บทที่ 4

ผลการทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> การสกัดสารจากใบพลูคาวและศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

1. การสกัดน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) จากใบพลูคาว

ในการทดลองนี้ใช้ใบพลูคาวโดยมีน้ำหนักสด 601.67 กรัม มาทำการกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่าได้ส่วนของน้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 0.48 กรัม เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 0.08 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำหนักสด โดยมีวิธีการคำนวณ ดังนี้

$$\frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดที่ได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักสดของใบพลูคาวปั่นละเอียด (กรัม)}} \times 100 = \text{เปอร์เซ็นต์น้ำหนักสด (\%w/w)}$$

$$\frac{0.48 \text{ กรัม}}{601.67 \text{ กรัม}} \times 100 = 0.08 \text{ \%w/w}$$

2. การสกัดส่วนสกัดหยาบจากกากพลูคาวที่เหลือจากการกลั่นน้ำมันหอมระเหย

2.1 ส่วนของสารไม่มีขั้ว (nonpolar)

เมื่อนำกากพลูคาวที่ได้จากการกลั่นน้ำมันหอมระเหยมาสกัดส่วนของสารไม่มีขั้ว โดยใช้กากพลูคาวน้ำหนักสด 700.00 กรัม พบว่าได้ส่วนของสารไม่มีขั้ว เท่ากับ 4.24 กรัม เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 0.60 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำหนักสด โดยมีวิธีการคำนวณแช่นเดียวกันกับการสกัดน้ำมันหอมระเหย ดังนี้

$$\frac{4.24 \text{ กรัม}}{700.00 \text{ กรัม}} \times 100 = 0.60 \text{ \%w/w}$$

2.2 ส่วนของสารมีขั้ว (polar)

เมื่อนำกากพลูคาวที่ได้จากการกลั่นน้ำมันหอมระเหยมาสกัดส่วนของสารมีขั้ว โดยใช้กากพลูคาวน้ำหนักสด 700.00 กรัม พบว่าได้ส่วนของสารมีขั้ว เท่ากับ 3.12 กรัม เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 0.44 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำหนักสด โดยมีวิธีการคำนวณเช่นเดียวกันกับการสกัดน้ำมันหอมระเหย ดังนี้

$$\frac{3.12 \text{ กรัม}}{700.00 \text{ กรัม}} \quad X \quad 100 = 0.44 \text{ \%w/w}$$

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบโดยวิธี TLC-bioassay

นำสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำมันหอมระเหย ส่วนที่มีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้วมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Cladosporium cladosporioides* พบว่า

3.1 น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ได้โดยพบแถบยับยั้งที่ Rf_1 0.17-0.23 และ Rf_2 0.53-0.70 และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้โดยพบแถบยับยั้งที่ Rf_1 0.17-0.30 และ Rf_2 0.53-0.70 (ดูภาพที่ 3)

3.2 สารสกัดส่วนที่ไม่มีขั้วซึ่งสกัดโดยไดคลอโรมีเทนพบว่าไม่ปรากฏแถบยับยั้งเชื้อราทั้ง *Cladosporium cladosporioides* และ*Colletotrichum gloeosporioides* (ดูภาพที่ 4)

3.3 สารสกัดส่วนที่มีขั้วซึ่งสกัดโดยเมธานอลพบว่าไม่ปรากฏแถบยับยั้งเชื้อราทั้ง *Cladosporium cladosporioides* และ *Colletotrichum gloeosporioides* (ดูภาพที่ 5)

3.4 ชุดควบคุม ประกอบด้วย 2 ชุด คือ ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายเมธานอลพบว่าเกิดการเจริญของเชื้อราตลอดทั้งแผ่น (ดูภาพที่ 6)

ภาพที่ 3 ผล TLC-bioassay ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (ขวา) และเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (ซ้าย) ของน้ำมันหอมระเหย (ปรากฏแถบยับยั้ง)

ภาพที่ 4 ผล TLC-bioassay ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (ซ้าย) และ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (ขวา) ของสารสกัดไม่มีขั้ว (ไม่ปรากฏแถบยับยั้ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพที่ 5 ผล TLC-bioassay ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (ซ้าย) และ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (ขวา) ของสารสกัดมีขั้ว (ไม่ปรากฏแถบยับยั้ง)

