KHON KAEN AGR. J. 48 (5): 980-989 (2020)./doi:10.14456/kaj.2020.89.

การเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของใบมะนาวโห่ภายใต้สภาวะเค็ม

Changes of antioxidant activity in Karanda leaves under salinity conditions

สกุลกานต์ สิมลา[1*] สุรศักดิ์ บุญแต่ง[1] และสุพัตรา สารแสน[1]

Sakunkan Simla[1*], Surasak Boontang[1] and Suphattra Sarasean[1]

บทคัดย่อ: ความเค็มสามารถกระตุ้นให้เกิดการสะสมสารพฤกษเคมีในพืชได้ ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระภายใต้สภาวะความเค็มจากเกลือสินเธาว์ซึ่งเป็นเกลือชนิดหลักของดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยมีพืชทดสอบคือมะนาวโห่ (*Carissa carandas* L.) เลือกใช้ส่วนใบซึ่งเป็นชิ้นส่วนที่มีตลอดทั้งปีและมีสรรพคุณที่เป็นประโยชน์ทางการแพทย์ ทำการประเมินที่ 6 ความเข้มข้นของเกลือสินเธาว์ คือ 0, 25, 50, 75, 100 และ 125 mM ที่ 4 ระยะพัฒนาการของใบ คือใบอ่อน ใบเพสลาด ใบเจริญเต็มที่ และใบแก่ ผลการศึกษาพบว่า ต้นมะนาวโห่สามารถทนความเค็มได้ถึงระดับความเข้มข้นที่ 50 mM โดยความเข้มข้นของเกลือสินเธาว์ที่ 25 mM เป็นระดับที่ส่งเสริมให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุด โดยระยะพัฒนาการของใบส่งผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของใบ ใบอ่อนเป็นใบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH มากที่สุด ใบเพสลาดและใบเจริญเต็มที่เป็นใบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ FRAP มากที่สุด และใบแก่เป็นใบที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสสระแบบ ABTS มากที่สุด โดยพบว่าใบแก่ที่ได้รับเกลือสินเธาว์ความเข้มข้น 25 mM เป็นใบที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการหาวิธีการกระตุ้นให้เกิดการสะสมสารสำคัญในใบมะนาวโห่เพื่อให้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพเพิ่มมากขึ้น

คำหลัก: ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ FRAP, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH, *Carissa carandas*, ระยะพัฒนาการของใบ

ABSTRACT: Salinity can stimulate the accumulation of phytochemistry in plants. For this reason, the antioxidant activity has been studied under saline conditions caused by the Rock of Salt, which is the main salt of saline soil in the northeast in Karandas (*Carissa carandas* L.) leaf, which is an all-year-round component and has medical benefits. The different concentrations of rock salt (0, 25, 50, 75, 100 and 125 mM) at 4 development stages of the leaf (leaflet, early mature, mature and late mature leaf) were examined. The study showed that the Karandas plant could endure salinity to the concentration level of 50 mM. The concentration of rock salt at 25 mM was the level that can promotes the most antioxidant activities. The development stages of the leaves affect the antioxidant activity of the leaves. The leaflet has the highest DPPH antioxidant activity. The early mature and mature leaf has the most FRAP antioxidant activity and the late mature leaves has the most ABTS antioxidant activity. The result indicated that late mature leaf with the concentration of rock salt at 25 mM had the highest antioxidant activity. The results from this study can be used as a guideline to finding ways for stimulate the accumulation of major compounds in the Karandas leaf for providing the healthiest pharmacological effects.

Keywords: FRAP antioxidant activity, ABTS antioxidant activity, DPPH antioxidant activity, *Carissa carandas*, leaf development

Received November 1, 2019

Accepted March 31, 2020

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

[1] Department of Agricultural Technology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Kantarawichai District, Maha Sarakham 44150

* Corresponding author: sakunkan.s@msu.ac.th

แก่นเกษตร 48 ฉบับที่ 5: 980-989 (2563)./doi:10.14456/kaj.2020.89.

