บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสกัดสารต้านเชื้อราและแบคทีเรียจากเปลือกและเมล็ดของผลลำไย

จากการนำผลลำไยในช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ มาสกัดสารต้านเชื้อราและแบคทีเรีย โดยใช้เปลือกและเมล็ดลำไย 400 กรัมนั้นจะใช้จำนวนผลในแต่ละอายุการเก็บเกี่ยวต่างกันไปเนื่องจากขนาดของผลแตกต่างกันดังภาพที่ 1

ภาพที่ 1 ผลลำไยช่วงอายุต่าง ๆ

ภาพที่ 2 เปลือกและเมล็ดลำไยที่นำมาสกัด

ลำไยในช่วงอายุต่าง ๆ เมื่อนำมาสกัดด้วยเอทานอล 95 % ระเหย solvent ออกที่สภาพความดันต่ำแล้วได้สารสกัดหยาบ (crude extract)ปรากฏว่าในเปลือกนั้นสารสกัดหยาบที่ได้มีสีเขียวลักษณะหนืดคล้ายน้ำมันส่วนเมล็ดมีสีน้ำตาลขุ่นลักษณะหนืดเช่นเดียวกับในเปลือกดังภาพที่ 3

ภาพที่ 3 สารสกัดหยาบจากเปลือกและเมล็ดลำไย

เมื่อนำผลลำไยช่วงอายุต่าง ๆ มาสกัดและระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำแล้วนำไปชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบจากเปลือกและเมล็ดได้น้ำหนักแตกต่างกันคือ สารสกัดจากเมล็ดจากลำไยช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ มีปริมาณมากกว่าสารสกัดหยาบจากเปลือก โดยสารสกัดหยาบจากเปลือกที่สกัดจากลำไยช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ มีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์ หลังเก็บเกี่ยว 3 วัน ช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์ อายุเก็บเกี่ยว และช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบจากเมล็ดนั้นช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ มีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือที่อายุเก็บเกี่ยว ช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์ หลังเก็บเกี่ยว 3 วัน ช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์ และช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์ ตามลำดับดังตารางที่ 8

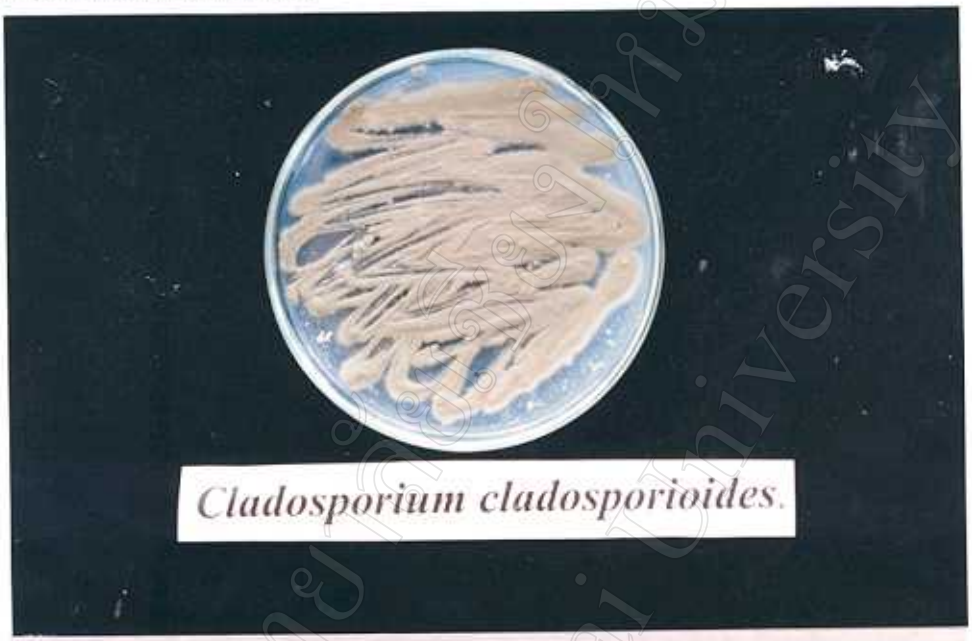
ตารางที่ 8 น้ำหนักของสารสกัดหยาบช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ จากเปลือกและเมล็ด 400 กรัม

ลำไยช่วงอายุต่าง ๆ	น้ำหนักสารสกัดหยาบจากเปลือก (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดหยาบจากเมล็ด (กรัม)	จำนวนผลลำไยที่ใช้		เส้นผ่าศูนย์กลางของผลลำไย (ซม.)
			เมล็ด	เปลือก	
ก่อนเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์	21.12	37.68	410	450	1.59 + 0.064
ก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์	18.48	24.94	241	275	2.05 + 0.119
ก่อนเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์	19.22	20.21	159	175	2.20 + 0.219
ก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์	14.76	20.38	150	170	2.54 + 0.088
อายุเก็บเกี่ยว	16.47	25.37	145	167	2.65 + 0.048
หลังเก็บเกี่ยวบ่ม 3 วัน	18.96	21.77	144	170	2.65 + 0.048

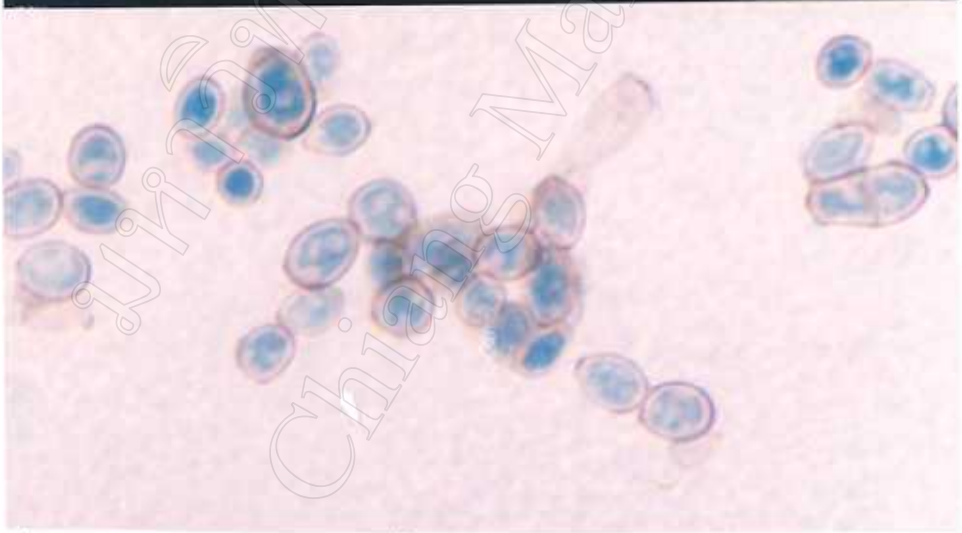
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

4.2 เตรียมเชื้อราและแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดสอบสารสกัด

จากการเตรียมเชื้อราและแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดสอบสารสกัดเชื้อราและแบคทีเรียต่าง ๆ มีลักษณะดังภาพที่ 4-8



A



B

ภาพที่ 4 A : ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* อายุ 7 วัน เส้นใยมีสีเขียวเมื่อแก่มีสีเขียวขี้ม้า เส้นใยไม่ฟู

B : ลักษณะโคนิเดียของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* กำลังขยาย 1,000 เท่าโคนิเดียมีสีเข้มมีผนังกั้นตามขวาง อาจมี 1 เซลล์หรือ 2 เซลล์ มีลักษณะภาพทรงหลายแบบเช่น ภาพวงรี ภาพเรียวรีคล้ายเมล็ดข้าวสาร

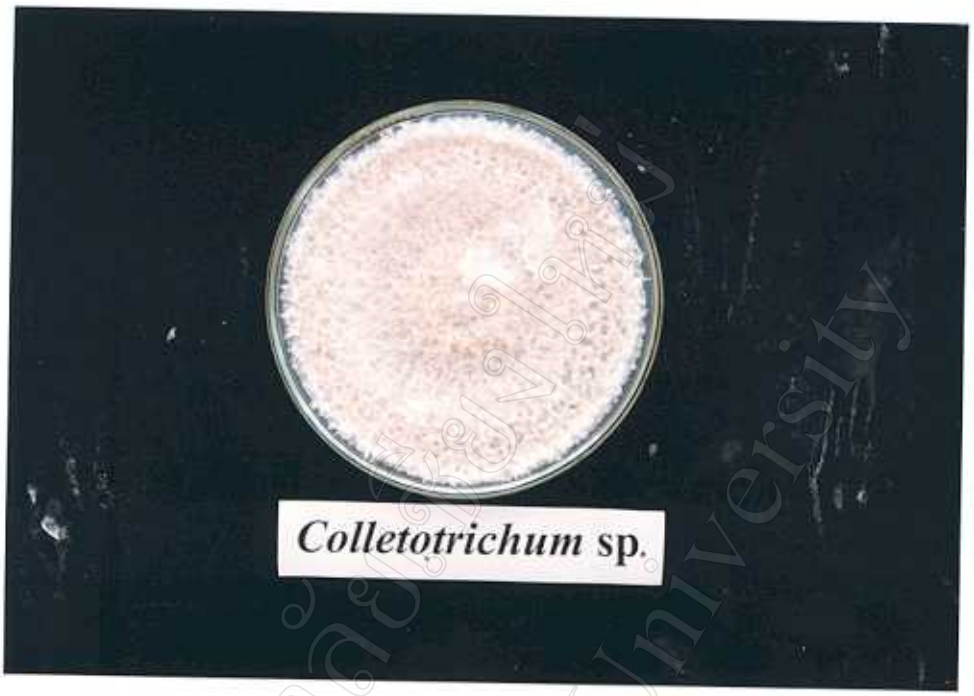
A

B

ภาพที่ 5 A : ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. อายุ 7 วัน เส้นใยมีสีขาว ไม่ฟู เมื่อแก่จะสร้างสปอร์ลักษณะเป็นของเหลวสีดำ

B : ลักษณะโคนีเดียของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. กำลังขยาย 400 เท่า โคนีเดียมีลักษณะสีเข้ม มีหลายเซลล์ ภาพทรงยาวเรียวรี มีระยางค์ที่ปลาย 2 เส้น หรือมากกว่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

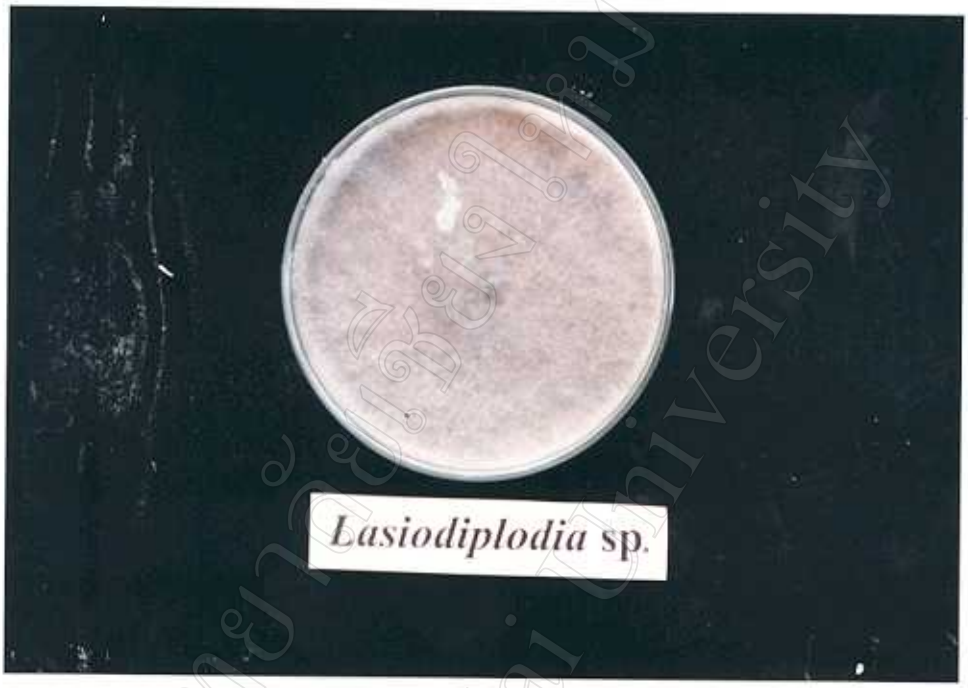


A

B

ภาพที่ 6 A : ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. อายุ 7 วัน
เส้นใยมีสีขาวไม่ฟูมากเมื่อแก่จะสร้างโคนีเดียลักษณะเป็นของเหลวสีส้ม
B : ลักษณะโคนีเดียของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. กำลังขยาย 400 เท่า
โคนีเดียมีลักษณะใส รูปทรงยาวเรียวรี ตรงกลางเซลล์มีสีเข้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. อายุ 7 วัน เส้นใยมีสีขาว ฟูมาก เมื่อแก่เส้นใยจะสีเข้มขึ้นเป็นสีเทาดำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

A

B

ภาพที่ 8 A : ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Seratia marcescens* อายุ 3 วัน มีสีชมพูเข้มถึงสีแดง

B : ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* อายุ 3 วัน มีสีเทา

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

4.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียบนผลลำไยหลังการเก็บเกี่ยวของสารสกัดจากผลลำไยในช่วงอายุต่าง ๆ ก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว

4.3.1 การหาข้อมูลเบื้องต้น

การงอกของสปอร์เชื้อราในน้ำกลั่น

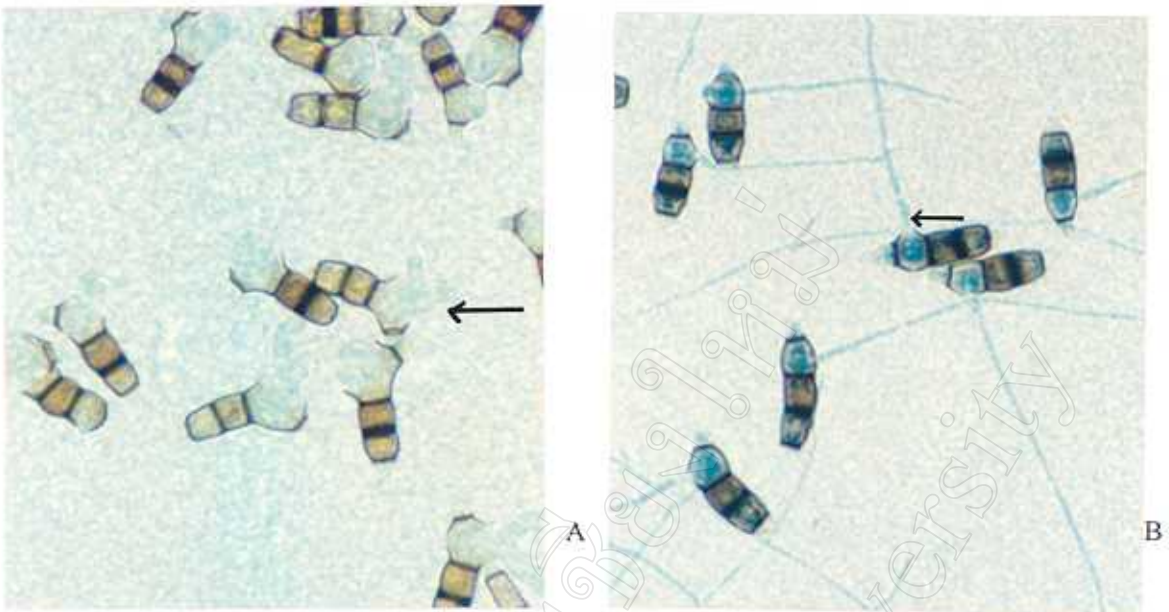
จากการหาจำนวนชั่วโมงการงอกของสปอร์เชื้อราชนิดต่าง ๆ ที่ตรวจพบหลังการบ่มเชื้อผลปรากฏว่าเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ใช้เวลามากที่สุดคือ 10 ชั่วโมง เชื้อรา *Colletotrichum* sp. ใช้เวลา 7 ชั่วโมง และเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ใช้เวลา 6 $^{1}/_{2}$ แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 จำนวนชั่วโมงที่ตรวจพบสปอร์งอกหลังการบ่มเชื้อ

ชนิดเชื้อรา	จำนวนชั่วโมง
Cladosporium cladosporioides	10
Colletotrichum sp.	7
Pestalotiopsis sp.	6 $^{1}/_{2}$

การทดสอบสารสกัดหยาบกับสปอร์เชื้อรา

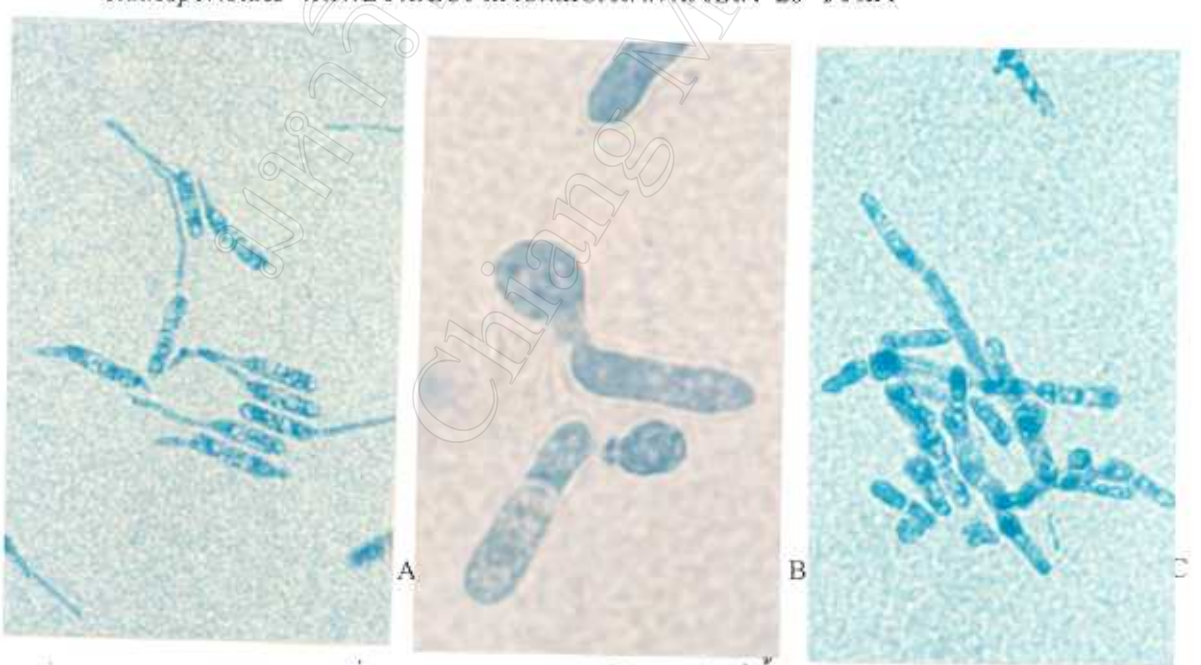
จากการทดสอบเพื่อหาจำนวนชั่วโมงที่สารสกัดชะลอการงอกของสปอร์เชื้อรา ผลปรากฏว่าในเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. สปอร์ของเชื้อราจะเริ่มงอกเมื่อ 6 $^{1}/_{2}$ ชั่วโมงและเกิดการงอกแบบผิดปกติโดยมีลักษณะ germ tube ที่บวมเมื่อเทียบกับการงอกในน้ำกลั่นของสปอร์เชื้อรา ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 A : ลักษณะ germ tube ที่ผิดปกติ (ศรชี้) ของสปอร์เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.

B : ลักษณะ germ tube ที่งอกปกติ (ศรชี้) ของสปอร์เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.

เมื่อทดสอบสารสกัดหยาบกับเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เพื่อหาจำนวนชั่วโมงที่สารสกัดสามารถชะลอการงอกของสปอร์ผลปรากฏว่าสปอร์ของเชื้อราเริ่มงอกเมื่อ 8 ชั่วโมงและสปอร์เชื้อรางอกผิดปกติโดยสร้าง appressorium และ germ tube ที่บวมดังภาพที่ 10 ส่วนเชื้อ *Cladosporium cladosporioides* นั้นพบว่าสปอร์ไม่งอกเมื่อเวลาผ่านไปถึง 20 ชั่วโมง



ภาพที่ 10 A : การงอกปกติของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* sp.

B : การงอก appressorium ของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* sp.

C : อาการบวมของ germ tube ของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* sp.

การวัดเปอร์เซ็นต์การงอกและ appressorium ของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* sp. เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากเปลือกและเมล็ด พบว่าสปอร์เชื้อราจะงอกเมื่อเวลา 8 ชั่วโมง โดยสารสกัดจากเปลือกจะทำให้เกิด appressorium เมื่อเวลา 8-9 ชั่วโมง สปอร์งอก germ tube ที่บวมเมื่อเวลา 10-13 ชั่วโมง และไม่พบสปอร์ที่งอก germ tube ปกติ ส่วนสารสกัดจากเมล็ดนั้นไม่พบสปอร์ที่งอก germ tube บวมและสปอร์ที่งอกปกติ แต่สปอร์เกิด appressorium เมื่อเวลา 8-13 ชั่วโมง แต่ในเอทานอล และน้ำนั้น สปอร์เชื้อราจะงอกเมื่อเวลา 7 ชั่วโมง และมีเปอร์เซ็นต์การงอกอย่างปกติเพิ่มขึ้นเมื่อเวลานานขึ้น และไม่เกิด appressorium หรือสปอร์ที่งอก germ tube บวม ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การงอกและ appressoriumของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* sp.

จำนวนชั่วโมง	เปลือก		เมล็ด		เอทานอล		น้ำ	
	appressorium	ปกติ	appressorium	ปกติ	appressorium	ปกติ	appressorium	ปกติ
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	54	0	51
8	74	0	60	0	0	50	0	60
9	80	0	50	0	0	70	0	90
10	*	0	55	0	0	98	0	78
11	*	0	65	0	0	95	0	80
12	*	0	64	0	0	78	0	95
13	*	0	70	0	0	99	0	98

* คือลักษณะการงอกของสปอร์ที่ germ tube บวม

การทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกับการงอกของสปอร์เชื้อรา

จากการนำสารสกัดหยาบจากลำไยช่วงอายุเก็บเกี่ยวความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ความเข้มข้นต่างกัน 10 ลำดับ คือ 1/10, $1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$, $1/10^5$, $1/10^6$, $1/10^7$, $1/10^8$, $1/10^9$ และ $1/10^{10}$ กรัม / มิลลิลิตร ทดสอบกับสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ผลปรากฏว่าสปอร์จะงอก

เมื่อใช้ความเข้มข้นของเปลือก $1/10^4$ และความเข้มข้นของเมล็ด $1/10^6$ โดยสปอร์มีลักษณะการงอกที่ปกติและเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลปรากฏว่าในเอทานอลสปอร์งอก 98 % และในน้ำสปอร์งอก 95 % ผลการวัดเปอร์เซ็นต์การงอกแสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อรา *Collectotrichum* sp. โดยใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกและเมล็ดลำไยความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (กรัม/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์	
	เปลือก	เมล็ด
1/10	0	0
$1/10^2$	0	0
$1/10^3$	0	0
$1/10^4$	50	0
$1/10^5$	52	0
$1/10^6$	60	56
$1/10^7$	65	55
$1/10^8$	73	78
$1/10^9$	90	92
$1/10^{10}$	97	87

4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบบนผลลำไย

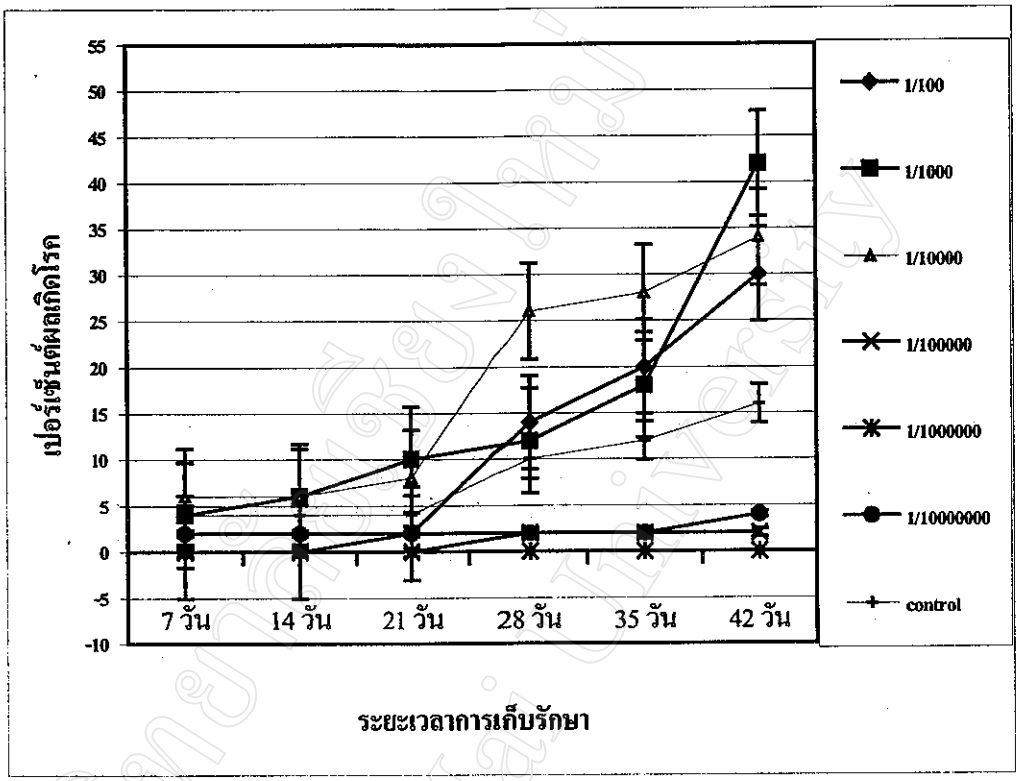
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบบนผลลำไยโดยใช้สารความเข้มข้นต่าง ๆ

เมื่อนำสารสกัดหยาบความเข้มข้นต่างๆมาทดสอบบนผลลำไยแล้วตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโดยแยกตามระดับอาการผลปรากฏว่าในระยะเวลาการเก็บรักษาตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเมื่อทดสอบกับสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แต่ในสัปดาห์ที่ 4 เริ่มมีความแตกต่างกันคือ ในสัปดาห์ที่ 4, 5 ค่าเฉลี่ยผลที่เกิดโรคเมื่อใช้สารสกัดความเข้มข้น $1/10^4$ มีมากที่สุด โดยไม่แตกต่างทางสถิติกับสารสกัดเข้มข้น $1/10^2$, $1/10^3$ และ control แต่แตกต่างทางสถิติกับความเข้มข้น $1/10^5$, $1/10^6$ $1/10^7$ ส่วนสัปดาห์ที่ 6 นั้นค่าเฉลี่ยผลที่เกิดโรคเมื่อใช้สารสกัดเข้มข้น $1/10^3$ มีมากที่สุดโดยไม่แตกต่างทางสถิติกับ $1/10^2$, $1/10^4$ แต่แตกต่างทางสถิติกับสารสกัดเข้มข้น $1/10^5$, $1/10^6$, $1/10^7$ และ control ดังแสดงในตารางที่ 12 และภาพที่ 11