ภาพที่ 6 ผล TLC-bioassay ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของชุดควบคุมซึ่งใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (ซ้าย) และเมธานอล (ขวา) (ไม่ปรากฏแถบยับยั้ง)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

4. การนำสารสกัดบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* มาหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง GC-MS

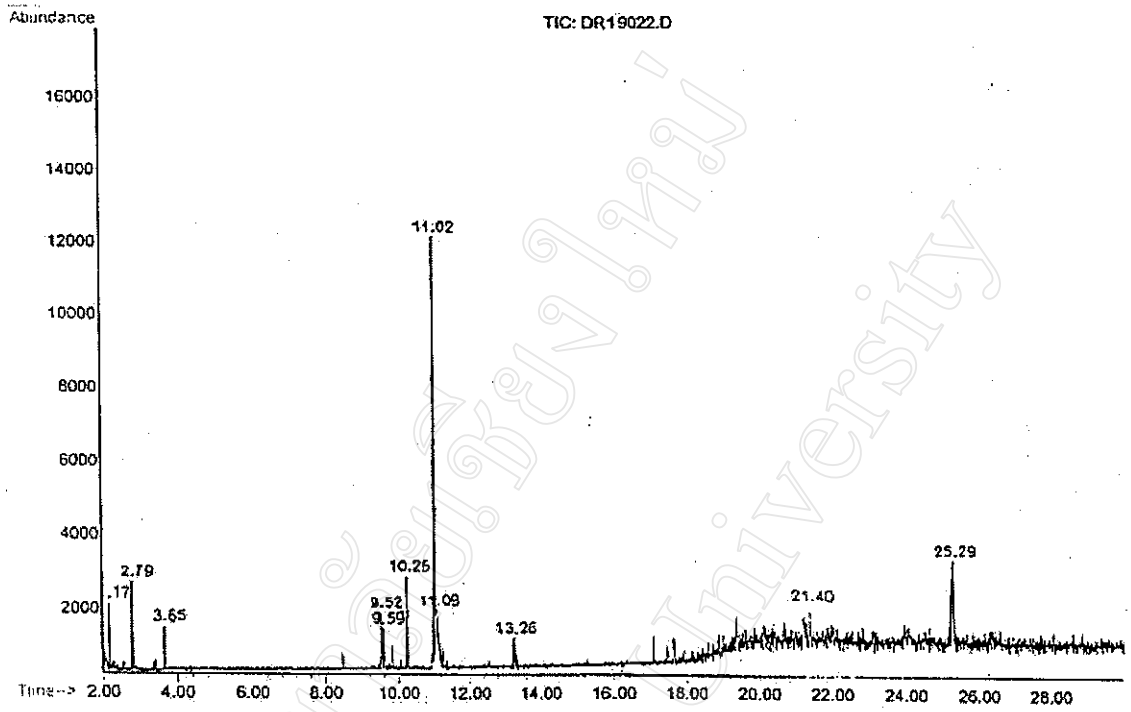
จากข้อ 3 พบแถบยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* 2 แถบ คือ แถบยับยั้ง Rf_1 และ Rf_2 ซึ่งตรงกับแถบยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ทั้ง 2 แถบ (ดูภาพที่ 3) และพบว่าแถบยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ที่ Rf_2 ที่ได้จากการทดลองนั้นตรงกับแถบยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ซึ่งแน่งน้อยได้ทำการวิเคราะห์ไว้แล้วเมื่อปี 2541 พบว่าสารยับยั้งที่ Rf_2 คือสารคาพริลแอลดีไฮด์ (capryl aldehyde) ดังนั้นผู้ทำการทดลองจึงนำเฉพาะแถบต้านเชื้อราที่ Rf_1 มาทำการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง GC-MS โดยให้ใช้ชื่อแทนสารบริสุทธิ์ที่ Rf_1 ว่า สาร A ซึ่งได้ผลการทดลอง ดังนี้

