สำนักหอสมุดกลาง_พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ

T043918

นาย นนทพล ปุริเกษม
นาย วรวิทย์ เจริญวนันท์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.. 43918
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545

.b.....
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สาขาเคมีอุตสาหกรรม
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ 2216686

Effect of Crude Extracts from *Cassia alata* Leaf on *in vitro* growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

Mr. Nontapol Purikasaem

Mr. Vorawit Charoenvanan

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

For the Degree of Bachelor of Science

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Lardkrabang

2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ

นักศึกษา นาย นนทพล ปุริเกษม
นาย วรวิทย์ เจริญวนันท์

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.พัชนี เจริญยิ่ง

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(ผศ.ดร. สมศักดิ์ วรมงคลชัย) หัวหน้าภาควิชาเคมี

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(ผศ.ดร. อิทธิพล แจ้งชัด) ประธานกรรมการ

(ดร. วันฉัตร ชื่นชม) กรรมการ

(ดร. พัชนี เจริญยิ่ง) กรรมการ

(ผศ.ดร.ถนิมนันต์ เจนอักษร) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. สภาพห้องปฏิบัติการ
นักศึกษา	นาย นนทพล ปุริเกษม
	นาย วรวิทย์ เจริญวนันท์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.พัชนี เจริญยิ่ง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

จากการศึกษาสารสกัดจากใบของต้นชุมเห็ดเทศด้วยตัวทำละลายเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เมทานอล พบว่าสารที่สกัดได้จากใบของต้นชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา คือ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง โดยที่สารสกัดในชั้นคลอโรฟอร์มมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดชั้นเฮกเซน และเมทานอล ที่ความเข้มข้น 100, 500,1000 และ 5000 ppm และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเท่ากับ 27.26, 26.91, 44.10 และ 55.10 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Effect of Crude Extracts from *Cassia alata* Leaf on *in vitro* growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.
Name	Mr. Nontapol Purikaseam
	Mr. Vorawit Charoenvanan
Special Project Advisor	Dr. Patchanee Charoenying
Special Project Co-advisor	Asst. Professor Dr. Tanimnun Jaemaksorn
Department	Chemistry
Academic	2001

Abstract

The objective of this research was to investigate an activity of the crude extract of *Cassia alata* leaves in hexane, chloroform, and methanol. The experiment for testing antifungal activity was carried out with *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. which is the cause of anthracnose of mango (*Mangifera indica* L.). The results showed that the crude chloroform extract could inhibit the fungal growth when the concentration was increased to 100, 500,1000 and 5000 ppm. Percent inhibition of growth was 27.26, 26.91, 44.10 and 55.10, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ ดูแล และช่วยเหลือเป็นอย่างดี ของคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่

ขอขอบพระคุณ ดร.พัชนี เจริญยิ่ง ที่ดูแล เอาใจใส่เป็นอย่างดี ตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆ ในทุกด้าน ที่ทำให้โครงงานนี้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณพระคุณ ผศ.ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร สำหรับคำแนะนำในการทดลองทางด้านโรคพืช

ขอขอบพระคุณ ดร. อิทธิพล แจ้งชัด และ ดร. วันฉัตร ชื่นชม ที่เป็นกรรมการตรวจสอบโครงงานฉบับนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ที่คอยช่วยเหลือในเรื่องการเบิกจ่ายอุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่คณะเกษตรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอนุเคราะห์ในเรื่องที่เกี่ยวข้องทางด้านโรคพืช

ขอขอบพระคุณบิดามารดา ที่ให้กำเนิด เลี้ยงดู และสนับสนุนในการทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณแม่บ้านที่คอยดูแลเรื่องของความสะอาดและพนักงานรักษาความปลอดภัยที่ปฏิบัติหน้าที่อย่างเคร่งครัดทุกค่ำคืน

ขอขอบพระคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคนที่มีส่วนร่วมทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้ปิดลงด้วยความราบรื่น และท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณทุกดวงวิญญาณที่คุ้มครองให้เราปลอดภัยต่อสิ่งชั่วร้ายทั้งปวง

นาย นนทพล ปุริเกษม

นาย วรวิทย์ เจริญวนันท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาคผนวก	ซ
อักษรย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการดำเนินงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	1
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการพื้นฐาน	
2.1 สารเคมีป้องกันและกำจัดเชื้อราคืออะไร	3
2.2 ประวัติการใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดโรคพืช	3
2.3 สารประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร	5
2.4 การสกัดสารสำคัญจากพืช	12
2.5 การแยกส่วนผสม	16
2.6 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	17
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์	20
3.2 ขั้นตอนการวิจัย	22
3.3 วิธีการทดลอง	22
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 ผลการสกัดตัวอย่างพืชด้วยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลาย	25
4.2 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช	25
4.3 ผลการศึกษาหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 ผลการแยกสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่างๆ ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี 35

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย 37

5.2 วิจารณ์ผลการวิจัย 37

5.3 ข้อเสนอแนะ 38

เอกสารอ้างอิง 39

ภาคผนวก 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสบนใบมะม่วง 8

รูปที่ 2.2 แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสบนช่อดอก 8

รูปที่ 2.3 แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง 9

รูปที่ 2.4 โครงสร้างเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. 10

รูปที่ 2.5 ลักษณะรูปร่างของ conidia ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. 10

รูปที่ 2.6 ใบของต้นชุมเห็ดเทศ 11

รูปที่ 2.7 ต้นชุมเห็ดเทศ 12

รูปที่ 2.8 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) 15

รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างของ CHAETOGLOBOSIN C 18

รูปที่ 4.1 อิทธิพลของสารสกัดใบชุมเห็ดเทศ (จากตัวทำละลาย hexane) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน 30

รูปที่ 4.2 อิทธิพลของสารสกัดใบชุมเห็ดเทศ (จากตัวทำละลาย chloroform) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน 31

รูปที่ 4.3 อิทธิพลของสารสกัดใบชุมเห็ดเทศ (จากตัวทำละลาย methanol) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน 32

รูปที่ 4.4 อิทธิพลของสารสกัดใบชุมเห็ดเทศต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักของสารสกัดหยาบ (crude extract) ในชั้นตัวทำละลายต่างๆ 25

ตารางที่ 4.2 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ 26

ตารางที่ 4.3 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ 26

ตารางที่ 4.4 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ 28

ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. โดยสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ 29

ตารางที่ 4.6 แสดงระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกส่วนประกอบของสารสกัด 34

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการแยกสารสกัดด้วย TLC โดยสังเกตด้วยตาเปล่า ทดสอบด้วยรังสี UV และ developing solvent 34

ตารางที่ 4.8 แสดงการเก็บ fraction ในการแยกสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม 35

ตารางที่ 4.9 แสดงการรวมส่วนประกอบที่แยกได้ของสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก

หน้า

ภาคผนวกที่ 1 ตารางข้อมูลผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ 41

ตารางผนวกที่ ก - 1 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 1 วัน 42

ตารางผนวกที่ ก - 2 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 2 วัน 43

ตารางผนวกที่ ก - 3 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 3 วัน 44

ตารางผนวกที่ ก - 4 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 4 วัน 45

ตารางผนวกที่ ก - 5 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 5 วัน 46

ตารางผนวกที่ ก - 6 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 6 วัน 47

ตารางผนวกที่ ก - 7 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 7 วัน 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก (ต่อ)

หน้า

ตารางผนวกที่ ก - 8 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 1 วัน 49

ตารางผนวกที่ ก - 9 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 2 วัน 50

ตารางผนวกที่ ก - 10 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 3 วัน 51

ตารางผนวกที่ ก - 11 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 4 วัน 52

ตารางผนวกที่ ก - 12 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 5 วัน 53

ตารางผนวกที่ ก - 13 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 6 วัน 54

ตารางผนวกที่ ก - 14 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 7 วัน 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก (ต่อ)

ภาคผนวกที่ 2	อาหารเลี้ยงเชื้อรา	56
ภาคผนวกที่ 3	การคำนวณปริมาณของสารสกัดในจานเลี้ยงเชื้อ	61
ภาคผนวกที่ 4	ความรู้เกี่ยวกับลักษณะของพืชสมุนไพร	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อักษรย่อ

EtOAc	Ethyl acetate
C	Chloroform
H	Hexane
M	Methanol
TLC	Thin Layer Chromatography
PDA	Potato Dextrose Agar
nm	Nanometer
UV	Ultraviolet
ppm	part per million

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

1.1 ความสำคัญที่มาของโครงงานวิจัย

การควบคุมศัตรูพืชชนิดต่างๆ ทั้งด้านโรคพืช แมลงศัตรูพืช วัชพืชและศัตรูพืชอื่นๆ รวมไปถึงเชื้อราที่เกิดขึ้นในพืช เป็นสิ่งที่สำคัญและจำเป็นในการผลิตพืชผลทางการเกษตรทุกชนิด ซึ่งปัจจุบันเกษตรกรส่วนใหญ่ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศนิยมที่จะควบคุมศัตรูพืชหรือเชื้อรา ชนิดต่างๆ โดยการใช้สารเคมีสังเคราะห์ เนื่องจากเป็นวิธีการที่สามารถปฏิบัติได้สะดวก รวดเร็ว และให้ผลดี อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีในการป้องกันจำกัดศัตรูพืชติดต่อกันเป็นระยะเวลานานๆ นอกจากจะก่อให้เกิดอันตรายต่อเกษตรกรผู้ผลิตโดยตรงแล้ว สารพิษตกค้างทางการเกษตรเหล่านี้ยังมีผลทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรชนิดต่างๆ ซึ่งจะแพร่เข้าสู่ห่วงโซ่อาหารของมนุษย์และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้นจึงได้มีการตระหนักถึงพิษภัยและอันตรายที่จะเกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีในการควบคุมศัตรูพืชและเชื้อราที่เกิดขึ้นกับพืช โดยการเลือกใช้สารผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่สามารถสกัดได้จากพืชเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคพืช สารสกัดจากสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดการใช้สารเคมีให้น้อยลงและลดอันตรายที่จะเกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีเนื่องจากสารสกัดที่ได้จากธรรมชาตินั้นเป็นสารที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้สารเคมีสังเคราะห์

1.2 วัตถุประสงค์ของการดำเนินงานวิจัย

1.2.1. ศึกษาวิธีการแยกสารประกอบจากใบชุมเห็ดเทศ

1.2.2. ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดที่ได้จากใบของต้นชุมเห็ดเทศ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

โครงงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาส่วนประกอบทางเคมีในสมุนไพรธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา สมุนไพรที่ทำการศึกษา คือ ใบของต้นชุมเห็ดเทศ โดยข้อมูลที่ได้จะนำไปเป็นตัวบ่งบอกถึงสารเคมีที่อยู่ในสมุนไพร ซึ่งน่าจะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการป้องกันกำจัดโรคพืชในประเทศไทยต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1. ทราบถึงวิธีการเตรียมและการเก็บรักษาสมุนไพรธรรมชาติที่จะใช้ในการวิจัย

1.4.2. ทราบถึงวิธีการสกัดเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารสำคัญออกจากสมุนไพร

1.4.3.ทราบถึงวิธีการหาระบบของสารละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจสอบสารสำคัญที่มีอยู่ในสมุนไพรธรรมชาติ

1.4.4. ทราบถึงวิธีการแยกสารสำคัญและการเก็บรักษา

1.4.5. ได้สารสกัดจากธรรมชาติที่ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการพื้นฐาน

2.1 สารเคมีป้องกันและกำจัดเชื้อราหรือสารฆ่าราคืออะไร [1]

คำว่า Fungicide (ฟังจิไซด์) มาจากคำสองคำในภาษาลาตินมารวมกัน คือ คำว่า fungus (ฟังกัส = รา) และ Caedo (ซีโด = ฆ่า) ในทางอักษรศาสตร์แปลคำนี้ว่า สารหรืออะไรก็ตามที่สามารถฆ่า กำจัดเชื้อราได้ เพราะฉะนั้นคำว่า fungicide หรือสารฆ่ารา หมายถึง สารเคมีที่มีความสามารถฆ่าและกำจัดเชื้อราได้ มิได้จำกัดเฉพาะราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช แต่รวมถึงราที่ทำลายสี ราที่ทำลายเสื้อผ้า ใยสังเคราะห์ และราที่เป็นสาเหตุของโรคในคนด้วย

2.2 ประวัติการใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดโรคพืชในประเทศไทย [1]

เนื่องจากประเทศทางตะวันตกและสหรัฐอเมริกา เป็นประเทศที่มีการวิจัยและพัฒนาการใช้สารเคมีการเกษตรกันมานาน และมีประสิทธิภาพสูงมากในระดับที่ประเทศไทยเราไม่อาจจะสู้ได้ โดยเฉพาะต้องลงทุนสูงมากแต่ยังมีปัญหาอื่นๆ อีกมากที่ทำให้เราไม่จำเป็นต้องพัฒนาสารเคมีด้วยตัวเองเช่น ขาดนักวิจัย ขาดอุตสาหกรรมเคมีพื้นฐาน ขาดระบบพื้นฐาน ขาดระบบการตลาดที่มีประสิทธิภาพ ความต้องการใช้ในประเทศต่ำ เป็นต้น แต่ถ้าในอนาคตประเทศไทยมีการพัฒนาทรัพยากรและบุคคลากรที่มีคุณภาพดีขึ้นกว่านี้ วิถีทางแบบนี้อาจจะเปลี่ยนไป สารเคมีที่นำมาในสมัยก่อนนั้นมาควบคู่กับสารเคมีกำจัดแมลงและวัชพืช ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้

หลังสงครามโลกครั้งที่ 2

เป็นช่วงที่มีผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลงที่เหลือใช้จากสงครามตกค้างนานปีนำมาใช้กับแมลงศัตรูพืช และมีสารกำจัดโรคพืชเริ่มนำมาใช้กัน คือ สารประกอบของทองแดง เช่น บอร์โด - มิกซเจอร์ ทองแดงออกไซด์ ทองแดงออกซีคลอไรด์ และสารไดไธโอคาร์พาเมต เช่น ไซเน็บ และมาเน็บ ในระยะนั้นได้นำมาใช้กับโรคของยาสูบ ทางภาคเหนือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วงปี พ.ศ. 2500

เริ่มมีการบรรจุหีบห่อสารเคมีการเกษตรในประเทศ โดยสั่งซื้อมาเป็นปริมาณมากแล้วนำมาแบ่งบรรจุเป็นหีบห่อเล็กๆ อีกทีหนึ่ง และในช่วงหลังๆ มีการผสมสูตรสารเคมีให้เหมาะสมออกจำหน่ายด้วย เช่น การบรรจุหีบห่อของทองแดงออกซีคลอไรด์ใหม่ โดยเจือจางชนิดเข้มข้น 60 % ไปเป็น 45% และ 40% ตามลำดับเป็นต้น ในระยะนี้การควบคุมคุณภาพยังไม่มี และมีการแข่งขันกันมาก ดังนั้นบริษัทต่างๆ จึงเริ่มทำให้สินค้าแตกต่างกันโดยการเติมสี และในบางครั้งถึงกับเจือจางสารพิษจนไม่มีฤทธิ์ต่อการกำจัด แต่ยังคงขายได้เพราะเกษตรกรไม่รู้ปัญหาของโรคและแมลงมีมากจนเกษตรกรรอไม่ได้ อย่างไรก็ตามเกษตรกรได้รับความเสียหายมากทั้งผลผลิตและถูกพ่อค้าหลอก

