

7.81, 9.30, 2.05 และ 4.22 ตามลำดับ

อภิปรายผล: สารสกัดหยาบจากผักปลังขาวแบบสดที่หมักด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็งในระบบทางเดินอาหารมากกว่าสารสกัดหยาบจากผักปลังแดงแบบสดที่หมักด้วยเอทานอลร้อยละ 95 โดยมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง KB, KATO III, SW480 และ KKU-M156 ในระดับปานกลางตามข้อกำหนดของ NCI แต่เมื่อทำการแยกสกัดด้วยวิธี partition extraction พบว่า fraction ชั้นคลอโรฟอร์มของสารสกัดหยาบผักปลังแดงมีศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็ง KATO III, SW480, LS 174T และ KKU-M156 มากกว่าประมาณ 3-6 เท่าของสารสกัดหยาบผักปลังขาว

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: ผักปลังแดงแบบสดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 และทำการแยกสกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็งโรกระบบทางเดินอาหารที่ดีที่สุด โดยฤทธิ์ที่แตกต่างกันอาจเนื่องจากสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวิเคราะห์หาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ การทดสอบในสัตว์ทดลอง และการทดสอบความเป็นพิษเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในอนาคต

คำสำคัญ: ผักปลังขาว, ผักปลังแดง, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง, โรคมะเร็งในระบบทางเดินอาหาร

Comparison of Cytotoxic Activity against Gastrointestinal Cancer Cell Lines of *Basella alba* L. and *Basella rubra* L. Extracts

Yanisa Ruaysup^{*}, Srisopa Ruangnoo^{†, §}, Arunporn Itharat^{†, ‡}

^{*}Master of Science Program in Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Klong Nueng Sub-District, Klong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

[†]Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Klong Nueng Sub-District, Klong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

[‡]Center of Excellent in Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Klong Nueng Sub-District, Klong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

[§]Corresponding author: srisopa_r@yahoo.com

Abstract

Introduction and objective: *Basella alba* L. and *B. rubra* L. (*phak plang* in Thai) are medicinal plants in many Asian countries, and they have been traditionally used as food and traditional medicine for treatments of constipation and peptic ulcer. This study aimed to investigate and compare cytotoxic activity against gastrointestinal cancer cell lines of *B. alba* and *B. rubra* extracts.

Methods: The extractions of *B. alba* and *B. rubra* were undertaken by maceration with 95% ethanol and then by the partition extraction method. All extracts were examined for cytotoxic activity against gastrointestinal cancer cell lines namely oral epidermoid carcinoma (KB), gastric carcinoma (KATO III), colorectal adenocarcinoma (SW480 and LS 174T), cholangiocarcinoma (KKU-M156), and hepatocellular carcinoma (Hep G2), and normal cell lines including HaCat (immortal human epidermal keratinocytes) by SRB assay.

Results: The *B. alba* crude extract showed higher cytotoxic activity against gastrointestinal cancer cell lines than *B. rubra*. The *B. alba* crude extract showed cytotoxic activity against KB, KATO III, SW480 and KKU-M156 cell lines with IC_{50} of 39.31, 33.82, 31.54, 33.79 $\mu\text{g/mL}$, respectively, while LS 174T, and Hep G2 cell lines with IC_{50} of 63.06 and 59.63 $\mu\text{g/mL}$. The *B. alba* crude extract also showed the highest selectivity index (SI) between HaCaT cell lines against cancer cell lines including KB, KATO III, SW480, and KKU-M156 with SI of 2.39, 2.78, 2.98, and 2.79, respectively. In addition, the chloroform mix ethyl acetate fraction of ethanolic extract of fresh

B. alba showed good cytotoxic activity against KB, KATO III, LS 174T, KKU-M156, and HepG2 cell lines except the SW480 cell lines, that the chloroform fraction of ethanolic extract of fresh *B. rubra* had higher activity. Interestingly, the chloroform fraction of ethanolic extract of fresh *B. rubra* showed an SI value better than *B. rubra*.

Discussion: This research aimed to investigate and compare of cytotoxic activity against gastrointestinal cancer cell lines of *B. alba* and *B. rubra* extracts by SRB assay. The results showed that the *B. alba* crude extract had more potent cytotoxic activity ($SI > 2$) against gastrointestinal cancer cells than *B. rubra* and showed moderate cytotoxic activity against KB, KATO III, SW480 and KKU-M156 cell lines, as established by NCI. Further extraction found that the chloroform fraction of *B. rubra* crude extract had potent cytotoxic activity against KATO III, SW480, KKU-M156, and LS 174T about 3–6 times more than the *B. alba* crude extract.

Conclusion and Recommendation: The extraction of *B. rubra* by maceration with 95% ethanol and fractionated with chloroform showed the best potential cytotoxic activity against gastrointestinal cancer cells. These results provide basic information about the biological activity including cytotoxic activity against gastrointestinal cancer of *Basella* species extracts. However, further investigations on chemical markers, *in vivo* pharmacological activity testing, and toxicity testing are needed for future development as a product.

