



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช	โรคพืช
สาขา	ภาควิชา
เรื่อง	การควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียว ที่เกิดจากเชื้อรา <i>Penicillium digitatum</i> Sacc. บนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชัน (Turmeric; <i>Curcuma longa</i> Linn.)
	Control of Green Mold Rot on Citrus Fruits cv. Sai-Numphaung Caused by <i>Penicillium digitatum</i> Sacc., With Crude Extracts of Turmeric (<i>Curcuma longa</i> Linn.)
นางผู้วิจัย	นางสาวศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ์
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	(รองศาสตราจารย์สมศิริ แสงโชติ, Ph.D.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(อาจารย์เนตรนภิส เขียวขำ, Dr.rer.nat)
หัวหน้าภาควิชา	(รองศาสตราจารย์สมศิริ แสงโชติ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.

สืบสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียว ที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* Sacc. บนผลส้มพันธุ์
สายน้ำผึ้ง ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชัน (Turmeric; *Curcuma longa* Linn.)

Control of Green Mold Rot on Citrus Fruits cv. Sai-Numphaung Caused by *Penicillium digitatum*
Sacc., With Crude Extracts of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.)

โดย

นางสาวศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

พ.ศ. 2553

ศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ์ 2553: การควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียว ที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* Sacc. บนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชัน (Turmeric; *Curcuma longa* Linn.) ปรินญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สมศิริ แสงโชติ, Ph.D. 133 หน้า

ขมิ้นชันผงที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และ เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดขมิ้นชันผงที่สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* คือ 6250 97.7 1562.5 และ 12500 ppm ตามลำดับ ค่า ED_{50} คือ 52.53 51.14 52.03 และ 51.23 ppm ตามลำดับ และค่า ED_{90} คือ 92.53 91.14 92.03 และ 91.23 ppm ตามลำดับ

สารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm สามารถลดการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวบนส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ โดยพบการเกิดโรค 25% เมื่อนำสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm สามารถควบคุมความรุนแรงของโรคได้อย่างสมบูรณ์ ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในสารสกัดขมิ้นชันผง ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm สามารถยับยั้งและชะลอการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ 4 วัน และช่วยยืดอายุในการเก็บรักษาผลผลิตส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้นานกว่าผลส้มที่จุ่มน้ำ โดยในวันที่ 6 พบว่า ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งมีความแน่นเนื้อ 0.76 g/mm² และมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 13 °Brix ในขณะที่ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่ไม่ได้จุ่มสารสกัดมีความแน่นเนื้อ 0.42 g/mm² และมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 15.7 °Brix

การเก็บรักษาสารสกัดขมิ้นชันผงไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 13 เดือน อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 เดือน สามารถคงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ได้ นอกจากนี้สารสกัดจากขมิ้นชันผง มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยมีค่า antioxidant activity คือ 54.83% และ IC_{50} คือ 77.89 µg/mL นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดของคน โดยมีค่ายับยั้งเซลล์มะเร็ง คือ 95.71% และ IC_{50} คือ 2.97 µg/mL จากการวิเคราะห์หาชนิดของสารออกฤทธิ์หลักของสารสกัดขมิ้นชันผง ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium digitatum* โดยใช้เครื่อง HPLC และ GC-MS สารออกฤทธิ์เป็นสาร ar – turmerone และคาดว่าเป็นสาร demethoxycurcumin, terpenoids และ sesquiterpene ซึ่งจัดว่าเป็นสารออกฤทธิ์หลักที่พบในขมิ้นชัน

Sasivimol Laksanaphisut 2010: Control of Green Mold Rot on Citrus Fruits cv. Sai-Numphaung
Caused by *Penicillium digitatum* Sacc., With Crude Extracts of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.).
Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology.
Thesis Advisor: Associate Professor Somsiri Sangchote, Ph.D. 133 pages.

Crude extracts of turmeric powder obtained from four extract solvents including metanol, ethanol, hexane and methanol:ethanol:hexane at 1:1:1 (v/v/v) showed the minimum inhibitory concentration (MIC) at 6250, 97.7, 1562.5 and 12500 ppm respectively. ED_{50} was 52.53, 51.14, 52.03 and 51.23 ppm respectively. ED_{90} was 92.53, 91.14, 92.03 and 91.23 ppm respectively.

Crude extracts of turmeric powder in 20% ethanol at 30000 ppm showed disease incidence of green mold rot on treated citrus fruits by 25%. The combination of crude extract of turmeric powder in 20% ethanol at 30000 ppm with the fungicide imazalil at 250 ppm was completely control. These treatments were delayed disease development for 4 days. These were examined for fruit firmness and total soluble solids after storage for 6 days. It showed that firmness of treated citrus fruits was 0.76 g/mm^2 and total soluble solids at 13 °Brix whereas untreated citrus fruits were 0.42 g/mm^2 and 15.7 °Brix respectively.

Crude extracts of turmeric powder stored at -20 °C for 13 months, at 4 °C and 25 °C for 4 months still showed a good growth inhibition of *P. digitatum*. Furthermore, these crude extracts of turmeric were showed 54.83% antioxidant activity, $IC_{50} = 77.89 \text{ } \mu\text{g/mL}$ and 95.71% anticancer activity of lung human, $IC_{50} = 2.97 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

The crude extract and fractions of turmeric powder were analyzed by HPLC and GC-MS. The major antifungal compounds of turmeric were *ar* – turmerone, cf. demethoxycurcumin, terpenoids and sesquiterpene.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมศิริ แสงโชติ ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิชาเอก ดร.เนตรนภิส เขียวขำ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอกและรองศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา
วัชรโรทัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประพัฒน์ ลักษณะพิสุทธิ์ และคุณวีระณีย์ ทองศรี ที่
ให้คำแนะนำและเป็นที่ปรึกษาการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด รวมถึง Mag. Johann Schinnerl จาก
Department of systemic and evolutionary botany, University of Vienna ประเทศออสเตรีย ที่ทำ
การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางเคมีและให้คำปรึกษาแนะนำ และ Ms. Tuyagerel Batmunkh จาก
Natural product and polymer materials laboratory, Inje University สาธารณรัฐเกาหลีใต้ ที่ให้
คำแนะนำในการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง ตลอดจนพี่ๆ น้องๆ และ
เพื่อนๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ เป็นกำลังใจทั้งกายและใจ ในการทำวิทยานิพนธ์
จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และน้องสาว ที่สนับสนุนและเป็นกำลังใจมาโดย
ตลอดจนวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ โครงการพัฒนานักศึกษาด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว
และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย
ในครั้งนี้

ศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ์

พฤษภาคม 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(9)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	35
ผลและวิจารณ์	53
ผล	53
วิจารณ์	96
สรุปและข้อเสนอแนะ	105
สรุป	105
ข้อเสนอแนะ	106
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	107
ภาคผนวก	119
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	120
ภาคผนวก ข ตารางแสดงผลความแปรปรวนทางสถิติ	123
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	133

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 อัตราส่วนต่างๆ ของสารละลายอินทรีย์ (organic solvents)	46
2 การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (%) ของเชื้อรา <i>P. digitatum</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน	54
3 การงอกของโคนิเดียเชื้อรา <i>P. digitatum</i> (%) บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมด้วยตัวทำละลายชนิดและความเข้มข้นต่างๆ กัน หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 21 ชั่วโมง	57
4 การยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา <i>P. digitatum</i> (%) บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง	59
5 ค่า MIC, ED ₅₀ และ ED ₉₀ ต่อยับยั้งของโคนิเดียของเชื้อรา <i>P. digitatum</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง	62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่

หน้า

- 6 จำนวนผลที่เป็นโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) 20% ที่ระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน 64
- 7 จำนวนผลที่เป็นโรคและความรุนแรงของโรคผลเน่าราสีเขียว (%) บนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน 66
- 8 จำนวนผลที่เป็นโรคและความรุนแรงของโรคผลเน่าราสีเขียว (%) บนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน 69
- 9 จำนวนผลที่เป็นโรคและความรุนแรงของโรคผลเน่าราสีเขียว (%) สายน้ำผึ้งด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 10000 และ 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 500 และ 750 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน 72
- 10 การพัฒนาขนาดแผลของโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน 75
- 11 จำนวนผลที่เป็นโรคและความรุนแรงของโรคผลเน่าราสีเขียว (%) บนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในน้ำและสารสกัดจากขมิ้นชันผง ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน 76

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า	
12	ค่าความแน่นเนื้อของผลส้มและปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS: total soluble solid) ของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในน้ำ และสารสกัดขมิ้นชัน ผง 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm หลังจากเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน	78
13	ประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงในการยับยั้งการเจริญ <i>C. herbarium</i> บน แผ่น TLC ที่ค่า $R_f = 0.89$ เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 เดือน	80
14	ประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>C. herbarium</i> บน TLC ที่ค่า $R_f = 0.89$ เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตั้งแต่เดือนที่ 9 ถึงเดือนที่ 13	80
15	ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ Bio-activity assay และค่า R_f ที่สามารถยับยั้งการเจริญ ของเชื้อรา <i>C. herbarium</i>	91
16	antioxidant activity (%) ที่ระดับความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ของ α -Tocopherol sample A sample B sample C sample D sample E sample F และ sample G	92
17	การยับยั้งเซลล์มะเร็งรังไข่ของหนู (%) ที่ระดับความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ของ sample A sample B sample C sample D sample E sample F และ sample G	94

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข1 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการงอกของโคนิเดียเชื้อรา <i>P. digitatum</i> (%) ต่อตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร PDA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 21 ชั่วโมง	124
ข2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการงอกของโคนิเดียเชื้อรา <i>P. digitatum</i> (%) ต่อสารสกัดขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร PDA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง	124
ข3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการงอกของโคนิเดียเชื้อรา <i>P. digitatum</i> (%) ต่อสารสกัดขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร PDA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง	125
ข4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการงอกของโคนิเดียเชื้อรา <i>P. digitatum</i> (%) ต่อสารสกัดขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายเฮกเซน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร PDA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง	125
ข5 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการงอกของโคนิเดียเชื้อรา <i>P. digitatum</i> (%) ต่อสารสกัดขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร PDA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง	126

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข6 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา <i>P. digitatum</i> (%) บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน	126
ข7 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของจำนวนผลที่เป็นโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซนอัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) 20% ความเข้มข้น 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน	127
ข8 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความรุนแรงของโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเฮกเซน:เอทานอล:เมทานอล อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) 20% ที่ระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน	127
ข9 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของจำนวนผลที่เป็นโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน	128
ข10 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความรุนแรงของโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน	128

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข11 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของจำนวนผลที่เป็นโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน	129
ข12 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความรุนแรงของโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน	129
ข13 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของจำนวนผลที่เป็นโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ระดับความเข้มข้น 10000 และ 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 500 และ 750 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน	130
ข14 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความรุนแรงของโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ระดับความเข้มข้น 10000 และ 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 500 และ 750 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน	130
ข15 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของ antioxidant activity (%) ของสารสกัดจากขมิ้นชันผง ที่ระดับความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ของ α-Tocopherol sample A sample B sample C sample D sample E sample F และ sample G	131

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข16 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดของคน (%) ของสารสกัดจากขมิ้นชันผง ที่ระดับความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ของ sample A sample B sample C sample D sample E sample F และ sample G	131
ข17 ระดับในการประเมินความรุนแรงโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง	132

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ส่วนต่างๆ ของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งตามขวางและตามยาว	10
2	โครงสร้างทางเคมีของสารเคมี imazalil	20
3	โครงสร้างโมเลกุลไคตินและไคโตแซน	24
4	โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีของสารในกลุ่ม volatile oil	30
5	โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีของ curcuminoids	30
6	เซลล์มะเร็งปอด A431 cell ที่ถูกเก็บไว้ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส	50
7	การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา <i>P. digitatum</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน	55
8	การยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา <i>P. digitatum</i> (%) บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง	60
9	การยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา <i>P. digitatum</i> (%) บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง	61
10	การเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ภายหลังจากทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลาย 20% ที่ระดับ 0 ppm สารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm และสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน	65

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- | | | |
|----|---|----|
| 11 | <p>การเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ภายหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสารสกัดจากขมิ้นชันสด และขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลาย เอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm, น้ำ, ชุดควบคุม (เอทานอล 20%) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน</p> | 67 |
| 12 | <p>การเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวบนส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ภายหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm, สารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) และไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ น้ำ, เอทานอล 20% และ 0.5% acetic acid หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน</p> | 70 |
| 13 | <p>การเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ภายหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm และ 30000 ppm, สารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm และสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm 500 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน</p> | 73 |
| 14 | <p>การเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ภายหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm ร่วมกับ imazalil 750 ppm และสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm, สารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับ 500 ppm และสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับ 750 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน</p> | 74 |

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	การขยายขนาดแผลของโรคผลเน่าราสีเขียวบนสั้มนพันธุ์สายน้าฝิ่ง หลังจากปลูกเชื้อรา <i>P. digitatum</i> แล้วจุ่มในน้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน	75
16	อาการโรคผลเน่าราสีเขียวของสั้มนพันธุ์สายน้าฝิ่ง หลังจากทำการปลูกเชื้อรา <i>P. digitatum</i> แล้วจุ่มในน้ำ และสารสกัดขมิ้นชันผง 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm โดยเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน	77
17	ลักษณะของผลสั้มนพันธุ์สายน้าฝิ่งหลังจากจุ่มในน้ำ (A) และสารสกัดขมิ้นชันผง 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน	78
18	ประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>C. herbarium</i> และ <i>P. digitatum</i> หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 13 เดือน, ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 เดือน	81
19	ความสามารถของสารสกัดขมิ้นชันผงเมื่อฉายภายใต้แสง UV 254 nm, 365 nm ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>C. herbarium</i> บนแผ่น TLC	82
20	ความสามารถของ fraction II ₂ ที่ค่า R _f = 0.89 เมื่อฉายภายใต้แสง UV 254 nm, 365 nm, ทดสอบ activity ของสารออกฤทธิ์โดยการพ่น anisaldehyde reagent ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>C. herbarium</i> และ <i>P. digitatum</i> บนแผ่น TLC	83
21	ความสามารถของ fractions VII ₁ , VII ₂ และ VIII ₁ ที่เป็นสารออกฤทธิ์ เมื่อฉายภายใต้แสง UV 365 nm, 254 nm และการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>C. herbarium</i> และ <i>P. digitatum</i> บนแผ่น TLC	84
22	UV spectra ของสารออกฤทธิ์ที่ทำการแยกได้จากตัวอย่าง sample B ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC คือ peak 1 และ peak	86

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	สารกลุ่ม curcuminoids คือ เส้นสีแดงและน้ำเงิน ที่พบในสารสกัดขมิ้นชันผง (crude extract) และเส้นสีแดงที่พบในสารออกฤทธิ์ คือ sample B เมื่อนำมาเทียบค่า UV spectra ที่ค่าการดูดกลืนแสง UV 400 nm โดยใช้เครื่อง HPLC	88
24	สารกลุ่ม curcuminoids ที่พบในสารสกัดขมิ้นชันผง (crude extract) sample B peak 1 และ peak 2 เป็นสารกลุ่ม terpenoids เมื่อนำมาเทียบค่า UV spectra ที่ค่าการดูดกลืนแสง UV 400 nm โดยใช้เครื่อง HPLC	89
25	สารออกฤทธิ์ที่พบในสารสกัดขมิ้นชันผง sample B ภายใต UV-DAD detection ที่ค่าการดูดกลืนแสง UV 400 และ 230 nm โดยใช้เครื่อง HPLC	90
26	antioxidant activity (%) ของ α -Tocopherol และ sample A ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	93
27	การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดของคน (%) ของ sample A ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	95

การควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียว ที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* Sacc. บนผลส้ม
พันธุ์สายน้ำผึ้ง ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชัน (Turmeric; *Curcuma longa* Linn.)

Control of Green Mold Rot on Citrus Fruits cv. Sai-Numphaung Caused by
Penicillium digitatum Sacc., With Crude Extracts of Turmeric
(*Curcuma longa* Linn.)

คำนำ

ส้มเป็นที่นิยมรับประทานทั้งสดและแปรรูปอย่างกว้างขวางทั่วโลก ซึ่งในประเทศไทยพบว่า มีการปลูกส้มได้ดีในทุกภาค โดยแหล่งปลูกส้มพันธุ์เขียวหวาน (*Citrus reticulata* Blanco.) ในภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดปทุมธานี สระบุรี นครนายก ทางภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดแพร่ เชียงใหม่ เชียงราย ทางภาคใต้ ได้แก่ สุราษฎร์ธานี และยะลา (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550)

ในปี พ.ศ. 2552 มีปริมาณผลผลิตส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง 2,182 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งมีแนวโน้มลดลงจากปี พ.ศ. 2550 และ 2551 ที่มีผลผลิตส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง 2,428 และ 2,360 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2552) ซึ่งสาเหตุส่วนหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งลดลงนั้นมาจากปัญหาโรคและแมลง ซึ่งโรคที่สำคัญของส้ม คือ โรคผลเน่าราสีเขียวมีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* Sacc. เป็นโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวที่พบได้ทั่วไปในหลายๆ ประเทศในแถบเอเชีย โดยเฉพาะในประเทศที่มีสภาพอากาศเย็นหรือในผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่มีการเก็บรักษาในห้องเย็น และพบได้ทั้งในแปลงปลูก ขั้นตอนการเก็บเกี่ยว การเก็บรักษา จนกระทั่งการวางจำหน่ายตามท้องตลาด (สรวงสรรค์, 2549) ดังนั้นในกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งจึงนิยมใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการควบคุมโรค ซึ่งทำให้เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้ผลิตและผู้บริโภค และนอกจากนี้ยังทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ดังนั้นจึงหาแนวทางในการนำสารสกัดจากธรรมชาติที่มนุษย์ใช้บริโภคในชีวิตประจำวันอยู่แล้วมาใช้ควบคุมโรคซึ่งค่อนข้างจะปลอดภัยและสลายตัวได้ง่ายจึงมีพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมต่ำ รวมทั้งหาได้ง่ายในท้องถิ่น

ขมิ้นชัน (turmeric) *Curcuma longa* Linn. โดยทั่วไปมักใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร เครื่องสำอาง และยารักษาโรค ซึ่งเป็นพืชที่หาได้ง่ายในแถบเอเชีย (Jayapakasha *et al.*, 2005) โดยเฉพาะทางภาคใต้ของประเทศไทยที่มีการปลูกและแปรรูปผลผลิตขมิ้นชันเป็นจำนวนมาก จาก

รายงานของ สุภัทรา และคณะ (2547) พบว่า สารสกัดขมิ้นชันทั้งในรูปสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Dothiorella* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Pythium aphanidermatum* ด้วยวิธี poisonous food technique นอกจากนี้มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืชได้ดี (Ortuño *et al.*, 2006)

ไคโตแซนเป็นอนุพันธ์ของไคติน ที่สกัดได้จากส่วนของเปลือกกุ้ง ปู หอยและเชื้อราบางชนิด ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต สามารถเข้ากันได้ดีกับธรรมชาติ (biocompetible) และย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (biodegradable) (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2006) เมื่อนำมาเคลือบผักและผลไม้จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลผลิตได้ (Meng *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด และมีคุณสมบัติเป็นสารชักนำความต้านทานโรคในพืช โดยชักนำให้เกิดเอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่จะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้หลายชนิด (Bautista-Baños *et al.*, 2006) นอกจากนี้การเคลือบผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งด้วยสารละลายไคโตแซน มีผลต่อการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* ของส้มหลังการเก็บเกี่ยวได้ (Liu *et al.*, 2007)

ทั้งนี้ในการใช้สารเคมีควบคุมโรคของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังการเก็บเกี่ยวอย่างต่อเนื่อง จะส่งผลทำให้เชื้อสาเหตุเกิดการต้านทานสารเคมีขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาแก่เกษตรกรอย่างมาก แต่ในสภาพปัจจุบันเกษตรกรยังคงจำเป็นที่จะต้องใช้สารเคมี ได้แก่ orthophenyl phenate, imazalil และ thiabendazole (Teixid'o *et al.*, 2001) ในการควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะ imazalil ที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายในประเทศไทย การใช้สารเคมีควบคุมโรคนั้นต้องกำหนดปริมาณของสารเคมีลงให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และไม่ตกค้างในผลผลิต ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาและหาวิธีการที่เหมาะสมในการควบคุมโรคของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งภายหลังการเก็บเกี่ยวที่ปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์ รวมถึงการลดปริมาณสารเคมีและค่าใช้จ่ายลง

ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ถึงการนำสารสกัดจากขมิ้นชันร่วมกับไคโตแซนและสารเคมีควบคุมโรค คือ imazalil ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium*

digitatum Sacc. เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งภายหลังการเก็บเกี่ยว ที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค เกษตรกรและสิ่งแวดล้อม



วัตถุประสงค์

1. ศึกษาหาตัวทำลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากขมิ้นชัน
2. ศึกษาชนิดของสารออกฤทธิ์และประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดขมิ้นชัน
3. ศึกษาหาความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง
4. ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันเมื่อนำมาใช้ร่วมกับ ไคโตแซน และ สารเคมีควบคุมเชื้อรา imazalil ในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

การตรวจเอกสาร

ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

ส้ม (*Citrus spp.*) เป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ถิ่นกำเนิดของส้มอยู่ในแถบทวีปเอเชีย บริเวณเขตอบอุ่นของไหล่เขาด้านตะวันตกของเทือกเขาหิมาลัย ปัจจุบันมีการปลูกส้มทั้งในแถบหนาวและแถบร้อนของซีกโลกเหนือและซีกโลกใต้ โดยมีแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ยุโรป แอฟริกาตอนใต้ ออสเตรเลีย อินเดีย และสาธารณรัฐประชาชนจีน สำหรับประเทศไทยมีการปลูกส้มเช่นกัน แหล่งปลูกส้มที่สำคัญจะแตกต่างกันตามชนิดของส้ม (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

ประเทศไทยพบว่าการปลูกส้มได้ดีทุกภาค โดยแหล่งปลูกทางภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดปทุมธานี สระบุรี นครนายก ทางภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดแพร่ เชียงใหม่ เชียงราย นอกจากนี้ ภาคใต้ ได้แก่ สุราษฎร์ธานี และยะลา (เอียน, 2536) แหล่งผลิตส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ กำแพงเพชร และสุโขทัย มีเนื้อที่เพาะปลูกทั้งหมด 61.14% จังหวัดเชียงราย และแพร่ มีเนื้อที่เพาะปลูกทั้งหมด 21.48% (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2552)

การบริโภคส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งภายในประเทศไทย มีร้อยละ 99 ของผลผลิตสดทั้งหมด คือ 494,156 ตัน การนำเข้าส่วนใหญ่มาจากสาธารณรัฐประชาชนจีน จากการเปิดเสรีทางการค้า ส่งผลกระทบต่อราคาส้มที่เกษตรกรได้รับ ในส่วนของปริมาณการส่งออกในรูปผลสดมีน้อย ส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์จำพวกน้ำส้มต่างๆ (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2552)

ในด้านการผลิต พบว่าในปี พ.ศ.2552 มีพื้นที่การผลิตผลส้มต่อไร่ ลดลงจากปี พ.ศ.2550 และ 2551 ทำให้ผลผลิตต่อไร่ (กิโลกรัม) ลดลงจาก 2,428 และ 2,360 กิโลกรัมต่อไร่ ในปี พ.ศ. 2550 และ 2551 ตามลำดับ เป็น 2,182 กิโลกรัมต่อไร่ ในปี พ.ศ.2552 โดยที่มีต้นทุนการผลิต (บาท/ตัน) สูงขึ้น มีผลทำให้ราคาที่เกษตรกรขายได้และผลตอบแทนสุทธิ (บาท/ตัน) เพิ่มสูงขึ้นด้วย (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2552)

ตลาดคู่ค้าที่สำคัญของประเทศไทยในการส่งออกส้มผลสด คือ พม่า ลาว จีน และ อินโดนีเซีย และมีตลาดคู่แข่งที่สำคัญ คือ จีน เวียดนาม และฟิลิปปินส์ (สำนักงานเศรษฐกิจ การเกษตร, 2552)

ส้มเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลก โดยมีผลผลิต 108 ล้านตันในปี ค.ศ. 2004 (Ballester *et al.*, 2006) โดยมูลค่าการส่งออกมาก ทั้งในรูปของผลสดและแปรรูป ได้แก่ น้ำส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งแช่แข็ง น้ำส้มและน้ำผลไม้จำพวกส้ม โดยประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดย พบว่าการส่งออกผลสดมากที่สุด โดยในปี พ.ศ. 2550 มีปริมาณการส่งออก 13,289 ตัน รวม มูลค่า 218 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) จากการรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจ การเกษตร เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ระบุว่าในปี พ.ศ. 2550 ราคาส้มพันธุ์เขียวหวานที่เกษตรกรขาย ได้โดยเฉลี่ยทั่วประเทศ 11.76 บาท/กิโลกรัม และมีแนวโน้มราคาสูงขึ้นในปี พ.ศ. 2551

ลักษณะโดยทั่วไปของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งจัดอยู่ในกลุ่มส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata* Blanco.) (บุรีณี, 2548) จัดอยู่ใน Family Rutaceae Subfamily Aurantiodeae มี 150 วงศ์ และ 1600 สกุล (Roy and Goldschmidt, 1996)

การจัดแบ่งกลุ่มของส้มตามหลักการทางพืชสวน

อาศัยหลักความสำคัญทางเศรษฐกิจ แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม (มงคล, 2528) ได้แก่

1. กลุ่มส้มแมนดาริน (mandarins group)

เป็นกลุ่มส้มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในเขตร้อน เป็นไม้ผลขนาดเล็ก ต้นสูงประมาณ 2.5-3 เมตร ทรงพุ่มมีลักษณะแน่นทึบ เริ่มให้ผลผลิตเมื่ออายุ 3 ปี และให้ผลผลิตไม่ ต่ำกว่า 15 ปี ตั้งแต่ระยะดอกบาน จะใช้เวลาประมาณ 8 เดือนจึงเก็บเกี่ยว (กรมวิชาการเกษตร, 2547) มีลักษณะใกล้เคียงกับกลุ่มออเรนซ์ ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งในกลุ่มแมนดารินได้แก่ ส้มจีน ส้มเขียวหวาน ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ส้มจุก ส้มแก้ว ส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็กไปถึงขนาดใหญ่ โดยมี

เส้นผ่าศูนย์กลางของผล 5-8 เซนติเมตร (มงคล, 2528) น้ำหนักของผลประมาณ 5-6 ผลต่อ 1 กิโลกรัม (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

2. กลุ่มส้มเกลี้ยงและส้มตรา (oranges group)

เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดในโลก มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย ทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดียทางแถบธิเบตไปจนถึงจีนและพม่า แบ่งเป็น 2 พวก คือ สวิทออเรนซ์ (sweet orange) ได้แก่ ส้มเกลี้ยงและส้มตรา (มงคล, 2528) ซึ่งเป็นไม้พุ่มขนาดกลาง ต้นสูงประมาณ 5-7 เมตร ทรงพุ่มค่อนข้างทึบ กิ่งก้านแข็งแรง มีหนามขนาดใหญ่ ผลแก่จะใช้เวลาประมาณ 7.5-8 เดือน (กรมวิชาการเกษตร, 2547) อีกกลุ่มคือกลุ่มชาวออเรนซ์ (sour orange)

