โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	ผลของสารสกัดจากกระชาย *Boesenbergia rotunda* ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	นายโภคิน ช่างทุ่งใหญ่
เลขประจำตัวนิสิต	5932135623
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของสารสกัดจากกระชาย *Boesenbergia rotunda* ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก

นายโภคิน ช่างทุ่งใหญ่

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

Effects of *Boesenbergia rotunda* extract on cervical cancer cells

Mr. Pokin Changthungyai

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Bachelor of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2019

ชื่อเรื่อง	ผลของสารสกัดจากกระชาย *Boesenbergia rotunda* ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	โภคิน ช่างทุ่งใหญ่
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ
ปีการศึกษา	2562

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

.....รัชนีกร ธรรมโชติ.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานฯ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ)

....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานฯ ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

.....อัญชิษฐา สัจจารักษ์.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานฯ ร่วม
(อาจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจารักษ์)

.....เพลินพิศ.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง ผลของสารสกัดจากกระชาย *Boesenbergia rotunda* ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก

ชื่อนิสิต โภคิน ช่างทุ่งใหญ่

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ

ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

พืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ประกอบด้วยชนิดพืชที่มีความหลากหลายสูง นับว่าเป็นวงศ์พืชที่ใหญ่วงศ์หนึ่งของโลกประมาณ 1,500 ชนิด และมีการกระจายตัวในประเทศเขตร้อนชื้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีภูมิอากาศแบบร้อนชื้น รวมถึงในประเทศไทยก็มีพืชในวงศ์ขิงอยู่ราว ๆ 300 ชนิด และ มีการใช้พืชในวงศ์นี้ไปสร้างประโยชน์มากมายด้วยเอกลักษณ์เฉพาะของกลิ่นที่มาจากสารหอมละเหยภายใน ทั้งใช้ในการประกอบอาหาร ตลอดจนอุตสาหกรรมเครื่องหอม อีกทั้งพืชในวงศ์ขิงยังมีฤทธิ์ทางยาที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาอาการต่าง ๆ ของโรคได้ การศึกษานี้จึงสนใจที่จะนำพืชในวงศ์นี้ คือกระชาย *(Boesenbergia rotunda)* มาศึกษาผลของสารสกัดที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปที่ 0.1, 1, 10, 100 ug/ml การตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูกก็สูงขึ้นตามลำดับ อีกทั้งการศึกษาวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของกระชายกับพืชในวงศ์ขิง โดยใช้ยีน *18S rRNA* ยีน *5.8S rRNA* และ ยีน *matK* พบว่ากระชายในประเทศไทยมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ กับกระชายจากประเทศอินเดียมากกว่ากระชายจากประเทศจีน ฟิลิปปินส์ และเวียดนาม มีความสัมพันธ์กันทางวิวัฒนาการ

คำสำคัญ: กระชาย, มะเร็งปากมดลูก, วิวัฒนาการชาติพันธุ์, *18S rRNA*, *5.8S rRNA*, *matK*

Title	Effects of *Boesenbergia rotunda* extract on cervical cancer cells
Student name	Pokin Changthungyai
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Assist. Prof. Dr. Rachaneekorn Tammachote
Acardemic year	2019

Abstract

Zingiberaceae is one of the most variety family of plant. Moreover, it can be one of the biggest family which contain about 1,500 species into and spread in spacious part of Southeast Asia where is the tropical zone. Especially in Thailand, there are approximately 300 species. Thai people well known about essential oil in *Zingiberaceae* which can use for various advantages such as cooking, portion industry untill to pharmaceutical industry. In addition it has effect for release and cure some symptom so in this reserch interest in *Boesenbergia rotunda* to prevent proliferation in cervical cancer. In the result, When the cells were incubated with 0.1, 1, 10, 100 ug/ml, cell viability decreased in a dose-dependent manner. Also the phylogenetic has shown Thai *Boesenbergia rotunda* has more closer phylogenetic with India than China Philippines and Vietnam.

Keywords: *Boesenbergia rotunda*, cervical cancer, phylogenetic, *18S rRNA*, *5.8S rRNA*, *matK*

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้แนวทางตลอดการปฏิบัติงาน รวมถึงเป็นกำลังใจในการแก้ไขปัญหา ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และกรุณาให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุขที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ เอื้อเฟื้อให้การใช้ห้องปฏิบัติการ และ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจารักษ์ ที่ให้ความรู้ความเข้าใจ ตลอดจนแนวทางในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต ที่เอื้อเฟื้อเซลล์มะเร็งปากมดลูกในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และเพื่อน ๆ รวมถึงทุก ๆคนที่คอยอยู่เคียงข้าง ให้ความช่วยเหลือในทุกด้านอย่างเต็มที

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
สารบัญตาราง	ญ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา	7
4 ผลการทดลอง	21
5 อภิปรายผลการศึกษา	27
6 สรุปผลการศึกษา	27
เอกสารอ้างอิง	28

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	สัณฐานวิทยาของกระชาย	4
4.1.1	กระชายบดละเอียดในเอทานอล 95% บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที	21
4.1.2	ของเหลวจากการสกัดกระชาย *B. rotunda* ด้วยเอทานอล 95%	22
4.1.3	สารสกัดสารจากกระชาย *B. rotunda* ในขั้นตอนของการระเหยเอทานอล	22
4.1.4	สารสกัดสารจากกระชาย *B. rotunda* หลังจากการระเหยเอทานอลออก	23
4.2	กราฟแสดงการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก	24
4.3.1	วิวัฒนาการชาติพันธุ์จากยีน *18S rRNA*	25
4.3.2	วิวัฒนาการชาติพันธุ์จากยีน *5.8S rRNA*	26
4.3.3	วิวัฒนาการชาติพันธุ์จากยีน *matK*	27

