# การสำรวจฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากหญ้าทะเล และสาหร่ายทะเลที่เก็บจากอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี และชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย

# Screening bioactivities of sea grasses' extracts and algal extracts collected from Khun Krabaen Bay, Chantaburi and Bangsaen Beach, Chonburi, Thailand

จงกลณี จงอร่ามเรือง*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

Jongkolnee Jongaramruong*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Bangsaen, Chonburi 20131, Thailand

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้รายงานตัวอย่างทั้งหมด 16 ตัวอย่าง จาก 15 สปีชีส์ซึ่งเป็นสาหร่ายทะเลและหญ้าทะเลที่เก็บได้จากอ่าวคุ้งกระเบน 13 ตัวอย่าง และเก็บได้จากทะเลบางแสน 3 ตัวอย่าง ผลการทดสอบสารสกัดตัวอย่างทั้งหมดด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ปาก ฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ปาก เต้านม และเซลล์ปอด ฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ตลอดจนฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบว่าสารสกัดตัวอย่างที่แสดงฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคเริมที่ปาก และฤทธิ์ต้านวัณโรค มีจำนวนถึง 14 ตัวอย่าง แต่ไม่มีสารสกัดตัวอย่างใด ที่แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบ ทั้งนี้สารสกัดของสาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota* sp. แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้งสามชนิดดีที่สุด คือมะเร็งปาก ($IC_{50}$ 2.17 µg/mL) มะเร็งเต้านม ($IC_{50}$ 2.27 µg/mL) และมะเร็งปอด ($IC_{50}$ 1.90 µg/mL) นอกจากนี้สาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum* sp. ยังแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดค่อนข้างดีที่ค่า $IC_{50}$ 4.18 µg/mL ส่วนสาหร่ายสีแดง *Acanthophora spicifera* ที่เก็บจากอ่าวคุ้งกระเบนยังแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งแตกต่างจากที่เก็บจากบางแสนด้วย

**คำสำคัญ :** ฤทธิ์ต้านไวรัส ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านยีสต์ ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ฤทธิ์ต้านวัณโรค

## Abstract

A total of fifteen species from sixteen samples of algae and sea grasses were collected from Kung Krabaen Bay and Bangsaen Beach in Thailand. Extracts of thirteen samples from Kung Krabaen Bay and three samples from Bangsaen Beach were screened for cytotoxicity against Vero cells, anti-*Herpes simplex* virus type 1 (HSV-1), anti-cancer (KB, BC and NCI-H187), anti-fungal *Candida albicans*, anti-tuberculosis (TB), anti-malarial *Plasmodium falciparum* K1 strain and anti-inflammatory activities. A total of fourteen extracts showed anti-HSV-1 and anti-TB activities, however, none of them was active in the anti-inflammatory assay. The brown alga *Dictyota* sp. displayed strong anti-KB, anti-BC and anti-NCI-H187 activities ($IC_{50}$ 2.17, 2.27 and 1.90 µg/mL, respectively). Moreover, *Sargassum* sp. was also strongly active against NCI-H187 at $IC_{50}$ 4.18 µg/mL. *Acanthophora spicifera* from Kung Krabaen Bay but not from Bangsaen showed differentiated anti-cancer activity.

