ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี

Biological Activity of Crude Extract from *Barleria strigosa*

ณัฐพร มานะประดิษฐ์[1]*, **สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม**[1] **และ พัชนี เจริญยิ่ง**[2]
Nuttaporn Manapradit[1]*, Supattra Poeaim[1] and Patchanee Charoenying[2]
[1]สาขาวิชาชีววิทยา; [2]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1]Department of Biology; [2]Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520
**Corresponding author: cool_coo24@hotmail.com*

บทคัดย่อ

ตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีในชั้นเมทานอล โดยทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ในเซลล์ไลน์ (cell line) จำนวน 5 ชนิด (P388, HT-29, MCF-7, HepG-2 และ Vero) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดระหว่าง 250-4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT colorimetric assay พบว่าสารสกัดหยาบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (50% cytotoxicity concentration : CC_{50}) เท่ากับ 413.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิดอื่นในระดับต่ำ เมื่อศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์ในเซลล์ไลน์ P388 ที่มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 59-61 โครโมโซม พบว่าค่าดัชนีการแบ่งเซลล์ (mitotic index : MI) ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 50 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า MI เท่ากับ 66.49 และ 57.73% ตามลำดับ และเมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) ต่อแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa*) ที่ระดับความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ดีที่สุด

ABSTRACT

Crude methanol extract of *Barleria strigosa* leave was screened for their biological activities. Cytotoxicity of the crude methanol extract was analyzed using an MTT colorimetric assay in five different cell lines (P388, HT-29, MCF-7, HepG-2 and Vero) at concentrations ranging from 250 to 4000 µg/ml. The results found the extract are highly toxic against to murine leukemia cell line (P388). The 50% cytotoxicity concentration (CC_{50}) of the extract for 24 hours was 413.89 µg/ml. For preliminary study of the genotoxic potential, P388 cell line had a chromosome number range from 59 to 61 chromosomes per metaphase. The mitotic index (MI) is used for genotoxic potential in P388. The mitotic index decreases compared with the control have 66.49 and 57.73% at 50 and 200 µg/ml concentrations, respectively. The obtained extracts were tested for their antimicrobial activity against three bacterial strains (*Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) at 62.5, 125, 250, 500 and 1000 mg/ml using paper disc diffusion method. The results indicated that crude methanolic extract exhibited strong antimicrobial activity against *Bacillus subtilis.*

คำสำคัญ: ความเป็นพิษต่อเซลล์, การยับยั้งจุลินทรีย์, ดัชนีการแบ่งตัว, สังกรณี
Keywords: cytotoxicity, antimicrobial, mitotic index, *Barleria strigosa*

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายของทรัพยากรทางชีวภาพ และมีการใช้ยาสมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆมาเป็นเวลานาน แต่ความนิยมในการใช้ได้ลดลงอย่างมากในช่วงอุตสาหกรรมผลิตยาเคมีสังเคราะห์แผนปัจจุบันได้เจริญอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งผู้บริโภคได้ตระหนักถึงอันตรายจากผลข้างเคียง ทำให้สมุนไพรเป็นที่สนใจและมีความสำคัญอีกครั้ง พืชวงศ์ Acanthaceae ถูกนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพรและหาสารที่สำคัญ เช่น รางจืด ฟ้าทะลายโจร และทองพันชั่ง เป็นต้น ซึ่งสกุล *Barleria* อยู่ในวงศ์นี้เช่นกัน และมีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เสลดพังพอน (*B. lupulina*) มีฤทธิ์ในการลดน้ำตาล และมีความสามารถในการต้านอาการอักเสบ (Suba *et al*., 2004) อังกาบหนู (*B. prionitis*) ทำให้เกิดความเป็นหมันในหนูหรือนำมาใช้เป็นสารคุมกำเนิด (Verma *et al*., 2005) และสารสกัดเอทานอลจากเมล็ดของอังกาบ (*B. cristata*) มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของหนู (Singh *et al*., 2012) รวมทั้งแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก *B. prionitis*, *B. greenii* และ *B. albostellata* (Amoo *et al*. 2009) และสารสกัดจากใบและแคลลัสของ *B. prionitis* (Shukla *et al*., 2011) แต่ยังไม่พบการรายงานด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง การแบ่งเซลล์ และการตายของเซลล์ของพืชสกุล *Barleria* โดยเฉพาะสังกรณี (*Barleria strigosa* Willd.)

เพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ทั้งในรูปสมุนไพร และการหาสารที่สำคัญต่อไป วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณี ทั้งความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์ไลน์จำนวน 5 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนู (P388) เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งตับ (HepG-2) และเซลล์ไตลิงแอฟริกันปกติ (Vero) ด้วยวิธี MTT colorimetric assay ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ด้วยวิธี paper disc diffusion รวมทั้งผลต่อการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากค่าดัชนีการแบ่งเซลล์ (mitotic index) ในเซลล์ไลน์ P388 ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **การเตรียมสารสกัด**

นำใบสังกรณีสดมาล้างและอบแห้งที่อุณหภูมิ 45ºC จนน้ำหนักคงที่ บดให้เป็นผงก่อนห่อด้วยผ้าขาวบาง สกัดสารด้วยวิธีการสกัดแบบการหมัก (maceration) ในตัวทำละลายเมทานอล ในสภาวะเขย่า โดยเปลี่ยนตัวทำละลายใหม่ทุก 7 วัน จนครบ 3 ครั้ง กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำไปทำการระเหยด้วยเครื่อง evaporator

2. **การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี** MTT colorimetric assay

เลี้ยงเซลล์ไลน์ (P388, HT-29, HepG-2, MCF-7 และ Vero) ในอาหาร RPMI-1640 ที่มี Fetal Bovine Serum (FBS) 8% ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37ºC ที่มี CO_2 5% ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการทดสอบระยะสั้นกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในภาชนะนอกร่างกาย (*in vitro*) ด้วยวิธี MTT colorimetric assay ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Mosmann (1993) โดยปลูกเซลล์ใน 96-well plates ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น ดังนี้ P388 ($8x10^4$ cell/ml), MCF-7 ($1x10^5$ cell/ml), HT-29, HepG-2 และ Vero ($1.5x10^5$ cell/ml) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37ºC ที่มี CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยอดสารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 250, 500, 1000, 2000 และ 4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น positive control และใช้ DMSO 1% เป็น negative control ก่อนครบเวลา 4 ชั่วโมงทำการเติมสาร MTT ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มต่อจนครบเวลา และละลายผลึกฟอร์มาซานด้วย DMSO: methanol (1: 1) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

3. **การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อดัชนีการแบ่งเซลล์** (mitotic index)

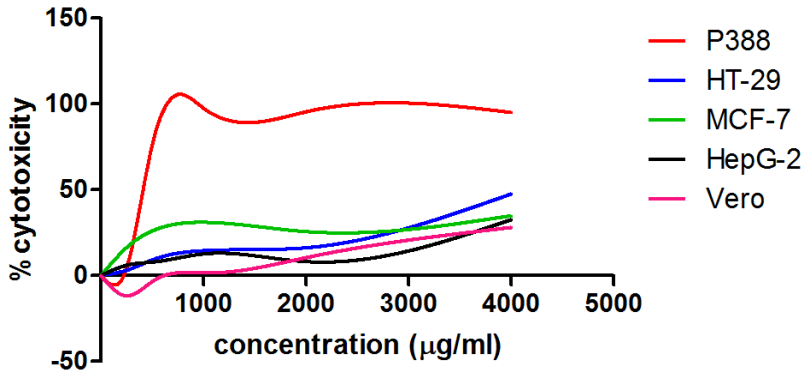
เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ P388 ในอาหาร RPMI-1640 ที่มี FBS 8% ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ที่มี CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 50 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง ก่อนครบเวลาทำการเติมสาร colcemid ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อครบเวลานำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก และทำให้เซลล์บวม (hypotonic treatment) โดยสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 0.075 M และตรึงเซลล์ เตรียมสไลด์และย้อมสีโครโมโซมด้วยสี giemsa นับจำนวนโครโมโซมและศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์ ซึ่งได้จากการสุ่ม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากจำนวนเซลล์เมทาเฟส 2000 เซลล์ ของกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

4. **การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี** paper disc diffusion

