รายงานผลการวิจัย

เรื่อง ประสิทธิภาพของสารสกัดจากไมยราบต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงน้ำดอกไม้ในระหว่างการเก็บรักษา

Efficacy of Extracts from *Mimosa pudica* L. for Controlling Anthracnose Disease of 'Nam Dok Mai' Mangoes During Storage

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2556
จำนวน 345,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวฐิติพรรณ ฉิมสุข

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
15/พฤษภาคม/2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องประสิทธิภาพของสารสกัดจากไมยราบต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงน้ำดอกไม้ในระหว่างการเก็บรักษาได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย เงินงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ มีระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2555 ถึงเดือนตุลาคม 2556 เป็นเงิน 345,000 บาท (สามแสนสี่หมื่นห้าพันบาทถ้วน) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ คณะกรรมการดำเนินงานพิจารณา ผู้เกี่ยวข้องในการดำเนินการวิจัยทุกท่าน สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ในการเอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินการวิจัยและอุปกรณ์เครื่องมือในการทดลอง สุดท้ายขอขอบคุณสาขาวิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ในการเอื้อเฟื้อการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ และกระบวนการทดสอบเชื้อราทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

ฐิติพรรณ ฉิมสุข

หัวหน้าโครงการวิจัย

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้
B : .....
I : .....
วันที่ ..... 3 ก.ย. 2557
เลขเรียกหนังสือ

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	3
คำนำ	5
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	14
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	15
การตรวจเอกสาร	16
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	21
ผลการวิจัย	26
วิจารณ์ผลการวิจัย	26
สรุปผลการวิจัย	42
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	50

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ตัวอย่างสารต้านอนุมูลหรือโปรตีนบางชนิดที่สามารถพบได้ในธรรมชาติ	12
ตารางที่ 2	ประโยชน์และดัชนีตัววัดความสำเร็จ	15
ตารางที่ 3	สารเคมี	21
ตารางที่ 4	เครื่องมือและอุปกรณ์	22
ตารางที่ 5	เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดไมยราบด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ	27
ตารางที่ 6	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดไมยราบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ	27
ตารางที่ 7	ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดไมยราบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำแสดงด้วยค่า IC_{50}	28
ตารางที่ 8	ผลการแยกองค์ประกอบสารสกัดเอทานอลของไมยราบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	29
ตารางที่ 9	ข้อมูลความถี่และชนิดการสั่นของสารสกัด fraction 8	31
ตารางที่ 10	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* ของสารสกัดเอทานอลของไมยราบละลายในตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ	33
ตารางที่ 11	ผลการทดสอบสารสกัดน้ำของไมยราบต่อการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในตัวทำละลายเอทานอลและตัวทำละลายน้ำ	37
ตารางที่ 12	ผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลของไมยราบ และสารสกัดน้ำของไมยราบต่อการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้	41

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะของมะม่วงน้ำดอกไม้	5
ภาพที่ 2	ลักษณะของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เข้าทำลายบนผลมะม่วงที่ส่วนต่างๆ โดย a คือ การเข้าทำลายส่วนใบ b คือ การเข้าทำลายส่วนดอก c, d และ e คือ การเข้าทำลายส่วนผล	6
ภาพที่ 3	โครงสร้างสารเคมีกำจัดโรคพืช a คือ benomyl, b คือ thiabendazole และ c คือ prochloraz	7
ภาพที่ 4	ลักษณะดอกและใบของไมยราบ	9
ภาพที่ 5	ระดับของสารตัวอย่างที่เหมาะสมในหลอด NMR	25
ภาพที่ 6	ลักษณะสารสกัดหยาบจากไมยราบ ด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ซ้าย) และน้ำ (ขวา)	27
ภาพที่ 7	ผลการทดสอบด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดย F = fraction	29
ภาพที่ 8	^{1}H-NMR สเปกตรัมของ fraction 8	30
ภาพที่ 9	ค่าความยาวคลื่นสูงสุดของสารสกัด fraction 8	31
ภาพที่ 10	อินฟราเรดสเปกตรัมของสารสกัด fraction 8	31
ภาพที่ 11	ผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลของไมยราบในตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ	32
ภาพที่ 12	ผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลของไมยราบ ในตัวทำละลายน้ำ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	33

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 13	ผลการทดสอบสารสกัดน้ำของไมยราบในตัวทำละลายน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ	36
ภาพที่ 14	ผลการทดสอบสารสกัดน้ำของไมยราบในตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ	36
ภาพที่ 15	ผลการทดสอบชุดควบคุม (น้ำกลั่น) น้ำอุ่น และสารเคมี ต่อการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ ทั้งหมด 5 ซ้ำ ของวันที่ 8	41
ภาพที่ 16	ผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลของไมยราบ และสารสกัดน้ำของไมยราบต่อการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ทั้งหมด 5 ซ้ำของวันที่ 8	42

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากไมยราบต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงน้ำดอกไม้ในระหว่างการเก็บรักษา

Efficacy of Extracts from *Mimosa pudica* L. for Controlling Anthracnose Disease of 'Nam Dok Mai' Mangoes During Storage

ฐิติพรรณ ฉิมสุข[1]

Thitiphan Chimsook[1]

[1]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของต้นไมยราบ (*Mimosa pudica*วงศ์Mimosaceae หรือ Fabaceae) ที่ได้จากจังหวัดชัยภูมิ ประเทศไทย และศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไมยราบโดยวิธี ABTS assay นอกจากนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกและความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอลของไมยราบมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ค่า IC_{50}0.19±0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดน้ำแสดงค่า IC_{50}เท่ากับ 0.08±0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารสกัดทั้งสองชนิดมีปริมาณฟีนอลิกรวมในระดับสูงที่ 65.42±1.01 mg GAE/g extract ในสารสกัดเอทานอล และ 57.12±1.68mg GAE/g extract ในสารสกัดน้ำ ตามลำดับจากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าไมยราบมีศักยภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ

จากผลฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดเอทานอลของไมยราบจึงสนใจแยกองค์ประกอบและพิสูจน์เอกลักษณ์สารสกัดเอทานอลของไมยราบโดยแยกองค์ประกอบเบื้องต้นโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบรวดเร็ว ด้วยตัวทำละลายเฮ

กเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่อัตราส่วนต่างๆ หลังจากนั้นจึงทดสอบด้วยเทคนิคTLC ผลการทดลองพบว่าในส่วนสกัดเฮกเซน พบมีสารองค์ประกอบ 6ชนิด และในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท พบมีสารองค์ประกอบ 6ชนิด ในการแยกองค์ประกอบสารสำคัญให้บริสุทธิ์ การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคทางสเปคโตสโกปี และการศึกษาสมบัติของในการต้านอนุมูลอิสระจะมีการดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

สารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลของไมยราบนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา*C. gloeosporioides*ด้วยวิธี poisoned food techniques โดยสารสกัดแต่ละชนิดนำมาละลายในตัวทำละลายสองชนิดคือ น้ำและเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ และนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดน้ำใน 95% เอทานอลแสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราอย่างสมบูรณ์อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น10000 ppm ยับยั้งได้ 100%และสารสกัดเอทานอลใน 95% เอทานอลแสดงค่าการยับยั้งเชื้อราที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 20000ppm ยับยั้งได้ 64.00%จากผลการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดน้ำและเอทานอลที่ความเข้มข้น20000ppm จึงนำสารสกัดนี้มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides*บนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคมากกว่าสารสกัดน้ำอย่างมีนัยสำคัญที่22.45% และ 17.06% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยสรุปพบว่าพืชชนิดนี้มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ดำเนินการกับเชื้อราก่อโรคในมะม่วงและจำเป็นต้องดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญเพื่อเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราในมะม่วงและผลไม้ชนิดอื่นๆได้ดียิ่งขึ้น

คำสำคัญ: ไมยราบ โรคแอนแทรคโนส เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioide* มะม่วงน้ำดอกไม้

Abstract

The total phenolic contents of the ethanol and aqueous extracts of the whole plantof *Mimosa pudica*Linn.belonging to the genus *Mimosa pudica* (Family : Mimosaceaeor Fabaceae), which originates from Chaiyaphum Province, Thailand were determined in this experiment. The antioxidant activity of the extracts of *M. pudica*Linn.was also evaluated by ABTS assay. In addition, correlation analysis between total phenolic contents and antifungal activity was also made in the present study. The results revealed that ethanolic extract were efficient in scavenging free radicals with IC_{50} value of 0.19±0.01 mg/ml, while the IC_{50} for aqueous extract was 0.08±0.01 mg/ml. In addition, both extracts also contained the high level of total phenolic compounds at 65.42±1.01 mg GAE/g extract in ethanolic extract and 57.12±1.68mg GAE/g extract in aqueous extract, respectively. The present study suggested that *M. pudica*Linn. could be a potential source of natural antioxidants.

The significant antioxidant activity of ethanol extract of *M. pudica*Linn. was encouraging enough to pursue isolation and characterization of the active constituents. In the current study, the chemical substance was then preliminary isolated through the quick column chromatography using hexane dichloromethane ethylacetate and methanol at various ratio. Next, the substances were studied with TLC, which showed that there were 6 kinds of substance in hexane extract and 6 kinds of substance in ethylacetate extract. The pure substance was further isolated identified from chemical components by spectrophotometer and studied the qualification of the substance in antioxidant activity.

Aqueous and ethanolic extracts of *M. pudica*Linn.were screened for antifungal activity against *C. gloeosporioides*by poisoned food techniques. Each extracts were dissolved in two solvents; water and ethanol and then evaluated the antifungal activity at different concentrations. It was observed that the aqueous extract in 95% ethanol showed significant antifungal activity and completely inhibited at 10000 ppm (100%). In addition, ethanolic extract in 95% ethanol showed significant inhibited at 20000 ppm (64.00%). Furthermore, the efficiency of ethanolic and aqueous extracts at 20000 ppm were evaluated the inhibition of mycelia growth of *C. gloeosporioides*on Nam Dok Mai mango. It was observed that the ethanolic extract (22.45%) showed higher significant antifungal activity than aqueous extract (17.06%) compared with the control test. In conclusion, this plant in being an edible one can possible be exploited in the

management of pathogenic fungi in mango and the modified chemical constituents are necessary to improve the antifungal activity in mango and the other fruits.

Key words: *Mimosa pudica* L., Anthracnose Disease, *Colletotrichum gloeosporioide*, 'Nam Dok Mai' Mangoes

คำนำ

มะม่วง (*Magifera indica* L.) เป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยชนิดหนึ่ง สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศเป็นจำนวนมาก และมูลค่าการส่งออกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ทั้งในประเทศญี่ปุ่น มาเลเซีย ฮ่องกง และออสเตรเลีย ซึ่งมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ พบว่ามีการส่งออกทั้งในรูปผลสดเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามปัญหาที่ประสบในการส่งออก คือ การสูญเสียคุณภาพผลิตผล และปัญหาโรคหลังการเก็บเกี่ยวซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากระหว่างการขนส่ง

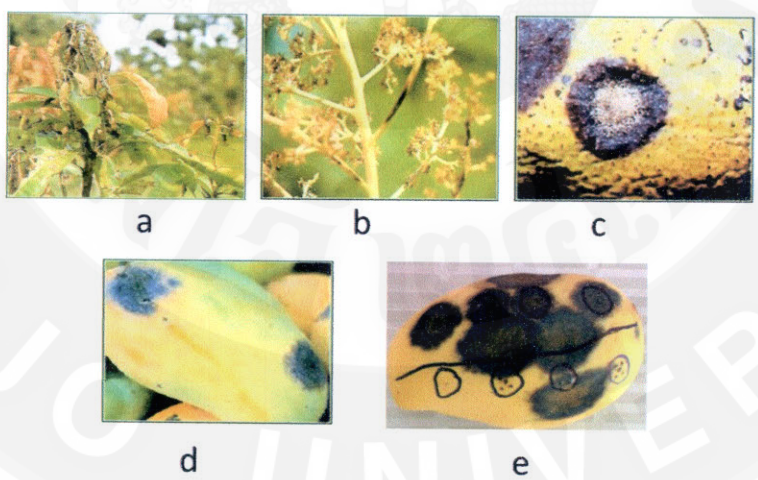
มะม่วงน้ำดอกไม้ เป็นมะม่วงชนิดรับประทานสุก ลักษณะผลเรียวยาว มีเนื้อมาก เมล็ดลีบเล็ก ผิวบาง เมื่อดิบมีรสเปรี้ยว ผิวสีเขียวนวล เนื้อแน่น ผลสุกมีผิวเหลืองนวล กลิ่นหอม เนื้อละเอียด มีรสหวาน มีเบต้าแคโรทีนสูง มะม่วงน้ำดอกไม้ที่นิยมรับประทานมี 2 ชนิด คือ มะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง และมะม่วงน้ำดอกไม้เบอร์ 4 ลักษณะของมะม่วงน้ำดอกไม้แสดงดังภาพที่ 1

ภาพที่ 1 ลักษณะของมะม่วงน้ำดอกไม้

มะม่วงน้ำดอกไม้เป็นพันธุ์ที่ออกดอกง่าย เจริญเติบโตเร็ว เป็นพันธุ์ที่นิยมบริโภคทั้งในและต่างประเทศ โดยเฉพาะตลาดต่างประเทศมีความต้องการมาก แต่การผลิตเพื่อส่งออกต่างประเทศต้องทำอย่างประณีต สีผิวต้องสม่ำเสมอ โดยทั่วไปแล้ว มะม่วงเป็นพืชที่ค่อนข้างทนทานต่อการเข้าทำลายของโรคพืชหลายชนิด และทนต่อสภาพแวดล้อมที่ผันแปรอย่างรวดเร็วได้ดีพอสมควร แต่ในเรื่องของปริมาณและคุณภาพของผลผลิตมะม่วงแล้ว มีโรคพืชหลายชนิดที่สามารถทำลายความเสียหายส่งผลให้ผลผลิตลดลงหรือไม่มีผลผลิตเลย และทำให้คุณภาพของผลผลิตไม่เป็นไปตามที่ตลาดต้องการทำให้ราคาผลผลิตตกต่ำ (สุชาติ, 2557)

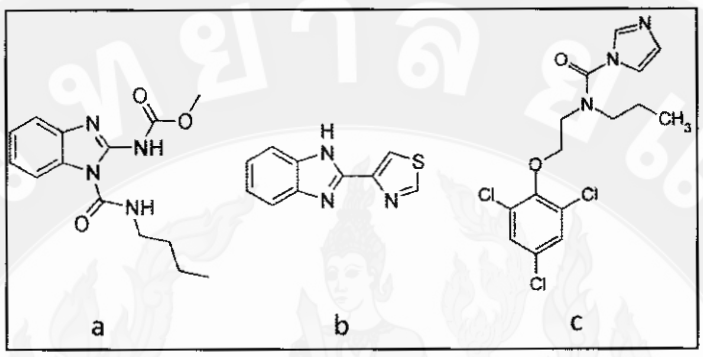
โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose disease) ของผลมะม่วงเป็นโรคหนึ่งที่สำคัญที่ทำความเสียหายอย่างรุนแรง และเป็นปัญหาในการขนส่งผลมะม่วงออกไปจำหน่ายในตลาดต่างประเทศ สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสเกิดจากเชื้อรา เช่น เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

(*C. gloeosporioides*) หรือเชื้อรา *P. mangiferae Ahmad* เป็นต้น ซึ่งอาการของโรคจะเริ่มปรากฏกับผลที่อยู่ระหว่างการบ่มและผลสุกและลุกลามเมื่อผลสุกงอมมากขึ้น โดยเฉพาะมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้จะอ่อนแอต่อการเกิดโรคมากกว่ามะม่วงพันธุ์อื่น (ภาพที่ 2) นอกจากนี้มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มีปริมาณน้ำตาลสูงทำให้มีโอกาสสูงที่เชื้อจะเจริญและลุกลามได้อย่างรวดเร็ว การป้องกันโรคแอนแทรคโนสอาจทำโดยใช้สารเคมีสังเคราะห์ ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ ซึ่งการใช้สารเคมีจะมีผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นการใช้สารสกัดจากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ได้ เช่น สารสกัดแมงลักคาที่สามารถนำมาใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของกล้วยหอมที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *C. musae* (ฉวีวรรณ, 2542) เป็นต้น ไมยราบ เป็นพืชล้มลุกชนิดหนึ่งเป็นวัชพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น การยับยั้งจุลินทรีย์ การยับยั้งแบคทีเรีย เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจต้นไมยราบมาศึกษา โดยมีเป้าหมายที่จะศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากไมยราบในการควบคุมและป้องกันเชื้อราโดยเฉพาะเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสกับผลมะม่วงน้ำดอกไม้ ผลสำเร็จและองค์ความรู้ที่ได้สามารถช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าสารเคมีสังเคราะห์ และลดปัญหาจากการใช้สารเคมีในเรื่องสารพิษต่อค้างในผัก ผลไม้ และสิ่งแวดล้อม ตลอดจนการเกิดภาวะต้านทานต่อสารเคมีหรือการดื้อยา นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มมูลค่าผลไม้ส่งออกของประเทศไทย ลดการนำเข้าสารเคมีสังเคราะห์ ตลอดจนเป็นแนวทางในการใช้สารสกัดจากธรรมชาติในการผสมกับสารเคลือบผิวป้องกันเชื้อรา และชะลอการสุกของมะม่วงต่อไป



ภาพที่ 2 ลักษณะของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เข้าทำลายบนผลมะม่วงที่ส่วนต่างๆ โดย a คือ การเข้าทำลายส่วนใบ b คือ การเข้าทำลายส่วนดอก c, d และ e คือ การเข้าทำลายส่วนผล (ทรงกลด, 2556)

โรคแอนแทรคโนสสามารถป้องกันกำจัดได้โดยสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชหลายชนิด ซึ่งเป็นวิธีการเดียวที่จะลดความเสียหายจากโรคนี้ได้อย่างรวดเร็ว และทันเหตุการณ์ ซึ่งต้องใช้ให้ถูกกับจังหวะการเข้าทำลายของเชื้อโรค สารป้องกันกำจัดโรคพืชหลายชนิด เช่น bennomyl, thiabendazole, prochloraz, mancozeb, captan, copper oxychloride เป็นต้น สามารถใช้ป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสได้ ตัวอย่างโครงสร้างเคมีของสารกำจัดโรคพืชบางชนิดแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างสารเคมีกำจัดโรคพืช a คือ benomyl, b คือ thiabendazole และ c คือ prochloraz

การเลือกใช้สารเคมีนั้นขึ้นกับความรุนแรงของโรค การป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสควรทำในระยะที่มะม่วงกำลังจะแตกใบอ่อนและเมื่อมะม่วงจะแทงช่อดอก ควรฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดสัมผัส เช่น mancozeb, captan, copper oxychloride เป็นต้น อาจจะผสม หรือสลับกับสารประเภทดูดซึม เช่น prochloraz, azoxystrobin, benomyl, carbendazim หรือสารดูดซึมอื่นๆ พ่นทุก 10-14 วันประมาณ 3-4 ครั้ง นอกจากนี้การควบคุมป้องกันกำจัดโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลิตผลมีหลายวิธี เช่น การใช้สารเคมี น้ำร้อน ไอน้ำร้อน การใช้รังสีหรือการควบคุมโดยชีววิธี (Eckert, 1983) โดยการใช้น้ำร้อนก็เป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพดีในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่เข้าทำลายแบบแฝงในผลิตผล แต่การใช้น้ำร้อน ไอร้อน ต้องระวังมากเพราะต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่าระดับอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสาเหตุโรคนั้นทนได้ และต้องเป็นอุณหภูมิที่ผลิตผลทนได้ด้วย ซึ่งก็จะแตกต่างกันไปในมะม่วงแต่ละพันธุ์ อุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 50 องศาเซลเซียส ช่วงเวลา 10-15 นาที ในบางการทดลองทำการผสมสารกำจัดเชื้อโรคในน้ำร้อน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัด (นิพนธ์, 2542) สำหรับเชื้อราที่เข้าทำลายแบบแฝง เช่น โรคแอนแทรคโนส นิยมใช้สารเคมีในกลุ่ม benzimidazole ได้แก่ thiabendazole, benomyl, carbendazim และ thiabendazole-methyl (Eckert, 1983) ซึ่งสารเคมีในกลุ่มนี้ สามารถแทรกซึมลงไปในผิวผลิตผลและทำลายเชื้อได้ (Ben-Aire, 1975; Eckert *et al.*, 1979) โดยที่ benomyl มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีกว่า แต่ในด้านความคงตัวของสารเคมีหลังการใช้แล้ว thiabendazole และ carbendazim มีความคงตัวดีกว่า (Eckert, 1983) ปัญหาที่สำคัญยิ่งอีกประการหนึ่ง คือผลกระทบจากการใช้สารเคมี อันได้แก่ ความ

