกษาดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC และMinimal bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดน้ำและ *ethanol* ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ต่อเชื้อ *S. aureus, P. aeruginosa* และ MRSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (n = 3)

สารสกัด	ชนิดพืช	*S. aureus*		*P. aeruginosa*		MRSA	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
น้ำ	กะเม็งตัวเมีย	12.5	25	50	>100	50	>100
	กะเม็งตัวผู้	12.5	25	50	>100	50	>100
	กระดุมทองเลื้อย	50	50	100	100	>100	>100
95% ethanol	กะเม็งตัวเมีย	25	25	50	>100	100	100
	กะเม็งตัวผู้	25	25	50	>100	100	>100
	กระดุมทองเลื้อย	25	50	50	100	50	>100
ยามาตรฐาน ceftriaxone		-	10	-	10	-	10

จากการทดสอบหาค่า MIC พบว่าทั้งสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของพืชทั้งสาม มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ได้ และสารสกัดส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA โดยสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพดีที่สุด ได้แก่ สารสกัดน้ำของกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ดีที่สุดโดยมีค่า MIC เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัด ethanol ของกระดุมทองเลื้อย มีค่า MIC เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดทั้งสามมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* และ MRSA มีค่า MIC เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบ MBC พบว่าสารสกัดน้ำและ ethanol ของพืชทั้งสามสามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ มีค่า MBC เท่ากับ 25-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีเพียงสารสกัดของกระดุมทองเลื้อยที่สามารถฆ่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีค่า MBC เท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีเพียงสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมียที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ MRSA มีค่า MBC เท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO)

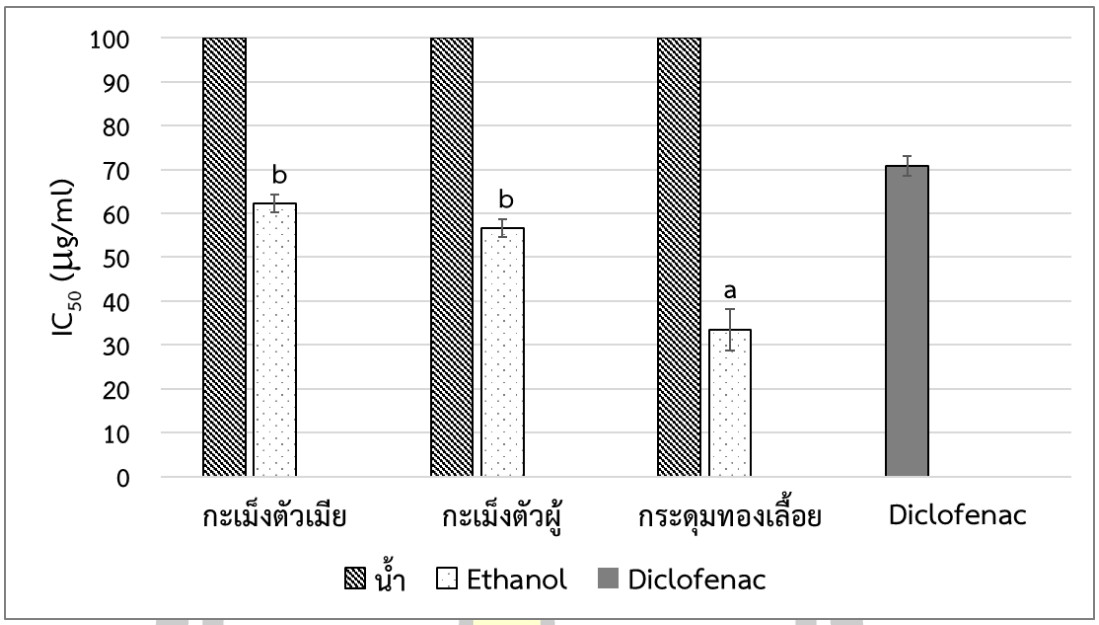
นำสารสกัดทั้ง 6 สารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ macrophage (RAW 264.7) โดยวัดความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการสร้าง NO ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย lipopolysaccharide (LPS) รายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบเป็นค่าร้อยละการยับยั้งการหลั่ง NO (% inhibition) และค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการหลั่ง NO ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ของสารสกัดว่าไม่ได้เกิดจากตายของเซลล์โดยการวัดค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด ด้วยเทคนิค MTT รายงานเป็นค่าการอยู่รอดของเซลล์ (% cell viability) ซึ่งต้องมากกว่าร้อยละ 70 ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 7 และภาพที่ 13

ตาราง 7 ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการหลั่ง NO ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) และร้อยละการยับยั้งการหลั่ง NO (% inhibition) ของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ในเซลล์ RAW 264.7 และค่าการอยู่รอดของเซลล์ (% cell viability) (n = 3)

สารสกัด	ชนิดพืช	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) [% inhibition ที่ความเข้มข้น 100ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร]				% cell viability (MTT)	
		n1	n2	n3	mean±SD	-LPS	+LPS
น้ำ	กะเม็งตัวเมีย	>100 [10.27]	>100 [9.60]	>100 [9.41]	>100 [9.76±0.45]	97.99±1.74	98.23±3.75
	กะเม็งตัวผู้	>100 [40.45]	>100 [38.30]	>100 [41.09]	>100 [39.95±1.47]	96.11±0.30	98.63±1.48
	กระดุมทองเลื้อย	>100 [6.36]	>100 [4.97]	>100 [4.99]	>100 [5.44±0.80]	98.25±4.55	99.13±1.64
95% ethanol	กะเม็งตัวเมีย	59.91 [76.57]	62.93 [77.74]	63.80 [72.66]	62.21±2.04[b] [75.66±2.66]	96.41±1.56	97.29±0.56
	กะเม็งตัวผู้	57.41 [80.56]	58.14 [79.57]	54.37 [79.34]	56.64±1.82[b] [79.83±0.65]	99.71±1.07	108.70±2.84
	กระดุมทองเลื้อย	31.51 [98.58]	38.85 [96.64]	29.94 [99.47]	33.43±4.76[a] [98.23±1.45]	97.16±1.18	97.47±3.51
Diclofenac Positive control		72.21 [67.85]	68.21 [66.56]	72.03 [65.95]	70.82 ±2.26 [66.79±0.97]	103.03±2.91	101.69±3.69

เปรียบเทียบโดยใช้ One-way ANOVA with Scheffe multiple comparison ([ab] ค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p<0.05$)

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว



ภาพประกอบ 13 ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการหลั่ง NO ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ในเซลล์ RAW 264.7 เปรียบเทียบโดยใช้ One-way ANOVA with Scheffe multiple comparison (^{ab} ค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p<0.05$) (n = 3)

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการสร้าง NO พบว่าสารสกัด ethanol ของพืชทั้ง 3 มีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบดีกว่าสารสกัดน้ำและยา diclofenac ซึ่งเป็น positive control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกระดุมทองเลื้อยมีฤทธิ์ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 33.43±4.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดีกว่ากะเม็งตัวผู้และกะเม็งตัวเมีย ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 56.64±1.82 และ 62.21±2.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสารสกัดชั้นน้ำของพืชทั้ง 3 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO ได้น้อยกว่าร้อยละ 50 จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ RAW 264.7 พบว่าสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของพืชทั้ง 3 ไม่ได้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีค่า % cell viability มากกว่า 70%

4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

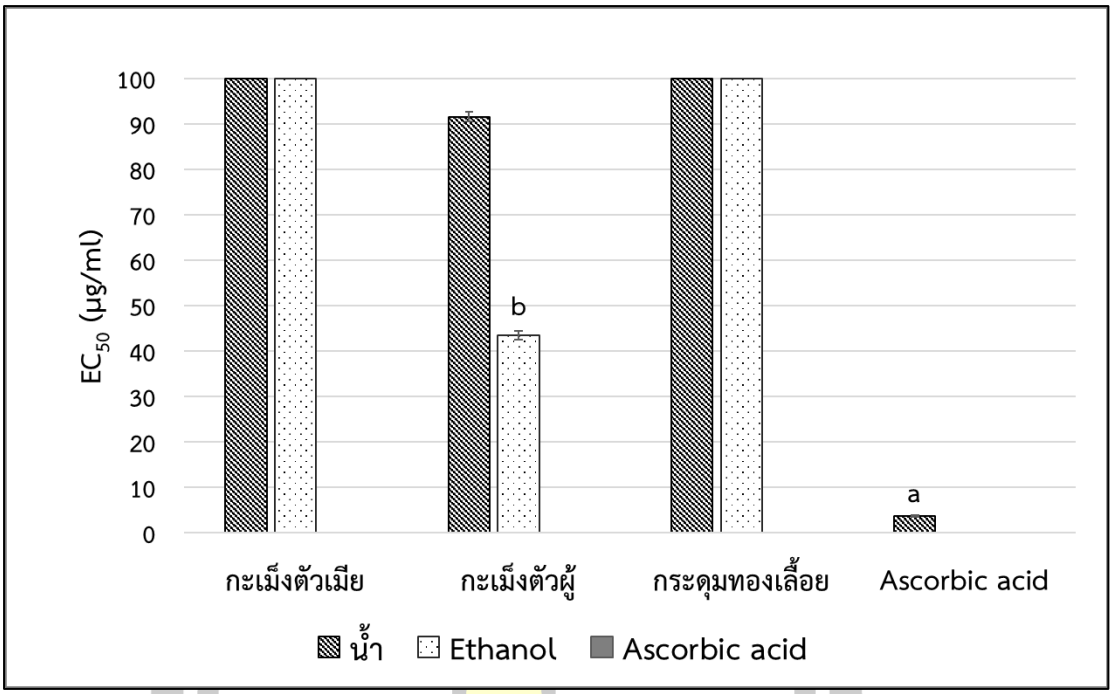
นำสารสกัดทั้ง 6 สารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay รายงานผลเป็นค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% inhibition) และค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (EC_{50}) ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 8 และภาพที่ 14

ตาราง 8 ค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (EC_{50}) และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% inhibition) ของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (n = 3)