Key words: *Basella alba* L., *Basella rubra* L., cytotoxic activity, gastrointestinal cancer

บทนำและวัตถุประสงค์

โรคมะเร็งในระบบทางเดินอาหาร เป็นโรคที่พบได้บ่อยทั้งในประเทศไทยและอีกหลายประเทศจากสถิติทั่วโลกขององค์การอนามัยโลก (WHO) ในประเทศไทย พ.ศ. 2563 โรคมะเร็งตับเป็นโรคมะเร็งที่พบได้มากที่สุดเป็นอันดับ 1 โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่พบมากเป็นอันดับ 4^[1] ส่วนมะเร็งกระเพาะอาหารและมะเร็งท่อน้ำดีแม้อุบัติการณ์เกิดโรคไม่สูงมากแต่อัตราการเกิดโรคมียังคงสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในทุกปี ซึ่งใกล้เคียงกับข้อมูลทางสถิติ 10 อันดับโรคมะเร็งที่พบบ่อยในประเทศไทยของสถาบันมะเร็งแห่งชาติในประเทศไทย พ.ศ. 2563 พบว่า ในเพศชายมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งตับและท่อน้ำดีมากที่สุดเป็นอันดับ 1 โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นอันดับ 2 และมะเร็งกระเพาะอาหารเป็นอันดับ 8 ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 20.5, 19 และ 2.6 ตามลำดับ ส่วนในเพศหญิงโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่พบมากเป็นอันดับ 3 โรคมะเร็งตับและท่อน้ำดีเป็นอันดับ 5 และโรคมะเร็ง

กระเพาะอาหารเป็นอันดับ 9 คิดเป็นร้อยละ 10.1, 6.1 และ 1.6 ตามลำดับ^[2] ซึ่งสาเหตุส่วนใหญ่ของโรคมะเร็งดังกล่าวเป็นผลมาจากพฤติกรรมการบริโภคอาหารและการดำเนินชีวิต^[3] การป้องกันการเกิดโรคมะเร็งจึงถือเป็นสิ่งสำคัญอย่างมาก เช่น การหลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารปิ้งย่าง อาหารที่มีไขมันสูง รวมถึงการเลือกรับประทานอาหารที่มีไฟเบอร์สูงก็เป็นส่วนช่วยในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่^[4]

ผักปลังเป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรที่มีไฟเบอร์สูงพบได้ทั่วไปในประเทศแถบเอเชีย ในประเทศไทยพบได้สองชนิดคือ ผักปลังขาว (*Basella alba* L.) (ลำต้นอวบน้ำเขียวเรียบสีเขียว ใบเดี่ยวเรียงสลับเป็นรูปหัวใจ) และผักปลังแดง (*Basella rubra* L.) (ลำต้นอวบน้ำเขียวเรียบสีแดงเข้ม ใบเดี่ยวเรียงสลับเป็นรูปหัวใจ) ผักปลังทั้งสองเป็นพืชล้มลุกจัดอยู่ในวงศ์ BASELLACEAE^[5] คนส่วนใหญ่นิยมนำมารับ

ประทานเป็นอาหารและใช้เป็นยาสมุนไพร มีสรรพคุณเป็นยาระบายอ่อน ๆ ช่วยป้องกันอาการท้องผูก นอกจากนี้ทั้งลำต้นมีฤทธิ์เย็นช่วยขับพิษร้อน ลดไข้ แก้อ่อนใน แก้กะเพาะปัสสาวะอักเสบ ภายนอก ร่างกายใช้รักษาแผลสด แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวกและรักษาโรคผิวหนังอักเสบ^[5-7] ผักปลังประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดเช่น ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แคโรทีนอยด์ ซาโปนินและอัลคาลอยด์ รวมถึงสารจำพวกไฟเบอร์ วิตามิน เกลือแร่และกรดอะมิโนที่จำเป็น^[8-11] ซึ่งมีหลายงานวิจัยระบุว่าสารกลุ่มนี้มีความสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบ^[8,12-18] การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผักปลังที่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดจากใบผักปลังขาวสามารถป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูได้โดยป้องกันการบาดเจ็บของเยื่อบุกระเพาะอาหาร^[6] ลดการหลังกรดและปลดปล่อยสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อช่วยป้องกันการเกิด oxidative stress ในกระเพาะอาหาร^[7,19] สารสกัดผักปลังขาวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A431 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.66 mg/mL ต่ำกว่าสารสกัดจากผักปลังแดงถึงสองเท่า ในขณะที่ค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2 และเซลล์มะเร็งกระดูกชนิด MG63 ของผักปลังทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 7 mg/mL^[20] นอกจากนี้สารสกัดชั้นเมทานอลของผักปลังขาวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.54 μ g/mL^[21] และการศึกษาในหนูพบว่าสารสกัดชั้นน้ำจากใบและเมล็ดผักปลังขาวยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิด Ehrlich ascites carcinoma โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis^[22] การศึกษาฤทธิ์ต้านการ

