P-ISSN 2586-9000
E-ISSN 2586-9027

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : *http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj*
ปีที่ 30 ฉบับที่ 1 (มกราคม-กุมภาพันธ์ 2565) หน้า [74-84]

ผลของ MeJA และ SA ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของยอดมหาหงส์ในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of MeJA and SA on Total Phenolic Content, Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of *in vitro* *Hedychium coronarium* Shoots

ณัฐนรี ไพสิฐสกุลนาท, เยาวพา จิระเกียรติกุล,* ภาณุมาศ ฤทธิไชย
สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120
Nutnaree Phaisitsakulnat, Yaowapha Jirakiattikul*, Panumart Rithichai
Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,
Thammasat University, Pathum Thani 12120
Received 27 April 2021; Received in revised 3 June 2021; Accepted 16 June 2021

บทคัดย่อ

การกระตุ้นเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของพืชสมุนไพรที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่ออุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ methyl jasmonate (MeJA) และ salicylic acid (SA) ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของยอดมหาหงส์ (*Hedychium coronarium*) โดยเพาะเลี้ยงยอดมหาหงส์บนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม 6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 8.87 µM ร่วมกับ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 2.69 µM และ MeJA ความเข้มข้น 200 – 400 µM หรือ SA ความเข้มข้น 100 – 200 µM นาน 4 สัปดาห์ จากการทดลอง พบว่า SA สามารถกระตุ้นยอดมหาหงส์ในการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่า MeJA โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 100 µM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (57.67±1.80 mg GAE/g dry extract) สูงสุดหรือสูงกว่า 1.24 ของสิ่งทดลองควบคุม (46.49±4.60 mg GAE/g dry extract) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50} เท่ากับ 71.53±2.71 µg/mL) และ $ABTS^{\bullet+}$ (EC_{50} เท่ากับ 326.22±18.91 µg/mL) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (28.09±0.94 เปอร์เซ็นต์) ดีที่สุด ดังนั้น SA ความเข้มข้น 100 µM มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของยอดมหาหงส์ในสภาพปลอดเชื้อ

คำสำคัญ: มหาหงส์; สารต้านอนุมูลอิสระ; ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส; Salicylic acid; สารกระตุ้น

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** yjirakia@tu.ac.th **doi:**

Abstract

Increased secondary metabolite contents of medicinal plants under aseptic culture using the elicitation method could be useful for pharmaceutical and cosmetic industries. The objective of this experiment was to investigate the effect of methyl jasmonate (MeJA) and salicylic acid (SA) at different concentrations on total phenolic content, antioxidant, and tyrosinase inhibitory activities in shoot cultures of *Hedychium coronarium*. The *in vitro* shoots were cultured for four weeks on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 8.87 µM 6-benzyladenine (BA), 2.69 µM 1-naphthaleneacetic acid (NAA), and 200 – 400 µM MeJA or 100 – 200 µM SA. The results revealed that SA was more effective than MeJA for enhancing total phenolic content, antioxidant, and tyrosinase inhibitory activities. The highest total phenolic content of 57.67±1.80 mg GAE/g dry extract was obtained from 100 µM SA treated shoots or 1.24 times higher than that of the control (46.49±4.60 mg GAE/g dry extract). The greatest DPPH and $ABTS^{\bullet+}$antioxidant (EC_{50} of 71.53±2.71 and 326.22±18.91 µg/mL), and tyrosinase inhibitory activities (28.09±0.94%) were also recorded from this treatment. Therefore, 100 µM SA was effective for enhancing antioxidant contents and tyrosinase inhibitory activity of *in vitro H. coronarium* shoots.

