

ฤทธิ์ทางชีวภาพและการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของรากสิบสองราศี

Biological Activities and Phytochemical Screening of *Launaea sarmentosa* Root

วัชรภรณ์ ประภาสะโนบล

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

Email: vatcharaporn.pra@mail.pbru.ac.th

บทคัดย่อ

สิบสองราศีเป็นพืชที่พบในเป็นพืชล้มลุกที่พบในท้องถิ่นวัดเขาตะเครา ตำบลบางครก อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรีในประเทศไทย ยังพบว่ามีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของรากสิบสองราศีไม่มากนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากสิบสองราศี โดยทำการประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ ได้แก่ ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (H_2N_1) ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริมชนิดที่ปาก ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด ได้แก่ มะเร็งปอด (NCI-H187) มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยแต่ละการทดสอบใช้วิธี Green fluorescent protein microplate assay (GFPMA), UNANA-based enzyme inhibition assay, Green Fluorescent Protein (GFP)-based assay และ Resazurin Microplate assay (REMA) ตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดเอทานอลของรากสิบสองราศีที่มีความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคได้เท่านั้นและสารสกัดเอทานอลของรากสิบสองราศีนี้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และพบว่ามีสารพิษเคมี ได้แก่ แอลคาลอยด์ สเตียรอยด์และฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ความเป็นพิษต่อเซลล์ สารพิษเคมี สิบสองราศี

Abstract

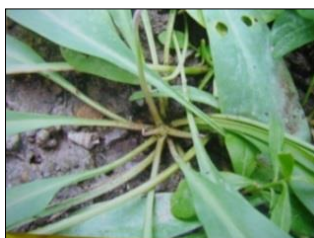
Launaea sarmentosa (Willd.) Sch. Bip. ex Kuntze is Thai medicinal plant, which is distributed in Phetchaburi province. This plant was collected from Bangkok sub-district of Phetchaburi province. There were a few reports data about the biological activities of *L. sarmentosa* extracts. The aim of this study was to investigate the biological activities of the ethanolic extracts of *L. sarmentosa* root. The extracts was evaluated for their biological activities including anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity, antiviral- H_2N_1 , anti-HSV-1 (*H. simplex* type-1), anti-bacterial activity against *Bacillus cereus* (anti-*B. cereus*), antifungal activity against *Candida albican* and cytotoxic activity against three human cancer cell lines including epidermoid carcinoma of oral cavity KB, breast adenocarcinoma MCF-7 and small cell lung cancer NCI-H187 by using Green fluorescent protein microplate assay (GFPMA), UNANA-based enzyme inhibition

assay, Green Fluorescent Protein (GFP)–based assay and Resazurin Microplate assay (REMA), respectively. The results showed that the extracts was inactive to all of biological assays except only anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity with the concentration values of 50 µg/ml. In addition, *in vitro* cytotoxicity of the extracts was non toxicity to Vero cells. Phytochemicals screening of root extracts in ethanol revealed the presence of alkaloid, steroid and flavonoid.

Keywords: Anti-TB, Cytotoxicity, Phytochemical, *Launaea sarmentosa*

บทนำ

ลิสบอนราศีหรือผักลิ้นห่านมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Launaea sarmentosa* (Willd.) Sch.Bip.ex Kuntze อยู่ในวงศ์ Asteraceae มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นพืชล้มลุก มีใบรอบลำต้น ใบยาวคล้ายลิ้น ขอบใบหยัก ปลายใบโค้ง แตกต้นอ่อนออกจากกระหว่างลำต้นที่ทอดเลื้อยไปตามพื้นดิน และระหว่างลำต้นจะมีใบวางเป็นคู่ แผ่นใบยาวประมาณ 20-25 เซนติเมตร มีสีเขียว ฐานใบแคบคล้ายเป็นก้าน ปลายใบกลมป้านออก ช่อดอกสีเหลือง ก้านช่อดอกยาวประมาณ 3-5 เซนติเมตร ก้านช่อดอกตั้งตรง มีฐานดอกหุ้ม กลีบดอกเป็นแฉกช่อดอกแบบกระจุกแน่นมี 8-10 กลีบ (รูปที่ 1)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 1 (ก) ลักษณะใบ (ข) ดอก และ (ค) รากของลิสบอนราศี