สภาวะที่ใช้

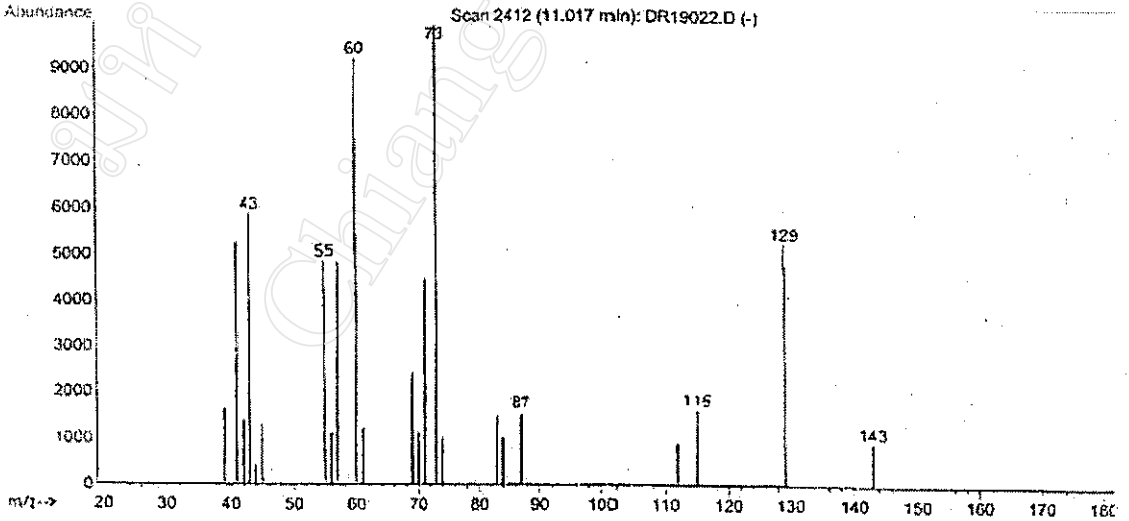
Column	DB-1
Carrier gas	N_2
Flow rate	50 kg/cm^2
Injection volume	0.6 µl
Detector	FID
Injection temperature	230 °C
Detection temperature	240 °C
Initial temperature	100 °C
Range of temperature	100-200 °C
Rate	3 °C/min

ผลการวิเคราะห์

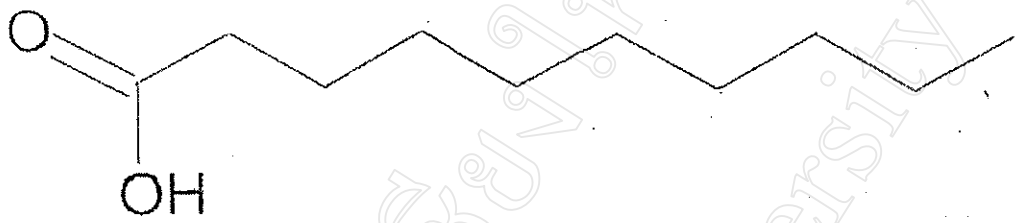
พบว่าสาร A มี retention time ที่ 11.02 min ดังภาพที่ 7 และมีแมสสเปกตรัมดังภาพที่ 8 ซึ่งจากฐานข้อมูลใน library (Wiley) มี % identity เท่ากับ 90 % คาดว่าสาร A น่าจะเป็น decanoic acid หรือ capric acid ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง ดังภาพที่ 9 และมีรูปแบบการแตกตัวในแมสสเปกโตรมิเตอร์ดังรูปที่ 10 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการแตกแมสของสาร A จะเห็นว่าสาร A มี fragment ต่าง ๆ คล้ายคลึงกับ capric acid จึงคาดว่าเป็นสารตัวเดียวกัน