Keywords: Antioxidant; Elicitor; *Hedychium coronarium*; Salicylic acid; Tyrosinase inhibition

1. บทนำ

มหาหงส์ (*Hedychium coronarium* J. Koenig) หรือ white ginger เป็นไม้ล้มลุกเนื้ออ่อนที่มีหัว หรือเหง้าอยู่ใต้ดิน มีดอกสีขาว มีกลิ่นหอม พืชชนิดนี้จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae [1] มีสารทุติยภูมิที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ ไดเทอร์ปีน [2] และน้ำมันหอมระเหย ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้สามารถใช้รักษาโรคต่างๆ ได้ เช่น ต้านแบคทีเรีย และเชื้อรา ระงับการอักเสบ ลดความดันโลหิตสูง และต้านมะเร็ง เป็นต้น [3] นอกจากนี้พืชในวงศ์ Zingiberaceae ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (antityrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน การยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวจะช่วยป้องกันการสะสมเม็ดสีเมลานินทำให้ผิวขาวขึ้น [4] จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้มหาหงส์เป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมการผลิตยาและเครื่องสำอางมากขึ้น แต่การปลูกในสภาพธรรมชาติอาจให้ผลผลิตที่มีปริมาณและคุณภาพของสารไม่สม่ำเสมอ นอกจากนี้ต้องใช้เวลาเพาะปลูกนานหลายเดือนจึงจะเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ ทำให้ผลผลิตอาจมีไม่เพียงพอต่อความต้องการ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ โดยวิธีการนี้สามารถผลิตต้นใหม่ให้ได้จำนวนมากในเวลาไม่นาน ได้ต้นใหม่ที่ปลอดโรค และสามารถใช้เป็นแหล่งผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญสำหรับนำไปเป็นยารักษาโรคทางการแพทย์ได้ เนื่องจากเป็นการผลิตในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมสภาพแวดล้อม รวมถึงปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสมต่อความต้องการของพืช ทำให้ผลิตสารทุติยภูมิได้ตลอดทั้งปีอย่างต่อเนื่อง ซึ่งชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงมีข้อมูลทางพันธุกรรมที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ รวมถึงการสังเคราะห์สารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกับต้นแม่พันธุ์ [5] แต่มักพบว่า ชิ้นส่วนพืชที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผลิตสารทุติยภูมิได้ในปริมาณที่น้อยกว่าชิ้นส่วนพืชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ [6] ดังรายงานในพรมมิ (*Bacopa*

monnieri) [7] กระชาย (*Boesenbergia rotunda*) [8] และหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) [9] จึงได้มีการศึกษาเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชสมุนไพรหลายชนิดด้วยการเติมสารกระตุ้นลงในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งการใช้สารกระตุ้นนี้เป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย ลดระยะเวลาในการผลิตจึงเหมาะสำหรับการผลิตเพื่อการค้า [10] สารกระตุ้นที่นิยมใช้ ได้แก่ salicylic acid (SA) methyl jasmonate (MeJA) และ yeast extract (YE) เป็นต้น [6] ซึ่งการใช้ MeJA และ SA เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในพืชที่มีลำต้นใต้ดินเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อได้มีรายงานแล้ว เช่น การเพิ่มปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดของ *Paris polyphylla* Sm. ด้วย SA [11] และสารไอโซ ฟลาโวนอยด์ของกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) ด้วย MeJA [12] รวมถึงพืชในวงศ์ Zingiberaceae เช่น *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt et Smith ที่พบว่า MeJA สามารถกระตุ้นให้เพิ่มปริมาณสาร terpinen-4-ol ได้ [13] และในขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) ที่พบว่า การเติม SA และ YE สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ [14] อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่ง รวมถึงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของยอดมหาหงส์เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาผลของ MeJA และ SA ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในยอดมหาหงส์ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งผลการทดลองนี้จะสามารถผลิตยอดมหาหงส์ในสภาพปลอดเชื้อที่มีคุณภาพ และเพียงพอต่อความต้องการในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง

2. อุปกรณ์และวิธีการ

นำยอดมหาหงส์ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 µM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 µM และ MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 µM หรือ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 µM นาน 4 สัปดาห์ อาหารทุกสูตรที่ใช้ในการทดลองเติมน้ำตาลทราย 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH ของอาหารเท่ากับ 5.6-5.8 ด้วย 1 N NaOH จากนั้นนำไปนึ่งกำจัดเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที สภาพห้องเพาะเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 5 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีน้ำหนักแห้งของยอดประมาณ 2 g บันทึกผลการทดลอง ได้แก่ น้ำหนักสดก่อนและหลังเพาะเลี้ยง แล้วคำนวณค่า growth index (GI) ตามรายงานของ Abeda และคณะ (2014) [15] จากสมการ GI = น้ำหนักสดหลังการเพาะเลี้ยง / น้ำหนักสดก่อนการเพาะเลี้ยง