สารสกัด	ชนิดพืช	EC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) [% inhibition ที่ความเข้มข้น 100ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร]			
		n1	n2	n3	mean±SD
น้ำ	กะเม็งตัวเมีย	>100 [28.62]	>100 [25.72]	>100 [27.89]	>100 [27.41±1.50]
	กะเม็งตัวผู้	92.53 [52.08]	90.41 [52.44]	91.71 [51.40]	91.55±1.07 [51.97±0.53]
	กระดุมทองเลื้อย	>100 [20.32]	>100 [21.97]	>100 [19.06]	>100 [20.45±1.46]
95% ethanol	กะเม็งตัวเมีย	>100 [38.31]	>100 [35.48]	>100 [35.13]	>100 [36.31±1.74]
	กะเม็งตัวผู้	43.72 [86.35]	44.33 [86.26]	42.38 [85.81]	$43.48±1.00^{b}$ [86.14±0.29]
	กระดุมทองเลื้อย	>100 [16.90]	>100 [17.99]	>100 [16.32]	>100 [17.07±0.84]
Ascorbic acid		3.82	3.79	3.44	$3.68±0.21^{a}$

เปรียบเทียบโดยใช้ One-way ANOVA with Scheffe multiple comparison (^{ab} ค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p<0.05$) (n = 3)

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว



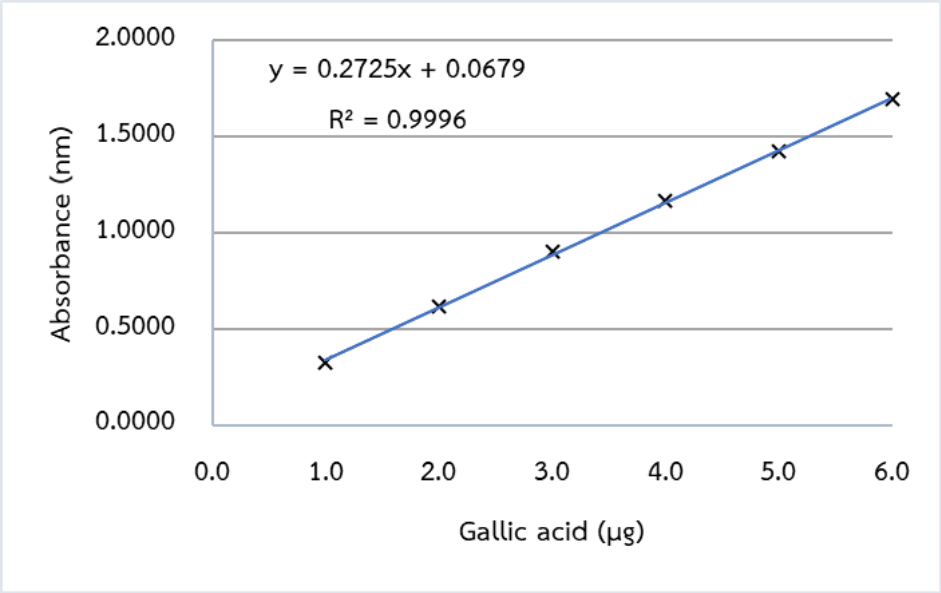
ภาพประกอบ 14 ค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (EC_{50}) ของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay เปรียบเทียบโดยใช้ One-way ANOVA with Scheffe multiple comparison (ab ค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p<0.05$) (n = 3)

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวผู้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 43.48±1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และดีกว่าสารสกัดน้ำที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 91.55±1.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยังต่ำกว่า ascorbic acid ซึ่งเป็น positive control มีค่า EC_{50} เท่ากับ 3.68±0.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสารสกัดกะเม็งตัวเมียและกระดุมทองเลื้อยที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าร้อยละ 50

4.6 การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay

จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay โดยคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในหน่วยมิลลิกรัมของ gallic acid equivalents (GAE) ต่อสารสกัด

1 กรัม เทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid ที่แสดงในภาพที่ 15 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมดังแสดงในตารางที่ 9

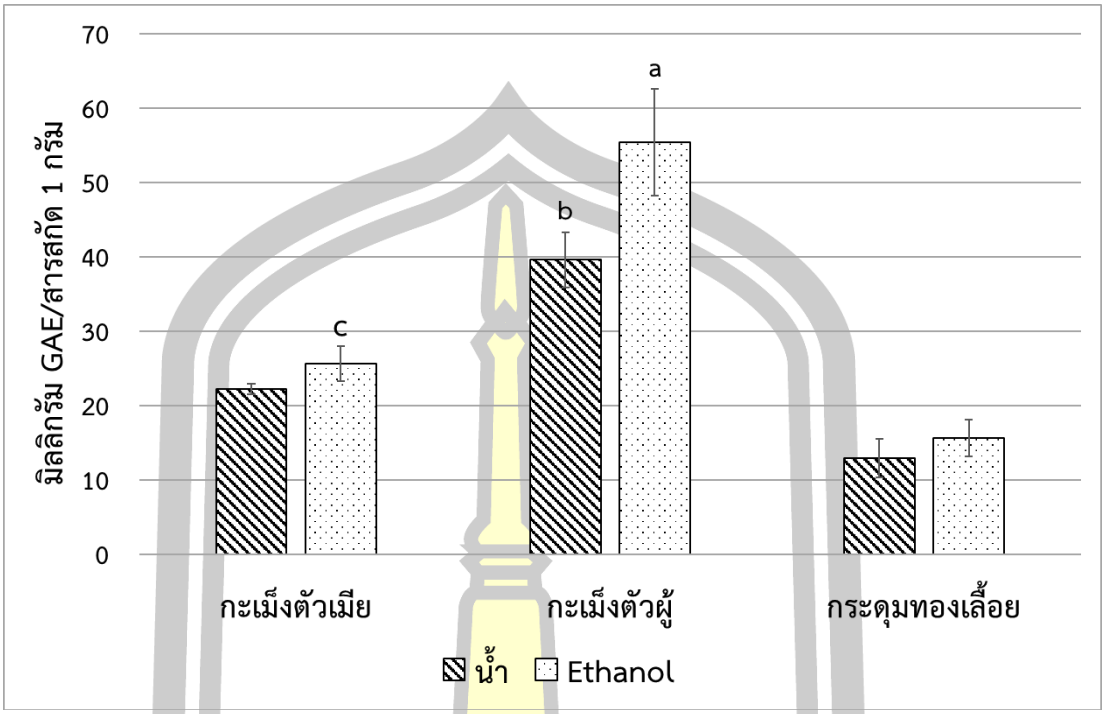


ภาพประกอบ 15 กราฟมาตรฐานของสาร gallic acid

ตาราง 9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย (n = 3)

สารสกัด	ชนิดพืช	ปริมาณ total phenolic (มิลลิกรัม GAE/สารสกัด 1 กรัม)			
		n1	n2	n3	mean± SD
น้ำ	กะเม็งตัวเมีย	22.58	21.39	22.69	22.22±0.72
	กะเม็งตัวผู้	42.21	35.30	41.22	39.58±3.74[b]
	กระดุมทองเลื้อย	13.13	10.18	15.32	12.88±2.58
95% ethanol	กะเม็งตัวเมีย	28.21	23.65	25.04	25.63±2.34[c]
	กะเม็งตัวผู้	61.57	47.55	57.26	55.46±7.18[a]
	กระดุมทองเลื้อย	13.30	18.29	15.28	15.62±2.51

เปรียบเทียบโดยใช้ One-way ANOVA with Scheffe multiple comparison ([abc] ค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p<0.05$) (n = 3)



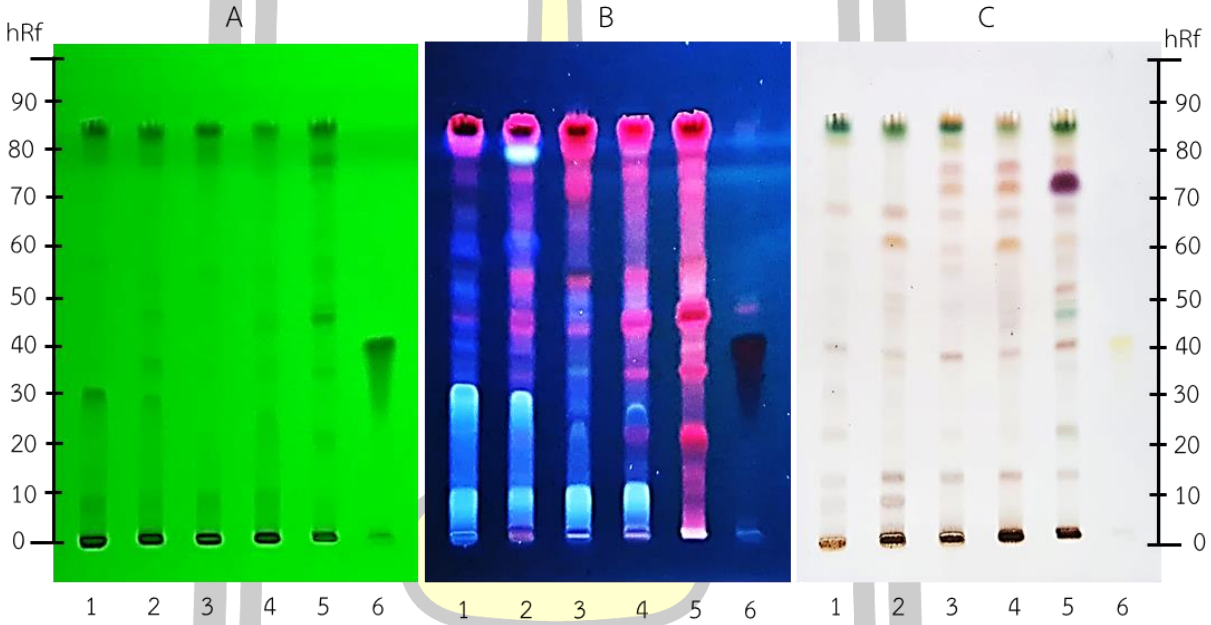
ภาพประกอบ 16 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย เปรียบเทียบโดยใช้ One-way ANOVA with Scheffe multiple comparison (abc ค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p<0.05$) (n = 3)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay พบว่าสารสกัด ethanol ของพืชแต่ละชนิดมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดน้ำ สารสกัดทั้งสองของกะเม็งตัวผู้มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดของพืชอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัด ethanol มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 55.46±7.18 มิลลิกรัม GAE ต่อสารสกัด 1 กรัม มากกว่าสารสกัดน้ำที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 39.58±3.74 มิลลิกรัม GAE ต่อสารสกัด 1 กรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคือสารสกัด ethanol และสารสกัดน้ำของกะเม็งตัวเมีย ส่วนกระดุมทองเลื้อยมีปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด โดยสารสกัดน้ำของกระดุมทองเลื้อยยังมีปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยกว่าสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย

4.7 การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC)

ศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) โดยจัดทำรอยพิมพ์โครมาโตกราฟี (TLC fingerprint) ของสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ที่เป็น authentic กะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ที่จัดซื้อจากร้านขายเครื่องยาสมุนไพร กระดุมทองเลื้อย และ