เป็นพิษต่อ มนุษย์ การทำลายระบบนิเวศ การชักนำให้เกิดศัตรูพืชชนิดใหม่ และการที่เชื้อดื้อยามากยิ่งขึ้น (Fry, 1982) มีรายงานหลายฉบับพบการดื้อยาของรา เช่น Gilpatrick พบว่าสารเคมีประเภทดูดซึมกลุ่ม bemzimidazole ทำให้ราสร้างความต้านทานได้มากที่สุด (Gilpatrick, 1983) มีรายงานการดื้อยาของเชื้อราก่อโรคในผลไม้หลายชนิด เช่น เชื้อรา *C. musae* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วยต้านทานต่อสาร benomyl ได้สูงถึง 8000 ppm (Griffe, 1973) กรองจิตรายงานว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะละกอสามารถต้านทานต่อสารเคมี benomyl และสารเคมีกลุ่ม benzimidazole ได้ (กรองจิต, 2528) หลังจากที่มีการใช้สารเคมีดังกล่าวติดต่อกันในระยะหนึ่ง นอกจากนี้ยัง พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถต้านทานต่อสาร benomyl เมื่อใช้ในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวในปริมาณที่มากเกินไป (Spalding, 1982 ; Jeffries *et al.*, 1990)

การทดสอบในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสนั้นมีหลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ poisoned food technique, agar well diffusion method, paper disc diffusion เป็นต้น แต่ละเทคนิคมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

เทคนิคที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

1. Poisoned food technique

เทคนิค Poisoned food เป็นเทคนิคที่ผสมสารทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทำให้เกิดความเป็นพิษในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในทดสอบการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา (กัลทิมา, 2554)

2. Paper disk diffusion method

เทคนิค Paper disk diffusion เป็นการละเลงเชื้อที่ต้องการจะทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้น แล้ววางกระดาษที่ผสมสารที่จะทดสอบลงบนผิวหน้าของวุ้นในจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อให้เจริญเติบโต แล้วนำจานเพาะเชื้อมาอ่านผลทดสอบ โดยสังเกตรอบๆ กระดาษที่วางว่ามี Inhibition zone เกิดขึ้นหรือไม่ ซึ่งจะสังเกตเห็นจากวงใสรอบๆ กระดาษที่ผสมสาร (นวพร, 2552)

นอกจากนี้ยังมีเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว ดังตัวอย่าง

1. Hot water treatment

เทคนิค Hot water treatment เป็นเทคนิคการจุ่มในน้ำร้อนเพื่อฆ่าเชื้อ ซึ่งนิยมจุ่มที่ 52-55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากน้ำขึ้นจากน้ำร้อนแล้ว จะจุ่มลงในน้ำเย็นอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วเก็บในอุณหภูมิต่ำ (จริงแท้, 2542)

2. Vapour heat treatment

เทคนิค Vapour heat treatment เป็นเทคนิคการพ่นอากาศร้อนไปยังอุปกรณ์สร้างไอน้ำแล้วจึงไหลไปสัมผัสกับผลไม้ เพื่อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 46.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดไข่

และหนอนแมลงวันผลไม้และลดความเสียหายจากการเข้าทำลายของเชื้อแอนแทรคโนส (จริงแท้, 2548)

ไมยราบ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mimosa pudica* L. จัดเป็นพืชวงศ์ (ตระกูล) ถั่ว Fabaceae (Legu minosae)-Mi ประเภทไม้ล้มลุก ไมยราบมีชื่อเรียกอื่น ๆ เช่น กระทืบยอด กะหงับ ก้านของนาหมื่อม้ะ ระงับ หงับพระพาย หญ้าจิยอบ หญ้าป้นยอด หนามหญ้าราบ และ Sensitive plant เป็นต้นไมยราบมักถูกมองกันว่าเป็นวัชพืชไร้ค่า แต่เป็นพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น การยับยั้งจุลินทรีย์ (Feng *et al*., 1998) การยับยั้งแบคทีเรีย (Akter *et al*., 2010; Ballakrishnan, 2006; Mukesh, 2010) ตลอดจนมีสรรพคุณแก้ปวดหลังและสรรพคุณอื่น ๆ อีกหลากหลาย ลักษณะของไมยราบนั้นแสดงดังภาพที่ 4

ภาพที่ 4 ลักษณะดอกและใบของไมยราบ

ไมยราบมีลักษณะเป็นไม้เลื้อย ทอดไปตามพื้นดิน เถามีหนามแหลมและมีขนสีน้ำตาลคลุมอยู่ทั่ว ใบ เป็นใบประกอบรูปขนนกสองชั้น มีความไวต่อการสัมผัส ยาว 10-15 เซ็นติเมตร เรียงตัวแบบนิ้วมือ ใบย่อยมี 17-22 คู่ ใบรูปไข่แกมขอบขนาน กว้าง 2.5-3 มิลลิเมตร ยาว 10-14 มิลลิเมตร ผิวใบด้านบนมีสีเขียวท้องใบมีสีม่วงอ่อน ดอก ออกเป็นดอกช่อ แบบช่อกระจุกแน่น (head) ออกที่ซอกใบ กลีบดอกสีชมพู ผลเป็นฝักข้อสั้น ๆ อยู่รวมกันเป็นช่อ ผลแก่สีดำ (Bui, 2001; Modern natural, 2001) ประโยชน์ของไมยราบ ไมยราบแม้จะเป็นพืชที่มีการแพร่กระจายพันธุ์อย่างรวดเร็วและกำจัดค่อนข้างยาก ซึ่งก่อให้เกิดปัญหา แต่ก็ยังมีประโยชน์ทางสมุนไพร สามารถนำทุกส่วนมาหั่นแล้วคั่ว โดยใช้ไฟอ่อนๆ จนมีกลิ่นหอม แล้วนำไปชงน้ำดื่มแทนชา ช่วยลดคอเลสเตอรอลและน้ำตาลในเลือดได้ (Genest, 2008; Kokane, 2009)

ราก แก้ไอ ขับเสมหะ แก้หลอดลมอักเสบเรื้อรัง แก้ระบบการย่อยอาหารของเด็กไม่ดี บำรุงกระเพาะอาหาร ทำให้ตาสว่าง ระงับประสาท แก้บิด ขับปัสสาวะ รักษาโรคปวดเวลามีประจำเดือน แก้ริดสีดวงทวาร ปวดข้อ กระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง

ต้น ขับปัสสาวะ แก้ไตพิการ แก้ทางเดินปัสสาวะอักเสบ ขับระดูขาว ขับโลหิต

ใบ แก้เริม งูสวัด โรคพุพอง ไฟลามป่า

ทั้งต้น ขับปัสสาวะแก้ไตพิการ แก้ทางเดินปัสสาวะอักเสบ ขับระดูขาว แก้ไข้ออกหัด แก้นอนไม่หลับ แก้กระเพาะอาหารอักเสบ สงบประสาท แก้ลำไส้อักเสบ แก้เด็กเป็นตานขโมย แก้ผื่นคัน แก้ตาบวมเจ็บแก้แผลฝี

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวกับโรคงูสวัด เริม 1. ฤทธิ์ต้านไวรัสเริม สารสกัดทั้งต้นของไมยราบด้วย 80% เอทานอล ทำการทดลองใน cell culture พบว่าผลการทดลองได้ผลไม่แน่นอนต่อการต้านเชื้อไวรัสเริม Herpes simplex type I (Van der Berghe DA, 1978) 2. ฤทธิ์ลดการอักเสบ มีการศึกษาในคนทั้งเพศชาย-หญิง โดยให้รับประทานยาตำรับซึ่งมีสารสกัดใบไมยราบหรือสวนทางทวารหนัก พบว่าสามารถลดการอักเสบได้

ผู้วิจัยเล็งเห็นว่างานวิจัยครั้งนี้เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง และเป็นสิ่งที่เป็นไปได้ในการที่จะหาแนว ทางการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยใช้สารสกัดจากไมยราบซึ่งเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ มาศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจนำส่วนต้นไมยราบมาศึกษาโดยมีเป้าหมายที่จะศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดไมยราบ ในการควบคุมและป้องกันเชื้อราโดยเฉพาะเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสกับผลมะม่วงน้ำดอกไม้ ผลสำเร็จและองค์ความรู้ที่ได้ช่วยแก้ไขปัญหาในเรื่องโรคเชื้อราที่พบแอบแฝงในมะม่วงน้ำดอกไม้ และในผัก ผลไม้ อื่น ๆ เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีที่มีราคาแพงและยังมีพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม สารตกค้างในผลไม้ ทำให้เชื้อต้านทานต่อสารเคมี ซึ่งจะช่วยเพิ่มมูลค่าผลไม้ส่งออกของประเทศไทย และที่สำคัญเป็นการลดปริมาณการนำเข้า สารเคมีจากต่างประเทศ ได้อีกด้วย

นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาเพิ่มเติมประเมินความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไมยราบนอกเหนือจากคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ ดังมีรายละเอียดสำคัญเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระดังต่อไปนี้

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุล ที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ (unpaired electron) อย่างน้อย 1 ตัวโคจรรอบวงนอกสุด อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก ทำให้อนุมูลอิสระไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบๆ โดยดึงหรือให้อิเล็กตรอนโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดพิษต่อเซลล์ในร่างกายจึงต้องมีการขจัดหรือกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไป โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระหรือเรียกว่า สารแอนติออกซิแดนซ์ อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลอิสระในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $A^{\cdot}$ อนุมูล $A^{-\cdot}$ และอนุมูล $A^{+\cdot}$ อนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวชนิดอื่น ตัวอย่างของอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{\cdot-}$) อนุมูลไฮดรอกซี ($^{\cdot}OH$) อนุมูลอัลคอกซี ($RO^{\cdot}$) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี ($HO_2^{\cdot}$) อนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลอิสระที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก และในขณะที่ไนตริกออกไซด์ (NO) หรืออนูมูลไนตริกออกไซด์ ($^{\cdot}NO$) อนุมูลวิตามินอี และอนุมูลวิตามินซี เป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวสูงรองลงมา

การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกันดังนี้

1. การแตกของพันธะโควาเลนท์แบบโฮโมไลซิส

$$A : B \longrightarrow A^{\cdot} + B^{\cdot}$$

2. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A + e^{-} \longrightarrow A^{\cdot-}$$

3. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวจากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

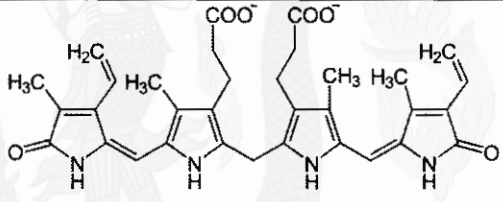
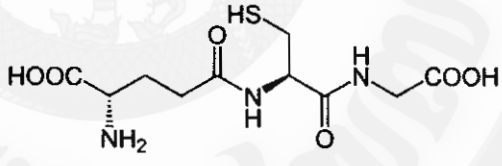
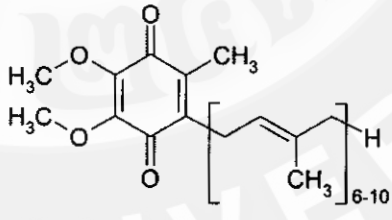
$$A \longrightarrow A^{+\cdot} + e^{-}$$

ดังนั้นเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดพิษต่อเซลล์ในร่างกายจึงต้องมีการขจัดหรือกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไป โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น กรดยูริก บิลิรูบิน วิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควิโนน เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากภายนอก เช่น สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งพบมากในพืช ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช ชา โกโก้ เป็นต้น

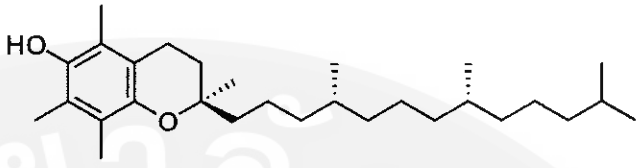
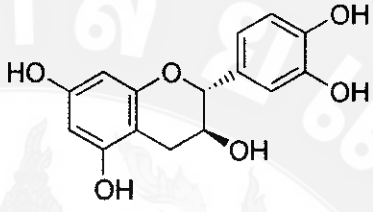
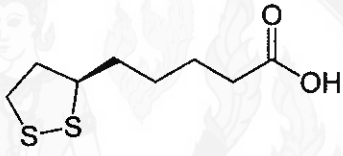
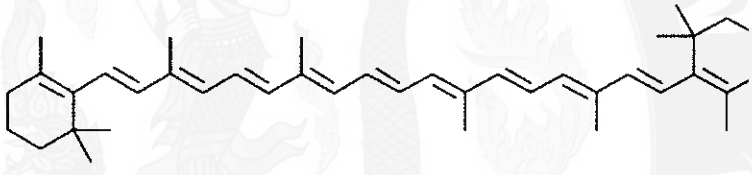
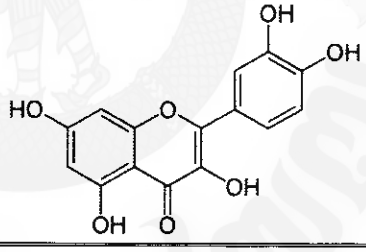
สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) คือ สารที่ทำลายอนุมูลอิสระ ลักษณะสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือ สารที่สามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระหรือสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนนั้น (พรทิพย์, 2012; พีระพรรณ, 2012) ตัวสารต้านอนุมูลอิสระจะมีอิเล็กตรอนอิสระอยู่ จำเป็นต้องมีสารอื่นมาช่วยให้เกิดการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระตัวแรกขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายชนิดทั้งที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็กหรือเอนไซม์ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงทำหน้าที่ป้องกันสารชีวโมเลกุลที่สำคัญภายในร่างกาย เช่น ไขมัน ดีเอ็นเอ และเอนไซม์ที่สำคัญ หรือป้องกันโครงสร้างของเซลล์ เช่น เยื่อบุผิวของเซลล์หรือออร์แกเนล นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังมีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเป็นลำดับ โดยออกฤทธิ์ที่จุดต่างๆ ของการสร้างอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามในภาวะปกติร่างกายของคนเรา จะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระอยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสภาวะที่สมดุล และส่วนที่สองคือ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือเบต้าแคโรทีน (β- carotinoid)

รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นพฤกษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย เช่น เอนไซม์คะตะเลส (catalase) กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส (glutathione peroxidase) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) และสารขจัดอนุมูลหรือโปรตีนบางชนิดที่สามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด (ไมตรีและคณะ, 2555) เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (catotinoid) เป็นต้น (เจนจิราและประสงค์, 2554) ลักษณะโครงสร้างเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารต้านอนุมูลหรือโปรตีนบางชนิดที่สามารถพบได้ในธรรมชาติ

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ	โครงสร้างทางเคมี
Bilirubin	
Glutathione	
Ubiquinone	

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารขจัดอนุมูลหรือโปรตีนบางชนิดที่สามารถพบได้ในธรรมชาติ (ต่อ)

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ	โครงสร้างทางเคมี
α-Tocopherol	
Catechin	
α-Lipoic acid	
β-Carotene	
Quercetin	

กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายกลไก เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) จับกับโลหะ (metal chelation) การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) และการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) วิธีการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน วิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันมีหลายวิธีดังต่อไปนี้

1. Scavenging activity of ABTS radical

วิธีการนี้เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้ reagent คือ [2, 2 - azinobis- (3 - ethylbenzothaiazoline - 6 - sulphonic acid)] โดยอาศัยการวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูล $ABTS^{\cdot+}$ ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีเขียว เกิดจากการออกซิไดซ์โดยอนุมูลเปอร์ออกซีเมื่อ

เติมสารทดสอบลงไปยับยั้งอนุมูลจะทำให้สีสารละลายจางลง โดยดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 nm ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้จะคำนวณเป็นค่าคงที่สัมพันธ์กับสารต้านอนุมูลมาตรฐาน Trolox จึงมีชื่อว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ข้อดีของ ABTS Assay คือ ทำได้ง่าย อนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ทำได้ในช่วง pH ที่กว้างทำให้สามารถศึกษากลไกได้โดยละเอียด และอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ทั้งในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์

2. DPPH Assay

วิธีการนี้เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้ reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็น stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล อาศัยอนุมูลของสาร DPPH ที่มีสีม่วงที่อยู่ในรูปอนุมูลไนโตรเจนที่มีความคงตัวมากซึ่งไม่ต้องผ่านการทำปฏิกิริยาให้เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณี $ABTS^{\bullet+}$ โดยสารต้านออกซิเดชันจะให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล DPPH ช่วยให้สารนี้เสถียร จึงส่งผลให้สารละลายเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองและมีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ข้อดีของ DPPH เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และง่ายต่อการวิเคราะห์ เป็นวิธีที่นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบ ข้อด้อยของวิธีนี้คือ อนุมูลของ $DPPH^{\bullet}$ มีความคงตัว ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่ความไวสูงได้

3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

วิธีนี้เป็นการใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก (Fe^{3+}-TPTZ) โดยใช้ปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งเมื่อสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก (Fe^{3+}-TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน แล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน (Fe^{2+}-TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ซึ่งสารสีม่วงน้ำเงินนี้จะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ข้อดีของวิธี FRAP เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ แต่มีข้อด้อยคือ กลไกของปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่เกี่ยวข้องกับกลไกในร่างกาย (โอภาและคณะ, 2549)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากไมยราบในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ในระหว่างการเก็บรักษา บนผลมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา

2. ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากไมยราบ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและดัชนีตัววัดความสำเร็จแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ประโยชน์และดัชนีตัววัดความสำเร็จ

ประโยชน์	ดัชนีตัววัดความสำเร็จ
1. องค์ความรู้ใหม่ในการวิจัยต่อไป	แนวทางการพัฒนาสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ในระหว่างการเก็บรักษา และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไมยราบ
2. ด้านการบริการความรู้แก่ประชาชน	เผยแพร่ความรู้ที่ได้ในวารสารด้านการเกษตร และสุขภาพ
3. ด้านการบริการความรู้แก่ภาคธุรกิจการส่งออก และนำไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์	ต่อยอดการองค์ความรู้ โดยการพัฒนาให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้จริง โดยอาจบูรณการกับศาสตร์อื่นเพื่อสร้างเป็นผลิตภัณฑ์ที่สกัดจากสารธรรมชาติและมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคเพื่อรักษาคุณภาพผัก ผลไม้และเพิ่มมูลค่าในการส่งออกในเชิงพาณิชย์
4. หน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์	4.1 ภาคการเกษตรและภาคอุตสาหกรรมการส่งออกพืช ผัก ผลไม้ 4.2 สถาบันการศึกษาต่าง ๆ ในภาคการเกษตร เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว การอารักขาโรคพืช
5. การตีพิมพ์ผลงานวิชาการ	ตีพิมพ์ผลการวิจัยในวารสารวิชาการ วารสารด้านการเกษตรและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว
6. การนำเสนอผลงานในที่ประชุม	เสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติ และการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