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเมื่อทดสอบกับสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร	% ผลที่เกิดโรค					
	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน	35 วัน	42 วัน
$1/10^2$	0	0	2	14^{ab*}	20^{ab}	30^{bc}
$1/10^3$	4	6	10	12^{ab}	18^{ab}	42^{c}
$1/10^4$	6	6	8	26^{b}	28^{b}	34^{bc}
$1/10^5$	0	0	0	2^{a}	2^{a}	2^{a}
$1/10^6$	0	0	0	0^{a}	0^{a}	0^{a}
$1/10^7$	2	2	2	2^{a}	2^{a}	4^{a}
control	4	4	4	10^{ab}	12^{ab}	16^{ab}

* ตัวเลขค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



Bars indicate standard errors

ภาพที่ 11 การเกิดโรคบนผลลำไยในระหว่างการเก็บรักษา 42 วัน โดยใช้สารสกัดหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ

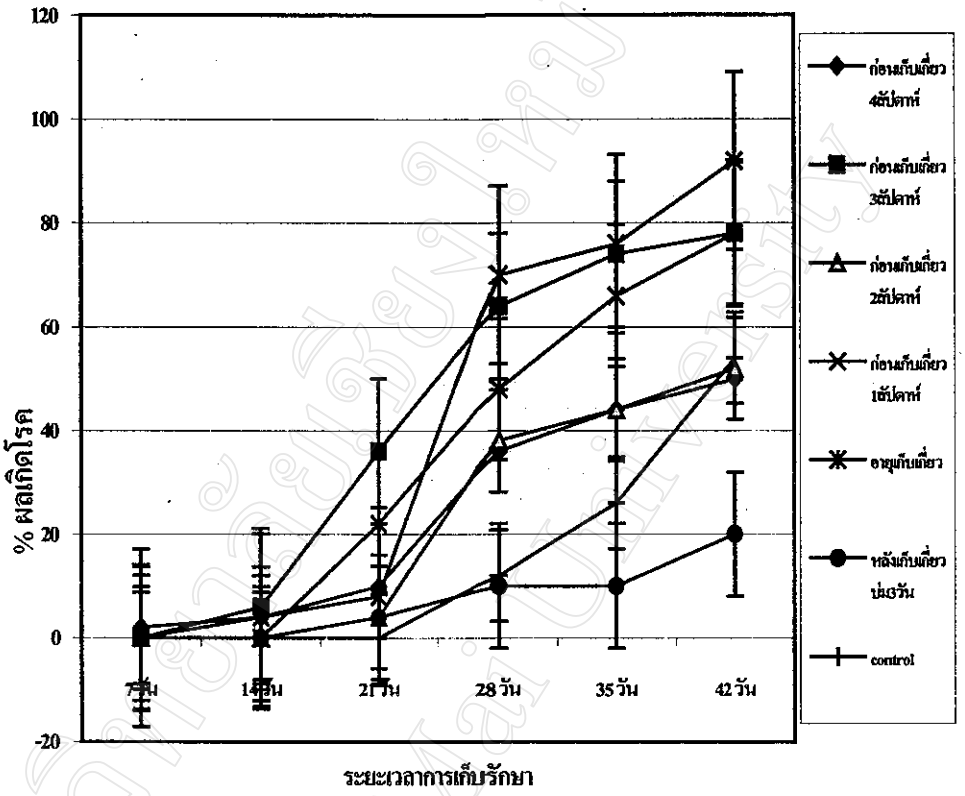
เมื่อนำสารสกัดหยาบจากช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ มาทดสอบบนผลลำไยแล้วตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแยกตามระดับอาการผลปรากฏว่าในระยะการเก็บรักษาสัปดาห์ที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แต่เริ่มมีความแตกต่างกันที่สัปดาห์ที่ 2 คือ สัปดาห์ที่ 2, 3 มีค่าเฉลี่ยผลที่เกิดโรคมากที่สุดเมื่อใช้สารสกัดจากลำไยช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์ แต่ในสัปดาห์ที่ 4, 5 และ 6 มีค่าเฉลี่ยผลที่เกิดโรคมากที่สุดเมื่อใช้สารสกัดจากลำไยช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์ ซึ่งจำนวนผลที่เกิดโรคมีมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญกับชุดที่ใช้สารสกัดจากลำไยช่วงอายุหลังการเก็บเกี่ยว 3 วันและชุด control ดังแสดงในตารางที่ 13 และภาพที่ 12

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนผลลำไยเมื่อทดสอบกับสารสกัดช่วงอายุต่าง ๆ

ช่วงอายุเก็บเกี่ยวต่าง ๆ	% ผลที่เกิดโรค					
	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน	35 วัน	42 วัน
ก่อนเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์	2	4^{ab*}	10^{ab}	36^{ab}	44^{ab}	50^{ab}
ก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์	0	6^{b}	36^{c}	64^{bc}	74^{b}	78^{bc}
ก่อนเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์	0	0^{a}	4^{ab}	38^{abc}	44^{ab}	52^{ab}
ก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์	0	4^{ab}	8^{ab}	70^{c}	76^{b}	92^{c}
อายุเก็บเกี่ยว	0	0^{a}	22^{bc}	48^{bc}	66^{b}	78^{bc}
หลังเก็บเกี่ยว 3วัน	0	0^{a}	4^{ab}	10^{a}	10^{a}	20^{a}
Control	0	0^{a}	0^{a}	12^{a}	26^{a}	54^{b}

* ตัวเลขค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



Bars indicate standard errors

ภาพที่ 12 การเกิดโรคบนผลลำไยในระหว่างการเก็บรักษา 42 วัน เมื่อใช้สารสกัดหยาบช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ

4.3.3 การแยกเชื้อโรคที่เกิดขึ้นหลังการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบบนผลลำไย

หลังจากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบบนผลลำไยแล้วสุ่มลำไยที่เกิดอาการโรค โดยเส้นใยของเชื้อราที่ขั้วผลแล้วลุกลามไปทั่วผลทำให้เกิดอาการของโรคลักษณะต่าง ๆ คือ มีเส้นใยเชื้อราสีขาวไม่ฟูหลังจากนั้นเกิดของเหลวสีดำขึ้นบนเส้นใย เส้นใยสีขาวปนเหลือโดยเส้นใยมีลักษณะค่อนข้างฟู และเส้นใยมีสีขาวฟูค่อนข้างหนา ดังแสดงในภาพที่ 13 และภาพที่ 14

ภาพที่ 13 เส้นใยของเชื้อราที่เกิดขึ้นที่ขั้วผลลำไย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

A

B

C

ภาพที่ 14 ลักษณะอาการต่าง ๆ ที่เกิดบนผลลำไย

A : เส้นใยสีขาวไม่ฟูมีของเหลวสีดำปรากฏ B : เส้นใยขาวปนเหลืองฟู

C : เส้นใยสีขาวเส้นใยค่อนข้างหนา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ผลจากการแยกเชื้อที่เกิดขึ้นบนผลลำไยบนอาหารวุ้นผลปรากฏว่าพบเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Colletotrichum* sp. และ unknow 2 ชนิดดังภาพที่ 15

ภาพที่ 15 ลักษณะเชื้อ unknow

unknow A : เชื้อมีเส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อยและโคนีเดียมีลักษณะรีมีผนังกั้น

unknow B : เชื้อมีเส้นใยสีขาวเจริญเป็นวงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและโคนีเดียมีลักษณะเป็นเส้นโค้ง (ศรชี้)

4.4 การตรวจหาแถบสารต้านเชื้อราและแบคทีเรียโดยวิธี TLC-bioassay

จากการนำสารสกัดหยาบจากข้อ 3.1 มาละลายในส่วนผสมของไดคลอโรมีเทนและน้ำกลั่นแล้วนำส่วนที่ละลายในไดคลอโรมีเทนมาสกัดเอาน้ำออกและระเหยไดคลอมีเทนออกให้แห้งได้สารสกัดส่วนที่ 1 ซึ่งสารสกัดจากเปลือกมีสีเขียวเข้ม ส่วนสารสกัดจากเมล็ดมีสีน้ำตาลเข้ม

ส่วนสารสกัดที่ละลายในน้ำเมื่อนำมาทำละลายในเอทิลอาซิเตทและน้ำกลั่นแล้วนำส่วนที่ละลายในเอทิลอาซิเตทมาสกัดเอาน้ำออกและระเหยเอทิลอาซิเตทออกให้แห้งได้สารสกัดส่วนที่ 2 ซึ่งสารสกัดจากเปลือกมีสีเขียวอ่อน ส่วนสารสกัดจากเมล็ดมีสีน้ำตาลอ่อน โดยใช้สารสกัดดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ปริมาณสารสกัดที่ใช้ในการตรวจสอบโดยวิธี TLC-bioassay

ลำไยช่วงอายุต่างๆ	ปริมาณสารสกัดส่วนที่ 1 (กรัม)		ปริมาณ Crude ที่ใช้ (กรัม)		ปริมาณสารสกัดส่วนที่ 1 เมื่อเทียบกับ Crude ที่สกัดจากเปลือกและเมล็ด 400 กรัม	
	เปลือก	เมล็ด	เปลือก	เมล็ด	เปลือก	เมล็ด
ก่อนเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์	1.055	1.202	12.266	15.000	1.817*	3.019
ก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์	1.490	1.393	12.225	15.020	2.252	2.313
ก่อนเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์	1.553	1.081	12.110	15.010	2.465	1.455
ก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์	1.170	1.336	11.540	15.118	1.496	1.801
เก็บเกี่ยว	1.180	1.070	19.990	20.060	0.972	1.353
หลังเก็บเกี่ยว 3 วัน	1.060	1.470	12.342	15.049	1.628	2.165

* วิธีการคำนวณผลการทดลอง

จาก crude จากเปลือกที่ใช้ 12.266 กรัม ได้สารสกัดส่วนที่ 1 1.055 กรัม

ดังนั้นปริมาณ crude จากเปลือกทั้งหมด 21.12 กรัม ได้สารสกัดส่วนที่ 1 = $\frac{21.12 \times 1.055}{12.266}$ กรัม

= 1.817 กรัม

เมื่อนำสารสกัดส่วนที่ 1 จากเปลือกและเมล็ดไปจุดบนแผ่นซิลิกาเจลและ develop ในตัวทำละลายตัวพาชนิดที่ 1 และ 2 สารสกัดจะแยกตัวเป็นชั้นดังภาพที่ 16-17

ภาพที่ 16 สารสกัดจากเปลือกและเมล็ดที่แยกชั้นในตัวทำละลายตัวพาชนิดที่ 1 ประกอบด้วย dichloromethane : methanol อัตราส่วน 95 : 5

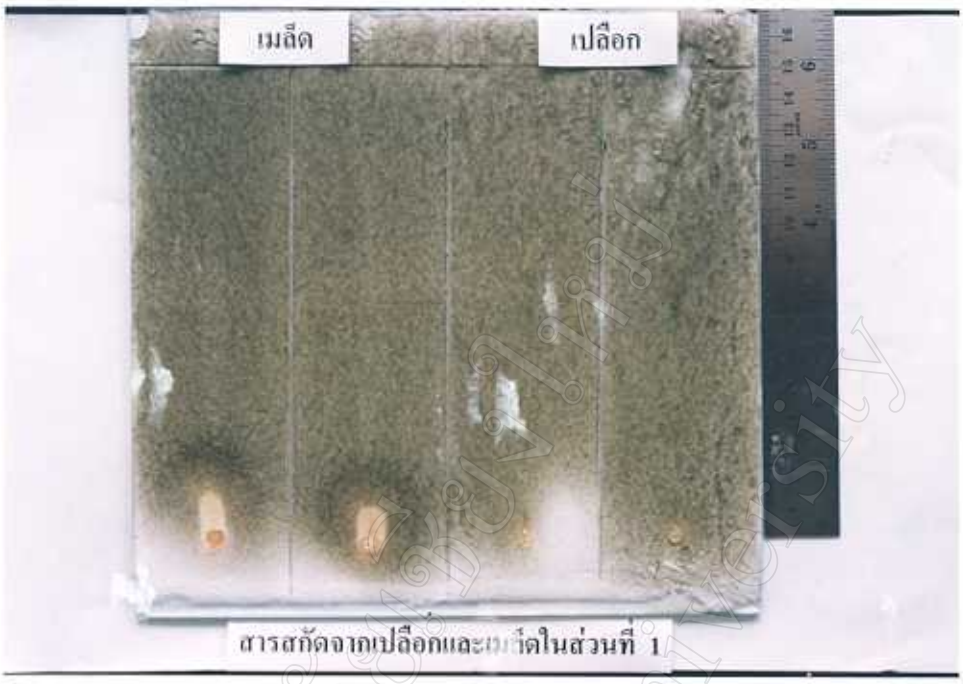
ภาพที่ 17 สารสกัดจากเปลือกและเมล็ดที่แยกชั้นในตัวทำละลายตัวพาชนิดที่ 2 ประกอบด้วย hexane : ethylacetate : methanol สัดส่วน 60 : 40 : 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