ลิสบอนราศีเป็นสมุนไพรที่ชาวบ้านในท้องถิ่นวัดเขาตะเครา ตำบลบางครก อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ใช้ใบสดรักษาแผลบริเวณผิวหนัง ทั้งแผลที่เกิดจากอาการคัน แผลสด แผลเน่าเปื่อย แผลอักเสบเป็นหนอง แผลพุพอง เริ่ม งามั่ว เพื่อรักษาอาการปวดแสบปวดร้อนลดอาการบวมและอักเสบได้เป็นอย่างดี (กั, 2550) และมีสรรพคุณทางยา แก้วปวดร้อน แก้วเจ็บคอ แผลในช่องปาก ผิ แผลเปื่อย ไฟไหม้ น้ำร้อนลวก แผลอักเสบเป็นหนอง (กัญจน, 2542) ต่อมาเมื่อมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากใบลิสบอนราศี พบว่ามีสาร 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสเตอรอยด์ (β -sitosterol และ stigmasterol) กลุ่มฟลาโวนอยด์ (luteolin) และพบสารกลุ่มไกลโคไซด์ (luteolin-7-O-glucoside) (บุษราคัมและปรีชา, 2551) และพบว่าสารสกัดเมทานอลของใบลิสบอนราศีแห้งสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ 7 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumonia* และ *Pseudomonas aeruginosa* (ตรีบุปผาและคณะ, 2551) และสารสกัดเอทิลเฮกเซน

เอทิลอะซิเตทและเมทานอลไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ *Candida albicans* เชื้อไวรัสเริมชนิดที่ปาก (*Herpes simplex virus type 1*) และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ความเข้มข้น 50 µg/ml (บุษราคัม และปรีชา, 2551) และสารสกัดเอทานอลและปิโตรเลียมอีเทอร์ของสารสกัดใบสับสองราศีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.397 และ 1.390 mg/ml ตามลำดับ และมีการหาปริมาณฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu phenol test พบว่าสารสกัดเอทานอลและปิโตรเลียมอีเทอร์มีปริมาณฟีนอลิก 33.684 และ 2.382 mgGAE ตามลำดับ (วัชรภรณ์และสุนันทา, 2555) และสารสกัดเฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเอทานอลจากใบสับสองราศีสดและแห้งไม่แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี Radioimmuno assay และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากใบแห้งและสดของสับสองราศีมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดชนิดอื่นที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.670 และ 1.810 mg/ml ตามลำดับ แต่ยังมีฤทธิ์ต่ำกว่ากรดแกลลิก (IC_{50} 0.514 mg/ml) สารสกัดทุกชนิดไม่แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งเต้านม (MCF-7) ด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (วัชรภรณ์, 2556) นอกจากนี้ยังมีทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (*Anti-Mycobacterium tuberculosis*, anti-TB) ต้านเชื้อมาลาเรีย (*Anti-malaria; Plasmodium falciparum*) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (*Anti-bacterial against Bacillus cereus*, anti-B. *cereus*) ต้านเชื้อไวรัส (H_2N_2) ต้านเชื้อไวรัสเริมชนิดที่ปาก (*H. simplex type-1*) และต้านเชื้อยีสต์ (*Anti-Candida albicans*) ด้วยวิธี Green fluorescent protein microplate assay Microculture radioisotope Fluorometric determination Green Fluorescent Protein based assay และ Resazurin Microplate assay ตามลำดับ พบว่าทุกสารสกัดไม่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ มีเพียงสารสกัด เฮกเซนของใบสดเท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ได้สูงสุดที่ค่า MIC 50 µg/ml (วัชรภรณ์และคณะ, 2557) แต่ยังไม่เคยมีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้กับส่วนรากของสับสองราศีเลย มีเพียงข้อมูลจากภูมิปัญญาท้องถิ่นของชาวอินเดียและมัลดีฟส์เท่านั้นที่มีการนำรากสับสองราศีมาใช้เป็นยาเพื่อรักษาบาดแผล คลอดบุตร ใช้รักษาอาการปวดเจ็บและความผิดปกติในช่องท้องโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ (Yusriya *et al.*, 2011) และใช้เป็นยาบำรุง ยาขับปัสสาวะและยาระบาย (Pullaiah, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าชาวประมงนิยมนำยางจากรากมาใช้ในการรักษาแผลที่ผิวหนังซึ่งเกิดจากเงี่ยงปลาแทง (Arun *et al.*, 2010) และมีการศึกษาพบสารกลุ่มแอลคาลอยด์ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต ไกลโคไซด์ แทนนินและสเตียรอยด์ในรากของสับสองราศีในประเทศอินเดียเท่านั้น (Yusriya *et al.*, 2013) แต่ยังไม่มีการศึกษาสารพฤกษเคมีในรากของสับสองราศีในประเทศไทยและเนื่องจากสารพฤกษเคมีแต่ละชนิดจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน เช่น แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (anthraquinone glycoside) มีฤทธิ์เป็นยาระบาย สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Beer *et al.*, 2002; Pourmorad *et al.*, 2006) ต้านอักเสบ (Sharma *et al.*, 2011) และเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย (Ghasemzadeh, *et al.*, 2010) แอลคาลอยด์ (alkaloids) มีฤทธิ์ต้านอักเสบและต้านมะเร็ง (พิสมัย, 2548) เป็นต้น ซึ่งการค้นพบชนิดของสารพฤกษเคมีจะสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ และยังเป็นแนวทางในการแยกสารให้บริสุทธิ์และระบุชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบต่อไปอีกด้วย

