บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 สมบัติทางกายภาพของสารสกัดจากน้ำหมักพืช

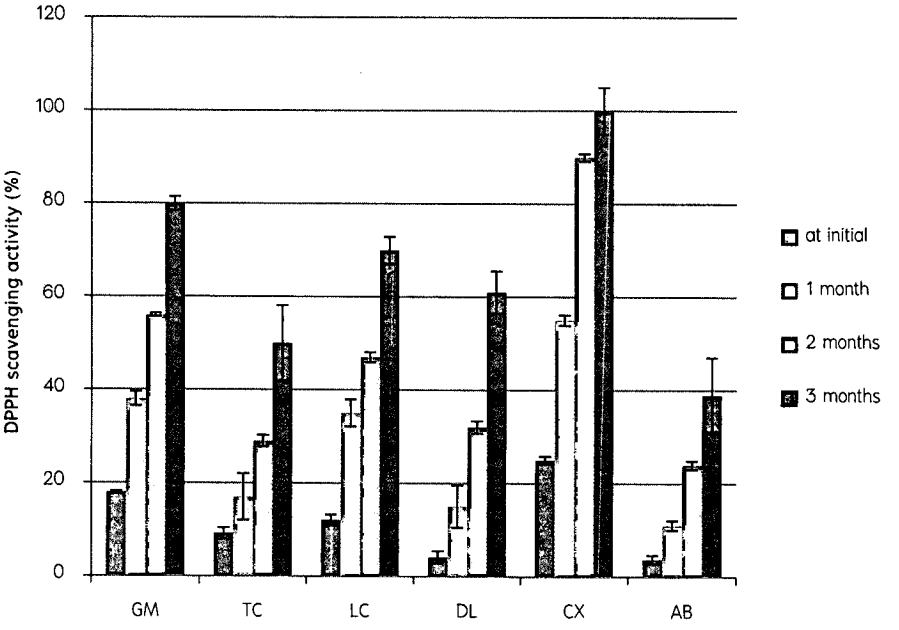
หลังจากการหมักพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ บอระเพ็ด ลิ้นจี่ ลำไย ว่านชักมดลูก มังคุด และตะลิงปลิง โดยใช้วิธีการหมักแบบมาตรฐาน เป็นเวลา 3 เดือน และนำน้ำหมักมาทดสอบสมบัติทางกายภาพ พบว่า สารสกัดส่วนใหญ่มีสีเข้ม และมีกลิ่นแอลกอฮอล์แรง มักมีรสขม โดยน้ำหมักจากพืชบางชนิดอาจมีรสเปรี้ยว หรือหวานได้เล็กน้อย ดัง**ตารางที่ 1**

ตารางที่ 1 สมบัติทางกายภาพของน้ำหมักแต่ละชนิด

Scientific name	Common name	Abbreviation	สี	กลิ่นแอลกอฮอล์	รส	ปริมาณฟองก๊าซ
Garcinia mangostana L.	mangosteen	GM	ม่วงเข้ม	แรง	ขม ฝาด	มาก
Tinospora crispa (L.)	heart – Leaved Moonseed	TC	ดำ	แรง	ขมมาก	น้อย
Litchi chinensis Sonn	lichi	LC	แดงเข้ม	แรง	เปรี้ยว อม หวาน	มาก
Dimocarpus longen Lour.	longan	DL	ดำ	แรง	เปรี้ยว อม หวาน	มาก
Curcuma xanthorrhiza Roxb.	temulawak	CX	ดำ	แรง	เปรี้ยวและมีรสขม	น้อย
Averhoa bilimbi Linn.	bilimbi.	AB	ดำ	แรง	เปรี้ยวและมีรสขม	ปานกลาง

เมื่อนำสารสกัดที่แห้งแล้วของน้ำหมักจากพืชทั้ง 6 ชนิด ที่เวลาเริ่มต้น และหลังจากหมักครบ 1, 2 และ 3 เดือน ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.01 mg/ml มาทดสอบฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH scavenging activity) ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.01 mg/ml พบว่า ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH ของน้ำหมักจากพืชทั้ง 6 ชนิด เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักในน้ำหมักทุกชนิด โดยน้ำหมักที่มีฤทธิ์ดีที่สุด เป็นน้ำหมักจากพืช CX รองลงมาคือ น้ำหมักจากพืช GM, LC, DL, TC และ AB ตามลำดับ ดัง**รูปที่ 4** หากพิจารณาผลการทดสอบเฉพาะเดือนที่ 3 เทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี ที่

แสดงเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้จับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 % (SC_{50}) หลังจากหมักครบ 3 เดือน ดัง**ตารางที่ 2** พบว่า น้ำหมักจากพืช CX และ GM มีค่า SC_{50} ที่ดีกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี (SC_{50} =0.025±0.008 mg/ml) โดยมีค่าเท่ากับ 0.011±0.008 และ 0.015±0.003 mg/ml โดยมีฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีว่าสารมาตรฐานวิตามินซีประมาณ 2.3 และ 1.7 เท่า ตามลำดับ

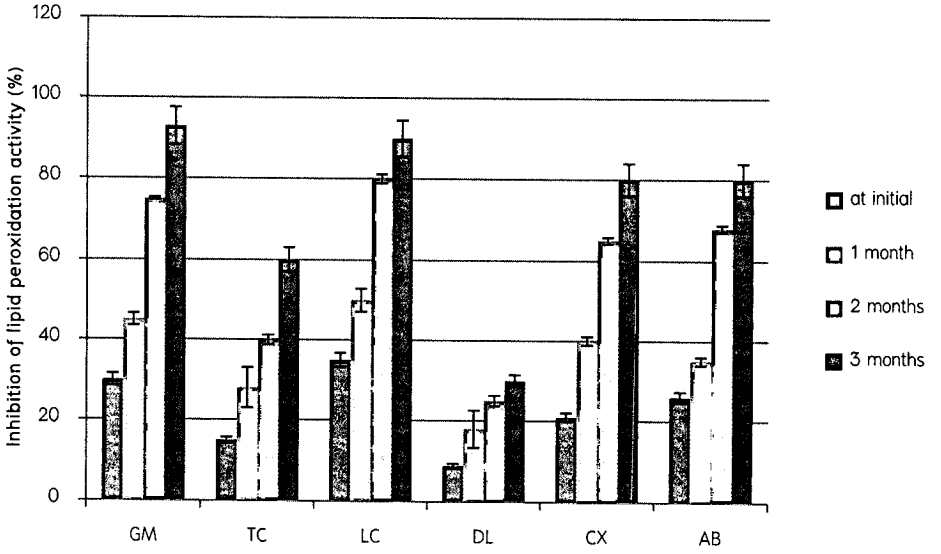


รูปที่ 4 ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH scavenging activity) ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.01 mg/ml ที่เวลาเริ่มต้น หลังจากหมักครบ 1, 2 และ 3 เดือน

ตารางที่ 2 ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH scavenging activity) โดยแสดงเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้จับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 % (SC_{50}) หลังจากหมักครบ 3 เดือน

Scientific name	Abbreviation	SC_{50} (mg/ml)
Garcinia mangostana L.	GM	0.015 ± 0.003
Tinospora crispa (L.)	TC	0.081 ± 0.012
Litchi chinensis Sonn	LC	0.029 ± 0.011
Dimocarpus longen Lour.	DL	0.046 ± 0.013
Curcuma xanthorrhiza Roxb.	CX	0.011 ± 0.008
Averhoa bilimbi Linn.	AB	0.095 ± 0.009
vitamin C		0.025 ± 0.008

เมื่อนำสารสกัดที่แห้งแล้วของน้ำหมักจากพืชทั้ง 6 ชนิด ที่เวลาเริ่มต้น และหลังจากหมักครบ 1, 2 และ 3 เดือน ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.01 mg/ml มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (Inhibition of lipid peroxidation activity) พบว่า ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ขึ้นกับระยะเวลาในการหมักเช่นเดียวกับฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH โดยน้ำหมักที่มีฤทธิ์ดีที่สุด เป็นน้ำหมักจากพืช GM รองลงมาคือ น้ำหมักจากพืช LC, AB, CX, TC และ DL ตามลำดับ ดัง **รูปที่ 5** หากพิจารณาผลการทดสอบเฉพาะเดือนที่ 3 เทียบกับสารมาตรฐานวิตามินอีที่แสดงเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ 50 % (IPC_{50}) หลังจากหมักครบ 3 เดือน **ดังตารางที่ 3** พบว่า น้ำหมักจากพืช GM และ LC มีฤทธิ์ดีที่สุด โดยมีค่า IPC_{50} เท่ากับ 0.015±0.005 และ 0.015±0.012 mg/ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม สารสกัดทั้งสองยังมีฤทธิ์ต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอีประมาณ 30 เท่า

