

## ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดใบชะพลู

พัชรินทร์ บุญหล้า<sup>1</sup>, เมธิณ ผดุงกิจ<sup>2</sup>, อุตมศักดิ์ มหาวีรวัฒน์<sup>3</sup> และ ธิดารัตน์ สมดี<sup>4</sup>

Received: 25 July 2014

Accepted: 3 November 2014

## บทคัดย่อ

**บทนำ:** ชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) เป็นพืชในวงศ์ Piperaceae ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ใบชะพลูนำมาใช้ในตำรายาไทยสำหรับปรับสมดุลของธาตุในร่างกาย วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดใบชะพลู **วิธีดำเนินการวิจัย:** สกัดใบชะพลูแห้งด้วยการหมัก โดยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ petroleum ether, hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใช้วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) และ วิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ ใช้วิธี Ames test ในเชื้อแบคทีเรีย *Samonella typhimurium* 2 สายพันธุ์คือ TA98 และ TA100 **ผลการวิจัย:** วิธี DPPH สารสกัด hexane มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด โดยให้ค่า  $EC_{50}$  เท่ากับ  $29.63 \pm 0.56$   $\mu\text{g/mL}$  และ วิธี FRAP สารสกัด methanol ให้ฤทธิ์ดีที่สุด ค่า Fe (II) equivalent เท่ากับ  $0.56 \pm 0.12$   $\mu\text{mol/mg}$  สารสกัดใบชะพลูไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และสารสกัด dichloromethane มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ ในการทดสอบโดยวิธี Ames test ได้ดีที่สุดทั้งสองสายพันธุ์ จากงานวิจัยในหลอดทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า สารสกัดจากชะพลูมีศักยภาพในการนำมาศึกษาต่อเพื่อที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อบำรุงร่างกายได้

**คำสำคัญ:** ชะพลู ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2557; 10(3): 283-294

<sup>1</sup> นิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.), สมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 44150

<sup>2</sup> Ph.D., ผู้ช่วยศาสตราจารย์, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

<sup>3</sup> M.PH., รองศาสตราจารย์, คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

<sup>4</sup> M.Sc., ผู้ช่วยศาสตราจารย์, คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

\* ติดต่อผู้พิมพ์: พัชรินทร์ บุญหล้า คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 44150 Email: n\_nmichi@hotmail.com

## Antioxidant and Antimutagenic Activities of *Piper sarmentosum* Roxb. Leaf Extracts

Phatcharin Boonla<sup>1\*</sup>, Methin Phadungkit<sup>2</sup>, Udomsak Mahaweerawat<sup>3</sup> and Thidarat Somdee<sup>4</sup>

### Abstract

**Introduction:** *Piper sarmentosum* Roxb. is an edible plant in the Piperaceae family used in many South East Asian countries. Their leaves are used in Thai traditional medicinal for improving element balance in human body. **Objectives:** The current study aimed to test antioxidant and antimutagenic activities of the *P. sarmentosum* extracts. **Methods:** The dry leaves of this plant were extracted by the maceration method using petroleum ether, hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol as solvents. The antioxidant activity was performed using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. The mutagenic and antimutagenic actions were tested using the Ames test in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains. **Results :** The hexane extract possessed the highest antioxidant activities in the DPPH assay with EC<sub>50</sub> value of 29.63±0.56 µg/mL and methanol extracts possessed the highest antioxidant activities in the FRAP assay with the Fe (II) equivalent of 0.56±0.12 µmol/mg. In the Ames test, the leaf extract exhibited no mutagenic activity, while the dichloromethane extract exhibited the strongest antimutagenic activity both in TA98 and TA100 strains. **Conclusion:** From this *in vitro* study, It can be concluded that the *P. sarmentosum* extracts have excellent potential for further study as dietary supplements.

**Keywords:** *Piper Sarmentosum* v Roxb, antioxidant activity, antimutagenic activity

IJPS 2014; 10(3): 283-294

<sup>1</sup> M.Sc. Candidate, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Thailand 44150

<sup>2</sup> Asst. Prof. PhD., Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Thailand 44150

<sup>3</sup> Assoc. Prof. M.PH., Faculty of Public Health, Mahasarakham University, Thailand 44150

<sup>4</sup> Asst. Prof. M.Sc., Faculty of Public Health, Mahasarakham University, Thailand 44150

\* **Corresponding author:** Phatcharin Boonla. Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Thailand 44150 Email: n\_nmichi@hotmail.com