ดังนั้นเมื่อผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องแล้วพบว่ายังมีรายงานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของรากสกลีบสองราศีน้อยมาก จึงเห็นควรที่จะมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและทดสอบสารพิษเคมีของสารสกัดจากรากสกลีบสองราศี ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (H_5N_1) ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มชนิดที่ปาก ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเป็นฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน เพื่อนำไปสู่การค้นพบตัวยาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพจากพืชที่มีอยู่ในท้องถิ่น และยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการวิจัยเพื่อพัฒนาสารสกัดจากรากสกลีบสองราศีให้กับชุมชนและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและทดสอบสารพิษเคมีของสารสกัดจากรากสกลีบสองราศี ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (H_5N_1) ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มชนิดที่ปาก ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดจากรากสกลีบสองราศี

เก็บตัวอย่างรากสกลีบสองราศีในเดือนพฤษภาคม จากตำบลบางครก อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืช (ID113642) และเก็บรักษาตัวอย่างพืชไว้ที่สำนักหอพรรณไม้ เลขที่ 61 ถนน พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร โดยนำรากสกลีบสองราศีสด 300 g ที่บดละเอียดมาสกัดด้วยวิธีการแช่หมักด้วยเอทานอล 95% เป็นเวลา 5 วันกรองและนำส่วนที่เป็นสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้แต่ละครั้งมารวมกันจะได้สารสกัดเอทานอล เก็บสารสกัดในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปใช้ในการวิจัยขั้นต่อไป โดยนำสารสกัดหยาบส่งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และทดสอบสารพิษเคมีที่ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*, $H_{37}\text{Ra}$ strain) ใช้วิธี Green fluorescent protein microplate assay (GFPM) (Changsen *et al.*, 2003) ใช้ตัว ทำละลาย และ negative control เป็น 0.5% DMSO (Dimethyl sulfoxide) MIC positive control คือ Rifampicin 0.0125-0.025 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin 0.313-1.25 $\mu\text{g/ml}$ Isoniazid 0.047-0.375 $\mu\text{g/ml}$ Ofloxacin 0.781-3.13 $\mu\text{g/ml}$ และ Ethambutol 0.938-3.75 $\mu\text{g/ml}$ โดยนำเชื้อแช่แข็งมาเขย่าเป็นเวลา 15 s และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C อาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7H12 broth ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 50 $\mu\text{g/ml}$

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (H_5N_1) ด้วยวิธี Fluorometric determination (MUNANA-based enzyme inhibition assay) (Hurt *et al.*, 2012) ตัวทำละลายและ negative control เป็น 1% DMSO IC_{50} ของ positive control (Oseltamivir carboxylate) 0.488 nM ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 100 $\mu\text{g/ml}$

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริมชนิดที่ปาก (*H. simplex* type-1) โดยใช้วิธี Green Fluorescent Protein (GFP)-based assay (Tanaka *et al.*, 2004) ตัวทำละลายและ negative control เป็น 0.5% DMSO IC_{50} ของ positive control (Acyclovir) 3.73 $\mu\text{g/ml}$ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 50 $\mu\text{g/ml}$

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ (*Candida albicans*, ATCC 90028) และการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA) (Sarker *et al.*, 2007) เลี้ยงในอาหารชนิด potato dextrose agar เติมเชื้อและสารตัวอย่างนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย resazurin บ่มที่ 37°C เวลา 30 นาที วัดสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้เครื่อง SpectraMax M5 multi-detection microplate reader (Molecular Devices, USA) และรายงานผลเป็น %inhibition ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

