สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

สารทางชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช

โดย

ดร. อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล

RCH
SB
732.6
ส8315ร

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....34410
วัน, เดือน, ปี.....1 พ.ย. 2542

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	2
กิตติกรรมประกาศ	3
สารบัญตาราง	4
สารบัญรูป	5
บทที่ 1 บทนำ	6
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	7
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน	11
บทที่ 4 ผลการทดลองและบทสรุป	15
ภาคผนวก	19
เอกสารอ้างอิง	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารทางชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช

บทคัดย่อ

พืชสมุนไพร 6 ชนิด คือ กระเทียม (*Allium sativum* Linn.) ใบกระเพรา (*Ocimum sanctum* Linn.) ขมิ้นอ้อย(*Curcuma domestica* Veleton) ขิง(*Zingiber officinale* Rose.) ใบมะกรูด(*Citrus hystrix* Dc.) และโป๊ยกั๊ก (*Illicium verum* Hook.) ที่ผ่านการอบแห้งแบบระเหิด และบดให้เป็นผง ก่อนที่จะนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น เอทานอล คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารที่สกัดได้ที่ความเข้มข้น 15,000 พีพีเอ็ม มาทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืช ด้วยวิธี Agar diffusion จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากกระเทียมให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้ดีที่สุด ในขณะที่สารที่สกัดได้จากใบกระเพรานั้น ไม่พบว่าให้ผลในการยับยั้งที่ความเข้มข้นดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of Biological Agent on Plant Pathogens

Abstracts

Six species of medicinal herbs. i.e. *Allium sativum* Linn. *Ocimum sanctum* Linn. *Curcuma domestica* Veleton *Zingiber officinale* Rose. *Citrus hystrix* Dc. and *Illicium verum* Hook. were freeze dried and groud into powder. They were extracted in 4 different solvent, i.e. distilled water, ethanol, chloroform and hexane for 48 hours. The antimicrobial activity of the extracts at concentration of 15,000 ppm were tested with plant pathogenic microorganisms by using agar diffusion method. The result showed that the extract of *Allium sativum* Linn. was the most effective on inhibitory effect on the growth of plant pathogenic microorganisms, whereas *Ocimum sanctum* Linn had no inhibitory effect.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยเรื่องนี้ได้สำเร็จลุล่วงลงได้ ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์, คณะวิทยาศาสตร์ และสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้งบประมาณสนับสนุนโครงงานวิจัยเรื่อง สารทางชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช นอกจากนั้นต้องขอขอบคุณ นางสาว จิราภรณ์ กรสิทธิกุล นางสาววันดี โรจน์อนวัช และนายศิรพงษ์ ณ พงษาที่ได้ช่วยเหลือในการทดลอง ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ได้ช่วยจัดการและอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ และธุรการระหว่างการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดลอง 6

ตารางที่ 2 แสดงผลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืช 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของสมุนไพร ที่อบแห้งแล้ว 18

รูปที่ 2 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aspergillus niger* ของสารสกัดจากกระเทียมในเฮกเซน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

จากการที่ประเทศไทย เป็นประเทศกสิกรรมที่มีรายได้ส่วนใหญ่ในรูปของผลผลิตทางการเกษตร ไม่ว่าจะเป็น พืช ผัก และผลไม้ ในขณะที่ปัจจุบันการเพาะปลูก พืช ผัก ผลไม้ เหล่านี้ มักประสบกับปัญหาของโรคพืชต่างๆ ที่เกิดจากจุลินทรีย์ ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณผลผลิตที่ได้ มีจำนวนที่ลดลง หรือให้ผลผลิตที่มีคุณภาพที่ต่ำลง ดังนั้น เกษตรกรจึงหาทางป้องกันและกำจัดโรคพืชเหล่านี้ โดยการใช้สารเคมี ซึ่งผลดังกล่าวนอกจากจะมีผลต่อผู้บริโภคในเรื่องของความปลอดภัยแล้ว ยังมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมด้วย เนื่องจากสารพิษที่ตกค้างอยู่ในดิน หรือสารพิษที่ปนเปื้อนลงสู่แม่น้ำลำคลอง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาหาสารที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยการศึกษาจากสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพร ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืช เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการทดแทนการใช้สารเคมีที่เป็นพิษนั้น โดยพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษานี้มี 6 ชนิด คือ กระเทียม ใบกระเพาะ ขมิ้นอ้อย ขิง ใบมะกรูด และโป๊กกั๊ก ส่วนชนิดของสารละลายที่ใช้ในการศึกษามี 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น เอทานอล คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน และเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืชที่จะใช้ทดสอบ ซึ่งแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดลอง

เชื้อจุลินทรีย์
Pichia kudriavzevii
Alternaria attemata
Cochliobolus lunatus
Botryodiplodia theobromae
Agrobacterium tumefaciens
Phodotorula graminia
Macrophomins phaseolina
Gibberella fujikuroi
Aspergilus niger

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืช ซึ่งในงานวิจัยนี้ จะเน้นเฉพาะเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช (plant pathogenic fungi) โดยอาจจำแนกลักษณะของราออกได้เป็น 5 class ได้แก่

1. Class Myxomycetes ได้แก่ ราเมือก (slime mould) ลักษณะของราประเภทนี้จะไม่สร้าง hypha vegetative และมีการแพร่พันธ์ โดย zoospore เช่น รา *Plasmodiophora brassicae* ซึ่งทำให้เกิดโรครากบวม
2. Class Phycomycetes ลักษณะของราประเภทนี้ มักอาศัยอยู่ในน้ำ หรืออาศัยอยู่ในดิน ซึ่งมักก่อให้เกิดโรคกับพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจมากมาย เช่น *Rhizopus stolonifer* ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากเน่าของผลไม้และผักต่างๆ
3. Class Ascomycetes จัดเป็นราชั้นสูง การขยายพันธ์แบบไม่อาศัยเพศ จะเป็นการสร้าง conidium ซึ่งอาจเกิดบน conidiophore หรือเกิดภายใน fruiting body ส่วนการขยายพันธ์แบบอาศัยเพศ จะเป็นการสร้าง ascospores ภายใน ascus ส่วนใหญ่ ascospore จะมีจำนวน 8 อัน ตัวอย่างของราประเภทนี้ ได้แก่ *Uncinula necator* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคราแป้งขาวขององุ่น
4. Class Basidiomycetes เป็นราที่มีวิวัฒนาการที่สูงขึ้น ส่วนใหญ่จะมักขยายพันธ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้าง conidium (oidium) ส่วนการขยายพันธ์แบบอาศัยเพศนั้น จะเกิดโดยการสร้าง basidiospores จำนวน 4 อัน บน basidium ที่อาจมีหรือไม่มี fruiting body หรือ basidiocarp ห่อหุ้ม
5. Class Deuteromycetes จัดเป็นราชั้นสูง ที่พบเฉพาะการสืบพันธ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยจะสร้างสปอร์ที่เรียกว่า conidium ขึ้นตรง conidiophore หรือบนหรือในส่วน fruiting body แบบต่างๆ ตัวอย่าง เช่น *Alternaria brassicae* เป็นสาเหตุโรคใบจุดของพืชพวกกะหล่ำ *Sclerotium rolfsii* เป็นสาเหตุโรคลำต้นเน่าของพืชหลายชนิด

ส่วนข้อมูลที่เกี่ยวกับพืชสมุนไพร ที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ผลโป๊ยกั๊ก ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923. *E. Coli* ATCC 25922 , *P. aeruginosa* ATCC 27853 , *C. albicans* , *A. flavus* และ *T. mentagophytes* สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* สารสกัดของใบฟ้าทลายโจร และส่วนต้นของบอระเพ็ดที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.thuringiensis* , *B.thuringiensis* , *B. sphaericus* สารสกัดของตะไคร้ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Epidermophyton floccosum* , *Microsporum gypseum* , *Trichophyton mentagophytes* ผลมะคำดีควายที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคพืช เช่น *Alternaria brassicicola, Colletotrichum capsici, Rhizoctonia solani , Sclerotium rolfsii* .