เมื่อนำสารสกัดส่วนที่ 2 จากเปลือกและเมล็ดไปจุดบนแผ่นซิลิกาเจลและ develop ในตัวทำละลายชนิดที่ 3 สารสกัดจะแยกตัวเป็นชั้นดังภาพที่ 18 และเมื่อ spray ด้วยเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* และแบคทีเรีย *Seratia marcescens* ไม่พบแถบยับยั้งเชื้อ

ภาพที่ 18 สารสกัดจากเปลือกและเมล็ดที่แยกชั้นในตัวทำละลายตัวพาชนิดที่ 3 ประกอบด้วย ethylacetate

หลังจากนั้นนำแผ่น TLC-plate ที่ develop แล้วไปสเปรย์สารแขวนลอย (Suspension) ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* และเชื้อแบคทีเรีย *Seratia marcescens* นำไปบ่มในกล่องบ่มเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ปรากฏว่าสารสกัดทั้งเปลือกและเมล็ดนั้นไม่พบแถบยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ส่วนสารสกัดที่สเปรย์เชื้อราปรากฏว่ามีแถบยับยั้งการเจริญของเชื้อราเกิดขึ้นชัดเจนมีลักษณะสีน้ำตาลอ่อนและสีเทาโดยมี Rf ช่วง 0-0.1 เกิดขึ้นในสารสกัดส่วนที่ 1 เมื่อใช้ solvent ชนิดที่ 1 ดังภาพที่ 19-20



ภาพที่ 19 แถบยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* เมื่อจุดสารสกัดส่วนที่ 1 เป็นจุดเดียวบน TLC-plate และ develop ด้วยตัวทำละลายตัวพา hexane : ethylacetate : methanol สัดส่วน 60 : 40 : 1

ภาพที่ 20 แถบยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* เมื่อจุดสารสกัดส่วนที่ 1 เป็นแถวบน TLC-plate และ develop ด้วยตัวทำละลายตัวพา hexane : ethylacetate : methanol สัดส่วน 60 : 40 : 1

4.5 การเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดจากลำไยอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ

เมื่อนำสารสกัดส่วนที่ 1 ซึ่งสกัดจากลำไยในช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ มาจุดบนแผ่น TLC – plate และสเปรย์สปอร์เชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* แล้วบ่มไว้ในกล่องบ่มเชื้อ 3 วันผลปรากฏ เกิดวงต้านการเจริญของเชื้อราบนแผ่น TLC-plate ที่จุดสารสกัดส่วนที่ 1 ไว้ ทุกช่วงอายุการเก็บเกี่ยวของลำไย โดยมีความกว้างของวงต้านเชื้อราที่แตกต่างกันคือ สารสกัดจากเมล็ดช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ จะมีความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางวงต้านเชื้อมากกว่าสารสกัดจากเปลือก และจะเห็นได้ว่าในเปลือกนั้นสารสกัดจากลำไยช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์ มีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงต้านเชื้อกว้างที่สุดรองลงมาคือ ช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์ ช่วงอายุเก็บเกี่ยว ช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์ 1 สัปดาห์ และช่วงหลังอายุเก็บเกี่ยว 3 วัน ตามลำดับ ส่วนในเมล็ดนั้นสารสกัดจากเมล็ดช่วงอายุหลังเก็บเกี่ยว 3 วัน มีความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางวงต้านเชื้อมากที่สุด รองลงมาคือ ช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์, 1 สัปดาห์, 2 สัปดาห์, 4 สัปดาห์ และที่ช่วงอายุเก็บเกี่ยวตามลำดับ โดยช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์ และอายุก่อนเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ มีความกว้างของวงต้านเชื้อเท่ากันดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการเปรียบเทียบสารสกัดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

ลำไยในช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ	สารสกัดส่วนที่ 1 (มก.)		ปริมาณสารสกัดใน 50 ไมโครลิตร (มก.)		เส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมที่ต้านเชื้อรา (มม.)	
	เปลือก	เมล็ด	เปลือก	เมล็ด	เปลือก	เมล็ด
ก่อนเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์	120	110	6.0*	5.5	6.33	10.33
ก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์	120	110	6.0	5.5	8.00	11.66
ก่อนเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์	100	100	5.0	5.0	6.66	10.33
ก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์	110	100	5.5	5.0	12.33	10.67
อายุเก็บเกี่ยว	80	70	4.0	3.5	7.66	10.00
หลังอายุเก็บเกี่ยว 3 วัน	100	100	5.0	5.0	4.00	14.67
Control solvent	0	0	0	0	0	0

* วิธีการคำนวณผลการทดลอง

ปริมาณสาร 1,000 ไมโครลิตร (1 มิลลิลิตร) มีเนื้อส่วนสกัดอยู่ 120 มิลลิกรัม

ถ้าในปริมาณสาร 50 ไมโครลิตรมีเนื้อสารสกัดอยู่ $\frac{120 \text{ มิลลิกรัม} \times 50 \text{ ไมโครลิตร}}{1,000 \text{ ไมโครลิตร}} = 6$ มิลลิกรัม

เมื่อนำเส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมต้านเชื้อไปเปรียบเทียบโดยคำนวณจากปริมาณ crude ทั้งหมดที่สกัดจากเปลือกและเมล็ด 400 กรัม (แสดงปริมาณของสารสกัดในตารางที่ 8) และต่อสารสกัด 1 มิลลิกรัม ผลปรากฏว่า เส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมต้านเชื้อราเมื่อคิดต่อ crude 1 มิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากเปลือกและเมล็ด จะเห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดจะทำให้เกิดวงต้านเชื้อรากว้างกว่าในเปลือก โดยสารสกัดจากเปลือกช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์ มีความกว้างของวงต้านเชื้อรามากที่สุด รองลงมาคือ ช่วงอายุเก็บเกี่ยว ช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์ , 2 สัปดาห์, 4 สัปดาห์ และ ช่วงหลังการเก็บเกี่ยว 3 วัน ตามลำดับ ส่วนในเมล็ด ช่วงอายุหลังการเก็บเกี่ยว 3 วัน มีความกว้างของวงต้านเชื้อรามากที่สุด รองลงมาคือ ช่วงอายุเก็บเกี่ยว ช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์, 3 สัปดาห์, 2 สัปดาห์ และ ช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 16 และภาพที่ 21

ตารางที่ 16 ความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางวงกลมต้านเชื้อรา

อายุการเก็บเกี่ยว	เส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมต้านเชื้อราของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ด 400 กรัม		เส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมต้านเชื้อราต่อ crude 1 มก.	
	เปลือก (มม.)	เมล็ด (มม.)	เปลือก (มม.)	เมล็ด (มม.)
ก่อนเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์	1,916.935*	5,434.200	1.055*	1.800
ก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์	3,001.916	4,903.560	1.333	2.120
ก่อนเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์	3,283.380	3,006.030	1.332	2.066
ก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์	3,354.032	3,843.334	2.242	2.134
อายุเก็บเกี่ยว	1,861.763	3,865.521	1.915	2.857
หลังการเก็บเกี่ยว 3 วัน	1,302.720	6,352.110	0.800	2.934
control	0	0	0	0

* วิธีการคำนวณผลการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ crude ทั้งหมด

ในเนื้อสารสกัดจากเปลือก 6 มิลลิกรัม มีเส้นผ่าศูนย์กลางของสารยับยั้ง 6.33 มิลลิเมตร

ถ้าในเนื้อสาร 1,817 มิลลิกรัม มีเส้นผ่าศูนย์กลางของสารยับยั้ง = $\frac{6.33 \text{ มม.} \times 1,817 \text{ มก.}}{6 \text{ มก.}}$

= 1,916.935 มิลลิเมตร

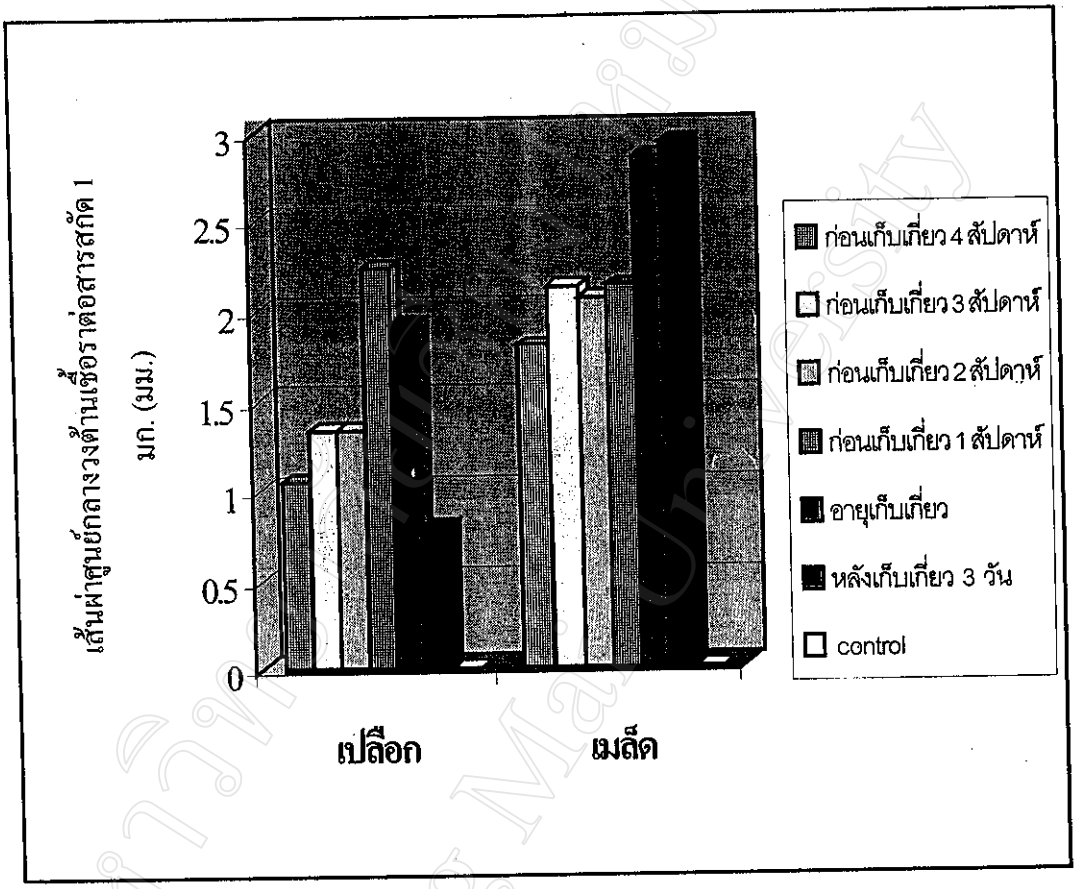
เมื่อเปรียบเทียบกับ crude 1 มิลลิกรัม

ในเนื้อสารสกัดจากเปลือก 1,817 มิลลิกรัมมีเส้นผ่าศูนย์กลางของสารยับยั้ง 1,916.935 มิลลิเมตร

ถ้าในเนื้อสาร 1 มิลลิกรัม มีเส้นผ่าศูนย์กลางของสารยับยั้ง = $\frac{1,916.935 \text{ มม.} \times 1 \text{ มก.}}{1,817 \text{ มก.}}$

= 1.055 มิลลิเมตร

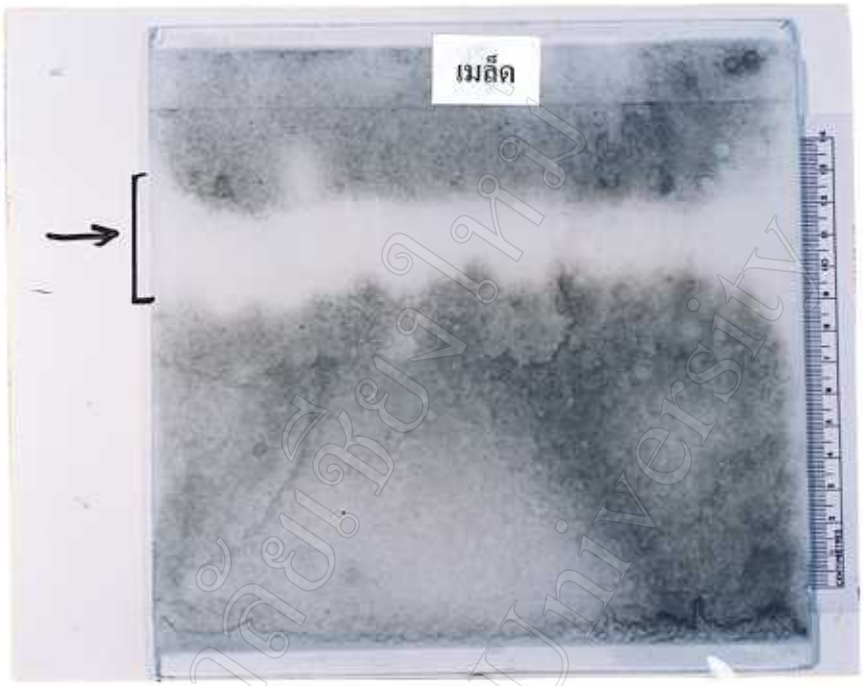
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



