วิธีการสกัดและตัวทำละลายที่แตกต่างกันในการสกัดพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) เพื่อการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.

The different methods and solvents for extraction of plants in Zingiberaceae for controlling of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.

วิไลลักษณ์ บุญหลาย[1], ปวีณา รัตนเสนา[2], ประภัสสร บุษหมั่น[3]
Wilailak Boonlai[1], Paweena Rattanasena[2], Prapassorn Bussaman[3]

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส ที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อพืชผลทางการเกษตรหลายชนิด งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเหง้าของกะทือ กระชายดำ ขิง ไพล และเปราะป่า ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งสกัดด้วยวิธีสกัดเย็นและสกัดร้อน ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล 95% พบว่าวิธีสกัดร้อนให้เปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดหยาบสูงกว่าวิธีสกัดเย็น และการใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ผลได้สูงที่สุดในสารสกัดหยาบเปราะป่า คือ 25.40% รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากไพลและกระชายดำ (17.25 และ 10.95% ตามลำดับ) และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าสารสกัดจากไพลที่ได้จากการสกัดร้อนด้วยเอทานอล 95% สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุดที่ 85.56±1.49% ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm และสารสกัดหยาบจากไพลที่ได้จากการสกัดเย็นที่ความเข้มข้น 3,000 ppm ขึ้นไป ในทุกตัวทำละลาย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้สมบูรณ์ 100% ซึ่งเท่ากับการใช้สารฆ่าเชื้อรา (carbendazim) จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากไพลสามารถใช้ควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคได้

คำสำคัญ: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., แอนแทรคโนส, สารสกัดจากพืช

---

[1] *นิสิตปริญญาโท,* [2] *อาจารย์,* [3] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ หน่วยวิจัยการควบคุมโดยชีววิธี คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150*

[1] *Master degree student,* [2] *Lecture,* [3] *Assistant professor, Department of Biotechnology, Biological Control Research Unit, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand.*

** Corresponding author: Wilailak Boonlai, Department of Biotechnology, Biological Control Research Unit , Faculty of Technology, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand. E-mail: wilailak_boon@yahoo.com*

Abstract

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Sacc. is a pathogen of anthracnose disease that causes severe losses in several crop plants. This study aims to evaluate the efficacy of crude extracts derived from rhizomes of *Zingiber zerumbet* (L.) Sm., *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker., *Z. offcinale vern.* Adra, *Z. montanum* (Koenig) Link ex Dietr. and *K. pulchra* (Ridl.) Ridl. for controlling *C. gloeosporioides*. These plants were extracted by maceration and soxhlet methods using hexane, dichloromethane and 95% ethanol as solvents. The results showed that soxhlet extraction could give higher percentages of yield than maceration and the use of 95% ethanol as solvent resulted in the highest yield in extraction of *K. pulchra* (Ridl.) Ridl. (25.40%) followed by *Z. montanum* (Koenig) Link ex Dietr and *K. parviflora* Wall. ex Baker (17.25 and 10.95, respectively). For evaluation of the efficacy of crude extracts against *C. gloeosporioides*, the results showed that *Z. montanum* (Koenig) Link ex Dietr extract at 10,000 ppm derived from using soxhlet and 95% ethanol could result in significant inhibition of spore germination at 85.56±1.49%. Moreover, at 3,000 ppm and above, all the extracts of *Z. montanum* (Koenig) Link ex Dietr. derived from using maceration were found to effectively suppress the mycelial growth of *C. gloeosporioides* at 100%, which was not significantly different from using the standard fungicide (carbendazim). This study may suggest that the extracts of *Z. montanum* (Koenig) Link ex Dietr. could effectively control the anthracnose disease and also have potential for future development as safe products for the consumers.

Key word: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., anthracnose, plant extracts

บทนำ

ปัจจุบันการผลิตพืชผลทั้งในและต่างประเทศได้มุ่งเน้นให้มีระบบการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตผลที่มีความปลอดภัยต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุนี้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่มีวัตถุประสงค์เพื่อทดแทนหรือลดปริมาณการใช้สารเคมีให้น้อยลง[1] โรคแอนแทรคโนส (anthracnose disease) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจต่างๆ มากมาย เช่น มะม่วง มะละกอ ยางพารา กล้วย องุ่น พริก ถั่ว มะเขือเทศ รวมทั้งกล้วยไม้ เป็นต้น และมีรายงานว่าสารสกัดจากพืชวงศ์ขิง(Zingiberaceae) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici, C. gloeosporioides*, *Dothiorella* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Pythium aphanidermatum* ได้[2] ซึ่งในพืชวงศ์ขิงพบสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สำคัญคือ flavonoids, terpenoids, tannins, polyphenols และ rutin ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส สารต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และมีกิจกรรมต่อต้านสารก่อมะเร็ง[3] และในการแยกสารสำคัญจากพืชนั้นวิธีการสกัดถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้[4]