**Keywords :** anti-virus, anti-cancer, anti-fungal, anti-malarial, anti-tuberculosis

* **Corresponding author.** E-mail: jongkoln@buu.ac.th

## บทนำ

ปัจจุบันเภสัชกรและนักเคมีได้ร่วมมือกันค้นคว้าหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทะเลมากขึ้นทุก ๆ วัน เพื่อหายาชนิดใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นจากแต่เดิมที่จำกัดวงแคบอยู่เฉพาะพืชบกเท่านั้น สาหร่ายทะเลและหญ้าทะเลจึงได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถและศักยภาพในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีประโยชน์หลากหลาย โดยเฉพาะด้านการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (del Val *et al.*, 2001) ตัวอย่างเช่น ฮาโลมอน (halomon) เป็นสารประกอบมอนอเทอร์พีนชนิดวงเปิดที่มีฮาโลเจน 5 ตัวเป็นองค์ประกอบ (pentahalogenated acyclic monoterpene) ที่แยกได้จากสาหร่าย *Portieria hornemannii* แสดงฤทธิ์ยับยั้งเนื้องอกชนิดต่าง ๆ และได้รับการคัดเลือกเข้าสู่การพัฒนายาในขั้นพรีคลินิก ก่อนที่จะนำไปใช้ต่อไป หากได้ผลดีต่อมนุษย์ (Fuller *et al.*, 1992) สปาเทนส์ (spatanes) แยกได้จากสาหร่าย *Stoechospermum marginatum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (de Silva *et al.*, 1982) ในขณะที่สารประกอบไดเทอร์พีน (diterpene) ที่แยกได้จาก *Dilophus okamurai* ทำให้ไม่เกิดการเข้าอยู่อาศัยของตัวอ่อนหอยเปาฮื้อในบริเวณนั้น (Kurata *et al.*, 1988) สารประกอบอัลคาลอยด์ประเภทอินดอล (indole alkaloids) ที่แยกได้จาก *Chondria atropurpurea* ออกฤทธิ์รักษาพยาธิลำไส้ได้ (Davyt *et al.*, 1998) สารประกอบมอนอเทอร์พีนชนิดวงเปิดที่มีฮาโลเจน (halogenated acyclic monoterpenes) ที่แยกได้จาก *Plocamium cartilagineum* แสดงฤทธิ์เป็นยาปฏิชีวนะต้านเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* (Rovirosa *et al.*, 1990). นอกจากนี้สาหร่ายสีแดง *Plocamium telfairiae* ยังผลิตสารประกอบมอนอเทอร์พีนชนิดวงปิดซึ่งมีฮาโลเจน (halogenated cyclic monoterpenes) ที่แสดงฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลง ต้านตัวอ่อนของยุงอีกด้วย (Watanabe *et al.*, 1990).

ในประเทศไทยมีการใช้สาหร่ายเป็นอาหาร และยาพื้นบ้านกันมานานแล้ว (สรวิศ 2543) ตัวอย่างเช่นสาหร่ายในกลุ่ม *Caulerpa* spp. ชาวบ้านจังหวัดตรังใช้รับประทานสดหรือลวกจิ้มน้ำพริก อย่างไรก็ตามผู้ที่รับประทานสาหร่ายนี้บางครั้งอาจได้รับสารพิษ caulerpin และ caulerpicin ที่ทำให้เกิดอาการชาที่ปลายลิ้น ชาตามมือและเท้า หากแพ้มากๆ จะหายใจขัดและเสียการทรงตัว สาหร่ายวุ้นในกลุ่ม *Chaetomorpha* spp. นั้น ชาวบ้านโดยเฉพาะที่เกาะสมุยใช้เคี่ยวทำวุ้น ไม่ใช้รับประทานสด เพราะจะทำให้คันคอ นอกจากนี้สาหร่ายที่นำมาใช้เป็นอาหารกลุ่มอื่น ๆ อีกได้แก่ *Gracilaria, Hypnea, Laurencia, Padina* และ *Turbinaria* สาหร่ายกลุ่ม *Padina* spp. เช่น สาหร่ายเห็ดหิน เห็ดหูหนูทะเล ใช้รับประทานสดเป็นผักจิ้ม แต่ต้องล้างให้สะอาดก่อนเพราะอาจมีไข่ปลา หรือสัตว์น้ำบางชนิดที่เป็นพิษเกาะอยู่ อาจทำให้ท้องเสียได้ สาหร่ายสีแดงในกลุ่ม *Laurencia* spp. ใช้รับประทานสดเป็นผักจิ้ม หรือยำแบบสาหร่ายวุ้น หรือนำไปทำยาแก้คอพอก สาหร่ายสีแดงในกลุ่ม *Sargassum* spp. นั้นชาวบ้านใช้ส่วนยอดมารับประทานสด หรือลวกจิ้มน้ำพริก นำมายำ หรือนำทั้งต้นมาแกงส้ม หรือแกงเหลืองได้ และยังนำมาตากแห้ง แล้วใช้ต้มน้ำรับประทาน แก้ร้อนใน หรือแก้ไข้ มีขายตามร้านขายยาจีนบางแห่ง

จนถึงปัจจุบันนี้ มีงานวิจัยที่ลงตีพิมพ์เกี่ยวกับสารประกอบที่ผลิตมาจากสิ่งมีชีวิตทางทะเลในประเทศไทยยังไม่มากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาทางด้านการแยกสารประกอบจากสาหร่ายทะเล และหญ้าทะเลในในประเทศไทยยังค่อนข้างจำกัด ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เน้นการเก็บตัวอย่างที่อ่าวคุ้งกระเบนเป็นหลัก ซึ่งบริเวณนี้จัดเป็นป่าชายเลนที่มีต้นโกงกางอยู่เป็นจำนวนมาก ระบบนิเวศน์ของอ่าวคุ้งกระเบนจึงเป็นจุดเด่นที่น่าสนใจ ที่มีพืชทะเลจำนวนมากที่ยังไม่มีรายงานการสำรวจและวิจัยทางด้านสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อน การศึกษานี้จึงมุ่งสำรวจการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชตัวอย่างทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวแทนของตัวอย่าง 15 สปีชีส์ เพื่อที่จะได้แยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจต่อไป