## บทนำ

ชะพลู (*Piper Sarmentosum* Roxb.) จัดเป็นพืชในวงศ์ Piperaceae เป็นพรรณไม้ล้มลุกแบบเลื้อยที่มีลำต้นทอดราบไปตามพื้นดิน และจะชูก้านใบขึ้นมาเหนือดินสูงประมาณ 1-1.5 ฟุต ลักษณะใบเป็นรูปหัวใจ แผ่นใบจะหนุ่มกว้างใหญ่ พื้นใบมีสีเขียวสดสีก้านใบสีเขียวกลม ไม่ใหญ่นัก พรรณไม้ชนิดนี้ชอบขึ้นตามที่ลุ่มต่ำและแฉะ โดยส่วนใหญ่จะปลูกไว้รับประทานและใช้ในการประกอบอาหารต่างๆ เช่น แกงหอยใบชะพลู (Tangkanakul *et al.*, 2011) แกงหัวปลีและซี่โครงหมูใส่ชะอมและใบชะพลู (Somdee *et al.*, 2010) เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีสรรพคุณรักษาหลายอย่างเช่น ลำต้น ใช้เป็นยารักษาเสมหะ ใบช่วยเจริญอาหาร ดอกช่วยย่อยอาหาร ขับลมในลำไส้ รากบำรุงธาตุ ขับลมในลำไส้ เป็นต้น (Boonyaprapat, 2539) จากการศึกษาพบว่าใบชะพลูมีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ (Silpasuwan, 1979) ฤทธิ์ยับยั้งการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ ลดการบีบตัวของลำไส้เล็ก (Apisariyakul, 1984; Apisariyakul and Anantasarn, 1984) ฤทธิ์เป็น cholinergic agonist ในลำไส้เล็กของหนู (Sunbhanich, 1988) ฤทธิ์ต้านการเกาะกันของเกล็ดเลือด (Han *et al.*, 1992) ฤทธิ์ต้านเบาหวานในผู้ป่วยเบาหวาน (Pongmarutai, 1989) และฤทธิ์ต้านเบาหวานในหนูทดลอง (Peungvicha *et al.*, 1998) การศึกษาความเป็นพิษพบว่า พิษเฉียบพลันมีค่า LD<sub>50</sub> มากกว่า 5 g/kg ในหนูขาว และมีพิษเรื้อรังในระดับต่ำ (Temsiririrkkul *et al.*, 2002) และสารสกัดน้ำของใบชะพลูไม่มีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อโครโมโซมของเซลล์ไข่กระดูกและไม่มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์ด้วย (Puchadapirom *et al.*, 2004)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับพืชผักเป็นจำนวนมาก เนื่องจากพืชผักมีประโยชน์และมีคุณค่าต่อร่างกายซึ่งในการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติทางเคมีของพืชผักสมุนไพรนั้นมีอยู่เป็นจำนวนมาก ในพืชผักผลไม้มีสารต้านออกซิเดชันหลายกลุ่มได้แก่ วิตามินซี

เบต้า-แคโรทีน วิตามินเอ เซเลเนียม ทองแดง แมงกานีส และสังกะสี เป็นตัวช่วยยับยั้งกระบวนการเกิดโรคได้หลายโรค เช่น โรคเบาหวาน โรคหัวใจ และมะเร็งซึ่งมีกลไกยับยั้งทั้งทางตรงและทางอ้อมโดยการไปจับกับอนุมูลอิสระไม่ให้อันตรายต่อเซลล์ได้ซึ่งสารแอนติออกซิแดนท์ที่พบมากในพืชผักและสมุนไพร เป็นกลุ่มไบโอฟลาโวนอยด์ (bioflavonoids) และโพลีฟีนอล (polyphenols) (Kratchanova *et al.*, 2010)

จากข้อมูลทางวิชาการพบว่า การประกอบอาหารที่ใช้ความร้อนสูงและนานเกินไป เช่น การปิ้งย่างรมควัน ทำให้เกิดสารพิษมากมาย เช่น สารพิษกลุ่มโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon) ซึ่งสารในกลุ่มนี้บางชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง ส่วนการหมักเพื่อทำแหนม หมูยอ ไส้กรอก เบคอน กุนเชียง โดยเติมดินประสิว เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อ *Clostridium botulinum* หรือทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีแดงสวย ก่อให้เกิดสารก่อมะเร็งกลุ่มไนโตรซามีน (nitrosamine) สำหรับการทอดหรือต้มสัตว์นานๆ ทำให้เกิดสารพิษกลุ่ม เอ็ดเตอโรไซคลิกเอมีน (heterocyclic amine) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง (Kanksadalumpai, 2005) ก่อนที่กระบวนการเกิดมะเร็งขึ้นจะมีกระบวนการก่อกลายพันธุ์ เพราะฉะนั้นพืชสมุนไพรใดสามารถการยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ได้จึงมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ในการยับยั้งการเกิดมะเร็งได้ สมุนไพรหลายชนิดที่มีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในพืชสมุนไพรนั้นแสดงคุณสมบัติในการยับยั้งการก่อกลายพันธุ์โดยที่สารสกัดจากพืชสมุนไพรเหล่านั้น จะไปมีผลทำให้ DNA ที่กลายพันธุ์กลับกลายเป็น DNA ปกติ ยับยั้งการเจริญ และการแพร่กระจายของเซลล์กลายพันธุ์ และทำให้สารก่อกลายพันธุ์อื่นๆ เสียคุณสมบัติไปจึงทำให้ไม่สามารถทำอันตรายต่อเซลล์ (Kanksadalumpai, 2005) จากการที่พืชผักสมุนไพรมีสารสำคัญหลายอย่างที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ นี้เอง ทำให้เป็น