ระยะปี พ.ศ. 2510

เป็นช่วงที่มีสารเคมีนานาชนิดและเกษตรกรตื่นตัว ดังนั้นการแข่งขันระหว่างบริษัทมีมากจึงมีการควบคุมคุณภาพการผลิต เช่น มีการใช้หลักสุขอนามัยระหว่างการผลิต มีการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องมือทันสมัยและโรงงานผสมสารเคมีก็สร้างได้ถูกสุขลักษณะมากขึ้น พร้อมทั้งผลิตในรูปสารผงฝุ่น สารผงผสมน้ำ หรือชนิดของเหลว เป็นต้น ในช่วงนี้มีสารดูดซึมเข้ามาชนิดแรก ได้แก่ สารเบโนมิล และใช้กันอย่างกว้างขวาง

ระยะปี พ.ศ. 2520 ถึงปัจจุบัน

การพัฒนาด้านการผสมสูตรได้เข้ามาถึงระยะที่อิ่มตัว แต่การบรรจุหีบห่อใหม่ และมีการโกงเนื้อสารบริสุทธิ์ในส่วนผสมของยายังคงมีอยู่ทั่วไปซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อทั้งเกษตรกรและผู้จำหน่าย การผลิตสารเคมีการเกษตรอาจจะเริ่มต้นในประเทศของเราเองแต่ทั้งนี้ควรจะเป็นสารเคมีที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางในปริมาณมาก เป็นที่ยอมรับและมีข้อมูลต่างๆ ทางชีววิทยาทุกด้านพร้อมมูลเท่านั้น เพราะการจะไปผลิตสารใหม่นั้นเป็นไปไม่ได้ โดยเฉพาะในแง่ชีววิทยาและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นอนาคตสารเคมีป้องกันและกำจัดโรคพืชเรายังต้องพึ่งพาจากต่างประเทศต่อไป แต่เราอาจจะพัฒนาวิธีการบรรจุ วิธีการผสมสูตรใหม่ๆ มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นกว่าที่เป็นอยู่ได้

ตามทัศนะของวงการวิทยาศาสตร์สมัยใหม่เชื่อว่า ในพืชสมุนไพรซึ่งเป็นสิ่งที่เป็นยารักษาโรคมานานประกอบด้วยสารประกอบทางเคมีหลายชนิด แต่ละส่วนของพืชสมุนไพรมีสารประกอบที่แตกต่างกันออกไป สารเหล่านี้เป็นตัวกำหนดสรรพคุณของพืชสมุนไพร ชนิดและปริมาณของสารจะแปรตามชนิดของพันธุ์สมุนไพร สภาพแวดล้อมที่ปลูกและช่วงเวลาที่เก็บพืชสมุนไพร นักวิทยาศาสตร์ได้นำความรู้ และวิธีการทางเคมีมาค้นคว้าวิจัย สารเคมีที่มีฤทธิ์ในพืชสมุนไพรทำให้ทราบรายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้าง ลักษณะ วิธีการสกัด การจำแนกและการตรวจสอบสารเหล่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 สารประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร [2]

สารประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร จำแนกได้เป็น 2 พวก ใหญ่ๆ คือ

1. Primary Metabolite เป็นสารที่มีอยู่ในพืชชั้นสูงทั่วไป พบได้ในพืชทุกชนิด เป็นผลิตผลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน เม็ดสี (pigment) และเกลืออนินทรีย์ (inorganic salt)

2. Secondary Metabolite เป็นสารประกอบที่มีลักษณะค่อนข้างพิเศษ พบต่างกันในพืชแต่ละชนิด คาดหมายว่าเกิดจากขบวนการชีวะสังเคราะห์ (Biosynthesis) ที่มีเอนไซม์ (enzyme) เข้าร่วม สารประกอบประเภทนี้มี อัลคาลอยด์ (Alkaloid) แอนทราควิโนน (Anthraquinone) น้ำมันหอมระเหย (Essential oil) เป็นต้น

ส่วนใหญ่สารพวก Secondary metabolite จะมีสรรพคุณทางยา แต่ก็มิได้แน่นอนตายตัวเสมอไป จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารพวก primary metabolite บางตัวก็ออกฤทธิ์ในการรักษาโรคได้เช่นกัน และยังมีข้อสังเกตอีกว่าสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางยาในพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งอาจมิใช่มีเพียงตัวเดียว อาจมีหลายตัวก็ได้

สารประกอบในพืชสมุนไพร มีมากมายหลายชนิด ในที่นี้จะกล่าวถึงบางตัวที่สำคัญ โดยแบ่งเป็น 7 กลุ่ม ดังนี้

1. คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates)

คาร์โบไฮเดรตเป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน คาร์โบไฮเดรตเป็นกลุ่มสารที่พบมากทั้งในพืชและสัตว์ สารที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เช่น แป้ง น้ำตาล กัม (Gum) วุ้น (Agar) น้ำผึ้ง เปคติน (Pectin) เป็นต้น

2. ไขมัน (Lipids)

ไขมันเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic Solvent) และเมื่อทำปฏิกิริยากับด่างจะกลายเป็นสบู่ น้ำมันในพืชหลายชนิดเป็นยาสมุนไพร เช่น น้ำมันละหุ่ง น้ำมันมะพร้าว

3. น้ำมันหอมระเหย (Volatile Oil หรือ Essential Oil)

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารที่พบมากในพืชเขตร้อน มีลักษณะเป็นน้ำมัน มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายในอุณหภูมิธรรมดา เบากว่าน้ำ สามารถสกัดออกมาจากส่วนของพืชได้โดยวิธีการกลั่นตัวด้วยไอน้ำ (Stream distillation) หรือการบีบ (expression) ประโยชน์คือเป็นตัวแต่งกลิ่นในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและสมุนไพรมีประโยชน์ด้านขับลม ฆ่าเชื้อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชสมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหย คือ กระเทียม ขิง ขมิ้น ไพล มะกรูด ตะไคร้ กานพลู อบเชย เป็นต้น

4. **เรซินและบาลซัม** (Resins and Balsums)

เรซินเป็นสารอินทรีย์หรือสารผสมประเภทโพลีเมอร์ มีรูปร่างไม่แน่นอน ส่วนใหญ่จะเปราะ แตกง่าย บางชนิดจะนิ่มไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อเผาไฟจะหลอมเหลวได้สารที่ใสข้น และเหนียว เช่น ชันสน เป็นต้น

บาลซัม เป็นสาร Resinous mixture ซึ่งประกอบด้วยกรดซินนามิก (Cinnamic Acid) หรือกรดเบนโซอิก (Benzoic Acid) หรือเอสเตอร์ของกรดสองชนิดนี้ เช่น กำยาน เป็นต้น

5. **แอลคาลอยด์** (Alkaloids)

แอลคาลอยด์เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ (Organic Nitrogen Compound) มักพบในพืชชั้นสูงมีสูตรโครงสร้างซับซ้อนและแตกต่างกันมากมาย ปัจจุบันพบแอลคาลอยด์มากกว่า 5,000 ชนิด คุณสมบัติของแอลคาลอยด์ คือ ส่วนใหญ่มีรสขม ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ (Organic Solvent) มีฤทธิ์เป็นด่าง แอลคาลอยด์มีประโยชน์ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะและลำไส้ ยาลดความดัน ยาควบคุมการเต้นของหัวใจ เป็นต้น พืชสมุนไพรที่มีแอลคาลอยด์เป็นส่วนมาก คือ หมาก ลำโพง ชิงโคนา ดองดึง ระย่อม ยาสูบ กลอย ฝิ่น แสลงใจ เป็นต้น

6. **กลัยโคไซด์** (Glycosides)

กลัยโคไซด์เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เกิดจาก aglycone (หรือ genin) จับกับส่วนที่เป็นน้ำตาล (glycone part) ละลายน้ำได้ดี โครงสร้างของ aglycone มีความแตกต่างกันหลายแบบทำให้ประเภทและสรรพคุณทางเภสัชวิทยาของกลัยโคไซด์มีหลายชนิด ใช้เป็นยาที่มีประโยชน์และสารพิษที่มีโทษต่อร่างกาย

กลัยโคไซด์จำแนกตามสูตรโครงสร้างของ aglycone ได้หลายประเภทคือ

- คาร์ดิแอ็ก กลัยโคไซด์ (Cardiac Glycosides) มีฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อหัวใจ และระบบการไหลเวียนของโลหิต เช่น ใบยี่โถ เป็นต้น
- แอนทราควิโนน กลัยโคไซด์ (Anthraquinone Glycosides) มีฤทธิ์เป็นยาระบาย ยาฆ่าเชื้อและสีย้อม เช่น ใบมะขามแขก ใบขี้เหล็ก ใบซุมเห็ดเทศ ใบว่านหางจระเข้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ซาโปนิน กลัยโคไซด์ (Saponin Glycosides) เป็นกลุ่มสารที่มีคุณสมบัติเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ เช่น ลูกประคำดีควาย เป็นต้น
- ไอโซไทโอไซยาเนต กลัยโคไซด์ (Isothiocyanate Glycosides) มีส่วนของ aglycone เป็นสารจำพวก Isothiocyanate
- แอลกอฮอลิก กลัยโคไซด์ (Alcoholic Glycosides) มี alycone เป็นแอลกอฮอล์

7. **แทนนิน** (Tannins)

เป็นสารที่พบได้ในพืชหลายชนิด มีโมเลกุลใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน มีสถานะเป็นกรดอ่อน รสฝาด แทนนินใช้เป็นยาฝาดสมาน ยาแก้ท้องเสีย ช่วยรักษาแผลไฟไหม้ และใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง กรณีที่รับประทานแทนนินเป็นประจำอาจทำให้เกิดมะเร็งได้ สมุนไพรที่มีแทนนิน คือ เปลือกทับทิม เปลือกอบเชย ใบฝรั่ง เป็นต้น

นอกจากสารดังกล่าว ในพืชสมุนไพรยังมีสารประกอบอีกหลายชนิด เช่น ไขมัน สเตียรอยด์ (Steroid) เป็นต้น สารเหล่านี้บางชนิดมีสรรพคุณทางยาเช่นกัน

ในการทดลองนี้ได้นำสมุนไพรชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ [3] มาควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ในมะม่วง โดยโรคนี้นอกจากจะทำความเสียหายให้แก่มะม่วงแล้วยังสามารถทำความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจอื่นๆ ได้อย่างกว้างขวางนับตั้งแต่พืชไร่ พืชสวน ไม้ดอก ไม้ประดับ และไม้ผลชนิดอื่นๆ และสามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะของการเจริญเติบโตของพืชไม่ว่าจะเป็น เมล็ด ใบ ดอก ผล ลำต้น และราก นอกจากนั้นยังเป็นโรคที่สำคัญหลังการเก็บเกี่ยวของพืชแทบทุกชนิดอีกด้วย โดยโรคนี้พบว่าเชื้อสาเหตุเริ่มแรกมักจะติดมากับเมล็ดจากต้นที่เป็นโรค หรือเชื้อดำรงชีพอยู่บนเศษซากพืชที่ตกค้างอยู่บนดิน และจะระบาดได้ดีในสภาพอากาศร้อนชื้นและมีฝนตกชุก หรือหมอกลงจัด โดยมักจะปลิวไปกับลม ฝน หรือติดไปกับแมลงตลอดจนเครื่องมือการเกษตรต่างๆ

สำหรับอาการของโรคแอนแทรคโนสที่เข้าทำลายมะม่วงนั้นจะพบว่า อาการที่เกิดบนใบระยะแรกๆ จะเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กบนใบอ่อน เนื้อเยื่อตรงกลางจุดจะเปราะแตกเป็นรูในใบที่เริ่มแก่ จุดเล็กๆ เกิดกระจัดกระจายบนใบทำให้ใบอ่อนที่กำลังเจริญแสดงอาการบิดเบี้ยว (รูปที่ 2.1) กรณีที่เป็นมากๆ รอยแผลลุกลามอย่างรวดเร็วทำให้เกิดรอยไหม้ขนาดใหญ่ทั่วทั้งใบ ใบจะแห้งตายและร่วงหล่น สำหรับมะม่วงที่กำลังออกดอก เชื้อโรคจะเริ่มเข้าทำลายตั้งแต่เริ่มแทงช่อดอก (รูปที่ 2.2) ดอกที่ถูกเชื้อทำลายจะร่วงหล่นหรือฝ่อไป ถ้าเป็นมากๆ ดอกอาจหลุดร่วงหมดทั้งช่อดอก ส่วนอาการบนผลมะม่วงเชื้อโรคจะติดไปกับผลในสภาพพักตัวจะเริ่มเจริญอย่างรวดเร็วเมื่อผลเริ่มสุกทำให้เกิดเป็นจุดดำ กระจัดกระจายบนผล (รูปที่ 2.3) จุดดังกล่าวขยายตัว

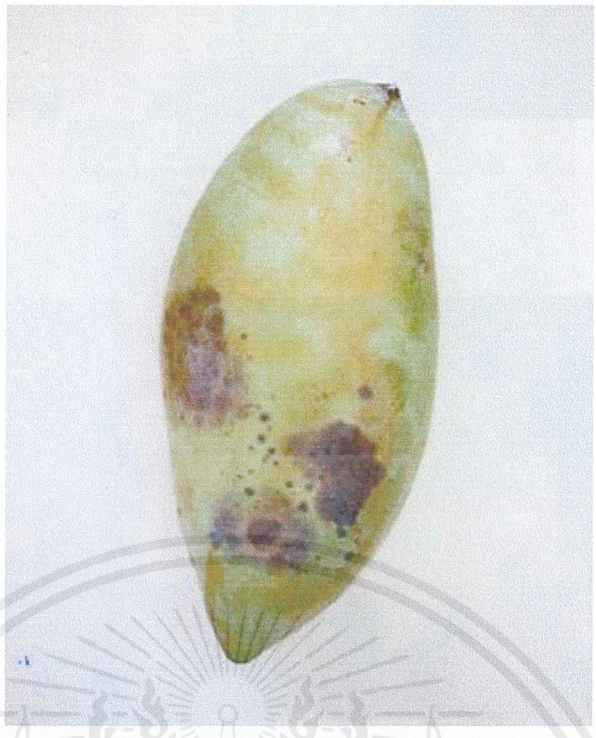
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกกว้าง และกลางจุดเกิดเป็นรอยบุ๋มตื้นๆ และผิวแตกออก รอยแผลอาจเชื่อมกันเกิดเป็นรอยแผลโตขึ้นในที่สุดแผลจะเน่าและยุบลง [4]