3. กลุ่มส้มโอและเกร๊ฟฟรุต (pummelo and grapefruits group)

ลักษณะของส้มสองชนิดนี้มีความคล้ายคลึงกัน โดยเฉพาะลำต้นและทรงพุ่ม แตกต่างกันตรงที่ส้มโอมีลำต้นใหญ่และแข็งแรง แต่เกร๊ฟฟรุตจะมีทรงพุ่มเล็กกว่า (มงคล, 2528) ส้มในกลุ่มนี้เป็นไม้ผลพุ่มขนาดกลาง ต้นสูงประมาณ 3-7 เมตร นับจากดอกบานจนถึงผลแก่ใช้เวลาประมาณ 8 เดือน (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

4. กลุ่มที่ผลมีรสเปรี้ยว (common acid members group)

ได้แก่ ชิตรอน (*Citrus medica* L.) เลมอน (*Citrus limon* L. Burn f.) ไลม์ (lime) หรือมะนาวไทย (*Citrus aurantifolia* Swing.) และชนิดที่ผลคล้ายมะนาว ได้แก่ lemonimes และ limequats

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งจัดอยู่ในกลุ่มส้มแมนดาริน ลักษณะของรูปร่างทรงต้นสายน้ำผึ้ง คล้ายคลึงกับส้มเขียวหวานมาก แต่ลักษณะของทรงพุ่มนั้นส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งมีทรงพุ่มแน่นและชะลูดกว่าส้มเขียวหวาน (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

1. การเจริญเติบโต

สัมพันธุ์สาหร่ายน้ำจืดเป็นไม้พุ่มยืนต้น ชนิดไม่ผลัดใบ มีความสูงประมาณ 10 เมตร หรือมากกว่า ทุกส่วนของโครงสร้างประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่เป็นต่อมให้น้ำยาง (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

2. ราก

รากที่เจริญมาจากเมล็ด คือ รากแก้ว โดยปกติระบบรากสัมพันธุ์สาหร่ายน้ำจืดมีเชื้อไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) อาศัยร่วมในลักษณะพึ่งพากันและกัน (symbiosis) ระบบรากแขนงของสัมพันธุ์สาหร่ายน้ำจืดมี 2 ชนิด คือ รากที่มีขนาดใหญ่ (pioneer root) เมื่อแตกแขนงต่อเนื่องไปเรื่อยๆ จะกลายเป็นโครงสร้างหลักของระบบรากทั้งหมด ส่วนระบบรากฝอย (fibrous root) เกิดเป็นกระจุกบนรากแก้ว หรือรากแขนงขนาดใหญ่ รากสัมพันธุ์สาหร่ายน้ำจืดโดยทั่วไปอยู่ในระดับค่อนข้างตื้น โดยมีความลึกประมาณ 50 เซนติเมตรจากผิวดิน (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

3. ลำต้น

ลำต้นมีขนาดเล็กจนถึงขนาดกลาง ในส่วนของกิ่งและลำต้นในขณะที่ยังอ่อนอยู่จะมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม มีสันนูน เมื่อเจริญเต็มที่กิ่งจะเริ่มกลมมนและสีเปลือกจะเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาล (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

4. ใบ

ใบของสัมพันธุ์สาหร่ายน้ำจืดมีขนาดเล็ก ลักษณะของกิ่งและใบจะตั้งขึ้น (erect form) แผ่นใบของสัมพันธุ์สาหร่ายน้ำจืดมีสีเขียวเข้มกว่าสีเขียวหวานแต่ขนาดของใบเล็กกว่าเล็กน้อย (Ladaniya, 2008) ใบเป็นใบเดี่ยว (unifoliate) มีรูปร่างเฉพาะที่ผิวใบด้านใต้ใบเท่านั้น เนื้อเยื่อชั้นพาลิเสด (palisade) ของใบจะมีต่อมน้ำมัน ก้านใบมีลักษณะเป็นปีก (wing) ซึ่งอาจเล็กแคบ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบเหมือนกับโครงสร้างใบของพืชแบบ C-3 ทั่วไป (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

5. ดอก

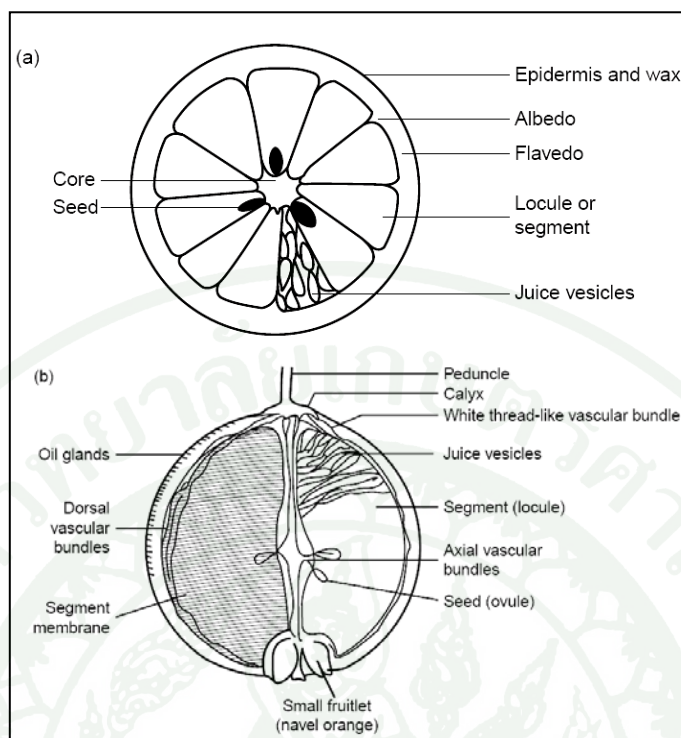
ดอกของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งมีกลิ่นหอม เกิดบริเวณส่วนปลายยอดอ่อนและมุมใบของกิ่งใหม่ ดอกมีจำนวน 2-5 ดอกต่อ 1 ช่อ เป็นดอกสมบูรณ์เพศ เส้นผ่านศูนย์กลางของดอกประมาณ 2.4-4 เซนติเมตร แต่ละดอกประกอบด้วย กลีบเลี้ยง กลีบดอก เกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมีย ดอกที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วส่วนก้านดอกเชื่อมต่อกับกลีบเลี้ยง ซึ่งกลีบเลี้ยงจะคงติดอยู่จนกระทั่งผลแก่ และมักพบต่อมน้ำมันปรากฏอยู่บนกลีบดอก (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

6. ผล

ผลจัดเป็นแบบเบอร์รี่ (berry) เรียกว่า hesperidium (Ladaniya, 2008) เจริญมาจากส่วนของรังไข่โดยตรง มี 10 กลีบ กลีบเชื่อมติดกันเป็นวงกลมล้อมรอบแกนกลาง (กรมวิชาการเกษตร, 2547) ลักษณะทรงผลกลมแป้น ขนาดปานกลาง โดยมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางผล 5-8 เซนติเมตร ผลจะมีความสูงน้อยกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางผล ด้านปลายผลราบหรือเว้าเป็นแอ่งตื้น ฐานผลส่วนใหญ่มน บางสายพันธุ์มีลูกขนาดเล็กและเตี้ย ผิวผลเรียบ มีต่อมน้ำมัน (oil gland) เกิดที่บนผิวผล (มณฑล, 2528) มีจำนวนเมล็ด 3-7 เมล็ด หรือมากกว่า (Ladaniya, 2008)

ส่วนของเปลือกผล แบ่งได้ 3 ชั้น (ภาพที่ 1) ได้แก่

- ชั้นนอกสุด (exocarp: flavedo) มีต่อมน้ำมันจำนวนมาก ขณะที่เป้นผลอ่อนมีสีเขียว แต่เมื่อผลสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม
- ชั้นกลาง (mesocarp: albedo) มีสีขาว เปลือกชั้นกลางบางมาก
- ชั้นในสุด (endocarp: rag) ลักษณะเป็นเยื่อโปร่งใสหุ้มรอบช่องของรังไข่ หรือกลีบของผลส้มผนังด้านในของชั้นนี้จะแบ่งเซลล์และขยายตัวออกกลายเป็นตัวกึ่ง (juice sac) เป็นส่วนที่เก็บสะสมน้ำ น้ำตาล และสารต่างๆ (กรมวิชาการเกษตร, 2547)



ภาพที่ 1 ส่วนต่างๆของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งตัดตามขวาง (a)
และผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งตัดตามยาว (b)

ที่มา: Ladaniya (2008)

ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่แก่จัดจะมีผิวสีเขียวอมเหลือง แต่หากปลูกในเขตอากาศเย็น มีผิวผลสีเขียวเข้ม สีของผลส้มนั้นขึ้นอยู่กับทั้งธรรมชาติและความต้องการของผู้บริโภค ซึ่งส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่ปลูกในเขตร้อนสียังคงเขียวอยู่เมื่อผลแก่ แต่ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งในเขตกึ่งร้อน สีเขียวจะหายไปทำให้ปรากฏสีเขียวเข้ม (จริงแท้, 2550) เปลือกบางและอ่อน ปอกออกได้ง่าย ผลไม่ค่อยพุ่ม ผนังกลีบบางมีรกลน้อย ชันนึ่ม ถู้น้ำหวาน มีขนาดเล็กและสั้น ฉ่ำน้ำ เนื้อผลมีสีส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง รสชาติหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย (มงคล, 2528; บุญนิ, 2548)

ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งจัดเป็นผลไม้ที่มีการหายใจแบบ non climacteric fruit คือ ในระหว่างการสุกอัตราการหายใจมีการเปลี่ยนแปลงและเพิ่มขึ้น ไม่มาก และพบว่าอัตราการหายใจของผลที่เก็บจากต้นแม่จะลดลงอย่างช้าๆ และมีการผลิตเอทิลีนต่ำ (สมบุญ, 2548) แต่เมื่อผลสุกการหายใจกลับสูงขึ้นจนถึงจุดสูงสุดแล้วจึงลดลง (จริงแท้, 2550)

การเก็บเกี่ยวผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

เนื่องจากส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งเป็นผลผลิตที่มีลักษณะเป็น non climacteric fruits จึงต้องรอให้ผลแก่เต็มที่ซึ่งจะเก็บเกี่ยวได้ ความหวานและสีผิวมีโอกาสบ่มให้ดีขึ้นเล็กน้อยหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากยังมีอัตราการหายใจอยู่บ้างแต่จะค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ การเปลี่ยนแปลงของสารอาหารและสารประกอบต่างๆ ในผลมีน้อย ความหวานจึงมีเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เมื่อเวลาผ่านพ้น “ระยะทิ้งให้ลืมนั่น” (วินศ, 2549)

การเก็บรักษา

สารเคลือบผิวช่วยลดอัตราการหายใจและการระเหยน้ำให้น้อยลง ทำให้ผิวส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งไม่เหี่ยวแห้ง เป็นมันวาว สารเคลือบผิวที่ใช้มีหลายชนิด เช่น shellac resin และ wax สัตว์เคระห์จำพวก polyethylene wax วิธีการเคลือบอาจใช้การฉีดพ่น หรือเคลือบผิวด้วยแปรงช่วยให้แว็กซ์กระจายตัว โดยมากมักใช้ผสมในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยง่ายเพื่อช่วยให้แห้งเร็ว (วินศ, 2549)

โรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

จากการรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2550 กล่าวถึงในด้านการผลิตส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งมีแนวโน้มลดลง ได้แก่ เนื้อที่ให้ผลผลิต (ไร่) ผลผลิตต่อไร่ (กิโลกรัม) และราคาที่เกษตรกรขายได้ (บาท/ตัน) ทั้งนี้พบว่า สาเหตุส่วนหนึ่งนั้นเกิดจากการแพร่ระบาดของโรคและแมลง ซึ่งความสูญเสียของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังการเก็บเกี่ยว เกิดจากโรคที่เกิดจากเชื้อรา ได้แก่ เชื้อรา *Geotrichum candidum* ก่อให้เกิดอาการเน่า (soft rot) เชื้อรา *Diplodia* และ *Diaporthe* spp. ก่อให้เกิดอาการขั้วผลเน่า (stem end rot) เชื้อรา *Rhizopus* spp. ก่อให้เกิดอาการ transit rot และ เชื้อรา *Penicillium digitatum*, *P. italicum* ที่ก่อให้เกิดโรคราสีเขียวและราสีฟ้า (green and blue mold) ตามลำดับ (Mukhopadhyay, 2004)

โรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง เป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจมากที่สุดโรคหนึ่ง พบได้ในหลายประเทศ ได้แก่ สเปน สหรัฐอเมริกา คือ แคลิฟอร์เนีย และเขตพื้นที่ปลูกส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งในแถบร้อนชื้น (Usall *et al.*, 2008) รวมถึงใน

ประเทศไทย ซึ่งโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (green mold rot) มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* Sacc. (Ortuño *et al.*, 2006) ที่ก่อให้เกิดความเสียหายหลังการเก็บเกี่ยวอย่างมากต่อพืชตระกูลส้ม เชื้อราชนิดนี้จะเข้าทำลายทางบาดแผลได้ ทั้งในแปลงปลูก โรงบรรจุหีบห่อ โรงเก็บรักษา และระหว่างการขนส่ง จนกระทั่งตามท้องตลาด (Whitedside *et al.*, 1989; Ballester *et al.*, 2006; Leelasuphakul *et al.*, 2008)

ลักษณะของอาการ

ลักษณะอาการเริ่มแรกบนผิวผลส้มจะนูนบริเวณจุดที่เชื้อเข้าทำลาย หลังจากนั้นจะมีการเจริญของเส้นใยสีขาวบนผลส้ม (Ploetz, 2003; Whitedside *et al.*, 1989) โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตร แล้วจะสร้างโคนิเดียสีเขียวมะกอก (green olive) ซึ่งจะสร้างบนเส้นใย โดยโคนิเดียสามารถแพร่กระจายได้ง่ายโดยทางลม ในสภาพที่มีความชื้นต่ำ ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งจะมีลักษณะผิวเหี่ยวแห้งและแข็ง (dry mummy) แต่ในสภาพความชื้นสูง มักพบการปนเปื้อนแบคทีเรีย และเชื้อราชนิดอื่น ทำให้ผลเน่าและเน่าในที่สุด (Whitedside *et al.*, 1989)

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Penicillium digitatum* Sacc.

เชื้อรา *Penicillium digitatum* Sacc. มี conidiophores ขนาด 30-100 x 4-5 μm ผนังเรียบ matulae ขนาด 15-30 x 4-6 μm phialides ขนาด 15-29 x 3.5 μm โคนิเดียผิวเรียบ ค่อนข้างกลม ไปจนถึงทรงกระบอก แต่ส่วนใหญ่จะเป็นทรงรี (Ploetz, 2003) โคนิเดียมีขนาด 4-7 x 6-8 μm และสร้างโคนิเดียต่อกันเป็นลูกโซ่ (บุรณิ, 2548) การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (artificial media) มีลักษณะเหมือนกับที่ปรากฏบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (Whitedside *et al.*, 1989) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร czapak agar โคโลนีจะบางและเจริญได้น้อย แต่บนอาหาร malt extract agar จะเจริญได้อย่างรวดเร็ว โคโลนีมีลักษณะฟู และมีสีเหลืองเขียว จนถึงสีเขียวมะกอก (Ploetz, 2003)

การจัดหมวดหมู่ (Classification) ของเชื้อรา *Penicillium digitatum* Sacc.

Division	Eumycota
Class	Hyphomycetes
Order	Moniliales
Family	Moniliaceae
Genus	<i>Penicillium</i>

ที่มา: Pitt (1979)

การเข้าทำลายของเชื้อรา

Mukhopadhyay (2004) กล่าวว่า เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ระหว่างการเก็บรักษาและตามท้องตลาดที่ก่อให้เกิดอาการเน่า (rot) มี 15 สปีชีส์ โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อราในสปีชีส์ *Penicillium* และ *Alternaria* โดยสามารถเข้าทำลายผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือนได้ การเข้าทำลายของเชื้อรา *P. digitatum* จะเข้าทำลายผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งทางบาดแผลในระหว่างการเก็บเกี่ยวจนกระทั่งการเก็บรักษาหรือการวางขายตามท้องตลาด (Leelasuphakul *et al.*, 2008)

การแพร่กระจายของเชื้อรานี้สามารถสร้างโคนิเดียที่สามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถพบโคนิเดียของเชื้อได้ที่ทั้งบนผิวของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังเก็บเกี่ยว ในแปลง ในโรงเก็บ ในระบบการขนส่งทุกขั้นตอนตั้งแต่ในรถขนส่งจนกระทั่งในตลาดที่ทำการซื้อขายส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง เนื่องจากภายในผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งมีค่า pH ต่ำ ความชื้นสูง และมีสารอาหารปริมาณมาก จึงทำให้อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคได้ง่าย ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเน่าเสีย การผลิตสารพิษและไม่สามารถวางจำหน่ายได้ (Chien *et al.*, 2007)

เชื้อรา *P. digitatum* เข้าสู่ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งทางบาดแผล ซึ่งเอนไซม์ exopolysaccharuronase (exo-PG) จากเชื้อรา และเอนไซม์ pectinmethylesterase (PME) ที่มีในผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งจะทำงานร่วมกันเพื่อทำหน้าที่ย่อยสลายเพคตินในชั้น middle lamella และสร้าง galacturonic acid ขึ้น บริเวณที่เนื้อเยื่อส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งถูกเชื้อราทำลายมีปริมาณ galacturonic acid ปริมาณ 12 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักผลสด ขณะที่ปริมาณ galacturonic acid ในเนื้อเยื่อปกติมี 5

มิลลิกรัมต่อน้ำหนักผลสด ซึ่ง galacturonic acid มีผลต่อการยุบตัวของไซโตพลาสซึมและการบวมของผนังเซลล์ทำให้เกิดอาการจุดฉ่ำน้ำบนผลแล้วขยายขนาดขึ้น ต่อมาเชื้อราจะสร้างกลุ่มของเส้นใยสีขาวเจริญปกคลุมผล และสร้างโคนิเดียสีเขียวจำนวนมากที่ฟุ้งกระจายได้ง่ายทำให้เป็นแหล่งของเชื้ออื่นๆ เข้าทำลายผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งต่อไป ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเข้าทำลายผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งทั้งผลได้ภายใน 2-3 วันเท่านั้น (บุรณิ, 2548)

สารระเหย (volatiles) จากเปลือกส้ม ที่มีผลต่อการงอกและการยืดตัวของ germ tube ของเชื้อรา *P. digitatum* และ *P. italicum* ได้จากการศึกษาของ Droby *et al.*, (2008) พบว่า สารระเหยจากเปลือกผลเกรฟฟรุ้ตมีผลกระตุ้นทำให้โคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* และ *P. italicum* งอกได้ 75.1% และ 37.5% ตามลำดับ และเมื่อทำการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ดังกล่าวพบว่าสารประกอบหลักของสารออกฤทธิ์นี้คือ limonene นอกจากนี้ acetaldehyde, ethanol และคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลในการกระตุ้นการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* และนอกจากนี้ Stange *et al.*, (2002) พบว่า สาร nootkatone ที่สกัดจากเปลือกผลเกรฟฟรุ้ต โดยใช้เอทานอล 80% เป็นตัวทำละลาย สามารถกระตุ้นการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* และ *P. italicum* ได้เช่นกัน

วงจรโรคและการแพร่ระบาด

เชื้อรา *Penicillium digitatum* Sacc. มีวงจรชีวิตสั้น โดยสามารถมีชีวิตครบชีวิจักรภายใน 3-5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Yahyazadeh *et al.*, 2007) เชื้อราสามารถดำรงชีพอยู่ได้ในแปลงปลูกได้ในลักษณะของโคนิเดีย (conidia) การเข้าทำลายเริ่มแรกนั้นจะเข้าทำลายทางบาดแผล และนอกจากนี้เชื้อรา *P. digitatum* ยังสามารถเข้าทำลายได้ทางบาดแผลที่เกิดจากความเสียหายทางสรีระของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้เช่นกัน เช่น อาการ chilling injury, oleocellosis และขั้วผลเน่า (Whitedside *et al.*, 1989) นอกจากนี้ต่อมน้ำมัน (oil gland) ยังมีผลต่อการชักนำและกระตุ้นการเข้าทำลายของเชื้อ เชื้อราเข้าทำลายผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 22-27 องศาเซลเซียส (Ploetz, 2003) และที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียสนั้นมีการพัฒนาของโรคอย่างรวดเร็ว และมีการเจริญช้าลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียสและต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส โดยส่วนใหญ่ อุณหภูมิที่สามารถยับยั้งการพัฒนาของโรคได้ คือ อุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส (Whitedside *et al.*, 1989)

การควบคุมโรค

เชื้อรา *Penicillium digitatum* Sacc. จะเจริญได้ดีในอุณหภูมิต่ำประมาณ 24 องศาเซลเซียส ในอุณหภูมิที่สูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเจริญเติบโตช้าลง (Chang and Jan, 2003) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งในระหว่างการเก็บรักษา บุรณิ (2548) ได้รายงานไว้ว่า เชื้อราสาเหตุโรคน้ำราสีเขียวที่สามารถเข้าทำลายผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังการเก็บเกี่ยวในช่วงการล้างทำความสะอาดผลในโรคบรรจุหีบห่อ ในการควบคุมโรคจึงมีการนำสารเคมีสังเคราะห์กำจัดเชื้อรา (fungicides) มาใช้ในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลส้ม (Cănamás *et al.*, 2008)

การควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียว สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีทางกายภาพ วิธีการใช้ชีววิธี การใช้สารเคมีและการใช้หลายวิธีร่วมกัน

1. การควบคุมโรคโดยวิธีทางกายภาพ

วิธีทางกายภาพโดยการใช้อุณหภูมิสูง ได้แก่ น้ำร้อนและความร้อน การฉายรังสี ควบคุมกับการคัดแปลงและควบคุมสภาพบรรยากาศของโรงเก็บ เป็นการกระตุ้นสารยับยั้งเชื้อรา (antifungal compounds) เช่น lignin, lignin-like materials และ สารประกอบ phenolic ที่มีอยู่ในพืช และนอกจากนี้ยังมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้โดยตรง (Plaza *et al.*, 2003)

1.1 การใช้อุณหภูมิสูง ได้แก่ การจุ่มผลส้มกัมควอท (kumquat) ก่อนการเก็บรักษา ในน้ำที่อุณหภูมิ 53 หรือ 56 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที สามารถลดความเสียหายที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* และ *P. italicum* แต่หากใช้อุณหภูมิสูงกว่านี้จะมีผลทำให้ความเสียหายของผลส้มกัมควอทเพิ่มมากขึ้น (Mukhopadhyay, 2004)

การใช้ความร้อน เมื่อทำการเก็บรักษาผลส้มหลังที่เก็บเกี่ยวแล้วไม่เกิน 48 ชั่วโมง ใว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 98% เป็นระยะเวลา 70 ชั่วโมง สามารถลดความเสียหายที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium* ได้ (Mukhopadhyay, 2004)

การสมานบาดแผล (curing) ผลส้มพันธุ์ *Citrus sinensis* cv. Navelina และ

salustiana ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส นาน 65 ชั่วโมง แล้วเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน สามารถยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มได้ และโดยสามารถเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไว้ได้นาน 2 เดือน และไม่มีผลต่อคุณภาพของผลส้ม (Plaza *et al.*, 2003)

1.2 การฉายรังสี ได้แก่ รังสีแกมมา เพื่อใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาและควบคุมโรคของผักและผลไม้ คือ ค่ารังสีขนาด 200-300 Krad ซึ่งได้ถูกนำมาใช้กับผลไม้หลายชนิด (บุรณิ, 2548) นอกจากนี้ยังพบว่า รังสี UV ยังส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณของสารประกอบ scoparone และ scopoletin ที่มีอยู่ในผลส้มซึ่งสารประกอบดังกล่าวเป็นสารในกลุ่ม phenolic compounds ที่มาจากกระบวนการสังเคราะห์ phenylpropanoid metabolism ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราและกระตุ้นความต้านทานในส้ม นอกจากนี้รังสี UV ยังมีผลต่อเชื้อรา *P. digitatum* โดยตรงอีกด้วย (Ballester *et al.*, 2006) รังสี UV-C (254 nm) มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* ได้มากกว่า 45% โดยพบว่า ผลส้มโอ (*Citrus aurantium*) ที่ถูกฉายด้วยรังสี UV-C (254 nm) จะมีปริมาณของสารในกลุ่ม flavonoids ได้แก่ tangeretin เพิ่มขึ้น 70% ซึ่งสารดังกล่าวเป็นพิษต่อเชื้อรา (fungi toxins) เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อรา (Arcas *et al.*, 2000)

2. การควบคุมโรคโดยชีววิธี

2.1 การนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (microbial antagonists) มาใช้ในการควบคุมโรค เพื่อใช้แทนการใช้สารเคมี เชื้อจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคของส้ม ได้แก่ *Pichia guilliermondii*, *Pantoea agglomerans* (Teixid'o *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2007), *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus subtilis*, *Pichia anomala*, *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora guilliermondii* (Janisiewicz and Korsten., 2002) และ *Trichoderma viridae* (Diaz *et al.*, 1990) ปัจจุบันได้มีการผลิตยีสต์ 1 ชนิดและแบคทีเรีย 2 ชนิด ที่ถูกใช้เป็นการค้าในสหรัฐอเมริกา คือ *Candida oleophila* strain I-182 มีชื่อการค้า คือ Aspire TM ผลิตโดย Ecogen Inc. (Langhorne, PA) และ *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 และ ESC-11 686 มีชื่อการค้า คือ BIOSAVE-10TM และ BIOSAVE-11TM ผลิตโดย EcoScience Corp., (Orlando), FL เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของแอปเปิ้ล สาลี่และส้ม (Teixid'o *et al.*, 2001)

Leelasuphakul *et al.*, (2007) ได้ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และสาร metabolites ของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

P. digitatum พบว่า สารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีผลต่อการเจริญและการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* ที่มีค่า $EC_{50} = 77.26$ และ $86.10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ตามลำดับ และเมื่อนำมาควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้ม พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ปริมาณ $20 \mu\text{L}$ จำนวน 10^8 CFU mL^{-1} สามารถลดการเกิดโรคบนผลส้มได้ 86.7% และชะลอการเกิดโรคได้ 6 วัน และเมื่อนำสาร metabolites ของ *Bacillus subtilis* สามารถลดการเกิดโรคได้ 72.5% และชะลอการเกิดโรคได้ 5 วัน

Cañamás *et al.*, (2008) พบว่า แบคทีเรีย *Pantoea agglomerans* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มได้ มากกว่า 50% ทั้งในแปลงและในห้องปฏิบัติ

Meziane *et al.*, (2006) ได้นำ *Serratia plymuthica* 2 strains คือ strain IC1270 และ IC14 มาควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวและสีฟ้าของส้ม โดยพบว่าปริมาณเซลล์ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นปริมาณของเชื้อปฏิชีวนะที่สามารถควบคุมโรคดังกล่าวได้ โดย strain IC1270 มีบทบาทในการแย่งแย่งอาหารและ strain IC14 มีบทบาทในการเข้าทำลายเซลล์ของเชื้อรา *P. digitatum* และ *P. italicum*

Janisiewicz and Korsten (2002) กล่าวว่า การใช้ยีสต์ *Candida famata* ในการลดความเสียหายของส้มที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* พบการเพิ่มขึ้นของ phytoalexin, scoparone และ scopoletin ขึ้นเป็น 12 เท่า ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิด เป็นสารที่ถูกชักนำขึ้นเพื่อต้านทานเชื้อราหลังจากที่ผลส้มเกิดบาดแผล 4 วัน