ที่น่าสนใจว่าสมุนไพรที่ใช้เป็นเครื่องประกอบอาหารน่าจะมีสารสำคัญในการต้านการก่อกลายพันธุ์ในเนื้อสัตว์ได้ จึงได้มีการศึกษาที่น่าสนใจคือฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของพืชผักสมุนไพร

ชะพลูเป็นผักพื้นบ้านที่คนนิยมนำมารับประทานสด ใช้ในการประกอบอาหาร และส่วนประกอบของเมี่ยงคำ เป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ช่วยบำรุงธาตุ มีโปรตีนสูง มีคุณค่าทางโภชนาการ ในประเทศไทยมีตำรายาพื้นบ้านที่ใช้การต้มชะพลูทั้งห้า ปรึบธาตุ มีฤทธิ์กระตุ้นการเคลื่อนไหวของลำไส้และคลายกล้ามเนื้อเพื่อให้ข้อมูลสรรพคุณของชะพลูครบถ้วนสมบูรณ์มากขึ้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดใบชะพลู

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การสกัดสาร

นำใบชะพลูที่ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป เก็บจากพื้นที่ อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม มาทำการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และบดลดขนาดจนเป็นผง จากนั้นนำผงใบชะพลู 500g มาหมัก (maceration) ต่อเนื่อง ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆตามลำดับดังนี้ petroleum ether, hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol ใช้ตัวทำละลายชนิดละ 1,000 mL ใช้เวลา 7 วันต่อชนิดตัวทำละลาย จากนั้นนำไปกรองและระเหยแห้งด้วย rotary evaporator และ freeze dryer ตามลำดับ นำสารสกัดที่ได้เก็บในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 °C

### 2. การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของใบชะพลู

2.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Chu, 2000)

1) เตรียมสารสกัดใบชะพลู ความเข้มข้น 5 ระดับ (15-500 mg/L) ด้วย methanol ในหลอดทดลอง

2) เตรียม DPPH ความเข้มข้น 60 mg/L ด้วย methanol

3) นำสารสกัดที่ได้ จากข้อ 2.1.1 จำนวน 125  $\mu$ L มาผสมกับ สารละลาย DPPH ในข้อ 2.1.2 จำนวน 125  $\mu$ L ใน 96 well plate

4) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาวะไร้แสงเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm แล้วคำนวณค่า % radical scavenging จากสูตร

$$\% \text{ radical scavenging} = \frac{A_{\text{ctrl}} - A_{\text{sample}} \times 100}{A_{\text{ctrl}}}$$

เมื่อ A ctrl คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ของสารละลาย DPPH และ A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ของสารสกัดใบชะพลูที่ผสมกับสารละลาย DPPH นำค่า % radical scavenging กับความเข้มข้น ที่ได้ไป สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดใบชะพลูที่ทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ได้ครึ่งหนึ่ง ( $EC_{50}$ ) โดยรายงานผลการต้านออกซิเดชันเป็นค่า  $EC_{50}$  ของสารสกัดใบชะพลูเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid

2.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันโดยวิธี FRAP (Benzie, 1999)

1) เตรียม FRAP reagent โดยผสม acetate buffer pH 3.6 และ 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyr-dyl-triazine) ในอัตราส่วน 30 : 1 ตามลำดับ

2) เตรียม  $FeSO_4$  เข้มข้น 10 – 3,000  $\mu$ mole/mL

3) นำสารในข้อ 2.2.1 มาทำปฏิกิริยากับสารข้อ 2.2.2 ในอัตราส่วน 30 : 1 ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ 593 nm สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ  $\text{FeSO}_4$

4) เตรียมสารสกัดใบชะพลูแต่ละชนิดและสารมาตรฐาน ascorbic acid ให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL

5) นำสารในข้อ 2.2.1 มาทำปฏิกิริยากับสารข้อ 2.2.4 ในอัตราส่วน 30 : 1 ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 nm ค่าที่ได้นำไปแทนค่า ในสมการเส้นตรงจากกราฟ  $\text{FeSO}_4$  ในข้อที่ 2.2.3 เรียกว่า FRAP value

6) นำค่า FRAP value ของสารสกัดใบชะพลูชั้นต่างๆ มาเปรียบเทียบกับ ค่า FRAP value ของสารมาตรฐาน ascorbic acid