## ระเบียบวิธีวิจัย

### การเก็บตัวอย่างและการเตรียมสารสกัด

ตัวอย่างทั้งหมด 16 ตัวอย่าง เก็บจากอ่าวคุ้งกระเบนและหาดบางแสน ประเทศไทย จัดเป็นตัวแทนของตัวอย่าง 15 สปีชีส์ของสาหร่ายทะเล และหญ้าทะเล โดยระบุหมายเลขตัวอย่าง ดังตารางที่ 1 และเก็บรักษาตัวอย่าง (Voucher herbarium specimens) ไว้ที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ตัวอย่างจะถูกแช่เย็นไว้ทันที ที่เก็บตัวอย่างสดขึ้นจากทะเลโดยวิธีดำน้ำ หรือเก็บตัวอย่างสดตอนน้ำทะเลลง จนกว่าจะนำมาสกัด นำตัวอย่างแช่แข็งมาเติมเมทานอลจนท่วมตัวอย่าง เทของเหลวที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอลรวมไว้ นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน

**ตารางที่ 1** รายละเอียดการเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษา

| ลำดับ | ประเภทของสิ่งมีชีวิตและชื่อ | สถานที่ | วิธีเก็บ | วันที่/เดือน/ปี |
|---|---|---|---|---|
| | สาหร่ายสีแดง | | | |
| 1 | *Acanthophora spicifera* (Vahl) Børgesen | A[a] | IT[d] | 01/10/2546 |
| 2 | *Acanthophora spicifera* (Vahl) Børgesen | B[b] | SW[e] | 01/11/2546 |
| 3 | *Gracilaria rubra* C.F. Chang et B.M. Xia | A | IT | 01/10/2546 |
| 4 | *Gracilaria* sp. | B | SW | 01/11/2546 |
| 5 | *Hypnea* sp. | B | SW | 01/11/2546 |
| 6 | *Laurencia* sp. | B | SW | 01/11/2546 |
| 7 | *Solieria* sp. | B | SW | 13/06/2546 |
| | สาหร่ายสีเขียว | | | |
| 8 | *Acetabularia* sp. | C[c] | IT | 24/01/2547 |
| 9 | *Caulerpa lentillifera* J. Agardh | B | SW | 01/11/2546 |
| 10 | *Chaetomorpha* sp. | B | SW | 01/11/2546 |
| | สาหร่ายสีน้ำตาล | | | |
| 11 | *Dictyota* sp. | A | IT | 01/10/2546 |
| 12 | *Padina minor* Yamada | C | IT | 24/01/2547 |
| 13 | *Sargassum oligocystum* Montagne | C | Scuba | 28/12/2546 |
| | หญ้าทะเล | | | |
| 14 | *Enhalus acoroides* (Linnaeus f.) Royle | C | Scuba | 02/11/2546 |
| 15 | *Halodule pinifolia* (Miki) den Hartog | B | SW | 01/11/2546 |
| 16 | *Halophila ovalis* (R. Brown) Hooker f. | B | SW | 01/11/2546 |

[a]A: หาดบางแสน; [b]B: บ่อเลี้ยงโครงการพระราชดำริอ่าวคุ้งกระเบน; [c]C: ทะเลอ่าวคุ้งกระเบน; [d]IT: intertidal collection; [e]SW: shallow water collection ด้วยมือ หรือใช้ไม้สวิงยาวช้อนช่วยตัก

ลดความดัน นำส่วนที่เหลือหลังจากระเหยเมทานอลส่วนใหญ่ออกไปแล้ว มาทำการแยกชั้น (partitioned) ต่อโดยใช้กรวยแยกด้วยตัวทำละลายระหว่างไดคลอโรมีเทนและเอทธิลอะซีเตด (1:1) เพื่อแยกชั้นน้ำออก ระเหยแห้งจนได้สารสกัดตัวอย่าง

**การหาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด**

สารสกัดตัวอย่างที่ได้นำมาวิเคราะห์การออกฤทธิ์ต่าง ๆ ตามวิธีการทดสอบโดยย่อ ดังนี้

ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ทดสอบโดยใช้เซลล์จากไตของลิง (Vero monkey kidney cell line, ATCC (American Type Culture Collection) CCL-81) และตรวจวัดปริมาณโปตีนภายในเซลล์ (cellular protein content) เพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ตามวิธีของ Skehan *et al.* (1990) กล่าวโดยย่อคือเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตตามปกติจะถูกเก็บมา แล้วเจือจางลงให้เป็น $10^5$ cells/mL แล้วนำสารสกัดตัวอย่างที่จะทดสอบมาเจือจางลงให้ได้ความเข้มข้น 200 µL ใส่ลงในไมโครไทเทอร์เพลต (microtiter plates) นำเพลตไปอบที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มี $CO_2$ 5% อยู่เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เติมปริมาตรที่แน่นอนของกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้น 50% ลงไป แล้วอบเพลตที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำและเป่าให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำเพลตมาย้อมสี เป็นเวลา 30 นาที ด้วย sulforhodamine B (SRB) 0.05% ที่ละลายใน acetic acid เข้มข้น 1% แล้วล้างเอา SRB ออกด้วย acetic acid เข้มข้น 1% เป่าเพลตให้แห้งด้วยลมหรืออากาศก่อนจุ่มลงใน Tris base เข้มข้น 10 mM อ่านค่า Optical density ของเพลตที่ 510 nm สำหรับสารตัวอย่างที่ให้การออกฤทธิ์ที่ 50 µg/mL ถูกนำมาเจือจาง เพื่อหาค่า $IC_{50}$ การทดลองนี้ใช้ Ellipticine เป็น positive control

ฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคเริมที่ปาก (Anti-*Herpes simplex* virus type 1) ทดสอบโดยใช้ HSV-1 strain ATCC VR 260

ด้วยวิธี colorimetric microtiter plate ซึ่งหาการเจริญเติบโตของ host cell โดยตรวจวัด cellular protein content ตามวิธีของ Skehan *et al.* (1990) วัดการเจริญเติบโตของ host cells, Vero cell line ATCC CCL-81 ที่ติดเชื้อไวรัส และใช้สารสกัดตัวอย่างเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม การทดลองนี้ใช้ Acyclovir และ DMSO เป็น positive และ negative control ตามลำดับ สารสกัดถูกทดสอบที่ความเข้มข้นที่ไม่มีพิษต่อเซลล์ (non-cytotoxic concentrations) หรือที่การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์น้อยกว่า 50% (inhibition of cell growth < 50%) สารสกัดที่สามารถยับยั้งไวรัสได้มากกว่า 50% จะถูกทดสอบต่อ เพื่อหาความเข้มข้นที่ยับยั้งไวรัสได้ถึง 50% ($IC_{50}$)

ฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ปาก (calprotectin-negative oral carcinoma cell line, KB cells) และฤทธิ์ต้านมะเร็งที่เต้านม (Breast cancer cell line, BC cells) หาโดยวัด cellular protein content ตามวิธี ATCC CCL-17 ของ Skehan *et al.* (1990) การทดลองนี้ใช้ Elliptine และ doxorubicin เป็น positive control ส่วน negative control ใช้ DMSO

ฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด (National Cancer Institute human small cell lung carcinoma, NCI-H187 cells) หาโดยใช้วิธี MTT assay ของ Plumb et al. (1989) คือ เจือจางเซลล์ลงให้เหลือเป็น $10^5$ cells/mL แล้วนำสารสกัดตัวอย่างที่จะทดสอบมาเจือจางลงให้ได้ความเข้มข้น 200 µL ใส่ลงในไมโครไทเทอร์เพลต นำเพลตไปอบที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มี $CO_2$ เข้มข้น 5% อยู่เป็นเวลา 5 วัน แล้วเติมสารละลาย 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT) เข้มข้น 2 mg/mL ลงไปในแต่ละหลุม 50 µL หุ้มเพลตด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ แล้วอุ่นเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เซนติฟิวส์ที่ความเร็วรอบ 200 x g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม DMSO 200 µL และสารละลายบัฟเฟอร์ Sorensen glycine 25 µL แล้วอ่านค่า reduced MTT (formazan) ที่ 570 nm การทดลองนี้ใช้ Elliptine และ doxorubicin เป็น positive control ส่วน negative control ใช้ DMSO

ฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ *Candida albicans* (Anti-fungal activity) ตามวิธีของ Scudiero *et al.* (1988) เลี้ยงเชื้อยีสต์บนเพลต (potato dextrose agar, PDA) ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน แล้ว single colonies ของเชลล์ *C. albicans* (3 ใน 5) ที่แขวนลอยอยู่ในตัวกลาง RPMI 1640 ถูกเลี้ยงในขวดเขย่าจนกระทั่งมีความหนาแน่นของเซลล์ถึง $2x10^6$ CFU/mL นำสารแขวนลอยนี้มา 100 µL เติมลงไปในแต่ละหลุมของเพลต พร้อมกับเติมสารสกัดตัวอย่าง 100 µL อบเพลตที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย MTT เข้มข้น 0.5 mg/mL ปริมาตร 50 µL ใน RPMI 1640 ลงไปในแต่ละหลุม แล้วอุ่นที่ 37 °C เป็นเวลาอีก 4 ชั่วโมง หา reduced MTT (formazan) ด้วยวิธี ATCC CCL-17 ทั้งนี้ formazan ที่เกิดบ่งบอกถึงการเจริญเติบโตของ *Candida albicans* การทดลองนี้ใช้ Amphotericin B และ DMSO เป็น positive และ negative control ตามลำดับ

ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Anti-tuberculosis activity) หาโดยวิธี alamar blue susceptibility (MABA) ตามวิธีของ Collins และ Franzblau (1997) นำสารสกัดตัวอย่างมา 100 µL เจือจางเป็นสองเท่าด้วยน้ำ หรือ DMSO ในเพลต 96 หลุม เติมแบคทีเรีย (*M. tuberculosis* H37Ra) ลงไปในแต่ละหลุม โดยให้มีแบคทีเรียประมาณ $5x10^4$ CFU/mL อบที่ 37 °C เติม alamar blue ลงในแต่ละหลุมหลังจากเกิดรีดักชันแล้ว อบเพลตที่ 37 °C บันทึกผลทุก 24 ชั่วโมง การทดลองนี้ใช้ Rifampicin, kanamycin และ isoniazide เป็น positive control

ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (Antiplasmodial activity) ทดสอบกับ *Plasmodium falciparum* (K1, multi drug resistant strain) ตามวิธีของ Trager and Jensen (1976) และหาปริมาณวิเคราะห์การออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองด้วยเทคนิค microculture radioisotope ตามวิธีของ Desjardins *et al.* (1979) นำ erythrocytes 1.5% กับ parasitemia 1% ผสมกัน แล้วใส่สารสกัดตัวอย่างที่ละลายใน DMSO 1% ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% อบเพลต37 (C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม [$^3$H] hypoxanthine (Amersham, USA) 25 µL (0.5 µCi) ลงใน culture medium แต่ละหลุม อบเพลตต่ออีก 24 ชั่วโมง ระดับของ radioactively labeled hypoxanthine จะบ่งบอกการเจริญเติบโตของปรสิต ซึ่งหาได้โดยใช้ Top Count microplate scintillation counter (Packard, USA) ค่า Inhibition concentration ($IC_{50}$) บอกความเข้มข้นที่ทำให้การเจริญเติบโตของปรสิตลดลง 50% การทดลองนี้ใช้ dihydroartemisinine (DHA) เป็น positive control

ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory assay) ทดสอบตามวิธีของ Kirtikara *et al.* (1998, 2001) นำเซลล์เพาะเลี้ยงจากหนู (cultured immortalized mouse) PGH-1 และ PGH-2 ชนิดที่เป็น null cells ที่ความเข้มข้น $1x10^5$ cells/

mL มาใส่ในตัวกลางที่ไม่มีเซรุ่ม (serum-free medium) และมี arachidonic acid เข้มข้น 20 μM หรือ calcium ionophore A23187 เข้มข้น 2 μM เป็นเวลา 30 นาที แล้ววิเคราะห์ความเข้มข้นของ $PGE_2$ โดยวิธี $^3H$ radioimmuno assay (Amersham, USA) ด้วยการวัดการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ cyclooxygenase

สำหรับทุกการทดสอบดังกล่าวข้างต้น ส่งบริการวิเคราะห์ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยี ชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

## ผลและอภิปรายผลการทดลอง

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดตัวอย่างทั้งหมด 16 ชนิดแสดงดังตารางที่ 2 สารสกัด 14 ตัวอย่างออกฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคเริม (HSV-1) และวัณโรค (TB) อย่างไรก็ตาม ไม่มีสารสกัดใดเลยที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ (COX) สารสกัดของ *Dictyota* sp. ออกฤทธิ์สูงสุดต่อไวรัสเริมที่ระดับ $IC_{50}$ 0.700 μg/mL ในขณะที่สารสกัดของ *Gracillaria* sp. ออกฤทธิ์อ่อนที่สุดที่ระดับ $IC_{50}$ 40.0 μg/mL ส่วน *Acanthophora spicifera* ที่เก็บจากอ่าวคุ้งกระเบน *Dictyota* sp. และ *Halophila ovalis* แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับ $IC_{50}$ 28.3, 13.1 และ 26.6 μg/mL ตามลำดับ สาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota* sp. แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปาก (KB) เต้านม (BC) และปอด (NCI-H187) ค่อนข้างสูงมากที่ระดับ $IC_{50}$ 2.17, 2.27 และ 1.90 μg/mL ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น *Sargassum oligocystum* ยังออกฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดค่อนข้างดีที่ระดับ $IC_{50}$ 4.18 μg/mL สาหร่ายสีน้ำตาลทั้งสามชนิด คือ *Dictyota* sp., *Padina minor* และ *Sargassum oligocystum* แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดได้ดี เฉพาะหญ้าทะเล *Halophila ovalis* และ *Enhalus acoroides* รวมทั้งสาหร่ายสีแดง *Acanthophora spicifera* ที่เก็บจากอ่าวคุ้งกระเบนเท่านั้น ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ได้ นอกจากนี้ *Dictyota* sp. ยังออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียดีมาก ที่ระดับ $IC_{50}$ 2.90 μg/mL ส่วนสาหร่ายสีเขียว *Caulerpa lentillifera* และ *Chaetomorpha* sp. แสดงฤทธิ์ต้านไวรัสเริม และวัณโรคได้ ในจำนวนสาหร่ายสีแดงทั้งหมด 7 สปีชีส์ และหญ้าทะเลทั้งหมด 3 สปีชีส์ แสดงฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเริมได้