รูปที่ 2.1 แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสบนใบมะม่วง [4]

รูปที่ 2.2 แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสบนช่อดอก [4]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

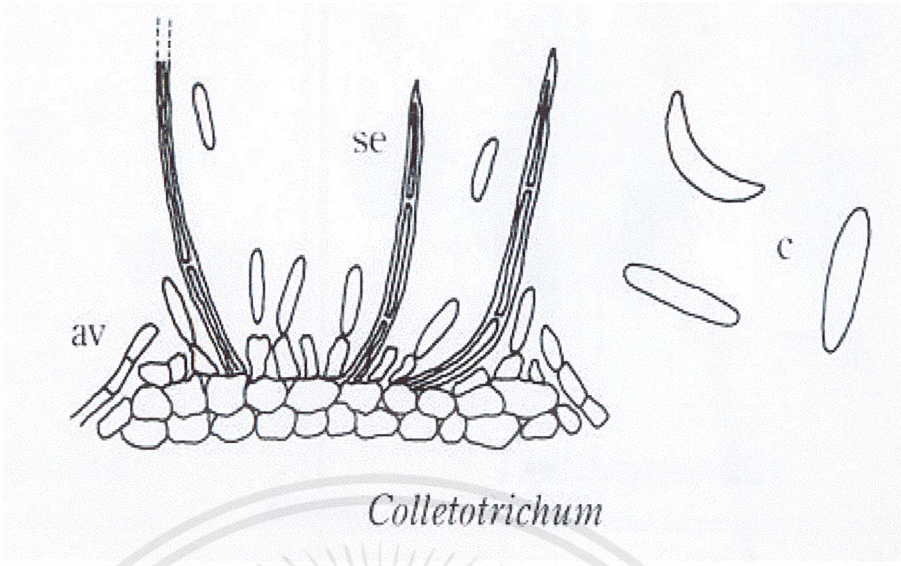


รูปที่ 2.3 แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง [4]

จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส [5] พบเชื้อสาเหตุคือ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. จัดอยู่ใน Division Eumycota, Sub-division Deuteromycotina, Class Coelomycetes , Order Melanconiales, Family Melanconiaceae, Genus *Colletotrichum*, Species *gloeosporioides*

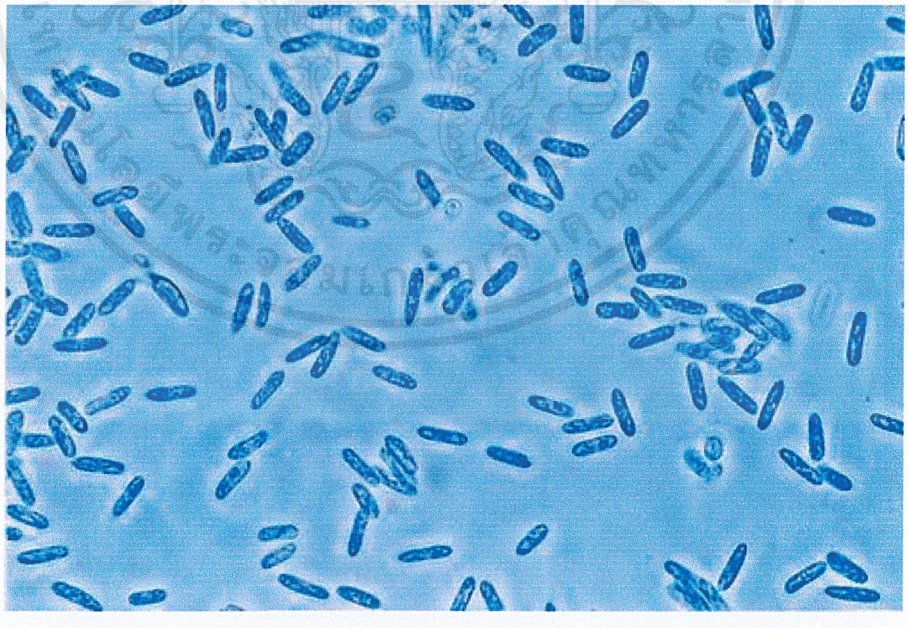
เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้อยู่ใน Class Coelomycetes เป็นราที่ไม่มี Sexual stage การขยายพันธุ์มีวิธีเดียว คือการสร้าง conidia (รูปที่ 2.4 และ 2.5) โดย conidia เกิดบนก้านที่เรียกว่า conidiophore เชื้อราจึงสามารถสร้าง conidia ได้อย่างรวดเร็วและมีจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าสภาพแวดล้อมต่างๆ เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสง อาหารและความเป็นกรดด่างของอาหาร เป็นต้น conidiophore อยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า acervulus (รูปที่ 2.4) มีลักษณะคล้ายรูปจาน เกิดที่ผิวของพืชอาศัยบริเวณใต้ชั้น epidermis เมื่อส่วนนี้เจริญเต็มที่จะดันให้เซลล์พืชแตกออกและนอกจากนี้ยังมีโครงสร้างอีกชนิดหนึ่งที่มีลักษณะคล้ายหนามขนาดเล็ก เรียกว่า setae ขึ้นแซมอยู่ในระหว่าง conidiophore (รูปที่ 2.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



AV (ACERVULUS) C (CONIDIA) SE (SETAE)

รูปที่ 2.4 โครงสร้างเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. [6]



รูปที่ 2.5 ลักษณะรูปร่างของ conidia ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. [6]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในโครงงานวิจัยได้นำใบของต้นชุมเห็ดเทศมาศึกษา มีข้อมูล [7] ดังต่อไปนี้

ชุมเห็ดเทศ

ชื่ออื่น : หมากกะลิงเทศ, ลับมืนหลาว,ขี้คาก (ภาคเหนือ), ชุมเห็ดใหญ่, ชุมเห็ดเทศ (ไทยภาคกลาง), ส้มเห็ด (เชียงราย), ตะสีพอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), จุมเห็ด (มหาสารคาม)

ชื่อสามัญ : Ringworm Bush, Candelabra Bush, Seven Golden Candle-stick

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Cassia alata Linn.*

วงศ์ : CAESAL PININACEAE

ลักษณะทั่วไป

ไม้พุ่มขนาดสูงประมาณ 3 เมตร ใบเป็นใบประกอบมีใบย่อย 5 - 12 คู่ ใบรูปไข่ปลายมน ดอกออกเป็นช่อตามปลายกิ่ง กลีบดอกสีเหลือง แต่ละดอกมีกลีบดอก 5 กลีบ ผลเป็นฝัก เมื่อแก่มีสีดำและแตกตามแนวยาว แต่ละฝักมีเมล็ด 50 ถึง 60 เมล็ด

แหล่งที่พบ

ถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาเขตร้อน พบขึ้นอยู่ตาม ที่ชุ่มชื้นบริเวณรกร้าง และมีผู้นำมาปลูกเป็นไม้ประดับ

สรรพคุณ

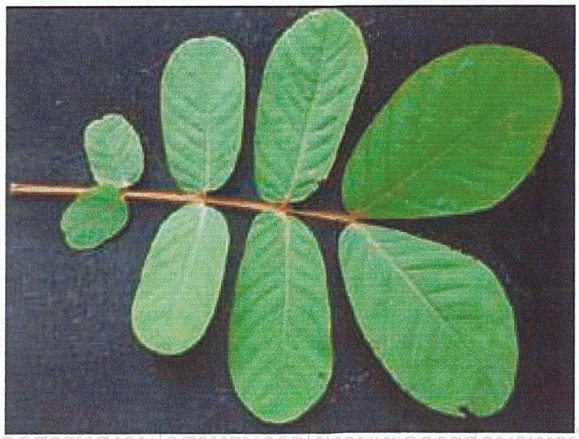
ใบ ใช้ภายนอกแก้กลาก ผิวหนังอักเสบ ผื่นคัน มีน้ำเหลือง แผลบวม ฝี ต้มน้ำกินเป็นยาระบาย อมบ้วนปาก แก้กระเพาะอาหารอักเสบ

ดอก ใช้เป็นยาระบาย

เปลือก ใช้ขับน้ำเหลืองเสีย

เมล็ด ใช้ขับพยาธิ

ต้นอ่อน ต้มกินเป็นยาขับพยาธิไส้เดือน



รูปที่ 2.6 ใบของต้นชุมเห็ดเทศ [7]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.7 ต้นชุมเห็ดเทศ [7]

2.4 การสกัดสารสำคัญจากพืช [8]

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัด วิธีเหล่านี้ได้แก่

1. Maceration เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีแช่สมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือ โถ เป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (marc) ให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่นำไปกรอง การสกัดถ้าจะสกัดให้หมดจด (exhausted) อาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลายๆ ครั้ง วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Percolation เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือเรียกว่า Percolator นำสมุนไพรมาแช่กับตัวทำละลายพอชื้นทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่ แล้วค่อยๆ บรรจุผงยาทีละน้อยเป็นชั้นลงใน Percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (solvent head) ประมาณ 0.5 ซม. ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออก โดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์ บีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันนำไปกรอง

เพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารในขั้นอุตสาหกรรมใช้ Countercurrent – operated percolator battery และมีการดัดแปลงวิธีการสกัดให้มีการเคลื่อนที่ของสารที่จะสกัด และตัวทำละลายเข้าหากัน เรียกว่า Counter current extraction

3. การสกัดด้วย Soxhlet Extractor เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในขวดก้นกลมระเหยขึ้นไปและกลั่นตัวลงมาใน thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในขวดก้นกลม และขวดก้นกลมนี้ได้รับความร้อนจาก heating mantle หรือ หม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไป ทิ้งสารสกัดไว้ในขวดก้นกลม ตัวทำละลายเมื่อกระทบ condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาใน thimble อีกครั้ง กระบวนการสกัดจะเกิดขึ้นซ้ำๆ เช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วยจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว

4. Liquid-liquid Extraction เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลาย แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

4.1. Extractant lighter คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

4.2. Raffinate lighter คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

5. การสกัดสารน้ำมันหอมระเหย (Extraction of volatile oil)

5.1 Resorption เป็นวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีดูดซับ โดยมากใช้สกัดกลีบดอก ซึ่งอาจทำได้โดย

- เรียงกลีบดอกลงไปบนแผ่นแก้ว เมื่อน้ำมันหอมระเหยถูกดูดซับแล้วให้รีบเปลี่ยนกลีบดอก แล้วจึงนำขี้ผึ้งไปสกัดน้ำมันหอมระเหยอีกครั้งหนึ่ง

- นำกลีบดอกไปต้มกับไขมันที่อุณหภูมิต่ำๆ แล้วกรองเอากลีบดอกออก นำไขมันไปสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ผ่านอากาศซึ่งอุ่นเข้าไปพร้อมกับละอองของไขมันเหนือกลีบดอกเพื่อดูดซับน้ำมันหอมระเหยไว้

5.2 Solvent Extraction เป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหย โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น สกัดน้ำมันกานพลูโดยใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์

5.3 Mechanical Expression เป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหย โดยวิธีบีบ เช่น นำเปลือกผลส้มไปบีบจะได้ water-in-oil emulsion ซึ่งแยกน้ำมันหอมระเหยออก โดยวิธี centrifugation

5.4 Stream distillation เป็นการกลั่นโดยใช้ไอน้ำ โดยผ่านไอน้ำไปบนสมุนไพร ซึ่งบรรจุไว้ใน flask พร้อมกับน้ำ โดยที่ไอน้ำจะพาเอาน้ำมันหอมระเหยไปยัง condenser แล้วกลั่นตัวเป็นของเหลว เมื่อทิ้งไว้น้ำมันจะแยกตัวออกจากน้ำ

5.5 Water distillation เป็นการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรโดยต้มกับน้ำ เมื่อน้ำและน้ำมันหอมระเหย ระเหยขึ้นไปถึง condenser จะกลั่นตัวแล้วจึงนำของเหลวที่ได้ไปแยกน้ำมันหอมระเหยจากชั้นน้ำ เครื่องมือที่ใช้คือ Clevineaur's apparatus ซึ่งมีชนิดสำหรับน้ำมันหอมระเหยซึ่งหนักกว่าน้ำและสำหรับน้ำมันหอมระเหยที่เบากว่าน้ำ

6. Extraction by Thermomicrodistillation เป็นการสกัดสารโดยใช้เครื่องมือ Thermomicro Analysis and Separation Ovens (TAS oven) เป็นการสกัดสารขนาดน้อยมาก นำสารใส่ลงใน cartridge ซึ่งข้างหนึ่ง seal อีกข้างหนึ่งเป็น capillaries เมื่อใส่เข้าใน oven ความร้อนจะทำให้สารระเหย หรือระเหิดออกมาทาง capillaries รองรับสารที่ระเหยหรือระเหิดออกมาด้วยแผ่น TLC แล้วนำไปตรวจสอบอีกทีหนึ่ง

การเลือกใช้ตัวทำละลาย [8]

ในการสกัดจะได้ผลหรือไม่ขึ้นอยู่กับการคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติ

1. เป็นตัวทำละลายสารที่เราต้องการสกัดได้ดีพอ
2. ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป
3. ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด
4. ไม่เป็นพิษ
5. ราคาพอสมควร

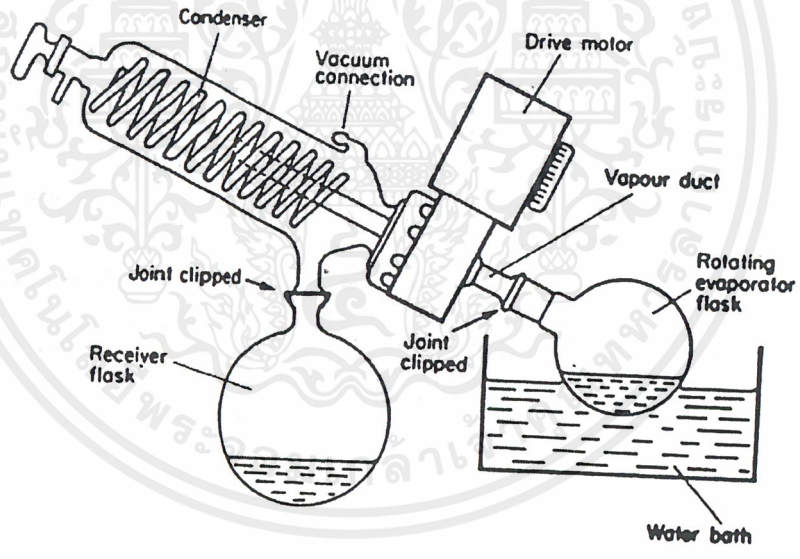
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำสารสกัดให้เข้มข้น [8]

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักจะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนซึ่งอาจทำได้หลายวิธี คือ