### 3. การทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์โดยวิธี Ames test (Kangsadalamai, 1996)

3.1 การเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ  
นำเชื้อ *S. typhimurium* TA 100 (ตรวจสอบการกลายพันธุ์แบบ base-pair substitution) และ TA 98 (ตรวจสอบการกลายพันธุ์แบบ frame-shift substitution) มาเลี้ยงในอาหาร oxiod nutrient broth (12 mL) แล้วนำมา incubate ใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด เจือจางเชื้อลง 8 เท่า ด้วย normal saline เพื่อวัดค่า OD อ่านค่าที่ความยาวคลื่น 620 nm จะได้ประมาณ 0.3-0.4

3.2 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์

1) นำหลอดทดลองหลอดใหม่เติม  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ -KCl buffer 500  $\mu\text{L}$  และเติมสารสกัดจากใบชะพลู 100  $\mu\text{L}$  ที่มีความเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 4 mg/mL ตามลำดับ และเชื้อ *S. typhimurium* TA 100 หรือ TA 98 100  $\mu\text{L}$  incubate บน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 นาที

2) เมื่อครบกำหนด เติม Top agar ที่เติม histidine ที่ผสม biotin แล้ว 2 mL

3) จากนั้นนำเทบน plate อาหาร แล้ว incubate 37 °C นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนับจำนวนเชื้อที่มีการเจริญโดยเปรียบเทียบกับ control คือเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 4. การทดสอบฤทธิ์การต้านการก่อกลายพันธุ์โดยวิธี Ames test (Kangsadalamai, 1996)

4.1 การเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ  
เชื้อ *S. typhimurium* TA 100 และ TA 98 เลี้ยงในอาหาร oxiod nutrient broth (12 mL) แล้วนำมาเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อลง 8 เท่าด้วย normal saline เพื่อวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 620 nm จะได้ประมาณ 0.3-0.4

4.2 การเตรียม nitrosated products

1) แยกหลอดทดลองระหว่าง TA 100 และ TA 98 โดยการเติม 0.2 N HCl 740  $\mu\text{L}$ , 1-aminopyrine 10  $\mu\text{L}$  และ 2 M  $\text{NaNO}_3$  250  $\mu\text{L}$  ตามลำดับสำหรับ TA 98 และ 0.2 N HCl 710  $\mu\text{L}$ , 1-AP 40  $\mu\text{L}$  และ 2M  $\text{NaNO}_3$  250  $\mu\text{L}$  ตามลำดับสำหรับ TA 100

2) นำสารที่เตรียมได้ทั้งสองหลอดไปเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการแช่น้ำแข็ง 1 นาที

3) เติม 2M Ammonium sulfamate 250  $\mu\text{L}$  ลงในทั้งสองหลอดและแช่ในน้ำแข็งอีก 10 นาที

4.3 การทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์

1) นำหลอดทดลองเติม nitrosated products 100  $\mu\text{L}$  และ  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ -KCl buffer 500  $\mu\text{L}$  และเติมสารสกัดใบชะพลู 100  $\mu\text{L}$  ที่มีความเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 4 mg/mL และเชื้อ *S. typhimurium* TA 100 หรือ TA 98 จำนวน 100  $\mu\text{L}$  เขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที

2) เมื่อครบกำหนด เติม Top agar ที่เติม histidine ที่ผสม biotin แล้ว 2 mL

3) จากนั้นนำไปเทบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนับจำนวนเชื้อที่เจริญ โดยเปรียบเทียบกับ control คือเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยคำนวณหา % modification จากสูตร

$$\% \text{ modification} = \frac{(A-B) \times 100}{(A-C)}$$

เมื่อ A หมายถึงค่า revertant colonies ของ positive control คือเชื้อที่เติมสารก่อกลายพันธุ์

B หมายถึงค่า revertant colonies ของเชื้อที่เติมสารสกัดใบชะพลูและสารก่อกลายพันธุ์

C หมายถึงค่า revertant colonies ของ negative control คือเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

## 5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของลักษณะที่ศึกษา และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

## ผลการวิจัย

### 1. การสกัดใบชะพลู

การสกัดใบชะพลูพบว่าได้ % สารสกัด คือ petroleum ether, hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol เท่ากับ 8.50, 7.75, 8.35, 11.27 และ 61.20 % ตามลำดับ โดยคำนวณจากสูตร % สารสกัด = (น้ำหนักสารสกัด / น้ำหนักผงใบชะพลูแห้ง) x 100

