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

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : *http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj*
ปีที่ 30 ฉบับที่ 2 (มีนาคม-เมษายน 2565) หน้า [1-13]

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดขมิ้นอ้อย

Biological Activities of *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe

ชุติมา แก้วพิบูลย์[1,*], ณวงศ์ บุนนาค[2]

[1]*สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210*

[2]*สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ สงขลา 90000*

Chutima Kaewpiboon[1,*], Nawong Boonnak[2]

[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung 93210*

[2]*Department of Basic Science and Mathematics, Faculty of Science, Thaksin University, Songkhla 90000*

Received 14 March 2021; Received in revised from 9 September 2021; Accepted 18 October 2021

บทคัดย่อ

ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe) เป็นพืชสมุนไพรที่จัดอยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) มีสารสำคัญกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของขมิ้นอ้อย แต่เนื่องจาก พืชวงศ์ขิงมีความหลากหลาย และยากต่อการระบุชนิด จึงใช้วิธีการทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล เพื่อระบุชนิด และช่วยยืนยันตัวอย่างพืชที่นำมาใช้การทดลอง จากการทดลองพบว่าพืชตัวอย่างอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae สกุล *Curcuma zedoaria* และมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างจาก *C. longa* นอกจากนี้มีปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกรวมเท่ากับ 84.32±2.21 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี ABTS EC_{50} มีค่าเท่ากับ 150.00±10.00 และ 110.00±5.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 102.5±38.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลจากขมิ้นอ้อยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (HaCaT) โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสารสกัดจากขมิ้นอ้อยจึงมีความน่าสนใจต่อการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ยา และสารปรุงแต่งอาหาร

คำสำคัญ: ขมิ้นอ้อย; ปริมาณฟีนอลิกรวม; ต้านอนุมูลอิสระ; ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส; ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ผิวหนัง

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** chutima.k@tsu.ac.th

Abstract

Curcuma zedoaria (Christm.) Roscoe is a medicinal plant belonging to the family of Zingiberaceae, which contains active compounds as curcuminoids, a wide range of biological activities. Therefore, this research aims to study the biological activities of *C. zedoaria.* However, Zingiberaceae plants showed a rich diversity. The classification based on morphological characters and molecular technique confirmed the plant sample was used in the experiment. From the result, plant sample was belonged to Zingiberaceae, *C. Zedoaria*, and showed that DNA patterns differ from *C. longa*. In addition, the results showed that crude extract exhibited total phenolic compounds of 84.32±2.21 mg GAE/g extract. The antioxidant activities assay by DPPH and ABTS method showed EC_{50} values of 150.00±10.00 and 110.00±5.21 µg/mL, respectively. In addition, the crude extract showed the inhibitory activity of tyrosinase with IC_{50} values of 102.5±38.89 µg/mL. Furthermore, methanol crude extract of *C. zedoaria* was non-cytotoxic against HaCaT cell lines at a concentration of 200 µg/mL. Therefore, developing the *C. zedoaria* extract as a diverse cosmeceutical, medicinal and food additives applications is suggested.

Keywords: *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe; Total phenolic compound; Antioxidant; Inhibitory activity of tyrosinase; Cytotoxicity against HaCaT cell line

1. บทนำ

ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe) จัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) มีลักษณะเด่นคือเป็นพืชล้มลุกหลายฤดู มีลำต้นใต้ดินแบบไรโซมหรือเหง้า และมีกลิ่นเฉพาะซึ่งเกิดจากน้ำมันหอมระเหย จึงมักใช้ผงขมิ้นอ้อยแต่งสีเหลืองในอาหาร เนื่องจากมีสี และกลิ่นเฉพาะ มีถิ่นกำเนิดในอินเดียตะวันออกเฉียงเหนือ และอินโดนีเซีย และพบมากในภูมิประเทศในเขตร้อนชื้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ [1] มีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายขมิ้นชัน (*C. longa* Linn.) ซึ่งจัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ขิงเช่นเดียวกัน ซึ่งในประเทศไทยพบประมาณ 300 ชนิด พืชกลุ่มนี้นับว่าเป็นพืชที่มีวิวัฒนาการสูง เช่น มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครงสร้างดอก หรือโครงสร้างบางส่วนหายไป ดังนั้นการจำแนกพืชสกุลขมิ้นโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะเหง้า สีของเหง้า ตำแหน่งช่อดอก สี และรูปร่างของดอก ยังมีความสับสนอยู่มาก และไม่ชัดเจน เนื่องจากเกิดความผันแปรของลักษณะต่างๆ ตามสภาพแวดล้อม ทาให้พืชสกุลขมิ้นต่างชนิดกันแต่อยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกันมีลักษณะบางประการเหมือนกัน ดังนั้นจึงต้องอาศัยวิธีการอื่นมาช่วยในการจัดจำแนก ซึ่งปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล ช่วยในการจำแนกพืชวงศ์นี้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้ทั้ง 2 วิธี เพื่อจัดจำแนกพืชตัวอย่างก่อนนำมาใช้ศึกษา [2] นอกจากนี้มีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของขมิ้นอ้อยที่หลากหลาย ได้แก่ รักษาโรคความผิดปกติทางโลหิตวิทยา และการไหลเวียนโลหิต [3] ต้านมะเร็ง [4] ต้านการอักเสบ [5] ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา [6] เป็นต้น ซึ่งในพบองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญอยู่ 2 กลุ่ม คือสารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ ซึ่งป็นสารสีเหลืองในพืชสกุลขมิ้น