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

เมื่อ FU_T และ FU_C คือค่าเฉลี่ยของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์จากสภาวะที่เติมและไม่ได้เติมสารสกัด และใช้ตัวทำละลายและ negative control เป็น 0.5% DMSO IC_{50} ของ positive control (Amphotericin B) 0.0728 $\mu\text{g/ml}$ และการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ใช้ค่า MIC ของ positive control (Vancomycin) 2.00 $\mu\text{g/ml}$ และความเข้มข้นของสารสกัดที่ 50 $\mu\text{g/ml}$

ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งใช้วิธี REMA ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Brien *et al.* (2000) เป็นการวัดสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์เช่นเดียวกับการทดสอบเชื้อยีสต์ ใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากันคือ 50.0 $\mu\text{g/ml}$ และเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบได้แก่เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB (epidermoid carcinoma of oral cavity, ATCC CCL-17) เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (breast adenocarcinoma, ATCC HTB-22) และเซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H187 (small cell lung cancer, ATCC CRL-5804) โดยใช้ 0.5% DMSO เป็น negative control และใช้ยา Ellipticine (IC_{50} 2.55 $\mu\text{g/ml}$) Doxorubicin (IC_{50} 1.02 $\mu\text{g/ml}$) เป็น positive control เซลล์มะเร็งช่องปาก Tamoxifen (IC_{50} 9.58 $\mu\text{g/ml}$) และ Doxorubicin (IC_{50} 7.74 $\mu\text{g/ml}$) เป็น positive control ในการทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม ส่วนเซลล์มะเร็งปอดใช้ positive control เป็นยา Ellipticine (IC_{50} 3.74 $\mu\text{g/ml}$) และ Doxorubicin (IC_{50} 0.074 $\mu\text{g/ml}$)

ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell, African green monkey kidney, ATCC CCL-81) ใช้วิธี Green fluorescent protein (GFP) (Hunt *et al.*, 1999) โดยใช้ 0.5% DMSO เป็น negative control และใช้ยา Ellipticine (IC_{50} 0.951 $\mu\text{g/ml}$) เป็น positive control

หมายเหตุ การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ต้านเชื้อแบคทีเรีย ทำการแปลผลดังนี้ ถ้าสามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่าร้อยละ 90 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ (inactive) แต่ถ้าสามารถยับยั้งเชื้อได้เท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 90 แสดงว่ามีฤทธิ์ (active) ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (H_2N_1) ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริมชนิดที่ปาก ฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์และความเป็นพิษต่อเซลล์ทำการแปลผลดังนี้ ถ้าสามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่าร้อยละ 50 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ แต่ถ้าสามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 50 แสดงว่ามีฤทธิ์

การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น (สินธพและคณะ, 2555 ; รัตนา, 2547 ; Harborne, 1998)

การทดสอบคูมาริน (coumarin) นำพืชสด 1 g ใส่หลอดทดลองอังกระดาศกรงที่ปากหลอดจุ่มหลอดลงในอ่างน้ำร้อน 5 นาที นำกระดาศกรงมาหยดสารละลาย 10%NaOH นำไปส่องแสงอัลตราไวโอเลต 366 nm สังเกตผลบวกเกิดการเรืองแสง

การทดสอบแทนนิน (tannins) นำสารสกัด 5 mg มาทดสอบกับ 1% gelatin 1 ml ผลบวกจะเกิดตะกอนสีขาว

การทดสอบซาโปนิน (saponins) ทดสอบการเกิดฟอง (Foam test) นำสารสกัด 5 mg เติมน้ำกลั่น 3 ml ต้ม 5 นาที เขย่าแรงๆ 1 นาที ผลบวกเป็นฟองรูปหกเหลี่ยมที่คงทนนานกว่า 30 นาที

การทดสอบสารฟีนอล (phenolic) นำสารสกัด 5 mg มาเติม 10% FeCl₃ 1 ml ผลบวกเกิดสีผสมของเขียว น้ำเงินหรือสีดำ

การทดสอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ด้วยวิธี Cyanidin test นำสารสกัด 5 mg ใส่ผง Mg 5 mg เติมน้ำ conc.H₂SO₄ 1 ml ผลบวกสังเกตรสีของสารละลายฟลาโวน (flavones) ให้สีแดงฟลาโวนอล (flavonols) ให้สีแดง-สีเลือดหมูและฟลาวาโนน (flavanones) ให้สีแดงเข้ม-ม่วงแดง

การทดสอบสารแอนทราควิโนน (antraquinones) ด้วย Borntrager's test นำสารสกัด 5 mg เติมน้ำ 10%HCl 2 ml ต้ม 5 นาทีสกัดด้วย CH₂Cl₂ 5 ml และนำชั้นน้ำเติม 10%NH₃ 1 ml ผลบวกให้สีแดงชมพู

การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) ด้วย Kedde's test นำสารสกัด 5 mg เติมน้ำ Kedde's reagent 0.5 ml ผลบวกสีม่วงเป็นส่วนของวงแหวนที่ไม่มีอิมิตัว และการทดสอบ Klier-kiliani นำพืชมา 1 g สกัดด้วย EtOAc เติมน้ำ 95%EtOH 5 หยดลงในสารสกัดหยด FeCl₃ 5 หยดและหยด conc.H₂SO₄ 2-3 หยดลงข้างหลอดผลบวกเป็นวงแหวนสีม่วงของส่วนน้ำตาลดีออกซี (deoxy sugars)

การทดสอบ Lieburmann-Burchard นำสารสกัด 5 mg เติมน้ำอะซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) 1-2 หยด สังเกตสีภายใน 10 วินาที ผลบวกสารไตรเทอร์พีน (triterpenes) ให้สีม่วงแดงและถ้าเป็นสเตียรอยด์ (steroids) ให้สีฟ้าเขียว

การทดสอบ Dragendroff's reagent นำสารสกัด 5 mg มาละลายในกรด HCl เจือจาง หยดรีเอเจนต์ 1-2 หยด ผลบวกแอลคาลอยด์ (alkaloids) เกิดตะกอนสีส้ม

ผลการวิจัย

ปริมาณสารสกัดของรากสิบสองราศี จากการนำรากสิบสองราศีสดจำนวน 100 g ที่เก็บจากตำบลบางครก อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรีมาสกัดด้วยเอทานอล 95% พบว่าได้สารสกัดมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม 23.616 กรัม (%w/w 7.872)

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดรากสิบสองราศี การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (H₂N₂) ฤทธิ์ต้านไวรัสริมชนิดที่ปาก ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ของสารสกัดรากสิบสองราศี ได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดรากลิบสองราศี

The biological activities	% Inhibition	Activity
anti-TB	116.28	Active
antivirus-H ₅ N ₁	0	Inactive
anti-HSV-1	20.18	Inactive
anti- <i>B. cereus</i>	0.108	Inactive
antifungal	8.52	Inactive

จากตารางที่ 1 ปรากฏว่าสารสกัดเอทานอลของรากลิบสองราศีที่ความเข้มข้น 50.0 µg/ml แสดงฤทธิ์ต้านวัณโรคที่ 116.28% แต่ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (H₅N₁) ฤทธิ์ต้านไวรัสเรมีชนิดที่ปาก ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ และผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดรากลิบสองราศี

Cytotoxic activity	% Inhibition	Activity
Small cell lung (NCI-H187)	15.68	Inactive
Oral cavity(KB)	6.57	Inactive
Breast adenocarcinoma(MCF-7)	0.00	Inactive
Vero cell	-	Non-cytotoxic

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (ตารางที่ 2) พบว่าสารสกัดรากลิบสองราศีไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ มะเร็งปอด (NCI-H187) มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (Vero cell)

ผลการทดสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดรากลิบสองราศี

การทดสอบสารพิษเคมีของสารสกัดรากลิบสองราศีเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อให้ทราบว่าในตัวอย่างพืชมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารในกลุ่มใด สารบางกลุ่มไม่มีวิธีตรวจสอบที่เฉพาะเจาะจงและเป็นวิธีทางเคมี อย่างไรก็ตามบางวิธีการตรวจสอบไม่สามารถอธิบายกลไกการเกิดปฏิกิริยาได้และการตรวจสอบสารแต่ละกลุ่มหรือโครงสร้างแต่ละแบบมักมีมากกว่า 1 วิธี อาจทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลแต่ในเบื้องต้นในงานวิจัยนี้จะเลือกวิธีที่ง่าย เป็นที่นิยมและสามารถเห็นผลชัดเจนเท่านั้น ผลการทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับสารพิษเคมีที่พบในสารสกัดจากใบลิบสองราศีสดและแห้ง แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดใบสดและแห้ง (วัชราภรณ์และคณะ, 2557) และรากสิบสองราศี