นำตัวอย่างไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลานาน 3 วัน บันทึกน้ำหนักแห้ง จากนั้นทำการสกัดตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างแห้ง และเอทานอล อัตรา 1:3 โดยปริมาตร สกัดซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งสกัดนาน 3 วัน กรองด้วยกระดาษกรอง และระเหยใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 3 วัน วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ตามวิธีการดังนี้

2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric ตามรายงานของ Autaijamsripon และคณะ (2014) [7] โดยละลายสารสกัดด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL ผสมสารละลาย 2M Folin- Ciocalteu's reagent ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 100 µL สารละลาย 7.5 เปอร์เซ็นต์

Na_2CO_3 ปริมาตร 80 µL และสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 µL ใน 96 well-microplate วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm รายงานผลเป็น mg GAE/g dry extract

2.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ตามรายงานของ Autaijamsripon และคณะ (2017) [7] โดยละลายสารสกัดให้มีความเข้มข้น 5 mg/mL sonicate สารละลายนาน 1 นาที นำสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 µL ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µL วางไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ใช้ BHT เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์มาตรฐาน คำนวณหาค่า EC_{50} ของสารละลายตัวอย่าง

2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ radical cation decolorization assay

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ radical cation decolorization assay โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Re และคณะ (1999) [16] เตรียมสารสกัดตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 mg/mL นำไป sonicate จนสารสกัดละลาย ปิเปตสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 20 µL และสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ reagent ปริมาตร 180 µL ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ใช้ BHT เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์มาตรฐาน คำนวณหาค่า EC_{50} ของสารละลายตัวอย่าง

2.4 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Chan *et al.* (2008) [17] ละลายสารสกัดด้วย absolute ethanol ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 mg/mL นำสารละลายไป sonicate จากนั้นปิเปตสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 20 µL เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M; pH 6.8) ปริมาตร 100 µL เอนไซม์ไทโรซิเนส (300 units/mL) ปริมาตร 40 µL และเติมสารละลาย L-DOPA (8 mM) ปริมาตร 40 µL ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 492 nm ใช้ kojic acid เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมาตรฐาน นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละสิ่งทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเจริญเติบโต

จากการเพาะเลี้ยงยอดมหาหงส์บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 µM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 µM และเติม MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 µM หรือ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 µM เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารกระตุ้นเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ พบว่า ยอดที่ได้รับ MeJA และ SA มีการเจริญเติบโตน้อยกว่ายอดที่ไม่ได้รับสารกระตุ้น โดยค่า growth index (GI) ของยอดที่พัฒนามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง (รูปที่ 1 A) ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้นมีค่า GI สูงสุด เท่ากับ 2.69±0.57 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่า GI ของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 400 µM SA ความเข้มข้น 100 และ 200 µM ที่มีค่า GI เท่ากับ 2.04±0.08 2.02±0.09 และ 1.82±0.20 ตามลำดับ ส่วนน้ำหนักแห้ง พบว่า เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับค่า GI โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้นมีน้ำหนักแห้งสูงสุด เท่ากับ 35.30±0.69