2.2 การใช้สารสกัดจากพืช (plant extract) เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว นั้น สุภัทรา และคณะ (2547) พบว่า สารสกัดหยาบจากขมิ้นชันที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *L. theobromae* ได้ 78.8% และ 75.5% ตามลำดับ

การใช้สารสกัดจากกระเทียมโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ร่วมกับน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และสารเคลือบผิวส้ม เพื่อควบคุมโรคบนส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งวเลนเซียและ shamouti แล้วเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ 10 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้น 90-95% เป็นระยะเวลา 30 วัน

พบว่า สามารถควบคุมโรคราสีเขียวและสีฟ้าของส้มที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* และ *P. italicum* ตามลำดับ โดยพบว่า สารออกฤทธิ์หลัก คือ allicin (diallyl thiosulfinate) โดยมีผลต่อการยับยั้ง เอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา (Obagwu and Korsten, 2003)

2.3 สารระเหย (volatiles) มีผลต่อการยับยั้งการงอกของเชื้อรา *P. digitatum* ได้แก่ aliphatic aldehydes (C 5-9), octanal ที่มีค่า $IC_{50} = 60 \mu\text{L/L}$, citral มีผลในการยับยั้งการงอกของ germ tube ของเชื้อรา *P. digitatum* ที่มีค่า $IC_{50} = 100 \mu\text{L/L}$ โดยที่ความเข้มข้น 0.006-0.15 ppm มีผลต่อการกระตุ้นการงอกของเชื้อรา *P. digitatum* แต่ถ้าหากความเข้มข้นที่สูงกว่าระดับความเข้มข้นดังกล่าวมีผลต่อการยับยั้งการงอกของโคนิเดีย *P. digitatum* (Droby *et al.*, 2008)

ในส่วนของเปลือกของส้ม ส่วนใหญ่จะพบสารประกอบของ flavonone glycosides และ polymethoxyflavones ได้แก่ narigin, hesperidin ที่พบมากในผลเกรฟฟรุต พันธุ์ Star Ruby และ sanguinelli orange ตามลำดับ โดยเฉพาะ polymethoxyflavones ที่พบในส้มพันธุ์ สายน้ำผึ้งกลุ่ม orange โดยสารประกอบดังกล่าวเป็นสารประกอบในกลุ่มของ phenolic compounds มีบทบาทสำคัญยับยั้งการสร้างโคนิเดียและการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* (Ortuño *et al.*, 2006)

2.4 น้ำมันหอมระเหย (Essential oils) พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจาก thyme (*Thymus vulgaris*) และ กานพลู (*Eugenia caryophyllata*) มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* (Yahyazadeh *et al.*, 2007)

3. การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี

การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคของส้มหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ orthophenyl phenate, imazalil, thiabendazole pyrimethanil, fludioxonil และ sodium *o*-phenylphenate ได้ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวและโรคราสีฟ้าของส้มหลังการเก็บเกี่ยว มานานกว่า 25 ปี (Teixid'o *et al.*, 2001; Kinay *et al.*, 2007) โดยเฉพาะในเขตแคลิฟอร์เนียที่เป็นบริเวณที่มีการปลูกส้มเป็นการค้าอย่างกว้างขวาง ได้นำสารเคมีควบคุมโรคทั้งชนิดเดียวและหลายชนิดมาใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรค (Kinay *et al.*, 2007; Smilanick *et al.*, 2006) ในปัจจุบันพบว่าการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคลดน้อยลง เนื่องจากพบสารตกค้างในสภาพแวดล้อม ทั้งยังเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ และเชื้อสาเหตุมีความต้านทานต่อสารเคมี

จึงมีการนำสารเคมีชนิดใหม่มาทดแทนสารเคมีที่เชื้อสาเหตุมีความต้านทาน และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของส้มหลังการเก็บเกี่ยวได้ดี ได้แก่ fludioxonil, azoxystrobin และ pyrimethanil (Kanetis *et al.*, 2008 Zhang *et al.*, 2009)

pyrimethanil (PYR) เป็นสารในกลุ่ม anilinopyrimidines (Kanetis *et al.*, 2008) มีบทบาทในการยับยั้งปลดปล่อยเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์พืช และยับยั้งการสังเคราะห์ methionine ซึ่งถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มหลังการเก็บเกี่ยว โดยพบว่า pyrimethanil สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* ได้โดยมีค่า $EC_{50} = 0.2-0.4$ mg/L ค่า pH 4-7 และที่ระดับความเข้มข้น 500 mg/L สามารถลดการเกิดโรคได้มากกว่า 90% โดยที่ไม่มีผลต่อคุณภาพของส้ม (Smilanick *et al.*, 2006) รวมถึงเชื้อรา *Botrytis cinerea* และเชื้อรา *Venturia inaequalis* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรค scab ของแอปเปิ้ลและสาลี่ แต่สาร anilinopyrimidines ยังมิบทบาทในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียน้อย แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการยืดยาวของ germ tube ได้ดี (Kanetis *et al.*, 2008)

azoxystrobin เป็นสารเคมี broad-spectrum อยู่ในกลุ่ม QoI ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารสังเคราะห์พื้นฐานโมเลกุลของสารกำจัดเชื้อรา strobilurin A ซึ่งทั้ง strobilurins และ azoxystrobin ไปรบกวนระบบการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนภายในไมโทคอนเดรียของกระบวนการหายใจ (Kanetis *et al.*, 2008) Zhang *et al.*, (2009) รายงานว่า azoxystrobin ที่ระดับความเข้มข้น 0.0426 และ 0.025 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียและการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* ได้ 50% (EC_{50}) ตามลำดับ

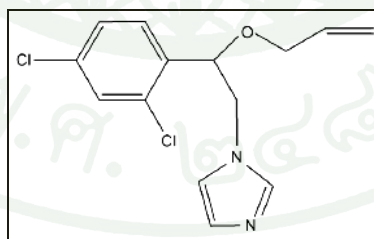
fludioxonil เป็นสารในกลุ่ม phenylpyrroles ที่เป็นกลุ่มของ nonsystemic ที่ถูกสังเคราะห์มาจากแบคทีเรีย genus *Pseudomonas* เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมโรคในสวนผลไม้ (Kanetis *et al.*, 2008) และโรคหลังการเก็บเกี่ยวของส้ม ซึ่ง fludioxonil มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขั้วผลเน่า (diplodia stem-end rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Lasioidiplodia theobromae* และ โรคผลเน่าราสีเขียว (green mold rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* ของส้มในฟลอริดา (Zhang, 2007) นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคของผลไม้ไม้เนื้อแข็ง (stone fruits) และเชื้อที่เป็น seedborne (เชื้อที่ติดกับเมล็ด) โดยสารเคมีดังกล่าวมีผลในยับยั้งการงอกของโคนิเดีย การยืดยาวของ germ tube และการเจริญของเส้นใย (Kanetis *et al.*, 2008)

Kanetis *et al.*, (2008) พบว่า สารเคมี azoxystrobin, fludioxonil และ pyrimethanil สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย มีค่า $EC_{50} = 0.014, 0.025$ และ $0.313 \mu\text{g/mL}$ และยับยั้งการออกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* มีค่า $EC_{50} = 0.074, 0.163$ และ $1.195 \mu\text{g/mL}$

benomyl ได้ถูกนำมาใช้ฉีดพ่นก่อนการเก็บเกี่ยวส้มในแถบแอฟริกาใต้ เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* ที่ก่อให้เกิดโรคเน่าของส้มหลังการเก็บเกี่ยว (Ladaniya, 2008)

imazalil ((1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propenyloxy)ethyl]-1H-imidazole) (ภาพที่ 2) เป็นสารเคมีกำจัดเชื้อราที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางกับโรคหลังการเก็บเกี่ยวของ ผัก ผลไม้และไม้ดอก (Maruyama *et al.*, 2007) โดยนำมาใช้กำจัดโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลส้มหลายชนิด เช่น เลมอน (lemon) ออเรนจ์ (orange) และเกรฟฟรุต (grapefruit) ในช่วงระหว่างการเก็บรักษาและการขนส่ง (Watanabe *et al.*, 2001)

imazalil จัดอยู่ในกลุ่มทางเคมี คือ imidazoles ที่มี mode of actions ในยับยั้งการสังเคราะห์ sterol ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ (FRAC, 2007) ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดเชื้อราที่มีความเป็นพิษกับเชื้อรา *Penicillium* ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับค่า pH และค่า pKa ที่เหมาะสมที่สุดคือ 6.53 ซึ่งพบว่าที่สภาพ pH 7.0 ทำให้ imazalil แพร่เข้าเส้นใยเชื้อรา *Penicillium italicum* และทำให้โคนิเดียมีความผิดปกติ บวมพอง และ germ tube ผิดรูป (Siecel and Racsbaile, 1978) Bus (1992) พบว่า imazalil สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* มีค่า $ED_{50} = 0.88 \text{ mg/L}$



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารเคมี imazalil

ที่มา: Maruyama *et al.*, (2007)

นอกจากนี้ในด้านของความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เมื่อนำสารเคมี imazalil มาใช้ในกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวผลไม้ พบว่า การตรวจหาสารพิษตกค้างบนผลผลิตที่จุ่มด้วยสารเคมี imazalil มีสารพิษตกค้างค่อนข้างน้อย คือ ไม่เกิน 5 ppm ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค (บุรณี, 2548)

นอกจากนี้พบว่า การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคอย่างต่อเนื่องจะมีผลทำให้เชื้อเกิดความต้านทานสารเคมีขึ้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาและหาวิธีการที่เหมาะสมในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่ปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์ (Teixid'o *et al.*, 2001)

จึงได้มีการใช้ polyhexamethylene biguanide (PHMB) เป็นองค์ประกอบของสารที่ละลายได้ดีในน้ำเพื่อใช้ในการฆ่าเชื้อโรค เป็นสารที่ใช้ในการฆ่าเชื้อในสระว่ายน้ำ ซึ่งได้ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง โดยใช้ PHMB ระดับความเข้มข้น 1000 - 4000 ppm สามารถควบคุมโรคขั้วผลเน่า (stem end rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Diplodia natalensis* โรค sour rot ที่เกิดจากเชื้อรา *Geotrichum citri-aurantii* และโรคน้ำราสีเขียว (green mold) ที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* (Brown and Chambers, 1999)

สารในกลุ่มที่ค่อนข้างปลอดภัย (generally regarded as safe) ที่ถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้แก่ โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) และเอทานอล มีผลทำให้ความงอกของโคนเดียเชื้อรา *P. digitatum* ที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งลดลง (Janisiewicz and Korsten, 2002)

กรดเกลือคาร์บอเนต (carbonic acid salts) ได้แก่ โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) และโซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) ได้ถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารและในหีบปฏิบัติการมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อหลายชนิด อีกทั้งยังมีรายงานว่า ยังสามารถลดการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลส้มได้ ซึ่งสารละลายคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนตมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *Penicillium* spp. (Teixid'o *et al.*, 2001; Smilanick *et al.*, 2006)

นอกจากนี้การนำโซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) มาช่วยในการลดปริมาณการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา (fungicide) อีกทั้งยังมีการนำโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) มาใช้ร่วมกับวิธีการทางกายภาพอื่นๆ เพื่อใช้ในการควบคุมโรค เช่น การใช้ร่วมกับน้ำร้อน การใช้ร่วมกับสารอื่นๆ เช่น กรดซอร์บิก (sorbic acid) และสารละลายของเกลือ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbate) ที่มักนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารและมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา แบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งโพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbate) ได้ถูกนำมาใช้ในการทางการค้าเพื่อควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวแต่ยังไม่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายมากนัก โดยพบว่า การใช้โพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbate) ที่ pH 4-6 ร่วมกับสารเคมี imazalil, thiabendazole, pyrimethanil และ fludioxonil มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียม (Smilanick *et al.*, 2006) และ Montesinos-Herrero *et al.*, (2009) ได้ทดลองจุ่มผลส้มวาเลนเซียลงในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbate) ที่มีอุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที พบว่า สามารถลดการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวและสีฟ้าของส้มพันธุ์วาเลนเซียได้ 96 % และ 83 % ตามลำดับ หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 60 วัน และเมื่อนำโพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbate) มาใช้ร่วมกับสารเคมี imazalil พบว่าส้มพันธุ์ marisol clementine เกิดโรคผลเน่าราสีเขียวลดลง

4. การใช้สารเคมีร่วมกับเชื้อปฏิปักษ์

Teixid'o *et al.*, (2001) รายงานว่า ประสิทธิภาพของ *Pantoea agglomerans* ร่วมกับสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) ความเข้มข้น 2% ที่อุณหภูมิ 3 และ 20 องศาเซลเซียส สามารถลดการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มได้ 97.6% ซึ่งเช่นเดียวกับงานทดลองของ Torres *et al.*, (2007) ที่ได้จุ่มผลส้มในสารแขวนลอยเชื้อ *P. agglomerans* strain CPA-2 ปริมาณ 2×10^8 CFU/mL และโซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) ความเข้มข้น 3% ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 20-40 วินาที สามารถลดการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* และ *Penicillium italicum* ได้ 80% และเช่นเดียวกับ สรวงสรรค์ (2549) ได้ทดสอบเชื้อยีสต์ *C. utilis* ร่วมกับโซเดียมไบคาร์บอเนต 2% เพื่อควบคุมโรคราสีเขียวได้อย่างสมบูรณ์เช่นกัน

5. การใช้สารเคมีร่วมกับวิธีทางกายภาพ

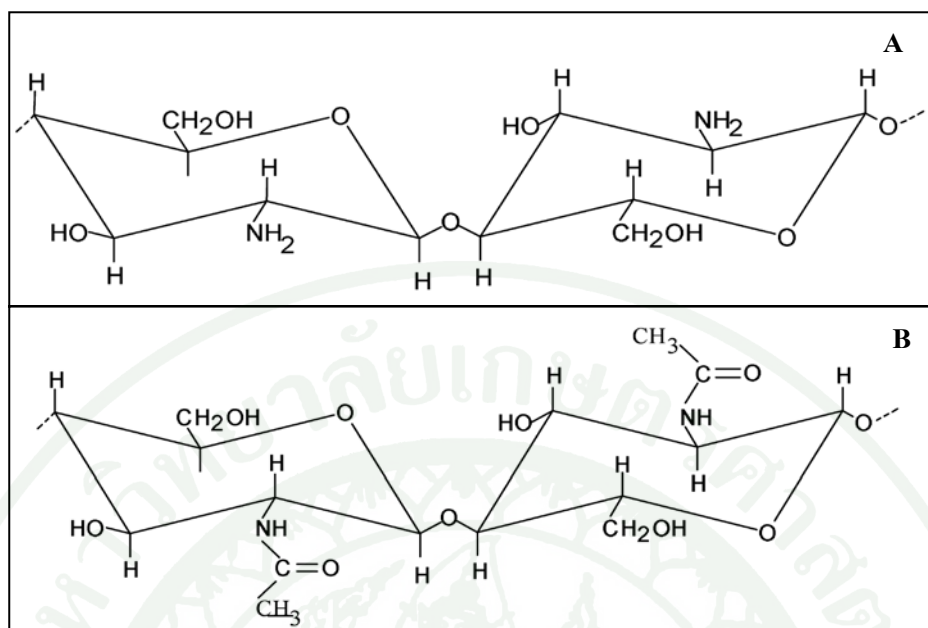
บุรณี (2548) พบว่า การจุ่มผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 52 54 และ 56 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที สามารถลดการเข้าทำลายของโรคเพื่อควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้โดยเกิดโรค 75% 66.7% 43.3% และ 20% ตามลำดับ และการใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ร่วมกับการใช้สารเคมีเชื้อรา imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm นาน 2 นาที สามารถควบคุมการเกิดโรคได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่การใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เพียงอย่างเดียวสามารถลดการเกิดโรค 58.3 %

การสมานบาดแผล (curing) ผลส้มวาเลนเซีย ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง พบการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้ม 17.4% และเมื่อทำการจุ่มผลส้มวาเลนเซียในสารละลาย thiabendazole ความเข้มข้น 500 ppm หลังจากการสมานบาดแผล (curing) สามารถลดการเกิดโรคได้ 93% (Zhang and Swingle, 2005)

ไคโตแซน (Chitosan)

ไคโตแซน [a (1 → 4) 2-amino-2-deoxy-β-D-glucan] เป็นอนุพันธ์ของไคติน (ภาพที่ 3) พบมากในส่วนนอกของเปลือกกุ้ง ปู หอยและเชื้อราบางชนิด เช่น *Aspergillus* และ *Mucor* (Qin *et al.*, 2006) ไคโตแซนถูกสร้างมาจากไคตินที่ผ่านกระบวนการกำจัดหมู่อะซิทิล (deacetylation) ไคโตแซนเป็นสารละลายที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์

คุณสมบัติของไคโตแซน เป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติที่มีประจุบวก มีความเหนียวใส สารละลายไคโตแซนสามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต สามารถเข้ากันได้ดีกับธรรมชาติ (biocompatible) และย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (biodegradable) (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2006) และ Bioactivity (Pacheco *et al.*, 2007)



ภาพที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลไคดิน (A) และไคโตแซน (B)

ที่มา: Hejazi and Amiji (2003)

ไคโตแซนถูกนำมาประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ด้านอุตสาหกรรมอาหาร การแพทย์ การบำบัดน้ำเสีย เครื่องสำอาง และการผลิตสัตว์ (Qin *et al.*, 2006) โดยเฉพาะด้านการเกษตรนั้น ไคโตแซนได้ถูกนำมาใช้ในขณะการเก็บรักษาผลิตผลทางการเกษตร ได้แก่ การเคลือบผิวผลไม้หลายชนิด เช่น สตรอเบอรี่ มะเขือเทศ ท้อ สาลี่ กีวีฟรุต ลิ้นจี่ แอปเปิ้ล และลำไย (Chien *et al.*, 2007) เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา ชะลอการเปลี่ยนสีของผลไม้ โดยไคโตแซนมีผลในการควบคุมการถ่ายเทน้ำและอากาศออกสู่ภายนอกของผล จึงเป็นการลดอัตราการคายน้ำและควบคุมคุณภาพของผลไม้ (Meng *et al.*, 2008) เช่น มะนาวที่ผ่านการสารเคลือบไคโตแซนที่ผลิตจากเปลือกกุ้งกุลาดำ สามารถยืดอายุการเก็บรักษามะนาวได้ อีกทั้งยังช่วยยืดระยะเวลาในการเปลี่ยนสีผิวของมะนาวได้ เป็นเวลา 24 และ 56 วัน (สุคนธ์, 2546)

การผลิตสัณฐานน้ำผึ้งส่งออกของไต้หวัน ได้มีการเคลือบผิวส้มด้วยไคโตแซน ทั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาโดยจะปลดอัตราการหายใจ ชะลอการพัฒนารสชาติ และชะลอการสุกโดยการยับยั้งการผลิตเอทิลีนและคาร์บอนไดออกไซด์ (Chien *et al.*, 2007)

ในทางโรคพืช ไคโตแซนจัดเป็น elicitor ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมการเกิดโรคของผักและผลไม้ก่อนและภายหลังการเก็บเกี่ยว โดยมีฤทธิ์ในการต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และการชักนำความต้านทานโรคของพืช (Bautista-Baños *et al.*, 2006) ทั้งนี้ประสิทธิภาพของไคโตแซนนั้นจะขึ้นอยู่กับ ชนิดของไคโตแซน ได้แก่ deacetylation degree และมวลโมเลกุลของไคโตแซน, ค่า pH ของไคโตแซน และอุณหภูมิ (Devlieghere *et al.*, 2004) ที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรคและเชื้อสาเหตุโรคนั้นๆ โดยไคโตแซนจะไปกระตุ้นทำให้พืชสร้างสารประกอบต้านทานเชื้อรา (antifungal compounds) ได้แก่ phytoalexin, pisatin และ hydrolytic enzymes ได้แก่ chitinases และ glucanases (Pacheco *et al.*, 2007)

ไคโตแซน ช่วยในการชะลอการเกิดโรคของผลไม้ในระหว่างการเก็บรักษา โดยสามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา การยืดยาวของ germ tube และการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ ซึ่งกลไกของไคโตแซนที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์นั้น เนื่องมาจากการจับกันของไคโตแซนกับหมู่ฟอสเฟตของ DNA ทำให้ส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ mRNA จึงทำให้การสังเคราะห์โปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์นั้นเกิดความผิดปกติไป (Meng *et al.*, 2008)

ไคโตแซน ได้ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวในผักและผลไม้หลายชนิด (Bautista-Baños *et al.*, 2006) เช่น การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่เป็น food-borne ได้แก่ *Corynebacterium michiganense*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* และ *Staphylococcus aureus* (Yang *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ไคโตแซนมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* และ *Erwinia amylovora* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรครากเน่าพืช อีกทั้งยังสามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสและไวรอยด์ เช่น การใช้ไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้น 0.1% ฉีดพ่นเพื่อควบคุมโรค alfalfa mosaic virus (ALMV) (Bautista-Baños *et al.*, 2006)

การควบคุมโรคก่อนการเก็บเกี่ยวที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา โดยไคโตแซนจะช่วยชะลอการแสดงอาการของโรคและยับยั้งการเกิดโรครากเน่าของต้นกล้า เช่น โรคที่เป็น seed-borne เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* และ *P. aphanidermatum* ที่ก่อให้เกิดโรครากเน่าต้นกล้ามะเขือเทศ โดยทำการจุ่มเมล็ดมะเขือเทศในสารละลายไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้น 0.5-2.0 mg/mL จะมีผลต่อการลดการพัฒนาของแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุ ทำให้ลดการเกิดการเข้าทำลายทางรากต้นกล้ามะเขือเทศ นอกจากนี้ยังมีการทดสอบการเคลือบเมล็ดพันธุ์

ข้าวสาลีด้วยสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 2-8 mg/mL ทำให้เมล็ดพันธุ์ข้าวสาลีงอกได้ดีและลดการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *F. graminearum* (Bautista-Baños *et al.*, 2006)

การควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว โดยมีเชื้อราที่สำคัญหลังการเก็บเกี่ยว คือ *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* และ *Penicillium* spp. (ธวัช, 2548) ปัจจุบันได้มีการทดลองใช้ไคโตแซน หรือไคโตแซนร่วมกับสารตัวทำลายต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกับผลไม้ เช่น การใช้สารละลายไคโตแซน 0.5% ร่วมกับเอทานอล 10 % และ 20% สามารถช่วยลดการเกิดโรค gray mold ที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่ก่อให้เกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวขององุ่น (Romanazzi *et al.*, 2007) และการพ่นไคโตแซนก่อนการเก็บเกี่ยวองุ่นจะช่วยลดการเกิดโรค gray mold ขององุ่นในระหว่างเก็บรักษา นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายไคโตแซนสามารถควบคุมโรค gray mold และ blue mold ที่เกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *Penicillium expansum* ในขณะเก็บรักษาผลมะเขือเทศที่อุณหภูมิ 25 และ 2 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยในการควบคุมโรคนั้นไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้น 1% และ 0.5 % จะมีผลในการยับยั้งการงอกของโคนิเดีย *Botrytis cinerea* และ *Penicillium expansum* ลำดับ ไคโตแซน ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 0.01% มีผลในการยับยั้งการยืดยาวของ germ tube ของเชื้อราทั้งสองชนิด และไคโตแซน ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% มีผลในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *Penicillium expansum* อีกทั้งไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ช่วยกระตุ้นความต้านทานโรคในผลมะเขือโดยพบเพิ่มปริมาณของ polyphenoloxidase (PPO), peroxidase (POD) และสารประกอบในกลุ่มของ phenolic ในขณะเก็บรักษา (Liu *et al.*, 2007)

การใช้สารละลายไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้น 0.5% และ 1% ในการเคลือบผลมะม่วงน้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยว พบว่า สารละลายไคโตแซนสามารถช่วยลดการสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณกรดที่ไต่เตทรได้ การเปลี่ยนแปลงสีเนื้อและเปลือก ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และสามารถชักนำให้มะม่วงสร้างเอนไซม์ไคตินเนสและเบต้า-1,3-กลูคาเนสขึ้นเพื่อใช้ในกลไกการป้องกันตัวเองของพืช โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีผลในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา *Cellotrichum gloeosporioides* ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของโคนิเดียได้ดี (สุตคนึง, 2546) นอกจากนี้การเคลือบผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งด้วยสารละลายไคโตแซน มีผลต่อการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* และ *Penicillium expansum* ของส้มหลังการเก็บเกี่ยวได้ (Liu *et al.*, 2007) Pacheco *et al.*, (2008) ได้ทดลองใช้ไคโตแซนร่วมกับยีสต์ *Pichia guilliermondii*

พบว่า สามารถควบคุมการเจริญเติบโตและชะลอการสร้างโคนิเดียของเชื้อรา *Penicillium digitatum* ได้

ธวัช (2547) รายงานว่า สารละลายไคโตแซนที่มีค่า pH 4.0 ที่ระดับความเข้มข้น 800 และ 1600 ppm สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียและยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Cellototrichum gloeosporioides* ตามลำดับ และเมื่อทดสอบกับผลมะม่วงที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำมาปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ภายหลังการจุ่มใน สารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าสารละลายไคโตแซนประสิทธิภาพในการลด ความรุนแรงและลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว นอกจากนี้ยังพบว่า สารละลายไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้น 6000 ppm ที่ค่า pH 5 สามารถชักนำให้มีกิจกรรมของ เอนไซม์ไคตินเนสและเบต้า-1,3-กลูคาเนสได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเก็บรักษา

ขมิ้นชัน (Turmeric; *Curcuma longa* Linn.)