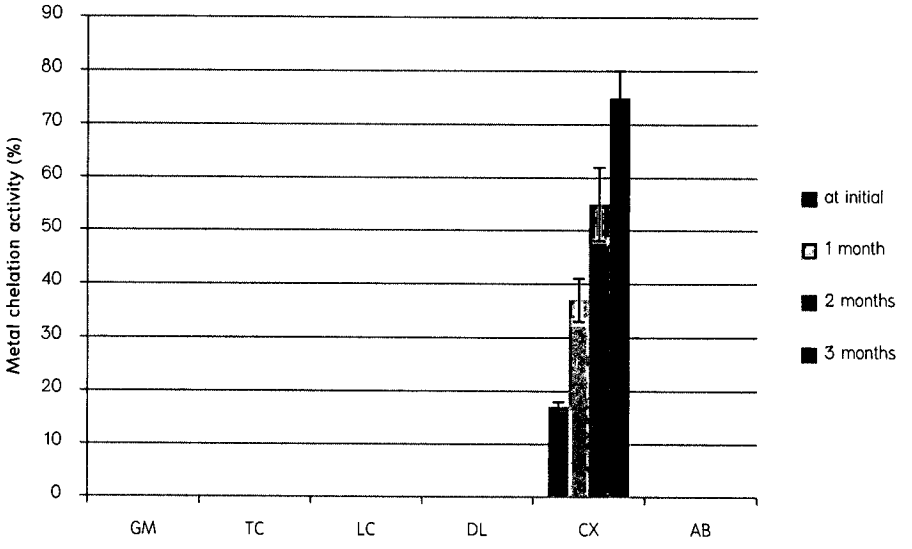


รูปที่ 5 ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (Inhibition of lipid peroxidation activity) ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.01 mg/ml ที่เวลาเริ่มต้น หลังจากหมักครบ 1, 2 และ 3 เดือน

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (Inhibition of lipid peroxidation activity) โดยแสดงเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการยับยั้งปฏิกริยาได้ 50 % (IPC_{50}) หลังจากหมักครบ 3 เดือน

Scientific name	Abbreviation	IPC_{50} (mg/ml)
Garcinia mangostana L.	GM	0.015 ± 0.005
Tinospora crispa (L.)	TC	0.051 ± 0.01
Litchi chinensis Sonn	LC	0.015 ± 0.012
Dimocarpus longen Lour.	DL	0.078 ± 0.01
Curcuma xanthorrhiza Roxb.	CX	0.027 ± 0.01
Averhoa bilimbi Linn.	AB	0.028 ± 0.001
vitamin E		0.000499 ± 0.00005

เมื่อพิจารณาฤทธิ์การจับกับโลหะ (metal chelation activity) ของน้ำหมักจากพืชทั้ง 6 ชนิด ที่เวลาเริ่มต้น และหลังจากหมักครบ 1, 2 และ 3 เดือน ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.01 mg/ml พบว่า มีน้ำหมักจากพืชเพียงชนิดเดียวที่มีฤทธิ์จับกับโลหะ (**รูปที่ 6**) โดยพบว่าสารสกัดจากน้ำหมักที่ CX ที่หมักครบเวลา 3 เดือน มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้จับโลหะได้ 50 % (MC_{50}) เท่ากับ 0.17±0.09 mg/ml ดัง**ตารางที่ 4** โดยมีฤทธิ์ต่ำกว่าสารมาตรฐาน EDTA ประมาณ 1000 เท่า

