รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae*) และสารเคมีที่ใช้ในการปฐมพยาบาลบางชนิดต่อการปล่อยเข็มพิษของแมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*) และแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*)

Effects of extracts of *Ipomoea pes-caprae* and other topical first-aid chemicals on nematocyst discharge of *Rhopilema hispidum* and *Sanderia malayensis*

สลิล ชั้นโรจน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 55251

สัญญาเลขที่ 45.5 / 2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae*) และสารเคมีที่ใช้ในการปฐมพยาบาลบางชนิดต่อการปล่อยเข็มพิษของแมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*) และแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*)

Effects of extracts of *Ipomoea pes-caprae* and other topical first-aid chemicals on nematocyst discharge of *Rhopilema hispidum* and *Sanderia malayensis*

สลิล ชั้นโรจน์

วิไลวรรณ พวงสันเทียะ

ศิริวรรณ ชูศรี

คณะวิทยาศาสตร์ และ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล

มหาวิทยาลัยบูรพา

พฤศจิกายน พ.ศ. 2561

บทคัดย่อ

วิธีการปฐมพยาบาลผู้ที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุนในปัจจุบันอาศัยข้อมูลงานวิจัยจากการทดสอบในแมงกะพรุนที่พบในต่างประเทศ ซึ่งมีความแตกต่างของชนิดของพิษและลักษณะของเข็มพิษจากแมงกะพรุนที่พบในประเทศไทย โดยทะเลในเขตจังหวัดชลบุรีจะพบแมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*) บ่อยที่สุดเพราะเป็นแมงกะพรุนที่เข้ามาตามฤดูมรสุม ในขณะที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลมีแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*) ซึ่งเป็นแมงกะพรุนไฟที่มีลักษณะสวยงาม อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีการศึกษาวิจัยถึงพิษและการถอนพิษของแมงกะพรุนทั้งสองขนิดนี้ เพื่อให้สามารถปฐมพยาบาลผู้ที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุนดังกล่าวได้ถูกต้องและทันท่วงที ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความรุนแรงของพิษของแมงกะพรุนทั้งสองชนิดโดยวิเคราะห์ร้อยละการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง และทดสอบว่าสารสกัดจากผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-capres*) หรือสารเคมีอื่นๆ มีส่วนช่วยในการถอนพิษแมงกะพรุนดังกล่าวหรือไม่ จากการศึกษาโดยใช้หนวดแมงกะพรุนบดละเอียดพบว่าหนวดแมงกะพรุนไฟมีฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกมากกว่าหนวดแมงกะพรุนหนังโดยมีค่าความหนาแน่นที่ทำให้เม็ดเลือดแตงแตกครึ่งหนึ่ง (EC_{50}) ที่ 13.2 และ 218.8 mg-tentacle/ml ตามลำดับ เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการถอนพิษที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและการป้องกันการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุน ผู้วิจัยพบว่า น้ำคั้นจากใบผักบุ้งทะเล สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเล น้ำส้มสายชูกลั่น และแทนนิน มีฤทธิ์ในการถอนพิษแมงกะพรุน ในขณะที่น้ำคั้นจากใบผักบุ้งทะเล สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเล น้ำส้มสายชูกลั่น แคลเซียม EDTA และแทนนิน มีฤทธิ์ในการลดอัตราการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังในสารละลาย แต่มีเพียงสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเล แคลเซียม และน้ำส้มสายชูกลั่น เท่านั้นที่ป้องกันการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังบนผิวหนังเทียมที่เลียบแบบการปฐมพยาบาลในสถานการณ์จริงได้ ในขณะที่แอลกอฮอล์และเหล้าขาวนอกจากจะเพิ่มฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนแล้ว ยังส่งผลให้เกิดการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้น ดังนั้นในการปฐมพยาบาลผู้ป่วยที่ได้รับพิษแมงกะพรุนโดยการใช้น้ำส้มสายชูกลั่นจึงเป็นแนวทางการปฐมพยาบาลที่เหมาะสมแล้ว นอกจากนี้การพัฒนาสารสกัดจากผักบุ้งทะเลเพื่อใช้ในการปฐมพยาบาลจะช่วยให้การรักษาผู้ป่วยที่ได้รับพิษแมงกะพรุนมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

คำสำคัญ: แมงกะพรุนหนัง แมงกะพรุนไฟ ผักบุ้งทะเล การแตกของเม็ดเลือดแดง กะเปาะเข็มพิษ การปฐมพยาบาล

Abtract

Current first-aid practice for patients suffering from jelly-fish toxin in Thailand is primarily relied on outside jelly-fish research. These informations may not apply to endogenous jelly-fish toxin in terms of toxicology and cnidocyte anatomy**.** One of the most well-known jelly fish found in the sea shore of Chonburi province is edible jelly fish (*Rhopilema hispidum*), commonly showing up during monsoon season. Furthermore, there are aquarium glowing fire jelly fishes (*Sanderia malayensis*) cultivated in the institute of marine science in Chonburi province. However, the toxicology of their toxins and antidotes have not been described clearly. To be able to administer a proper and swift first-aid response to patients suffering from these jelly-fish venoms, we aimed to study the severity of their toxins against hemolysis of red blood cells and test the effect of sea morning glory (*Ipomoea pes-capres*) extract and other chemicals on jelly-fish venom neutralization. Results indicated that fire jelly-fish tentacles had a potent hemolytic effect on procine red blood cells compared to a mild hemolytic effect caused by edible jelly-fish tentacles as shown by the smaller half maximum effective concentration value (EC_{50}) of 13.2 and 218.8 mg/ml, respectively. We observed that fresh sea moning-glory juice, sea morning-glory extract, distilled vinegar, and tannin were able to effectively neutralize jelly-fish hemolytic toxin. Moreover, sea moning-glory juice, sea morning-glory extract, distilled vinegar, calcium, EDTA and tannin were capable of reducing edible jelly-fish nematocyst discharge in the solution. However, only sea morning-glory extract, calcium solution and distilled vinegar had protective effects on edible jelly-fish nematocyst discharge induced by sonication on artificial skin mimicking the first-aid application in the real situation. Interestingly, not only ethanol and vodka enhanced the hemolytic effect of jelly-fish toxin, but also increased the nematocyst discharge induced by sonication. Therefore, we encourage to continue using distilled vinegar as the first-aid practice for patients suffering from jelly-fish toxin. Besides, sea morning-glory extract is proved to be a potent remedy for patients suffering from jelly-fish toxin that could develop into a new medicine in the future.

Keyword: edible jelly fish, fire jelly fish, sea morning glory, red blood cell hemolysis, nematocyst, first aid practice

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....ก
Abstract.....ข
สารบัญเรื่อง.....ค
สารบัญตาราง.....ฉ
สารบัญภาพ.....จ
1.บทนำ.....1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....1
1.2 วัตถุประสงค์.....2
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....3
2. วิธีการดำเนินการวิจัย.....4
2.1 การเตรียมผักบุ้งทะเล.....4
2.2 การตรวจสอบพันธุกรรมผักบุ้งทะเล.....4
2.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผักบุ้งทะเล.....4
2.4 การวิเคราะห์ปริมาณแทนนินและสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดผักบุ้งทะเล 4
2.5 การเตรียมแมงกะพรุน.....5
2.6 การตรวจสอบพันธุกรรมแมงกะพรุน.....5
2.7 การเตรียมเม็ดเลือดแดง พิษแมงกะพรุน และผิวหนังเทียม.....6
2.7.1 การเตรียมเม็ดเลือดแดง.....6
2.7.2 การเตรียมพิษแมงกะพรุน.....6
2.7.3การเตรียมผิวหนัง.....7
2.8 การทดสอบฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุน และสารเคมีบางชนิดต่อการแตก
ของเม็ดเลือดแดงหมู.....7
2.9 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการ
ออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุน.....7
3. ผลการวิจัย.....9
3.1 ชนิดของผักบุ้งทะเลและแมงกะพรุนหนังที่เก็บมาจากบริเวณชายทะเลจังหวัดชลบุรี.....9
3.2 ลักษณะของเข็มพิษและเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุน.....13
3.3 ฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู.....14
3.4 ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการออกฤทธิ์ของ
เซลล์เข็มพิษและพิษของแมงกะพรุนหนัง.....18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5 ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนัง....23
3.6 ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังบนผิวหนังเทียม....29
3.7 ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการออกฤทธิ์ของพิษของแมงกะพรุนไฟ....31
3.8 ปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัดจากผักบุ้งทะเล....33
4. อภิปรายผลการวิจัย....34
4.1 ผักบุ้งทะเลและแมงกะพรุนที่พบในจังหวัดชลบุรี....34
4.2 ลักษณะเซลล์เข็มพิษ เข็มพิษ และพิษแมงกะพรุน....34
4.3 ฤทธิ์ต้านพิษแมงกะพรุนหนังของผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิด....35
4.5 ฤทธิ์สารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนัง....36
4.6 เปรียบเทียบความสามารถในการป้องกันและบรรเทาพิษแมงกะพรุนหนังของผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิด....37
4.7 สารออกฤทธิ์ต้านพิษแมงกะพรุนในผักบุ้งทะเล....37
5. สรุปผลการวิจัย....38
6. ผลผลิต....39
6.1 ผลงานเชิงสาธารณะ....39
รายงานสรุปการเงิน....40
เอกสารอ้างอิง....41
ประวัตินักวิจัย....44

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากแมงกะพรุนและผักบุ้งทะเล.....6
ตารางที่ 2. ผลของสารเคมีในครัวเรือนและสารสกัดจากผักบุ้งทะเลต่อการวิเคราะห์ร้อยละ
การแตกของเม็ดเลือดแดงหมู.....19
ตารางที่ 3. ปริมาณฟีนอลรวมและแทนนินในสารสกัดจากใบผักบุงทะเล.....33

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1. การเตรียมตัวอย่างผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae*) เพื่อใช้สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดย-ตัวอย่างผักบุ้งทะเลเก็บมาจาก อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (ซ้าย) โดยแยกส่วนใบออกจากลำต้นและราก (กลาง) จากนั้นนำมาสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเอทานอล 9

ภาพที่ 2. ลักษณะของแมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*) ที่เก็บมาได้จากทะเลบริเวณจังหวัดชลบุรีและผ่านกระบวนการทำความสะอาดแล้วส่วนหมวกและตัวจะถูกแยกออก โดยส่วนหนวดจะถูกแยกนำไปเก็บที่อุณหภูมิ–80 °C และเข้าสู่กระบวนการ autolysis เพื่อให้เซลล์เข็มพิษหลุดออกมา.....9

ภาพที่ 3. ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ใช้ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของแมงกะพรุนและผักบุ้งทะเล เลนที่ 1 และ 2 ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอจากใบผักบุ้งทะเลที่บริเวณยีน *atpF-atpH* และ *ITS2* ตามลำดับ เลนที่ 4 และ 6 ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอจากแมงกะพรุนหนังที่บริเวณยีน *16S rDNA* และเลนที่ 7 และ 8 ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอจากแมงกะพรุนไฟที่บริเวณยีน *16S rDNA*.....10

ภาพที่ 4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่าง *5.8S* และ *28S* ไรโบโซมอลดีเอนเอ (*ITS2*) ของผักบุ้งทะเลที่ใช้ในการทดลอง (sea morning glory).....11

ภาพที่ 5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่างยีน *AtpF* และ *AtpH* ของผักบุ้งทะเลที่ใช้ในการทดลอง (sea morning glory).....11

ภาพที่ 6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่างยีน *16S* ไรโบโซมอลดีเอนเอของแมงกะพรุนหนังที่ใช้ในการทดลอง (edible jellyfish).....12

ภาพที่ 7. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่างยีน *16S* ไรโบโซมอลดีเอนเอของแมงกะพรุนไฟที่ใช้ในการทดลอง (fire jellyfish).....12

ภาพที่ 8. เซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนที่ได้จากกระบวนการ autolysis โดยเซลล์เข็มพิษที่ติดอยู่บริเวณหนวด (ซ้าย) จะหลุดออกมาอยู่ในน้ำทะเล (ขวา) และ มีสัดส่วนของเข็มพิษในน้ำทะเลมากขึ้นในวันที่ 4 (ล่าง) เมื่อเทียบกับวันที่ 1 (บน).....13

ภาพที่ 9. ลักษณะและความยาวของเข็มพิษที่พบในแมงกะพรุนหนัง (ซ้าย) และแมงกะพรุนไฟ (ขวา).....14

ภาพที่ 10. การแตกของเม็ดเลือดแดงหมูที่ได้รับ Triton-X 100 ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบค่า EC_{50} ที่ 44.8 $\pm$ 2.7 ppm.....14

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 11. ลักษณะของเม็ดเลือดแดงหมูที่ได้รับ Triton-X 100 0 ppm (ซ้าย) 40 ppm (กลาง) และ 100 ppm (ขวา) โดยพบเซลล์เม็ดเลือดแดงหมูหลงเหลืออยู่น้อยมากที่ความเข้มข้น Triton-X 100 100 ppm.....15
ภาพที่ 12. การแตกของเม็ดเลือดแดงหมูที่ได้รับหนวดแมงกะพรุนหนังบดละเอียดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบค่า EC_{50} ที่ 218.8 mg/ml.....16
ภาพที่ 13. การแตกของเม็ดเลือดแดงหมูที่ได้รับโปรตีนที่สกัดจากเซลล์เข็มพิษของแมงกะพรุนหนังที่ผ่านกระบวนการ autolysis ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบค่า EC_{50} ที่ 153.0 ug /ml.....17
ภาพที่ 14. การแตกของเม็ดเลือดแดงหมูที่ได้รับหนวดแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*) บดละเอียดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบค่าEC_{50} ที่ 13.2 mg/ml.....17
ภาพที่ 15. การแตกของเม็ดเลือดแดงหมูที่ได้รับหนวดแมงกะพรุนไฟ (*Chysaora sp.*) หรือตำแยทะเลบดละเอียดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบค่า EC_{50} ที่ 74.4 mg/ml.....17
ภาพที่ 16. ผลของน้ำส้มสายชูกลั่น (5%) ต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก โดยมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้นร้อยละ 12.....20
ภาพที่ 17. ผลของเอทานอลต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก.....20
ภาพที่ 18. ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลที่สกัดด้วยเอทานอลต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก โดยมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml.....21
ภาพที่ 19. ผลของน้ำคั้นจากผักบุ้งทะเลสดต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก โดยมีค่า IC_{50} ที่สัดส่วนผักบุ้งทะเลที่ใช้คั้นน้ำ 6 mg/ml.....21
ภาพที่ 20. ผลของ $CaCl_2$ ต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก.....22
ภาพที่ 21. ผลของ EDTA ต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก.....22
ภาพที่ 22. ผลของแทนนินต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก โดยมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 0.9 mg/ml.....23

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 23. ลักษณะของเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังและกะเปาะเข็มพิษที่แตกจากการสั่นด้วยคลื่นความถี่สูงที่เวลาต่างๆ โดยพบกะเปาะเข็มพิษแตกเล็กน้อยที่เวลาที่ 0 และ 6 นาที (บนซ้ายและบนขวา) และแตก มากขึ้นที่เวลา 9 นาที (ล่างซ้าย) และพบกะเปาะเข็มพิษแตกมากกว่าร้อยละ 33 เมื่อบ่มที่ 12 นาที (ล่างขวา).....24
ภาพที่ 24. ผลของเวลาที่เซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังได้รับการสั่นด้วยคลื่นความถี่สูงที่ต่อร้อยละการแตกของกะเปาะเข็มพิษ.....25
ภาพที่ 25. ผลของน้ำส้มสายชูกลั่น (5%) ต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษ โดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับน้ำส้มสายชูกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที.....25
ภาพที่ 26. ผลของเอทานอลต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษ โดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที.....26
ภาพที่ 27. ผลของน้ำใบผักบุ้งทะเลคั้นสดต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษโดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับน้ำใบผักบุ้งทะเลคั้นสดที่สัดส่วนต่างๆ ภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที.....26
ภาพที่ 28. ผลของสารสกัดใบผักบุ้งทะเลด้วยเอทานอลต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษโดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับสารสกัดใบผักบุ้งทะเลที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที.....27
ภาพที่ 29. ผลของ $CaCl_2$ ต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษ โดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับ $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที.....27
ภาพที่ 30. ผลของ EDTA ต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษ โดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที.....28
ภาพที่ 31. ผลของแทนนินต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษ โดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับกรดแทนนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที.....28
ภาพที่ 32. เปรียบเทียบร้อยละการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังบนผิวหนังเทียมที่ทำจากไส้หมูหลังการล้างออกด้วยสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดเป็นระยะเวลา 1 นาที ก่อนนำไปกระตุ้นให้แตกด้วยการสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงกับชุดควบคุมที่ไม่ได้นำไปกระตุ้น.....30

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 33. ลักษณะของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังบนผิวหนังเทียมที่ทำจากไส้หมู
หลังการล้างออกด้วย EDTA (ซ้ายบน) สารสกัดจากผักบุ้งทะเล (ขวาบน) น้ำส้มสายชู (ล่างซ้าย)
และแอลกอฮอล์ 70% (ล่างขวา) เป็นระยะเวลา 1 นาที ก่อนนำไปกระตุ้นให้แตกด้วยการสั่น
สะเทือนด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง.....31
ภาพที่ 34. ผลของน้ำคั้นจากผักบุ้งทะเลสดต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนไฟ
เมื่อใช้พิษจากหนวดแมงกะพรุนไฟบดละเอียดในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก
โดยมีค่า IC_{50} ที่สัดส่วนใบผักบุ้งทะเลสดต่อน้ำ 7 mg/ml.....32
ภาพที่ 35. ผลของน้ำส้มสายชูกลั่น (5%) ต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนไฟ
เมื่อใช้พิษจากหนวดแมงกะพรุนไฟบดละเอียดในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก
โดยมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้นร้อยละ 9.....32
ภาพที่ 36. ผลของเอทานอลต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนไฟเมื่อใช้พิษจากหนวด
แมงกะพรุนไฟบดละเอียดในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก.....33

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

จากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในปัจจุบันส่งผลให้เกิดอุบัติการณ์เพิ่มจำนวนของแมงกะพรุนในประเทศไทยและประเทศอื่นๆทั่วโลก ปรากฏการณ์ดังกล่าวส่งผลกระทบในทางลบต่ออุตสาหกรรมท่องเที่ยวทางทะเลและสุขภาวะของคนในชุมชน โดยในปี พ.ศ. 2558 สำนักระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุขได้รายงานจำนวนผู้ที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุน 194 รายจาก 6 จังหวัด และในปี พ.ศ. 2559 ปีเดียวมีรายงานผู้ที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุนในบริเวณอำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (หาดชะอำ) และอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี (หาดบางแสน) รวมกันมากกว่า 500 ราย ในขณะที่แนวทางในการปฐมพยาบาลผู้ที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุนที่ใช้ในปัจจุบันอาศัยความเชื่อของชาวบ้าน ภูมิปัญญาท้องถิ่นหรือใช้ผลการศึกษาวิจัยที่ได้จากแมงกะพรุนสายพันธุ์อื่นซึ่งอาจแตกต่างจากสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย โดยขั้นตอนที่สำคัญในการปฐมพยาบาลผู้ที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุนมี 3 ขั้นตอนคือ การป้องกันไม่ให้เซลล์เข็มพิษปล่อยเข็มพิษออกมา การทำให้พิษแมงกะพรุนเสียสภาพ และการบรรเทาอาการเจ็บปวดอันเนื่องมาจากพิษแมงกะพรุนตามลำดับ เมื่อพิจารณาขั้นตอนทั้ง 3 จะพบว่าการป้องกันไม่ให้เซลล์เข็มพิษปล่อยเข็มพิษออกมาเป็นขั้นตอนที่ช่วยให้การปฐมพยาบาลประสบความสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากเซลล์เข็มพิษที่หลุดออกจากแมงกะพรุนและติดอยู่กับผิวหนังมนุษย์ร้อยละ 16 – 24 เท่านั้นที่ปลดปล่อยเข็มพิษออกมา (Yanagihara et al., 2016) ที่เหลือจะถูกปล่อยออกมาเมื่อเซลล์ดังกล่าวถูกกระตุ้นหรือได้รับการกระทบกระเทือน เนื่องจากแมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*) เป็นแมงกะพรุนที่มีพิษไม่รุนแรงแต่สร้างปัญหาให้กับอุตสาหกรรมการท่องเที่ยวทางทะเลของจังหวัดชลบุรี ในขณะที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา สามารถเพาะเลี้ยงแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*) ซึ่งมีพิษรุนแรงได้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae*) สารเคมีบางชนิดและวิธีการปฐมพยาบาลตามความเชื่อชาวบ้านและตามคำแนะนำของหน่วยงานราชการต่อการปล่อยเข็มพิษของแมงกะพรุนทั้งสองชนิด เพื่อนำมาใช้ในการพัฒนาเภสัชภัณฑ์และกำหนดแนวทางในการปฐมพยาบาลผู้ที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุนที่ถูกต้องตามหลักวิชาการต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลในการยับยั้งการปล่อยเข็มพิษของเซลล์เข็มพิษของแมงกะพรุน