อักเสบพบว่าสารสกัดจากใบผักปลังขาวชั้นเมทานอลร้อยละ 50 สามารถลดอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan ได้ อย่างมีนัยสำคัญ^[23] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์สมานแผล^[24] และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ^[22]

จากการทบทวนวรรณกรรมผักปลังขาวและผักปลังแดงมีฤทธิ์เป็นยาระบาย ช่วยบรรเทาอาการท้องผูกและยังมียานวิจัยที่พบว่าผักปลังขาวสามารถป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้ ซึ่งคุณประโยชน์ดังกล่าวอาจลดปัจจัยหนึ่งที่จะนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งในระบบทางเดินอาหาร ส่วนผักปลังแดงยังไม่พบงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้ผักปลังทั้งสองยังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระบบทางเดินอาหาร

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ มะเร็งช่องปาก มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดผักปลังขาวและผักปลังแดง

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

ผักปลังขาว (*B. alba*) และผักปลังแดง (*B. rubra*) สดทั้งต้น (Figure 1, Figure 2) ถูกเก็บจากจังหวัดพระนครศรีอยุธยาและได้ถูกนำไปตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์และหมายเลขอ้างอิงของตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย (voucher specimen) จากพิพิธภัณฑ์สมุนไพร กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกโดยหมายเลขอ้างอิง ได้แก่ TTM No. 0005451 และ TTM No. 0005452 ตามลำดับ



Figure 1 *Basella alba* L.

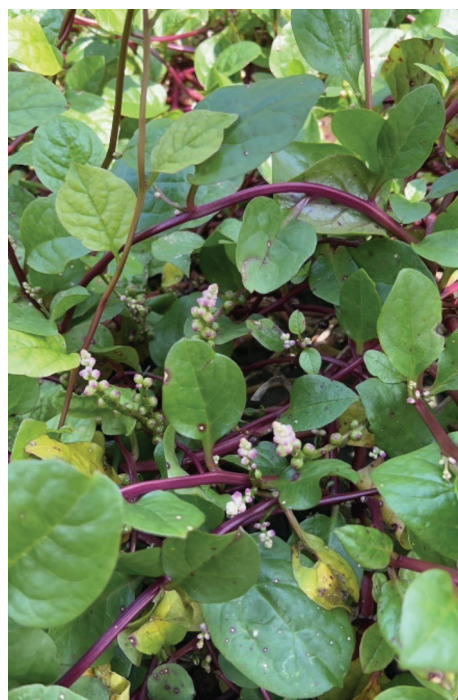


Figure 2 *Basella rubra* L.

2. วิธีการศึกษา

2.1 การสกัดสาร

นำผักปลังสดทั้งสองชนิดมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ หมักด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ในอัตราส่วน 1:3 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองแล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) ทำซ้ำอีกสองครั้ง แล้วอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 °C ให้ตัวทำละลายระเหยหมด จากนั้นนำสารสกัดหยาบของผักปลังทั้งสองมาทำการสกัดแยกด้วยวิธี partition extraction ซึ่งสารจะถูกแยกออกเป็นสัดส่วน (fraction) ตามความสามารถในการละลายหรือความมีขั้วของสารโดยจะใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่าง ๆ เริ่มแรกนำสารสกัดหยาบมาละลายด้วยเมทานอลร้อยละ 95 จากนั้นใส่ในกรวยแยก (separating funnel) แล้วเติมตัวทำละลายลงไปจากขั้วต่ำไปขั้วสูงซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน (hexane) คลอโรฟอร์ม (chloroform) เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) บิวทานอล (butanol) และน้ำ (deionized water) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาทำการทดสอบ

2.2 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activity)

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบมี 6 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB (ATCC No. CCL-17) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด KATO III (ATCC No. HTB-103) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW480 (ATCC No. CCL-228) และ LS 174T (ATCC No. CL-188) เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2 (ATCC No. HB8065) และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M156 ซึ่งเซลล์ KKU-M156 ได้รับการอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.ปิติ อึ้งอารีย์วิทยาและศ.ดร.ภก.วีรพล