mg/shoot และยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 200 µM มีน้ำหนักแห้งน้อยสุด 24.83±2.19 mg/shoot (รูปที่ 1 B)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า MeJA และ SA ทุกความเข้มข้นส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตของยอดมหาหงส์ ทำให้ยอดมีการเจริญเติบโตลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก MeJA และ SA กระตุ้นให้พืชเกิดกลไกการป้องกันตัวเองคล้ายการถูกรบกวนจากเชื้อจุลินทรีย์ จึงทำให้พืชอยู่ในสภาวะเครียด นอกจากนี้ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolic pathways) ของสารปฐมภูมิไปสร้างและสะสมเป็นสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ [18] ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Abdollahpoor และคณะ (2017) [19] ที่พบว่า ยอด *Hypericum perforatum* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 25 – 100 µM นาน 3 สัปดาห์ มีน้ำหนักสด (0.16 – 0.50 g FW) น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารกระตุ้น (1.00 g FW) หรือการเพาะเลี้ยงยอดของ *Lavandula angustifolia* บนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 5 – 15 mg/L เป็นเวลานาน 21 วัน มีน้ำหนักสด (27.35±1.15 – 85.28±3.41 mg FW) น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม (127.38±4.40 mg FW) [20] อย่างไรก็ตาม สารกระตุ้นเหล่านี้อาจส่งเสริม หรือไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชบางชนิด ดังเช่น แคลลัสของ Rosa hybrida ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 0.05 – 5 µM หรือ SA ความเข้มข้น 100 – 400 µM นาน 15 วัน พบว่า มีน้ำหนักสดไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม (435.25±2.90 – 447.00±3.14 mg FW) [21] และ Ali และคณะ (2007) [22] พบว่า การเพาะเลี้ยงรากของ *Panax ginseng* ร่วมกับการเติม MeJA หรือ SA ความเข้มข้น 200 µM เป็นเวลานาน 3 5 และ 7 วัน มีน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม (4.15±0.08 – 4.54±0.15 g DW/L) ดังนั้น ชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้นที่ต่างกันมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชที่เพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช [23]

3.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

จากการทดลอง พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดมหาหงส์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง (รูปที่ 2 A) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 100 µM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 57.67±1.80 mg GAE/g dry extract และไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 200 µM ที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิค เท่ากับ 53.85±2.99 mg GAE/g dry extract หรือสูงกว่า 1.24 และ 1.16 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม (46.49±4.60 mg GAE/g dry extract) ตามลำดับ ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 µM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดน้อยและไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม โดยมีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 45.75±4.82 และ 43.69±1.39 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ

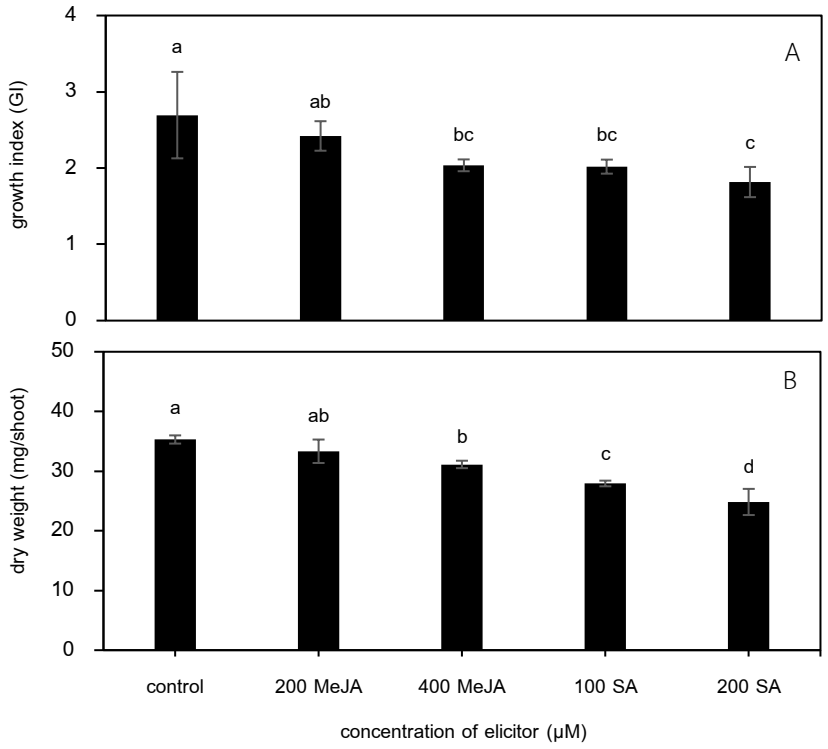

Figure 1 A) Growth index (GI) and B) dry weight of *in vitro H. coronarium* shoots after cultured for 4 weeks on MS medium supplemented with 8.87 μM BA and 2.69 μM NAA in combination with 200 – 400 μM MeJA or 100 – 200 μM SA comparing to non-elicitor treatment