การตรวจเอกสาร

มะม่วงเป็นผลไม้ที่นิยมปลูกในท้องที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยเพราะสภาพอากาศภูมิประเทศเอื้ออำนวย แต่ในการปลูกมะม่วงนั้นปัญหาที่พบเสมอ คือ ศัตรูของมะม่วง ศัตรูที่ทำความเสียหายให้กับมะม่วงตลอดฤดูกาล มักมีสาเหตุมาจากโรคเป็นส่วนใหญ่ (ชะลอ, 2539) โรคมะม่วงที่สำคัญได้แก่ โรคแอนแทรคโนส เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* โรคราดำ เกิดจากเชื้อรา *Meliola sp.* และ *Capnodium sp.* โรคราแป้งขาว ของช่อดอกเกิดจากเชื้อรา *Oidium mangiferac* (ขจรศักดิ์, 2529) โรคเปลือกแตกยางไหล เกิดจากเชื้อรา *Borbotryodiplodia theobnomac* หรือเชื้อรา

Diplodia natalensis (สุภาวดี, 2526) โรคขั้วผลเน่าเกิดจากเชื้อรา *Dothiorella dominicana, D. Mangiferac, Botryodiplodia theobnomac* และ *Phomopsis mangiferac* (ฉวีวรรณ, 2536) นอกจากนี้ยังพบการเน่าเสียของผลมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Asperngillus niger* และ *Gloeosporiu mangiferac* (ภัทรลดา, 2535)

โดยธรรมชาติพืชจะมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ เช่น การสร้างไฟโตอะเล็กซินต่อต้านเชื้อสาเหตุ หรือการที่พืชขับสารออกมาจากราก (root exudate) หรือสารธรรมชาติที่ได้จากเศษซากพืช สารออกฤทธิ์เหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (ชัยโย และคณะ, 2524; นพพล, 2547) สารกลุ่มนี้ ได้แก่ อัลคาลอยด์ (alkaloid) ไกลโคซายด์ (glycoside) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซาโพนิน (saponin) สเตอรอยด์ (steroid) แทนนิน (tannin) และน้ำมันหอมระเหย (essential oil) เป็นต้น สารเหล่านี้สกัดได้จากพืช (plant extract) ซึ่งวิธีการสกัดมีได้หลายวิธี เช่น การหมักหรือแช่ (maceration) การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) การกลั่นด้วยไอน้ำ (water-steam distillation) การสกัดอย่างต่อเนื่องด้วย soxhlet (soxhlet continuous extraction) การสกัดด้วยวิธีแยกชั้น (partition) เป็นต้น สารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิดมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ หรือเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ (ชัยณรงค์, 2534; แสงมณี, 2539) เช่น สารสกัดจากเทียนขาวยับยั้งเชื้อรา *Curvularia* และ *Helminthosporium* สารสกัดจากพลูยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* สะเดามีฤทธิ์เป็นพิษต่อไส้เดือนฝอยราก ปม และสารสกัดจากพืชที่ฤทธิ์ต่อเชื้อราสาเหตุของการเกิดโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง (ธารทิพย์, 2540; พัฒนาและคณะ, 2536)

วิชัยและคณะพบว่าสารสกัดจากพืชบางชนิดสามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ได้ผลดี (วิชัยและคณะ, 2548) โดยนำผลมะม่วงที่แก่จัดทำการปลูกเชื้อด้วยสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร บ่มเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมงในสภาพชื้น จากนั้นนำผลมะม่วงจุ่มในสารละลายของสารสกัดจากพืชที่ผ่านการสกัดโดยใช้น้ำร้อน และ/หรือแอลกอฮอล์ จุ่มนาน 2 นาที แล้วผึ่งผลมะม่วงให้แห้งแล้วจัดเรียงในถาดโฟมแล้วคลุมด้วยพลาสติก PVC เก็บในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน ปรากฏว่าสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ของทองพันชั่ง (*Rhincanthus nasutus*) ป้องกันการเกิดโรคได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ ข่า (*Psemna hebasca*) ที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ ชงโค (*Bauhinia purpurea*) ที่สกัดด้วยน้ำ และว่านน้ำ (*Acorus calamus*) ที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์

ชัยณรงค์ในปี 2534 รายงานว่าการนำผลมะม่วงจุ่มในสารละลายเชื้อรา *C. gloeoporioides* ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ มิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาจุ่มในสารละลายของสารสกัดจากพืช (ว่านน้ำ ทองพันชั่ง ข่า ขมิ้น กระเพราป่า) ที่ความเข้มข้น 5,000 ppm นาน 2 นาที จากนั้นนำไปเก็บในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 13-15 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเป็นสภาพที่เหมือนกับที่ใช้ในการส่งผลผลิต

การเกษตรไปต่างประเทศ โดยจะเก็บผลมะม่วงดังกล่าวไว้ในตู้ประมาณ 21 วัน แล้วนำมาตรวจพบว่ามีพื้นที่ผิวการเกิดโรคมากกว่า 51 เปอร์เซ็นต์ (ชัยณรงค์, 2534)

ในปี 2545 ได้พัฒนาสูตรผสมสารสกัดจากข่า ว่านน้ำ และทองพันชั่ง เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว จากการพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข่า ว่านน้ำ และทองพันชั่ง เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนส สาเหตุโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz) Sacc. สารสกัดหยาบใน dichloromethane จากทองพันชั่งไม่สามารถควบคุมเชื้อราได้ผลดีเท่ากับสารสกัดหยาบจากข่าและว่านน้ำ เมื่อศึกษาต่อพบว่าสารออกฤทธิ์จากข่าคือ 1'-- acetoxychavicol acetate (ACA) มีสูตรโมเลกุล $C_{13}H_{14}O_4$ ส่วนสารออกฤทธิ์จากว่านน้ำคือ *cis*-b- asarone มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{12}H_{16}O_3$ และเมื่อนำสารทั้งสองชนิดไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz) Sacc. ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการโดยวิธี poison food technique และโดยวิธีจุ่มผลมะม่วง พบว่าสารทั้งสองชนิดสามารถควบคุมเชื้อราดังกล่าวได้ดีใกล้เคียงกัน ต่อมาจึงได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ (formulation) เฉพาะสาร ACA ในรูปของ emulsifier concentrate (EC) ใช้ควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz) Sacc. ได้ดีมากโดยผลมะม่วงมีค่าความเสียหายเนื่องจากเชื้อราดังกล่าว ลดลงต่ำกว่าการใช้สาร benomyl ซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้ควบคุมเชื้อราชนิดนี้กับมะม่วงเพื่อการส่งออกในปัจจุบันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (จรรยา, 2545)

รวีวรรณ, 2546; นิตยา, 2540; Dean, 1991 และสิริวิภา, 2539 ได้พัฒนาวิธีการใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชโดยใช้ร่วมกับน้ำร้อนในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงระยะหลังการเก็บเกี่ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

นักวิจัยจากสำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ (ปส.) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ได้พัฒนาจุลินทรีย์อาบรังสีหยุดโรคพืช โดยศึกษาวิธีการนำจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพ มายับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในผักผลไม้เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีอันตรายในกลุ่มเกษตรกร โดยศึกษาจุลินทรีย์ 4 ชนิดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคดังกล่าว โดยทดสอบจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่ได้ไปทดสอบกับผลมะม่วงและพริกในห้องปฏิบัติการ รวมถึงทดสอบจริงในสวนมะม่วงของเกษตรกร กระทั่งได้จุลินทรีย์เป้าหมาย 1 ชนิด ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถยับยั้งการลุกลามของเชื้อราแอนแทรคโนสได้ถึง 89.23% และหลังจากฉีดเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ลงในมะม่วงและพริก 7-14 วัน มีผลให้แผลบนผิวของมะม่วงและพริกลดลงอย่างชัดเจน จากนั้นได้ทดลองเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา ให้สามารถกำจัดโรคแอนแทรคโนสให้หมดเกลี้ยง แม้จะใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณน้อย โดยใช้รังสีแกมม่าฉายจุลินทรีย์ในปริมาณพอเหมาะภายในห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ ปัจจุบันเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ ได้นำไปผสมเป็นหัวเชื้อสำหรับฉีดพ่นลงในแปลงมะม่วงน้ำดอกไม้ส่งออก

ทดแทนการใช้สารเคมี ส่งผลให้สินค้าที่ใช้สารธรรมชาติในการยับยั้งโรคนั้นสามารถส่งออกไปยังต่างประเทศได้มากขึ้น

วนัสนันท์และพิทยาในปี 2548 ได้ศึกษาการใช้สารสกัดจากดีปลีเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว ทำการศึกษาโดยสกัดสารออกฤทธิ์จากผลดีปลีแห้ง Java long pepper (*Piper retrofractum Vahl.*) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทานอล 95% ทำการแยกสารองค์ประกอบในสารสกัดหยาบด้วย TLC (Thin layer chromatography) และตรวจสอบทางชีววิทยา (TLC-bioassay) โดยใช้เชื้อรา *C. cladosporioides* พบบริเวณต้านเชื้อรา (clear zone) ที่ชัดเจนที่สุด 2 บริเวณ ทำการแยกสารองค์ประกอบบริเวณที่ออกฤทธิ์ดีข้างต้นเพื่อให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธี Column chromatography (CC) นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยเปรียบเทียบที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ppm และเปรียบเทียบกับสารเคมีเบนโนมิลเข้มข้น 500 ppm พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 100% และที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm สามารถยับยั้งได้ 89.91% แสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีมากของสารสกัดจากดีปลีที่จะนำไปทดแทนสารเคมีในการควบคุมโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวมะม่วงได้ (วนัสนันท์และพิทยา, 2548)

วารินและคณะในปี 2549 ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิต่อต้านเชื้อราจากเชื้อรา *Trichoderma harrianum* สายพันธุ์กลายในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงน้ำดอกไม้ โดยก่อนหน้านี้ในปี 2547 ได้ศึกษาการใช้แบคทีเรียในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่ใบและผลมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* (วารินและคณะ, 2549)

กัทลีวัลย์และคณะในปี 2549 ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชต่อการควบคุมโรคพืชที่สำคัญบางชนิดในสภาพห้องปฏิบัติการและโรงเรือน สารสกัดจากพืชที่นำมาศึกษาได้แก่ หางไหล กานพลู หนอนตายหยาก ดีปลี โดยทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii Colletotrichum gloeosporioides Marssonina sp. Pythium sp.* และ *Phytophthora sp.* สารสกัดสูตรสารสกัดของ หนอนตายหยาก : ดีปลี : กานพลู (10%) มีแนวโน้มในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีกว่าสารเคมี mancozeb (0.1%) ช่วยลดการเกิดแผลและขนาดของแผลได้ดีกว่าสารเคมี (กัทลีวัลย์และคณะ, 2549)

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยในปี 2552 ได้ทำการวิจัยพัฒนาการควบคุมโรคเน่าผลไม้เขตร้อนด้วยชีววิธี โดยการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคเน่าของผลไม้เขตร้อนหลังการเก็บเกี่ยว กระทั่งได้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในกลุ่มของแบคทีเรีย ยีสต์ และราจากแหล่งธรรมชาติ รวม 21 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ “รา” ซึ่งเป็นสาเหตุโรคพืช ได้แก่ ยีสต์ *Pichia tannicola P.kudriavzevii* 2147, แบคทีเรีย *Bacillus subtillis* TISTR8, *B. amyloliquifaciens* UPT 14 และ PUT 19 และรา *Trichoderma harzianum* และ *T. pseudodonigii* จุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่ม

จะมีกลไกการควบคุมราสาเหตุโรคแตกต่างกัน โดยยีสต์และรานั้นควบคุมจุลินทรีย์สาเหตุโรคด้วยการครอบครองพื้นที่ ส่วนแบคทีเรียจะปล่อยสารปฏิชีวนะบางชนิดลงในอาหารทำให้มีผลต่อการเจริญของราอันเป็นสาเหตุของโรคเน่า และได้ทดลองนำมะม่วงสายพันธุ์น้ำดอกไม้ และพันธุ์โชคอนันต์ ซึ่งสายพันธุ์ดังกล่าวมักเป็นโรคแอนแทรกโนส (โรคเน่าในแอบแฝง) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่ม 1 นำสารที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Bacillus subtillis* TISTR8, *B.amyloliquifaciens* PUT 14 และ PUT 19 ผสมกับสารเคลือบผิวแล้วนำไปเคลือบผิวผลมะม่วง นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน ผลที่ได้พบว่า ชุดการทดลองที่ไม่ได้เคลือบผิวเป็นโรคอย่างรุนแรง คล้ายคลึงกับชุดที่เคลือบสารเพียงอย่างเดียวในขณะที่ชุดที่เคลือบผิวด้วยสารเคลือบผสมกับสารเคมีสังเคราะห์ และสารเคลือบผิวที่ผสมกับสารสกัดจากแบคทีเรีย ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีกว่า

อัจฉราและคณะในปี 2552 ศึกษาการใช้สารสกัดจากใบขี้เหล็กในการควบคุมคุณภาพและป้องกันโรคแอนแทรคโนสในกล้วยหอมทองหลังการเก็บเกี่ยว และมีการศึกษาการใช้สารสกัดจากใบขี้เหล็กในการป้องกันโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ (อัจฉราและคณะ, 2552)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้เทคนิคตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา มีดังต่อไปนี้

Satish *et al.*, 2007 ได้ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดทั้งหมด 52 ชนิด โดยใช้วิธี agar well diffusion method โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดแตกต่างกัน ผลการทดสอบพบว่าพืช 12 ชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. โดยมีค่าเฉลี่ย zone of inhibition เท่ากับ 8, 10, 13 มิลลิเมตร ตามลำดับ

นิภาดาและคณะ, 2554 ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* Penz. โดยทดสอบทั้งหมด 6 วิธี คือ สารสกัดจากเปลือกมังคุดสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 10, 100, 1,000 และ10,000 ppm เปรียบเทียบกับ benomyl ความเข้มข้น 750 ppm และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยผสมกับอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ก่อนใส่เชื้อด้วยวิธี poisoned food technique แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้น 100, 1,000 และ10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* เท่ากับ 54.01, 54.05 และ 55.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ benomyl ความเข้มข้น 750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์

กรรณิกาและคณะในปี 2556 ได้ศึกษาประสิทธิภาพของกระเทียม (*Allium sativum* Linn.) หอมแดง สาบเสือ มะกรูด และหอมใหญ่ ในการยับยั้งการเจริญ และการงอกของสปอร์ของเชื้อราสองชนิด คือ *C. gloeosporioides* และ *Fusarium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุของโรคพืช ผลการทดลองพบว่า กระเทียมสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *Fusarium* sp. ได้ดีที่สุด รองลงมาคือหอมหัวใหญ่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. ได้อย่างสมบูรณ์ แต่ยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่น้ำหนัก 10 กรัม และถ้าเพิ่มน้ำหนักมาก ๆ ก็จะยิ่งยับยั้งเชื้อราได้ดี สำหรับ

มะกรูดยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้ดีที่สุดที่น้ำหนัก 10 กรัม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ดีที่ 5 กรัม

รัตติยาและคณะในปี 2554 ได้ศึกษาการทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดเปลือกมังคุดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยวิธี poison food techniques และ agar well diffusion method ผลการทดลองพบว่า หลังการปลูกเชื้อบนอาหาร 7 วัน การเจริญของเส้นใยถูกยับยั้งโดยมีอัตราการยับยั้งเชื้อราที่ 34.01 และ 47.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

Ambikapathy *et al.*, 2011 ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดทั้ง 5 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อรา *Pythium debaryanum* ด้วยวิธี agar well diffusion method ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมทานอลของ *Lawsonia inermis* สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด

ปัณรสีและภัทรา, 2012 ได้ศึกษาการใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกว่านหางจระเข้เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนส และโรคขั้วผลเน่าในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ โดยทำการสกัดสารจากเปลือกว่านหางจระเข้ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ผลการทดลองพบว่า ผลของสารสกัดหยาบจากเปลือกว่านหางจระเข้ในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนส และโรคขั้วผลเน่าบนผลมะม่วงที่ได้รับการปลูกเชื้อในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* 41.71 ถึง 66.87 เปอร์เซ็นต์ โดยความเข้มข้นที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดคือ 6,000, 10,000 และ 10,000 ppm ตามลำดับ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไมยราบมีดังนี้

Azmi *et al.*, 2011 ได้รายงานรวบรวมผลการวิจัยฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไมยราบ ซึ่งผลที่ได้พบว่า สารสกัดไมยราบมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายหลาย เช่น ยับยั้งแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัส ช่วยป้องกันตับ รักษาแผลอักเสบ โรคเบาหวาน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย สารประกอบที่พบในสารสกัดไมยราบ ส่วนใหญ่พบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ไทโรซีน ไมโมซินามิน กรดไมโมซินิค ไมโมซีน และแทนนิน เป็นต้น

Muthukumaran *et al.*, 2011 ได้รายงานผลงานวิจัยเรื่องการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดไมยราบจากเมือง Pattukkottai ประเทศอินเดีย โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ 4 เทคนิค ได้แก่ DPPH, Nitric Oxide (NO), ABTS และ Hydrogen peroxide free radical model ผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 35.00 ± 1.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และNitric Oxide (NO) ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 78.10 ± 1.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนวิธี ABTS แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 81.00 ± 3.85 ไมโครกรัมต่อลิตร และวิธี H_2O_2 แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 449.60 ± 1.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า สารสกัดไมยราบนั้นมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

Zhang *et al.*, 2011 ศึกษาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลของไมยราบที่พบทางตอนใต้ของประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ซึ่งในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ 2 เทคนิค ได้แก่ DPPH radical-scavenging activity และ Ferric reducing / antioxidant power ผลการทดลองพบว่า ไมยราบแสดงศักยภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีมาก โดยแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 0.61 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากตัวอย่างงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพืชหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดเชื้อราแอบแฝง ซึ่งคือ โรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วงน้ำดอกไม้ และในตัวอย่างพืชชนิดอื่น ไมยราบเป็นพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย รวมทั้งฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงสนใจที่นำไมยราบมาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ในระหว่างการเก็บรักษารอการจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

สถานที่ดำเนินการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการโรคพืช หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สารเคมี

ตารางที่ 3 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Agar	-	-	Thailand
Benomyl	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	บริษัท แองโกลไทย เคมีคัล ซัพพลายส์ จำกัด	Thailand
Clorox	NaOCl	THE clorox company	USA
Dichloromethane	CH_2Cl_2	Lab-Scan	Thailand
Ethanol 95%	C_2H_5OH	Merck	Germany
Ethyl Acetate	$CH_3COOC_2H_5$	Lab-Scan	Thailand
Glucolin Glucose – D	$C_6H_{12}O_6$	บริษัท แอล.พี จำกัด	Thailand
Hexane	C_6H_{14}	Lab-Scan	Thailand
Methanol	CH_3OH	Merck	Germany
Silica gel 60	SiO_2	Merck	Germany

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่สำคัญเพื่อใช้ในการ แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือ – อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต และ รุ่น	ประเทศ
เครื่องชั่งดิจิตอล 2 ตำแหน่ง (Analytical balance)	Monobloc รุ่น PB3002-5	Switzerland
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)	Mettler foledo รุ่น AB204	Switzerland
หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)	ฮิรายามา รุ่น HVA-50	Japan
เครื่องทำความเย็น (Cooling)	Buchi B-740	Switzerland
เครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (Evaporator)	Buchi รุ่น R-114	Switzerland
เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Fourier transform infrared spectrometer)	Perkin Elmer SpectrumRX I	UK
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)	บริษัท เบคไทย รุ่น UNE 600	Germany
ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow)	ห้างหุ้นส่วนจำกัด แลบเซอร์วิส Biohazard Class II รุ่น V6	Thailand
เตาอบไมโครเวฟ (Microwave)	บริษัท แอลจีอิเลคทรอนิคส์ (ประเทศไทย) จำกัด รุ่น MS2127CW	Thailand
เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance)	Varien 400 MHz magnets	USA
จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)		Thailand