1.2.2 ศึกษาผลของสารเคมีบางชนิดต่อการปล่อยเข็มพิษของเซลล์เข็มพิษของแมงกะพรุน

1.2.3 ศึกษาผลของวิธีการปฐมพยาบาลตามความเชื่อชาวบ้านและตามคำแนะนำของหน่วยงานราชการต่อการปล่อยเข็มพิษของเซลล์เข็มพิษของแมงกะพรุน

1.2.4 ศึกษากลไกการยับยั้งการปล่อยเข็มพิษของเซลล์เข็มพิษของแมงกะพรุน

1.2.5 ใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในการพัฒนาเภสัชภัณฑ์และกำหนดแนวทางในการปฐมพยาบาลผู้ที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุนที่ถูกต้องตามหลักวิชาการ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 เก็บตัวอย่างผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae*) บริเวณจังหวัดชลบุรี บริเวณหาดวอนนภา ต.แสนสุข อ.เมืองชลบุรี

1.3.2 สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผักบุ้งทะเลด้วยตัวทำละลายเอทานอล

1.3.3 วิเคราะห์ปริมาณแทนนินและสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากผักบุ้งทะเล

1.3.4 เก็บตัวอย่างแมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*) ที่พบบริเวณจังหวัดชลบุรี และใช้ตัวอย่างแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*) จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

1.3.5 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลต่อพิษของแมงกะพรุนหนังและแมงกะพรุนไฟ

1.3.6 ทดสอบฤทธิ์ของสารเคมี 4 ชนิด ได้แก่ ethanol calcium chloride EDTA และ tannin ต่อพิษของแมงกะพรุนหนังและแมงกะพรุนไฟ

1.3.7. ทดสอบฤทธิ์ของสารที่ใช้ในการปฐมพยาบาลตามความเชื่อชาวบ้านและตามคำแนะนำของหน่วยงานราชการ ได้แก่ น้ำส้มสายชู และแอลกอฮอล์ ต่อพิษของแมงกะพรุนหนังและแมงกะพรุนไฟ

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

วิธีการปฐมพยาบาลผู้ที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุนในปัจจุบันอาศัยข้อมูลงานวิจัยจากการทดสอบในแมงกะพรุนที่พบในต่างประเทศ ภูมิปัญญาท้องถิ่น หรือความเชื่อของชาวบ้าน ดังนั้นเพื่อให้สามารถปฐมพยาบาลผู้ที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุนได้อย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษาผลของสารเคมีหรือวิธีการที่ใช้ในการปฐมพยาบาลต่อการปล่อยเข็มพิษของแมงกะพรุนจึงเป็นสิ่งสำคัญลำดับต้นๆ โดยแนวทางที่ดีที่สุดคือการหาวัตถุดิบที่หาง่ายในบริเวณที่มีแมงกะพรุนมาใช้ในการปฐมพยาบาล ซึ่งหนึ่งในนั้นคือการใช้ผักบุ้งทะเล โดยใช้ส่วนลำต้นและใบมาขยำแล้วพอกลงบนบริเวณที่โดนพิษแมงกะพรุน น้ำยางจากผักบุ้งทะเลซึ่งมีลักษณะลื่นจะช่วยลดพิษจากแมงกะพรุนได้โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของพิษแมงกะพรุนซึ่งเป็นโปรตีน (Pongprayoon et al., 1991a) และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Pongprayoon et al., 1991b) ส่งผลให้ผู้ที่ได้รับพิษรู้สึกเจ็บปวดลดลง อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการปฐมพยาบาลผู้ที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุนขั้นตอนที่สำคัญที่สุดคือการป้องกันไม่ให้เซลล์เข็มพิษปล่อยเข็มพิษออกมา แต่ยังไม่มีผู้ศึกษาผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลต่อกระบวนการดังกล่าว โดยผู้วิจัยคาดว่าผักบุ้งทะเลซึ่งมีปริมาณแทนนินและสารประกอบฟีนอลิกสูง (Qasim et al., 2016) ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าวอาจส่งผลให้กระบวนการกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษไม่ทำงานเนื่องจากโปรตีนเสียสภาพ หรือเซลล์เข็มพิษเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะไปจนไม่สามารถปล่อยเข็มพิษได้ หรือเข็มพิษที่ออกมาเสียสภาพจนไม่สามารถแทงทะลุผิวหนังได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งทดสอบผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลต่อการยับยั้งการปล่อยเข็มพิษของเซลล์เข็มพิษจากแมงกะพรุน และทดสอบสารเคมีอื่นที่มีรายงานหรือความน่าจะเป็นในการยับยั้งการปล่อยเข็มพิษ รวมถึงการใช้วิธีการทั่วไปที่ชาวบ้านใช้ในการปฐมพยาบาล เพื่อนำมาเปรียบเทียบและแสดงให้เห็นว่าวิธีการใดใช้ได้หรือไม่ได้ในการยับยั้งการปล่อยเข็มพิษของแมงกะพรุน นอกจากนี้การศึกษากลไกในการยับยั้งการปล่อยเข็มพิษระดับเซลล์จะช่วยให้สามารถเลือกสารที่ใช้ทดแทนได้ง่ายขึ้นในกรณีที่เกิดเหตุสุดวิสัยและไม่สามารถเข้าถึงผักบุ้งทะเลหรือสารเคมีอื่นได้ เพื่อให้นักท่องเที่ยวมีความมั่นใจและตระหนักถึงความปลอดภัยในการท่องเที่ยวทางทะเล และประชาชนในชุมชนริมทะเลสามารถประกอบกิจการได้โดยไม่ต้องกังลต่อผลกระทบทางสุขภาพและจิตใจที่อาจที่เกิดขึ้นจากพิษแมงกะพรุน

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมผักบุ้งทะเล

ผักบุ้งทะเลได้มาจากพื้นที่บริเวณหาดวอนนภา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี จากนั้นนำมาทำความสะอาดและแยกเป็นส่วนของใบ และเก็บตัวอย่างไว้ที่ -80 °C

2.2 การตรวจสอบพันธุกรรมผักบุ้งทะเล

ชั่งตัวอย่างผักบุ้งทะเล 0.01g นำมาบดด้วย Edwards' buffer ในอัตราส่วน 1:1 นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ในอัตราส่วน 1:1 นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 10 นาที และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทานอล 70% แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 5 นาที 1-2 ครั้ง จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ *atpF-atpH* และ *ITS2* (ตารางที่ 1) และเอนไซม์ Taq DNA – polymerase จากนั้นทำบริสุทธิ์ผลผลิตพีซีอาร์และส่งไปอ่านลำดับดีเอ็นเอ นำลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาเทียบกันเองและเทียบกับลำดับในฐานข้อมูล NCBI

2.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผักบุ้งทะเล

นำตัวอย่างผักบุ้งที่ทำการเก็บไว้ที่ -80 °C สกัดด้วยเอทานอล โดยชั่งตัวอย่าง 6 g ใส่เอทานอล 60 ml (อัตราส่วน 1:10) ทำการบดหรือปั่นให้ละเอียด จากนั้นนำไปเขย่าทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้แบ่งใส่หลอด microfugetube ขนาด 2 ml แล้วนำไประเหยเอทานอลออกภายใต้สภาวะสุญญากาศ เก็บสารสกัดเข้มข้นไว้ที่ -20 °C นำมาละลายในน้ำหรือบัฟเฟอร์เมื่อต้องการใช้ในการทดลอง

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณแทนนินและสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากผักบุ้งทะเล

นำสารสกัดผักบุ้งที่ทำการเก็บไว้ที่ -20 °C มาละลายในน้ำแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วย Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแทนนิกเป็นสารมาตรฐาน จากนั้นหาปริมาณแทนนินโดยเติม Poly(vinylpolypyrrolidone) ลงไปในสารละลายสารสกัดจากผักบุ้งทะเล รอให้ตกตะกอนแล้วนำส่วนใสมาวิเคราะห์

หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอีกรอบด้วย Folin-Ciocalteu โดยค่าความแตกต่างของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกคือปริมาณแทนนิน

2.5 การเตรียมแมงกะพรุน

ตัวอย่างแมงกะพรุนหนังจะถูกเก็บจาก 2 แหล่ง คือ ทะเลในบริเวณหาดบางแสน ต.แสนสุข จังหวัดชลบุรี และตลาดเก่าอ่างศิลา ต.อ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงตุลาคมโดยทำการเก็บตัวอย่างแมงกะพรุนหนังด้วยสวิงขนาดตาข่าย 1 เซนติเมตร ช้อนตัวอย่างแมงกะพรุนใส่ถังที่มีน้ำความเค็ม นำมาบรรจุในถุงพลาสติกใสก้นกลมมัดถุงให้แน่นไม่ให้มีฟองอากาศเหลืออยู่ภายในถุง บรรจุลังโฟม ปิดฝาให้สนิท และนำตัวอย่างมาที่ห้องปฏิบัติการ นำถุงที่บรรจุแมงกะพรุนลอยในอ่างน้ำเค็มที่มีการเตรียมไว้ล่วงหน้า โดยมีการปรับความเค็มและอุณหภูมิให้ใกล้เคียงกับค่าคุณภาพน้ำที่เก็บตัวอย่างแมงกะพรุนหนังจากธรรมชาติ และให้อากาศเล็กน้อยก่อนปล่อยแมงกะพรุนลงในถังน้ำเค็มเพื่อรอการศึกษา จากนั้นทำความสะอาดเพื่อเอาเมือกที่ตัวแมงกะพรุนออก ทำการล้างด้วยน้ำทะเลเทียม 2-3 ครั้ง จากนั้นตัดส่วนหนวดออกจากร่มของแมงกะพรุนสด แล้วนำส่วนหนวดมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และทำการแบ่งเก็บในหลอด microtube ขนาด 2 ml โดยชั่งส่วนหนวดที่ตัดแล้ว 1 g เก็บตัวอย่างไว้ที่ -80 °C ในขณะที่ตัวอย่างแมงกะพรุนไฟได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งเพาะเลี้ยงแมงกะพรุนดังกล่าว โดยนำตัวอย่างมาเฉพาะส่วนหนวดที่สลัดทิ้ง แบ่งเก็บในหลอดทดลองโดยเก็บตัวอย่างไว้ที่ -80 °C

2.6 การตรวจสอบพันธุกรรมแมงกะพรุน

นำตัวอย่างหนวดแมงกะพรุนหนัง 1 g หรือตัวอย่างหนวดแมงกะพรุนไฟ 0.2 g มาบดในบัฟเฟอร์ 1 ml ให้ละเอียด ปิเปตส่วนใส 300 ul ไปต้มที่ 80 °C นาน 30 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดดีเอนเอ ประกอบด้วย P1 (10 mM Tris pH 8 , 4 mM ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)) ปริมาตร 150 ul บัฟเฟอร์ P2 (200 mM sodium hydroxide (NaOH) , 1% w/v sodium dodecyl sulfate (SDS)) ปริมาตร 250 ul และบัฟเฟอร์ P3 (4.2 M guanidine hydrochloride , 0.9 M potassium acetate ปรับ pH 4.8 โดยใช้ glacial acetic acid) ปริมาตร 250 ul เพื่อตกตะกอนโปรตีน ทำการผสมกันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้มาผ่านกระบวนการตกตะกอนดีเอนเอโดย isopropanol ในอัตราส่วน 1:1 นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 15 นาที จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่

ความเร็ว 10,000 rpm นาน 5 นาที 1-2 ครั้ง จากนั้นนำดีเอนเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *COI* และ *16S* rDNA บนไมโตคอนเดรีย (Armani et al., 2014) (ตารางที่ 1) และเอนไซม์ Taq DNA polymerase จากนั้นทำบริสุทธิ์ผลผลิตพีซีอาร์และส่งไปอ่านลำดับดีเอ็นเอ นำลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาเทียบกันเองและเทียบกับลำดับในฐานข้อมูล NCBI

ตารางที่ 1. ลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากแมงกะพรุนและผักบุ้งทะเล

สิ่งมีชีวิตที่ตรวจสอบ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับ	ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดว่าจะได้ (bp)
ผักบุ้งทะเล	atpF	ACTCGCACACACTCCCTTTCC	579 - 622
	atpH	GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT	
ผักบุ้งทะเล	ITS-S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	450 - 550
	ITS-S3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
แมงกะพรุน	16S_P1	TCGACTGTTTACCAAAAACATAGC	254 - 256
	16S_P3	GTCGCCCCAACTAAACTACCAAACTT	

2.7 การเตรียมเม็ดเลือดแดง พิษแมงกะพรุน และผิวหนังเทียม

2.7.1 การเตรียมเม็ดเลือดแดง

นำเลือดหมูสดจากตลาดมาล้างในสารละลายน้ำตาลซูโครสใน PSE บัฟเฟอร์ (sucrose 250 g , Na_2HPO_4 1.44 g , EDTA 0.37 g ต่อบัฟเฟอร์ 1 ลิตร; pH 7.4) ในอัตราส่วน 1:5 ค่อยๆใส่เลือดหมูสดลงไปในสารละลายโดยให้เลือดหมูสดแยกชั้นอยู่ด้านบนของสารละลายน้ำตาลซูโครส แล้วนำไปปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดที่สมบูรณ์แยกออกจากน้ำเลือด จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาล้างเม็ดเลือดในสารละลาย PBSE บัฟเฟอร์ (NaCl 8 g , KCl 0.2 g , Na_2HPO_4 1.44 g , KH_2PO_4 0.24 g ต่อบัฟเฟอร์ 1 ลิตร; pH 7.4) เพื่อให้ได้เม็ดเลือดแดงที่สมบรูณ์ แล้วนำมาปรับความหนาแน่นของเม็ดเลือดแดงให้เหมาะสมในการทดลอง

2.7.2 การเตรียมพิษแมงกะพรุน

- การเตรียมเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนัง

ทำการชั่งตัวอย่างแมงกะพรุนหนัง (บริเวณหนวด) ที่ทำการตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้ว 15 กรัม ใส่ลงในหลอดขนาด 50 mL แล้วเติมน้ำทะเลเทียม 15 mL (ในอัตราส่วน 1:1) แช่ไว้ประมาณ 3-4 วัน และทำการเขย่า 1-2 ครั้งต่อวัน

จนกว่าเซลล์เข็มพิษจะหลุดออกมา จากนั้นทำการกรองแล้วนำส่วนใสไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วทำการเก็บตัวอย่างที่ -80 °C

- การเตรียมพิษจากหนวดแมงกะพรุนโดยการบดละเอียด

นำหนวดแมงกะพรุนหนังที่แบ่งเก็บไว้ 1 g มาบดให้ละเอียดในบัฟเฟอร์ 1 ml หรือแมงกะพรุนไฟ 0.3 g มาบดให้ละเอียดในบัฟเฟอร์ 3 ml แล้วนำส่วนที่บดละเอียดได้ไปใช้ในการทดสอบ

2.7.3 การเตรียมผิวหนังเทียม

นำลำไส้เล็กของหมูที่ได้จากตลาดสดมาล้างให้สะอาดในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS5 (NaCl 2 g , KCl 0.2 g , Na_2HPO_4 7 g , KH_2PO_4 0.24 g ต่อบัฟเฟอร์ 1 ลิตร; pH 7.4) ประมาณ 3-4 ครั้ง จนลำไส้เล็กของหมูสะอาด ไม่มีคราบเมือกติดอยู่ แล้วทำการยืดแผ่นลำไส้หมูที่ผ่านกระบวนการออกและขึงไว้บนกระจกให้ได้เป็นแผ่นบาง

2.8 การทดสอบฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุน และสารเคมีบางชนิดต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงหมู

นำเม็ดเลือดแดงหมูที่ผ่านการล้างทำความสะอาดดังข้อ 2.7.1 แล้ว มาปรับความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรให้อยู่ในช่วง 0.4 – 0.8 จากนั้นนำไปทดสอบกับฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนัง แมงกะพรุนไฟและทดสอบกับสารเคมีบางชนิด เช่น สารสกัดผักบุ้งทะเลที่สกัดด้วยเอทานอล น้ำผักบุ้งทะเลที่คั้นสด น้ำส้มสายชูกลั่น5% เหล้าขาว แอลกอฮอล์ 70% กรดแทนนิก แคลเซียมและ EDTA โดยวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร เพื่อหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู ในการทดลองนี้ใช้ 1% tritonX-100 เป็นชุดควบคุมการแตกของเม็ดเลือดแดง 100%

2.9 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุน

2.9.1 ทดสอบในหลอดทดลอง

นำเม็ดเลือดแดงหมูที่ผ่านการล้างทำความสะอาดดังข้อ 2.7.1 แล้ว มาปรับความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรให้อยู่ในช่วง 0.4 – 0.8 จากนั้นนำเม็ดเลือดแดงมาเติมบัฟเฟอร์ที่ประกอบไปด้วยพิษแมงกะพรุนในสัดส่วนร้อยละ 10 (100 ul) และสารเคมีที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ สารสกัดผักบุ้งทะเลที่สกัดด้วยเอทานอล น้ำผักบุ้งทะเลที่คั้นสด น้ำส้มสายชูกลั่น 5% เหล้าขาว แอลกอฮอล์ 70% กรดแทนนิก

แคลเซียมและ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้ววัดค่าการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงหมูที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร

2.9.2 ทดสอบในผิวหนังเทียม

นำลำไส้เล็กของหมูที่ทำความสะอาดแล้วดังข้อ 2.7.3 มาตัดให้ได้ขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วแช่ในบัฟเฟอร์ที่มีเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุน เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้เซลล์เข็มพิษที่เตรียมไว้ดังข้อ 2.7.2 จากนั้นทำการล้างเซลล์เข็มพิษออกด้วยสารเคมีบางชนิด เช่น สารสกัดผักบุ้งทะเลที่สกัดด้วยเอทานอล น้ำผักบุ้งทะเลที่คั้นสด น้ำส้มสายชูกลั่น 5% เหล้าขาว แอลกอฮอล์ 70% กรดแทนนิก แคลเซียมและ EDTA ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปกระตุ้นการแตกของเซลล์เข็มพิษภายใต้การสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง นาน 1 นาที จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. ผลการวิจัย