คู่คงวิริยพันธุ์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ทำการทดสอบโดยวิธี Sulforhodamine B (SRB) assay^[25-26] สำหรับเซลล์ KATO III และ SW480 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 (ยี่ห้อ Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่เติม 10% Fetal bovine serum (FBS) (ยี่ห้อ Biochem, ประเทศเยอรมัน) และ 1% penicillin-streptomycin (P/S) (ยี่ห้อ Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา) เซลล์ LS 174T ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimum Essential Media (MEM) (ยี่ห้อ Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่เติม 10% FBS และ 1% P/S เซลล์ Hep G2 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่เติม 10% FBS, 1% P/S และ 10 mM Hepes (ยี่ห้อ Gibco, ประเทศไต้หวัน) และสุดท้ายเซลล์ KKKU-M156 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด HAM's F12 (ยี่ห้อ Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา) เติมน้ำด้วย 10% FBS, 1% P/S, 1% Sodium pyruvate ($C_3H_3NaO_3$) (ยี่ห้อ Gibco, ประเทศจีน) และ 12.5 mM Hepes นอกจากนี้ยังทำการทดสอบกับเซลล์ปกติชนิด HaCaT (CLS No.300493) เพื่อใช้ในการคำนวณค่า Selectivity index (SI) ซึ่งถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ยี่ห้อ Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา) เติมน้ำด้วย 10% FBS และ 1% P/S โดยเซลล์ทั้งหมดจะถูกเพาะเลี้ยงภายในตู้บ่มเพาะ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C

สารสกัดจะถูกละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) (ยี่ห้อ RCI Labscan, ประเทศไทย) ที่ปราศจากเชื้อเตรียมที่ความเข้มข้น 20 mg/mL ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงใน 96-well microplate หลุมละ 100 μ L โดยให้ความหนาแน่นของเซลล์ตามอัตรา

การเจริญเติบโตของแต่ละเซลล์ในตู้บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100, 50, 10 และ 1 μ g/mL หลุมละ 100 μ L โดยในแต่ละความเข้มข้นจะทำซ้ำ 4 หลุมแล้วนำไปบ่มต่อในตู้บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS) (ยี่ห้อ Gibco, ประเทศอังกฤษ) ที่ปราศจากเชื้อหลุมละ 200 μ L แล้วดูดออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไปหลุมละ 200 μ L บ่มต่ออีกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรึงเซลล์ที่มีชีวิตด้วย 40% trichloroacetic acid (TCA) (ยี่ห้อ Merck, ประเทศเยอรมนี) ที่เย็นจัดหลุมละ 100 μ L บ่มต่อในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างกรดด้วยน้ำและทำการย้อมเซลล์ด้วยสี 0.4% SRB (ยี่ห้อ Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา) หลุมละ 50 μ L ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ทำการล้างสีส่วนเกินออกด้วย 1% acetic acid (ยี่ห้อ RCI Labscan, ประเทศไทย) ทิ้งเฟลทให้แห้งแล้วละลายสีด้วย 10 mM tris base (ยี่ห้อ Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา) หลุมละ 100 μ L นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (ยี่ห้อ Thermo Scientific, ประเทศออสเตรเลีย) ที่ความยาวคลื่น 492 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณ % growth inhibition และหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ร้อยละ 50)

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{OD control} - \text{OD sample}}{\text{OD control}} \times 100$$

การสรุปว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่ดีจะต้องมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 30 μ g/mL สารสกัดที่มีฤทธิ์ปานกลางต้องมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 50 μ g/mL และสารบริสุทธิ์ (pure compound) ต้องมีค่า

น้อยกว่า $4 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานของ National Cancer Institute (NCI) ประเทศสหรัฐอเมริกา^[27] และต้องคำนึงถึงค่า Selectivity index (SI) ซึ่งคำนวณได้จากค่า IC_{50} (normal cell) หารด้วยค่า IC_{50} (cancer cell) หมายถึงอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพบ่งบอกถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ จากรายงานก่อนหน้านี้หากค่า SI น้อยกว่า 1 ตัวอย่างอาจเป็นพิษและไม่สามารถใช้เป็นยาสมุนไพรได้ หากค่าอยู่ระหว่าง 1-10 ต้องมีการทดสอบซ้ำโดยใช้วิธีการทดสอบทางชีวภาพอื่น ๆ เพื่อยืนยันผลและหากมีค่ามากกว่า 10 ขึ้นไปสันนิษฐานได้ว่าตัวอย่างมีศักยภาพสามารถนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาต่อไปได้^[28-29]

2.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบทั้งหมดได้รับการวิเคราะห์ซ้ำสามครั้ง ($n = 3$) ผลลัพธ์จะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard error of measurement; SEM) ($\text{mean} \pm \text{SEM}$) วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ one-way Analysis of Variance (ANOVA) โดยการใช้การทดสอบ Scheffe เพื่อเทียบความแตกต่างในแต่ละตัวอย่าง ($p\text{-value} < 0.05$)

ผลการศึกษา

1. การสกัดแยกด้วยวิธี partition extraction

การสกัดแยกด้วยวิธี partition extraction ของสารสกัดหยาบของผักปลังขาวและผักปลังแดง (Table 1) พบว่า fraction ชั้นคลอโรฟอร์มจากสารสกัดหยาบผักปลังขาวมีร้อยละผลผลิต (% yield)

