บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การสกัดสารจากใบพลูคาวและศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

1. การสกัดสารจากใบพลูคาว

เมื่อทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบพลูคาวโดยใช้วิธีกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่า ได้ส่วนของน้ำมันหอมระเหยเพียง 0.08 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด (% w/w) ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมาก ต้องใช้ชุดกลั่นขนาดใหญ่เพื่อให้ได้ปริมาณของน้ำมันหอมระเหยเพียงพอต่อการนำไปทดลอง ในส่วนของสารอื่น ทั้งสารไม่มีขั้ว (nonpolar) และสารมีขั้ว (polar) ทำการสกัดโดยใช้วิธีแช่กากใบพลูคาวที่ผ่านการสกัดแยกเอาส่วนของน้ำมันหอมระเหยออกไปแล้ว พบว่าได้ปริมาณของสารสกัดหยาบ 0.60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด (% w/w) และ 0.44 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด (% w/w) ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นแล้ว ส่วนของสารไม่มีขั้วและมีขั้วซึ่งสกัดโดยการแช่จะให้ปริมาณของสารสกัดที่มากกว่า แต่วิธีนี้จะมีข้อเสีย คือ สิ้นเปลืองตัวทำละลายมากและสารสกัดหยาบที่ได้จะมีสารปนเปื้อนมาก ต่างจากน้ำมันหอมระเหยที่มีสารปนเปื้อนน้อยกว่า (เอื้อพร,2531)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบโดยวิธี TLC-bioassay และการหาสูตรโครงสร้างของสารยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหย สารไม่มีขั้วและสารมีขั้ว ที่สกัดได้จากใบพลูคาวโดยใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมธานอล ตามลำดับ มาทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดโดยวิธี TLC-bioassay พบว่า น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Cladosporium cladosporioides* ได้ โดยแถบที่น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ มี 2 แถบ คือ Rf_1 0.17-0.30 และ Rf_2 0.53-0.70 ส่วนแถบที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Cladosporium cladosporioides* มี 2 แถบ เช่นกัน คือ Rf_1 0.17-0.23 และ Rf_2 0.53-0.70 ซึ่งเมื่อนำแถบยับยั้งมาเปรียบเทียบกันระหว่าง 2 เชื้อ พบว่าตรงกัน (ดูภาพที่ 3) โดยแถบยับยั้ง Rf_2 ที่ได้จากการทดลองยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 นั้น ตรงกับแถบยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ซึ่งแน่งน้อย (2541) ได้เคยนำสารสกัดจากใบพลูคาวมาทำการยับยั้ง

เชื้อดังกล่าว และได้ทำการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของแถบยับยั้ง Rf_2 พบว่าเป็นสาร คาพริลแอลดีไฮด์ (capryl aldehyde) หรือ คาโพรนแอลดีไฮด์ (capronaldehyde) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Hayashi *et al.* (1995) ที่ได้ทำการกลั่นน้ำมันหอมระเหยและพบสารสำคัญ คือ capryl aldehyde, methyl-n-nonyl ketone และ lauryl aldehyde ส่วนสารบนแถบยับยั้ง Rf_1 นั้น ผู้ทดลองได้นำไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง GC-MS พบว่าสารบนแถบยับยั้ง Rf_1 คือ คาพริคแอซิด (capric acid) หรือ เดคาโนอิคแอซิด (decanoic acid) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานผลในปี 1972 ของ Kameoka *et al.* ซึ่งแน่งน้อย (2541) ได้อ้างไว้ว่าได้ทำการศึกษาส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นด้วยไอน้ำจากใบพลูคาว พบว่ามีส่วนประกอบเป็นสารเคมี 32 ชนิดด้วยกัน และหนึ่งในนั้น มีสาร capric acid โดยคาดว่าสารที่ให้กลิ่นเฉพาะของพลูคาวน่าจะเป็น methyl-n-nonyl ketone และ methyl lauryl sulfide

ในการทำ TLC-bioassay ในการทดลองครั้งนี้ เชื้อราที่ต้องการยับยั้ง คือ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* แต่เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้มีลักษณะเส้นใยเจริญเป็นสีขาวปนเทา จึงทำให้เห็นผลการทดลองไม่ค่อยชัดเจน ดังแสดงในภาพต่าง ๆ ผู้ทดลองจึงนำเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ซึ่งมีลักษณะเส้นใยเจริญเป็นสีเขียวมาทดลองเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ให้เห็นผลการทดลองชัดเจนยิ่งขึ้น