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมวัตถุดิบ

ต้นไมยราบสด จากวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีชัยภูมิ อ.เมือง จ.ชัยภูมิ นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด จากนั้นผึ่งในที่ร่มให้แห้ง และนำมาทำให้เป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปอบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนแห้ง แล้วเก็บไมยราบแห้งที่ได้ในที่แห้งและเย็น เพื่อนำไปใช้ในการทดลองและวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดจากไมยราบ

นำไมยราบแห้งมาสกัดด้วยตัวทำละลายโดยการแช่สกัดไมยราบแห้ง 200 กรัม ในตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอล 95% และน้ำ โดยในตัวทำละลายเอทานอล ใช้เวลาสกัดนาน 2 สัปดาห์ และคนสารสกัดทุกๆ 2 วัน ในส่วนสารสกัดน้ำ นำไมยราบแห้ง 200 กรัม แช่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เป็นเวลา 1 วัน โดยคนสารสกัดทุกๆ 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ บันทึกน้ำหนักของสารสกัดและคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลิก (Polyphenolic compounds)

ศึกษาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของไมยราบ โดยดัดแปลงจากวิธีการ Folin-Ciocalteu (Hammerschmidt and Pratt, 1978) ดังนี้ ผสมสารสกัดไมยราบ 0.2 มิลลิลิตรกับสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu 1 มิลลิลิตร และสารละลาย 7.5% sodium carbonate 0.8 มิลลิลิตร ทิ้งส่วนผสมนาน 1 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยเทียบกับกรดแกลลิก (กรัม/100 กรัม)

4. การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Re *et al.*, 1999)

การทดสอบความสามารถในการต้านหรือกำจัดอนุมูลอิสระในสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของไมยราบทำโดยการเตรียมน้ำยา ABTS โดยผสม 7 ไมโครโมลาร์ของ ABTS 5 มิลลิลิตรกับ 140 ไมโครโมลาร์ของโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) 88 ไมโครลิตร และเก็บในที่มืด 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (deionize water) ในขั้นตอนการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูล ABTS ทำโดย หยดน้ำยา ABTS 1.8 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีสารที่ต้องการทดสอบหรือน้ำที่ปราศจากไอออน ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 6 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank คำนวณความสามารถในการกำจัดอนุมูล $ABTS^{\cdot+}$ เป็นร้อยละ จากสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ความสามารถกำจัดอนุมูล ABTS (\%)} = [1- (A_{734\ sample} / A_{734\ deionize\ water}] \times 100$$

เมื่อ $A_{734\ sample}$ และ $A_{734\ deionize\ water}$ เป็นค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรของสารทดสอบและของน้ำที่ปราศจากไอออน ตามลำดับ เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของ

Trolox ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามิน อี โดยผลการวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox จึงมีชื่อว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

5. การแยกสารสำคัญเบื้องต้นด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography)

นำสารสกัดเอทานอลของไมยราบ แยกองค์ประกอบสารสำคัญเบื้องต้นด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (quick column chromatography)โดยใช้ silica gel 60 บรรจุในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10.0 เซนติเมตร และสูง 4.0 เซนติเมตร ผสมสารสกัดกับ silica และใส่ในคอลัมน์ ชะด้วยตัวทำละลายโดยเพิ่มสภาพความเป็นขั้วของตัวทำละลายจากขั้วน้อยไปขั้วมาก คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตท และเมทานอล ตามลำดับ ในอัตราส่วนต่างๆ ระเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันต่ำ บันทึกร้อยละผลผลิต ลักษณะสารที่แยกได้ และตรวจสอบสารสำคัญในแต่ละ fraction ที่เหมือนกัน ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

6. การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคสเปกโทรสโคปี

พิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลของไมยราบที่แยกองค์ประกอบด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีและ ^{1}H-NMR

6.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (Ultraviolet–visible spectroscopy, UV-Vis)

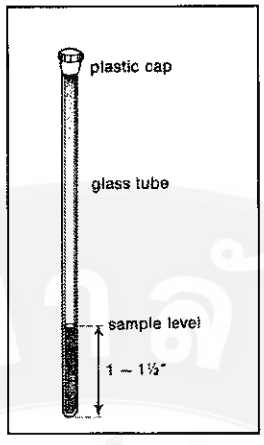
เตรียมสารสกัดที่มีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสารสกัด 50 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล และใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล แล้วทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 200-700 nm ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี

6.2 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)

นำสารสกัดเอทานอลของไมยราบหยดลงบนแผ่น NaCl เตรียมเป็นแผ่นฟิล์มบาง แล้วนำไปวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารสกัดด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี ในช่วงความเลขคลื่น 400 – 4000 cm^{-1}

6.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดหยาบด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรสโคปี (Nuclear magnetic resonance spectrometer ; NMR)

นำสารสกัดละลายด้วย $CDCl_3$ และใส่ในหลอด NMR โดยเติมสารละลายตัวอย่างที่เตรียมในปริมาณ 0.6 – 0.8 มิลลิลิตรให้ระดับของสารตัวอย่างในหลอด NMR สูงประมาณ 3 – 4 เซนติเมตร ดังภาพที่ 5 นำมาวิเคราะห์ ^{1}H-NMR สเปกตรัมที่ 400 MHz



ภาพที่ 5 ระดับของสารตัวอย่างที่เหมาะสมในหลอด NMR

7. การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้

7.1 การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

นำเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ผ่านการพิสูจน์โรคแล้วตามวิธีของ Koch's postulates (อธิบายในภาคผนวก) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เข็มปลายงอตัดชิ้นวุ้นบริเวณที่ปลายเส้นใยเจริญจาก Slant เชื้อรา *C. gloeosporioides* วางชิ้นวุ้นบนกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25°C นาน 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มในเอทานอล 95% แล้วลนไฟฆ่าเชื้อ รอให้ cork borer เย็นลง จึงตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา นำชิ้นวุ้นของเชื้อราที่ตัดแล้วมาวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยให้ด้านที่มีเชื้อราสัมผัสผิวหน้าอาหาร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 25 °C นาน 7 วัน แล้วจึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

7.2 การศึกษาผลของสารสกัดไมยราบต่อการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides*

ศึกษาผลของสารสกัดไมยราบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) นำเชื้อรา *C. gloeosporioides* อายุ 7 วัน มาทดสอบด้วยวิธี Poisoned food technique บนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดไมยราบที่ความเข้มข้น 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000 ppm ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และเปรียบเทียบข้อมูล กับการใช้สารเคมียับยั้งเชื้อ

รา ได้แก่ Benomly ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm บันทึกการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา (นิภาดา และคณะ, 2554)

7.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากไมยราบในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

นำผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่สุกแก่เต็มที่มาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ตากลมให้แห้ง นำมาทดลองโดยจุ่มผลมะม่วงใน 4 สภาวะการทดลอง ได้แก่ การจุ่มในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 °C สารเคมี benomyl ที่ 500 ppm ในสารสกัดเอทานอล และน้ำจากไมยราบ ที่ความเข้มข้น 20,000 ppm เป็นเวลา 5 นาที ตากลมให้แห้ง แล้วใช้เข็มทำแผล 3 แผล แล้วใช้ cork borer เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่อายุ 10 วัน แล้วย้ายมาวางบนผลมะม่วง แล้วนำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการวัดขนาดแผลของการเกิดโรคและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* (วิชัย และชัยณรงค์, 2548)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

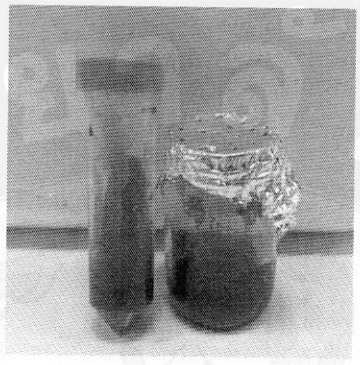
1. ผลการสกัดสารจากไมยราบ

ผลการสกัดไมยราบ 200 กรัมโดยการหมักด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ เอทานอลและน้ำ พบว่า ผลผลิตร้อยละของสารสกัดจากไมยราบด้วยเอทานอลและน้ำที่อุณหภูมิห้อง 28 องศาเซลเซียส เท่ากับ 4.93% และ 9.73% ตามลำดับ สารสกัดเอทานอลที่ได้มีลักษณะข้นหนืดสีเขียวเข้ม และสารสกัดน้ำมีลักษณะข้นหนืดสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งข้อมูลผลการสกัดไมยราบแสดงดังตารางที่ 5 และลักษณะสารสกัดหยาบที่ได้แสดงดังภาพที่ 6 ทั้งนี้จากการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากไมยราบ พบว่า ตัวทำละลายที่ใช้ในการเริ่มสกัดไมยราบมีหลายชนิด เช่น เอทานอล เมทานอล น้ำ คลอโรฟอร์ม ดังเช่นงานวิจัยของ Sunil Mistry และคณะในปี 2012 ทำการสกัดไมยราบ 400 กรัมด้วยตัวทำละลายเอทานอลได้ผลผลิตร้อยละ 6.6% ขณะที่งานวิจัยของ Karthikeyen and Deepa, 2009 ได้สกัดไมยราบ 100 กรัม ด้วยตัวทำละลายน้ำและได้ผลผลิตร้อยละ 4.2% ทั้งนี้ลักษณะของสารสกัดไมยราบด้วยน้ำของ Karthikeyen and Deepa มีลักษณะข้นหนืดและสีเขียวเข้ม คล้ายกับสารสกัดไมยราบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลในการทดลองนี้ อย่างไรก็ตาม สารสกัดเอทานอลในการทดลองนี้ได้นำไปศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตลอดจนการแยกองค์ประกอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค quick column chromatography และฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *C. gloeosporioides*

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดไมยราบด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ

สารสกัดไมยราบ	ลักษณะของสารสกัด	น้ำหนักที่ได้ (กรัม)	เปอร์เซ็นผลผลิต
เอทานอล	ข้นหนืด สีเขียวเข้ม	9.86	4.93
น้ำ	ข้นหนืด สีน้ำตาลเข้ม	19.46	9.73



ภาพที่ 6 ลักษณะสารสกัดหยาบจากไมยราบ ด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ซ้าย) และน้ำ (ขวา)

2. ผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดไมยราบ

สารสกัดเอทานอลและน้ำของไมยราบนำมาศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก และรายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักของตัวอย่าง 1 กรัม (mg GAE/g extract) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดไมยราบแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดไมยราบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ

สารสกัด	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/ g extract)	
	สารสกัดเอทานอล	สารสกัดน้ำ
ไมยราบ	65.42±1.01	57.12±1.68

*mg GAE คือ มิลลิกรัมแกลลิก

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดเอทานอลสูงกว่าสารสกัดน้ำ โดยไมยราบที่สกัดด้วยเอทานอล มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 65.42±1.01 mg GAE/g extract และสารสกัดน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 57.12±1.68 mg GAE/g extract ตามลำดับ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดเอทานอลและน้ำ มีปริมาณใกล้เคียงกับการศึกษาของ Zuhaib *et al.*, 2011 ที่ได้รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทานอลของไมยราบ (71.23±0.15

mg GAE/g extract) และจากผลการศึกษาของ Singh *et al.*, 2012 ได้รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดน้ำของไมยราบ (53.16±0.45 mg GAE/g extract)

3. การวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS

การวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วย 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline - 6-sulfonic acid (ABTS) เป็นการวัดความสามารถในการต้านหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัด โดย ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระด้วยการเติมโซเดียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดโดยใช้ Trolox เป็นสารควบคุม แสดงผลการทดลองด้วยค่า IC_{50} แสดงผลดังตารางที่ 7

ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay พบว่า สารสกัดเอทานอลมีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดน้ำ แต่หากเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox พบว่า สารสกัดไมยราบในตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระน้อยกว่า Trolox อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดในสารสกัด โดยสารสกัดเอทานอลของไมยราบมีปริมาณของฟีนอลิกรวมสูงและมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกกับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ Velazquez *et al.*, 2009

ตารางที่ 7 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดไมยราบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำแสดงด้วยค่า IC_{50}

สารสกัด	IC_{50} (mg/ml)	
	เอทานอล	น้ำ
ไมยราบ	0.08±0.01	0.19±0.01
Trolox	0.02±0.00	0.02±0.00

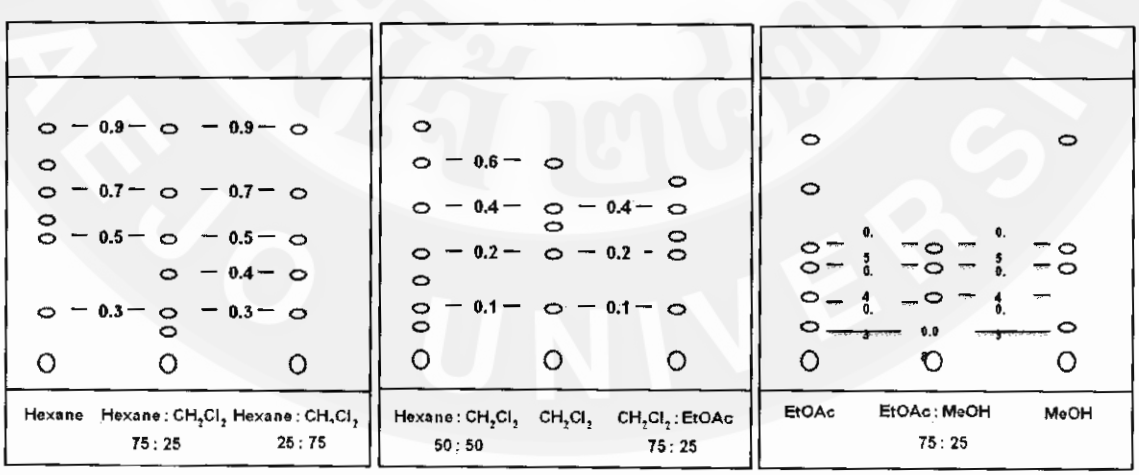
4. ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเอทานอลของไมยราบด้วยเทคนิค quick column chromatography

ผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดไมยราบในตัวทำละลายสองชนิดพบว่าในสารสกัดเอทานอลปริมาณฟีนอลิกและความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่าในสารสกัดน้ำ ดังนั้นจึงสนใจนำส่วนสารสกัดเอทานอลของไมยราบนำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค quick column chromatography โดยนำสารสกัดเอทา

นอล 6 กรัม มาแยกองค์ประกอบด้วยเทคนิค quick column chromatography โดยมีตัวทำละลายที่มีการเพิ่มสภาพความมีขั้วจากน้อยไปมากคือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตท และเมทานอล ตามลำดับ ด้วยอัตราส่วนแตกต่างกันในปริมาตรรวม 50 cm^3 และรวบรวม fraction ได้ 9 fraction เมื่อนำไปแยกองค์ประกอบด้วยเทคนิค TLC โดยมีระบบตัวทำละลายคือ ปิโตรเลียมอีเทอร์/คลอโรฟอร์ม (1:4) และคลอโรฟอร์ม/อะซีโตน (3:1) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 8 โดยแสดงลักษณะสารของแต่ละ fraction ที่รวบรวมได้ตลอดจนน้ำหนัก ระบบตัวทำละลาย และแสดงด้วยรูปการทดสอบการองค์ประกอบแต่ละ fraction ที่ปรากฏด้วยเทคนิค TLC ดังภาพที่ 7

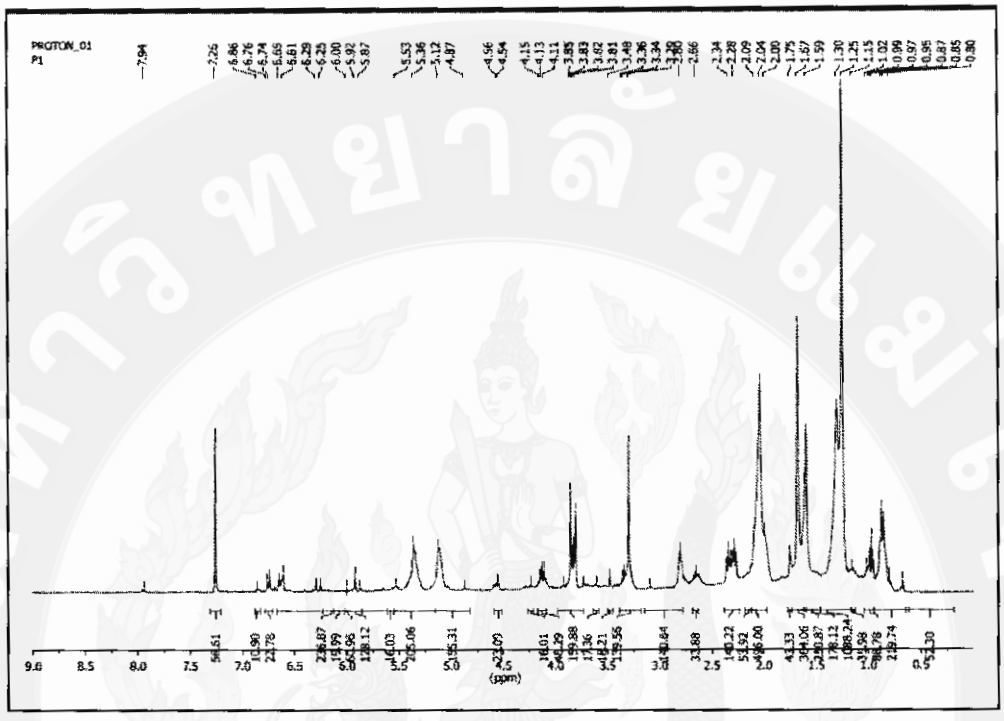
ตารางที่ 8 ผลการแยกองค์ประกอบสารสกัดเอทานอลของไมยราบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

Fraction No.	ตัวทำละลาย	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสาร
1	Hexane	1.24	ข้นหนืด - สีเขียวเข้ม
2	Hexane/ CH_2Cl_2 (25 :75)	0.57	ข้นหนืด - สีเขียวเข้ม
3	Hexane/ CH_2Cl_2 (50 :50)	0.73	ข้นหนืด – สีเขียวเข้ม
4	Hexane/CH_2Cl_2 (75 :25)	0.05	ข้นหนืด – สีเขียวเข้ม
5	CH_2Cl_2	0.02	สีเหลืองอ่อน
6	CH_2Cl_2/EtOAc (25:75)	0.84	ข้นหนืด – สีเขียวเข้ม
7	EtOAc	1.54	ข้นหนืด – สีเขียวเข้ม
8	EtOAc/MeOH (25:75)	0.80	ข้นหนืด – สีน้ำตาลเข้ม
9	MeOH	1.00	ข้นหนืด – สีน้ำตาลเข้ม



ภาพที่ 7 ผลการทดสอบด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดย F = fraction

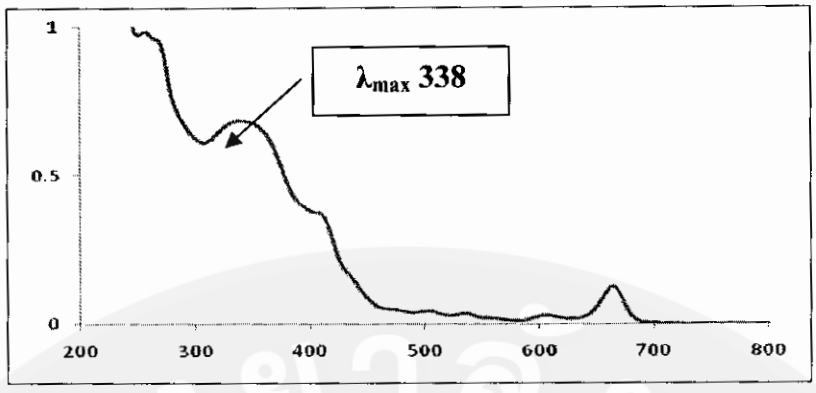
ทดลองเลือก fraction ที่ 8 นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR จากสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR ของ fraction 8 โดยรวมพบตำแหน่งโปรตอนของหมู่เมทิลในช่วง 2.34 – 2.66 และตำแหน่งโปรตอนของวงอะโรมาติกระหว่าง 5.0 -7.0 ppm แสดงดังภาพที่ 8