3.1 ชนิดของผักบุ้งทะเลและแมงกะพรุนหนังที่เก็บมาจากบริเวณชายทะเลจังหวัดชลบุรี

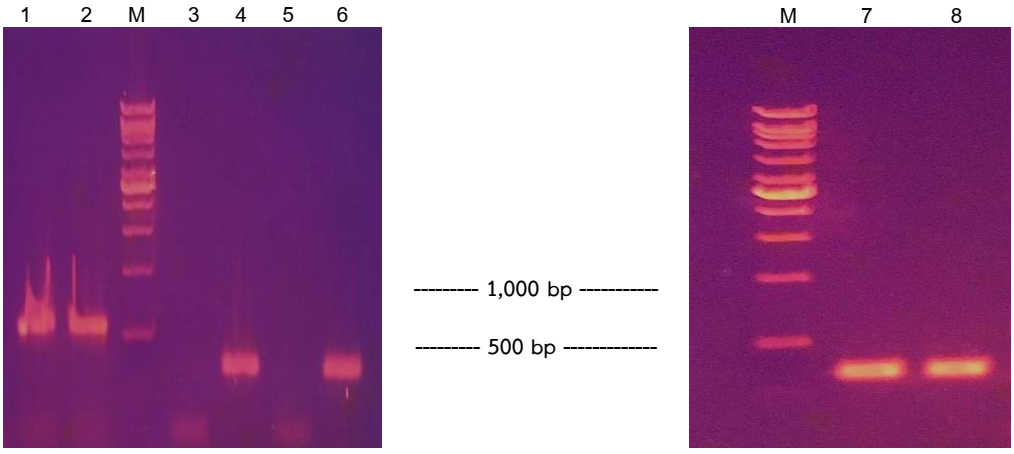
ภาพที่ 1. การเตรียมตัวอย่างผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae*) เพื่อใช้สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดย-ตัวอย่างผักบุ้งทะเลเก็บมาจาก อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (ซ้าย) โดยแยกส่วนใบออกจากลำต้นและราก (กลาง) จากนั้นนำมาสกัดด้วยเทคนิคการสกัดร่วมด้วยเอทานอลและเฮกเซน (ขวา)

ภาพที่ 2. ลักษณะของแมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*) ที่เก็บมาได้จากทะเลบริเวณจังหวัดชลบุรีและผ่านกระบวนการทำความสะอาดแล้ว ส่วนหมวกและตัวจะถูกแยกออก โดยส่วนหนวดจะถูกแยกนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –80 °C และเข้าสู่กระบวนการ autolysis เพื่อให้เซลล์เข็มพิษหลุดออกมา

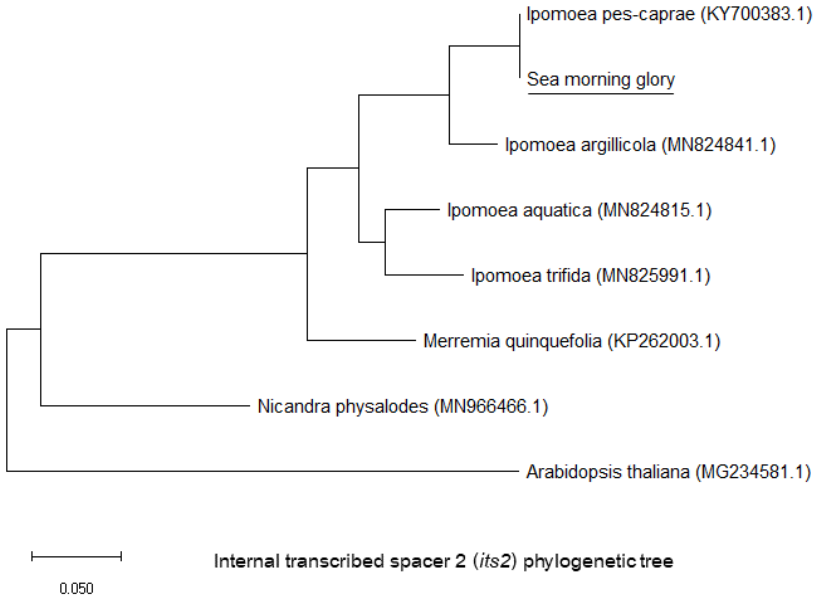
จากการเก็บตัวอย่างแมงกะพรุนหนังและผักบุ้งทะเลจากบริเวณพื้นที่ชายทะเลในจังหวัดชลบุรีพบว่า ผักบุ้งทะเลพบขึ้นได้ทั่วไปบริเวณชายหาดและพื้นที่ใกล้ชายหาด (ภาพที่ 1) โดยจะเลื้อยไปตามพื้นดินทราย หรือเศษวัสดุต่างๆ เช่น กองไม้และกองหิน เป็นต้น โดยสามารถเก็บตัวอย่างได้ตลอดปี ในขณะที่ตัวอย่างแมงกะพรุนหนังนั้นจะพบในช่วงฤดูมรสุมเท่านั้น โดยพบได้มากในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงตุลาคม และพบประปรายในช่วงเดือนพฤศจิกายน

ถึงธันวาคม โดยมีลักษณะจำเพาะคือส่วนหมวกจะมีขนาดใหญ่และมีรอยจุด ส่วนหนวดจะเป็นเส้นสั้นๆ ไม่ยาวมากเมื่อเทียบกับขนาดลำตัว (ภาพที่ 2) เมื่อนำตัวอย่างผักบุ้งทะเลและแมงกะพรุนมาสกัดดีเอนเอและเพิ่มปริมาณดีเอนเอ พบว่าขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่อยู่ในช่วงที่ต้องการศึกษาโดยผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากผักบุ้งทะเลมีขนาดอยู่ในช่วง 450 – 622 bp ขึ้นอยู่กับชนิดของไพร์เมอร์ที่ใช้ (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 3) ในขณะที่ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้แมงกะพรุนหนังและแมงกะพรุนไฟมีขนาดอยู่ในช่วง 254 – 256 bp (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 3)

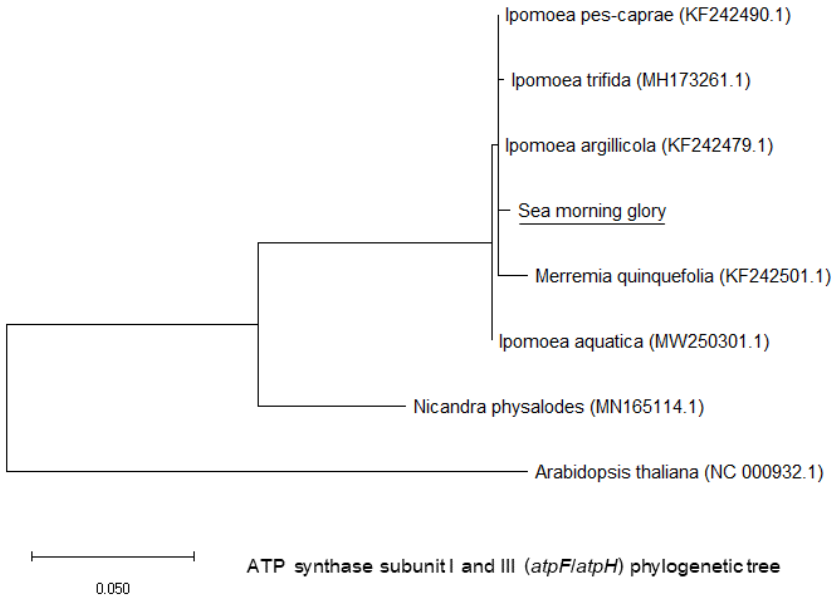
เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับดีเอนเอและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนากร (phylogenetic analysis) พบว่าดีเอนเอที่สกัดได้จากผักบุ้งทะเลสามารถยืนยันว่าเป็นผักบุ้งทะเลได้ (*Ipomoea pes-caprae*; ภาพที่ 4) เมื่อใช้ลำดับดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณที่ตำแหน่งระหว่าง *5.8S* และ *28S* ไรโบโซมอลดีเอนเอ (ภาพที่ 4) แต่ไม่สามารถแยกได้เมื่อใช้ลำดับดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณที่ตำแหน่งระหว่างยีน *AtpF* และ *AtpH* (ภาพที่ 5) ในขณะที่ดีเอนเอที่สกัดได้จากแมงกะพรุนหนังและแมงกะพรุนไฟได้จากการเพิ่มปริมาณที่ตำแหน่งระหว่างยีน *16S* ไรโบโซมอลดีเอนเอ สามารถยืนยันว่าเป็นแมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*; ภาพที่ 6) และแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*; ภาพที่ 7)



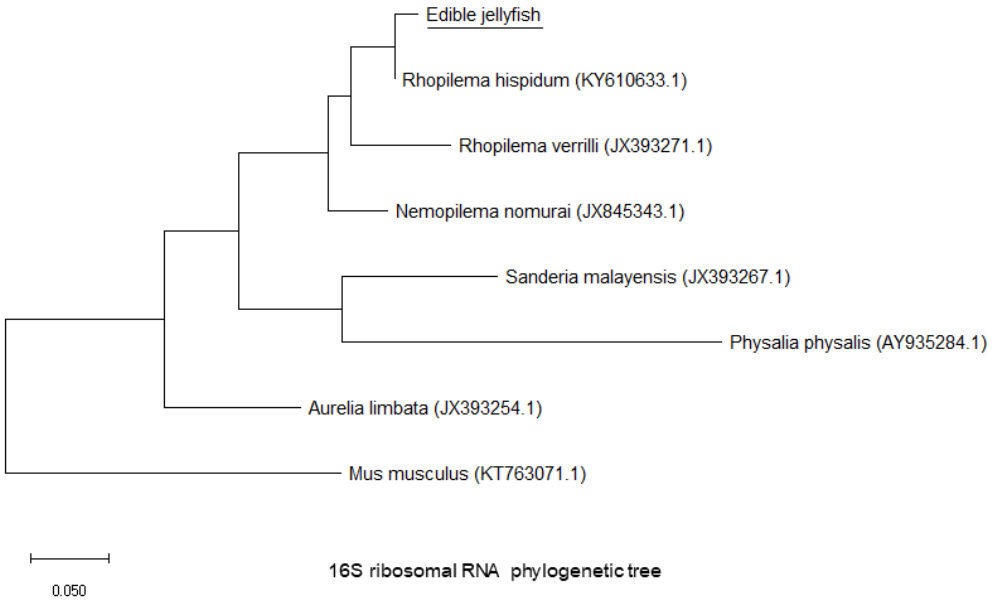
ภาพที่ 3. ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ใช้ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของแมงกะพรุนและผักบุ้งทะเล เลนที่ 1 และ 2 ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอจากใบผักบุ้งทะเลที่บริเวณยีน *atpF-atpH* และ *ITS2* ตามลำดับ เลนที่ 4 และ 6 ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอจากแมงกะพรุนหนังที่บริเวณยีน *16S rDNA* และเลนที่ 7 และ 8 ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอจากแมงกะพรุนไฟที่บริเวณยีน *16S rDNA*



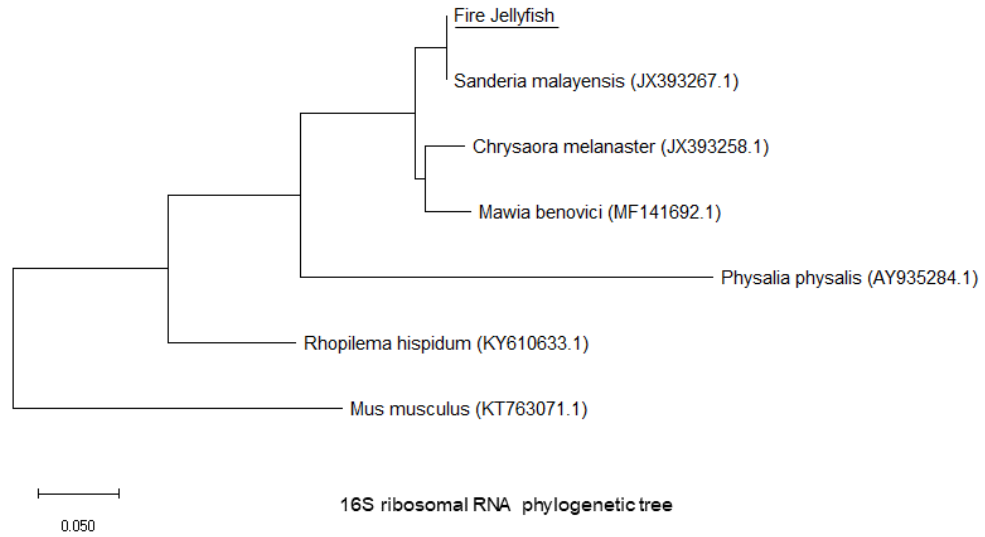
ภาพที่ 4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่าง *5.8S* และ *28S* ไรโบโซมอลดีเอนเอ (*ITS2*) ของผักบุ้งทะเลที่ใช้ในการทดลอง (sea morning glory)



ภาพที่ 5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่างยีน *AtpF* และ *AtpH* ของผักบุ้งทะเลที่ใช้ในการทดลอง (sea morning glory)



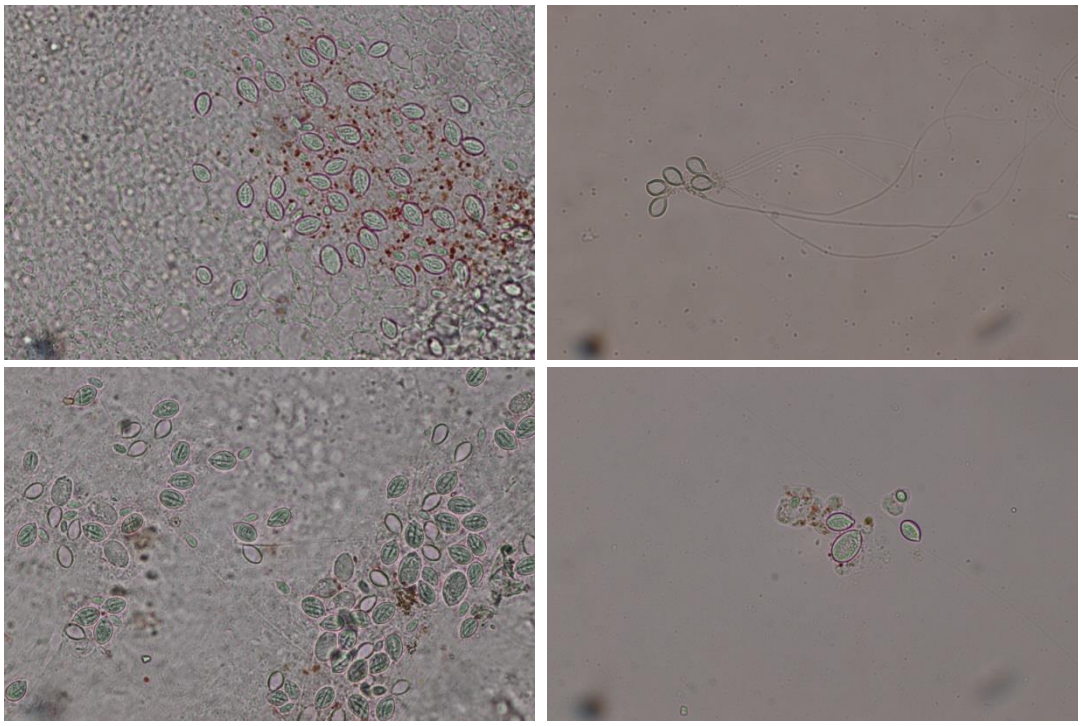
ภาพที่ 6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่างยีน *16S* ไรโบโซมอลดีเอนเอของแมงกะพรุนหนังที่ใช้ในการทดลอง (edible jellyfish)



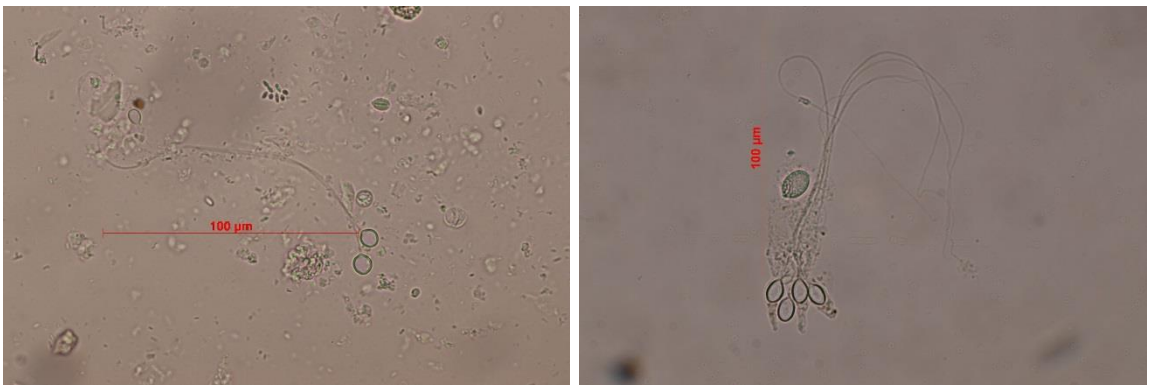
ภาพที่ 7. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่างยีน *16S* ไรโบโซมอลดีเอนเอของแมงกะพรุนไฟที่ใช้ในการทดลอง (fire jellyfish)

3.2 ลักษณะของเข็มพิษและเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุน

หนวดแมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*) และแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*) ถูกนำมาทำความสะอาด (ภาพที่ 2) และแยกเก็บชิ้นส่วนหนวดไว้ที่ -80 °C เพื่อใช้ในการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์เข็มพิษและทดสอบพิษ ในขณะที่หนวดจำนวนหนึ่งจะถูกนำไปผ่านกระบวนการแยกเซลล์เข็มพิษออก (autolysis) โดยแช่ไว้ในน้ำทะเลเป็นระยะเวลา 4 วัน (ภาพที่ 8) จากผลการศึกษาพบว่ามีเข็มพิษบางส่วนที่หลุดออกมาโดยยังไม่ปล่อยเข็มพิษออกมาในวันที่ 4 ของการทดลอง (ภาพที่ 8 ล่างขวา) ในขณะที่เซลล์เข็มพิษบางส่วนที่ติดอยู่บนหนวดแมงกะพรุนปล่อยเข็มพิษออกมาเช่นกัน (ภาพที่ 8 ล่างซ้าย) ซึ่งพบได้น้อยมากในวันแรกที่เก็บตัวอย่างมา โดยแมงกะพรุนแต่ละชนิดจะมีชนิดของเซลล์เข็มพิษมากกว่า 1 ชนิด และเมื่อปล่อยเข็มพิษแล้วแมงกะพรุนไฟจะมีเซลล์เข็มพิษที่มีลักษณะรีและมีเข็มพิษที่ยาวกว่าแมงกะพรุนหนังประมาณ 2 เท่า (ภาพที่ 9)



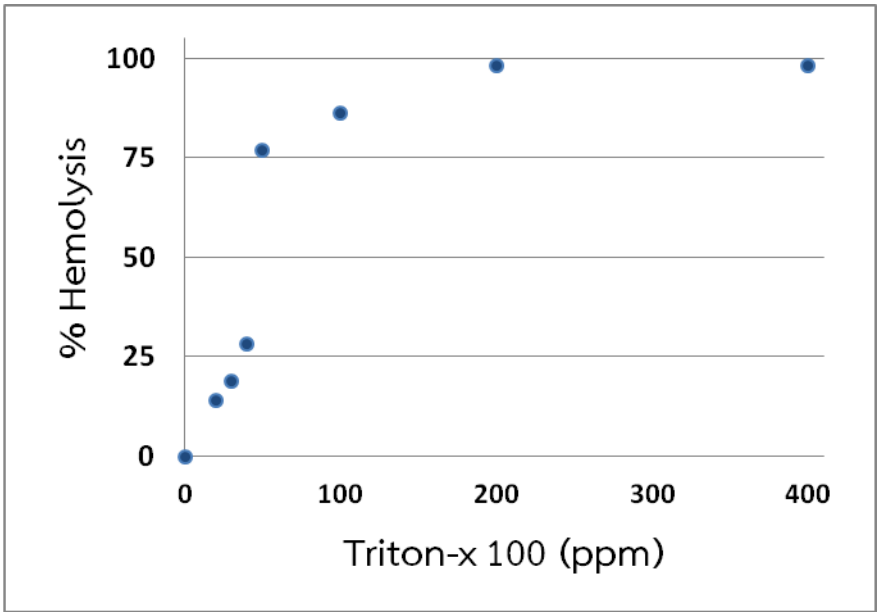
ภาพที่ 8. เซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนที่ได้จากกระบวนการ autolysis โดยเซลล์เข็มพิษที่ติดอยู่บริเวณหนวด (ซ้าย) จะหลุดออกมาอยู่ในน้ำทะเล (ขวา) และมีสัดส่วนของเข็มพิษในน้ำทะเลมากขึ้นในวันที่ 4 (ล่าง) เมื่อเทียบกับวันที่ 1 (บน)