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

6.1.1 ตารางข้อมูลของยีน *18S rRNA* 10

6.2.1 ตารางข้อมูลของยีน *5.8S rRNA* 14

6.3.1 ตารางข้อมูลของยีน *matK* 17

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

พืชวงศ์ขิงเป็นที่รู้จักและได้นำมาใช้เป็นประโยชน์ต่อมวลมนุษย์เป็นเวลาช้านาน มาแล้ว โดยนำมาใช้ประกอบอาหาร หรือเป็นเครื่องเทศ เช่น ขิง (*Zingiber officinale*) ข่า (*Alpinia galanga*) กระชาย (*Boesenbergia rotunda*) กระวาน (*Amomum testaceum*) และ ขมิ้น (*Curcuma longa*) รวมทั้งนำมาใช้เป็นสมุนไพร เช่น ว่านชักมดลูก (*Curcuma zanthorhiza*) และมหาหงส์ (*Hedychium coronarium*) เป็นต้น พืชในวงศ์ขิงมีลักษณะเด่นที่สังเกตได้จากภายนอกคือ จะมีลักษณะเป็นหัว เหง้า หรือลำต้นใต้ดิน ละภายในยังประกอบไปด้วยน้ำมันหอมระเหยที่ทำให้พืชแต่ละชนิดในวงศ์นี้มีเอกลักษณ์ของกลิ่นที่แตกต่างกันไป สำหรับคนไทยจะคุ้นเคยกับการนำพืชในวงศ์นี้ไปใช้ในชีวิตประจำวันจึงไม่เป็นปัญหากับการระบุชนิด โดยดูจากลักษณะทางภายนอกรวมไปถึงกลิ่นที่แตกต่างกันออกไปก็สามารถแยกได้ โดยไม่ต้องดูลักษณะโครงสร้างของดอกที่มีความซับซ้อนทางวิวัฒนาการ ที่ลดรูปหรือมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไป การกระจายตัวของพืชวงศ์ขิงพบอย่างมากในประเทศที่มีภูมิอากาศแบบร้อนชื้นบริเวณเส้นศูนย์สูตรโดยเฉพาะบริเวณประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยคาดว่าพบได้ประมาณ 300 ชนิด จากเกือบ 1,500 ชนิดทั่วโลก ทำให้พืชในวงศ์ขิงถือว่ามีความหลากหลายและการแปรผันสูงจึงนับได้ว่าเป็นพืชวงศ์ใหญ่ได้วงศ์หนึ่งในโลกนี้ การที่จะระบุชนิดในระดับสากลเพื่อการสื่อสารทางวิทยาศาสตร์ ต้องตระหนักว่าจะต้องไม่ทำให้เกิดความสับสน เพื่อที่จะสามารถนำพืชที่ถูกต้องมาใช้ประโยชน์ เหล่านี้จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่นักวิทยาศาสตร์ต่างพยายามศึกษาหาเครื่องมือการจัดจำแนก และนำไปสู่การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชให้ได้อย่างถูกต้องแม่นยำในที่สุด (พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2551)

กระชายเป็นพืชล้มลุก เจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่เขตอบอุ่นที่มีความชื้นสูงและเขตร้อน โดยมีการกระจายพันธุ์ในทวีปเอเชียตะวันออกเชียงใต้เป็นจำนวนมาก กระจายได้ในบริเวณกว้างตั้งแต่ระดับความสูงเท่ากับน้ำทะเลจนไปถึงระดับความสูงที่ 2,000 เมตรจากระดับน้ำทะเล (Larsen, 2002) กระชายเป็นสมุนไพรไทยที่มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในเชิงอุตสาหกรรมเช่น การนำไปใช้ในประกอบอาหาร การสกัดน้ำมันหอมระเหยไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องหอม รวมถึงสกัดเป็นเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อใช้ในการรักษาโรค (บังอร ศรีพานิชกุลชัย., 2548) เคยมีการศึกษาสายวิวัฒนาการของพืชในวงศ์ Zingiberaceae โดยใช้ข่าเป็นพืชทดลอง (Li et al.,2020)

วิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogenetics) เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต โดยใช้องค์ความรู้พื้นฐานทางด้านวิวัฒนาการ รวมไปถึงความรู้ทางพันธุศาสตร์โมเลกุลเข้ามาเป็นตัวบ่งชี้ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น และนำเสนอความสัมพันธ์ออกมาเป็นรูปแบบแผนภูมิที่เรียกว่า phylogenetic tree ทำให้การศึกษาสายวิวัฒนาการของพืชที่สนใจสามารถนำไปวิเคราะห์ความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ รวมถึงทราบจุดแยกของวิวัฒนาการของพืชที่สนใจอีกด้วย

มะเร็งปากมดลูกเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยพบเป็นอันดับ 2 ของมะเร็งในสตรีไทย รองจากมะเร็งเต้านม WHO/ICO ได้รายงานในปี พ.ศ. 2551 ว่าประเทศไทยมีประชากรสตรีที่เสี่ยงต่อมะเร็งปากมดลูก 26.09 ล้านคน มีอายุตั้งแต่ 15 ปี ขึ้นไป (HPV Information Centre., 2010) จำนวนผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ปีละ 9,999 ราย เสียชีวิต 5,216 ราย หรือประมาณร้อยละ 53 ถ้าคิดเป็นวันแล้วจะมีสตรีไทยเสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูกเฉลี่ยวันละ 14 คน (ไพฑูรย์ อบเชย, 2553)

การรักษามะเร็งปากมดลูกในปัจจุบันมีหลากหลายวิธี เช่น การผ่าตัด รังสีรักษา รังสีร่วมรักษา เคมีบำบัด ฮอร์โมน ยารักษาตรงเป้า การรักษาเพื่อบรรเทาอาการ การรักษาแบบประคับประคอง และการรักษาทางอายุรกรรมทั่วไป ซึ่งอาจมีผลข้างเคียงทำให้ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ เบื่ออาหาร ผมหรือขนร่วง รวมถึงปริมาณเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดลดลง (ณรงค์ กีรติวิทยานันท์, 2561) ดังนั้น การรักษาด้วยแพทย์ทางเลือก หรือการใช้สมุนไพร จึงเป็นแนวทางการรักษาที่อาจลดอาการข้างเคียงลงได้ ได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้สมุนไพรหลายชนิดในการรักษามะเร็งปากมดลูก เช่น อบเชย (Koppikar et al., 2010), โรสแมรี่ (Santos et al., 2016) และ ขิง (Zhang et al., 2017)