มากที่สุดมีค่าเท่ากับร้อยละ 78.26 ส่วน fraction ของสารสกัดหยาบผักปลังแดงพบว่า fraction ชั้นน้ำได้ร้อยละผลผลิตมากที่สุดมีค่าเท่ากับร้อยละ 60.42

2. ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโรครบบทางเดินอาหารของสารสกัดหยาบผักปลังขาวและผักปลังแดง (Table 2) พบว่าสารสกัดหยาบผักปลังขาวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโรครบบทางเดินอาหารทุกเซลล์ได้มากกว่าผักปลังแดง โดยสารสกัดหยาบผักปลังขาวมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด KATO III เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW480 และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M156 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 39.31, 33.82, 31.54 และ 33.79 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด LS 174T และเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 63.06 และ 59.63 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งสารสกัดหยาบผักปลังขาวยังแสดงค่า SI ที่ดีต่อเซลล์มะเร็ง KB, KATO III, SW480 และ KKU-M156 มีค่า SI เท่ากับ 2.39, 2.78, 2.98 และ 2.79 ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดหยาบผักปลังแดงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง KATO III, SW480, KKU-M156 และ Hep G2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 65.97, 52.76, 83.68 และ 94.74 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนผลการทดสอบของเซลล์มะเร็ง KB และ LS 174T ที่ความเข้มข้นสูงสุด 100 $\mu\text{g/mL}$ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้และค่า SI ต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิดมีค่าน้อยกว่า 2

ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ fraction จากสารสกัดหยาบผักปลังขาวและผักปลังแดง (Table 2) พบว่า fraction ชั้นคลอโรฟอร์ม

Table 1 The percentage of yield of the fractions of *B. alba* and *B. rubra* extracts.

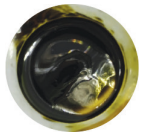
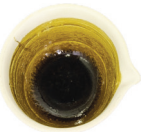
Extract	Fraction	Volume of solvent (mL)	Code	%Yield	Characteristics
Ethanolic extract of fresh <i>B. alba</i> (FAE)	Hexane	450	FAE (H)	3.38	
	CHCl ₃	400	FAE (C)	78.26	
	CHCl ₃ : EtOAc (1:1)	300	FAE (C:E)	1.29	
	Water	200	FAE (W)	5.17	
Ethanolic extract of fresh <i>B. rubra</i> (FRE)	Hexane	300	FRE (H)	9.57	
	CHCl ₃	400	FRE (C)	5.58	
	EtOAc	300	FRE (E)	6.58	
	BuOH	100	FRE (B)	19.34	
	Water	100	FRE (W)	60.42	

Table 2 Cytotoxic activity against six cancer cell lines and normal cell lines of the crude extracts and the fractions of *B. alba* and *B. rubra* extracts.

Sample	IC ₅₀ (μg/mL)						
	KB	KATO III	SW480	LS 174T	KKU-M156	Hep G2	HaCaT
FAE	39.31 ± 2.97 [SI = 2.39]	33.82 ± 1.19 [SI = 2.78]	31.54 ± 4.15 [SI = 2.98]	63.06 ± 5.81 [SI = 1.49]	33.79 ± 0.55 [SI = 2.79]	59.63 ± 5.26 [SI = 1.58]	94.14 ± 1.95
FAE (H)	> 100 [SI = NV]	> 100 [SI = NV]	> 100 [SI = NV]	75.88 ± 3.65 [SI = 1.32]	62.22 ± 3.00 [SI = 1.61]	> 100 [SI = NV]	> 100
FAE (C)	> 100 [SI = NV]						-
FAE (C:E)	5.22 ± 0.24* [SI = 1.60]	6.04 ± 0.40* [SI = 1.39]	5.36 ± 0.14* [SI = 1.56]	5.90 ± 0.73* [SI = 1.42]	6.00 ± 0.08* [SI = 1.40]	5.59 ± 0.09* [SI = 1.50]	8.38 ± 0.62
FAE (W)	> 100 [SI = NV]						-
FRE	> 100 [SI = NV]	65.97 ± 1.97 [SI = 1.52]	52.76 ± 2.32 [SI = 1.90]	> 100 [SI = NV]	83.68 ± 2.94 [SI = 1.20]	94.74 ± 1.97 [SI = 1.06]	> 100
FRE (H)	74.20 ± 4.41 [SI = 1.14]	35.70 ± 1.80 [SI = 2.38]	34.71 ± 0.72 [SI = 2.45]	43.78 ± 4.03 [SI = 1.94]	41.53 ± 2.29 [SI = 2.04]	2.60 ± 4 3.26 [SI = 1.99]	84.90 ± 6.54
FRE (C)	30.35 ± 1.35 [SI = 1.60]	6.21 ± 0.65* [SI = 7.81]	5.21 ± 0.82* [SI = 9.30]	23.59 ± 2.52 [SI = 2.05]	11.48 ± 1.08* [SI = 4.22]	31.07 ± 0.61 [SI = 1.56]	48.46 ± 1.91
FRE (E)	> 100 [SI = NV]						-
FRE (B)	> 100 [SI = NV]						-
FRE (W)	> 100 [SI = NV]						-