บทนำ

มะนาวโห่ (*Carissa carandas* L.) เป็นผลไม้โบราณพื้นเมืองชนิดหนึ่งที่สามารถเก็บเกี่ยวผลได้ตลอดทั้งปี แต่มีมากช่วงเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม เป็นพืชที่มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งสูง มีลักษณะเป็นพุ่มสูงประมาณ 2-3 เมตร ลำต้นมีสีน้ำตาลเข้ม มีหนามแหลม และมีน้ำยางสีขาว ใบเป็นใบเดี่ยว รูปรีเกือบกลม ปลายใบเว้าเล็กน้อย โคนใบมนเว้าเข้าหาก้านใบ หลังใบและท้องใบเรียบ ใบอ่อนมีสีแดง ก้านใบสั้น ดอกออกเป็นช่อออกตามซอกใบใกล้ปลายยอด กลีบดอกมีสีขาว โคนดอกสีชมพูอมแดง ผลเป็นรูปทรงกลมรี ผิวเรียบ ผลอ่อนสีขาว ผลแก่เป็นสีชมพูจนเป็นสีแดงเข้มจนเกือบดำ (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2556; Kumar et al., 2013) ผลไม้ชนิดนี้ได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากสีสันของใบและผลที่มีความสวยงามและการที่มีหนามแหลมคม ทำให้ใช้เป็นแนวรั้วตามธรรมชาติได้เป็นอย่างดี (Sharma and Banyal, 2010) นอกจากนี้มะนาวโห่มีฤทธิ์ทางยาสามารถนำไปใช้รักษาโรคหรือรับประทานควบคู่กับยาแผนปัจจุบันได้เป็นอย่างดี และยังมีรายงานยืนยันว่าการบริโภคมะนาวโห่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ร่างกาย (Sudjaroen and Suwannahong, 2017) มะนาวโห่มีสรรพคุณในการดูแลปรับสมดุลร่างกาย คือ มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง ป้องกันมะเร็ง ชะลอการแก่ก่อนวัย ช่วยบำรุงโลหิต ขยายหลอดเลือด ป้องกันโรคหัวใจ รักษาโรคปอด และถุงลมโป่งพองได้ (ประกอบ, 2556) ผลจากการที่มีสรรพคุณทางยาพื้นบ้านจำนวนมากจึงได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชของมะนาวโห่ โดยพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ในการต้านอาการอักเสบ อาการปวด และอาการไข้ ฤทธิ์ในการต้านอาการชัก ฤทธิ์ในการบำรุงหัวใจ ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ในการต้านเบาหวาน และฤทธิ์ปกป้องความเป็นพิษต่อตับ (สกุลกานต์, 2559)

ผลมะนาวโห่จัดเป็นแหล่งของแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ที่สำคัญ เนื่องจากเมื่อผลเริ่มสุกจะมีการพัฒนาสีจากสีเข้มมากจนถึงดำ (สกุลกานต์ และคณะ, 2556) ราก เปลือกลำต้น เนื้อไม้ ใบ ผล เมล็ด น้ำยาง และยอดอ่อนของมะนาวโห่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ แต่ใบเป็นชิ้นส่วนที่มีตลอดทั้งปี และมีสรรพคุณทางการแพทย์ คือ มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งรังไข่ ชนิด Caov-3 ได้เป็นอย่างดี (Sulaiman et al., n.d.; Philippine Medicinal Plants, 2012; Kumar et al., 2013) มีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบจากการบวมที่อุ้งเท้าของหนูได้สูงถึง 72.10% และสามารถลดอาการไข้ได้อย่างมีนัยสำคัญ นานถึง 4 ชั่วโมงหลังจากให้สารสกัด (Hati et al., 2014) มีฤทธิ์ปกป้องตับ โดยสามารถยับยั้งการทำลายเซลล์ตับได้ (Bhati et al., 2014) มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ คือ *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* (Verma and Chaudhary, 2011; Agarwal et al., 2012) และมีเมื่อใบมะนาวโห่มีระยะพัฒนาการเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณสารพฤกษเคมีเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจึงควรพิจารณาระยะใบเพื่อสามารถใช้ประโยชน์จากใบมะนาวโห่ได้อย่างสูงสุด (ภานุวัฒน์ และคณะ, 2560) และยังพบว่าเมื่อระดับความเค็มเพิ่มขึ้น ความสูงต้น ปริมาตรทรงพุ่ม ปริมาณคลอโรฟิลล์ a และ b ในใบ อัตราส่วนของคลอโรฟิลล์ a ต่อ b อัตราส่วนของแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์ ปริมาณน้ำตาลและโปรตีน จำนวนดอกและผลต่อต้น น้ำหนักผลต่อต้น และขนาดผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ปริมาณแคโรทีนอยด์และฟีนอลิก เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Tayyab et al., 2016) เห็นได้ว่ามะนาวโห่เป็นพืชที่มีศักยภาพในการทนเค็มเนื่องจากสามารถทนเค็มได้ถึง 10 dS/m ซึ่งเป็นระดับเค็มมาก (สุมาลี, 2555)