จากที่กล่าวมาข้างต้นว่ามีการใช้กระชายเป็นพืชสมุนไพรไทย โดยมีการสกัดเป็นเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อใช้ในการรักษาโรคอย่างแพร่หลาย (บังอร ศรีพานิชกุลชัย, 2548) จากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่ากระชายมีส่วนในการต้านมะเร็งได้ในเซลล์มะเร็งปอดในหนูทดลอง อีกทั้งสามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT-29 โดยกระชายมีสาร boesenbergin A ที่ไปทำลายเซลล์มะเร็งให้ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ และตายในที่สุด (Kirana et al., 2007) รวมถึงยังสามารถยับยั้งการทำงานของเซลล์ไลน์ B-lymphoblastoid ที่ถูกชักนำให้เป็นมะเร็งโดยไวรัส EBV (Murakami et al., 1993) เซลล์มะเร็งตับ (HepG2 และ WRL-68) เซลล์มะเร็งปอด (A549) และมะเร็งต่อมลูกหมาก (PC3) (Isa et al., 2012; Ming-Yue, et al., 2012)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของกระชาย และผลของสารสกัดของกระชายต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก

2. วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของสารสกัดจากกระชายต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก
2. ศึกษาวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของกระชาย

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระชาย

กระชายเป็นไม้ล้มลุกในวงศ์ *Zingiberaceae* มีรากที่อวบน้ำรูปทรงกระบอกค้อนไปทางยาว ปลายเรียวมีความยาวประมาณ 3-11 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 1-2 เซนติเมตร ทีมีถิ่นกำเนิดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลักษณะภายนอกเป็นสีน้ำตาลอ่อน เนื้อภายในมีสีขาวจนไปถึงสีเหลืองเข้ม ซึ่งเป็นกระชายเช่นเดียวกันแต่มีชื่อทางพฤกษศาสตร์แตกต่างกันถึง 8 ชื่อ ได้แก่ *Boesenbergia cochinchinensis* (Gagnep.) Loes., *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr., *Curcuma rotunda* L., *Gastrochilus panduratus* (Roxb.) Ridl., *Gastrochilus rotundus* (L.) Alston, *Kaempferia cochinchinensis* Gagnep., *Kaempferia ovate* Roscoe และ Kaempferia pandurata Roxb. แต่ที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายคือ *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf (Eng-Chong et al., 2012)

กระชาย (*B. rotunda*) มีการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการรักษาอาการป่วย เช่น อาการไขข้ออักเสบ กล้ามเนื้อบาดเจ็บ โรคเก๊าต์ ลำไส้อักเสบ อาการแน่นท้อง โรคกระเพาะอาหาร (Chaudhury and Rafei, 2001) อีกทั้งยังมีสรรพคุณในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร ต้านอาการอักเสบของอวัยวะภายใน ตลอดจนการต้านเซลล์มะเร็ง (Kirana et al., 2007)

http://www.สมุนไพร-ไทย.com/สมุนไพรไทย

(a)

http://www.สมุนไพร-ไทย.com/สมุนไพรไทย

(b)

http://supavineevarity.blogspot.com/2014/07/blog-post.html

(c)

รูปที่ 2.1 สัณฐานวิทยาของกระชาย (a) ดอก (b) ต้น (c) ราก

2.2 โรคมะเร็ง

มะเร็งเป็นกลุ่มอาการของโรคที่เกิดความผิดปกติจากเซลล์ร่างกายในระดับสารพันธุกรรม จึงส่งผลกระทบให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วผิดปกติที่ไม่สามารถควบคุมได้ จนเป็นสาเหตุให้เกิดเป็นก้อนเนื้อที่ผิดปกติขึ้นมา เซลล์ที่ผิดปกติเหล่านี้จะมีความสามารถในการเคลื่อนย้ายรุกรานไปยังเนื้อเยื้อบริเวณอื่น ๆ ภายในร่างกาย และ มีความสามารถในการสร้างเส้นเลือดขึ้นมาหล่อเลี้ยงก้อนเนื้อที่มีความผิดปกตินั้น ๆ ซึ่งการรุกรานไปไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ อาจเจริญเติบโตโดยตรงเข้าไปในเนื้อเยื้อข้างเคียง (invasion) หรือการเคลื่อนย้ายเซลล์ในยังบริเวณที่ไกลจากจุดกำเนิดโดยผ่านระบบเลือดและน้ำเหลือง (metastasis) (Sabrina et al., 2004)

ปัจจุบันโรคมะเร็งในมนุษย์สามารถแบ่งได้มากกว่า 100 ชนิดซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามอวัยวะที่เกิดความผิดปกติ การเกิดมะเร็งส่วนใหญ่จะเกิดจากจุดเริ่มต้นของเซลล์เดียวที่มีความผิดปกติ และหลุดออกจากการควบคุมของระบบภายในร่างกายทำให้เกิดการเพิ่มจำนวน และรุกรานไปอย่างรวดเร็ว หรือเกิดจากระบบร่างกายที่ผิดปกติจนทำให้เซลล์มีการสะสมความผิดปกติของสารพันธุกรรมเป็นระยะเวลานานจนกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด การเกิดเซลล์มะเร็งเป็นการเกิดแบบที่มีหลายขั้นตอนรวมกันทั้งเกิดจากความผิดปกติที่ตัวเซลล์เอง และความผิดปกติจากระบบภายในร่างกาย จึงอาจกล่าวได้ว่าการเกิดเซลล์มะเร็งเป็นการเกิดแบบ multistep process (Sabrina et al., 2004)

2.3 มะเร็งปากมดลูก

มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นบริเวณปากมดลูก ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ล่างสุดของมดลูกมีความยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร และ ความกว้างประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร ลักษณะของปากมดลูกจะมีทางเชื่อมต่อกันของช่องคลอดกับมดลูก การเกิดมะเร็งปากมดลูกจะเกิดจากเซลล์ของปากมดลูกเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่มีความผิดปกติอย่างช้า ๆ ซึ่งมีชื่อเรียกการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบบนี้ว่า dysplasia โดยหลังจากการที่เซลล์เกิดความผิดปกติเป็นเวลานานก็จะมีการแบ่งตัว และ เติบโตกระจายขยายลึกเข้าไปจากส่วนของปากมดลูกไปยังอวัยวะอื่น ๆ รอบปากมดลูก