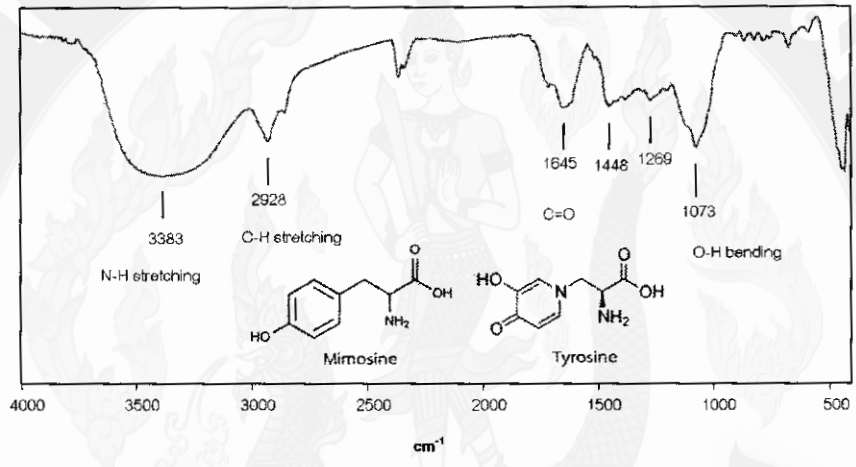
ภาพที่ 8 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของ fraction 8

ผลการวิเคราะห์เบื้องต้นขององค์ประกอบที่แยกได้จากสารสกัดเอทานอลด้วยเทคนิค TLC และ ^{1}H-NMR พบว่าสารสกัดที่แยกได้นั้นยังไม่บริสุทธิ์และจำเป็นต้องใช้เทคนิค PTLC (preparative thin layer chromatography) เพื่อแยกองค์ประกอบของสารสกัดในแต่ละ fraction เพื่อให้ได้องค์ประกอบที่บริสุทธิ์และนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อระบุโครงสร้างทางเคมีทั้งหมดที่แยกได้จากสารสกัดเอทานอลของไมยราบต่อไป

นอกจากนี้ได้นำสารสกัดในส่วน fraction 8 พิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นด้วยเทคนิค UV-Vis ผลการทดลองปรากฏค่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ 338 นาโนเมตร สเปคตรัมแสดงดังภาพที่ 9 และจากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่อง FT-IR พบหมู่ฟังก์ชันสำคัญ ได้แก่ N-H, C=C, C=O, C-N, C-H และ O-H ซึ่งใกล้เคียงกับโครงสร้างเคมีของ mimosine และ tyrosine ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในไมยราบข้อมูลความถี่และชนิดการสั่นแสดงดังภาพที่ 10 และตารางที่ 9 ตามลำดับ



ภาพที่ 9 ค่าความยาวคลื่นสูงสุดของสารสกัด fraction 8



ภาพที่ 10 อินฟราเรดสเปกตรัมของสารสกัด fraction 8

ตารางที่ 9 ข้อมูลความถี่และชนิดการสั่นของสารสกัด fraction 8

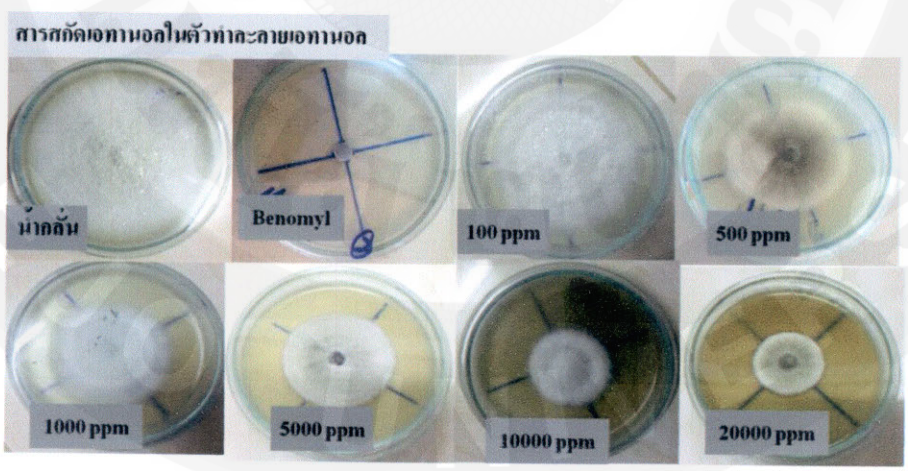
Wavenumber (cm^{-1})	**Assignments**
3382	N-H stretching
2929	C-H stretching
1709	C=O
1638	C=C stretching
1072	O-H bending

5. ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้

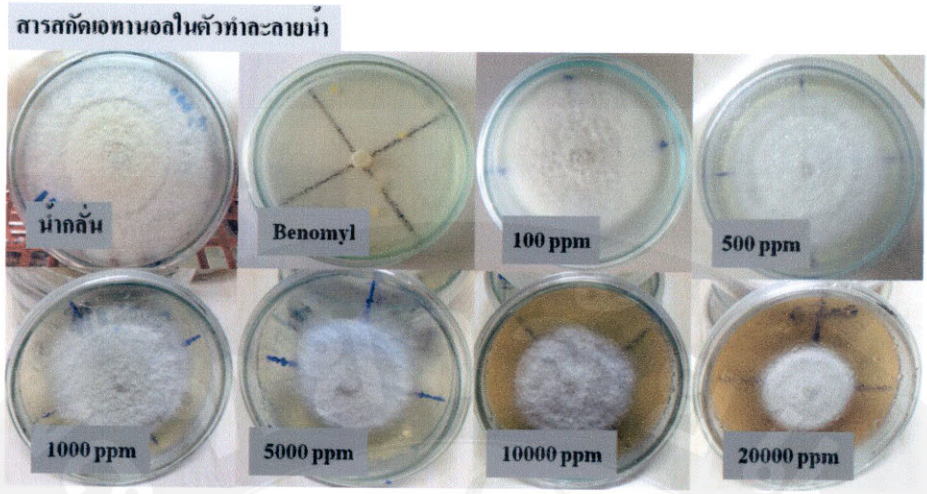
ในการทดลองนี้ทดสอบการเจริญของเส้นใยเชื้อราด้วยวิธี poisoned food technique โดยทดสอบด้วยสารสกัดไมยราบ 2 ชนิด คือ สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของไมยราบ ในการทดสอบนำสารสกัดแต่ละชนิดละลายในตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำกลั่นและเอทานอล และนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง โดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 7 วัน และทดสอบโดยผสมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 100, 500, 1,000, 5,000, 10,000 และ 20,000 ppm ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และสารเคมีกำจัดเชื้อราสังเคราะห์คือ benomyl และศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides*

5.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเอทานอลของไมยราบ

สารสกัดเอทานอลของไมยราบนำมาละลายในตัวทำละลายน้ำและเอทานอล และนำมาทดสอบการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี posisoned food technique บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยของเชื้อราทุกวันที่ 2, 4, 6, และ 8 และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราแสดงดังภาพที่ 11 และ 12 และข้อมูลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยของเชื้อราแสดงดังตารางที่ 10



ภาพที่ 11 ผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลของไมยราบ
ในตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 12 ผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลของไมยราบ ในตัวทำละลายน้ำ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* ของสารสกัดเอทานอลของไมยราบละลายในตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ

ชุดการทดลอง	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา		เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา	
	สารสกัดเอทานอล (ในเอทานอล)	สารสกัดเอทานอล (ในน้ำ)	สารสกัดเอทานอล (ในเอทานอล)	สารสกัดเอทานอล (ในน้ำ)
น้ำกลั่น	8.11±0.037^{h}	8.29±0.091^{g}	0.00±0.000^{a}	0.00±0.000^{a}
สารเคมี benomyl	0.00±0.000^{a}	0.00±0.000^{a}	100.00±0.000^{h}	100.00±0.000^{g}
100 ppm	6.97±0.121^{g}	7.51±0.118^{f}	14.06±1.504^{b}	9.40±0.968^{b}
500 ppm	6.19±0.053^{f}	6.24±0.162^{e}	23.67±0.761^{c}	24.73±1.918^{c}
1000 ppm	4.78±0.111^{e}	5.59±0.048^{d}	41.06±1.230^{d}	32.57±1.090^{d}
5000 ppm	4.31±0.048^{d}	5.33±0.066^{d}	46.86±0.584^{e}	35.71±0.830^{d}
10000 ppm	3.19±0.048^{c}	4.58±0.197^{c}	60.67±0.647^{f}	44.75±2.549^{e}
20000 ppm	2.92±0.054^{b}	4.00±0.135^{b}	64.00±0.325^{g}	51.75±1.954^{f}

* ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่มีตัวอักษรกำกับในแนวตั้งต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดเอทานอลที่ละลายในเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 100, 500,

1,000, 5,000, 10,000 และ 20,000 ppm นาน 8 วัน โดยมีชุดควบคุม คือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และ benomyl เป็นสารเคมีเปรียบเทียบ พบว่า การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสามารถยับยั้งได้ในการเจริญระยะแรก โดยค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 4 ผลการทดลองพบว่า ชุดควบคุมคือน้ำกลั่นปลอดเชื้อมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราเท่ากับ 4.25±0.027 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) กับอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ และที่ระดับความเข้มข้น 10000 และ 20000 ppm ของการทดสอบในวันที่ 4 ผลการทดลองพบว่าการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา 0.00±0.000 เซนติเมตร เท่ากันทั้งสองระดับความเข้มข้น และค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 10000 และ 20000 ppm นี้พบว่าให้ค่าเฉลี่ยเท่ากันกับค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลาง benomyl ที่ 0.00±0.000 เซนติเมตร การยับยั้งเชื้อราที่ให้ผลรองลงมาคือ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 5000 ppm ในการทดลองวันที่ 4 พบว่าค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราเท่ากับ 1.63±0.046 เซนติเมตร และที่ระดับความเข้มข้นลดลงของสารสกัด พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรามากขึ้นตามลำดับ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่ทดสอบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีค่าเฉลี่ยน้อยกว่าค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของชุดควบคุม เมื่อเลี้ยงเชื้อราครบ 8 วัน พบว่า ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราลดลง โดยชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่ 8.11±0.037 เซนติเมตร ค่าเฉลี่ยนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่วัดได้จากการทดสอบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ 6 ระดับ และเมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่า สารสกัดมีความสามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 8 ได้ทุกระดับความเข้มข้น โดย benomyl มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งที่ 100% และส่วนสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 20000 ppm ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดคือ 64.00% และระดับความเข้มข้น 10000 ppm ให้ผลการยับยั้งเชื้อรารองลงมาที่ 60.67% และพบว่า เมื่อระดับความเข้มข้นสารสกัดลดลง เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราลดลงตามลำดับ และน้อยที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ที่ 14.06%

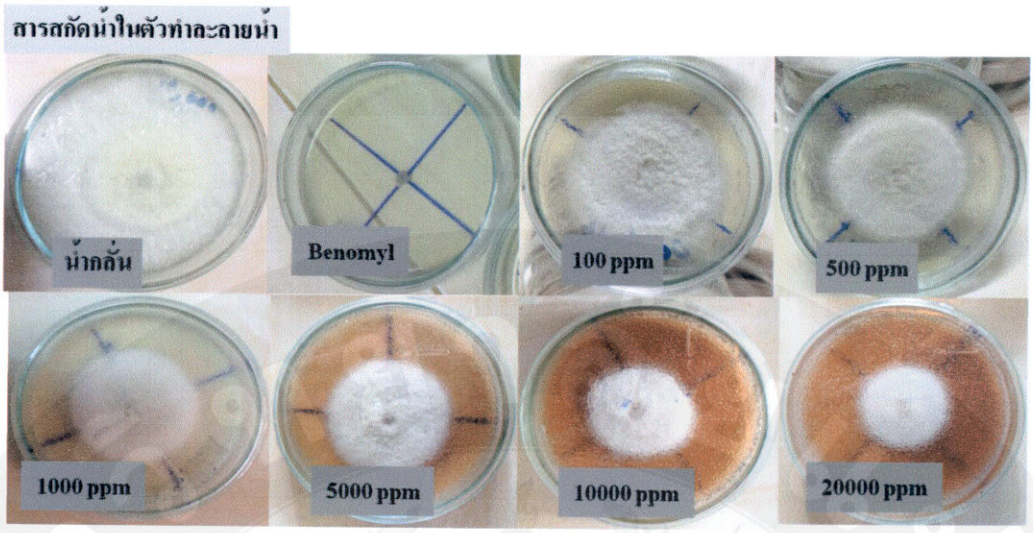
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดเอทานอลที่ละลายในน้ำที่ระดับความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 100, 500, 1,000, 5,000, 10,000 และ 20,000 ppm เป็นเวลา 8 วัน โดยมีชุดควบคุม คือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และ benomyl เป็นสารเคมีเปรียบเทียบ ผลการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ในระยะแรก โดยค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2 ของชุดควบคุม

เท่ากับ 1.95±0.045 เซนติเมตร และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) กับอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 20000 ppm ในการทดลองวันที่ 2 มีการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา 0.75±0.035 เซนติเมตร การยับยั้งเชื้อราที่ให้ผลรองลงมา คือ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 10000 ppm ในผลการทดลองวันที่ 2 พบว่า มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราเท่ากับ 1.10±0.016 เซนติเมตร สำหรับที่ระดับความเข้มข้นที่ลดลงของสารสกัด พบว่า จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรามากขึ้น ตามลำดับ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่ทดสอบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นั้นมีค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราน้อยกว่าที่พบในชุดควบคุม เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราจนครบ 8 วัน พบว่า ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราลดลง โดยชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่ 8.29±0.091 เซนติเมตร ค่าเฉลี่ยนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่วัดจากการทดลองด้วยสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันทั้ง 6 ความเข้มข้นและเมื่อผลการทดลองคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่า สารสกัดมีความสามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 8 ได้ในทุกระดับความเข้มข้น โดย benomyl มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 100% และส่วนสารสกัดที่ 20000 ppm พบว่า ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด คือ 51.75% และรองลงมาที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm ยับยั้งได้ 44.75% และพบว่าที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดลดลง เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราลดลงตามลำดับ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยที่สุดพบที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เท่ากับ 9.40%

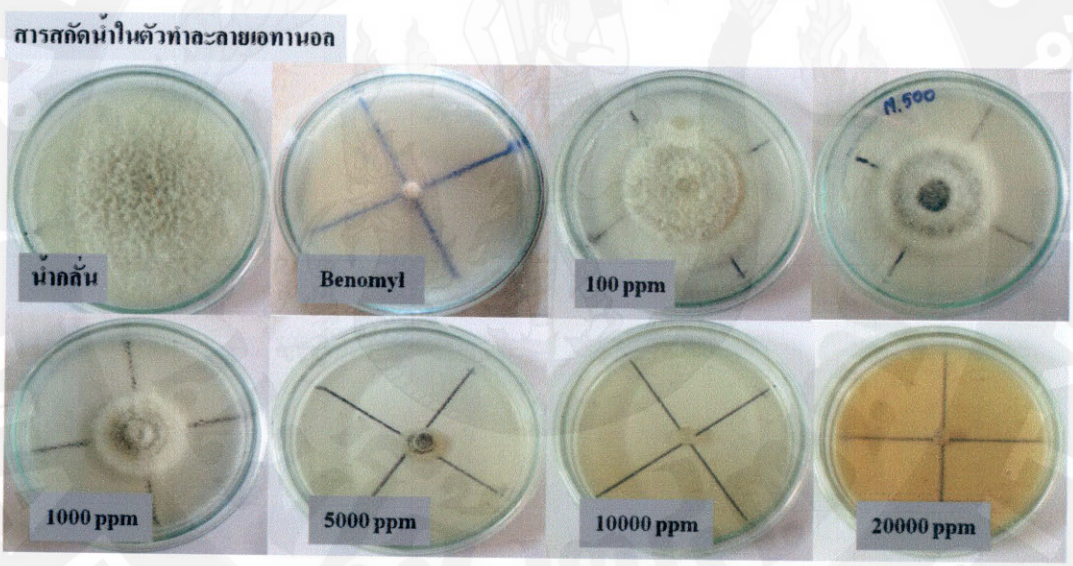
โดยสรุปพบว่า สารสกัดเอทานอลที่ละลายในตัวทำละลาย คือ เอทานอลจะให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ 64.00% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่า สารสกัดเอทานอลที่ละลายในตัวทำละลายคือน้ำ ที่ยับยั้งเชื้อราได้น้อยกว่าที่ 51.75%

5.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดน้ำของไมยราบ

สารสกัดน้ำของไมยราบนำมาละลายในตัวทำละลายน้ำและเอทานอล และนำมาทดสอบการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี posisoned food technique บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยของเชื้อราทุกวันที่ 2, 4, 6, และ 8 และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราแสดงดังภาพที่ 13 และ 14 และข้อมูลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยของเชื้อราแสดงดังตารางที่ 11



ภาพที่ 13 ผลการทดสอบสารสกัดน้ำของไมยราบในตัวทำละลายน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 14 ผลการทดสอบสารสกัดน้ำของไมยราบในตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบสารสกัดน้ำของไมยราบต่อการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในตัวทำละลายเอทานอลและตัวทำละลายน้ำ

ชุดการทดลอง	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา		เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา	
	สารสกัดน้ำ (ในน้ำ)	สารสกัดน้ำ (ในเอทานอล)	สารสกัดน้ำ (ในน้ำ)	สารสกัดน้ำ (ในเอทานอล)
น้ำกลั่น	8.39±0.018^{h}	8.20±0.095^{f}	0.00±0.000^{a}	0.00±0.000^{a}
สารเคมี benomyl	0.00±0.000^{a}	0.00±0.000^{a}	100.00±0.000^{h}	100.00±0.000^{f}
100 ppm	7.01±0.036^{g}	6.15±0.223^{e}	16.51±0.562^{b}	25.00±1.498^{b}
500 ppm	6.60±0.045^{f}	5.06±0.207^{d}	21.33±0.479^{c}	38.29±1.285^{c}
1000 ppm	6.28±0.012^{e}	4.36±0.114^{c}	25.15±0.295^{d}	46.83±0.582^{d}
5000 ppm	5.84±0.033^{d}	1.82±0.070^{b}	30.39±0.511^{e}	77.80±0.688^{e}
10000 ppm	5.37±0.051^{c}	0.00±0.000^{a}	36.00±0.524^{f}	100.00±0.000^{f}
20000 ppm	4.78±0.056^{b}	0.00±0.000^{a}	43.03±0.687^{g}	100.00±0.000^{f}

* ค่าเฉลี่ยการเจริญของเส้นใยที่มีตัวอักษรกำกับในแนวตั้งต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดน้ำที่ละลายน้ำที่ระดับความเข้มข้น 6 ระดับ คือ เข้มข้น 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000 ppm เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และ benomyl ผลการทดลองพบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดในการเจริญของเชื้อราในระยะแรก โดยค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 2 ของชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 2.88±0.030 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยนี้มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 20000 ppm ในวันที่ 2 ของการทดสอบแสดงค่าการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 1.49±0.024 เซนติเมตร การยับยั้งเชื้อราที่ให้ผลรองลงมา คือที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 10000 ppm โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 1.63±0.034 เซนติเมตร และเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลดลง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราจะมีขนาดมากขึ้นตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราของชุดที่