## 2. การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของใบชะพลู

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH โดยการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดใบชะพลูที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ คือ สารสกัด petroleum ether สารสกัด hexane สารสกัด dichloromethane สารสกัด ethyl acetate และ สารสกัด methanol เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน คือ ascorbic acid เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าผลที่ได้แตกต่างกัน ( $p < 0.05$ ) ซึ่งในการเปรียบเทียบครั้งนี้ ใช้ปริมาณความเข้มข้นของสารที่ยับยั้ง DPPH ได้ 50% (50 % efficiency concentration,  $EC_{50}$ ) เป็นตัวที่บ่งบอกถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยชั้นของสารสกัดที่ให้ค่าต้านออกซิเดชันที่สุด (ค่า  $EC_{50}$  ต่ำที่สุด) ได้แก่ สารสกัดชั้น hexane (ตารางที่ 1)

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันวิธี FRAP โดยการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชะพลูที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ คือ สารสกัด petroleum ether สารสกัด hexane สารสกัด dichloromethane สารสกัด ethyl acetate และ สารสกัด methanol เปรียบเทียบกับ สารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน คือ ascorbic acid เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีความแตกต่างกัน ( $p < 0.05$ ) ซึ่งในการเปรียบเทียบครั้งนี้ใช้ปริมาณความเข้มข้นของ Fe (II) ( Fe (II) equivalents ) เป็นตัวที่บ่งบอกถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยชั้นของสารสกัดที่ให้ค่าต้านออกซิเดชันสูงที่สุด (ค่า Fe (II) equivalent สูงที่สุด) ได้แก่ สารสกัดชั้น methanol (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1** ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP ของสารสกัดใบชะพลู

| สารสกัด         | EC <sub>50</sub> ของวิธี DPPH<br>(µg/mL) | Fe (II) equivalent (µmole/mg ของสารสกัด)<br>ของวิธี FRAP |
|-----------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| petroleum ether | 110.81±0.85 <sup>E</sup>                 | 0.15±0.00 <sup>E</sup>                                   |
| hexane          | 29.63±0.56 <sup>B</sup>                  | 0.35±0.00 <sup>C</sup>                                   |
| dichloromethane | 55.02±1.67 <sup>C</sup>                  | 0.34±0.00 <sup>C</sup>                                   |
| ethyl acetate   | 78.57±0.45 <sup>D</sup>                  | 0.21±0.00 <sup>D</sup>                                   |
| methanol        | 80.19±0.46 <sup>D</sup>                  | 0.56±0.12 <sup>B</sup>                                   |
| ascorbic acid   | 5.26±0.57 <sup>A</sup>                   | 1.37±0.23 <sup>A</sup>                                   |

หมายเหตุ : A, B, C, D, E อักษรต่างกันในแต่ละแถวแสดงว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

### 3. การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดใบชะพลู

ทำการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธี Ames test โดยนำสารสกัดใบชะพลู ที่มีปริมาณ 0.5, 1, 2 และ 4 mg/plate มาทดสอบฤทธิ์ก่อกลาย

พันธุ์โดยทำการทดลองในเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* 2 สายพันธุ์คือ TA98 และ TA100 เปรียบเทียบกับเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติซึ่งผลการทดสอบพบว่าใบชะพลูไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** จำนวน Revertant colonies ในการทดสอบก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธี Ames test ของสารสกัดใบชะพลู ในเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100

| Fraction       | Amount<br>(mg/plate) | Revertant colony * |           |
|----------------|----------------------|--------------------|-----------|
|                |                      | TA 98              | TA100     |
| สารสกัดใบชะพลู | 0.5                  | 8 ± 4              | 71 ± 21   |
|                | 1                    | 9 ± 4              | 80 ± 20   |
|                | 2                    | 13 ± 2             | 101 ± 3   |
|                | 4                    | 13 ± 4             | 125 ± 2   |
| Positive**     | -                    | 609±135            | 1305.4±81 |

\* ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย/จานเลี้ยงเชื้อจากการทดลอง (n=5)

\*\* จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดจากสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 1- aminopyrene

#### 4. การทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์สารสกัดใบชะพลู

การทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธี Ames test โดยเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดใบชะพลู ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ คือ petroleum ether, hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol โดยมีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของสารมาตรฐานคือ 1-aminopyrene ซึ่งทำการทดลองในเชื้อแบคทีเรีย *S. typh-*