3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการเติม MeJA และ SA ความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ส่งผลให้ยอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (รูปที่ 2 B) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติมสารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิดทุกความเข้มข้น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าสิ่งทดลองควบคุม ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่มี SA ความเข้มข้น 100 μM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 71.53±2.71 μg/mL การเติม SA ความเข้มข้น 200 μM ยอดที่พัฒนามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 97.46±0.75 μg/mL นอกจากนี้ ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่มี MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 μM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 101.68±0.73 และ 126.70±0.54 μg/mL ตามลำดับ ส่วนยอดที่ไม่เติมสารกระตุ้น หรือสิ่งทดลองควบคุมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยที่สุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 132.35±1.12 μg/mL

3.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$

ยอดมหาหงส์ที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA และ SA ความเข้มข้นต่างๆ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (รูปที่ 2 C) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 100 μM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ดีที่สุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 326.22±18.91 μg/mL ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 200 μM และ MeJA ความเข้มข้น 200 μM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 369.23±5.63 และ 368.05±1.71 μg/mL ตามลำดับ ส่วนยอดที่พัฒนาบน

อาหารที่มี MeJA ความเข้มข้น 400 µM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{•+}$ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 421.84±22.03 µg/mL ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม (408.44±4.68 µg/mL)

3.5 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (เปอร์เซ็นต์ inhibition) พบว่า ยอดมหาหงส์ที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA และ SA ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (รูปที่ 2 D) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 100 µM มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด เท่ากับ 28.09±0.94 เปอร์เซ็นต์ หรือสูงกว่า 1.74 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม (16.18±0.31 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา คือ ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 200 µM มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ 22.23±1.32 เปอร์เซ็นต์ หรือสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 1.37 เท่า ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 µM มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ 15.30±0.61 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม ในขณะที่การเติม MeJA ความเข้มข้น 400 µM มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยที่สุด เท่ากับ 13.05±1.20 เปอร์เซ็นต์

ชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้น เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของพืช [6, 24] จากการทดลองจะเห็นได้ว่า การเติม SA ความเข้มข้น 100 และ 200 µM ส่งผลให้ยอดมหาหงส์มีการสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่า MeJA ซึ่ง Vasconsuelo และ Boland (2007) [24] ได้กล่าวไว้ว่าในการกระตุ้นเพื่อเพิ่มสารทุติยภูมินั้น พืชแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้น โดย SA เป็นสารประกอบฟีนอลิคที่จัดอยู่ในกลุ่มของฮอร์โมนพืชที่ได้จากกระบวนการของ shikimic acid pathway ทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ การให้ SA จากภายนอก จะทำให้มีการส่งสัญญาณจากระยะไกลไปยัง methyl salicylic (MeSA) จากนั้น MeSA จะนำสัญญาณที่ได้รับความเครียดจากส่วนต่างๆ ของพืชไปส่งยังเนื้อเยื่อที่อยู่ในสภาวะปกติ และจะเปลี่ยนไปเป็น SA เพื่อกระตุ้นให้เกิดการป้องกันและตอบสนองต่อความเครียดนั้นๆ ด้วยระบบ systemic acquired resistance (SAR) โดยจะกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีน หรือสารเคมีขึ้นมาเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค หรือความเครียดต่างๆ นอกจากนี้เนื้อเยื่อพืชบริเวณที่มี SA สะสมอยู่สามารถถูกกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิชนิดต่างๆ ขึ้นได้ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ โดยจะมีส่วนเข้ามาช่วยในกระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจากสภาวะเครียดต่างๆ ของพืช [25] จากกระบวนการที่กล่าวมา จึงทำให้ SA สามารถกระตุ้นให้ยอดมหาหงส์มีการสร้างสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเพิ่มขึ้น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีขึ้นด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของพืชหลายชนิดที่พบว่า SA ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิต่างๆ ได้ดีกว่า MeJA เช่น *Citrus unshiu* [26], *Withania somnifera* [27] และ *Phyllanthus pulcher* [28] แต่ความเข้มข้นของ SA ที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด จากการทดลองนี้สามารถกล่าวได้ว่า SA ความเข้มข้น 100 µM สามารถกระตุ้นให้ยอดมหาหงส์มีการสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อตอบสนองของพืชในการกระตุ้นเพื่อเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้น สภาพการเพาะเลี้ยง เช่น แสง และส่วนประกอบของอาหาร เป็นต้น [6, 24] ดังนั้นปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จะได้ทำการศึกษาต่อไปในยอดมหาหงส์ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อให้ผลของการกระตุ้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