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชวงศ์ขิง ได้แก่ กะทือ กระชายดำ ขิง ไพล และเปราะป่า โดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล 95% ที่สกัดด้วยวิธีการสกัดเย็นและสกัดร้อน ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการศึกษา

ขั้นตอนการเตรียมการทดลอง

เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ นำเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. ที่ได้มาจากคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน [5]

การเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา (spore suspension) ทำได้โดยเติมน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่มีเชื้อราอายุ 5-7 วัน จากนั้นใช้ลูป (loop) เขี่ยเส้นใยเชื้อราให้ทั่วเพื่อให้สปอร์กระจายตัว และเติม Tween 20 จำนวน 1 หยด เพื่อให้สปอร์เชื้อรากระจายตัว จากนั้นเขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) เป็นเวลา 1 นาที แล้วนับจำนวนของสปอร์ด้วย hemacytometer ให้ได้ความเข้มข้นจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร [6]

การเตรียมสารสกัดจากพืช พืชที่ใช้ในการทดลองคือเหง้าแก่ของ กะทือ (*Zingiber zerumbet* (L.) Sm.) กระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker) ขิง (*Z. offcinale vem.*Adra) ไพล (*Z. montanum* (Koenig) Link ex Dietr.) และเปราะป่า (*K. pulchra* (Ridl.) Ridl.) โดยนำมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด แล้วตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำมาอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด (hammer mill) แล้วกรองผ่านตะแกรงที่มีขนาดรูเท่ากับ 5 มิลลิเมตร แล้วนำมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล 95 % หลังจากนั้นนำผงพืชแห้งที่ได้มาสกัดด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน ดังนี้

1. วิธีการสกัดเย็น ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Silva และคณะ[7] โดยนำผงแห้งของพืชแห้งแต่ละชนิดมาแช่ในตัวทำละลาย อัตราส่วน 1:3 (w/v) นาน 48 ชั่วโมง แล้วกรองเอากากออก แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) จนได้สารที่มีลักษณะข้นเหนียว เรียกว่าสารสกัดหยาบ (crude extract)

2. วิธีการสกัดร้อน เป็นการสกัดโดยใช้เครื่องซอกห์เลต (soxhlet extractor) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Nuttawan[8] โดยใส่ผงแห้งของพืชปริมาณ 50 กรัม ลงใน cellulose extraction thimbles (ขนาด 43 มิลลิเมตร x 123 มิลลิเมตร) จากนั้นใส่ตัวทำละลายปริมาตร 400 มิลลิลิตร และทำการสกัดที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยแล้วเกิดการควบแน่นจนเกิดการสกัดซ้ำกันไปเรื่อยๆ เป็นเวลานานประมาณ 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าการสกัดสมบูรณ์ (สารสกัดที่ได้ออกมาจะมีลักษณะเป็นสีใส) จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ จนได้สารที่มีลักษณะข้นเหนียว (crude extract) นำสารสกัดหยาบที่ได้จาก 2 วิธีดังกล่าวข้างต้นมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เปอร์เซ็นต์ผลได้จากการสกัด (% yield) โดยคำนวณจากสูตร

$$\% \text{ yield (w/w)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g)}}{\text{น้ำหนักของวัตถุดิบ (g)}} \times 100$$

จากนั้นจึงนำสารสกัดหยาบที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ขั้นตอนการทดลอง

การทดสอบผลของสารสกัดหยาบต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc.

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา ทำได้โดยวิธีการใช้ glass slide ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Dhingra และ Sinclair[9] โดยนำแผ่นสไลด์แก้วปลอดเชื้อวางลงในจานเพาะเลี้ยง (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร) จากนั้นเตรียมอาหาร PDA แล้วผสมกับสารสกัดหยาบเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดที่ 9,000 7,000 5,000 และ 3,000 ppm แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเทอาหารที่ผสมสารสกัดหยาบลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีแผ่นสไลด์เพื่อให้อาหารกระจายท่วมทั่วทั้งแผ่นสไลด์

สำหรับชุดควบคุมแบบลบจะใช้อาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารสกัดหยาบและชุดควบคุมแบบบวกจะเติมสารฆ่าเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้น 0.005% (ตามคำแนะนำข้างขวด) แล้วปล่อยให้ผิวหน้าของอาหารแข็งตัวจึงหยดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเกลี่ย (spread) ให้สปอร์กระจายอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงตัดชิ้นวุ้นในจานเลี้ยงเชื้อรอบๆ แผ่นสไลด์ทิ้ง และนำแผ่นสไลด์ที่มีชิ้นวุ้นอยู่ด้านบนมาหยดด้วย lactophenol จำนวน 2-3 หยด แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ขนาดเล็ก แล้วนำสไลด์ดังกล่าวไปตรวจนับจำนวนสปอร์ที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสุ่มนับสปอร์จำนวน 100 สปอร์ แล้วหาค่าเฉลี่ย ทำการทดลอง 4 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ โดยใช้สูตรดังนี้ [10]

$$I = [100 ((S_c - S_t)/ S_c)]$$

เมื่อ; I คือเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา

S_c คือค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์เชื้อราที่งอกบนอาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารสกัดหยาบ

S_t คือค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์เชื้อราที่งอกบนอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบ

การทดสอบผลของสารสกัดหยาบต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc.

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทำได้โดยวิธี poisoned food technique (PFT) ที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Tasiwal และคณะ[11] โดยผสมสารสกัดหยาบกับอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดที่ 9,000 7,000 5,000 และ 3,000 ppm จากนั้นจึงเขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงในจานอาหาร สำหรับชุดควบคุมแบบลบจะใช้อาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารสกัดหยาบและชุดควบคุมแบบบวกจะเติมสารฆ่าเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้น 0.005% จากนั้นเจาะอาหารแข็ง PDA ที่มีเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. ที่เจริญบนผิวหน้าด้วย cork borer ปลอดเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร โดยตัดเส้นใยบริเวณขอบของโคโลนีเพื่อให้ได้เส้นใยที่กำลังอยู่ในช่วงของการเจริญ จากนั้นนำชิ้นวุ้นไปวางคว่ำบริเวณจุดกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร) ที่มีอาหาร PDA ผสมกับสารสกัดหยาบ แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ทำการทดลอง 4 ซ้ำ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยโดยใช้สูตรดังนี้ [12]

$$I = [100 ((C - T)/ C)]$$

เมื่อ; I คือเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย

C คือค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมที่ไม่ผสมสารสกัดหยาบ

T คือค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารผสมสารสกัดหยาบ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิจัยนี้เป็นการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized desing, CRD) เพื่อวิเคราะห์การยับยั้งการงอกสปอร์และการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากพืชที่แตกต่างกัน จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16 และ One-way Anova และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P<0.05)

ผลการศึกษา

จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดหยาบจากพืช 5 ชนิด ได้แก่ กะทือ กระชายดำ ขิง ไพล และเปราะป่า พบว่าวิธีการสกัดร้อนมีเปอร์เซ็นต์ผลได้

สูงกว่าวิธีการสกัดเย็นในทุกตัวทำละลาย (Table 1) ซึ่งสารสกัดหยาบจากเปราะป่าที่สกัดร้อนด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% มีเปอร์เซ็นต์ผลได้สูงที่สุด เท่ากับ 25.40% รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากไพล และสารสกัดหยาบจากกระชายดำ เท่ากับ 17.25% และ 10.95% ตามลำดับ สำหรับวิธีการสกัดเย็นพบว่าสารสกัดหยาบจากเปราะป่าที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 8.22% รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากเปราะป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน และสารสกัดหยาบจากไพลที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% มีค่าเท่ากับ 7.93% และ 7.18% ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบจากกระชายดำจากวิธีการสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายเฮกเซน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ผลได้จากการสกัดต่ำที่สุดเท่ากับ 0.26% ซึ่งพบว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูง (เอทานอล) ทำให้ได้เปอร์เซ็นต์ผลได้สูงกว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ (เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc.

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. ด้วยวิธี glass slide หลังจากการทดสอบ 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดหยาบจากไพลที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด จากวิธีสกัดร้อน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุดเมื่อสกัดด้วยเอทานอล 95% โดยมีค่าสูงถึง 85.56±1.49% รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากไพลที่ได้จากการสกัดเย็นสามารถยับยั้งได้ 82.28±1.35% ส่วนสารสกัดหยาบจากกระชายดำ ขิง และเปราะป่าไม่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ (ไม่แสดงข้อมูล)

Table 1 A comparisons of maceration and soxhlet extraction of plant extracts on extraction yield (%).

Plants	Yield (%)					
	maceration			soxhlet extraction		
	Hexane	Dichloro-methane	95% Ethanol	Hexane	Dichloro-methane	95% Ethanol
Z. zerumbet	1.61	2.06	3.11	1.73	2.06	5.31
K. parviflora	0.26	2.60	4.39	2.96	6.73	10.95
Z. offcinale	1.10	1.41	3.54	4.16	6.06	9.60
Z. montanum	2.21	5.92	7.18	4.10	7.15	17.25
K. pulchra	4.83	7.93	8.22	7.21	9.50	25.40

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc.

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากกะทือ กระชายดำ ขิง ไพล และเปราะป่า ที่ระดับความเข้มข้น 9,000 7,000 5,000 และ 3,000 ppm ด้วยวิธี PFT พบสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรวงศ์ขิงที่ได้จากวิธีสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยดีกว่าวิธีการสกัดร้อน สำหรับวิธีการสกัดเย็นพบว่าสารสกัดหยาบจากขิง ไพลและเปราะป่า ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 3,000 ppm ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราของเส้นใยได้สูงถึง 100.00% ซึ่งมีค่าเท่ากับชุดควบคุม (0.005% carbendazim) (Table 2) ยกเว้นกระชายดำที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้เท่ากับ 75.37±1.16% มากกว่า

การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 % (p<0.05) สำหรับวิธีการสกัดร้อน พบว่าสารสกัดหยาบจากไพลที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้สมบูรณ์ 100.00% เท่ากับ ชุดควบคุมที่เป็นสารฆ่าเชื้อรา (Table 3) รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากไพลที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (91.41±0.97%) ขิง (89.92±1.12%) และไพล (87.32±1.27%) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ตามลำดับ

Table 2 Inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. mycelial growth due to the extracts derived from maceration with different solvent.

Plant	Solvents	Inhibition of mycelia (%) *			
		9,000 ppm	7,000 ppm	5,000 ppm	3,000 ppm
Z. zerumbet	Hexane	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	84.43±4.09^{cB}	80.60±0.56^{cBC}
	Dichloromethane	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	82.84±3.12^{cB}	79.11±1.20^{cC}
	95% Ethanol	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	91.42±0.54^{bB}
K. parviflora	Hexane	100.00±0.00^{aA}	77.21±4.22^{dB}	75.36±3.07^{dBC}	75.37±1.16^{dBC}
	Dichloromethane	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	70.15±2.79^{fB}	67.13±4.05^{gBC}
	95% Ethanol	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	91.42±1.24^{bB}	69.20±2.70^{fgC}
Z. offcinale	Hexane	100.00±0.00^{aA}	76.71±4.60^{dB}	74.81±3.01^{deBC}	73.52±4.10^{deBCD}
	Dichloromethane	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	76.52±2.62^{dB}	72.95±1.40^{deBC}
	95% Ethanol	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}
Z. montanum	Hexane	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}
	Dichloromethane	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}
	95% Ethanol	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}
K. pulchra	Hexane	100.00±0.00^{aA}	92.91±0.60^{bB}	70.88±4.06^{efC}	70.69±2.92^{efC}
	Dichloromethane	100.00±0.00^{aA}	87.31±0.82^{cB}	78.33±3.64^{dC}	73.30±3.39^{deD}
	95% Ethanol	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}
control	carbendazim	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}

Note: * mean ± SD

Means within the row followed by the same uppercase letter are not significantly different at P< 0.05 as determined by DMRT.

Means within the column followed by the same lowercase letter are not significantly different at P< 0.05 as determined by DMRT.

Table 3 Inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. mycelial growth due to the extracts derived from soxhlet extraction with different solvent.

Plant	Solvents	Inhibition of mycelia (%) *			
		9,000 ppm	7,000 ppm	5,000 ppm	3,000 ppm
Z. zerumbet	Hexane	100.00±0.00^{aA}	80.60±1.67^{fB}	76.31±2.50^{eC}	74.60±3.66^{ghC}
	Dichloromethane	100.00±0.00^{aA}	82.84±1.67^{eB}	77.41±2.24^{eC}	75.38±0.86^{gCD}
	95% Ethanol	100.00±0.00^{aA}	88.07±1.57^{dB}	85.44±1.29^{dC}	82.09±0.93^{efD}
K. parviflora	Hexane	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	92.91±0.60^{bB}	82.85±1.99^{defC}
	Dichloromethane	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	86.01±0.58^{cdB}
	95% Ethanol	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	85.64±0.14^{cdB}
Z. offcinale	Hexane	100.00±0.00^{aA}	91.78±0.76^{bB}	89.92±1.12^{cB}	72.19±2.46^{hC}
	Dichloromethane	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	84.98±0.28^{cdeB}
	95% Ethanol	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	89.92±1.12^{bB}
Z. montanum	Hexane	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100±0.00^{aA}
	Dichloromethane	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	91.41±0.71^{bB}
	95% Ethanol	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	87.32±1.27^{bcB}
K. pulchra	Hexane	92.53±0.70^{bA}	89.55±0.59^{cA}	85.08±0.58^{dB}	74.05±2.88^{ghC}
	Dichloromethane	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100±0.00^{aA}	83.68±0.84^{defB}
	95% Ethanol	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	92.54±0.55^{bB}	82.27±1.04^{efC}
control	carbendazim	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}

Note: * mean ± SD

Means within the row followed by the same uppercase letter are not significantly different at $P< 0.05$ as determined by DMRT.

Means within the column followed by the same lowercase letter are not significantly different at $P< 0.05$ as determined by DMRT.

วิจารณ์และสรุปผล

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรวงศ์ขิงต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส โดยมีพืชทดสอบได้แก่ กะทือ กระชายดำ ขิง ไพล และเปราะป่า ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดมี 3 ชนิดคือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล 95% ซึ่งสกัดด้วยวิธีการสกัดเย็นและสกัดร้อน ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

จากการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ผลได้จากการสกัด พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% มีเปอร์เซ็นต์ผลได้จากการสกัดสูงกว่าการใช้ตัวทำละลายเฮกเซน และไดคลอโรมีเทน โดยสารสกัดหยาบจากเปราะป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ด้วยวิธีการสกัดร้อนมีเปอร์เซ็นต์ผลได้จากการสกัดมากที่สุด เท่ากับ 25.40% รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากไพลและกระชายดำ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ผลได้จากการสกัดเท่ากับ 17.25% และ 10.95% ตามลำดับ และสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดร้อนมีเปอร์เซ็นต์ผลได้สูงกว่าวิธีสกัดเย็นในทุกตัวทำละลาย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Aspé และ Fernández ที่รายงานว่าการสกัดด้วยวิธีสกัดร้อนมีเปอร์เซ็นต์ผลได้มากกว่าการสกัดเย็น อาจจะเกิดจากความร้อนทำให้ตัวทำละลายเกิดการเดือดและไอระเหย แล้วไอระเหยเข้าไปดึงสารที่อยู่ในพืชทำให้สามารถสกัดสารออกมาได้มากกว่าการสกัดเย็น[13] และมีรายงานว่าปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายเดียวกันจากวิธีการสกัดร้อนให้เปอร์เซ็นต์ผลได้จากการสกัดสูงกว่าวิธีการสกัดเย็นในทุกตัวทำละลาย[14]

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชวงศ์ขิงต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา

C. gloeosporioides (Penz.) Sacc. พบว่าสารสกัดจากไพลที่ได้จากวิธีสกัดร้อน ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุดที่เท่ากับ 85.56±1.49% ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm ซึ่งเป็นผลการทดลองที่แตกต่างกับการทดสอบประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยที่พบว่าสารสกัดหยาบจากไพลที่สกัดด้วยทุกตัวทำละลาย และสารสกัดหยาบจากขิง เปราะป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ด้วยวิธีการสกัดเย็น ที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้สมบูรณ์ 100.00% ซึ่งมีฤทธิ์เท่ากับสารฆ่าเชื้อรา carbendazim นอกจากนี้พบว่าสารสกัดหยาบทุกชนิดที่ได้จากวิธีการสกัดเย็น ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% นั้นมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราได้ดีกว่าวิธีการสกัดร้อน ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานว่าการสกัดที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60-70 องศาเซลเซียส อาจจะช่วยรักษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบที่อาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราไม่ให้สลายตัวระหว่างการสกัด[13] นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานว่าไพลมีน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และยังมีสาร zerumbone ซึ่งเป็นสารจำพวก sesquiterpene ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเน่าในพืช[15] และนอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไพลและเปราะป่ามีสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม terpenes ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ [16] นอกจากนี้ยังมีสารประกอบฟีนอลิกที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูง[17] ซึ่งมีรายงานว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อราตามธรรมชาติ[18,19] ผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าพืชสมุนไพรวงศ์ขิงมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส จึงควรส่งเสริมการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรนี้มาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองส่งเสริมการวิจัยและบริการวิชาการ แห่งมหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยประจำปี 2556 และขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมืออุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. วีระณีย์ ทองศรี. การควบคุมโรคของไม้ผลก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธี. Postharvest Newsletter. 2555;11(2):5.
2. สุภัทรา จามกระโทก, ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล, ชลิดาเล็ก สมบูรณ์, นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง, อุดม ฟ้ารุ่งสาง. ผลของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรวงศ์ขิงในการต่อต้านราสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 2549; 37(2):98-101.
3. Victo'rio CP. Therapeutic value of the genus Alpinia, Zingiberaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2011;21(1):194-201.
4. Prasad KN, Yang E, Yi C, Zhao M, Jiang Y. Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2009;10(2):155-9.
5. Anaruma ND, Schmidt FL, Duarte MCT, Figueira GM, Delarmelina C, Benato EA, et al. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. In yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. Brazilian Journal of Microbiology. 2010;41(1):66-73.
6. วนัสนันท์ สะอาดล้วน. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากดีปลีเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วง. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2548.
7. Silva PA, Oliveira DF, Prado NRTd, Carvalho DAd, Carvalho GAd. Evaluation of the antifungal activity by plant extracts against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Ciência e Agrotecnologia. 2008;32(2):420-8.
8. Nuttawan Yoswathana. Active ingredients of *Kaempferia galangal* Linn. By using novel technique and application in microbial

inhibition crea. 35th Congress on Science and Technology of Thailand. 15-17th October 2009.

9. Dhingra OD, Sinclair JB. Basic plant pathology methods: CRC press; 1995.
10. Ogbebor NO, Adekunle AT, Enobakhare DA. Inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sac. causal organism of rubber (*Hevea brasiliensis Muell*. Arg.) leaf spot using plant extracts. African Journal of Biotechnology. 2007;6(3).
11. Tasiwal V, Benagi VI, Hegde YR, Kamanna BC, Naik KR. In vitro evaluation of botanicals, bioagents and fungicides against anthracnose of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Karnataka J Agric Sci. 2009;22(4):803-6.
12. De Costa DM, Gunawardhana HMDM. Effects of sodium bicarbonate on pathogenicity of *Colletotrichum musae* and potential for controlling postharvest diseases of banana. Postharvest Biology and Technology. 2012;68(0):54-63.
13. Aspé E, Fernández K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. Industrial Crops and Products. 2011;34(1):838-44.
14. อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, งามผ่อง คงคาทิพย์, สุภนิดา บัวบาน, นวลอนงค์ นาคคง, นิภา เขื่อนควบ. การศึกษาการติดสีผมของสารสกัดจากใบเทียนกิ่ง (*Lawsonia inermis* Linn.) การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม 5-7. กรุงเทพฯ, 2544, หน้า 141-146 (444 หน้า)
15. ดำรง พงศ์พุทธชาติ. ผลยับยั้งของพืชสมุนไพรบางชนิดต่อเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคผิวหนัง. รวมบทคัดย่องานวิจัยการแพทย์แผนไทยและทิศทางการวิจัยในอนาคต สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2543;184
16. จุพาพันธุ์ รัตนนิล, ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล, รชา เทพษร. ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของฟิล์มบริโภคได้จากผงบุกผสมสารสกัดจากสมุนไพรไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 2554;42 (3(พิเศษ)):196-9.
17. Chan EW, Lim Y, Wong S. Antioxidant properties of ginger leaves: An overview. Free Radicals and Antioxidants. 2011;1(1):6-16.
18. Tasiwal V, Benagi VI, Hegde YR, Kamanna BC, Naik KR. In vitro evaluation of botanicals, bioagents and fungicides against anthracnose of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Karnataka J Agric Sci. 2009;22 (4):803-6.
19. Girijashankar V, Thayumanavan B. Evaluation of *Lawsonia inermis* Leaf Extracts for Their *in vitro* Fungitoxicity Against Certain Soilborne Pathogens. Indian Journal of Plant Protection. 2005;33(1):111-4.