*imurium* 2 สายพันธุ์คือ TA98 และ TA100 ที่มีปริมาณ 0.5, 1, 2 และ 4 mg/plate พบว่า ผลการทดลองศึกษาฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดใบชะพลูแปรผันตามความเข้มข้นในทุกสารสกัดใบชะพลูด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยสายพันธุ์ TA98 และ TA 100 สารสกัดที่ให้ฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด ได้แก่ สารสกัด dichloromethane (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 3** จำนวน Revertant colonies ในการทดสอบความสามารถในการด้านการก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธี Ames test ของสารสกัดใบชะพลูที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยมีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของสารมาตรฐานคือ 1-aminopyrene ในเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 (n=5)

| Fraction        | Amount<br>(mg/plate) | TA 98                 |                     | TA100               |                   |
|-----------------|----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
|                 |                      | Revertant<br>colony * | %<br>modification** | Revertant<br>colony | %<br>modification |
| Petroleum ether | 0.5                  | 111.67±71.76          | 82.06               | 825.00±450.72       | 49.37             |
|                 | 1                    | 58.00±5.72            | 91.18               | 998.00±58.89        | 36.90             |
|                 | 2                    | 49.33±7.59            | 92.66               | 687.33±47.62        | 59.29             |
|                 | 4                    | 36.67±4.49            | 94.81               | 519.50±47.79        | 71.39             |
| Hexane          | 0.5                  | 75.33±21.85           | 88.23               | 1221.00±165.85      | 2.83              |
|                 | 1                    | 83.33±7.13            | 86.93               | 1058.67±31.93       | 32.53             |
|                 | 2                    | 49.00±1.41            | 92.71               | 994.67±123.11       | 37.14             |
|                 | 4                    | 71.50±4.11            | 88.89               | 895.00±100.2        | 44.33             |
| Dichloromethane | 0.5                  | 45.33±15.69           | 93.33               | 694.00±150.74       | 58.81             |
|                 | 1                    | 64.00±9.75            | 90.16               | 522.00±141.83       | 71.21             |
|                 | 2                    | 34.00±6.38            | 95.26               | 388.00±126.86       | 80.86             |
|                 | 4                    | 31.50±15.29           | 95.69               | 189.00±26.98        | 95.21             |

| Fraction      | Amount<br>(mg/plate) | TA 98                 |                     | TA100               |                   |
|---------------|----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
|               |                      | Revertant<br>colony * | %<br>modification** | Revertant<br>colony | %<br>modification |
| Ethyl acetate | 0.5                  | 61.00±27.31           | 90.67               | 1150.33±358.71      | 25.92             |
|               | 1                    | 43.00±24.06           | 93.73               | 1158.67±87.23       | 25.32             |
|               | 2                    | 35.33±20.49           | 95.03               | 953.33±62.51        | 40.12             |
|               | 4                    | 20.33±18.15           | 97.59               | 572.67±281.05       | 67.56             |
| Methanol      | 0.5                  | 335.57±74.05          | 43.97               | 704.67±222.82       | 58.05             |
|               | 1                    | 409.00±102.16         | 31.49               | 731.33±267.56       | 56.12             |
|               | 2                    | 200.67±10.14          | 66.92               | 360.00±53.74        | 82.89             |
|               | 4                    | 579.50±281.19         | 25.08               | 242.00±118.46       | 91.39             |
| Positive****  | -                    | 609.00±135.00         | -                   | 1305.40±81.00       | -                 |

\* ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย/จานเลี้ยงเชื้อจากการทดลอง (n=5)

\*\* ค่าเฉลี่ยของ %modificationจากการทดลอง (n=5)

\*\*\* จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดจากสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 1- aminopyrene

## อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดใบชะพลูโดยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดที่ให้ฤทธิ์ดีที่สุดคือ สารสกัดชั้น hexane รองลงมาคือชั้น dichloromethane ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sumazian และคณะ (2010) ที่พบว่า สารสกัดใบชะพลู มีความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ที่ระดับ EC<sub>50</sub> ประมาณ 54.21 µg/mL และจากการศึกษาของ Atiax และคณะ (2011) พบว่าสารสกัด hexane ของใบชะพลู มีสาร  $\beta$ -sitosterol ซึ่งสารดังกล่าว มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH ตามรายงานของ Rao และคณะ (2013)

การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดใบชะพลูโดยวิธี FRAP พบว่า สารสกัดที่ให้ฤทธิ์ดีที่สุดคือ สารสกัดชั้น methanol รองลงมาคือชั้น ethyl acetate ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hafizah

และคณะ (2010) ที่ศึกษาสารสกัดใบชะพลูด้วยวิธี FRAP พบว่าให้ฤทธิ์ดี (18.90 µmol Fe (II)/g น้ำหนักสารสกัด) โดยงานวิจัยเดียวกันนี้ได้หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีปริมาณสูง (90.86 mg gallic acid/g น้ำหนักสารสกัด) แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารสกัดใบชะพลูที่ทำให้เกิดฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันคือสารประกอบ ฟีนอลิก

