ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ต้านก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* กวาวเครือแดง *Butea superba* และกวาวเครือดำ *Mucuna collettii* ด้วยวิธีทดสอบแบบเอมส์

นายเกศ พูลเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-2293-8

MUTAGENIC AND ANTIMUTAGENIC ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica*, RED KWAO KRUA *Butea superba* AND BLACK KWAO KRUA *Mucuna collettii* BY AMES TEST

Mr. Kade Pulcharoen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-14-2293-8

Thesis Title	MUTAGENIC AND ANTIMUTAGENIC ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica,* RED KWAO KRUA *Butea superba* AND BLACK KWAO KRUA *Mucuna collettii* BY AMES TEST
By	Mr. Kade Pulcharoen
Program in	Biotechnology
Thesis Advisor	Associate Professor Wichai Cherdshewasart, D.Sc.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Kingkaew Wattanasermkit
.....Chairman
(Associate Professor Kingkaew Wattanasermkit, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Wichai Cherdshewasart, D.Sc.)

.....Thesis Co-advisor
(Associate Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

N. Ngamrojanavanich
.....Member
(Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.)

Chanpen Chanchao
.....Member
(Assistant Professor Chanpen Chanchao , Ph.D.)

เกศ พูลเจริญ: ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ต้านก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* กวาวเครือแดง *Butea superba* และกวาวเครือดำ *Mucuna collettii* ด้วยวิธีทดสอบแบบเอมส์ (MUTAGENIC AND ANTIMUTAGENIC ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica,* RED KWAO KRUA *Butea superba* AND BLACK KWAO KRUA *Mucuna collettii* BY AMES TEST) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร.วิชัย เชิดชีวศาสตร์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ จำนวน 153 หน้า ISBN 974-14-2293-8

ทดสอบความเป็นพิษต่อ *Salmonella* Typhimurium TA98 และTA100 ของสารสกัดจากกวาวเครือทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารสกัดจากกวาวเครือดำ มีความเป็นพิษมากที่สุด ต่อ *S.* Typhimurium TA98 ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และฤทธิ์ต้านก่อกลายพันธุ์ ด้วยวิธีทดสอบแบบเอมส์ ที่ ระดับความเข้มข้น 0.625, 1.25 และ 2.5 mg/plate (100 µl) ด้วย *S.* Typhimurium TA98 และTA100 ในภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 พบว่าสารสกัดจากกวาวเครือขาว 28 จังหวัด กวาวเครือแดง 24 จังหวัด และกวาวเครือดำ 4 จังหวัดไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ยกเว้นสารสกัดกวาวเครือแดงจากจังหวัดราชบุรีเมื่อนำมาทดสอบด้วย *S.* Typhimurium TA98 ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/plate (100 µl) ในภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ซึ่งมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) การทดสอบฤทธิ์ต้านก่อกลายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/plate (100 µl) ต่อสารก่อกลายพันธุ์ 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2) 0.01 µg/plate (100 µl) ด้วย *S.* Typhimurium TA 100 ในภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ S9 พบว่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ด้วยสาร AF-2 ในกวาวเครือขาวจากจังหวัดอุทัยธานี กวาวเครือแดงจากจังหวัดกาญจนบุรี และกวาวเครือดำจากจังหวัดเชียงใหม่ มีค่าเท่ากับ 25.75, 53.36 และ 50.55 ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยสารก่อกลายพันธุ์ Benzo(*a*)Pyrene (B(*a*)P) 5 mg/plate ในภาวะที่มีเอนไซม์ S9 พบว่า กวาวเครือขาวจากจังหวัดสุโขทัย กวาวเครือแดงจากจังหวัดชลบุรี และกวาวเครือดำจากจังหวัดกาญจนบุรี สามารถยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ด้วยสาร B(*a*)P เท่ากับ 55.95, 88.61 และ 92.87 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และจากการยืนยัน ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ต้านก่อกลายพันธุ์ ที่ ระดับความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 mg/well (10 µl) เมื่อทดสอบด้วย *Bacillus subtilis* H17 and H45 ในภาวะไม่มีเอนไซม์ S9 พบว่าสารสกัดกวาวเครือทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และตรวจพบสารสกัดกวาวเครือดำจากจังหวัดเชียงราย กวาวเครือแดงจากจังหวัดเลย ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 mg/well สามารถยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของสาร AF-2 0.1 µg/well (10 µl) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และกวาวเครือขาวจากจังหวัดอุทัยธานี ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/well สามารถยับยั้ง การก่อกลายพันธุ์ของสาร AF-2 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยสรุปไม่พบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากกวาวเครือทั้งหมด แต่พบฤทธิ์ต้านก่อกลายพันธุ์ในกวาวเครือบางตัวอย่าง และพบฤทธิ์ต้านก่อกลายพันธุ์แรงที่สุดจากกวาวเครือดำ

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4672212223: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: Mutagenicity / Antimutagenicity / *Pueraria mirifica* / *Butea superba* / *Mucuna collettii* / Ames Test / *rec* assay

KADE PULCHAROEN: MUTAGENIC AND ANTIMUTAGENIC ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica,* RED KWAO KRUA *Butea superba* AND BLACK KWAO KRUA *Mucuna collettii* BY AMES TEST. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. WICHAI CHERDSHEWASART, D.Sc., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D. 153 pp. ISBN 974-14-2293-8