ในบรรดาตัวอย่างทั้งหมดมีเพียงสาหร่ายสองชนิดเท่านั้นที่ไม่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริม แสดงให้เห็นว่าอาจมีสารเมตาบอไลซ์สามัญที่มีอยู่ในสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีแดง และสาหร่ายสีน้ำตาลที่เป็นตัวออกฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเริมดังกล่าวร่วมกัน ดังมีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Lee *et al.* (2004) ที่แสดงให้เห็นว่าสารประกอบกลุ่มพอลีแซกคาไลด์ที่มีหมู่ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ (sulfated polysaccharides) ซึ่งแยกได้จากสาหร่ายมีฤทธิ์ต้านไวรัสได้ อย่างไรก็ตามไม่น่าเป็นไปได้ที่สารประกอบที่ชอบน้ำ (hydrophilic compound) เช่นนั้นจะมีปริมาณมากพออยู่ในสารสกัดที่ชอบไขมัน (lipophilic extracts) นอกจากนี้สารสกัดจากหญ้าทะเลที่ยังไม่ทราบแน่ชัด ถึงการมีอยู่ของสารประกอบกลุ่มพอลีแซกคาไลด์ ที่มีหมู่ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบดังกล่าว ก็ยังแสดงฤทธิ์ต้านไวรัสในการศึกษาครั้งนี้ด้วย ดังนั้นแหล่งที่มาของการออกฤทธิ์ต้านไวรัสจึงควรค่าต่อการศึกษาค้นคว้าวิจัยต่อไป

สารสกัด *Dictyota* sp. ออกฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุดแทบทุกชนิด ยกเว้นฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ผลการทดสอบครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่ามีเมตาบอไลซ์ที่มีความเป็นพิษ ชนิดไม่เฉพาะเจาะจงอยู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นที่ทราบดีว่า *Dictyota* spp. เป็นแหล่งของสารประกอบไดเทอร์พีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (biologically active diterpenes) (Siamopoulou *et al.*, 2004).

ในทางตรงกันข้าม สารสกัดของ *Acanthophora spicifera* ที่เก็บจากอ่าวคุ้งกระเบนแสดงฤทธิ์ยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญต่อทั้งเชื้อวัณโรค *M. tuberculosis* และ มะเร็งเต้านม แต่กลับไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งที่ปากและปอด ชี้ให้เห็นถึงขั้นของความแตกต่าง (degree of differentiation)ด้านการออกฤทธิ์ของสาหร่ายชนิดนี้ ซึ่งน่าสนใจที่สารสกัดของสาหร่าย *A. spicifera* ที่เก็บจากบางแสนกลับไม่แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม และไม่ยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. albicans* ด้วย บ่งบอกถึงความผันแปรแตกต่างด้านภูมิศาสตร์ที่มีผลต่อการผลิตสารเมตาบอไลซ์ สาหร่ายสปีชีส์นี้เป็นตัวอย่างที่ดีในการดำเนินงานวิจัยต่อไปในเรื่องติดตามสารทุติยภูมิที่แยกได้จากสาหร่ายที่เก็บจากสถานที่ต่างกันทั้งสองแหล่งดังกล่าว

ถึงแม้ว่าหญ้าทะเลไม่ได้เป็นที่ทราบกันดีนักในแง่แหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่สารสกัดจากหญ้าทะเลในการศึกษาครั้งนี้ แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพถึง 4 ชนิด พอเพียงที่จะเห็นถึงความสำคัญในการติดตามให้วิจัยต่อไปได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามการขาดข้อมูลการวิจัยก่อนหน้านี้ เกี่ยวกับการแยกสารจากหญ้าทะเลกลุ่มนี้ในประเทศไทย ประกอบกับความน่าสนใจด้านนิเวศน์วิทยาระหว่างสัตว์ทะเลกับหญ้าทะเลบริเวณอ่าวคุ้งกระเบน ทำให้เพิ่มความสำคัญต่อการศึกษาวิจัยทางเคมีของหญ้าทะเลมากยิ่งขึ้น