1. Free Evaporation คือ การทำให้ระเหยแห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water- bath) หรือ Hot plate บางครั้งอาจจะเป่าอากาศร้อนลงไปในสารสกัดด้วย เพื่อให้ระเหยได้เร็วขึ้น

2. Distillation *in vacuo* เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยการกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ vacuum pump เครื่องมือนี้เรียกว่า เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ distillation flask, condenser และ receiving flask ดังรูปที่ 2.8 โดยส่วน distillation flask จะหมุนอยู่ตลอดเวลาที่ทำงาน และ แช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำเพื่อให้การกระจายของความร้อนทั่วถึงและสม่ำเสมอ เครื่องมือที่ดีจะต้องมีระบบการทำสุญญากาศที่ดี ระยะระหว่าง distillation flask และ condenser ที่ดี



รูปที่ 2.8 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) [9]

3. การแช่แข็ง (Freezing) ถ้าเป็นสารสกัดด้วยน้ำใช้ freeze dryer แต่ถ้าเป็นตัวทำละลายอื่นเฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่แข็ง ซึ่งเราแยกจาก concentrated extract โดย centrifuge

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Ultrafiltration เป็นการสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้ membrane ซึ่งใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเมกุลสูงกว่า 5,000 กรัมต่อโมล

2.5 การแยกส่วนผสม (Separation) [8]

Thin-layer Chromatography (TLC)

เป็นการแยกสารโดยใช้ stationary phase ซึ่งเป็นแผ่นเคลือบบน support ซึ่งอาจเป็นแก้ว aluminium หรือ polyethylene เมื่อหยดสารผสมลงบน stationary phase แล้วจึงนำแผ่น TLC ที่ได้ไปใส่ tank ซึ่งบรรจุ mobile phase ที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดกระบวนการที่ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ผ่านไปบน stationary phase ซึ่งเรียกว่า development ขณะที่เกิด development สารก็แยกออกจากกัน กลวิธีในการแยกจะมีทั้ง adsorption และ partition แต่จะมีกลวิธีใดมากกว่า ขึ้นอยู่กับว่าแผ่น TLC ที่เตรียมขึ้นนั้นถูกนำไป activate หรือไม่ การ activate แผ่น TLC ทำได้โดยอบแผ่น TLC ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง จะทำให้น้ำระเหยออกไปจาก particle ของ adsorbent กลวิธีจึงเป็น adsorption มากกว่า partition แต่ถ้าไม่ได้นำ plate ไป activate น้ำที่จับอยู่ที่ particle จะทำหน้าที่เป็น liquid stationary phase จะมี partition mechanism เกิดมากกว่าเดิม น้ำที่เคลือบอยู่นี้มาจากความชื้นในอากาศ

Thin-layer Chromatography (TLC) มีข้อดีกว่า Paper chromatography (PC) หลายอย่าง คือ

1. ใช้เวลาในการ develop น้อยกว่า
2. ไม่มี fiber ทำให้ band diffusion หรือ zone broading น้อยลง ทำให้การแยกสาร (separation) ดีขึ้น
3. ใช้กับน้ำยาที่มีฤทธิ์กัดรุนแรงได้
4. ใช้ตัวอย่างน้อยกว่าจึงมีความไวในการตรวจสอบมากกว่า PC

การประยุกต์ TLC ในการศึกษาสารเคมีจากสมุนไพร

1. ใช้วิเคราะห์หาสารเบื้องต้นว่ามีกี่ชนิด และบางครั้งอาจบอกได้ว่าเป็นสารประเภทใด
2. ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับ Column chromatography
3. ใช้ตรวจสอบ fraction ที่ได้มาจาก Column chromatography เพื่อรวม fraction ที่เหมือนกัน
4. แยกสารบางชนิดที่มีปริมาณน้อย
5. ใช้แยกสารปริมาณซึ่งแยกโดยวิธี Column chromatography ไม่ได้ผล
6. ใช้หาปริมาณสารในการผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.6 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Literature survey)

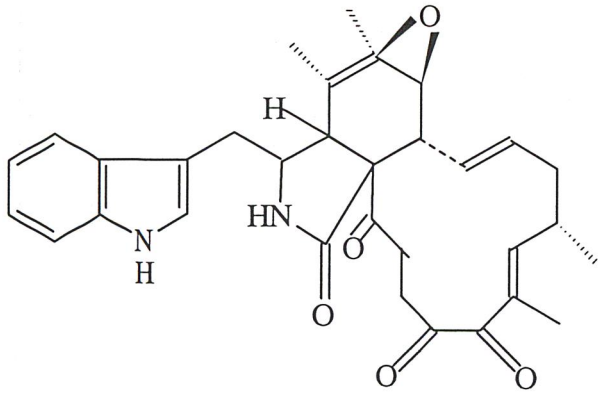
โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ของมะม่วง ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นโรคที่ทำความเสียหายต่อทั้งปริมาณและคุณภาพของมะม่วงเป็นอย่างมากนอกจากนี้ยังสามารถทำให้เกิดโรคกับไม้ผลอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น ฝรั่ง ชมพู่ องุ่น พุทรา เป็นต้น จึงทำให้เกิดมีระบาดของโรคนี้เป็นไปอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝน ซึ่งมีความชื้นสูงและมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 24 - 32 องศาเซลเซียส โดยมีรายงานศึกษาเกี่ยวกับความต้องการทางสรีรวิทยา (physiology) ของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพืชหลายชนิด [10] เช่น

ในปี ค.ศ. 1990 Gupta และ Pathak ได้ทำการทดสอบเกี่ยวกับความรุนแรงของโรคเน่าหรือแอนแทรคโนสเนื่องจากการปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ลงบนผลมะละกอโดยวิธี cork – wounding method พบว่าหลังจากปลูกเชื้อลงบนผลมะละกอที่สุกหรือเกือบสุกจะพบความรุนแรงของโรคดังกล่าวมากกว่าการปลูกเชื้อลงบนผลมะละกอดิบ และการบ่มผลมะละกอที่ผ่านการปลูกเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ยังไม่พบอาการของโรค และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในการทดลองนี้อยู่ในระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นยังพบว่าความรุนแรงของโรคดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศด้วย โดยความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ พบความรุนแรงของโรคมากที่สุด [10]

ในปี ค.ศ. 1996 วีระณีย์ ศรีพรมสุข ได้ทำการทดลองใช้สารสกัดจากจุลินทรีย์ *Chaetomium globasum, Chaetomium Cupreum* และ *Trichoderma harzianum* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporiodes* พบว่า สารปฏิชีวนะ Chaetoglobosin C ที่ผลิตจาก *Chaetomium globasum* ที่ความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ดีที่สุดถึง 90.55 และ100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาได้แก่สารปฏิชีวนะ Chaetocuprin ที่ผลิตจาก *Chaetomium Cupreum* ที่ความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ดีที่สุด 89.09 และ 96.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ [10]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43918



รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างของ CHAETOGLOBOSIN C [10]

สำหรับรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดสารจากใบชุมเห็ดเทศในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ มีดังต่อไปนี้

ในปี ค.ศ. 1988 ผู้ที่ทำการค้นคว้าคือ M. Devasagayam และคณะนักวิทยาศาสตร์ชาวอินเดียได้ใช้สารสกัดจากส่วนใบของ *Cassia alata* มาศึกษาพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลอง (หนู) ลดลง [12]

ในปี ค.ศ. 1990 ผู้ที่ทำการค้นคว้าคือ S. Palannichamy and S. Nagarajan ชาวอินเดียได้ใช้สารสกัดจากส่วนใบของ *Cassia alata* มาศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* , *Trichophyton rubrum* และ *Microsporam gypseum* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคผิวหนัง [13]

ในปี ค.ศ. 1994 ผู้ที่ทำการค้นคว้าคือ S. Damodaran และ S. Venkataraman ชาวอินเดียได้ใช้สารสกัดจากส่วนใบของ *Cassia alata* มาศึกษาทางอายุรแพทย์ในการรักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อ *Pityriasis versicolor* ได้ [14]

ในปี ค.ศ. 1995 ผู้ที่ทำการค้นคว้าคือ Darah Ibrahim และ Halim Osman นักเคมีชาวมาเลเซีย ได้ใช้สารสกัดจากส่วนใบของ *Cassia alata* มาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อรา พบว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเพียงอย่างเดียว ได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes var.interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes var.mentagrophytes*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Trichoophyton rubrum, Microsporum canis, Microsporum gypseum, Fusarium solani, Aspergillus niger, Clasosporium werneckii, Penicillium sp. [3]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. แอบโซลูท เอทานอล (Absolute Ethanol)
2. แอนนิซาลดีไฮด์ (Anisaldehyde)
3. 2–บิวทานอล (2–butanol) เกรดการค้า
4. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. Sulfuric Acid)
5. แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium Sulfate)
6. เอทธิล อะซิเตต (Ethyl Acetate) เกรดการค้า
7. เฮกเซน (Hexane) เกรดการค้า
8. เมทานอล (Methanol) เกรดการค้า
9. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) เกรดการค้า
10. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เกรดการค้า
11. ซิลิกาเจล เบอร์ 7729 ของ MERCK (Silica Gel 7729)
12. ซิลิกาเจล เบอร์ 7734 ของ MERCK (Silica Gel 7734)
13. น้ำกลั่น (Distilled water)
14. มันฝรั่ง (Potato)
15. กลูโคส (Glucose)
16. วุ้น (Agar) ผลิตโดยห้างหุ้นส่วนจำกัด พัฒนาสินเอ็นเตอร์ไพรส์
17. Acetone เกรดวิเคราะห์
18. 95 % เอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. TLC Tank
2. TLC Plate (Silica Gel on Aluminium)
3. คอลัมน์
4. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)
5. Aspirator
6. แผ่นให้ความร้อน (Hot Plate)
7. ชุดปั้ม
8. ขวดรูปชมพู่
9. ขวดก้นกลม
10. หลอดทดลอง
11. กระบอกตวง
12. ปิเปต
13. บีกเกอร์
14. Vial
15. หลอดทดลอง
16. แท่งแก้วคนสาร
17. ช้อนตักสาร
18. กระดาษกรอง
19. กรวยกรอง
20. Aluminium Foil
21. แผ่นกระจก
22. Stand and Clamp
23. จานเพาะเชื้อ
24. เข็มเขี่ยเชื้อ
25. แท่งแก้วงอ
26. ปากคีบ (Forcep)
27. ตะเกียงแอลกอฮอลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ขั้นตอนการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างของพืชที่สนใจวิจัยในที่นี้คือ ใบชุมเห็ดเทศนำมาตากแดดให้แห้งและบดให้ละเอียด

2. นำตัวอย่างในข้อ 1 มาสกัดโดยวิธีการแช่ลงในตัวทำละลายที่เหมาะสม ได้แก่ hexane, chloroform และ methanol เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3. กรองแยกส่วนที่เป็นกากและชั้นตัวทำละลาย จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายมาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ จะเรียกส่วนนี้ว่า สารสกัดหยาบ (crude extract)

4. แบ่งสารสกัดหยาบ (crude extract) มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา (antifungal activity)

5. การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นตัวทำละลายต่างๆ ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

6. การแยกสารโดยใช้เทคนิค column chromatography

3.3 วิธีการทดลอง แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

3.3.1. การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) ในแต่ละชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ

1.1 นำใบของต้นชุมเห็ดเทศแห้งมาบดละเอียดหนัก 1200 กรัม แช่ในชั้น hexane เป็นเวลา 1 สัปดาห์ คนอย่างสม่ำเสมอทุกวัน

1.2 ค่อยๆ รินกรองเอาสารสกัดออก บีบสารละลายออกจากกากให้มากที่สุด

1.3 ระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ

1.4 ชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบ (crude extract) ชั้น hexane โดยให้รหัสเป็น Ca (L)/ Crude/ Hexane ตามชนิดของตัวทำละลาย

1.5 นำกากที่ได้จากการกรองในข้อ 1.2 มาผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมาแช่ใน chloroform และทำเหมือนในข้อ 1.1 - 1.4 จากนั้นนำกากที่ได้มาแช่ต่อใน methanol จากนั้นก็ปฏิบัติเหมือนเดิม กากที่แช่ใน chloroform ใช้รหัสแทนว่า Ca (L)/ Crude/ Chloroform และกากที่แช่ใน methanol ใช้รหัสแทนว่า Ca (L)/ Crude/ Methanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2. **การทดสอบประสิทธิภาพการใช้สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง**

ทำการทดลองแบบ 2 Factorial experiment in Completely Randomized Design จำนวน 5 ซ้ำ โดยมี 2 Factors คือ Factor A และ Factor B

Factor A แทนชนิดของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศในตัวทำละลายชั้นต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง 3 ตัวทำละลาย คือ hexane, chloroform และ methanol มี 3 ระดับ

Factor B แทนระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 100, 500, 1000, 5000 ppm มี 5 ระดับ

วิธีการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด

1. ชั่งสารสกัดหยาบ (crude extract) แต่ละชั้นตัวทำละลาย มา 1 กรัมใส่ในขวด vial จากนั้นนำไป flow ไนโตรเจนเพื่อไล่สารละลายที่หลงเหลือจากการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ นำมาละลายในอะซีโตน (acetone) 10 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเข้มข้น 10,000 ppm จากนั้นจึงเจือจางความเข้มข้นของสารละลายเคมีดังกล่าวลงมาเรื่อยๆ จาก 10,000 เป็น 5,000, 1,000, 500 และ100 ppm ตามลำดับ ด้วยการผสมกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2. เตรียมอาหาร PDA (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) จากนั้นทำการตวงใส่ขวดขนาดเล็กขวดละ 18 มิลลิลิตร โดยใช้กระบอกตวง จากนั้นนำขวดไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

3. จากนั้นนำไปเทใส่ในจานเพาะเชื้อขนาด 9 เซนติเมตร ที่ทำการอบฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 18 มิลลิลิตร ซึ่งในจานเพาะเชื้อได้ใส่สารสกัดของแต่ละความเข้มข้นลงไป 2 มิลลิลิตร จากนั้นรอให้วุ้นแข็งตัว

4. ใช้ cork borer เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดส่วนรอบนอกของโคโลนีของเชื้อรา

5. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเผาไฟฆ่าเชื้อแล้วย้ายชิ้นส่วนของเชื้อราที่ตัดด้วย cork borer วางลงตรงกลางจานอาหารที่ใช้ทดสอบจานละ 1 ชิ้น ทำเช่นนี้ทุกชนิดของสารสกัดแล้วบ่มเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง

6. ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญโดยการวัดตามแนวเส้นที่ตัดกันเป็นรูปกากบาททุกวันแล้วหาค่าเฉลี่ยทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3. **การหา Solvent System ที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธี** Column Chromatography

1. ตัดแผ่น TLC Plate ขนาด 2X5 เซนติเมตร ทำการ spot crude ที่ละลายแล้ว ลงบนแผ่น TLC 2 จุด โดยแต่ละจุดมีความเข้มต่างกัน