มะนาวโห่เป็นพืชที่มีสรรพคุณทางการแพทย์ มีศักยภาพในการปลูกได้ในพื้นที่ที่มีความเค็ม และความเค็มสามารถกระตุ้นในเกิดการสะสมปริมาณสารพฤกษเคมีบางชนิดในมะนาวโห่ได้ (Tayyab et al., 2016) ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระภายใต้สภาวะความเค็มจากเกลือสินเธาว์ซึ่งเป็นเกลือชนิดหลักของดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่เป็นพื้นที่ที่มีปัญหาดินเค็มมากที่สุด คือ 17.8 ล้านไร่ และยังมีพื้นที่มีการแพร่เกลืออีก 19.4 ล้านไร่ (อรุณี, 2547) โดยทำการศึกษาในใบมะนาวโห่ ซึ่งเป็นชิ้นส่วนที่มีตลอดทั้งปี ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการหาวิธีการกระตุ้นให้เกิดการสะสมสารพฤกษเคมีในใบมะนาวโห่เพื่อให้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพมากที่สุด

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมต้นมะนาวโห่

ย้ายปลูกต้นมะนาวโห่ อายุ 2 ปี พันธุ์สีชมพูที่เพาะเมล็ดจากต้นเดียวกันเพื่อควบคุมให้เป็นพันธุกรรมเดียวกัน เนื่องจากมะนาวโห่เป็นพืชผสมตัวเองที่มีการผสมเกสรก่อนดอกบานทำให้มีความเป็นพันธุ์แท้สูง และด้วยเป็นพืชที่มียางจึงนิยมขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ด มีพันธุกรรมเดียวกัน โดยเลือกต้นที่มีขนาดต้นใกล้เคียงกันลงในกระถางพลาสติกขนาด 17 นิ้ว ที่ใส่ดินปลูกไว้ ชั่งน้ำหนักให้เท่ากันที่ 35 กิโลกรัมต่อกระถาง จากนั้นนำกระถางไปวางบนถาดรองกระถางแล้ววางในโรงเรือนที่มุงหลังคาพลาสติก โดยวางให้มีระยะห่างระหว่างต้น 1 เมตร และระยะห่างระหว่างแถว 0.75 เมตร

2. การให้ความเค็มกับต้นมะนาวโห่

หลังจากย้ายปลูกต้นมะนาวโห่ที่อายุ 2 ปี นาน 6 เดือน ทำการตัดแต่งกิ่งเพื่อเตรียมให้ความเค็ม หลังจากนั้น 1 เดือน คือ เดือนมกราคม 2562 ทำการให้ความเค็ม โดยการชั่งเกลือสินเธาว์น้ำหนัก 0, 51.14, 102.28, 153.42, 204.56 และ 255.70 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ลงในกระถางมะนาวโห่ที่มีการงดการให้น้ำ 3 วัน ตามค่าความจุสนามของดินในกระถางจะได้ความเค็มตามสิ่งทดลอง คือ 0, 25, 50, 75, 100 และ 125 mM ตามลำดับ ซึ่งเมื่อให้สารละลายเกลือสินเธาว์ลงในดินแล้ววัดค่าการนำไฟฟ้าได้ 0.26, 0.88, 2.02, 2.25, 2.94 และ 3.32 dS/m ตามลำดับ

3. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 6×4 factorial in completely randomized design จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 2 ต้น มี 2 ปัจจัย คือ ระดับความเค็ม 6 ระดับ ได้แก่ 0, 25, 50, 75, 100 และ 125 mM และระยะพัฒนาการของใบ 4 ระยะ คือ ระยะใบอ่อน (ใบคู่ที่ 1-3 ที่อายุ 20 วันหลังตัดแต่ง) ระยะใบเพสลาด (ใบคู่ที่ 5 ที่อายุ 45 วันหลังตัดแต่ง) ระยะใบเจริญเต็มที่ (ใบคู่ที่ 7 ที่อายุ 55 วันหลังตัดแต่ง) และระยะใบแก่ (ใบคู่ที่ 11 ที่อายุ 68 วันหลังตัดแต่ง)

