



KKU SCIENCE JOURNAL

Journal Home Page : <https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/KKUSciJ>

Published by the Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand



สารพฤกษเคมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านอักเสบในหลอดทดลองของสารสกัด ใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดง

Phytochemicals, Antioxidant and *In Vitro* Anti-inflammatory Activities of *Mitragyna speciosa* Korth. 'Kan Daeng' Leaf Extract

พิชาพัชร์ ฐิติชนอภิพงษ์¹ อ้อมบุญ วัลลิสุต^{1*} อัจฉรา แก้วน้อย¹ และ จันทนา ยะหัวฝาย²Pichapat Thititanaapipong¹, Omboon Vallisuta^{1*}, Atchara Kaewnoi¹ and Jantana Yahuafai²¹สาขาแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร 10600²งานวิจัยคลินิกและนวัตกรรม สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร 10400¹Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Science and Technology Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok, 10600, Thailand²Research Clinic and Innovation National Cancer Institute, Bangkok, 10400, Thailand

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content; TPC) และฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content; TFC) รวมถึงประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสารสกัดใบกระท่อม (*Mitragyna speciosa* Korth.) พันธุ์ก้านแดง ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ผลการวิเคราะห์พบว่า สารสกัดมีค่า TPC เท่ากับ 285.50 ± 1.67 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูล ต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g extract) และค่า TFC เท่ากับ 358.97 ± 0.98 มิลลิกรัมเคอควิโนลีนสมมูล ต่อกรัมสารสกัด (mg QE/g extract) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดวัดโดยวิธี DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.39 ± 0.49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิธี ABTS⁺ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.76 ± 0.33 มิลลิกรัมวิตามินซีสมมูลต่อกรัมสารสกัด และวิธี FRAP ให้ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเท่ากับ $5,211.44 \pm 9.36$ มิลลิโมลเพอร์ริซซัลเฟตสมมูล ต่อกรัมสารสกัด นอกจากนี้ การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (LPS) พบว่า สารมาตรฐานไมทราจินีนสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO; 8.09 - 17.44 ไมโครโมลาร์) อินเตอร์ลิวคิน-6 (IL-6; 12,850.67 พิโคกรัม/มิลลิลิตร) และพรอสตาแกลนดินอี 2 (PGE2; 157.47 พิโคกรัม/มิลลิลิตร) ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่สารสกัดใบกระท่อมสามารถลดการผลิต NO (7.03 - 26.93 ไมโครโมลาร์) และ IL-6 (11,600.83 - 14,656.83 พิโคกรัม/มิลลิลิตร) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดงมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ ซึ่งสนับสนุนการใช้ประโยชน์ของกระท่อมตามภูมิปัญญาพื้นบ้าน และแสดงถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาสารสกัดใบกระท่อมเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพในอนาคต

*Corresponding Author, E-mail: omboon.va@bsru.ac.th

Received date: 3 March 2025 | Revised date: 20 June 2025 | Accepted date: 14 July 2025

doi: 10.14456/kkuscij.2025.28

ABSTRACT

This study aimed to determine the total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC), as well as to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of 95% ethanolic extract from the leaves of red-veined kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.). The extract exhibited a TPC of 285.50 ± 1.67 mg gallic acid equivalent per gram of extract (mg GAE/g extract) and a TFC of 358.97 ± 0.98 mg quercetin equivalent per gram of extract (mg QE/g extract). Antioxidant activity measured by the DPPH assay showed an IC_{50} of 7.39 ± 0.49 μ g/mL. The ABTS assay yielded an IC_{50} of 17.76 ± 0.33 mg ascorbic acid equivalent per gram of extract, while the FRAP assay revealed a ferric reducing antioxidant power of $5,211.44 \pm 9.36$ mM $FeSO_4$ equivalent/g extract. Anti-inflammatory activity was assessed in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. The standard compound mitragynine significantly inhibited the production of nitric oxide (NO; $8.09 - 17.44$ μ M), interleukin-6 (IL-6; $12,850.67$ pg/mL) and prostaglandin E_2 (PGE₂; 157.47 pg/mL). The kratom extract also significantly reduced NO ($7.03 - 26.93$ μ M) and IL-6 ($11,600.83 - 14,656.83$ pg/mL) production. These findings indicate that the red-veined kratom leaf extract possesses promising antioxidant and anti-inflammatory properties, supporting its traditional use in Thai medicine and highlighting its potential for future development as a health-promoting natural product.

คำสำคัญ: กระท่อมพันธุ้ก้านแดง ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ

Keywords: Kan Daeng Kratom, Antioxidant, Anti-inflammatory

บทนำ

กระท่อม (*Mitragyna speciosa* Korth.) อยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบในประเทศมาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และประเทศไทย เจริญเติบโตในดินที่อุดมสมบูรณ์ ความชื้นสูง แสงแดดปานกลาง (สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด, 2564) ในตำรายาของแพทย์พื้นบ้านทางภาคใต้ใช้เปลือกและใบของกระท่อมในการรักษาอาการท้องเสีย ปวดท้อง แก้กิด บรรเทาอาการปวดตามร่างกาย รักษาโรคเบาหวาน กระเพาะอาหาร นอกจากนี้ในตำราแพทย์แผนไทยพบกระท่อมเป็นส่วนประกอบของยา 7 ตำรับ ได้แก่ ยาแก้บิดลงเป็นเลือด ยาหล่อมอารมณ์ ยาหนุมาณจงถนนปีดมหาสมุทร ยาแก้บิดหัวลูก ยาทาให้อดฝืน ยาประสะกาฬแดง และยาประสะกระท่อม (ธัญและคณะ, 2559) ใช้ภายนอกในลักษณะยาทาหรือยาพ่นในการบรรเทาอาการปวดข้อเข่า ลดอาการปวด บวมคลายกล้ามเนื้อ บรรเทาอาการฟกช้ำ (พระขวัญชัย, 2565) มีรายงานแสดงว่าสารสกัดใบกระท่อมสามารถลดการปวดและการอักเสบได้ (Suhaila *et al.*, 2009) นอกจากการใช้ประโยชน์ด้านการรักษาโรคโดยการกินและใช้ภายนอกแล้ว ยังพบว่าภาคใต้ของประเทศไทย ใช้ใบกระท่อมในการต้อนรับแขกในสังคมในประเพณีที่สำคัญ เช่น งานบวช งานแต่งงาน หรือเมื่อทำงานที่ต้องใช้กำลัง หรือการทำงานกลางแจ้ง โดยวิธีกินใบกระท่อมแบบดั้งเดิม คือการเคี้ยวใบสดที่รูดเส้นกลางใบออก (ดวงแก้วและคณะ, 2559) องค์ประกอบทางเคมีที่พบในส่วนต่าง ๆ ของกระท่อมมีหลายชนิดโดยพบว่า ใบ มีสารกลุ่มอัลคาลอยด์ เฟลโวนอยด์ เฟนิลโพรพานอยด์ ลิกแนน ไตรเทอร์ปีนอยด์ (สาวิตรีและคณะ, 2563) โดยสารสำคัญหลักที่พบคือ อัลคาลอยด์ ไมทราไจนิน มีความสำคัญต่อระบบประสาท ระบบทางเดินหายใจ การทำงานของหัวใจ มีฤทธิ์ระงับประสาทส่วนกลางทำให้ลดความเจ็บปวดของร่างกายได้ (จุไรทิพย์, 2560) นอกจากนี้ยังมีรายงานกลไกการออกฤทธิ์ของไมทราไจนินเป็น partial agonist ต่อตัวรับ μ -opioid ซึ่งมีบทบาทในการออกฤทธิ์ระงับปวดและยับยั้งการส่งสัญญาณความเจ็บปวด (Thongpradichote *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 2004)

จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของใบกระท่อม ด้วยวิธี DPPH assay มีการศึกษาวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล น้ำ (Parthasarathy *et al.*, 2009; Shaik Mossadeq *et al.*, 2009) เอทานอลร้อยละ 95 (ชวภณและชยานนท์, 2566) และเอทานอลร้อยละ 96 (Yuniarti *et al.*, 2020) โดยผลการศึกษาพบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น (Parthasarathy *et al.*, 2009) การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอักเสบ พบว่าการใช้เอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ในการต้านอักเสบ สามารถระงับความเจ็บปวดได้ดีและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังชนิด HaCaT human keratinocytes CRL-2522 human fibroblasts B16F10 melanocytes และ RAW 264.7 (Tuntiyasawasdikul *et al.*, 2024)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าตัวทำละลายเมทานอลจะสามารถสกัดอัลคาลอยด์ (Zhang *et al.*, 2018) และสารประกอบฟีนอลิก ออกมาได้มากกว่า (Zakaria *et al.*, 2021) แต่ความปลอดภัยในการใช้กับมนุษย์ยังน้อยกว่าตัวทำละลายเอทานอล ดังนั้น การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของกระท่อมในครั้งนี้จึงเลือกศึกษาการสกัดกระท่อมด้วยตัวทำละลายเอทานอล เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง (Mojzer *et al.*, 2016) และเป็นตัวทำละลายที่ยอมรับได้สำหรับการจดทะเบียนผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์สุขภาพ (Mohamed, 2015) และเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH การทดสอบการลดสีของอนุมูล ABTS^{•+} และการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็ก (FRAP) รวมทั้งฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้ประโยชน์จากพืชกระท่อมต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดกระท่อม

ผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างพืชกระท่อม จากจังหวัดชุมพร ในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2566 แล้วนำส่งที่พิพิธภัณฑ์สมุนไพรกรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กรุงเทพมหานคร เพื่อตรวจสอบยืนยันเอกลักษณ์และชื่อพฤกษศาสตร์ *Mitragyna speciosa* Korth. และให้หมายเลขไว้เพื่อการอ้างอิง คือหมายเลข TTM No.0005467

นำตัวอย่างใบกระท่อมสายพันธุ์ก้านแดงจำนวน 2,000 กรัม มาล้างให้สะอาด แล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นอบด้วยเตาอบลมร้อนอุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร จากนั้นนำมาผ่านตะแกรงร่อนขนาดเบอร์ 60 นำผงที่ได้จากการบดจำนวน 200 กรัม มาหมักเป็นเวลา 7 วัน ด้วยเอทานอลร้อยละ 95 อัตราส่วนผงกระท่อมต่อเอทานอล 1:10 แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้จากการกรองไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็งแบบสุญญากาศ (Freeze dry) นำมาชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้เพื่อหาปริมาณร้อยละของสารสกัดหยาบ (% Yield)

2. การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content, TPC)

หาปริมาณ TPC ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.01 0.02 0.04 0.06 0.08 และ 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำสารสกัดกระท่อม (95% เอทานอล) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรมาเติมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ โพลิน-ซีโอแคลตูในน้ำ ให้ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วนำมาเติม 7.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต 80 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีแล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Perkin Elmer®, Em Sight 3400) ทำการทดลอง 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวม นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าที่ได้ในรูปของ มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมสารสกัด (Gallic acid equivalent, GAE/g extract) (Chewchinda *et al.*, 2019)

3. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content, TFC)

หาปริมาณ TFC ด้วยวิธี Aluminium chloride method โดยเตรียมสารมาตรฐานควอร์เซทิน (Quercetin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 45 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร จากนั้นนำสารสกัดกระท่อม ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารมาตรฐานปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติม 2 เปอร์เซ็นต์ อะลูมิเนียมคลอไรด์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Perkin Elmer®, Em Sight 3400) ทำการทดลอง 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าที่ได้ในรูปของมิลลิกรัมควอร์เซทินสมมูลต่อกรัมสารสกัด (Quercetin equivalent, QE/g extract) (Sithisarn *et al.*, 2015)

4. การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบกระท่อม ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน เตรียมสารสกัดกระท่อม ที่ความเข้มข้น 1.56 3.12 6.25 12.50 และ 25 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร แล้วนำสารสกัดกระท่อมปริมาตร 80 ไมโครลิตร มาเติมสารละลาย DPPH ในเมทานอล ความเข้มข้น 152 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Perkin Elmer®, Em Sight 3400) ทำการทดลอง 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณตามสมการข้างล่างแสดงในค่า IC₅₀ (50% Inhibitory Concentration) (ศุภรัตน์และคณะ, 2564)

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A_c - A_{bc}) - (A_s - A_{bs})}{A_c - A_{bc}} \times 100$$

เมื่อ	A _c	= absorbance of control
	A _b	= absorbance of blank control
	A _s	= absorbance of sample
	A _{bs}	= absorbance of blank sample

5. การทดสอบการลดสีของอนุมูล ABTS^{•+}

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการเตรียมสารละลาย 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS^{•+}) ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโพแตสเซียมเพอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ นำสารละลาย ABTS^{•+} กับสารละลายโพแตสเซียมเพอร์ซัลเฟตผสมกันในอัตราส่วน 1:0.5 ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 12 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางสารละลาย ABTS^{•+} โดยใช้เอทานอลให้มีค่าการดูดกลืนแสงช่วง 0.7 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เตรียมสารละลายของสารสกัดกระท่อมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS^{•+} ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Perkin Elmer®, Em Sight 3400) ทำการทดลอง 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นำผลการทดลอง ที่ได้มาคำนวณการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} โดยแสดงค่าในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมสารสกัด (mg ascorbic acid equivalent/g extract) (สุชาติและปวีณา, 2558; พิชาพัทธ์และคณะ, 2568)

6. การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็ก (FRAP assay)

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็ก โดยการเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย มิลลิโมลาร์ 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ใน 40 มิลลิโมลาร์ ของกรดไฮโดรคลอริก อัตราส่วน 10:1:1 จากนั้นเตรียม สารละลายของสารสกัดกระท่อมที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเอทานอล ปิเปตสารสกัดกระท่อมปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติม FRAP reagent ปริมาตร 180 ไมโครลิตรเขย่าเล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้ 4 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Perkin Elmer®, Em Sight 3400) ทำการทดลอง 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืน แสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟเส้นตรง ($y = 0.6164x - 0.0629$ $R^2 = 0.9996$) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง กับความเข้มข้นของ สารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตมาวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณ โดยแสดงค่าที่ได้ในรูปแบบ มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด (mM FeSO₄ equivalent/g extract) (สุชาติดาและปวีณา, 2558; พิชทรัพย์และคณะ, 2568)

$$\text{FRAP (mMFe}^{2+} \text{ eq. / g extract)} = \frac{\text{mM Fe}^{2+} \text{ จากกราฟ} \times \text{ml ตัวอย่าง}}{\text{g สารสกัด}}$$

7. การเพาะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ ประกอบด้วย Fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37 °C ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ร้อยละ 5 ความชื้น 80 - 90 เปอร์เซ็นต์ sub-culture ทุก 3 วัน (Nattha *et al.*, 2021)

8. ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดกระท่อมและสารไมทราจินีนต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT assay

ทดสอบความเป็นพิษของเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT assay นำเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 จำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปบ่มในตู้ที่มี CO₂ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารมาตรฐาน ไมทราจินีนและสารสกัดกระท่อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อย่างเดียว จากนั้น นำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม MTT ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละ หลุมจำนวน 5 ไมโครลิตร และนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดูดส่วนน้ำออกให้หมดทุกหลุม แล้วเติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกฟอร์มazan หาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (TECAN, USA) (วรวิทย์และคณะ, 2564) โดยสารที่ทดสอบจะถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อร้อยละ การมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (BenSaad *et al.*, 2017) สามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) ได้จากสมการ

$$\% \text{ การรอดชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสง (OD) ของเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ}}{\text{ค่าดูดกลืนแสง (OD) ของเซลล์กลุ่มควบคุม}} \times 100$$

9. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของไมทราไจนีนและสารสกัดกระท่อมในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ต่อการหลั่ง NO

เตรียมสารมาตรฐานไมทราไจนีนที่ความเข้มข้น 12.5 25 50 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดกระท่อมที่ความเข้มข้น 12.5 25 50 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้ Dexamethasone ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นกลุ่มควบคุมบวก เนื่องจาก Dexamethasone ละลายได้ในไขมัน สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ไซโตพลาสซึมได้ มีฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยเข้าไปจับกับ glucocorticoid receptor แล้วไปควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทำให้สามารถยับยั้งไซโตไคน์ (IL-1 IL-6 TNF- α) และเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Chang *et al.*, 2021) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 จำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (100 ไมโครลิตร) นำไปบ่มในตู้ที่มี CO₂ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใส่สารมาตรฐาน ไมทราไจนีนที่ความเข้มข้น 12.5 25 50 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร และสารสกัดกระท่อมที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 12.5 25 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้ที่มี CO₂ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงเติม Lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* 0111: B4, Sigma-aldrich, Germany) ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในตู้ CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการตรวจวัดปริมาณของไนตริกออกไซด์ (NO) ที่สร้างขึ้นจากเซลล์มาโครฟาจ ในรูปของ nitrite โดยนำส่วนน้ำของอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำปฏิกิริยากับ Griess reagent (Promega, USA.) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader (TECAN, USA.) เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ได้รับไมทราไจนีน และสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (การทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ) โดยคำนวณหาปริมาณของ Nitrite จากกราฟมาตรฐานของ Nitrite (Park *et al.*, 2014; Ohgami *et al.*, 2003)

10. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ต่อการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 TNF- α และ PGE2

ระดับไซโตไคน์ IL-6 TNF- α และ PGE2 ในส่วนน้ำของเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกทดสอบด้วยไมทราไจนีนและสารสกัดกระท่อมความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มาโครฟาจ นำไปบ่มในตู้ที่มี CO₂ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม LPS (*Escherichia coli* 0111: B4, Sigma-aldrich, Germany) ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อย่างเดียว นำไปเลี้ยงในตู้ที่มี CO₂ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเฉพาะส่วนน้ำ นำมาวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปของ Luminex® reagent kits (Merck Millipore, Merck group, Darmstadt, Germany) โดยมีวิธีการดังนี้ คือ ใช้เม็ดแม่เหล็กที่เคลือบแอนติบอดีจับกับตัวอย่างส่วนน้ำ 25 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมของแผ่น 96 หลุม จากนั้นทำการบ่มบนเครื่องเขย่าแม่เหล็กที่อุณหภูมิ 4 °C ในที่มืดเป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นทำการล้างเม็ดแม่เหล็ก จำนวน 3 ครั้ง และเติมแอนติบอดีตรวจจับ ทำการบ่มต่ออีก 60 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด และเติมสาร streptavidin-phycoerythrin นำไปบ่มเป็นเวลา 30 นาที ทำการล้างอีกสองครั้ง และเติมสาร sheath fluid ทำการวัดระดับไซโตไคน์และ PGE2 ด้วยเครื่อง xMAP® INTELLIFLEX โดยคำนวณความเข้มข้นของระดับไซโตไคน์และ PGE2 จากกราฟมาตรฐาน

11. การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการทดลองนี้ใช้ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n = 3$) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics version 26 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มที่ทดสอบด้วย LPS เพียงอย่างเดียว กับกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) จากนั้นจึงทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่ ด้วยวิธี Duncan's test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กำหนดค่า $p < 0.05$

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ปริมาณสารสกัดเอทานอล

นำใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดงมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 (อัตราส่วน 1:10) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสารสกัดที่ได้มีสีเขียวเข้ม นำไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ แล้วนำมาทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็งแบบสูญญากาศ ได้ร้อยละของสารสกัดเท่ากับ 22.67 ± 0.60 เกือบสารสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

2. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ TPC และปริมาณ TFC

ปริมาณ TPC ที่พบในสารสกัดกระท่อมพันธุ์ก้านแดงเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($R^2 = 0.9997$) สมการเส้นตรงที่ได้มีค่าเท่ากับ ($y = 5.9823x - 0.0168$) ผลการทดสอบพบปริมาณ TPC มีค่า 285.50 ± 1.67 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมสารสกัด (ตารางที่ 1)

ปริมาณ TFC ของสารสกัดกระท่อมพันธุ์ก้านแดงเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานควอซิทิน ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($R^2 = 0.9997$) สมการเส้นตรงที่ได้มีค่าเท่ากับ ($y = 11.779x - 0.0835$) ผลการทดสอบพบปริมาณ TFC มีค่า 358.97 ± 0.98 มิลลิกรัมควอซิทินสมมูลต่อกรัมสารสกัด (ตารางที่ 1)

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกระท่อมพันธุ์ก้านแดงด้วยวิธี DPPH assay พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.39 ± 0.49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก 2.47 ± 0.10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 2)

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระท่อมพันธุ์ก้านแดงด้วยวิธี ABTS⁺ assay โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงจากการสร้างกราฟมาตรฐาน ($R^2 = 0.999$) โดยมีสมการเส้นตรง ($y = 1.1741x + 15.177$) พบว่าสารสกัดกระท่อม มีค่า Ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (VEAC) เท่ากับ 17.76 ± 0.33 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมสารสกัด (ตารางที่ 2)

ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารสกัดกระท่อมพันธุ์ก้านแดงด้วยวิธี FRAP assay โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงจากการสร้างกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ($R^2=0.9996$) โดยมีสมการเส้นตรง ($y=0.6164x - 0.0629$) จากการทดสอบพบว่าสารสกัดกระท่อม (95% EtOH) มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเท่ากับ $5,211.44 \pm 9.36$ มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบปริมาณ TPC และปริมาณ TFC ของสารสกัดกระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95

สารพฤษเคมี	สารมาตรฐาน	กราฟมาตรฐาน (Equation and R ²)	ความเข้มข้น
TPC	กรดแกลลิก	y= 5.9823x - 0.0168 R ² = 0.9997	285.50 ± 1.67 mg GAE/g extract
TFC	ควอซิทิน	y=11.779x - 0.0835 R ² = 0.9997	358.97 ± 0.98 mg QE/g extract

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS and FRAP assays ของสารสกัดกระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95

ตัวอย่าง / สารมาตรฐาน	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ IC ₅₀ of DPPH (µg/ml)	VEAC of ABTS (mg ascorbic acid /g extract)	FRAP assay (mM FeSO ₄ equivalent/g extract)
สารสกัดกระท่อม (95% EtOH)	7.39 ± 0.49	17.76 ± 0.33	5,211.44 ± 9.36
กรดแอสคอร์บิก	2.47 ± 0.10	-	-

4. ความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7

เมื่อนำสารมาตรฐานไมทราจินีนและสารสกัดกระท่อมแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay พบว่า สารมาตรฐานไมทราจินีนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 มีอัตราการรอดชีวิต 61% แต่สารมาตรฐานไมทราจินีนความเข้มข้น 12.5 - 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ความเจริญของเซลล์มากกว่า 100% และสารสกัดกระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ความเข้มข้น 12.50 - 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีอัตราการรอดชีวิต 98 - 106% แสดงว่าความเข้มข้นที่มีขนาดต่ำ สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ได้ และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารมาตรฐานและสารสกัดกระท่อม ในการทดลองนี้เลือกใช้การทดลองความเข้มข้นของสารมาตรฐานไมทราจินีนและความเข้มข้นของสารสกัดกระท่อมที่มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 80% (BenSaad *et al.* 2017) จึงเลือกใช้สารมาตรฐานไมทราจินีน ที่ความเข้มข้น 12.5 25 50 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดกระท่อมที่ความเข้มข้น 12.5 25 50 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของการทดสอบในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 (รูปที่ 1)

5. ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดกระท่อมในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ต่อการหลั่ง NO

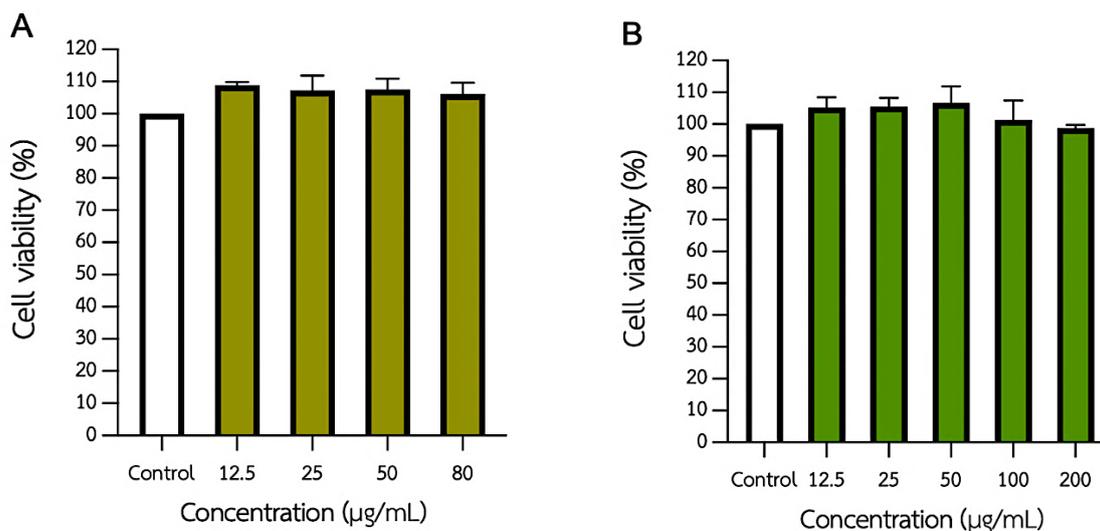
จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่ง NO ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารมาตรฐานไมทราจินีนที่ความเข้มข้น 50 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้าง NO (8.09 - 17.44 ไมโครโมลาร์) ได้อย่างมีนัยสำคัญและสารสกัดกระท่อมที่ความเข้มข้น 50 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้าง NO (7.03 - 26.93 ไมโครโมลาร์) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบการสร้าง NO (33.68 ไมโครโมลาร์) ในกลุ่มที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 2)

6.ฤทธิ์ต้านการอักเสบของไมทราไจนินและสารสกัดกระท่อมในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ต่อการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 TNF- α และ PGE2

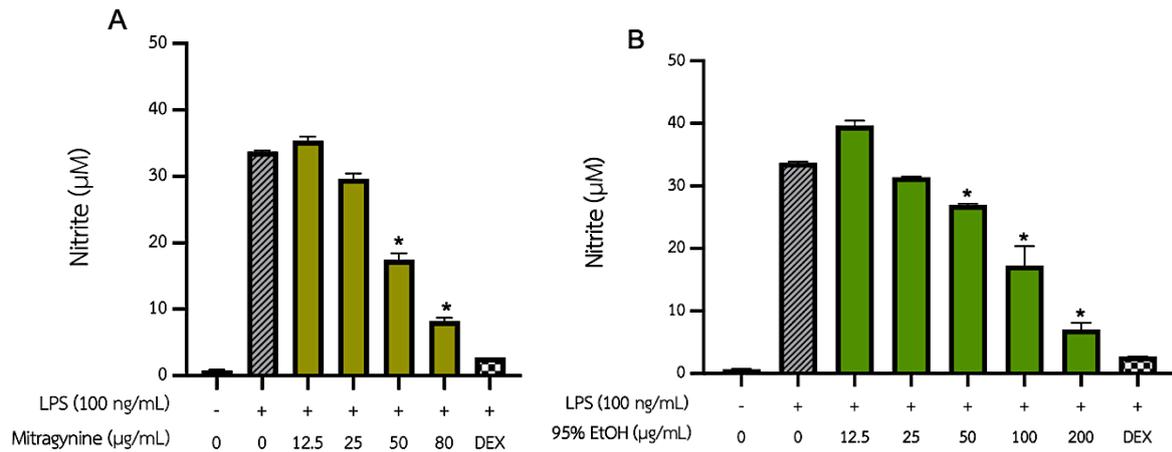
การทดสอบฤทธิ์ของสารมาตรฐานไมทราไจนินและสารสกัดกระท่อมในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารมาตรฐานไมทราไจนินที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (12,850.67 pg/mL) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว (18,024.63 pg/mL) ส่วนสารสกัดกระท่อมที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ก็แสดงฤทธิ์ยับยั้ง IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน โดยมีค่าการหลั่งอยู่ในช่วง 11,600.83 – 14,656.83 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (* $p < 0.05$) (รูปที่ 3)