(*Curcuma* spp.) สารกลุ่มเคอร์คิวมินนอยด์ (curcuminoids) ประกอบด้วย curcumin bisdemethoxycurcumin demethoxycurcumin dihydrocurcumin tetrahydrodemethoxycurcumin tetrahydrobisdemethoxycurcumin Curzerene Furanodiene Furanodienone, Zederone Zedoarone และน้ำมันหอมระเหย ส่วนใหญ่ประกอบด้วย sesquiterpenoids (80–85%) และ monoterpenoids (15–20%) [7] ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสารออกฤทธิ์กลุ่มฟีนอลิก และฤทธิ์ทางชีวภาพของขมิ้นอ้อย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ผิวหนัง เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ และปลอดภัย

2. อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 การเก็บรักษาพรรณไม้แห้ง และระบุชนิดของพืช

เก็บตัวอย่างพืชตามขั้นตอนทางพฤกษศาสตร์ (Bridson and Forman, 1992) [8] เลือกชิ้นส่วนพืชที่สมบูรณ์เป็นธรรมชาติ ทั้งส่วนราก ลำต้นใต้ดิน ใบ ใบประดับ และดอก มาวางเรียง ในกระดาษที่จะใช้อัด โดยจัดให้เป็นระเบียบสลับคว่ำหงาย ในแนวทแยง หรือเป็นรูปซิกแซกเป็นรูปตัวอักษร M N V W และ Z ปิดด้านบน-ล่างด้วยแผ่นไม้ แล้วนำไปเก็บรักษาที่ตู้อบพันธุ์ไม้ จากนั้นนำตัวอย่างพืชอัดแห้งมาจัดวางบนกระดาษแข็ง และเย็บติดกับกระดาษ จากนั้นบันทึกข้อมูลลักษณะเด่นของพืช เพื่อใช้ในการระบุลักษณะสำคัญของพืชในระดับวงศ์ (Family) และนำมาใช้ในการระบุสกุล (genus) และชนิด (species) โดยการใช้รูปวิธาน (keys) จากเอกสารต่างๆ พร้อมทั้งเปรียบเทียบตัวอย่างพรรณไม้แห้งที่ห้องเก็บรักษาพรรณไม้แห้ง มหาวิทยาลัยทักษิณ

2.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขมิ้นอ้อย

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนด้วยวิธี Doyle and Doyle (1987) [9] ของตัวอย่างขมิ้น 5 แหล่งปลูกจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย และรวบรวมมาปลูกในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง กรมวิชาการเกษตร จังหวัดตรัง เป็นระยะเวลา 1 ปี ดังนี้ (1) ขมิ้นผสม จังหวัดตาก (2) ขมิ้นด้วง จังหวัดพัทลุง (3) ขมิ้นด้วง จังหวัดสงขลา (4) ขมิ้นผสม จังหวัดปัตตานี (5) ขมิ้นอ้อย จังหวัดตรัง แล้วจึงนำมาปรับความเข้มข้น 30 นาโนกรัม เพื่อทำปฏิกิริยา RAPD กับไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ที่มีขนาด 10 เบส จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ OPA-05 OPA-09 OPA-10 OPB-02 และOPH-17 ด้วยวิธีการพีซีอาร์ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ (30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร และ PCR master mix (dNTP (2 มิลลิโมลาร์) 2 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 มิลลิโมลาร์) 0.8ไมโครลิตร TaqDNA polymerase (5ยูนิตต่อไมโครลิตร) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยารอบแรก 94 องศาเซลเซียส 5 นาที รอบที่ 2-30 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และรอบสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้วุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ TAE ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และย้อมดีเอ็นเอด้วยสี SYBR™ Gold Gel Stain