Suzuki และคณะ (1973) ได้รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยของกานพูล และใบกระวาน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ รวมถึงเชื้อราบางชนิด และน้ำมันหอมระเหยจากพริกไทย ขิง สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด Tansey และ Appleton (1975) ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยใช้น้ำคั้นจากระเทียมสด พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้เป็นจำนวนมาก ได้แก่ *Allomycesarbuscula Butler , Alternaria alternata , Apiporthe sp., Ascobolus lineolatus, Aspergilus amstelodami, A.nidulans , A. niger , C . albicans , Cephalosporium globosum , Chaetomium sp, Cladosporium resinae , Collybia velutipes , Coniohpora suffocata , Coniothyrium sp., Coprinus atramentarius , Corticium galactinum, Cunninghamella echinulata., Dipodascus uninucleatus., E. floccosum , Favolus sp., Fomes everhartii, Fusarium solani., Geotrichum candidum ., Hansenula wingei, Histoplasma capsulatum , Lenzites betulina., Leptosphaerulina argentinensis, Lipomyces starkeyi ., Mycotypha microspora , Penicilium camenbertii, P. cyclopium., P.notatum., P.vemiculatum., Phoma sp., Phycomyces blakesleeanus., Pichia menbranaefaciens., Polyporus versicolor ., Saccharomyces microeliipsodes , Stereum frustulatum , S. hirsutum* .

ประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ยังขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสารที่สกัดด้วย Morrs (1979) ได้รายงานว่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย anethole ที่ระดับ 500 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ได้ ส่วนการใช้สารพวก carvone ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม. จะยับยั้งการเจริญของ *C.albicans* ได้เช่นกัน Pllecuer (1979) พบว่าน้ำมันหอมระเหยของ *Lavanula officinalis* มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสียได้ น้ำมันหอมระเหยของเทียนขาว เทียนกลม เทียนข้าวเปลือก กระเทียม และหัวหอม ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Clostridium* sp. ได้(Huhtanen , 1980) ส่วนกานพูลและโป๊ยกั๊กสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp.(Hitokoto , 1980) นอกจากนั้นยังได้มีผู้ศึกษาประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆอีก ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ กระไดลิง ขมิ้นเครือ ขมิ้นอ้อย กระทกรก เจตมูลเพลิงแดง เหงือก ปลาหมอ จำปี โด่ไม่รู้ล้ม ตะโก ทองพันชั่ง เป็นต้น โดยทดสอบกับจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ *S. aureus , B. subtilis , E. coli* และ *C. albicans* ปรากฏว่า มีสมุนไพรหลายชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ได้ ซึ่งความสามารถในการออกฤทธิ์นั้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของสมุนไพร และชนิดของจุลินทรีย์ สารสกัดจากสมุนไพรในแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารสกัดในคลอโรฟอร์ม และปิโตรเลียมอีเทอร์ (พรรนิภา , 2521)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องเทศ 27 ชนิด ในการยับยั้งจุลินทรีย์ 33 ชนิด ปรากฏว่าส่วนมากน้ำมันหอมที่สกัดจากเครื่องเทศสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเครื่องเทศที่ไม่สกัดน้ำมัน และน้ำที่เหลือจากการสกัดน้ำมัน ซึ่งพบว่า กานพูลสามารถยับยั้งการเจริญของ *Rhizopus* sp. ได้ดีที่สุด กระชายสามารถยับยั้งการเจริญของ *Rhizopus* sp. ข่ายับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. และ *Rhizopus* sp. ขมิ้นขาวและขมิ้นเหลืองยับยั้งการเจริญของ *S. cerevisiae* ดอกจันทร์ยับยั้งการเจริญของ *Alternaia* sp. ตะไคร้ยับยั้งการเจริญของ *Rhizopus* sp. และ *Penicilium* sp. ใบกระเพรา และใบมะกรูดยับยั้งการเจริญของ *Cunninghamella* sp. และ *Aspergilus* sp. นอกจากนี้ยังมีใบโหระพา ผิวมะกรูด พริกขี้หนูผลยาว พริกชี้ฟ้า ไพล ลูกกระวาน ลูกจันทร์ ลูกผักชี ใบสาระแหน่ พริกไทย หัวหอมแดง หัวกระเทียม อบเชย ยี่หร่า และพริกขี้หนูผลสั้น สามารถยับยั้งการเจริญของ *Rhizopus* sp., *Penicilium* sp., *Cunninghamella* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Curvularia* sp., และ *Mucor* sp., เป็นต้น (บัญญัติ , 2518)