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดเป็นอันดับที่ 2 ในประชากรผู้หญิงไทยรองจากมะเร็งเต้านม จากการรายงานใน Cancer in Thailand Vol. V, 2001-2003 ของ Nation Cancer Institute ระบุถึงอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งในประเทศไทย พบว่าในประเทศไทยมีจำนวนผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งปากมดลูกคิดเป็น 18.1% ต่อประชากรหนึ่งแสนคน (Khuhaprema et al., 2010)

จากการรายงานศึกษาถึงสาเหตุของมะเร็งปากมดลูก มีข้อมูลที่ได้รับพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์อย่างชัดเจนว่าสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูกเกิดจากการติดเชื้อไวรัส Human papillomavirus (HPV) ซึ่งสามารถติดต่อกันผ่านสารคัดหลั่ง และการมีเพศสัมพันธ์ ไวรัส HPV เป็นไวรัสในสกุล *Papillomaviridae* โดยเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa มีการติดเชื่อ HPV ไทป์ 16 และ C33a เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิดที่เกิดจากความผิดปกติที่ไม่ใช่การติดเชื้อไวรัส HPV (Koppikar et al., 2010)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการ

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์

1. เครื่องอบไอร้อน (hot air oven)
2. เครื่องกลั่นระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator)
3. ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
4. ไมโครปิเปตต์ทิป (micropipette tip)
5. เขย่าสาร (shaker) รุ่น SPL 15
6. ชุดกรองสุญญากาศ และปั๊มสุญญากาศ
7. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
8. ผ้าขาวบาง
9. เครื่องปั่น
10. ตะแกรงร่อน 200 mm
11. กรวยกรอง (funnel)
12. 0.45 µm Millipore filter (AxyGen, USA)
13. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
14. T25 flask
15. 12 wells plate

สารเคมี

1. Dimethysulfoxide (DMSO)
2. Folin-Ciocalteu reagent (Sigma, USA)
3. Sodium carbonate (Sigma, USA)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich, Germany)
5. Enzyme tripsin
6. Buffer BPS
7. Ethanol 95%

วิธีการดำเนินงาน

1. การรวบรวมตัวอย่างในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองซื้อมาจากกระชายจากตลาดสามย่าน กรุงเทพมหานคร มาระบุชนิดโดยใช้รูปอนุกรมวิธาน Flora of Thailand Vol.13 Part 2 2016 และนำมาล้างให้สะอาดหั่นเป็นชิ้นประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$C จนแห้งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ดัดแปลงจากวิธีของ ธิดา ไชยวังศรี, 2555) จากนั้นนำมาทำให้ละเอียดด้วยด้วยเครื่องปั่น และนำไปร่อนด้วยตะแกรงที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 200 มิลลิเมตร

2. การสกัดสารจากกระชาย

สกัดสารจากกระชายด้วยเอทานอล โดยนำผงกระชายที่ผ่านการร่อนแล้วมาสกัดด้วยเอทานอล 95% (v/v) ในอัตราส่วนกระชาย 1 ส่วนต่อเอทานอล 5 ส่วน นำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ 800 รอบต่อนาที ตามวิธีของ จารวี สุขประเสริฐ และ สุบงกช ทรัพย์แดง (2555) และ ทำการกรองแยกตะกอน จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาระเหยแบบสุญญากาศ ตามวิธีของธิดา ไชยวังศรี (2555) ชั่งน้ำหนักจากสารสกัดที่ได้และนำมาคำนวณหา % yield และนำมาละลายด้วย 1% DMSO เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์ และ คณะ , 2559)

3. การเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก

นำเซลล์มะเร็งปากมดลูกมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยง Dulbecco’s Modified Medium (DMEM) ที่ใส่ 10% fetal bovine serum (FBS) และ antibiotic antimycotic 1% จากนั้นนำเข้าเครื่อง incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

4. การวิเคราะห์การมีชีวิตของเซลล์

การศึกษาความมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกทำโดย นำเซลล์มะเร็งปากมดลูกใส่ใน 96 well plate ปริมาณหลุมละ 10^4 เซลล์ต่อหลุม และนำไปเข้าตู้เลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการดูดสารละลายภายในหลุมออก และ ใส่สารสกัดกระชายที่ละลายใน 1% DMSO ตามความเข้มข้นคือ 0, 0.1, 1, 10 และ 100 ug/ml ลงไปในหลุมปริมาณหลุมละ 220 ul จากนั้นนำ 96 well plate กลับไปเข้าเครื่อง incubator อีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นดูดสารละลายออกจากหลุม และ ใส่ 0.1% (w/v) AlamarBlue หลุมละ 100 ul และนำกลับเข้าเครื่อง incubator อีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยเครื่อง SpectraMax M3 Microplate Reader เลือกความยาวคลื่นที่ 570/600 นาโนเมตร

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลระหว่างกลุ่มโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS ด้วย one way ANOVA ที่ ความเชื่อมันทางสถิติ 95%

6. รวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรม

ทำการรวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรมของ กระชาย (*Boesenbergia rotunda*) ขมิ้น (*Curcuma longa*) และ ขิง (*Zingiber officinale*) ในฐานข้อมูล (www.ncbi.nlm.nih.gov ; 29 พฤษภาคม 2563) โดยเลือก sequence ของยีนที่ต้องการคือ ยีน *18S rRNA* ยีน *5.8S rRNA* และ ยีน *matK* โดยมีรายละเอียดข้อมูลดังตารางที่ 6.1-6.3

ตาราง 6.1. ตารางข้อมูลของยีน *18S rRNA* ที่ใช้ในการศึกษา

number	accession number	organism	description	locality
1	AF478726	*Boesenbergia rotunda*	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	มาเลเซีย
2	AF478727	*Boesenbergia rotunda*	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	มาเลเซีย
3	KR002077	*Boesenbergia rotunda*	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	ไทย

ตารางที่ 6.1 (ต่อ)

4	KR816707.1	*Zingiber officinale*	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	อินเดีย
5	KR816711.1	*Zingiber officinale*	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	อินเดีย
6	KR816713.1	*Zingiber officinale*	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	อินเดีย

ตารางที่ 6.1 (ต่อ)

7	KU159400	*Boesenbergia rotunda*	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	เวียดนาม
8	KX832041.1	*Curcuma longa*	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	จีน
9	KX832042.1	*Curcuma longa*	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	จีน

ตารางที่ 6.1 (ต่อ)