ทดสอบด้วยสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ามีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่าในชุดควบคุม และเมื่อเลี้ยงเชื้อราจนครบ 8 วัน พบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ลดลง โดยชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่ 8.39±0.018 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อรา ที่ได้จากการทดสอบด้วยสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันทั้ง 6 ระดับความเข้มข้น และเมื่อนำผลการทดลองคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่า สารสกัดมีความสามารถยับยั้งการเจริญโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 8 ได้ทุกระดับความเข้มข้น โดย benomyl มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 100% และพบว่าสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 20000 ppm ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด คือ 43.04% และรองลงมาที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm ยับยั้งได้ 36.00% นอกจากนี้ พบว่า ถ้าความเข้มข้นสารสกัดลดลงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราจะลดลง ตามลำดับ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดน้ำที่ละลายในเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 6 ระดับ คือ เข้มข้น 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000 ppm นาน 8 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และ benomyl พบว่า เมื่อสังเกตผลการเจริญเติบโตของเชื้อราครบ 8 วัน บันทึกค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ของชุดควบคุมเท่ากับ ±0.045 เซนติเมตร และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) กับค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10000 และ 20000 ppm มีการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อรา เท่ากันที่ 0.00±0.000 เซนติเมตร ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราเท่ากับค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราของ benomyl ที่ 0.00±0.000 เซนติเมตร การยับยั้งเชื้อราของสารสกัดที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 10000 ppm มีค่าลดลงตามลำดับ สังเกตได้จากค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่มากขึ้นตามลำดับ และค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) และน้อยกว่าค่าเฉลี่ยของชุดควบคุม นำผลการทดลองคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่า สารสกัดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ทุกระดับความเข้มข้นมากน้อยแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดย benomyl มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 100% ส่วนสารสกัดที่ 10000 ppm และ 20000 ppm ให้ผลการยับยั้งได้ดีที่สุดที่ 100% เช่นเดียวกับสารเคมี benomyl และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลงตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นสารสกัดน้อยลง และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$)

โดยสรุปพบว่า สารสกัดน้ำของไมยราบที่ละลายในเอทานอลจะให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ 100% ที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm ซึ่งดีกว่าการนำสารสกัดน้ำของไมยราบละลายในน้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 20000 ppm ที่แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพียง 43.00% โดยความสามารถในการยับยั้งเชื้อราจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลดลง

จากการพิจารณาผลการทดลองการนำสารสกัดของไมยราบมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่า สารสกัดไมยราบที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ สารสกัดน้ำของไมยราบที่ละลายในเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด 100% และเทียบเท่ากันกับการใช้สารเคมี benomyl และจากการพิจารณาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของไมยราบที่ละลายในตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ เอทานอลและน้ำ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของไมยราบที่ละลายในตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ เอทานอลและน้ำ ที่ความเข้มข้น 1000, 5000, 10000 และ 20000 ppm ให้ผลการยับยั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 ppm สารสกัดน้ำในตัวทำละลายเอทานอลให้ผลการยับยั้งที่แตกต่างกันกับสารสกัดเอทานอลในตัวทำละลายทั้งสองชนิด และสารสกัดน้ำในตัวทำละลายน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

อย่างไรก็ตามในการกำจัดเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง เพื่อให้ได้ผลรวดเร็วการป้องกันกำจัดโรคนั้นนิยมใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรามากกว่าโดยเฉพาะในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) คือ เบนโนมิล (benomyl) ไทอะเบนดาโซล (thaibendazole) หรือคาร์เบนดาซิม (carbendazim) ซึ่งเป็นสารเคมีชนิดดูดซึม (systemic fungicide) เพราะสามารถควบคุมโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราชั้นสูงได้ดี (Sariah, 1989) แต่การใช้สารเคมีดังกล่าวติดต่อกันเป็นเวลานาน มักประสบปัญหาการทนทานต่อสาร (resistance to fungicide) หรือเชื้อรามีการปรับตัวเกิดเป็นเชื้อกลายพันธุ์ (mutant) ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ เนื่องจากการใช้สารเคมีก่อให้เกิดผลกระทบตามมาหลายด้าน การใช้สารสกัดจากพืชจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ถูกนำมาควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยว พืชสมุนไพรนั้นแต่เดิมมุ่งเน้นเฉพาะทางการแพทย์ โดยนำมาใช้เป็นยาหรือองค์ประกอบส่วนหนึ่งของยารักษาโรคในมนุษย์ (วิมลมาศ, 2526) ด้วยคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้สารสกัดจากพืชถูกนำมาศึกษา และใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตรมากขึ้น และการนำสารสกัดจากพืชเพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราควรมีระดับความเข้มข้นสูงเพื่อการยับยั้งที่ได้ผลดี สอดคล้องกับตัวอย่างงานวิจัยในการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนส ดังเช่นในงานวิจัยของอนุวัฒน์ในปี 2545 พบว่าสารสกัดจากข่า ความเข้มข้น 10,000 ppm ทำให้การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบลดลง ระหว่าง 83-87 % ส่วนสารสกัดจากไพล (*Jengibre colorado*) ทำให้เชื้อรา

C. gloeosporioides ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้งานวิจัยของ วิไลรัตน์และเกษมในปี 2552 ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง พบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อรา *C. gloesparioides* (Penz) และการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 10 ชนิด โดยใช้สารสกัดผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) 5 ระดับความเข้มข้น 50, 500, 5,000, 10,000 และ 20,000 µg/ml และไม่ผสมสารสกัด (0 µg/ml) โดยพบว่าสารสกัดจากข่า ที่สกัดด้วย hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone และ ethanol มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ สารสกัดกระเทียม และใบดีปลีที่สกัดด้วยตัวทำละลายดังกล่าว (82.50-100%) ที่ความเข้มข้น 5,000 µg/ml ขึ้นไป นอกจากนี้สารสกัดผลดีปลี ตะไคร้ หน่อไม้ และสาบเสือ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยถึงปานกลางบางชนิด ที่ความเข้มข้น 5,000 µg/ml ยับยั้งเชื้อโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกัน ยกเว้นสารสกัดหน่อไม้และสาบเสือที่สกัดด้วย hexane ทุกความเข้มข้นยับยั้งได้น้อย สารสกัดหอมหัวใหญ่ ที่สกัดด้วย dichloromethane และ acetone ที่ความเข้มข้น 10,000-20,000 µg/ml รวมทั้งสารสกัดจากขิง และใบรัก ที่สกัดด้วย ethyl acetate และ acetone มีผลยับยั้งได้ดี ยกเว้นสารสกัดจากหอมหัวใหญ่และขิงที่สกัดด้วยน้ำ ในขณะที่สารสกัดจากกระเพราป่า และดอกรัก ยับยั้งได้ดีในตัวทำละลายบางชนิดเท่านั้น แต่ส่วนใหญ่ให้ผลยับยั้งระดับปานกลาง และต่ำ

6. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำ ในการควบคุมการเกิดโรคบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ในห้องปฏิบัติการ

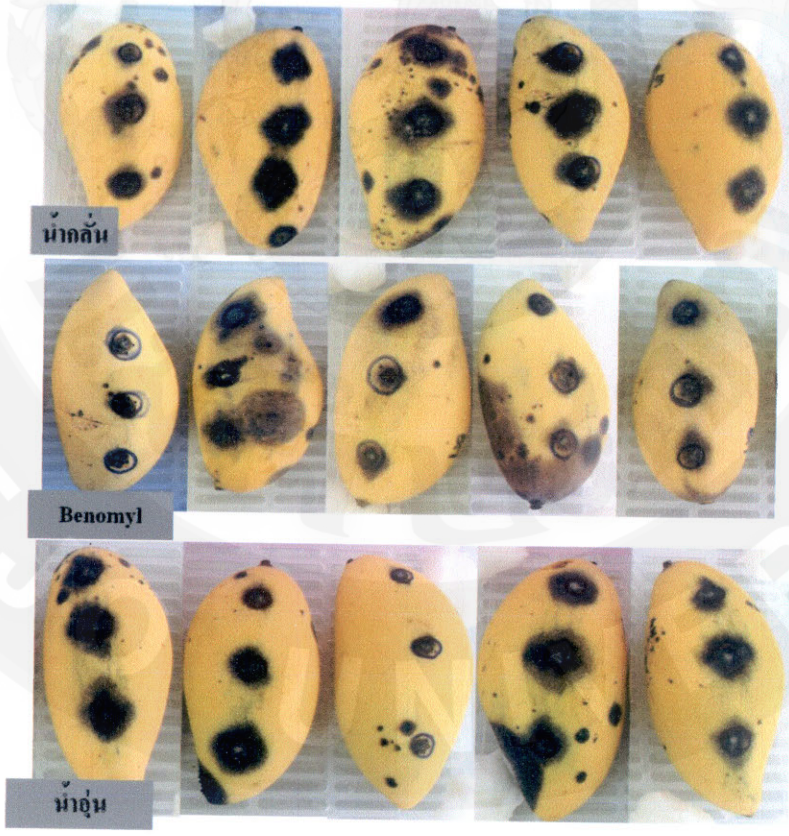
ในการทดลองนี้ได้ทดสอบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ด้วยวิธีการจุ่ม โดยมีสารสกัดไมยราบ 2 ชนิด คือ สารสกัดเอทานอลของไมยราบและสารสกัดน้ำของไมยราบ โดยในการทดลองเลือกสารสกัดที่ให้เปอร์เซ็นต์ที่ดีที่สุดของการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คือที่ความเข้มข้น 20,000 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และ benomyl เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ในห้องปฏิบัติการ

สารสกัดเอทานอลของไมยราบและสารสกัดน้ำของไมยราบ และนำมาทดสอบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธีการจุ่ม บันทึกขนาดของแผลที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทุกวันที่ 2, 4, 6, และ 8 และนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 12 และภาพที่ 15 และ 16 ตามลำดับ

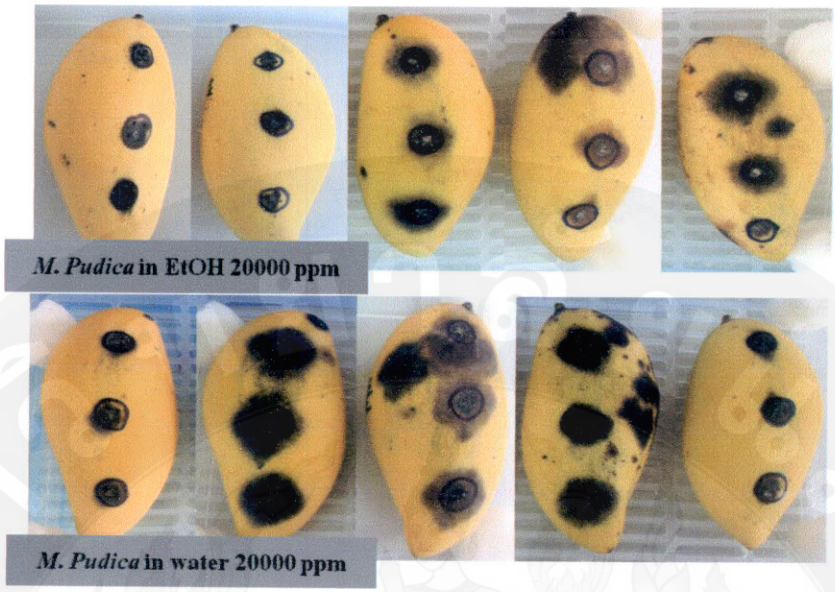
ตารางที่ 12 ผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลของไมยราบ และสารสกัดน้ำของไมยราบต่อการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้

ชุดการทดลอง	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา วันที่ 8	%การยับยั้งการเกิดโรค
น้ำกลั่น	2.88±0.054[b]	0.000 ±0.000[a]
สารเคมี benomyl 500 ppm	2.14±0.130[a]	25.80±3.682[b]
น้ำอุ่น	2.39±0.151[ab]	16.65±6.305[ab]
สารสกัดเอทานอลิก 20000 ppm	2.22±0.189[a]	22.45±7.443[b]
สารสกัดน้ำ 20000 ppm	2.38±0.317[ab]	17.06±9.848[ab]

* ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่มีตัวอักษรกำกับในแนวตั้งต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)



ภาพที่ 15 ผลการทดสอบชุดควบคุม (น้ำกลั่น) น้ำอุ่น และสารเคมี ต่อการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ ทั้งหมด 5 ซ้ำ ของวันที่ 8



ภาพที่ 16 ผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลของไมยราบ และสารสกัดน้ำของไมยราบต่อการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ ทั้งหมด 5 ซ้ำ ของวันที่ 8

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำในการควบคุมการเกิดโรคบนผลมะม่วงในห้องปฏิบัติการ พบว่า ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนผลมะม่วงในวันที่ 8 ชุดควบคุม ปรากฏค่าเฉลี่ยขนาดของแผลเท่ากับ 2.88±0.054 เซนติเมตร และสารสกัดเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 20000 ppm แสดงค่าเฉลี่ยขนาดของแผลเท่ากับ 2.22±0.189 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยนี้มีค่าแตกต่างกันกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และเมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การควบคุมการเกิดโรค พบว่า สารสกัดมีความสามารถควบคุมการเกิดโรคบนผลมะม่วง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในวันที่ 8 ได้ทุกระดับความเข้มข้น โดยสารสังเคราะห์ benomyl มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 25.80% และส่วนสารสกัด พบว่า ให้ผลการยับยั้ง คือ 22.45% และรองลงมาคือสารสกัดน้ำของไมยราบ สามารถยับยั้งได้ 17.06% โดยผลที่ได้นั้นมีค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งที่ไม่สูงมากนัก อาจเกิดจากการรบกวนของเชื้อแฝงที่อยู่ในผลมะม่วงสุก ซึ่งอาจเกิดจากการที่เชื้อฝังอยู่ตั้งแต่ในระยะผลอ่อนและเมื่อผลมะม่วงสุกเต็มที่เชื้อแฝงอาจจะเริ่มแสดงการเกิดโรคบนผลในขณะทำการทดลอง

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไมยราบในตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ ถึงผลของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า สารสกัดเอทานอลของไมยราบมีปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมด (65.42±1.01 mg GAE/g extract) สูงกว่า

สารสกัดน้ำ (52.37±0.70 mg GAE/g extract) และเมื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay พบว่า สารสกัดเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดน้ำ แสดงในค่า IC_{50} 0.08±0.01 mg/ml และ 0.19±0.01 mg/ml ตามลำดับ และพบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดทั้งสองชนิดของไมยราบ

จากการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลที่มีในปริมาณสูงกว่าสารสกัดน้ำ ดังนั้นจึงสนใจนำส่วนสารสกัดเอทานอลของไมยราบนำมาแยกองค์ประกอบทางเคมี ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็วโดยเปลี่ยนสภาพความมีขั้วของตัวชะจากน้อยไปมาก คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตท และเมทานอล ด้วยอัตราส่วนแตกต่างกันในปริมาตรรวม 50 cm^3 และรวบรวมได้ 9 fraction เมื่อนำไปแยกองค์ประกอบด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลายคือ ปิโตรเลียมอีเทอร์/คลอโรฟอร์ม (1:4) และคลอโรฟอร์ม/อะซีโตน (3:1)

ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยวิธี poisoned food technique ซึ่งทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าสารสกัดจากเอทานอลและสารสกัดจากน้ำ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ทุกความเข้มข้น แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นสารสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมสารสกัด โดยสารสกัดเอทานอลในตัวทำละลายเอทานอลและสารสกัดเอทานอลในตัวทำละลายน้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 20000 ppm ให้ผลการยับยั้งมากที่สุด คือ 64.00 % และ 51.75 % ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ให้ผลการยับยั้งที่น้อยที่สุด คือ 14.06% และ 9.40% ส่วนสารสกัดน้ำในตัวทำละลายน้ำ และสารสกัดน้ำในตัวทำละลายเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 20000 ppm ให้ผลการยับยั้งมากที่สุด คือ 43.03% และ 100.00 % ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ให้ผลการยับยั้งที่น้อยที่สุด คือ 16.51% และ 25.00% ตามลำดับ

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของไมยราบต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 20000 ppm ให้ผลการยับยั้งมากที่สุด จึงเลือกความเข้มข้นที่ 20000 ppm ไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมการเกิดโรคบนผลมะม่วง ที่ได้รับการปลูกเชื้อในห้องปฏิบัติการ สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำสามารถควบคุมการเกิดโรคบนผลมะม่วงได้ 22.45% และ 17.06% ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้นี้ทำให้เป็นแนวทางที่ดีในการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรโดยอาจใช้ประกอบกับการใช้สารเคมี เพื่อลดการใช้สารเคมีโดยตรงในปริมาณสูง หรือใช้ร่วมกับพืชชนิดอื่นที่ได้รายงานถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดี เนื่องจากสารเคมีอย่างเดียวในปัจจุบันนี้ สารเคมีเหล่านี้สามารถดูดซึมหรือสะสมบนผิวหรือผลของมะม่วงได้ โดยเฉพาะในกลุ่มของมะม่วงน้ำดอกไม้ส่งออก อาจมีผลกระทบต่อคุณภาพของมะม่วงได้ และอาจก่อให้เกิดสารเคมีสะสมแก่ผู้บริโภค ดังนั้น การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่

น่าสนใจอย่างยิ่งในการนำไปประยุกต์ใช้ทางการเกษตร ทั้งในทุกระยะของการปลูก จนถึงระยะการเก็บเกี่ยวหรือหลังการเก็บเกี่ยว

เอกสารอ้างอิง

กรรณิกา เนืองภา ปรากรม ประยูรรัตน และแสงมณี ชิงดวง. 2556. ประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium sp.* 945-950. จาก http://www.agriqua.doae.go.th [22 กุมภาพันธ์ 2557].

กรองจิต แซ่หงอ. 2528. **การศึกษาลักษณะความต้านทานของเชื้อ *Colletotrichum* spp. ต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทดูดซึมบางชนิด.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

กัลทิมา พิชัย. 2554. **การศึกษาการใช้สารสกัดพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญในพื้นที่สะลวง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่น.** รายงานผลการวิจัย. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่: เชียงใหม่.

ขจรศักดิ์ ภวกุล. 2529. **โรคไม้ผลของไทย.** กลุ่มงานวิจัยโรคไม้ผล กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ. 74 น.

จริงแท้ ศิริพานิช. 2538. **สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ. 300 น.

จริงแท้ ศิริพานิช. 2548. **สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ. 398 น.

ฉวีวรรณ บุญเรือง. 2536. **โรคขั้วผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis mangiferae* Ahmad. และการควบคุม.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร-มหาบัณฑิต สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

ฉวีวรรณ บุญเรือง. 2542. **การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดแมงลักคาที่มีผลในการควบคุม *Colletotrichum musae.*** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ วิทยาเขตพระนครศรีอยุธยา หันตรา: พระนครศรีอยุธยา.

ชลอ ชำนาญพิทักษ์. 2539. **โรคไม้ผลและการป้องกันกำจัด.** สำนักพิมพ์อักษรการพิมพ์: กรุงเทพฯ. 96 น.

ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล. 2534. เทคนิคการวิจัยการใช้สารสกัดจากพืชป้องกันการเกิดโรคของเชื้อ 4 สาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว. **ว.ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง.** 5(1): 21-23

ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ มยุรี หาญตระกูล เกรียงศักดิ์ พูนสุข โสภณ เริงสำราญ สมใจ เพ็งปรีชา และอมร เพชรสม. 2524. **สมุนไพร การรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นสำหรับงานวิจัย ของ โครงการศึกษาวิจัย สมุนไพร อันดับที่ 02**. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรงเทพฯ. 223 น.

ทรงกลด ซื่อสัตตบงกช. 2556. โรคแอนแทรคโนส (anthracnose). **กรมส่งเสริมการเกษตร** จาก http://www.stou.ac.th [18 ธันวาคม 2556].