Phytochemicals	Leaf extracts (วัชราภรณ์และคณะ, 2557)						Root
	Hexane	Hexane	Ethyl	Ethyl	Ethanol	Ethanol	extracts
	(fresh)	(dry)	acetate (fresh)	acetate (dry)	(fresh)	(dry)	
triterpenes	×	×	×	×	×	×	×
steroids	✓	✓	×	✓	×	×	✓
saponins	×	×	×	×	×	×	×
cardiac	×	×	×	×	×	×	×
glycosides							
phenolic	×	×	✓	✓	×	×	×
coumarins	×	×	×	×	×	×	×
flavonoids	×	×	✓	✓	×	×	✓
tannins	×	×	×	×	✓	✓	×
antraquinones	×	×	×	×	×	×	×
alkaloids	×	×	×	×	✓	×	✓

✓ หมายถึงพบสารกลุ่มที่ทดสอบ × หมายถึงไม่พบสารกลุ่มที่ทดสอบ

จากตารางที่ 3 สารสกัดรากสิบสองราศีพบสารสเตียรอยด์ ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเอทานอลของรากสดสิบสองราศีแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพต้านเชื้อวัณโรคที่ความเข้มข้น 50.00 µg/ml แต่ในสารสกัดจากใบไม่แสดงฤทธิ์ ซึ่งแตกต่างจากสารสกัดจากส่วนใบสดที่พบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ได้สูงสุดที่ค่า MIC 50.00 µg/ml (วัชราภรณ์และคณะ, 2557) ซึ่งสอดคล้องกับภูมิปัญญาท้องถิ่น¹และสรรพคุณทางยาที่ใช้ในการรักษาแผล (กัญจน, 2542) ซึ่งจากผลการวิจัยในส่วนใบสดและรากสดของสิบสองราศีแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าส่วนพืชแห้งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของอรุณและกาญจนา (2560) ที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลของพืชสมุนไพรสดหลายชนิดพบว่าสารสกัดจากใบตัวสดมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคด้วยค่า MIC 50.00 µg/ml ส่วนฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่ทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (H_2N_2) ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริ่มชนิดที่ปาก ฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งพบว่าทั้งสารสกัดจากทั้งรากและใบของสิบสองราศีไม่แสดงฤทธิ์เช่นเดียวกัน ส่วนสารพฤษเคมีที่พบในรากสิบสองราศีเป็นชนิดเดียวกันกับที่พบในส่วนใบ (วัชราภรณ์และคณะ, 2557) ได้แก่ สเตียรอยด์ ฟลาโวนอยด์และแอลคา

ลอยด์นั้น มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพิษเคมีเหล่านี้ เช่น สารกลุ่มแอลคาลอยด์มีฤทธิ์ต้านการอักเสบต้านเบาหวาน ต้านออกซิเดชัน และต้านแบคทีเรียได้ (Souto *et al.*, 2010; Tiong *et al.*, 2013; Bousselessela *et al.*, 2013) และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ต้านมะเร็งและต้านจุลชีพได้ดี (Pietta, 2000; Ren *et al.*, 2003; Ozcelik *et al.*, 2008) สอดคล้องกับที่สารสกัดแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งซึ่งน่าจะเกิดจากสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นสารออกฤทธิ์ (Bousselessela *et al.*, 2013) และสอดคล้องกับการใช้ประโยชน์ตามภูมิปัญญาที่ใช้ส่วนใบและรากสิบสองราศีในการรักษาแผลติดเชื้อที่ผิวหนังได้ (กั, 2550; กัญจน, 2542; Arun *et al.*, 2010) เนื่องจากมีสารกลุ่มแอลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบและต้านแบคทีเรีย (Souto *et al.*, 2011; Bousselessela *et al.*, 2013) และมีสารฟลาโวนอยด์ที่ต้านจุลชีพได้ดี (Ozcelik *et al.*, 2008) แต่ในส่วนใบยังพบสารแทนนินและฟีนอลิกที่แตกต่างจากรากจึงทำให้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* (วัชรารมณ์และคณะ, 2557) ที่แตกต่างกัน ดังนั้นส่วนของพืชที่ต่างกันจะมีชนิดและปริมาณองค์ประกอบทางเคมีหรือสารพิษเคมีที่ต่างกัน จึงส่งผลให้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกันอีกด้วย