**ตารางที่ 2** ผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดตัวอย่างที่เก็บได้ตามตารางที่ 1

| ลำดับ | ประเภทของสิ่งมีชีวิต และชื่อ | ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีต่อ cell line, organism หรือ enzyme (μg/mL) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Vero[a] | HSV-1[b] | KB[c] | BC[d] | NCI[e] | CA[f] | MT[g] | PF[h] | COX[i] |
| | สาหร่ายสีแดง | | | | | | | | | |
| 1 | *Acanthophora spicifera*[j] | - | 4.50 | - | - | - | - | 100 | - | - |
| 2 | *Acanthophora spicifera*[k] | 28.3 | 5.90 | - | 12.6 | - | 36.2 | 12.5 | - | - |
| 3 | *Gracilaria rubra* | - | 2.40 | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | *Gracilaria* sp. | - | 40.0 | - | - | - | - | 200 | - | - |
| 5 | *Hypnea* sp. | - | 2.00 | - | - | - | - | 50.0 | - | - |
| 6 | *Laurencia* sp. | - | 5.30 | - | - | - | - | 50.0 | - | - |
| 7 | *Solieria* sp. | - | 8.20 | - | - | - | - | 50.0 | - | - |
| | สาหร่ายสีเขียว | | | | | | | | | |
| 8 | *Acetabularia* sp. | - | - | - | - | - | - | 200 | - | - |
| 9 | *Caulerpa lentillifera* | - | 15.1 | - | - | - | - | 100 | - | - |
| 10 | *Chaetomorpha* sp. | - | 16.0 | - | 17.7 | - | - | 100 | - | - |
| | สาหร่ายสีน้ำตาล | | | | | | | | | |
| 11 | *Dictyota* sp. | 13.1 | 0.700 | 2.17 | 2.27 | 1.90 | - | 6.25 | 2.90 | - |
| 12 | *Padina minor* | - | 21.6 | - | - | 14.2 | - | 200 | - | - |
| 13 | *Sargassum oligocystum* | - | - | - | - | 4.18 | - | - | - | - |
| | หญ้าทะเล | | | | | | | | | |
| 14 | *Enhalus acoroides* | - | 3.50 | - | - | - | 40.5 | 50.0 | - | - |
| 15 | *Halodule pinifolia* | - | 6.10 | - | - | - | - | 50.0 | - | - |
| 16 | *Halophila ovalis* | 26.6 | 2.20 | - | - | - | 12.6 | 25.0 | - | - |

[a]cytotoxicity towards Vero cells, $IC_{50}$; [b]*Herpes simplex* virus type 1, $IC_{50}$; [c]oral carcinoma cell line, $IC_{50}$; [d]breast cancer cell line, $IC_{50}$; [e]lung cancer cell line, $IC_{50}$; [f]*Candida albicans*, $IC_{50}$; [g]*Mycobacterium tuberculosis*, MIC; [h]*Plasmodium falciparum* (malarial parasite), $EC_{50}$; [i]COX-1 และ COX-2, สารสกัดทุกตัวไม่ยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงสุด 10 μg/mL; [j]จากหาดบางแสน; [k]จากอ่าวคุ้งกระเบน

## สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota* sp. ให้ผลการยับยั้งทางชีวภาพสูงที่สุดในบรรดาตัวอย่างทั้งหมด ส่วนสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum oligocystum* และ *Padina minor* แสดงฤทธิ์ยับยั้งดีรองลงมา กลุ่มสาหร่ายสีแดง *Laurencia* sp. และ *Acanthophora spicifera* ให้ผลการออกฤทธิ์ที่น่าสนใจอย่างมีนัยสำคัญโดยเฉพาะต่างสถานที่เก็บกัน ส่วนสาหร่ายสีเขียว *Caulerpa lentillifera* แสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจแม้จะไม่สูงมากนักก็ตาม เช่นเดียวกับในกลุ่มของหญ้าทะเลทั้งสามชนิดคือ *Enhalus acoroides*, *Halodule pinifolia* และ *Halophila ovalis* ที่ถึงแม้ผลการออกฤทธิ์ไม่สูงเด่นมากนัก แต่มีจุดที่น่าสนใจควรติดตามศึกษาการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไปในด้านนิเวศวิทยาทางเคมี เป็นต้น

