

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การสกัดสารต้านเชื้อราและแบคทีเรียจากเปลือกและเมล็ดของผลลำไย

จากการนำผลลำไยอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ มาสกัดสารต้านเชื้อราและแบคทีเรียซึ่งลำไยที่นำมาสกัดมีขนาดผลต่างกันไป ผลปรากฏว่าสารสกัดหยาบมีสีเขียวจากเปลือกและมีสีน้ำตาลจากเมล็ดทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่ามีส่วนของรงควัตถุปนอยู่ด้วย ซึ่งรงควัตถุเป็นองค์ประกอบในเปลือกและเมล็ดในพืช (คณัย, 2539) และรงควัตถุบางชนิดยังมีคุณสมบัติที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นแอลกอฮอล์ (Gross, 1987) จากผลการทดลองปริมาณสารสกัดหยาบจากเปลือกลำไยช่วงอายุก่อนเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ มีมากที่สุดรองลงมาคือ อายุก่อนเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์ อายุหลังเก็บเกี่ยว 3 วัน อายุก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์ ช่วงอายุเก็บเกี่ยว และอายุก่อนการเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากเมล็ดนั้น อายุก่อนเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ มีปริมาณมากที่สุดรองลงมาคือช่วงอายุเก็บเกี่ยว อายุก่อนเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์ หลังการเก็บเกี่ยว 3 วัน อายุก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์และอายุก่อนเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณสารสกัดหยาบทั้งจากเปลือกและเมล็ดนั้นมีปริมาณไม่เท่ากันในช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าปริมาณสารที่มีอยู่ในเปลือกและเมล็ดช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ นั้นมีปริมาณไม่เท่ากันหรืออาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบที่ได้มีลักษณะเหนียวหนืดยากที่จะสังเคราะห์ระดับใดที่ตัวทำละลายระเหยออกไปหมด

การเตรียมเชื้อราและแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบสารสกัด

ในการทดลองนี้เชื้อราที่ใช้ในการทดลองคือ *Cladosporium cladosporioides*, *Lasiodiplodia* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Colletotrichum* sp. แบคทีเรีย *Erwinia carotovora* ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกจากลำไย (ธิดา, 2535 และ เสน่ห์, 2530) และเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีสีชมพูเข้มสามารถสังเกตผลการทดลองได้ชัดเจน และเหตุผลที่เลือกใช้เชื้อในการทดลองดังกล่าว เนื่องจากเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของลำไย จึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการนำผลการทดลองไปประยุกต์ใช้ควบคุมโรคต่อไป

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียบนผลลำไยหลังการเก็บเกี่ยวของสารสกัดจากลำไยช่วงอายุต่าง ๆ ก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว

การทดสอบสารสกัดหยาบกับสปอร์เชื้อรา

ในการทดสอบสารสกัดหยาบกับการงอกของสปอร์เชื้อรานั้นผลปรากฏว่า สารสกัดหยาบมีผลทำให้สปอร์เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. งอก germ tube ที่มีลักษณะบวม และกระตุ้นการสร้าง appressorium ในสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* sp. งอกผิดปกติ ซึ่งอาจมีแนวโน้มว่าสารสกัดหยาบอาจจะเร่งการเข้าทำลายของเชื้อทำให้เกิดโรคมามากขึ้นเมื่อนำสารสกัดหยาบไปใช้ควบคุมโรคเพราะในเชื้อ *Colletotrichum* sp. นั้นเกิด appressorium ขึ้นมากเมื่อเทียบกับชุดควบคุมดังตารางที่ 10 ซึ่งจะทำให้เชื้อสามารถ infect เข้าสู่พืชได้ดียิ่งขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยการเข้าทำลายทางบาดแผลบนผล (คณัย, 2534) จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดหยาบอาจมีสารมีคุณสมบัติเร่งการเจริญของเชื้ออยู่ด้วยหรืออาจมีสารอาหารเช่น น้ำตาลปนติดมากับสารสกัดหยาบ และในการทดสอบสารสกัดหยาบโดยใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการชะลอการงอกของสปอร์นั้นผลปรากฏว่าในเมล็ดใช้ความเข้มข้นน้อยกว่าเปลือกซึ่งเป็นไปได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรามีปริมาณมากในเมล็ดหรืออาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมากกว่า