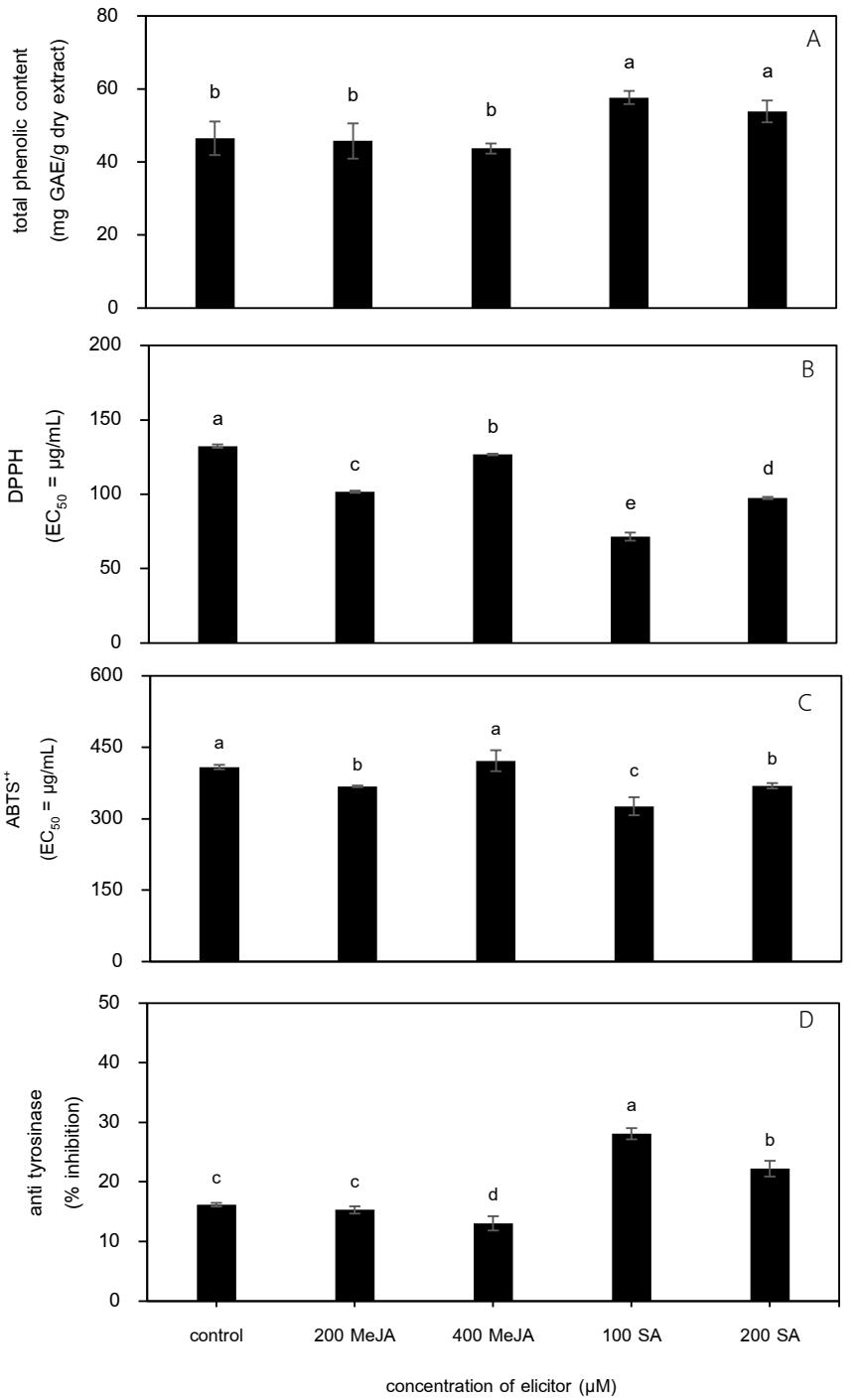

Figure 2 A) total phenolic content, B) DPPH radical scavenging activity, C) $ABTS^{\bullet+}$radical scavenging activity and D) tyrosinase inhibitory activity of *in vitro H. coronarium* shoots cultured on MS medium supplemented with 8.87 µM BA and 2.69 µM NAA in combination with 200 – 400 µM MeJA or 100 – 200 µM SA comparing to non-elicitor treatment for 4 weeks

4. สรุปผลการวิจัย

ยอดมหาหงส์ในสภาพปลอดเชื้อตอบสนองต่อ SA ได้ดีกว่า MeJA โดยยอด SA ความเข้มข้น 100 µM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (57.67±1.80 mg GAE/g dry extract) สูงสุด หรือสูงกว่า 1.24 ของสิ่งทดลองควบคุม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50} เท่ากับ 71.53±2.71 µg/mL) $ABTS^{\bullet+}$ (EC_{50} เท่ากับ 326.22±18.91 µg/mL) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (28.09±0.94 เปอร์เซ็นต์) ดีที่สุด

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ 2563 ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาณัฐ เดชะยนต์ สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่กรุณาให้คำปรึกษา และสอนวิธีการวิเคราะห์หาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และขอขอบคุณหน่วยห้องปฏิบัติการวิจัยกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยนี้

6. References

[1] Pachurekar, P. and Dixit, A. K., 2017, A review on pharmacognostical phytochemical and ethnomedicinal properties of *Hedychium Coronarium* J.Koenig an endangered medicine, International Journal of Chinese Medicine. 1: 49-61.

[2] Matsuda, H., Morikawa, T., Sakamoto, Y., Toguchida, I. and Yoshikawa, M., 2002, Labdane-type diterpenes with inhibitory effects on increase in vascular permeability and nitric oxide production from *Hedychium coronarium*, Bioorg. Med. Chem. 10: 2527-2534.