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยร่วมกับสำนักงานการอุดมศึกษาแห่งชาติโดยมีศาสตราจารย์ ดร. อุดม ก๊กผล ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นนักวิจัยที่ปรึกษา และได้รับการสนับสนุนจากศูนย์นวัตกรรมทางเคมี: โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษา และการวิจัยทางเคมี (PERCH-CIC) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ขอขอบคุณ คุณธิดารัตน์ น้อยรักษา และคุณสุชา มั่นคงสมบูรณ์ จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณ คุณเจษฎา เจริญวัฒน์ คุณเพ็ญแข คุณาวงค์เดช และคุณนพดล ค้าขาย ศูนย์ศึกษาการพัฒนาประมง โครงการพระราชดำริ อ่าวคุ้ง-กระเบน ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง ขอบคุณการให้บริการวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพ ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยี ชีวภาพแห่งชาติ และขอบคุณภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยบูรพาที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

สรวิศ เผ่าทองสุข. 2543. สาหร่าย: ศักยภาพการวิจัย และพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Collins, L. A.; and Franzblau, S. G. 1997. Microplate Alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 41, 1004-1009.

Davyt, D. E. W.; Fernandez, R.; Mariezcurrena, R.; Mombru, A. W.; Saldana, J.; Dominguez, L.; Coll, J.; and Manta, E. 1998. A new indole derivative from the red alga *Chondria atropurpurea*: Isolation, structure determination, and anthelmintic activity. Journal of Natural Products 61, 1560-1563.

de Silva, S. S. M.; Gamage, S. K. T.; Kumar, N. S.; and Balasubramaniam, S. 1982. Antibacterial activity of extracts from the brown seaweed *Stoechospermum marginatum*. Phytochemistry 21, 944-945.

Desjardins R. E.; Canfield C. J.; Haynes, J. D.; and Chulay, J. D. 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 16, 710-718.

del Val A. G.; Platus, G.; Basilio, A.; Cabello, A.; Gorrochategui, J.; Suay, I.; Vicente, F.; Portillo, E.; del Rio, M. J.; Reina, G. G.; and Pelaez, F. 2001. International Microbiology 4, 35-40.

Fuller R. W.; Cardellina, J. H.; Kato, Y.; Brinen, L. S.; Clardy, J.; Snader, K. M.; and Boyd, M. R. 1992. A pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria hornemannii* produces a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor cell lines. Journal of Medicinal Chemistry 35, 3007-3011.

Kirtikara, K.; Morham, S. G.; Raghow, R.; Laulederkind, S. J. F.; Kanekura, T.; Goorha, S.; and Ballou, L. R. 1998. Compensatory prostaglandin $E_2$ biosynthesis in cyclooxygenase 1 or 2 null cells. Journal of Experimental Medicine 187, 517-523.

Kirtikara, K.; Swangkul, S.; and Ballou, L. R. 2001. The analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drug selectivity in prostaglandin G/H synthase (PGHS)-null cells. Inflammatory Research 50, 327-332.

Kurata, K.; Suzuki, M.; Shiraishi, K.; and Taniguchi, K. 1988. Spatane-type diterpenes with biological activity from the brown alga *Dilophus okamurai*. Phytochemistry 27, 1321-1324.

Lee, L. B.; Hayashi, K.; Maeda, M.; and Hayashi, T. 2004. Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae. Planta Medica 70, 813-817.

Plumb, J. A.; Milroy, R.; and Kaye, S. B. 1989. Effect of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-forman absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. Cancer Research 49, 4435-4440.

Rovirosa, J.; Sanchez, I.; Palacios, Y.; Darias, J.; and San-Martin, A. 1990. Antimicrobial activity of a new monoterpene from *Plocamium cartilagineum* from Antarctic Peninsula. Boletin de la Sociedad Chilena de Quimica 35, 131-135.

Skehan, P.; Ritsa, S.; and Dominic, S. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. Journal of National Cancer Institute 82, 1107-1112.

Siamopoulou, P.; Bimplakis, A.; Iliopoulou, D.; Vagias, C.; Cos, P.; Berghe, D. V.; and Roussis, V. 2004. Diterpenes from the brown algae *Dictyota dichotoma* and *Dictyota linearis*. Phytochemistry 65, 2025-2030.

Trager, W.; and Jensen, J. B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. Science 193, 673-675.

Watanabe, K.; Umeda, K.; Kurita, Y.; Takayama, C.; and Miyakado, M. 1990. Two insecticidal monoterpenes, telfairine and aplysiaterpenoid A, from the red alga *Plocamium telfairiae*: structure elucidation, biological activity and molecular topographical consideration by a semiempirical molecular orbital study. Pesticide Biochemistry and Physiology 37, 275-286.