10	KX832043.1	*Curcuma longa*	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	จีน
11	KY701331	*Boesenbergia rotunda*	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	ฟิลิปปินส์

ตาราง 6.2. ตารางข้อมูลของยีน *5.8S rRNA* ที่ใช้ในการศึกษา

number	accession number	organism	description	locality
1	AJ388281.1	Boesenbergia rotund	5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer 1 (ITS1) and internal transcribed spacer 2 (ITS2)	มาเลเซีย
2	AY626269	Boesenbergia rotund	5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	มาเลเซีย
3	HM236119	Boesenbergia rotund	5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	จีน
4	HM236120	Boesenbergia rotund	5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	จีน
5	JQ409956.1	Curcuma longa	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	อินเดีย
6	KM983478	Boesenbergia rotund	5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	อินเดีย

ตารางที่ 6.2 (ต่อ)

7	KM983479	Boesenbergia rotund	5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	อินเดีย
8	KM983480	Boesenbergia rotund	5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	อินเดีย
9	KM983481	Boesenbergia rotund	5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	อินเดีย
10	KM983482	Boesenbergia rotund	5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	อินเดีย
11	KM983483	Boesenbergia rotund	5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	อินเดีย
12	KX425623	Boesenbergia rotunda	5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	อินเดีย
13	KY701331.1	Boesenbergia rotunda	5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	มาเลเซีย

ตารางที่ 6.2 (ต่อ)

14	LC461717.1	Curcuma longa	5.8S rRNA, ITS 2 and 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate	ไทย
15	LC461745.1	Zingiber officinal	5.8S rRNA, ITS 2 and 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate	ไทย
16	LC461777.1	Boesenbergia rotunda	5.8S rRNA, ITS 2 and 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate	ไทย
17	LS999889.1	Zingiber officinale	18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene	ฟิลิปปินส์
18	LT853920.1	Curcuma longa	5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene	ฟิลิปปินส์

ตาราง 6.3. ตารางข้อมูลของยีน *matK* ที่ใช้ในการศึกษา

number	accession number	organism	description	locality
1	AF478826	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	ฟิลิปปินส์
2	AF478827	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	ฟิลิปปินส์
3	DQ408354	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	ไทย
4	DQ408355	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	ไทย
5	DQ408356	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	ไทย
6	GU180401.1	*Zingiber officinale*	maturase K (matK) gene, partial cds	จีน
7	HM236119	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	จีน
8	HM236120	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	จีน
9	HM367644	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	อินเดีย
10	KJ872473.1	*Zingiber officinale*	maturase K (matK) gene, partial cds	อินเดีย
11	KM983425	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	อินเดีย
12	KM983426	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	อินเดีย
13	KM983428.1	*Curcuma longa*	maturase K (matK) gene, partial cds	อินเดีย
14	KR002075	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	อินเดีย

ตารางที่ 6.3 (ต่อ)

15	KU159411	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	เวียดนาม
16	KU159411.1	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	เวียดนาม
17	KX432257	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	เวียดนาม
18	KX432257.1	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	เวียดนาม
19	KX832044.1	*Curcuma longa*	maturase K (matK) gene, partial cds	จีน
20	KY033363.1	*Curcuma longa*	maturase K (matK) gene, partial cds	อินเดีย
21	KY448305.1	*Zingiber officinale*	maturase K (matK) gene, partial cds	อินเดีย
22	KY701344	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, complete cds	เวียดนาม
23	LC461778	*Boesenbergia rotunda*	maturase K (matK) gene, partial cds	ไทย

7. การศึกษาวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของกระชาย

ศึกษาวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของกระชายโดยใช้ The CIRPES Science Gateway V.3.3 (https://www.phylo.org)

ทำ sequence alignment โดยใช้ MAFFT on XSEDE V.3.3 (http://www.phylo.org/index.php/tools/mafft_tg.html) และ ทำการ set parameter โดยให้ Maximim Hours to Run เป็น 2 และ Output format เป็น FASTA

ทำการ convert file format จากสกุล Masff เป็นสกุล FASTA และ Phylip โดยใช้ NCLconverter V.3.3 (http://www.phylo.org/index.php/tools/nclconverter.html)

ทำการหา Model สำหรับทำ Phylogenetic analysis โดยใช้ Tools jModelTest2 on XSEDE V.3.3 (http://www.phylo.org/index.php/tools/jmodeltest2_xsede.html) ได้ best-fitted model ของแต่ละยีน

ทำ Phylogenetic analysis ด้วย Maximum Likelihood framework โดยการใช้ RAxML-HPC Blackbox V.3.3 (http://www.phylo.org/index.php/tools/raxmlhpc2bb.html) โดยใช้ best-fittes model ที่ได้จากข้างต้น และทำการศึกษา phylogenetic tree ได้ด้วยโปรแกรม Figtree V.14.4 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

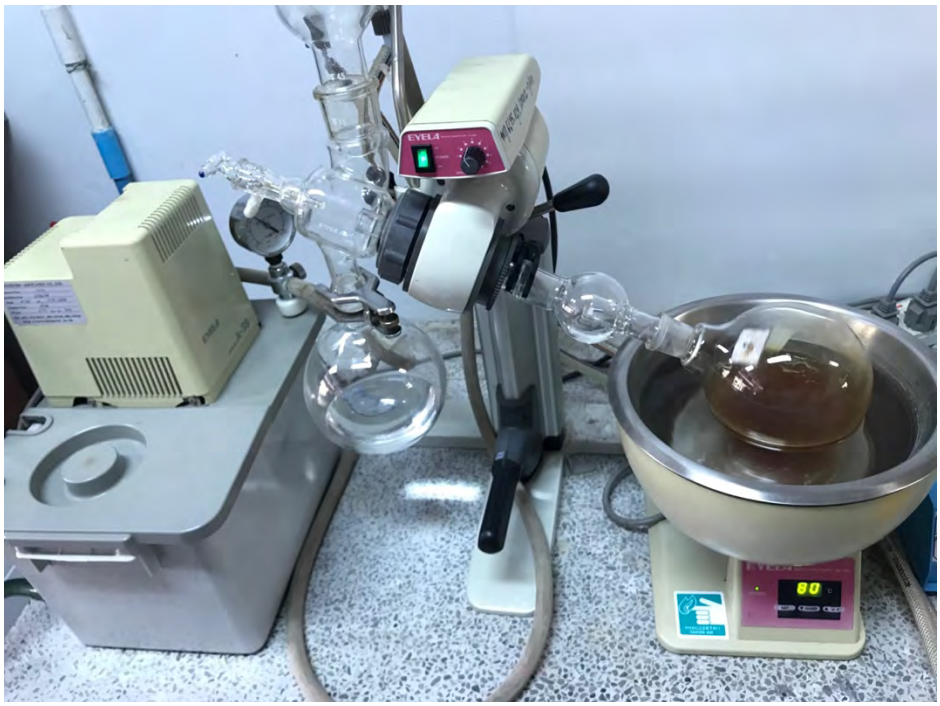
4.1 การสกัดสารจากกระชาย *B. rotunda* ด้วยเอทานอล 95%