ขมิ้นชัน จัดอยู่ในวงศ์ขิง ซึ่งพบและเจริญได้ดี ในเขตร้อนชื้น ได้แก่ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย จาเมกา และเปรู (Jayaprakasha *et al.*, 2005) ซึ่งในประเทศอินเดีย จีนและประเทศในแถบเอเชีย ตะวันออกเฉียงใต้ มักนำมาใช้เป็นเครื่องเทศ ส่วนประกอบของอาหารและย้อมสี นอกจากนี้มีฤทธิ์ ทางยา (Chattopadhyay *et al.*, 2004)

ในอดีตขมิ้นชันได้ถูกนำมาใช้ในการสמןแผลที่ผิวหนังและดับ โดยมี curcumin ที่เป็น สารออกฤทธิ์ของขมิ้นชันมีคุณสมบัติในการขัดขวางกระบวนการ lipid peroxidation ซึ่งเป็น กระบวนการที่สำคัญในการเกิดโรคต่างๆ ในคน (Quiles *et al.*, 2002) เช่น เส้นเลือดอุดตัน โดย พบว่า curcumin ความเข้มข้น 10 μ M สามารถยับยั้ง LDL (low-density lipoproteins) oxidation ได้ 40-85% (Aggarwal *et al.*, 2005)

การจัดจำแนก (Classification) ขมิ้นชัน (Turmeric; *Curcuma longa* Linn.) ตามระบบของ Linnaeus

Class	Liliopsida
Subclass	Commelinids

Order	Zingiberales
Family	Zingiberaceae
Genus	<i>Curcuma</i>
Species	<i>Curcuma longa</i>

ที่มา: Chattopadhyay *et al.* (2004)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าใต้ดินมากเป็นตระกูลเดียวกันกับว่านหรือขิง มีความสูงได้มากกว่า 1 เมตร ลักษณะของใบเป็นใบเดี่ยวขนาดใหญ่ รูปหอกแกมขนานกัน กว้างประมาณ 8-10 เซนติเมตร และยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ก้านใบมีลักษณะแคบ มีร่องเล็กน้อย ดอกจะออกเป็นช่อใหญ่ ก้านช่อนั้นจะยาวพุ่งออกมาจากใต้ดิน ก้านช่อดอกมียาวประมาณ 5-5.5 เซนติเมตร ส่วนใบประดับสีเขียวอ่อนๆ หรือสีขาว ตรงส่วนปลายช่อดอกจะมีสีชมพูอ่อน จะจัดเรียงซ้อนกันอยู่อย่างระเบียบ ใบประดับ 1 ใบ จะมีดอกอยู่ 2 ดอก (Ravindran *et al.*, 2007)

องค์ประกอบทางเคมีของขมิ้นชัน

ขมิ้นชัน ประกอบด้วย น้ำมันหอมระเหย ประมาณ 5% อัลคาลอยด์ แป้ง สารเคอร์คูมิน (curcumin) เคอร์คูมินอยด์ (other curcuminoids) และน้ำมันขมิ้นชัน (turmeric oil) ปริมาณ 5-8% นอกจากนี้ turmerol ซึ่งเป็น copotioc acid ปริมาณ 0.1% และ veleric acid ปริมาณ 0.1% (Jain *et al.*, 2007)

curcumin demethoxycurcumin bis-demethoxycurcumin และ ar-turmerone เป็นสารประกอบหลักที่พบในขมิ้นชัน ซึ่งพบปริมาณของเคโรทีนอยด์ในปริมาณมาก (Ravindran *et al.*, 2007)

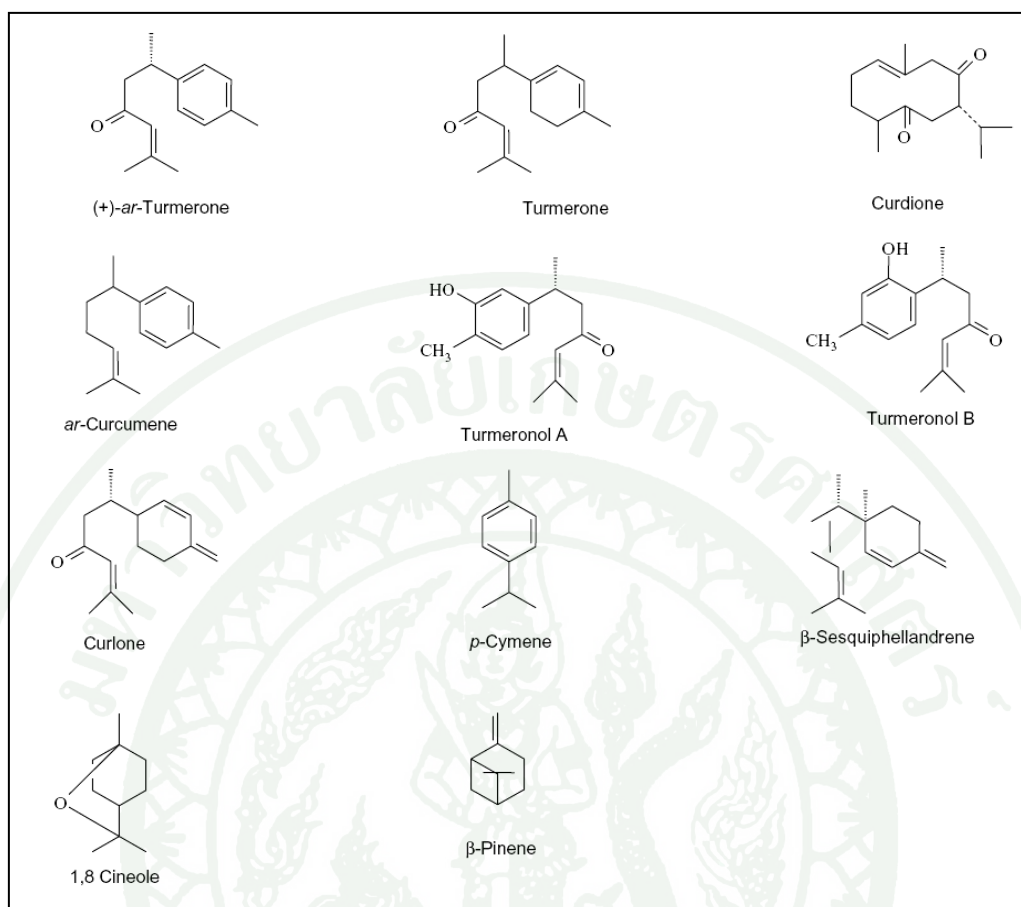
องค์ประกอบทางเคมีของขมิ้นชัน พบว่า มี 2 กลุ่มหลัก คือ

1. volatile oil

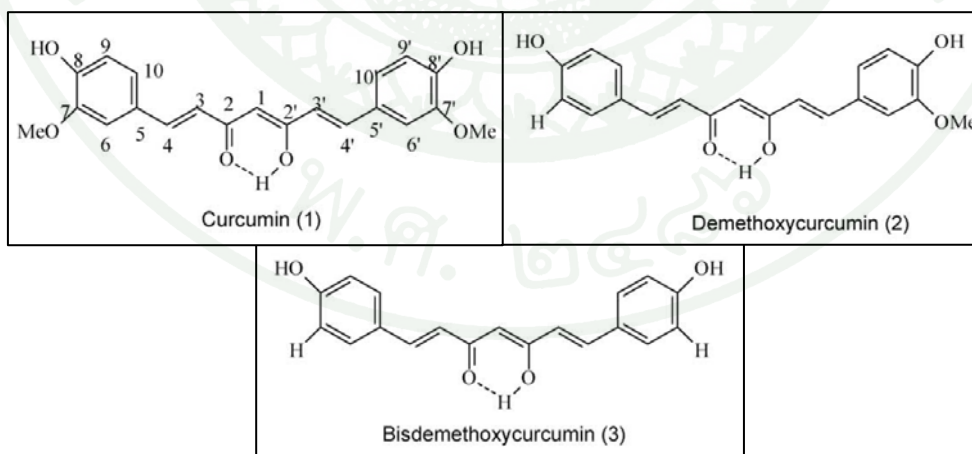
น้ำมันหอมระเหย (volatile oil) ของขมิ้นชัน เป็นสารที่มีกลิ่น ซึ่งสารนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ phenolic compounds โดยทำการกลั่นไอน้ำ (steam distillation) จะพบสารต่างๆ ได้แก่ sesquiterpene, ketone, alcohol, *p*-cymene, β -sesquiphellandrene, turmerone, *ar*-turmerone และ sesquiterpene alcohol (ภาพที่ 4) โดยในประเทศจีน พบ turmerone 24%, *ar*-turmerone 8.4% และ curdione 11.58% เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหย แต่ปริมาณของสารองค์ประกอบแต่ละชนิดนั้นไม่แน่นอนเสมอไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพื้นที่ปลูก และชนิดของขมิ้นชัน เช่น ในศรีลังกา พบ turmerone ปริมาณ 20-39% และ *ar*-turmerone ปริมาณ 24.7-48.9% เป็นต้น (Jayaprakasha *et al.*, 2005)

2. non-volatile curcuminoids

กลุ่มเคอร์คูมินอยด์จัดเป็นกลุ่ม non-volatile (Chang *et al.*, 2006) เป็นที่ทำให้เกิดสีเหลืองในขมิ้นชัน ซึ่งสารกลุ่มนี้จัดเป็น phenolic compounds สามารถดูดซับแสงที่ความยาวคลื่น 420-430 nm ในตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งเคอร์คูมินอยด์แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ curcumin, demethoxycurcumin และ *bis*-demethoxycurcumin (ภาพที่ 5) ทั้ง 3 กลุ่มเป็นกลุ่มสารที่ทำให้เกิดสีเหลือง โดยพบในส่วนเหง้า (rhizome) ของขมิ้นชัน (Jayaprakasha *et al.*, 2005) และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและขัดขวางการเกิดโรค รวมถึงมีประสิทธิภาพในการเป็น antioxidant, anticarcinogenic, anti-inflammatory, antiviral และ anti-infections activities (Ravindran *et al.*, 2007)



ภาพที่ 4 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีของสารในกลุ่ม volatile oil



ภาพที่ 5 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีของ curcuminoids

(ที่มา: Jayaprakasha *et al.*, 2005)

ฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity)

1. สารต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

อนุมูลอิสระ หรือ free radical คือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนในวงโคจรชั้นนอกสุดปราศจากคู่ เกิดขึ้นเมื่อวงโคจรของอิเล็กตรอนชั้นนอกสุดของโมเลกุลหนึ่งๆ ได้รับความเสียหายหรือสูญเสียอิเล็กตรอนออกไปหนึ่งอิเล็กตรอน (จริงแท้, 2550)

สารสกัดจากขมิ้นชันและสารประกอบ curcumin ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในขมิ้นชัน พบว่า มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ได้เทียบเท่ากับ วิตามินซี และวิตามินอี (Sliver, 1997) Ravindran *et al.*, (2007) กล่าวว่า curcumin, demethoxycurcumin, bis-demethoxycurcumin และ diacetyl curcumin มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยคาดว่าจะเป็นตัวกลางในการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes) ได้แก่ superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase

curcumin มีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ (oxygen free radicals) ซึ่งได้แก่ superoxide anions, อนุมูลของไฮดรอกซิล (hydroxyl radicals) (Jayaprakasha *et al.*, 2005) ในยับยั้งการสังเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และอนุมูลไนไตรต์ (nitrite radical) (Chattopadhyay *et al.*, 2004) ได้โดยจะขัดขวางการทำงานของ lipid peroxidation ซึ่งเป็นกระบวนการที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ และโรคมะเร็ง (Jayaprakasha *et al.*, 2005)

demethoxycurcumin พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ในขณะที่ curcumin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล superoxide anion (Sirijaroonwong *et al.*, 2007)

2. สารต่อต้านเชื้อโรคต่างๆ (Antimicrobial activity)

สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เชื้อราและไวรัส (Sliver, 1997; Ross, 2003)

2.1 สารต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity)

น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Staphylococcus albus*, *S. aureus* และพบว่าสารออกฤทธิ์ curcumin ที่ระดับ 2.5-5.0 mg/mL มีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus typhosus* (Jayaprakasha *et al.*, 2005) สารสกัดจากขมิ้นที่มีคลอโรฟอร์ม เอทานอล 95% น้ำและปิโตรเลียมอีเทอร์ ที่ระดับความเข้มข้น 250 mg/mL สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* (Ross, 2003) Ravindran *et al.*, (2007) กล่าวว่า สารสกัดจากเหง้าของขมิ้นชันมีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus albus*, *E.coli* และ *Pseudomonas pyocyanea*

2.2 สารต่อต้านเชื้อรา (antifungal activity)

Ravindran *et al.*, (2007) กล่าวว่า สารสกัดจากขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอลมีผลต่อเชื้อราหลายชนิด โดยที่สารสกัดจากเหง้าของขมิ้นชันมีผลในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *Alternaria solani*, *Botrytis cineria*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondite*, *Pyricularia oryzae* และ *Rhizoctonia solani*

สุภัทรา และคณะ (2547) รายงานว่า สารสกัดขมิ้นชันทั้งในรูปสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา สาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Dothiorella* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis* sp., และ *Pythium aphanidermatum* ด้วยวิธี poisonous food technique โดยน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืชได้ดี (Ortuño *et al.*, 2006; Stange *et al.*, 2002) และสารสกัดจากขมิ้นชันสดผลทำให้เชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Penicillium digitatum* หยุดการเจริญเติบโต (Jain *et al.*, 2007) และในแต่ละ fraction ของสารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium moniliforme* และ *Penicillium digitatum* (Jayaprakasha *et al.*, 2005)

น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันแห้ง เมื่อทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้ออัตราส่วน 1:100 โดยปริมาตร มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *Curvularia oryzae*, *Helminthosporium*

oryzae, *Penicillium corymbiferum*, *P. javanicum* และ *P. lilacinum* (Ross, 2003) และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum falcatum* และ *Fusarium moniliforme* (MIC = 1000 ppm) และ *Curvularia pallescens*, *A.niger*, *Fusarium oxysporum* (MIC = 2000 ppm) (Ravindran *et al.*, 2007)

3. สารต่อต้านเชื้อไวรัสเอดส์ (anti-HIV)

curcumin และ curcumin boron มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัส HIV-1 และ HIV-2 proteases โดย curcumin ที่ค่า $IC_{50} = 40 \mu M$ มีในการยับยั้งเชื้อไวรัส HIV-1 (Jayaprakasha *et al.*, 2005)

4. สารต่อต้านเซลล์มะเร็ง (anti-tumor activity)

curcumin เป็นสารที่ทำให้เกิดสีเหลืองในขมิ้นชัน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านเซลล์มะเร็งและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งของคน (Jain *et al.*, 2007) ซึ่ง curcumin มีหน้าที่ไปขัดขวางการทำงานของ lipid peroxidation และความเสียหายของ DNA โดยที่จะไปลดปริมาณ Fe-NTA และ hydrogen peroxide ที่เป็นสาเหตุของการเกิดเซลล์มะเร็ง (Ravindran *et al.*, 2007)

Zhang *et al.*, (2008) พบว่า สารในกลุ่ม curcuminoids ได้แก่ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิด nitric oxide (NO) ที่ถูกผลิตขึ้นในกระบวนการเสื่อมของเซลล์มะเร็งในสมองของคน (Jayaprakasha *et al.*, 2005)

5. สารออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity)

น้ำมันหอมระเหยและแต่ละ fraction ของสารสกัดจากเหง้าของขมิ้นชัน มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ โดยจะลดการเจริญของตุ่ม (granuloma) และ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์ (Jayaprakasha *et al.*, 2005)

นอกจากนี้ขมิ้นชัน ได้ถูกนำมาใช้เป็นยาที่ช่วยให้ก๊าซถูกขับออกจาก
กระเพาะอาหาร, hypocholesteremic, ยับยั้งสารพิษจากตับ (anti-hepatotoxic) และสารแก้พิษ
(antivenom activity) โดยมีรายงานว่าสาร curcumin จัดเป็น bioactive component ซึ่งมีคุณสมบัติ
เป็นพิษต่อแบคทีเรียและเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Pal and Pal, 2000)



อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อรา *Penicillium digitatum* Sacc.

1.1 การแยกเชื้อรา *Penicillium digitatum* Sacc.

นำผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่แสดงอาการโรคผลเน่าราสีเขียว มาแยกเชื้อราสาเหตุ ด้วยวิธีการ tissue transplanting โดยตัดเนื้อเยื่อของเปลือกส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งบริเวณรอยต่อระหว่างส่วนที่แสดงอาการโรคกับส่วนเนื้อเยื่อปกติ ขนาด 0.5X0.5 เซนติเมตร จึงนำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย 1% sodium hypochlorite (Clorox® 10%) นาน 3 นาที หลังจากนั้นจึงล้างน้ำด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (distilled water) จำนวน 2 ครั้งแล้วตัดเนื้อเยื่อบริเวณรอบๆ ชั้นส่วนของเนื้อเยื่อของเปลือกส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่ฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วนำมาวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก1.1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน จึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดบริเวณปลายโคโลนีของเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องและเก็บเชื้อไว้เพื่อศึกษาต่อไป

1.2 การเตรียมสารแขวนลอยโคโคนีเดียของเชื้อรา *P. digitatum*

เตรียมได้โดยใช้เชื้อรา *P. digitatum* อายุ 7-10 วันหลังจากเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA (ภาคผนวก ก1.1) โดยใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (distilled water) และหยดสารละลาย tween 80 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1-2 หยด จึงนับจำนวนโคโคนีเดีย 1×10^6 โคโคนีเดียต่อมิลลิลิตร โดยใช้ haemocytometer ภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์

2. การเตรียมผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งเพื่อใช้ในการทดลอง

นำผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่สุ่มมาจากตลาดไท ตลาดสี่มุมเมือง และตลาดนัดพันธุ์ไม้ มก. โดยคัดเลือกผลที่สมบูรณ์ไม่มีบาดแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของโรค แมลงและอื่นๆ นำมาที่ห้องปฏิบัติการ โรคหลังการเก็บเกี่ยวและโรคเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน หลังจากนั้นนำผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งมาทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำสบู่ และน้ำสะอาด 2 ครั้ง ฆ่าเชื้อที่ผิวผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งด้วยสารละลาย 1%

sodium hypochlorite (Clorox® 10%) นาน 3 นาที และน้ำสะอาด 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดขมิ้นชันผง

การเตรียมตัวอย่างขมิ้นชันผง จากจังหวัดตรัง และแซ่ขมิ้นชันผง 400 กรัม ลงในตัวทำละลายต่างๆ คือ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 600 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในที่มืดเป็นระยะเวลา 3 วัน จึงนำมารองสารละลายด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองแล้วมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator แล้วจึงทำการแยกเพื่อเอาน้ำออก โดยใช้ separating funnel เดิมกลอโรฟอร์ม ปริมาตร 2 ใน 3 ส่วนของสารละลายทั้งหมด ซึ่งจะสารสกัดขมิ้นชันที่ต้องการนั้นจะละลายอยู่ในส่วนของกลอโรฟอร์มซึ่งเป็น lipophilic phase หลังจากนั้นระเหยกลอโรฟอร์มออกด้วยเครื่อง evaporator แล้วชั่งน้ำหนักแห้งสารสกัดขมิ้นชัน จากนั้นเก็บสารสกัดขมิ้นชันในตัวทำละลายเมทานอล แล้วเก็บรักษาในที่มืด อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum*

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงในระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. digitatum* ทำโดยการนำโคนินเดียของเชื้อรา *P. digitatum* ผสมรวมกับ 0.5% water agar (WA) แล้วใช้ปลายเข็มแตะสารแขวนลอยโคนินเดียดังกล่าว ลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน โดยทำการเก็บผลการทดลองทุก 24 ชั่วโมง และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (ธวัช, 2548)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(A - B) \times 100}{A}$$

เมื่อ

- A คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ไม่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผง
- B คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายและระดับความเข้มข้นต่างๆ

5. การทดสอบความเข้มข้นของตัวทำละลายที่มีผลต่อการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum*

การงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* ต่อตัวทำละลายต่างๆ คือ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 0% (น้ำ) 10% 20% 30% 40% และ 50% แล้วจึงนำเกลี่ย (spread) บนอาหาร PDA (potato dextrose agar) ที่มีอาหาร PDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 2 จาน เกลี่ยเชื้อต่อชุดการทดลอง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมงแล้วนับจำนวนโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* ที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

6. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่มีผลต่อการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum*

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* โดยนำสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* ปริมาณ 1×10^3 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงแผ่นสไลด์หลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ปริมาตร 100 μL ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายต่างๆ ดังกล่าว ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.8 1.5 3.1 6.1 12.2 24.4 48.8 97.7 195.3 390.6 781.3 1562.5 3125 6250 12500 25000 50000 และ 100000 ppm แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงทำการนับจำนวนโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* ที่งอกต่อการสุ่มนับจำนวน 100 โคนิเดียต่อชุดการทดลองภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับจำนวนโคนิเดียที่งอกบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ไม่ผสมสารสกัดขมิ้นชัน นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของโคนิเดียเชื้อราโดยใช้สูตร (ธวัช, 2548)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(A - B) \times 100}{A}$$

เมื่อ

- A คือ จำนวน โคนิเดียที่งอกบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ไม่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผง
 B คือ จำนวน โคนิเดียที่งอกบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่
 ละลายในตัวทำละลายและระดับความเข้มข้นต่างๆ

หลังจากนั้นจึงนำผลที่ได้มาศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำ
 ละลายแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* โดยศึกษาความเข้มข้นที่
 ต่ำที่สุดของสารสกัดขมิ้นชันผงที่สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* (MIC:
 minimum inhibitory concentration) และประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงต่อการยับยั้งการงอก
 ของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* (ED: Effective dose) ได้ 50% และ 90% คือ ED₅₀ และ ED₉₀
 ตามลำดับ

7. การทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งด้วยสารสกัดขมิ้นชันผงที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ

การทดสอบสารสกัดขมิ้นชันผงมาทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนส้มพันธุ์สาย
 น้ำผึ้ง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) ทำการทดลองละ
 4 ซ้ำๆ ละ 5 ผล จากนั้นโดยการทำแผลที่ขั้วผล ห่างจากขั้วผล 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 แผล แล้ว
 ปลูกรเชื้อโดยหยดสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อราจำนวน 1×10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 μL
 ลงบนแผล แล้วหยดสารสกัดขมิ้นชันผงที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 20% ที่
 ได้จากการทดลองที่ 5 คือ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน ใน
 อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 30000
 40000 และ 50000 ppm ปริมาตร 10 μL โดยแบ่งการทดลองออกเป็นดังนี้

การทดลองที่ 1 หยคน้ำกลั่นนิ่งมาเช็ดลงบนแผล

การทดลองที่ 2 หยดตัวทำละลาย เมทานอล 20% ลงบนแผล

- การทดลองที่ 3 หยดตัวทำละลายเอทานอล 20% ลงบนแผล
- การทดลองที่ 4 หยดตัวทำละลายเฮกเซนลงบนแผล
- การทดลองที่ 5 หยดตัวทำละลายเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) 20% ลงบนแผล
- การทดลองที่ 6 หยดสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm ลงบนแผล
- การทดลองที่ 7 หยดสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm ลงบนแผล
- การทดลองที่ 8 หยดสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเฮกเซน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm ลงบนแผล
- การทดลองที่ 9 หยดสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm ลงบนแผล

หลังจากทำการหยดสารสกัดขมิ้นชันผงในแต่ละการทดลองลงบนแผลที่ปลูกเชื้อแล้ว จึงบ่มในตะกร้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% เรียบร้อยแล้ว บรรจุสัมพันธ์สายน้ำผึ้งที่ทดสอบ หลังจากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกที่มีความชื้นด้วยการฉีดยาน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อไว้ในถุง แล้วปิดปากถุงให้แน่น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จึงบันทึกจำนวนผลสัมพันธ์สายน้ำผึ้งที่เป็นโรค

8. การทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลสัมพันธ์สายน้ำผึ้งด้วยสารสกัดขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผง

การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผง ในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลสัมพันธ์สายน้ำผึ้งที่ละลายในตัวทำละลายที่ได้จากการทดลองที่ 5 คือ เอทานอล 20% โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) ทำ

การทดลองละ 4 ซ้ำๆ ละ 5 ผล จากนั้นทำแผลที่ขั้วผล โดยห่างจากขั้วผล 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 แผล แล้วปลูกเชื้อโดยหยดสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อราจำนวน 1×10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 μL บนแผล หลังจากนั้นหยดสารสกัดขมิ้นชันสด และสารสกัดขมิ้นชันผง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระดับความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 7 น้ำ เพื่อเป็นชุดควบคุม (control) ปริมาตร 10 μL ลงบนแผลที่ปลูกเชื้อแล้ว โดยแบ่งการทดลองออกเป็นดังนี้

- การทดลองที่ 1 หยคน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อลงบนแผล
- การทดลองที่ 2 หยดตัวทำละลายเอทานอล 20% ลงบนแผล
- การทดลองที่ 3 หยดสารสกัดขมิ้นชันผง
- การทดลองที่ 4 หยดสารสกัดขมิ้นชันสด

หลังจากทำการหยดสารสกัดขมิ้นชันในแต่ละการทดลองลงบนแผลที่ปลูกเชื้อแล้ว จึงบ่มในตะกร้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% เรียบร้อยแล้ว จึงบรรจุสัมพันธ์สายน้ำผึ้งที่ทดสอบ หลังจากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกที่มีความชื้นด้วยการฉีกน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อไว้ในถุง แล้วปิดปากถุงให้แน่น บ่มไว้ในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จึงบันทึกจำนวนผลสัมพันธ์สายน้ำผึ้งที่เป็นโรคและความรุนแรงของโรค (ตารางผนวกที่ 17)

9. การควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลสัมพันธ์สายน้ำผึ้งด้วยสารสกัดขมิ้นชันผงร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid)

การนำสารสกัดขมิ้นชันผง ไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) และสารสกัดขมิ้นชันผงมาทดสอบการควบคุมโรคเน่าราสีเขียวบนสัมพันธ์สายน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถควบคุมโรคได้ดีจากการทดลองที่ 8 นำมาทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) ทำการทดลองละ 4 ซ้ำๆ ละ 5 ผล โดยการทำแผลที่ขั้วผล โดยห่างจากขั้วผล 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 แผล แล้วปลูกเชื้อโดยหยดสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* จำนวน 1×10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 μL บนแผล หลังจากนั้นหยดสารสกัดขมิ้นชันผงที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระดับความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 8 ไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) และน้ำเป็นชุดควบคุม (control) ปริมาตร 10 μL บนแผลที่ทำการปลูกเชื้อแล้ว โดยแบ่งการทดลองออกเป็นดังนี้

- การทดลองที่ 1 หยคน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนแผล
- การทดลองที่ 2 หยคั่วทำลายเอทานอล 20%
- การทดลองที่ 3 หยคไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) ลงบนแผล
- การทดลองที่ 4 หยค 0.5% acetic acid ลงบนแผล
- การทดลองที่ 5 หยคสารสกัดขมิ้นชันผง
- การทดลองที่ 6 หยคสารสกัดขมิ้นชันผงร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) ลงบนแผล

หลังจากทำการทดสอบในแต่ละการทดลองลงบนแผลที่ปลูกเชื้อแล้ว จึงทำการบ่ม โดยนำตะกร้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% เรียบร้อยแล้ว จึงบรรจุสัมพัทธ์สายน้ำผึ้งที่ทดสอบ หลังจากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกที่มีความชื้นด้วยการฉีดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อไว้ในถุง แล้วปิดปากถุงให้แน่น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จึงบันทึกจำนวนผลสัมพัทธ์สายน้ำผึ้งที่เป็นโรคและความรุนแรงของโรค (ตารางผนวกที่ 17)

10. การเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงร่วมกับสารเคมี imazalil

นำผลการทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของสัมพัทธ์สายน้ำผึ้งที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 9 มาทดสอบในการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนสัมพัทธ์สายน้ำผึ้ง โดยใช้สารสกัดขมิ้นชันผงร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 500 และ 750 ppm เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันผงและสารเคมี imazalil ที่เหมาะสมในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของสัมพัทธ์สายน้ำผึ้ง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) ทำการทดลองละ 4 ซ้ำๆ ละ 5 ผล โดยการทำแผลที่ขั้วผล โดยห่างจากขั้วผล 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 แผล แล้วปลูกเชื้อโดยหยคสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* จำนวน 1×10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 μ L ลงบนแผล หลังจากนั้นหยคสารสกัดขมิ้นชัน, สารเคมี imazalil และน้ำกลั่นเพื่อเป็นชุดควบคุม (control) ปริมาตร 10 μ L โดยแบ่งการทดลองเป็นดังนี้

- การทดลองที่ 1 หยคน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนแผล
- การทดลองที่ 2 หยคั่วทำลายเอทานอล 20% ลงบนแผล
- การทดลองที่ 3 หยคสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm

- การทดลองที่ 4 หยดสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm
- การทดลองที่ 5 หยด imazalil ในระดับความเข้มข้น 250 ppm
- การทดลองที่ 6 หยด imazalil ในระดับความเข้มข้น 500 ppm
- การทดลองที่ 7 หยด imazalil ในระดับความเข้มข้น 750 ppm
- การทดลองที่ 8 หยดสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm ร่วมกับ imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm ลงบนแผล
- การทดลองที่ 9 หยดสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับ imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm ลงบนแผล
- การทดลองที่ 10 หยดสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm ร่วมกับ imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ลงบนแผล
- การทดลองที่ 11 หยดสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับ imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ลงบนแผล
- การทดลองที่ 12 หยดสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm ร่วมกับ imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 750 ppm ลงบนแผล
- การทดลองที่ 13 หยดสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับ imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 750 ppm ลงบนแผล