4. การดูแลรักษาภายหลังให้ความเค็ม

ดูแลต้นหลังย้ายปลูกโดยการให้น้ำประปา ที่มีค่า pH 7.75 และ EC 0.653 ds/m ซึ่งเป็นน้ำเพื่อการชลประทานที่มีคุณภาพดีตามมาตรฐานขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (อรุณี, 2547) ในอัตรา 2 ลิตร/กระถาง โดยเป็นปริมาณที่น้ำซึมถึงก้นกระถางไม่ล้นออกจากกระถาง ทุก 3 วัน และมีการพรวนดินพร้อมกำจัดวัชพืช โรคและแมลงตามความเหมาะสม

5. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

นำตัวอย่างใบสดมาล้างทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโกร่งบด เติมไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียด แล้วเก็บในถุงซิปแช่ตู้ทำความเย็นที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

6. การสกัดตัวอย่าง

สกัดตัวอย่างใบมะนาวโห่ตามวิธีการของจิราภรณ์และมัณฑนา (2559) โดยนำใบที่บดละเอียด 2 กรัม เติมสารละลายเอทานอล ร้อยละ 99.9 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 155 รอบต่อนาที ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเทส่วนที่ใส เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

7. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

1) วิธีดักจับอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) ประยุกต์ตามวิธีของจิราภรณ์ และมัณฑนา (2559)

2) วิธีดักจับอนุมูลอิสระ 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) ประยุกต์ตามวิธีของ Kriengsak et al. (2006)

3) การวัดความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric reducing antioxidant power: FRAP) ประยุกต์วิธีของจิราภรณ์ และมัณฑนา (2559)

8. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของลักษณะฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระตามแผนการทดลอง และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในลักษณะที่มีความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$

ผลการศึกษา

จากการประเมินผลของเกลือสินเธาว์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของใบมะนาวโห่ พบว่า ต้นมะนาวโห่สามารถทนความเข้มข้นของเกลือสินเธาว์ได้สูงที่สุดที่ 50 mM ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 75-125 mM ต้นมะนาวโห่ไม่สามารถรอดชีวิตได้ ดังนั้นจึงทำการประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่เป็นผลจากเกลือสินเธาว์ที่ 3 ระดับ คือ 0, 25 และ 50 mM เท่านั้น ดังผลการศึกษาดังนี้

1. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS

การให้เกลือสินเธาว์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันมีผลทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) โดยเมื่อมีระดับความเค็มเพิ่มขึ้นเป็น 25 mM ทำให้ใบมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS เพิ่มขึ้นสูงที่สุด สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 34.21 (**Table 1**) และพบว่าระยะพัฒนาการของใบที่ต่างกันมีผลทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) โดยเมื่อใบมีพัฒนาการเพิ่มมากขึ้นทำให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นมากตามไปด้วย จึงทำให้ในใบแก่เป็นใบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS มากที่สุด สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 36.21 (**Table 1**) และพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเกลือและระยะพัฒนาการของใบ โดยใบแก่ที่ได้รับเกลือสินเธาว์ความเข้มข้น 25 mM เป็นใบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS มากที่สุด สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 61.17 ส่วนใบอ่อนที่ได้รับเกลือสินเธาว์ที่ความเข้มข้น 25 mM เป็นใบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS น้อยที่สุด สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 9.61 (**Table 1**)

Table 1 Effect of three rock salt concentrations with four leaf developmental stage on ABTS antioxidant activity (inhibition percentage)

Leaf Developmental Stage	Rock Salt Concentration (mM)						Mean of Leaf Developmental Stage	
	0		25		50			
Leaflet	20.57	def	9.61	f	20.74	def	16.97	c
Early Mature Leaves	25.15	b-e	35.47	b	25.02	b-e	28.55	b
Mature Leaves	32.37	bc	30.59	bcd	24.05	cde	29.00	b
Late Mature Leaves	32.47	bc	61.17	a	15.00	ef	36.21	a
Mean of Rock Salt Concentration	27.64	b	34.21	a	21.20	c		
F-Test: NaCl	**							
Stage	**							
NaCl*Stage	**							
CV (%)	28.40							

**: significant at $p \leq 0.01$.

Mean with the same letter(s)of each factor and treatment combination was not significant different at $p \leq 0.05$, when comparing means with LSD method

2. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH

การให้เกลือสินเธาว์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันมีผลทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) โดยความเค็มที่ 25 mM เป็นระดับที่ทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลแบบ DPPH มากที่สุด สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 38.84 (**Table 2**) เมื่อใบมีระยะพัฒนาการเปลี่ยนไปจากระยะใบอ่อนไปเป็นระยะใบเพสลาด พบว่าระยะพัฒนาการของใบที่ต่างกันมีผลทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.05$) โดยใบอ่อนเป็นใบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH มากที่สุด สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 32.35 แต่เมื่อใบมีพัฒนาการจากระยะใบเพสลาดไปเป็นระยะใบแก่ พบว่ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกัน (**Table 2**) เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเกลือและระยะพัฒนาการของใบ พบว่าความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในใบมะนาวโห่ทั้ง 4 ระยะ โดยในใบอ่อนที่ไม่ได้รับเกลือสินเธาว์ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH มากที่สุด สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 53.66 แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับใบแก่ที่ได้รับเกลือสินเธาว์ความเข้มข้น 25 mM ส่วนใบแก่ที่มีการให้เกลือสินเธาว์ความเข้มข้น 50 mM มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH น้อยที่สุด สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 9.27 (**Table 2**)

Table 2 Effect of three rock salt concentrations with four leaf developmental stage on DPPH antioxidant activity (inhibition percentage)

Leaf Developmental Stage	Rock Salt Concentration (mM)			Mean of Leaf Developmental Stage
	0	25	50	
Leaflet	53.66 a	32.58 bc	10.82 f	32.35 a
Early Mature Leaves	25.75 cd	35.21 bc	15.20 ef	25.39 b
Mature Leaves	21.56 de	35.94 b	21.39 de	26.30 b
Late Mature Leaves	31.23 bcd	51.63 a	9.27 f	30.71 ab
Mean of Rock Salt Concentration	33.05 b	38.84 a	14.17 c	
F-Test: NaCl	**			
Stage	*			
NaCl*Stage	**			
CV (%)	24.01			

* and **: significant at $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively.

Mean with the same letter(s)of each factor and treatment combination was not significant different at $p \leq 0.05$, when comparing means with LSD method

3. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP

การให้เกลือสินเธาว์ในความเข้มข้นที่ต่างกันทำให้ใบมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ FRAP ลดลงทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) (**Table 3**) และพบว่าระยะพัฒนาการของใบที่ต่างกันมีผลทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP แตกต่างกัน โดยใบเพสลาดและใบเจริญเต็มที่เป็นระยะพัฒนาการของใบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ FRAP มากที่สุด ที่ 0.81 มิลลิโมลล์ของ Fe(II) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม (**Table 3**) และพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเกลือและระยะพัฒนาการของใบอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) โดยในใบแก่ที่มีการให้เกลือสินเธาว์ความเข้มข้น 25 mM มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ FRAP มากที่สุด ที่ 0.91 มิลลิโมล์ของ Fe(II) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม แต่ไม่แตกต่างกันกับใบเพสลาด และใบเจริญเต็มที่ที่มีการให้เกลือสินเธาว์ความเข้มข้น 25 mM และในใบเพสลาด ใบเจริญเต็มที่และใบแก่ที่ไม่ได้รับเกลือสินเธาว์ ในขณะที่ใบแก่ที่ได้รับเกลือสินเธาว์ความเข้มข้น 50 mM มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP น้อยที่สุด ที่ 0.41 มิลลิโมล์ของ Fe(II) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม (**Table 3**)

วิจารณ์ผล

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธีการ คือ แบบ DPPH แบบ FRAP และแบบ ABTS โดยทั้ง 3 วิธีการนี้ใช้หลักการในการวิเคราะห์แตกต่างกันไป โดยวิธีการแบบ DPPH การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์อนุมูล $DPPH^{+}$ ซึ่งเป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว การวิเคราะห์โดยใช้ ABTS เป็นวิธีขจัด $ABTS^{O+}$ เปรียบเทียบกับ Trolox เป็นการวัดความสามารถในการขขัดอนุมูล $ABTS^{O+}$ ที่มีความคงตัว วิธีการนี้จะถูกออกซิไดส์โดยอนุมูลเปอร์ออกซี เกิดเป็นเกิดเป็นอนุมูลที่มีประจุบวก $ABTS^{O+}$ และมีสี ดังนั้นเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปจะทำให้มีสีลดลง ส่วนการวิเคราะห์แบบ FRAP วิธีนี้เป็นการหาค่าความสามารถในการต้านการออกซิเดชัน (total antioxidant capacity) โดยตรง วิธีการนี้ใช้สารปรักอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+}-TPTZ (ferric tripyridyl triazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมเหล็กในสารนี้จะถูกริดิวซ์โดยสารต้านออกซิเดชัน ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ จะเห็นได้ว่าทั้ง 3 วิธีการใช้หลักการในการสร้างสารประกอบระหว่างอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่างใบพืชที่ทำการศึกษา จากการที่ร่างกายและเซลล์มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้หลายชนิด (โอภา, 2549) ทำให้ในการศึกษาครั้งนี้ จึงเลือกวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระถึง 3 วิธี เพื่อประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่หลากหลาย