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบ TNF- α พบว่าสารมาตรฐานไมทราไจนินที่ความเข้มข้น 12.5 25 50 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (6,603.65 - 6,706.37 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และสารสกัดกระท่อมที่ความเข้มข้น 25 50 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (6,651.77 - 6,702.24 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง TNF- α อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม LPS (6,697.11 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (รูปที่ 4)

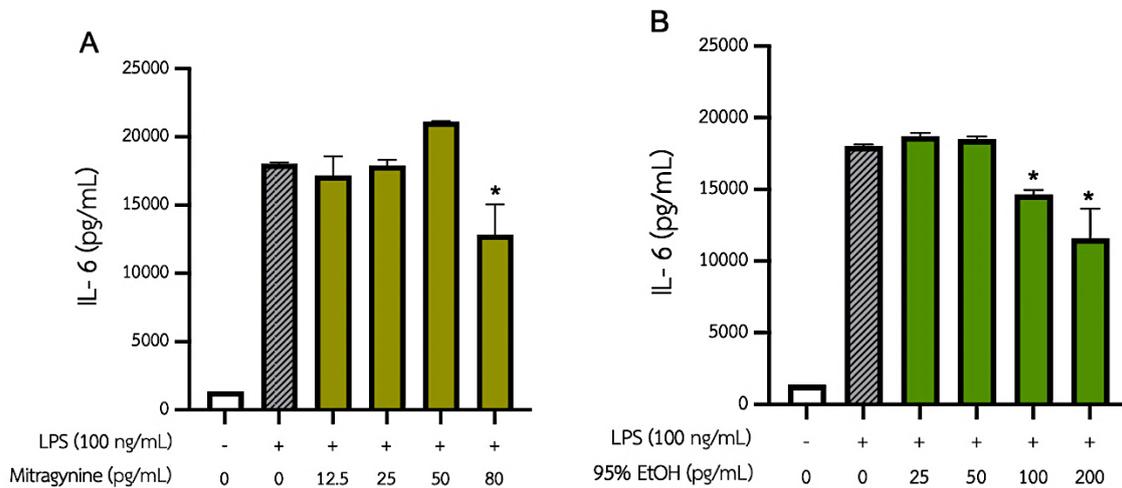
ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบ PGE2 พบว่าสารมาตรฐานไมทราไจนินที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการหลั่ง PGE2 ได้ (157.47 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เมื่อเทียบกับกลุ่ม LPS (168.65 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) อย่างไรก็ตาม สารสกัดกระท่อมที่ความเข้มข้น 25 50 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (163.38 - 169.65 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง PGE2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 5)



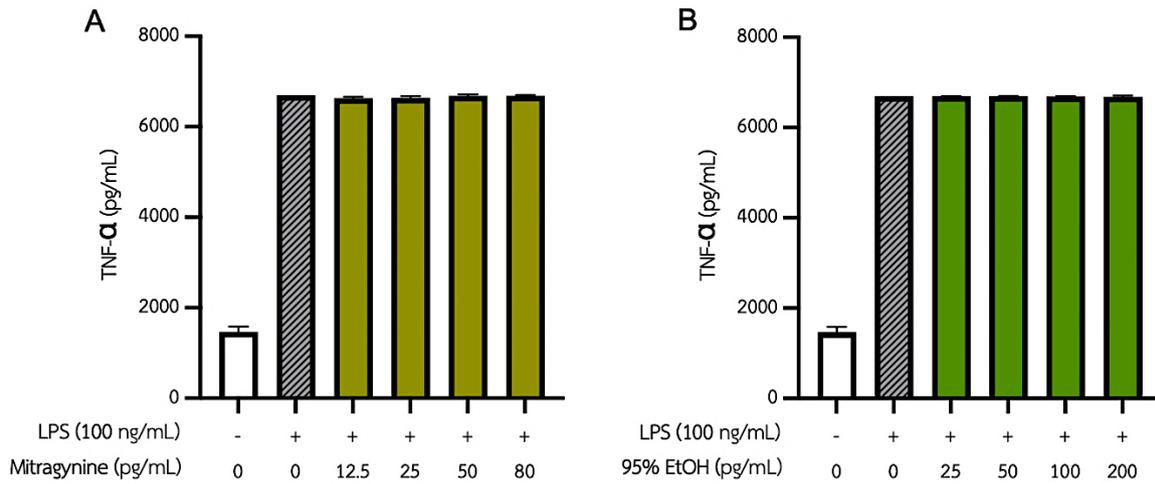
รูปที่ 1 ผลของสารมาตรฐานไมทราไจนิน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความอยู่รอดของเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ภายหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อัตราการรอดชีวิตของเซลล์แสดงเป็นร้อยละเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ



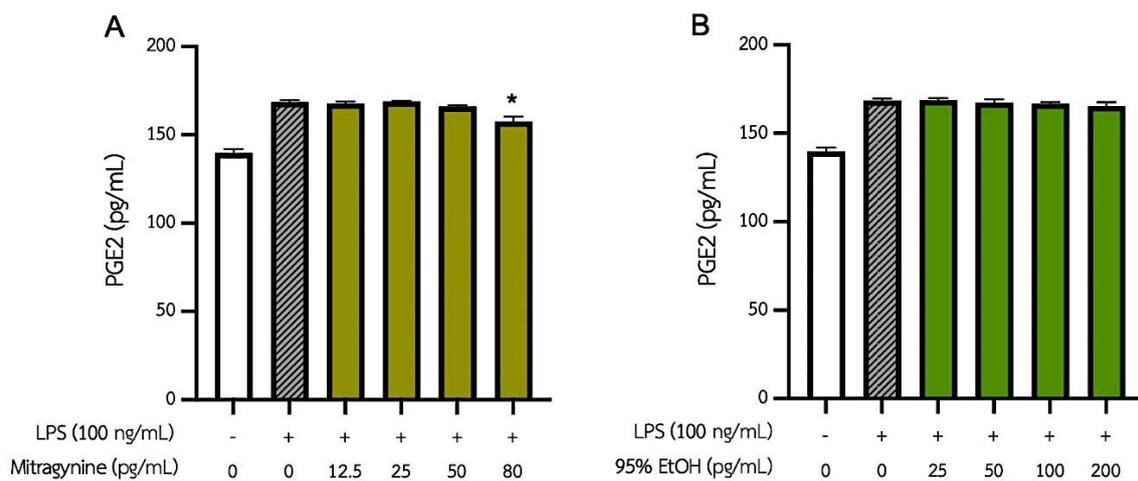
รูปที่ 2 ผลของสารมาตรฐานไมทราไจนิน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ต่อการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 โดยเซลล์ถูกบ่มร่วมกับสารทั้งสองที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (100 ng/mL) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เดกซาเมทาโซน (DEX, 20 µg/mL) เป็นกลุ่มควบคุมบวก ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว



รูปที่ 3 ผลของสารมาตรฐานไมทราไจนิน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ต่อการต้านการอักเสบ โดยการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 ในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 โดยเซลล์ถูกบ่มร่วมกับสารทั้งสองที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (100 ng/mL) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การหลั่ง IL-6 ตรวจวัดโดยใช้ชุดทดสอบ ELISA ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว



รูปที่ 4 ผลของสารมาตรฐานไมทราไจนีน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ TNF- α ในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 เซลล์ถูกบ่มร่วมกับสารทั้งสองเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (100 ng/mL) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การหลั่ง TNF- α ตรวจวัดโดยใช้ชุดทดสอบ ELISA ผลลัพธ์ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว



รูปที่ 5 ผลของสารมาตรฐานไมทราไจนีน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการหลั่ง PGE2 ในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 โดยเซลล์ถูกบ่มร่วมกับสารทั้งสองเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (100 ng/mL) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การหลั่ง PGE2 ตรวจวัดโดยใช้ชุดทดสอบ ELISA ผลลัพธ์ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการทดลองพบว่า สารสกัดกระท่อมพันธุ์ก้านแดงที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) เท่ากับ 285.50 ± 1.67 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูล ต่อกรัมสารสกัด ซึ่งสูงกว่าผลการศึกษาของธัญญภัทร์และณัฏฐารุณี (2567) ที่ใช้เอทานอล 95% เช่นกัน โดยพบ TPC เท่ากับ 166.81 ± 9.20 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมสารสกัด และสูงกว่าผลของ Zhang *et al.* (2023) ที่ใช้เอทานอล 70% ซึ่งมี TPC เท่ากับ 24.62 ± 3.74 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมสารสกัด แสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้ตัวทำละลายเอทานอล 95% สามารถสกัดสารฟีนอลิกได้มากกว่าการใช้เอทานอล 70% นอกจากนี้ วิธีการและระยะเวลาการสกัดยังส่งผลต่อปริมาณ TPC ด้วย ในส่วนของปริมาณสารฟีนอลอยด์ทั้งหมด (TFC) พบว่า สารสกัดกระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มี TFC เท่ากับ 358.97 ± 0.98 มิลลิกรัมแควอซิทีนสมมูลต่อกรัมสารสกัด ซึ่งสูงกว่าผลการศึกษาของ Melania *et al.* (2024) ที่ใช้เอทานอล 96% ซึ่งให้ค่า TFC เพียง 0.86 ± 0.0 มิลลิกรัมแควอซิทีนสมมูลต่อกรัมสารสกัด แสดงให้เห็นว่าการหมักด้วยเอทานอล 95% เป็นเวลา 7 วัน เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระออกมาได้ในปริมาณมาก ทั้งนี้ สารฟีนอลิกและฟีนอลอยด์เป็นสารสำคัญที่มีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสารฟีนอลิกสามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ส่วนสารฟีนอลอยด์ที่มีปริมาณสูงในพืช มักแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธี ได้แก่ 1) วิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดดังกล่าวมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.39 ± 0.49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าผลการศึกษาของหน้า ได้แก่ ขวณและชยานนท์ (2566) ที่รายงานค่า SC_{50} เท่ากับ 43 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Yuniarti *et al.* (2020) ที่ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 38.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Zhang *et al.* (2023) เท่ากับ 21.61 ± 0.01 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ วิมลรัตน์และคณะ (2567) เท่ากับ 15.60 ± 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้น สารสกัดใบกระท่อมด้วยเอทานอล 95% มีศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดในกลุ่มที่เปรียบเทียบ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับชนิดของพันธุ์พืชที่ใช้ และแสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระท่อมพันธุ์ก้านแดง สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีแม้ในความเข้มข้นต่ำ 2) วิธี ABTS⁺ assay พบว่าสารสกัดกระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีค่า VEAC เท่ากับ 17.76 ± 0.33 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมสารสกัด ขณะที่ผลการศึกษาของธัญญภัทร์และณัฏฐารุณี (2567) ซึ่งใช้วิธีการสกัดแบบเขย่าด้วยเอทานอล 95% ที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าให้ค่า VEAC สูงถึง 219.91 ± 1.08 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมสารสกัด ส่วนผลการศึกษาของ Zhang *et al.* (2023) ที่ใช้เอทานอล 70% พบว่า ให้ค่า VEAC เท่ากับ 9.33 ± 0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมสารสกัด แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดขึ้นอยู่กับทั้งชนิดของตัวทำละลายและวิธีการสกัด โดยการสกัดด้วยวิธีเขย่าด้วยเอทานอล 95% ให้ฤทธิ์ที่สูงกว่าการหมักนึ่งในงานวิจัยนี้ 3) วิธี FRAP assay พบว่าสารสกัดใบกระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีค่า FRAP เท่ากับ $5,211.44 \pm 9.36$ มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด ซึ่งสูงกว่าค่าที่รายงานโดย Zhang *et al.* (2023) ที่ใช้เอทานอล 70% ซึ่งได้ค่า FRAP เท่ากับ 89.31 ± 1.44 มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด สะท้อนให้เห็นว่าสารสกัดจากเอทานอล 95% มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} ได้ดีกว่า ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่ได้แสดงว่าไมทราเจนินและอนุพันธ์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Goh *et al.*, 2014)

จากผลการทดสอบทั้งสามวิธี ได้แก่ DPPH ABTS⁺ และ FRAP assay พบว่าวิธี DPPH และ ABTS⁺ เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในสถานะตัวกลางที่เป็นสารอินทรีย์ โดย DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร สีม่วง และมีโครงสร้างไนโตรเจนที่คงตัว ไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการกระตุ้นเพื่อเกิดอนุมูลใหม่ ส่วน ABTS⁺ เป็นอนุมูลอิสระที่สามารถรับไฮโดรเจนอะตอมจากสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดอนุมูลเปอร์ออกไซด์ (peroxyl radical) ในกระบวนการสลายตัว ส่วนวิธี FRAP เป็นการทดสอบในตัวกลางที่เป็นน้ำ ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมในเซลล์ของมนุษย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก (สุชาติและปวีณา, 2558) จึงให้ภาพรวมที่สอดคล้องกับสถานะทางชีวภาพมากกว่า

ในด้านฤทธิ์ด้านการอักเสบสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 50 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ สารมาตรฐานไมทราเจนิน ที่ความเข้มข้น 50 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยสามารถยับยั้งการหลั่ง NO ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS อย่างเดียว

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งสารไซโตไคน์อักเสบ ได้แก่ IL-6 TNF- α และ PGE2 ของสารมาตรฐานไมทราเจนินและสารสกัดจากพืชกระเทียมในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารทั้งสองชนิดมีผลลดการหลั่ง IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม ไม่พบฤทธิ์การยับยั้ง TNF- α ที่มีนัยสำคัญ และมีเพียงสารมาตรฐานไมทราเจนินในระดับความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถลดการหลั่ง PGE2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ การลดระดับของ IL-6 และ PGE2 อาจเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของสารมาตรฐานไมทราเจนินและสารสำคัญอื่นในสารสกัดกระเทียมที่ออกฤทธิ์ผ่านเส้นทาง MAPKs (เช่น p38, JNK) และ/หรือ JAK/STAT ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของ IL-6 และเอนไซม์ COX-2 ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง PGE2 (Kim *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2014) การที่ไมทราเจนินสามารถลดระดับ PGE2 ได้ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารออกฤทธิ์หลักในการต้านการอักเสบผ่านการยับยั้ง COX-2 มากกว่าสารสกัดหยาบที่มีองค์ประกอบสารอื่นๆ ร่วมด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ได้แสดงว่าไมทราเจนินออกฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้ง COX-2 และ prostaglandin E2 ในเซลล์มาโครฟาจ (Utar *et al.*, 2010)