ข้อควรคำนึงในการทำ TLC-bioassay

1. เชื้อราที่จะนำมาทดลองควรมีลักษณะเส้นใยที่สามารถสังเกตได้เมื่อเจริญอยู่บนแผ่น TLC
2. ในการสังเกตแถบยับยั้งเชื้อรา จะสังเกตได้ชัดเจนขึ้นเมื่อทำการหยดสารสกัดบนแผ่น TLC ด้วยปริมาณความเข้มข้นที่มากพอและสม่ำเสมอกันทั้งแถบ รวมถึงการพ่นสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อราควรมีความเข้มข้นของสปอร์มากพอหรือประมาณ 25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และใช้เวลาในการบ่มประมาณ 2-3 วันจะสังเกตเห็นแถบยับยั้งได้ชัดเจนขึ้น

3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration ; MIC) ของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

หลังจากทราบว่าสารบนแถบยับยั้ง Rf_1 และ Rf_2 คือ สาร capric acid และ capryl aldehyde แล้ว จึงนำสารทั้ง 2 ชนิด รวมทั้งน้ำมันหอมระเหยและสารฆ่าเชื้อรา benomyl มาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกัน พบว่า

1. ค่า MIC ของ capric acid ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ คือ 0.0250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ค่า MIC ของ capryl aldehyde ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ คือ 0.1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. ค่า MIC ของ น้ำมันหอมระเหย ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ คือ 0.1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
4. ค่า MIC ของ benomyl ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ คือ 0.0016 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งจะเห็นว่าสารฆ่าเชื้อรา benomyl มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* รองลงมา ได้แก่ capric acid ส่วน capryl aldehyde และน้ำมันหอมระเหยนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้เท่ากัน

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าสาร benomyl จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุด แต่เนื่องจากสาร benomyl เป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่มีพิษ เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ และหากใช้ควบคุมโรคพืชในปริมาณที่มากและติดต่อกันเป็นเวลานาน ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคจะลดน้อยลง เนื่องจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จะมีความต้านทานต่อสารเคมีเพิ่มขึ้น (Farungsang and Farungsang,1992)

ส่วนสาร capric acid ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรองลงมา เป็นกรดไขมัน (fatty acid) ที่มีคาร์บอน 10 อะตอม มีลักษณะเป็นของแข็ง มีจุดหลอมเหลว 31.4 องศาเซลเซียส จุดเดือด 270 องศาเซลเซียส มีกลิ่นเหม็นหืน เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษกับหนู พบว่ามีค่า LD_{50} 129 ± 5.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในทางอุตสาหกรรมจะใช้ capric acid ในการสังเคราะห์กลิ่นหอมของผลไม้ (Budavari,1996)

ในปี 2001 Senanayake and Shahidi ได้ทำการสังเคราะห์โครงสร้างของไขมันโดยใช้ capric acid เป็นสารตั้งต้นร่วมกับน้ำมันปลา ซึ่งประกอบไปด้วย สาร eicosapentaenoic acid (EPA) และ docosahexaenoic (DHA) โดยใช้เอนไซม์ไลเปส (lipase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในการสังเคราะห์โครงสร้างของกรดไขมัน capric acid นั้นเป็นกรดไขมันจำพวก Medium-chain

Fatty Acid (MCFA) ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัว ทางการแพทย์มักใช้สาร MCFA กับผู้ป่วยที่ต้องการลดน้ำหนัก แต่ สาร MCFA ไม่ใช่กรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย จึงต้องนำมาสังเคราะห์โครงสร้างของกรดไขมัน ร่วมกับ EPA และ DHA ซึ่งกรดไขมันทั้ง 2 ชนิดนี้ มีประโยชน์ต่อสุขภาพ คือ สามารถป้องกันโรคข้ออักเสบ โรคความดันโลหิตสูงกว่าปกติ อีกทั้ง DHA ยังเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อการพัฒนาของระบบประสาทส่วนกลางอีกด้วย นอกจากนั้นในปี 1996 Matuszewska *et al.* ยังได้นำ mono และ diglyceride จาก capric acid (MDG) มาใช้เป็นส่วนประกอบในการทำแคปซูลเพื่อนำมาผลิตเป็นยาอีกด้วย ในส่วนของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ในปี 2000 Neyts *et al.* พบว่า monoglyceride ของ capric acid สามารถต้านเชื้อ HIV, HSV, *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคหนองใน และ *Chlamydia trachomatis* ซึ่งเป็นปรสิตทำให้เกิดโรคหลอดปัสสาวะอักเสบและทวารหนักอักเสบ