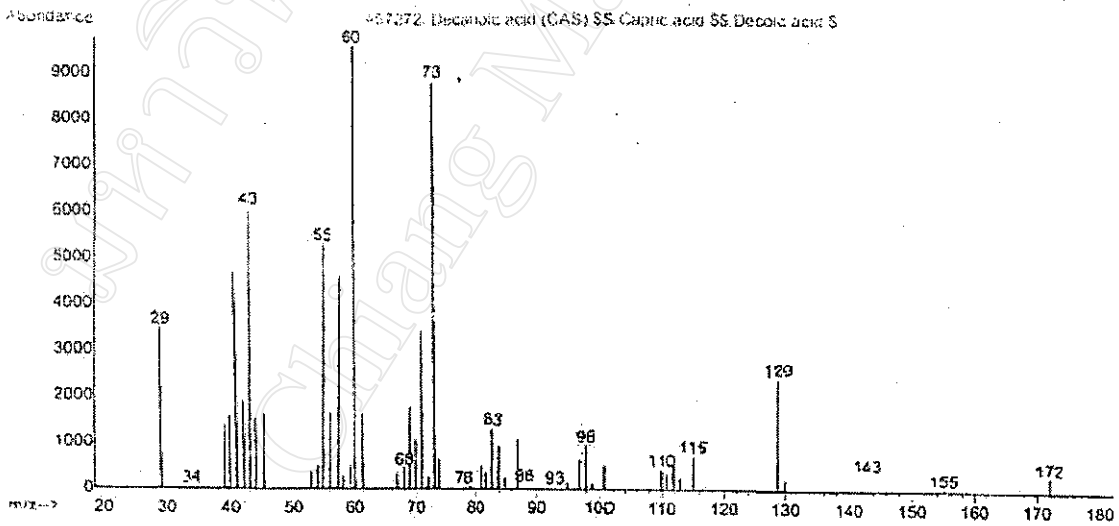
ภาพที่ 7 โครมาโทแกรมของสาร A จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS



ภาพที่ 8 ผลแมสสเปกตรัมของสาร A



ภาพที่ 9 สูตรโครงสร้างของสาร capric acid



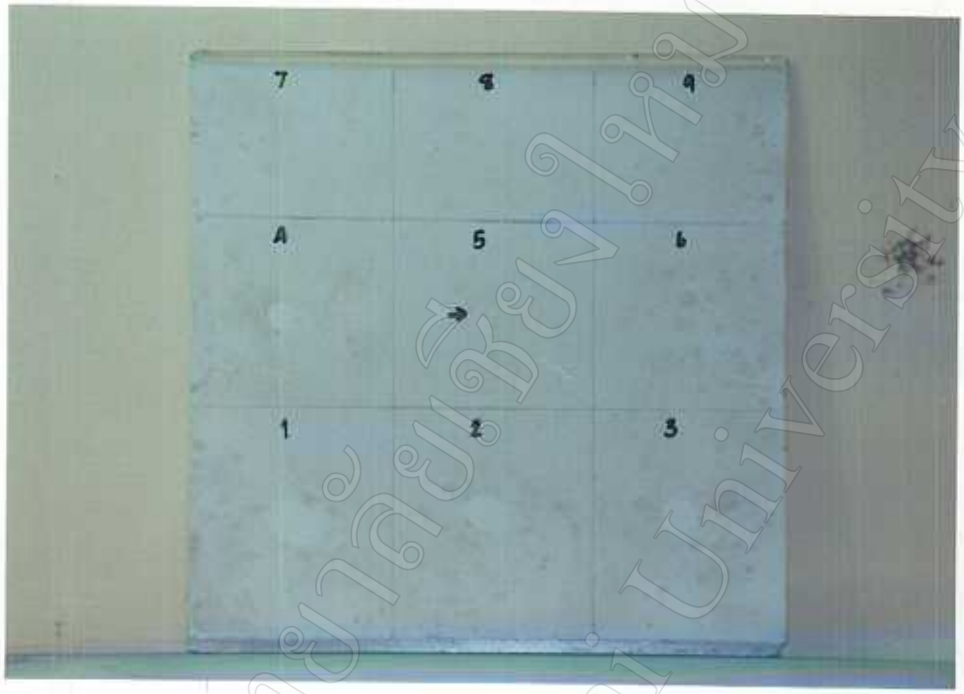
ภาพที่ 10 แมสสเปกตรัมของสาร capric acid (Wiley)