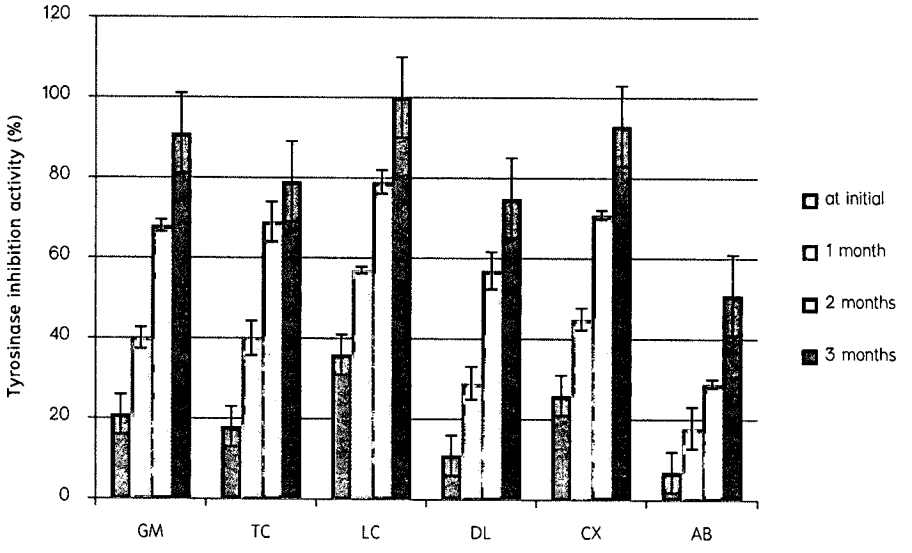


รูปที่ 6 ฤทธิ์การจับกับโลหะ (metal chelation activity) ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.01 mg/ml ที่เวลาเริ่มต้น หลังจากหมักครบ 1, 2 และ 3 เดือน

ตารางที่ 4 ฤทธิ์การจับกับโลหะ (metal chelation activity) โดยแสดงเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้จับโลหะได้ 50 % (MC_{50}) หลังจากหมักครบ 3 เดือน

Scientific name	Abbreviation	MC_{50} (mg/ml)
Garcinia mangostana L.	GM	-
Tinospora crispa (L.)	TC	-
Litchi chinensis Sonn	LC	-
Dimocarpus longen Lour.	DL	-
Curcuma xanthorrhiza Roxb.	CX	0.17 ± 0.09
Averhoa bilimbi Linn.	AB	-
EDTA		0.00015 ± 0.00001

สำหรับฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนส ซึ่งมีผลเกี่ยวกับการสร้างเม็ดสีเมลานินของน้ำหมักจากพืชทั้ง 6 ชนิด ที่เวลาเริ่มต้น และหลังจากหมักครบ 1, 2 และ 3 เดือน ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.01 mg/ml พบว่า ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสที่ดีที่สุด เป็นน้ำหมักจากพืช LC รองลงมาคือ น้ำหมักจากพืช CX, GM, TC, DL และ AB ตามลำดับ ดัง**รูปที่ 7** หากพิจารณาผลการทดสอบเฉพาะเดือนที่ 3 เทียบกับสารมาตรฐานกรดโคจิก โดยแสดงเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งฤทธิ์ยับยั้งการจับกับเอนไซม์ไทโรสิเนส (tyrosinase inhibition activity) ได้ 50 % (IC_{50}) หลังจากหมักครบ 3 เดือน ดัง**ตารางที่ 5** พบว่า น้ำหมักจากพืช LC มีฤทธิ์ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.00081±0.0006 mg/ml ซึ่งมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกรดโคจิก ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.00079±0.0004 mg/ml



รูปที่ 7 ฤทธิ์ยับยั้งการจับกับเอนไซม์ไทโรสิเนส (tyrosinase inhibition activity) ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.001 mg/ml ที่เวลาเริ่มต้น หลังจากหมักครบ 1, 2 และ 3 เดือน

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ยับยั้งการจับกับเอนไซม์ไทโรสิเนส (tyrosinase inhibition activity) โดยแสดงเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้จับโลหะได้ 50 % (IC_{50}) หลังจากหมักครบ 3 เดือน

Scientific name	Abbreviation	IC50 (mg/ml)
Garcinia mangostana L.	GM	0.00268 ± 0.0016
Tinospora crispa (L.)	TC	0.00426 ± 0.0008
Litchi chinensis Sonn	LC	0.00081 ± 0.0006
Dimocarpus longen Lour.	DL	0.00408 ± 0.0001
Curcuma xanthorrhiza Roxb.	CX	0.00271 ± 0.0005
Averhoa bilimbi Linn.	AB	0.50996 ± 0.06482
kojic acid		0.00079 ± 0.0004

จากข้อมูลสมบัติทางกายภาพ และฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวของน้ำหมักจากพืชทั้ง 6 ชนิด ทั้งหมด จึงนำข้อมูลทั้งหมดมาประเมิน เรียงลำดับและให้คะแนนน้ำหมักของพืชแต่ละชนิด พบว่าได้ลำดับคะแนนดัง**ตารางที่ 6** พบว่า พืชที่มีคะแนนสูงที่สุด ได้แก่ CX รองลงมาคือ GM, LC, TC, AB และ DL ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ลำดับคะแนนทั้งหมดของสารสกัด