TNF- α เป็นไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งในระยะเริ่มต้นของกระบวนการอักเสบ โดยมีการกระตุ้นและแสดงออกสูงสุดภายใน 1 - 3 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วย LPS ผ่านทาง NF- κ B pathway (Guha and Mackman, 2001; Tak and Firestein, 2001) ดังนั้น การวัดระดับ TNF- α หลังผ่านไป 24 ชั่วโมง อาจไม่สามารถแสดงผลการยับยั้งได้อย่างชัดเจน

เพื่อให้เข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ของสารทดสอบได้ดียิ่งขึ้น ควรดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในเส้นทาง MAPKs JAK/STAT และ NF- κ B รวมถึงวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของไซโตไคน์ในช่วงเวลาต่าง ๆ อย่างเป็นลำดับ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้พบว่าสารสกัดใบกระเทียมพันธุ์ก้านแดงที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีปริมาณสารฟีนอลิก (TPC) และฟลาโวนอยด์ (TFC) สูง และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยเฉพาะในการทดสอบด้วยวิธี DPPH ซึ่งให้ค่า IC₅₀ ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้า แสดงถึงศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้แม้ในความเข้มข้นต่ำ ด้านฤทธิ์ด้านการอักเสบ สารสกัดใบกระเทียมและสารมาตรฐานไมทราเจนินสามารถยับยั้งการหลั่ง IL-6 และ NO ในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง TNF- α อย่างชัดเจน และเฉพาะไมทราเจนินที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่านั้นที่สามารถลดระดับ PGE2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้ง COX-2 ผ่านกลไก MAPKs หรือ JAK/STAT pathway

โดยสรุป สารสกัดใบกระเทียมพันธุ์ก้านแดงมีศักยภาพเป็นแหล่งสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ ซึ่งควรศึกษาเพิ่มเติมในเชิงกลไกระดับโมเลกุลเพื่อยืนยันประสิทธิภาพและแนวทางการประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรมในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา และงานวิจัยคลินิกและนวัตกรรมสถาบันมะเร็งแห่งชาติที่เอื้อเพื่อสถานที่ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล. (2560). พิษกระท่อม (Kratom). ศูนย์การศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์. แหล่งข้อมูล: https://ccpe.pharmacycouncil.org/index.php?option=article_detail&subpage=article_detail&id=251. ค้นเมื่อวันที่ 24 ธันวาคม 2567.
- ชวภณ พุ่มพงษ์ และชยานนท์ เขาวาน์วุฒิกุล (2566). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองของสารสกัดใบกระท่อม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ 9(2): 25 - 33.
- ดวงแก้ว ปัญญาภู, สุเมธี นามเกิด, นิตาภา อินชัย และกุลสิริ ยศเสถียร (2559). กระท่อม: สมุนไพรหรือยาเสพติด. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก 14(3): 242 - 256.
- ณัช นาคะพันธ์, มณฑกา ธีรชัยสกุล, ศิริพร ปัทม, ขวัญเรือน สมพิมาย และปรีชา หนูทิม (2559). การศึกษาการใช้ประโยชน์จากกระท่อมในการรักษาโรคของหมอพื้นบ้านภาคใต้. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก 14(3): 274 - 285.
- ชญัญภัสร์ เขาวรรณกุลศักดิ์และณัฐภาวุฒิ ฐิติปราโมทย์. (2567). การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบกระท่อมและใบบัวบก. แหล่งข้อมูล: <https://postgrads.mfu.ac.th/wp-content/uploads/2024/11/6351701286.pdf>. ค้นเมื่อวันที่ 10 มิถุนายน 2568.
- สาวิตตรี อัจฉนาภกรชัย, อาภาศิริวงศ์ ณ อยุธยา, นิวัตติ แก้วประดับ, สมสมร ชิตตระกูล, จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล, เอกสิทธิ์ กุมารสิทธิ์, สมชาย ศรีวิริยะจันทร์, ดารณีย์ เจ๊ะหะ, วัชรพงศ์ พุ่มชื่น และดาริกา ไสงาม (2563). บทสรุปของพืชกระท่อม. (พิมพ์ครั้งที่ 2). สงขลา: ลีโอ ดีไซน์ แอน พรินทร์. หน้า 20 - 21.
- พระขวัญชัย อุดคชโย. (2565). เสน่ห์กระท่อมกับตำรับยาไทย เคี้ยว ฟน พอก ผง ตำ ต้ม สูบ กวน ฉีด รม ก้านเขียว ก้านแดง ชะงักน้กแล ชุมพร: ศูนย์เรียนรู้สมุนไพรไทยหมอพื้นบ้าน - หมอพร. หน้า 65.
- พิชชาพัชร ฐิติธนะอภิพงษ์, ศุภรัตน์ ดวนใหญ่, อ้อมบุญ วัลลิสุต, กวินท์ ศาสาย และจันทนา ยะหัวผาย (2025). ปริมาณสารฟลูคาเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดผักเสี้ยนผี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 27(1): 30 - 44.
- วิมลรัตน์ อินศวร, ศีลณัฐ วิเศษสมบัติ, ธนสร กรเลิศวานิช, ธีรพงศ์ เดชขุ่น และทิพย์รัตน์ ชาหอมชื่น (2567). ผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ สารสกัดจากใบกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) ที่สกัดด้วยเอทานอล. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 26(1): 34 - 41.
- วรวิทย์ จันทรสุวรรณ, สิริรัตน์ พานิช และอัญชญา ชัตติยะวงศ์. (2564). การตรวจสอบองค์ประกอบทางฟลูคาเคมีและความสามารถในการออกฤทธิ์ของน้ำสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบขลุ่ยสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ลดการอักเสบของผิวหนัง. ใน: รายงานการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม, กรุงเทพฯ. 1 - 89.
- ศุภรัตน์ ดวนใหญ่, ชารินันท์ แจงกลาง, อัจฉรา แก้วน้อย, เพชรน้ำผึ้ง รอดโพธิ์ และอาวุธ หงษ์ศิริ (2564). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิกรวม และ ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของ สารสกัดพิกัดตรีสมอ พิกัดตรีสัตถุลา พิกัดตรีผล สมภูฐาน. วารสารหมอยาไทยวิจัย 7(2): 93 - 104.
- สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด. (2564). ความรู้ทั่วไปและงานวิจัยพืชกระท่อม. แหล่งข้อมูล: <https://kratom.sci.psu.ac.th/knowledge/interdisciplinary/3176/>. ค้นเมื่อวันที่ 27 มกราคม 2568.
- สุชาติดา มานอก และปวีณา ลิ้มเจริญ (2558). การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร. วารสารก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ 15(1): 106 - 117.