ธารทิพย ภาสบุตร. 2540. **ผลของสารสกัดจากพืชบางชนิดที่มีต่อเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของ มะม่วง (*Collectotrichum gleosporiosdes* (Penz) Sacc.)** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร-มหาบัณฑิต สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

นพพล รัมมะสังข์. 2547. สมุนไพรไทย. จาก http://www.mukdahan.doae.go.th [22 มกราคม 2556].

นวพร ล้ำเลิศกุล. 2552. **เทคนิคปฏิบัติการจุลชีววิทยา.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่: เชียงใหม่. 80 น.

นิตยา กันหลง พัน อินทร์จันทร์ สมชาย กันหลง พัฒนา สนธิรัตน และประเทืองศรี สินชัยศรี. 2540. การควบคุมโรคหอมเลื้อยโดยใช้สารสกัดจากพืช. **ว.โรคพืช** 12(2): 143 - 153.

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2542. **โรคไม้ผลเขตร้อนและการป้องกันกำจัด.** สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ. 172 น.

นิภาดา ประสมทอง และคณะ. 2554. ผลของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. **รายงานการสัมมนาระบบเกษตรแห่งชาติ ครั้งที่ 7 :ระบบเกษตรไทยใต้ร่มพระบารมี เพื่อความมั่นคงทางอาหารและพลังงาน.** มหาสารคาม, 8-10 สิงหาคม: 520-525.

ปัณรสี สู่ศิริรัตน์ และภัทรา พลับเจริญสุข. 2552. **ประสิทธิผลของสารสกัดจากเปลือกว่านหางจระเข้ในการควบคุมหนอนใยผัก.** รายงานผลการวิจัย. มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์: กรุงเทพฯ.

พรทิพย์ วิรัชวงศ์. 2012. อนุมูลอิสระ (free radicals) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants). **วิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์.** จาก http://www.gpo.or.th/rdi/html/antioxidants.html [5 กุมภาพันธ์ 2557].

พีระพรรณ โพธิ์ทอง. 2012. สารต้านอนุมูลอิสระช่วยต้านโรค. จาก http://www.stou.ac.th [5 กุมภาพันธ์ 2557].

พัฒนา สนธิรัตน นิตยา กันหลง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และประเทืองศรี สินชัยศรี. 2536. **ผลของสาร สกัดกากพืชบางชนิดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสและเลื้อยของหอม.** รายงานผลงานวิจัย. กรมวิชาการเกษตร: กรุงเทพฯ.

ภัทรลดา เปี่ยมจิต. 2535. การทดสอบผลของสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชและสารสกัดจากพืชที่มีการเจริญเติบโตต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporiode*. วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

รัตติยา พงศ์พิสุทธา. 2554. การทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดเปลือกมังคุดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*. **ว.วิทยาศาสตร์เกษตร.** 42(3): 73-76.

รวีวรรณ เดื่อมขันมณี. 2546. การใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงระยะหลังการเก็บเกี่ยว. รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 6. ขอนแก่น, 24-27 พฤศจิกายน: 42-47.

วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และรุ่งนภา ก่อประดิษฐ์สกุล. 2534. การใช้สารสกัดจากพืชป้องกันการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง. รายงานการประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ, 4-7 กุมภาพันธ์ 2534: 307- 316.

วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล และชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล. 2548. **ฤทธิ์ของสารสำคัญจากพืชสมุนไพรในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง.** รายงานผลการวิจัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน: นครปฐม.

วิมลมาศ ลิปิพันธ์. 2526. ฤทธิ์การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร. **ไทยเภสัชสาร** 8:21-32.

วิไลรัตน์ ศรีนนท์ ธีรพล วันทิตย์ และ เกษม สร้อยทอง. 2552. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporiodes* (Penz.) สาเหตุโรคแอนแทรกโนสมะม่วงของสารสกัดจากพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน. **วิทยาศาสตร์เกษตร** 40(1): 75-78.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2552 จาก http://www.vcharkarn.com/vblog/50633 [8 สิงหาคม 2554].

สิริวิภา สัจจพงษ์. 2539. ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในการป้องกันกำจัดโรคของพืชผัก. **วิทยาสารสถาบันวิจัยพืชสวน.** 12: 76-83.

สุชาติ วิจิตรานนท์ และคณะ. 2557. โรคของมะม่วง. **กรมวิชาการเกษตร.** จาก http://www.thaikasetsart.com [20 มกราคม 2557].

สุภาวดี เลาหศิริ. 2526. **โรคยางไหลของมะม่วงพันธุ์เขียวเสวยและการรักษาด้วยสารเคมี.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

แสงมณี ชิงดวง. 2539. การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยใช้สมุนไพร. **ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา.** 6(2): 32-34.

อนุวัฒน์ จรัสรัตนไพบูลย์. 2545. ผลของสารสกัดหยาบจากข่าต่อโรคแอนแทรกโนสและการเจริญเติบโตของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. จาก http://www.phtnet.org/research/view-abstract.asp.research [18 สิงหาคม 2012].

อัจฉรา ฉัตรแก้ว ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์ และอภิรดี อุทัยรัตนกิจ. 2552. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบขี้เหล็กร่วมกับการใช้บรรจุภัณฑ์ต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของกล้วยหอมทองในระหว่างการเก็บรักษา. **Agricultural Sci. J.** 40(1): 285-288.

Aketr, A., F.A. Neela, M.S.I. Khan, M.S. Islam and M.F. Alam. 2010. Screening of ethanol, petroleum ether and chloroform extracts of Medicinal plants, *Lawasonia inermis* L. and *Mimosa pudica* L. for antibacterial activity. **Indian J Pharm Sci.** 72(3): 388-392.

Ambikapathy, V., S. Gomathi and A. Panneerselvam. 2011. Effect of antifungal activity of some medicinal plants against *Pythium debaryanum* (Hesse). **Asian J Plant Sci.** 1(3): 131-134.

Azmi, L., M. Kumar Singh and A. Kamal Akhtar. 2011. Pharmacological and biological overview on *Mimosa pudica*. **Linn. Int. j. pharm. life sci.** 2(11): 1226-1234.

Balakrishnan, N., V.H. Bhaskar, B. Jayakar, B. Sangameswaran. 2006. Antibacterial activity of *Mimosa pudica*, *Aegle marmelos* and *Sida cordifolia*. **Phcog Net.** 2: 198-9.

Ben- Aire, R. 1975. Benzimidazole penetration distribution and persistence in postharvest treated pears. **Phytopathol.** 65: 1187.

Bui, L-D. 2001. ***Mimosa pudica***. Available from: http://bio.maimi.edu/mimosa/mimosa.html [21 August 2014]/

Deans, S.G. 1991. Evaluation of antimicrobial activity of essential (volatile) oils. *In*: Linskens, H.F. and J.F. Jackson (ed.) **Essential oils and waxes.** Springer-Verlag: Germany. pp. 33.

Eckert, J.W. 1983. Control of postharvest diseasea with antimicrobial agents, *In*: **Post-harvest Phytology and Crop Preservation.** Mcgraw-Hill Book Co: New York. pp. 256-283.

Eckert, J.W., M.J. Kolbenzen, M.N. Rahm and K.J. Eckert. 1979. Influence of benomyl and methyl-2-benzimidazole carbamate on develment of *Penicillium digitatum* in the pericarp of orange fruit. **Phytopathol.** 69: 934.

Feng, Z., P.G. Hartel, R.W. Roncadori, S.J.S. Sung and J.E. Box. 1998. Inhibition of fungal colonization on the rhizoplane of the CS2-production plant, *Mimosa pudica L. In*: **Plant and Soil Sciences 82.** Klumwer Academic Publishers: Dordrecht Netherlands. pp. 115-126.

Fry, W.E. 1982. **Principles of plant disease management.** Academic Press: NewYork. 377 p.

Genest, S., C. Kerr, A. Shah, M. Mukhlesur Rahman, M. Saif Gadria, E. Naser, P. Nigam, L. Nahar and D. Sarker Satyajit. 2008. Comparative bioactivity studies on two *Mimosa* species. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.** 7: 38-43.

Gilpatrick, J.D. 1983. Management of resistance in plant pathogens. *In*: G.P. Georghiou and T. Saito (ed.). **Pest resistance to pesticides.** Plenum Press: New York. pp. 735-765.

Griffee, P. J. 1973. Resistance to benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae.* **Trans. Br. Mycol. Soc.** 60: 433-439.

Hammerschmidt, P.A. D.E. Pratt. 1978. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **J. Food Sci.** 43: 556-559.

Velazquez, J., A. Daniel and L. Cisneros-Zevallos. 2012. An alternative use of horticultural crops: stressed plants as biofactories of bioactive phenolic compounds. **Agriculture.** 2(3): 259-271.

Jeffries, P., J.C. Dodd, M.J. Jeger and R.A. Plumbley. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crop. **Plant Pathol.** 39: 343-366.

Karthikeyan, M. and M. K. Deepa. 2010. Antinociceptive activity of *Mimosa pudica* Linn. **Iranian J Pharmacol Ther.** 9(1): 11-14.

Kokane, D.D., R.Y. More, M.B. Kale, M.N. Nehete, P.C. Mehendale, C.H. Gadgoli. 2009. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica.* **J. Ethnopharmacol.** 124: 311-5.

Modern-natural. 2001. *Mimosa pudica Linn.* Available from: http://modern-natural.com/mimosa_pudica.htm. [3 October 2014].

Mukesh C.S. and S. Smita. 2010. Phytochemical and pharmacological screening of combined *Mimosa pudica Linn* and *Tridax procumbens* for *in vitro* antimicrobial activity. **Int J of Micr Res.** 1(3): 171-174.

Muthukumaran, P., P. Shanmuganathan and C. Malathi. 2011. In vitro antioxidant evaluation of *Mimosa pudica*. **Asian Journal of Pharmaceutical Research.** 1(2): 44-46.

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

Sariah, M. 1989. Detection of benomyl resistance in the anthracnose pathogen, *Colletotrichum capsici*. **J. Islam. Acad. Sci.** 2(3): 168-171.

Satish, S., D.C. Mohana, M.P. Raghavendra and K.A. Raveesha. 2007. Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. **J. Agric. Tech.** 3(1): 109-119.

Singh, R. and Y.T. Jasrai. 2012. *Mimosa hamate*(Willd.), a plant with anti-pathogenic properties. **Int. J. Med. Arom, Plants.** 2(4): 677-682.

Spalding, D.H. 1982. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest disease. **Plant Dis.** 66: 1185-1186.

Sunil, M., R. Patidar, V. Vyas, J. Jena and K.R. Dutt. 2012. Anti-inflammatory activity of *Mimosa pudica* Linn. (Mimosaceae) leaves: An ethnpharmacological study. **J. Pharm. Sci. & Res.** 4(3): 1789-1791.

Van der Berghe, D.A., M. Ieven, F. Mertens, A.J. Vlietinck, E. Iammens. 1978. Screening of higher plants for biological activities. II. antiviral activity. **J. Nat. Prod.** 41(4): 463-7.

Zhang, J., K. Yuan, W.L. Zhou, J. Zhou and P. Yang. 2011. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. from Southern China. **Pharmacogn Mag.** 7(25): 35-40.

Zuhaib, Z., S.T. Muralidhar, C. Bandopadhyay, M. Sinha and J. Sarkhel. 2011. Antioxidant activity of five selective medicinal plants. **Afr. J. Sci. Res.** 2(1): 126-147.

ภาคผนวก

1. คำนวณหาผลผลิตที่ได้ (เปอร์เซ็นต์)

สูตรที่ใช้ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต

$$\text{ผลผลิตที่ได้ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักผลผลิตที่ได้}}{\text{น้ำหนักพืชก่อนการสกัด}} \times 100$$

ตัวอย่างการคำนวณ

จากการนำไมยราบแห้ง 200 กรัม แช่ในเอทานอลเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วกรองสารสกัดที่ได้ จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ ทำให้ได้สารสกัดหยาบ 9.86 กรัม สามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้จาก

$$\% \text{ ผลผลิตที่ได้} = \frac{\text{น้ำหนักผลผลิตที่ได้}}{\text{น้ำหนักพืชก่อนการสกัด}} \times 100$$

$$= \frac{9.86 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 100$$

$$= 4.93 \%$$

***หมายเหตุ** การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ คำนวณด้วยวิธีเดียวกัน

2. การคำนวณหาเปอร์เซ็นการยับยั้งการเจริญของเส้นใย

$$\text{การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

โดย A คือ ค่าเฉลี่ยของการเจริญเส้นใยในชุดควบคุม, B คือ ค่าเฉลี่ยของการเจริญเส้นใยในชุดทดสอบ

ตัวอย่างการคำนวณแสดงดังนี้

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย ข้อมูล ณ วันที่ 8 ของการทดลอง พบว่า ชุดควบคุม มีค่าเฉลี่ยของการเจริญของเส้นใยอยู่ที่ 8.11 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยของการเจริญของเส้นใยในชุดทดสอบ ที่ความเข้มข้น 20000 ppm เท่ากับ 2.92 เซนติเมตร สามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยได้จาก

$$\% \text{ การยับยั้งการเจริญของเส้นใย} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

$$= \frac{8.11 - 2.92 \text{ cm} \times 100}{8.11 \text{ cm}}$$

$$= 64.00 \%$$

***หมายเหตุ** การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยที่ความเข้มข้นอื่นๆ คำนวณด้วยวิธีเดียวกัน

3. หลักการการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

เป็นเทคนิคที่แยกสารให้บริสุทธิ์จากของผสม การแยกสารโดยเทคนิคนี้แยกโดยผ่านของผสมลงในคอลัมน์ที่บรรจุตัวดูดซับหรือสารค้ำจุนที่มีเฟสคงที่เคลือบอยู่ แล้วชะด้วยเฟสเคลื่อนที่ สารในของผสมจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราที่ไม่เท่ากัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดระหว่างสารกับตัวดูดซับ เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบรวดเร็ว (quick column chromatography) เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด โดยอาศัยหลักการการเคลื่อนที่ของสารเคมีต่างชนิดกันบนตัวกลางในตัวทำละลายชนิดเดียวกันจะมีความเร็วต่างกัน ทำโดยการเตรียมคอลัมน์สำหรับแยกโดยการวางกระดาษกรองบน sintered glass ภายในของกรวยแก้ว ต่อปลายด้านล่างกรวยแก้วกับปั๊มดูดอากาศ ขณะเปิดปั๊มดูดอากาศเทซิลิกาเจลลงไปแล้วกดให้ซิลิกาเจลอัดแน่น และเรียบสม่ำเสมอ จนความสูงของซิลิกาเจลประมาณ 5 เซนติเมตร นำสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลจนเป็นผงร่วน ค่อยๆ เทของผสมดังกล่าวลงในคอลัมน์เกลี่ยให้เรียบและกดให้แน่น ปิดทับผิวหน้าด้วยกระดาษกรองอีกครั้ง เทตัวทำละลายที่ใช้สำหรับชะสารลงไป ตัวทำละลายที่ใช้สำหรับชะสารประกอบด้วย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทธิลอะซิเตท เมทานอล และน้ำ ผสมกัน ใน

อัตราส่วนต่างๆ นำสารละลายที่ชะได้แต่ละส่วนไปกลั่นแยกตัวทำละลายออกด้วยการกลั่นแบบลดความดันโดยใช้ rotary evaporator

1. คอลัมน์

เทคนิคในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีนั้น คอลัมน์ที่ใช้ในโครมาโตกราฟีจะมีลักษณะเป็นหลอดแก้วกลวง ปลายข้างหนึ่งทำให้เล็กลงเพื่อต่อเข้ากับตัวควบคุมการไหลของตัวทำละลาย ความสูงและขนาดของเฟสคงที่ที่บรรจุในคอลัมน์จะมีผลต่ออัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ถ้าเฟสคงที่มีขนาดเล็กและบรรจุในคอลัมน์สูงมากๆ จะทำให้การไหลของเฟสเคลื่อนที่ช้ามาก ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน

2. ตัวดูดซับ

สำหรับของแข็งที่ใช้บรรจุคอลัมน์ ต้องมีคุณสมบัติความมีขั้วมากกว่าเฟสเคลื่อนที่ การเลือกใช้ของแข็งต้องให้เหมาะสมกับชนิดของสารตัวอย่าง ของแข็งที่ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับ ของแข็งที่จะนำมาบรรจุในคอลัมน์ ต้องมีขนาดสม่ำเสมอ ขนาดของแข็งจะมีผลต่อเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์และประสิทธิภาพของคอลัมน์ ดังนั้นขนาดที่ใช้ควรเหมาะสม ของแข็งที่นำมาใช้ต้องไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ เนื่องจากการดูดซับของสารตัวอย่างขึ้นอยู่กับขั้วของตัวดูดซับหรือเฟสคงที่ นั่นคือ การเพิ่มขั้วของตัวดูดซับจะทำให้การดูดซับเพิ่มขึ้น โดยเรียงตามขั้ว ของแข็ง อะลูมินา และ ซิลิกาเจล จะเป็นตัวที่นิยมใช้มากที่สุด สำหรับซิลิกาเจล คือ ของแข็งโพลิเมอร์ของกรดซิลิซิก (H_2SiO_3) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ซิลินอล (Si-OH) ทำหน้าที่ดูดซับ ความเป็นขั้วของตัวดูดซับเรียงลำดับได้จากขั้วสูงไปขั้วต่ำ ดังนี้ alumina charcoal silica gel calcium oxide potassium carbonate sodium carbonate starch และ cellulose เป็นต้น

หลักการตรวจสอบโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatographys, TLC) หรือโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบางจัดเป็น planar chromatography อีกชนิดหนึ่ง ถ้าตัวดูดซับ (absorbent) เป็นเฟสที่อยู่กับที่ซึ่งถูกเคลือบบางๆบนแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติก โดยมี Gypsum ($CaSO_3$ (0.5 H_2O)) เป็นตัวยึดเหนี่ยว (binder) กลไกในการแยกส่วนมากจะเป็น absorption โดยมีหลักการดังนี้

ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี เป็นกระบวนการแยกสารที่ผสมกันโดยใช้เครื่องมือที่เป็นแผ่นแก้วฉาบด้วยตัวดูดซับชนิดที่เหมาะสมโดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารซึ่งมีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่แตกต่างกัน อันเป็นผลมาจากความสามารถของตัวดูดซับที่มีต่อสารแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ซึ่งมีหลักการและเทคนิคของการวิเคราะห์เหมือนกับวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟีทุกประการ แตกต่างกันที่ตัวเพลตแทนที่จะเป็นแผ่นกระดาษ แต่ใช้ของแข็งดูดซับเคลือบเป็นแผ่นบางๆ บนแผ่นแก้วหรือพลาสติก หรือแผ่นอะลูมิเนียม ตามปกติแผ่นบางๆ ของของแข็งที่เคลือบบนแผ่นแก้วจะมีความหนาระหว่าง 0.10-10 มิลลิเมตร วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ได้กว้างขวางกว่าวิธีเปเปอร์โครมาโทรกราฟีเพราะสามารถเลือกใช้เฟสคงที่ได้หลายชนิด สำหรับตัวทำละลายที่ทำหน้าที่เป็นตัวชะหรือสารดีเวลลอปทุกตัวที่สามารถใช้ในวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟีจะสามารถนำมาใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีได้ทั้งหมด โดยการเลือกของแข็งที่เป็นตัวดูดซับและตัวชะที่เข้าคู่กันได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม จะทำให้สามารถแยกสารออกจากกันเป็นอย่างดี ในการรายงานผลจะรายงานจำนวนจุดที่ปรากฏบนแผ่น TLC ค่า R_f ซึ่งการแสดงผลจะสังเกตได้จากการ spray หรือส่องภายใต้แสง UV ค่า R_f มีสูตรคำนวณดังต่อไปนี้

ค่า R_f = ระยะที่สารเคลื่อนที่ / ระยะที่ solvent เคลื่อนที่

ในการทดสอบ TLC นั้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นก่อนจะนำสารสกัดที่ได้มาแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