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบบนผลลำไย

การทดสอบสารสกัดหยาบจากลำไยช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ บนผลลำไยนั้นผลปรากฏว่าสารมีผลในการควบคุมโรคระหว่างการเก็บรักษาโดยรวมไม่ดีกว่าชุดควบคุมเช่นเดียวกับการใช้สารสกัดหยาบจากข่าเพื่อควบคุมโรคบนผลลำไย (อนุศักดิ์, 2538) โดยการทดลองนี้เปอร์เซ็นต์จำนวนผลที่เกิดโรคในชุดควบคุมและชุดที่ใช้สารสกัดหยาบมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แต่ช่วงการเก็บรักษา 2 สัปดาห์ถึง 6 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่า สารสกัดหยาบจากลำไยช่วงอายุเดียวกันในระหว่างการเก็บรักษาก็มีทั้งแตกต่างและไม่แตกต่างจากชุดควบคุมทางสถิติทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทดสอบบนผลนั้นมิใช่ปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่าง เช่น ปริมาณเชื้อที่ติดมาบนผลลำไย ความแข็งแรงของผลลำไยแต่ละผล ขนาดของผล ปริมาณสารต่าง ๆ ในผลลำไย ฯลฯ แต่จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ นั้นมีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดโรคมามากขึ้น นอกจากช่วงอายุหลังการเก็บเกี่ยว 3 วัน มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์จำนวนผลที่เกิดโรคน้อยกว่าชุดควบคุมและแตกต่างทางสถิติเมื่ออายุการเก็บรักษา 6 สัปดาห์ จึงอาจเป็นไปได้ว่ามีสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราอยู่มากกว่าลำไยช่วงอายุการเก็บเกี่ยวอื่น ๆ

ในการทดสอบสารสกัดหยาบบนผลลำไยโดยใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ นั้นผลปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์จำนวนผลเกิดโรคที่ใช้สารสกัดเริ่มมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่ออายุการเก็บรักษา 4 สัปดาห์ถึง 6 สัปดาห์ โดยจะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นที่สูงนั้นจะมีแนวโน้มทำให้เกิดโรคหลังเก็บเกี่ยวมากกว่าชุดควบคุม ทั้งนี้ผลการทดลองอาจสอดคล้องกับการทดสอบเบื้องต้น กล่าวคือเมื่อใช้สารสกัดหยาบทดสอบกับสปอร์เชื้อราจะทำให้สปอร์เกิดการงอกที่ผิดปกติและสร้าง appressorium ซึ่งหากใช้ความเข้มข้น $1/10^6$ ในการทดสอบอาจทำให้ผลในการยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าก็เป็นได้ แต่การทดลองไม่สามารถแสดงผลจากการทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบบนผลลำไยเพื่อที่จะนำมาใช้ในการทดสอบสารสกัดจากลำไยช่วงอายุต่าง ๆ ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดด้านเวลาและปริมาณผลลำไยที่นำมาทดสอบ

ในการทดสอบใช้สารสกัดจากเมล็ดช่วงอายุการเก็บเกี่ยว ทั้งนี้เพราะว่าจากการทดสอบเบื้องต้นสารสกัดจากเมล็ดมีแนวโน้มว่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรามากกว่าในเปลือกดังตารางที่ 11 นอกจากนี้เมล็ดช่วงอายุการเก็บเกี่ยวยังหาได้ง่ายมากกว่าช่วงอายุก่อนการเก็บเกี่ยวและมีความเป็นไปได้ในการนำมาประยุกต์ใช้ กล่าวคืออาจนำเมล็ดที่เหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมหรือจากการบริโภคมาใช้ให้เป็นประโยชน์และในการทดสอบสารช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ บนผลลำไยนั้นใช้ความเข้มข้นของสาร $1/10^4$ เนื่องจากในการทดสอบเบื้องต้นนั้น ในเมล็ดความเข้มข้น $1/10^6$ สามารถชะลอการงอกของสปอร์เชื้อรา แต่ในการทดสอบบนผลลำไยใช้ความเข้มข้นมากกว่าเนื่องจากคาดว่า การทดสอบบนผลลำไยนั้น มีปัจจัยหลายอย่างที่อาจทำให้ฤทธิ์ของสารอ่อนลงได้ ซึ่งหากพิจารณาผลการทดลองเมื่อใช้สารสกัดหยาบในความเข้มข้นต่าง ๆ นั้น ความเข้มข้นที่น้อยจะมีแนวโน้มการเกิดโรคน้อยกว่าโดยเฉพาะความเข้มข้น $1/10^6$ ผลไม่เกิดโรคเลยจึงควรใช้ความเข้มข้น $1/10^6$ มากกว่าความเข้มข้น $1/10^4$ ซึ่งหากใช้ความเข้มข้น $1/10^6$ ในการทดสอบอาจทำให้ผลในการยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าก็เป็นได้ แต่การทดลองไม่สามารถแสดงผลจากการทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบบนผลลำไย เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบสารสกัดจากลำไยช่วงอายุต่าง ๆ ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดด้านเวลาและปริมาณผลลำไยที่นำมาทดสอบ