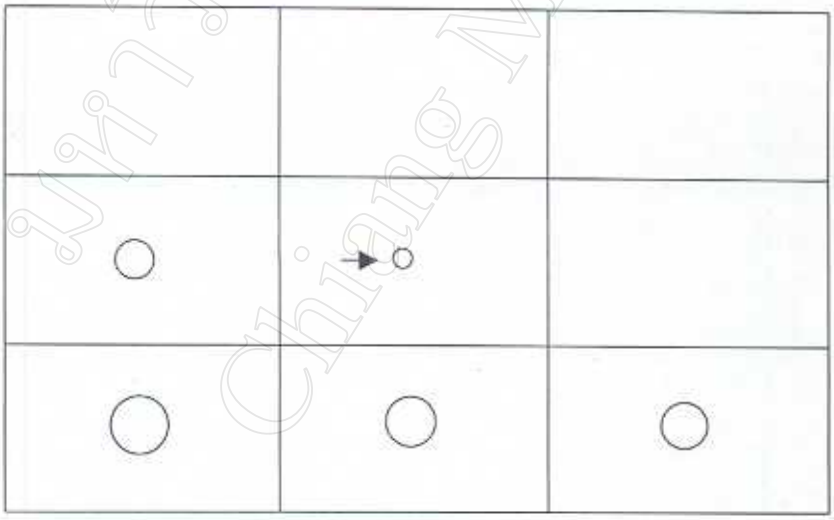
5. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration) ของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

หลังจากทราบว่าสาร A เป็น capric acid และอีกสารหนึ่งเป็น capryl aldehyde แล้ว จึงนำสารทั้ง 2 ชนิด รวมทั้งน้ำมันหอมระเหยและสารฆ่าเชื้อรา benomyl มาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกัน ซึ่งได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 11, 12, 13, และ 14 ดังนี้

ตารางที่ 2 ผลการทดลองในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสาร capric acid, capryl aldehyde, น้ำมันหอมระเหย และสารฆ่าเชื้อรา benomyl

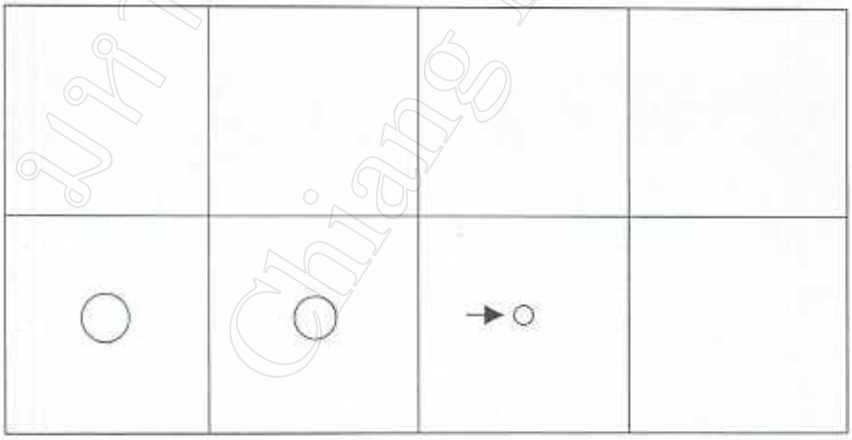
ช่องที่ (ภาพที่ 11-14)	ความเข้มข้นของสาร (ppm)	เส้นผ่านศูนย์กลางของแถบยับยั้ง (เซนติเมตร)			
		Capric acid	Capryl aldehyde	น้ำมันหอมระเหย	Benomyl
1	8,000	1.6	1.0	0.8	2.0
2	4,000	1.6	0.6	0.5	2.0
3	2,000	1.2	0.4	0.25	2.0
4	1,000	1.0	-	-	1.8
5	500	0.6	-	-	2.0
6	250	-	-	-	2.0
7	125	-	-	-	1.5
8	62.5	-	-	-	1.2
9	31.25	-	-	-	1.0
10	15.62	-	-	-	-