2.3 การสกัดสารจากขมิ้นอ้อย

เก็บขมิ้นอ้อยจากแปลงปลูกของศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง กรมวิชาการเกษตร จังหวัดตรัง ที่ปลูกเป็นระยะเวลา 1 ปี มาทำให้แห้ง โดยอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นบดให้ละเอียด และนำผงขมิ้นอ้อยแห้ง 400 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการแช่หมัก (maceration) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์เขย่าเป็นครั้งคราว และกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) และคำนวณหาค่าร้อยละผลผลิตของสาร (% extraction yield) จากสมการที่ 1

$$\text{ร้อยละผลผลิต (\% extraction yield)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบ}}{\text{น้ำหนักของพืช}} \times 100 \quad (1)$$

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์

วิเคราะห์ปริมาณของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในสารสกัดขมิ้นอ้อย ด้วยเทคนิคสเปคโตรสโคปี จากอุปกรณ์การตรวจวัดปริมาณเคอร์คูมินอยด์แบบมือถือที่พัฒนาขึ้น ตามวิธีของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopeia) [10] ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน จากการเตรียมตัวอย่าง ดังนี้ ชั่งสารสกัดหยาบ 60 มิลลิกรัม เติมตัวทำละลายเมทานอลปริมาตร 75 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าโดยใช้คลื่นเสียง (sonicate) เป็นเวลา 15 นาที และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล จากนั้นดูดสารละลายมา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล จากนั้นดูดสารละลาย 3 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล จากกนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณเคอร์คูมินอยด์จากกราฟมาตรฐาน โดยคิดเป็นปริมาณเคอร์คูมินร้อยละโดยน้ำหนัก (%w/w) โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu [11] โดยการชั่งสารสกัดหยาบขมิ้นอ้อย 1 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 525 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปไว้ในที่มืด 1 นาที จากนั้นเติม 7.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 525 ไมโครลิตร วางพักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูปมิลลิกรัมของสมมูลของกรดแกลลิก (gallic acid equivalents (GAE) ต่อกรัมของน้ำหนักสารสกัดหยาบ (mg GAE/g extract)

2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (DPPH radical scavenging activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH [12] โดยนำสารสกัดขมิ้นอ้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ (10 50 500 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เติมลงใน 96 well plate โดยเติมสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมเอทานอล 50 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหาค่าร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ (สมการที่ 2) เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์มีประสิทธิภาพกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50}) เทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี เป็นสารควบคุมการทดลองเชิงบวก

$$\text{ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH} = [\,(AC - AS) / AC] \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ AC = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ

AS = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

2.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (ABTS radical scavenging activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ตามวิธีของ [13] โดยนำสารสกัดขมิ้นอ้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ (10 50 500 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เติมลงใน 96 well plate โดยเติมสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมเอทานอล 50 ไมโครลิตร และสารละลาย ABTS 50 ไมโครลิตร (โดยใช้ ABTS เป็นอนุมูลอิสระเตรียมโดย 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (K_2SO_4) เข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ บ่มในที่มืดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหาค่าร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ (สมการที่ 3) เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์มีประสิทธิภาพกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50})

ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS = [(AC – AS) / AC] x100 (3)

เมื่อ AC = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่ไม่มีสารทดสอบ

AS = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่มีสารทดสอบ

2.8 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยังเอนไซม์ไทโรซิเนส ตามวิธีของ [14] โดยนำสารสกัดขมิ้นอ้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ (5 10 50 100 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เติมลงใน 96 well plate โดยเติมสารสกัดปริมาตร 40 ไมโครลิตร และเอนไซม์ไทโรซิเนส 40 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย L-dopa ปริมาตร 80 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และนำค่าการดูดกลืนแสงคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (สมการที่ 4) เพื่อคำนวณความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) โดยใช้กรดโคจิก (kojic acid) เป็นสารควบคุมการทดลองเชิงบวก

ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ = (Ac-Ab) – (As-Ab) / (Ac-Ab) x 100 (4)

เมื่อ Ab คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบสีของสาร

Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

2.9 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ผิวหนัง (HaCaT)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ผิวหนัง (HaCaT) ด้วยวิธี MTT [12] โดยเลี้ยงเซลล์ไลน์ผิวหนังในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มเลี้ยงไว้ 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาทำการทดสอบ จากนั้นเลี้ยงเซลล์ปริมาณ $5x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 96 well plate บ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารสกัดขมิ้นอ้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ (1 5 10 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ 100

ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโดยเติมสารละลาย MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออก และเติมสารละลาย DMSO ลงในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงคำนวณร้อยละการมีชีวิตรอด (สมการ 5) เพื่อคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) โดยใช้ยาอีโทโพไซด์ (etoposide) เป็นสารควบคุมเชิงบวก

$$\text{ร้อยละของการมีชีวิตรอด} = (OD_T / OD_C) \times 100 \quad (5)$$

เมื่อ OD_T = ค่าการดูดกลืนแสงที่มีสารทดสอบ

OD_C = ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่มีสารทดสอบ

3. ผลและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การเก็บรักษาพรรณไม้แห้ง และระบุชนิดของพืช

พืชที่ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษา จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งลักษณะเด่นของพืชที่นำมาระบุวงศ์ คือ มีเกสรตัวผู้ที่สมบรูณ์ 1 อัน (one fertile stamens one) และที่เหลือเป็นหมัน (staminode) และพืชตัวอย่างจัดอยู่ในสกุล *Curcuma* มีลักษณะเด่นของพืชที่นำมาระบุสกุล คือ มีใบประดับของช่อดอกเชื่อมติดกัน ลักษณะโดยทั่วไปคล้าย *Curcuma longa* Linn. แต่ต้นสูงกว่าขนาด เหง้า และใบใหญ่กว่า เหง้ามักโผล่ขึ้นมาเหนือดินเล็กน้อย และมีเนื้อในสีเหลือง ใบเป็นใบเดี่ยวแทงขึ้นจากเหง้า เรียงเป็นวงซ้อนทับกัน แผ่นใบเป็นรูปขอบขนาน ปลายใบแหลม โคนใบมน ด้านท้องใบจะมีขนนิ่มๆ ดอก ออกเป็นช่อรูปทรงกระบอก ก้านดอกจะยาวและพุ่งออกจากเหง้าที่อยู่ใต้ดิน ดอกมีสีขาว กลีบดอกสีนวล ใบประดับที่อยู่ส่วนล่างของช่อมีสีเขียวปลายแกมชมพู ที่อยู่ส่วนบนรูปใบหอกสีแดงเข้ม เมื่อระบุสกุล และชนิด (species) ได้คือ *C. zedoaria* (Christm.) Roscoe