สารมาตรฐาน apigenin โดยใช้ Silica gel GF254 เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) และใช้ระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ระบบ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้แก่ chloroform : hexane : ethanol (6:3:1), chloroform : benzene : ethanol : methanol (5:3:1.5:0.5) และ petroleum ether : chloroform : methanol (2:7.5:0.5) ตรวจสอบด้วย UV 254 และ 366 นาโนเมตร และสเปรย์ anisaldehyde/H_2SO_4 ในการจำแนกชนิดของพืชโดยเปรียบเทียบค่า hR_f ของสารมาตรฐานกับสมุนไพรแต่ละชนิด ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 13-15 และตารางที่ 10-12



ภาพประกอบ 17 เปรียบเทียบรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารสกัดกะเม็งตัวเมีย *authentic* (1) ,กะเม็งตัวเมียจากร้านขายเครื่องยา (2) ,กะเม็งตัวผู้ *authentic* (3), กะเม็งตัวผู้จากร้านขายเครื่องยา (4), กระดุมทองเลื้อย (5) และ *apigenin* (6) ด้วยระบบตัวทำละลาย *chloroform : hexane : ethanol* (6:3:1) ตรวจสอบภายใต้ *UV* 254 นาโนเมตร (*A*), 366 นาโนเมตร (*B*) และสเปรย์ *anisaldehyde/H2SO*4 (*C*)

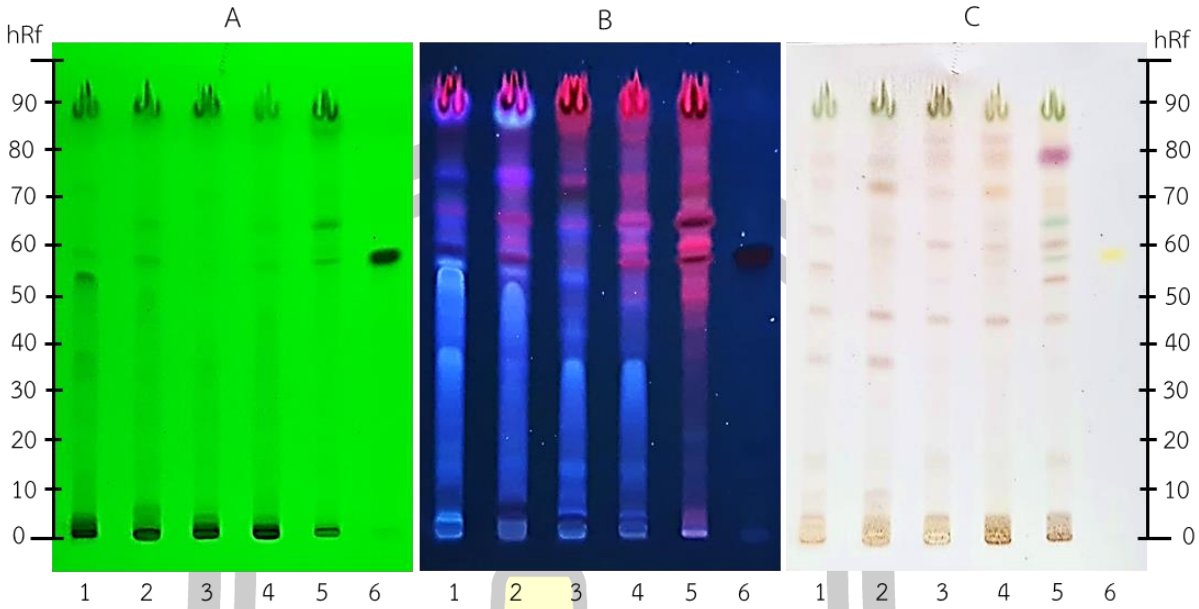
พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

ตาราง 10 ค่า hR_f และลักษณะ spot ของสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ กระดุมทองเลื้อย และ apigenin ด้วยระบบตัวทำละลาย chloroform : hexane : ethanol (6:3:1)

ลำดับ	hR_f	UV 254						UV 366						Anisaldehyde/H_2SO_4					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
1	7-11	G	G	G	G	-	-	BL	BL	BL	BL	-	-	BR	BR	-	-	-	-
2	13-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BR	BR	BR	BR	BR	-
3	21-22	BR	-	-	G	G	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-	-	BR	-
4	29-31	G	G	-	-	-	-	BL	BL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	35-36	-	G	-	G	G	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-	-	GR	-
6	40-41	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	G	BR	BR	BR	BR	BR	Y
7	47-48	-	-	-	G	G	-	R	R	R	R	R	-	-	BR	-	GR	GR	-
8	30-31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BR	-	-	BR	-
9	68-69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BR	BR	BR	BR	BR	-
10	59-61	-	-	-	-	-	-	BL	BL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	72-75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	-
12	77-78	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	-
13	78-80	G	G	G	G	G	-	R	Y	R	R	R	-	-	GR	-	GR	GR	-
14	84-86	G	G	G	G	G	-	R	R	R	R	R	-	GR	GR	GR	GR	GR	-

หมายเหตุ G=grey, GR=green, BL=blue, BR=brown, R=red, Y=yellow, P=Pink

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว



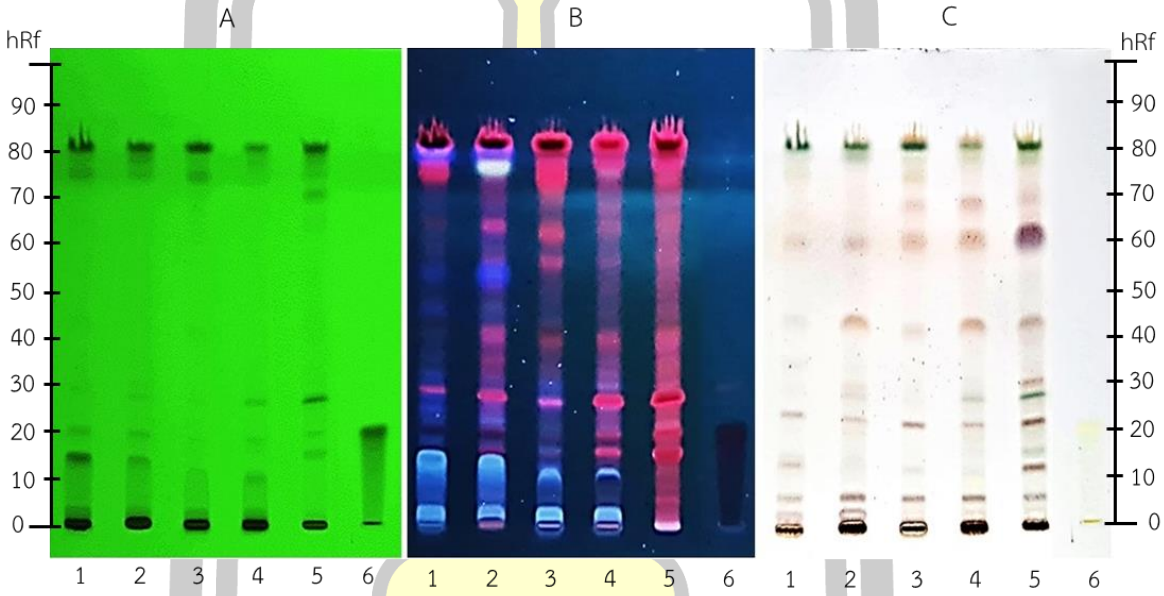
ภาพประกอบ 18 เปรียบเทียบรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารสกัดกะเม็งตัวเมีย *authentic (1)* , กะเม็งตัวเมียจากร้านขายเครื่องยา *(2)* ,กะเม็งตัวผู้ *authentic (3)*, กะเม็งตัวผู้จากร้านขายเครื่องยา *(4)*, กระดุมทองเลื้อย *(5)* และ *apigenin (6)* ด้วยระบบตัวทำละลาย *chloroform : benzene : ethanol : methanol (5:3:1.5:0.5)* ตรวจสอบภายใต้ *UV 254* นาโนเมตร *(A), 366* นาโนเมตร *(B)* และสเปรย์ *anisaldehyde/H_2SO_4 (C)*

ตาราง 11 ค่า hR_f และลักษณะ spot ของสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ กระดุมทองเลื้อย และ apigenin ด้วยระบบตัวทำละลาย chloroform : benzene : ethanol : methanol (5:3:1.5:0.5)

ลำดับ	hR_f	UV 254						UV 366						Anisaldehyde/H_2SO_4					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
1	3-4	G	G	G	G	-	-	-	-	-	-	-	-	BR	BR	BR	BR	BR	-
2	35-36	G	-	-	-	-	-	BL	BL	BL	BL	-	-	BR	BR	-	-	-	-
3	53-55	G	G	-	-	-	-	BL	BL	-	-	-	-	BR	-	-	-	BR	-
4	58-59	-	-	-	-	G	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-	-	GR	-
5	60-61	G	G	-	-	-	G	-	-	-	R	R	G	BR	BR	BR	BR	BR	Y
6	64-65	-	-	-	G	G	-	-	R	-	R	R	-	-	-	-	GR	GR	-
8	70-71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BR	BR	BR	BR	BR	-
9	72-73	-	-	-	-	-	-	BL	BL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	79-80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P	P	-

ลำดับ	hR_f	UV 254						UV 366						Anisaldehyde/H_2SO_4					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
11	82-83	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	-
12	88-91	G	G	G	G	G	-	R	Y	R	R	R	-	-	GR	-	GR	GR	-

หมายเหตุ G=grey, GR=green, BL=blue, BR=brown, R=red, Y=yellow, P=Pink



ภาพประกอบ 19 เปรียบเทียบรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารสกัดกะเม็งตัวเมีย *authentic (1)* , กะเม็งตัวเมียจากร้านขายเครื่องยา *(2)* ,กะเม็งตัวผู้ *authentic (3)*, กะเม็งตัวผู้จากร้านขายเครื่องยา *(4)*, กระดุมทองเลื้อย (*5)* และ *apigenin (6)* ด้วยระบบตัวทำละลาย *petroleum ether : chloroform : methanol (2:7.5:0.5)* ตรวจสอบภายใต้ *UV 254* นาโนเมตร *(A), 366* นาโนเมตร *(B)* และสเปรย์ *anisaldehyde/H_2SO_4 (C)*

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

ตาราง 12 ค่า hR_f และลักษณะ spot ของสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ กระดุมทองเลื้อย และ apigenin ด้วยระบบตัวทำละลาย petroleum ether : chloroform : methanol (2:7.5:0.5)