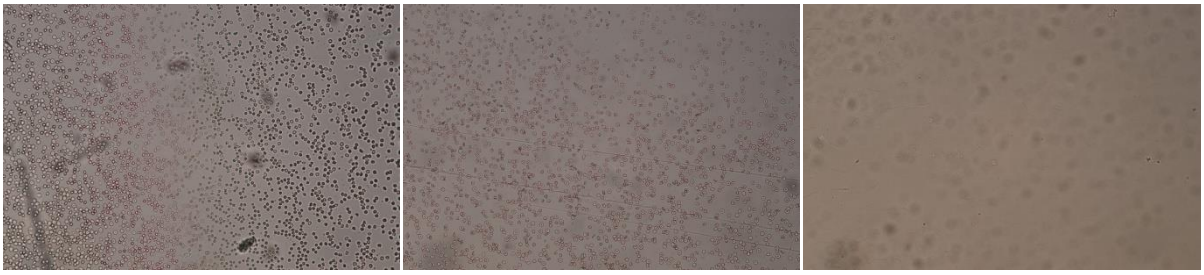
ภาพที่ 9. ลักษณะและความยาวของเข็มพิษที่พบในแมงกะพรุนหนัง (ซ้าย) และแมงกะพรุนไฟ (ขวา)

3.3 ฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลต่อพิษแมงกะพรุนนั้น ขั้นตอนแรกผู้วิจัยต้องศึกษาฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนก่อน โดยผู้วิจัยเลือกฤทธิ์ในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกเพราะเป็นฤทธิ์ที่ศึกษาได้รวดเร็วที่สุด โดยใช้ Triton-X 100 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวเป็นชุดควบคุมเชิงบวกที่ให้การแตกตัวของเม็ดเลือดแดง 100% จากการศึกษาพบว่า Triton-X 100 มีค่าความเข้มข้นที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัวครึ่งหนึ่ง (EC_{50}) อยู่ที่ 44.8 ppm (ภาพที่ 10) โดยพบว่าเม็ดเลือดแดงแตกมากกว่าร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ppm ขึ้นไป ซึ่งสังเกตได้จากการที่พบเม็ดเลือดแดงปกติได้จำนวนน้อยมากเมื่อได้รับ Triton-X 100 ที่ 100 ppm (ภาพที่ 11)

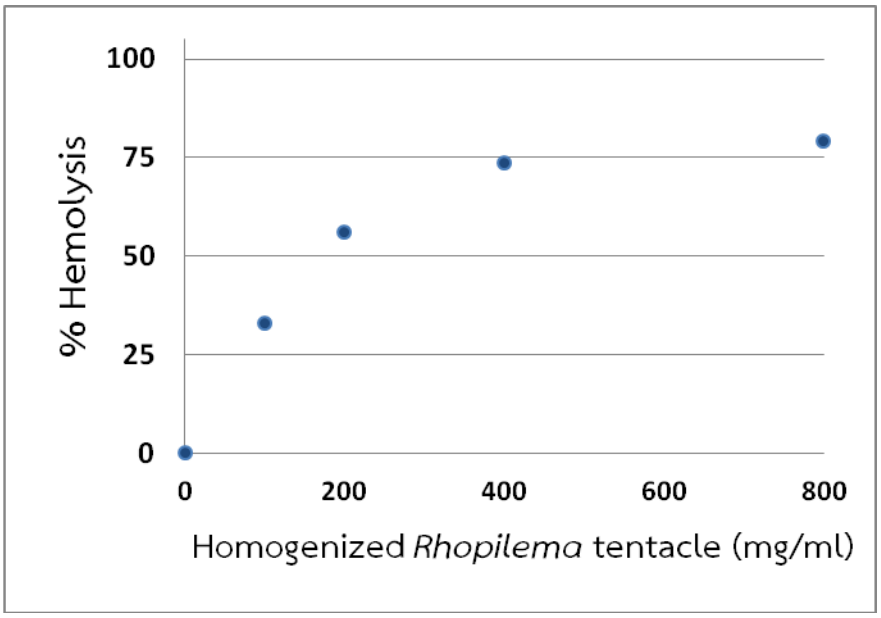


ภาพที่ 10. การแตกของเม็ดเลือดแดงหมูที่ได้รับ Triton-X 100 ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบค่า EC_{50} ที่ 44.8 $\pm$ 2.7 ppm

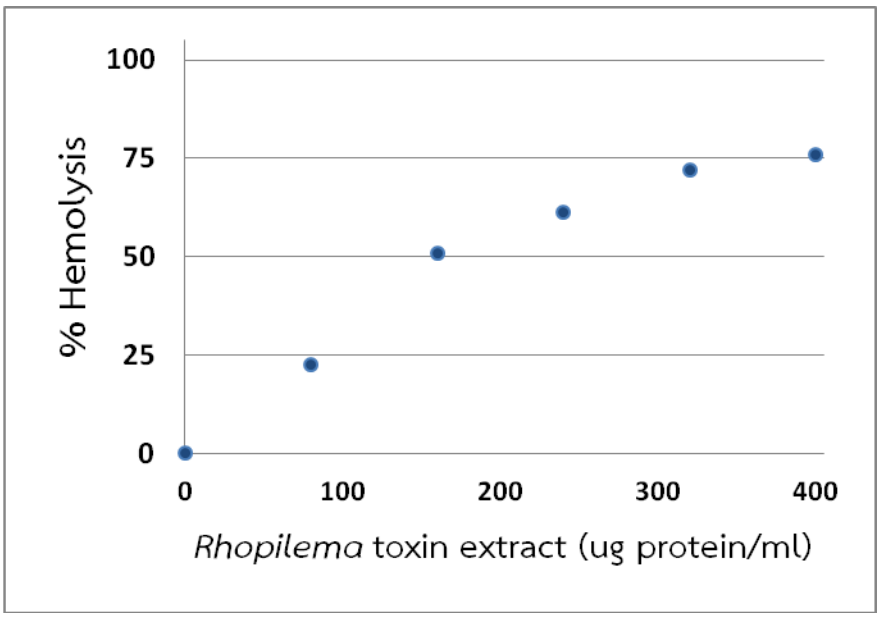


ภาพที่ 11. ลักษณะของเม็ดเลือดแดงหมูที่ได้รับ Triton-X 100 0 ppm (ซ้าย) 40 ppm (กลาง) และ 100 ppm (ขวา) โดยพบเซลล์เม็ดเลือดแดงหมูหลงเหลืออยู่น้อยมากที่ความเข้มข้น Triton-X 100 100 ppm

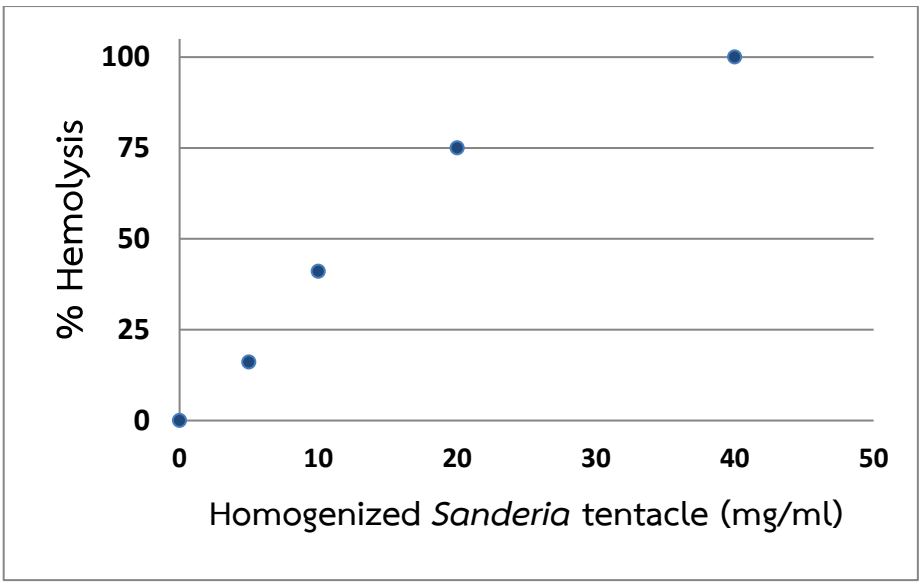
เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของพิษแมงกะพรุนหนังและแมงกะพรุนไฟจากบริเวณหนวด โดยใช้สารสกัดจากหนวดบดละเอียด พบว่าพิษที่ได้จากหนวดแมงกะพรุนหนังบดละเอียด (homogenized *Rhopilema* tentacle) มีค่าความเข้มข้นที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัวครึ่งหนึ่ง (EC_{50}) เท่ากับ 218.8 mg/ml (ภาพที่ 12) และเมื่อสกัดเฉพาะในส่วนเซลล์เข็มพิษจากกระบวนการ autolysis พบว่าพิษแมงกะพรุนหนังมีค่า EC_{50} เท่ากับ 153.0 ug/ml (ภาพที่ 13) ในขณะที่พิษที่ได้จากหนวดแมงกะพรุนไฟ *Sanderia* บดละเอียด (homogenized *Sanderia* tentacle) มีค่าความเข้มข้นที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัวครึ่งหนึ่ง (EC_{50}) เท่ากับ 13.2 mg/ml (ภาพที่ 14) เพื่อเปรียบเทียบกับแมงกะพรุนชนิดอื่นที่เก็บตัวอย่างได้จากบริเวณเดียวกันกับแมงกะพรุนหนังและไม่ได้เป็นแมงกะพรุนเลี้ยง ผู้วิจัยเลือกใช้แมงกะพรุนไฟที่เรียกว่าตำแยทะเล (*Chrysaora sp.*) มาเป็นชุดเปรียบเทียบโดยพบว่าพิษที่ได้จากหนวดแมงกะพรุนไฟ *Chrysaora* บดละเอียด (homogenized *Chrysaora* tentacle) มีค่า EC_{50} เท่ากับ 74.4 mg/ml (ภาพที่ 15) จากผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าพิษที่ได้จากหนวดแมงกะพรุนหนังบดละเอียดมีฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงหมูแตกน้อยกว่าพิษที่ได้จากหนวดแมงกะพรุนไฟทั้งสองชนิดบดละเอียดอย่างมีนัยสำคัญ โดยน้อยกว่าแมงกะพรุนไฟ *Sanderia* 16 เท่า และน้อยกว่าแมงกะพรุนไฟ *Chrysaora* 3 เท่า



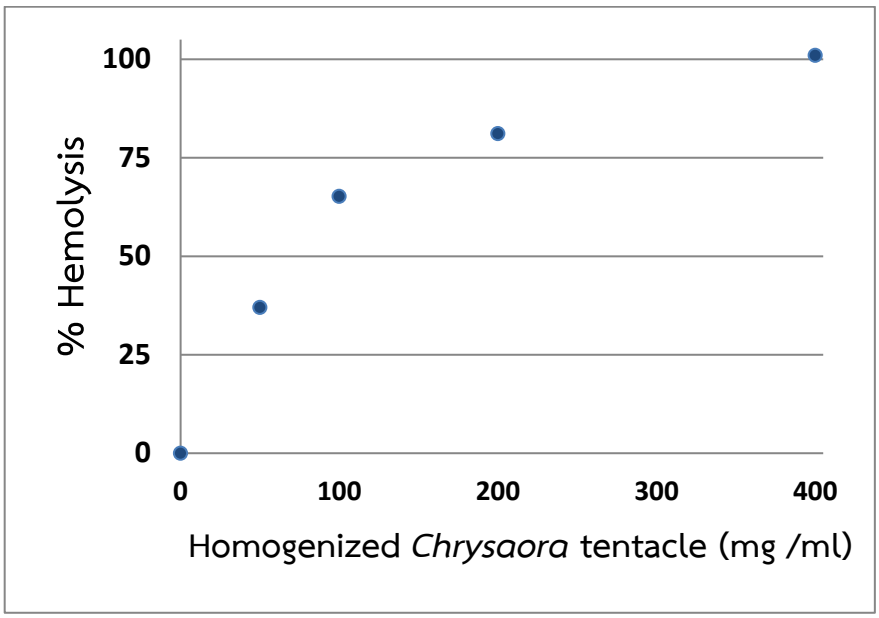
ภาพที่ 12. การแตกของเม็ดเลือดแดงหมูที่ได้รับหนวดแมงกะพรุนหนังบดละเอียดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบค่า EC_{50} ที่ 218.8 mg/ml



ภาพที่ 13. การแตกของเม็ดเลือดแดงหมูที่ได้รับโปรตีนที่สกัดจากเซลล์เข็มพิษของแมงกะพรุนหนังที่ผ่านกระบวนการ autolysis ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบค่า EC_{50} ที่ 153.0 ug /ml



ภาพที่ 14. การแตกของเม็ดเลือดแดงหมูที่ได้รับหนวดแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*) บดละเอียดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบค่า EC_{50} ที่ 13.2 mg/ml



ภาพที่ 15. การแตกของเม็ดเลือดแดงหมูที่ได้รับหนวดแมงกะพรุนไฟ (*Chysaora sp.*) หรือตำแยทะเลบดละเอียดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบค่า EC_{50} ที่ 74.4 mg/ml

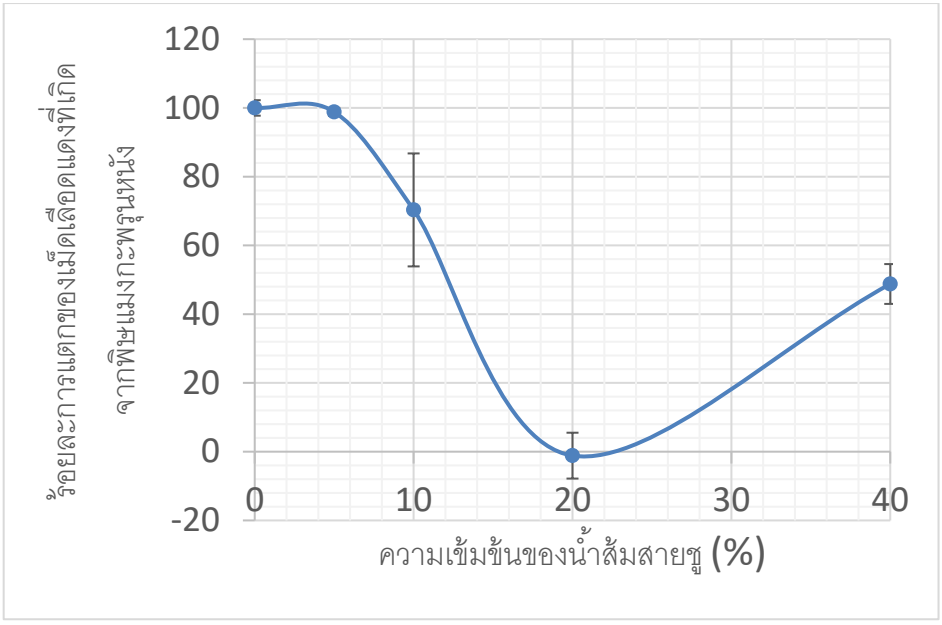
3.4 ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการออกฤทธิ์ของเซลล์เข็มพิษและพิษของแมงกะพรุนหนัง

เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผักบุ้งทะเลที่สกัดด้วยเอทานอล น้ำผักบุ้งทะเลคั้นสด น้ำส้มสายชูกลั่น5% เหล้าขาว แอลกอฮอล์ 70% กรดแทนนิก แคลเซียมและ EDTA ต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ผู้วิจัยทดสอบหาผลกระทบของสารดังกล่าวต่อการวิเคราะห์ร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง พบว่าสารทุกชนิดที่ใส่ไปส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ ชีวภาพ และทางเคมีของเม็ดเลือดแดง ยกเว้น EDTA ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงความเข้มข้นที่ทดลอง (0-80 mM) โดยน้ำส้มสายชูจะเปลี่ยนสีเม็ดเลือกที่ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 10 ส่วนเอทานอลจะไม่ส่งผลต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงในช่วงที่ทำการทดลอง (ร้อยละ 0-28) แต่ทำให้ลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดแดงเปลี่ยนไป ในขณะที่สารสกัดจากผักบุ้งทะเล น้ำคั้นจากผักบุ้งทะเล และแทนนิน ส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงและโปรตีนฮีโมโกลบิน นอกจากนี้แคลเซียมที่ความเข้มข้น 10-20 mM ส่งผลให้วัดค่าการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินที่ 415 nm ได้น้อยลง

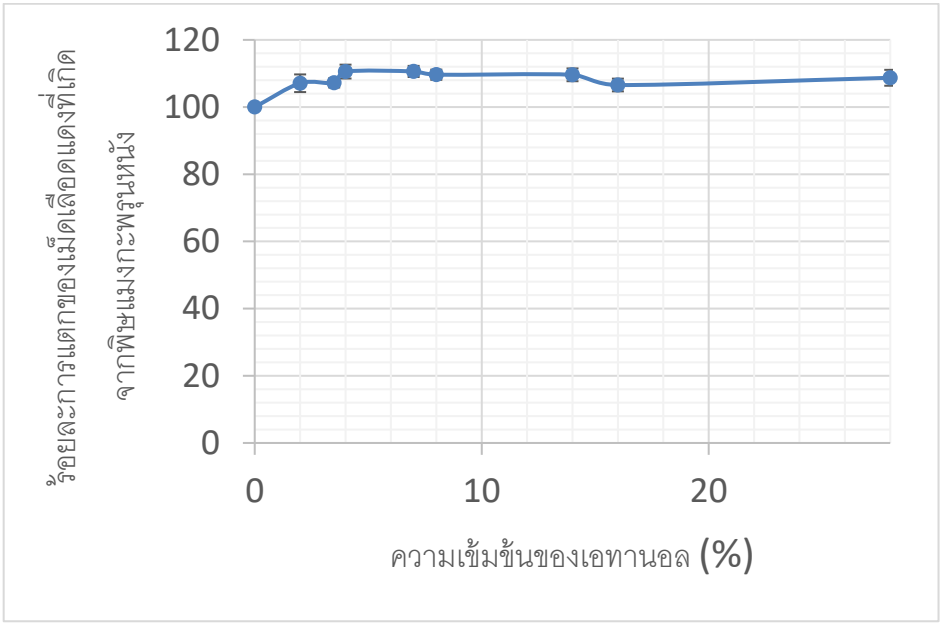
จากผลการศึกษาข้างต้นส่งผลให้ในการศึกษาผลของสารต่างๆ เหล่านี้ต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังจึงต้องใช้ชุดควบคุมที่ไม่ใส่เซลล์เข็มพิษและพิษแมงกะพรุนหนังเปรียบเทียบ ผลการวิเคราะห์พบว่าน้ำส้มสายชูกลั่น (5%) น้ำผักบุ้งทะเลคั้นสด สารสกัดจากผักบุ้งทะเล และแทนนิน สามารถต้านฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังได้โดยมีค่าความเข้มข้นที่ต้านพิษแมงกะพรุนหนังร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 12% (v/v) 2.5 mg/ml 6 mg/ml และ 0.9 mg/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 16 18 19 และ 22) ในขณะที่ EDTA ไม่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนัง (ภาพที่ 21) แต่ เอทานอล และ แคลเซียม กระตุ้นการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนัง (ภาพที่ 17 และ 20)