All the value expressed as mean ± SEM (n = 3), SI = selective index calculated by IC₅₀ of normal cell lines (HaCaT)/ IC₅₀ values of cancer cell lines, NV = no value since highest concentration 100 μg/mL showed < 50% inhibition of growth. * Showed significant differences compared to the crude extracts and the other fractions depend on the cell line (p-value < 0.05).

ผสมเอทิลอะซีเตตของสารสกัดหยาบผักปลังขาว มีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิดดีที่สุด ยกเว้นต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW480 ซึ่ง fraction ขึ้นคลอโรฟอร์มของสารสกัดหยาบผักปลังแดงมีฤทธิ์ที่ดีกว่าแต่ก็ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.21 $\mu\text{g/mL}$ fraction ขึ้นคลอโรฟอร์มผสมเอทิลอะซีเตตของสารสกัดหยาบผักปลังขาวมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง KB, KATO III, SW480, LS 174T, KKKU-M156 และ Hep G2 เท่ากับ 5.22, 6.04, 5.36, 5.90, 6.00 และ 5.59 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และเมื่อเทียบกันระหว่างกลุ่มเซลล์ KATO III, SW480 และ KKKU-M156 พบว่าค่า IC_{50} ของ fraction ขึ้นคลอโรฟอร์มผสมเอทิลอะซีเตตของสารสกัดหยาบผักปลังขาวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจาก fraction ขึ้นคลอโรฟอร์มของสารสกัดหยาบผักปลังแดง และเมื่อนำ fraction ที่มีฤทธิ์มาทดสอบกับเซลล์ปกติ HaCaT เพื่อคำนวณหาค่า SI พบว่า fraction ขึ้นคลอโรฟอร์มของสารสกัดหยาบผักปลังแดงมีค่า SI สูงที่สุดโดยมีค่าต่อเซลล์มะเร็ง KATO III, SW480, LS 174T และ KKKU-M156 เท่ากับ 7.81, 9.30, 2.05 และ 4.22 ตามลำดับ ในขณะที่ fraction ขึ้นคลอโรฟอร์มและขึ้นน้ำของสารสกัดหยาบผักปลังขาวและ fraction ขึ้นเอทิลอะซีเตต ขึ้นบิวทานอลและขึ้นน้ำของสารสกัดหยาบผักปลังแดงที่ความเข้มข้นสูงสุด 100 $\mu\text{g/mL}$ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโรกระบบทางเดินอาหารทุกชนิดได้

อภิปรายผล

ผักปลัง เป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่พบได้ทั่วไปใช้เป็นยาสมุนไพรและรับประทานเป็นอาหาร ในประเทศไทยพบได้สองชนิด คือ ผักปลังขาว (*B.*

alba) และผักปลังแดง (*B. rubra*) มีสรรพคุณเป็นยา ระบายอ่อน ๆ ป้องกันอาการท้องผูกและรักษาแผล ในกระเพาะอาหาร^[5-7] แต่การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ ผักปลังในปัจจุบันนั้นยังมีไม่มากอย่างเช่นการศึกษา ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระบบทางเดิน อาหาร ดังนั้นการศึกษานี้จึงศึกษาและเปรียบเทียบ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโรกระบบทางเดิน อาหารจากสารสกัดผักปลังขาวและผักปลังแดง ผล การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโรกระบบ ทางเดินอาหารของสารสกัดผักปลังขาวและผักปลัง แดง ได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB, เซลล์มะเร็ง กระเพาะอาหารชนิด KATO III, เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด SW480 และ LS 174T เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKKU-M156 และเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2 โดย วิธี SRB assay ครั้งนี้พบว่า สารสกัดหยาบจากผัก ปลังขาวแบบสดที่หมักด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระบบทางเดินอาหารดี กว่าสารสกัดหยาบจากผักปลังแดงแบบสดที่หมักด้วย เอทานอลร้อยละ 95 โดยที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็ง KB, KATO III, SW480 และ KKKU-M156 ในระดับปานกลางตามข้อกำหนดของ NCI ที่กล่าวว่า สารสกัดที่ออกฤทธิ์ดีต้องมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 30 $\mu\text{g/mL}$ และสารสกัดที่ออกฤทธิ์ปานกลางต้องมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 50 $\mu\text{g/mL}$ ^[27] การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษ ต่อเซลล์มะเร็งในครั้งนี้เป็นทดสอบกับเซลล์มะเร็งช่อง ปากชนิด KB, เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด KATO III, เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW480 และ LS 174T และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKKU-M156 เป็นครั้งแรก ในขณะที่เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2 เคยมีการศึกษา ของ Kumar et al. (2018) มาก่อนซึ่งพบว่าสารสกัดขึ้น น้ำของผักปลังขาวมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ดีกว่า

ผักปลังแดงมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.22 ± 0.13 และ 7.67 ± 0.13 mg/mL^[20] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าสารสกัดหยาบจากผักปลังขาวมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดีกว่าผักปลังแดง นอกจากนี้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของ Kilari et al. (2016) พบว่าสารสกัดชิ้นน้ำของผักปลังแดงสามารถยับยั้งการกระจายของมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการ apoptosis^[30] และการศึกษาของ Islam et al. (2018) ยังพบว่าสารสกัดชิ้นน้ำจากใบและเมล็ดของผักปลังขาวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับชนิด Ehrlich ascites carcinoma (EAC) cells มีร้อยละการยับยั้งเจริญเติบโตของเซลล์เท่ากับ 62.54 ± 2.41 และ 53.96 ± 2.34 ^[22] ตามลำดับ ผลการศึกษาในครั้งนี้มีค่า IC_{50} ดีกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ อาจเป็นเพราะใช้ตัวทำละลายชั้นเอทานอลซึ่งสามารถสกัดสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ได้มากกว่าตัวทำละลายชั้นน้ำ^[31] นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าผักปลังประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด เช่น ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แคโรทีนอยด์ ซาโปนิน และอัลคาลอยด์ รวมถึงสารจำพวกไฟเบอร์ วิตามิน เกลือแร่และกรดอามิโนที่จำเป็น^[8-11] ซึ่งมีหลายงานวิจัยระบุว่าสารกลุ่มนี้มีความสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ^[8,12-18] แต่เมื่อทำการสกัดแยกด้วยวิธี partition extraction พบว่าสารสกัดหยาบผักปลังแดงแบบสดที่หมักด้วยเอทานอลร้อยละ 95 แล้วทำการแยก fraction ด้วยคลอโรฟอร์มมีศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็งในระบบทางเดินอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์ KATO III, SW480, LS 174T และ KKU-M156 ดีที่สุดซึ่งมีศักยภาพมากกว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลของ

ผักปลังขาวแบบสดประมาณ 3-6 เท่า เหมาะสำหรับการนำไปศึกษาต่อในอนาคต ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวิเคราะห์เพิ่มเติมเพื่อหาสารประกอบหลักหรือสารประกอบบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น VLC, CC และ HPLC เป็นต้นซึ่งสารประกอบหลักหรือสารประกอบบริสุทธิ์ดังกล่าวอาจพบได้ในผักปลังแดงมากกว่าผักปลังขาว

ข้อสรุป

ผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าผักปลังแดงแบบสดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 และทำการแยกสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์มมีศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็งโรคระบบทางเดินอาหารที่ดีที่สุด ในขณะที่สารสกัดหยาบผักปลังขาวแบบสดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็งในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ มะเร็งช่องปาก, มะเร็งกระเพาะอาหาร, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดี ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบผักปลังแดง โดยฤทธิ์ที่แตกต่างกันอาจเนื่องจากสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ ผลการศึกษาในครั้งนี้สนับสนุนข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของผักปลังขาวและผักปลังแดง และสามารถนำไปต่อยอดโดยการวิเคราะห์หาสารสำคัญ การทดสอบในสัตว์ทดลอง และการทดสอบความเป็นพิษเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย

References

1. World Health Organization. Thailand Source: Globocan 2020. [Internet]. 2021 [cited 2021 Mar 5]; Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/764-thailand-fact-sheets.pdf>.
2. National Cancer Institute. Hospital-based cancer registry 2021 [Internet]. 2022 [cited 2023 Jan 17]; Available from: https://www.nci.go.th/e_book/hosbased_2564/index.html.
3. Arnold M, Abnet CC, Neale RE, Vignat J, Giovannucci EL, McGlynn KA, Bray F. Global burden of 5 major types of gastrointestinal cancer. *Gastroenterology*. 2020;159(1):335-49.e15.
4. American Cancer Society. Colorectal cancer. [Internet]. 2021 [cited 2021 Jan 12]; Available from: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer.html>.
5. Chatchawal C, Nualkaew N. Ceylon Spinach (L.), a nutritious local vegetable with potential for health food production. *J Thai Trad Alt Med*. 2009;7(2-3):197-201. (in Thai)
6. Kumar V, Bhat Z, Kumar D, Khan N, Chashoo IA, Ara I. Gastroprotective effect of leaf extracts of *Basella alba* var. *alba* against experimental gastric ulcers in rats. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2012;22:657-62.
7. Jaiswal SK, Rao CV. Evaluation of standardized fractions of *Basella alba* leaves as gastroprotective activity on ulcerated rats. *Orient Pharm Exp Med*. 2016;16:339-47.
8. Deshmukh S, Gaikwad D. A review of the taxonomy, ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Basella alba* (BASELLACEAE). *J Appl Pharm Sci*. 2014;4(1):153-65.
9. Glassgen WE, Metzger JW, Heuer S, Strack D. Betacyanins from fruits of *Basella rubra*. *Phytochemistry*. 1993;33(6):1525-7.
10. Kumar S, Prasad A, Iyer S, Vaidya S. Systematic pharmacognostical, phytochemical and pharmacological review on an ethno medicinal plant, *Basella alba* L. *J. Pharmacogn. Phytotherapy*. 2013;5(4):53-8.
11. Murakami T, Hirano K, Yoshikawa M. Medicinal foodstuffs. XXIII. 1) structures of new oleanane-type triterpene oligoglycosides, basellasaponins A, B, C, and D, from the fresh aerial parts of *Basella rubra* L. *Chem Pharm Bull*. 2001;49(6):776-9.
12. Abotaleb M, Liskova A, Kubatka P, Býssekberg D. Therapeutic potential of plant phenolic acids in the treatment of cancer. *Biomolecules*. 2020;10(2):221.
13. Abotaleb M, Samuel SM, Varghese E, Varghese S, Kubatka P, Liskova A, Büsselberg D. Flavonoids in cancer and apoptosis. *Cancers*. 2018;11(1):28.
14. Kanner J, Harel S, Granit R. Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem*. 2001;49(11):5178-85.
15. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*. 2020;12(2):457.
16. Olajire A, Azeez L. Total antioxidant activity, phenolic, flavonoid and ascorbic acid contents of Nigerian vegetables. *Afr. J. Food Sci. Technol*. 2011;2(2):22-9.
17. Oluwakemi OA, Akindele AJ, Bosede FS. Ascorbic acid, total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of two cultivars of *Basella alba*. *Food Sci. Technol*. 2017;5(4):92-6.
18. Maisuthisakul P, Pasuk S, Ritthiruangdej P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J. Food Compos. Anal*. 2008;21(3):229-40.
19. Venkatalakshmi P, Senthamaraiselvi V. Anti-ulcer effect of *Basella alba* leaf extract in aspirin induced albino rats. *Int J Pharm Sci Res*. 2012;3(8):2539.
20. Kumar BR, Anupam A, Manchikanti P, Rameshbabu AP, Dasgupta S, Dhara S. Identification and characterization of bioactive phenolic constituents, anti-proliferative, and anti-angiogenic activity of stem extracts of *Basella alba* and *rubra*. *J Food Sci Technol*. 2018;55:1675-84.
21. Pal K. Cell growth inhibition and apoptosis by extract of *Basella alba* plant on U937 cells. *World J. Pharm. Pharm. Sci*. 2015;5:1251-61.
22. Islam MS, Rahi MS, Jahangir CA, Rahman MH, Jerin I, Amin R, Hoque KMF, Reza MA. *In vivo* anticancer activity of *Basella alba* leaf and seed extracts against Ehrlich's ascites carcinoma (EAC) cell line. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018;2018.
23. Rodda R, Kota A, Sindhuri T, Kumar SA, Gnananath K. Investigation on anti-inflammatory property of *Basella alba* linn leaf extract. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2012;4(1):452-4.
24. Haneefa MKP, Abraham A, Saraswathi R, Mohanta GP, Nayar C. Formulation and Evaluation of Herbal Gel of *Basella alba* for wound healing activity. *J. Pharm. Sci. & Res*. 2010;4(1):1642-8.

25. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(13):1107-12.
26. Itharat A, Houghton PJ, Eno-Amooquaye E, Burke P, Sampson JH, Raman A. *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J Ethnopharmacol.* 2004;90(1):33-8.
27. Suffness M. Assays related to cancer drug discovery. *Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity.* 1990;6:71-133.
28. Peña-Morán OA, Villarreal ML, Álvarez-Berber L, Meneses-Acosta A, Rodríguez-López V. Cytotoxicity, post-treatment recovery, and selectivity analysis of naturally occurring podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on breast cancer cell lines. *Molecules.* 2016;21(8):1013.
29. Indrayanto G, Putra GS, Suhud F. Validation of *in-vitro* bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology.* 2021;46:273-307.
30. Kilari BP, Kotakadi VS, Penchalaneni J. Anti-proliferative and apoptotic effects of *Basella rubra* (L.) against 1, 2-dimethyl hydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. *J. Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(1):73-80.
31. Lyu JI, Ryu J, Seo KS, Kang KY, Park SH, Ha TH, Ahn JW, Kang SY. Comparative study on phenolic compounds and antioxidant activities of hop (*Humulus lupulus* L.) strobile extracts. *Plants.* 2022;11(1):135.