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis* ATCC6633, *S. aureus* ATCC25923 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 ในอาหาร Muller Hinton Broth (MHB) ให้มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland No. 05 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ตามวิธีของ Ansari *et al.* (2005) โดย swap เชื้อลงบนอาหาร Muller Hinton Agar (MHA) ละลายสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดสารสกัดลงในแผ่น paper disc แล้ววางลงบนอาหารที่ swab เชื้อแล้ว ใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมทานอลเป็น positive และ negative control ตามลำดับ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (clear zone) มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ไลน์ 5 ชนิด (P388, HT-29, HepG-2, MCF-7 และ Vero) ด้วยวิธี MTT พบว่าเมื่อบ่มสารร่วมเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดหยาบจากใบสังกรณีมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนู มากที่สุด โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 413.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่แสดงความเป็นพิษในระดับต่ำต่อเซลล์ HT-29, HepG-2, MCF-7 และ Vero ดังแสดงค่า CC_{50} ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีในชั้นเมทานอลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 5 ชนิดในรูปที่ 1 ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองจากต้นสังกรณี แต่ Suba *et al.* (2004) ที่ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ *B. lupulina* ต่อการลดน้ำตาลในหนู โดยให้หนูกินสารสกัดหยาบและฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้หนูตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) เท่ากับ 4.5 และ 3.7 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ



รูปที่ 1 ค่า CC_{50} ของสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีในชั้นเมทานอลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 5 ชนิด

ก่อนการศึกษาถึงผลต่อสารสกัดต่ออัตราการแบ่งเซลล์ ได้ศึกษาจำนวนโครโมโซมของเซลล์ไลน์ P388 พบว่าเซลล์ไลน์ P388 มีจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่เท่ากับ 59-61 โครโมโซมต่อหนึ่งเมทาเฟส ซึ่ง *Mus musculus* (mouse) มีจำนวนโครโมโซม 2n=40 และเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่ออัตราการแบ่งเซลล์จากดัชนีการแบ่งเซลล์ (mitotic index ; MI) ในเซลล์ไลน์ P388 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 50 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ไลน์ P388 มีดัชนีการแบ่งเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยค่า mitotic index ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 50 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 66.49 และ 57.73% ตามลำดับ และการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC6633 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 1000 และ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีขนาดของ clear zone เท่ากับ 29 และ 26.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเชื้อ *S. aureus* ATCC25923 ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีขนาดของ clear zone เท่ากับ 14 มิลลิเมตร แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC27853 สอดคล้องกับ Amoo และคณะ (2009) ศึกษาสารสกัดจากส่วนต่างๆของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 3 สปีชีส์ คือ *B. prionitis*, *B. greenii* และ *B. albostellata* พบว่ามีความสามารถในการเป็นยับยั้งแบคทีเรียโดยมีค่า minimum inhibitory concentrations (MIC) ระหว่าง 0.059-6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านการอักเสบ ซึ่งสอดคล้องกับพืชสกุล *Barleria* คือ *B. lupulina* และ *B. cristata* ที่มีองค์ประกอบทางเคมีชนิด iridoid glucoside ที่มีความสามารถในการต้านไวรัสชนิด herpes simplex virus type 2 (HSV-2) และต้านการอักเสบได้

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล พบว่าแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 413.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสของเซลล์ไลน์ P388 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดหยาบ 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าใบสังกรณีมีสารที่สำคัญและมีฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงเป็นแนวทางในการศึกษาหาสารที่สำคัญต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง งบประมาณประจำปี 2556 และขอขอบคุณสวนพฤกษศาสตร์ภาคตะวันออก (เขาหินซ้อน) จังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบสังกรณี

เอกสารอ้างอิง

Amoo, S.O., Finnie, J.F. and Van Staden, J. 2009. *In vitro* pharmacological evaluation of three *Barleria* species. J. Ethnopharmacol. 121: 274-277.

Ansari, M.A., Tirry L. and Moens, M. 2005. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbions of entomopathogenic nematodes. Biol. Control 50: 465-475.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Method 65:55-63.

Shukla, P., Singh, A., Gawri, S., Alexande, A. and Sonwane, S. 2011. *In vitro* propagation of *Barleria prionitis* Linn and its antibacterial activity. Int. J. Pharma Prof. Res. 2: 198-200.

Singh, R., Rajasree, P.H. and Sankar, C. 2012. Screening for anti-diabetic activity of the ethanolic extract of *Barleria cristata* seeds. Int. J. of Pharm. Life Sci. 3: 2044-2047.

Suba, V., Murugesan, T., Arunachalam, G., Mandal, S.C. and Saha, B.P. 2004. Anti-diabetic potential of *Barleria lupulina* extract in rats. Phytomedicine. 11: 202-205.

Verma, P.K., Sharma, A., Joshi, S.C., Gupta, R.S. and Dixit, V.P. 2005. Effect of isolated fractions of *Barleria prionitis* root methanolic extract on reproductive function of male rats: preliminary study. Fitoterapia. 76: 428–432.