เมื่อนำกระชายที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C มาบดอย่างละเอียด และ ใส่ในเอทานอล 95% ที่อัตราส่วน 1:5 โดยใช้น้ำหนักแห้งของกระชาย 20 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าให้สม่ำเสมอด้วยความเร็ว 800 รอบต่อนาที ได้ลักษณะของสารสกัดที่ได้เป็นของเหลวใส ไม่มีตะกอน ไม่แยกชั้น สีหลืองเข้ม ดังรูป 4.1-4.4

รูปที่ 4.1 กระชายบดละเอียดในเอทานอล 95% บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที

รูปที่ 4.2 ของเหลวจากการสกัดกระชาย *B. rotunda* ด้วยเอทานอล 95%

เมื่อนำของเหลวที่สกัดที่ได้ไปเข้ากระบวนการระเหยเอทานอลออก จะได้ของเหลวที่มีลักษณะหนืด สีเหลืองเข้มจนถึงน้ำตาล มี % yield อยู่ที่ 62.13%



รูปที่ 4.3 สารสกัดสารจากกระชาย *B. rotunda* ในขั้นตอนของการระเหยเอทานอล

รูปที่ 4.4 สารสกัดสารจากกระชาย *B. rotunda* หลังจากการระเหยเอทานอลออก

4.1.2 สกัดสารจากกระชายจากกระชาย *B. rotunda* ด้วยเอทานอล 95% ครั้งที่สอง

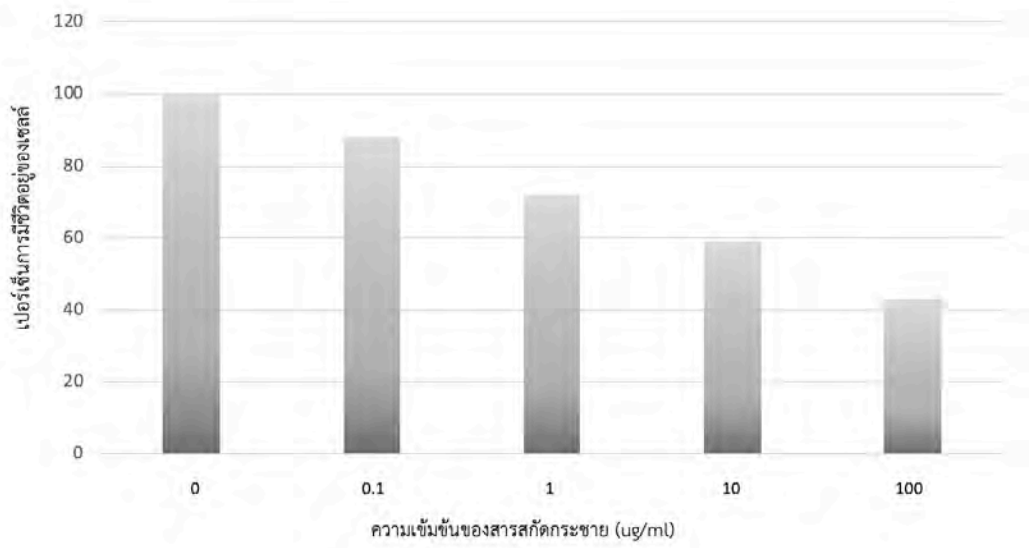
ลักษณะของสารสกัดที่ได้เป็นของเหลว ไม่มีตะกอน ไม่แยกชั้น สีหลืองเข้ม โดยในขั้นตอนของการสกัดด้วยเอทานอลใช้อัตราส่วน 1:5 คือน้ำหนักแห้งของกระชาย 10 กรัม ในเอทานอล 50 มิลลิลิตร เมื่อนำของเหลวที่สกัดได้ไปเข้ากระบวนการระเหยเอทานอลออก จะได้ของเหลวที่มี ลักษณะหนืด สีเหลืองเข้ม จนถึงน้ำตาล มี % yield อยู่ที่ 59.35%

4.1.3 สกัดสารจากกระชายจากกระชาย *B. rotunda* ด้วยเอทานอล 95% ครั้งที่สาม

ลักษณะของสารสกัดที่ได้เป็นของเหลว ไม่มีตะกอน ไม่แยกชั้น สีหลืองเข้ม โดยในขั้นตอน ของการสกัดด้วยเอทานอลใช้อัตราส่วน 1:5 คือน้ำหนักแห้งของกระชาย 10 กรัม ในเอทานอล 50 มิลลิลิตร เมื่อนำของเหลวที่สกัดได้ไปเข้ากระบวนการระเหยเอทานอลออก จะได้ของเหลวที่มี ลักษณะหนืด สีเหลืองเข้ม จนถึงน้ำตาล มี % yield อยู่ที่ 56.42%

4.2 Cell Viability Assay

ผลของสารสกัดกระชายที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10 และ 100 ug/ml ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่วัดด้วย Alamarblue ที่ช่วงคลื่น 570/600 นาโนเมตร เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดกระชายขึ้น อัตราการมีชีวิตอยู่ของ เซลล์มะเร็งปากมดลูกก็จะน้อยลงตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 72.4% และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน อยู่ที่ 22.6 ดังรูป 4.5