การเลือกใช้ตัวทำละลายสำหรับการแยกสาร ในกรณีที่สารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เป็นสารที่ไม่ทราบว่าคืออะไร หรือไม่มีการรายงานมาก่อนว่า ควรใช้ตัวทำละลายชนิดใด จะต้องมีการทดสอบโดยการทดลองเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสม การทดลองเลือกใช้ตัวทำละลายมีกฎเกณฑ์ว่า ควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาริตีต่ำสุดก่อน แล้วค่อยเพิ่มไปเรื่อยๆ จนกว่าจะได้ตัวทำละลายที่สามารถแยกออกได้อย่างเหมาะสม สำหรับตัวทำละลายที่นำมาใช้ในการดีเวล ลอปได้นั้น ต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสมดังนี้คือ

- ต้องมีความหนืดต่ำ (low viscosity) เพื่อทำให้เคลื่อนที่ได้เร็ว
- ถ้าจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายผสม ควรทำเป็นตัวทำละลายผสมที่น้อยชนิด เพราะถ้าผสมหลายชนิดจะมีโอกาสผิดพลาดได้ง่ายในการเตรียมส่วนผสม

- ถ้าเป็นสารผสมต้องสามารถผสมได้เป็นเนื้อเดียวกันจึงจะนำมาใช้ได้ (homogeneous)

- ต้องมีความบริสุทธิ์สูง ความบริสุทธิ์ในที่นี้ไม่ได้หมายถึงว่า ต้องปราศจากแร่ธาตุหรือสิ่งเจือปนทั้งหมด 100% แต่ความบริสุทธิ์ในที่นี้หมายถึงว่า ไม่มีตัวทำละลายตัวอื่นที่มีโพลาริตีตรงข้ามกับตัวทำละลายที่ใช้ปนอยู่ด้วย

ค่าโพลาริตีของตัวทำละลายชนิดต่างๆ เรียงจากน้อยไปหามาก ตามค่าคงที่ไดอิเล็กตริกได้ดังต่อไปนี้คือ Hexane Cyclohexane 1,4-Dioxane Carbon tetrachloride Toluene Diethyl ether Ethyl acetate Acetic acid, glacial Dichloromethane Pyridine Acetone Ethanol Methanol และ Water ตามลำดับ การนำไปใช้ประโยชน์นั้นขึ้นกับลักษณะการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี โดยจะมีเทคนิคของการวิเคราะห์เหมือนกับวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟี ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจพิสูจน์ทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ เช่น

-ใช้ตรวจหาผลิตผลที่ได้จากปฏิกิริยาว่าเป็นชนิดอะไร ปฏิกิริยานั้นให้ผลิตผลอะไรบ้าง ปฏิกิริยานั้นเกิดขึ้นสมบูรณ์หรือไม่

-ใช้ตรวจวิเคราะห์ จำแนกชนิดของยา ยาเสพติด

-ใช้จำแนกชนิดของสารพิษ เช่น ยาฆ่าแมลง ยา

-ใช้ในการแยกสารที่ได้จากสมุนไพร

-ใช้หาความสัมพันธ์ก่อนนำสารไปแยกด้วยวิธี Column Chromatography

-ใช้ยืนยันผลการตรวจแยกออกเป็น fraction ต่างๆจาก Column Chromatography

-ใช้ในการตรวจสารตัวอย่างแบบ screen เพื่อหาคร่าวๆ ว่าเป็นสารในกลุ่มใด

4. หลักการอัลตราไวโอเลต และวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี

เครื่อง UV-Vis เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้ คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสม

จะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่าเมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ ใช้ประโยชน์ทั้งในด้านพิสูจน์โครงสร้างและหาปริมาณของสาร ในปัจจุบันยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปีเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญทางวิทยาศาสตร์เป็นอย่างยิ่ง เพราะถือว่าเป็นเทคนิคที่ง่าย ถูกต้องแม่นยำและใช้กันอย่างกว้างขวาง

5. หลักการฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี

เครื่องฟูริเออร์ ทรานสฟอร์ม อินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Fourier transform infrared spectrometer, FTIR) เป็นหนึ่งในเทคนิคทางด้าน Infrared spectroscopic ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกประเภทของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และพันธะเคมีในโมเลกุล รวมถึงสามารถบอกถึงปริมาณองค์ประกอบที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารผสมตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิด เทคนิค FTIR นี้มีความไว ใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบน้อยกว่าเทคนิคอื่นๆ โดยที่รังสีอินฟราเรดเป็นช่วงหนึ่งของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นในช่วง 0.78-1000 ไมโครเมตร หรือ wavenumber ในช่วง 12800 ถึง 10 cm^{-1} = 1/wavelength (cm) โดยในช่วงของรังสีอินฟราเรดจะแบ่งเป็น 3 ช่วงได้แก่

1. ช่วงใกล้อินฟราเรด (near infrared) คือช่วง wavenumber 12800–4000 cm^{-1} เป็นช่วงที่เกิดโอเวอร์โทน (overtone region) มีประโยชน์ในการวิเคราะห์สารประกอบอะโรมาติก

2. ช่วงกลางอินฟราเรด (middle infrared) หรือ fundamental region แบ่งออกเป็น

ก. Group-frequency region เป็นช่วงที่อยู่ระหว่าง 4,000 – 1,300 cm^{-1} หรือ 2.5 – 8 cm^{-1} ซึ่งสเปกตรัมที่ได้ในช่วงนี้ส่วนใหญ่ได้จากพวกหมู่ฟังก์ชัน (Functional groups) แต่ไม่ให้ข้อมูลโครงสร้างที่สมบูรณ์

ข. Finger print region เป็นช่วงที่อยู่ระหว่าง 1,300 – 650 cm^{-1} สเปกตรัมที่ได้ในช่วงนี้ส่วนใหญ่เกิดจากโครงสร้างของโมเลกุลที่สมบูรณ์ ดังนั้นสเปกตรัมที่ได้จึงค่อนข้างยุ่งยาก การวิเคราะห์ต้องเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารที่ทราบโครงสร้างแล้ว

3. ช่วงไกลอินฟราเรด (far infrared) คือช่วงนี้ไม่ค่อยจะใช้ในการวิเคราะห์เนื่องจากสเปกตรัมมักจะเกิดจากการสั่นของโครงสร้างหรือเกิดจากการหมุนของโมเลกุล ช่วงที่จะใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ในการวิเคราะห์นั้น เป็นช่วงอินฟราเรดเป็นส่วนใหญ่ คือ จาก 4,000 ถึง 400 cm^{-1} หรือ 2.5 ถึง 25 μm สำหรับช่วงเลขคลื่นที่นิยมนำมาใช้งานวิเคราะห์สาร คือ ช่วงกลางอินฟราเรด (middle infrared)

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารตัวอย่างด้วยเทคนิคนี้ จะใช้ในการทำนายหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างของสารตัวอย่างเป็นหลัก โดยอาศัยการพิจารณาจากความถี่ที่สารเกิดการดูดกลืนรังสี

6. หลักการนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรสโคปี

เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear magnetic resonance spectrometer ; NMR) เป็นเทคนิคเกี่ยวข้องกับการวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกันของนิวเคลียสที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในการศึกษาเกี่ยวกับสูตรโครงสร้างของสาร ไม่ว่าจะเป็นสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจาก NMR เป็นเทคนิคที่ศึกษาเกี่ยวกับนิวเคลียส ตลอดจนสภาวะข้างเคียงรอบนิวเคลียสนั้นๆ ด้วย นอกจากนี้ ยังสามารถนำมาใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์ได้ด้วย

7. เทคนิคการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium) คือ ส่วนประกอบของสารอาหารที่เอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์เจริญและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. มีธาตุอาหารและความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์
2. มีความเป็นกรดและด่าง (pH) เหมาะสมกับการเจริญ
3. ปราศจากสารพิษที่มีผลต่อการเจริญ
4. ปราศจากสิ่งมีชีวิตชนิดใด ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น

อาหารเลี้ยงเชื้อสามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท

1.อาหารเลี้ยงเชื้อทีจำแนกตามองค์ประกอบของอาหาร

1.1 Complete medium หรือ Non – synthetic medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทีไม่ทราบส่วนประกอบทางเคมีทีแน่นอนทั้งชนิดและปริมาณ อาหารเลี้ยงเชื้อนี้จะมีสารอินทรีย์มากมายทีได้

จากสารสกัดจากเนื้อเยื่อพืช หรือสัตว์ เช่น Peptone Yeast extract Beef extract หรือ Malt extract เป็นต้น อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จึงช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ Nutrientbroth (NB) Nutrient agar (NA) Potato dextrose agar (PDA) หรือ Trypticase soy broth เป็นต้น

1.2 Chemically defined medium หรือ Synthetic medium เป็นอาหารสังเคราะห์ที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอน ดังนั้นในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้แต่ละครั้ง จะได้อาหารที่มีองค์ประกอบเหมือนกันทุกครั้ง เช่น Minimal medium ที่ประกอบด้วย กลูโคส 2.0 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัม K_2HPO_4 0.7 กรัม MgSO4 0.5 กรัม Agar 15.0 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

2. การกำจัดเชื้อ (Sterilization)

วิธีการทำให้อาหารเลี้ยงปราศจากสิ่งมีชีวิตใด ๆ สามารถทำได้โดย

1. การใช้สารเคมี (chemical sterilization) ในการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อ มักใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ (disinfectant) เพื่อฆ่าเชื้อบนโต๊ะปฏิบัติการ โดยการเช็ดโต๊ะด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อก่อนและหลังทำงาน การทำเช่นนี้จะช่วยควบคุมและลดโอกาสการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมบนโต๊ะในระหว่างการปฏิบัติการได้

2. การใช้ความร้อนชื้น (Moist heat) โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ในการกำจัดเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและภาชนะที่บรรจุในห้องปฏิบัติการนิยมใช้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-30 นาที ขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งไอน้ำร้อนจะแทรกซึมเข้าสู่เซลล์และสปอร์ ทำให้โปรตีน (เอนไซม์) ต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์เสียสภาพทางชีววิทยา

3. การใช้ความร้อนแห้ง (dry heat) โดยใช้ตู้อบ (hot–air oven) กำจัดเชื้อในเครื่องแก้ว เครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ ที่เป็นวัสดุชนิดไม่เสื่อมสภาพได้ง่าย เช่น จานเพาะเชื้อ ปิเปต ขวด รวมถึงสารเคมีที่เป็นผงบางชนิดที่ทนความร้อนสูงได้ เช่น แป้ง การกำจัดเชื้อโดยวิธีการนี้ทำได้โดยอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เวลา 1 – 2 ชั่วโมง วิธีการนี้จะทำให้เกิดการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrate) และเกิดการ oxidation ของสารต่างๆ ภายใน protoplasm

4. การกรอง (filtration) โดยใช้เยื่อกรองหรือแผ่นกรอง (membrane filtration) ที่ทำจาก cellulose acetate หรือ plastic polymer ที่มีความหนาเพียง 0.1 มิลลิเมตร ขนาดของรูเยื่อกรองตั้งแต่0.22 – 0.45 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดรูเล็กกว่าเซลล์จุลินทรีย์ วิธีการนี้นิยมใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ออก

จากอาหารเหลว หรือของเหลวที่สลายตัวได้ง่าย เมื่อถูกความร้อน เช่น ยาปฏิชีวนะ ซีรัม สารละลายน้ำตาลบางชนิด การกำจัดเชื้อด้วยวิธีการนี้จุลินทรีย์ถูกแยกออกจากอาหารเหลว โดยเซลล์จุลินทรีย์จะติดอยู่บนเยื่อกรองอาหาร หรือของเหลวที่ผ่านการกรองแล้วจะปราศจากจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงต้องเก็บในภาชนะที่ผ่านการกำจัดเชื้อ

5. การเผาไฟ (Incineration) ในการเขี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้ออาจใช้ Loop หรือ Needle การกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมาบน Loop หรือ Needle ก่อนและหลังจากการเขี่ยเชื้อสามารถทำได้ง่ายๆ โดยการเผาไฟจนร้อนแดง การใช้ Forceps ในการคีบจับวัสดุต่างๆแบบปลอดเชื้อเช่น ใช้คีบจับ Disc ที่มียาปฏิชีวนะวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้จุ่ม Forceps ในแอลกอฮอล์แล้วลนไฟทันที ส่วนการกำจัดเชื้อบนแท่งแก้วงอ (Spreader) ซึ่งใช้สำหรับเกลี่ยเชื้อบนอาหารเพื่อให้เชื้อกระจายบนอาหารนั้นใช้วิธีเดียวกับ Forceps

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ มีดังนี้

1. กล้องจุลทรรศน์ เป็นเครื่องมือที่สำคัญมากโดยเฉพาะ การศึกษารูปร่าง โครงสร้างและการเรียงตัวของเชื้อ

2. Petri dish จานอาหารเลี้ยงเชื้อมีฝาปิด อาจจะทำด้วยแก้วหรือพลาสติก มีพื้นที่ผิวของอาหารมากกว่าหลอดทดสอบ ปกติจะบรรจุอาหารลงในจานประมาณ 15 – 20 มิลลิลิตร

3. Inoculating Loop and Needle loop และ needle เป็นเครื่องมือที่ทำด้วยลวดตัวนำความร้อนที่ดี เช่น Nichrom หรือ Platinum มีด้ามทำด้วยฉนวนความร้อน ลักษณะของ loop ตรงปลายเส้นลวดขดเป็นวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มม. ส่วน needle นั้นปลายตรง การฆ่าเชื้อเครื่องมือทั้งสองชนิดใช้วิธี incineration คือการเผาไฟโดยตรง เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากภาชนะหนึ่งไปใส่อีกในภาชนะหนึ่ง

4. Pipette เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายของเชื้อ หรือสารเคมีจากภาชนะหนึ่งไปใส่อีภาชนะหนึ่งในปริมาณที่แน่นอน ปิเปตมีหลายขนาดคือ 0.1 ml., 1 ml., 5 ml., 10 ml. หรือ 20 ml. เลือกใช้งานตามความเหมาะสม

5. Slide เป็นแผ่นแก้วสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาดประมาณ 2.5 x 7.5 cm. ใช้สำหรับเป็นที่รองรับเชื้อจุลินทรีย์ในการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ หรือ concave slide ชนิดที่มีหลุมตรงกลางใช้สำหรับดูการเคลื่อนไหวของจุลินทรีย์

6. Refrigerator ใช้สำหรับเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อหรือสารอื่นๆ ที่ต้องการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ เช่น ยาปฏิชีวนะ, serum, plasma

7. Sterilizers เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับทำลายจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และวัสดุ อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ

7.1 Autoclave เป็นเครื่องมือที่ใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลาย และเครื่องมือแพทย์ เป็นการฆ่าเชื้อโดยความร้อนของไอน้ำ

7.2 Hot air oven ใช้ฆ่าเชื้อในเครื่องแก้วต่างๆ เช่น Petri dish, pipette ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 1 ชม. 30 นาที

8. การเตรียมและการบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียม potato dextrose agar

สูตรอาหาร PDA

มันฝรั่ง	200 กรัม
เดกซ์โทรส	20 กรัม
วุ้น	20 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียมมีดังนี้

1. ปอกเปลือกมันฝรั่ง หั่นเนื้อมันฝรั่งเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดด้านละประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งให้ได้น้ำหนักตามสูตร แล้วต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนเดือดนานประมาณ 10 - 15 นาที อย่าทำให้เนื้อมันฝรั่งเละ กรองเอาแต่น้ำ

2. ชั่งน้ำตาลเดกซ์โทรส และวุ้นให้ได้น้ำหนักตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนช่วยจนวุ้นละลายหมด

3. ผสมส่วนประกอบจากข้อ 1 และ ข้อ 2 เข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบตามสูตร

2. การบรรจุอาหาร

1.บรรจุอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วลงในหม้อกรอกอาหาร กรอกอาหารใส่ขวดและหลอดทดสอบ ระวังอย่าให้อาหารเปื้อนปากขวดหรือปากหลอด

2. ปิดขวดหรือหลอดอาหารด้วยการอุดด้วยจุกสำลีที่แน่นพอสมควร โดยนำสำลีที่ปริมาณเหมาะสมกับขนาดของหลอดทดสอบมาปั้นให้แน่นเป็นแท่งลักษณะทรงกระบอก ทดลองอุดและดึงจุกสำลีหลาย ๆ ครั้ง จุกสำลีที่ดีจะยังคงรูปอยู่เหมือนเดิม หลังจากบรรจุอาหารเรียบร้อยแล้ว รวบรวมขวดและหลอดอาหารใส่ตะกร้า ปิดหุ้มด้วยกระดาษหนา ๆ เพื่อป้องกันไอน้ำหยดลงมาทำให้สำลีเปียก นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเข้ากันดีแล้วไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งด้วยหม้ออัดความดันโดยใช้อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นภายหลังการทำให้ปราศจากเชื้อเทใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฝาปิด (petri dish)

4. ทำความสะอาดภาชนะและเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารให้เรียบร้อย

9. การแยกเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนมะม่วง

ตัดชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรค ให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร แช่ด้วยน้ำยาคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปวางบนอาหาร water agar (WA) 3 วัน ตัดบริเวณปลายเส้นใยเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เพื่อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการเก็บเชื้อไว้ในอาหาร PDA เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

10. การทดสอบการเกิดโรคบนผลมะม่วง

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA 10 วัน ใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เพื่อตัดบริเวณขอบโคโลนี แล้วนำไปปลูกเชื้อบนผล และใบของมะม่วงน้ำดอกไม้ วางบนแผลที่ใช้เข็มเจาะ แล้วนำไปบ่มในกล่องให้ความชื้นเป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดแผลที่เป็นโรค เพื่อคัดเลือก isolate ที่สามารถทำให้เกิดโรคได้รุนแรงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

11. การพิสูจน์โรคตามวิธีการ Koch's postulates

สำหรับเชื้อสาเหตุโรคพืชที่แยกได้บริสุทธิ์ และยังไม่ได้พิสูจน์ให้แน่ชัดว่าเป็นสาเหตุของโรคจริง จำเป็นต้องมีการพิสูจน์ให้แน่ชัดโดยอาศัยหลักการพิสูจน์โรคของ Kach (Koch's Postulates) ซึ่งมี 4 ข้อ ดังนี้

1. ส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรคและเกิดจากจุลินทรีย์ จะต้องพบจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุร่วมอยู่ในส่วนนั้นเสมอ (constant association)

2. เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคสามารถแยกนำไปเลี้ยงให้บริสุทธิ์ (isolation in pure culture) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือบนพืชปกติพันธุ์ที่เป็นโรคง่าย ในกรณีที่เชื้อโรคเป็นปรสิตแบบถาวร (obligate parasite)

3. นำเชื้อสาเหตุที่บริสุทธิ์นั้นไปปลูกบนพืชปกติที่เป็นชนิดและพันธุ์เดียวกับข้อ 2 ต้นพืชปกติจะต้องแสดงอาการของโรคให้เห็น

4. เชื้อที่เป็นสาเหตุสามารถแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์จากต้นพืชที่เป็นโรค จากผลการปฏิบัติในข้อ 3 ได้อีก แล้วนำไปปลูกบนต้นปกติใหม่ ต้นพืชปกตินั้นจะแสดงอาการของโรคให้เห็นอีกเหมือนในข้อ 3 (re – isolation and re – inoculation)

หากเป็นจริงตามวิธีการดังกล่าวแล้ว เชื้อที่แยกได้นั้นจึงจะเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค การพิสูจน์โรคตามวิธีดังกล่าว อาจมีการแตกต่างไปบ้างในรายละเอียด เนื่องจากธรรมชาติของโรคและคุณสมบัติของเชื้อที่เป็นสาเหตุแตกต่างไปจากโรคและเชื้อที่เป็นสาเหตุอื่นๆ