ลำดับ	hR_f	UV 254						UV 366						Anisaldehyde/H_2SO_4					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
1	3-4	G	G	G	G	-	-	BL	BL	BL	BL	-	-	BR	BR	-	-	-	-
2	5-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BR	BR	BR	BR	BR	-
3	12-14	G	G	-	-	-	-	BL	BL	-	-	-	-	BR	-	-	-	BR	-
4	16-17	-	-	-	-	G	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-	-	GR	-
5	20-21	G	G	-	-	-	G	-	-	-	R	R	G	BR	BR	BR	BR	BR	Y
6	27-28	-	-	-	G	G	-	R	R	R	R	R	-	-	BR	-	GR	GR	-
7	30-31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BR	-	-	BR	-
8	42-43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BR	BR	BR	BR	BR	-
9	52-54	-	-	-	-	-	-	BL	BL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	59-62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P	P	-
11	67-69	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	-
12	75-77	G	G	G	G	G	-	R	Y	R	R	R	-	-	GR	-	GR	GR	-
13	86-87	G	G	G	G	G	-	R	R	R	R	R	-	GR	GR	GR	GR	GR	-

หมายเหตุ G=grey, GR=green, BL=blue, BR=brown, R=red, Y=yellow, P=Pink

ผลการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) พบว่ากะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ที่จัดซื้อจากร้านขายเครื่องยาสมุนไพรมีลักษณะแถบสารรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีตรงกับสมุนไพร authentic แตกต่างกันเพียงความเข้มของแถบสาร และพืชทั้ง 3 ชนิด มีรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีที่แตกต่างกัน ระบบตัวทำละลายที่แยกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ดีที่สุด คือ chloroform : hexane : ethanol (6:3:1) โดยสามารถแยกรายละเอียดได้ดังนี้

- แยกกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ออกจากกระดุมทองเลื้อยโดยแถบเรืองแสงสีฟ้าลำดับที่ 1 hR_f 7-11 ภายใต้ UV 366
- แยกกะเม็งตัวเมียออกจากกะเม็งตัวผู้โดยแถบเรืองแสงสีฟ้าลำดับที่ 4 hR_f 29-31 ภายใต้ UV 366 นาโนเมตร
- แยกกระดุมทองเลื้อยออกจากกะเม็งตัวผู้โดยแถบสีเขียวลำดับที่ 7 hR_f 47-48 และแถบสีชมพูเข้มลำดับที่ 11 hR_f 72-75 หลัง spray anisaldehyde/H_2SO_4 ซึ่งกระดุมทองเลื้อยจะมีความเข้มของแถบสีมากกว่ากะเม็งตัวผู้
- รอยพิมพ์โครมาโตกราฟีไม่สามารถระบุแถบสารที่ตรงกับสารมาตรฐาน apigenin ได้

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม และศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมี ของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol จากส่วนทั้งต้นของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ MRSA พบว่าทั้งสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของพืชทั้งสาม มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ได้ และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. aureus* โดยสารสกัดน้ำของกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้มีฤทธิ์ดีที่สุด ส่วนฤทธิ์ต่อเชื้อ MRSA พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA แต่มีเพียงสารสกัดน้ำของกะเม็งตัวเมียที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อดังกล่าว

การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่ง NO ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS พบว่าสารสกัด ethanol ของพืชทั้งสามมีฤทธิ์ต้านอักเสบดีกว่าสารสกัดน้ำรวมถึงยามาตรฐาน diclofenac อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกระดุมทองเลื้อยมีฤทธิ์ดีที่สุด รองลงมาเป็นกะเม็งตัวเมีย และกะเม็งตัวผู้ ส่วนสารสกัดน้ำของพืชทั้งสามมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO น้อย มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT ไม่พบความเป็นพิษของสารสกัดทั้งสามต่อเซลล์ RAW 264.7

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่ามีเพียงกะเม็งตัวผู้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยสารสกัด ethanol มีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสารสกัดอื่นๆ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อย มีค่า EC_{50} มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay พบว่าสารสกัด ethanol ของพืชทั้งสามมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดน้ำ และสารสกัดทั้งสองของกะเม็งตัวผู้มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่ากะเม็งตัวเมียและกระดุมทองเลื้อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) โดยจัดทำรอยพิมพ์โครมาโตกราฟี (TLC fingerprint) ของสารสกัด ethanol กะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ที่เป็น authentic กะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ที่จัดซื้อจากร้านขายเครื่องยาสมุนไพร กระดุมทองเลื้อย และสารมาตรฐาน apigenin โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ระบบ ผลการศึกษาพบว่ากะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ที่จัดซื้อจากร้านขายเครื่องยาสมุนไพรมีลักษณะแถบสารรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีตรงกับสมุนไพร authentic แตกต่างกันเพียงความเข้มของแถบสาร และพืชทั้ง 3 ชนิด มีรอย

พิมพ์โครมาโตกราฟีที่แตกต่างกัน เทคนิค TLC ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถระบุแถบสารที่ตรงกับสารมาตรฐาน apigenin ได้

5.2 อภิปรายผลการทดลอง

ในการเก็บตัวอย่างพืชเพื่อทำการวิจัยนั้น ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างกะเม็งตัวเมีย (authentic) ได้ปริมาณน้อย จึงจัดซื้อตัวอย่างสมุนไพรจากร้านจำหน่ายเครื่องยาสมุนไพรมาใช้ในการสกัดเพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต่างๆ ในขณะที่กระดุมทองเลื้อยสามารถพบตัวอย่างได้ทั่วไปในธรรมชาติ จึงสามารถใช้พืช authentic ในการทดลองได้ ส่วนกะเม็งตัวผู้ ในระยะแรกของการศึกษา ผู้วิจัยได้สอบถามหมอพื้นบ้านและร้านจำหน่ายเครื่องยาสมุนไพรในพื้นที่ต่างๆ แต่ไม่สามารถหาตัวอย่างกะเม็งตัวผู้ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของวิภัสราและคณะ, 2561 ที่รายงานผลการสำรวจในงานวิจัยว่าไม่พบกะเม็งตัวผู้ในธรรมชาติ และไม่พบว่ามีการจำหน่ายกะเม็งตัวผู้ในร้านขายยาสมุนไพร และปัจจุบันอาจไม่มีการนำไปใช้เป็นสมุนไพรเนื่องจากไม่สามารถหาตัวอย่างพืชได้ทั่วไป ดังนั้นผู้วิจัยจึงสอบถามไปยังร้านขายเครื่องยาสมุนไพรในประเทศจีน โดยสืบค้นชื่อภาษาจีนจากชื่อวิทยาศาสตร์ *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski และจัดซื้อเครื่องยาสมุนไพรกะเม็งตัวผู้ ภายใต้ชื่อภาษาจีนว่า “peng qi ju” (Shu *et al*., 2011) จากร้านขายเครื่องยาสมุนไพรในประเทศจีนมาเพื่อใช้ในการทดลอง โดยได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์เภสัชกรณัฐพงษ์ วิชัย อาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ในการจัดซื้อตัวอย่างสมุนไพรดังกล่าวจากประเทศจีนให้ ต่อมาเมื่อใกล้เสร็จสิ้นการศึกษาวิจัย ผู้วิจัยได้ค้นพบสมุนไพรกะเม็งตัวผู้ ณ อุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จ.นครปฐม จึงเก็บตัวอย่างนำมาจัดทำรอยพิมพ์โครมาโตกราฟี เพื่อเปรียบเทียบเอกลักษณ์ทางเคมีกับพืชที่จัดซื้อจากประเทศจีน

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพพบว่าทั้งกะเม็งตัวเมีย และกะเม็งตัวผู้ มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพทั้ง *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ได้ดี เช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่ากะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพอย่างกว้างขวาง (Darah et al., 2013; Karthikumar et al., 2007; Jehan et al., 2011; Selvamani et al., 2014) สอดคล้องกับการใช้กะเม็งตัวเมียในการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาบาดแผลและโรคผิวหนังในประเทศอินเดีย (Jahan et al., 2014) และการใช้ในประเทศไทยที่มีการนำกะเม็งตัวเมียมาพัฒนาเป็นตำรับยาสมุนไพรครีมกะเม็งเพื่อใช้ในการรักษาแผลเรื้อรังในโรงพยาบาลในจังหวัดบุรีรัมย์ เช่นเดียวกับกะเม็งตัวผู้ที่มีสรรพคุณในการแก้โรคผิวหนัง แม้ว่าปัจจุบันจะยังไม่พบการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของกะเม็งตัวผู้ก็ตาม นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดน้ำของกะเม็งตัวเมียมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ MRSA ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของกะเม็งตัวเมียต่อเชื้อ MRSA มาก่อน เชื้อ MRSA คือ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactams ซึ่งปัจจุบันยาหลักที่ใช้รักษาคือ vancomycin แต่ปัจจุบันในหลายประเทศ มีรายงาน เชื้อ MRSA ดื้อ

ต่อยา vancomycin เพิ่มขึ้น สำหรับประเทศไทย ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ ของโรงพยาบาล 46 แห่ง พบว่า ใน ปี พ .ศ.2556 เชื้อ MRSA มีความไวต่อยา vancomycin ร้อยละ 98 หมายถึง ผู้ป่วยร้อยละ 2 มีแนวโน้มการรักษาด้วยยา vancomycin จะไม่ได้ผล (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข,2564) ผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของกะเม็งตัวเมียในการพัฒนาเป็นยาสมุนไพรที่ใช้รักษาแผลที่มีการติดเชื้อ MRSA ซึ่งมักพบได้บ่อยจากการติดเชื้อในชุมชน โดยเฉพาะในผู้ป่วยเบาหวานที่มักเกิดแผลที่เท้าและเสี่ยงต่อการติดเชื้อ MRSA ได้ง่าย แม้ว่าค่า MBC ในการศึกษาครั้งนี้จะค่อนข้างสูง แต่อาจเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดกะเม็งตัวเมียได้โดยการพัฒนาวิธีการสกัด การพัฒนาระบบนำส่งยาทางผิวหนัง หรือการใช้สมุนไพรกะเม็งตัวเมียร่วมกับสมุนไพรอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA เช่น น้ำมันอบเชย (วนิดา และคณะ, 2020) ขมิ้นชัน (พีรพัฒน์, วีรพงศ์, สุบัณฑิต, 2553) เป็นต้น ส่วนฤทธิ์ต้านจุลชีพของกระดุมทองเลื้อยในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ากระดุมทองเลื้อยสามารถยับยั้ง *S. aureus* แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบอื่นๆ ได้หลายชนิด (Taddei and Rosas, 1999; Balekar et al., 2012) มีการแยกสารจากสารสกัดใบด้วย ethanol พบสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ คือ ent-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid (Balekar et al., 2012) ผลการศึกษาสอดคล้องกับสรรพคุณของกระดุมทองเลื้อยที่ใช้ในการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาแผลเรื้อรังในประเทศเบลีซ (Neelam et al., 2014) แต่ในประเทศไทย ยังไม่พบการใช้กระดุมทองเลื้อยในทางการแพทย์พื้นบ้าน อาจเนื่องมาจากกระดุมทองเลื้อยมีถิ่นกำเนิดในต่างประเทศ (กลุ่มงานพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, 2564)