2. เตรียม TLC tank โดยมีกระดาษกรองวางด้านใน tank และเตรียมกระจกไว้ปิด

3. ทดสอบอัตราส่วนของสารละลายที่ค่าต่างๆ โดยเริ่มจากสารละลายในอัตราส่วน 10:90 แล้วจึงลดหรือเพิ่มสารละลายชนิดต่างๆ ขึ้นอยู่กับการแยกสารในสารสกัดหยาบ (crude extract) บนแผ่น TLC

4. จุ่มแผ่น TLC ที่เตรียมได้ลง tank ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่ไปถึงระดับ solvent front ที่กำหนดไว้

5. ในกรณีที่สารเป็นทางยาวจะใช้ butanol 2-3 หยด ผสมในสารละลายเพื่อช่วยในการแยกสารจากกันดียิ่งขึ้น

6. ผลการทดลองที่เกิดขึ้นว่าสารที่แยกได้เป็นอย่างไร ถ้าสารสามารถแยกเห็นเป็นจุดอย่างชัดเจนแสดงว่าอัตราส่วนที่ผสมใน TLC tank เป็น solvent system ที่เหมาะสม แต่ถ้ายังไม่พบต้องทำการเพิ่มหรือลดอัตราส่วนของสารละลายเพื่อให้ได้ solvent system ที่เหมาะสม

7. นำแผ่น TLC ไปทดลองการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

8. นำแผ่น TLC ที่ได้ไปย้อมด้วย developing solvent โดยวางแผ่น TLC ไว้บนกระจกนำสำลีชุบ developing solvent ป้ายให้ทั่วแผ่น จากนั้นนำไปอุ่นบนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของจุดที่เกิดขึ้น

9. ใช้ solvent system ที่หาได้ไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธี column chromatography

การระเหยตัวทำละลาย

1. ใส่สารที่ต้องการระเหยตัวทำละลายลงในขวดก้นกลมประมาณครึ่งขวด

2. นำไปติดตั้งกับเครื่องระเหยสุญญากาศโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 30 - 40 องศาเซลเซียส

3. เมื่อระเหยตัวทำละลายออกไปแล้วในขวดก้นกลมจะเหลือแต่สารที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดตัวอย่างพืชด้วยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

จากการทดลองได้นำเอาใบชุมเห็ดเทศที่มีน้ำหนัก 1200, 1129 และ 1069 กรัม มาแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ในชั้น hexane, chloroform และ methanol ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมากรองและระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ พบว่ามีน้ำหนักของสารสกัด และเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักของสารสกัดดิบ (Crude Extract) ในชั้นตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารตัวอย่าง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์
Hexane	1200	18.03	1.5
Chloroform	1129	33.40	2.92
Methanol	1069	91.36	8.55

4.2 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช

จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. บนอาหาร PDA โดยสารสกัดใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ hexane, chloroform และ methanol ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 100, 500, 1,000 และ 5,000 ppm ภายในระยะเวลา 7 วัน พบว่าทั้งสองปัจจัย คือ ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายที่นำมาใช้สกัดสารของใบชุมเห็ดเทศมีอิทธิพลต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยปัจจัยชนิดของตัวทำละลายที่นำมาสกัดสารของใบชุมเห็ดเทศพบว่าสารสกัดจากชั้น chloroform มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยน้อยที่สุดโดยเริ่มตั้งแต่วันแรกจนถึงวันสุดท้าย คือ 1.08, 1.76, 2.87, 3.98, 4.92, 5.51และ 6.05 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือ สารสกัดจากชั้น methanol และ hexane ดังตารางที่ 4.2 ส่วนปัจจัยความเข้มข้นพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยน้อยที่สุดโดยเริ่มตั้งแต่วันแรกจนถึงวันสุดท้าย คือ 0.97, 1.74, 2.84, 3.92, 4.65, 5.36 และ 5.77 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาที่ระดับความเข้มข้น 1,000, 500, 100 และ 0 ppm ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ

สารสกัดจากชั้น	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยในแต่ละชั้นตัวทำละลาย						
Factor A	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
Hexane	1.48 a [1/]	2.49 a	3.87 a	4.86 b	6.00 a	6.84 a	7.30 a
Chloroform	1.08 b	1.76 c	2.87 c	3.98 c	4.92 c	5.51 b	6.05 b
Methanol	1.38 a	2.26 b	3.71 b	4.95 a	5.83 b	6.74 a	7.33 a
F 0.01	4.98	4.98	4.98	4.98	4.98	4.98	4.98
F- ratio	85.83**	130.54**	199.57**	266.23**	220.91**	296.09**	170.11**

ตารางที่ 4.3 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ความเข้มข้น	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยในแต่ละความเข้มข้น						
Factor B	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
0 ppm	2.09 a [1/]	3.27 a	4.55 a	5.78 a	7.23 a	8.33 a	8.73 a
100 ppm	1.20 b	2.09 b	3.52 b	4.75 b	5.83 b	6.55 b	7.10 b
500 ppm	1.16 b	1.90 c	3.39 b	4.44 c	5.37 c	6.05 c	6.69 c
1000 ppm	1.06 c	1.86 c	3.11 c	4.10 d	4.85 d	5.54 d	6.18 d
5000 ppm	0.97 d	1.74 d	2.84 d	3.92 e	4.65 e	5.36 e	5.77 e
F 0.01	3.65	3.65	3.65	3.65	3.65	3.65	3.65
F- ratio	290.11**	220.67**	176.06**	300.24**	416.94**	461.23**	250.90**

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีเปรียบเทียบ Treatment mean แบบ Duncan 's Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ที่มีอิทธิพลร่วมสองปัจจัย คือ สารสกัดจากตัวทำละลายแต่ละชนิด และระดับความเข้มข้นของสารสกัดต่างกัน มีผลทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง หมายความว่า อิทธิพลร่วมของปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน ในวันแรกของการวัดจนถึงวันสุดท้าย พบว่าเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ถูกยับยั้งได้ดีที่สุดโดยการใช้สารสกัดจากตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม ที่ความเข้มข้น 5000 ppm โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 0.7, 1.24, 1.79, 2.58, 3.18, 3.46, 3.92 cm ดังตารางที่ 4.4

จากการทดลอง พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายต่างชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ จะให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน กล่าวคือ สารสกัดจากชั้นคลอโรฟอร์มจะมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชั้นเฮกเซนและเมทานอล และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นที่แตกต่างกันในชั้นคลอโรฟอร์มพบว่าที่ความเข้มข้น 5000 ppm จะให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุดเท่ากับ 55.10 ดังตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ

Treatment		เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)						
Factor A	Factor B	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
Hexane	0	2.09 a[1/]	3.27 a	4.55 a	5.78 a	7.23 a	8.33 a	8.73 a
	100	1.36 b	2.78 b	4.04 b	5.12 b	6.38 b	7.01 b	7.54 b
	500	1.32 b	2.10 cd	3.68 cd	4.50 d	5.55 d	6.27 cd	6.90 c
	1000	1.24 bc	2.23 c	3.62 cde	4.42 de	5.43 de	6.22 cd	6.69 cd
	5000	1.13 c	2.10 cd	3.47 def	4.50 d	5.41 de	6.40 c	6.64 cd
Chloroform	0	2.09 a	3.27 a	4.55 a	5.78 a	7.23 a	8.33 a	8.73 a
	100	0.92 e	1.25 g	2.71 h	4.09 f	5.25 ef	5.70 f	6.35 d
	500	0.85 e	1.77 f	3.10 g	4.59 cd	5.43 de	5.99 de	6.38 d
	1000	0.82 ef	1.30 g	2.19 I	2.86 g	3.54 g	4.10 g	4.88 e
	5000	0.70 f	1.24 g	1.79 j	2.58 h	3.18 h	3.46 h	3.92 f
Methanol	0	2.09 a	3.27 a	4.55 a	5.78 a	7.23 a	8.33 a	8.73 a
	100	1.34 b	2.24 c	3.82 bc	5.05 b	5.85 c	6.97 b	7.42 b
	500	1.30 b	1.85 de	3.39 ef	4.22 ef	5.13 f	5.90 ef	6.79 c
	1000	1.12 cd	2.05 cde	3.53 def	5.00 b	5.58 d	6.32 c	6.98 c
	5000	1.10 d	1.88 de	3.26 fg	4.72 c	5.37 def	6.22 cd	6.74 cd
%CV		7.98	7.50	5.47	3.57	3.48	3.38	4.05

1/ = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีเปรียบเทียบ Treatment mean แบบ Duncan 's Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. โดยสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ

ชนิดของตัวทำละลาย	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น			
	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	5000 ppm
Ca(L)/crude/Hexane	13.74	20.96	23.37	23.94
Ca(L)/crude/Chloroform	27.26	26.91	44.10	55.10
Ca(L)/crude/Methanol	15.01	22.22	20.01	20.50

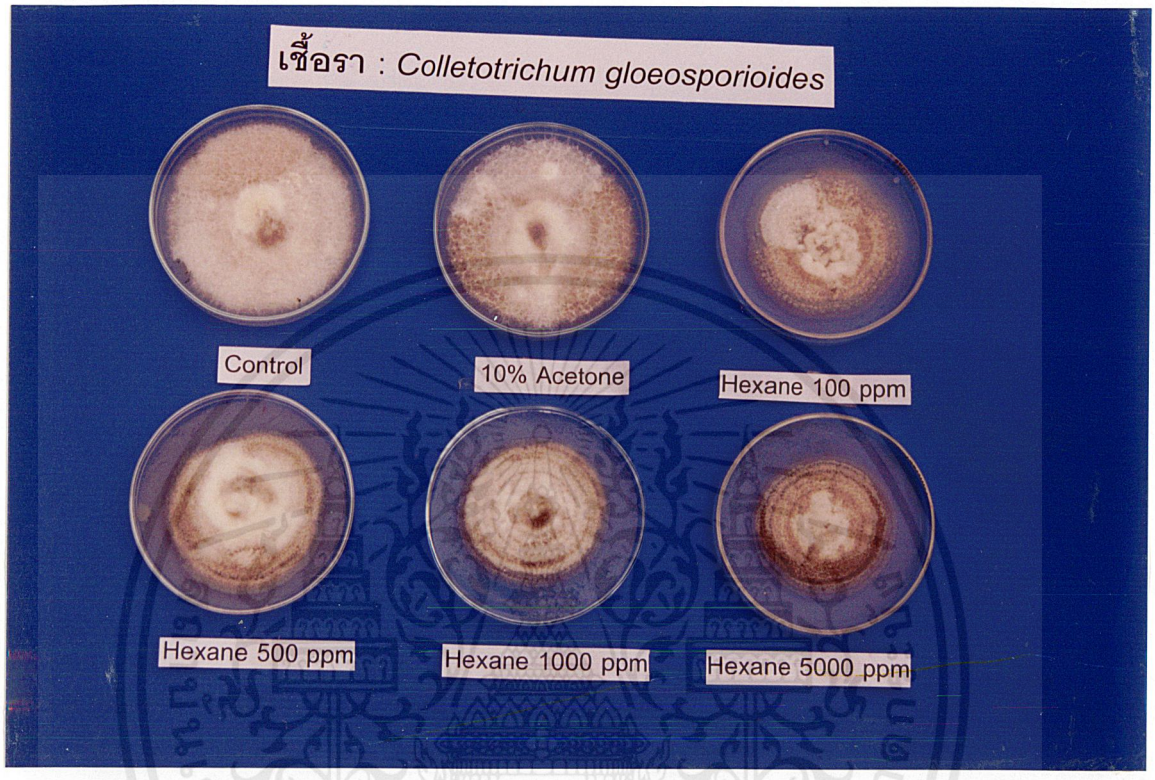
เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต คำนวณจากสูตร $PI = (A_1 - A_2)/A_1 \times 100$

A_1 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคในการทดลองเปรียบเทียบ (control) (cm)

A_2 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญร่วมกับจุลินทรีย์ต่อต้าน (cm)

จากรูป พบว่าสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. โดยที่สารสกัดจากชั้น chloroform จะให้ผลการยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ได้จากชั้น hexane และ methanol ดังรูปที่ 4.1 – 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

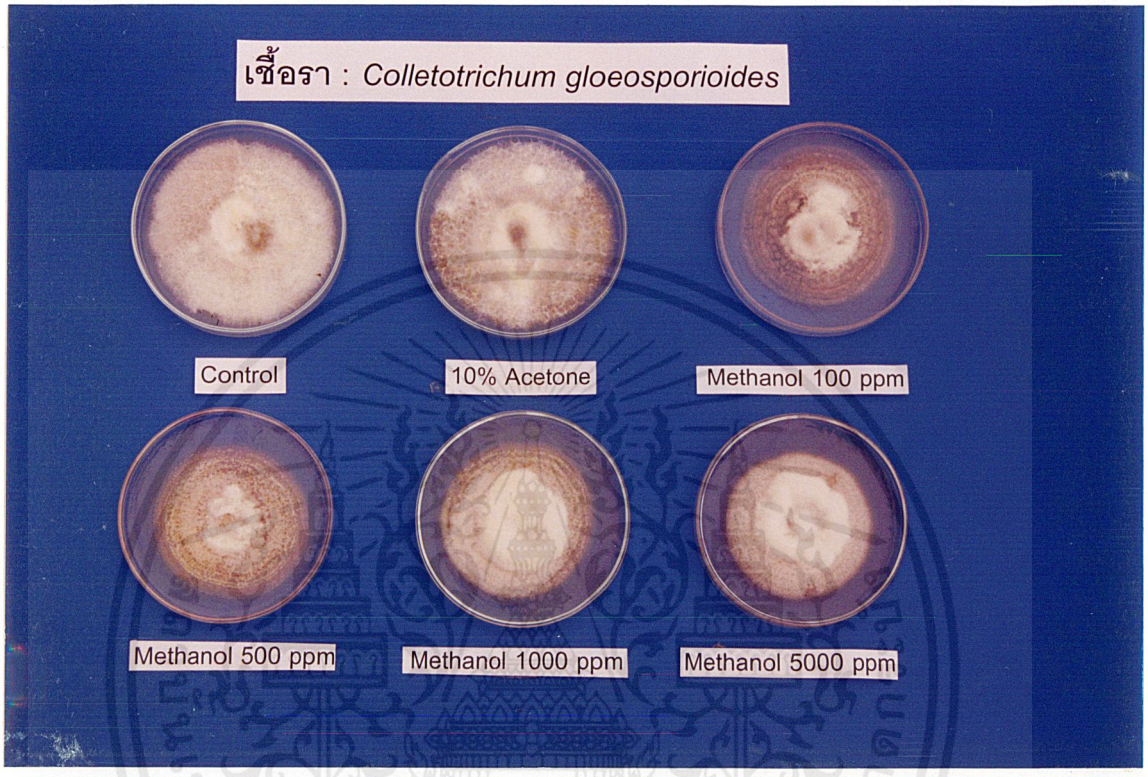


รูปที่ 4.1 อิทธิพลของสารสกัดใบชุมเห็ดเทศ (จากตัวทำละลาย hexane) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