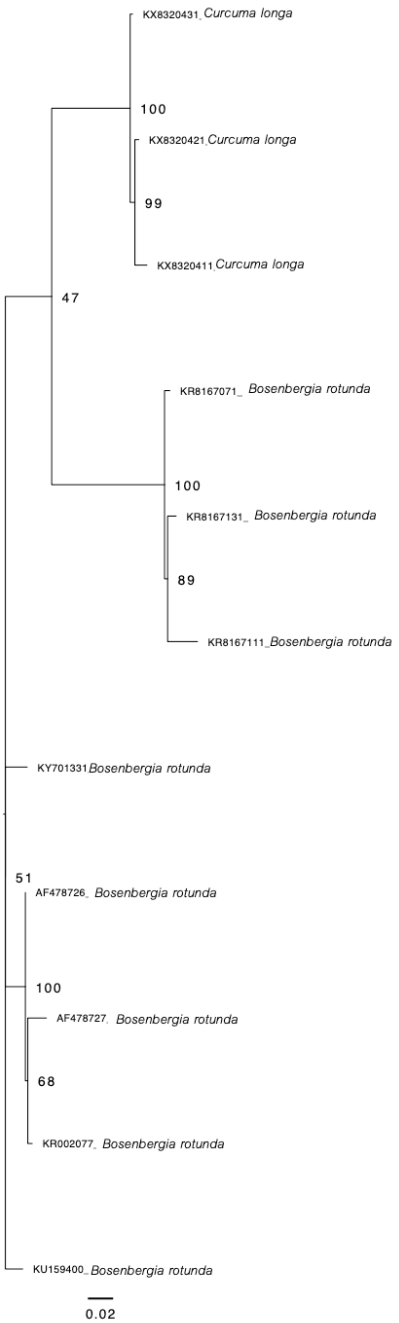


รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

4.3 ผลของสายวิวัฒนาการ

4.3.1 ยีน *18S rRNA*

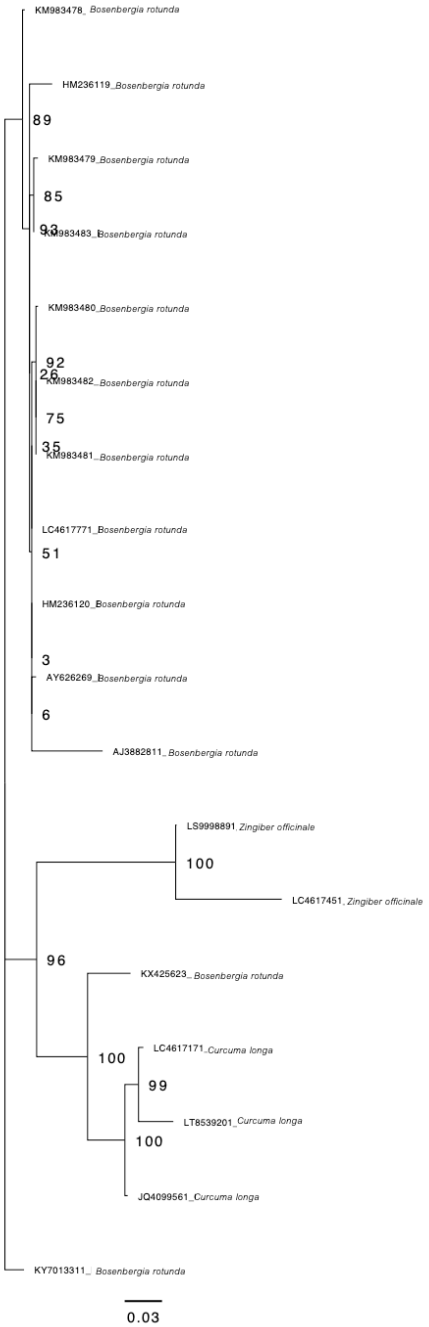
จากผลของการทำ Phylogenetic tree ของยีน *18S rRNA* กระชาย โดยใช้ ขมิ้น และขิงเป็น outgroup พบว่า กระชายจากประเทศไทยมีความสัมพันธ์กับกระชายจากประเทศมาเลเซียมากกว่าประเทศจีน อินเดีย เวียดนาม และฟิลิปปินส์ โดยมีค่า bootstrap value เท่ากับ 100% แสดงให้เห็นความใกล้ชิดกันของวิวัฒนาการ รวมไปถึงการจัดแยกเคลดดังกล่าวมีความเชื่อมั่นอยู่ในระดับสูง



รูปที่ 4.3.1 วิวัฒนาการชาติพันธุ์จากยีน *18S rRNA*

4.3.2 ยีน *5.8S rRNA*

จากผลของการทำ Phylogenetic tree ของยีน *5.8S rRNA* กระชาย โดยใช้ ขมิ้น และขิง เป็น outgroup พบว่า กระชายจากประเทศไทยมีความสัมพันธ์กับกระชายจากประเทศมาเลเซีย มากกว่าประเทศ จีน อินเดีย เวียดนาม และฟิลิปปินส์ โดยมีค่า bootstrap value เท่ากับ 89% ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 85-100% แสดงให้เห็นความใกล้ชิดกันของสายพันธุกรรม รวมไปถึงการจัดแยกเคลดดังกล่าวมีความเชื่อมั่นอยู่ในระดับสูง



รูปที่ 4.3.2 วิวัฒนาการชาติพันธุ์จากยีน *5.8S rRNA*

4.3.3 ยีน *Maturase K* (MatK)

จากผลของการทำ Phylogenetic tree ของยีน *5.8S rRNA* กระชาย โดยใช้ ขมิ้น และขิง เป็น outgroup พบว่า กระชายจากประเทศไทยมีความสัมพันธ์กับกระชายจากประเทศมาเลเซีย มากกว่าประเทศ จีน อินเดีย เวียดนาม และฟิลิปปินส์ โดยมีค่า bootstrap value เท่ากับ 100% ซึ่งแสดงให้เห็นความใกล้ชิดกันของวิวัฒนาการ รวมไปถึงการจัดแยกเคลดดังกล่าวมีความเชื่อมั่นอยู่ในระดับสูง