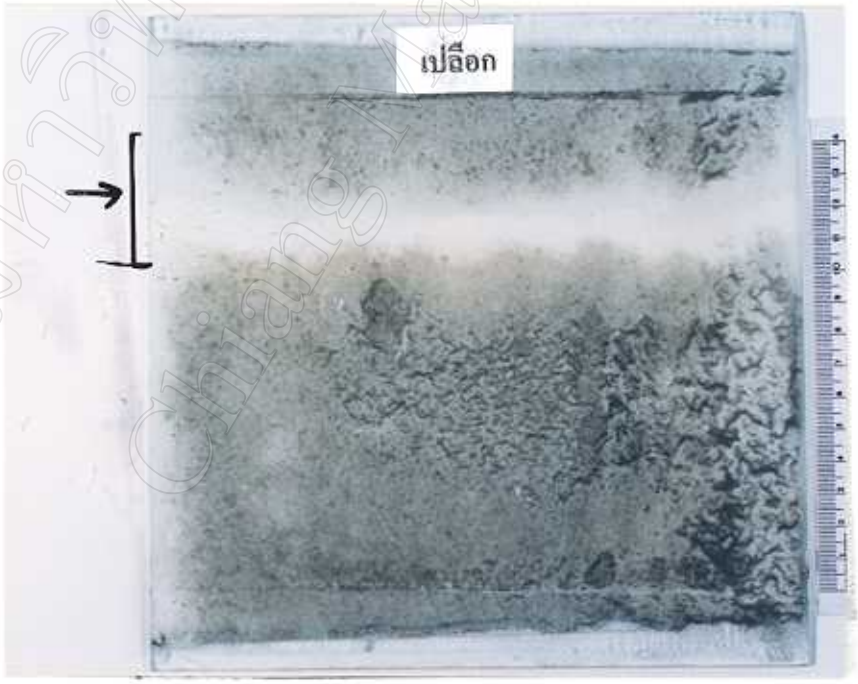
ภาพที่ 21 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงกลมต้านเชื้อราของสารสกัดช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ

4.6 การทำสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราให้บริสุทธิ์ขึ้น

เมื่อขูดเอาซิลิกาเจลในส่วนที่มีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ Rf 0-0.1 ดังแสดงในภาพที่ 20 มาละลายในเมทานอล กรองและระเหยเอาตัวทำละลายออกและนำสารที่เหลือไปจุดบนแผ่นซิลิกาเจลแล้ว develop ในตัวทำละลายตัวพาเมทานอล แล้วนำไปสเปรย์เชื้อราผลปรากฏว่ามีแถบยับยั้งเชื้อราทั้งในเปลือกและเมล็ดโดยในเปลือกมี Rf ช่วง 0.7-0.83 ส่วนในเมล็ดมี Rf ช่วง 0.63-0.83 ดังภาพที่ 22



A



B

ภาพที่ 22 แถบยับยั้ง (ศรชี้) การเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้น A : สารสกัดจากเมล็ด B : สารสกัดจากเปลือก

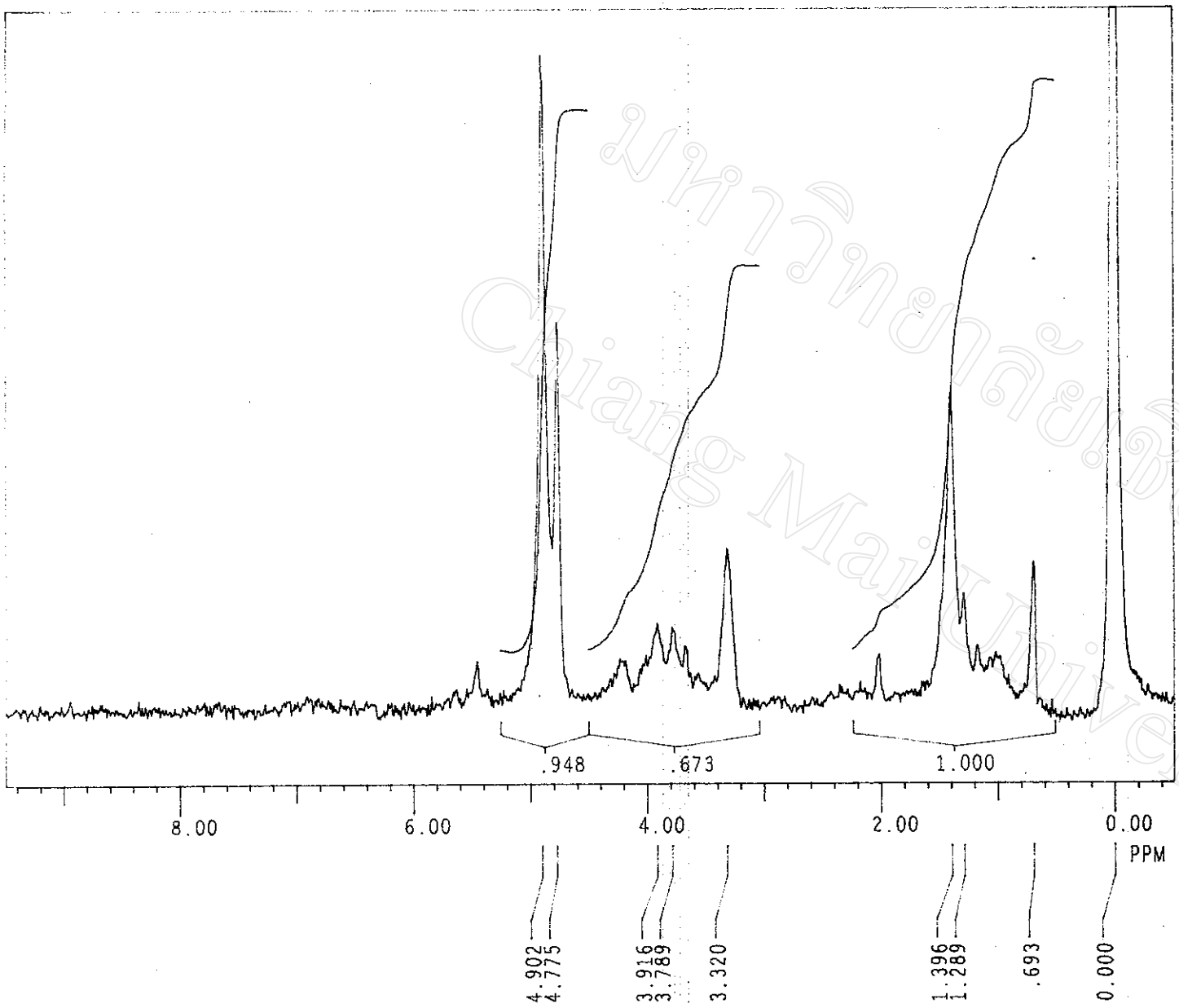
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

4.7 การศึกษาสารที่เป็นองค์ประกอบในแถบสารที่สามารถยับยั้งเชื้อราด้วยเครื่องมือ spectrometer

4.7.1 การวิเคราะห์สารด้วยวิธี ^{1}H-NMR

ผลการวิเคราะห์สารที่สามารถยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี ^{1}H-NMR ปรากฏว่าทั้งในเปลือกและเมล็ดไม่มีพีคที่ δ ประมาณ 7.00 ppm ซึ่งเป็นพีค proton ของ aromatic ดังนั้นสารจึงอาจเป็นพวก aliphatic compound ดังภาพที่ 23-24

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



** ACQUISITION COMMENT **

Sample : UNKNOWN 1

Solvent : METHYL ALCOHOL
Conc. : -
Refer. : TMS
Tube D. : 5 mm
Operator: S.ARARMRUENG
Date : 27/1/1999
Memo : PUK

** ACQUISITION PARAMETER **

Acquis. mode : Normal
Spectrum width : 20 ppm
No. of acquis. : 8
Pulse interval : 5.0 sec
Data point : 4 k point

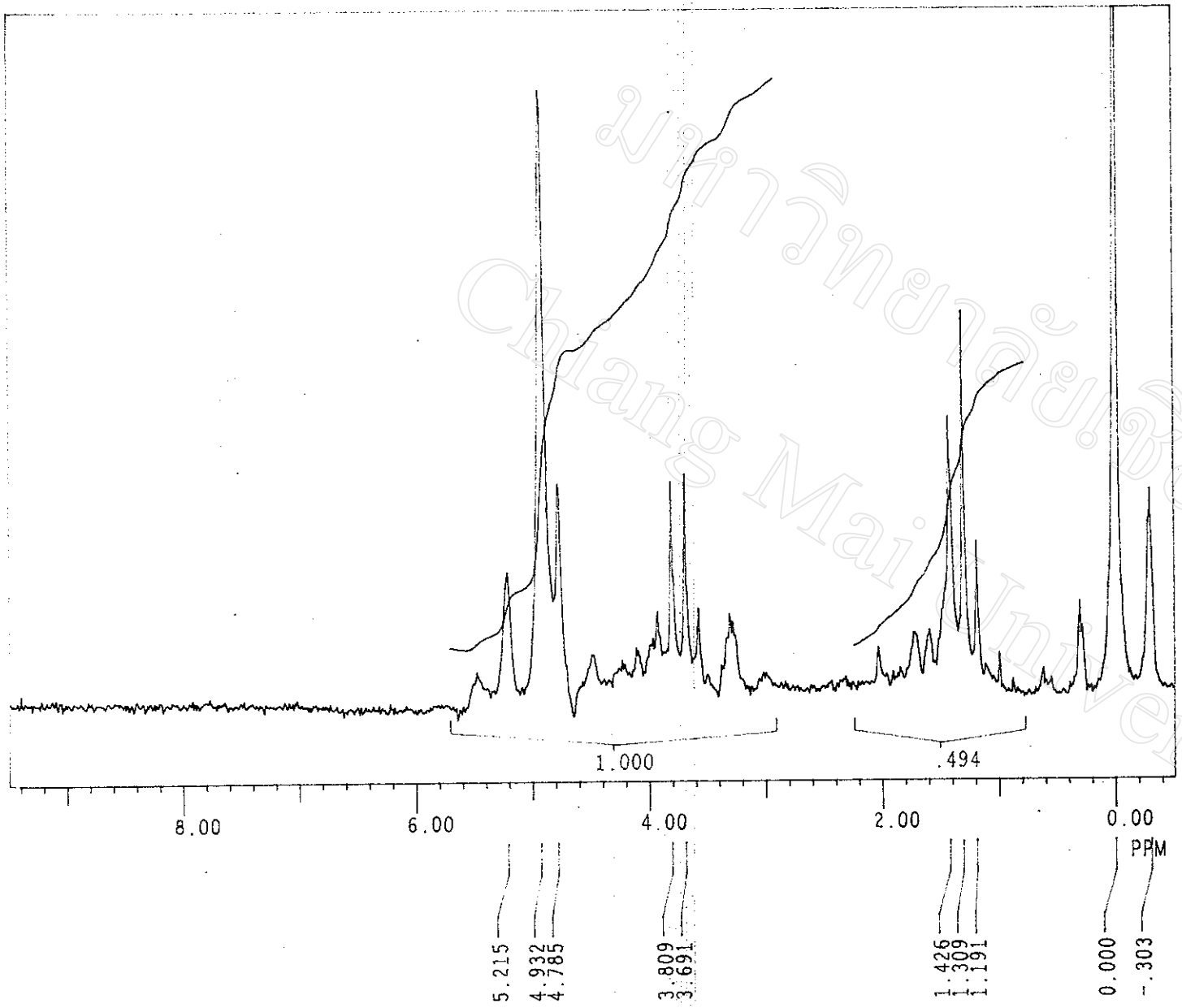
Pulse width 90 : 20 micro sec

** PROCESSING PARAMETER **

Proce.data point: 4 k point
Display range : 10.00 ppm
Display gain : 5.00
Gain mode : Normal

รูปที่ 23 ^{1}H-NMR spectrum ของสารจากเมล็ดใน NMR-tube

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



HITACHI R-1500

** ACQUISITION COMMENT **

Sample : UNKNOWN 2

Solvent : METHYL ALCOHOL
Conc. : -
Refer. : TMS
Tube D. : 5 mm
Operator: S.ARARMRUENG
Date : 27/1/1999
Memo : PUK

** ACQUISITION PARAMETER **

Acquis. mode : Normal
Spectrum width : 20 ppm
No. of acquis. : 8
Pulse interval : 5.0 sec
Data point : 4 k point