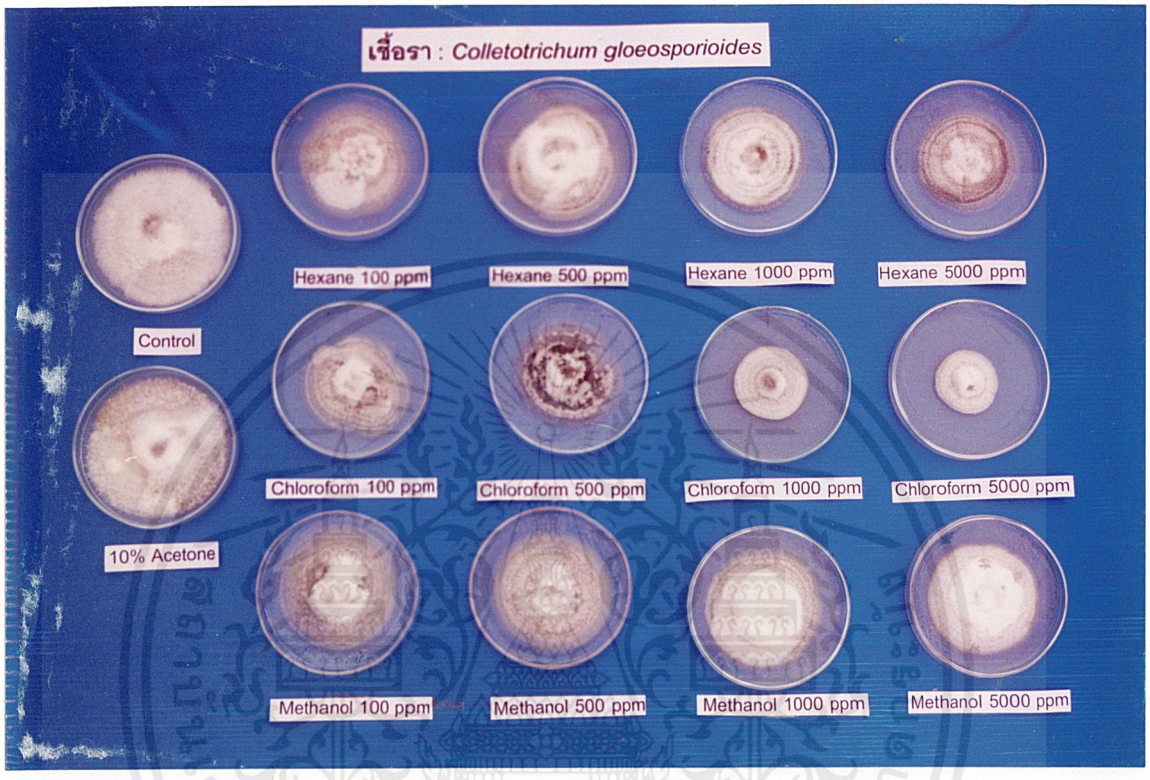
รูปที่ 4.2 อิทธิพลของสารสกัดใบชุมเห็ดเทศ (จากตัวทำละลาย chloroform) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 อิทธิพลของสารสกัดใบชุมเห็ดเทศ (จากตัวทำละลาย methanol) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 อิทธิพลของสารสกัดใบชุมเห็ดเทศต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

จากรูปที่ 4.4 เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าและผลข้อมูลทางสถิติในตารางที่ 4.2 - 4.4 ให้ผลสอดคล้องกันว่าสารสกัดจากตัวทำละลายชั้นคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. เราจึงมุ่งเน้นการแยกส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดจากชั้นคลอโรฟอร์ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกส่วนประกอบทางเคมีจากสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ ด้วยเทคนิค TLC เพื่อนำไปใช้แยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

4.3.1 ผลการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดชั้นต่าง ๆ

เมื่อนำสารสกัดจากชั้นเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เมทานอล มาทำการทดสอบด้วย TLC โดยทำการสุ่มค่าความเป็นขั้วของระบบตัวทำละลายต่างๆ พบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกส่วนประกอบของสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่างๆ

สารสกัดชั้นตัวทำละลาย	ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม
Hexane	50 %hexane : 50 %ethyl acetate
Chloroform	40 %dichloromethane : 60 %ethyl acetate
Methanol	60 %dichloromethane : 40 %ethyl acetate

4.3.2. ผลของการแยกสารสกัดด้วยระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม

ทำการแยกส่วนประกอบในสารสกัดด้วย TLC โดยสังเกตุจากตาเปล่า ทดสอบกับรังสี UV และ Developing Solvent ได้ผลดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการแยกสารสกัดด้วย TLC โดยสังเกตุด้วยตาเปล่า ทดสอบด้วยรังสี UV และ developing solvent

พบจำนวนจุดของสารที่ / สารสกัดจากชั้น	สังเกตุด้วยตาเปล่า (จุด)	สังเกตุจาก UV 254 nm (จุด)	สังเกตุจาก UV 366 nm (จุด)	Developing Solvent (จุด)
Hexane	5	5	5	5
Chloroform	3	4	4	4
Methanol	3	4	3	4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการแยกสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำสารสกัดที่สกัดได้จากตัวทำละลายชั้นคลอโรฟอร์มมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตร-กราฟี และทำการเก็บ fraction โดยเริ่มแรกใช้ 100 % ไดคลอโรมีเทน เป็น mobile phase จากนั้นเพิ่มขั้วด้วยเอทธิล อะซิเตตไปจนถึง 100 % เอทธิล อะซิเตต ซึ่งจำนวน fraction ได้แสดงไว้ดังตารางที่ 4.8

ผลของการแยกส่วนประกอบในชั้น คลอโรฟอร์ม

Stationary Phase : Silica gel เบอร์ 7729

Solvent system : 1. ใช้ไดคลอโรมีเทนเป็น mobile phase

2. ไดคลอโรมีเทนเพิ่มความเป็นขั้วด้วยเอทธิล อะซิเตต

3. เมทานอล (All purpose elution)

ตารางที่ 4.8 แสดงการเก็บ fraction ในการแยกสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม

Eluent	Fraction No.
100 %CH_2Cl_2	1 – 145
5 % EtOAc : 95 % CH_2Cl_2	146 – 149
10 % EtOAc : 90 % CH_2Cl_2	150 – 154
15 % EtOAc : 85 % CH_2Cl_2	155 – 158
20 % EtOAc : 80 % CH_2Cl_2	159 – 182
100 % EtOAc	183 – 209

ทำการตรวจสอบสารที่เก็บจากคอลัมน์ด้วย TLC และรวม fraction ที่ให้ผลเหมือนกันได้ดังแสดงในตารางที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงการรวมส่วนประกอบที่แยกได้ของสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม

No.	Fraction ขวดที่	ลักษณะของสาร	*ลักษณะสีหลังจากทดสอบกับ Developing Solvent
1	1 – 16	ของเหลวหนืดสีเหลือง	สีม่วง
2	17 – 23	ของเหลวหนืดสีเหลือง	สีม่วง ชมพู เขียว
3	24 – 54	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม	สีม่วง ชมพู เขียว น้ำตาล
4	55 – 68	ของแข็งสีเขียว	สีม่วง น้ำเงิน เขียว เขียวเข้ม
5	69 – 110	ของแข็งสีเขียว	สีเขียวเข้ม น้ำเงิน
6	111 – 138	ของแข็งสีเขียว	สีเขียวเข้ม เขียวอ่อน
7	139 – 145	ของแข็งสีเขียว	สีเขียว น้ำตาล
8	146 – 149	ของแข็งสีเขียว	สีเขียว เขียวเข้ม น้ำเงิน
9	150 – 182	ของแข็งสีเขียว	สีเขียวเข้ม เขียวอ่อน น้ำเงินเข้ม
10	183 – 209	ของแข็งสีเขียว	สีเขียว เขียวอ่อน

* สีที่อธิบายอยู่ในตารางจะเรียงจากตามลำดับจากบนลงล่างของแผ่น TLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและวิจารณ์ผล

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. สามารถสกัดสารจากใบซุมเห็ดเทศด้วยวิธีการแช่ตัวทำละลาย เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และ เมทานอล ได้สารสกัดหยาบ (crude extract) 1.50, 2.92 และ 8.55 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตามลำดับ

2. สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบซุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*) ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตรกราฟี โดยสามารถแยกสารสกัดจากชั้นคลอโรฟอร์มได้ 10 ส่วนประกอบ สารสกัดจากชั้นคลอโรฟอร์มมีของแข็งสีเขียวเป็นองค์ประกอบหลัก และมีส่วนที่เป็นของเหลวหนืดในปริมาณเล็กน้อย

3. จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อรา พบว่าสารสกัดจากชั้นคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 5000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากชั้นเฮกเซน และเมทานอล คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 55.10

5.2 วิจารณ์ผลการวิจัย

- จากตารางที่ 4.1 (หน้า 26) ค่าเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ แสดงถึง ปริมาณของสารสกัดที่สกัดออกมาได้ จากตาราง พบว่าเมื่อสกัดสารด้วยตัวทำละลาย methanol, chloroform และ hexane จะได้ปริมาณสารออกมาดังนี้ คือ 8.55, 2.92, และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสามารถสกัดสารจากชั้น methanol ออกมาได้มากที่สุด แสดงว่าสารที่อยู่ในใบซุมเห็ดเทศโดยส่วนใหญ่แล้วเป็นสารอินทรีย์ที่มีขั้ว ได้แก่ กลุ่มของสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล คาร์บอนิลหรือ กลุ่มสารที่มีเฮทเทอโรอะตอม เช่น ไนโตรเจน หรือ ออกซิเจน เป็นองค์ประกอบ

- จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. บนอาหาร PDA โดยสารสกัดใบซุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ hexane, chloroform และ methanol ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 100, 500, 1,000 และ 5,000 ppm ภายในระยะเวลา 7 วัน พบว่า สารสกัดจากตัวทำละลายชั้นคลอโรฟอร์มที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดมีผลทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราน้อยที่สุด คือ 3.92 เซนติเมตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเท่ากับ 55.10 เมื่อเปรียบเทียบกับชั้นเฮกเซนและเมทานอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานทดลองของ Palannichamy และ Nagarajan (1990) ได้ใช้สารสกัดจากส่วนใบของ *Cassia alata* มาศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* , *Trichophyton rubrum* และ *Microsporam gypseum* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคผิวหนัง [13] นอกจากนั้น Darah Ibrahim และ Halim Osman (1995) ได้ใช้สารสกัดจากส่วนใบของ *Cassia alata* มาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อรา พบว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเพียงอย่างเดียว ได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes var.interdigitale, Trichophyton mentagrophytes var.mentagrophytes, Trichoophyton rubrum, Microsporum canis, Microsporum gypseum, Fusarium solani, Aspergillus niger, Clasosporium werneckii, Penicillium sp.* [3]

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ผลการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเพียงอย่างเดียวอาจไม่พออธิบายลักษณะการยับยั้งการเจริญเติบโต ควรทำการวัดปริมาณสปอร์ เพื่อช่วยในการอธิบาย

2. ควรจะนำสารสกัดจากตัวทำละลายชั้นคลอโรฟอร์มไปทำการศึกษาต่อไปว่าเป็นสารชนิดใด และมีโครงสร้างแบบใด ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

3. ควรจะนำสารสกัดจากตัวทำละลายชั้นต่างๆ ไปทดสอบกับเชื้อราชนิดอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. ธรรมศักดิ์ สมมาตย์ **สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช** พิมพ์ครั้งที่ 2 กลุ่มหนังสือเกษตร หน้า 20 พ.ศ. 2528
2. สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน **สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน** พิมพ์ครั้งที่ 2 สำนักพิมพ์ดอกหญ้า หน้า 15 พ.ศ. 2541
3. Darah Ibrahim, Halim Osman, *Journal of Ethnopharmacology*, 45, 151, (1995)
4. นิพนธ์ วิสารทานนท์ **การทำสวนมะม่วง** พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์ ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม หน้า 1 พ.ศ. 2533
5. ประสาทพร สมิตะมาน **โรคพืชวิทยา** พิมพ์ครั้งที่ 3 ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หน้า 124 พ.ศ. 2534
6. Anna L. Snowdon.,*A Colour Atlas of Post – Harvest Disease & Disorders of Fruit & Vegetables*, Wolfe Scientific,1,50, 1990
7. สมสุข มัจฉาชีพ **พืชสมุนไพรไทย** พิมพ์ครั้งที่ 2 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา หน้า 81 พ.ศ. 2542
8. วันดี กฤษณพันธ์ **เภสัชวินิจฉัย - ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ** พิมพ์ครั้งที่ 2 ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เล่ม 1 หน้า 130 พ.ศ. 2534
9. อ้อมบุญ ล้วนรัตน์ **การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ** พิมพ์ครั้งที่ 1 ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หน้า 21 พ.ศ. 2536
10. วีระณีย์ ศรีพรมสุข **การศึกษาลักษณะความต้องการทางสรีรวิทยาของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporiodes*** (Penz.) Penz.& Sacc. **สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง** (Mangifera indica L.) **และการควบคุมโรคโดยใช้สารสกัดจากจุลินทรีย์** พิมพ์ครั้งที่ 1 สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง หน้า4 พ.ศ.2539
11. เกษม สร้อยทอง **ผลการใช้เชื้อราป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสมะม่วง** วารสารเคหการเกษตร 18(4) หน้า 157
12. M. Devasagayam, S. Palanichamy, S. Nagarajan, *Journal of Ethnopharmacology* , 22,81,1988.
13. S. Palanichamy, S. Nagarajan, *Journal of Ethnopharmacology*, 29, 337, 1990.
14. S. Domodaran, S. Venkataraman, *Journal of Ethnopharmacology*, 42,19,1994.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ 1
ตารางข้อมูลผลการทดลอง
และการวิเคราะห์ทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 1 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 1 วัน

Treatment	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี					Average
	R1	R2	R3	R4	R5	
HB1	1.98	1.9	2.04	2.4	2.14	2.09
HB2	1.48	1.3	1.36	1.4	1.24	1.36
HB3	1.35	1.36	1.32	1.3	1.28	1.32
HB4	1.2	1.22	1.16	1.34	1.26	1.24
HB5	1.2	1.16	1.02	1.1	1.18	1.13
CB1	1.98	1.9	2.04	2.4	2.14	2.09
CB2	0.99	0.85	0.99	0.82	0.94	0.92
CB3	0.9	0.78	0.82	0.85	0.89	0.85
CB4	0.88	0.84	0.8	0.76	0.82	0.82
CB5	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
MB1	1.98	1.9	2.04	2.4	2.14	2.09
MB2	1.5	1.22	1.26	1.32	1.38	1.34
MB3	1.24	1.36	1.28	1.34	1.26	1.3
MB4	1.1	1.12	1.16	1.08	1.12	1.12
MB5	1.02	1.14	1.04	1.06	1.1	1.07