การตรวจหาแถบสารต้านเชื้อราและแบคทีเรียโดยวิธี TLC-bioassay

จากการนำสารสกัดหยาบละลายด้วย ไดคลอโรมีเทนและน้ำกลั่น แล้วนำส่วนที่ละลายในไดคลอโรมีเทน (สารสกัดส่วนที่ 1) มา develop ใน solvent ซึ่งประกอบด้วย hexane : ethylacetate : methanol สัดส่วน 60: 40 : 1 แล้วพ่นด้วยสปอร์เชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* และเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีสีสามารถสังเกตเห็น

แถบยับยั้ง ได้ชัดเจน ผลปรากฏว่ามีแถบยับยั้งเกิดขึ้นที่ Rf ประมาณ 0-0.1 ซึ่งเป็น Rf ที่ต่ำทั้งในเปลือกและเมล็ด ส่วนสารสกัดส่วนที่ 2 ไม่ปรากฏแถบยับยั้งขึ้นเมื่อทดสอบกับเชื้อราและแบคทีเรีย จากแถบยับยั้งที่เกิดขึ้นเมื่อใช้สารสกัดส่วนที่ 1 นั้นคาดว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราควรเป็นสารประเภทเดียวกัน เนื่องจากสารมีการเคลื่อนที่บนวัสดุภาคคงที่คล้ายคลึงกันและเป็นสารที่ polar มาก จากหลักการแยกสารโดยวิธี Thin-layer chromatography (อนุศักดิ์, 2538)

การเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดจากลำไย
อายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ

จากการเปรียบเทียบเส้นผ่าศูนย์กลางของวงด้านเชื้อราของสารสกัดช่วงอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ ในเปลือกนั้นอายุก่อนการเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์มีมากที่สุดรองลงมาคือ อายุเก็บเกี่ยวก่อนอายุเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์ ก่อนอายุเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์ ก่อนอายุเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ และหลังการเก็บเกี่ยว 3 วัน ตามลำดับซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในธรรมชาตินั้นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่มีในเปลือกลำไยนั้นจะมีมากขึ้นก่อนที่ลำไยจะสุกแก่เต็มที่ เพื่อช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรค ส่วนในเมล็ดนั้นพบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของวงด้านเชื้อราของสารสกัดพบมากในช่วงหลังเก็บเกี่ยว 3 วัน และพบน้อยเมื่อลำไยยังอ่อนอยู่ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อราจะเพิ่มมากขึ้นตามการพัฒนาของเมล็ดลำไย และจะสังเกตได้ว่าลำไยช่วงอายุหลังการเก็บเกี่ยว นั้นเป็นระยะก่อนการงอกของเมล็ด ดังนั้นสารจึงอาจมีมากขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายของเอมบริโอซึ่งจะเจริญไปเป็นต้นต่อไป เช่นเดียวกับพืชทั่วไปที่มีสารต้านการเจริญของเชื้อโรคในช่วงการเจริญของพืชและปริมาณสารนั้นจะลดลงเมื่อพืชเริ่มเข้าสู่ขบวนการเสื่อมสลาย (दनัย, 2534)

การนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อราไปให้บริสุทธิ์ขึ้น

จากการนำสารช่วง Rf ประมาณ 0-0.1 ของเปลือกและเมล็ดมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้เมทานอลเป็น solvent ผลปรากฏว่าพบแถบยับยั้งเชื้อในเปลือก Rf ช่วง 0.7-0.83 และในเมล็ด Rf ช่วง 0.63-0.83 ซึ่งแถบสารที่ยับยั้งมี Rf เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับการใช้ hexane : ethylacetate : methanol แสดงว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรานั้นอาจเป็นสารที่มีขั้ว (polar) เนื่องจากสามารถทำให้เคลื่อนที่ได้โดยเมทานอลใน TLC (ประเสริฐ, 2528) และในเมล็ดมีแถบยับยั้งที่กว้างกว่าในเปลือก แสดงว่าสารสกัดจากเมล็ดอาจมีปริมาณหรือมีฤทธิ์สูงกว่าในเปลือกซึ่งสอดคล้อง

คล่องกับการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดจากลำไยอายุ การเก็บเกี่ยวต่าง ๆ บน TLC-plate

การศึกษาสารที่เป็นองค์ประกอบในแถบสารที่สามารถยับยั้งเชื้อราด้วยเครื่องมือ spectrometer

ผลจากการวิเคราะห์สารในเปลือก Rf ช่วง 0.7-0.83 และในเมล็ด Rf ช่วง 0.63-0.83 ดังแสดงในภาพที่ 22 ด้วยวิธี $^1\text{H-NMR}$ ปรากฏว่าไม่มีพีค δ ประมาณ 7.00 ppm สารจึงอาจเป็น พวก aliphatic compound

ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่าทั้งในเปลือกและเมล็ดอาจเป็นสารที่มีมวล โมเลกุลค่อนข้างต่ำและเป็นสารที่มีองค์ประกอบหลายสารซึ่งทำให้ยากต่อการ identify อีกทั้งสาร ด้านเชื้อในลำไยยังมีผู้ศึกษาน้อยจึงไม่มีสาร standard ในการเปรียบเทียบและสารส่วนใหญ่ซึ่ง polar (จาก TLC) อาจไม่ออกมาในการทำ GC ดังนั้น Mass speet ที่ได้ อาจเป็นของสารส่วน น้อย ควรจะใช้เครื่อง HPLC-MS ในการวิเคราะห์ reversed phase

ในการวิเคราะห์สารด้วย IR spectrum ปรากฏว่าสารอาจประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน O-H, C-H stretching และหมู่ฟังก์ชัน $\text{C}=\text{O}$ และในการวิเคราะห์สารด้วย UV-spectroscopy พบว่า สารทั้งเปลือกและเมล็ดดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 242 nm ซึ่งอาจแสดงว่ามี conjugated double bonds

จากผลการวิเคราะห์สารโดยเครื่องมือต่าง ๆ จึงคาดว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ เชื้อราทั้งในเปลือกและเมล็ดอาจเป็นสารชนิดเดียวกันและเป็นสารพวก aliphatic compound ซึ่งมี conjugated double bonds เป็นสารประกอบที่ตรวจพบในผลลำไย (Wong, 1996)

การทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราบน TLC-Plate พบว่าแสดงการ ยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* และเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. และแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* โดยและพบว่าค่า Minimum Inhibitory Concentration 35.0 ไมโครกรัม/ ไมโครลิตร ในเปลือก และ 15.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตรในเมล็ด จะเห็นว่าค่า Minimum Inhibitory Concentration ในเมล็ดนั้นมีค่าน้อยกว่าในเปลือกทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ ยับยั้งการเจริญของเชื้อในเมล็ดมีมากกว่าในเปลือกซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบเปรียบเทียบสารใน การทดลองข้างต้นที่ได้กล่าวไว้ แต่ในการทดสอบบนจานเลี้ยงเชื้อนั้น ไม่พบวงยับยั้งของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ซึ่งน่าจะแสดงวงยับยั้งเช่นเดียวกับการทดสอบบน TLC-plate ทั้ง นี้ อาจเนื่องมาจากมีสภาพแวดล้อมไม่เหมือนกันและสภาพในจานเลี้ยงเชื้ออาจเหมาะสมกับการ

เจริญของเชื้อมากกว่าจึงทำให้สังเกตไม่เห็นวงขั้วยั้งและสารอาจแพร่ในอาหารวุ้นทำให้เชื้อจาง จึงมีผลต่อเชื้อต่ำลง

การทดสอบสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นกับสปอร์เชื้อรา

จากการนำสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นมาทดสอบกับสปอร์ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* และเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ผลปรากฏว่าสารสกัดสามารถชะลอการงอกของสปอร์เชื้อราทั้งสองชนิดได้และมีลักษณะการงอกของสปอร์ที่ปกติ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แสดงว่าสารสกัดหยาบที่ทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นนั้นไม่กระตุ้นการสร้าง appressorium ในเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และสามารถชะลอการงอกของสปอร์เชื้อราเมื่อเทียบกับการงอกของสปอร์ในน้ำกลั่น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการทำให้สารสกัดหยาบบริสุทธิ์ขึ้นจะมีผลในการควบคุมโรคได้ดีกว่าการใช้สารสกัดหยาบที่ยังไม่ผ่านขั้นตอนที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้น