Pulse width 90 : 20 micro sec

** PROCESSING PARAMETER **

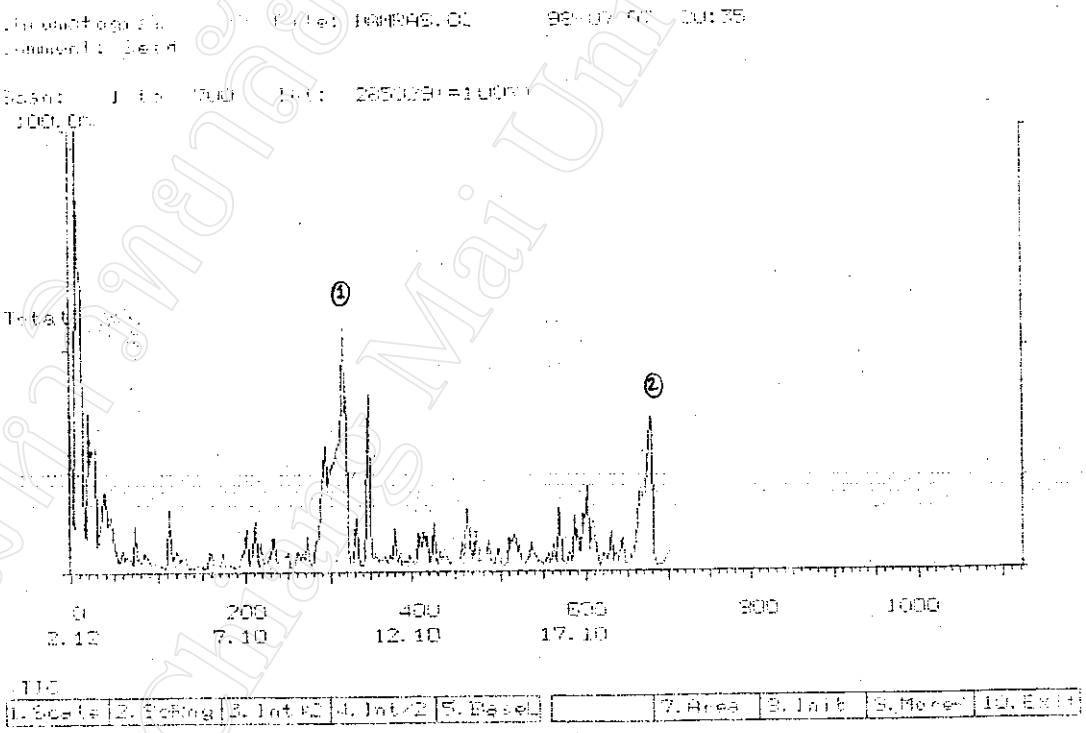
Proce.data point: 4 k point
Display range : 10.00 ppm
Display gain : 2.00
Gain mode : Normal

รูปที่ 24 ^{1}H-NMR spectrum ของสารจากเปลือกใน NMR-tube

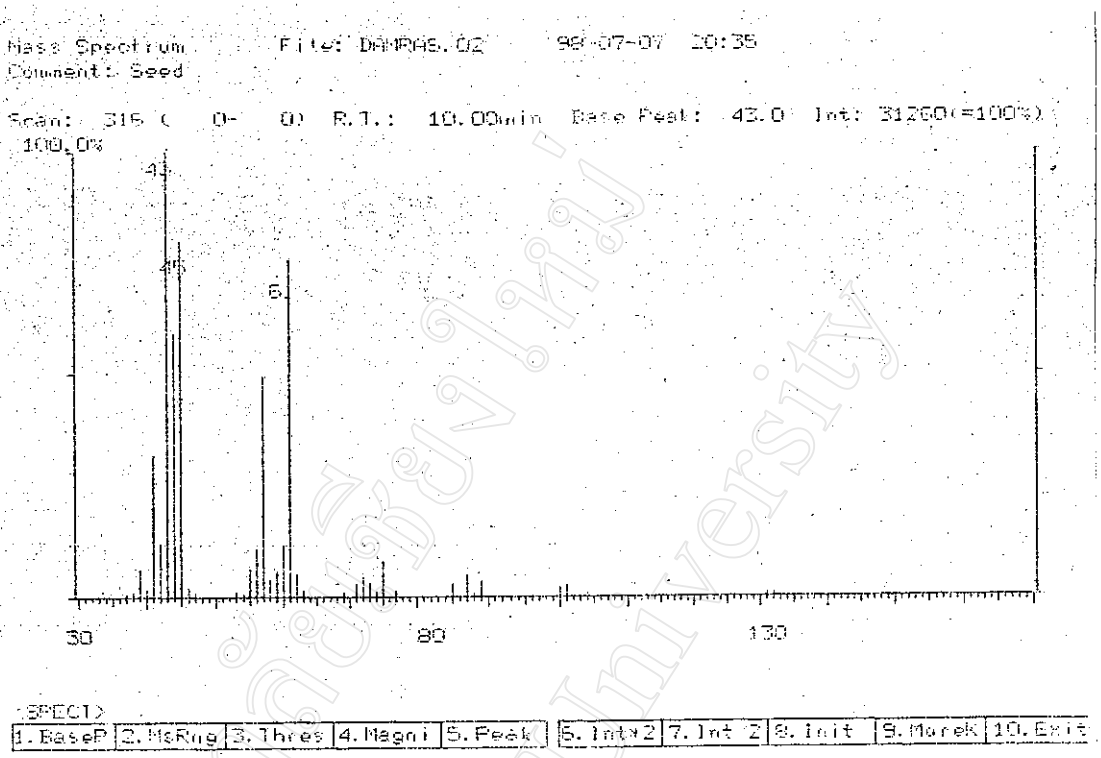
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

4.7.2 การวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง แก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตมิเตอร์

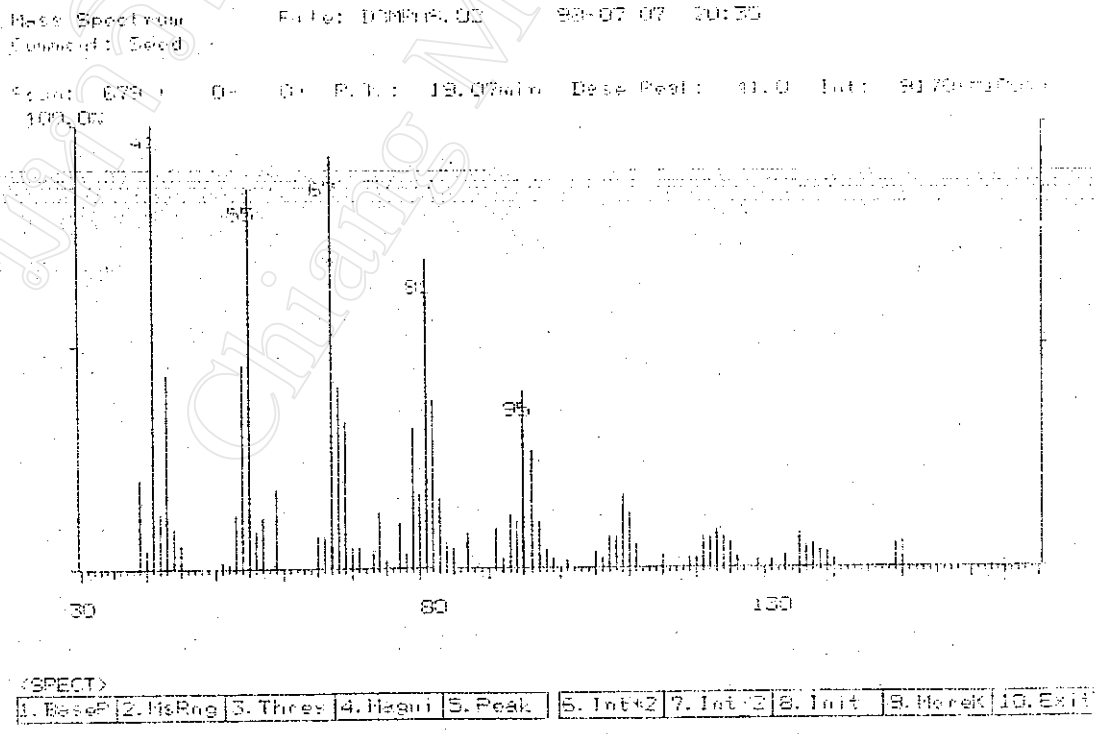
พบว่าสารยับยั้งเชื้อราจากเมล็ดประกอบด้วยสารหลักอย่างน้อยสองสารคือสารหมายเลข 1 และ 2 ดังภาพที่ 25 เป็นสารที่มีค่า retention time คือ 9.96 และ 18.98 ดังภาพที่ 26, 27 ซึ่งเป็นสารที่อาจมีค่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 61 และ 95 ตามลำดับ ส่วนสารยับยั้งเชื้อราในเปลือกนั้นประกอบด้วยสารหลักหนึ่งสาร คือสารหมายเลข 3 ดังภาพที่ 28 เป็นสารที่มีค่า retention time คือ 9.35 ซึ่งอาจมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 61 คล้ายคลึงกับสารหมายเลข 1 จากเมล็ดดังภาพที่ 29



ภาพที่ 25 โครมาโตรแกรมของสารยับยั้งเชื้อราจากเมล็ดโดย GC-MS

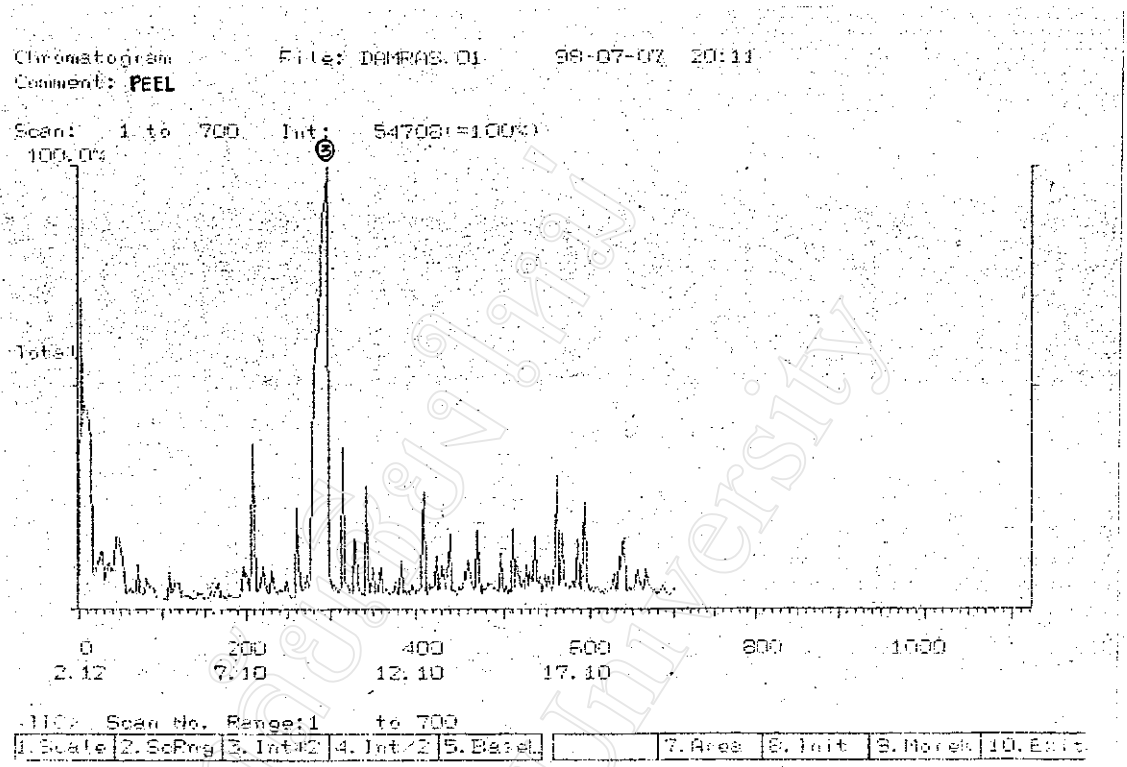


ภาพที่ 26 แมสสเปกตรัมของสารยับยั้งเชื้อราจากเมล็ดโดย GC-MS ที่ Rt = 9.98

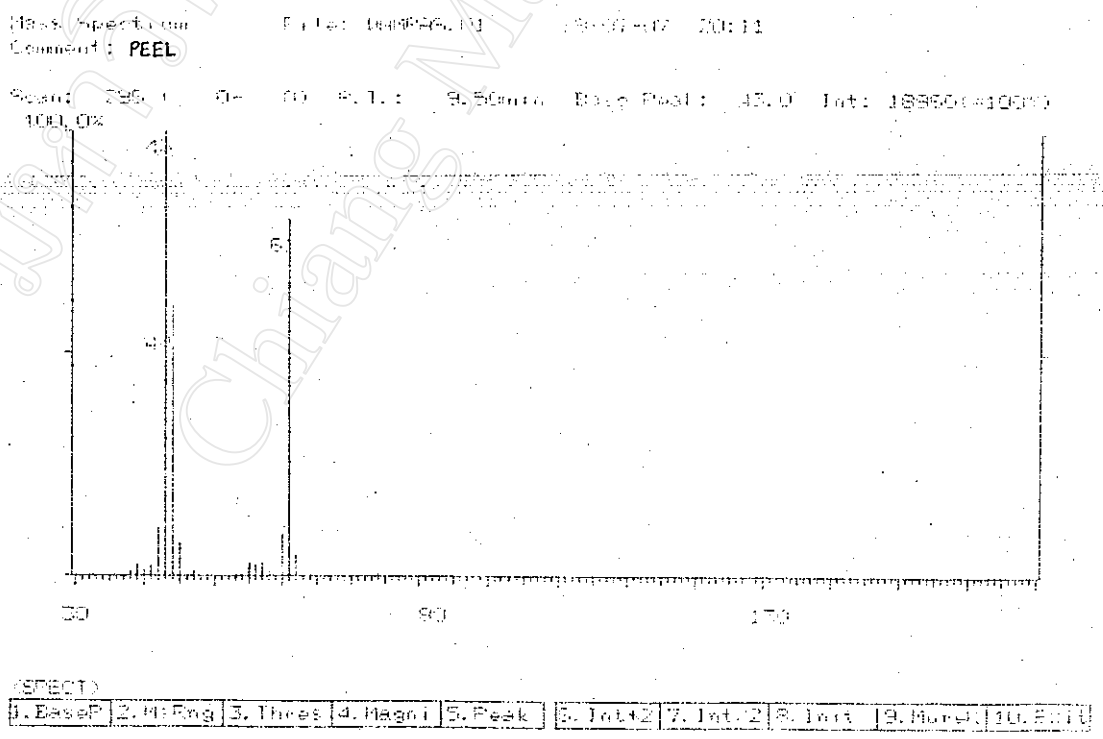


ภาพที่ 27 แมสสเปกตรัมของสารยับยั้งเชื้อราจากเมล็ดโดย GC-MS ที่ Rt = 18.98

(peak 1, 2 ในภาพที่ 26)