[3] Joshi, S., Chanotiva, C. S., Agarwala, G., Prakasha, O., Panta, A. K. and Mathelab, C. S., 2008, Terpenoid compositions, and antioxidant and antimicrobial properties of the rhizome essential oils of different *Hedychium species*, Chem. Biodivers. 5: 299-309.

[4] Kim, Y. J. and Uyama, H., 2005, Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, Cell. Mol. Life Sci. 62: 1707-1723.

[5] Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G. A., 2002, Plant cell culture: chemical factories of secondary metabolites, Biotechnol. Adv. 20: 101-153.

[6] Namdeo, A. G., 2007, Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review, Pharmacogn. Rev. 1: 69-79.

[7] Autaijamsripon, J., Jirakiattikul, Y. Rithichai, P, and Itharat, A., 2017, Effect of culture periods on secondary metabolite contents and antioxidant activity of *in vitro Bacopa monnieri* shoots, Thai Science and Technology Journal. 25: 443-452. (in Thai)

[8] Yusuf, N. A., Annuar, M. M. S. and Khalid, N., 2013, Existence of bioactive flavonoids in rhizomes and plant cell cultures of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Kulturpfl, Aust. J. Crop Sci. 7: 730-734.

[9] Jirakiattikul Y, Rithichai P, Songsri O, Ruangnoo S, Itharat A., 2016, *In vitro* propagation and bioactive compound

accumulation in regenerated shoots of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill, Acta Physiol Plant. 38: 249.

[10] Jiao, J., Gai, Q. Y., Wang, X., Qin, Q. P., Wang, Z. Y., Liu, J. and Fu, Y. J., 2018, Chitosan elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures for enhancing flavonoid productivity and gene expression and related antioxidant activity, Ind. Crops Prod. 124: 28-35.