ผลของความเข้มข้นของเกลือต่อการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในใบมะนาวโห่

อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ รวมทั้งโรคอัลไซเมอร์ (วชิราภรณ์ และคณะ, 2556) การวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธีการ โดยมีความแตกต่างกันตามอนุมูลอิสระที่นำมาใช้ในการทดสอบ ปัจจุบันมีการศึกษากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระในผักและผลไม้มากมายหลายชนิด (เจนจิรา และประสงค์, 2554) การศึกษาในครั้งนี้ พบว่า เมื่อต้นมะนาวโห่ได้รับความเค็มถึงระดับ 25 mM ใบมะนาวโห่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อมีการให้ความเค็มเพิ่มมากขึ้นถึงความเข้มข้น 50 mM ความสามารถดังกล่าวกลับมีปริมาณลดลงเช่นเดียวกับการสะสมปริมาณสารพฤกษเคมี ซึ่งโดยปกติแล้ว เมื่อพืชเครียดจะชักนำให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระ เช่น superoxide radicals (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radicals (OH) ซึ่งจะทำลายส่วนต่างๆ ของเซลล์ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก ไขมัน บริเวณต่างๆ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ (สุมาลี, 2555) และความเครียดที่เกิดขึ้นนี้ทำให้กระตุ้นการสร้างสารพฤกษเคมีต่างๆ ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่พืชสร้างขึ้นมานี้ได้ สารพฤกษเคมีดังกล่าวนี้ยังสามารถช่วยลดความเสียหายเนื่องจากภาวะการถูกออกซิไดซ์ (oxidative damage) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการสร้าง ROS (Reactive oxygen species) ภายใต้สภาวะเครียด

จากความเค็ม (อธิภัทร, 2556) จึงอาจส่งผลให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้มากขึ้นตามไปด้วย ลักษณะเช่นนี้พบได้ในการศึกษาในต้นอ่อนของเรพซีดส์ (Falcinelli et al., 2017) และต้นอ่อนของบัควีท (Lim et al., 2012) ที่พบเช่นเดียวกันว่าเมื่อมีการให้ความเค็มสูงขึ้นในระดับหนึ่ง มีการกระตุ้นในมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อมีการให้ความเค็มเพิ่มมากเกินไปกลับส่งผลให้ความสามารถดังกล่าวกลับลดลง

Table 3 Effect of three rock salt concentrations with four leaf developmental stage on FRAP antioxidant activity (mM Fe(II) per gram)

Leaf Developmental Stage	Rock Salt Concentration (mM)			Mean of Leaf Developmental Stage
	0	25	50	
Leaflet	0.68 b	0.44 c	0.62 b	0.58 c
Early Mature Leaves	0.87 a	0.88 a	0.67 b	0.81 a
Mature Leaves	0.87 a	0.89 a	0.67 b	0.81 a
Late Mature Leaves	0.88 a	0.91 a	0.41 c	0.73 b
Mean of Rock Salt Concentration	0.82 a	0.78 a	0.59 b	
F-Test: NaCl	**			
Stage	**			
NaCl*Stage	**			
CV (%)	11.76			

**: significant at p≤0.01.

Mean with the same letter(s)of each factor and treatment combination was not significant different at p≤0.05, when comparing means with LSD method

ผลของระยะพัฒนาการต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในใบมะนาวโห่