ตารางที่ 2. ผลของสารเคมีในครัวเรือนและสารสกัดจากผักบุ้งทะเลต่อการการวิเคราะห์ร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงหมู

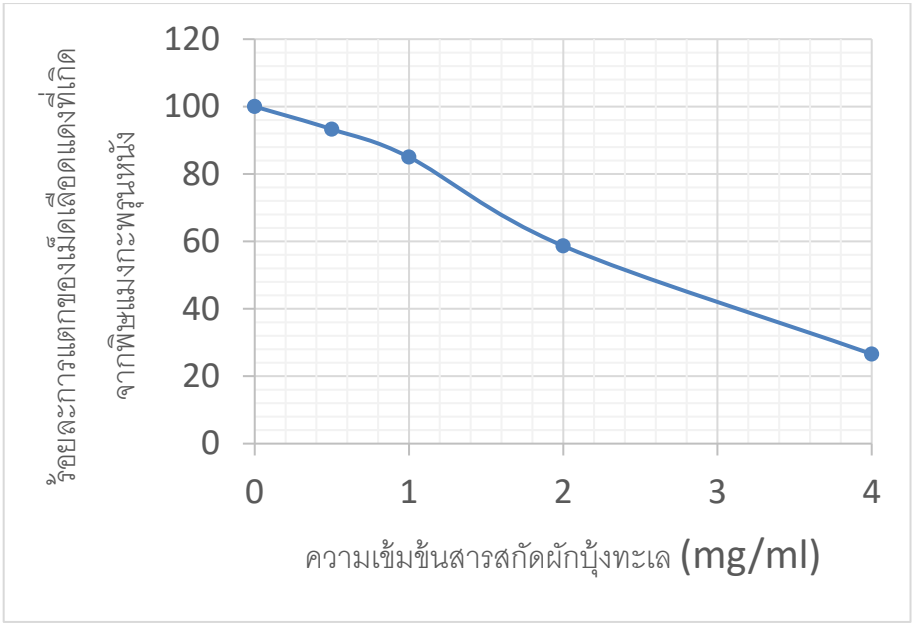
สารเคมี	ผลต่อการวิเคราะห์การแตกของเม็ดเลือดแดงหมู
น้ำส้มสายชูกลั่น (5%)	ใส่น้ำส้มสายชูเกิน 10% ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีทำให้สีเปลี่ยน
เอทานอล	ไม่ส่งผลต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงในช่วง 0-28 % แต่ทำให้เม็ดเลือดแดงเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง
สารสกัดจากผักบุ้งทะเล (เอทานอล)	ใส่สารสกัดจากผักบุ้งทะเล 0.5 – 4.0 mg/ml ส่งผลให้วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ได้ลดลงตามความเข้มข้นสารสกัดที่เพิ่มขึ้น
ผักบุ้งทะเลคั้นสด	ใส่ผักบุ้งทะเลคั้นสดในอัตราส่วนผักบุ้งต่อน้ำ 5 – 40 mg/ml ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงเริ่มตกตะกอนตามสัดส่วนของผักบุ้งทะเลที่เพิ่มขึ้น
EDTA	ไม่ส่งผลต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงในช่วง 0 - 80 mM
$CaCl_2$	ใส่ $CaCl_2$ ให้ส่งผลให้วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ได้ลดลงที่ความเข้มข้น 10-20 mM และกลับคืนมาที่ความเข้มข้น 40 – 80 mM
Tannic acid	ใส่แทนนินในช่วง 0.05 – 1.85 mg/ml ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงเริ่มตกตะกอนตามความเข้มข้นของแทนนินที่เพิ่มขึ้น



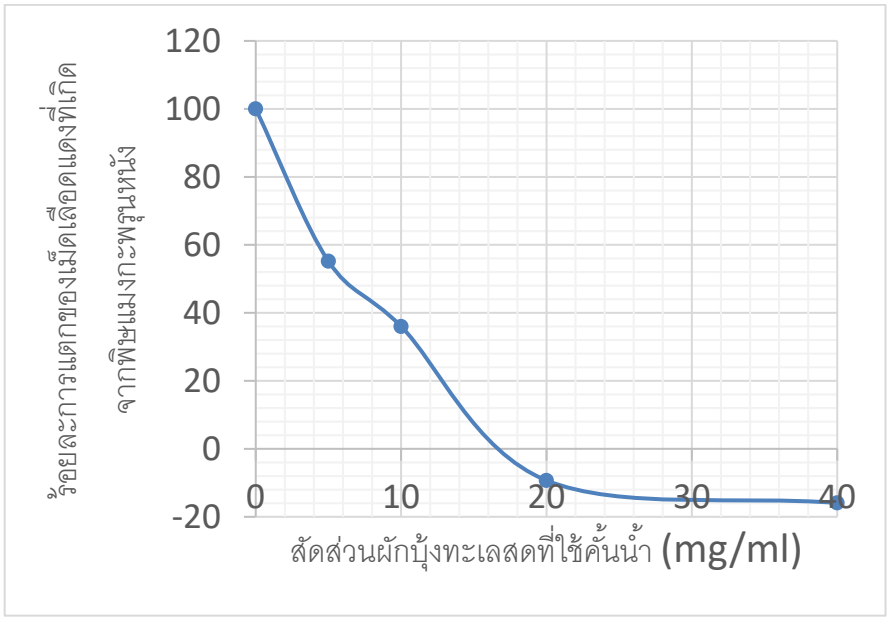
ภาพที่ 16. ผลของน้ำส้มสายชูกลั่น (5%) ต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก โดยมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้นร้อยละ 12



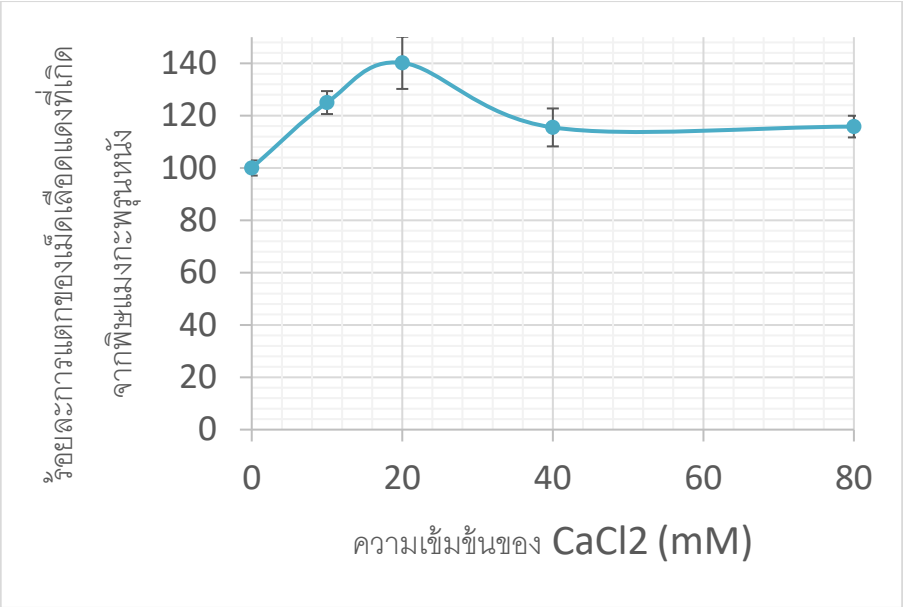
ภาพที่ 17. ผลของเอทานอลต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก



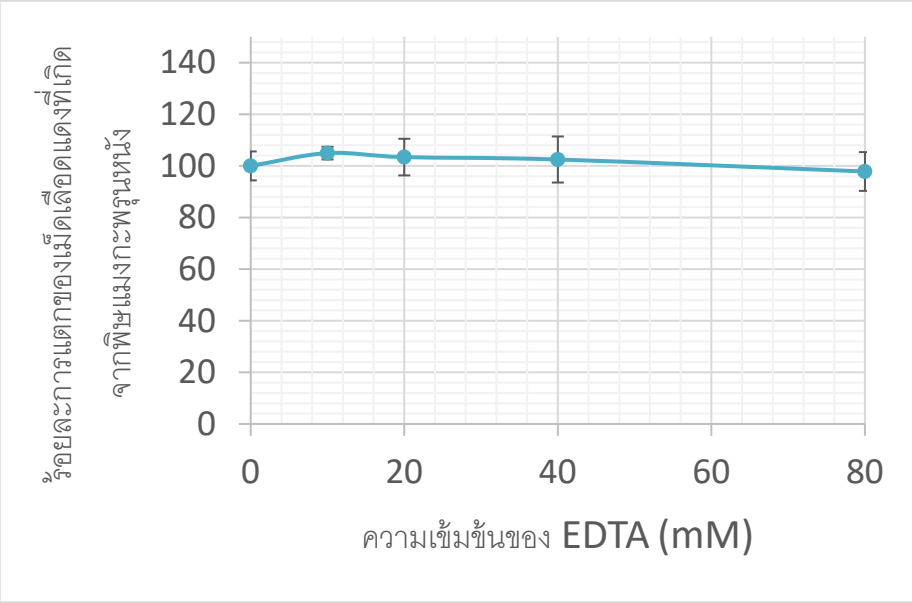
ภาพที่ 18. ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลที่สกัดด้วยเอทานอลต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก โดยมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml



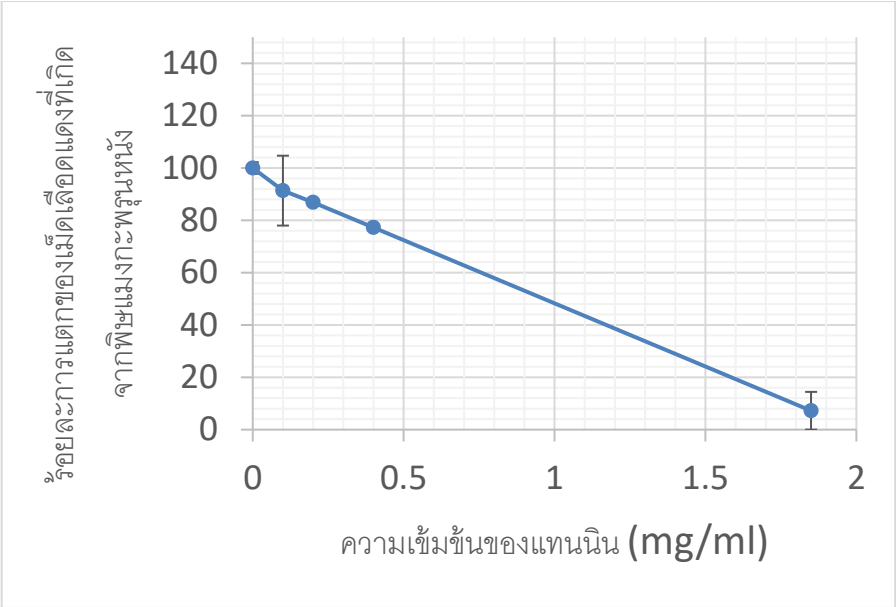
ภาพที่ 19. ผลของน้ำคั้นจากผักบุ้งทะเลสดต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก โดยมีค่า IC_{50} ที่สัดส่วนผักบุ้งทะเลที่ใช้คั้นน้ำ 6 mg/ml



ภาพที่ 20. ผลของ $CaCl_2$ ต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก



ภาพที่ 21. ผลของ EDTA ต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก



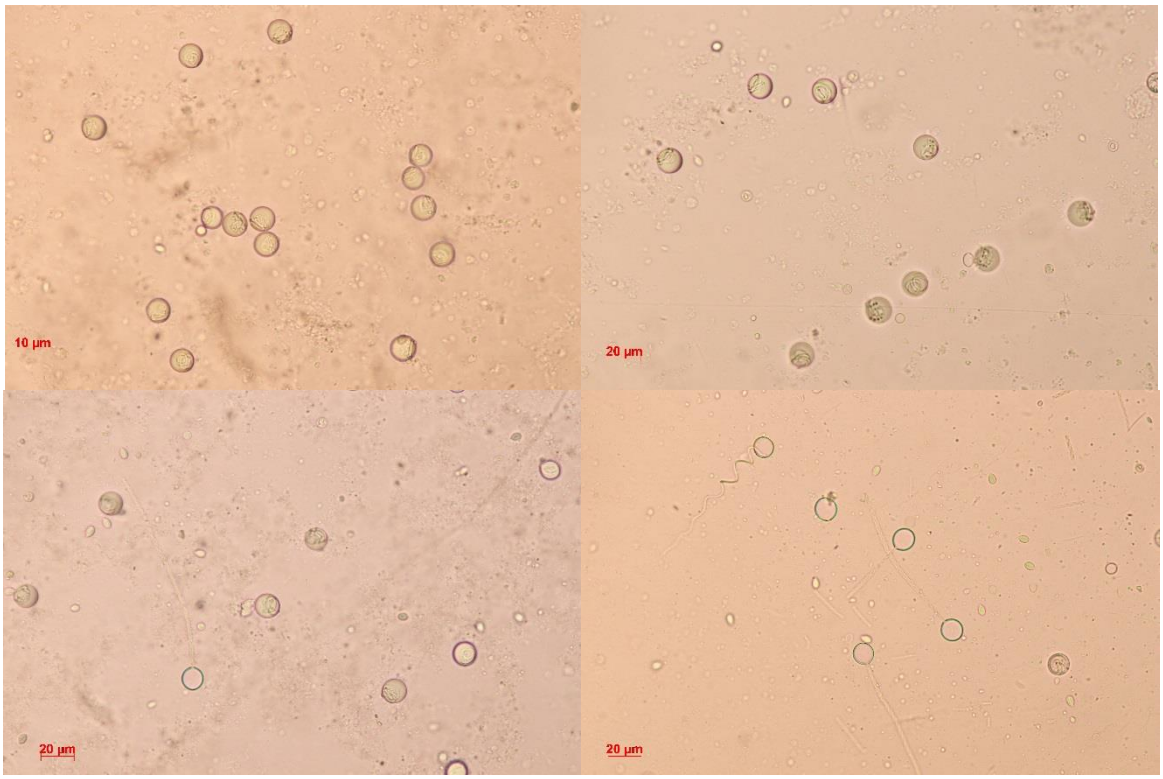
ภาพที่ 22. ผลของแทนนินต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก โดยมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 0.9 mg/ml

3.5 ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนัง

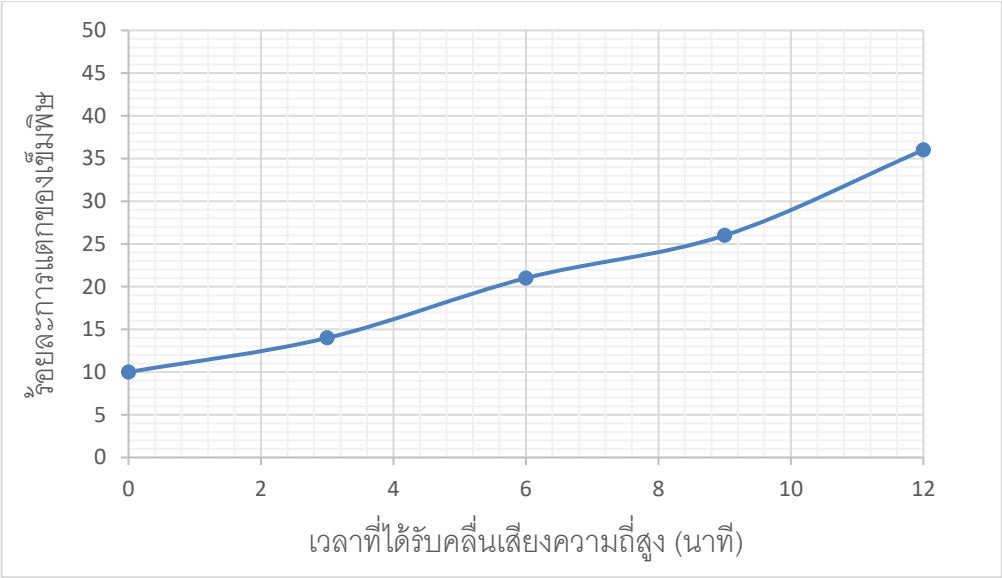
เพื่อศึกษาผลของสารต่างๆ ต่อการป้องกันการแตกกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนัง ผู้วิจัยได้ทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้กะเปาะเข็มพิษแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง โดยพบว่าการบ่มเซลล์เข็มพิษไว้ใต้คลื่นเสียงความที่สูงที่เวลามากกว่า 12 นาที จะส่งให้มีสัดส่วนกะเปาะเข็มพิษแตกมากกว่าร้อยละ 33 (ภาพที่ 23 และ 24) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้เวลาที่ 12 นาทีในการศึกษา

จากการทดสอบผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษโดยใช้ชุดควบคุมเป็นการเติมสารชนิดต่างๆ ลงไปโดยไม่ได้ผ่านการกระตุ้นให้กะเปาะเข็มพิษแตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ผู้วิจัยพบว่าเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนในสารละลายที่ประกอบไปด้วยน้ำคั้นสดใบผักบุ้งทะเล (10 – 40 mg/ml) สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเล (2 – 4 mg/ml) แคลเซียม (20 – 80 mM) และ EDTA (20 – 80 mM) สามารถลดอัตราการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนที่เกิดจากการกระตุ้นดวยคลื่นเสียงความถี่สูงได้ (ภาพที่ 27 - 30) ในขณะที่เอทานอลที่ความเข้มข้นเกินร้อยละ 8 กระตุ้นให้กะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนแตกมากขึ้นเมื่อได้รับคลื่นเสียงความถี่สูง นอกจากนี้น้ำส้มสายชูกลั่นความเข้มข้นเกินร้อยละ 20 และแทนนินที่ความเข้มข้นเกิน 0.1 mg/ml สามารถลดอัตราการการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนที่เกิดขึ้นเองในชุดควบคุมและจากการกระตุ้นดวยคลื่นเสียงความถี่สูงได้ แสดงให้

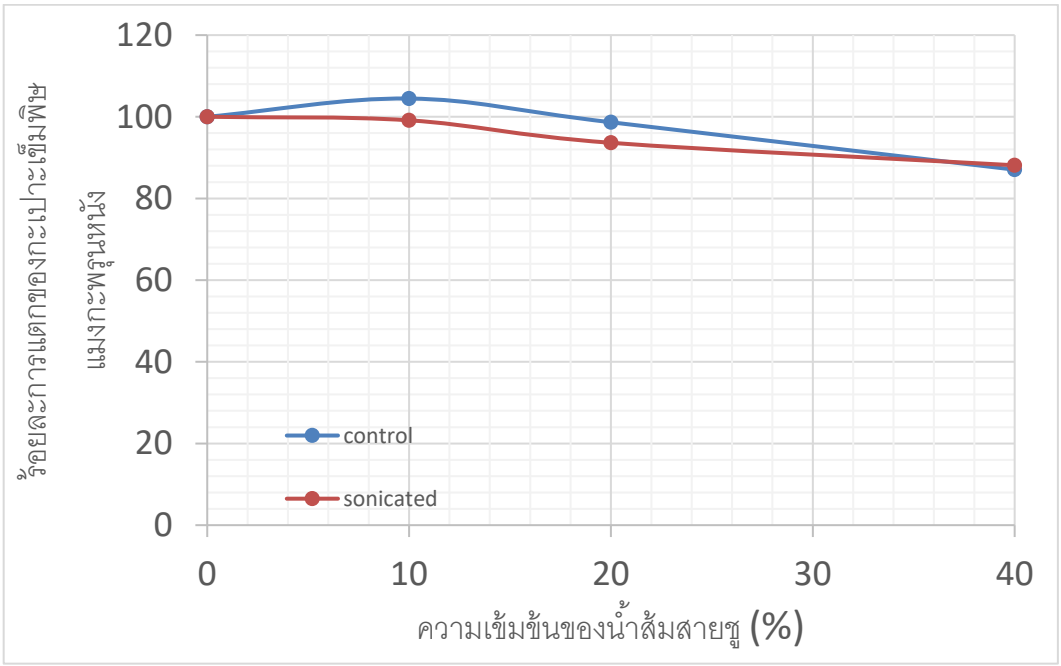
เห็นว่าน้ำส้มสายชูกลั่นและแทนนินไม่ได้ช่วยลดอัตราการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง แต่ลดจำนวนกะเปาะเข็มพิษที่แตกลงทั้งในชุดควบคุมและชุดที่กระตุ้นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง โดยความเข้มข้นของแทนนินที่ใช้ทดสอบให้ประสิทธิภาพสูงกว่าน้ำส้มสายชูกลั่นในการลดจำนวนกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนที่แตก (ภาพที่ 25 และ 31)