จากผลการวิจัยที่ผ่านมาควรมีค้นหาฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสัมพันธ์กับข้อมูลจากภูมิปัญญาท้องถิ่นในการใช้ใบและรากของสิบสองราศีในการรักษาโรคซึ่งอาจได้ข้อมูลที่มีความสอดคล้องหรืออาจได้ข้อมูลใหม่ que แสดงถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบและรากของสิบสองราศี นอกจากนี้ยังควรมีการแยกสารให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ชนิดของสารที่อยู่ในกลุ่มสารพิษเคมีเบื้องต้นที่พบว่าเป็นองค์ประกอบทางเคมีจากสิบสองราศี เนื่องจากยังมีข้อมูลและงานวิจัยเกี่ยวกับพืชสิบสองราศีค่อนข้างน้อยมากในปัจจุบัน

สรุปผลการวิจัย

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (H_2N_2) ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มชนิดที่ปาก ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ของสารสกัดจากรากสดสิบสองราศีพบว่าสารสกัดเอทานอลของรากสิบสองราศีที่ความเข้มข้น 50.0 $\mu\text{g/ml}$ แสดงฤทธิ์ต้านวัณโรคที่ 116.28% แต่ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (H_2N_2) ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มชนิดที่ปาก ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ และสารสกัดเอทานอลของรากสิบสองราศีไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (Vero cell) และการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นด้วยปฏิกิริยาเคมี พบว่า สารสกัดจากรากสดสิบสองราศีมีสเตียรอยด์ ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบซึ่งนับว่าเป็นกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสอดคล้องกับภูมิปัญญาท้องถิ่น อย่างสารกลุ่มแอลคาลอยด์มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านแบคทีเรีย ส่วนสารกลุ่มฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านมะเร็งและต้านจุลชีพได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรีที่สนับสนุน เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กัญญา ตีวพิเศษ. (2542). ผักพื้นบ้านภาคใต้. กรุงเทพมหานคร:สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
- กี กุหลาบ. (2550). ผู้ใช้สิบสองราศี. ตำบลบางครก อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี. สัมภาษณ์ 5 กุมภาพันธ์ 2550.
- ตรีบุปผา มิ่งเมือง ดำรงค์ พงศ์พุทธชาติและบุษกร อู่ยวงษ์. (2551). ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบสิบสองราศี. ในการประชุมนำเสนอผลการวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรีครั้งที่ 1. เพชรบุรี: มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.
- บุษราคัม ททรัพย์อุดมผลและปรีชา ภูวไพโรศิรสา. (2551). องค์ประกอบทางเคมีจากผักลิ้นห่าน. ในการประชุมนำเสนอผลการวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรีครั้งที่ 1. เพชรบุรี: มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.
- พิสมัย เหล่าภัทรเกษม. (2548). บทบาทของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการป้องกันและรักษา มะเร็ง. ศรีนครินทร์เวชสาร, 20(3), 180-189.
- รัตนา อินทรานุกุล. (2547). การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วัชรารณ ประภาสะโนบล. (2556). ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ต้านการอักเสบและต้านมะเร็งจากใบสิบสองราศี. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ ราชภัฏสุราษฎร์ธานี ครั้งที่ 9. สุราษฎร์ธานี: มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี
- วัชรารณ ประภาสะโนบลและสุนันทา แก้วสระแสน. (2555). ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบสิบสองราศี. วารสารวิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี, 9 (1), 12-19.
- วัชรารณ ประภาสะโนบล สุริยา น้อยสุวรรณ วารุณี นาคสงค์และชรินทร์ ศรีธาผล. (2557). ฤทธิ์ทางชีวภาพและการตรวจสอบพิษเคมีเบื้องต้นจากใบสิบสองราศี. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์ศึกษาเพื่อสร้างแรงบันดาลใจสู่นวัตกรรมครั้งที่ 1. เพชรบุรี: มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.
- สินธพ โฉมยา, ขวลิต สิทธิสมบัติ, วันดี ญาณไพศาล, นุชนาฏ กิจเจริญ, อุทัย โสณะพันธุ์และเพ็ญพรรณ เวชวิทยาขลัง. (2552). [อินเทอร์เน็ต]. นครปฐม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร; [ปรับปรุงเมื่อ 2552; เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 ตุลาคม 2555]. การตรวจสอบเบื้องต้นทางพิษเคมี. เข้าถึงได้จาก: <http://pg.pharm.su.ac.th/course/pcoglab1/screen/method/method.htm>
- อรุณ จันทรคำและกาญจนา วงศ์กระจ่าง. (2560). สารสกัดสมุนไพรไทยต่อการต้านมะเร็งและต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์, 9(9), 112-122.