H = สารสกัดในตัวทำละลาย hexane

C = สารสกัดในตัวทำละลาย chloroform

M = สารสกัดในตัวทำละลาย methanol

B1 = ความเข้มข้น 0 ppm

B2 = ความเข้มข้น 100 ppm

B3 = ความเข้มข้น 500 ppm

B4 = ความเข้มข้น 1000 ppm

B5 = ความเข้มข้น 5000 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 2 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 2 วัน

Treatment	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี					Average
	R1	R2	R3	R4	R5	
HB1	3.2	3.16	3.22	3.43	3.32	3.27
HB2	2.58	2.8	2.77	2.88	2.84	2.77
HB3	2.1	2.05	2	2.2	2.15	2.1
HB4	2.1	2.2	2.18	2.4	2.26	2.23
HB5	2.16	2.1	2	2.08	2.15	2.1
CB1	3.2	3.16	3.22	3.43	3.32	3.27
CB2	1.3	1.2	1.28	1.2	1.25	1.25
CB3	1.9	1.67	1.72	1.7	1.85	1.77
CB4	1.38	1.36	1.28	1.14	1.35	1.3
CB5	1.2	1.3	1	1.16	1.52	1.24
MB1	3.2	3.16	3.22	3.43	3.32	3.27
MB2	2	2.25	2.08	2.4	2.45	2.24
MB3	1.82	1.9	1.89	1.82	1.8	1.85
MB4	2.1	2.32	2.45	1.68	1.7	2.05
MB5	1.62	2.28	2.18	1.7	1.63	1.88

H = สารสกัดในตัวทำละลาย hexane

C = สารสกัดในตัวทำละลาย chloroform

M = สารสกัดในตัวทำละลาย methanol

B1 = ความเข้มข้น 0 ppm

B2 = ความเข้มข้น 100 ppm

B3 = ความเข้มข้น 500 ppm

B4 = ความเข้มข้น 1000 ppm

B5 = ความเข้มข้น 5000 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 3 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 3 วัน

Treatment	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี					Average
	R1	R2	R3	R4	R5	
HB1	4.54	4.16	4.56	4.88	4.63	4.55
HB2	4.2	4.1	3.9	4.1	3.9	4.04
HB3	3.7	3.75	3.64	3.65	3.66	3.68
HB4	3.5	3.6	3.54	3.76	3.68	3.62
HB5	3.45	3.5	3.44	3.48	3.48	3.47
CB1	4.54	4.16	4.56	4.88	4.63	4.55
CB2	2.78	2.66	2.7	2.64	2.77	2.71
CB3	3.22	2.98	3	3.1	3.2	3.1
CB4	2.25	2.18	2.1	2.06	2.36	2.19
CB5	1.75	1.85	1.64	1.7	2.02	1.79
MB1	4.54	4.16	4.56	4.88	4.63	4.55
MB2	3.55	3.6	3.75	4.2	4	3.82
MB3	3.3	3.6	3.4	3.32	3.35	3.39
MB4	3.6	3.6	3.75	3	3.68	3.53
MB5	3.06	3.66	3.02	3.12	3.46	3.26

H = สารสกัดในตัวทำละลาย hexane

C = สารสกัดในตัวทำละลาย chloroform

M = สารสกัดในตัวทำละลาย methanol

B1 = ความเข้มข้น 0 ppm

B2 = ความเข้มข้น 100 ppm

B3 = ความเข้มข้น 500 ppm

B4 = ความเข้มข้น 1000 ppm

B5 = ความเข้มข้น 5000 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 4 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 4 วัน

Treatment	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี					Average
	R1	R2	R3	R4	R5	
HB1	5.7	5.52	5.96	5.93	5.8	5.78
HB2	5.16	5.2	5	5.1	5.15	5.12
HB3	4.5	4.46	4.48	4.45	4.6	4.5
HB4	4.4	4.5	4.35	4.45	4.41	4.42
HB5	4.38	4.42	4.48	4.5	4.5	4.46
CB1	5.7	5.52	5.96	5.93	5.8	5.78
CB2	4	4.2	4.1	3.98	4.15	4.09
CB3	4.88	4.7	4.55	4.35	4.46	4.59
CB4	2.96	2.88	2.82	2.74	2.9	2.86
CB5	2.5	2.55	2.48	2.5	2.88	2.58
MB1	5.7	5.52	5.96	5.93	5.8	5.78
MB2	4.85	5	4.9	5.35	5.15	5.05
MB3	4.25	4	4.05	4.44	4.36	4.22
MB4	4.95	5	5.3	4.65	5.12	5
MB5	4.72	4.89	4.26	4.82	4.9	4.72

H = สารสกัดในตัวทำละลาย hexane

C = สารสกัดในตัวทำละลาย chloroform

M = สารสกัดในตัวทำละลาย methanol

B1 = ความเข้มข้น 0 ppm

B2 = ความเข้มข้น 100 ppm

B3 = ความเข้มข้น 500 ppm

B4 = ความเข้มข้น 1000 ppm

B5 = ความเข้มข้น 5000 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 5 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 5 วัน

Treatment	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี					Average
	R1	R2	R3	R4	R5	
HB1	7.31	6.91	7.26	7.38	7.28	7.23
HB2	6.46	6.32	6.4	6.38	6.36	6.38
HB3	5.65	5.6	5.5	5.55	5.54	5.57
HB4	5.38	5.44	5.36	5.46	5.5	5.43
HB5	5.44	5.48	5.32	5.42	5.4	5.41
CB1	7.31	6.91	7.26	7.38	7.28	7.23
CB2	5.2	5	5.38	5.26	5.4	5.25
CB3	5.85	5.2	5.68	5.15	5.38	5.45
CB4	3.6	3.54	3.58	3.4	3.56	3.54
CB5	3	3.36	2.92	3.15	3.45	3.18
MB1	7.31	6.91	7.26	7.38	7.28	7.23
MB2	5.7	6.05	5.78	5.5	6.2	5.85
MB3	5.05	5.3	5	5.1	5.2	5.13
MB4	5.8	5.65	5.7	5	5.74	5.58
MB5	5.15	5.69	5.35	5	5.65	5.37

H = สารสกัดในตัวทำละลาย hexane

C = สารสกัดในตัวทำละลาย chloroform

M = สารสกัดในตัวทำละลาย methanol

B1 = ความเข้มข้น 0 ppm

B2 = ความเข้มข้น 100 ppm

B3 = ความเข้มข้น 500 ppm

B4 = ความเข้มข้น 1000 ppm

B5 = ความเข้มข้น 5000 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 6 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 6 วัน

Treatment	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี					Average
	R1	R2	R3	R4	R5	
HB1	8.3	8.05	8.42	8.4	8.5	8.33
HB2	7	6.9	7.1	7.05	7	7.01
HB3	6.34	6.25	6.2	6.24	6.3	6.27
HB4	6	6.25	6.2	6.3	6.34	6.22
HB5	6.28	6.45	6.38	6.43	6.44	6.4
CB1	8.3	8.05	8.42	8.4	8.5	8.33
CB2	5.65	5.4	5.75	5.8	5.89	5.7
CB3	6.75	5.68	6	5.72	5.78	5.99
CB4	4.12	4.06	4.18	3.9	4.22	4.1
CB5	3.3	3.6	3.18	3.48	3.72	3.46
MB1	8.3	8.05	8.42	8.4	8.5	8.33
MB2	6.7	7.25	6.8	6.68	7.35	6.96
MB3	5.95	6	6.1	5.65	5.78	5.9
MB4	6.45	6.25	6.55	5.85	6.48	6.32
MB5	5.9	6.36	6	6.42	6.48	6.23

H = สารสกัดในตัวทำละลาย hexane

C = สารสกัดในตัวทำละลาย chloroform

M = สารสกัดในตัวทำละลาย methanol

B1 = ความเข้มข้น 0 ppm

B2 = ความเข้มข้น 100 ppm

B3 = ความเข้มข้น 500 ppm

B4 = ความเข้มข้น 1000 ppm

B5 = ความเข้มข้น 5000 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 7 ผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 7 วัน

Treatment	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี					Average
	R1	R2	R3	R4	R5	
HB1	8.7	8.58	8.8	8.85	8.71	8.73
HB2	7.65	7.48	7.54	7.52	7.52	7.54
HB3	7	6.9	6.86	6.88	6.85	6.9
HB4	6.5	6.7	6.65	6.76	6.82	6.69
HB5	6.9	6.64	6.52	6.58	6.56	6.64
CB1	8.7	8.58	8.8	8.85	8.71	8.73
CB2	6.2	6.1	6.3	6.62	6.55	6.35
CB3	7.21	6.15	6.45	6	6.1	6.38
CB4	4.82	4.88	4.92	4.79	5	4.88
CB5	3.6	4.2	3.46	3.72	4.64	3.92
MB1	8.7	8.58	8.8	8.85	8.71	8.73
MB2	7.05	7.8	7.25	7	7.98	7.42
MB3	6.88	7	6.95	6.45	6.69	6.79
MB4	7.1	7	7.2	6.55	7.05	6.98
MB5	6.67	7.12	6.05	6.58	7.3	6.74

H = สารสกัดในตัวทำละลาย hexane

C = สารสกัดในตัวทำละลาย chloroform

M = สารสกัดในตัวทำละลาย methanol

B1 = ความเข้มข้น 0 ppm

B2 = ความเข้มข้น 100 ppm

B3 = ความเข้มข้น 500 ppm

B4 = ความเข้มข้น 1000 ppm

B5 = ความเข้มข้น 5000 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 8 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 1 วัน

SOV	df	SS	MS	F	F.05	F.01
treatment	14	14.726	1.052	98.45 **	1.84	2.34
A	2	1.834	0.917	85.827 **	3.15	4.98
B	4	12.398	3.099	290.106 **	2.53	3.65
AB	8	0.494	0.062	5.778 **	2.09	2.82
Error	60	0.641	0.011			
Total	74	15.367	0.208			

** = มีความแตกต่างทางนัยสำคัญยิ่ง (highly significant)

CV = 7.98 %

A = สารสกัดในตัวทำละลายแต่ละชนิด

B = ความเข้มข้นของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 9 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 2 วัน

SOV	df	SS	MS	F	F.05	F.01
treatment	14	34.149	2.439	91.955**	1.84	2.34
A	2	6.925	3.463	130.538**	3.15	4.98
B	4	23.414	5.853	220.67**	2.53	3.65
AB	8	3.809	0.476	17.951**	2.09	2.82
Error	60	1.592	0.027			
Total	74	35.74	0.483			

** = มีความแตกต่างทางนัยสำคัญยิ่ง (highly significant)

CV = 7.502 %

A = สารสกัดในตัวทำละลายแต่ละชนิด

B = ความเข้มข้นของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 10 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 3 วัน

SOV	df	SS	MS	F	F.05	F.01
treatment	14	46.274	3.305	90.933**	1.84	2.34
A	2	14.508	7.254	199.569**	3.15	4.98
B	4	25.599	6.4	176.063**	2.53	3.65
AB	8	6.168	0.771	21.210**	2.09	2.82
Error	60	2.181	0.036			
Total	74	48.455	0.655			

** = มีความแตกต่างทางนัยสำคัญยิ่ง (highly significant)

CV = 5.472 %

A = สารสกัดในตัวทำละลายแต่ละชนิด

B = ความเข้มข้นของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 11 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 4 วัน

SOV	df	SS	MS	F	F.05	F.01
treatment	14	34.149	2.439	91.955**	1.84	2.34
A	2	6.925	3.463	130.538**	3.15	4.98
B	4	23.414	5.853	220.67**	2.53	3.65
AB	8	3.809	0.476	17.951**	2.09	2.82
Error	60	1.592	0.027			
Total	74	35.74	0.483			

** = มีความแตกต่างทางนัยสำคัญยิ่ง (highly significant)

CV = 7.502 %

A = สารสกัดในตัวทำละลายแต่ละชนิด

B = ความเข้มข้นของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 12 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 5 วัน

SOV	df	SS	MS	F	F.05	F.01
treatment	14	96.274	6.877	181.236**	1.84	2.34
A	2	16.764	8.382	220.909**	3.15	4.98
B	4	63.28	15.82	416.939**	2.53	3.65
AB	8	16.229	2.029	53.466**	2.09	2.82
Error	60	2.277	0.038			
Total	74	98.55	1.332			

** = มีความแตกต่างทางนัยสำคัญยิ่ง (highly significant)

CV = 3.488 %

A = สารสกัดในตัวทำละลายแต่ละชนิด

B = ความเข้มข้นของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 13 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 6 วัน

SOV	df	SS	MS	F	F.05	F.01
treatment	14	134.355	9.597	206.970**	1.84	2.34
A	2	27.458	13.729	296.091**	3.15	4.98
B	4	85.546	21.387	461.234**	2.53	3.65
AB	8	21.351	2.669	57.558**	2.09	2.82
Error	60	2.782	0.046			
Total	74	137.137	1.853			

** = มีความแตกต่างทางนัยสำคัญยิ่ง (highly significant)

CV = 3.382 %

A = สารสกัดในตัวทำละลายแต่ละชนิด

B = ความเข้มข้นของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก - 14 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนผลของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อายุ 7 วัน

SOV	df	SS	MS	F	F.05	F.01
treatment	14	121.768	8.698	111.488**	1.84	2.34
A	2	26.541	13.271	170.105**	3.15	4.98
B	4	78.294	19.573	205.895**	2.53	3.65
AB	8	16.932	2.117	27.130**	2.09	2.82
Error	60	4.681	0.078			
Total	74	126.448	1.709			

** = มีความแตกต่างทางนัยสำคัญยิ่ง (highly significant)

CV = 4.051 %

A = สารสกัดในตัวทำละลายแต่ละชนิด

B = ความเข้มข้นของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ 2

อาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อรา (Fungus cultur medium) หมายถึง วัตถุใดก็ตามที่นำไปเลี้ยงเชื้อรา แล้วสามารถทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดี และปราศจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นขึ้นปะปน อาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดหนึ่งๆ จะมีคุณสมบัติดีเลวอย่างไร มีข้อควรพิจารณาดังต่อไปนี้ คือ

1. ส่วนประกอบของธาตุอาหารและความเข้มข้น
2. ระดับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร
3. อัตราของออกซิเจนและความชื้น
4. การเปลี่ยนแปลงในอุณหภูมิปกติ
5. ความเกี่ยวพันธ์กับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

ถ้าแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อราตามส่วนประกอบทางเคมีแล้วแบ่งได้ 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อตามธรรมชาติ** (Natural media) ประกอบไปด้วยสารตามธรรมชาติ อาจได้จากชิ้นส่วนของพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ด้วยกัน ไม่ทราบอัตราส่วนของสารประกอบทางเคมีที่แน่นอน เช่น