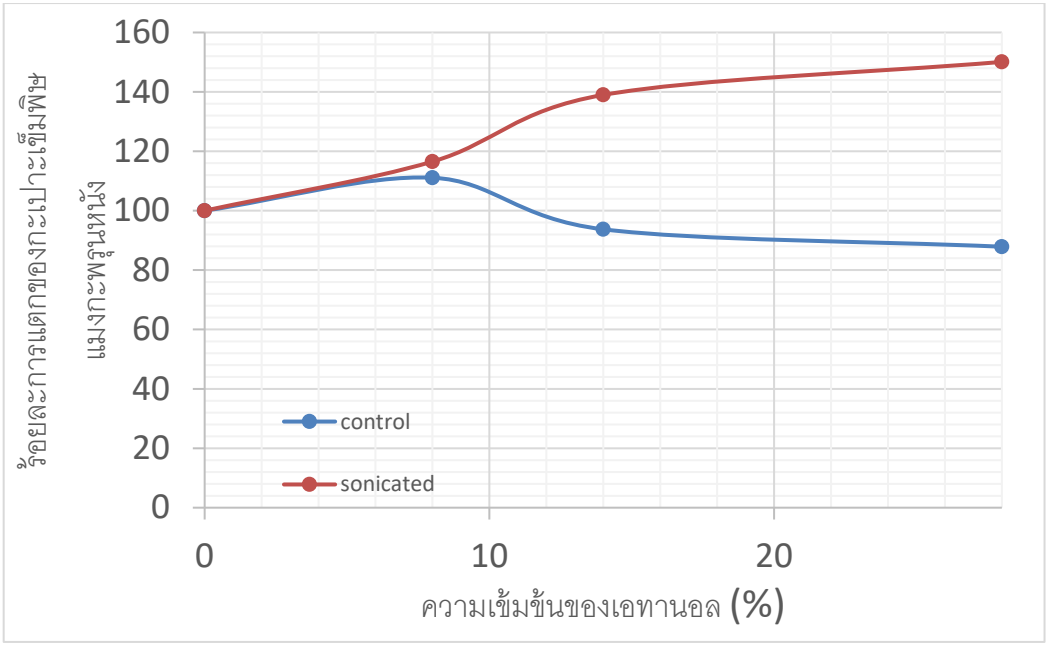
ภาพที่ 23. ลักษณะของเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังและกะเปาะเข็มพิษที่แตกจากการสั่นด้วยคลื่นความถี่สูงที่เวลาต่างๆ โดยพบกะเปาะเข็มพิษแตกเล็กน้อยที่เวลาที่ 0 และ 6 นาที (บนซ้ายและบนขวา) และแตกมากขึ้นที่เวลา 9 นาที (ล่างซ้าย) และพบกะเปาะเข็มพิษแตกมากกว่าร้อยละ 33 เมื่อบ่มที่ 12 นาที (ล่างขวา)



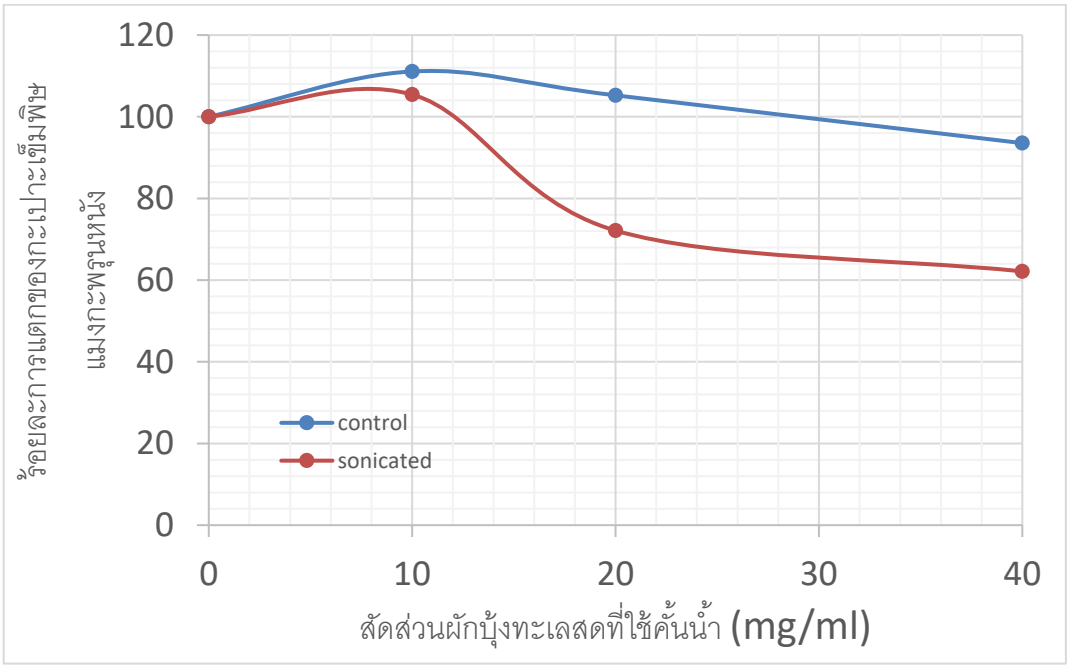
ภาพที่ 24. ผลของเวลาที่เซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังได้รับการสั่นด้วยคลื่นความถี่สูงที่ต่อร้อยละการแตกของกะเปาะเข็มพิษ



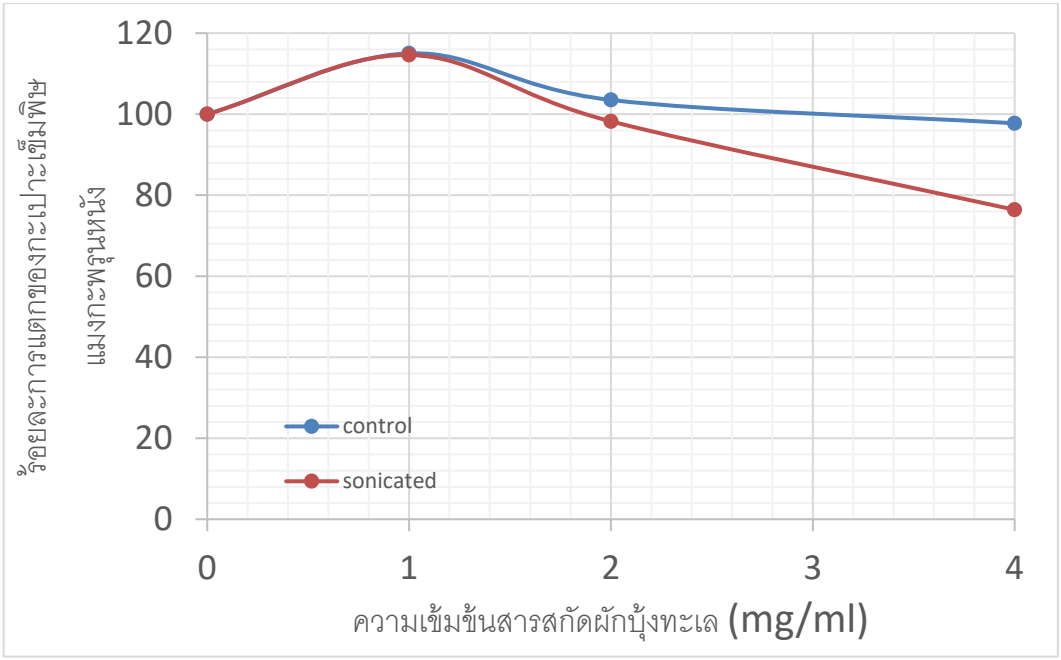
ภาพที่ 25. ผลของน้ำส้มสายชูกลั่น (5%) ต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษ โดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับน้ำส้มสายชูกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที



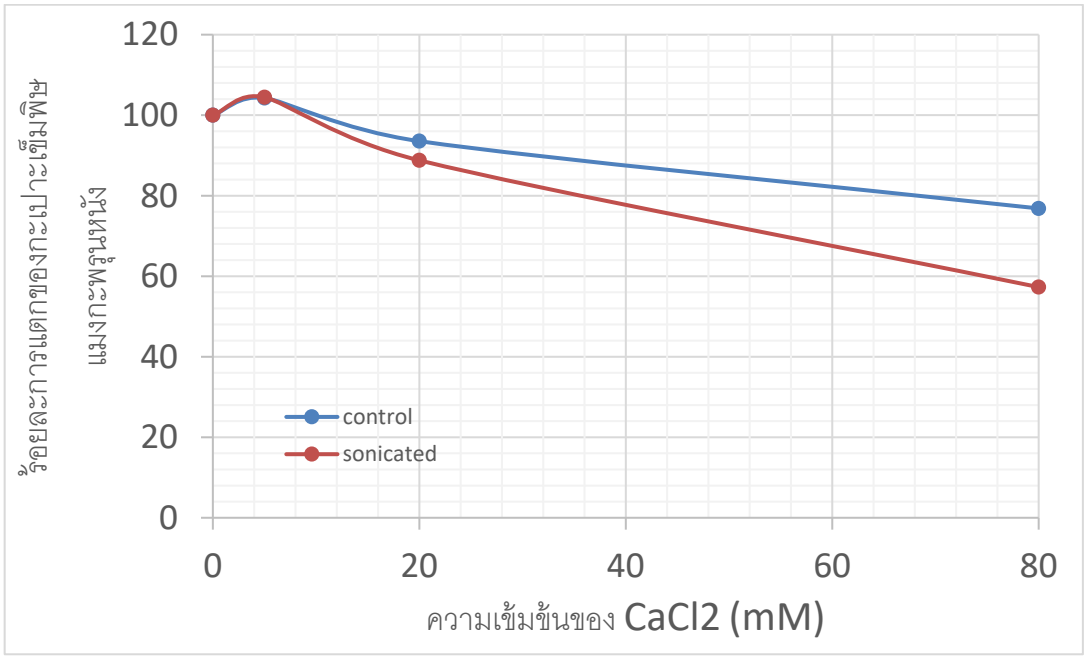
ภาพที่ 26. ผลของเอทานอลต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษ โดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที



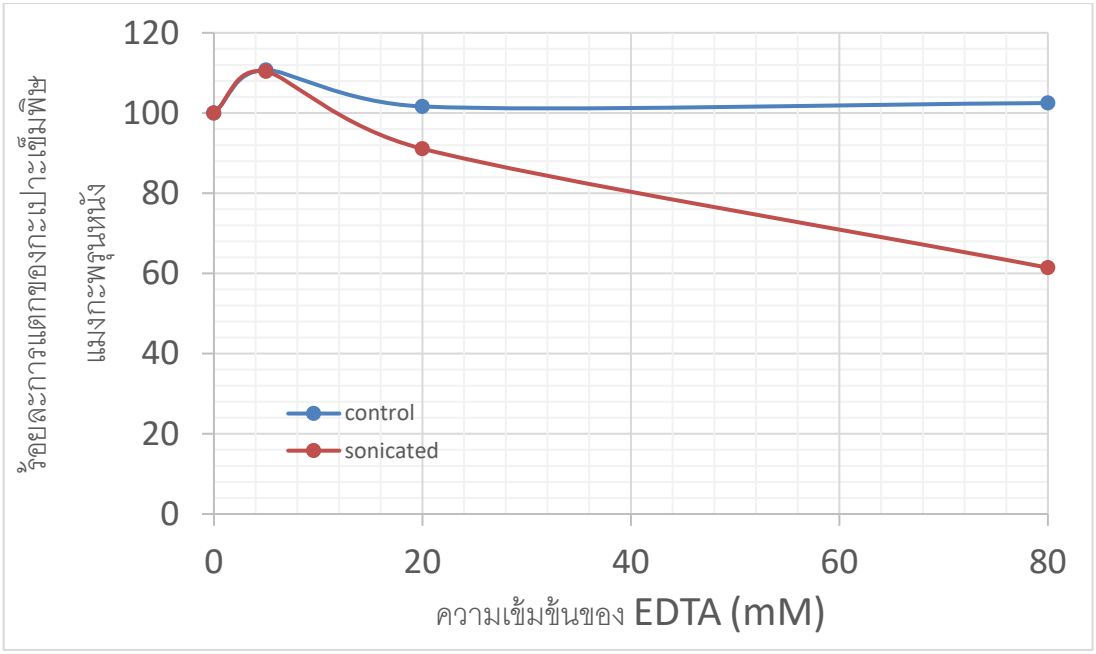
ภาพที่ 27. ผลของน้ำใบผักบุ้งทะเลคั้นสดต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษ โดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับน้ำใบผักบุ้งทะเลคั้นสดที่สัดส่วนต่างๆ ภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที



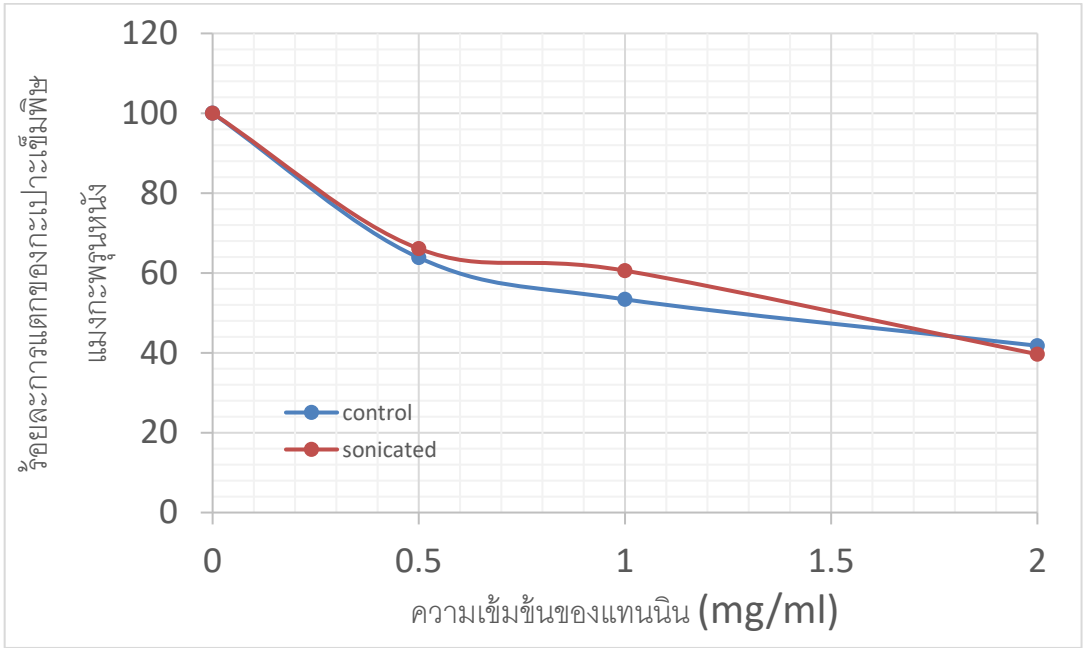
ภาพที่ 28. ผลของสารสกัดใบผักบุ้งทะเลด้วยเอทานอลต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษ โดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับสารสกัดใบผักบุ้งทะเลที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที



ภาพที่ 29. ผลของ $CaCl_2$ ต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษ โดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับ $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที



ภาพที่ 30. ผลของ EDTA ต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษ โดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที

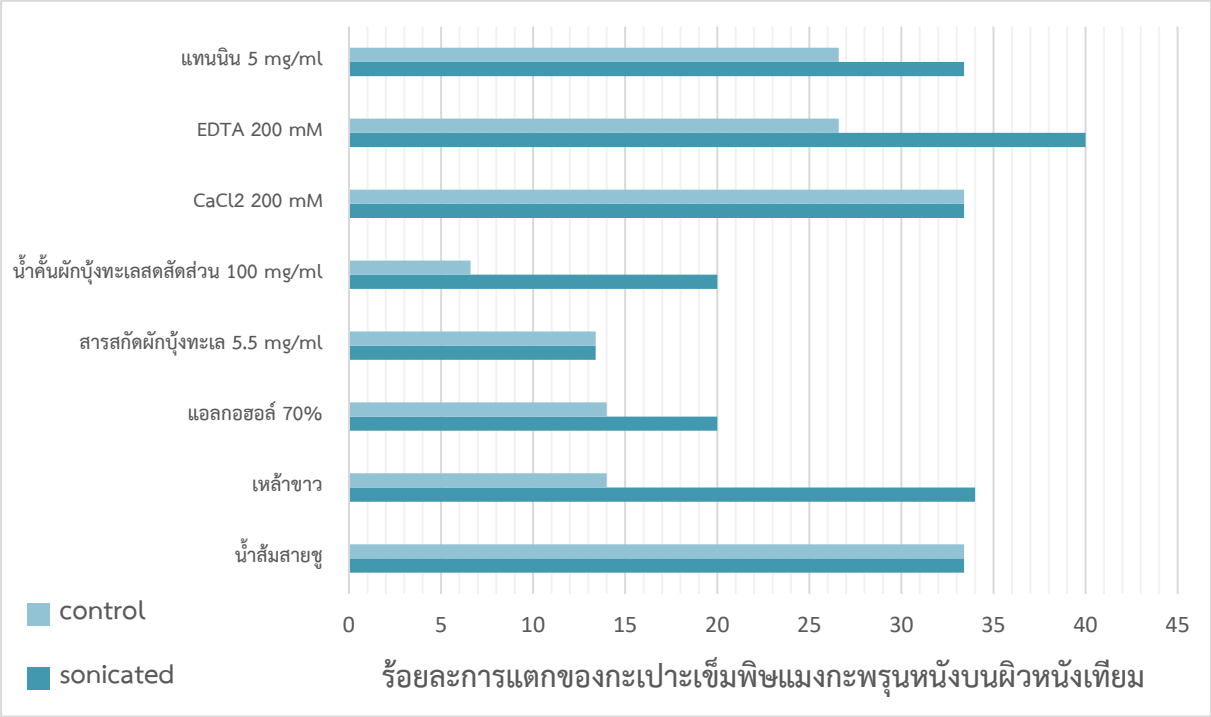


ภาพที่ 31. ผลของแทนนินต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษ โดยการบ่มเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังร่วมกับกรดแทนนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 12 นาที