หลังจากทำการทดสอบในแต่ละการทดลองลงบนแผลที่ปลูกเชื้อแล้ว แล้วบ่มในตะกร้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% เรียบร้อยแล้ว จึงบรรจุส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่ทดสอบ หลังจากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกที่มีความชื้นด้วยการฉีดน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อไว้ในถุง แล้วปิดปากถุงให้แน่น บ่มไว้ในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จึงบันทึกจำนวนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เป็นโรคและความรุนแรงของโรค (ตารางผนวกที่ 17)

11. การยืดอายุการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

นำผลจากการทดลองที่ 10 ที่สามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ดีที่สุด มาทดสอบจุ่มผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยแบ่งการทดลองเป็นชุดการทดลองละ 4 ซ้ำๆ ละ 5 ผล โดยที่ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่นำมาทดสอบนั้นจะไม่ผ่านการเคลือบผิวมาก่อน หลังจากนั้นทำแผลที่ขั้วผล โดยห่างจากขั้วผล 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 แผล แล้วปลูกเชื้อโดยหยดสารแวนิลอยโคนิเดียเชื้อรา

P. digitatum จำนวน 1×10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 μL บนแผล หลังจากนั้นจุ่มผลส้มที่ทำ การปลูกเชื้อแล้ว ลงในสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm และน้ำกลั่นเพื่อเป็นชุดควบคุม (control) นาน 20 วินาที โดย แบ่งการทดลองเป็นดังนี้

การทดลองที่ 1 จุ่มน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อลงบนแผล

การทดลองที่ 2 จุ่มสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับ imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm ลงบนแผล

แล้วฝั้ผลส้มที่ทดสอบให้แห้ง จึงทำการบ่มในตะกร้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% เรียบร้อยแล้ว บรรจุส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่ทดสอบ หลังจากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกที่มีความชื้น ด้วยการฉีดน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อไว้ในถุง แล้วปิดปากถุงให้แน่น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จึง ทำการบันทึกขนาดของแผลและระยะเวลาการเกิดโรค ทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 6 วัน

12. การจุ่มผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

นำผลจากการทดลองที่ 10 ที่สามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ดี ที่สุด มาทดสอบจุ่มผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) ทำการทดลองละ 4 ซ้ำๆ ละ 5 ผล โดยที่ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่นำมาทดสอบ นั้นจะไม่ผ่านการเคลือบผิวมาก่อน หลังจากนั้นจะทำการทดลองเช่นเดิมโดยการทำแผลที่ขั้วผล โดยห่างจากขั้วผล 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 แผล แล้วปลูกสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อราจำนวน 1×10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 μL บนแผล หลังจากนั้นจุ่มผลส้มที่ทำการปลูกเชื้อแล้ว ลง ในสารสกัดขมิ้นชันผง ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm และน้ำกลั่นเพื่อเป็นชุดควบคุม (control) นาน 20 วินาที แล้วฝั้ผลส้มพันธุ์สาย น้ำผึ้งในแต่ละการทดลองให้แห้ง

แล้วบ่มในตะกร้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% เรียบร้อยแล้ว จึงบรรจุส้มพันธุ์สาย น้ำผึ้งที่ทดสอบ หลังจากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกที่มีความชื้น ด้วยการฉีดน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อไว้ในถุง แล้วปิดปากถุงให้แน่น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน จึงบันทึกจำนวนผล ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เป็นโรค, ความรุนแรงของโรค (ตารางผนวกที่ 17), ค่าความแน่นเนื้อของผลส้ม

โดยใช้เครื่อง fruits hardness tester และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS; total soluble solid) โดยใช้เครื่อง hand refractometer ของน้ำส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งในแต่ละชุดทดสอบ

13. ประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายต่างๆ คือ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน ในอัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium herbarium*, *Penicillium digitatum* และการทดสอบ activity และการเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ โดยศึกษาจากการปรากฏของสี ด้วยการพ่นด้วยสาร anisaldehyde reagent โดยเก็บสารสกัดขมิ้นชันผงไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 25 องศาเซลเซียส โดยสารสกัดขมิ้นชันผงที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทดสอบเป็นระยะเวลา 13 เดือน และสารสกัดขมิ้นชันผงที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส ทดสอบเป็นระยะเวลา 4 เดือน โดยทดสอบทุกเดือนๆ ละ 1 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งการทดสอบจะนำสารสกัดขมิ้นชันผงมาทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี Bio-activity assay บนแผ่น TLC (thin layer chromatography) plate โดยศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* โดยนำสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายต่างๆ มา spot บนแผ่น TLC plate และนำมา develop ใน tank ที่บรรจุ chloroform: methanol อัตราส่วน 96:4 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร) หลังจากนั้นจึงพ่นสารแวนิลลอยโคนินเคียเชื้อรา *C. herbarium* ที่อยู่ใน malt extract broth (MEB) (ภาคผนวก ก 1.3) แล้วบ่มไว้ในสภาพชื้น เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิด clear zone ที่ค่า $R_f = 0.89$ และทดสอบสารออกฤทธิ์โดยการพ่นด้วยสาร anisaldehyde reagent (ภาคผนวก ก2) เพื่อทดสอบ activity ของแต่ละส่วนของสารออกฤทธิ์ โดยนำสารสกัดจากขมิ้นชันผง มา spot บนแผ่น TLC หลังจากนั้นจึงพ่นสาร anisaldehyde reagent แล้วนำมาอบโดยให้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 100-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จะปรากฏสีตามกลุ่มของสาร จึงทำการบันทึกการปรากฏของสีในกลุ่มของสารและความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *C. herbarium* ที่ค่า $R_f = 0.89$ และเมื่อทำการทดสอบครบตามระยะเวลาที่กำหนดไว้ข้างต้น จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum*

14. การแยกสารตามความสามารถการละลายของสารสกัดขมิ้นชันผงโดยวิธี column chromatography (CC)

การแยกสารตามความสามารถการละลายของสารสกัดขมิ้นชันผงใช้วิธี column chromatography (CC) ซึ่งจะได้เป็น fractions ต่างๆ โดยอาศัยหลักการในการชะล้างของสารสกัดผ่านคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล (silica gel 60, ขนาด 0.2-0.5 mm ของบริษัท Merck KGaA, Germany) ปริมาตร 60 กรัม และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย เฮกเซน เอธิลอะซิเตต และเมทานอล (ตารางที่ 1) โดยจะนำสารสกัดขมิ้นชันผงที่เตรียมไว้มาทำการระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง evaporator แล้วเทตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) ในอัตราส่วนต่างๆ ลงในขวดสารสกัดขมิ้นชัน เทลงในคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจลที่อุดปลายคอลัมน์ด้วยสำลีเรียบร้อยแล้ว โดยเก็บแต่ละ fraction ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เมื่อเก็บสารละลายได้ครบทุก fractions แล้วระเหยตัวทำละลายออก แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นเติมเมทานอลเพื่อเป็นตัวทำละลาย แล้วเก็บรักษาไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 อัตราส่วนต่างๆ ของสารละลายอินทรีย์ (organic solvents)

Fraction	เฮกเซน (มิลลิลิตร)	เอธิลอะซิเตต (มิลลิลิตร)	เมทานอล (มิลลิลิตร)
I	100	-	-
II	75	25	-
III	50	50	-
IV	25	75	-
V	-	100	-
VI	-	75	25
VII	-	50	50
VIII	-	25	75
IX	-	-	100

15. Bio-activity assay

15.1 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการวิเคราะห์ชนิดของสารออกฤทธิ์

15.1.1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยสารสกัดขมิ้นชันผงและ fractions ต่างๆ

นำสารสกัดขมิ้นชันผงและ fractions ต่างๆ ที่แยกได้ ทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี Bio-activity assay บนแผ่น TLC โดยศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium herbarium* และ *Penicillium digitatum* เพื่อหาส่วนของสารสกัดขมิ้นชันผงที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราได้ดี โดยนำสารสกัดจากขมิ้นชันผง และ fractions ต่างๆ มา spot บน แผ่น TLC แล้วนำมา develop ใน tank ที่บรรจุ chloroform: methanol ในอัตราส่วน 96:4 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงพ่น spore suspension ของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* ที่อยู่ใน potato dextrose broth (PDB) (ภาคผนวก ก1.2) แล้วบ่มไว้ในสภาพชื้น เป็นเวลา 18 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ตรวจสอบการเกิดแถบยับยั้ง (clear zone) และบันทึกค่า Rf (rate of flow) และทดสอบ activity ของกลุ่มสารออกฤทธิ์ โดยการพ่นด้วย anisaldehyde reagent แล้วนำมาอบด้วยความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 100-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จะปรากฏสีตามชนิดของกลุ่มสาร จึงบันทึกสีที่ปรากฏและค่า Rf

$$\text{ค่า Rf} = \frac{\text{ระยะทางที่เกิดแถบยับยั้ง (เซนติเมตร)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}$$

15.1.2 การวิเคราะห์หาชนิดของสารออกฤทธิ์

จากผลการทดลองที่ 15.1.1 เมื่อพบ fractions ที่พบแถบยับยั้ง (clear zone) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* จึงนำ fraction ที่พบนั้นมาแยกสารและวิเคราะห์หาชนิดของสารออกฤทธิ์ โดยที่จะทำให้สารออกฤทธิ์นั้นมีความบริสุทธิ์ขึ้นในเบื้องต้น โดยการ spot แต่ละ fraction ลงบนแผ่น preparative layer chromatography (PLC) (PLC silica gel 60 F₂₅₄, 0.5 mm, 20 glass plates 20X20 cm, Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, Germany) แล้วนำมา develop ใน tank ที่บรรจุ chloroform: methanol ใน

อัตราส่วน 96:4 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วจึงขูดซิลิกาออกจากแผ่น PLC plates บริเวณส่วนที่ปรากฏ clear zone แล้วเติมตัวทำละลายเมทานอล แล้วกรองด้วยกรวยกรอง (filter funnels, Artikel-Nr. 21504) แล้วจะได้เป็น samples ต่างๆ หลังจากนั้นนำ samples มาแยกสารให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) และทำการวิเคราะห์หาชนิดสารออกฤทธิ์ โดยการใช้เครื่อง GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) และนำสารออกฤทธิ์มาเปรียบค่า UV spectra ด้วยเครื่อง HPLC อีกครั้ง

15.2 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของสารสกัดขมิ้นชันผงและ samples ต่างๆ

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดขมิ้นชันผง โดยเตรียมสารสกัดขมิ้นชันผงและ samples ต่างๆ ที่ได้ทำการทดสอบแล้วว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* ด้วยวิธี Bio-activity assay บนแผ่น TLC จากผลการทดลองที่ 15.1 นำมาทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radial scavenging assay แล้วทำการหาค่า antioxidant activity (%) และ the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) ซึ่งเตรียมตัวอย่างในระดับความเข้มข้นตั้งต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงทำการเจือจางเป็นระดับความเข้มข้น 3.125 6.25 12.5 25 50 100 200 400 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ทำการทดสอบใน 96-well multiwell plates จำนวน 3 ซ้ำต่อการทดลอง ทดสอบเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระ คือ α -Tocopherol เป็น positive control และเอทานอล เป็น negative control ซึ่งใช้สารอนุมูลอิสระเป็นตัวทดสอบ คือ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)) (Philip Molyneux, 2004) ที่ระดับความเข้มข้น 60 μ M โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยแบ่งการทดลองเป็นดังนี้

- การทดลองที่ 1 เอทานอล 200 μ L (Blank)
- การทดลองที่ 2 DPPH ความเข้มข้น 60 μ M ปริมาตร 100 μ L และเอทานอล ปริมาตร 100 μ L
- การทดลองที่ 3 สารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 50 μ g/ml ปริมาตร 100 μ L และเอทานอล ปริมาตร 100 μ L
- การทดลองที่ 4 สารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 50 μ g/ml ปริมาตร 100 μ L และ DPPH ความเข้มข้น 60 μ M ปริมาตร 100 μ L

- การทดลองที่ 5 สารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 25 µg/ml ปริมาตร 100 µL และ
เอทานอล ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 6 สารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 25 µg/ml ปริมาตร 100 µL และ
DPPH ความเข้มข้น 60 µM ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 7 สารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 12.5 µg/ml ปริมาตร 100 µL และ
เอทานอล ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 8 สารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 1.25 µg/ml ปริมาตร 100 µL และ
DPPH ความเข้มข้น 60 µM ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 9 สารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 6.25 µg/ml ปริมาตร 100 µL และ
เอทานอล ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 10 สารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 6.25 µg/ml ปริมาตร 100 µL และ
DPPH ความเข้มข้น 60 µM ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 11 สารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 3.125 µg/ml ปริมาตร 100 µL และ
เอทานอล ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 12 สารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 3.125 µg/ml ปริมาตร 100 µL และ
DPPH ความเข้มข้น 60 µM ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 13 α – Tocopherol ความเข้มข้น 400 µg/ml ปริมาตร 100 µL และเอทานอล
ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 14 α – Tocopherol ความเข้มข้น 400 µg/ml ปริมาตร 100 µL และ DPPH
ความเข้มข้น 60 µM ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 15 α – Tocopherol ความเข้มข้น 200 µg/ml ปริมาตร 100 µL และเอทานอล
ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 16 α – Tocopherol ความเข้มข้น 200 µg/ml ปริมาตร 100 µL และ DPPH
ความเข้มข้น 60 µM ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 17 α – Tocopherol ความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 100 µL และเอทานอล
ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 18 α – Tocopherol ความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 100 µL และ DPPH
ความเข้มข้น 60 µM ปริมาตร 100 µL
- การทดลองที่ 19 α – Tocopherol ความเข้มข้น 50 µg/ml ปริมาตร 100 µL และเอทานอล
ปริมาตร 100 µL

การทดลองที่ 20 α – Tocopherol ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μL และ DPPH
ความเข้มข้น 60 μM ปริมาตร 100 μL

การทดลองที่ 21 α – Tocopherol ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μL และเอทานอล
ปริมาตร 100 μL

การทดลองที่ 22 α – Tocopherol ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μL และ DPPH
ความเข้มข้น 60 μM ปริมาตร 100 μL

หลังจากนั้นบ่มไว้ในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง 517 nm โดยใช้เครื่อง fluorescence multi-detection reader จึงนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} และ antioxidant activity (%) โดยใช้สูตร (ดัดแปลงจาก Majhenic *et al.*, 2007)

% DPPH activity (antioxidant activity) คือ

$$\frac{100 - (\text{ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง}_{\text{sample}} - \text{ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง}_{\text{Blank}}) \times 100}{(\text{ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง}_{\text{control sample}})}$$

15.3 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (anticancer) ของสารสกัดขมิ้นชันผงและ samples ต่างๆ

การศึกษาสารสกัดขมิ้นชันผงและ samples ต่างๆ ที่ได้ทำการทดสอบแล้วว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* ด้วยวิธี Bio-activity assay บนแผ่น TLC จากผลการทดลองที่ 15.1 นำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดของคน โดยวิธี MTT cell cytotoxic assay เพื่อหาค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (%) และ the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) ซึ่งเตรียมตัวอย่างในระดับความเข้มข้นตั้งต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 3.125 6.25 12.5 25 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ทำการทดสอบใน 96-well multiwell plates จำนวน 3 ซ้ำต่อการทดลอง ทดสอบเปรียบเทียบ 1% DMSO และอาหารเลี้ยงเซลล์ (cell culture medium; RPMI-1640 medium, 10% FBS (fetal bovine serum), 5% sodium pyruvate, 5% penicillin, Sigma) โดยใช้เซลล์มะเร็งปอดของคนเป็นเซลล์ทดสอบ คือ A431 cell line จำนวน 2×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ MTT reagent [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Florian M. Freimoser *et al.*, 1999) ความเข้มข้น 5 mg/L

การเตรียมเซลล์มะเร็ง โดยนำเซลล์มะเร็ง A431 cell (จาก Inje university, Korea) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปอดของคน (ภาพที่ 6) ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วจะเห็นตะกอนเซลล์ตกอยู่ก้นหลอด จึงดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีเจือจาง DMSO ความเข้มข้น 10% ซึ่งเป็นสารละลายที่ใช้ในการเก็บรักษาเซลล์มะเร็ง A431 cell ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 6 เซลล์มะเร็งปอด A431 cell ที่ถูกเก็บไว้ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

หลังจากนั้นย้ายเซลล์แขวนลอยมะเร็ง A431 ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ (cell culture flask) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงจึงดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติม PBS 1M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อล้างเอาเซลล์เซลล์มะเร็ง A431 cell ที่ตายออก จึงดูดเอา PBS 1M ดังกล่าวออก หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อครบ 96 ชั่วโมง จะพบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์จะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีส้มอ่อน จึงดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติม PBS 1M เพื่อล้างเอาเซลล์มะเร็ง A431 cell ที่ตายออก จึงดูด PBS 1M ออก

หลังจากนั้นเติม solution A [(+) phenol red, sodium pyruvate 100 mM และ penicillin streptomycin solution] ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์มะเร็ง A431 cell ที่มีชีวิต ซึ่งจะติดที่ก้นขวดเลี้ยงเซลล์ให้หลุดออก แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลา 5 นาที เมื่อครบ 5 นาที จึงดูดเอา solution A ที่มีเซลล์มะเร็ง A431 cell ลงในหลอดเพื่อนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 1000 rpm นาน 5 นาที แล้วดูดเอา solution A ออก หลังจากนั้นเติม

อาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีเซลล์มะเร็ง A431 cell อยู่ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลา 5 นาที เมื่อครบ 5 นาที จึงนับจำนวนเซลล์ให้ได้ จำนวน 2×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

หลังจากนั้นนำสารละลายแขวนลอยเซลล์มะเร็ง A431 cell ลงใน 96-well multiwell plates จำนวน 200 μ L ต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมแล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ปริมาตร 100 μ L และตัวอย่างทดสอบ ปริมาตร 100 μ L โดยแบ่งการทดลองเป็น ดังนี้

การทดลองที่ 1	อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 200 μ L
การทดลองที่ 2	อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 μ L และสารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 50 μ g/ml ปริมาตร 100 μ L
การทดลองที่ 3	อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 μ L และสารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 25 μ g/ml ปริมาตร 100 μ L
การทดลองที่ 4	อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 μ L และสารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 12.5 μ g/ml ปริมาตร 100 μ L
การทดลองที่ 5	อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 μ L และสารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 6.25 μ g/ml ปริมาตร 100 μ L
การทดลองที่ 6	อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 μ L และสารสกัด หรือ samples ความเข้มข้น 3.125 μ g/ml ปริมาตร 100 μ L

แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุม เติม PBS 1M ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุมเพื่อดึงเอาเซลล์มะเร็งที่ตายออก แล้วดูด PBS 1M ออก เติม MTT reagent ที่มีความเข้มข้น 0.5 mg/mL โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เป็นตัวทำละลายเจือจาง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบ 4 ชั่วโมง จึงดูดเอา MTT reagent ออก แล้วเติม 1% DMSO ลงในหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง 570 และ 650 nm โดยใช้เครื่อง fluorescence multi-detection reader แล้วจึงนำมาคำนวณค่า IC_{50} และการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (%) โดยใช้สูตร

เซลล์มะเร็งที่มีชีวิต (%)

$$= \frac{(\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง}_{\text{ตัวอย่างทดสอบ}})}{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง}_{\text{ชุดควบคุม}}} \times 100$$

การยับยั้งเซลล์มะเร็ง (%)

$$= 100 - \text{เซลล์มะเร็งที่มีชีวิต} (\%)$$

16. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ และห้องปฏิบัติการ Natural product and
polymer materials มหาวิทยาลัยอินเจ มณฑลปูซาน สาธารณรัฐเกาหลีใต้

17. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มตั้งแต่ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือน มกราคม พ.ศ. 2553 รวมระยะเวลา 20
เดือน

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่มีต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum*

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเฮกเซน:เอทานอล:เมทานอล อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* บนอาหาร PDA หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 8 วัน พบว่า สารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายทุกชนิด มีผลในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ซึ่งสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 50000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้มากที่สุด คือ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2, ภาพที่ 7)

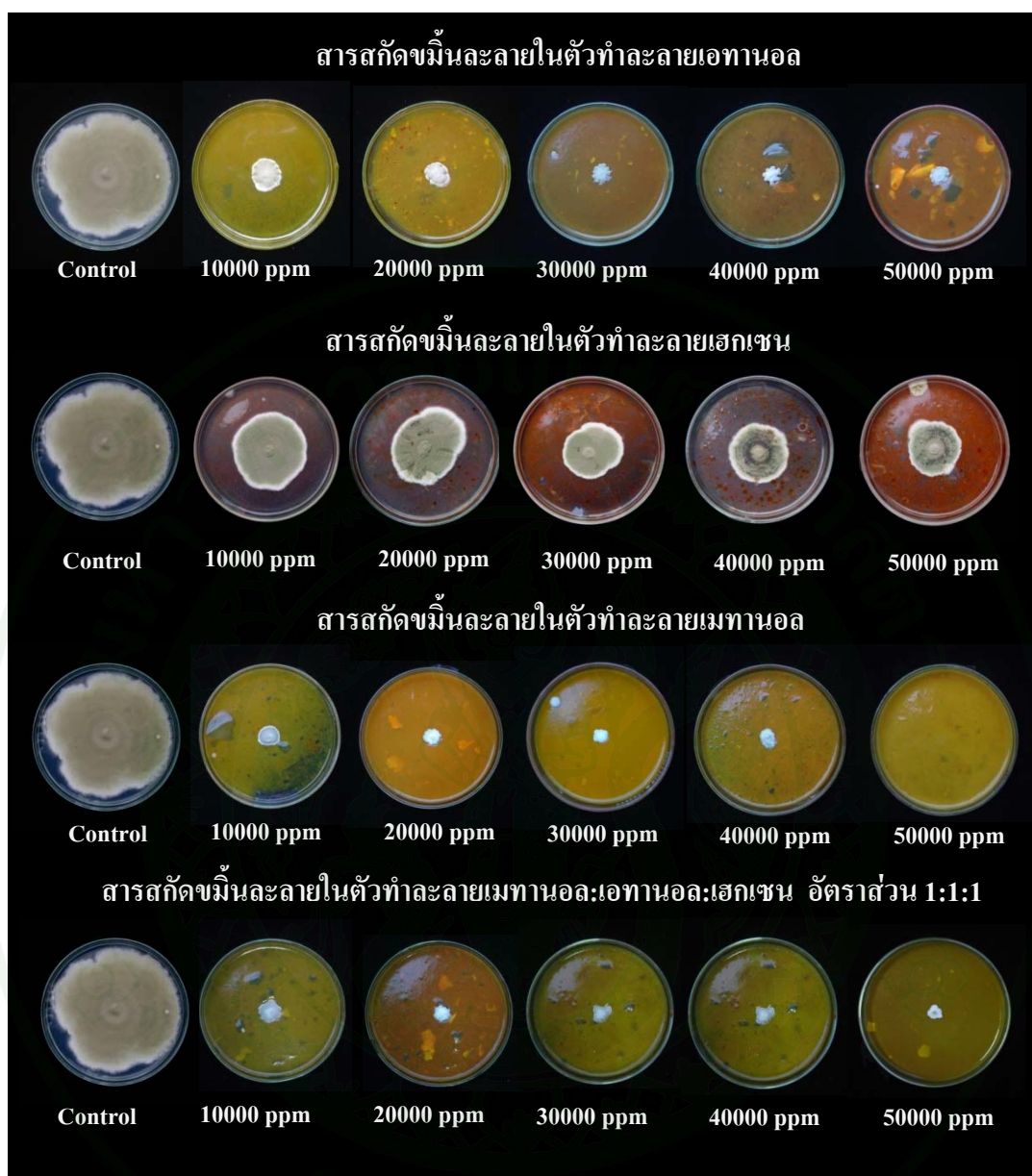
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ทำให้การแสดงผลของประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* นั้นไม่ชัดเจน ดังนั้น จึงได้ทำการทดสอบระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิดที่เหมาะสมต่อการทดลองในครั้งต่อไป

ตารางที่ 2 การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (%) ของเชื้อรา *P. digitatum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน

ระดับความเข้มข้น	การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (%) ของเชื้อรา <i>P. digitatum</i> ^{2/}			
ของสารสกัด	ชนิดของตัวทำละลาย			
ขมิ้นชันผง (ppm)	เมทานอล	เอทานอล	เฮกเซน	เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน ^{1/}
ชุดควบคุม	0o	0o	0o	0o
10000	77.68i	75.75j	34.23n	77.47i
20000	91.52cd	79.29h	48.07l	84.44f
30000	90.99b	84.01fg	36.70m	85.19ef
40000	88.20d	82.83g	36.48m	88.52d
50000	100.00a	86.16e	55.47k	89.91bc

หมายเหตุ ^{1/} อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร)

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ตามวิธีวิเคราะห์ Duncan's New Multiple Range Test



ภาพที่ 7 การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *P. digitatum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชั้นผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน

2. การทดสอบความเข้มข้นของตัวทำลายที่มีผลต่อการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum*

จากการทดสอบความเข้มข้นของตัวทำลายที่มีผลต่อการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* ที่ระดับความเข้มข้น 10% 20% 30% 40% และ 50% บนอาหาร PDA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 21 ชั่วโมง พบว่า ตัวทำลายที่มีผลต่อการงอกของเชื้อรา *P. digitatum* น้อย คือ ตัวทำลายเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 10% และ 20% มีการงอกของเชื้อรา *P. digitatum* คือ 91.75% และ 82.25% ตามลำดับ ตัวทำลายเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 10% และ 20% มีการงอกของเชื้อรา *P. digitatum* คือ 90.95% และ 71.9% ตามลำดับ ตัวทำลาย 3 ชนิดคือ เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 10% และ 20% มีการงอกของเชื้อรา *P. digitatum* คือ 94.55% และ 98.45% ตามลำดับ และตัวทำลายเฮกเซนทุกระดับความเข้มข้นคือ 10% 20% 30% 40% และ 50% มีผลต่อการงอกของเชื้อรา *P. digitatum* น้อย คือ 98.45%, 94.1%, 98.2%, 99% และ 98.25% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) คือ PDA ที่มีการงอกของเชื้อรา *P. digitatum* 100% ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

ในการทดสอบความสามารถการละลายสารสกัดขมิ้นชันผงของตัวทำลาย พบว่า ตัวทำลายเมทานอล เอทานอล และตัวทำลาย 3 ชนิดคือ เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 10% มีความสามารถในการละลายสารสกัดขมิ้นชันผงได้น้อย ดังนั้นจึงได้เลือกใช้ตัวทำลายต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 20% ในส่วนของตัวทำลายเฮกเซนที่ใช้ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 100% ซึ่งเป็นตัวทำลายที่ไม่สามารถเจือจางได้เนื่องจากเฮกเซนเป็นตัวทำลายที่มีขั้วน้อยซึ่งจะไม่ละลายในน้ำที่เป็นตัวทำลายที่มีขั้วสูง และทั้งนี้จะเห็นได้ว่าทุกระดับความเข้มข้นของตัวทำลายเฮกเซนมีผลต่อความงอกของเชื้อรา *P. digitatum* ที่ไม่แตกต่างกันมาก