ภาพที่ 28 โครมาโตรแกรมของสารยับยั้งเชื้อราจากเปลือกโดย GC-MS



ภาพที่ 29 แมสสเปกตรัมของสารยับยั้งเชื้อราจากเปลือกโดย GC-MS ที่ Rt = 9.35 (peak 3 ในภาพที่ 28)

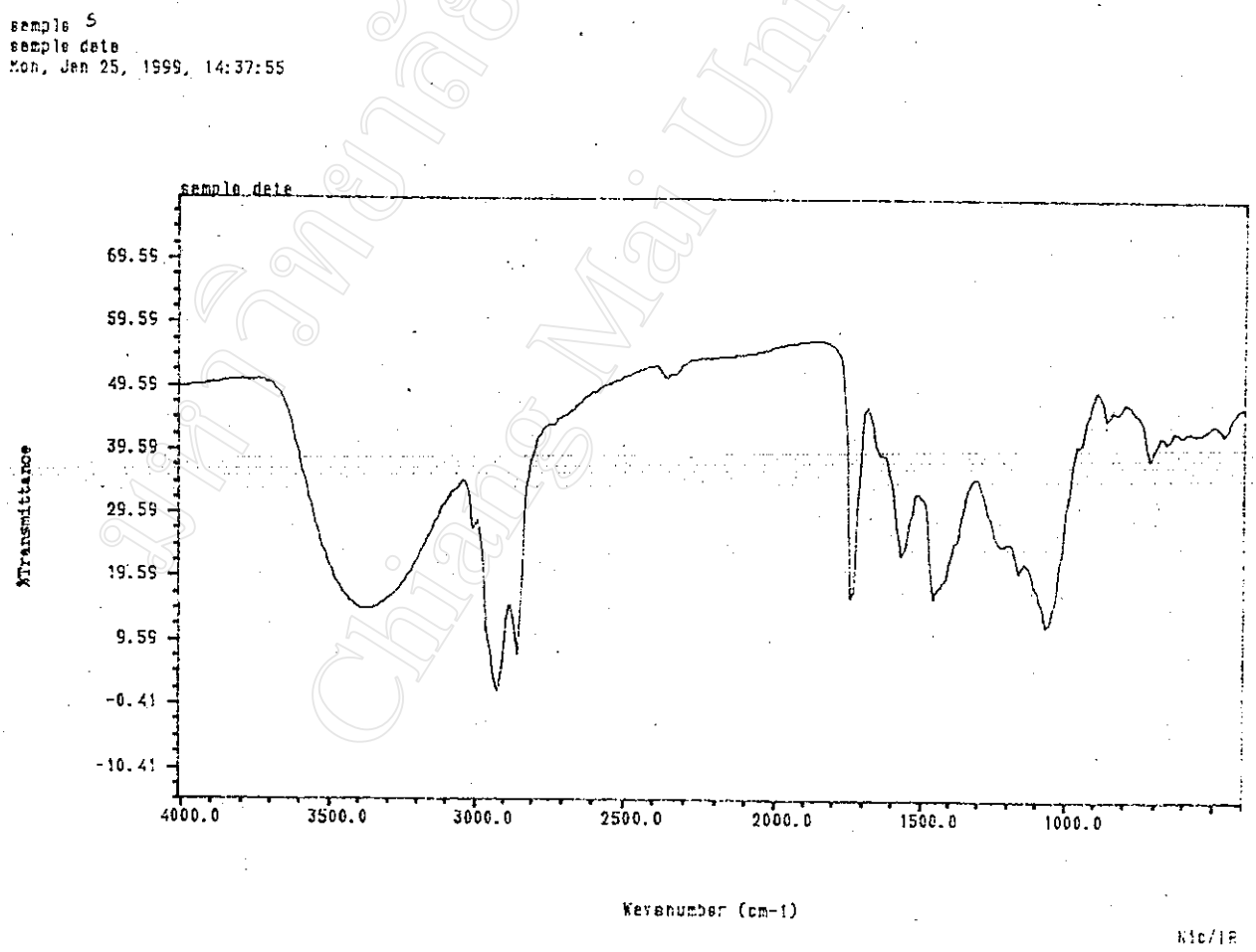
4.7.3 การวิเคราะห์สารด้วยเครื่องอินฟาเรดสเปกโตมิเตอร์

เมื่อนำสารจากเปลือกที่ Rf ช่วง 0.7-0.83 และ สารจากเมล็ดที่ Rf 0.63-0.83 ดังแสดงในภาพที่ 22 มาทำมาทำการวิเคราะห์ผลปรากฏว่า IR spectum ของสารยับยั้งเชื้อราทั้งจากเปลือกและเมล็ดมีลักษณะคล้ายคลึงกันดังภาพที่ 30-31 คือ

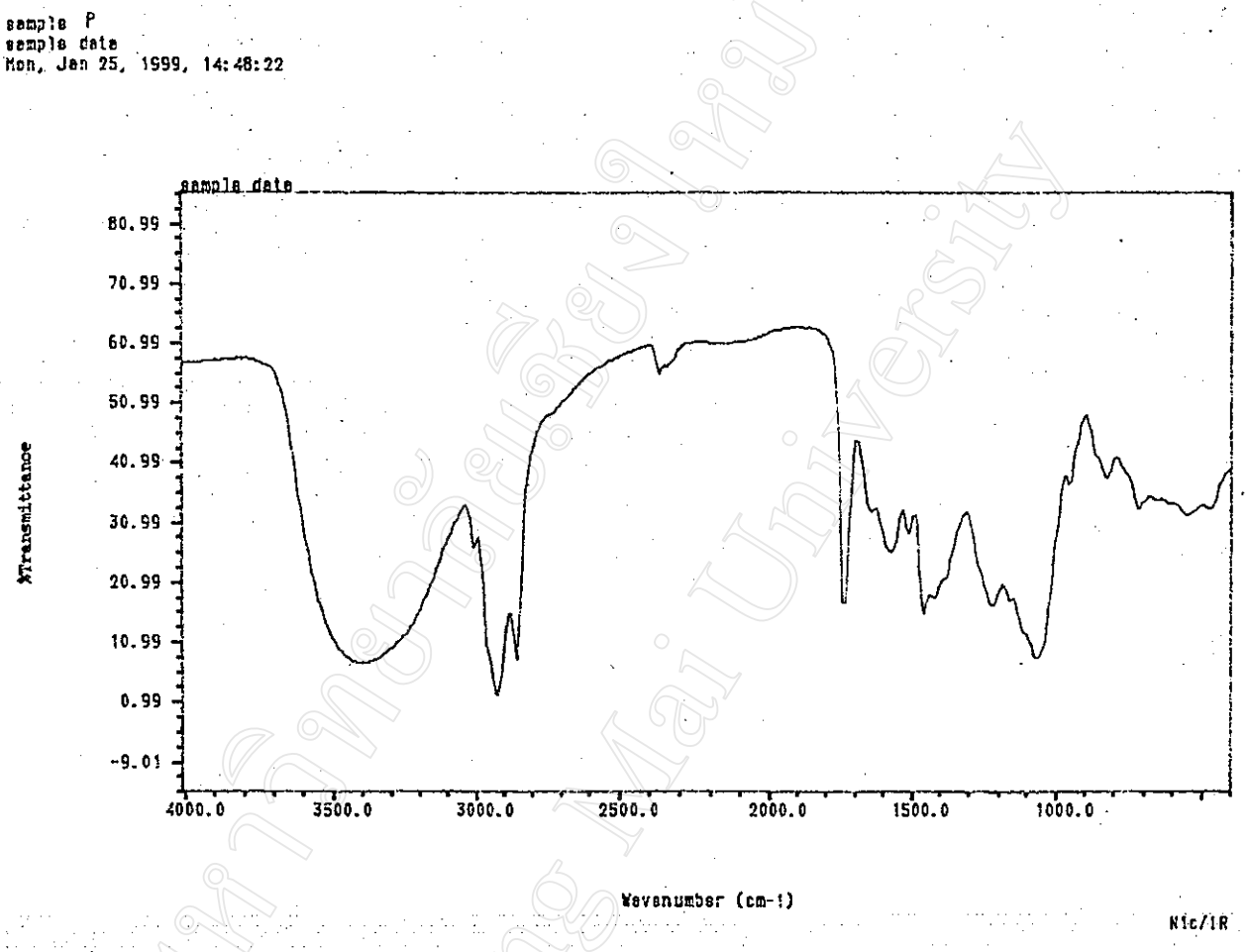
ที่ความถี่ 3,400 cm^{-1} หมู่ฟังก์ชัน O-H (hydroxyl)

ที่ความถี่ 2,900 cm^{-1} หมู่ฟังก์ชัน C-H Stretching

ที่ความถี่ 1,750 cm^{-1} หมู่ฟังก์ชัน $C(=O)O$ (ester)



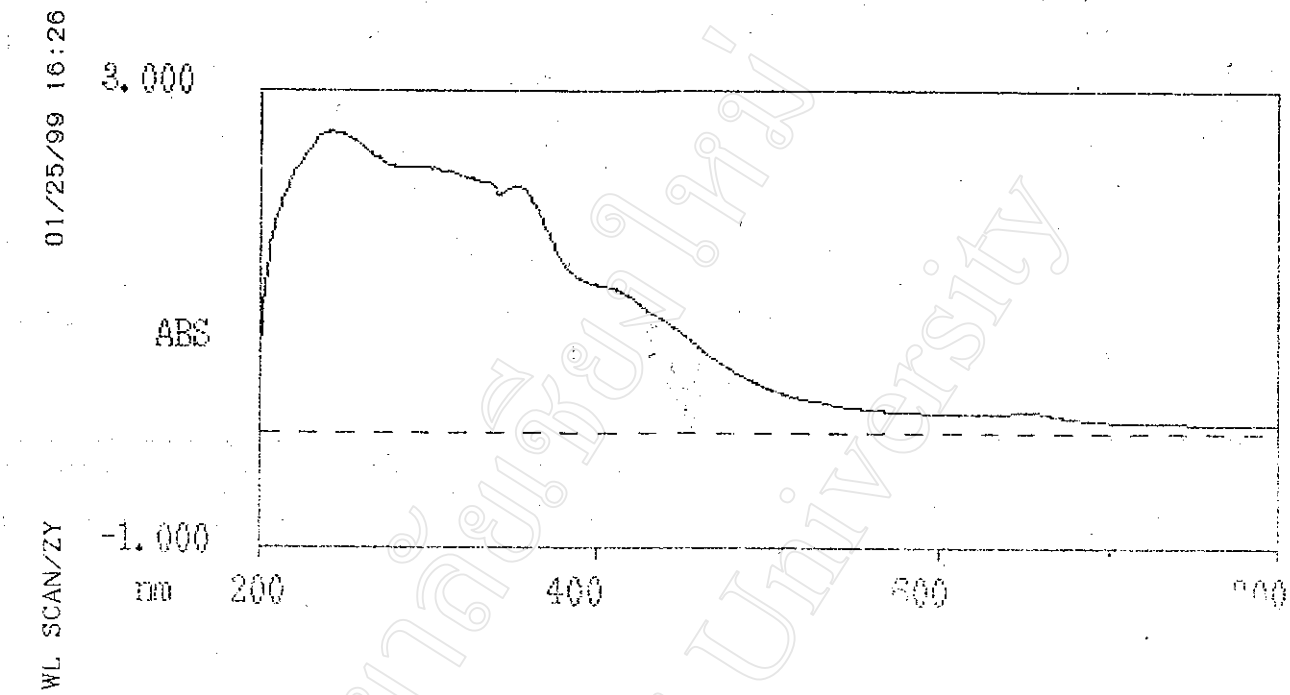
ภาพที่ 30 IR spectum ของสารยับยั้งเชื้อจากเมล็ด (neut)



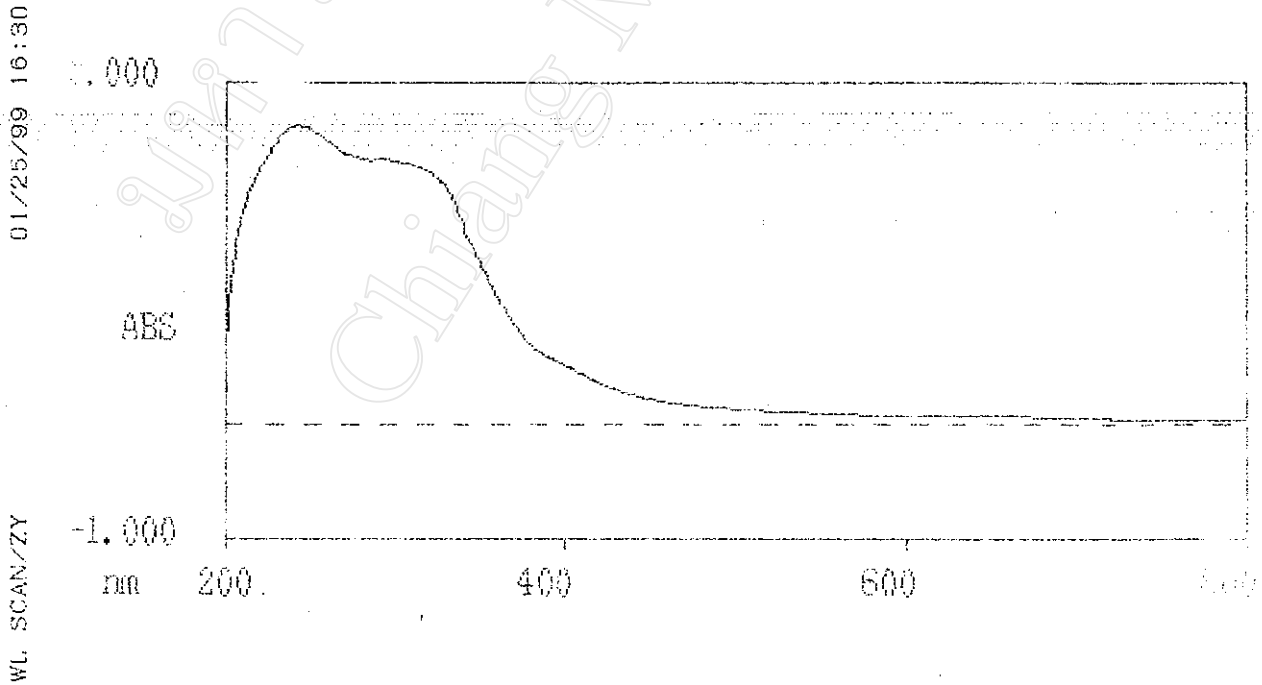
ภาพที่ 31 IR spectum ของสารยับยั้งเชื้อจากเปลือก (neut)

4.7.4 การวิเคราะห์สารด้วย UV-spectroscopy

เมื่อนำสารจากเปลือกที่ Rf ช่วง 0.7-0.83 และ สารจากเมล็ดที่ Rf 0.63-0.83 ดังแสดงในภาพที่ 22 ไปวัดการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 200-600 nm ผลปรากฏว่าสารยับยั้งเชื้อจากเปลือกดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 242 nm และ 289 nm ส่วนในเมล็ดดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 242 nm และ 289 nm ดังภาพที่ 32-33 ซึ่งแสดงว่าอาจมี conjugated double bonds ในโมเลกุล



ภาพที่ 32 การดูดกลืนแสง UV ของสารยับยั้งเชื้อจากเมล็ด



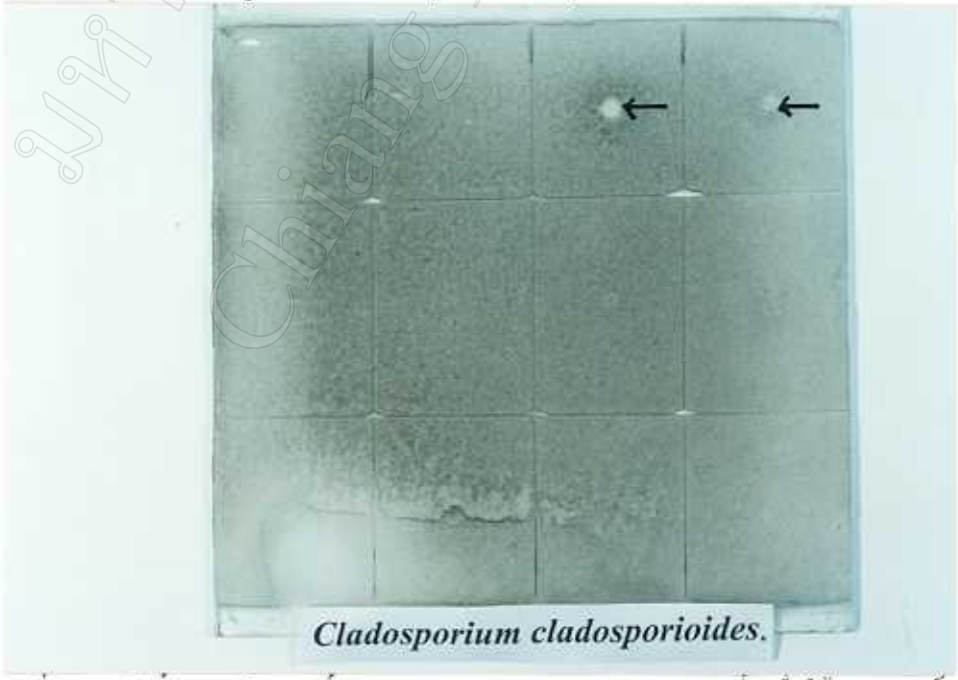
ภาพที่ 33 การดูดกลืนแสง UV ของสารยับยั้งเชื้อจากเปลือก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

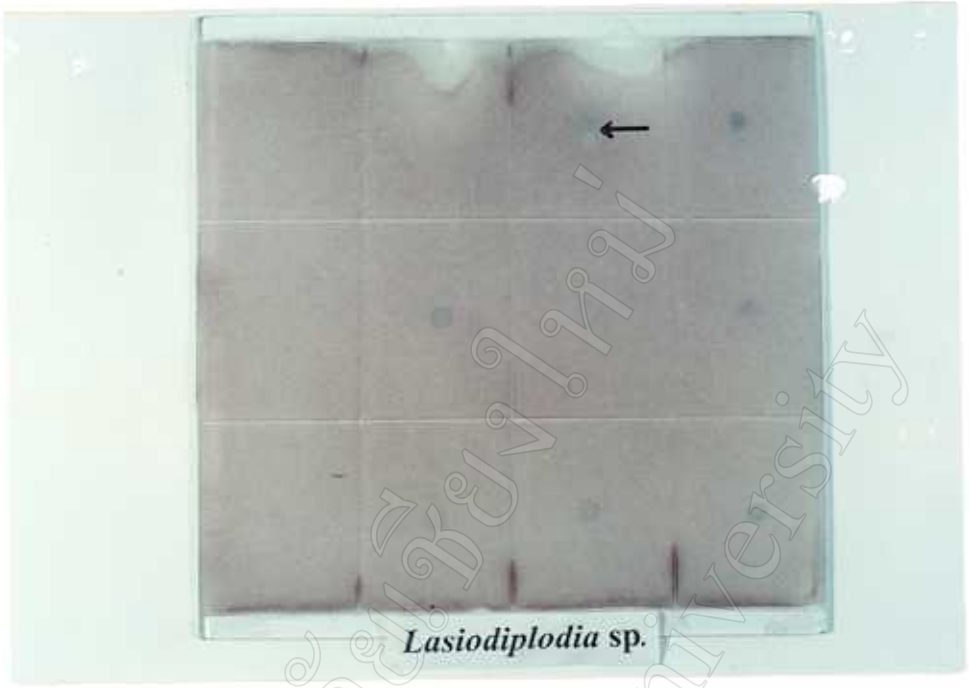
3.8 การหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

จากการนำเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides, Lasiodiplodia* sp. และเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* ทดสอบบน TLC-plate ผลปรากฏว่าค่า Minimum Inhibitory Concentration ของเชื้อทั้งสามมีค่า 15.5 ในเมล็ดและ 35.0 ในเปลือกซึ่งสังเกตจากวงยับยั้งที่เกิดขึ้นดังภาพที่ 34-39 แต่การทดสอบบนจานเลี้ยงเชื้อนั้นไม่พบวงยับยั้ง

ภาพที่ 34 วงยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (ศรชี้) เมื่อใช้สารจากเปลือก



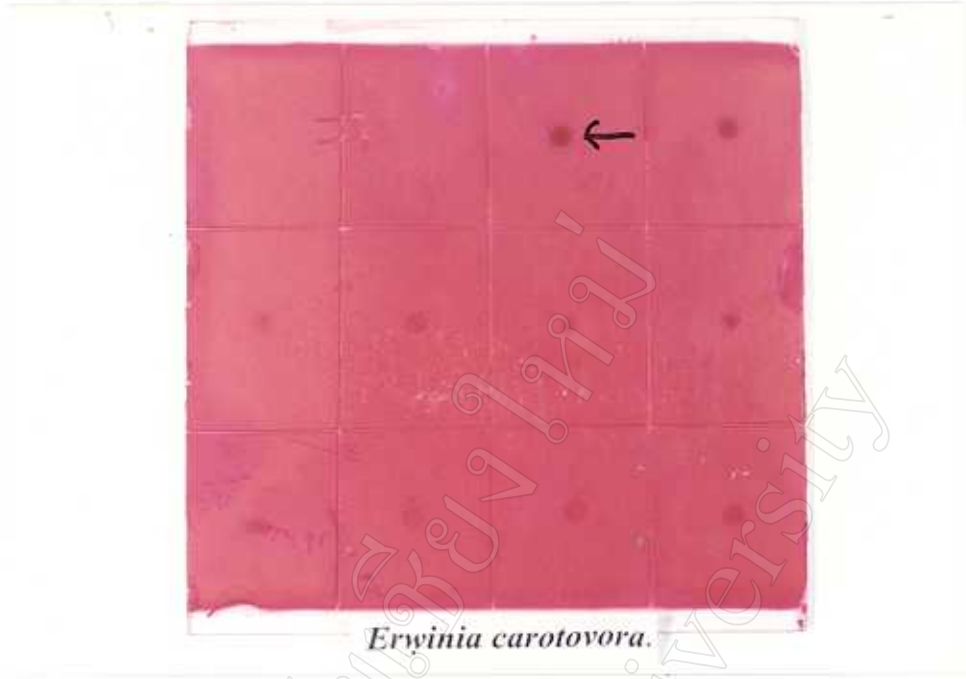
ภาพที่ 35 วงยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (ศรชี้) เมื่อใช้สารจากเมล็ด



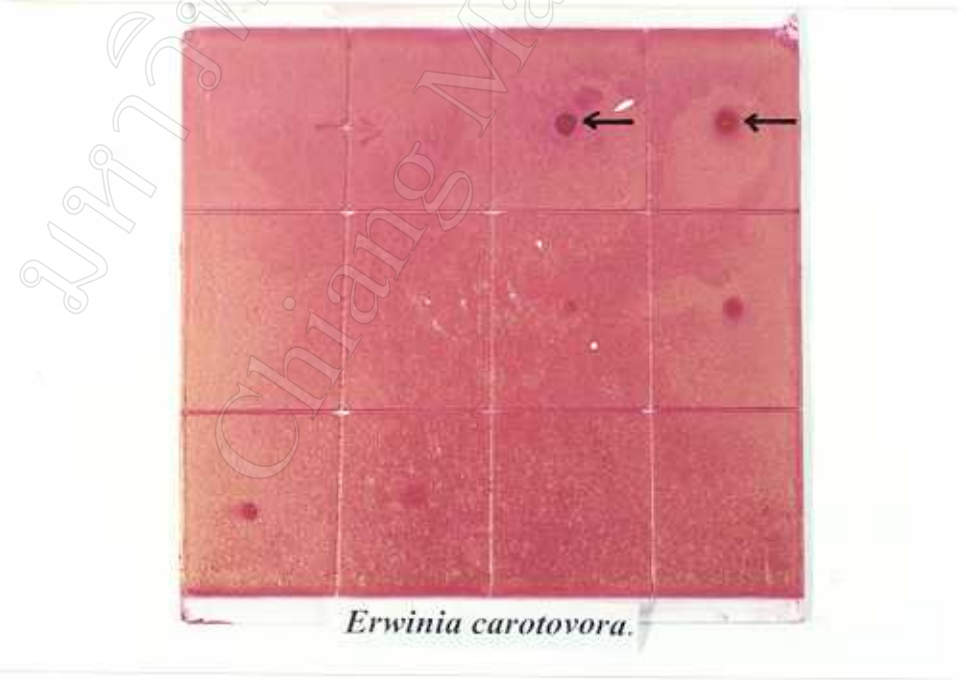
ภาพที่ 36 วงยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. (ศรชี้) เมื่อใช้สารจากเปลือก

ภาพที่ 37 วงยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. (ศรชี้) เมื่อใช้สารจากเมล็ด

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



ภาพที่ 38 วงยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* (ศรชี้) เมื่อใช้สารจากเปลือก



ภาพที่ 39 วงยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* (ศรชี้) เมื่อใช้สารจากเมล็ด

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

3.9 การทดสอบสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นกับการงอกของสปอร์เชื้อรา

จากการทดสอบสารกับสปอร์เชื้อรา *Cladosporium cladosporioides, Colletotrichum* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ผลปรากฏว่าสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* sp. งอกเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารจากเปลือก 35.0 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และจากเมล็ด 31.0 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร มีการงอกที่ปกติโดยงอกเมื่อ 8 ชั่วโมง ในเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* นั้นงอกได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารจากเปลือก 8.75 ไมโครกรัม/ไมโครลิตรและจากเมล็ด 7.75 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร มีการงอกที่ปกติโดยงอกเมื่อ 20 ชั่วโมง ส่วนในเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. นั้น งอกเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารจากเปลือก 17.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และจากเมล็ด 15.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตรโดยเริ่มงอกเมื่อ 6 $^{1}/2$ ชั่วโมง แต่ในความเข้มข้นของสารจากเปลือก 35.0 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และจากเมล็ด 31.0 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร นั้นจะทำให้สปอร์มีลักษณะผิดคือสปอร์จะมีลักษณะบวมและมีรอยปริแตกที่บริเวณผนังเซลของสปอร์ ดังภาพที่ 40

ภาพที่ 40 ลักษณะบวมและผนังเซลปริแตกของสปอร์ *Pestalotiopsis* sp. (ศรชี้)