นอกจากนั้นยังมีรายงานเพิ่มเติมว่า ขมิ้นอ้อยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergilus niger* , *Curvularia* sp ., *Helminthosporium* sp ., *Sartorya* sp ., *Penicilium* sp ., และ *Alternaria* sp.(เอี้ยงคุณ 2524) ส่วนสารที่แยกได้จากเปลือกมังคุดเป็นพวก xanthone , 3-0-methyt mangostin , 3-6-di-methyl mangostin , 1-isomangostin และ mangostin triacetate เมื่อทดสอบกับเชื้อรา 14 ชนิด ซึ่งเป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคกับมนุษย์ และเชื้อราสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืช ปรากฏว่าเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบพวกที่ถูกยับยั้งการเจริญได้สูง คือ *E. foccossum*, *A. solani*, *Mucor* sp , *Rhizopus* sp. และ *C. echinulata* ส่วนพวกที่ถูกยับยั้งปานกลางได้แก่ *T. mentagrophytes* , *A.flavus*, *Penicilium* sp. ส่วนเชื้อรา *C. albicans* สามารถเจริญได้เป็นปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากงานวิจัยต่างๆ ที่ได้กล่าวมานี้แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนถึงบทบาทของสารสกัดจากพืชสมุนไพร ที่ผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นขั้นตอนที่เกี่ยวข้องในงานวิจัยนี้ จะแบ่งออกเป็น

1. การทดสอบศักยภาพของสารที่สกัดได้จากพืชสมุนไพร ที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช โดยเชื้อจุลินทรีย์เป็นสาเหตุของโรคพืชที่จะศึกษา มี

   Pichia kudriavzevii

   Alternaria attemata

   Cochliobolus lunatus

   Botryodiplodia theobromae

   Agrobacterium tumefaciens

   Phodotorula graminia

   Macrophomins phaseolina

   Gibberella fujikuroi

   Aspergilus niger

2. การศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสาร ออกจากพืชสมุนไพร โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษา มี 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น เอทานอล คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน
3. การแยกและทำให้สารที่ได้มีความบริสุทธิ์ เพื่อศึกษาชนิดและโครงสร้างบางอย่างโดยวิธี Bioautography , Thin-layer Chromatography

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืช ที่ใช้ในการศึกษานี้ มีทั้งหมด 9 ชนิด คือ

Pichia kudriavzevii

Alternaria atternata

Cochliobolus lunatus

Botryodiplodia theobromae

Agrobacterium tumefaciens

Phodotorula graminia

Macrophomins phaseolina

Gibberella fujikuroi

Aspergilus niger

2. พืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง มีทั้งหมด 6 ชนิด คือ กระเทียมสด โป๊ยกั๊ก ขิงแก่ ใบกระเพรา ใบมะกรูด ขมิ้นอ้อย

3. อุปกรณ์และสารเคมี :

อุปกรณ์

1. ตู้บ่ม
2. เครื่องชั่ง
3. เครื่องเขย่า
4. หม้อนึ่งความดัน
5. เครื่องแช่แข็ง
6. เครื่องระเหิดแห้ง
7. แผ่นเคลือบซิลิกาเจล
8. เมนเบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตต และชุดเครื่องกรอง
9. เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ ปิเปต บีกเกอร์ ฟลาสก์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมี

1. เฮกเซน
2. คลอโรฟอร์ม
3. เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95
4. เอทิลอะซิเตต
5. โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต

4. วิธีดำเนินการทดลอง

1. การสกัดพืชสมุนไพร

วิธีการ

1. ล้างพืชสมุนไพรให้สะอาดแล้ว นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (Blender) ให้ละเอียด
2. อบแห้งพืชสมุนไพรด้วยเครื่องระเหิดแห้ง(Freeze drier)
3. ชั่งสมุนไพรที่ปั่นละเอียดและอบแห้งแล้ว 10 กรัม
4. เติมตัวทำละลาย คือ น้ำกลั่นลงไปในพืชสมุนไพรจากข้อ 3 ที่ได้ชั่งน้ำหนักไว้ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร
5. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วันเพื่อให้สารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรถูกสกัดออกมาอยู่ในน้ำกลั่น
6. กรองกากพืชสมุนไพรออกด้วยกระดาษกรอง(Whatman no 4) นำส่วนใสที่กรองได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 - 8 องศาเซลเซียส ส่วนของกากสมุนไพรที่เหลือจะถูกนำมาสกัดอีกครั้ง ด้วยตัวทำละลายตัวเดิม 100 มิลลิลิตร
7. กรองส่วนของกากสมุนไพรออกด้วยกระดาษกรอง(Whatman no 4) แล้วนำส่วนใสที่กรองได้ไปรวมกับส่วนใสในข้อ 6 ก่อนนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำไปหาน้ำหนักแห้งของสารสกัด
8. ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 4 - 7 โดยเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นเอทานอลเข้มร้อยละ 95 เฮกเซน และ คลอโรฟอร์ม ตามลำดับ

2. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. เตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคพืชที่จะใช้ในการทดสอบ ในน้ำกลั่นที่มี Tween 80 ในปริมาณ 0.01 เปอร์เซนต์ ให้มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร
2. ปิเปตสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อในแต่ละชนิด ในปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ เชื้อละ 4 จาน หลังจากนั้นเทอาหาร Potato Dextrose Agar(PDA) 20 มิลลิลิตรตามลงไป ผสมให้เข้ากัน
3. ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะอาหารที่มีสารแขวนลอยของสปอร์ในข้อ 2 โดยการเจาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 หลุมต่อจานเพาะเชื้อ
4. นำสารที่สกัดได้จากพืชสมุนไพรที่นำมาทำให้มีความเข้มข้นเป็น 3 , 6 , 9 , 12 และ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
5. ปิเปตสารที่เตรียมไว้ 80 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมที่เจาะไว้แล้ว ในปริมาตรเท่ากับ 80 ไมโครกรัมต่อหลุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง
6. หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (Clear Zone) ที่เกิดขึ้น

3. การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารชีวภาพที่ผลิตได้จากสารสกัดจากพืชสมุนไพรออกจากสิ่งเจือปนโดยใช้วิธีทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟฟี่(Thin Layer Chromatography) มีวิธีการดังนี้

1 การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่สกัดได้จากพืชสมุนไพรโดยวิธีทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟฟี่

นำสารสกัดจากสมุนไพรที่ทำให้เข้มข้นแล้ว โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สภาวะสูญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หยดสารที่ทำให้เข้มข้นนี้ไปแล้วบนแผ่นซิลิกาเจล (Silica gel 60 ; Merck, Germany) ที่หนา 0.25 มิลลิเมตร กว้าง 10 เซนติเมตร โดยตำแหน่งที่หยดอยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นซิลิกาเจลประมาณ 1.5 เซนติเมตร โดยทำใน 2 ลักษณะ คือ ทำแบบหยดเป็นจุดกับหยดเป็นทางยาวในแนวตรง แล้วนำแต่ละแผ่นไปดีเวลลอป (develcp) ในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยสารละลายผสมโดยให้ส่วนปลายล่างของแผ่นแช่อยู่ในตัวทำละลายสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยใช้สารละลายผสมดังนี้ เอทิลอะซีเตต : เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม เป็นอัตราส่วน 5 : 5 : 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อสารละลายซึมมาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 2.0 เซนติเมตร นำมาทำให้แห้ง แล้วนำส่วนที่หยดแบบจุดมาทำการตรวจหาตำแหน่งของสาร โดยใช้โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ต่อจากนั้นจึงนำไปเทียบกับตำแหน่งที่หยดเป็นทางยาวในแนวที่ตรงกัน แล้วจึงขูดเอาผงซิลิกาออก ในแต่ละตำแหน่งของสาร นำผลซิลิกาที่ดูดซับสารนี้ไปทำการแยกเอาผงซิลิกาออก โดยการละลายในตัวทำละลายชนิดใดชนิดหนึ่งใน 6 ชนิด ที่กล่าวมาข้างต้น หลังจากนั้นนำมากรองโดยใช้กระดาษกรอง จะได้สารสกัดที่จะนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและบทสรุป

จากการศึกษาชนิดของสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพร ที่นำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืช ดังแสดงในตารางที่ 1