Cytotoxicity evaluation of the 3 plant extracts on *Salmonella* Typhimurium TA98 and TA 100 revealed that *Mucuna collettii* extract exhibited the strongest cytotoxicity on *S.* Typhimurium TA98. Mutagenic and antimutagenic activities of *Pueraria mirifica*, *Butea superba* and *Mucuna collettii* collected from 28, 24 and 4 provinces, respectively were tested. Their extracts were evaluated by Ames test using *S.* Typhimurium strain TA98 and TA100 under the absence and presence of metabolic activity conditions at the concentration of 0.625, 1.25 and 2.5 mg/plate (100 µl) in comparison with the control. No mutagenicity was induced by all plant extracts except *B. superba* collected from Ratchaburi province which exhibited mutagenicity ($P < 0.05$) in *S.* Typhimurium strain TA98 under the absence of metabolic activity condition at the concentration of 2.5 mg/plate (100 µl). In the test with mutagenicity on *Salmonella* strains, all plant extracts exhibited significant inhibition ($P<0.05$) against 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2) and Benzo(*a*)Pyrene (B(*a*)P). *P. mirifica* collected from Uthai Thani, *B. superba* collected from Kanchanaburi, *M. collettii* collected from Chiang Mai inhibited mutagenicity induced by AF-2 0.01 µg/plate (100 µl) on *S.* Typhimurium strain TA100 at the inhibition percentage of 25.72, 53.36 and 50.55, respectively. *P. mirifica* collected from Sukhothai, *B. superba* collected from Chonburi, *M. collettii* collected from Kanchanaburi inhibited mutagenicity induced by B(*a*)P 5 µg/plate on *S.* Typhimurium strain TA100 at the inhibition percentage of 55.95, 88.61 and 92.87, respectively. The mutagenicity and antimutagenicity assay of the plant extracts were confirmed in *rec* assay with *Bacillus subtilis* strain H17 and H45 under the absence of metabolic activity conditions. All plant extracts at the concentration of 2.5, 5 and 10 mg/well (10 µl) exhibited no mutagenicity. *Mucuna collettii* collected from Chiang Rai and *Butea superba* collected from Loei exhibited significant inhibition ($P < 0.05$) against AF-2 0.1 µg/well (10 µl) at the concentration of 2.50 mg/well (10 µl), and *P. mirifica* collected from Uthai Thani exhibited significant inhibition ($P < 0.05$) against AF-2 at the concentration of 10 mg/well (10 µl). In summary, all Kwao Krua in this study showed no mutagenicity but antimutagenicity was detected in certain samples. The strongest antimutagenicity was found in *M. collettii.*

Field of study…Biotechnology ……Student's signature……Kade K.……

Academic……2005…… .Advisor's signature……

Co-advisor's signature ……

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deeply appreciation and grateful thanks to my advisor, Associate Professor Dr. Wichai Cherdshewasart, Department of Biology, for his extremely helpful guidance, suggestions, continual encouragement and interest throughout this study as well as for his huge collected plant samples from his own research. Especially I would like to really thank Associate Professor Dr. Sirirat Rengpipat, Department of Microbiology, with her kindness guidance, Associate Professor Dr. Kingkaew Wattanasermkit, Department of Biology, Associate Professor Dr. Nattaya Ngamrojanavanich, Program in Biotechnology, and Assistant Professor Dr. Chanpen Chanchao, Department of Biology, for their valuable comments and all suggestions.

Special thanks for Department of Microbiology and Biology for laboratory facilities, Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for access to use the necessary instruments for my thesis.

I am indebted to Mrs. Sunan Limthiamcharoen and her colleague to excellent assistance for my study. Sincere thanks for Ms. Rattana Panriansaen, Ms. Sutijit Sriwatcharakul, Ms.Yosaporn Kitsamai, Ms. Wanrawee Sungkapong, Ms. Wandee Sutijit and the members of Kwao Krua Research Laboratory, Department of Biology for their generous help. Thanks for Mr. Adipol Dilokpimol for his warm assistance. Special thanks for Dr. Wannee Kusamran, Ms. Anong Tepsuwan and Ms. Nantana Meesiriphun, National Cancer Institute, for their helpful guidance of Ames's technique.

I really express my whole-heartedly appreciation to my parents, my family members and all of my friends; Ache, Kaew, Mc, Orn, I.C and Bee who have never left me alone.

This project was granted by Central of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

CONTENTS

Page

Page

LIST OF TABLES

Page

Page

LIST OF FIGURES

Page

Page

Page

LIST OF ABBREVIATION

°C	Degree Celsius
AF-2	2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
B(*a*)P	Benzo(*a*)Pyrene
BW	Body weight
°C	Degree Celsius
cm	Centrimetre
DMSO	Dimethyl sulphoxide
DNA	Deoxy ribonucleic acid
hr	hour
IC_{50}	Median Inhibition Concentration
Kg	Kilogram
L	Liter
LD_{50}	Median Lethal Dose
LC_{50}	Median Lethal Concentration
MGA	Minimal Glucose Agar
MW.	Molecular Weight
m	Metre
mm	Millimetre
µM	Micromolor
µg	Microgram
µl	Microliter
ml	Milliliter
min	Minute
ng	Nanogram
PI	Percentage Inhibition
S.E.M.	Standard Mean Error