ตารางที่ 3 การงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* (%) บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมด้วยตัวทำละลายชนิดและความเข้มข้นต่างๆ กัน หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 21 ชั่วโมง

ระดับความเข้มข้น ของตัวทำละลาย (%)	การงอกของโคนิเดีย (%) ในแต่ละความเข้มข้นของตัวทำละลาย ชนิดของตัวทำละลาย			
	เมทานอล ^{2/}	เอทานอล ^{2/}	เฮกเซน ^{2/}	เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน ^{1,2/}
0	100.00e	100.00e	100.00e	100.00e
10	91.75c	90.95c	98.45c	96.00c
20	82.25c	71.90bc	94.10c	94.55c
30	34.10ab	15.55a	98.20c	83.35c
40	14.65a	8.46a	99.00d	72.85bc
50	8.50a	4.30a	98.25c	18.65a

หมายเหตุ ^{1/} อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร)

^{2/} ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ตามวิธีวิเคราะห์ Duncan's New Multiple Range Test

3. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่มีผลต่อการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.8 1.5 3.1 6.1 12.2 24.4 48.8 97.7 195.3 390.6 781.3 1562.5 3125 6250 12500 25000 50000 และ 100000 ppm ที่มีผลต่อการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดขมิ้นที่ละลายในตัวทำละลายแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* ได้ดีที่สุด คือ สารสกัดขมิ้นที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 100000 ppm สามารถยับยั้งการงอกได้ 86.3% สารสกัดขมิ้นที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 3125 ppm สามารถยับยั้งการงอกได้ 95.5% สารสกัดขมิ้นที่ละลายในตัวทำละลายเฮกเซนที่ระดับความเข้มข้น 100000 ppm สามารถยับยั้งการงอกได้ 93.8% และสารสกัดขมิ้นที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 100000 ppm สามารถยับยั้งการงอกได้ 73.6% โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

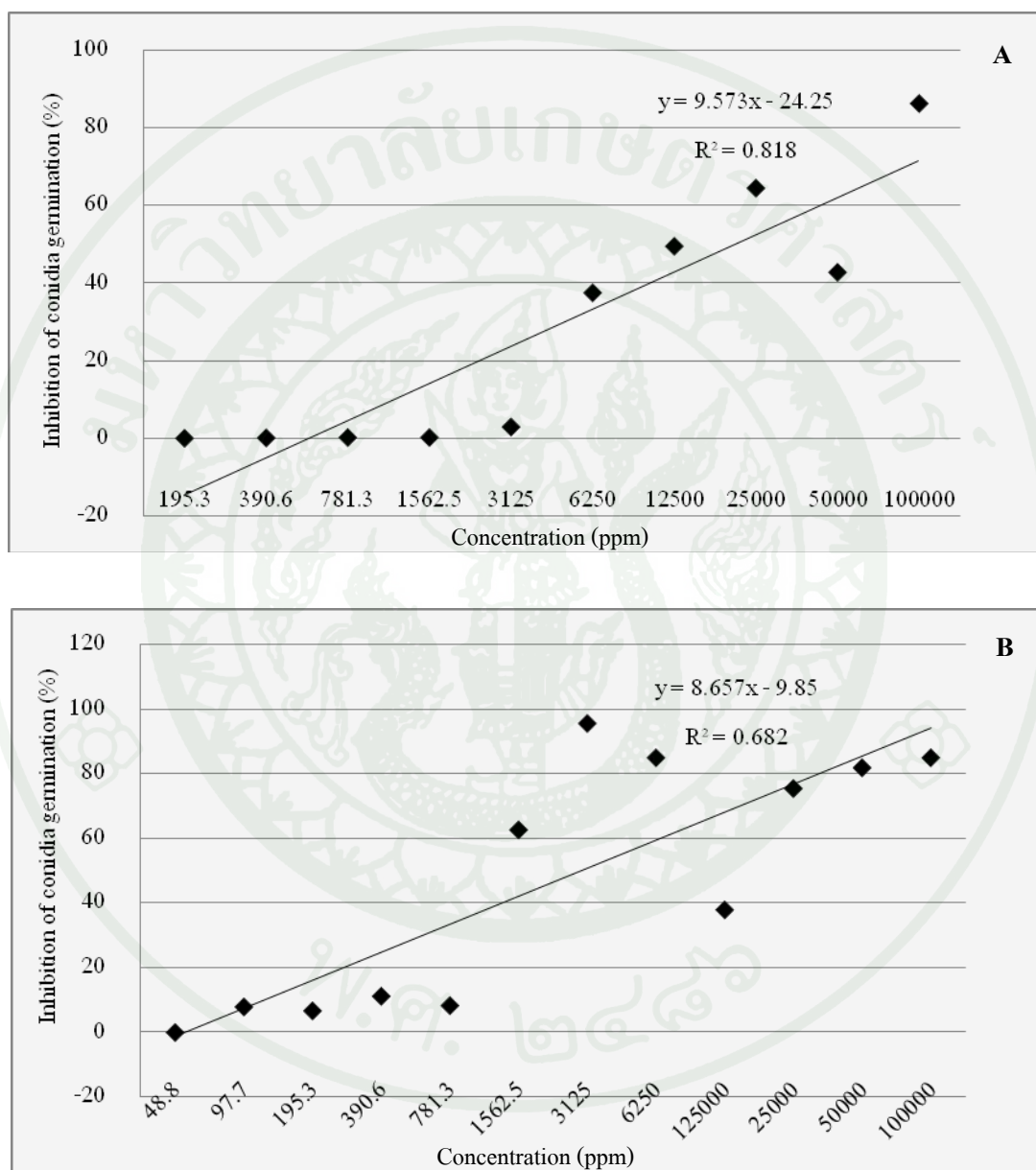
จากการศึกษาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดขมิ้นชันผงที่สามารถยับยั้งการงอก (MIC: minimum inhibitory concentration) ของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* พบว่า ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และ เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* ได้ คือ 6250 97.7 1562.5 และ 12500 ppm ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การยับยั้งการงอกของโคนิเดีย (%) เชื้อรา *P. digitatum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

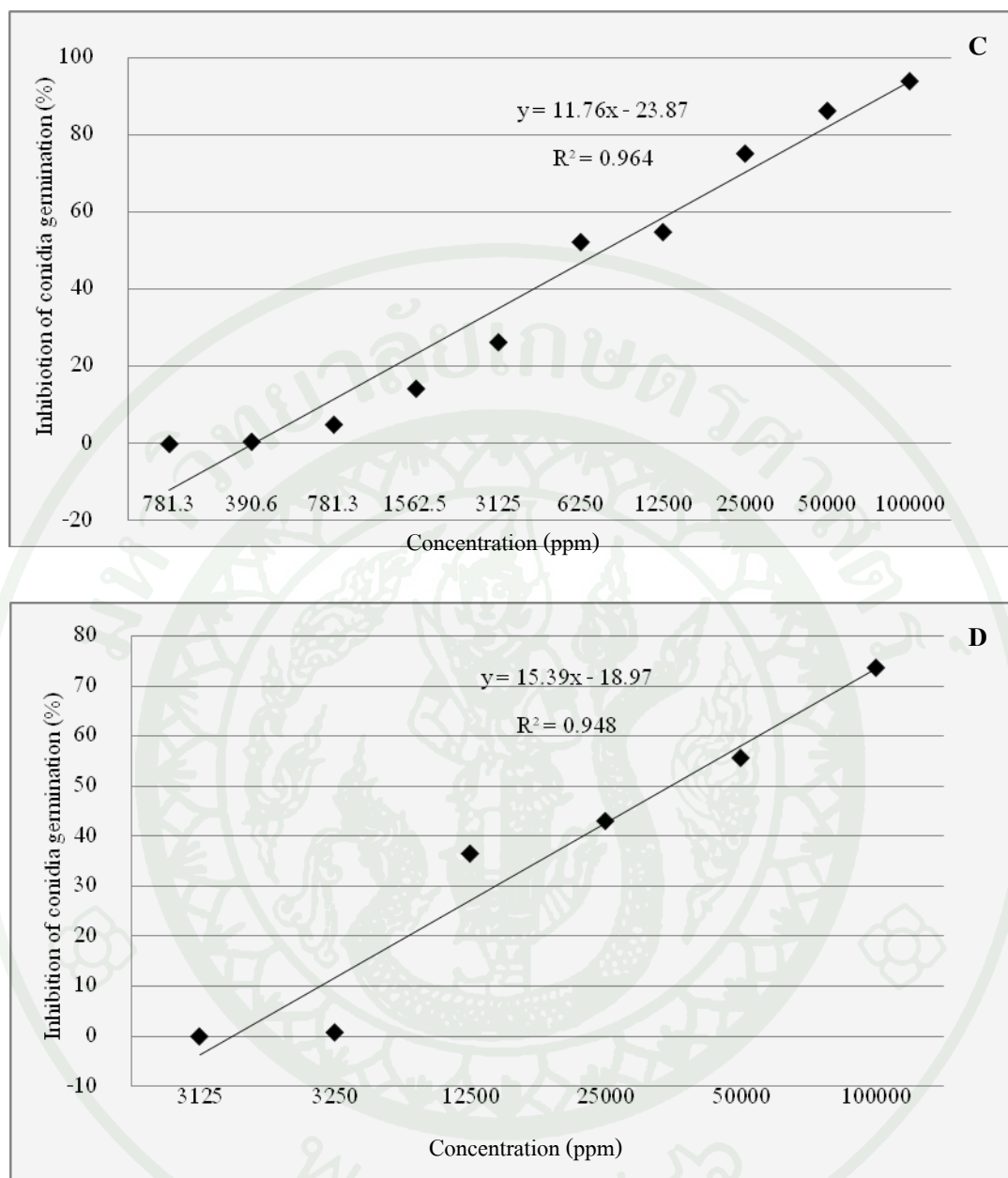
ระดับความเข้มข้นของ สารสกัดขมิ้นชันผง (ppm)	การยับยั้งการงอกของโคนิเดีย (%) ของเชื้อรา <i>P. digitatum</i>			
	ชนิดของตัวทำละลาย			
	เมทานอล ^{2/}	เอทานอล ^{2/}	เฮกเซน ^{2/}	เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน ^{1/2/}
0	0f	0g	0g	0e
0.2	0f	0g	0g	0e
0.4	0f	0g	0g	0e
0.8	0f	0g	0g	0e
1.5	0f	0g	0g	0e
3.1	0f	0g	0g	0e
6.1	0f	0g	0g	0e
12.2	0f	0g	0g	0e
24.4	0f	0g	0g	0e
48.8	0f	0g	0g	0e
97.7	0f	7.9fg	0g	0e
195.3	0f	6.7fg	0g	0e
390.6	0.1f	11.2f	0.6g	0e
781.3	0.2f	8.3fg	5g	0e
1562.5	0.2f	62.6d	14.3f	0e
3125	2.9f	95.5a	26.3e	0e
6250	37.5e	84.9b	52.2d	0.8e
12500	49.5d	37.9e	54.8d	36.5d
25000	64.5b	75.4c	75.1c	43c
50000	42.8c	81.8bc	86.15b	55.6b
100000	86.3a	84.9b	93.8a	73.6a

หมายเหตุ ^{1/} อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร)

^{2/} ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ตามวิธีวิเคราะห์ Duncan's New Multiple Range Test



ภาพที่ 8 การยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* (%) บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล (A) เอทานอล (B) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 การยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* (%) บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเฮกเซน (C) และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) (D) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

เมื่อได้ผลการเชิงเส้น (ภาพที่ 8 และ 9) จึงนำมาคำนวณหาค่า ED (effective dose) จากตารางที่ 5 พบว่า ประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงต่อการยับยั้งการงอก คือ ค่า ED₅₀ ของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) คือ 52.53 51.14 52.03 และ 51.23 ppm ตามลำดับ และค่า ED₉₀ ของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) คือ 92.53 91.14 92.03 และ 91.23 ppm ตามลำดับ ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 5 แสดงค่า MIC, ED₅₀ และ ED₉₀ ต่อการยับยั้งของโคนิเดียของเชื้อรา *P. digitatum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

ค่าการยับยั้ง (ppm)	ชนิดของตัวทำละลาย			
	เมทานอล	เอทานอล	เฮกเซน	เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน ^{1/}
MIC	6250	97.7	1562.5	12500
ED ₅₀	52.53	51.14	52.03	51.23
ED ₉₀	92.53	91.14	92.03	91.23

หมายเหตุ ^{1/} อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร)

4. การทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งด้วยสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

จากผลการทดสอบสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) 20% ที่ระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm มาใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า สารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm พบการเกิดโรค 40% และ 25% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) พบการเกิดโรค 60% ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 10)

จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล 20% สามารถควบคุมโรคได้เช่นเดียวกับสารสกัดสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% แต่เนื่องจากตัวทำละลายเมทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยและคงประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง จึงได้เลือกใช้สารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ในการทดลองครั้งต่อไป

ตารางที่ 6 จำนวนผลที่เป็นโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจาก
ขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:
เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) 20% ที่ระดับความ
เข้มข้น 0 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศา
เซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

ชุดการทดลอง	ระดับความเข้มข้นของ สารสกัดขมิ้นชันผง (ppm)	จำนวนผลที่เป็นโรค (%) ^{1/}
ชุดควบคุม (น้ำ)	0	60abcde
ชุดควบคุม (เมทานอล)	0	80cde
ชุดควบคุม (เอทานอล)	0	55ab
ชุดควบคุม (เฮกเซน)	0	95e
ชุดควบคุม เมทานอล:เอทา นอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ ปริมาตร)	0	80cde
เมทานอล	10000	35ab
	20000	50abcd
	30000	40ab
	40000	60abcde
	50000	55abcd
เอทานอล	10000	55abcd
	20000	45abc
	30000	25a
	40000	45abc
	50000	50abcd
เฮกเซน	10000	85de
	20000	80cde
	30000	80bcde
	40000	85cde

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชุดการทดลอง	ระดับความเข้มข้นของ สารสกัดขมิ้นชันผง (ppm)	จำนวนผลที่เป็นโรค (%) ^{1/}
เฮกเซน	50000	85de
เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน	10000	70bcde
อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร)	20000	45abc
	30000	60abcde
	40000	45abc
	50000	50abcd

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ตามวิธีวิเคราะห์ Duncan's New Multiple Range Test



ภาพที่ 10 การเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ภายหลังจากทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลาย 20% และระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (A), สารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm (B) และสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm (C) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

5. การทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งด้วยสารสกัดขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผง

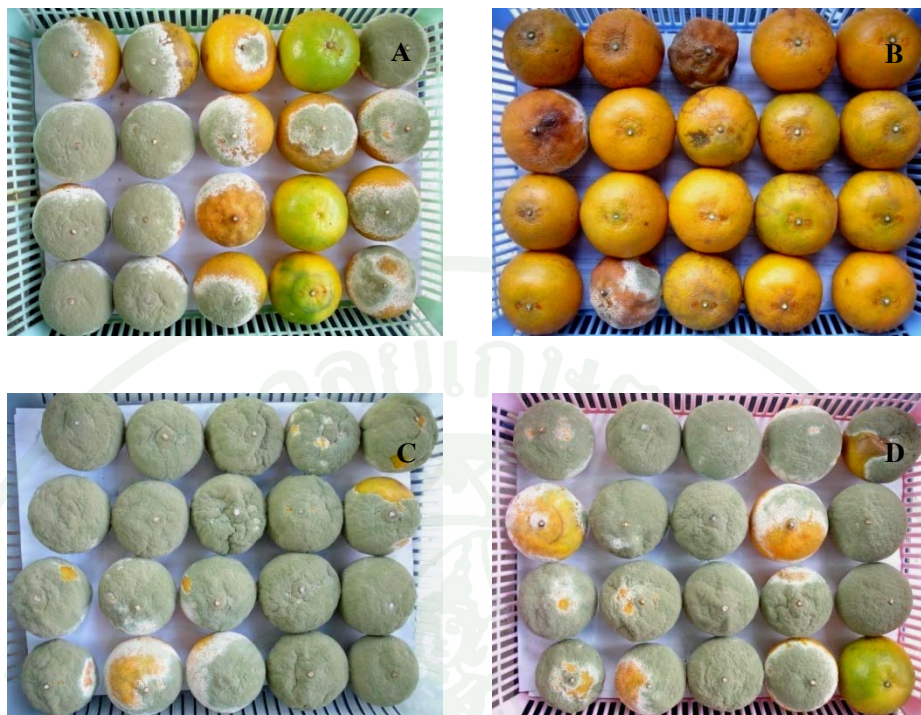
จากการทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งด้วยสารสกัดขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผง ที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ซึ่งได้จากผลการทดลองที่ 4 และหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า สารสกัดขมิ้นชันสดที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% สามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ดีที่สุด โดยพบการเกิดโรค 25% และความรุนแรงของโรค 19% ในขณะที่สารสกัดขมิ้นชันสดที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% พบการเกิดโรค 85% และความรุนแรงของโรค 66% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ น้ำ และเอทานอล 20% ที่พบการเกิดโรค 100% และ 95% ตามลำดับ ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 7, ภาพที่ 11)

ตารางที่ 7 จำนวนผลที่เป็นโรคและความรุนแรงของโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

ชุดการทดลอง	ความรุนแรงของโรค (%) ^{1/2/}	จำนวนผลที่เป็นโรค (%) ^{1/}
ชุดควบคุม (น้ำ)	100c	100c
ชุดควบคุม (เอทานอล 20%)	95c	95bc
ขมิ้นชันสด	66b	85b
ขมิ้นชันผง	19a	25a

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีวิเคราะห์ Duncan's New Multiple Range Test

^{2/} % พื้นที่ผิวของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เป็นโรคเฉลี่ยจาก 20 ผล



ภาพที่ 11 การเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ภายหลังจากทดสอบประสิทธิภาพของ สารสกัดสารสกัดจากขมิ้นชันสด (A), ขมิ้นชันผง (B) ที่ละลายในตัวทำละลาย เอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm, ชุดควบคุม (น้ำ) (C) และ ชุดควบคุม (เอทานอล 20%) (D) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

6. การควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งด้วยสารสกัดขมิ้นชันผงร่วมกับ ไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ที่สามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ ซึ่งได้จากผลการทดลองที่ 5 ร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) ที่มีค่า pH 4.5 แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า สารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm สามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ดีที่สุด โดยพบการเกิดโรค 10% และความรุนแรงโรค 0.75% ในขณะที่สารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) พบการเกิดโรค 40% และความรุนแรงโรค 10.5% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ น้ำ, เอทานอล 20%, 0.5% acetic acid และไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) ที่พบการเกิดโรค 95% 95% 100% และ 65% ตามลำดับ ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 8, ภาพที่ 12)

ตารางที่ 8 จำนวนผลที่เป็นโรคและความรุนแรงของโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

ชุดการทดลอง	ความรุนแรงของโรค (%) ^{1,2/}	จำนวนผลที่เป็นโรค (%) ^{1/}
ชุดควบคุม (น้ำ)	95c	95d
ชุดควบคุม (เอทานอล)	95c	95d
0.5% acetic acid	100c	100d
ไคโตแซน 2%	18.5b	65c
สารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm	0.75a	10a
สารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับไคโตแซน 2%	10.5ab	40b

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีวิเคราะห์ Duncan's New Multiple Range Test

^{2/} % พื้นที่ผิวของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เป็นโรคเฉลี่ยจาก 20 ผล



ภาพที่ 12 การเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวบนส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ภายหลังการทดสอบประสิทธิภาพของ สารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm (A), สารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) (B) และไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) (C) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ น้ำ (D), เอทานอล 20% (E) และ 0.5% acetic acid (F) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

7. การเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงร่วมกับสารเคมี imazalil

จากการทดสอบการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง โดยใช้สารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 10000 และ 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 500 และ 750 ppm แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า สารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm และสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 750 ppm สามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ดีที่สุด โดยพบไม่พบการเกิดโรคและความรุนแรงของโรค เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ น้ำและเอทานอล 20% พบการเกิดโรค 100% และ 95% ตามลำดับ ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 9, ภาพที่ 13 และ 14)

จึงทำการคัดเลือกสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm เพื่อทำการศึกษาต่อไปและเป็นชุดการทดลองที่เหมาะสมที่สุดในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง เนื่องจากชุดการทดลองดังกล่าวมีปริมาณความเข้มข้นของสารเคมี imazalil ได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ ร่วมกับการใช้สารสกัดจากพืช คือ ขมิ้นชันผง ที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น เพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและเกษตรกร อีกทั้งยังเป็นการลดต้นทุนการใช้สารเคมี imazalil ซึ่งเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการทดลองที่ตั้งไว้

ตารางที่ 9 จำนวนผลที่เป็นโรคและความรุนแรงของโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในดัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 10000 และ 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 500 และ 750 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

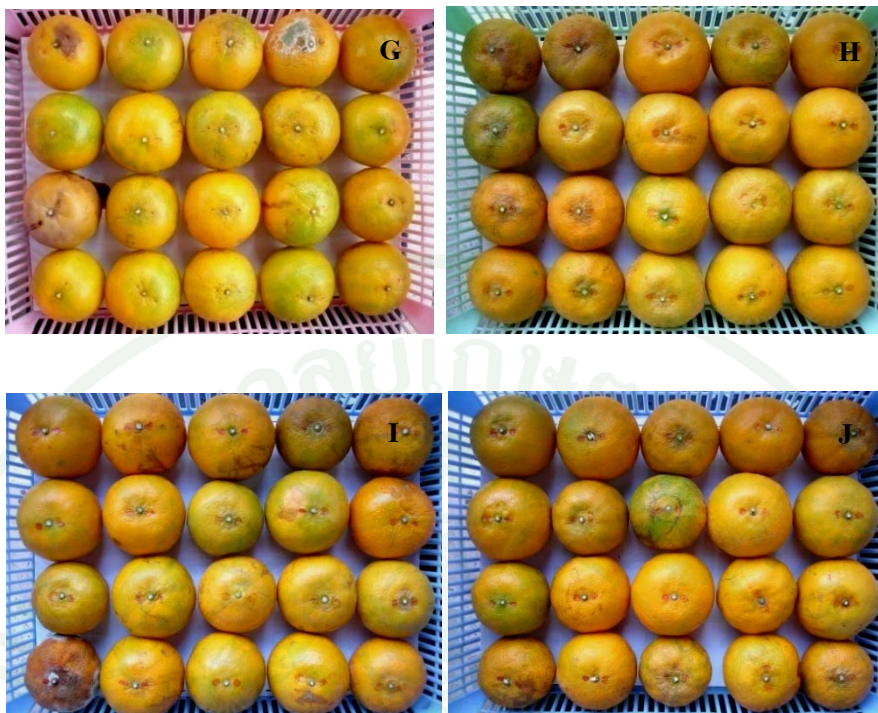
ชุดการทดลอง	ความรุนแรงของโรค (%) ^{1,2/}	จำนวนผลที่เป็นโรค (%) ^{1/}
ชุดควบคุม (น้ำ)	100d	100d
ชุดควบคุม (เอทานอล 20%)	95d	95d
ขมิ้นชันผง ระดับความเข้มข้น 10000 ppm	55c	55c
ขมิ้นชันผง ระดับความเข้มข้น 30000 ppm	15ab	15ab
ขมิ้นชันผง ระดับความเข้มข้น 10000 ppm	15ab	50c
ร่วมกับ imazalil 250 ppm		
ขมิ้นชันผง ระดับความเข้มข้น 10000 ppm	14.5ab	35bc
ร่วมกับ imazalil 500 ppm		
ขมิ้นชันผง ระดับความเข้มข้น 10000 ppm	1.75a	15ab
ร่วมกับ imazalil 750 ppm		
ขมิ้นชันผง ระดับความเข้มข้น 30000 ppm	0a	0a
ร่วมกับ imazalil 250 ppm		
ขมิ้นชันผง ระดับความเข้มข้น 30000 ppm	5ab	5a
ร่วมกับ imazalil 500 ppm		
ขมิ้นชันผง ระดับความเข้มข้น 30000 ppm	0a	0a
ร่วมกับ imazalil 750 ppm		
imazalil 250 ppm	5.5ab	15ab
imazalil 500 ppm	19.5b	35bc
imazalil 750 ppm	1a	20ab

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีวิเคราะห์ Duncan's New Multiple Range Test

^{2/} % พื้นที่ผิวของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เป็นโรคเฉลี่ยจาก 20 ผล



ภาพที่ 13 การเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ภายหลังจากทดสอบประสิทธิภาพของ สารสกัดจากมันชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 10000 (C), 30000 ppm (D), สารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm (E) และสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm 500 ppm (F) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน



ภาพที่ 14 การเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ภายหลังการทดสอบประสิทธิภาพของ สารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm ร่วมกับ imazalil 750 ppm (G) และสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm (H), สารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับ 500 ppm (I) และสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับ 750 ppm (J) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

8. การยืดอายุการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

เมื่อนำผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งจุ่มในสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน จากตารางที่ 10 พบว่า ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในน้ำ แสดงอาการลักษณะซ้ำและ นิมของโรคผลเน่าราสีเขียวให้เห็นในวันที่ 2 หลังจากปลูกเชื้อ (ภาพที่ 15) มีขนาดของแผล 15 ตารางเซนติเมตร และแผลมีการขยายขนาดมากขึ้น จนกระทั่งเชื้อรา *P. digitatum* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรค ได้สร้างเส้นใยสีขาวปกคลุมทั่วทั้งผลและต่อมาจึงสร้างโคนิเดียบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ในขณะที่ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm แสดงอาการ

ของโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ในวันที่ 6 หลังจากปลูกเชื้อ และมีขนาดของแผล 12 ตารางเซนติเมตร เมื่อเทียบกับผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งในวันเดียวกันที่จุ่มในน้ำ มีขนาดของแผล 34 เซนติเมตร และสามารถชะลอการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ 4 วัน หลังจากปลูกเชื้อ

ตารางที่ 10 การพัฒนาขนาดแผลของโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน

วันที่	ค่าเฉลี่ยขนาดแผล (ตารางเซนติเมตร)	
	จุ่มในน้ำ	จุ่มในสารสกัดขมิ้นชัน 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm
0	0	0
1	0	0
2	15	0
3	22	0
4	29	0
5	32	0
6	34	12



ภาพที่ 15 การขยายขนาดแผลของโรคผลเน่าราสีเขียวบนส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง หลังจากปลูกเชื้อรา *P. digitatum* แล้วจุ่มในน้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน

9. การจุ่มผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

จากการทดลองจุ่มผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งในน้ำและสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่า ผลส้มที่จุ่มในสารสกัดจากขมิ้นชันผง ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm ลดการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มได้ โดยพบการเกิดโรค 5% และพบความรุนแรงของโรค 0.5% ในขณะที่ผลส้มที่จุ่มในน้ำ พบการเกิดโรค 85% และความรุนแรงของโรค 70.25% (ตารางที่ 11, ภาพที่ 16)

ตารางที่ 11 จำนวนผลที่เป็นโรคและความรุนแรงของโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ที่จุ่มในน้ำและสารสกัดจากขมิ้นชันผง ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน

ชุดการทดลอง	ความรุนแรงของโรค (%) ^{1/}	จำนวนผลที่เป็นโรค (%)
ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งเคลือบด้วยน้ำ	70.25	85
ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งเคลือบด้วยสารสกัดขมิ้นชันผง 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil 250 ppm	0.5	5

หมายเหตุ ^{1/}% พื้นที่ผิวของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เป็นโรคเฉลี่ยจาก 20 ผล



ภาพที่ 16 อาการโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง หลังจากทำการปลูกเชื้อรา