ส่วนสาร capryl aldehyde ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* รองลงมาจาก capric acid นั้น เป็นสารจำพวกแอลดีไฮด์ มีจำนวนคาร์บอน 8 อะตอม มีลักษณะเป็นของเหลว มีจุดเดือด 163.4 องศาเซลเซียส (Budavari, 1996) โดยทั่วไปแล้วสารจำพวกแอลดีไฮด์จะทำให้ระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อผิวด้านในของร่างกายที่เป็นเมือก เช่น ในจมูก และ ช่องทางเดินอาหาร เป็นต้น และหากสูดดมเข้าไป อาจทำให้เกิดอาการมึนงง ซึม หรือทำให้เกิดอาการง่วงนอนได้ ทั้งนี้เนื่องจากสารมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง (Fairhall, 1969) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าสาร capryl aldehyde จะเป็นสารจำพวกแอลดีไฮด์ แต่ในน้ำมันหอมระเหยพลูคาวก็มีสาร capryl aldehyde ปนอยู่น้อยมาก จากการรายงานของ วีณา ในปี 2543 พบว่า พลูคาวมีพิษต่อร่างกายน้อยมาก ซึ่งผลข้างเคียงที่พบ คือ หากรับประทานมากจนเกินไปอาจทำให้อาเจียนอันเนื่องจากพลูคาวมีกลิ่นคาว

แม้ว่าสาร capryl aldehyde จะมีความเป็นพิษอยู่บ้าง แต่ในปี 1998 Bedino and Testore รายงานว่าภายในอัณฑะของหนู มีเอนไซม์ aldehyde dehydrogenase (ALDH) ซึ่งสามารถย่อยสาร capryl aldehyde ได้ โดยมี Mg^{+} เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และในปี 2002 Wang *et al.* ได้รายงานว่า ภายในตับก็มีเอนไซม์ aldehyde dehydrogenase (ALDH) ซึ่งสามารถย่อยสาร capryl aldehyde ได้เช่นกัน

4. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยวิธี paper disc technique ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หลังจากที่ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี paper disc technique พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อได้ เท่ากับ 2,000 ppm ซึ่งมีค่าตรงกันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งได้บนแผ่น TLC-plate ขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นที่น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งได้ มีขนาด 0.12, 0.11, 0.10 และ 0.07 เซนติเมตร ที่ความเข้มข้น 5,000, 4,000, 3,000 และ 2,000 ppm ตามลำดับ โดยถ้าวงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างกว่าชุดควบคุม 3 มิลลิเมตร ถือว่าเชื้อนั้นไวต่อการทดสอบ (sensitive) ถ้าวงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างกว่าชุดควบคุม 2-3 มิลลิเมตร ถือว่าเชื้อนั้นไวต่อการทดสอบปานกลาง (moderatery sensitive) และถ้าวงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างกว่าชุดควบคุมน้อยกว่า 2 มิลลิเมตร ก็จัดว่าเชื้อนั้นต้านทานต่อการทดสอบ (resistance) (วัชรี, 2543) ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ ทำให้ทราบว่า ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยตั้งแต่ 2,000 ppm ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยถือว่าเชื้อนั้นไวต่อการทดสอบ

5. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

จากการทดสอบเบื้องต้นในการหาจำนวนชั่วโมงที่เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จะเริ่มงอกในสภาวะปกติ พบว่า เชื้อจะเริ่มงอกชั่วโมงที่ 7 โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอก 38.89 เปอร์เซ็นต์ และที่ชั่วโมงที่ 12 จะมีเปอร์เซ็นต์การงอก 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยมาทดสอบประสิทธิภาพกับสปอร์เชื้อรา พบว่าน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ 12 ชั่วโมง ไม่พบการงอกของสปอร์เลย

6. การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเชื้อรา (morphology)

เมื่อนำเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เจริญในอาหารเหลวซึ่งมีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบ มาตรวจลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เจริญในอาหารเหลวปกติ (ชุดควบคุม) โดยใช้กล้อง TEM พบว่า ลักษณะและองค์ประกอบของเซลเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบ มีลักษณะรูปร่างของเซลเหี่ยวผิดรูปเมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเซลมีรูปร่างสมบูรณ์ ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการสูญเสียของเหลวภายในเซลออกมาภายนอกเซล (plasmolysis) ส่วนประกอบอื่น ๆ ภายในเซล เช่น

ไมโตคอนเดรีย (mitocondria) แวคิวโอล (vacuole) อินคลูชั่นบอดี (inclusion body) นิวคลีโอลัส (nucleolus) และนิวเคลียส(nucleus) เกิดการสลายตัว จนไม่สามารถสังเกตได้

ทุกส่วนประกอบของเซลเชื้อรามีความสำคัญต่อการเจริญและพัฒนาของเซล ซึ่งจากผลการทดลองนำน้ำมันหอมระเหยมาทดสอบกับเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ทำให้ โครงสร้างต่าง ๆ ภายในเซลถูกทำลายโดยนิวเคลียสซึ่งประกอบด้วยนิวคลีโอลัสถูกทำลาย ในส่วนของไมโตคอนเดรียและอินคลูชั่นบอดีซึ่งทำหน้าที่สร้างและเป็นแหล่งพลังงานก็สลายไป จึงส่งผลให้เซลเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ถ้าได้รับน้ำมันหอมระเหยในปริมาณความเข้มข้นมากกว่า 500 ppm

<u>การทดลองที่ 2</u> การประยุกต์ใช้กับมะม่วง

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยว โดยเริ่มจากความเข้มข้นต่ำสุด คือ 2,000, 4,000, 6,000, 8,000 และ 10,000 ppm บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 5 วัน พบว่า ขนาดแผลของชุดการทดลองที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และชุดควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งหมายความว่า ในการทดลองนี้ ซึ่งใช้วิธีสร้างแผลบนผลมะม่วงแล้วหยดสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เมื่อบ่มทิ้งไว้จนครบ 12 ชั่วโมงจึงหยดน้ำมันหอมระเหยลงบนแผลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2,000 จนถึง 10,000 ppm ยังไม่สามารถยับยั้งการเกิดอาการของโรคอันเนื่องจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ อาจเนื่องจาก น้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสารที่ไม่ละลายในน้ำไม่สามารถซึมเข้าสู่ผิวของผลมะม่วงที่เกิดการติดเชื้อ จึงทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้

เอื้อพร (2531) ได้อธิบายความแตกต่างระหว่าง volatile oil และ fixed oil ไว้ดังนี้ คือ

Volatile oil	Fixed oil
1. ระเหยได้แต่ช้า	1. ระเหยไม่ได้
2. กลั่นจากพืชด้วยไอน้ำได้	2. กลั่นจากพืชด้วยไอน้ำไม่ได้
3. ไม่มี glyceryl esters ของ fatty acids	3. ประกอบด้วย glyceryl estersของ fatty acids
4. ไม่ทำให้เกิดจุดมัน (permanent grease spot) บนกระดาษ	4. ทำให้เกิดจุดมันบนกระดาษได้
5. saponify ด้วยด่างไม่ได้	5. ถูก saponify ด้วยด่างได้
6. ไม่เหม็นหืน (rancid) แต่สามารถถูก oxidized และเกิด resinify ได้	6. เหม็นหืน

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่ผ่านมา พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* แต่เนื่องจากคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหย ที่ไม่ละลายน้ำและไม่สามารถซึมลึกเข้าสู่ผิวของมะม่วงได้ ดังนั้นในอนาคตจึงควรทำการศึกษาถึงวิธีการที่เหมาะสมที่จะช่วยให้น้ำมันหอมระเหยนั้นซึมลึกเข้าสู่ผิวของมะม่วงได้นานพอที่จะมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และสามารถควบคุมการพัฒนาของโรคแอนแทรคโนสได้ โดยการทำให้น้ำมันหอมระเหยอยู่ในรูปของสาร emulsion เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University