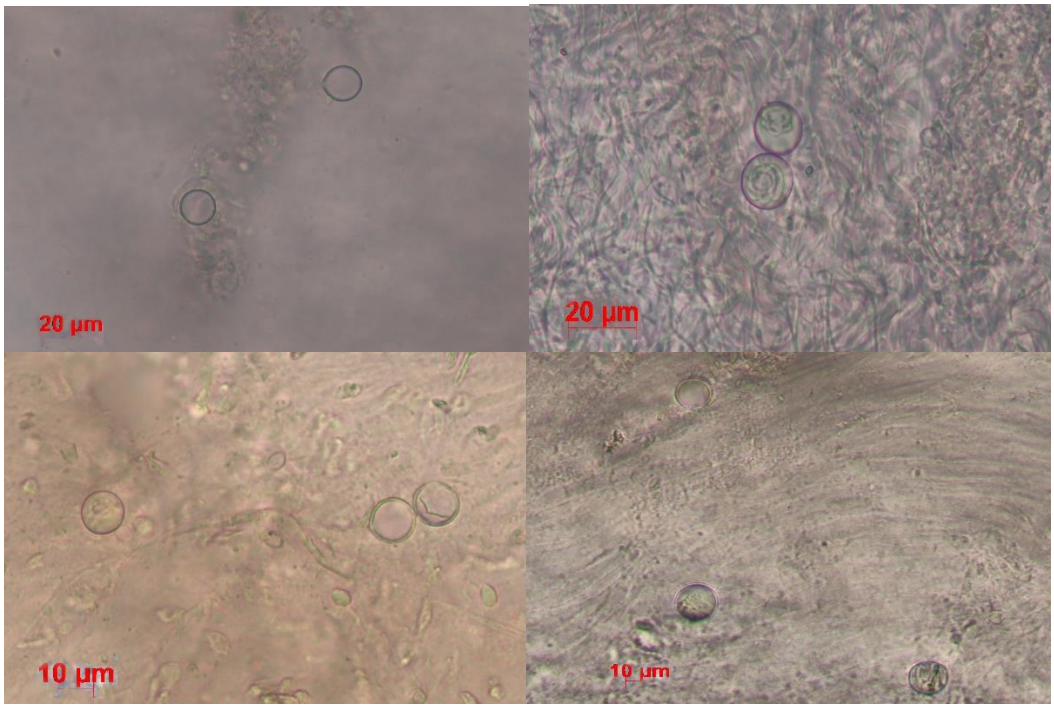
3.6 ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังบนผิวหนังเทียม

เพื่อทดสอบผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังเลียนแบบสภาวะจริงที่ไม่ได้แช่อยู่ในสารละลายในหลอดทดลอง ผู้วิจัยจึงได้ใช้ผนังไส้หมูในการทดสอบทำเป็นผิวหนังเทียมให้เซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนหนังมาจับ และทำการกระตุ้นให้กะเปาะเข็มพิษแตกออกด้วยการสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง จากนั้นทดสอบผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังบนผิวหนังเทียม โดยหลังจากที่จุ่มผิวหนังเทียมลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเซลล์เข็มพิษและพิษแมงกะพรุนแล้ว นำผิวหนังเทียมดังกล่าวมาล้างด้วยสารละลายที่มีสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีชนิดต่างๆ เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเลียนแบบการปฐมพยาบาลผู้ที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุน และใช้ชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ผู้วิจัยพบว่ามีผิวหนังเทียมที่ได้รับสารละลายแคลเซียมที่ความเข้มข้น 200 mM สารสกัดผักบุ้งทะเลที่ความเข้มข้น 5.5 mg/ml และน้ำส้มสายชูกลั่น (5%) ที่ไม่ได้เจือจาง มีอัตราการแตกของกะเปาะเข็มพิษคงที่เมื่อเซลล์เข็มพิษผนผิวหนังเทียมได้รับการกระตุ้นให้แตกด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ภาพที่ 32) แสดงให้เห็นว่าสารดังกล่าวข้างต้นที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบมีคุณสมบัติในการป้องกันการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังเมื่อนำไปใช้ในสภาวะจริง แตกต่างจากการการทดลองในสารละลายซึ่งน้ำคั้นสดใบผักบุ้งทะเล EDTA และแทนนิน ให้ผลในการลดอัตราการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังได้ดี โดยเมื่อนำมาทดสอบกับผิวหนังเทียมแล้วพบว่ามีอัตราการแตกของกะเปาะเข็มพิษมากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ภาพที่ 32 และ 33) อย่างไรก็ตามในกรณีที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงผู้วิจัยพบว่าการใช้น้ำคั้นใบผักบุ้งทะเลสดที่สัดส่วนการสกัด 100 mg/ml มีอัตราการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนน้อยที่สุดบนผิวหนังเทียม (ภาพที่ 32) ที่ประมาณร้อยละ 7 หรือแม้แต่การใช้เอทานอล 70% หรือเหล้าขาวที่ส่งผลให้มีอัตราการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนบนผิวหนังเทียมที่ร้อยละ 14 ในกรณีที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ภาพที่ 32) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในสารละลายที่เมื่อไม่ได้กระตุ้นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงเอทานอลจะไม่ส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการแตกของกะเปาะเข็มพิษ (ภาพที่ 26) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาอัตราการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังบนผิวหนังเทียมทั้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงและที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดจาก

ใบผักบุ้งทะเลมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการป้องกันการแตกของของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังโดยมีอัตราการแตกคงที่อยู่ที่ร้อยละ 13 (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32. เปรียบเทียบร้อยละการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังบนผิวหนังเทียมที่ทำจากไส้หมูหลังการล้างออกด้วยสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดเป็นระยะเวลา 1 นาที ก่อนนำไปกระตุ้นให้แตกด้วยการสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงกับชุดควบคุมที่ไม่ได้นำไปกระตุ้น

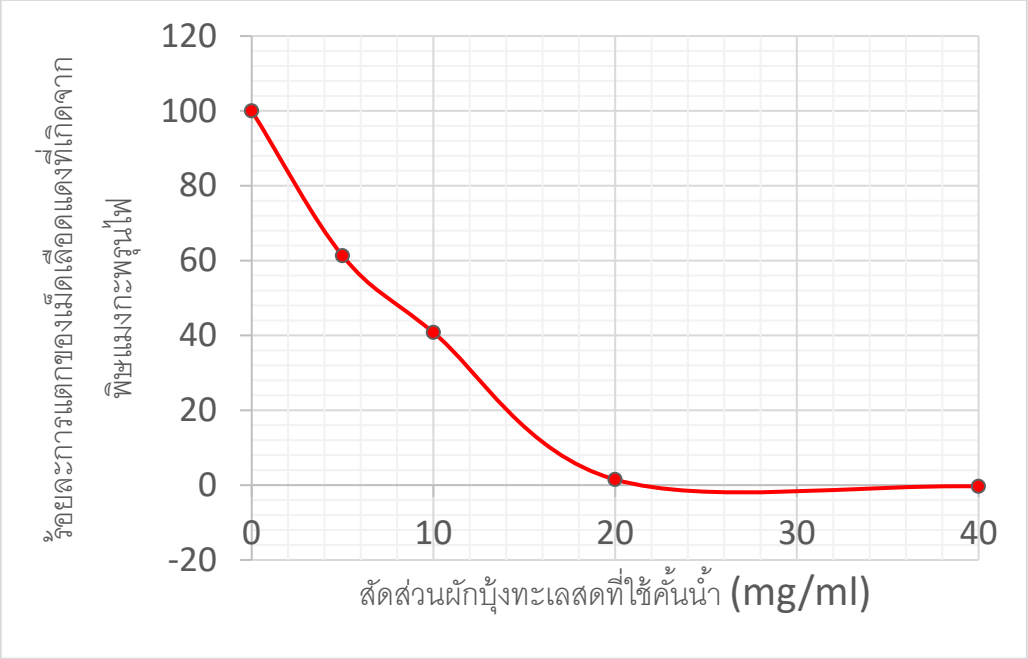


ภาพที่ 33. ลักษณะของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังบนผิวหนังเทียมที่ทำจากไส้หมูหลังการล้างออกด้วย EDTA (ซ้ายบน) สารสกัดจากผักบุ้งทะเล (ขวาบน) น้ำส้มสายชู (ล่างซ้าย) และแอลกอฮอล์ 70% (ล่างขวา) เป็นระยะเวลา 1 นาที ก่อนนำไปกระตุ้นให้แตกด้วยการสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

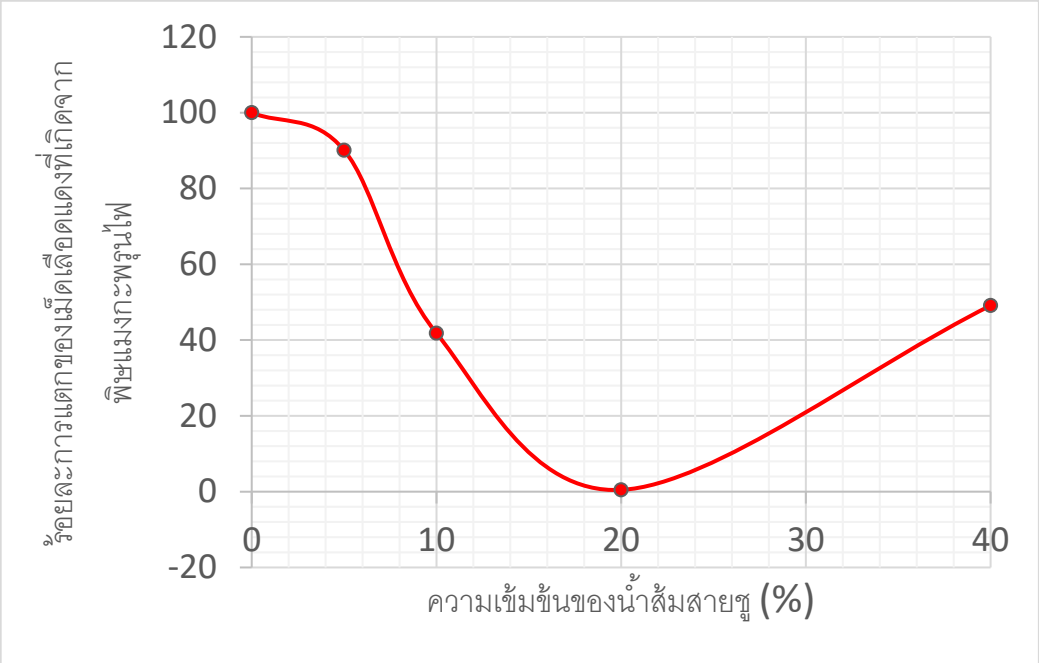
3.7 ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการออกฤทธิ์ของพิษของแมงกะพรุนไฟ

เนื่องจากพิษแมงกะพรุนไฟ *Sanderia* ที่ได้ต้องสกัดมาจากหนวดแมงกะพรุนไฟที่สลัดทิ้งในตู้เพาะเลี้ยงและมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการศึกษา นอกจากนี้ผู้วิจัยไม่สามารถใช้พิษจากเซลล์เข็มพิษของแมงกะพรุนไฟที่ได้จากการแยกเซลล์เข็มพิษด้วยกระบวนการ autolysis ได้ เนื่องจากพบฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงหมูแตกน้อยมากเมื่อใช้กระบวนการดังกล่าว ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนไฟในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตกโดยการใช้หนวดแมงกะพรุนไฟบดละเอียดซึ่งให้ฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงหมูแตกได้ดี (ภาพที่ 14) โดยผลการทดสอบพบว่าผลที่ได้คล้ายคลึงกับผลการทดสอบโดยใช้พิษแมงกะพรุนหนัง กล่าวคือน้ำคั้นผักบุ้งทะเลสดและน้ำส้มสายชูกลั่นสามารถต้านฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนหนังได้โดยมีค่าความเข้มข้นที่ต้านพิษแมงกะพรุนหนังร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับสัดส่วนใบผักบุ้งทะเลสดต่อน้ำ 7 mg/ml (ภาพที่ 34) และความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูกลั่นร้อยละ 9 (ภาพที่ 35) ในขณะที่การใช้เอทานอลส่งผลให้มีการออกฤทธิ์ของพิษมากขึ้น (ภาพที่ 36)

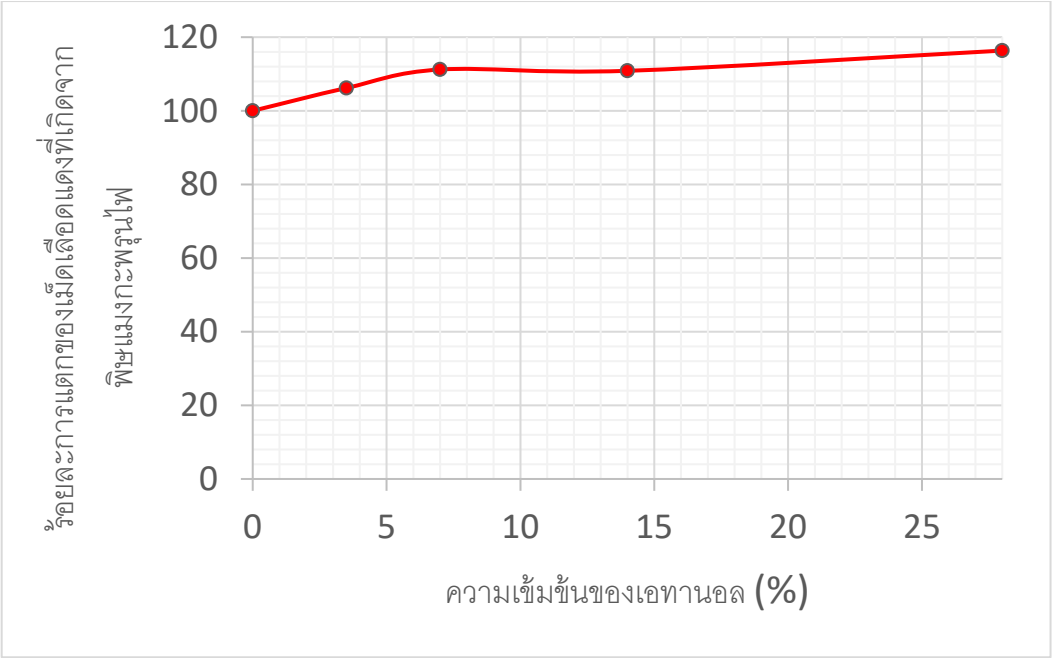
3.7 ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการออกฤทธิ์ของพิษของแมงกะพรุนไฟ



ภาพที่ 34. ผลของน้ำคั้นจากผักบุ้งทะเลสดต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนไฟเมื่อใช้พิษจากหนวดแมงกะพรุนไฟบดละเอียดในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก โดยมีค่า IC_{50} ที่สัดส่วนใบผักบุ้งทะเลสดต่อน้ำ 7 mg/ml



ภาพที่ 35. ผลของน้ำส้มสายชูกลั่น (5%) ต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนไฟเมื่อใช้พิษจากหนวดแมงกะพรุนไฟบดละเอียดในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก โดยมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้นร้อยละ 9



ภาพที่ 36. ผลของเอทานอลต่อการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนไฟเมื่อใช้พิษจากหนวดแมงกะพรุนไฟบดละเอียดในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมูแตก

3.8 ปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัดจากผักบุ้งทะเล

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเทียบเท่าแทนนินในสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลพบว่าสารสกัดจากผักบุ้งทะเลที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม 61.5mg/g อย่างไรก็ตามเมื่อตกตะกอนแทนนินด้วย Poly(vinyl)polypyrrolidone พบว่ามีปริมาณแทนนินเท่ากับ 54.8mg/g (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3. ปริมาณฟีนอลรวมและแทนนินในสารสกัดจากใบผักบุงทะเล

ตัวอย่าง	**ปริมาณฟีนอลรวม (mg/g น้ำหนักสด)**	**ปริมาณแทนนิน (mg/g น้ำหนักสด)**
สารสกัดผักบุ้งทะเลที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์	61.5 ± 0.01	54.8 ± 0.005

4. อภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผักบุ้งทะเลและแมงกะพรุนที่พบในจังหวัดชลบุรี

เนื่องจากพื้นที่บริเวณอ่างศิลา-บางพระ เป็นพื้นที่ที่มีการทำอุตสาหกรรมแปรรูปแมงกะพรุนมาตั้งแต่อดีต ส่งผลให้มีชาวประมงออกไปจับแมงกะพรุนหนังและแมงกะพรุนลอดช่องในช่วงฤดูมรสุมของทุกปี โดยในปี พ.ศ.2562 แมงกะพรุนหนังเข้ามาก่อน และเข้ามามากที่สุดในช่วงเดือนกันยายน และช่วงท้ายฤดูมรสุมจะพบแมงกะพรุนลอดช่อง และพบแมงกะพรุนไฟและแมงกะพรุนกล่องเข้ามาประปราย ในขณะที่ผักบุ้งทะเลนั้นพบได้ทั่วไปตามชายหาดและพื้นดินที่เข้ามาจากชายหาดในรัศมี 1 กิโลเมตร แสดงให้เห็นว่าผักบุ้งทะเลสามารถขึ้นในในพื้นดินทั่วไป แต่ด้วยความที่ผักบุ้งทะเลสามารถทนความเค็มของน้ำทะเลได้ เราจึงมีโอกาสพบผักบุ้งทะเลบริเวณชายหาดได้มากกว่าพืชชนิดอื่น เมื่อนำผักบุ้งทะเลและแมงกะพรุนมาสกัดดีเอนเอเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบว่ากระบวนการสกัดดีเอนเอจากแมงกะพรุนมักจะได้ดีเอนเอที่มีคุณภาพต่ำ ส่งผลให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ อันเนื่องมาจากองค์ประกอบหลักของแมงกะพรุนคือน้ำและเซลล์แมงกะพรุนเสื่อมสลายได้อย่างรวดเร็ว ถ้าปราศจากการเตรียมตัวอย่างที่ดี อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแล้ว ซึ่งใช้การเพิ่มปริมาณบริเวนดีเอนเอบนไมโตคอนเดรียจีโนม ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้อยู่ในช่วงที่ทำนายไว้ คือ 300-700 bp แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้น่าจะมาจากบริเวณดีเอนเอที่สนใจ โดยเมื่อส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปหาลำดับดีเอนเอและวิเคราะห์ชเงวิวัฒนาการกับลำดับจากฐานข้อมูล NCBI พบว่า ดีเอนเอที่เพิ่มปริมาณได้สอดคล้องกับบริเวณที่สนใจบนคลอโรพลาสต์และไมโตคอนเดรียจีโนม แสดงให้เห็นว่าสิ่งมีชิวตที่ใช้ในการศึกษานั้นเป็นผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-capres*) แมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*) และแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*) ตามสายพันธุ์ที่สนใจจริง

4.2 ลักษณะเซลล์เข็มพิษ เข็มพิษ และพิษแมงกะพรุน

โดยทั่วไปแมงกะพรุนแต่ละชนิดจะมีเซลล์เข็มพิษหลากหลายรูปแบบมากกว่า 1 ชนิด โดยมีแบบที่เป็นวงกลมขนาดประมาณ 20 ไมโครเมตร และแบบที่เป็นวงรีขนาดประมาณ 10 ไมโครเมตร ซึ่งพบได้ในทั้งแมงกะพรุนหนังและแมงกะพรุนไฟ อย่างไรก็ตามเมื่อเซลล์เข็มพิษดังกล่าวยิงเข็มพิษออกมากลับมีความยาวของเข็มพิษต่างกันโดยแมงกะพรุนไฟที่มีฤทธิ์ร้ายแรงกว่าแมงกะพรุนหนังนั้นจะพบเข้มพิษที่ยาวกว่าสองเท่าตัว และเมื่อเซลล์เข็มพิษปล่อย