- BenSaad, L.A., Kim, K.H., Quah, C.C., Kim, W.R. and Shahimi, M. (2017). Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A and B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17: 47. doi: 10.1186/s12906-017-1555-0.
- Chang, W.T., Hong, M.Y., Chen, C.L., Hwang, C.Y., Tsai, C.C. and Chuang, C.C. (2021). Mutant glucocorticoid receptor binding elements on the interleukin-6 promoter regulate dexamethasone effects. *BMC Immunol* 22: 24. doi: 10.1186/s12865-021-00413-z.
- Chewchinda, S., Kongkiatpaiboon, S. and Sithisarn, P. (2019). Evaluation of Antioxidant Activities, Total Phenolic and Total Flavonoid Contents of Aqueous Extracts of Leaf, Stem, and Root of *Aerva lanata*. *Journal of Natural Sciences Chiang Mai University* 18(3): 345 - 357. doi: 10.12982/CMUJNS.2019.0024.
- Goh, T.B., Koh, R.Y., Mordi, M.N. and Mansor, S.M. (2014). Antioxidant value and antiproliferative efficacy of mitragynine and a silane-reduced analogue. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15(14): 5659 - 5665. PMID: 25081682.
- Guha, M. and Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling* 13(2): 85 - 94. doi: 10.1016/S0898-6568(00)00149-2.
- Kim, H.K., Cheon, B.S., Kim, Y.H., Kim, S.Y. and Kim, H.P. (2010). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology* 69(10): 1511 - 1519.
- Thongpradichote S, Matsumoto K, Tohda M, Takayama H, Aimi N, Sakai S-I, Watanabe H. Identification of opioid receptor subtypes in antinociceptive actions of supraspinally administered mitragynine in mice. *Life Sciences* 62(16): 1371 - 1378. doi: 10.1016/s0024-3205(98)00075-7.
- Melania, P., Masriani., Muharini, R., Alimuddin A.H. and Sartika, R.P. (2024). Total phenolic and flavonoids content, and antioxidant activity of Kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) leaf ethanol extract. *Jurnal Natural* 24(1): 16 - 21. doi: 10.24815/jn.v24i1.33125.
- Matsumoto, K., Horie, S., Ishikawa, H., Takayama, H., Aimi, N., Ponglux, D. and Watanabe, K. (2004). Antinociceptive effect of 7-hydroxymitragynine in mice: Discovery of an orally active opioid analgesic from the Thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*. *Life Sciences* 74(17): 2143 - 2155. doi: 10.1016/j.lfs.2003.09.054.
- Mojzer, E. B., Hrcic, M. K., Skerget, M., Knez, Z. and Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* 21(7): 901. doi: 10.3390/molecules21070901.
- Mohamed, H.M. (2015). Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 66: 176 - 192. doi: 10.1016/j.trac.2014.11.010.
- Nattha, P., Santad, W., Pritsana, R. and Chutha, T.Y. (2021). Inflammatory response of raw 264.7 macrophage cells teated with dragonfruit oligosaccharide on lipopolysaccharide-induced inflammation. *Food Science and Technology Research* 27(1): 111 - 119. doi: 10.3136/fstr.27.111.

- Ohgami, K., Shiratori, K., Kotake, S., Nishida, T., Mizuki, N., Yazawa, K. and Ohno, S. (2003). Effects of Astaxanthin on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation In Vitro and In Vivo. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 44(6): 2694 - 2701. doi: 10.1167/iops.02-0822.
- Park, H.S., Choi, H.Y. and Kim, G.H. (2014). Preventive effect of *Ligularia fischeri* on inhibition of nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages depending on cooking method. *Biological Research* 47: 69. doi: 10.1186/0717-6287-47-69.
- Parthasarathy, S., Azizi, J.B., Ramanathan, S., Ismail, S., Sasidharan, S., Said, M.I.M. and Mansor, S.M. (2009). Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous, Methanolic and Alkaloid Extracts from *Mitragyna Speciosa* (Rubiaceae Family) Leaves. *Molecules* 14(10): 3964 - 3974. doi: 10.3390/molecules14103964.
- Shaik Mossadeq, W.M., Sulaiman, M.R., Tengku Mohamad, T.A., Chiong, H.S., Zakaria, Z.A., Jabit, M.L., Baharuldin, M.T.H. and Israf, D.A. (2009). Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of *Mitragyna speciosa* Korth methanolic extract. *Medical Principles and Practice* 18(5): 378 - 384. doi: 10.1159/000226292.
- Sithisarn, P., Rojsanga, P., Sithisarn, P. and Kongkiatpaiboon, S. (2015). Antioxidant Activity and Antibacterial Effects on Clinical Isolated *Streptococcus suis* and *Staphylococcus intermedius* of Extracts from Several Parts of *Cladogynosorientalis* and Their Phytochemical Screenings. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015: 908242. doi: 10.1155/2015/908242.
- Suhaila, S.M., Sulaiman, M.R., Tengku Mohamad, T.A., Chiong, H.S., Zakaria, Z.A., Jabit, M.L., Baharuldin, M.T., Israf, D.A. and Arulselvan, P. (2009). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Mitragyna speciosa* Korth methanolic extract. *Medical Principles and Practice*. 18: 378 - 384. doi: 10.1159/000226292.
- Tak, P.P. and Firestein, G.S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation* 107(1): 7 - 11.
- Tanaka, T., Narazaki, M. and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology* 6(10): a016295.
- Tuntiyasawasdikul, S., Junlatat, J., Tabboon, P., Limpongsa, E. and Jaipakdee, N. (2024). *Mitragyna speciosa* ethanolic extract: Extraction, anti-inflammatory, cytotoxicity, and transdermal delivery assessments. *Industrial Crops and Products* 208: 117909. doi: 10.1016/j.indcrop.2023.117909.
- Utar, Z., Majid, M.I.A., Adenan, M.I., Jamil, M.F.A. and Tan, M.L. (2011). Mitragynine inhibits the COX-2 mRNA expression and prostaglandin E₂ production induced by lipopolysaccharide in RAW264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology* 136(1): 75 - 82. doi: 10.1016/j.jep.2011.04.011.
- Yuniarti, R., Nadia, S., Alamanda, A., Zubir, M., Syahputra, R.A. and Nizam, M. (2020). Characterization, Phytochemical Screenings and Antioxidant Activity Test of Kratom Leaf Ethanol Extract (*Mitragyna speciosa* Korth) Using DPPH Method. *Journal of Physics: Conference Series* 1462(1): 012026. doi: 10.1088/1742-6596/1462/1/012026.

- Zakaria, F., Tan, J.K., Mohd Faudzi, S.M., Abdul Rahman, M.B. and Ashari, S.E. (2021). Ultrasound-assisted extraction conditions optimisation using response surface methodology from *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil leaves. *Ultrasonics Sonochemistry* 81: 105851. doi: 10.1016/j.ultsonch.2021.105851.
- Zhang, P., Wei, W., Zhang, X., Wen, C., Ovatlamporn, C. and Olatunji, O.J. (2023). Antidiabetic and antioxidant activities of *Mitragyna speciosa* (kratom) leaf extract in type 2 diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 162: 114689. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114689.
- Zhang, Q.W., Lin, L.G. and Ye, W.C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* 13: 20. doi: 10.1186/s13020-018-0177-x.