นอกจากนี้ มีรายงานการวิจัย ที่พบว่าใบชะพลูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี ได้แก่ การศึกษาของ Ugusman *et al.* (2012) ที่พบว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จากใบชะพลู มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ในหลอดทดลองจากการชักนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ได้นอกจากนี้ยังพบว่าใบชะพลูมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ 91.02 mg QE/g และปริมาณสารฟีนอลิก 48.57 mgGAE/g และจากการศึกษาของ Chanwitheesuk *et al.* (2005) ได้หาปริมาณสารต้านออกซิเดชันในใบชะพลูพบว่ามี

ascorbic acid, vitamin E, total carotenes, total xanthophylls, tannin, total phenolics เท่ากับร้อยละ 16.6, 0.01, 3.82, 5.81, 17.7 และ 123 mg ตามลำดับ การศึกษาของ Subbramaniam *et al.* (2003) สารสกัด methanol ของใบชะพลู สามารถกำจัดอนุมูลอิสระแบบ superoxide ได้ร้อยละ 88 การศึกษาของ Azlina *et al.* (2011) พบว่า ใบชะพลูมีฤทธิ์ในการปกป้องปอดในหนูทดลองที่ชักนำให้เกิดภาวะ oxidative stress การทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธี Ames test เป็นการนำเชื้อ *S. typhimurium* TA98 (ตรวจสอบการกลายพันธุ์แบบ frame-shift substitution) และ TA100 (ตรวจสอบการกลายพันธุ์แบบ base-pair substitution)

ซึ่งจะพิจารณาจากการเปลี่ยนลำดับที่ของนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอที่จุดย่อย (point mutation) บนโครโมโซมโดยผลจากการศึกษาพบว่าฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์จะเพิ่มความสามารถมากขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นมากขึ้นตามไปด้วย โดยสารสกัดใบชะพลูที่มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ที่ดีที่สุดคือ สารสกัดชั้น dichloromethane ให้ค่าการต้านการก่อกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Nuntatovattana and Tongyong (2010) ที่พบว่า สารสกัดใบชะพลูด้วยอะซิโตน ที่ปริมาณ 0.8 – 3.2 mg/plate ให้ค่าการต้านการก่อกลายพันธุ์สูงกว่าร้อยละ 80 inhibition ทั้ง TA 98 และ TA 100 และนอกจากนี้ยังพบว่า ใบชะพลูที่มาประกอบอาหารสำเร็จรูปยังคงมีฤทธิ์ในการต้านการก่อกลายพันธุ์ด้วย ได้แก่ การศึกษาของ Somdee *et al.* (2010) พบว่า สารสกัด hexane ของ แกงห้วยปลีกับซีโรงหมูใส่ชะอมและใบชะพลู ไม่มีผลก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ และมีฤทธิ์การต้านการก่อกลายพันธุ์ที่ระดับ  $IC_{50}$  เท่ากับ 4.38 และ 6.82 mg/plate ใน TA 98 และ TA 100 ตามลำดับ และการศึกษาของ Tangkanakul *et al.* (2011) พบว่า สารสกัด methanol ของ แกงหอยใบชะพลู มีความสามารถต้านการก่อกลายพันธุ์ ที่ร้อยละ 70 ในสายพันธุ์ TA 98 ซึ่งถือว่ามียุทธในระดับที่สูง

จากการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการยืนยันได้ว่า ใบชะพลูมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันและมีฤทธิ์ในการต้านการก่อกลายพันธุ์ได้ และเป็นแนวทางในการที่จะพัฒนาสารสกัดใบชะพลูเป็นผลิตภัณฑ์ที่ช่วยป้องกันโรคหรืออาการผิดปกติที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระหรือสารก่อกลายพันธุ์

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนวิจัยสำหรับนิสิตบัณฑิตศึกษา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ปี 2555 และ ขอขอบคุณ รศ.ดร.แก้ว กังสดาลอำไพ ที่อนุเคราะห์ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100

## References

- Apisariyakul A., Investigation of fractions isolated from Thai medicinal plants affecting isolated rat ileum. In: *Proceedings of the 10th Conference of Science and Technology of Thailand*, Chiangmai, 1984:450-451.
- Apisariyakul A., Anantasam V., A pharmacological study of the Thai medicinal plants used as cathartics and antispasmodics. In: *Proceedings of the 10th Conference of Science and Technology of Thailand*, Chiangmai, 1984: 452-453.
- Atiax E., Ahmad F., Sirat H. M., and Arbain D., Antibacterial Activity and Cytotoxicity Screening of Sumatran Kaduk (*Piper sarmentosum* Roxb.) *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 2011; 10(1): 1-5.
- Azlina MFA., Kamisah Y., Rahman RFA., Faizah O., *Piper sarmentosum* Roxb protects lungs against oxidative stress induced by