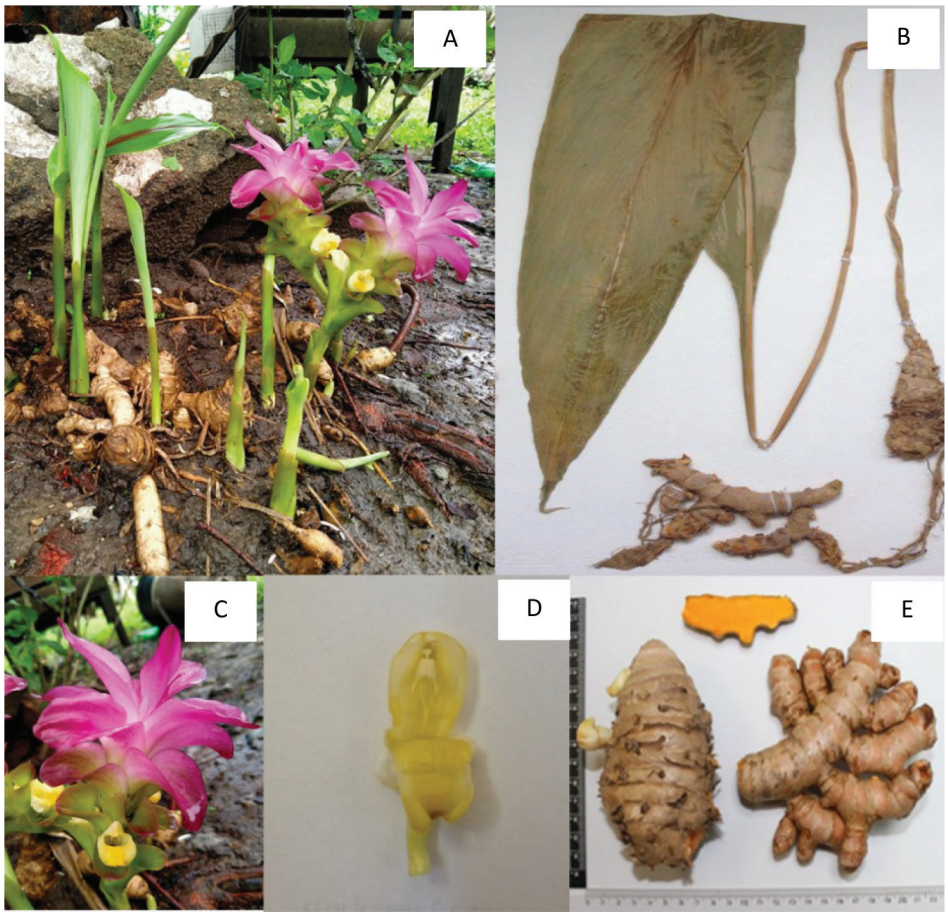

Figure 1 *Curcuma zedoaria* (A) habit, (B) herbarium specimen (C) coma bract, (D) flower, (E) whole rhizome and cross section of primary rhizome

3.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขมิ้นอ้อย

จากผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขมิ้นทั้ง 5 แหล่งปลูก (Table 1) ด้วยเทคนิค random amplification of polymorphic DNA (RAPD-PCR) ด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มชนิด OPA-10 พบว่าสามารถแสดงความต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ขมิ้นอ้อย แหล่งปลูก จ.ตรัง พบดีเอ็นเอขนาด 1,400 bp เพียงแถบเดียว ซึ่งต่างจากขมิ้นผสม แหล่งปลูก จ.ตาก และ จ.ปัตตานี ที่พบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ประมาณ 1,300 และ 600 bp และขมิ้นด้วง ในแหล่งปลูก จ.สงขลา และ จ.พัทลุง ที่พบดีเอ็นเอ 3 แถบที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ประมาณ 1,750 1,400 และ 700 bp (Table 1, Figure 2) ดังนั้นจึงสามารถยืนยันพืชตัวอย่างด้วยเทคนิคทางโมเลกุล ร่วมกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อจัดจำแนกกลุ่มของพืชตัวอย่างที่นำมาศึกษา จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของขมิ้น ซึ่งมีผลต่อลักษณะเหง้าที่แตกต่างกัน และปริมาณสารออกฤทธิ์กลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการจัดจำแนกพืชสกุลขมิ้นโดยใช้เทคนิคทางพันธุ์ศาสตร์โมเลกุล พบว่าขมิ้นมีความหลายหลายทางพันธุกรรม และสามารถจัดจำแนกกลุ่มได้ ประมาณ 2-4 กลุ่ม และพบว่า *Curcuma longa* และ *C. zedoaria* จัดอยู่ในกลุ่มต่างกัน [15]

Table 1 Scientific names, cultivars, rhizome characteristics, DNA band sizes and curcumin content of the samples

Scientific name	Cultivars	Rhizome characteristics	DNA band Sizes (bp)	Curcumin content (%w/w)
Curcurma longa Linn.	Tak		1,200 500	2.66±0.08
Curcurma longa Linn.	Phatthalung		1,750 1,400 625	7.78±0.13
Curcurma longa Linn.	Songkhla		1,750 1,350 700	6.22±0.06
Curcurma longa Linn.	Pattani		1,300 625	3.67±0.08
Curcurma zedoaria (Christm.) Roscoe	Trang		1,400	1.85±0.05