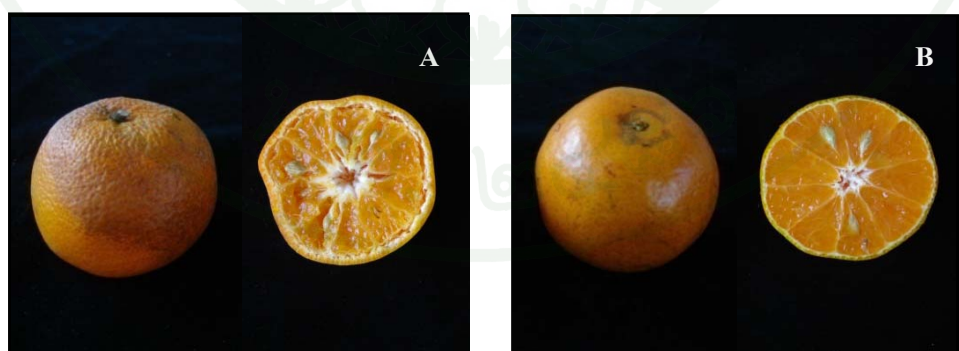
P. digitatum แล้วจุ่มในน้ำ และสารสกัดขมิ้นชันผง 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm โดยเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน

- A. ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในน้ำก่อนเก็บรักษา
- B. ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในสารสกัดขมิ้นชันผง 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm ก่อนเก็บรักษา
- C. ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในน้ำหลังจากเก็บรักษา
- D. ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในสารสกัดขมิ้นชันผง 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm หลังจากเก็บรักษา

จากตารางที่ 12 เมื่อวัดค่าความแน่นเนื้อของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งโดยใช้เครื่อง fruits handness tester ทดสอบที่ผิวผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS: total soluble solid) โดยใช้เครื่อง hand refractometer ของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในน้ำ และสารสกัดขมิ้นชันผง 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่า ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในน้ำ มีลักษณะเหี่ยว โดยมีค่าความแน่นเนื้อ 0.42 g/mm² และมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 15.7 °Brix ในขณะที่ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในสารสกัดขมิ้นชันผง 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm มีลักษณะแข็ง มีค่าความแน่นเนื้อ 0.76 g/mm² และมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 13 °Brix (ภาพที่ 17)

ตารางที่ 12 ค่าความแน่นเนื้อและปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS: total soluble solid) ของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในน้ำ และสารสกัดขมิ้นชันผง 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 6 วัน

ชุดการทดลอง	ความแน่นเนื้อ (g/mm ²) ^{1/}	ปริมาณของแข็งที่ ละลายน้ำได้ (°Brix) ^{1/}
ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในน้ำ	0.42	15.7
ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในสารสกัดขมิ้นชันผง 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm	0.76	13



ภาพที่ 17 ลักษณะของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังจากจุ่มในน้ำ (A) และสารสกัดขมิ้นชันผง 30000 ppm ร่วมกับ imazalil 250 ppm (B) หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน

10. ประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่เก็บรักษาสารสกัดขมิ้นชันผงไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 13 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 เดือน ในยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* ที่ค่า $R_f = 0.89$ และการทดสอบ activity ของสารออกฤทธิ์ด้วยการพ่นสาร anisaldehyde reagent พบว่า สารสกัดขมิ้นชันผงที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 เดือน (ตารางที่ 13) พบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *C. herbarium* ลดลงตั้งแต่เดือนที่ 1 จนกระทั่งเดือนที่ 2 และ 3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบ activity ของสารออกฤทธิ์ พบว่า สารสกัดขมิ้นชันผงที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงสีที่ปรากฏที่ค่า $R_f = 0.62$ และ สารสกัดขมิ้นชันผงที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงสีที่ปรากฏที่ค่า $R_f = 0.62$ เช่นกัน ในส่วนของสารสกัดขมิ้นชันผงที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 เดือน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *C. herbarium* ลดลง ในเดือนที่ 13 และเมื่อทำการทดสอบ activity ของสารออกฤทธิ์ พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงสีที่ปรากฏที่ค่า $R_f = 0.48$ (ตารางที่ 14)

เมื่อครบระยะเวลาที่เก็บรักษาสารสกัดขมิ้นชันผงในแต่ละอุณหภูมิ จึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* พบว่า สารสกัดขมิ้นชันผงที่เก็บไว้ในแต่ละอุณหภูมียังคงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* บนแผ่น TLC ได้ (ภาพที่ 18)

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* บนแผ่น TLC ที่ค่า $R_f = 0.89$ เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 เดือน

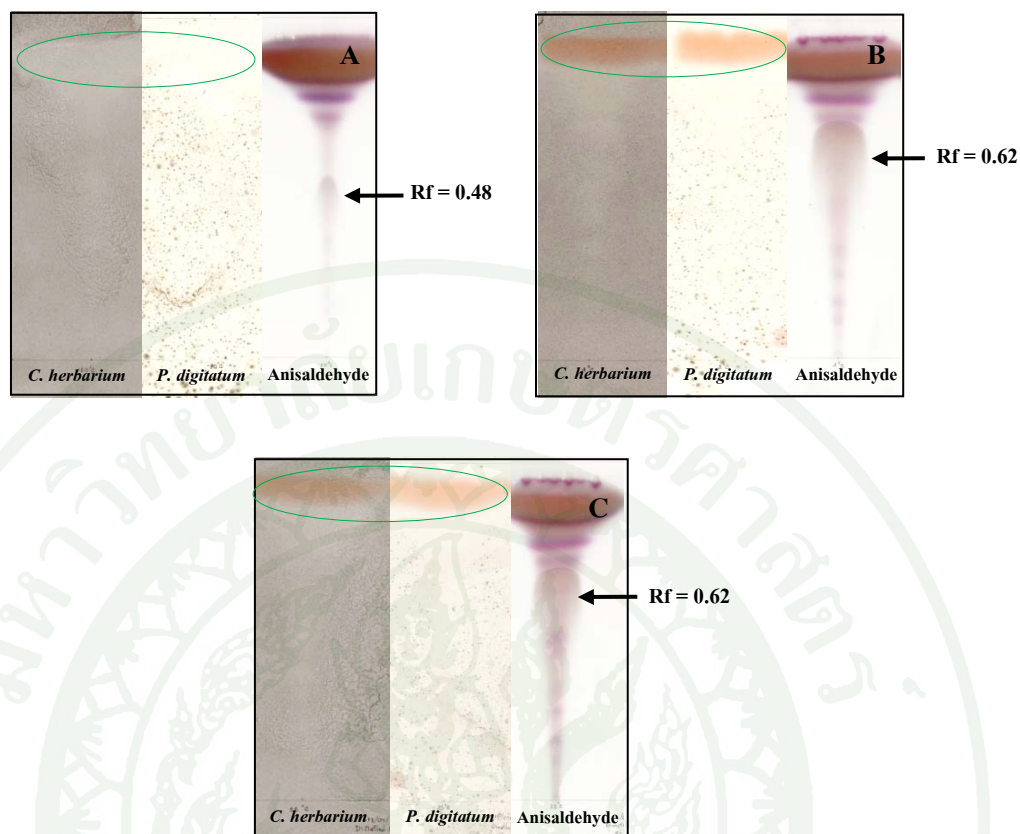
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>C. herbarium</i> บน TLC plate				
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)				
	0	1	2	3	4
-20	++++	++++	++++	++++	++++
4	+++	++	++	+	+
25	+++	++	+	+	+

ตารางที่ 14 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* บน TLC ที่ค่า $R_f = 0.89$ เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตั้งแต่เดือนที่ 9 ถึงเดือนที่ 13

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>C. herbarium</i> บน TLC plate				
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)				
	9	10	11	12	13
-20	++++	++++	++++	++++	+

หมายเหตุ: ระดับที่ใช้สำหรับประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* ที่ค่า $R_f = 0.89$ ต่อระยะเวลาการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิต่างๆ

เชื้อรา <i>C. herbarium</i> สามารถเจริญได้แต่ยังพบ clear zone	+
เกิด clear zone ขนาดพื้นที่ $0.1-5.0 \text{ cm}^2$	++
เกิด clear zone ขนาดพื้นที่ $5.1-10.0 \text{ cm}^2$	+++
เกิด clear zone ขนาดพื้นที่ $10.1-15.0 \text{ cm}^2$	++++
เกิด clear zone ขนาดพื้นที่ มากกว่า 15 cm^2	+++++
ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>C. herbarium</i>	-



ภาพที่ 18 ประสิทธิภาพของสารสกัดน้ำมันชั้นผงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 13 เดือน (A), ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (B) และ 25 องศาเซลเซียส (C) เป็นระยะเวลา 4 เดือน (วงกลมสีเขียว คือ แถบแสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* ที่ค่า $R_f = 0.89$)

11. การแยกสารตามความสามารถการละลายของสารสกัดน้ำมันชั้นผงโดยวิธี column chromatography (CC)

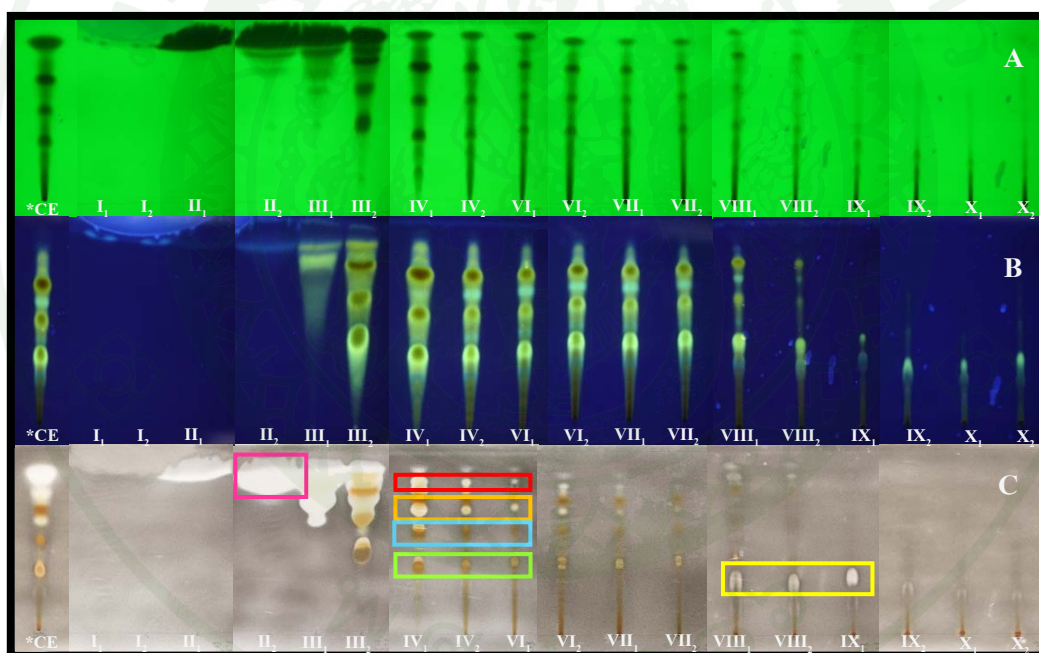
สารสกัดน้ำมันชั้นผงที่ละลายในตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และ เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) และเมื่อทำแยกสารตามความสามารถการละลายของสารสกัดน้ำมันชั้นผง ด้วยวิธีการ column chromatography (CC) สามารถแยกสารได้ 18 fractions

12. Bio-activity assay

12.1 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการวิเคราะห์ชนิดของสารออกฤทธิ์

12.1.1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยสารสกัดขมิ้นชันผงและ fractions ต่างๆ

เมื่อทำการแยกสารออกฤทธิ์ออกจากสารสกัดขมิ้นชันผง โดยวิธีการ column chromatography นั้น สามารถแยกได้ 18 fractions แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium herbarium* และ *Penicillium digitatum* และทดสอบ activity ของสารออกฤทธิ์โดยการพ่นด้วย anisaldehyde reagent บนแผ่น TLC ดังภาพที่ 19

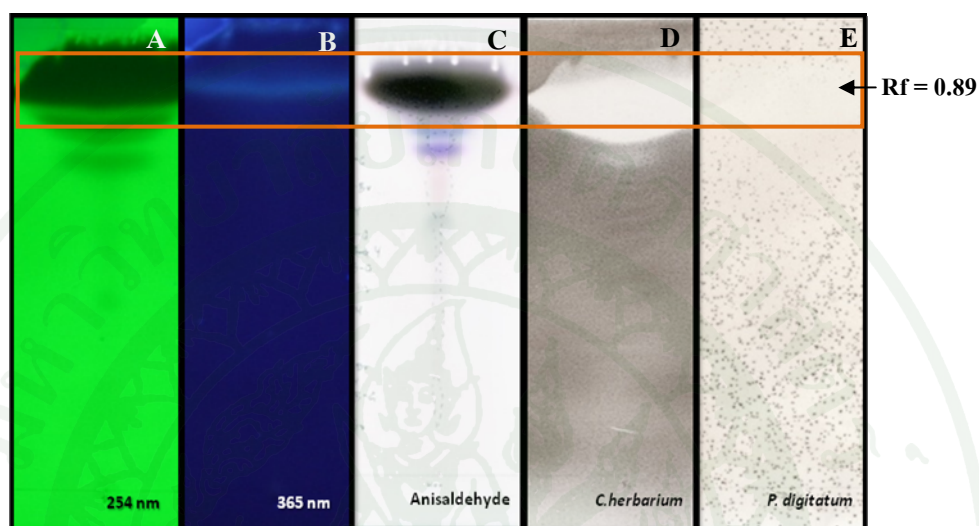


* CE คือ crude extract of turmeric (สารสกัดขมิ้นชันผง)

ภาพที่ 19 ความสามารถของสารสกัดขมิ้นชันผงและ fractions ต่างๆ เมื่อดูภายใต้แสง UV

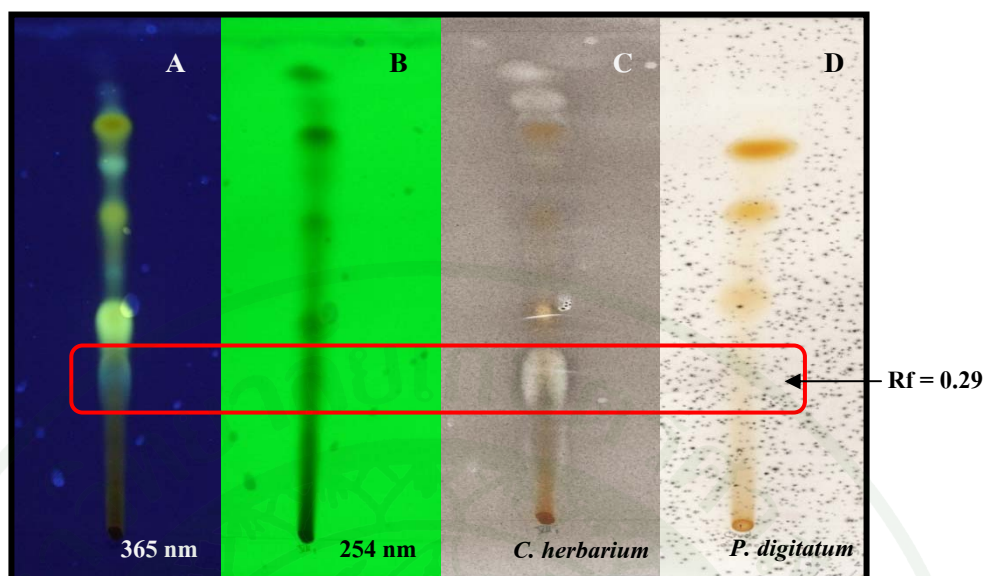
254 nm (A), 365 nm (B) และการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* (C) บนแผ่น TLC (สีเหลืองสีเหลือง คือ sample B สีเหลืองสีชมพู คือ sample C สีเหลืองสีส้ม คือ sample D สีเหลืองสีเขียว คือ sample E สีเหลืองสีแดง คือ sample F และ สีเหลืองสีฟ้า คือ sample G)

จากภาพที่ 20 พบว่า fraction II₂ ที่ค่า Rf = 0.89 เกิด clear zone ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* และเมื่อพ่นด้วย anisaldehyde reagent เกิดสีน้ำตาลของ polyacetylene (Merck, 1980)



ภาพที่ 20 ความสามารถของ fraction II₂ ที่ค่า Rf = 0.89 เมื่อดูภายใต้แสง UV 254 nm (A), 365 nm (B), ทดสอบ activity ของสารออกฤทธิ์โดยการพ่น anisaldehyde reagent (C) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* (D) และ *P. digitatum* (E) บนแผ่น TLC

และนอกจากนี้ยังพบว่า fractions VII₁, VII₂ และ VIII₁ ที่ค่า Rf = 0.29 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* บนแผ่น TLC ได้เช่นกัน (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 ความสามารถของ fractions VII₁, VII₂ และ VIII₁ ที่เป็นสารออกฤทธิ์ เมื่อฉายภายใต้แสง UV 365 nm (A), 254 nm (B), การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* (C) และ *P. digitatum* (D) บนแผ่น TLC

แล้วจึงนำ fraction II₂ ที่ค่า Rf = 0.89 และ fraction VII₁, VII₂ และ VIII₁ ที่ค่า Rf = 0.29 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่นำไปวิเคราะห์หาชนิดของสารออกฤทธิ์ โดยก่อนการวิเคราะห์หาชนิดของสารออกฤทธิ์นั้น ได้นำ fraction ดังกล่าวทำให้มีความบริสุทธิ์ขึ้นในเบื้องต้นก่อนนำไปวิเคราะห์

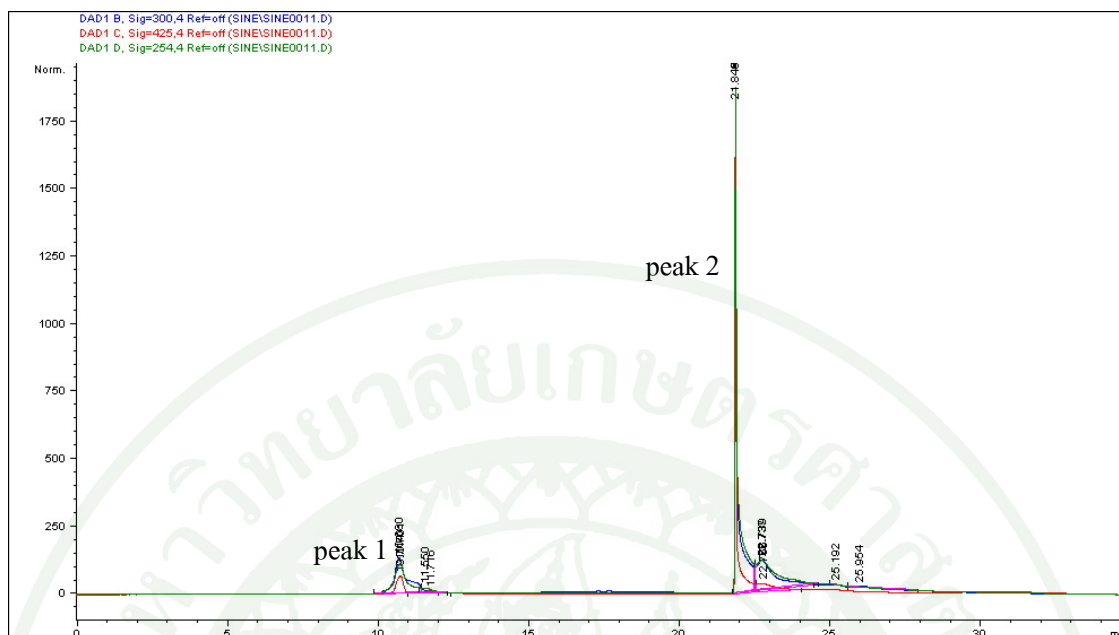
การทำให้สารออกฤทธิ์ของ fraction II₂ ที่ค่า Rf = 0.89 ให้มีความบริสุทธิ์ขึ้น โดย spot ลงบน preparative layer chromatography (PLC) plates (PLC silica gel 60 F₂₅₄, 0.5 mm, 20 Glass plates 20X20 cm, Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, Germany) แล้วนำมา develop ใน tank ที่บรรจุ chloroform: methanol ในอัตราส่วน 96:4 (โดย ปริมาตร/ ปริมาตร) จึงขูดซิลิกาออกจากแผ่น PLC plates ที่ค่า Rf = 0.89 ซึ่งเป็นแถบที่แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* ได้ แล้วนำมาละลายในตัวทำละลายเมทานอล หลังจากนั้นจึงกรองด้วยกรวยกรอง (Filter funnels, Artikel-Nr. 21504 Inhalt/ME 1 ST, Filternutsche 50 ml Por. 4 ของ บริษัท ROBU Glasfilter-Geräte GmbH) จะได้สารออกฤทธิ์ คือ sample C ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์หาชนิดของสารออกฤทธิ์ต่อไป

ในส่วนของ fraction VII₁, VII₂ และ VIII₁ ที่ค่า Rf = 0.29 นั้น การทำให้สารออกฤทธิ์ดังกล่าวมีความบริสุทธิ์ขึ้น โดยการรวมทั้ง 3 fractions แล้ว spot ลงบน preparative layer chromatography (PLC) plates จึงนำมา develop ใน tank ที่บรรจุ chloroform: methanol ในอัตราส่วน 96:4 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร) จึงจุดซิติลิกออกจากแผ่น PLC plates ที่ค่า Rf = 0.29 ซึ่งเป็นแถบที่แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* ได้ แล้วนำมาละลายในตัวทำละลายเมทานอล หลังจากนั้นจึงกรองด้วยกรวยกรอง จะได้สารออกฤทธิ์ คือ sample B ที่จะนำไปวิเคราะห์หาชนิดของสารออกฤทธิ์ต่อไป

12.1.2 การวิเคราะห์หาชนิดของสารออกฤทธิ์

เมื่อนำส่วนของสารออกฤทธิ์ที่พบ clear zone ของ fraction II₂ ที่ค่า Rf = 0.89 คือ sample C โดยการแยก sample C ให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) และนำไปวิเคราะห์หาชนิดของสารออกฤทธิ์ด้วยเครื่อง GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) โดยส่งวิเคราะห์ที่กรมวิทยาศาสตร์บริการ พบว่า สารออกฤทธิ์หลัก คือ สาร *ar* - turmerone

ในการวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ของ sample B คือ clear zone ของ fraction VII₁, VII₂ และ VIII₁ ที่ค่า Rf = 0.29 โดยการแยก sample B ให้มีความบริสุทธิ์ขึ้นด้วยเครื่อง HPLC พบว่าสามารถแยกสารได้ 2 ชนิด คือ peak 1 และ peak 2 (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 UV spectra ของสารออกฤทธิ์ที่ทำการแยกได้จากตัวอย่าง sample B ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC คือ peak 1 และ peak 2

Condition ในการแยกสารออกฤทธิ์ sample B ด้วยเครื่อง HPLC

Column: P/No. : OOG-4436-NO
 Desc. : Gemini 10 u C18 110A
 Size : 250x10.00 mm 10 micron
 S/No : 384635-1

Mobile phase: acetonitrile 100%

Flow rate: 1.3 mL/min for 35 min

Stop time: 35 min

Column temperature: 29 - 36.3 °C

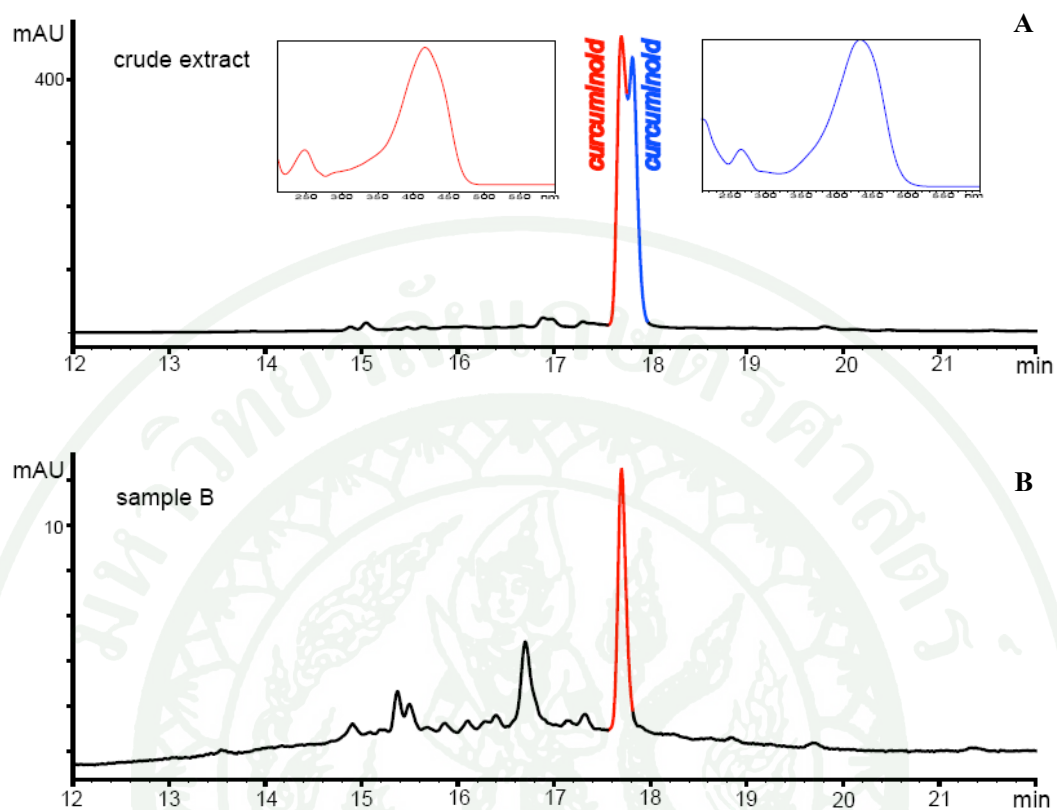
Sample volume: 80 µL was injected concentration 100 mg/mL