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัด ethanol ของพืชทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการสร้าง NO ดีกว่าสารสกัดน้ำและยา diclofenac สอดคล้องกับการใช้กะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ในการแพทย์พื้นบ้านของประเทศอินเดียเพื่อรักษาแผลและลดอาการบวม (Jahan et al., 2014) และงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าสารสกัดกะเม็งตัวเมียมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองได้ดี (Patrao et al., 2013; Sureshkumar et al., 2005) เช่นเดียวกับสารสกัดกะเม็งตัวผู้ (Lin et al., 2015; Manjamalai et al., 2011) ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบของกะเม็งตัวเมียคือ orobol โดยมีการยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ดี (Tewtrakul et al., 2011) ส่วนกะเม็งตัวผู้ มีรายงานว่าสาร wedelolactone ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ (Yuan et al., 2013) สำหรับกระดุมทองเลื้อยซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ได้ดีที่สุด แม้จะยังมีรายงานการวิจัยด้านการต้านการอักเสบไม่มากนัก แต่ก็มีฤทธิ์สอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ โดยพบฤทธิ์ต้านการอักเสบทั้งใน *in vitro* (Chung et al., 2009; Govindappa et al., 2011) และในสัตว์ทดลอง (Maldini et al., 2009) อย่างไรก็ตาม ยังไม่

มีรายงานการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบจากกระดุมทองเลื้อยมาก่อน แต่สาร wedelolactone ซึ่งมีรายงานว่าพบในกะเม็งตัวเมีย (Jahan et al., 2014) และกระดุมทองเลื้อย (Balekar et al., 2014) ด้วยเช่นกัน ดังนั้น wedelolactone จึงน่าจะเป็นสารตัวหนึ่งที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในกะเม็งตัวเมียและกระดุมทองเลื้อย แต่การที่กระดุมทองเลื้อยมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ที่โดดเด่นกว่าพืชอีก 2 ชนิด แสดงให้เห็นว่าน่าจะยังมีสารสำคัญอื่นๆ ที่ร่วมออกฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่ควรศึกษาวิจัยเพิ่มเติม เมื่อนำสารสกัด ethanol กระดุมทองเลื้อยมาเปรียบเทียบกับพืชสมุนไพรที่มีความโดดเด่นด้านการต้านอักเสบ คือ ไพล พบว่าไพลมีค่า IC_{50} ในการยับยั้งการหลั่ง NO ต่ำกว่าเล็กน้อย คือ 20.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อินทัช และคณะ, 2557) ในขณะที่กระดุมทองเลื้อยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 33.43±4.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การที่พืชทั้ง 3 ชนิดแสดงฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO ได้ดีกว่ายา diclofenac ซึ่งเป็นยากลุ่ม nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) อาจเนื่องมาจากการหลั่ง NO เป็นเพียงกลไกหนึ่งในกระบวนการอักเสบ ยังมีกลไกอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ อาทิเช่น การหลั่งสาร cytokine ต่างๆ ดังนั้นการสรุปว่าสารสกัดพืชใดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีหรือไม่ จำเป็นต้องใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบที่หลากหลายเพื่อยืนยันผลต่อไป เช่น ฤทธิ์ยับยั้งสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบได้แก่ prostaglandin E2 (PGE_2), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) และ interleukin (IL-1β, IL-6 และ IL-10) เป็นต้น รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการพัฒนาสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดไปใช้เพื่อรักษาหรือบรรเทาอาการที่มีสาเหตุมาจากกระบวนการอักเสบต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีเพียงสารสกัด ethanol กะเม็งตัวผู้ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดดเด่นโดยมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดน้ำ ส่วนสารสกัดกะเม็งตัวเมียและกระดุมทองเลื้อย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ค่อนข้างต่ำ คือมีค่า EC_{50} มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่รายงานว่าสารสกัดกะเม็งตัวเมียด้วย 70% และ 99% ethanol มีค่า EC_{50} มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (กรกนก และคณะ, 2020) ในขณะที่งานวิจัยของกระดุมทองเลื้อยที่สกัดด้วย methanol และ chloroform มีค่า EC_{50} 68.0± 0.36 และ 75.0 ± 0.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Poornima et al., 2021) ผลการเปรียบเทียบค่า EC_{50} ของกระดุมทองเลื้อยที่ใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันในงานวิจัยครั้งนี้กับงานวิจัยก่อนหน้า แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ จะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่า อาจเนื่องมาจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดและละลายสารต่าง ๆ ออกมาได้หลากหลายรวมถึงองค์ประกอบของแป้ง น้ำตาลและอื่น ๆ โดยเฉพาะสารที่มีขั้วสูง เพราะน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง ในขณะที่การใช้สารอินทรีย์ที่ไม่มีน้ำหรือมีน้ำเป็นส่วนประกอบที่น้อยกว่าเป็นตัวสกัดจะมี

ความจำเพาะเจาะจงต่อสารมากกว่า ทำให้สารสกัดที่ได้เป็นสารสกัดเฉพาะกลุ่ม มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า รวมถึงมีสภาพขั้วเป็นกลางมากกว่าน้ำ ทำให้สกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีขั้วปานกลางออกมาได้ดีกว่า (Dai, 2010)

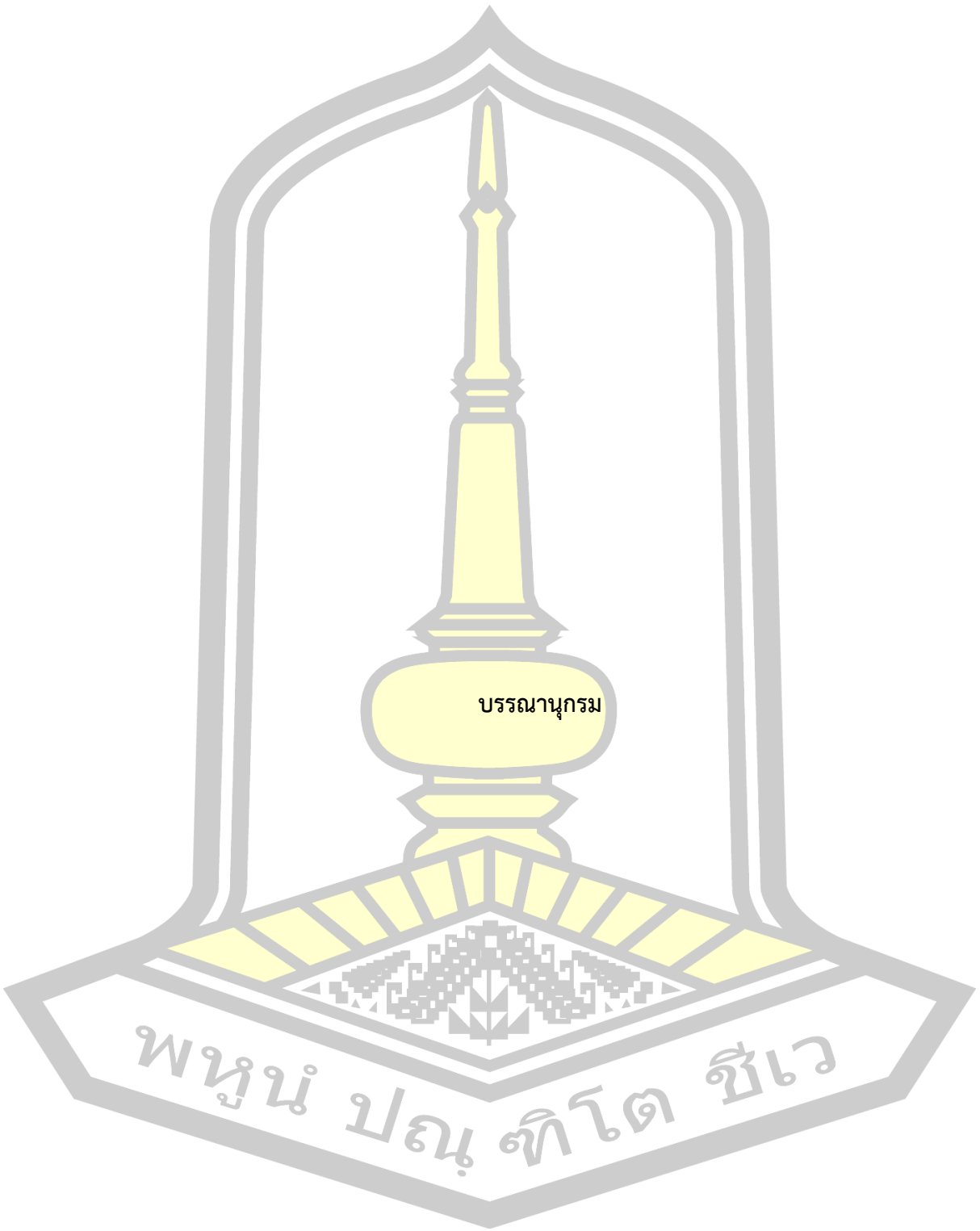
การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay พบว่าสารสกัด ethanol ของพืชแต่ละชนิดมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดน้ำ โดยสารสกัดกะเม็งตัวผู้มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดของพืชอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณฟีนอลิกรวมที่วิเคราะห์ได้มีความสัมพันธ์แปรผันตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยสารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวผู้ที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุดก็มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด และค่ารองลงมาคือสารสกัดน้ำของกะเม็งตัวผู้ ส่วนสารสกัดกะเม็งตัวเมียและกระดุมทองเลื้อยที่รายงานปริมาณฟีนอลิกรวม ระหว่าง 12.88 - 25.63 มิลลิกรัม GAE/สารสกัด 1 กรัมนั้น ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ผู้วิจัยกำหนดความเข้มข้นสูงสุดในการทดลองที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ของค่าดังกล่าวได้ แต่ก็สามารถคาดการณ์ได้ว่าค่า EC_{50} จะมีความสัมพันธ์แปรผันตรงกับปริมาณฟีนอลิกรวมเช่นกัน ปริมาณฟีนอลิกรวมที่มีความสัมพันธ์แปรผันตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH นี้ สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ระบุว่าสารสกัดที่มี total polyphenolic สูงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นกันโดยมีความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรง (Shrestha et al., 2006; Aryal et al., 2019)

การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) วิเคราะห์ผลที่ความยาวคลื่น 254 nm, 366 nm และ spray anisaldehyde/H_2SO_4 พบว่าพืชทั้ง 3 ชนิด มีรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีที่แตกต่างกัน โดยกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ที่จัดซื้อจากร้านขายเครื่องยาสมุนไพรมีลักษณะแถบสารรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีตรงกับสมุนไพร authentic แตกต่างกันเพียงความเข้มของแถบสาร อาจคาดการณ์ได้ว่าน่าจะมีสารบางตัวที่มีปริมาณสารที่แตกต่างกัน ระบบตัวทำละลายที่แยกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ชัดเจนที่สุดคือ chloroform : hexane : ethanol (6:3:1) โดยมีแถบสารที่แตกต่างกันอย่างน้อย 1 จุด อย่างไรก็ตามรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของพืชทั้ง 3 ชนิด ปรากฏแถบสารที่มีสีและค่า hR_f ตรงกันหลายจุด ซึ่งอาจหมายถึงการมีสารชนิดเดียวกัน เนื่องจากพืชทั้ง 3 อยู่ในวงศ์ Asteraceae เช่นเดียวกัน และโดยเฉพาะอย่างยิ่งแถบสารของกะเม็งตัวผู้และกระดุมทองเลื้อย ที่หลัง spray anisaldehyde/ H_2SO_4 แล้ว ให้แถบสารที่มีสีและค่า hR_f ตรงกันทุกจุด แตกต่างเพียงความเข้มของแถบสาร เนื่องจากพืชทั้ง 2 อยู่ในสกุลเดียวกัน คือ สกุล *Sphagneticola* และมีความใกล้ชิดทางอนุกรมวิธานมาก จึงเป็นไปได้ว่านอกจากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่มีความใกล้เคียงกันมากแล้ว องค์ประกอบสารเคมีในพืชทั้ง 2 ก็อาจมีความใกล้เคียงกันมากด้วย การใช้ spray anisaldehyde/ H_2SO_4 จะสามารถตรวจสอบสารกลุ่ม terpenes และ

steroids ได้ดี โดย monoterpenes จะให้สีฟ้า triterpenes ให้สีม่วง และ steroids ให้สีเทา (Gerlach et al, 2018) เทคนิค TLC ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถระบุแถบสารที่ตรงกับสารมาตรฐาน apigenin อาจเนื่องมากจาก apigenin มีปริมาณน้อยจนไม่ปรากฏเป็นแถบสารที่ชัดเจน หรืออาจเกิดจากมีสารอื่นที่มีค่า hR_f ใกล้เคียงกัน และบดบังแถบสาร apigenin ดังนั้น หากต้องการระบุสารบ่งชี้ (marker) apigenin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavonoids อาจใช้ spray reagent ที่มีความจำเพาะต่อสารกลุ่ม flavonoids เช่น aluminium chloride, antimony (III) chloride เป็นต้น (Ghosh et al., 1987) หรืออาจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จัดทำเป็น HPLC fingerprint ซึ่งวิธีนี้มีความสามารถในการแยกสารได้มากขึ้น peak จะถูกแยกด้วยความละเอียดที่สูงขึ้น และพื้นที่ใต้ peak สามารถบอกถึงปริมาณของสารได้

การศึกษาครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่ากะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย มีความแตกต่างกันทั้งเอกลักษณ์ทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยการทำรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีสามารถแยกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ ส่วนฤทธิ์ทางชีวภาพตามการใช้ทางการแพทย์พื้นบ้านที่เกี่ยวข้องกับการรักษาแผล และลดอาการอักเสบ บวม พบว่า กะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้มีฤทธิ์ต้านจุลชีพใกล้เคียงกัน กะเม็งตัวผู้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูง และแม้ว่ากระดุมทองเลื้อยจะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่โดดเด่น แต่กะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ก็มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีเช่นกัน โดยมีค่า IC_{50} ดีกว่ายามาตรฐาน diclofenac ดังนั้น กะเม็งตัวผู้จึงเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพที่ควรศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในด้านอื่นๆ และที่สำคัญคือการขยายพันธุ์เนื่องจากไม่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและไม่มีจำหน่ายในร้ายขายสมุนไพรในประเทศไทย และเนื่องจากกะเม็งตัวผู้และกระดุมทองเลื้อยมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน หากเกิดความเข้าใจผิดจากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ใกล้เคียงกันและการเผยแพร่ข้อมูลรูปภาพกระดุมทองเลื้อยในชื่อกะเม็งตัวผู้ในสื่อต่างๆ อย่างไม่ถูกต้องทำให้นำพืชมาใช้ไม่ถูกต้น ก็อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการใช้สมุนไพรทั้ง 2 ต้นได้

สารสำคัญที่พบเหมือนกันในพืชทั้ง 3 ชนิดที่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้าน คือสาร wedelolactone ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาสารจากกะเม็งตัวเมีย สาร wedelolactone มีรายงานว่าสามารถต้านเชื้อจุลชีพได้กว้างขวาง (Dalal et al., 2010; Lenza et al., 2009) และยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Shen et al., 2017; Yuan et al., 2013) ต้านมะเร็ง (Xu et al., 2014) ต้านเบาหวาน (Shahab *et al.,* 2018) การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแยกสกัดให้ได้สารสกัด wedelolactone rich fraction จึงอาจนำไปสู่การพัฒนาสารสกัดพืชทั้ง 3 ชนิด โดยเฉพาะกระดุมทองเลื้อยที่เป็นพืชที่หาได้ง่าย และขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว เพื่อเพิ่มศักยภาพการใช้พืชสมุนไพรเหล่านี้ต่อไปในอนาคตได้



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กรกนก เอกโยธินวงศ์, นิรมล ศากยวงศ์, สมจิต ดำริห์อนันต์ และ วรนันท์ นาคบรรพรรต. (2002). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกะเม็ง. *Thai Journal of Science and Technology*, *9*(1), 45-57.

กรมพัฒนาแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. (2553). *บัญชียาแผนไทย สำหรับโรงพยาบาลและหน่วยบริการสาธารณสุข พ.ศ.2553*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ก่องกานดา ชยามฤต. (2528). *สมุนไพร ตอนที่ 4.* ฝ่ายพฤกษศาสตร์ป่าไม้ กองบำรุง กรมป่าไม้ กรุงเทพฯ: ชุติมาการพิมพ์.

กลุ่มงานพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช วันที่สืบค้น 8 มีนาคม2564. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก https://www.dnp.go.th/botany/mplant/search. html?group=localname

คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ. (2561). บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561. วันที่สืบค้น 4 มีนาคม 2563 [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://fda.moph.go.th/sites/drug/Shared%20Documents/New/nlem2561.PDF.

นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. (2542). *สมุนไพรไม้พื้นบ้าน เล่ม 1*. กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด.

พิมพ์พรรณ ไพบูลย์หวังเจริญ, อุษา เก็จวลีวรรณ และ ณิชารีย์ เนตรทอง. (2555). คัมภีร์ธาตุพระนารายณ์ ฉบับใบลาน (ตำราโอสถพระนารายณ์) ชุดตำราภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย ฉบับอนุรักษ์ กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก ในพระบรมราชูปถัมภ์.

พินิจ เจ๊กอิน และ โสรยา แก้วลา. (2556). *การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก*. โครงงานวิจัยครุศาสตรบัณฑิต. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.

พรทิพย์ เต็มวิเศษ, บุษราภรณ์ ธนสีลังกูร, ธนาธิป ฉิมแพ และ ขวัญเรือ จันทม. (2555). *ประมวลสรรพคุณสมุนไพรไทย*. กรุงเทพฯ: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2553). ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าและสารสมุนไพรสกัดสดบางชนิดใน การยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus. วารสารพิษวิทยาไทย, 25*(1), 15-28.

มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์ไทยเดิม. (2452). *พระยาพิศณุประสาทเวช แพทย์ศาสตร์สงเคราะห์*

เล่ม 1. กรุงเทพฯ: ศุภวนิชการพิมพ์.

ยุวดี วงษ์กระจ่าง และ วสุ ศุภรัตนสิทธิ. (2558). *โทษจากการใช้สมุนไพรที่ควรรู้ (ตอนที่ 2).* วันที่สืบค้น 4 มกราคม 2563. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จากhttps://www.pharmacy.mahidol.ac.th

ราชัน ภู่มา และ สมราน สุดดี. (2557). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2557. กรุงเทพฯ: สำนักหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

ราชบัณฑิตยสถาน. (2557). *อนุกรมวิธานพืช อักษร ก* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: หจก.อรุณการพิมพ์.

วนิดา ไทรชมภู, ภรณ์ประภา อ่วมนุช, กัลยา แสงฉวี และ ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร. (2020). การพัฒนาเม็ดบีดส์จากน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus. Journal of Science* and Technology, *1*(1), 24-34.

วิมลพรรณ รุ่งพรหม, ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล, สัญญา เขียวไสว และ มุกดา ทรงไตรย์. (2553). สารยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้บำบัดโรคเบาหวาน .*วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 41*(3/1)(พิเศษ), 301-304.

วิทยา บุญวรพัฒน์. (2554). *สารานุกรมสมุนไพรไทย-จีนที่ใช้บ่อยในประเทศไทย.* กรุงเทพฯ: สมาคมศาสตร์การแพทย์แผนจีนในประเทศไทย.