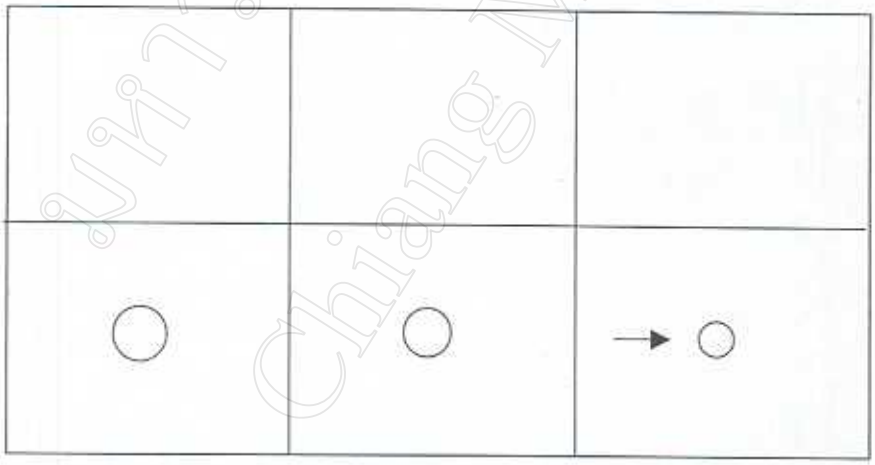
ภาพที่ 11 ผลการทดลองหาค่า MIC ของ capric acid โดยมีค่า MIC เท่ากับ 500 ppm (ช่องที่ 1 = 8,000 ppm, 2 = 4,000 ppm, 3 = 2,000 ppm, 4 = 1,000 ppm, 5 = 500 ppm, 6 = 250 ppm, 7 = 125 ppm, 8 = 62.5 ppm, 9 = 31.25 ppm)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



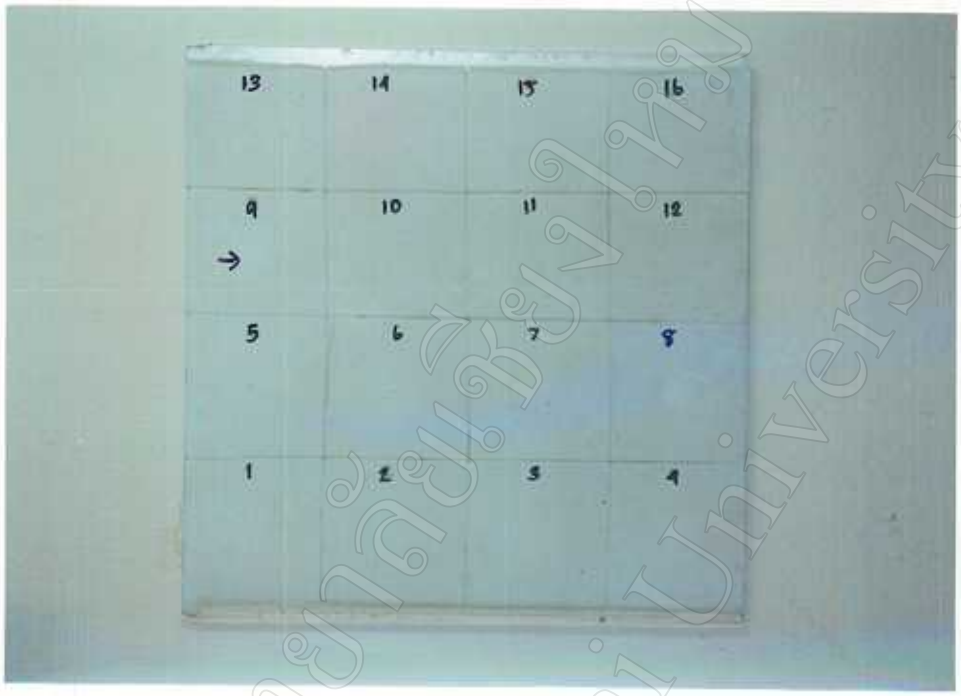
ภาพที่ 12 ผลการทดลองหาค่า MIC ของ capryl aldehyde โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2,000 ppm (ช่องที่ 1 = 8,000 ppm, 2 = 4,000 ppm, 3 = 2,000 ppm, 4 = 1,000 ppm, 5 = 500 ppm, 6 = 250 ppm, 7 = 125 ppm, 8 = 62.5 ppm)