- carbon tetrachloride in rats. *JMPR* 2011;5(26) : 6128-6135.
- Benzie I.F.F., Strain J.J., Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simutanous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Ezymol* 1999;(299): 15-27.
- Boonyaprapat N, Chokchaijarunporn A., Folk medicinal plants (Thai). Bangkok: Prachachon Ltd Publisher 1996; 308.
- Calomme M., Pieters L., Vlietinck A., BergheCV., Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. *Planta Med* 1996; (62): 22-66.
- Chanwitheesuk A., Teerawutgulrag., Rakariyatham N., Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry* 2005; 92 : 491-497.
- Chu YH, Chang CL, Hsu HF., Flvonoids content of several vegetables and their antioxidant activity. *Sci Food Agric* 2000;80(5): 561-566.
- Han G, Ma Y, Li C., The studies of natural PA-Fantagonistic neolignans from Piper genus and their struc-ture-activity relationships. *Beijing YikeDaxueXuebo* 1992; 24: 347-50.
- Hafizah AH, Zaiton Z, Zulkhairi A, Ilham AM, Anita MM, and Zaleha AM., Piper sarmentosum as an antioxidant on oxidative stress in human umbilical vein endothelial cellsinduced by hydrogen peroxide. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed &Biotechnol)* 2010 11(5): 357-365.
- Kangsadalampai K., Butryee C., Mnoonphol K., Direct mutagenicity of the polycyclic aromatic hydrocarbon containing fraction of smoked and charcoal-broiled foods treated with nitrite in acid solution. *Food Chem Toxicol*1996; (35): 213-218.
- Kangsadalampai K. and S. Soiphet., Antimutagenicity of 4-Hexylresorcinol Against Urethane in Somatic Mutation and Recombination Test , *Thai J. Pharm. Sci.* 2005; 29 (1-2): 21-27.
- Kratchanova M., Denev P., Ciz M., Lojek A. and Mihailov A., Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *ActaBiochemica Polonica* 2010; 57(2): 229-234.
- Nuntatovattana T., Tongyonk L., Antimutagenic effect of the extract from selected Thai green vegetables. *J Health Res* 2010; 24(2): 61-66.
- Peungvicha P, Thirawarapan SS, TamsiririrkkulR, Watanabe H, Prasain JK, Kadota S., Hypoglycemiceffect of the water extract of *Piper sarmentosum* in rats. *J Ethnopharmacol* 1998; 60:27-32.
- Pongmarutai M., Study on antidiabetic action of *Piper sarmentosum*. In: *Research Abstracts and Text Books*1969-1989, Prince of Songkhla University, Thailand, 1989: K 15.
- Puchadapirom P., Temcharoen P., Kongtim S., Himakoun L.,Peungvicha P., Tamsirir-

- irkkul R., Effect of the water extract of Chaplu (*Piper sarmentosum*) on the chromosomal damage of the bone marrow cells in rats by using micronucleus test. *Thai Journal of Phytopharmacy* 2004;11(1): 11-19.
- Rao N., Mittal S., Sudhanshu and Menghani E., Antioxidant Potential and Validation of Bioactive  $\beta$ -Sitosterol in *Eulophia camp-estris* Wall. *Advanced in BioResearch* 2013; 4 (1): 136-142.
- Silpasuwan S., Studies of the effects of some medicinal plants on growth of some bacteria in the family Enterobacteriaceae. MS Thesis, Chiangmai University, 1979.
- Somdee T., Wibuloutai J., Phetsom J., Mahaweerawat U., A study of mutagenicity and anti-mutagenicity of non-polar extracts in cooked local vegetable food recipe by Ames test. *KKU Res J* 2010; 15(11): 1015-1022.
- Sumazian Y., Syahida A., Hakim M. and Maziah M. Antioxidant activities, flavonoids, ascorbic acid and phenolic contents of Malaysian vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010 4(10). 881-890
- Sunbhanich M, Pongmarutai M, Ridditid W., A Preliminary study on pharmacological effect of *Piper sarmentosum* Roxb. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 1988;10:305-12.
- Subramaniam V., Adenan MI, Ahmad AR., Sahdan SR., Natural Antioxidants: *Piper sarmentosum* (Kadok) and *Morinda elliptica* (Mengkudu). *Mal J Nutr* 2003; 9(1): 41-51.
- Tangkanakul P., Trakontivakorn G., Saengprakai J., Auttaviboonkul P., Niyomwit B., Lowvitoon N. and Nakahara K., Antioxidant capacity and antimutagenicity of thermally processed Thai foods. *JARQ* 2011; 45(2): 211-218.
- Temsiririrkkul R., Acute and chronic toxicity of *Piper sarmentosum* extract. The report of National Research Council of Thailand, 2002.
- Tongyongk, L., Nuntatovattana, T. Antimutagenicity Effect of the Extracts from Selected Thai Green Vegetables. *Journal of Health Research*, 2010;24(2). 73-80.
- Ugusman A., Zakaria Z., Hui CK., Nordin NAMM., Mahdy ZA., Flavonoids of *Piper sarmentosum* and its cyto-protective effects against oxidative stress. *EXCLI Journal* 2012;11: 705-714.