เข็มพิษแล้วเซลล์จะมีลักษณะกลมในแมงกะพรุนหนังและคงสภาพรีในแมงกะพรุนไฟ แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างภายในที่ออกแบบมาแตกต่างกัน โดยแมงกะพรุนไฟออกแบบมาให้บรรจุเข็มพิษได้ยาวกว่าจึงอาจต้องมีโครงสร้างภายในที่แข็งแรงมากกว่า นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงพิษของแมงกะพรุนแต่ละชนิดแล้วเป็นที่น่าประหลาดใจว่าแมงกะพรุนแต่ละชนิดมีพิษรุนแรงต่างกัน โดยหนวดของแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*) มีพิษรุนแรงที่สุดในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก รองลงมาคือหนวดแมงกะพรุนไฟตำแยทะเล (*Chrysaora sp.*) ในขณะที่หนวดแมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*) มีพิษรุนแรงน้อยที่สุด อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่ากระบวนการแยกเซลล์เข็มพิษไม่เหมาะสมในการศึกษาพิษในเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*) เนื่องจากเมื่อนำมาสกัดพิษแล้วกลับตรวจพบฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกต่ำกว่าแมงกะพรุนหนังมากในขณะที่เมื่อใช้หนวดบดละเอียดมาทดลองกลับได้ฤทธิ์ที่สุงกกว่าแมงกะพรุนหนังมาก สาเหตุอาจเนื่องมาจากการเสื่อมสลายของเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนไฟที่หลุดออกมา และความหนาแน่นของเซลล์เข็มพิษบนหนวดแมงกะพรุนไฟที่มีมากกว่าแมงกะพรุนหนัง นอกจากนี้แมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*) ยังมีเข็มพิษที่ยาวกว่าแมงกะพรุนหนัง แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของแมงกะพรุนแต่ละชนิดนั้นนอกจากจะขึ้นกับชนิดของพิษแล้วยังขึ้นกับความหนาแน่นของเซลล์เข็มพิษและขนาดความยาวของเข็มพิษอีกด้วย

4.3 ฤทธิ์ต้านพิษแมงกะพรุนของผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิด

จากการทดสอบการต้านพิษแมงกะพรุนที่ทำให้เม็ลเลือดแดงแตกของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดทำให้ทราบว่า ผักบุ้งทะเลมีสารออกฤทธิ์ที่ยับยั้งการทำงานของพิษที่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก โดยสามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งในรูปสารสกัดและน้ำคั้นสด ในขณะที่สารเคมีบางชนิดก็ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของพิษที่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกเช่นกันโดยเฉพาะน้ำส้มสายชูกลั่นและแทนนิน โดยฤทธิ์ต้านพิษของน้ำส้มสายชูไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยน pH ของสารละลาย เนื่องจากในการทดลองมีการควบคุม pH โดบใช้บัฟเฟอร์ และความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่ใช้น้อยกว่าน้อยกว่าร้อยละ 2 เนื่องจากในน้ำส้มสายชูกลั่นมีกรดอะซีติกร้อยละ 5 ในขณะที่แทนนินส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงและพิษที่เป็นโปรตีนจึงมีคุณสมบัติในการต้านพิษแมงกะพรุนได้ อย่างไรก็ตามเอทานอลส่งผลให้เกิดการเพิ่มฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุน แสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนที่มากขึ้นในสภาวะที่มีขั้วน้อยลง นอกจากนี้ที่แคลเซียมความเข้มข้น 20 mM สามารถกระตุ้นการทำงานของพิษ

แมงกะพรุนหนังในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้มากขึ้น แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของพิษแมงกะพรุนต่อสรีรวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ควบคุมโดยความเข้มข้นของแคลเซียม เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว (ไม่ได้นำเสนอผลการทดลอง) โดยผู้วิจัยพบว่าแนวโน้มการต้านพิษที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยสารออกฤทธิ์ในผักบุ้งทะเลและน้ำส้มสายชูกลั่นต่อพิษของแมงกะพรุนหนังและแมงกะพรุนไฟเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งการใช้เอทานอลจะเพิ่มฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเช่นเดียวกัน

4.4 ฤทธิ์สารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดต่อการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนัง

กลไกหนึ่งในการป้องกันพิษแมงกะพรุนคือการป้องกันไม่ให้เซลล์เข็มพิษแตกออก เนื่องจากเซลล์เข็มพิษเหล่านี้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาวะที่เปลี่ยนแปลงไปภายนอก เช่น อุณหภูมิ การสั่นสะเทือน หรือสารเคมี จะถูกกระตุ้นให้ปล่อยเข็มพิษและพิษออกมา โดยทั่วไปเมื่อเซลล์เข็มพิษหลุดออกจากตัวแมงกะพรุน เซลล์เข็มพิษจะแตกออกประมาณร้อยละ 33 ที่เหลืออีกร้อยละ 67 จะแตกออกที่ผิวหนังของเหยื่อ ดังนั้นถ้าเราสามารถป้องกันการแตกของเซลล์เข็มพิษได้ก็จะสามารถช่วยลดผลของพิษแมงกะพรุนได้

ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าสารสกัดจากผักบุ้งทะเลและสารเคมีหลายชนิดที่ทำการทดสอบสามารถลดอัตราการแตกของกะเปาะเข็มพิษที่ถูกกระตุ้นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงได้ โดยน้ำคั้นใบผักบุ้งทะเล สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเล สารละลายแคลเซียม และสารละลาย EDTA มีประสิทธิภาพในการช่วยลดอัตราการแตกของเซลล์เข็มพิษได้ดี โดยมีแนวโน้มที่ออกฤทธิ์ดีขึ้นเมื่อให้ความเข้มข้นสูงขึ้น แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเปลี่ยนหรือรักษาโครงสร้างทางสรีรวิทยาของกะเปาะเข็มพิษให้ตอบสนองต่อการกระตุ้นได้น้อยลง ในขณะที่การใช้น้ำส้มสายชูกลั่นและแทนนินกลับให้ผลไม่ต่างกับเซลล์เข็มพิษที่ไม่ถูกกระตุ้น แต่ส่งผลให้ลดอัตราการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังได้ทั้งเซลล์เข็มพิษที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นโดนคลื่นเสียงความถี่สูงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่านำส้มสายชูกลั่นและแทนนินส่งผลต่อโครงสร้างทางกายภาพของเซลล์เข็มพิษและกะเปาะเข็มพิษของแมงกะพรุนหนัง ทำให้เกิดการลดสัดส่วนของกะเปาะที่แตกลงในทั้งสองชุดการทดลอง ที่น่าสนใจคือปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นไม่ส่งผลให้กะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังแตกมากขึ้นในชุดควบคุม แต่เมื่อใช้คลื่นเสียงความถี่สูงกระตุ้นจะส่งผลให้กะเปาะเข็มพิษ

แมงกะพรุนหนังแตกออกอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นถึงความไม่เสถียรของโครงสร้างกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนเมื่อได้รับเอทานอล

เพื่อให้สามารถตอบคำถามถึงการใช้ผักบุ้งทะเลและสารเคมีบางชนิดในการปฐมพยาบาลผู้ป่วยที่ได้รับพิษแมงกะพรุนผู้วิจัยจงได้ทำการทดสอบการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังบนผิวหนังเทียมที่ทำจากผนังลำไส้เล็กหมู จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากผักบุ้งทะเล สารละลายแคลเซียม และน้ำส้มสายชูกลั่นเท่านั้นที่เมื่อใช้ล้างเซลล์เข็มพิษแล้วจะป้องกันไม่ให้กะเปาะเข็มพิษแตกมากขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วนคลื่นเสียงความถี่สูง โดยสารแต่ละชนิดที่ใช้ส่งผลต่อการเกาะของเซลล์เข็มพิษบนผิวหนังเทียมด้วย โดยน้ำคั้นสดใบผักบุ้งทะเลและเอทานอลจะช่วยลดการเกาะของเซลล์เข็มพิษบนผิวหนังเทียมได้ แต่ไม่ช่วยลดการแตกของกะเปาะที่ถูกกระตุ้นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ในณะที่สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลสามารถป้องกันการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนหนังที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงและลดการเกาะของเซลล์เข็มพิษบนผิวหนังเทียมได้ จึงเหมาะสมในการใช้ล้างผิวหนังบริเวณที่ได้รับเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุน

4.5 สารออกฤทธิ์ต้านพิษแมงกะพรุนในผักบุ้งทะเล

เนื่องจากผักบุ้งทะเลมีรดชาติฝาดและมียาง ดังนั้นผู้วิจัยจึงสันนิษฐานว่าปัจจัยหนึ่งที่ช่วยต้านพิษของสารสกัดจากผักบุ้งทะเลคือสารออกฤทธิ์ในกลุ่มแทนนิน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอล โดยแทนนินจะจับกับโปรตีนหรือพิษแล้วทำให้โปรตีนนั้นไม่สามารถทำงานได้ โดยผู้วิจัยพบว่าในสารสกัดใบผักบุ้งทะเลประกอบไปด้วยสารประกอบฟีนอลหลายชนิด โดยมีแทนนินเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 90 แสดงให้เห็นว่าสารในกลุ่มนี้น่าจะเป็นกลุ่มหลักในการต้านพิษแมงกะพรุน ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าแทนนินสามารถลดพิษแมงกะพรุนและลดการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนในสารละลายได้ดี โดยตัวสารสกัดจากผักบุ้งทะเลเองก็มีสารลดอาการอักเสบ (Pongprayoon et al., 1991) ซึ่งจะช่วยให้ผู้ป่วยลดอาการเจ็บปวดลงอีกทางหนึ่งด้วย

4.6 การปฐมพยาบาลผู้ป่วยที่ได้รับพิษแมงกะพรุน

จากแนวทางการปฏิบัติในการปฐมพยาบาลผู้ป่วยที่ได้รับพิษแมงกะพรุนซึ่งนิยมใช้น้ำส้มสายชูนั้น จากผลการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสนับสนุนให้การใช้น้ำส้มสายชูเป็นแนวทางหลักในการถอนพิษแมงกะพรุน เพราะนอกจากน้ำส้มสายชูจะช่วยลดพิษแมงกะพรุนแล้วยังสามารถลดการแตกเพิ่มเติมของกะเปาะเข็มพิษได้ทั้งในหลอดทดลองและ

บนผิวหนังเทียม โดยสิ่งที่ไม่ควรใช้ในการปฐมพยาบาลคือแอลกอฮอล์เพราะจะส่งผลให้พิษแมงกะพรุนออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น และกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนแตกได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้การใช้น้ำใบผักบุ้งทะเลคั้นสดก็สามารถใช้ปฐมพยาบาลได้ดีเช่นกัน โดยน้ำผักบุ้งคั้นสดมีฤทธิ์ในการต้านพิษแมงกะพรุน และช่วยลดการเกาะของเซลล์เข็มพิษแมงกะพรุนบนผิวหนังในกรณีล้างออก และช่วยลดอัตราการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนในกรณีที่อยู่ในสารละลาย โดยในอนาคตการพัฒนาครีมและสารละลายสำหรับล้างผิวหนังจากสารสกัดใบผักบุ้งทะเลจะเป็นแนวทางที่น่าสนใจที่สุด เพราะนอกจากจะช่วยถอนพิษแมงกะพรุนและป้องกันกะเปาะเข็มพิษแตกแล้ว ยังสามารถลดอาการเจ็บปวดที่เกิดจากพิษแมงกะพรุนได้อีกทางหนึ่งด้วย

5. สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยสรุปได้ว่าหนวดแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*) มีฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้มากกว่าหนวดแมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*) และเข็มพิษของแมงกะพรุนไฟมีความยาวมากกว่าเข็มพิษของแมงกะพรุนหนังจึงส่งผลให้พิษแมงกะพรุนไฟมีฤทธิ์ที่รุนแรงกว่าแมงกะพรุนหนัง โดยพบสารที่สามารถลดพิษที่ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงได้คือ น้ำคั้นใบผักบุ้งทะเลสด สารสกัดเอทานอลจากใบผักบุ้งทะเล น้ำส้มสายชูกลั่น และแทนนิน และสารที่สามารถป้องกันการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนในสารละลายคือ น้ำคั้นใบผักบุ้งทะเลสด สารสกัดเอทานอลจากใบผักบุ้งทะเล น้ำส้มสายชูกลั่น แคลเซียม EDTA และแทนนิน โดยสารสกัดเอทานอลจากใบผักบุ้งทะเล สารละลายแคลเซียม และ น้ำส้มสายชูกลั่น สามารถป้องกันการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนบนผิวหนังเทียได้ ดังนั้นการปฐมพยาบาลผู้ป่วยที่ได้รับพิษแมงกะพรุนหนังด้วยสารสกัดจากผักบุ้งทะเลหรือน้ำส้มสายชูจึงเป็นวิธีการปฐมพยาบาลที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด เนื่องจากสามารถป้องกันการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนและต้านพิษที่ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ โดยสารที่ห้ามใช้ในการปฐมพยาบาลผู้ป่วยที่ได้รับพิษแมงกะพรุนคือแอลกอฮอล์เพราะจะกระตุ้นให้เกิดการแตกของกะเปาะเข็มพิษแมงกะพรุนและกระตุ้นการออกฤทธิ์ของพิษแมงกะพรุนในการทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง

6. ผลผลิต

6.1. ผลงานเชิงสาธารณะ

- การนำเสนอผลการศึกษาบางส่วนร่วมกับเทศบาลเมืองแสนสุขในงานวันทะเลโลก วันที่ 7 มิถุนายน พ.ศ. 2562 ณ บริเวณหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองชลบุรี
- การเผยแพร่ผลการศึกษาและจัดนิทรรศการโครงการ วันที่ 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2563 ณ เทศบาลเมืองแสนสุข ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองชลบุรี
- การเผยแพร่ผลการศึกษาร่วมกับเทศบาลเมืองแสนสุขและกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง วันที่ 24 และ 25 สิงหาคม 2563 ณ โรงแรมบางแสนเฮอริเทจ ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองชลบุรี

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 55251 **สัญญาเลขที่** 45.5/2562

โครงการวิจัยงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ ผลของสารสกัดจากผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae*) และสารเคมีที่ใช้ในการปฐมพยาบาลบางชนิดต่อการปล่อยเข็มพิษของแมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*) และแมงกะพรุนไฟ (*Sanderia malayensis*)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร.สลิล ชั้นโรจน์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ.2561 **ถึงวันที่** 31 มีนาคม พ.ศ. 2563

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 272,450 **บาท** **เมื่อ** 26 พฤศจิกายน พ.ศ.2561

งวดที่ 2 (40%) 217,960 **บาท** **เมื่อ** 30 กรกฎาคม พ.ศ. 2562

งวดที่ 3 (10%) 54,490 **บาท** **เมื่อ** ยังไม่ได้รับ

รวม 544,900 **บาท**

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	55,710	41,082.80	14,627.20
2. ค่าจ้าง	204,000	204,000	0
3. ค่าวัสดุ	159,700	165,077.20	-5377.20
4. ค่าใช้สอย	71,000	80,250	-9,250
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	54,490	54,490	0
รวม	544,900	544,900	0

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

1. Andrea, A., Lara, T., Xiong, X., Evgeniya, T., Alessandra, G., & Lorenzo, C. (2014). Development of a simple and cost-effective bead-milling method for DNA extraction from fish muscles. Food analytical methods, 7(4), 946-955.

2. Armani, A., Giusti, A., Castigliego, L., Rossi, A., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., & Guidi, A. (2014). Pentaplex PCR as screening assay for jellyfish species identification in food products. Journal of agricultural and food chemistry, 62(50), 12134-12143.

3. da Silva Barth, C., de Souza, H. G. T., Rocha, L. W., da Silva, G. F., dos Anjos, M. F., Pastor, V. D. A., Bresolin, T.M.B., Couto, A.G., Santin, J.R. & Quintão, N. L. M. (2017). Ipomoea pes-caprae (L.) R. Br (Convolvulaceae) relieved nociception and inflammation in mice–A topical herbal medicine against effects due to cnidarian venom-skin contact. Journal of Ethnopharmacology, 200, 156-164.

4. Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic acids research, 19(6), 1349.

5. Kawahara, M., Uye, S., Burnett, J., & Mianzan, H. (2006). Stings of edible jellyfish (Rhopilema hispidum, Rhopilema esculentum and Nemopilema nomurai) in Japanese waters. Toxicon, 48(6), 713-716.

6. Kitatani, R., Yamada, M., Kamio, M., & Nagai, H. (2015). Length is associated with pain: jellyfish with painful sting have longer nematocyst tubules than harmless jellyfish. PloS one, 10(8), e0135015.

7. Montgomery, L., Seys, J., & Mees, J. (2016). To Pee, or Not to Pee: A Review on Envenomation and Treatment in European Jellyfish Species. Marine drugs, 14(7), 127.

8. Nüchter, T., Benoit, M., Engel, U., Özbek, S., & Holstein, T. W. (2006). Nanosecond-scale kinetics of nematocyst discharge. Current Biology, 16(9), R316-R318.

9. Parsons, T. R., & Lalli, C. M. (2002). Jellyfish population explosions: revisiting a hypothesis of possible causes. La mer, 40, 111-121.

10. Pongprayoon, U., Bohlin, L., & Wasuwat, S. (1991a). Neutralization of toxic effects of different crude jellyfish venoms by an extract of Ipomoea pes-caprae (L.) R. Br. Journal of ethnopharmacology, 35(1), 65-69.

11. Pongprayoon, U., Baeckström, P., Jacobsson, U., Lindström, M., & Bohlin, L. (1991b). Compounds inhibiting prostaglandin synthesis isolated from Ipomoea pes-caprae. Planta medica, 57(06), 515-518.

12. Pyo, M. J., Lee, H., Bae, S. K., Heo, Y., Choudhary, I., Yoon, W. D., Kang, C. & Kim, E. (2016). Modulation of jellyfish nematocyst discharges and management of human skin stings in Nemopilema nomurai and Carybdea mora. Toxicon, 109, 26-32.

13. Qasim, M., Abideen, Z., Adnan, M. Y., Gulzar, S., Gul, B., Rasheed, M., & Khan, M. A. (2017). Antioxidant properties, phenolic composition, bioactive compounds and nutritive value of medicinal halophytes commonly used as herbal teas. South African Journal of Botany, 110, 240-250.

14. Sunthon, P. & Wasuwat, S. (1985) Jellyfish dermatitis treated by the extract of Ipomoea pes-caprae. Siriraj Hospital Gazette, 37, 329-338.

15. Thaikruea, L., & Siriariyaporn, P. (2016). The magnitude of severe box jellyfish cases on Koh Samui and Koh Pha-ngan in the Gulf of Thailand. BMC research notes, 9(1), 108.

16. Tibballs, J., A Yanagihara, A., C Turner, H., & Winkel, K. (2011). Immunological and toxinological responses to jellyfish stings. Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy), 10(5), 438-446.

17. Ward, N. T., Darracq, M. A., Tomaszewski, C., & Clark, R. F. (2012). Evidence-based treatment of jellyfish stings in North America and Hawaii. Annals of emergency medicine, 60(4), 399-414.

18. Vieira, D., Padoani, C., Soares, J. D. S., Adriano, J., Cechinel Filho, V., de Souza, M. M., Bresolin, T. M. B. & Couto, A. G. (2013). Development of hydroethanolic extract of Ipomoea pes-caprae using factorial design followed by antinociceptive and antiinfl ammatory evaluation. Revista Brasileira de Farmacognosia, 23(1), 72-78.

19. Wasuwat, S. (1970). Extract of Ipomoea pes-caprae (Convolvulaceae) antagonistic to histamine and jelly-fish poison. Nature, 225(5234), 758-758.

20. Wilcox, C. L., & Yanagihara, A. A. (2016). Heated debates: hot-water immersion or ice packs as first aid for Cnidarian envenomations?. Toxins, 8(4), 97.

21. Yanagihara, A. A., Wilcox, C., King, R., Hurwitz, K., & Castelfranco, A. M. (2016). Experimental assays to assess the efficacy of vinegar and other topical first-aid approaches on cubozoan (Alatina alata) tentacle firing and venom toxicity. Toxins, 8(1), 19.

22. Pongprayoon, U., Baeckström, P., Jacobsson, U., Lindström, M., & Bohlin, L. (1991). Compounds inhibiting prostaglandin synthesis isolated from Ipomoea pes-caprae. Planta medica, 57(06), 515-518.