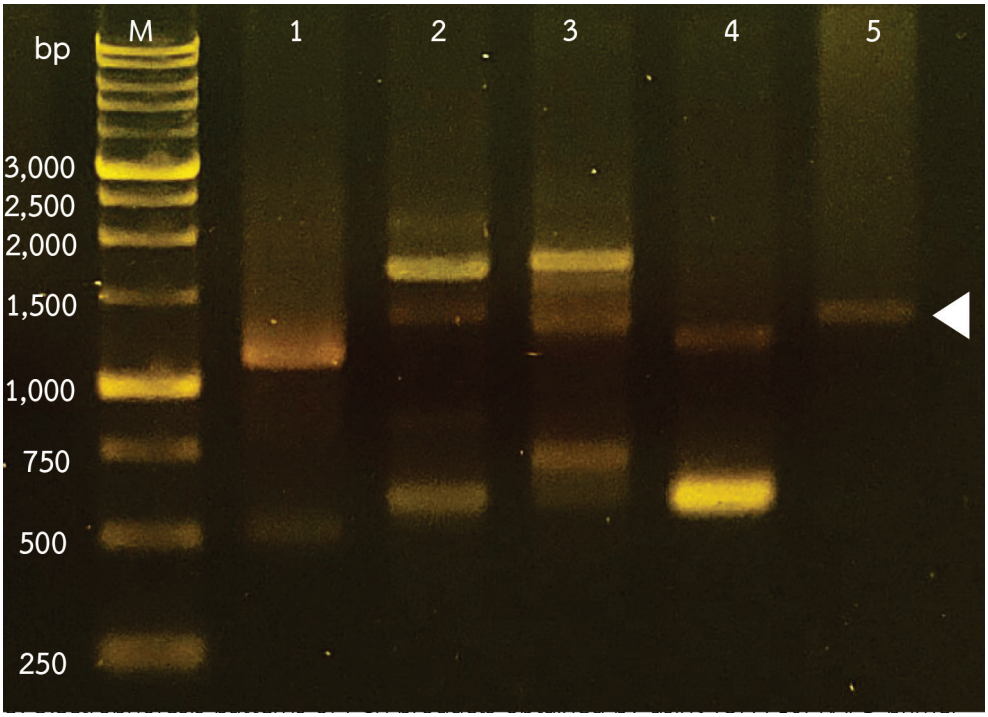

Figure 2 Gel electrophoresis patterns of PCR products obtained by using (OPA-10) RAPD primer Lane M: marker, 1: *Cucurma longa* var.Tak, 2: *C. longa* var. Phatthalung , 3: *C. longa* var. Songkhla, 4: *C. longa* var. Pattani and 5 *C. zedoaria* var. Trang

3.3 การสกัดสารจากขมิ้นอ้อย และวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์

จากการสกัดขมิ้นอ้อยด้วยตัวทำละลายเมทานอล จะได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) มีลักษณะเป็นผงแห้งสีน้ำตาลแดง ได้ร้อยละผลผลิต (%yield) เท่ากับ 2.5 หลังจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ด้วยเทคนิคสเปคโตรสโคปี ตามวิธีของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopeia) พบว่ามีปริมาณสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์โดยคิดเป็นปริมาณสารเคอร์คูมิน ร้อยละ 1.85±0.05 โดยน้ำหนัก (%w/w) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเคอร์คูมินกับ *Curcuma longa* จากแหล่งปลูกอื่นๆ (Table 1) พบว่าขมิ้นอ้อยมีปริมาณสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Toda และคณะ 2016 รายงานว่าพบปริมาณสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ใน *C. longa* มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับใน *C. zedoaria* [16] แต่พบว่าในขมิ้นอ้อยมีสารกลุ่มน้ำมันหอมระเหย ดังนี้ 1,8-cineole curzerenone/epi-curzerenone α-copaene camphor β-caryophyllene elemol germacrone curzerene และ β-elemene. ซึ่งแตกต่างจากที่พบใน *C. longa* [17] ดังนั้นอาจาส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของขมิ้นอ้อย

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu สามารถคำนวณโดยใช้สมการเส้นตรงของกรดแกลลิก จากสมการ $y = 0.115x - 0.0795$, $R^2 = 0.9985$ พบว่าสารสกัดขมิ้นอ้อยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดเท่ากับ

84.32±2.21 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดขมิ้นอ้อย มีค่า EC_{50} เท่ากับ 150.00±10.00 และ110.00±5.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดี สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sandrasari (2019) พบว่าปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกของขมิ้นอ้อย (*C. zedoaria*) ต่ำกว่าในขมิ้นชัน (*C. longa*) และสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH [18] นอกจากนี้พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของขมิ้นอ้อยพบมากในน้ำมันหอมระเหย ที่แยกได้จากเหง้าแห้งของขมิ้นอ้อย โดยใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ และสกัดด้วยตัวทำละลาย และทำการสกัดแยกส่วนสกัดย่อยของน้ำมันระเหยง่าย โดยใช้เทคนิค silica gel column chromatography พบสารประกอบ 36 ชนิด ได้แก่ terpenes 17 ชนิด alcohols 13 ชนิด และ ketones 6 ชนิด โดยพบว่าองค์ประกอบหลักที่พบคือ สาร epi-curzerenone และ curzerene ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธีทางเคมี พบว่าน้ำมันหอมระเหย ออกฤทธิ์ในระดับปานกลางถึงระดับดีมากในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH [19] จึงเป็นสาเหตุให้สารสกัดจากขมิ้นอ้อยมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระได้ต่ำกว่าในตัวควบคุมเชิงบวก ดังนั้นการสกัดสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระควรเลือกวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์หลักในการต้านอนุมูลอิสระ

Table 2 Total phenolics content (TPC) and antioxidant activities of ethanolic extract of *Curcuma zedoaria*

Samples	TPC	Antioxidant activities (EC_{50}; µg/mL)	
	mg GAE/g extract	DPPH assay	ABTS assay
C. zedoaria extract	84.32 ± 2.21	150.00 ± 10.00[a]	110.00 ± 5.12[a]
Vitamin C	-	8.50 ±. 0.50[b]	10.23 ± 1.12[b]

The values are mean ± standard deviation (n=3). [a-b]Means within each column followed by different letters are significantly different ($p<0.05$) using unpaired T-test.