Scientific name	common name	Abbreviation	Score	Ranking
Garcinia mangostana L.	mangosteen	GM	264	2nd
Tinospora crispa (L.)	heart – Leaved Moonseed	TC	189	4th
Litchi chinensis Sonn	lichi	LC	260	3rd
Dimocarpus longen Lour.	longan	DL	166	6th
Curcuma xanthorrhiza Roxb.	temulawak	CX	348	1st
Averhoa bilimbi Linn.	bilimbi.	AB	170	5th

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

หลังจากนำสารสกัดของน้ำหมักจากพืชทั้ง 6 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29), มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งเม็ดสีเมลานิน ($B_{16}F_{10}$) นอกจากนี้ยังทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของร่างกาย เช่น เซลล์ผิวหนัง (skin fibroblast) ด้วยวิธี sulforhodamine B colorimetry assay เพื่อหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ดีที่สุด โดยพิจารณาจากค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดของน้ำหมักจากพืชทั้ง 6 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 50 % โดยพิจารณาพร้อมกับค่าความปลอดภัยของสารสกัดของน้ำหมักจากพืชทั้ง 6 ชนิดในเซลล์ปกติ เพื่อดูค่าความจำเพาะเจาะจงในฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง แต่ไม่ก่อให้เกิดพิษในเซลล์ปกติของสารสกัด ได้ผลการทดลองดัง**ตารางที่ 7** พบว่า สารสกัดของน้ำหมักจากพืช CX สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ทุกชนิด โดยมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ (เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งลำไส้ใหญ่(HT-29), มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งเม็ดสีเมลานิน ($B_{16}F_{10}$) ดังนี้คือ 370±23, 446±27, 386±8 และ 470±14 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ที่ผู้บริโภคนิยมซื้อมารับประทาน และมีราคาแพงนั้น มีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ (เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งลำไส้ใหญ่(HT-29), มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งเม็ดสีเมลานิน ($B_{16}F_{10}$) ดังนี้คือ 3700±112, 293±11, 1480±88, 1660 ±86 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งเม็ดสีเมลานิน ($B_{16}F_{10}$)ได้น้อยกว่าสารสกัดของน้ำหมักจากพืช CX ประมาณ 10, 4 และ 3.5 เท่า ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาค่าความผิดต่อเซลล์ของสารสกัดของน้ำหมักจากพืช CX และผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด พบว่า สารสกัดของน้ำหมักจากพืช CX มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่าผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด โดยมีค่า cell viability เท่ากับ 59.6±3.6 และ 44.4 ±4.6

% ตามลำดับ แสดงว่า สารสกัดของน้ำหมักจากพืช CX มีความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดประมาณ 1.34 เท่า แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดของน้ำหมักจากพืช CX ยังมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งน้อยกว่ายาต้านการเจริญของเซลล์มาตรฐาน Cisplatin และ Doxorubicin

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งลำไส้ใหญ่(HT-29) , มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งเม็ดสีเมลานิน ($B_{16}F_{10}$) (IC_{50}, mg/ml) และความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ปกติ

Scientific name	common name	Abv	IC_{50} (mg/ml)				Cell viability (%)
			HeLa	HT-29	HepG2	$B_{16}F_{10}$	
Garcinia mangostana L.	mangosteen	GM	736±11	451±38	>	655±41	112.5±8.4
Tinospora crispa (L.)	Heart – Leaved Moonseed	TC	862±23	>	615±18	1010±73	39.6±1.3
Litchi chinensis Sonn	lichi	LC	1500±65	>	>	>	104.3±11.1
Dimocarpus longen Lour.	longan	DL	>	>	>	>	68.6±7.4
Curcuma xanthorrhiza Roxb.	temulawak	CX	370±23	446±27	386±8	470±14	59.6±3.6
Averhoa bilimbi Linn.	bilimbi	AB	>	>	>	>	110±9.8
Commercial product			3700±112	293±11	1480±88	1660±86	44.4±4.6
Cisplatin			0.28±0.02	0.19±0.01	26.4±1.2	-	-
Doxorubucin			7.59±0.03	8.21±0.05	0.70±0.02	8.29±0.1	-

หมายเหตุ : “>” หมายถึง มีค่ามากกว่า 1000 mg/ml, “-” หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