การศึกษาในครั้งนี้ พบว่าระยะพัฒนาการของใบที่ต่างกันทั้ง 4 ระยะ ทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS DPPH และ FRAP แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยในใบแก่เป็นใบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS และ DPPH สูงที่สุด และเมื่อระยะพัฒนาการจากใบอ่อน จนมาถึงใบเจริญเต็มที่ ใบมะนาวโห่มีการเก็บสะสมสารต้านอนุมูลอิสระในรูปของ FRAP สูงที่สุด การที่ใบเจริญเต็มที่เป็นระยะที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ FRAP มากที่สุด อาจมาจากการที่ใบในระยะนี้เป็นระยะที่มีสารพฤกษเคมีสะสมอยู่ในปริมาณมากพอสมควร ซึ่งสารพฤกษเคมีเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จึงมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ FRAP ได้มากกว่าใบในระยะอื่นๆ อีกทั้งในระยะใบเจริญเต็มที่ยังเป็นระยะที่ใบมีสารทุติยภูมิมากอีกระยะหนึ่งเช่นกัน ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่ได้จากกระบวนการชีวสังเคราะห์ เพื่อสร้างสารชนิดต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของพืช ได้แก่ สารพวกอัลคาลอยด์ ฟีนอลิก อะซีโทจีนิน และเทอร์พีนอยด์ (ประไพรัตน์, 2555) ลักษณะเช่นนี้สอดคล้องกับการศึกษาระยะพัฒนาการของใบข้าวต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า มีสารต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH สูงที่สุดที่ร้อยละ 4.16 (Krasaetep et al., 2011) แต่ขัดแย้งการศึกษาของนิภาพร และคณะ (2557) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH ของใบอ่อนมีค่ามากกว่าใบแก่ ที่มีความขัดแย้งกันเช่นนี้ เนื่องจากพืชแต่ละชนิด มีการสร้างสารสำคัญต่างๆ แตกต่างกันออกไปในแต่ละระยะ ขึ้นที่ปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ พันธุกรรม พื้นที่การเจริญเติบโต และชนิดของพืช

โดยเมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเกลือและระยะพัฒนาการของใบต่อการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในใบมะนาวโห่ พบว่า เป็นไปในทิศเดียวกับปัจจัยหลักทั้ง 2 ปัจจัย คือ เมื่อมีการให้สารละลายเกลือความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นถึงระดับ 25 mM ในระยะใบแก่ ทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการหาวิธีการกระตุ้นให้เกิดการสะสมสารสำคัญในใบมะนาวโห่เพื่อให้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพมากที่สุด

สรุป

ผลจากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของเกลือสินเธาว์ที่ 25 mM เป็นระดับที่ส่งเสริมให้ใบแก่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุด ทั้งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH แบบ FRAP และแบบ ABTS

เอกสารอ้างอิง

จิราภรณ์ กระแสเทพ และมัณฑนา นครเรียบ. 2559. ปริมาณฟินอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดข้าวทับทิมชุมแพ. น. 69-78 ใน: การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว กลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประจำปี 2559 8 - 10 มีนาคม 2559. โรงแรมหนองหาร ดิแอลลิแกนท์ จังหวัดสกลนคร.

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์ 1: 59-70.

นิภาพร ยลสวัสดิ์, มณทินี ธีรารักษ์ และจำรูญ เล้าสินวัฒนา. 2557. การประเมินความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ และการจับโลหะ และปริมาณฟินอลิคจากใบทุเรียน 10 พันธุ์. แก่นเกษตร 42: 88-93.

ประกอบ คุปรัตน์. 2556. ผลไม้ที่มีคุณสมบัติเป็นยา - มะม่วงหาวมะนาวโห่ (*Carissa carandas*). แหล่งข้อมูล: http://pracob.blogspot.com. ค้นเมื่อ 20 สิงหาคม 2558.

ประไพรัตน์ สีพลไกร. 2555. สารอินโดลอัลคาลอยด์และฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นพญาสัตบรรณ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 14: 54-65.

ภานุวัฒน์ สีพันธ์, สกุลกานต์ สิมลา, พัชรี สิริตระกูลศักดิ์ และชฎาพร เสนาคุณ. 2560. ระยะพัฒนาการต่อปริมาณสารพฤกษเคมีและความสามารถ ในการต้านอนุมูลอิสระในใบมะนาวโห่. วารสารวิทยาศาสตร์แก่นเกษตร 45: 336-341.

วชิราภรณ์ ผิวล่อง, สุรศักดิ์ สัจจบุตร, ศิริลักษณ์ สิงห์เพชร และจารุรัตน์ เอี่ยมศิริ. 2556. อิทธิพลของระยะเวลาสุกต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของมะนาวโห่. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 44: 337-340.