3.6 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดขมิ้นอ้อย มีค่า IC_{50} เท่ากับ 102.50 ± 38.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้ต่ำกว่าชุดควบคุมเชิงบวก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Table 3) ซึ่งไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างเมลานิน หรือเม็ดสี ดังนั้นสารสกัดขมิ้นอ้อย จึงมีสารที่สามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีได้ ซึ่งมีรายงานวิจัยแสดงว่าสาร curcumin ไม่เป็นสารออกฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่เป็นสารกลุ่มอื่นที่พบในพืชสกุลขมิ้น เช่น สาร zederone ซึ่งพบในขมิ้นอ้อย [20] เป็นต้น แต่จากงาน

วิจัยนี้แสดงว่าฤทธิ์ยับยังเอนไซม์ไทโรซิเนสยังคงต่ำกว่าชุดควบคุมเชิงบวก ซึ่งเป็นผลจากการใช้สารสกัดหยาบในการทดลอง ดังนั้นสามารถแยกสารบริสุทธิ์จากขมิ้นอ้อยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Table 3 Inhibitory tyrosinase activity of ethanolic extract of Curcuma zedoaria

Samples	Inhibitory tyrosinase activity (IC_{50}; µg/mL)
C. zedoaria extract	102.50 ± 38.89[a]
Kojic acid	17.00 ± 1.00[b]

The values are mean ± standard deviation (n=3). [a-b] Means within each column followed by different letters are significantly different ($p<0.05$) using unpaired T-test.

3.7 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดขมิ้นอ้อยต่อเซลล์ไลน์ผิวหนัง

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดขมิ้นอ้อย ด้วยวิธี MTT พบว่ามีค่า IC_{50} > 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 4) ซึ่งพบว่าสารสกัดนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองระดับต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากขมิ้นอ้อยเป็นสมุนไพรที่สามารถใช้บริโภคได้อย่างปลอดภัยจึงมีสารกลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำเช่นเดียวกัน นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยทดสอบพิษของขมิ้นอ้อย ทั้งในระดับหลอดทดลอง และสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดขมิ้นอ้อยไม่แสดงพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง และในหนูทดลอง รวมถึงไม่พบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์อีกด้วย [21] ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยหากต้องการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

Table 4 Cytotoxic activity of ethanolic extract of Curcuma zedoaria

Samples	Cytotoxic activity (IC_{50}; µg/mL)
C. zedoaria extract	>200
Etoposide	5.8 ± 0.14

The values are mean ± standard deviation (n=3).

4. สรุปผลการทดลอง

การระบุชนิดของขมิ้นอ้อยสามารถใช้วิธีทางรูปวิธาน และใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล ช่วยในการจัดจำแนกกลุ่มของขมิ้นอ้อยได้ และพบว่าสารสกัดเมทานอลของขมิ้นอ้อย แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการต้านอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ผิวหนังในหลอดทดลอง ดังนั้นสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาเป็นตำรับเครื่องสำอางสำหรับผิวกระจ่างใส (lightening product) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และปลอดภัยต่อการพัฒนาต่อยอดสารสกัดขมิ้นอ้อยเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการวิจัยเงินรายได้มหาวิทยาลัยทักษิณ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณประเภททุนวิจัยบูรณาการ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2564 และทุนสนับสนุนบางส่วนจากเงินรายได้โครงงานวิจัยของสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ และขอขอบคุณข้อมูลสนับสนุนบางส่วนจากนางสาวภาวินี นาคพน

6. References

[1] Zhou, L., Zhang, K., Li, J., Cui, X., Wang, A., Huang, S., Zheng, S., Lu, Y. and Chen, W., 2013, Inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis involved in reproductive toxicity induced by sesquiterpenoids of *Curcuma zedoaria* in rats. Reprod Toxicol. 37: 62-9.

[2] Angel, G.R., Menon, N., Vimala, B. and Nambisan, B., 2014, Essential oil composition of eight starchy Curcuma species. Ind. Crops Prod. 60: 233–238.