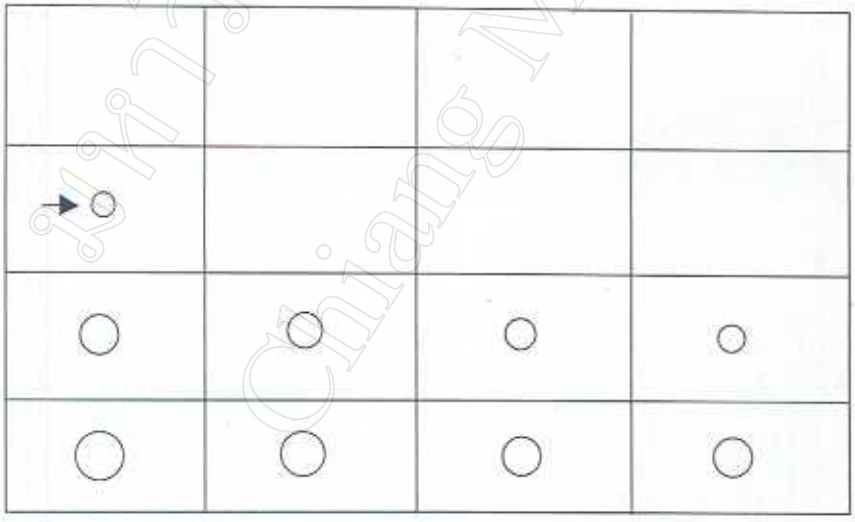
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



ภาพที่ 13 ผลการทดลองหาค่า MIC ของ น้ำมันหอมระเหย โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2,000 ppm (ช่องที่ 1 = 8,000 ppm, 2 = 4,000 ppm, 3 = 2,000 ppm, 4 = 1,000 ppm, 5 = 500 ppm, 6 = 250 ppm)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University





ภาพที่ 14 ผลการทดลองหาค่า MIC ของ benomyl โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 ppm (ช่องที่ 1 = 8,000 ppm, 2 = 4,000 ppm, 3 = 2,000 ppm, 4 = 1,000 ppm, 5 = 500 ppm, 6 = 250 ppm, 7 = 125 ppm, 8 = 62.5 ppm, 9 = 31.25 ppm , 10 = 15.62 ppm)

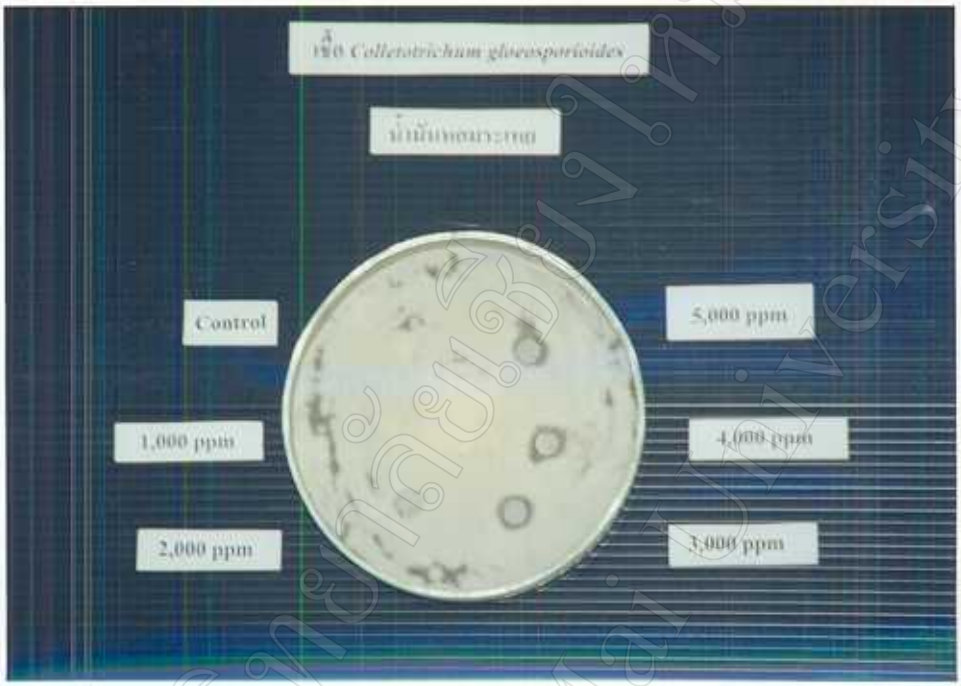
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

6. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยวิธี paper disc technique ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการทดลองหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยบนแผ่น TLC-plate ทำให้ทราบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ คือ 2,000 ppm ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงนำน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 และ 5,000 ppm มาทดสอบประสิทธิภาพบนจานอาหาร PDA โดยวิธี paper disc technique ซึ่งได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 15 ดังนี้

ตารางที่ 3 ผลการทดลองในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยพลูคาวบนจานอาหาร PDA โดยวิธี paper disc technique

ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย (ppm)	เส้นผ่านศูนย์กลางของแถบยับยั้ง (เซนติเมตร)
5,000	0.12
4,000	0.11
3,000	0.10
2,000	0.07
1,000	-
control (dichloromethane)	-



ภาพที่ 15 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของน้ำมันหอมระเหยบนจานอาหาร PDA ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่น้ำมันหอมระเหยยับยั้งได้ คือ 2,000 ppm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

7. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

จากการทดสอบในการหาจำนวนชั่วโมงที่เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จะเริ่มงอกในสภาวะปกติ พบว่า เชื้อจะเริ่มงอกชั่วโมงที่ 7 แต่เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยมาทดสอบกับสปอร์ของเชื้อรา พบว่า น้ำมันหอมระเหยจะสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 16

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

ชั่วโมงที่	เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อรา	
	ชุดควบคุม	น้ำมันหอมระเหย
5	0	0
6	0	0
7	38.89	0
8	51.42	0
9	62.86	0
12	100.00	0

A B

ภาพที่ 16 A = ลักษณะการงอกปกติของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (ชุดควบคุม)
B = ลักษณะการถูกยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

8. การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเชื้อรา (morphology) โดยใช้กล้อง TEM (Transmission Electron Microscope)

เมื่อนำเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เจริญในอาหารเหลวซึ่งมีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบ มาตรวจลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับที่เจริญในอาหารเหลวปกติ (ชุดควบคุม) โดยใช้กล้อง TEM พบว่า ลักษณะและองค์ประกอบของเซลเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในภาพที่ 17โดยเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบ มีลักษณะรูปร่างของเซลเหี่ยวผิดรูป เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเซลมีรูปร่างสมบูรณ์ ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการสูญเสียของเหลวภายในเซลออกมาภายนอก (plasmolysis) และส่วนประกอบอื่น ๆ ภายในเซล เช่น ไมโตคอนเดรีย (mitocondria) แวคิวโอล (vacuole) อินคลูชั่นบอดี (inclusion body) นิวคลีโอลัส (nucleolus) และ นิวเคลียส (nucleus) เกิดการสลายตัว จนไม่สามารถสังเกตได้

A

B

ภาพที่ 17 ลักษณะของเซลปกติของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เลี้ยงในอาหารปกติ (A = 8000X) และเซลของเชื้อราซึ่งออร์แกเนลล์ต่าง ๆ ถูกทำลายหลังจากเลี้ยงในอาหารที่ผสมน้ำมันหอมระเหย (B = 15000X)โดย CW = ผนังเซล (cell wall), CM = เซลเมมเบรน (cell membrane), M = ไมโตคอนเดรีย (mitocondria), N = นิวเคลียส (nucleus), NE = นิวคลีโอลัส (nucleolus), IB = อินคลูชั่นบอดี (inclusion body),V = แวคิวโอล (vacuole)

<u>การทดลองที่ 2</u> การประยุกต์ใช้กับมะม่วง

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยวโดยเริ่มจากความเข้มข้นต่ำสุด คือ 2,000 4,000 6,000 8,000 และ 10,000 ppm ซึ่งใช้น้ำกลั่นผสม tween 20 ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อลิตร เป็นตัวทำละลาย โดยมีชุดควบคุมเป็น น้ำกลั่นผสม tween 20 เช่นกัน เมื่อบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 5 วันพบว่าแผลมีการขยายเพิ่มขึ้นจึงทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง แล้วนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าขนาดแผลของชุดการทดลองที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และชุดควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5) ซึ่งหมายความว่าในการทดลองนี้น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 2,000 ppm จนถึง 10,000 ppm ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ ดังแสดงในภาพที่ 18

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยวโดยใช้น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย (ppm)	เส้นผ่านศูนย์กลางของแผลบนผลมะม่วง (เซนติเมตร)		
	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
2,000	0.35	0.66	0.83
4,000	0.43	0.70	0.98
6,000	0.40	0.77	0.98
8,000	0.41	0.70	0.99
10,000	0.41	0.65	0.97
ชุดควบคุม	0.27	0.59	0.89
% CV	25.57	30.66	20.30
LSD	0.11	0.23	0.21

ภาพที่ 18 ผลการทดลองการนำน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University