1.1 Alphacel Medium

Alphacel	20.0	กรัม
$MgSO_4$	1.0	กรัม
KH_2PO_4	1.5	กรัม
$NaNO_3$	1.0	กรัม
น้ำมะพร้าว	50.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดเป็นด่างให้ได้ประมาณ 5.6 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 20 ปอนด์/ตารางนิ้ว ใช้เวลา 20 นาที ส่วนน้ำมะพร้าวหลังจากกรองด้วยกระดาษกรองแล้วให้แยกนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที เก็บไว้ที่ 6 องศาเซลเซียส เวลาจะใช้จึงนำไปผสมกับส่วนประกอบอื่นๆ อาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้ใช้กระตุ้นให้เชื้อราหลายชนิดสร้างสปอร์ได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 Potato Dextrose Agar

มันฝรั่งปลอกเปลือก	200.0	กรัม
Dextrose(น้ำตาลทราย)	20.0	กรัม
วุ้น	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

เหมาะสำหรับเชื้อราทั่วไปโดยเตรียมจากมันฝรั่ง วุ้น และน้ำตาลทราย ตามอัตราส่วนข้างบนเริ่มจากนำมันฝรั่งไปต้มลงในน้ำประมาณ 500 มิลลิลิตร จนเนื้อมันฝรั่งนิ่มจากนั้นกรองเอาส่วนที่เป็นน้ำเก็บไว้ นำวุ้นและDextrose (น้ำตาลทราย) ไปต้มในน้ำประมาณ 500 มิลลิลิตร ให้ละลายแล้วนำไปผสมกับน้ำมันฝรั่งที่เก็บไว้และทำการตวงใส่ขวดขนาดเล็ก ขวดละ 18 มิลลิลิตร โดยใช้กระบอกตวง จากนั้นนำขวดไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. **อาหารเลี้ยงเชื้อที่สังเคราะห์ขึ้น** (Synthetic media) หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบส่วนประกอบทางเคมีจำนวน และปริมาณที่แน่นอน เช่น

2.1 Czapek's agar

$NaNO_3$	3.00	กรัม
K_2HPO_4	1.00	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.50	กรัม
KCl	0.50	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
Sucrose	30.00	กรัม
วุ้น	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

ใช้เลี้ยงเชื้อรา Aspergillus, Penicillium และ Nocardia

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 Glucose yeast agar

Glucose	1.00	เปอร์เซ็นต์
Yeast extract	0.30	เปอร์เซ็นต์
K_2HPO_4	0.20	เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4.7H_2O$	0.02	เปอร์เซ็นต์
วุ้น	2.00	เปอร์เซ็นต์
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

เหมาะสำหรับเชื้อราพวก Coprinus lagopus และ Agaricales อื่นๆ ให้สร้างโครงสร้างพิเศษ

วิธีการฆ่าเชื้อ (Methods of Sterilization)

เมื่อเตรียมอาหารสูตรต่างๆ ได้เรียบร้อยแล้ว ก่อนนำไปใช้เลี้ยงเชื้อราจำเป็นต้องกำจัดสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่อาจหลงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้หมดอย่างสมบูรณ์ได้ 2 วิธี คือ

วิธีทางฟิสิกส์ (physical methods)

โดยการให้ความร้อนและการกรอง การใช้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อในอาหารชนิดต่างๆ นั้น โดยทั่วไปใช้ความร้อนชื้นเนื่องจากสามารถแทรกซึมผ่านเข้าทำลายจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้ดี และไม่ทำให้น้ำซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อระเหยหรือแห้งหายไป ความร้อนชื้นที่ใช้มีอยู่ 2 แบบ คือ

1.1 ความร้อนชื้นแบบของอาร์โนลด์ (Arnold sterilization) เป็นการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 3 วันๆ ละ 1 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที (แต่ละครั้งเว้นห่างกันประมาณ 24 ชั่วโมง) วิธีนี้ฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อพวก เยลลาติน นม และคาร์โบไฮเดรตต่างๆ หากใช้อุณหภูมิสูงกว่านี้หรือเวลานานเกินไป สารประกอบคาร์โบไฮเดรตต่างๆ จะแตกตัวและเยลลาตินจะไม่แข็งตัวเมื่อทิ้งไว้ให้เย็น ความจำเป็นที่ต้องใช้การฆ่าเชื้อถึง 3 ครั้ง เนื่องจาก

การฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 เซลล์ร่างการของจุลินทรีย์ (vegetatiue cell) จะถูกทำลายหมด ส่วนพวกที่เป็นสปอร์จะไม่ตาย เมื่อทิ้งไว้ต่อไปสปอร์ของจุลินทรีย์จะงอกได้เป็นเซลล์ร่างกายภายใน 24 ชั่วโมง

การฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ปฏิบัติหลังครั้งแรก 24 ชั่วโมง จากความร้อนและเวลาที่ใช้จะทำลายเซลล์ต่างๆ ที่เพิ่งงอกจากสปอร์ทั้งหมด ดังนั้นจุลินทรีย์ทั้งที่เป็นเซลล์ร่างกายและสปอร์จะถูกทำลายทั้งหมด เพื่อความแน่นอนจึงปฏิบัติครั้งที่ 3 อีกครั้งหนึ่ง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 การฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอ (autoclave sterilizer) เป็นการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ได้จากหม้อนึ่งความดันไอ ซึ่งจุลินทรีย์จะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที ความร้อนที่ได้จจากไอน้ำนั้นจะต้องมีไอน้ำเป็นจำนวนมากพอที่จะให้ความร้อนสูงถึง 121 องศาเซลเซียส ดังนั้น หม้อนึ่งต้องสามารถทนความดันของไอน้ำที่เกิดขึ้นภายในหมอนึ่งความดันไอนั้นได้ หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อราครบเวลาตามกำหนดเรียบร้อยแล้วก่อนนำออกจากหม้อนึ่งความดันไอจำเป็นต้องปล่อยทิ้งไว้ให้หม้อค่อยๆ เย็นลงโดยการดับไฟจนความดันภายในหม้อเหลือไม่เกิน 5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว แล้วค่อยๆ เปิดลิ้นนิรภัย (safety vale) ให้ไอออกหมดจึงเปิดฝาออก อย่าเปิดลิ้นนิรภัยทันทีหลังจากที่นึ่งฆ่าเชื้อเสร็จเพราะจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อราเดือดแล้วดันสำลีที่อุดจุกไว้หลุดขณะที่ไอน้ำพุ่งออกจากลิ้นนิรภัย

การฆ่าเชื้อด้วยการกรอง (sterilization by filtration) วิธีนี้เหมาะสำหรับใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เสื่อมสลายตัวได้ง่าย เมื่อถูกความร้อนเช่น สารพวกฮอร์โมน และวิตามินบางชนิด เครื่องกรองที่ใช้จะต้องมีประสิทธิภาพดีสามารถนำจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ยกเว้นไวรัสออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เช่น เครื่องกรองแบคทีเรีย เป็นต้น

วิธีทางเคมี (chemical methods)

การฆ่าเชื้อด้วยวิธีทางเคมีเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมและใช้ได้ผลมากพอสมควร แต่มีข้อเสียอยู่ที่ว่าสารเคมีบางชนิดเป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และพืช สารเคมีบางชนิดราคาค่อนข้างแพง อย่างไรก็ดีการนำวิธีการฆ่าเชื้อทางเคมีมาใช้กับวิชาเชื้อราวิทยาสามารถกระทำได้ดังนี้

2.1 การใช้สารโปรไพลีนอ๊อกไซด์ (propylene oxide) ฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของวุ้น โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นลงบนจานเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตรแล้วเอียงให้อาหารกระจายทั่วจานเลี้ยงเชื้ออย่างสม่ำเสมอ ปล่อยให้อาหารแข็งตัวเติมสารโปรไพลีนอ๊อกไซด์ 1 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อเมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงนำจานเลี้ยงเชื้อนั้นไปใช้ต่อ

2.2 การฆ่าเชื้อบนโต๊ะปฏิบัติการ โดยการใช้เอทธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ หรือสารประกอบของเกลือแคลเซียม หรือโซเดียมฮายโปคลอไรท์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ชุบสำลีทำความสะอาดบริเวณพื้นโต๊ะปฏิบัติการ

2.3 การฆ่าเชื้อในตู้ย้ายเชื้อ สารเคมีที่ใช้คือ ด่างทับทิม 5 กรัม ผสมฟอร์มาลินเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แล้วปล่อยทิ้งไว้ 5 วัน จึงใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ 3
การคำนวณปริมาณของสารสกัด ในจานเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณสารสกัดในจานเลี้ยงเชื้อ

สารละลายสารสกัดผสมอาหาร PDA 20 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 100 ppm. (1 g/L)

ในอาหาร PDAผสมสารสกัด 1000 มิลลิลิตร มีสารสกัด 1 กรัม

ในอาหาร PDAผสมสารสกัด 20 มิลลิลิตร มีสารสกัด 1 x 20 / 1000 = 0.02 กรัม

สารละลายสารสกัดผสมอาหาร PDA 20 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 500 ppm. (5 g/L)

ในอาหาร PDA ผสมสารสกัด 1000 มิลลิลิตร มีสารสกัด 5 กรัม

ในอาหาร PDA ผสมสารสกัด 20 มิลลิลิตร มีสารสกัด 5 x 20 / 1000 = 0.1 กรัม

สารละลายสารสกัดผสมอาหาร PDA 20 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 1000 ppm. (10 g/L)

ในอาหาร PDA ผสมสารสกัด 1000 มิลลิลิตร มีสารสกัด 10 กรัม

ในอาหาร PDA ผสมสารสกัด 20 มิลลิลิตร มีสารสกัด 10 x 20 / 1000 = 0.2 กรัม

สารละลายสารสกัดผสมอาหาร PDA 20 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 5000 ppm. (50 g/L)

ในอาหาร PDA ผสมสารสกัด 1000 มิลลิลิตร มีสารสกัด 50 กรัม

ในอาหาร PDA ผสมสารสกัด 20 มิลลิลิตร มีสารสกัด 50 x 20 / 1000 = 1 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ 4
ความรู้เกี่ยวกับลักษณะของพืชสมุนไพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความรู้เกี่ยวกับลักษณะของพืชสมุนไพร [2]

ส่วนประกอบของต้นไม้โดยทั่วไป แบ่งออกเป็น 5 ส่วนคือ ราก ลำต้น ใบ ดอก และผล ส่วนของต้นไม้เหล่านี้มี รูปร่าง ลักษณะ โครงสร้าง และบทบาทต่อต้นพืชที่แตกต่างกันไป ราก ลำต้นและใบ เป็นส่วนที่ปรุงอาหารมีบทบาทร่วมกันในการดูดซึมอาหาร ผลิตอาหาร ลำเลียงอาหาร และสะสมอาหารในต้นพืช ทำให้ต้นพืชได้รับอาหารเพื่อเจริญเติบโตต่อไป ส่วนของดอก ผล รวมทั้งเมล็ด เป็นส่วนที่มีบทบาทสืบพันธุ์ทำให้ต้นพืชชนิดนั้นแพร่พันธุ์กระจายจำนวนต่อไป

โครงงานนี้ได้นำใบของพืชมาใช้ในการสกัดสาร ดังนั้นจะกล่าวถึงเฉพาะใบของพืช ก่อนอื่นต้องมาทำความรู้จักกับใบของพืชกันก่อน

ใบ ใบเป็นส่วนประกอบที่สำคัญกับต้นพืชมีหน้าที่สังเคราะห์แสง ผลิตอาหารและเป็นส่วนแลกเปลี่ยนน้ำและอากาศของต้นพืช ใบเกิดจากด้านนอกของกิ่งหรือตากิ่ง ลักษณะที่พบโดยทั่วไปเป็นแผ่นที่มีสีเขียว (สีเขียวเกิดจากสารชื่อคลอโรฟิลล์ อยู่ในใบของพืช) ใบของพืชหลายชนิดใช้เป็นยาสมุนไพรได้ เช่น มะกา ฟ้าทลายโจร กะเพรา ชุมเห็ดเทศ ฝรั่ง มะขามแขก เป็นต้น รูปร่างและลักษณะของใบ ใบที่สมบูรณ์มีส่วนประกอบ 3 ส่วน คือ ตัวใบ ก้านใบและหูใบ ใบที่มีส่วนประกอบครบทั้ง 3 ส่วนเรียกว่า ใบสมบูรณ์ และใบที่มีส่วนประกอบไม่ครบ อาจมีเพียงหนึ่งหรือสองส่วน เรียกว่า ใบไม่สมบูรณ์ ตัวใบมีลักษณะเป็นแผ่น ตัวใบยึดอยู่กับก้านใบด้านล่างของก้านใบติดกับตากิ่ง หูใบติดอยู่กับด้านข้างทั้งสองข้างก้านใบส่วนปลาย หูใบนี้มีบทบาทป้องกันรักษาใบขณะยังอ่อนอยู่ หูใบมักมีขนาดเล็ก และเป็นสีเขียว หากพิจารณาถึงลักษณะของตัวใบจะประกอบด้วย รูปร่างของใบ ปลายใบ ฐานใบหรือโคนใบ ริมใบหรืออาจเรียกว่า หยักใบและอาจสังเกตภายในของตัวใบ เส้นใบและเนื้อของใบ หากต้องการสังเกตลักษณะของใบให้พิจารณาตั้งแต่รูปร่างของใบ ปลายใบ โคนใบ ริมใบ เส้นใบ และเนื้อของใบอย่างละเอียดและอาจเปรียบเทียบกับลักษณะของตัวใบที่คล้ายคลึงกันจะทำให้จำแนกใบได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

ชนิดของใบแบ่งได้เป็น 2 แบบ ใหญ่ๆ คือ

1. แบบใบเดี่ยว คือ ก้านใบอันหนึ่งมีเพียงใบเดียว เช่น กระวาน กานพลู ยอ เป็นต้น
2. แบบใบประกอบ คือ ใบตั้งแต่ 2 ใบขึ้นไปที่เกิดขึ้นบนก้านอันใบเดียวมี มะขามแขก แคบ้าน ขี้เหล็ก เป็นต้น

สิ่งที่น่าสังเกตอีกอย่างของใบ คือ ลักษณะการเรียงตัวของใบที่มีหลายแบบ เช่น เกิดสับหว่างกัน เกิดเป็นคู่ เกิดเป็นกลุ่ม เกิดเป็นวงกลม เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีเส้นใบ โดยทั่วไปเส้นใบมี 2 แบบ คือ แบบขนานและแบบร่างแห รวมทั้งยังมีความแตกต่างของเนื้อใบ เนื้อใบมีหลายอย่าง เช่น แบบหนัง แบบหญ้า แบบกระดาษ แบบอมน้ำ หากสังเกตตัวใบควรสังเกตความหนาบางและความอมน้ำของใบด้วย จะช่วยให้เรารู้จักต้นไม้นั้นดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้