[3] Lobo, R., Prabhu, K.S. and Shirwaikar, A., 2009, *Curcuma zedoaria* Rosc (white turmeric): A review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. J. Pharm. Pharmacol. 61: 13–21.

[4] Seo, W.G., Hwang, J.C., Kang, S.K., Jin, U.H., Suh, S.J., Moon, S.K. and Kim, C.H., 2005, Suppressive effect of Zedoariae rhizome on pulmonary metastasis of B16 melanoma cells. J. Ethnopharmacol. 101: 249–257.

[5] Makabe, H., Maru, N., Kuwabara, A., Kamo, T. and Hirota, M., 2006, Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria.* Nat. Prod. Res. 20: 680–685.

[6] Wilson, B., Abraham, G., Manju, V.S., Mathew, M., Vimala, B., Sundaresan, S. and Nambisan, B., 2005, Antimicrobial activity of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma malabarica* tubers. J. Ethnopharmacol. 99: 147–151

[7] Singh, P., Singh, S., Kapoor, I.P.S., Singh, G., Isidorov, V. and Szczepaniak, L., 2013, Chemical composition and antioxidant activities of essential oil and oleoresins from *Curcuma zedoaria* rhizomes. Food Biosci. 3: 42–48.

[8] Bridson, D. and Forman, L., 1992., The Herbarium Handbook. 3rd ed. Kew, UK: Royal Botanic Gardens.

[9] Doyle, J. and Doyle, J., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.

[10] Department of Medical Science, Thai Herbal pharmacopoeia, 2016, KHAMIN CHAN: 145-151

[11] Sukati, S. and Khobjai, W., 2019, Total Phenolic Content and DPPH Free Radical Scavenging Activity of Young Turmeric Grown in Southern Thailand. In: URU International Conference on Science and Technology 2018. Trans Tech Publications Ltd: 61–69.

[12] Kaewpiboon, C., Lirdprapamongkol, K., Srisomsap, C, Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T. and Puwaprisirisan, P., 2012, Studies of the *in vitro* cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants, BMC Comp. Altern. Med. 12: 127.

[13] Tanvir, E.M., Hossen, M.S., Hossain, M.F., izwana, A., Siew, H.G., Ibrahim, K. and Nurul, K., 2017, Antioxidant Properties of Popular Turmeric (*Curcuma longa*) Varieties from Bangladesh. J Food Qual: 8471785.

[14] Du, Z.Y., Jiang, Y.F., Tang, Z.K., Mo, R.Q., Xue, G.H., Lu, Y.J., Zheng, X., Dong, C.Z. and Zhang, K., 2011, Antioxidation and tyrosinase inhibition of polyphenolic curcumin analogs. Biosci Biotechnol Biochem. ;75(12): 2351-8.

[15] Maknoi, C., 2006, Taxonomy and Phylogeny of the Genus Curcuma L. (Zingiberaceae) with Particular Reference to Its Occurrence in Thailand. Ph.D. Thesis, Prince of Songkla University, Thailand.

[16] Tohda, C., Nakayama, N., Hatanaka, F. and Komatsu, K., 2006, Comparison of Anti-inflammatory Activities of Six Curcuma Rhizomes: A Possible Curcuminoid-independent Pathway Mediated by *Curcuma phaeocaulis* Extract. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 3(2), 255–260.

[17] Dosoky, N. S., Satyal, P. and Setzer, W.N., 2019, Variations in the Volatile Compositions of Curcuma Species. Foods (Basel, Switzerland), 8(2), 53.

[18] Sandrasari, D.A., Sabariman, M. and Azni, I.N., 2019, Determination of potential level of Indonesian rhizomes as an antioxidant based on phenolic compound and antioxidant activity. IOP Conf Ser Earth Environ Sci 383:012017.

[19] Mau, J.L., Eric, Y.C., Wang N.P., Chen, C.C., Chang, C.H. and Chyau, C.C., 2013, Composition and antioxidant activity of the essential oil from Curcuma zedoaria, Food Chemistry: 82(4): 583-591.

[20] Akter, J., Islam, M.Z., Hossain, M.A. and Takara, K., 2021, Anti-tyrosinase properties of different species of turmeric and isolation of active compounds from *Curcuma amada*. Med Chem Res 30:1669–1676.

[21] Lakshmi, S., Padmaja, G. and Remani, P., 2011, Antitumour Effects of Isocurcumenol Isolated from *Curcuma zedoaria* Rhizomes on Human and Murine Cancer Cells. International journal of medicinal chemistry: 253962.