- Arun, A.B., Beena, K.R., Raviraja, N.S., & Sridhar, K.R. (2010). Coastal sand dunes neglected ecosystem. [Internet]. Oct [cited 2015 Aug 14]. Available from: <http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles9.htm>
- Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W.C.A., & Manley, M. (2002). Phenolic compounds: A review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 23(2), 48-61.
- Bousselessela, H., Yahia, M., Mahboubi, A., Benbia, S., & Massinissa, Y. (2013). Antioxidant and antibacterial activity of alkaloids and terpenes extracts from *Euphorbia granulate*, *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 7(3).
- Brien, J.O., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267: 5421-5426.
- Changsen, C., Franzblan, S., & Palittapongarnpim, P. (2003). Improved green fluorescent protein reporter gene-based microplate screening for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter. *Antimicrob. Agents Chemother*; 47, 3682-3687.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E., & Rahmat, A. (2010). Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 15, 4324-4333.
- Harborne, J.B. (1998). *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 3rd ed. London: Chapman & Hall, 182-190.
- Hunt, L., Jordan, M., De, J.M., & Wurm, F.M. (1999). GFP-expressing mammalian cells for fast, sensitive, noninvasive cell growth assessment in a kinetic mode. *Biotechnol and Bioeng*, 65, 201-205.
- Hurt, A.C., Okomo-Adhiambo, M., & Gubareva, L.V. (2012). The fluorescence neuraminidase inhibition assay: a functional method for detection of influenza virus resistance to the neuraminidase inhibitors. *Methods Mol Biol*, 865, 115-25.
- Ozcelik, B., Orhan, D.D., Ozgen, D., & Ergun, F. (2008). Antimicrobial activity of flavonoids against extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(4), 1151-1157.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Product*, 63, 1035-1042.
- Pourmorad, F., Hosseini Mehr, S.J., & Shahabimajid, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142-1145.

- Pullaiah, T. (2006). Encyclopedia of world medicinal plants, 1,1217.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., & Zhang, L. (2003). Flavonoids: promising anticancer agents, *Medicinal Research Reviews*, 23(4), 519-534.
- Sarker, S.D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 321-324.
- Sharma, G.N., Dubey, S.K., Sati, N., & Sanadya, J. (2011). Anti-inflammatory activity and total flavonoid content of *Aeglemarmelos* seeds. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 3(3), 214-218.
- Souto, A.L., Tavares, J.F., Silva, M.S., Diniz, M.F.F.M., Athayde-Filho, P.F., & Filho, J.M.B. (2010). Anti-inflammatory activity of alkaloids: An update from 2000 to 2010, *Molecules*, 16, 8515-8534.
- Tanaka, M., Kodaira, H., Nishiyama, Y., Sata, T., & Kawaguchi, Y. (2004). Construction of recombinant herpes simplex virus type I expressing green fluorescent protein without loss of any viral genes, 6(5), 485-93.
- Tiong, S.H., Looi, C.Y., Hazni, H., Arya, A., Paydar, M., Wong, W.F., Cheah, S.C., Mustafa, M.R., & Awang, K. (2013). Antidiabetic and antioxidant properties of alkaloids from *Catharan thusroseus*(L.) G. Don, *Molecules*, 18, 9770-9784.
- Yusriya, S., Harisha, C.R., Shukla, V.J., & Acharya, R.N. (2011). A pharmacognostical and pharmacological evaluation of a folklore medicinal plant “Kulhafa” *Launaea sarmentosa* (Willd) Schultz Bip.exKuntze). MD (Ayu) Dissertation, IPGT and RA, Gujarat Ayurved University, Jamnagar.
- Yusriya, S., Harisha, C.R., Shukla, V.J., & Acharya, R.N. (2013). Pharmacognostical evaluation of *Launaea sarmentosa* (Willd.) schultz Bip.exKuntze root. An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda[Internet]. Nov [cited 2015 Oct 14]. Available from: <http://www.ayujournal.org>