ชื่อโครงการวิจัย (ไทย) การบ่งชี้สายพันธุ์ของพืชในสกุลอังกาบ (*Barleria* sp.) โดยเทคนิคทางโมเลกุล และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ (*Barleria cristata* L.)

(ภาษาอังกฤษ) The Delimitation of *Barleria* based on Molecular Technique and Cytotoxicity of Crude Extracts from *Barleria cristata* L.

แหล่งเงิน เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555 จำนวนเงิน 320,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2554 - 30 กันยายน 2555

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
E-mail: poeaim@hotmail.com

ชื่อ-สกุล ผู้ร่วมโครงการ นายวินัย สมประสงค์
กลุ่มวิจัยเพื่อการคุ้มครองพันธุ์พืช
กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร
E-mail: winny_utd@hotmail.com

คำสำคัญ: พืชสกุล *Barleria,* อังกาบ, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, สารสกัดหยาบ, ความเป็นพิษต่อเซลล์, เทคนิค MTT

Keywords: *Barleria* sp., *Barleria cristata* L., genetic diversity, crude extract, cytotoxicity, MTT assay

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของพืชในสกุล *Barleria* ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ (*Barleria cristata* Linn.) โดยศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 18 ตัวอย่าง และพืชนอกสกุล *Barleria* จำนวน 2 ตัวอย่าง คือทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสบริเวณ *trn*L-*trn*F ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ พบชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 930-967 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลาย สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 6 กลุ่ม ตามสปีชีส์ได้อย่างชัดเจน คือ เสลดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina*) อังกาบหนู (*Barleria prionitis*) สังกรณี (*Barleria*

strigosa) อังกาบ (*Barleria cristata*) และหญ้าหัวนาค (*Barleria strigosa var. polytricha*) ที่แยกออกไปจากชนิดอื่นๆ อย่างชัดเจน และระงับพิษ (*Barleria siamensis*) ที่แสดงความใกล้ชิดกับพืชนอกสกุล และเมื่อศึกษาความหลากหลายของพืชสกุล *Barleria* จำนวน 15 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (Randomly Amplified Polymorphic DNA: RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 74 ชนิด มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม พบว่าไพรเมอร์จำนวน 23 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชัดเจน 10 ชนิด มาวิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Jaccard มีค่าระหว่าง 0.14-0.70 และเมื่อสร้างเดนโดรแกรมโดยวิธี UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ 3 กลุ่มใหญ่ โดยสังกรณี (*B. strigosa*) และอังกาบ (*B. cristata*) แสดงความใกล้ชิดกัน จึงควรมีการทบทวนเรื่องการจัดจำแนกของพืชสกุล *Barleria* นี้ต่อไป

ในการทดลองเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ (*B. cristata*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบที่ได้มาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 6 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF7 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT29 เซลล์มะเร็งช่องปากของมนุษย์ชนิด KB เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 และเซลล์ไตลิงชนิด Vero cell ที่ระดับความเข้มข้น 0-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในหลอดทดลองด้วยวิธี Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) พบว่าสารสกัดหยาบแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด และเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด P388 ซึ่งเป็นเซลล์ประเภท Lymphocyte มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์เป็นพิษ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50}) ในเซลล์ P388, MCF7, HT29 และ KB เท่ากับ 1447.52, 866.36, 1907.56 และ 1236.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์เฉพาะเซลล์ P388 โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 966.22 และ 1742.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion ต่อเชื้อแกรมบวก 3 ชนิด (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341) และแกรมลบ 2 ชนิด (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* ATCC 25922) ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเฉพาะสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีฤทธิ์ในการยับยั้งต่อ *S. aureus* และ *E. coli* ในระดับต่ำ โดยสารที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่จากสารสกัดหยาบที่วิเคราะห์โดย GC-MS คือ 9,12,15-Octadecatrien-1-ol

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the phylogenetic relationships and genetics diversity of *Barleria* sp., and biological activities of crude extracts from *Barleria cristata* Linn. were investigated. For phylogenetic relationships and genetics diversity by molecular techniques, the *trn*L-*trn*F region sequences of chloroplast DNA were amplified from 18 samples of *Barleria* sp. and 2 samples (*Rhinacanthus nasutus* and *Andrographis paniculata*) for outgroup. The size of amplified products is 930-967 base pairs. Phylogenetic tree analysis of those sequences can be generated into 6 main groups that can divide each species of *Barleria*: *Barleria lupulina, B. prionitis, B. strigosa, B. cristata, B. strigosa var. polytricha* and *B. siamensis*. Nevertheless, *B. siamensis* was separated into group which containing *R. nasutus*. Furthermore, *B. strigosa var. polytricha* is clearly separated from other species. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to study genetic relationship among 15 samples of *Barleria* sp. Seventy-four random primers were screened and 23 primers are able to amplify DNA fragments. Ten primers which gave clear RAPD banding pattern were selected and analyzed all species. The value of Jaccard similarity coefficient ranged from 0.14-0.70. A dendrogram constructed by UPGMA clustering method was revealed three major clusters. The highest genetic similarity was found between *B. strigosa* and *B. cristata*. For this reason, species revision should be planned.

To determine the cytotoxic and antimicrobial activity, the leaves of *B. cristata* were sequentially extracted with three organic solvents (hexane, ethyl acetate and ethanol). Crude extracts were investigated for their cytotoxic activity against for six cell lines: murine lymphocytic (P388), human breast cancer (MCF7), human colon adenocarcinoma (HT29), human hepatoma (HepG2), human mouth epidermal adenocarcinoma (KB) and African green monkey kidney (Vero cell) in culture using the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The cell lines were exposed to crude extracts (0 - 2000 µg/ml) for 24 hours. The crude extracts from leaves of *B. cristata* were exhibited the low cytotoxic effect on cell lines. The hexane extract was exhibited the most effective cytotoxic activity and the most potent cytotoxic activity against P388 cell line. The crude hexane was toxic to P388, MCF7, HT29 and KB cell line with 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) at 1447.52, 866.36, 1907.56 and 1236.75 µg/ml., respectively. The crude ethyl acetate and ethanol extracts were toxic to P388 cell line with CC_{50} at 966.22 and 1742.23 µg/ml., respectively. For antimicrobial test, paper disc diffusion method was tested against three gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341) and two gram negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* ATCC 25922) at concentrations of 25, 50 and 100 mg/ml for 24 hours. The crude hexane extract from *B. cristata* showed antimicrobial

activity against *S. aureus* and *E. coli*. The mostly chemical constituents from crude extracts that analyzed by GC-MS were 9,12,15-Octadecatrien-1-ol.