รูปที่ 4.3.3 วิวัฒนาการชาติพันธุ์จากยีน *matK*

บทที่ 5

อภิปราย และ สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการสารสกัดจากกระชาย โดยการนำกระชายมาอบแห้ง บดให้ละเอียด และ สกัดด้วยเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 1:5 ทั้งหมดสามครั้ง พบว่าการสกัดในครั้งแรกได้ปริมาณของผลผลิตมากที่สุดอยู่ โดยมี % yield อยู่ที่ 56.42% ครั้งที่สอง มี % yield อยู่ที่ 59.35% ครั้งที่สาม มี % yield อยู่ที่ 56.42% และมีค่าเฉลี่ย % yield อยู่ที่ 57.40 จากรูปที่ 4.5 เมื่อนำสารสกัดจากกระชายไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งปากมดตามความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10 และ 100 ug/ml พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดกระชายมีความเข้มข้นที่มากขึ้น การตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูกก็จะมากขึ้นตามไปด้วย โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดกระชาย 100 ug/ml มีอัตราการตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูกมากที่สุด แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกระชายสามารถไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

ในส่วนของการศึกษาวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของกระชายโดยใช้ยีนที่สนใจ 3 ยีนด้วยกันคือ ยีน*18S rRNA* ยีน *5.8S rRNA* และ ยีน *matK* โดยรวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ขิง 3 ชนิด คือ กระชาย (Boesenbergia rotunda) โดยใช้ ขมิ้น (Curcuma longa) และ ขิง (Zingiber officinale) เป็น out group จากรูปที่ 4.3.1, 4.3.2 และ 4.3.3 ทำให้ทราบว่ากระชายจากประเทศไทยมีความสัมพันธ์กับกระชายจากประเทศมาเลเซียมากกว่าประเทศ จีน อินเดีย เวียดนาม และฟิลิปปินส์ ซึ่งความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการจากยีนทั้งสามที่เลือกมามีผลสอดคล้องไปในทางเดียวกัน และมีการรายงานผลของกระชาย *B. rotunda* ที่มาจากประเทศมาเลเซียเกี่ยวกับการยับยั้ง มะเร็งรังไข่ (CaOV3), มะเร็งลำไส้ (HT-29), มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) รวมไปถึงมะเร็งปากมดลูก (Hela) อีกด้วย (Jing, Baker, Mohamed and Rahmat, 2010) ดังนั้นการทดลองผลของสารสกัดกระชายต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกของโครงงานวิทยาศาสตร์ชิ้นนี้ก็อาจจะสามารถประยุกต์ และนำพืชอื่น ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น มาใช้เป็นสารสกัดพืชสมุนไพรในการทดลองเพื่อดูความมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก รวมไปถึงสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นการรักษาทางเลือกของโรคมะเร็งปากมดลูกในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

จารวี สุขประเสริฐ และ สุบงกช ทรัพย์แตง. 2555. การศึกษาผลของตัวทำละลายในการสกัดสมุนไพร ที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย. **วารสารผลงานวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ 15** : 101-102.

ณรงค์ กีรติวิทยานันท์. **อยู่อย่างสุข เมื่อต้องรับ"คีโม".[ออนไลน์]. 2561. แหล่งที่มา: http://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor/e-pl/articledetail.asp?id=739** [18 สิงหาคม 2562]

ธิดา ไชยวังศรี. 2555. ประสิทธิภาพของสารสกัดพืชสมุนไพร ในการยับยั้งการเจริญเติบของแบคทีเรียก่อโรค. **วารสารนเรศวรพะเยา** 5 : 333-342.

บังอร ศรีพานิชกุลชัย. 2557. กระชายกับการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์. **วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ** 15_: 290-295.

พวงเพ็ญ ศิริรักษ์. 2551. การศึกษาพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ในประเทศไทย. **NU Science Journal** 5 : 119 – 128.

วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์ และ คณะ. 2559. ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922. **วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ** 19 : 39-42.

ไพฑูรย์ อบเชย. **อุบัติการณ์มะเร็งปากมดลูกในประเทศไทย**. [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา : https://stri.cmu.ac.th/article_detail.php?id=17 [18 สิงหาคม 2562]

Miller, M.A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. (2010) "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees V3.3. [Online]. Available: https://www.phylo.org/sub_sections/portal/sc2010_paper.pdf, 29 May 2019

Isa, N.M. et al. 2012. *In vitro* anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of boesenbergin A, a chalcone isolated from *Boesenbergia rotunda* (L.) (fingerroot). **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research** 45 : 524-530.

Jing, Baker, Mohamed and Rahmat. 2011 Effects of Selected *Boesenbergia* Species on the Proliferation of Several Cancer Cell Lines. **Journal of Pharmacology and Toxicology** 6 : 272-282.

Kirana C., Jones G. and Mcintosh G. 2007. Anticancer properties of panduratin A isolated from *Boesenbergia pandurata* (Zingiberaceae). **Journal of Natural Medicines** 100 : 139-145.

Koppikar S., Choudhari A., Suryavanshi S., Kumarit S. and Chattopadhyay S. 2010. Aqueous Cinnamon Extract (ACE-*c*) from the bark of *Cinnamomum cassia* causes apoptosis in human cervical cancer cell line (SiHa) through loss of mitochondrial membrane potential. **Biomed Central Research** 10 : 186-204.

Kress, J. and Larsen, K. 2001. Smithatris, a new genus of Zingiberaceae from Southeast Asia. **Systematic Botany**, 26 : 226-230.

Li, D.M. 2020. Organization, comparative analyses and phylogenetic relationships in Family Zingiberaceae. **Molecular Diversity Preservation International** 9 : 286.

Murakami, et al. 1993. Possible antitumor promoting properties of edible plants from Thailand, and identification of an active constituent, cardamonin, of *Boesenbergia pandurate*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** 57 : 191-193.

Nakamura T., Yamada K., Tomoii K. and Katoh. 2018. Parallelization of MAFFT for large-scale multiple. **Oxford University Press** 34 : 2490-2492

sequence alignments

Santos et al. 2016. Assessment of cytotoxic activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), turmeric (*Curcuma longa* L.), and ginger (*Zingiber officinale* R.) essential oils in cervical cancer cells (HeLa). **Scientific World Journal** 16 : 8-12.

Zhang et al. 2017. 10-Gingerol, a phytochemical dDerivative from "Tongling White Ginger", inhibits cervical cancer: insights into the molecular mechanism and inhibitory targets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 65 : 289-299.

Zhu, M.Y., et al. 2012. Variation in apoptotic gene expression through oligonucleotide microarray profiling. **Journal of Lower Genital Tract Disease** 19 : 46-54.