สกุลกานต์ สิมลา, สุรศักดิ์ บุญแต่ง และพัชรี สิริตระกูลศักดิ์. 2556. การประเมินปริมาณสารพฤกษเคมีบางประการและกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระใน *Carissa carandas* L. แก่นเกษตร 41: 602-606.

สกุลกานต์ สิมลา. 2559. มะนาวโห่: พืชในวรรณคดีไทยที่มากมายด้วยประโยชน์. แก่นเกษตร, 44: 557-566.

สุมาลี ชูกำแพง. 2555. พืชในสภาวะเครียดเกลือ. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 4: 15-24.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2556. มะม่วงหาว มะนาวโห่ (ออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.qsbg.org. 20 สิงหาคม 2558.

อธิภัทร เงินหมื่น. 2556. ผลของความเค็มต่อลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของพืชทนเค็มบางชนิดที่พบภายในพื้นที่นากุ้งทิ้งร้าง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

อรุณี ยูวะนิยม. 2547. การจัดการดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. แหล่งข้อมูล: http://www.sri.cmu.ac.th/~environment/Download/050505.pdf. ค้นเมื่อ 20 มกราคม 2560.

โอภา วัชระคุปต์. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พี.เอส. พรินท์, กรุงเทพฯ.

Agarwal, T., R. Singh, A.D Shukla, and I. Waris. 2012. In vitro study of antibacterial activity of *Carissa carandas* leaf extracts. Asian J. Plant Sci. Res. 2: 36-40.

Bhati, P., A. Shukla, M. Sharma, and P. mourya. 2014. Hepatoprotective activity of leaves extracts of *Carissa carandas* Linn. Indo Am. J. Pharm. Res. 4: 5185-5192

Falcinelli, B., V. Sileoni, O. Marconi, and G. Perretti. 2017. Germination under moderate salinity increases pheonlic content and antioxidant activity in rapeseed (*Brassica napus* var *okeifera* Del.) sprouts. Molecules 22: 1-13.

Hati, M., B.K. Jena, S. Kar, and A.K. Nayak. 2014. Evaluation of anti-inflammatory and anti-pyretic activity of *Carissa carandas* L. leaf extract in rats. J. Pharm. Chem. Bio. Sci. 1: 18-25.

Krasaetep, J., M. Nakornriab, D. Puangpronpitag. 2011. Antioxidant activity and total phenolic contents in leaf of some Thai rice cultivars. Int. J. Applied Chem. 7: 285-296.

Kriengsak, T., J.B. Unaro, and C. Kevin. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. J. Food Compos. Anal. 669–675.

Kumar, S., P. Gupta, and V. Gupta K.L. 2013. A critical review on Karamarda (*Carissa carandas* Linn.). Int. J. Pharm. Bio. Arch. 4: 637 -642

Lim, J.H., K.J. Park, B.K. Kim, J.W. Jeong and H.J. Kim. 2012. Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.). Food Chem. 135: 1065-1070.

Philippine Medicinal Plants. 2012. Caranda. Available: http://goo.gl/kBShxE. Accessed Aug. 6, 2014.

Sharma, S.K., and S.K. Banyal. 2010. Rehabilitation of marginal lands through karonda cultivation. Int. Agri. 49: 6-10.

Shiow, Y.W., and H.S. Lin. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. J. Agri. Food Chem., 48: 140–146.

Sudjaroen, Y., and K. Suwannahong. 2017. *In vitro* antioxidant, antibacterial, and cytotoxicity activities from Karanda (*Carissa carandas* L.) fruit extracts. Int. J. Green Pharm. 11: S189-S193.

Sulaiman, S.F., W.S. Teng, O.K. Leong, S.R. Yusof, and T.S.T. Muhammad. (n.d.). Anticancer study of *Carissa carandas* extracts. Available: http://goo.gl/ W2WjSG. Accessed May 16, 2014.

Tayyab, M. Azeem, M. Qasim, and R. Ahmad. 2016. Effect of sea salt irrigation on plant growth, yield potential and some biochemical attributes of *Carissa carandas*. Pak. J. Bot. 3: 853-859.

แก่นเกษตร 48 ฉบับที่ 5: 980-989 (2563)./doi:10.14456/kaj.2020.89.

Verma, S., and H.S. Chaudhary. 2011. Effect of *Carissa carandas* against Clinically Pathogenic bacterial strains. J. Pharm. Res. 4: 3769-3771.**Table 1** Feed ingredients component and analytical nutrients composition of the control diets for each period of growth (Cont.)