วิภัสรา ศรีวิเศษ, เอ็นดู เทศารินทร์ และ วิชุดา พาเรื่อง. (2560).*ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพและฤทธิ์ต้านอักเสบของกะเม็ง กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย.* (โครงการวิจัย). คณะเภสัชศาสตร์: มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540). *ร่วมอนุรักษ์มรดกไทย สารานุกรมสมุนไพร*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2564). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). วันที่สืบค้น 8 มีนาคม 2564 [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/fact_sheet/11_57.pdf

สำนักยากลุ่มพัฒนาระบบงานระบบยาแห่งชาติและสารสนเทศ. (2556). *ยาผสมเพชรสังฆาตสูตรที่ 2* วันที่สืบค้น 12 พฤศจิกายน 2563. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://ndi.fda.moph.go.th/Uploads/main_drug_file/20171021185635.pdf

โสภณ เมฆธน, ชุติมา บุณยประภัศร, ธีรภัทร ประยูรสิทธิ, วุฒิชัย ดวงรัตน์, ประนอม คำเที่ยง, สุริยะ วงศ์คงคาเทพ, ปณิธาน จินดาภู, รัชฎา สุริยกุล ณ อยุธยา และ พีระพล สุทธิวิเศษศักดิ์. (2559). *แผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพร ฉบับบที่ 1 พ.ศ. 2560-2564*. นนทบุรี: ทีเอส อินเตอร์พริ้นท์.

อินทัช ศักดิ์ภักดีเจริญ, สุนิตา มากชูชิต และ อรุณพร อิฐรัตน์. (2557). การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดสมุนไพรผสม. *ธรรมศาสตร์เวชสาร*, 14, 7-12.

อุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ. (2010). กะเม็ง. วันที่สืบค้น 12 พฤศจิกายน 2562. [ออนไลน์] . เข้าถึงได้จาก https://sireepark.mahidol.ac.th/th/search

Ana, L., Eulina, F., Ana, P., Ruan, A., and Mateus, C. (2019). Phytochemical screening and antimicrobial activity testing of crude hydroalcoholic extract from leaves of *Sphagneticola trilobata* (Asteraceae). *Ciencia Rural Journal, 49*(4), 1-6.

Arunachalam G., Subramanian, N., Pazhani, G.P. and Ravichadran, N. (2009). Anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Eclipta prostrata* L. (Astearaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 3*(3), 97-100.

Arvigo, R. and Balik, M. (1993). Rainforest remedies. In: One Hundred Healing Herbs of Belize. Lotus Press, *Twin Lakes*, 221.

Aryal, S., Baniya, M.K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R. and Koirala, N. (2019). Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants (Basel), 8*(4), 96.

Balekar, N., Nakpheng, T., Katkam, N.G. and Srichana, T. (2012). Wound healing activity of entkaura-9(11),16-dien-19-oic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *Phytomedicine, 19*(13), 1178-1184.

Balekar, N., Nakpheng, T. and Srichana, T. (2014). A Phytochemical and Pharmacological *Wedelia trilobata* L. Review. *Chiang Mai Journal of Scienceis, 41*(3), 590-605.

Bakht, J., Islam, A. and Shafi, M. (2011). Antimicrobial potentials of *Eclipta alba* by well diffusion method. African Journal of Biotechnology, *10*(39), 7658-7667.

Chattopadhyay, K. and Chattopadhyay, B.D. (2008). “Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein”. *Journal of researchand education in indian medicine*, 127, 571-576.

Chin, F.C., Wen, Y.H., Hong, Y.G., Bo, R. and Wang, P. (2014). Antioxidative and UVB Protective Effect of Water Extract of *Eclipta prostrata* L. *The Scientific World Journal, 10*(11), 1-8.

Dai, J. (2010). Plant Phenolics Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules Journal,* 15, 7313-7352.

Darah, I., Lim, SH. and Nithianantham, K. (2013). Effects of Methanol Extract of *Wedelia chinensis* Osbeck (Asteraceae) Leaves against Pathogenic Bacteria with Emphasise on Bacillus cereus. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *75*(5), 533–539.

Dalah, S., Kataria, S.K., Sastry, K.V. and Rana, S.V.S. (2010). Phytochemical Screening of Methanolic Extract and Antibacterial Activity of Active Principles of Hepatoprotective Herb, *Eclipta alba*. *International Journal of Ethanobotanical Reseach,* 14, 248-58.

Dhandapani, R. (2007). Hypolipidemic activity of *Eclipta prostrata* (L.) L. leaf extract in atherogenic diet induced hyperlipidemic rats. *Indian Journal of Experimental Biology, 45*(7), 617-619.

Gerlach, A.L., Gadea, A., Silveira, R.M., Clerc, P. and Devehat, F.L. (2018). The Use of anisaldehyde sulfuric acid as an alternative spray reagent in TLC analysis reveals three classes of compounds in the genus Usnea Adans. (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota). Preprint. [online]. Retrieved May 20, 2021, Available from https://www.preprints.org/manuscript/201802.0151/v1

Ghada, M., Suzan, F. and Salah, A. (2005). Comparative study for the protective effect of Silymarin, *Eclipta alba* extract against high fat diet induce insulin resistance and hyperglycemia in rats. *Journal* of *Drug Research and Development, 26*(1), 63-71.

Ghosh, P., Sil, P. and Thakur, S. (1987). Spray reagent for the detection of coumarins and flavonoids on thin-layer plates. *Journal of Chromatography*, 403, 285-287.

Govindappa, M., Naga, S.S., Poojashri, M.N., Sadananda, T.S. and Chandrappa C.P. (2011). Antimicrobial, antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory activity of ethanol extract and active phytochemical screening of *Wedelia trilobata* (L.) *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 3, 43-51.

Guzik, T.J., Korbut, R. and Adamek, G.T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, *54*(4), 469-487.

Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine,* 46, 531-542.

Hussain, I., Khan, N., Ullah, R., Shanzeb, A.S., Khan, F.A. and Yaz, S. (2011). Phyto-chemial, physiochemical and anti-fungal activity of *Eclipta alba*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5*(19), 2150-2155.

Hyeon, Y.L. (2017). Enhancement of Skin Anti-Inflammatory Activities of *Eclipta prostrata* L. from the Ultrasonic Extraction Process. *Applied Sciences*, 7, 1-10.

Jahan, R., Al-Nahain, A., Majumder, S. and Rahmatullah, M. (2014). Ethnopharmacological Significance of *Eclipta alba* (L.) Hassk. (Asteraceae). *International Scholarly Research Notices*, (8), 1–22.

Jung, H.W., Seo, U.K., Kim, J.H., Leem, K.H. and Park, Y.K. (2009). Flower extract of Panaxnotoginsengattenuates lipopolysaccharideinduced inflammatory response via blocking of NF-kB signaling pathway in murine macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, *122*(2), 313-319.

Karthikumar, S., Vigneswari, K. and Jegatheesan, K. (2007). Sceening of antibacterial and antioxidant activities of leves of *Eclipta prostrata* (L), *Scientific Research and Essay, 2*(4),101-4.

Kokate, C.K., Purohit, A.P. and Gokhale, S.B. (2006). *Pharmacognosy (34 th ed),* Nirali Prakashan: Pune.

Kushad, M., Masiuymas, J., Lali, A.N. and Kait, W. (2003). *Health promoting phytochemicals in vegetables*. *Horticultural reviews*, 28, 85-125.

Kumar, N. (2014). Survey on Medicinal Plants used in Indian System of Medicine tehsil Joginder

Kumar, S.P., Kumar, B.S., Chandana, V.R., Vijaykumar, M., Ojha, S.K. and Bavani, M.E. (2012). "Antisecretory and antiulcer activities of *Eclipta alba* Linn. In rats," in Proceedings of the 5th World Ayurveda Congress, Oral Presentation. *Ancient Science of Life, 32*(1), 3.

Kumudini, T., Shubha, G., Deepak, K., Shirish, A. and Anil K. (2013). Antimicrobail activity of *Sphagneticola trilobata* (L.) PRUSKI, against some human pathogenic bacteria and fungi. *International Quarterly Journal of life sicences, 8*(2), 695-700.

Lenza, V.A., Morel, L.J.F., Juliana, S., Coppede, J.S., Fernandes, V.C., Martinez, N.M., Franca, S.C., Beleboni, R.O., Pereira, P.S. and Fachin, A.L. (2009). Antimicrobial activities of ethanol extract and coumestans from eclipta alba (L.) Hassk

(Asteraceae). *Latin American Journal of Pharmacy,* 26, 863–868.

Lin, W.C., Wen, C.C., Chen, Y.H., Hsiao, P.W., Liao, J.W. and Peng, C.I. (2015). Integrative Approach to Analyze Biodiversity and Anti-Inflammatory Bioactivity of *Wedelia* Medicinal Plants. *Public Library of Science, 10*(16), 1-24.

Makchuchit, S., Rattarom, R. and Itharat, A. (2017). The anti-allergic and anti inflammatory effects of Benjakul extract (a Thai traditional medicine), its constituent plants and its some pure constituents using in vitro experiments. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 1018–1026.

Manjamalai, A., Shukoor, S.A., Haridas, A. and Grace, V.M. (2011). Evaluation of antifungal and Anti-inflammatory effect on methanol extract of *Wedelia chinensis* leaves. *Pharmaceutical and Biomedical Research, 2*(1), 30-37.

Manvar, D., Mishra, M., Kumar, S. and Pandey, V.N. (2012). Identification and evaluation of anti-hepatitis C virus phytochemicals from *Eclipta alba*. *Journal of* Ethnopharmacology*, 144*(3), 544-545.

Meena, A.K., Rao, M.M., Meena, R.P. and Panda, P. (2011). Pharmacological and phytochemical evidences for the plants of Wedelia genus : A Review. *Asian Journal Pharmaceutical Research*, *1*(1), 1-6.

Merina, P.D. and Selva, K.S. (2013). Preliminary Phytochemical Analysis Of Illicium verum and *Wedelia chinensis*. *International Journal of PharmTech Research, 5*(2), 324-329.

Mequanint, W., Makonnen, E. and Urga, K. (2011). In vivo Anti-inflammatory activities of leaf extracts of *Ocimum lamiifolium* in mice model. *Journal of Ethnopharmacology, 134*(1), 32-36.

Mishra, G., Singh, P., Garg, V.K., Parvez, N. and Yadav, S. (2011). Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Wedelia chinensis*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences* and *Research, 2*(1). 25-29.

Mizokami, S., Arakawa, N. and Ambrosio, S. (2012). Kaurenoic acid from *Sphagneticola trilobata* inhibits inflammatory pain: effect on cytokine production and activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. *Journal of Natural Products*, *75*(5), 896-904.

Mottakin, A., Chowdhury, R., Haider M., Rahman, K., Hasan, C. and Rashid, M. (2004). Cytotoxicity and antibacterial activity of extractives from *Wedelia calendulacea*. *Elsevier journal*, 75. 355–359.

