บทคัดย่อ

มะกิ้ง (*Hodgsonia heteroclita* subsp. *indochinensis*) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae ซึ่งเป็นพืชหายากที่ใกล้สูญพันธุ์ ส่วนต่าง ๆ มีสรรพคุณทางยาที่มีการใช้ตามภูมิปัญญา และในเมล็ดมะกิ้งมีน้ำมันปริมาณสูง มะกิ้งจึงเป็นพืชอนุรักษ์ที่ควรศึกษาข้อมูลเพื่อสนับสนุนการใช้ประโยชน์เพื่อมิให้พืชสูญพันธุ์ไป ในแผนงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา การกระจายตัว นิเวศวิทยา และการใช้ประโยชน์ของพืชสกุลมะกิ้ง การขยายพันธุ์ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของมะกิ้ง และศักยภาพของน้ำมันมะกิ้ง จึงแบ่งเป็น 6 โครงการย่อย ดังนี้

1. โครงการที่ 1 การกระจายตัว นิเวศวิทยา และการใช้ประโยชน์ของพืชสกุลมะกิ้ง
2. โครงการที่ 2 การศึกษาการขยายพันธุ์ และสัณฐานวิทยาของมะกิ้ง
3. โครงการที่ 3 การขยายพันธุ์มะกิ้งโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4. โครงการที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของมะกิ้ง
5. โครงการที่ 5 ศักยภาพของน้ำมันมะกิ้งเพื่อใช้เป็นอาหารสุขภาพ
6. โครงการที่ 6 ศักยภาพของน้ำมันมะกิ้งการพัฒนาเป็นสารช่วยทางเภสัชกรรม และเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

ผลการศึกษา ในแต่ละโครงการ มีรายละเอียดดังนี้

จากการสำรวจและการตรวจวินิจฉัยชนิด (identification) โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่ามะกิ้ง (*Hodgsonia heteroclita* subsp. *indochinensis*) คือพืชเพียงชนิดเดียวในสกุล *Hodgsonia* ที่มีการกระจายตัวใน 4 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย น่าน และแม่ฮ่องสอน พบการใช้ประโยชน์ใน 10 ชาติพันธุ์ ได้แก่ กะเหรี่ยง ละว้า ไทยวน ลาหู่ ถิ่น เมี่ยน ดาราอาง (ปะหล่อง) อาข่า ไทเขิน และลีซอ โดยทุกชาติพันธุ์จะนำส่วนของเมล็ดปิ้งไฟรับประทานเป็นของกินเล่น หรือปรุงเป็นน้ำพริก

การศึกษาการขยายพันธุ์ และสัณฐานวิทยาของมะกิ้ง ผลการศึกษาพบว่า ผลมะกิ้งมีลักษณะกลมขนาดใหญ่ สีเขียวและน้ำตาล เปลือกผลบาง ภายในผลประกอบด้วยเนื้อนุ่มสีขาว และเมล็ดขนาดใหญ่สีน้ำตาล รูปไข่ยาว ขนาดใหญ่ จำนวน 6 เมล็ด เมล็ดมีกะลาแข็ง สีน้ำตาลหุ้มเมล็ด เมล็ดประกอบด้วย 2 พู มีผนังสีน้ำตาล มีรูพรุนกั้นระหว่าง 2 พู แต่ละเมล็ดมีเยื่อหุ้มเมล็ด 2 ชั้น ผนังชั้นนอกสีขาว ผนังด้านในสีเหลือง ลักษณะเนื้อในเมล็ดเป็นสีขาวมีน้ำมัน และมีคัพภะอยู่ เมื่อนำเมล็ดมาเพาะในวัสดุปลูกประมาณ 2 สัปดาห์ เมล็ดจึงเริ่มงอก โดยต้นอ่อนจะเจริญทะลุผ่านรูเปิดบริเวณปลายเมล็ด และรอยแตกด้านข้างของเมล็ด บางเมล็ดเจริญเติบโตได้ 1 ต้น บางเมล็ดเจริญเติบโตได้ 2 ต้น และจากการศึกษาพบว่าเปลือกแข็งของเมล็ดไม่ใช่อุปสรรคในการงอกของเมล็ดมะกิ้ง

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการกระตุ้นการเกิดรากของกิ่งชำมะกิ้งสามารถสรุปได้ว่า 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 1,000 มก/ลิตร สามารถกระตุ้นให้กิ่งชำมะกิ้งเกิดรากได้จำนวนมาก ในขณะที่ Indole-3-butyric acid (IBA) ความเข้มข้น 2,000 มก/ลิตร สามารถ

กระตุ้นการเจริญเติบโตทำให้รากมีความยาวมากกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ ส่วนการทดลองปลูกมะกิ้งด้วยเมล็ด ในระบบพรางแสง และปลูกกลางแจ้ง พบว่าการพรางแสงด้วยตาข่ายพรางแสงสีดำ ประมาณ 70% ทำให้ต้นมะกิ้งมีการเจริญเติบโตดีกว่าการปลูกกลางแจ้ง

ในการศึกษาสภาวะของการฆ่าเชื้อที่ผิวและองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ชิ้นส่วนมะกิ้งในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใบและยอดควรใช้สารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 5 % เขย่านาน 10 นาที ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อส่วนปล้องและข้อที่มีตาข้าง ควรใช้สารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 10 % เขย่านาน 5 และ 10 นาที ตามลำดับ และการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดควรใช้สารสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 20 % เขย่านาน 10 นาที จากนั้นได้เพาะเลี้ยงแต่ละชิ้นส่วนบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารกลุ่มออกซินและไซโตในนินในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ร่วมกับ TDZ และ BA พบว่าใบสามารถอยู่รอดและเกิดแคลลัสเล็กๆ ได้ การชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือ เพาะเลี้ยงส่วนของใบเลี้ยง (cotyledon) ในอาหารสูตร MS ที่เติมเติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดมะกิ้ง นำส่วนของใบ เถา เนื้อผล มาสกัดด้วยวิธีการสกัดต่อเนื่องด้วย Soxhlet's apparatus โดยใช้ 95 % เอทานอล เป็นตัวทำละลาย และเนื้อในเมล็ดส่วนหนึ่งนำไปสกัดต่อเนื่องด้วย Soxhlet's apparatus โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ และคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย และอีกส่วนนำไปบีบน้ำมันโดยใช้วิธีการบีบเย็นเครื่องชนิดอัดเกลียว ปริมาณผลผลิตของสารสกัดแอลกอฮอล์จากส่วนใบ, เถา และเนื้อผล มีปริมาณดังนี้ 9.85$\pm$1.61, 6.24$\pm$3.12 and 10.75$\pm$4.35 % w/w ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จาก ใบ เถา เนื้อผลพบสารพวกกลุ่มฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน สเตอรอล และแทนนิน สำหรับน้ำมันมะกิ้ง พบว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันมะกิ้ง ส่วนใหญ่เป็น Linoleic acid 47.01 g/100g และOleic acid 14.92 g/100g สารสกัดแต่ละส่วนที่ได้ นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ก่อมะเร็งและต้านมะเร็งในแบคทีเรียด้วยการทดสอบเอมส์ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ผลพบว่าสารสกัดทุกส่วนของมะกิ้งไม่จัดว่าสารสกัดที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลชีพต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Candida albican* ในการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกิ้ง รวมถึงความสามารถในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ฆ่าและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะกิ้งส่วนต่าง ๆ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดมะกิ้งไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซัลโมเนลลาธัยฟิมิวเรียมสายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น และพบว่าในสภาวะที่มีเอนไซม์กระตุ้นสารสกัดมะกิ้งมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ MeIQ และ AFB_1 ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธัยฟิมิวเรียม โดยเถาที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วย MeIQ ได้สูงสุด ส่วนผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วย AFB_1 ได้สูงสุด แต่ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้นสารสกัดมะกิ้งส่วนใหญ่ไม่มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์

จากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ AF-2 และ NaN_3 ยกเว้นสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลเท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์อย่างอ่อนจากการเหนี่ยวนำด้วย AF-2 ได้ ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดมะกิ้งทุกส่วนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดได้ต่างกัน โดยสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์อีเทอร์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับได้ดีที่สุด แต่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่พบว่าทั้งสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดมะกิ้งส่วนต่างๆ แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แตกต่างกัน โดยสารสกัดเถาที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้สูงที่สุด ส่วนสารสกัดใบที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และมีความสามารถในการกำจัดเหล็กได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดมะกิ้งไม่สามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ต้านมะเร็ง quinone reductase ได้

มะกิ้งจากการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีพื้นฐาน คำนวณโดยน้ำหนักแห้ง พบว่ามีไขมันร้อยละ 37.96 ± 0.97 โปรตีนร้อยละ 30.17 ± 0.37 เถ้าร้อยละ 4.31 ± 0.24 เส้นใยหยาบร้อยละ 2.63 ± 0.61 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 24.93 ± 1.44 เมื่อวิเคราะห์ไขมัน พบว่ามีไขมันอิ่มตัว 17.53 g/100g และมีไขมันไม่อิ่มตัว 27.31 g/100g มี trans fat น้อยกว่า 0.01 g/100g และมีวิตามินอีในรูป alpha-tocopherl 11.08 mg/100g เมื่อวิเคราะห์กรดไขมันอิสระ พบว่ามีกรดไขมันชนิด cis 9,12-Linoleic acid ในปริมาณที่มากที่สุด กรดอะมิโนที่มีปริมาณสูง 4 อันดับแรกเป็นกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ phenylalanine leucine histidine และ lysine (2815 2288 1929 และ 1852 mg/100g ตามลำดับ) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเนื้อในเมล็ดมะกิ้ง โดยวิธี DPPH พบว่ามีค่า IC_{50} 2.65 ± 0.20 และมีค่า GE 0.58 ± 0.05 mg/ml เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี FRAP พบว่ามีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ 4.90 ± 1.05 mM / g $FeSO_4$. $7H_2O$ และเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี ABTS พบว่ามีค่า EC_{50} 10.33 ± 0.12 และมีค่า TEAC 0.70 ± 0.06 micro mol/

การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำมันมะกิ้งเพื่อใช้เป็นเครื่องสำอาง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียมอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ พบว่าตำรับที่เตรียมด้วยอิมัลซิฟายเออร์ผสมที่มี HLB เท่ากับ 12 มีความคงตัวมากกว่าตำรับอื่น เมื่อนำน้ำมันมะกิ้งไปเตรียมครีมใช้น้ำมันร้อยละ 5 ทุกตำรับ ทั้งหมด 5 สูตร พบว่าได้อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ มีสีขาวและเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีฟอง ความหนืดเหมาะสม มีความคงตัวดีไม่แยกชั้นหลังถูกปั่น เมื่อทาบนผิวหนังให้ความรู้สึกเนียน ไม่เหนอะหนะ แผ่กระจายได้ดี ให้ความชุ่มชื้นและไม่มันจนเกินไป ครีมทุกตำรับที่ผ่านการทดสอบความคงสภาพโดยที่สภาวะ 40 °ซ, 4 °ซ และที่อุณหภูมิห้อง จากข้อมูลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ จะเห็นว่าน้ำมันมะกิ้งมีแนวโน้มที่น่าจะเป็นวัตถุดิบที่มีคุณค่าในการใช้ประโยชน์เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพและเครื่องสำอางต่อไป

คำสำคัญ: มะกิ้ง น้ำมันมะกิ้ง การกระจายตัวและนิเวศวิทยา การขยายพันธุ์ ฤทธิ์ทางชีวภาพ

Abstract

Making (*Hodgsonia heteroclita* subsp. *indochinensis*); a rare and endangers species, member in a family Cucurbitaceae. Various parts; leaves, stem, pulp and seeds, have been used as medicine followed the indigenous wisdom. High content of fixed oil found in their seeds. For conservation and sustainable uses, scientific supports are essential. The aims of this research project were to study on the distribution, ecology and uses of plants in Genus *Hodgsonia*, study on propagation, chemical constituents and biological activities and potential for their uses. This research project was divided into 6 subprojects as following;

1. Subproject 1: Distribution, ecology and uses of plants in Genus *Hodgsonia*
2. Subproject 2: Study on propagation and morphology of Making (*Hodgsonia heteroclita* subsp. *indochinensis*
3. Subproject 3: Micropropagation of *Hodgsonia heteroclita* subsp. *Indochinensis*
4. Subproject 4: Chemical constituents and Biological Activities of *Hodgsonia heteroclita* subsp. *Indochinensis*
5. Subproject 5: Potential of Making oil for Health Food
6. Subproject 6: Potential of Making oil for Research and Development as Pharmaceutical Necessity and Cosmetic products

Results of each subproject were shown as following:

From the surveys and identification using morphological characters revealed that "Making" (*Hodgsonia heteroclita* subsp. *indochinensis*) was the only one species in the genus *Hodgsonia* which was found in four provinces including Chiang Mai, Chiang Rai, Nan and Mae Hong Son. In the upper of northern Thailand, the seed of Making was used as food by the ten ethnic groups, including the Karen, Lawa, Lahu, Mien, Palong, Akha, Tai kheun and Lisu. The oil-rich cotyledons were grilled for making chili sauce or snack.

Study on propagation and morphology of Making, the result found that *H. macrocapa* produces big brownish green fruit with thin peel and soft white mesocarp. Six oblong seeds are embedded inside. Seed coat is hard and brown color. It consists of 2 carpels which are separated by porous septa. White testa and yellow integument are

observed. Seed kernel is oily and embryo embedded near micropyle where plumule can grow out. One seed can produce 2 plants. Hard seed coat is not a problem for germination. Study on effects of plant growth regulators on rooting of climber cutting found that 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) 100 ppm promoted number of root, while Indole-3-butyric acid (IBA) promoted root elongation as compared to other treatments. Planting systems under 70 % shading and without shading were observed. Plant growth and development under shading was better than without shading.

For Micropropagation, in this study was carried out to select the most suitable surface-sterilized condition and culture media for *in vitro* propagation of Making's explants. For surface sterilization, leave and shoots were surface sterilized with 5 % Clorox for 5 min., node and internodes were surface sterilized with 10% for 5 and 10 min., respectively, and seed was sterilized with 20 % for 10 min. Then, sterilized explants were placed on semi-solid MS basal medium supplemented with different concentrations of auxins and cytokinins. It was found that leave could survived and produced tiny callus in MS supplemented with combination of 2, 4-D, TDZ and BA. The best callus induction was observed when cotyledon were cultured in MS supplemented with 0.5 mg/l 2, 4-D.

Chemical constituents and biological activities of *H. heteroclita* subsp. *Indochinensis* were studied. Each part of leaves, stem and flesh fruit was separately extracted with Soxhlet's apparatus using 95 % ethanol as solvent. The oil-rich cotyledons were divided into 2 parts; one was extracted with Soxhlet's apparatus using chloroform as solvent and another one was prepared by using screw press. The percentage yield of alcoholic extracts from leaves, stem and flesh fruit were 9.85 ± 1.61, 6.24 ± 3.12 and 10.75 ± 4.35 % w/w, respectively. The result of phytochemical screening of all extracts found that flavonoids, anthraquinones, sterols and tannins were major phytochemical groups. Linoleic acid (47.01 g/100 g) and oleic acid (14.92 g/100 g) were major fatty acid found in Making oil.

Each fractions of alcoholic extracts was evaluated their antioxidant activities, antimutagenicity and mutagenicity by aims test, cytotoxicity test and antimicrobial activities. As results, all fractions did not showed significant results in antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* and *Candida albican*.

Anti-mutagenicity and mutagenicity by aims test, cytotoxicity test and also capacity of quinone reductase inducer were studied in each extracts. The results revealed

that the extracts of Making had no mutagenesis to *Salmonella typhimurium* strain TA 98 and TA100 in condition with and without enzymatic activation. Interestingly, in the condition with enzymatic activation the Making extracts showed anti-mutagenesis to *S. typhimurium* using MeIQ and AFB_1 as mutagens. The most potent was found in the extracts from stem (mutated with MeIQ) and flesh fruit (mutated with AFB_1). However, in the absence of enzymatic activation, almost of the extracts had no anti-mutagenesis to S. typhimurium strain mutated with AF-2 และ NaN_3 except the extract of flesh fruit. Moreover, all of the extracts demonstrated of cytotoxicity with different potency. The extract of flesh fruit showed cytotoxicity in lung cancer cell line while petroleum ether extract of the oil-rich cotyledons gave high cytotoxicity in hepatic cancer cell line. Cytotoxicity of colon cancer cell line was found that the extract of flesh fruit and the oil-rich cotyledons gave high cytotoxicity. In addition, all fractions of the Making extracts gave antioxidant activities with different potency. The extract of stem revealed the most potent in hydroxyl free radical scavenging activity while the leaves extract gave potent activity in DPPH assay and FRAP assay. But all fractions did not induce quinone reductase.

Proximate analysis of Making; base on dry basis, was found that the oil-rich cotyledons had 37.96 ± 0.97 % of lipid, 30.17 ± 0.37 % of protein, 4.31 ± 0.24 % of ash, 2.63 ± 0.61 % of crude fiber and 24.93 ± 1.44 % of carbohydrate. Fat analysis of Making was revealed that The oil-rich cotyledons had 17.53 g/100 g of saturated fat, 27.31 g/100 vg of unsaturated fat, less than 0.01 g/100 g of *trans* fat and 11.08 mg/100 g of vitamin E. Cis 9,12-Linoleic acid (22.15 g/100g) was found as the major fatty acid. Analysis of amino acids was found that the forth ranks of amino acids were essential amino acids, such as phenylalanine, leucine, histidine and lysine (2,815, 2,288, 929 and 1,852 mg/100 g, respectively). Antioxidant activities of Making oil were studied. The results revealed that it gave antioxidant activity in DPPH assay with the value of IC_{50} = 2.65 ± 0.20 mg/ml and 0.58 ± 0.05 mg/ml gallic acid equivalent (GE). For FRAP method, it was found that it had 4.90 ± 1.05 mM/g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ antioxidant abilities. Moreover, Making oil demonstrated antioxidant activity in DPPH assay with the value of EC_{50} = 10.33 ± 0.12 μmol/ml and 0.70 ± 0.06 μmol/ml trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC).

Development of skincare product from Making oil was studied in this project. Hyrophile-lipophile balance (HLB) of Making oil for formulation of oil-in-water emulsion

was determined and showed that emulsion which formulated by HLB 12 emulsifier was the most stable. Formulation of 5 emulsions by using 5 % of Making oil resulted in oil-in-water emulsions. The appearance of emulsions was white and homogenous with no bubble. Viscosity was appropriate. The emulsions showed no separating layer after centrifugation. The product showed smooth texture and good spreadability after applying on skin. All emulsion formulas showed good stability after stored at 40°C, 4°C and room temperature. With good properties of Making oil in its chemical compositions and biological activities resulted that the Making oil has a trend to be a valuable raw material for cosmetic products or health products.

Keyword: *Hodgsonia heteroclita* subsp. *Indochinensis*, Making oil, distribution and ecology, propagation and biological activity