จากผลที่ได้พบว่า สารสกัดของสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบเป็น สารสกัดจากกระเทียม ใบมะกรูด โป๊ยกั๊ก ขิง และขมิ้นอ้อย ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากใบกระเพรานั้นไม่พบว่าให้ผลในการยับยั้งที่ความเข้มข้นดังกล่าว และจากความสามารถของสารที่สกัดได้จากสมุนไพรดังกล่าว เมื่อเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ในการสกัด เพื่อหาตำแหน่งของสารที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Bioautography Assay บนโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง เมื่อระบบของสารละลายที่ใช้ประกอบด้วย เอทิลอะซิเตต ต่อเฮกเซนต่อคลอโรฟอร์ม มีอัตราส่วนเป็น 5 ต่อ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ จะพบว่าสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดมีสารมากกว่า 1 ชนิด ที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืชได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงผลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืช

สารสกัดจากสมุนไพร	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้ง (เซนติเมตร)								
	P	R	A	M	C	G	B	N	T
Alium sativum Linn.									
Water extract	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ethanol extract	0	0	0.7	0	0.2	0	1.4	0.3	0
Chloroform extract	0	0	3.2	0.6	2.2	0	1.5	1.8	1.1
Hexene extract	0.1	0.4	1.2	0.5	1.0	0	1.7	1.5	0
Citrus hystrix Dc.									
Water extract	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0
Ethanol extract	0	0	0	0	0.6	1.3	0.07	0.3	1.3
Chloroform extract	0	0	0	0	0	0	0.3	0	1.5
Hexene extract	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ilicium verum Hook.									
Water extract	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0
Ethanol extract	0	0	0	0	0	0	0	0.35	0
Chloroform extract	0	0	0	0	0	0	0.08	0.33	0
Hexene extract	0	0.2	0.2	0	0	0	0	0.27	0
Zingiber officinale Rose.									
Water extract	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0
Ethanol extract	0	0	0	0.2	0.4	0	0	0.6	0
Chloroform extract	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hexene extract	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Curcuma domestica Valeton.									
Water extract	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ethanol extract	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chloroform extract	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hexene extract	0	0	0	0	0	0	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

หมายเหตุ 1. ไม่พบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบจากสารสกัดของ *Ocimum sanctum* Linn. ในทุกสารละลายที่ใช้ในการสกัด

2. เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืช ที่ใช้ทดสอบ

P = *Pichia Kudriavzevil*

A = *Altemaria attemata*

C = *Cochliobolus lunatus*

B = *Botryodiplodia theobromae*

T = *Agrobacterium tumefaciens*

R = *Rhodotorula graminia*

M = *Macrophomins phaseolina*

G = *Gibberella fujikuroi*

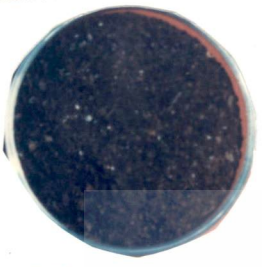
N = *Aspergilus niger*

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

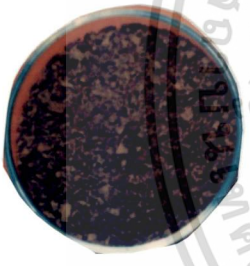
34410

ก. โป๊ยกั๊ก

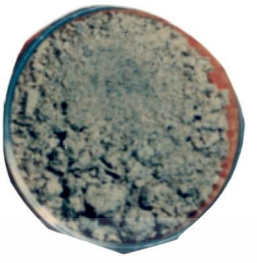


ข. มะกรูด

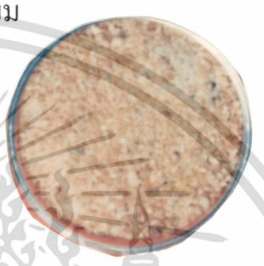
ค. ขมิ้นอ้อย



ง. ขิง

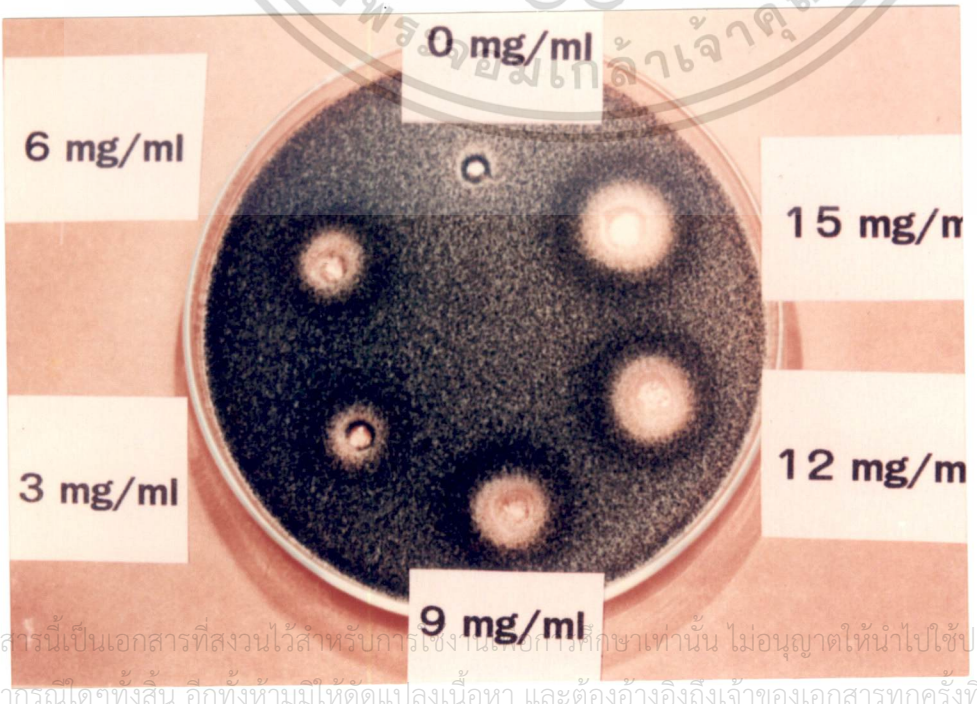


จ. กระเทียม



ฉ. ใบกระเพาะ

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของสมุนไพร ที่อบแห้งแล้ว



รูปที่ 2 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aspergillus niger* ของสารสกัดจากกระเทียม ในเฮกเซน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Agar

Beef Extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
water	1000	ลิตร

ปรับพีเอชให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.0 ทำลายเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที

2. Potato Dextrose Agar

Glucose Monohydrate	20	กรัม
Potato	200	กรัม
Agar	20	กรัม
Water	1000	ลิตร

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้ว และหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋า 200 กรัม ต้มนาน 30 นาที กรองเอาแต่ส่วนน้ำ ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมกลูโคสและวุ้น พร้อมกับต้มต่อจนวุ้นละลาย ทำลายเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

บัญญัติ สุขศรีงาม .2518. ประสิทธิภาพของเครื่องเทศบางชนิด ในการยับยั้งการเจิญของจุลินทรีย์ วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

พรรณิภา ชุมศรี .2521. การตรวจสอบสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์. สภาวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.

Azad,H.R., J.R.Davis, W.C.Schnathorst and C.I.Kado.1987. Influence of verticillium resistant and susceptiboe potato genotypes on populations of antagonistic rhizosphere and rhizoplane bacteria and free nitrogen fixers. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26:99-104.

Berdy,J., 1980 ."Recent Advances in and Prospects of Antibiotic Research." Process Biochemistry, Oct./Nov., 28-35.

Haavik,H.I.1974. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis* : effect of glucose. 81:383-390.

Huhtanen,C.N.1980. Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alcohols. J.Food Producton. 43:195-196.

Morris,J.A.1979. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils . J.of the America Oil Chemist's Soc. 56:595-603.

Phnonypaichit,S., N.Suvannarat., V.Petchrat., M.Ongsakul., L.Nilrat., and P.Wiriyachitra., 1990. Antifungal Activities of Extracts from *Maesa ramentacea*, *Sapindus rarak* and *Sapindus omarginatus*. Songklanakarin J.Sci.Technol.14(4)361-366.

Sukhoom,A., S.Chavanich and S. Hayashida.1990. Condition effects on production of biological active substance from *Bacillus licheniformis*. Microbial Utilization of Renewable Resources. 7:275-282.

Suzuki,I.J., B.Dainuis and J. H.Kilbuck.1973. A modified method of aflatoxin determination in spices. J.Food.Sci. 30:940-950.

Tansey,M.R. and J.A.Appleton.1975. Inhibiton of fungal growth by garlic extract . Mycologia. 67:409-411.

Yokotsuka,K., P.Karuwanna., W.Porntaweewat., K.Nozaki., and T.Seki., 1990.Antimicrobial Activity of Extracts of Plants Grown in Thailand against Microorganisms in Grape Juice and Wines. Annual Reports of ICBiotech. vol 13.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้