[11] Raomai, S., Kumaria, S., Kehie, M. and Tandon, P., 2015, Plantlet regeneration of *Paris polyphylla* Sm. via thin cell layer culture and enhancement of steroidal saponins in mini-rhizome cultures using elicitors, Plant Growth Regul. 75: 341-353.

[12] Saisavoey, T., Thongchul, N., Sangvanich, P. and Karnchanatat, A., 2014, Effect of methyl jasmonate on isoflavonoid accumulation and antioxidant enzymes in *Pueraria mirifica* cell suspension culture, J. Med. Plants Res. 8: 401-407.

[13] Victório, C. P., Cruz, I. P. D., Kuster, R. M. and Lge, C. L. S., 2011, Terpinen-4-ol is overproduced in tissue cultures of *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt et Smith by induction of methyl jasmonate, Lat. Am. J. Pharm. 30: 1858-1861.

[14] Ali, A. M. A., El-Nour, M. E. M. and Yagi, S. M., 2018, Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors, J. Genet. Eng. Biotechnol. 16: 677-682.

[15] Abeda, H. Z., Kouassi, M. K., Yapo, K. D., Koffi, E., Sie, R. S., Kone, M. and Kouakou, H. T., 2014, Production and enhancement of anthocyanin in callus line of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), Int. J. Rec. Biotech. 2: 45-56.

[16] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Rad. Biol. Med. 26: 1231-1237.

[17] Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Wong, L. F., Lianto, F. S., Wong, S. K., Lim, K. K., Joe, C. E. and Lim, T. Y., 2008, Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species, Food Chem. 109: 477-483.

[18] Chen, H., Chen, F., 2000, Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-transhinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. Process Biochem. 35: 837-840.

[19] Abdollahpoor, M., Kalantari, S., Azizi, M. and Saadat, Y. A., 2017, Effects of methyl jasmonate and chitosan on shoot and callus growth of Iranian *Hypericum perforatum* L. in vitro cultures, J. Medicinal Plants By-Products. 2: 165-172.

[20] Miclea, I., Suhani, A., Zahan, M. and Bunea, A., 2020, Effect of jasmonic acid and salicylic acid on growth and biochemical composition of *in-vitro*-propagated *Lavandula angustifolia* Mill,

Agronomy. doi:10.3390/agronomy10111722.

[21] Ram, M., Prasad, K. V., Singh, S. K., Hada, B. S. and Kumar, S., 2013, Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L, Plant Cell Tiss. Organ Cult. 113: 459-467.

[22] Ali, M. B., Hahn, E. J. and Paek, K. Y., 2007, Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures, Molecules. 12: 607-621.

[23] Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Boonyeun, T., Ruangnoo. S. and Itharat, A., 2020, Improvement of dioscorealide B production by elicitation in shoot cultures of *Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill, Physiol. Mol. Biol. Plants. 26: 585-591.

[24] Vasconsuelo, A.A. and Boland, R., 2007, Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plant, Plant Sci. 172: 861-875.

[25] Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A., 2010, Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review, Environ. Exp. Bot. 68: 14-25.

[26] Yamamoto, R., Ma, G., Zhang, L., Hirai, M., Yahata, M., Yamawaki, K., Shimada, T., Fujii, H., Endo, T. and Kato, M., 2020, Effects of salicylic acid and methyl jasmonate treatments on flavonoid and carotenoid accumulation in the juice sacs of satsuma mandarin in vitro, Appl. Sci. 10, 8916; doi:10.3390/app10248916.

[27] Sivanandhan, G., Rajesh, M., Arun, M., Jeyaraj, M., Dev, G. K., Arjunan, A., Manickavasagam, M., Muthuselvam, M., Selvaraj, N. and Ganapathi, A., 2013, Effect of culture conditions, cytokinins, methyl jasmonate and salicylic acid on the biomass accumulation and production of withanolides in multiple shoot culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal using liquid culture, Acta Physiol. Plant. 35: 715-728.

[28] Danaee, M., Farzinebrahimi, R., Kadir, M. A., Sinniah, U. R., Mohamad, R. and Taha, R. M. 2015. Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher.* Braz, J. Bot. 38: 265-272.