Murugaian, P., Ramamurthy, V., and Karmegam, N., (2004). Hepatoprotective activity of *Wedelia calendulacea* against acute hepatotoxicity in rats. *Agricultural and Biological Sciences*, *4*(6), 685-687.

Nazim, U., Atiar, R., Nazim, A., Sohel, R., Rasheda, A. and Masudul, A. (2010). Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of ethanol extract. *International Journal of Biological and Medical Research, 1*(4), 341-346.

Nithin, R., Padmaja, V., Shaji, S., Shiji, S. and Ancy P. (2018). Comparative Study on Antimicrobial Activity of *Wedelia chinesis* and *Wedelia calendulaceae*, *International Research Journal of Pharmacy and Medical Sciences*, *1*(3), 49-51.

Nomani, I., Mazumder, A. and Chakraborthy, G.S. (2013). *Wedelia chinensis* (Asteraceae)-an overview of a potent medicinal herb. *International Journal of PharmTech Research*, *5*(3), 957–964.

Pandy, M.K., Singh, G.N., Sharma, R.K. and Lata, S. (2011). Antibacterial activity of *Eclipta alba* (L.) Hassk. *Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1*(7), 104-107.

Patel, M., Rai, D. and Mishra, S. (2009). Assessment of anti-oxidant and wound healing potential of *Eclipta alba, Centella asiatica* and their combination with *Piper nigrum. Journal of Natural Remedies, 9*(1), 21-26.

Peng, C., Chung, K. and Li, H. (1998). *Sphagneticola trilobata*. Flora of Taiwan (2 nd ed), Taiwan. Department of botany, 39. 287-297.

Pietta, P. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.

Poornima, M.C. and Salman, M.I. (2021). Study of antioxidant properties and phytochemical constituents of *Sphagneticola trilobata* L. leaves extract. *International Journal of Pharmaceutical Sciences* and *Research, 12*(1), 569-75.

Prabu, K., Kanchana, N. and Mohamed, S.A. (2011). Hepatoprotective effect of *Eclipta alba* on paracetamol induced liver toxicity in rats. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, *1*(3), 75-79.

Qi, M.L., Hai, Y.Z., Xian, K.Z. and Jian, G.J. (2012). *Eclipta prostrata* L. phytochemicals: Isolation, structure elucidation, and their antitumor activity. *Food and Chemical Toxicology, 50*(11), 4016-4022.

Rehana H. and Nagarajanb N. (2013). GC-MS determination of bioactive components of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merrill. *Journal of Chemical and Pharmaceutical*, *5*(4), 279-285.

Rungrot, C., Somchai, B., Ratchanok, P., Supaluk, P., Somsak, R. and Virapong, P. (2015). Bioactive triterpenoids, antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of *Eclipta prostrata* Linn. *Journal of Applied Pharmaceutical Science, 5*(03), 46-50.

Sadik, A., Zainab, A.l. and Mouruj, A.A. (2013). The extraction and partial purification of wedelolactone from local *Eclipta alba* Plant. *Iraqi Journal of Science*, 54, 1084-1089.

Sawant, M., Isaac, J.C. and Narayanan, S. (2004). Analgesic studies on total alkaloids and alcohol extracts of *Eclipta alba* (Linn.) Hassk. *Phytotherapy Research, 18*(2), 3-111.

Shahab, U., Faisal, M., Alatar, A. and Ahmad, S. (2018). Impact of wedelolactone in the anti-glycation and anti-diabetic activity in experimental diabetic animals. *InternationalUnion of Biochemistry and Molecular Biology, 70*(6), 547-552.

Shrestha, P. and Dhillion, S .(2006). Diversity and traditional knowledge concerning wild food species in a locally managed forest in Nepal. *agroforestry systems journal,* 66, 55–63.

Shen, P., Yang, X., Jiang, J., Wang, X., Liang, T. and He, L. (2017). Wedelolactone from *Eclipta alba* inhibits lipopolysaccharide-enhanced cell proliferation of human renal mesangial cells via NF-**K**B signaling pathway. *American Journal of Translational Research*, *9*(5), 2132–2142.

Sies, H., Stahl, W. and Sundquist, A. (1992). “Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, betacarotene and other carotenoids”. *Annals of the New York Academy of sciences*, 368, 7-19.

Sureshkumar, S., Sivakumar, T., Chandrasekar, M. and Joghee, N. (2006). Investigating the anti-inflammatory and analgesic activity of leaves of *wedelia chinensis* [osbeck] merr. In standard experimental animal. *Iranian Journal of Pharmaceutical*

Research, *5*(2), 123-129.

Taddei, A. and Rosas, A.J. (1999). Antimicrobial activity of *Wedelia trilobata* crude extracts. *International Journal Of Phytotherapy and Phytopharmcology*, *6*(2). 133-134.

Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., Tansakul, P., Cheenpracha, S. and Karalai, C. (2011). Anti-inflammatory constituents from *Eclipta prostrata* using RAW 264.7 macrophage cells. *Phytotherapy Research, 25*(9). 131-136.

The plant list. (2010). *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski. Accessed 18 th November 2019. [online]. Available from: http://www.theplantlist.org/tpl/record/gcc-5859

Uddin, N., Rahman, A., Ahmed, N.D., Rana, S., Akter, R. and Chowdhury, A.M. (2010). Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of *Eclipta alba* ethanol extract. *International Journal of Biological and Medical Research, 1*(4), 341-346.

Uthairung, A., Rattarom, R. and Mekjaruskul, K. (2020). Cosmeceutical applications of essential oils of Amomum biflorum Jack from whole plant and rhizome. *Thai Journal of Science and Technology*, *9*(5), 680-692.

Verma, N., Khosa, R. and Garg, K. (2008). Wound healing activity of *Wedelia chinensis* leaves. *Pharmacologyonline*, *2*(3), 139-145.

Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.

Wagner, H., Geyer, B., Kiso, Y., Hikino, H. and Rao, G.S. (1986). Coumestans as the main active principles of the liver drugs *E.clipta alba* and *Wedelia calendulaceae*, *Planta Medica*, 34, 370-374.

Xu, D., Lin, T.H., Yeh, C.R., Cheng, M.A., Chen, L.M., Chang, C. and Yeh, S. (2014). The Wedelolactone Derivative Inhibits Estrogen Receptor-Mediated Breast, Endometrial, and Ovarian Cancer Cells Growth. *BioMed Research International,* 1-11.

Yuan, F., Chen, J., Sun, P.P., Guan, S. and Xu, J. (2013). Wedelolactone inhibits LPS-Induced pro-Inflammation via NF-kappaB pathway in RAW 264.7 cells. *Journal of Biomedical Science, 20*(1). 1-11.

Zafar, R. and Sagar, B. (1999). In vitro plant regeneration of *Eclipta alba* and increased

production of coumestans. *Fitoterpia*, *70*(4), 348-356.

Zhu, S., Yilin, C., Yousheng, C. and Lin, YR. (2011). Asteraceae. *Flora of China Vol. 20-21*; Science press (Beijing) and Missouri botanical garden press (st.Louis), 1-8.

Zhu, S., Yilin, C., Yousheng, C. and Lin, YR. (2011). *Eclipta prostrata*. *Flora of China Vol.20-21*; Science press (Beijing) and Missouri botanical garden press (st.Louis), 869.

Zhu, S., Yilin, C., Yousheng, C. and Lin, YR.(2011). Heliantheae**.** *Flora of China Vol. 20-21*; Science press (Beijing) and Missouri botanical garden press (st.Louis), 852-878.

Zhu S, Yilin C, Yousheng C. and Lin YR. (2011). *Sphagneticola calendulacea*. *Flora of China; Vol. 20-21*; Science press (Beijing) and Missouri botanical garden press (st.Louis), 871.

Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A. Dennis, D.A. and Barrow, C.J. (2006). A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, *18*(3), 445-450.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB)

1. ชั่ง TSB 15 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร เติม DI water 500 มิลลิลิตร นำไปต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส
2. ปิเปตอาหาร TSB ใส่ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด
3. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
4. แบ่ง TSB ลงในหลอดทดลองจำนวน 3 หลอด ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขี่ยเชื้อ *S. aureus, P. aeruginosa* และ MRSA จาก slant agar มา 1 โคโลนี จุ่มเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร TSB
5. นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA)

1. ชั่ง MHA 38 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติม DI water 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส ระหว่างรอต้องใช้แท่งแก้วคนตลอดเวลา
2. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45 องศาเซลเซียส เทลงplate
3. ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งแล้วเก็บในอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ที่ความเข้มข้น 0.1 mM ใน methanol

1. ชั่ง DPPH 1.972 มิลลิกรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร
2. เติม methanol analytical grade ประมาณครึ่งหนึ่งของ volumetric flask เขย่าให้เข้ากัน
3. ปรับปริมาตรจนถึงขีดที่กำหนด ให้มีความเข้มข้น 0.1 mM

การเตรียมสารสเปรย์ anisaldehyde/H_2SO_4

1. เติม anisaldehyde 0.5 มิลลิลิตร, acetic acid 50 มิลลิลิตร กรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ คนให้เข้ากัน
2. เก็บใส่ขวดสเปรย์

การเตรียม 0.04 M HCl ใน isopropanol

1. ตวง concentrated HCL (38%) 3.31 มิลลิลิตร
2. ค่อยๆ รินผสมลงใน isopropanol 996.69 มิลลิลิตร
3. เก็บในขวดแก้วที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม MTT

1. ชั่ง MTT ปริมาณ 50 มิลลิกรัม
2. ละลายด้วย PBS 10 มิลลิลิตร เก็บในขวดกันแสง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวนิศารัตน์ สังคะรัมย์

วันเกิด 4 พฤศจิกายน 2533

สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 58 หมู่ 6 ตำบลลำปลายมาศ อำเภอลำปลายมาศ จังหวัดบุรีรัมย์ รหัสไปรษณีย์ 31130

ตำแหน่งหน้าที่การงาน แพทย์แผนไทย

สถานที่ทำงานปัจจุบัน โรงพยาบาลบุรีรัมย์ เลขที่ 10/1 ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ รหัสไปรษณีย์ 31000

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2548 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนลำปลายมาศ
อำเภอลำปลายมาศ จังหวัดบุรีรัมย์

พ.ศ. 2552 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนลำปลายมาศ
อำเภอลำปลายมาศ จังหวัดบุรีรัมย์

พ.ศ. 2556 (พท.บ.) สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

พ.ศ.2564 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.)
สาขาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ทุนวิจัย ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ สำหรับนิสิตบัณฑิตศึกษา คณะเภสัชศาสตร์ ประจำ ปีงบประมาณ พ.ศ .2562

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว