ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช | โรคพืช

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรเพื่อลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าและของผักในเรือนทดลองและการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์

Utilization of Herbal Extract to Control Population of *Erwinia carotovora* the Cause of Vegetable Soft Rot Disease in Greenhouse and their Active Substances Analysis

นามผู้วิจัย นางสาววัชรา สุวรรณ์อาศน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์ศศิธร วุฒิวณิชย์, วท.ม.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล, Dr.sc.agr.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชนี ฮงประยูร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรเพื่อลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าและของผักในเรือนทดลองและการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์

Utilization of Herbal Extract to Control Population of *Erwinia carotovora* the Cause of Vegetable Soft Rot Disease in Greenhouse and their Active Substances Analysis

โดย

นางสาววัชรา สุวรรณ์อาศน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)
พ.ศ.2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัชรา สุวรรณ์อาศน์ 2555: การใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรเพื่อลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักในเรือนทดลองและการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ศศิธร วุฒิวณิชย์ , วท.ม. 65 หน้า

ศึกษาการใช้ประโยชน์จากสารสกัดหยาบของพืชสมุนไพรในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผัก ใช้สมุนไพร 20 ชนิด มาสกัดสารสกัดหยาบด้วยเอทานอล 95 % และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยวิธี paper disc agar diffusion ในห้องปฏิบัติการ พบสารสกัดหยาบจากพืช 8 ชนิด ที่ก่อให้เกิดบริเวณยับยั้งเห็นได้ชัดเจน ได้แก่ ผลสมอพิเภก ผลเบญกานี เปลือกผลทับทิม ผลกานพลู ผลสมอไทย เปลือกผลมังคุด ใบฝรั่ง และ ใบพลู โดย จะให้ผลดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1,000 ppm โดยสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก ผลเบญกานี และเปลือกผลทับทิม ให้ผลดีที่สุดและมีค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้ง 0.41,0.33 และ 0.25 เซนติเมตร ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบจากพืชทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้น 10,000 และ 20,000 ppm มาใช้ทดสอบในการลดปริมาณเชื้อในดินจำลองการติดเชื้อ โดยการคลุกลงในดิน ทำการสุ่มตรวจนับปริมาณเชื้อทุก 5 วันเป็นเวลา 30 วันโดยวิธี soil serial dilution และ spread plate บนอาหาร endo agar พบสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกที่ความเข้มข้น 20,000 ppm สามารถลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคในดินได้ดีที่สุด โดยปริมาณเชื้อลดลงจาก 3.20 x10^7 cfu/g ในวันแรก เหลือ 2.50x10^5 cfu/g ในวันที่ 30 เมื่อเทียบกับ control ในช่วงเวลาเดียวกันที่พบปริมาณเชื้อในระดับ 9.87 x10^5 cfu/g จึงนำสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกมาศึกษาความถี่ของการใช้เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด พบว่าการราดสารสกัดความเข้มข้น 20,000 ppm ทุกๆ 10 วัน 3 ครั้งติดต่อกัน มีผลทำให้พบการเกิดโรคน้อยที่สุด ที่ 17.50 % และปริมาณเชื้อในวันที่ 30 ลดลงเหลือ 5.55 x10^6 cfu/g เมื่อเทียบกับ control มีเปอร์เซ็นต์ การเกิดโรค 82.50% และปริมาณเชื้อในช่วงเดียวกันสูงถึง 1.96 x10^7 cfu/g จึงนำสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกมาแยกสารออกฤทธิ์โดยวิธี quick column chromatography ได้สาร 33 fraction จัดกลุ่มสารที่มีลักษณะคล้ายกันได้ 5 fraction นำแต่ละ fraction มาทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยวิธี paper disc agar diffusion พบว่าสารสกัด fraction ที่ FS2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของบริเวณยับยั้ง 0.85 เซนติเมตร นำสารสกัด FS2 มาแยกด้วย column chromatography อีกครั้งได้สาร 15 fraction นำแต่ละ fraction ไปทดสอบกับเชื้อ พบสาร FS2-5 ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด จึงนำสาร FS2-5 มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วย TLC plate มีค่า R_f= 0.50 มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองใส เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างโดยนิวเคลียร์แมกเนติก (NMR) พบว่าสเปกตรัมของ^{1}H NMR แสดงสัญญาณดังต่อไปนี้ 2.5 ppm, hydroxyl protons; 3.7 ppm, methoxy protons; 7.0 ppm, aromatic protons ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายสาร methyl gallate

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Watchara Suwanart 2012: Utilization of Herbal Extract to Control Population of *Erwinia carotovora* the Cause of Vegetable Soft Rot Disease in Greenhouse and their Active Substances Analysis. Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Sasitorn Vudhivanich, M.S. 65 pages.

Utilization of herbal extract for reduce population of *Erwinia carotovora*, the cause of vegetable soft rot, in the infested soil were studied. Twenty kinds of ethanol crude herbals extract were tested for *Erwinia carotovora* growth inhibition by paper disc agar diffusion method on double layer nutrient glucose agar (NGA).It was founded that eight kinds of crude extracts could inhibited the growth of bacteria with inhibition zone. The crude extract of beleric myrobalan fruit nutgall fruit and pomegranate fruit peel were selected according to their hogher inhibition zone at 0.41, 0.33 and 0.25 cm, respectively. Each herbal crude extracts at the concentration of 10,000 and 20,000 ppm were tested to the artificial infested soil in greenhouse condition. Soil was sampling and the bacterial population was evaluated by serial dilution and viable plate count on endo agar every 5 days until 30 days. The experimental result showed beleric myrobalan fruit extract 20,000 ppm could reduced bacterial population from $3.2X10^{7}$cfu/g to $2.5X10^{5}$cfu/g within 30 days compared with bacterial population in control plot was $9.87X10^{5}$cfu/g. The crude extract of beleric myrobalan fruit 20,000 ppm was tested to artificial infested soil for a frequency of herbal used. It showed soil drench with beleric myrobalan fruit crude extract 3 times every 10 days could reduce bacterial population to $5.55X10^{6}$cfu/g and the disease was appeared at 17.5% compared to the bacterial population in control treatment at $1.96X10^{7}$cfu/g and percentage disease was 82.5%. Crude extract of beleric myrobalan fruit was purified by column chromatography and further separated by TLC. Five different fractions FS1- FS5 was received and each fraction was tested again for growth inhibition of the soft rot bacteria by paper disc agar diffusion method. It founded that fraction FS2 could inhibited the growth of *Erwinia carotovora* giving the widest inhibition zone of 0.85 cm. FS2 fraction was separated by column chromatography and retested. Sub fraction FS2-5 provided the widest inhibition zone and was selected to further purified by preparative thin layer chromatography.A single spot showing dark brown sediment characteristic with R_f value of 0.50 was collected to analysis with nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). They were showed several peaks at at aromatic proton 2.5 ppm, hydroxyl protons; 3.7 ppm, methoxy protons; 7.0 ppm similar to methyl gallate.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ศศิธร วุฒิวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ดร. ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทดลอง ตลอดจนให้คำปรึกษาเกี่ยวกับอุปกรณ์ตลอดการทดลองและให้คำแนะนำแก้ไขข้อผิดพลาดของวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ รศ.สมชาย สุขกุล ประธานการสอบ และดร.ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้ให้คำแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ดร.พรศิริ หลีวานิช ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์สาร อ.อมรศรี ขุนอินทร์ กรุณาให้คำปรึกษาด้านการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง และขอขอบคุณ คุณอังคาร ยิสารคุณ คุณพรวิภา โสภณพัฒนโภคา คุณเกษศิณี ศรีไพร คุณธิดาวรรณ ชมเดช คุณอรพินท์ ทองอร่าม คุณดวงหทัย สุขกิจ และคุณนวรัตน์ อิ่มจิตร ที่ค่อยช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อมาโนช คุณแม่บุญช่วย คุณวิทยา สุวรรณ์อาศน์ ที่ได้อบรมและให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

วัชรา สุวรรณ์อาศน์

พฤษภาคม 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
อุปกรณ์	19
วิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	28
ผล	28
วิจารณ์	51
สรุป	54
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	56
ภาคผนวก	63
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	65

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	พืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง	20
2	ไอโซเลทของเชื้อ *Erwinia carotovora* แยกได้จากผักที่ใช้ในการทดลอง	21
3	เชื้อบริสุทธิ์ 5 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากผักกาดขาวและผักกาดหัว	28
4	ค่าเฉลี่ยการประเมินระดับความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อ 5 ไอโซเลทหลังปลูกเชื้อนาน 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบบนพืชทดสอบ 5 ชนิด	29
5	สรีรวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ ECC19 เปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิง	33
6	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากการระเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary vacuum evaporator	34
7	ค่าเฉลี่ยความกว้าง (เซนติเมตร) บริเวณยับยั้งเชื้อ *Erwinia carotovora* ของสารสกัดหยาบจากพืช 20 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 -100,000 ppm	38
8	ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเน่าเละในผักกาดเขียวปลีอายุ 40 วัน ที่แยกได้จากดินในแต่ละกรรมวิธี โดยเปรียบเทียบกับ control ตั้งแต่วันที่ 5 -30	40
9	ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* ในดินแต่ละกรรมวิธี และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเน่าเละในผักเปรียบเทียบกับ control ตั้งแต่วันที่ 5 -30	42
10	ลักษณะปริมาณและค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) (เซนติเมตร) ของสารสกัดจากสมอพิเภกแต่ละ fraction ที่แยกโดยวิธีคอลัมภ์โครมาโตกราฟี	45
11	ลักษณะและค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) (เซนติเมตร) ของสารสกัดจากสมอพิเภกแต่ละ fraction (FS2-1 ถึง FS2-15) ที่แยกโดยวิธีคอลัมภ์โครมาโตกราฟี	47

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะอาการเน่าเละในพืชชนิดต่างๆหลังจากปลูกเชื้อไอโซเลท ECC19 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง	31
2	ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืช 8 ชนิด โดยการทกสอบด้วย paper disc agar diffusion ที่ระดับความเข้มข้น 1,000, 5,000, 10,000, 50,000 และ 100,000 ppm ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora*	36
3	ลักษณะทางกายภาพของสาร 33 fraction (F1 ถึง F33) ที่แยกสกัดจากผลสมอพิเภก โดยวิธี quick column chromatography	44
4	ลักษณะทางกายภาพของสาร 15 fraction (FS2-1 ถึง FS2-15) ที่แยกสกัดจากผลสมอพิเภก โดยวิธี quick column chromatography	46
5	สัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร FS2-5 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบผลสมอพิเภก	49
6	สัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร FS2-5 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบผลสมอพิเภก เปรียบเทียบกับสัณญาณสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร methyl gallate	50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

NGA	=	nutrient glucose agar
NB	=	nutrient broth
ppm	=	ส่วนในล้านส่วน
MIC	=	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration)
MBC	=	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (minimum bactericidal concentration)
TLC	=	thin layer chromatography
UV	=	ultraviolet
FS	=	fraction
Rf	=	relative front
NMR	=	nuclear magnetic resonance spectroscopy

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรเพื่อลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักในเรือนทดลองและการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์

Utilization of Herbal Extract to Control Population of *Erwinia carotovora* the Cause of Vegetable Soft Rot Disease in Greenhouse and their Active Substances Analysis

คำนำ

โรคเน่าเละของผักที่เกิดจากแบคทีเรีย เป็นโรคสำคัญของพืชผักโดยเฉพาะอย่างยิ่งในวงศ์กะหล่ำ อาการเริ่มจากรอยช้ำฉ่ำน้ำที่ขยายตัวออกอย่างรวดเร็วทั้งในแนวกว้างและแนวลึก ลักษณะแผลจะเละ มีเมือกเยิ้มและมีสีน้ำตาลคล้ำ มีกลิ่นเหม็นเฉพาะตัว สาเหตุโรคเกิดจาก *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae จัดเป็นกลุ่ม facultative anaerobe เชื้อเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 27-30 °C ไม่สร้าง endospore (Schaad *et al*.,2001) เชื้อเข้าสู่พืชได้ดีทางบาดแผล ต้นผักที่เป็นโรคจะเน่าอย่างรวดเร็ว เชื้อสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในเศษซากพืชในดินได้นานหลายปี เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม และมีผักที่อ่อนแอต่อโรคปลูกลงไป เชื้อที่อยู่ในดินสามารถเพิ่มปริมาณและก่อให้เกิดโรคแก่พืชได้ โรคนี้นอกจากจะสร้างความเสียหายในแปลงแล้วยังทำให้ผักเสียหายระหว่างการขนส่ง และรอจำหน่ายเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากไม่มีการจัดการที่มีประสิทธิภาพ การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืชก่อให้เกิดพิษต่อทั้งสภาพแวดล้อม ผู้บริโภคและเกษตรกรโดยตรง จึงได้มีการ ศึกษาวิธีการในการควบคุมโรค ทดแทนการใช้สารเคมี และพบว่าสารสกัดจากพืชหลายชนิดมีแนวโน้วสามารถนำมาควบคุมโรคพืชได้ อารีย์ (2546) นำสารสกัดจากพืชวงศ์ Commelinaceae 5 ชนิด ซึ่งสกัดด้วยเอทานอลและน้ำกลั่น นำมาทดสอบฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย 15 ชนิดบนอาหาร NA พบว่า สารสกัดหยาบจากว่านกาบหอยสด ที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 6,000, 8,000 และ 10,000 ppm สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Erwinia carotovora* ธรรดร (2546) ศึกษาการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากสมุนไพร ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 % ต่อเชื้อรา *Alternaria brassicicola.,Fusarium oxysporum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่าสารสกัดจากกานพลูและว่านน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์ เจตน์(2545)ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

42 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาวและ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักโดยวิธี Paper disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งและหูปลาช่อน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิด ส่วนสารสกัดหยาบจากต้นลูกใต้ใบและมะขามสุก ยับยั้งเฉพาะ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* จากรายงานดังกล่าวทำให้เห็นถึงศักยภาพของสมุนไพรไทยในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผัก ในระดับห้องปฏิบัติการและในสภาพดินจำลองการติดเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผัก ในระดับห้องปฏิบัติการและในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียในดิน

2. วิเคราะห์กลุ่มสารธรรมชาติเบื้องต้นและสารออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ให้ผลดีที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

โรคเน่าเละของผัก (Soft rot of vegetable)

โรคเน่าเละของผักมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย เป็นโรคที่ได้รับการจัดลำดับให้อยู่ในกลุ่มของโรคที่สำคัญมากโรคหนึ่งของพืชผัก ในด้านของการระบาดและความเสียหาย ลักษณะอาการจะเริ่มจากรอยช้ำฉ่ำน้ำ (water soaked) ขึ้นก่อน แผลจะขยายโตออกทั้งโดยรอบและลึกลงภายในเนื้ออย่างรวดเร็ว เนื้อเยื่อส่วนนี้ก็จะอ่อนยุบตัวลง ภายในเวลาเพียง 1-2 วันอาการเน่าจะกระจายออกไปอย่างกว้างขว้างครอบคลุมทั้งส่วนของพืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย ลักษณะแผลจะเละแฉะเป็นเมือกเยิ้ม มีสีคล้ำ หรือสีน้ำตาลพร้อมกับมีกลิ่นเฉพาะตัว (ศักดิ์, 2537) อาการเน่าเละนี้เกิดเนื่องจากเมื่อแบคทีเรียสาเหตุเข้าสู่พืชได้แล้ว จะเจริญเพิ่มจำนวนอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์พืช (intercellular space) แล้วปล่อย pectolytic enzyme ได้แก่ pectin methyl esterase (PME), depolymerase (DP), polygalacturonase (PG), และ pectin lyase (PL) ออกมาย่อยสารเชื่อมระหว่างเซลล์พืช ทำให้เซลล์พืชแยกหลุดออกจากกัน เนื้อเยื่อพืชยุบตัวลง ของเหลวภายในพืชจะซึมออกมาจากบริเวณที่เน่าเป็นอาหารให้แก่แบคทีเรียและมักมีจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ใช่สาเหตุโรค(secondary organism) มาลงทำลายซ้ำเติมภายหลังจากที่พืชเป็นโรคแล้ว ทำให้เกิดอาการเน่ามากขึ้น ในการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมักพบแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และเชื้ออื่นๆเจริญปะปนมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเสมอ (ศศิธร, 2545) สาเหตุโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae รูปร่างเป็นท่อนตรง (rod shaped)ขนาด 0.5-1.0 x 1.0 -3.0 ไมครอน อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆหรือจับกันเป็นคู่ ในบางกรณีอาจพบต่อกันเป็นสายสั้นๆ ติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่โดย peritrichous flagella จัดเป็น facultative anaerobic เชื้อเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยา oxidase เป็นลบและ catalase เป็นบวกสร้างกรดเมื่อเจริญในอาหารที่มีน้ำตาล fructose, galactose, glucose, sucrose และ methlyglucoside เชื้อกลุ่มนี้ไม่สร้าง endospore (Schaad *et al*., 2001) การแพร่ระบาดและการอยู่ข้ามฤดูของเชื้อ พบบริเวณแผลที่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้มแฉะ จะเต็มไปด้วยเซลล์แบคทีเรียสาเหตุโรคเป็นจำนวนมาก ซึ่งแพร่กระจายได้ดีโดยน้ำ ติดไปกับปีกและขาของแมลง หรือติดไปกับมีด จอบ และเข้าสู่พืชได้ดีทางบาดแผล ต้นผักเป็นโรคเน่าอย่างรวดเร็วและยุบตัวลงไปกองติดกับพื้นดิน เชื้อสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในเศษซากพืชในดินได้นานหลายปี นอกจากนี้ยังพบว่ามีแมลงบางชนิดเป็นตัวช่วยในการแพร่ระบาด สำหรับการเกิดและการแพร่ระบาดของโรคนี้ในประเทศไทยเกิดจากมีเชื้อสะสมอยู่ในดินบริเวณแปลงปลูกพืช เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม และมีผักที่อ่อนแอต่อโรคปลูกลงไป เชื้อที่อยู่ในดินสามารถเพิ่มปริมาณ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และก่อให้เกิดโรคแก่พืชได้ เมื่อมีต้นพืชเป็นโรคอยู่ในแปลงแม้เพียง 1-2 ต้น จะกลายเป็นแหล่งของเชื้อพร้อมที่จะแพร่ระบาดทั้งแปลงโดยน้ำ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคซึ่งมักจะแพร่ระบาดและสร้างความเสียหายอย่างมากในช่วงฤดูฝน เนื่องจากสภาพอุณหภูมิสูง 30-36 องศาเซลเซียส และความชื้นสูง สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการพัฒนาของโรค ทำให้อาการโรครุนแรง แต่ถ้าหลังการติดเชื้อแล้วอุณหภูมิลดต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส อาการของโรคจะไม่รุนแรง แผลจะไม่ขยาย ทั้งนี้เนื่องจากอากาศเย็นไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โรคนี้นอกจากจะสร้างความเสียหายในแปลงแล้ว ยังทำให้ผักเสียหายระหว่างการขนส่งและรอจำหน่ายเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าไม่มีการจัดการที่ดีพอ

รายงานเกี่ยวกับการใช้พืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ที่ก่อโรคให้เกิดโรคในคนและสัตว์

Elgayyar *et al.* (2001) ศึกษาความสามารถของน้ำมันหอมระเหยของพืชสมุนไพรและเครื่องเทศเพื่อควบคุมการเติบโตของจุลินทรีย์ โดยใช้แผ่นยาปฏิชีวนะเป็นcontrol พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากออริกาโน (oregano) ให้ผลยับยั้งสูงสุด โดยมีบริเวณยับยั้งประมาณ 70-80 มิลลิเมตร ซึ่งค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้จุลินทรีย์ตายประมาณ 8 ppm บัญญัติ (2518)ได้ทดสอบความสามารถของเครื่องเทศ 27 ชนิดในการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ 33 ชนิด พบว่าน้ำมันหอมระเหยในเครื่องเทศสามารถยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเครื่องเทศที่ไม่สกัดน้ำมันและน้ำที่เหลือจากการสกัดน้ำมัน ยกเว้น กระชาย ลูกจันทน์ ดอกจันทน์ น้ำเครื่องเทศที่เหลือจากการสกัดน้ำมัน ยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าส่วนอื่นๆ และกานพลูยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดโดยสามารถยับยั้งการเติบโตทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย ใบแมงลักให้ผลยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียเท่านั้น สิริพรและคณะ (2539) ทดสอบความสามารถของเครื่องเทศและพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอาหาร ได้แก่ *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*และ *Yersinia enterocolitica* พบว่าสารสกัดจากกานพลูมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ สารสกัดจากใบพลูสามารถยับยั้งการเติบโตของ *E. coli* O157:H7 ได้สูงสุด ในขณะที่สารสกัดจากเปลือกทับทิมสามารถยับยั้งการเติบโตของ *Y. enterocolitica* ได้ดี สำหรับประสิทธิภาพของกานพลูในการยับยั้งการเติบโตของ *L. monocytogenes* ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเติบโตดีกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และประสิทธิภาพจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น

Duffy and Power (2001) ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดของพืชในประเทศจีนด้วยสารละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำในการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ต่างๆ พบว่าสารสกัดของ licorice (*Glyerrhizae uralensis*) มีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเติบโตของ *Basillus subtilis* เป็น 1 มก./มิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจาก goldthread rhizome และ skullcap root มีค่าความเข้มข้นที่ 5 มก./มิลลิลิตร สำหรับ *E.coli* ถูกยับยั้งด้วย goldthread rhizome และ skullcap root ที่ความเข้มข้น 25 มก./มิลลิลิตร Hitoko *et al.* (1980) รายงานการใช้พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ *S. aureus, B. subtilis, E. coli* และ *Candida albicans* โดยใช้พืชสมุนไพรได้แก่ กระไดลิง ขมิ้นเครือ ขมิ้นอ้อย กระทกรก เจตมูลเพลิงแดง เหงือกปลาหมอ จำปีโด่ไม่รู้ล้ม ตะโก ทองพันชั่ง พบว่าสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ได้มากน้อย ขึ้นอยู่กับชนิดของสมุนไพรและชนิดของจุลินทรีย์ สารสกัดจากสมุนไพรในแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่ มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารสกัดในคลอโรฟอร์ม และปิโตเลียมอีเทอร์ Apisariyakul *et al*. (1995) ได้ศึกษาผลของ tumeric oil และ Curcumin ต่อเชื้อราก่อให้เกิดโรคผิวหนัง จำนวน 15 ชนิด พบว่า tumeric oil สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค 4 ชนิดและยีสต์ 6 ชนิด แต่ Curcumin ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้ รายงานการวิจัยของพืชสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส มักเป็นการศึกษาเพียงไม่กี่ชนิด ซึ่งได้แก่ *Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella typhi, Shigella boydii* และ *Staphylococcus aureus*

วาทินี (2546) พบว่าสารสกัดจากใบพลูสามารถยับยั้งการเจริญของแบคมีเรียที่ทดสอบ 6 ชนิดคือ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Samonella derby, S. typhi, S. typhimurium, Lactobacillus sp.* และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี พบว่าสารประกอบที่สามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียในสารสกัดจากใบพลูคือ ยูจีนอล

ธิดารัตน์ (2534) ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคอุจาระร่วงบิด และเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคทางเดินหายใจ ของสารสกัดแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 85 เปอร์เซ็นต์ จากใบฟ้าทะลายโจร พบว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วง และบิด ได้ดีกว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคทางเดินหายใจ สารสกัดจากแอลกอฮอล์ 85 เปอร์เซ็นต์ ที่มีความเข้มข้น 25 มก./มิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้ง เชื้อ *E.coli*,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Salmonella krefeld, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* 01 และ *Shigella dysenteriae* ได้ดีกว่าสารสกัดแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน Alzoreky and Nakahara (2003) ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากพืชที่กินได้จากจีน ญี่ปุ่นไทย และเยเมน ในการยับยั้งการเติบโตของ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* และ *Salmonella infantis* ซึ่งค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดของพืชที่มีต่อแบคทีเรียเหล่านี้เป็น 165-2,640 มิลลิกรัม/ลิตร โดยสารสกัดจาก *Cinnamomum cassia*, *Rumex nervosus*, *Ruta graveolens*, *Thymus serpyllum*, *Azadirachta indica* และ *Zingiber officinale* ยับยั้งการเติบโตของ *B. cereus* ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 165-660 มิลลิกรัม/ลิตร ในขณะที่ *E. coli* และ *S. infantis* ถูกยับยั้ง ด้วย *C. cassia* เพียงชนิดเดียวที่ความเข้มข้นสูงถึง 2,640 มิลลิกรัม/ลิตร

สุจินต์และ มาลี (2533) ได้สกัดน้ำมันหอมระเหยจากแง่งขิง พบว่าได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 2.73 โดยน้ำหนัก และสารสกัดหยาบของเปลือกแคแสด ดอกเข็มสีแดง เหง้ากระทือ ได้สารสกัดร้อยละ 25.2 , 8.73 และ 6.23 โดยน้ำหนักตามลำดับ เมื่อแยกสารสกัดนี้โดยใช้คอลัมน์โครมาโท-กราฟฟี (Column Chromatography) ได้สารสกัดจากเปลือกแคแสด 3 ส่วน จากดอกเข้มสีแดง 4 ส่วน จากเหง้ากระทือ 5 ส่วน จากขิง 3 ส่วน เมื่อนำมาทดสอบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 6 จีนัส ปรากฏว่าสารสกัดส่วนที่ 1 และ 2 ของเปลือกแคแสดให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* สารสกัดส่วนที่ 4 ของดอกเข็มสีแดงให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *S. aureus* และ *E. coli* สารสกัดส่วนที่ 2 ของกระทือมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ *P. mirabilis* ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากขิงให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmomella enterrotidis, P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *P. mirabilis* ในปี 2001 Chattopadhyayและคณะได้ศึกษาสารสกัดของใบ *Alstonia macrophylla* พบว่ามีองค์ประกอบของ tannins, flavonoids, saponins,sterols, triterpene และ reducing sugars และยังพบว่าสารที่สกัดด้วย n-butanol จะมี β-sitosterol,ursolic acid, β-sitosterol glucoside ซึ่งสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการเติบโตของ *S. aureus*, *S.saprophyticus*, *S. faecalis*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* และ *Microsporum gypseum*

Watt and Pretorius (2001) ศึกษาการแยกองค์ประกอบของสารสกัดของพืช *Carpobrotus edulis* L.ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์นำ ส่วนที่สามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียไปวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง ได้สารประกอบเป็นฟลาโวนอยด์ 5 กลุ่ม ได้แก่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รูทิน (rutin) นิโอเฮสเพอริดิน (neohesperidin) ไฮเปอร์โรไซด์(hyperoside) แคคทิชิน (cactichin) และกรดเฟอร์รูริค (ferrulic acid) Yff,*et.al.* (2002) แยกสารสกัดของ *Pentanisia prunelloides* โดยใช้โครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง ส่วนที่ละลายในเอทิลอะซิเตทยับยั้งการเติบโตของ *B. subtilis*, *S.aureus*, *E. coli* และ *Klebsiella pneumoniae* จากนั้นจึงนำสารสกัดไปหาโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC-MS) พบว่าสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียคือกรดพาลมิติก (palmitic acid)

มาลินและคณะ (2538) ได้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารละลายจากเปลือกผลทับทิม พบว่ามีสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ของกรดแทนนิค เมื่ออยู่ในความเป็นกรดด่างสูงขึ้นสารสกัดมีสีเข้มขึ้น แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์น้อยลง การเก็บสารสกัดละลายน้ำจากเปลือกผลทับทิมนาน 12 เดือนที่ 0-50 องศา-เซลเซียส พบว่าไม่มีผลต่อสมบัติทางกายภาพหรือทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ลดลง

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ศศิธร (2546) ได้ศึกษาการจัดการดินเพื่อลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีในสภาพโรงเรือน โดยใช้น้ำสกัดหยาบและกากของพืช 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกทับทิม ใบพลู เปลือกส้มเขียวหวาน ต้นลูกใต้ใบและเปลือกผลมังคุด คลุกลงในดินที่มีเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ ในอัตรา 800 กิโลกรัมต่อไร่ ในกระบะซีเมนต์ขนาด 1 ลูกบาศก์เมตร จากนั้นจึงนำผักกาดเขียวปลีอายุ 40 วันย้ายปลูกลงไปกระบะละ 10 ต้น ตรวจนับปริมาณเชื้อในดินทุกสัปดาห์ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 ถึงสัปดาห์ที่ 5 โดยการเก็บตัวอย่างดินมาทำ serial dilution และ spread plate บนอาหาร Endo agar พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถลดปริมาณเชื้อในดินลงได้ โดยทำให้ปริมาณเชื้อในดินในแต่ละสัปดาห์ลดลงในอัตราที่สูงกว่า control ในสัปดาห์ที่ 5 ปริมาณเชื้อในดินทุกกรรมวิธีที่คลุกด้วยน้ำสกัดหยาบและกากของพืช ลดลงอยู่ที่ระดับ 0.23 - 0.47 x 10^3 cfu/ml ในขณะที่ปริมาณเชื้อในดินที่เป็น control ยังคงอยู่ที่ระดับ 0.15 x 10^4 cfu/ml น้ำสกัดหยาบและกากของใบพลูสามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ดีที่สุด โดยลดจาก 0.21 x 10^6 cfu/ml ในสัปดาห์ที่ 0 เหลือ 0.7 x 10^4 , 0.36 X 10^4 , 0.18 x 10^4 , 0.3 x 10^3 และ 0.23 x 10^3 cfu /ml ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ น้ำสกัดหยาบและกากของต้นลูกใต้ใบ และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปลือกผลทับทิม นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้น้ำสกัดและกากของใบพลูและเปลือกผลทับทิมคลุกลงในดินที่มีการติดเชื้อ สามารถชะลอการพัฒนาของโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่นๆ

อุไรวรรณ (2544) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืช 56 ชนิดในการควบคุมโรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของมะเขือเทศ ส่วนสารสกัดที่ได้จากทับทิมให้ผลในการยับยั้งได้ดีทั้งในสภาพสดและสภาพแห้ง และพบว่าฤดูกาลเก็บ สภาพการเก็บรักษา และชนิดของพันธุ์พืช มีผลต่อประสิทธิภาพของสารสกัด

วงศ์และคณะ (2536)ได้สกัดสารจากใบพลูแห้งและเมล็ดพริกไทยด้วยน้ำ แอลกอฮอล์และอะซีโตน แล้วนำสารสกัดที่ได้ ทดสอบผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* โดยวิธี Disc diffusion technique พบว่าสารสกัดจากพลูในตัวทำละลายดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. solanacearum* ได้ โดยสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการสกัดที่สุดได้แก่ แอลกอฮอล์ อะซีโตน และน้ำ ตามลำดับ

พรทิพย์และคณะ (2538) ศึกษาสารสกัดดิบจากคูณ ชุมเห็ดเทศ และขมิ้นชัน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas solanacearum* และ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* โดยสารสกัดดิบจากขมิ้นสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง 3 ชนิด ได้ 80- 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า ED_{50} ที่ต่ำกว่า 30,000 ส่วนในล้านส่วน(ppm) ซึ่งเทียบเท่า หรืออาจดีกว่าสารเคมี copper oxychoride โดยเฉพาะต่อเชื้อ *P. solanacearum* ต้องใช้ความเข้มข้นของ copper oxychoride สูงกว่า 100,000 ppm จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดดิบจากชุมเห็ดเทศสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้โดยมีค่า ED_{50} ต่อเชื้อ *Erwinia carotovora* และ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ประมาณ 100,000 ppm และต่อเชื้อ *P. solanacearum* ประมาณ 300,000 ppm ต่อมาในปี 2545 เจตน์ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรจำนวน 42 ชนิด ทดสอบด้วยวิธี Paper disc diffusion กับเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาวและ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผัก พบว่าสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งและหูปลาช่อนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* และ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ส่วนสารสกัดหยาบจากต้นลูกใต้ใบและมะขามสุก ยับยั้ง *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sinlapasuwan (1981) สกัดสารจากพืชสมุนไพร 15 ชนิด ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆเช่น ปิโตเลียมอีเทอร์, ไดเอทธิลอีเทอร์และน้ำกลั่น และนำสารที่สกัดได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในตระกูล Enterobacteriaceae 8 ชนิด พบว่าสารสกัดจาก หนุมานประสานกาย มีผลต่อเชื้อ *Erwinia* sp. ส่วนสารสกัดจากขี้เหล็กนั้นพบว่าไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากพลูที่สกัดด้วยไดเอธิลอีเธอร์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากพลูที่สกัดด้วย ปิโตเลียมอีเธอร์ตามลำดับ อารีย์ (2546) ใช้สารสกัดจากพืชวงศ์ Commelinaceae 5 ชนิด ได้แก่ หญ้าปักกิ่ง ผักปราบ ว่านกาบหอย ก้ามปูหลุด และหัวใจสีม่วง โดยทำการสกัดด้วยเอทานอลและน้ำกลั่น เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 15 ชนิดบนอาหาร NA พบว่า สารสกัดหยาบจากว่านกาบหอยสด ที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 6,000 8,000 และ 10,000 ppm. สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Erwinia carotovora* และยังพบอีกว่าสารสกัดหยาบจากว่านกาบหอยสดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรีย
แกรมบวก

วงศ์และคณะ (2538) รายงานการใช้สารสกัดจากวัชพืชและพืชอื่นๆจำนวน 26 ชนิดได้แก่ น้ำนมราชสีห์ ผกากรอง ผักบุ้งขาว กระทกรก มัยราบ เขียวไก่กา สาบเสือ ผักโขม ผักเป็ดถั่วผี หญ้าละออง สาบหมู สาบหมา กระเม็ง ก้านบัว ดีปลี ใบสะเดาช้าง เมล็ดสะเดาช้าง ใบละหุ่งเปล้าใหญ่ เปล้าน้อย กระเพราแดง กระเพราขาว ขมิ้นชัน ใบย่านาง และใบรัก ทดสอบยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* โดยวิธี Paper disc method พบว่าสารสกัดจากใบเปล้าน้อยและใบละหุ่ง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้ ต่อมาในปี2539 วงศ์และคณะ ได้ศึกษาประสิทธิภาพ ของสารสกัดจากพืชธรรมชาติในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าสารสกัดจากใบพลู ยอดเปล้าน้อย และต้นตะไคร้หอม ที่ความเข้มข้น 1,000 ส่วนในล้านส่วนปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อต้น สามารถป้องกันโรคนี้ได้ จากการทดลองยังพบอีกว่าการใช้สารบดแห้งจากพืชทั้ง 3 ชนิดข้างต้น อัตรา 10,000 ppm คลุกกับหัวพันธุ์ก่อนปลูกสามารถป้องกันการเกิดโรคเหี่ยวดังกล่าวได้เช่นกัน

สุพจน์ (2548) ได้ศึกษาวิธีการสกัดและทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 89 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* โดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % เป็นตัวทำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ละลาย จากนั้นทดสอบโดยวิธี Paper disc diffusion พบสารสกัดจากพืชสมุนไพร 19 ชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ จากนั้นได้นำสารสกัด ที่ปรับระดับความเข้มข้นเป็น 5 ระดับ พบว่า 2 ลำดับแรกที่ให้ผลดีที่สุดคือ เปลือกผลทับทิมและสมอพิเภก นำมาแยกสกัดอย่างละเอียดโดย Quick Column chromatography แยกได้ 31 ลำดับ นำแต่ละลำดับมาหากลุ่มสารธรรมชาติเบื้องต้นโดยวิธี Phytochemical method พบว่าสารที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์และแทนนิน

ธรรดร (2546) ศึกษาสมบัติการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากสมุนไพร 4 ชนิดด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ คือ กานพลู ว่านน้ำ สารภี และหนอนตายหยาก ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสกุลผักกาดคือ *Alternaria brassicicola, Fusarium oxysporum และ Colletotrichum gloeosporioides* พบว่าสารสกัดจากกานพลูและว่านน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์ และเมื่อนำสารสกัดทั้ง 4 ชนิดทำการแยกส่วนโดย Thin layer chromatography เพื่อตรวจสอบสารองค์ประกอบและชนิดสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา และทำ Bioassay พบว่าสารสกัดจากกานพลู ว่านน้ำ และสารภี ให้แถบสารองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราอย่างละ 1 แถบสาร โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.81, 0.87 และ 0.28 ตามลำดับ

ณัฐทิยา (2550) แยกสารสกัดหยาบแห้งออกมาได้ 21 fraction ด้วยวิธี Column chromatography นำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* de Bary สาเหตุ โรคสแคปขององุ่น พบว่า fraction ที่ 12 และ 13 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ และเมื่อศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้น พบว่ามีสาร alkaloids เป็นส่วนสำคัญและเมื่อแยกสกัด alkaloid ไปทดสอบพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ สาเหตุได้

จิตรยา (2552) ศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดจากพืช 9 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* พบว่าสารสกัดจากชวงเจีย (*Zanthoxylum* sp.) ปริมาณ 1มิลิลิตร ใส่ในดิน นาน 2 -8 สัปดาห์ มีประสิทธิภาพในการยัยยั้งเชื้อในดินได้ดีที่สุด จากนั้นทำการทดสอบสารสำคัญทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดชวงเจียพบกลุ่ม Alkaloids เป็นส่วนประกอบ และเมื่อแยกสารโดยวิธี Thin layer chromatography พบว่าที่ตำแหน่ง R_f 0.36 ทำทำปฏิริยากับน้ำยา Dragendorff เกิดจุดสีน้ำตาลส้มของสารกลุ่ม alkaloid

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารสำคัญในพืช

สมุนไพร (Medicinal plant หรือ herb) หมายถึง พืชที่เกิดจากธรรมชาติ และเป็นประโยชน์ต่อชีวิต มนุษย์ในเชิงสุขภาพ ทั้งการส่งเสริมสุขภาพและการรักษาโรค (ปณิตา และเชาวลิต, 2543) สารเคมีที่แยกได้ในพืช จำแนกออกเป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ primary metabolite และ secondary metabolite โดย primary metabolite เป็นสารที่พบได้ในพืชทุกชนิด เป็นผลิตผลที่ได้จาก

กระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน และไขมัน ส่วน secondary metabolite นั้นพบไม่เหมือนกันในพืชแต่ละชนิด ไม่พบทั่วไปและไม่มี metabolic function ที่ชัดเจน เช่น แอลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ แทนนิน เป็นต้น secondary metabolite มีสารตั้งต้น เป็นกรดอะมิโน acetate และ mevalonate โดยมีเอนไซม์ (enzyme) มาเกี่ยวข้อง ซึ่งพืชต่างชนิดกันมีเอนไซม์ไม่เหมือนกันทำให้วิถีทางในกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ต่างกันไป และได้สารประเภท secondary metabolite ต่างกันไปในต้นไม้ต่างชนิดกันหรือต่างฤดู สาเหตุที่แท้จริงในการสร้าง secondary metabolite ในพืชยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าอาจเกิดจากการพยายามปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป (วันดี, 2536) ในสมุนไพรแต่ละชนิดประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด บางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacological action) ซึ่งมักเรียกว่าสารสำคัญ (active constituents) สามารถนำมาใช้เป็นยา นอกจากนี้ยังใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารและเครื่องสำอาง สารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายชนิด ซึ่งอาจแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 7 กลุ่มดังนี้ (รัตนา, 2547)

1. คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน (carbon) ไฮโดรเจน (hydrogen) และออกซิเจน (oxygen) โดยไฮโดรเจนและออกซิเจนมักจะพบในสัดส่วน 2:1 เป็นกลุ่มสารที่พบทั้งในพืชและสัตว์ คาร์ไฮเดรตในพืชสร้างขึ้นจากการสังเคราะห์แสงและเก็บสะสมไว้ ซึ่งจะถูกนำมาใช้เป็นอาหารของคนและสัตว์

2. ไขมัน (lipids) เป็นเอเทอร์ที่เกิดจากกรดไขมันที่มีโมเลกุลยาว (long chain fatty acid) จับกับแอลกอฮอลล์ (alcohol)

3. น้ำมันหอมระเหย (volatile oils หรือ essential oils) พบได้ในส่วนต่างๆของพืช เช่น ดอก ใบ ผล กลีบเลี้ยง เป็นต้น มีลักษณะเป็นน้ำมันที่มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธรรมดา ไม่มีสี แต่เมื่อถูกออกวิไดส์ (oxidized) จะทำให้สีเข้มขึ้น จึ้งต้องเก็บในขวดสีชา ที่ปิดสนิท

4. เรซินและบาลซัม (resins and balsams) สารกลุ่มนี้ประกอบด้วยเรซินและสารประกอบที่มีเรซินเป็นองค์ประกอบ เช่น โอเลโอเรซิน(oleoresins) ดอเลโอกัมเรซิน(oleo-gum-resins) และบาลซัม(balsams)

5. แอลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นสารกลุ่มใหญ่มากที่สุดกลุ่มหนึ่งที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย พบมากในพืชชั้นสูง เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (organic nitrogen compounds) คุณสมบัติโดยทั่วไปของแอคาลอยด์คือ มีรสขม มีฤทธิ์เป็นด่าง ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent)

6. ไกลโคไซด์ (glycosides) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยส่วนอะไกลโคน (aglycone) หรือจีนิน (genin) จับกับน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลหรือเรียกส่วนของไกลโคน (glycone) จัดเป็นสารกลุ่มใหญ่อีกกลุ่มหนึ่งที่นำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรค และบางชนิดมีฤทธิ์เป็นสารพิษ โดยทั่วไปไกลโคไซด์จะละลายได้ในตัวทำละลายที่มีขั้วขึ้นอยู่กับจำนวนและชนิดน้ำตาลของโครงสร้างไกลโคนของไกลไซด์ การจำแนกไกลโคไซด์ตามสูตรโครงสร้างแบ่งได้ดังนี้(วันดี, 2536)

6.1) คาร์ดิโอ-แอคทิพ หรือ คาร์ดิแอ็กไกลโคไซด์ (cardio-active group or cardiac glycoside) สารกลุ่มนี้จะมี aglycone เป็น steroid nucleus มีฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อหัวใจ ตัวอย่างเช่น digitoxinstrophanthin และ scillaren

6.2) แอนทราควิโนน กลัยโคไซด์ (anthraquinone glycoside) มีส่วน aglycone เป็นอนุพันธ์ของ anthracene มีฤทธิ์เป็นยาระบายและยาถ่าย ตัวอย่างเช่น emodin aloe- emodin และ sennoside

6.3) ซาโปนิน กลัยโคไซด์ (saponin glycoside) มีส่วน aglycone เป็นสารจำพวก steroid หรือ triperpenoid เป็นกลุ่มสารที่มีคุณสมบัติเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ ตัวอย่างเช่น dioscinและ sarsaponin

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.4) ไซยาโนเจนนีติก กลัยโคไซด์ (cyanogenetic glycoside) มีส่วน aglycone เป็น cyanogenetic nitrile สารในกลุ่มนี้เมื่อถูกย่อยจะได้สารจำพวกไซยาไนด์ ตัวอย่างเช่น amygdalin

6.5) ไอโซไทโอไซยาเนท กลัยโคไซด์ (isothiocyanate glycoside) มีส่วน aglycone เป็นสารจำพวก isothiocyanate ตัวอย่างเช่น sinigin และ sinalbin

6.6) ฟลาโวนอล กลัยโคไซด์ (flavonal glycoside) มีส่วน aglycone เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็น C_6-C_3-C_6 ส่วนใหญ่จะเป็นสารมีสี (pigments) ในพืช ตัวอย่างเช่น rutin quercetin และ luteolin

6.7) แอลกอฮอลิค กลัยโคไซด์ (alcoholic glycoside) มีส่วน aglycone เป็นแอลกอฮอล์ เช่น salicin

6.8) ฟีนอลิค กลัยโคไซด์ (phenolic glycoside) มีส่วน aglycone เป็นสารพวก phenolic compound ตัวอย่างเช่น arbutin

6.9) แอลดีไฮด์ กลัยโคไซด์ (aldehyde glycoside) มีส่วน agylcone เป็นสารจำพวก aldehyde ตัวอย่างเช่น glucovanilin

6.10) แลคโทน กลัยโคไซด์ (lactone glycosides) มีส่วน aglycone เป็น lactone ring ตัวอย่างเช่น coumarin และ santonin

6.11) กลุ่มแทนนิน (tannins) เป็นสารกลุ่มใหญ่ มีโครงสร้างซับซ้อน มักเป็นสารผสมของ polyphenols ประกอบด้วยเอสเทอร์ที่เกิดจาก gallic acid หรือ polyhydric compound จับกับน้ำตาลกลูโคส เกิดเนื่องจาก phenolic compound จับกับคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีน สารกลุ่มนี้พบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิด สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ true tannin มีน้ำหนักโมเลกุล1,000-5,000 และ pseudo tannin ซึ่งมีโมเลกุลเล็กกว่า pseudo tannin เป็นสารที่ทำให้คุณสมบัติบางอย่างคล้าย true tannin ตัวอย่างของ pseudo tannin เช่น gallic acid พบในกระเทียม catechins พบในเปลือกสีเสียด และ chlorogenic acid พบในเมล็ดกาแฟ เมล็ดแสลงใจ เป็นต้น ตัวอย่างของtrue tannin ได้แก่ gallo tannin พบได้ในเปลือกอบเชย กลีบกุหลาบ เปลือกผลและเปลือกต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทับทิม ใบยูคาลิปตัส และเปลือกต้นโอ๊ค condensed tannin พบได้ในเปลือกอบเชย เปลือกซิงโคนาเมล็ดหมาก ใบชา และเปลือกสีเสียด

7. เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) เป็นสารประกอบที่ประกอบด้วยหน่วยที่เรียกว่า หน่วยไอโซพรีน (isoprene units) ซึ่งเป็นโซ่แขนง (branched chain) ของคาร์บอน 5 ตัว มีพันธะไม่อิ่มตัว 2 พันธะ ดังนั้นในบางครั้งอาจเรียกไอโซพรีนอยด์ (isopreniods) สารประกอบประเภทเทอร์พีนอยด์พบกระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในพืชชั้นสูง นอกจากนี้ยังพบในเชื้อรา แมลง จุลลินทรีย์ (microorganisms) และสิ่งมีชีวิตในทะเล (marineorganisms)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการตรวจหาและการแยกสารสกัดจากพืชสมุนไพรโดยวิธีโครมาโทกราฟี (Chromatography)

โครมาโทกราฟีเป็นการแยกสารแต่ละชนิดออกจากกัน โดยอาศัยความสามารถในการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดที่แตกต่างกันบนเฟสดูดซับคงที่ (stationary phase) และตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งขึ้นกับสมบัติต่างๆ ของสาร เช่น ขนาดโมเลกุล ความมีประจุ เป็นต้น (กล้าณรงค์, 2544) เทคนิคโครมาโทกราฟีเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพและทันสมัยสามารถแยกสารผสมให้เป็นองค์ประกอบเดี่ยวๆ ได้ และใช้ในการหาปริมาณของสาร ตัวอย่างที่นำมาตรวจอาจเป็นก๊าซ ของเหลว หรือของแข็งก็ได้ (Scott, 1995) โครมาโทกราฟีมีอยู่หลายชนิด ดังนี้

1. โครมาโทกราฟีชนิดกระดาษ (Paper Chromatography)

โครมาโทกราฟีชนิดกระดาษเป็นวิธีการแยกสารผสม โดยอาศัยหลักการแพร่พื้นผิวของตัวละลาย 2 ชนิดที่ไม่เท่ากัน เนื่องมาจากความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย โครมาโทกราฟีชนิดกระดาษนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายโดยใช้กระดาษกรองเป็นตัวดูดซับสามารถใช้โครมาโทกราฟีชนิดกระดาษในการแยกสารประกอบที่ละลายน้ำและสารประกอบฟีนอลิคบางชนิด (Houghton *et al*., 1998)

2. โครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง (Thin Layer Chromatography)

โครมาโทกราฟีชนิดผิวบางเป็นกระบวนการแยกสารที่ผสมกันโดยใช้เครื่องมือที่เป็นแผ่นแก้วหรือแผ่นอลูมิเนียมชนิดบางฉาบด้วยตัวดูดซับชนิดที่เหมาะสมโดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารซึ่งมีอัตราเร่งในการเคลื่อนที่แตกต่างกัน อันเป็นผลมาจากความสามารถของตัวดูดซับที่มีต่อสารแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ตัวดูดซับในการทำโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง ได้แก่ ซิลิกาเจล (silica gel) อะลูมิเนียมออกไซด์(aluminium oxide) ซีไลต์ (celite) แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide) แมกนีเซียมฟอสเฟต (magnesium phosphate) โพลีเอไมด์ (polyamide) และเซลลูโลส (cellulose) (Harborne,1984)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (High Pressure Thin-Layer Chromatography)

จัดเป็นวิธีที่พัฒนามาจากโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการหาปริมาณและแยกสารสูงขึ้น โดยใช้แอดซอร์เบนท์ที่มีขนาดอนุภาคเล็กลง (2-7 ไมโครมิเตอร์) และมีความแตกต่างของขนาดอนุภาคน้อยมาก ทำให้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูงนี้ ทำได้รวดเร็ว มีความถูกต้องแม่นยำและความไวมากขึ้น ให้ผลการทดลองที่เที่ยงตรง นอกจากนี้ยังมีเครื่องเดนซิโตมิเตอร์เป็นองค์ประกอบโดยทำหน้าที่เป็นเครื่องตรวจวัด (detector) จึงใช้มากในงานวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญจากพืชสมุนไพร (รัตนา, 2547)

4. โครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์ (Column Chromatography)

โครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์จะเป็นแบบของเหลว-ของแข็งโครมาโทกราฟีหรือโครมาโทกราฟีดูดซับ ซึ่งใช้วิเคราะห์สารอินทรีย์และชีวเคมี เฟสที่อยู่กับที่ที่ใช้บรรจุในคอลัมน์โดยทั่วไปคือซิลิกาและอะลูมินาซึ่งมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงมาก ตัวอย่างของตัวดูดซับและตัวทำละลายแสดงในตารางที่ 5 สำหรับอีกแบบเป็นของเหลว-ของเหลวโครมาโทกราฟี หรือพาติชันโครมาโทกราฟี (Liquid-Liquid Chromatography or Partition Chromatography) โดยเทคนิคนี้เฟสที่ติดอยู่กับที่เป็นของเหลวเคลือบบนวัสดุรองรับเป็นชั้นบางๆ วัสดุรองรับจะมีความเฉื่อยทางเคมีสูงมาก สำหรับตัวทำละลายที่ทำหน้าที่เป็นตัวชะ อาจจะเป็นสารละลายหนึ่งชนิดหรือเป็นสารละลายผสมก็ได้ (Houghton and Raman, 1998) ตัวชะจะทำหน้าที่พาสารแต่ละชนิดให้เคลื่อนที่ไปด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกันจึงทำให้แยกสารออกจากกันได้

5. โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High performance Liquid Chromatography, HPLC)

เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นจากความรู้ทางทฤษฎีเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์ซึ่งมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ไม่ว่าจะเป็นสารที่บรรจุภายในคอลัมน์หรือในส่วนของเครื่องมือแต่ละส่วน แต่กลไกก็คงเหมือนกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ต่างจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีตรงที่เฟสเคลื่อนที่ถูกปั๊มผ่านคอลัมน์ภายใต้ความดันสูง จึงใช้เวลาในการแยกหรือวิเคราะห์ลดลง 1-2 เท่า นอกจากนี้การใช้ตัวดูดซับที่มีขนาดอนุภาคเล็กลง จึงทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์เพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จัดเป็นเครื่องมือที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์และแยกสารเกือบทุกชนิด เนื่องจาก HPLC มีข้อดีเหนือกว่าลิควิดโครมาโทกราฟีชนิดอื่นๆคือ มีประสิทธิภาพสูงในการแยก มีความไวง่ายต่อการวิเคราะห์หาปริมาณ ใช้เวลาน้อย ให้ผลถูกต้อง และเที่ยงตรง (รัตนา, 2547)

6. แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography)

แก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์สารผสมที่ระเหยง่าย (volatile compound) เมื่อสารผสมผ่านเข้าไปในคอลัมน์ที่มีเฟสคงที่ สารผสมจะถูกแยกออกจากคอลัมน์ด้วยเวลาที่ต่างกัน นอกจากนี้การพัฒนาใช้เครื่องตรวจสอบ (detector) ที่มีความไวสูงชนิดตรวจจับไอออน ionization detector จะเป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบสารที่มีความเข้มข้นน้อยในระดับส่วนในพันล้านส่วน (part per billion level) นิยมใช้ Gas Liquid Partition Chromatography ในการตรวจสอบน้ำมันหอมระเหยของเครื่องเทศ (Pruthi, 1980)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 เครื่องกลั่นระเหยระบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator)

1.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟี

1.3 TLC silica gel 60 F 257 Merck, 20x20 เซนติเมตร

1.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

1.5 เครื่องเขย่า (gyratory shaker)

1.6 เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์

1.7 ตู้ปลอดเชื้อ

1.8 เอทิลแอลกอฮอล์ 95% (C_2H_5OH 95%)

1.9 กระดาษกรอง (Whatman No. 1)

1.10 แทงค์ TLC

1.11 Kieselgel 60 (35-70 mesh ASTM) Merck

1.12 ตัวทำละลาย hexane, chloroform และ ethanol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. พืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 20 ชนิด

ตารางที่ 1 พืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	ชื่อพืช	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาสาสตร์	ส่วนที่ใช้
1	กล้วย	banana	*Musa sapientum* L.	ผล
2	กานพลู	clove	*Eugenia caryophyllus*	ผล
3	ขมิ้นชัน	tumeric	*Curcuma longa* L.	เหง้า
4	ชะเอมเทศ	spanish licorice	*Glycyrrhiza glabra* L.	ราก
5	ดอกเข็มสีแดง	west indian jaxmine	*Ixora coccinea*	ดอก
6	ทับทิม	pomegranate	*Punica granatum*	ผล
7	เบญกานี	nut gall	*Quercus infectoria* Olivier	ผล
8	ฝรั่ง	guava	*Psidium guajava*	ใบ
9	พริกหอม	bird chilli	*Capsicum frutescens*	ผล
10	พลู	betel pepper	*Piper betle* L.	ใบ
11	ฟ้าทะลายโจร	creyat root	*Andrographis paniculata* Nees.	ใบ
12	มะขาม	tamarind	*Tamarindus indica*	ผล
13	มังคุด	mangosteen	*Garcinia mangostana*	เปลือผล
14	แมงลัก	hairy basil	*Ocimum americanum* L.	ใบ
15	สมอไทย	chebulic myrobalan	*Terminalia chebula* Retz	ผล
16	สมอพิเภก	beleric myrobalan	*Terminalia bellirica*	ผล
17	สะระแหน่	kitchen int	*Metha cordifolia* Opiz.	ใบ
18	หนุมานประสานกาย	ha-nu-man-pa-san-kai	*Schefflera venulosa* Harms.	ลำต้นและใบ
19	หมาก	areca nut	*Areca catechu* L.	ผล
20	หูปลาช่อน	floras paint brush	*Emilia sonchifolia*	ใบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. เชื้อทดสอบ

เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผัก

ตารางที่ 2 ไอโซเลทของเชื้อ *Erwinia carotovora* แยกได้จากผักที่ใช้ในการทดลอง

ไอโซเลท	แหล่งที่มา
1	ตลาดปฐมมงคล จ.นครปฐม (รับมาจาก จ.กาญจนบุรี)
2	ตลาดปฐมมงคล จ.นครปฐม (รับมาจาก จ.เชียงใหม่)
3	ตลาดสดอำเภอหนองฉาง จ.อุทัยธานี (รับมาจาก จ.นครสวรรค์)
4	สหกรณ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม
5	ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน เชื้อสาย พันธุ์ ECC19 (วิลาวรรณ์,2551)

วิธีการ

1. การศึกษาเชื้อ *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผัก

1.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

เก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคพืชจากตัวอย่างผักที่แสดงอาการของโรคเน่าเละ และมีอาการลักษณะเป็นรอยแผลช้ำ ฉ่ำน้ำ มีเมือกเยิ้มและส่งกลิ่นเหม็นฉุน ซึ่งเป็นกลิ่นเฉพาะตัว โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรค บริเวณที่ต่อกับเนื้อเยื่อปกติ นำไปล้างในน้ำสะอาด ปล่อยให้น้ำไหลผ่านล้างส่วนผิวนอกออก จากนั้นตัดบริเวณรอยต่อที่ช้ำเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาบดในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำไป cross streak บน อาหาร endo agar เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแดงเข้ม เยิ้ม เป็นมันและเหลือบแสง (metallic sheen) มา cross streak เพิ่มปริมาณบนอาหาร NGA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) เตรียมสารแขวนลอยเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นนำไปปรับค่า optical density (O.D.) ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตรให้มีค่า 0.2 ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณเชื้อ Ecc จำนวน 10^8 cfu/ml (รุ่งรัตน์,2548) นำสารแขวนลอยเชื้อไปทดสอบการเกิดโรคกับพืชทดสอบ คือ ผักกาดขาวปลี มันฝรั่ง แครอท หอมหัวใหญ่ และกระหล่ำปลี โดยหยดสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนชิ้นพืชทดสอบที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิว ด้วย 0.6% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้งๆละ 5 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจบันทึกผลการทดลอง (ดัดแปลงจากวิลาวรรณ์,2551 และวัฒนิกร,2550)

1.3 การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ

ทดสอบ gram reaction โดยหยด 3% KOH ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่ทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว จากนั้นใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กระจายลงบนแผ่นกระจกสไลด์บริเวณที่หยด 3% KOH ทิ้งไว้สักครู่ใช้ loop แตะบริเวณที่ทำการทดสอบถ้าหนืด ยืดเป็นเส้นแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ยืนยันผลโยการนำไปย้อมสีแบบแกรม(gram's stain) โดยใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียแล้วกระจายลงแผ่นกระจกสไลด์ที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อและทำลายคราบมัน ยึด(fixed) เซลล์ด้วยการลนด้วยเปลวไฟ 1-2 ครั้ง จากนั้นนำไปย้อมสีแบบแกรมด้วยสาร crystal violet และ safranin–O ตามวิธีของ Schaad (2001) ทดสอบปฏิกิริยา oxidative/fermentative โดยนำเชื้อ stab inoculate ในอาหาร Huge and Leifson's medium (peptone 20 กรัม, NaCl 5.0 กรัม, K_2HPO_4 0.3 กรัม, bromthymol blue 0.03 กรัม และ agar 3.0 กรัม) เชื้อละ 2 หลอด หลอดหนึ่งเททับด้วย parafin oil ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส สังเกตุดูการเปลี่ยนสีของอาหาร ประกอบกับการสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดต่างๆได้แก่ sorbitol, manitol, sucrose, raffinose, arabitol และ lactose ($NH_4H_2PO_4$ 0.5 กรัม, K_2HPO_4 0.5 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม, Nacl 5 กรัม, yeast extract 1 กรัม, agar 12 กรัม, เติมน้ำ 1 ลิตร bromcresol purple 0.7 มิลลิลิตรใน 1.5% alcohol solution pH 6.8 หลังนึ่งฆ่าเชื้อเติม carbon source 0.5% (V/V)) เปรียบเทียบกับข้อมูลใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition และเปรียบเทียบกับ reference stain ที่มีรายงานการศึกษาแล้ว (วัฒนิกร,2550; Holt *et al.,* 1994)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การสกัดสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรและทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* ในระดับห้องปฏิบัติการ (ดัดแปลงวิธีการจากสุพจน์, 2548)

2.1 พืชทดสอบใช้พืชสมุนไพรไทย 20 ชนิด (ตารางที่ 1)

2.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากพืช

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้ง 100 กรัม บดให้ละเอียด ใส่ลงในขวดแก้วเติมเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 200 มิลลิลิตร (อัตราพืชต่อตัวทำละลาย 1 ต่อ 2) นำไปเข้าเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง (30-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองเศษพืชออกด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และนำส่วนน้ำที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยระบบสูญญากาศ (rotary evaporator) รวบรวมสารสกัดหยาบที่ได้บรรจุขวดแก้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora* โดยใช้วิธี paperdisc agar diffusion

นำสารสกัดหยาบจากข้อ 2.2 จำนวน 1 กรัมละลายในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 100,000 ppm ใช้ micropipette 10 ไมโครลิตร หยดสารลงบน paper disc วางลงบนอาหาร double layer NGA ตามตำแหน่งที่กำหนด โดยมี negative control ซึ่งหยดน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแทนสารสกัด วางกลางจาน ทำ 5 ซ้ำต่อ 1 ชนิดพืชบ่มเชื้อ 24 ชั่วโมง ตรวจและบันทึกผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)

2.4 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 1,000 5,000 10,000 50,000 และ 100,000 ppm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำสารสกัดหยาบจากพืช ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้จากข้อ 2.3 มาปรับความเข้มข้นเป็น 5 ระดับ 1,000 5,000 10,000 50,000 และ 100,000 ppm นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโดยวิธี paperdisc agar diffusion บนอาหาร double layer NGA เพื่อหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืช เพื่อลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* ในดินจำลองการติดเชื้อ (ดัดแปลงวิธีการจาก ศศิธร, 2546 และ วิลาวรรณ์, 2551)

นำสารสกัดหยาบจากพืช 3 ลำดับแรก ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการโดย วิธี paperdisc agar diffusion มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อในดินจำลองการติดเชื้อ โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Erwinia carotovora* เพิ่มปริมาณบนอาหาร nutrient glucose agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย (bacterial suspension) ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อวัดค่าความขุ่นเซลล์ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร O.D. เท่ากับ 0.2 ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณเชื้อจำนวน 10^8 cfu/ml (รุ่งรัตน์, 2548) จากนั้นนำสารสกัดจากพืช 3 อันดับแรก ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Erwinia carotovora* ในการทดลองที่ 2 ปรับเป็น 2 ระดับความเข้มข้นที่ 10,000 และ 20,000 ppm วางแผนการทดลองแบบสุ่มแบบสมบูรณ์ (CRD) รวม 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมไว้คลุกดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้เชื้อ 500 มิลลิลิตรต่อดิน 5กิโลกรัมหลังจากนั้น นำดินที่มีเชื้อโรคมาคลุกกับสารสกัดในอัตราสาร 500 มิลลิลิตรต่อดิน 5 กิโลกรัมเช่นกัน จากนั้นนำแต่ละกรรมวิธีใส่ใน กระบะ ขนาด กว้าง x ยาว x ลึก (33 x 50 x 13 เซนติเมตร) นำผักกาดเขียวปลี อายุ 40 วัน ที่เตรียมไว้ ย้ายปลูกลงในกระบะ ๆละ 10 ต้น สังเกตอาการของโรค บันทึกจำนวนต้นที่เป็นโรค และติดตามเป็นระยะๆ พร้อมทั้งสุ่มเก็บตัวอย่างดิน ตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในดินทุก 5 วัน ตั้งแต่วันที่ 1 (เชื้อเริ่มต้น) ถึงวันที่ 30 โดยการนำตัวอย่างดินมาทำ serial dilution และ spread plate บน endo agar คำนวณหาปริมาณเชื้อในดินแต่ละกรรมวิธี เปรียบเทียบกับ negative control ไม่ใส่สารสกัดและเชื้อ ส่วน positive control ซึ่งใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อแทนสารสกัด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การศึกษาความถี่ในการใส่สารสกัดจากพืช ลงในดินที่เหมาะสม เพื่อให้ลดปริมาณเชื้อในดินให้อยู่ในระดับต่ำจนไม่ก่อให้เกิดโรค

นำสารสกัดจากพืชที่ที่ระดับความเข้มข้นให้ผลดีที่สุด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Erwinia carotovora* ในดินจากการทดลองที่ 2 มาศึกษาความถี่ของการใช้ เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มแบบสมบูรณ์ (CRD) 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ โดยนำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมไว้คลุกดิน โดยใช้เชื้อ 500 มิลลิลิตรต่อดิน 5 กิโลกรัมจากนั้นนำดินที่คลุกเชื้อแล้ว มาคลุกสารสกัดจากพืชในอัตราสารสกัด 500 มิลลิลิตรต่อดินที่คลุกเชื้อ 5 กิโลกรัมโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธี 1 คลุกสารสกัดจากพืชลงในดินครั้งเดียว ก่อนย้ายปลูกกล้าผัก

กรรมวิธี 2 คลุกสารสกัดจากพืชลงดินก่อนย้ายปลูก หลังจากนั้นราดสารสกัดจากพืชชนิดและความเข้มข้นเดิมซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งห่างกัน 10 วัน (รวมใส่สารสกัดจากพืชลงดินทั้งหมด 3 ครั้ง)

กรรมวิธี 3 ทำเช่นเดียวกันกับกรรมวิธีที่ 2 แต่ราดสารสกัดจากพืชชนิดและความเข้มข้นเดิมซ้ำอีก 5 ครั้งโดยแต่ละครั้งห่างกัน 5 วัน (รวมใส่สารสกัดจากพืชลงดินทั้งหมด 6 ครั้ง)

กรรมวิธี 4 คลุกสารสกัดจากพืชก่อนย้ายปลูก และราดสารสกัดซ้ำอีก 9 ครั้ง โดยแต่ละครั้งห่างกัน 3 วัน (รวมใส่สารสกัดลงดินทั้งหมด 10 ครั้ง)

กรรมวิธี 5 negative control ไม่ใส่สารสกัดและเชื้อ

กรรมวิธี 6 positive control ซึ่งใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อแทนสารสกัด

สังเกตอาการของโรค บันทึกจำนวนต้นที่เป็นโรค และติดตามเป็นระยะๆ พร้อมทั้งสุ่มเก็บตัวอย่างดิน ตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในดินทุก 5 วัน ตั้งแต่วันที่ 1 (เชื้อเริ่มต้น) ถึงวันที่ 30 โดยการนำตัวอย่างดินมาทำ serial dilution และ spread plate บน endo agar คำนวณหาปริมาณเชื้อในดินแต่ละกรรมวิธี เปรียบเทียบกับ negative control ไม่ใส่สารสกัดและเชื้อ ส่วน positive control ซึ่งใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อแทนสารสกัด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การแยกสารสกัดอย่างละเอียดโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบรวดเร็ว (quick Column chromatography) และทดสอบประสิทธิภาพของสาร (ดัดแปลงวิธีการจาก ชนิดา, 2552 และ ชมพูนุท,2550)

การแยกสารสกัดโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบรวดเร็ว (quick Column chromatography) จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยังการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในการทดลองที่ 4 นำสารสกัดที่ให้ผลดีที่สุดมาแยกสกัดอย่างละเอียดโดยวิธี โครมาโตกราฟีแบบรวดเร็ว นำซิลิกาเจล (Kieselgel 60 ขนาด 35-70 mesh ของ Merck) สำหรับโครมาโตกราฟี ผสมกับเฮกเซน คนไล่ฟองอากาศออกให้หมด จากนั้นเทลงในคอลัมภ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร โดยมีสำลีรองด้านล่าง ให้ซิลิกาเจลมีน้ำหนักเป็น25 เท่าของน้ำหนักสารเริ่มแรก เติม hexaneให้เต็มคอลัมภ์ แล้วปล่อยให้ไหลออกจนเหลือ ตัวทำละลายเหนือซิลิกาเจลประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นใส่สารสกัดลงไปอย่างสม่ำเสมอ ชะสารด้วยตัวทำละลายครั้งละ 50 มิลลิลิตร โดยเริ่มตัวทำละลายที่มีขั่วน้อยไปมากจาก hexane chloroform, methanol และน้ำ ตามลำดับ โดยลดปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยลง ครั้งละ 10 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมาก ครั้งละ 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บสารที่ชะได้ fraction ละ 50 มิลลิลิตร นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography) และรวม fraction ที่มีลักษณะคล้ายกัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกจนหมด จึงนำสารแต่ละ fraction มาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora*โดยวิธี paperdisc agar diffusion ตามวิธีข้อ 2.3

นำสาร fraction ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อ *Erwinia carotovora*มาแยกให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยคอลัมน์โคมาโทกราฟี โดยนำซิลิกาเจล มาผสมกับ hexane คนไล่ฟองอากาศออกให้หมด ก่อนเทใส่คอลัมน์พร้อมปล่อยให้ตัวทำละลายไหลออก ขณะเดียวกันใช้สายยางเคาะรอบ ๆ คอลัมน์ เพื่อให้ ซิลิกาเจล จัดเรียงตัวอย่างสม่ำเสมอ เติมตัวทำละลายให้เต็มแล้วปล่อยให้ไหลออกจนเหลือตัวทำละลายอยู่เหนือซิลิกาเจล ประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นจึงใส่สารใน fraction ที่คัดเลือกมาแล้ว ซึ่งละลายอยู่ใน methanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปบนซิลิกาเจล ก่อนชะด้วยตัวทำละลาย โดยใช้ hexane, chloroform, methanol และน้ำ ในความเข้มข้นต่างๆ เก็บสารที่ได้ด้วยหลอดทดลองหลอดละ 20 มิลลิลิตร ในแต่ละ fraction ก่อนนำไปตรวจสอบด้วย TLC แล้วรวม fraction ที่มีลักษณะคล้ายกัน นำสารที่ได้มาทดสอบการยับยั้งการเจริญเชื้อ *Erwinia carotovora*โดยวิธี paper disc agar diffusion

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การนำสารจาก fraction ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Erwinia carotovora*ให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค TLC (ดัดแปลงวิธีการจาก ชมพูนุท 2550)

โดยใช้แผ่น TLC ชนิด plate sillica gel ขีดสารลงบนแผ่น TLC โดยให้รอยขีดห่างจากขอบ ล่าง 2 เซนติเมตร ปล่อยให้สารแห้ง นำด้านล่างของแผ่น TLC ใส่ในแทงค์ ซึ่งภายในอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย ปิดฝาแทงค์ ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่มาถึงระดับที่ห่างจากขอบประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำแผ่น TLC ออกผึ่งให้แห้ง ก่อนนำไปตรวจภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ขูด sillica gel บริเวณที่ต้องการละลายในตัวทำละลาย จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g นาน 10 นาที แยกส่วนใสของตัวทำละลายออกจาก sillica gel ก่อนนำไประเหยตัวทำละลายออกจนหมด และหาค่า *Rf* ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสูตรและนำไปวิเคราะห์หากลุ่มสารต่อไป

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}$$

นำสารสกัดจากพืชลำดับที่ให้ผลดีในการยับยั้งของเชื้อ *Erwinia carotovora* มาพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยเตรียมสารบริสุทธิ์ในสารละลาย Acetone-d6 ก่อนนำมาแยกหาชนิดและสูตรโครงสร้างด้วยเครื่อง 300MHz nuclear magnetic resonance (NMR) ได้แก่ ^{16}H และ ^{13}C NMR ตามลำดับ นำข้อมูลที่ได้จาก NMR มาเปรียบเทียบกับสารที่มีรายงานแล้ว (รัตนา, 2547)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การศึกษาเชื้อ *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผัก

1.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

ตารางที่ 3 เชื้อบริสุทธิ์ 5 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากผักกาดขาวและผักกาดหัว

ไอโซเลท	แหล่งที่มา	พืชที่แยก
KCB	ตลาดปฐมมงคล จ.นครปฐม (รับมาจาก จ.กาญจนบุรี)	ผักกาดขาว
CM	ตลาดปฐมมงคล จ.นครปฐม (รับมาจาก จ.เชียงใหม่)	ผักกาดขาว
NKS	ตลาดสดอำเภอหนองฉาง จ.อุทัยธานี (รับมาจาก จ.นครสวรรค์)	ผักกาดขาว
NKP	สหกรณ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช	ผักกาดหัว
ECC19	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เชื้อไอโซเลท ECC19 (วิลาวรรณ์,2551)	-

1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค

ผลการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียที่แยกได้จากผักแต่ละไอโซเลทพบว่าเชื้อทั้ง 5ไอโซเลท(ตารางที่ 3) สามารถก่อให้เกิดอาการเน่าเละบนพืชทดสอบ ซึ่งได้แก่ผักกาด มันฝรั่ง แครอท หอมหัวใหญ่ และกระหล่ำปลี โดยพืชทดสอบทั้งหมดเริ่มแสดงอาการเน่าเละให้เห็นได้ชัดเจนได้หลังบ่มเชื้อนาน 48 ชั่วโมง ลักษณะอาการอาการเน่าคล้ำสีน้ำตาล มีเมือกเยิ้มและกลิ่นเหม็นฉุน (ภาพที่ 1) พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท สามารถทำให้เกิดอาการของโรคได้แตกต่างกัน โดยไอโซเลท ECC19 ก่อให้เกิดอาการของโรครุนแรงมากที่สุด ก่อให้เกิดอาการโรค โดยเกิดอาการเน่าเละภายใน 48 ชั่วโมง รองลงมาคือไอโซเลท NKP, KCB, NKS, CM ตามลำดับ(ตารางที่ 4) จึงทำการคัดเลือกเชื้อไอโซเลท ECC19 เป็นตัวแทนในการศึกษาในขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยการประเมินระดับความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อ 5 ไอโซเลทหลังปลูกเชื้อนาน 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบบนพืชทดสอบ 5 ชนิด

ไอโซเลท	พืชทดสอบ	ระดับอาการหลังปลูกเชื้อ 48 ชม[1/] จำนวนซ้ำ				ค่าเฉลี่ยระดับ[2/]อาการโรคหลังปลูกเชื้อ
		1	2	3	4	
KCB	ผักกาด	2	3	3	2	2.50
	มันฝรั่ง	3	2	2	2	2.25
	แครอท	3	2	2	2	2.25
	หอมหัวใหญ่	3	2	2	2	2.25
	กระหล่ำปลี	3	2	2	2	2.25
CM	ผักกาด	2	2	1	2	1.75
	มันฝรั่ง	2	1	1	1	1.25
	แครอท	1	1	1	1	1.00
	หอมหัวใหญ่	1	1	1	1	1.00
	กระหล่ำปลี	2	1	1	1	1.25
NKS	ผักกาด	3	2	2	2	2.25
	มันฝรั่ง	3	2	2	2	2.25
	แครอท	3	2	2	2	2.25
	หอมหัวใหญ่	2	2	2	2	2.00
	กระหล่ำปลี	2	2	2	2	2.00
NKP	ผักกาด	2	3	3	2	2.50
	มันฝรั่ง	3	2	2	2	2.25
	แครอท	3	2	2	2	2.25
	หอมหัวใหญ่	2	2	2	3	2.25
	กระหล่ำปลี	2	3	3	3	2.75

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลท	พืชทดสอบ	ระดับอาการหลังปลูกเชื้อ 48 ชม[1/] จำนวนซ้ำ				ค่าเฉลี่ยระดับ[2/]อาการโรคหลังปลูกเชื้อ
		1	2	3	4	
ECC 19	ผักกาด	4	4	4	4	4.00
	มันฝรั่ง	4	4	3	4	3.75
	แครอท	3	4	4	4	3.75
	หอมหัวใหญ่	4	4	4	3	3.75
	กระหล่ำปลี	4	4	4	4	4.00
control (น้ำนึ่ง)	ผักกาด	0	0	0	0	0.00
	มันฝรั่ง	0	0	0	0	0.00
	แครอท	0	0	0	0	0.00
	หอมหัวใหญ่	0	0	0	0	0.00
	กระหล่ำปลี	0	0	0	0	0.00

[1/]ระดับอาการของโรค (ดัดแปลงวิธีการจาก ศศิธร,2547)

ระดับ 0 คือไม่ปรากฏอาการของโรค

ระดับ 1 คือ แสดงอาการโรคบนพืชทดสอบรุนแรง 1-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่พืชทดสอบ

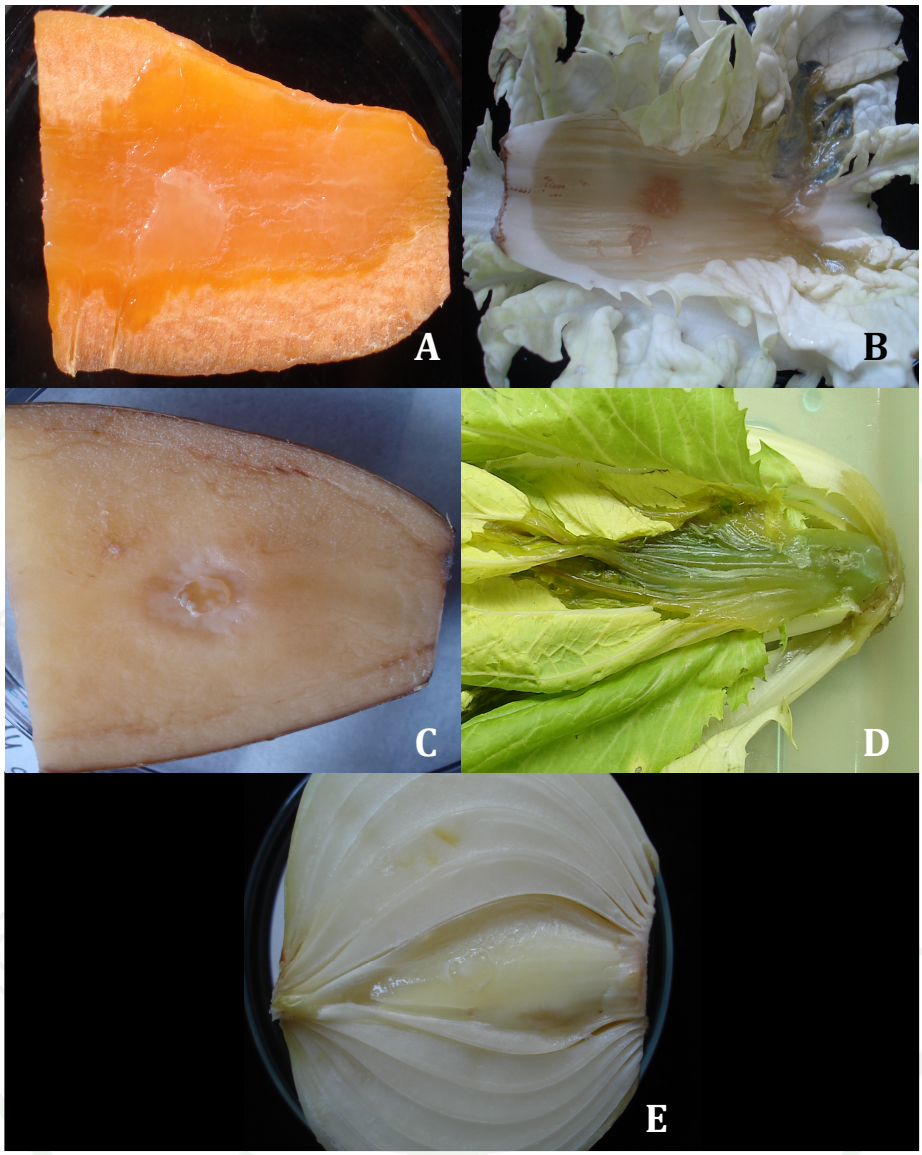
ระดับ 2 คือ แสดงอาการโรคบนพืชทดสอบรุนแรง 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่พืชทดสอบ

ระดับ 3 คือ แสดงอาการโรคบนพืชทดสอบรุนแรง 51-75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่พืชทดสอบ

ระดับ 4 คือ แสดงอาการโรคบนพืชทดสอบรุนแรง 76-100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่พืชทดสอบ

[2/]ค่าเฉลี่ยระดับอาการโรค = Σ (ระดับอาการโรค x จำนวนต้นที่เป็นโรค) / จำนวนต้นที่ปลูกเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการเน่าเละในพืชชนิดต่างๆหลังการปลูกเชื้อ *Erwinia carotovora* ไอโซเลท ECC19 ภายหลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง

A. ลักษณะแผลอ่อนนุ่ม มีเมือกเยิ้ม

B. ลักษณะแผลเน่าคล้ำสีน้ำตาลเนื้อเยื่อเละอ่อนนุ่ม

C. ลักษณะแผลยุบตัวลง เนื้อเยื่ออ่อนนุ่ม มีเมือกเยิ้ม

D. ลักษณะแผลสีน้ำตาล อ่อนนุ่มเละ มีเมือกเยิ้ม ส่งกลิ่นเหม็น

E. ลักษณะแผลที่ยุบตัวลง เนื้อเยื่ออ่อนนุ่ม มีเมือกเยิ้ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละ

ผลการศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (cultural characteristic) endo agar ของเชื้อไอโซเลท ECC19 พบว่าโคโลนี มีลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ เป็นมัน และเหลือบแสง (metallic sheen) ส่วนบนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) โคโลนีสีขาวนวล กลมนูน ขอบเรียบ เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียมาทดสอบ กับสารละลาย 3% KOH พบว่าเกิดเป็นเมือกเหนียวติดลูป ยืดขึ้นมาได้ และหลังจากนำไปย้อมสีแบบแกรม พบว่าเซลล์แบคทีเรีย ลักษณะรูปร่าง เป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของ safanin-o จากการทดสอบปฏิกิริยา oxidative/ fermentative พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ECC19 ทั้งในอาหารหลอดเปิดและหลอดปิดทับด้วย parafin oil มีการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลืองทั้ง 2 หลอด แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ECC19 สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่ขาดออกซิเจนชั่วคราว (facultative anaerobic) เมื่อทดสอบกับอาหาร Huge and Leifson's medium ประกอบกับการสร้างกรดจากน้ำตาลต่างๆพบว่าเชื้อสามารถสร้างกรดจากน้ำตาล manitol,raffinose และ lactose

เมื่อนำข้อมูลจากการศึกษาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition (Holt et al., 1994) พบว่าคุณสมบัติของเชื้อไอโซเลท ECC19 สอดคล้องกับคุณสมบัติของเชื้อ *Erwinia carotovora* sub sp. *carotovora* (ตารางที่ 5)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 สรีรวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ ECC19 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง

ลักษณะการทดสอบ	สายพันธุ์แบคทีเรีย	
	ECC19	*E. carotovora*[1/]
gram stain reaction	gram -	gram -
oxygen relationship	+	+
shape	short rod	short rod
3 % KOH	+	+
acid produced from :		
sorbitol	-	-
manitol	+	+
sucrose	-	-
raffinose	+	+
arabitol	-	-
lactose	+	+

[1/] อ้างอิงข้อมูลเปรียบเทียบของเชื้อ *Erwinia carotovora* ในตำรา Bergey's manual of determinative bacteriology ninth edition

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* ในระดับห้องปฏิบัติการ

2.1 พืชทดสอบ ใช้พืชสมุนไพรไทย 20 ชนิด (ตารางที่ 1)

2.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากพืช

ตารางที่ 6 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากพืชชนิดต่างๆหลังจากการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator

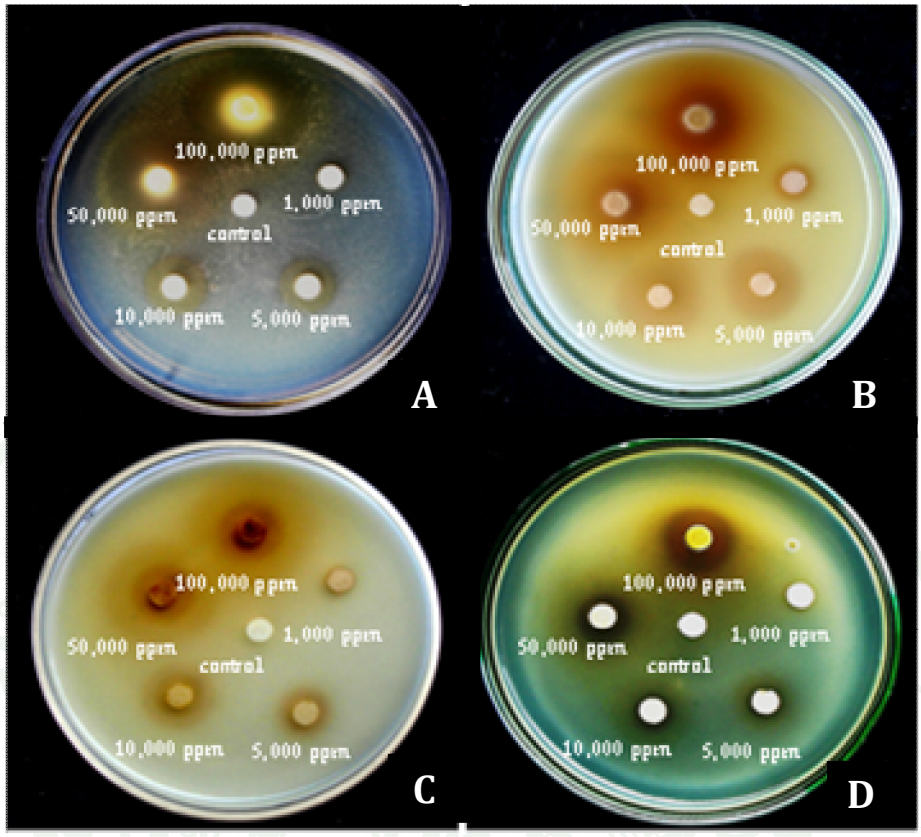
ลำดับที่	ชื่อพืช	ชื่อสามัญ	ลักษณะทางกายภาพ
1	กล้วย	banana	ของเหลวหนืดสีดำ
2	กานพลู	clove	ของเหลวหนืดข้นสีดำ
3	ขมิ้นชัน	tumeric	ของเหลวหนืดสีเหลืองเข้ม
4	ชะเอมเทศ	spanish licorice	ของเหลวหนืดสีดำ
5	ดอกเข็มสีแดง	west indian jaxmine	ผงละเอียดสีแดงเข้ม
6	ทับทิม	pomegranate	ของเหลวหนืดสีเหลืองแก่
7	เบญกานี	nut gall	ของเหลวหนืดสเขียวเข้ม
8	ฝรั่ง	guava	ของเหลวหนืดสีเขียวแก่
9	พริกหอม	bird chilli	ผงสีน้ำตาลแดง
10	พลู	betel pepper	ของเหลวหนืดข้นสีเขียวแก่
11	ฟ้าทะลายโจร	creyat root	ของเหลวหนืดสีดำ
12	มะขาม	tamarind	ของเหลวหนืดสีเหลืองใส
13	มังคุด	mangosteen	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
14	แมงลัก	hairy basil	ของเหลวหนืดสีเขียว
15	สมอไทย	chebulic myrobalan	ของเหลวหนืดข้นเขียวแข้ม
16	สมอพิเภก	beleric myrobalan	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
17	สะระแหน่	kitchen mint	ของเหลวหนืดสีเขียวแก่
18	หนุมานประสานกาย	ha-nu-man-pa-san-kai	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
19	หมาก	areca nut	ของเหลวหนืดข้นสีน้ำตาลแดง
20	หูปลาช่อน	floras paint brush	ของเหลวหนืดสีเขียว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora* โดยใช้วิธี paper disc agar diffusion

จากการนำสมุนไพร 20 ชนิด มาสกัดสารสกัดหยาบโดยใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบ ลักษณะต่างๆ (ตารางที่ 6) นำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อในห้องปฏิบัติการโดยวิธี paper disc agar diffusion โดยใช้สารสกัดหยาบ 5 ระดับความเข้มข้น 1,000 5,000 10,000 50,000 และ 100,000 ppm พบสารสกัดจากพืช 8 ชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ ของเชื้อ ได้แก่ สารสกัดหยาบจากผลกานพลู ผลเบญกานี ผลสมอพิเภก ผลสมอไทย เปลือกผลทับทิม เปลือกผลมังคุด ใบพลู และใบฝรั่ง โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดหยาบที่ให้ผลยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1,000 ppm 3 อันดับแรก ได้แก่ อันดับ 1 สารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก ให้ค่าเฉลี่ยเบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดที่ 0.41 เซนติเมตร อันดับที่ 2 สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมให้ค่าเฉลี่ยเบริเวณยับยั้ง 0.25 เซนติเมตร และอันดับที่ 3 สารสกัดหยาบจากผลเบญกานีให้ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้ง 0.33 เซนติเมตร (ภาพที่ 2 และตารางที่ 7)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

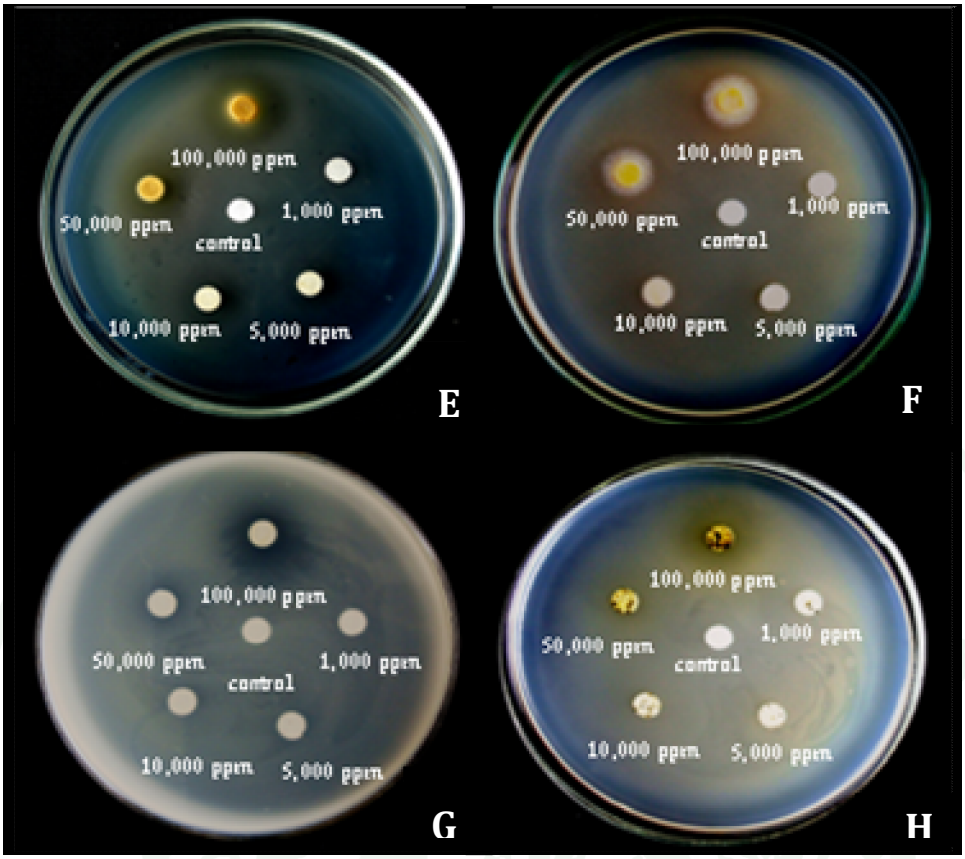


ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืช 8 ชนิด โดยการทดสอบด้วย paper disc agar diffusion ที่ระดับความเข้มข้น 1,000, 5,000, 10,000, 50,000 และ 100,000 ppm ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora*

A.ทับทิม B. เบญกานี

C.กานพลู D.สมอไทย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 (ต่อ)

E.สมอพิเภก F.มังคุด

G.พลู H.ฝรั่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยความกว้าง (เซนติเมตร) บริเวณยับยั้งเชื้อ *Erwinia carotovora* ของสารสกัดหยาบจากพืช 20 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 -100,000 ppm

พืช	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากพืช (ppm)					
	100,000	50,000	10,000	5,000	1,000	control
กล้วย	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u
กานพลู	1.08 c[1/]	0.91 d	0.49 lmn	0.38 nop	0.08 tu	0.00 u
ขมิ้น	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u
เข็มแดง	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u
ชะเอมเทศ	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u
ทับทิม	1.40 a	1.20 bc	0.66 g-j	0.56 jkl	0.25 p-s	0.00 u
เบญกานี	1.26 b	1.15 bc	0.82 def	0.63 h-k	0.33 opq	0.00 u
ฝรั่ง	0.75 e-h	0.53 klm	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u
พริก	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u
พลู	0.30 o-r	0.16 st	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u
ฟ้าทะลายโจร	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u
มะขาม	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u
มังคุด	0.56 jkl	0.43 mno	0.24 qrs	0.00 u	0.00 u	0.00 u
แมงลัก	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u
สมอไทย	0.78 d-g	0.61 i-l	0.19 rst	0.16 st	0.00 u	0.00 u
สมอพิเภก	1.24 b	1.10 c	0.85 de	0.71 f-i	0.41 mno	0.00 u
สะระแหน่	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u
หนุมานประสานกาย	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u
หมาก	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u
หูปลาช่อน	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u	0.00 u

[1/]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันของตารางมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์โดย LSD Test (P=0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค่าเฉลี่ยความกว้าง 4 ซ้ำ ของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) จากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora* ของสารสกัดหยาบจากพืช 20 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 1,000-100,000 ppm โดยใช้สูตรความกว้างของบริเวณยับยั้ง

$$= \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง - เส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นกระดาษกรอง}}{2}$$

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืช ในการลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* ในดินจำลองการติดเชื้อ

จากการนำสารสกัด 3 อับดับแรกที่ให้ผลดีที่สุด ในการทดลองที่ 2 ซึ่งได้แก่สารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก เปลือกผลทับทิม และผลเบญกานี ที่ความเข้มข้น 10,000 และ 20,000 ppm คลุกในดินจำลองการติดเชื้อ (ในอัตรา 500 มิลลิลิตรต่อดิน 5 กิโลกรัม) สุ่มตรวจนับปริมาณของเชื้อทุก 5 วันตั้งแต่วันที่ 1 (เริ่มต้น) ถึงวันที่ 30 รวม 7 ครั้ง พร้อมทั้งบันทึกจำนวนต้นที่เป็นโรคเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเน่าละในผักกาดเขียวปลี จากการเปรียบเทียบการเกิดโรค พบสารสกัดจากสมอพิเภกที่ความเข้มข้น 20,000 ppm แสดงอาการเกิดโรค 17.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากสมอพิเภกที่ความเข้มข้น 10,000 ppm แสดงอาการเกิดโรค 32.5 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากผลเบญกานีที่ความเข้มข้น 10,000 ppm แสดงอาการเกิดโรค 37.50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดความคุมที่แสดงอาการเกิดโรคถึง 97.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลสอดคล้องกับการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในดิน พบสารสกัดหยาบจากสมอพิเภกที่ความเข้มข้น 20,000 ppm สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุโรคได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดความคุมที่ไม่ได้คลุกกับสารสกัดหยาบจากพืช โดยประชากรของเชื้อในดินวันที่ 30 ลดลงเหลือ 2.50×10^5 cfu/g เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในช่วงเวลาเดียวกันคงอยู่ที่ 9.87×10^5 cfu/g สารสกัดหยาบจากสมอพิเภกและเบญกานี ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm สามารถลดประชากรของเชื้อลงที่ 3.82×10^5 cfu/g และ 3.80×10^5 cfu/g ตามลำดับซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

(ตารางที่ 8)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเน่าละในผักกาดเขียวปลีอายุ 40 วัน ที่แยกได้จากดินในแต่ละกรรมวิธี โดยเปรียบเทียบกับ control ตั้งแต่วันที่ 5 -30

พืช	ความเข้มข้น	ประชากรของเชื้อ *Erwinia carotovora* (cfu/g)							การเกิดโรค (%)
ทดสอบ	ppm	วันที่ 1	5	10	15	20	25	30	
ทับทิม	10,000	$3.20x10^7$u[1/]	$6.02x10^5$c-h	$4.40x10^5$a-f	$9.20x10^5$i-l	$6.60x10^5$d-i	$3.25x10^5$abc	$5.65x10^5$b-g	65.00[2/]
	20,000	$3.20x10^7$u	$6.50x10^5$d-h	$1.29x10^6$nop	$1.75x10^6$qr	$6.80x10^5$f-j	$3.10x10^5$ab	$7.72x10^5$g-k	82.50
เบญกานี	10,000	$3.20x10^7$u	$1.96x10^6$rs	$1.05x10^6$k-n	$9.40x10^5$jkl	$9.00x10^5$i-l	$4.70x10^5$a-f	$3.80x10^5$a-e	37.50
	20,000	$3.20x10^7$u	$1.60x10^6$pq	$2.03x10^6$s	$2.09x10^6$s	$5.40x10^5$b-g	$5.37x10^5$b-g	$6.72x10^5$f-j	70.00
สมอพิเภก	10,000	$3.20x10^7$u	$1.62x10^6$q	$3.20x10^6$t	$1.61x10^6$q	$8.60x10^5$h-l	$2.30x10^5$a	$3.82x10^5$a-d	32.50
	20,000	$3.20x10^7$u	$2.11x10^6$s	$1.07x10^6$k-m	$6.60x10^5$e-j	$1.06x10^6$lmn	$2.20x10^5$a	$2.50x10^5$a	17.50
control	0	$3.20x10^7$u	$3.01x10^6$t	$1.22x10^6$mn	$1.52x10^6$opq	$1.12x10^6$lmn	$1.26x10^6$mno	$9.87x10^5$klm	97.50

[1/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในตารางมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์โดย LSD Test (P=0.05)

[2/] เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค = (จำนวนต้นผักกาดที่เป็นโรค/จำนวนต้นผักกาดทั้งหมด) x 100%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การศึกษาความถี่ในการใช้สารสกัดจากที่เหมาะสม เพื่อควบคุมปริมาณเชื้อในดินให้อยู่ในระดับต่ำจนไม่ก่อให้เกิดโรค

จากการนำสารสกัดหยาบจากสมอพิเภกที่ความเข้มข้น 20,000 ppm ซึ่งให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora*ในดินจำลองการติดเชื้อจากการทดลองที่ 2 มาศึกษาความถี่ของการใช้ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการควบคุมปริมาณเชื้อสูงสุด โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 กรรมวิธี จากนั้นทำการสุ่มเก็บ ตัวอย่างดิน เพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในดินทุกๆ 5 วัน ตั้งแต่วันที่ 1 (เชื้อเริ่มต้น) ถึงวันที่ 30 โดยการนำตัวอย่างดินมาทำ serial dilution และ spread plate บนอาหารเลี้ยเชื้อ endo agar คำนวณหาปริมาณเชื้อในดินแต่ละกรรมวิธี เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถลดปริมาณเชื้อในดินลงได้ โดยทำให้ปริมาณเชื้อในดินแต่ละสัปดาห์ลดลงต่ำกว่าในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใช้สารสกัดหยาบจากสมอพิเภก โดยสังเกตุเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคลดลงและจำนวนประชากรของเชื้อ *Erwinia carotovora* จากการ spread plate ในกรรมวิธีที่ 2 ซึ่งคลุกสารสกัดทุกๆ 10 วันแสดงให้เห็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุดอยู่ที่ 24.00% เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งไม่ได้ใส่สารสกัดพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 82.50% สำหรับจำนวนประชากรของเชื้อ *Erwinia carotovora*ในกรรมวิธีที่ 2 จากวันที่ 1 (เชื้อเริ่มต้น) ถึงวันที่ 30 จะพบการลดลงของปริมาณเชื้ออยู่ที่ 5.55×10^{6} cfu/g เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมอยู่ที่ 1.96×10^{7} cfu/g ของในช่วงวันเดียวกัน (ตารางที่ 9)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* ในดินแต่ละกรรมวิธี และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเน่าละในผักเปรียบเทียบกับ control ตั้งแต่วันที่ 5 -30

กรรมวิธี	จำนวนประชากรของเชื้อ *Erwinia carotovora* (cfu/g)							การเกิดโรค (%)
	วันที่ 1	5	10	15	20	25	30	
T1 คลุกสารสกัด1 ครั้ง	$3.20x10^7$m[1/]	$4.25x10^6$abc	$4.00x10^6$ab	$4.27x10^6$abc	$4.52x10^6$a-d	$4.25x10^6$abc	$4.62x10^6$a-e	33.00[2/]
T2 คลุกสารสกัดทุกๆ 10วัน	$3.20x10^7$m	$6.47x10^6$b-g	$6.47x10^6$b-g	$3.87x10^6$ab	$4.95x10^6$a-f	$8.27x10^6$gh	$5.55x10^6$a-g	24.00
T3 คลุกสารสกัดทุกๆ 5 วัน	$3.20x10^7$m	$5.67x10^6$a-g	$1.33x10^7$i	$3.45x10^6$a	$4.60x10^6$ a-e	$7.30x10^6$efg	$7.57x10^6$f-h	37.50
T4 คลุกสารสกัดทุกๆ 3 วัน	$3.20x10^7$m	$6.87x10^6$c-g	$7.25x10^6$d-g	$4.05x10^6$ab	$3.32x10^6$a	$4.90x10^6$a-f	$6.80x10^6$c-g	40.00
T5 ไม่ใส่สารสกัดและเชื้อ	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T6 ชุดควบคุมใส่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อแทนสารสกัด	$3.20x10^7$m	$1.02x10^7$h	$1.66x10^7$jk	$1.59x10^7$ijk	$1.41x10^7$ij	$1.78x10^7$kl	$1.96x10^7$l	82.50

[1/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันของตารางมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์โดย LSD Test (P=0.0)

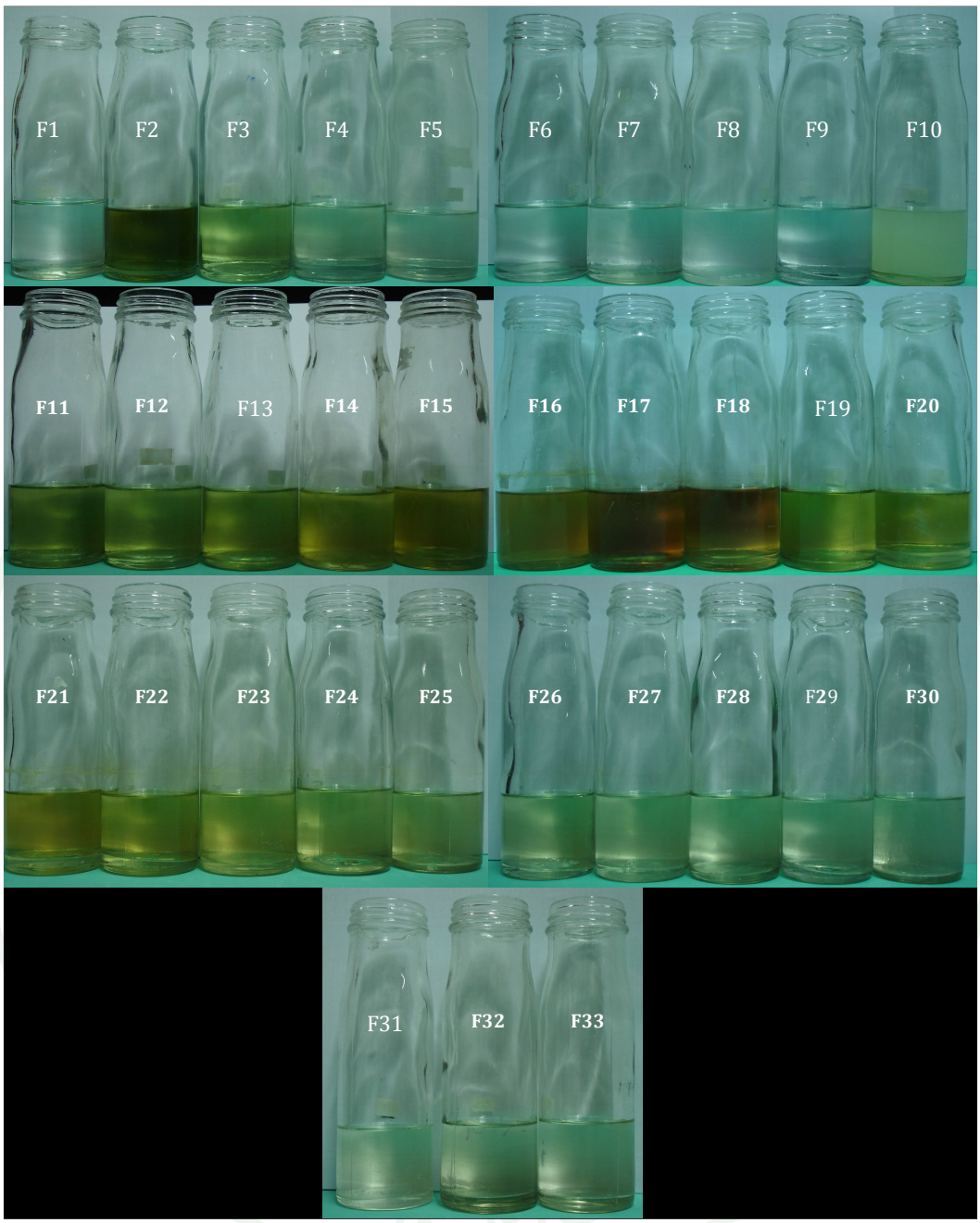
[2/] เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค = (จำนวนต้นผักกาดที่เป็นโรค/จำนวนต้นผักกาดทั้งหมด) x100

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การแยกสารสกัดอย่างละเอียดโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบรวดเร็ว (quick column chromatography) และทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืช

การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมภ์โครมาโทกราฟีแบบเร็ว และทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่แยกได้ โดยนำสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกซึ่งจากผลการทดสอบที่ผ่านมาพบว่าให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ดีที่สุด มาสกัดอย่างละเอียดโดยวิธีคอลัมภ์โคมาโทกราฟี แบบรวดเร็วโดยทำการชะด้วย hexane, chloroform, methanol และน้ำ ตามลำดับ ได้สาร 33 fraction fractionละ 50 มิลลิลิตร (ภาพที่ 3) นำแต่ละfraction ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (thin layer chromatography) สามารถจัดรวบรวมสารที่มีลักษณะคล้ายกันให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้เป็น 5 fraction นำแต่ละ fraction ระเหยให้แห้งจะได้ปริมาณและลักษณะของสารดังแสดงในตารางและผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารแต่ละ fraction ที่แยกได้จากคอลัมภ์โครมาโตกราฟีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora* โดยวิธี paper disc agar diffusion พบว่าสารในFS2 (F11-F16) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 0.85 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ FS3 (F17-F20) และ FS4 (F21-F25) เกิดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 0.75 และ 0.32 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนสาร FS1 (F1-F10) และ FS5 (F26-F33) ไม่สามารถก่อให้เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อ (ตารางที่10)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของสาร 33 fraction (F1 ถึง F33)ที่แยกสกัดจากผลสมอพิเภกโดยวิธี quick column chromatography

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

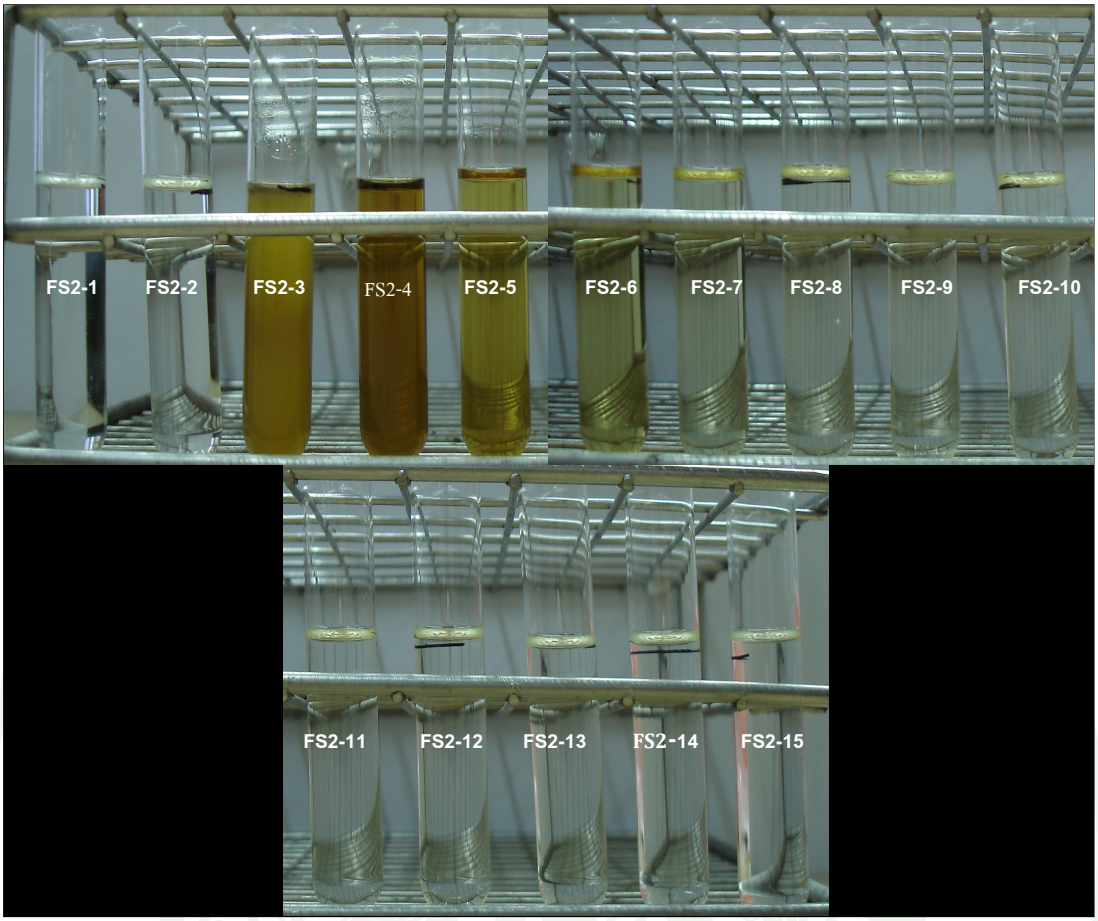
ตารางที่ 10 ลักษณะปริมาณและค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (เซนติเมตร) ของสารสกัดจากสมอพิเภกแต่ละ fraction ที่แยกโดยวิธีคอลัมภ์โครมาโตกราฟี

Fraction	ปริมาณสาร (มิลลิกรัม)	ลักษณะสาร	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)
FS1 (F1-F10)	957	ตะกอนสีเขียวแก่	0.00 d[1/]
FS2 (F11-F16)	1,145	ตะกอนสีน้ำตาล	0.85 a
FS3 (F17-F20)	2,413	ตะกอนสีน้ำตาลเข้ม	0.75 b
FS4 (F21-F25)	825	ตะกอนสีน้ำตาลแกมเขียว	0.32 c
FS5 (F26-F33)	264	ตะกอนสีน้ำตาลเหลือง	0.00 d

[1/]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์โดย LSD Test (P=0.05)

จากการนำสารสกัดหยาบ FS2 (F11-F16) มาแยกด้วยคอลัมภ์โคมาโทกราฟีแบบ quick column chromatography ที่ทำการชะด้วยตัวทำละลายจาก hexane, chloroform, methanol และน้ำซ้ำอีกครั้ง เก็บสารที่ได้ด้วยหลอดทดลองหลอดละ 20 มิลลิลิตร ได้สาร 15 fraction ดังนี้ FS2-1, FS2-2, FS2-3, FS2-4, FS2-5, FS2-6, FS2-7, FS2-8, FS2-9, FS2-10, FS2-11, FS2-12, FS2-13, FS2-14, FS2-15 ดังภาพที่ 4 นำสารที่ได้แต่ละfraction มาทดสอบการยับยั้งการเจริญเชื้อ *Erwinia carotovora* โดยวิธี paper disc agar diffusion พบว่าสารใน FS2-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด (ตารางที่ 11)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของสาร 15 fraction (FS2-1 ถึง FS2-15) ที่แยกสกัดจากผลสมอพิเภก โดยวิธี quick column chromatography

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 ลักษณะและค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (เซนติเมตร) ของสารสกัดจากสมอพิเภกแต่ละ fraction (FS2-1 ถึง FS2-15) ที่แยกโดยวิธีคอลัมภ์โครมาโตกราฟี

Fraction	ลักษณะสาร	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)
FS2-1	ใสไม่มีสี	0.00[1/]
FS2-2	ใสไม่มีสี	0.00 f
FS2-3	เหลืองอมเขียวขุ่น	0.21 e
FS2-4	เหลืองอมเขียวใส	0.49 c
FS2-5	เหลืองใส	0.85 a
FS2-6	เหลืองอ่อนใส	0.62 b
FS2-7	เหลืองอ่อนใส	0.25 d
FS2-8	ใสไม่มีสี	0.03 f
FS2-9	ใสไม่มีสี	0.03 f
FS2-10	ใสไม่มีสี	0.00 f
FS2-11	ใสไม่มีสี	0.00 f
FS2-12	ใสไม่มีสี	0.00 f
FS2-13	ใสไม่มีสี	0.00 f
FS2-14	ใสไม่มีสี	0.00 f
FS2-15	ใสไม่มีสี	0.00 f

[1/]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์โดย LSD Test (P=0.05)

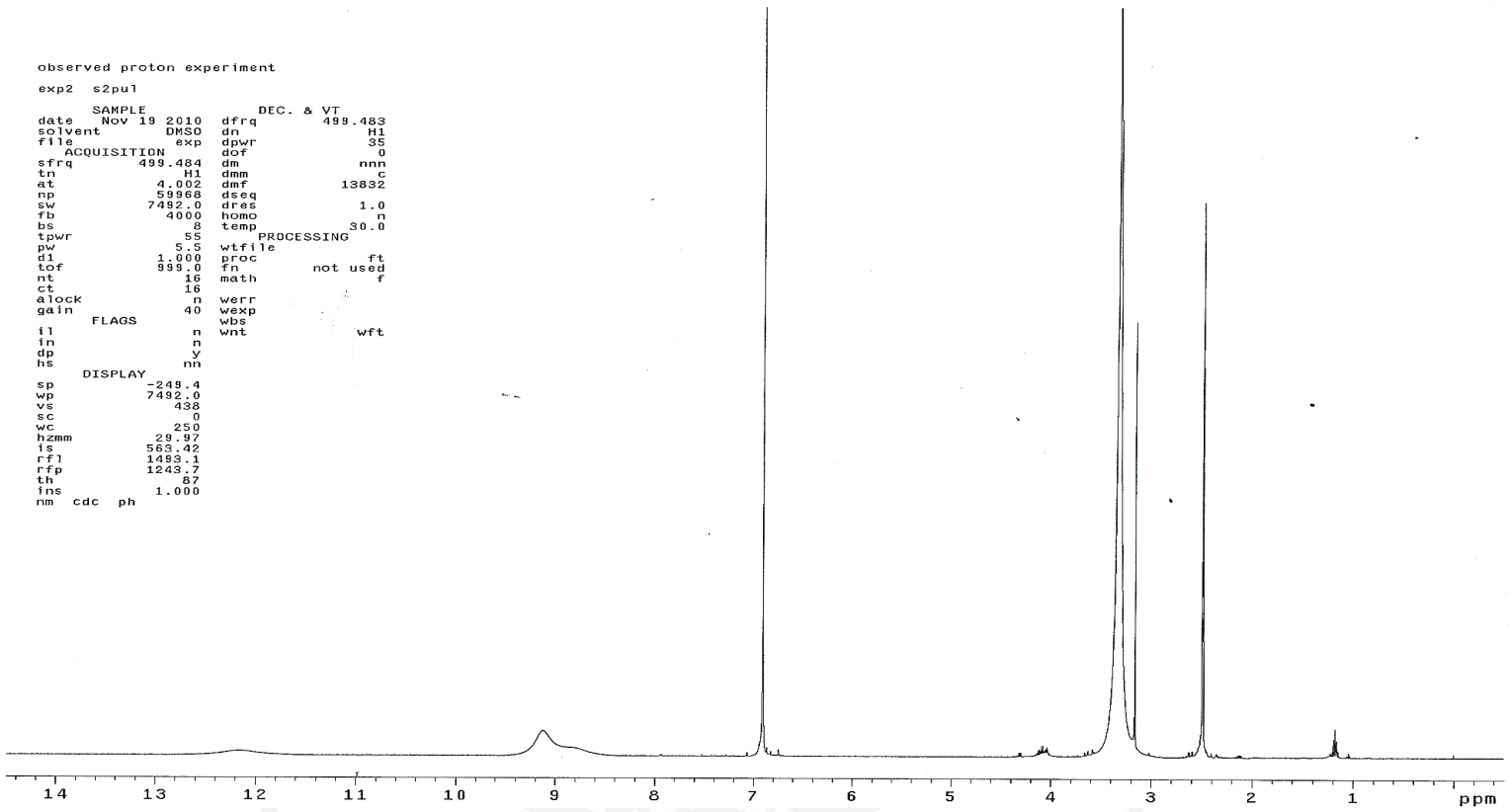
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การศึกษาชนิดของสารบริสุทธิ์

จากการนำสาร FS2-5 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Erwinia carotovora*ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC ด้วย TLC plate โดยใช้ระบบ $CHCl_3$: MeOH (9:1) มีค่า Rf = 0.50 นำไปวิเคราะห์โครงสร้างของสารทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสมอพพิเภก FS2-5 โดยเตรียมสารบริสุทธิ์ในสารละลาย Acetone-d6 ก่อนนำมาวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง 300 MHz nuclear magnetic resonance (NMR) ได้แก่ ^{1}H และ ^{13}C NMR ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่าผลของการวิเคราะห์โครงสร้างสาร แสดงสัญญาณดังต่อไปนี้

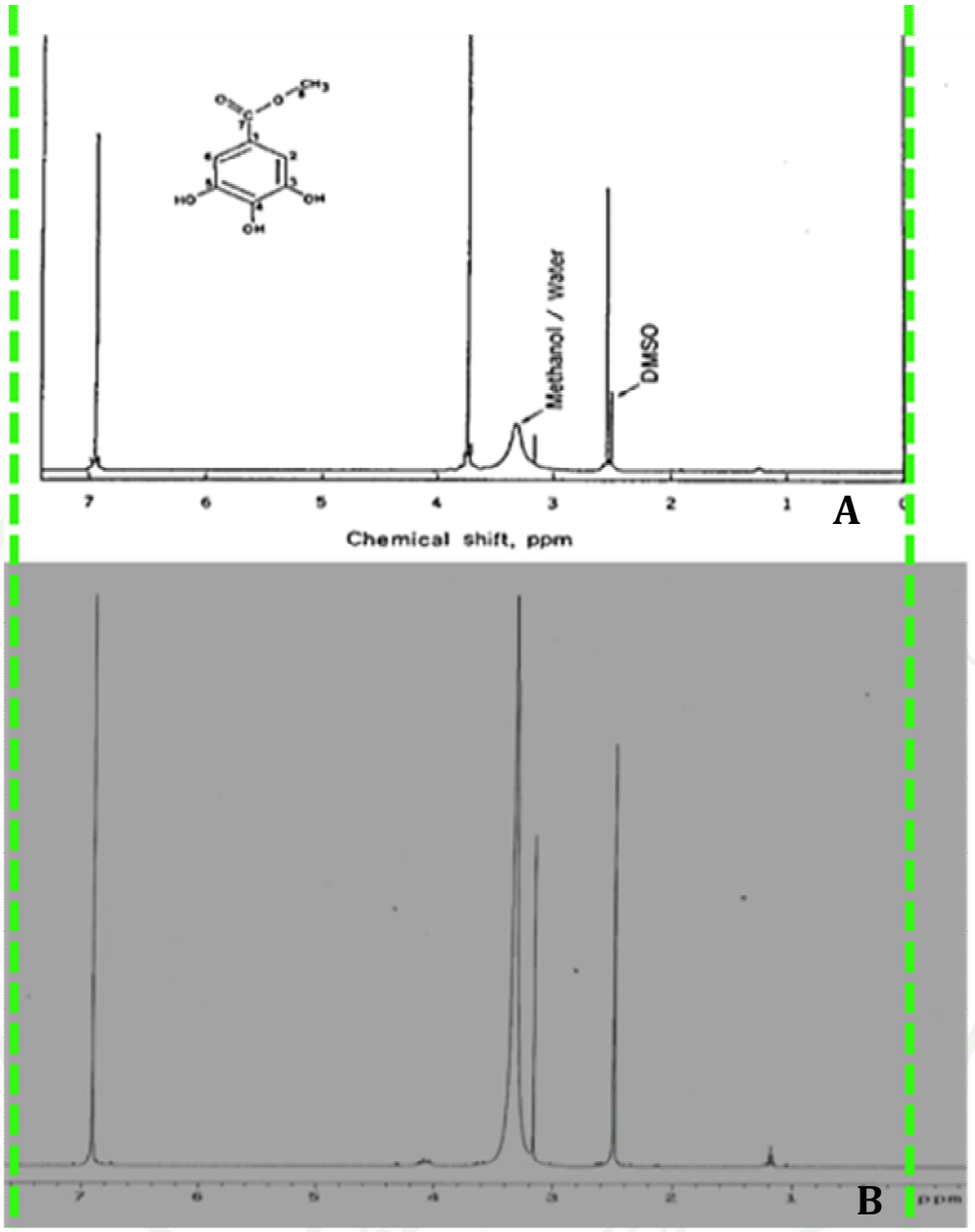
^{1}H NMR 2.5 ppm, hydroxyl protons; 3.7 ppm, methoxy protons; 7.0 ppm, aromatic protons ซึ่งมีลักษณะสัญญาณคล้ายสาร methyl galate (C J.M.Kane,1988) (ภาพที่ 5 และภาพที่ 6) ส่วน ^{13}C นาโนเมตรไม่สามารถอ่านผลได้อาจเนื่องจากสารมีปริมาณน้อยเกินไปหรือสารยังไม่บริสุทธิ์เพียงพอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 สัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร FS2-5 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบของผลสมอพิเภก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 สัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร FS2-5 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบของผลสมอพิเภก เปรียบเทียบกับสัณญาณสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร methyl gallate

A. สัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร methyl gallate ที่ได้จากรายงานการศึกษาของ Kane ในปี 1988

B. สัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร FS2-5 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบของสมอพิเภก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

จากการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากผักที่เป็นโรคเน่าเละ โดยเชื้อมีคุณสมบัติสามารถในการทำให้เกิดโรคเน่าเละกับพืชทดสอบเมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) เซลล์ย้อมติดสีแดงของ safranin-o เชื้อทำปฏิกิริยากับ 3% KOH รูปร่างเป็นท่อนสั้น (short rod) ขนาดประมาณ 0.7x1.2 ไมโครเมตร คุณสมบัติเป็น facultative anaerobic bacteria สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล manitol,raffinose และ lactose แต่ไม่เกิด phosphatase activity ไม่มีการใช้น้ำตาลจาก sucrose ไม่มีการผลิต indole ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวตรงกับเชื้อ *Erwinia carotovora* (Holt et al., 1994) การนำสมุนไพร 20 ชนิด มาสกัดสารสกัดหยาบโดยใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบ ลักษณะต่างๆเมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อในห้องปฏิบัติการโดยวิธี paper disc agar diffusion โดยใช้สารสกัดหยาบ 5 ระดับความเข้มข้น พบสารสกัดจากพืช 8 ชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ได้แก่ ผลกานพลู ผลเบญกานี ผลสมอพิเภก ผลสมอไทย เปลือกทับทิม เปลือกผลมังคุด ใบพลู และใบฝรั่ง โดยสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก เปลือกผลทับทิม และผลเบญกานี ให้ค่าเฉลี่ยเบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm คือ 0.41 ,0.33 และ 0.25 เซนติเมตร ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของสุพจน์ (2548) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมสดและผลสมอพิเภกสามารถยับยังการเจริญของเชื้อ ได้ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1,000 ppm ขึ้นไป

จากการนำสารสกัด 3 อับดับแรกที่ให้ผลดีที่สุด ในการทดลองที่ 1 ได้แก่สารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก เปลือกผลทับทิม และผลเบญกานี ที่ความเข้มข้น 10,000 และ 20,000 ppm คลุกในดินจำลองการติดเชื้อ สุ่มตรวจนับปริมาณของเชื้อทุก 5 วันตั้งแต่วันที่ 1 (เริ่มต้น) ถึงวันที่ 30 รวม 7 ครั้ง พบว่าสารสกัดจากผลสมอพิเภกความเข้มข้น 20,000 ppm สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในดินได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ control ที่ไม่ได้คลุกสารสกัดจากพืช โดยประชากรของเชื้อในดินวันที่ 30 ของกรรมวิธีที่คลุกด้วยสารสกัดจากผลสมอพิเภกลดลงเหลือ 2.50 x 10^5 cfu/g เมื่อเทียบกับ controlในช่วงเวลาเดียวกันยังคงอยู่ที่ 9.87x10^5 cfu/g ส่วนสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมและผลเบญกานีที่ความเข้มข้น 10,000 ppm ปริมาณเชื้อในวันที่ 30 ใกล้เคียงกันอยู่ที่ 3.85 x10^5 และ 3.80 x10^5 cfu/g ตามลำดับ จากการศึกษาความถี่ในการใส่สารสกัดจากพืช ลงในดินที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เหมาะสม เพื่อควบคุมปริมาณเชื้อในดินให้อยู่ในระดับต่ำจนไม่ก่อให้เกิดโรคในกรรมวิธีที่ 2 คลุกสารสกัดทุกๆ 10 วัน แสดงให้เห็นเปอร์เซ็นต์ การเกิดโรคน้อยที่สุดที่ 24.00% เมื่อเทียบกับกรรมวิธี ควบคุม ซึ่งไม่ได้ใส่สารสกัดพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 82.50% สำหรับจำนวนประชากรของเชื้อ *Erwinia carotovora*ในกรรมวิธีที่ 2 จากวันที่ 1 (เชื้อเริ่มต้น) ถึงวันที่ 30 จะพบการลดลงของปริมาณ เชื้ออยู่ที่ $5.55x10^6$ cfu/g เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ $19.60.x10^6$ cfu/g แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณเชื้อในดินของทุกกรรมวิธียังอยู่ในระดับที่สูงพอที่จะทำให้ผัดกาดเขียวปลีแสดงอาการเน่าเละได้ ซึ่งสอดคล้องกับศศิธร (2546) ศึกษาการจัดการดินเพื่อลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดเขียวปลีในสภาพโรงเรือน โดยใช้น้ำสกัดหยาบและกากของพืช 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกทับทิม ใบพลู เปลือกส้มเขียวหวาน ต้นลูกใต้ใบ และเปลือกผลมังคุด คลุกลงในดินพบว่าทุกกรรมวิธีสามารถลดปริมาณเชื้อในดินลงได้ โดยทำให้ปริมาณเชื้อในดินในแต่ละสัปดาห์ลดลงในอัตราที่สูงกว่า control ในสัปดาห์ที่ 5 ปริมาณเชื้อในดินทุกกรรมวิธีที่คลุกด้วยน้ำสกัดหยาบและกากของพืช ลดลงอยู่ที่ระดับ 0.23 - $0.47x10^3$ cfu/g ในขณะที่ปริมาณเชื้อในดินที่เป็น control ยังคงอยู่ที่ระดับ $0.15x10^4$ cfu/g จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการลดปริมาณประชากรเชื้อในดิน โดยใช้สารสกัดจากพืชดังกล่าว มีแนวโน้วให้ผลในการควบคุมปริมาณเชื้อได้ หากมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการที่เหมาะสมต่อไป หรือใช้ร่วมกับวิธีอื่นเช่น การไถพลิกกลับดินตากแดด การปลูกพืชหมุนเวียน อีกทั้งประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในห้องปฏิบัติการอาจให้ผลการยับยั้งเชื้อประสิทธิภาพดีแต่เมื่อนำไปใช้ในเรือนทดลองหรือในแปลงอาจให้ผลไม่ดีเท่าสภาพห้องปฏิบัติการซึ่งจากผลการทดลองในโรงเรือนต้องใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 20,000 ppm สารสกัดหยาบจึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด จิตรยา (2552) ได้กล่าวว่าทั้งนี้เนื่องจากในเรือนทดลองสภาพอากาศและแสงแดด และความชื้นอาจทำให้สภาพของสารเสื่อมสภาพหรือเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปอื่นได้ นอกจากนี้การนำสารสกัดจากพืชไปใช้ในสภาพจริงควรมีการทดลองปริมาณความเข้มข้นและอัตราการใช้ที่เหมาะสมในการนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาชนิดของสารบริสุทธิ์จากการนำสาร FS2-5วิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง 300 MHZNuclear Magnetic Resonance (NMR) ได้แก่ ^{1}H และ ^{13}C NMR พบว่าผลของการวิเคราะห์โครงสร้างสาร แสดงสัญญาณ 1H NMR 2.5 ppm, hydroxyl protons; 3.7 ppm, methoxy protons; 7.0 ppm, aromatic protons ซึ่งมีลักษณะสัญญาณคล้ายสาร methyl galate(Kane,1988) จากรายงานการศึกษาของ K-T Chung และคณะ (1998) ศึกษาความสามรถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ 8 ชนิด พบว่า tannic acid, proply gallate และ methyl gallate ที่ความเข้มข้น 100 – 1,000 ไมโคลกรัม/มิลลิลิตร สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อได้ และต่อมาในปี 2009 Jang Gi choi และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสาร methyl gallate ที่สกัดได้จากต้น Galla Chinensis (*Galla Rhois)* แสดงผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Enterobacter cloacae, Salmonella minesota, E.coli* ทีความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งได้ที่ 250 ppm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียที่แยกได้จากผักพบว่าทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถก่อให้เกิดอาการเน่าเละบนพืชทดสอบแตกต่างกัน หลังบ่มเชื้อนาน 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อไอโซเลท ECC19 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์ ก่อให้เกิดอาการของโรครุนแรงมากที่สุด และเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อไอโวเลท ECC19 เปรียบเทียบกับข้อมูลใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition (Holt et al., 1994) พบว่าคุณสมบัติของเชื้อไอโซเลท ECC19 สอดคล้องกับคุณสมบัติของเชื้อ *Erwinia carotovora* sub sp. *carotovora*

สารสกัดจากพืช 8 ชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยใช้วิธี paperdisc agar diffusion ได้แก่ สารสกัดหยาบจากผลกานพลู ผลเบญกานี ผลสมอพิเภก ผลสมอไทย เปลือกทับทิม เปลือกผลมังคุด ใบพลู และใบฝรั่ง สารสกัดหยาบที่ให้ผลยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1,000 ppm 3 อันดับแรก ได้แก่ สารสกัดหยาบจากสมอพิเภก เปลือกทับทิม และผลเบญกานี ให้ค่าเฉลี่ยบริเวณยั้บยับยั้งกว้างที่สุด ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm คือ 0.41, 0.33 และ 0.25 เซนติเมตร ตามลำดับ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืช ในการลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* ในดินจำลองการติดเชื้อ สารสกัดจากสมอพิเภกที่ความเข้มข้น 20,000 ppm สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคได้ถึง 82.50 เปอร์เซ็นต์ แสดงอาการเกิดโรค 17.5 เปอร์เซ็นต์ผล สอดคล้องกับการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในดินพบสารสกัดหยาบจากสมอพิเภกที่ความเข้มข้น 20,000 ppm สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุโรคได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดความคุมที่ไม่ได้คลุกกับสารสกัดหยาบจากพืช โดยประชากรของเชื้อในดินวันที่ 30 ลดลงเหลือ $2.50x10^5$ cfu/g เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในช่วงเวลาเดียวกันคงอยู่ที่ $9.87x10^5$ cfu/g

จากการศึกษาความถี่ในการใส่สารสกัดจากพืช ลงในดินที่เหมาะสม เพื่อควบคุมปริมาณเชื้อในดินให้อยู่ในระดับต่ำจนไม่ก่อให้เกิดโรคในกรรมวิธีที่ 2 คลุกสารสกัดทุกๆ 10 วัน แสดงให้เห็นเปอร์เซ็นต์ การเกิดโรคน้อยที่สุดที่ 24.00% เมื่อเทียบกับกรรมวิธี ควบคุม ซึ่งไม่ได้ใส่สารสกัดพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 82.50% สำหรับจำนวนประชากรของเชื้อ *Erwinia*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

*carotovora*ในกรรมวิธีที่ 2 จากวันที่ 1 เชื้อเริ่มต้น ถึงวันที่ 30 จะพบการลดลงของปริมาณ เชื้ออยู่ที่ $5.55x10^6$ cfu/g เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ $19.60.x10^6$ cfu/g

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากสมอพิเภกมาแยกสกัดอย่างละเอียดโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบรวดเร็ว (quick column chromatography) และทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืช โดยนำสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกมาแยกสารออกฤทธิ์โดยวิธี quick column chromatography ได้สาร 33 fraction จัดกลุ่มสารที่มีลักษณะคล้ายกันได้ 5 fraction นำแต่ละ fraction มาทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยวิธี paper disc agar diffusion พบว่าสารสกัด fraction ที่ FS2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ได้ดีที่สุดโดยให้ขนาดของบริเวณยับยั้ง 0.85 เซนติเมตร นำสารสกัด FS2 มาแยกด้วย column chromatography อีกครั้งได้สาร 15 fraction นำแต่ละ fraction ไปทดสอบกับเชื้อ พบสาร FS2-5 ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด จึงนำสาร FS2-5 ทำให้ บริสุทธิ์มากขึ้นด้วย TLC plate มีค่า R_f= 0.50 มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองใส

การศึกษาชนิดของสารบริสุทธิ์จากการนำสาร FS2-5วิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง 300 MHz (nuclear magnetic resonance,NMR) ได้แก่ ^{1}H และ ^{13}C NMR พบว่าผลของการวิเคราะห์โครงสร้างสาร แสดงสัญญาณ ^{1}H NMR 2.5 ppm, hydroxyl protons; 3.7 ppm, methoxy protons; 7.0 ppm, aromatic protons ซึ่งมีลักษณะสัญญาณคล้ายสาร methyl galate

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ก่องกานดา ชยามฤต. 2548. **ลักษณะประจำวงศ์พรรณไม้.** กลุ่มพฤษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, กรุงเทพฯ. 113 น.

กล้าณรงค์ ศรีรอต, สมศักดิ์ ทองเอก, สิริ ชัยเสรี, สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ และอรุณี อิงคากุล. 2544. Chromatography and spectroscopy ในการสกัดและวิเคราะห์ชีวสาร. **โครงการฝึกอบรมระยะสั้นภายในประเทศประจำปีงบประมาณ 2544 สาขาชีววิทยา.** สถาบันราชภัฏ.กระทรวงศึกษาธิการและภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพคณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จิตรยา จารุจิตร์. 2552. **การควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศโดยใช้สารสกัดจากพืชและธาตุซิลิกอนในเรือนทดลอง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เจตน์ มาธฤทธิ์. 2545. **การศึกษาสภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาวและ *Erwinia carotovora* sub sp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าและของผัก**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชนิดา แสนโครต. 2552. **การศึกษากลุ่มสารออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของขิง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

ชมพูนุท บุญราชแขวง. 2550. **อิทธิพลของสารทุติยภูมิจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ณัฐทิยา หาญณรงค์. 2550. **การศึกษาสารทุติยภูมิจากแห้มที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* de Berry สาเหตุโรคสแคบขององุ่น.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธรรดร โสตถิบำรุง. 2546. **สมบัติการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดสมุนไพรบางชนิดต่อเชื้อราก่อโรคในผักสกุลผักกาด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ธิดารัตน์ ปลื้มใจ. 2534. **ฤทธิ์ต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ของฟ้าทะลายโจร.** กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กรุงเทพฯ. 29 น.

ปณิตา สัจจวาที และเชาวลิต เขตต์กิ่ง. 2543. เครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรและเครื่องเทศ. **โครงงานวิศวกรรมการอาหาร**. ภาควิชาวิศวกรรมการอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

บัญญัติ สุขศรี. 2518. **ประสิทธิภาพของเครื่องเทศบางชนิดในการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว, ศุภลักษณ์ ฮอกกะวัด และวรรณทนา สินสิริ. 2538. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ. **รายงานผลการวิจัยโดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสารวิชาการจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น**. 67 น.

มาลิน จุลศิริ, รุ่งระวี เติมศิริฤทธิกุล, ศรีจันทร์ บุญชัย, พร้อมจิต ศรลัมพ์, นิโลบล พิมเสน, เพลินเนตร โลหะการ และอดิศักดิ์ หนูหน่าย. 2538. สารสกัดละลายน้ำต้านจุลชีพจากเปลือกผลทับทิม: การศึกษาความแรงต้านจุลชีพและความคงตัว. **วารสารเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล** 22(1): 1-7.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 215 น.

รุ่งรัตน์ วารีเขต. 2548. **การจัดจำแนกและการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคต้นแห้งตายของขนุนและจำปาดะ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วงศ์ บุญสืบสกุล, วนิดา ฐิตะฐานและณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2539. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชธรรมชาติต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง. **รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2539**. กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 151 น.

วงศ์ บุญสืบสกุล, วนิดา ฐิตะฐาน, ณัฏฐิมา บุญวัฒน์, สุทธิพงษ์ ญาณวารี และสุเนตรา ภาวิจิตร. 2538. การศึกษาผลของสารสกัดจากวัชพืชบางชนิดและพืชอื่นๆต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในห้องปฏิบัติการ. **รายงานการวิจัยกองโรคพืชและจุลชีววิทยา**. กลุ่มงานบักเตรีวิทยา. กรมวิชาการเกษตร. 138-140 น.

วงศ์ บุญสืบสกุล, สุทธิพงษ์ ญาณวารีและ สุเนตรา ภาวิจิตร. 2536. การศึกษาผลของสารสกัดจากพลูและพริกไทยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง. **รายงานการวิจัยกองโรคพืชและจุลชีววิทยา**. กลุ่มงานบักเตรีวิทยา.กรมวิชาการเกษตร. 128-135 น.

วัฒนิกร เทพโพธา. 2550**. การแยกความแตกต่างของเชื้อ *Erwinia carotovora* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคเน่าเละของผัก กับสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคต้นแห้งตายของขนุนด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิคเอเอฟแอลพี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วาทินี จตุรพรชัย. 2546. **การสกัดและการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ. 2551. **ลักษณะและการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ควบคุมเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของกะหล่ำดอก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วันดี กฤษณพันธุ์. 2536. **เภสัจวินิจฉัยยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1**. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ. 171 น.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. **โรคผักและการป้องกันกำจัด.** ภาควิชาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 198 น.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2545. **โรคของผักและการควบคุมโรค.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 183 น.

_____. 2546. การจัดการดินโดยใช้น้ำสกัดหยาบและกากของพืชเพื่อลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* sub sp.*carotovora* สาเหตุโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลี. **ว.กำแพงแสน**(1)1: 10-18

_____. 2547. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Erwinia carotovora* subap. *carotovora* เชื้อสาเหตุโรคเน่าเละของผัก. **วิทยาสารกำแพงแสน** 2: 72-81.

สิริพร สธนเสาวภาคย์, พรทิพย์ เจริญธรรมวัฒน์, มาลัย บุญรัตนกรกิจ และปทุมพร ฉิมเอนก. 2539. ผลของเครื่องเทศและสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร. **รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการวิจัยรหัส ท-อ** 6.39.

สุจินต์ ตันติพิสิฐกุล และ มาลี พรทวีทรัพย์. 2533. ประสิทธิภาพของสมุนไพรบางชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย. **รายงานการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ**. 20 น.

สุพจน์ ศุภนันธร. 2548. **การสกัดและการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อารีย์ วงศ์เราประเสริฐ. 2546. **ฤทธิ์ต้านจุลลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชวงศ์ Commelinaceae ที่มีผลต่อแบคทีเรียบางชนิด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

อุไรวรรณ ตวงสิน. 2544. **การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการควบคุมโรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของมะเขือเทศ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Alzoreky, N.S. and K. Nakahara. 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia**. Int. J. Food Microb**. 80: 223-230.

Apisariyakul A., N. Vanittanakom, and D. Buddhasukh. 1995. Antifungal activity of tumeric oil extracted from *Curcuma long* (Zingiberaceae). **Ethnopharmaco**l. Dec 49: 163-169

Chattopadhyay, D, K. Maiti, A.P. Kundu, M.S. Charkraborty, R. Bhadra, S. C. Mandal and A. B. Mandal. 2001. Antimicrobial activity of *Ralstonia macrophylla*: a folklore of bay islands. **J. Ethanopharmac**. 77: 49-55.

Cynthia J. M. Kane, Jay H. Menna and Yun-Chi Yen. 1988. Methyl Gallate, Methyl-3,4,5-trihydroxy-benzoate, is a Potent and Highly Specific Inhibitor of Herpes Simplex Virus *in vitro*.I. Purification and Characterization of Methyl Gallate From *Sapium Sebiferum*. **Bioscience Report**. Vol. 8, No. 1, 1998

Duffy, F.C. and R.F. Power. 2001. Antioxidant and antimicrobial properties of Some Chinese plant extracts**. Int.J. Antimicrobial Agents**. 17: 527-529

Elgayyar, M., F.A. Draughon, D.A. Golden and J.R. Mount. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **J. Food Protection**. 64(7): 1019-1024.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Harborne, J.B. 1984. **Phytochemical Methods.** Chapman and Hall, New York. 287 p.

Hitoko H., S. Morozumi, T.Wauke, S. Sakai and H. Kurate. 1980. Inhibitory effects of species on growth and toxin production of toxigenic fungi. **Appl. Environ. Microbiol**. 39 : 818-822.

Holt,J. G., N.R. Krieg, P. H. A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. **Bergey'sManual of Determinative Bacteriology, 9th ed**. The Williams and Wilkins Co.,Baltimore.

Houghton, P. J. and A. Raman. 1998. **Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts.** Chapman and Hall, London. 199 p.

Jang-Gi Choi, Ok-Hwa Kang , Young-Seob Lee , You-Chang Oh, Hee-Sung Chae , Hye-Jin Jang, Dong-Won Shin and Dong-Yeul Kwon. 2009. Antibacterial Activity of Methyl Gallate Isolated from Galla Rhois or Carvacrol Combined with Nalidixic Acid Against Nalidixic Acid Resistant Bacteria. ***Molecules*** , *14*(5), 1773-1780

K.-T. Chung, Z.Lu and M.w. Chou. 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, 36(12), 1053-1060

Malekzadeh, F., H. Ehsanifar, M. Shahamat, M. Levin and R. R. Colwell. 2001. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) Against *Helicobacter pylori.* **International Journal of Antimicrobial Agents** 18 (1): 85-88.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nakamura, C.V., T.U. Nakamura, E. Bendo, A.F. Melo, D.A. Cortez and B.P. Filho. 1999. Antibacteria activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.** 94 (5): 675-678.

Pruthi, J.S. 1980. **Spices and condiments : Chemistry, Microbiology, Technology.** Academic Press, New York. 449 p.

Schaad N.W., J.B.Jones,and W. Chun. 2001. **Laboratory Guide for identification of plant Pathologenic Bacteria.3rd** ed. APS Press, St.Paul, Minnesota. 245 p.

Scott, R.P.W. 1995. **Techniques and Practice of Chromatography.** Marcel Dekker, Inc.,New York. 395 p.

Sinlapasuwan, S. 1981. Studies of effects of some medicinal plant on growth of some bacteria in the family Enterobacteriaceae. **J. Sci. Fac. CMU. Spec**. Issue. 4: 61-62

Watt, E. and J. C. Pretorius. 2001. Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. **J. Ethnopharmac**. 76: 87-91.

Yff, B.T.S., K.L. Lindsey, M.B. Taylor, D.G. Erasmus and A.K. Jager. 2002. The pharmacological screening of *Pentanisia prunelloides* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid. **J. Ethanopharmac**. 79: 101-107.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมอพิเภก

ชื่อไทย (Thai Name) : สมอพิเภก

ชื่ออื่น (Native Name) : ลัน (ชื่อเรียกทาง จ.เชียงราย)
สมอแหน (ชื่อเรียกทางภาคกลาง)
แหน แหนขาว แหนตัน (ชื่อเรียกทางภาคเหนือ)
สะกู้(ชื่อเรียกทาง จ.แม่ฮ่องสอน)
ชิบะดู่ (ชื่อเรียกทาง จ.เชียงใหม่)

จัดอยู่ใน Family COMBRETACEAE Genus Terminalia Species *Terminalia bellirica* ลักษณะ ไม้ต้น แตกกิ่งแบบเจริญด้านข้าง (sympodial) ใบออกเป็นกระจุก ไม่มีกลีบดอก พบในเขตร้อนทั่วไป พบในป่าดิบที่ต่ำ (ก่องกานดา, 2548)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาววัชรา สุวรรณ์อาศน์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	12 เมษายน 2527
สถานที่เกิด	จังหวัดชัยนาท
ประวัติการศึกษา	วท.บ(เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิชาการส่งเสริมการเกษตรปฏิบัติการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	รางวัลชมเชย สาขาพืช งานประชุมวิชาการครั้งที่ 48 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก ภาควิชาโรคพืช ปี 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์