Visible absorbance: 254 300 and 425 nm

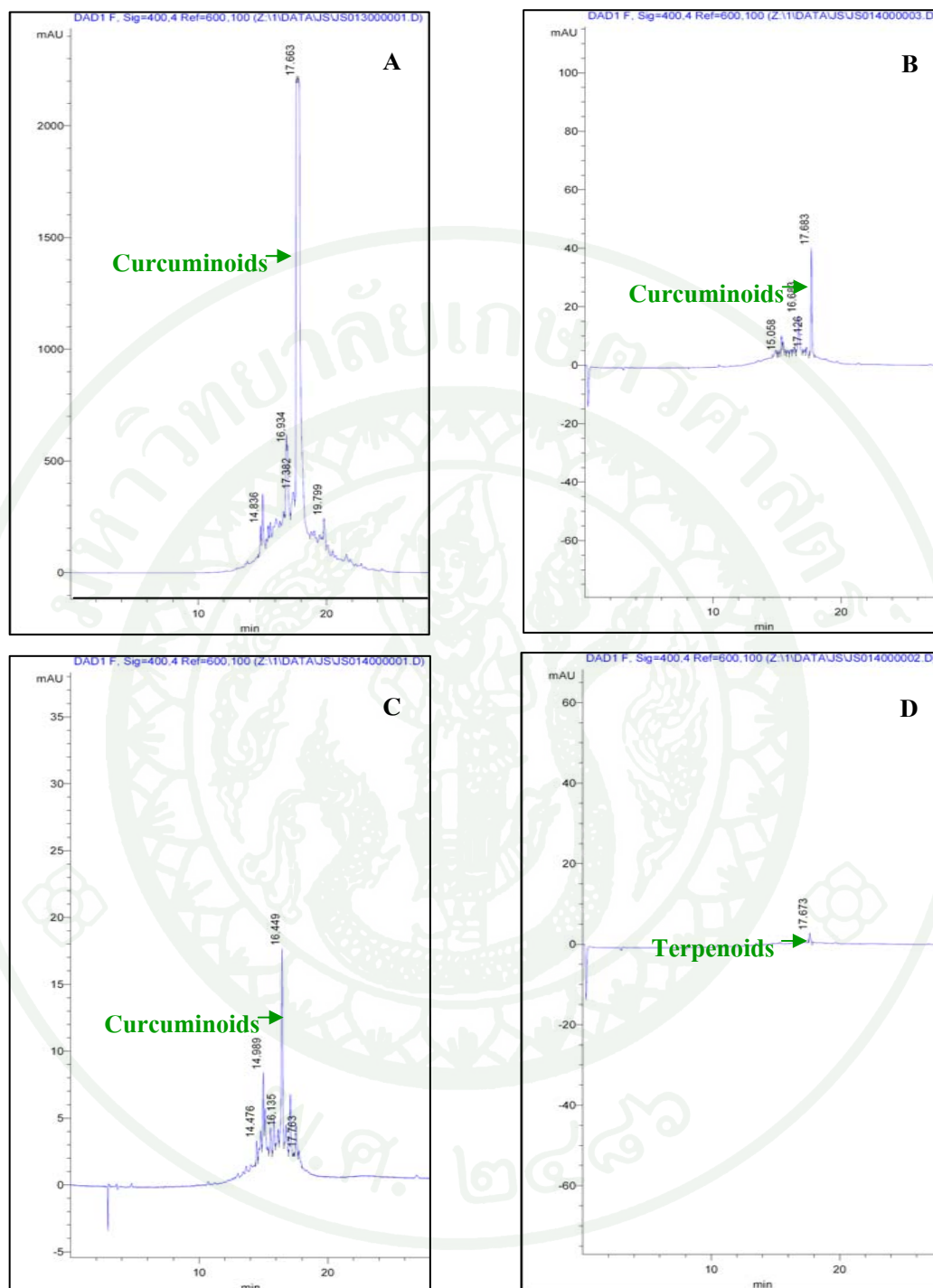
หลังจากนั้นจึงหาชนิดของกลุ่มสารของสารสกัดขมิ้นชันผง (crude extract), sample B peak 1 และ peak 2 โดยนำตัวอย่างดังกล่าวมาเทียบค่า UV spectra กับสาร standard ของกลุ่ม curcuminoids และ terpenoids จาก Department of systemic and evolutionary botany, University of Vienna, Austria โดยใช้เครื่อง HPLC พบว่า สารสกัดขมิ้นชันผง (crude extract) sample B และ peak 1 ภายใต UV spectra ที่ค่าการดูดกลืนแสง UV 400 nm และช่วง retention time เท่ากับ 17.663, 17.683 และ 16.669 นาที ตามลำดับ มีค่า UV spectra ใกล้เคียงกับสารในกลุ่มของ curcuminoids มาก จึงคาดว่าสารออกฤทธิ์ดังกล่าวอาจจะเป็นสารในกลุ่มของ curcuminoids (ภาพที่ 23 และ 24) และ peak 2 ภายใต UV spectra ที่ค่าการดูดกลืนแสง UV 400 nm และช่วง retention time เท่ากับ 17.673 นาที คาดว่าจะเป็นสารในกลุ่มของ terpenoids (ภาพที่ 24)

**Condition ในการแยกสารสกัดขมิ้นชันผง (crude extract),
sample B, peak 1 และ peak 2 ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC**

1. HPLC รุ่น Agilent 1100 Series with UV-VIS DAD
2. Column: Spherisorb ODS2 C18, 250 x 4,6mm, 5 μ m
3. Eluent: A: 15 μ mol ortho-Phosphoric acid
and 1.5 μ mol Tetrabutylammoniumhydroxide in water
B: Methanol, gradient grade
4. Injection volume: 10mL
5. Flow rate: 1 mL/min

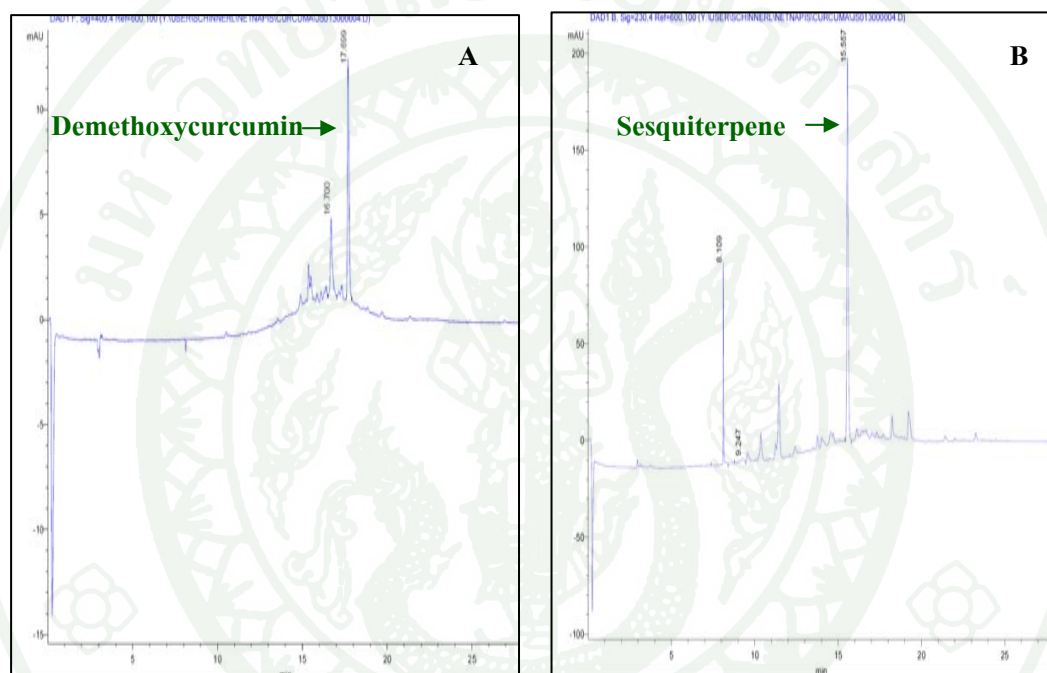


ภาพที่ 23 สารกลุ่ม curcuminoids คือ เส้นสีแดงและน้ำเงิน ที่พบในสารสกัดขมิ้นชันผง (crude extract) (A) และเส้นสีแดงที่พบในสารออกฤทธิ์ คือ sample B (B) เมื่อนำมาเทียบค่า UV spectra ที่ค่าการดูดกลืนแสง UV 400 nm โดยใช้เครื่อง HPLC



ภาพที่ 24 สารกลุ่ม curcuminoids ที่พบในสารสกัดมันชันผง (crude extract) (A) sample B (B) peak 1 (C) และ peak 2 (D) เป็นสารกลุ่ม terpenoids เมื่อนำมาเทียบค่า UV spectra ที่ค่าการดูดกลืนแสง UV 400 nm โดยใช้เครื่อง HPLC

หลังจากนั้นได้นำ sample B มาเทียบค่า UV spectra กับสาร standard คือ demethoxycurcumin และ sesquiterpene จาก Department of systemic and evolutionary botany, University of Vienna, Austria โดยใช้เครื่อง HPLC พบว่า sample B พบว่า ภายใต UV spectra ที่ค่าการดูดกลืนแสง UV 400 nm ช่วง retention time เท่ากับ 17.699 นาที คาดว่าจะเป็น demethoxycurcumin และภายใต UV spectra ที่ค่าการดูดกลืนแสง UV 230 nm ช่วง retention time เท่ากับ 15.557 นาที คาดว่าจะเป็นสาร sesquiterpene (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 สารออกฤทธิ์ที่พบในสารสกัดขมิ้นชันผง sample B ภายใต UV-DAD detection ที่ค่าการดูดกลืนแสง UV 400 (A) และ 230 nm (B) โดยใช้เครื่อง HPLC

ในทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ทั้ง 18 fractions โดยพบตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* จากการทดลองที่ 12.1 ได้แก่ sample B และ sample C ดังที่กล่าวไปข้างต้น แล้วนอกจากนี้ยังพบตัวอย่างที่ปรากฏแถบ clear zone คือ sample D E F และ G (ตารางที่ 15, ภาพที่ 19) จึงนำตัวอย่างดังกล่าวนี้และสารสกัดขมิ้น (sample A) ไปทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระและเซลล์มะเร็งปอดของคนต่อไป

ตารางที่ 15 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ Bio-activity assay และค่า Rf ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium*

ชื่อตัวอย่าง	สารสกัด/fraction	ค่า Rf ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>C. herbarium</i>
sample A*	สารสกัดขมิ้นชั้นผง	
sample B	VII ₁ +VII ₂ +VIII ₁	0.29
sample C	II ₂	0.89
sample D	IV ₁ +IV ₂ +V ₁	0.67
sample E	IV ₁ +IV ₂ +V ₁	0.37
sample F	IV ₁ +IV ₂ +V ₁	0.80
sample G	IV ₁ +IV ₂ +V ₁	0.63

* sample A เป็นสารสกัดขมิ้นชั้นผง เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ

12.2 ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารสกัดขมิ้นชั้นผง และ samples ต่างๆ

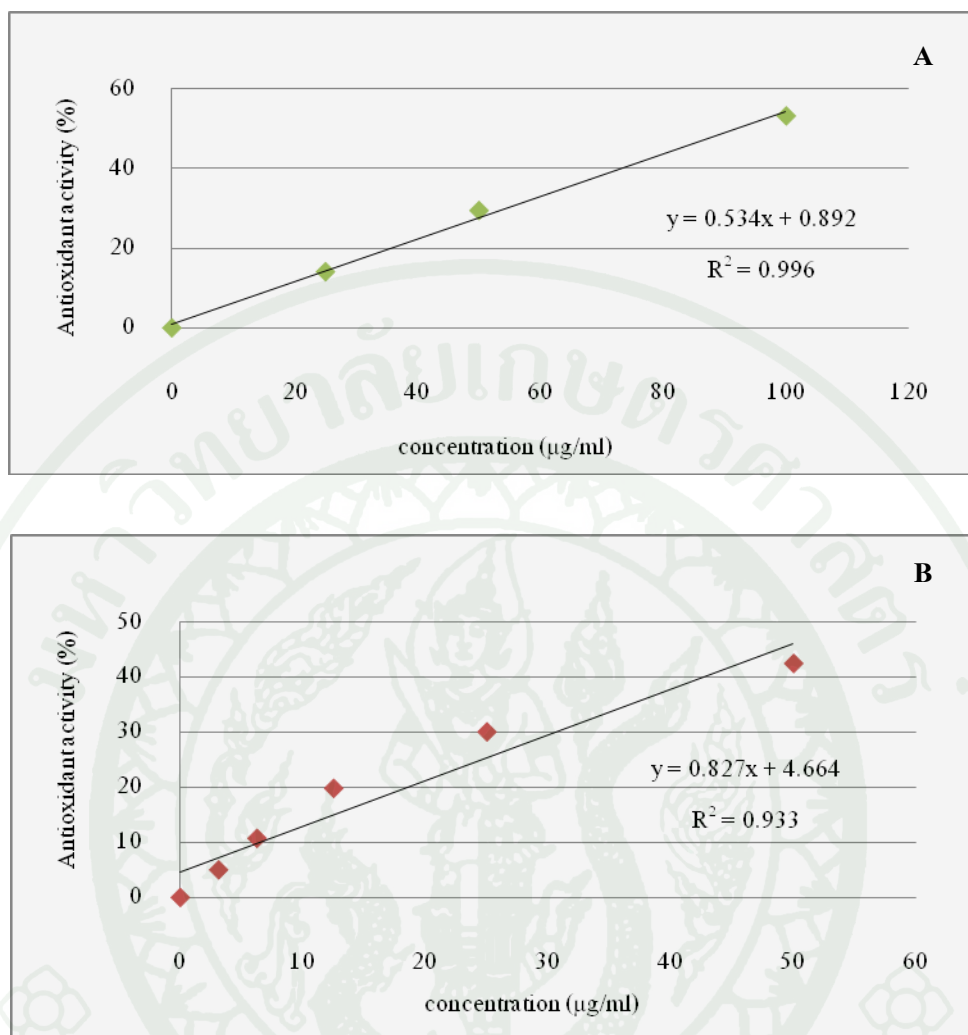
จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระในสารสกัดขมิ้นชั้นผงโดยเตรียมสารสกัดขมิ้นชั้นผงและ samples ต่างๆ ได้แก่ สารสกัดขมิ้นชั้นผง (sample A), fraction VII₁, VII₂, VII₃ ค่า Rf = 0.29 (sample B), fraction II₂ ค่า Rf = 0.89 (sample C), fraction IV₁+IV₂+V₁ ค่า Rf = 0.67 (sample D), fraction IV₁+IV₂+V₁ ค่า Rf = 0.37 (sample E), fraction IV₁+IV₂+V₁ ค่า Rf = 0.8 (sample F) และ fraction IV₁+IV₂+V₁ ค่า Rf = 0.63 (sample G) ที่ได้ทดสอบแล้วว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* ด้วยวิธี Bio-activity assay บนแผ่น TLC

จากผลการทดลองที่ 12.1 นำมาทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radial scavenging assay โดยการหาค่า antioxidant activity (%) และ the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร สารสกัดขมิ้นชันผง (sample A) มี antioxidant activity เท่ากับ 77.89% และ IC_{50} คือ 54.82 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในขณะที่ สารต้านอนุมูลอิสระ α -Tocopherol มี antioxidant activity เท่ากับ 76.68% และ IC_{50} เท่ากับ 91.96 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดขมิ้นชันผง (sample A) และสารต้านอนุมูลอิสระ α -Tocopherol มีค่า antioxidant activity มากที่สุด ที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 16, ภาพที่ 26)

ตารางที่ 16 antioxidant activity (%) ที่ระดับความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ของ α -Tocopherol sample A sample B sample C sample D sample E sample F และ sample G

ชุดการทดลอง	antioxidant activity (%) ^{1/}	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
α -Tocopherol	76.68a	91.96
sample A	77.89a	54.82
sample B	11.55c	> 13050
sample C	3.59d	> 13050
sample D	15.14c	> 13050
sample E	27.49b	1212.88
sample F	15.34c	> 13050
sample G	31.27b	13050

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ตามวิธีวิเคราะห์ Duncan's New Multiple Range Test



ภาพที่ 26 antioxidant activity (%) ของ α -Tocopherol (A) และ sample A (B) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

12.3 ศึกษาการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (anticancer activity) ของสารสกัดขมิ้นชันผงและ samples ต่างๆ

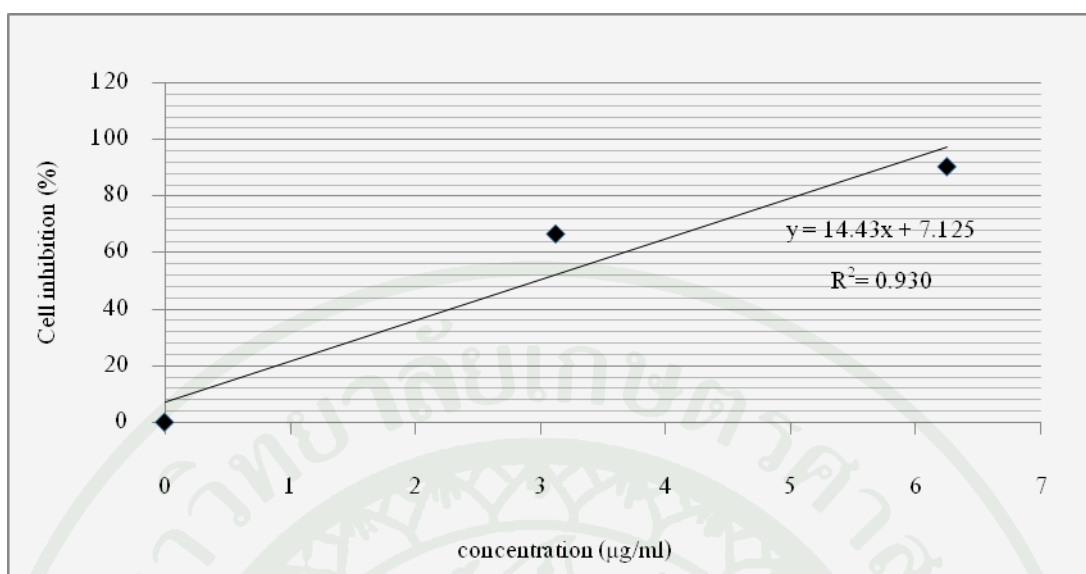
จากการศึกษาการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดของหนูในสารสกัดขมิ้นชันผงโดยเตรียมสารสกัดขมิ้นชันผงและ samples ต่างๆ ได้แก่ สารสกัดขมิ้นชันผง (sample A), fraction VII₁, VII₂, VII₃ ค่า Rf = 0.29 (sample B), fraction II₂ ค่า Rf = 0.86 (sample C), fraction IV₁+IV₂+V₁ ค่า Rf = 0.67 (sample D), fraction IV₁+IV₂+V₁ ค่า Rf = 0.37 (sample E), fraction IV₁+IV₂+V₁ ค่า Rf = 0.8 (sample F) และ fraction IV₁+IV₂+V₁ ค่า Rf = 0.63 (sample G) ที่ได้ทดสอบแล้วว่ามิฤทธิ์ในการ

ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* ด้วยวิธี Bio-activity assay บนแผ่น TLC จากผลการทดลองที่ 12.1 นำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยวิธี MTT cell cytotoxic assay จึงนำมาหาค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (%) และ the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) พบว่า สารสกัดขมิ้นชันผง (sample A) มีค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งมากที่สุด คือ 95.71% และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.97 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 17, ภาพที่ 27)

ตารางที่ 17 การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดของคน (%) ที่ระดับความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ของ sample A sample B sample C sample D sample E sample F และ sample G

ชุดการทดลอง	การยับยั้งเซลล์มะเร็ง (%) ^{1/}	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
sample A	95.71a	2.97
sample B	-6.40d	>84.99
sample C	45.92b	>84.99
sample D	18.92c	>84.99
sample E	21.02c	>84.99
sample F	37.55bc	84.99
sample G	15.33c	>84.99

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ตามวิธีวิเคราะห์ Duncan's New Multiple Range Test



ภาพที่ 27 การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดของคน (%) ของ sample A ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

วิจารณ์

สารสกัดจากขมิ้นชันผงที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ คือ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และ เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) สามารถนำมาประยุกต์ใช้โดยการจุ่มผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของ ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งในการรายงานเบื้องต้นได้ระบุไว้ว่า สารสกัดจาก ขมิ้นชันนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อรา *P. digitatum* ได้ ดังนั้นจึงเป็นแนวทางใน การศึกษาหาวิธีการนำสารสกัดจากขมิ้นชันมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* รวมถึงการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังการเก็บเกี่ยวที่มี ประสิทธิภาพและปลอดภัยต่อเกษตรกร ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

จากการนำตัวทำละลายต่างๆ ดังกล่าวมาสกัดสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราจากขมิ้นชัน ผง เพื่อใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง จากการทดลองในเบื้องต้น พบว่า ตัวทำละลายที่นำมาใช้ในการสกัดสารนั้นมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* คือ การ ทดลองประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงที่มีต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* ซึ่งจะ เห็นได้ว่า สารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายทุกชนิด คือ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) และทุกระดับ ความเข้มข้น คือ 10000 20000 30000 40000 และ 50000 ppm มีผลในการยับยั้งการเจริญของเส้น ใยเชื้อรา *P. digitatum* ได้ โดยเฉพาะสารสกัดจากขมิ้นที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ที่ระดับ ความเข้มข้น 50000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้อย่างสมบูรณ์ คือ 100% เมื่อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามพบว่าการ รายงานที่ได้กล่าวถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากขมิ้นชันที่มีผลต่อเชื้อราหลายชนิดรวมถึง เชื้อรา *P. digitatum* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าราสีเขียว โดยงานทดลองของสุภัทรา และคณะ (2547) ที่ได้นำสารสกัดจากขมิ้นชันที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มายับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *L. theobromae* ได้ 78.8% และ 75.5% ตามลำดับ และในแต่ละ fraction ของสารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium moniliforme* และ *Penicillium digitatum* (Jayaprakasha et al., 2005) และ นอกจากนี้สารสกัดจากขมิ้นชันสดสามารถทำให้เชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Penicillium digitatum* หยุดการเจริญเติบโต (Jain et al., 2007)

ดังนั้นจึงได้ศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของตัวทำลายที่เหมาะสมต่อการละลายสารสกัดขมิ้นชันและมีผลต่อการงอกต่อโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* น้อยที่สุด พบว่า ตัวทำลายเมทานอล เอทานอล และตัวทำลาย 3 ชนิด คือ เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 10% และ 20% มีผลต่อการงอกของโคนิเดีย คือ 71.9 - 98.45 % เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ น้ำ ที่มีการงอกของโคนิเดีย 100% แต่พบว่า ตัวทำลายดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้น 10% มีความสามารถในการละลายสารสกัดขมิ้นชันผงได้น้อย ดังนั้นจึงได้เลือกใช้ตัวทำลายต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 20% และในส่วนของตัวทำลายเฮกเซนใช้ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 100% เนื่องจากเป็นตัวทำลายที่ไม่สามารถเจือจางด้วยน้ำได้ เพราะเฮกเซนเป็นตัวทำลายที่มีขั้วน้อยซึ่งจะไม่ละลายในน้ำซึ่งเป็นตัวทำลายที่มีขั้วมาก และนอกจากนี้จะเห็นได้ว่าตัวทำลายเฮกเซนทุกระดับความเข้มข้นมีผลต่อความงอกของเชื้อรา *P. digitatum* น้อย คือ 94.10-99 % ดังนั้น จึงได้เลือกตัวทำลายเมทานอล เอทานอล ตัวทำลาย 3 ชนิด คือ เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น 20% และเฮกเซน ที่ระดับความเข้มข้น 100% มาทดลองครั้งต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* บนอาหาร PDA พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* ได้ (minimum inhibitory concentration; MIC) คือ 6250 97.7 1562.5 และ 12500 ppm ตามลำดับ ค่า ED_{50} คือ 52.53 51.14 52.03 และ 51.23 ppm ตามลำดับ และค่า ED_{90} คือ 92.53 91.14 92.03 และ 91.23 ppm ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Ross (2003) ซึ่งได้รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันแห้งที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราส่วน 1:100 โดยปริมาตร พบว่า มีผลต่อการเจริญของเชื้อราได้หลายชนิด ได้แก่ *Curvularia oryzae*, *Helminthosporium oryzae*, *Penicillium corymbiferum*, *P. javanicum* และ *P. lilacinum* และนอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum falcatum* และ *Fusarium moniliforme* (MIC = 1000 ppm) และ *Curvularia pallescens*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum* (MIC = 2000 ppm) (Ravindran *et al.*, 2007)

เมื่อนำสารสกัดจากขมิ้นชันผงมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังการเก็บเกี่ยว พบว่า สารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำลายเมทานอล และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคได้ โดยพบ

การเกิดโรค 40% และ 25% ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองนี้ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ โดยสอดคล้องกับงานทดลองของ Ravindran *et al.*, (2007) กล่าวว่า สารสกัดจากเหง้าขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอลมีผลต่อเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *Alternaria solani*, *Botrytis cineria*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondite*, *Pyricularia oryzae* และ *Rhizoctonia solani* นอกจากนี้มีการรายงานการใช้สารสกัดจากกระเทียมโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ร่วมกับน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และสารเคลือบผิวส้ม เพื่อควบคุมโรคบนส้มพันธุ์วเลนเซียและ shamouti พบว่า สารสกัดดังกล่าวสามารถควบคุมโรคราสีเขียวและสีฟ้าของส้มที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* และ *P. italicum* ได้ (Obagwu and Korsten, 2003) และจากการรายงานที่กล่าวว่า ตัวทำละลายเอทานอลมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ โดยที่เมทานอลจะสังเคราะห์กรดฟอร์มิกที่มีผลต่อเลนส์ตาและเซลล์สมองของมนุษย์ (neurotoxic) (Treichel, *et al.* 2003) แต่ในส่วน of ตัวทำละลายเอทานอล โดยพบว่าเป็นส่วนประกอบของ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เครื่องสำอาง และอื่นๆ ของมนุษย์ ดังนั้น จึงนำสารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอลมาประยุกต์ใช้ในการทดลองต่อไป เช่นเดียวกับการทดลองของ Majhenic *et al.*, (2007) ที่ได้นำสารสกัดจากเมล็ด guarana (*Paullinia cupana*) โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล พบว่า สามารถควบคุมเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* และ *Penicillium cyclopium* และแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus cereus* โดยวิธี Agar well diffusion และ broth dilution assay

เมื่อนำสารสกัดจากขมิ้นชันผงและขมิ้นชันสดมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน คือ สารสกัดขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผง ที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm พบว่า สารสกัดขมิ้นชันผงสามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ดีกว่าสารสกัดขมิ้นชันสด โดยพบการเกิดโรค 25% ทั้งนี้คาดว่าสารออกฤทธิ์ที่สามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งในขมิ้นชันสดอาจมีปริมาณน้อยกว่าขมิ้นชันผง Chillet *et al.*, (2007) กล่าวว่า แหล่งปลูกของพืชที่ต่างพื้นที่ จะมีผลต่อชนิดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพดิน สภาพภูมิอากาศ การเจริญเติบโต และการพัฒนาทางด้านสรีรวิทยาของพืชในแหล่งปลูกนั้นๆ นอกจากนี้รูปแบบการเก็บรักษาขมิ้นชันซึ่ง Subhadhirasakul *et al.*, (2007) พบว่า ปริมาณสาร curcuminoids ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญจะไม่ลดปริมาณลงเมื่อเก็บขมิ้นชันในสภาพที่แห้ง ได้ทั้งแบบผงและแบบแวน

หลังจากนั้นจึงเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง โดยใช้สารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) ที่มีค่า pH 4.5 ซึ่ง ธวัช (2548) รายงานว่า ไคโตแซนที่ pH 4.5 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้อย่างสมบูรณ์ จากผลการทดลองนี้ พบว่า สารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm สามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ดีกว่าการใช้สารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) หรือใช้ไคโตแซน 2% เพียงอย่างเดียว คือ พบการเกิดโรค 10% ทั้งนี้อาจมีผลมาจากปริมาณความเข้มข้นของไคโตแซนสูง คือ 2% ทำให้เป็นพิษต่อส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง จากการทดลองของ Yong-cai *et al.*, (2009) ทดลองใช้ไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้น 0% 0.25% 0.5% และ 1% เพื่อควบคุมโรค dry rot ของหัวมันฝรั่ง พบว่า ไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้น 0.5 - 1% สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียและการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium sulphureum* สาเหตุโรคได้ แต่พบว่าไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้น 1% มีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อหัวมันฝรั่ง นอกจากนี้ยังรายงานเพิ่มเติมว่า แม้ไคโตแซนมักใช้ในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมันฝรั่ง และ sweet cherries ระหว่างการเก็บรักษาอย่างแพร่หลาย แต่ควรใช้ไคโตแซนในความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยพบว่า ไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้น 0.5% เป็นความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพให้ผลในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้ดีที่สุด

และเมื่อนำสารสกัดขมิ้นชันผง ที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm และ 30000 ppm ใช้ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 500 และ 750 ppm เพื่อทดสอบระดับความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันและสารเคมี imazalil ที่เหมาะสมที่สามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ พบว่า สารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรค โดยไม่พบการเกิดโรค รวมทั้งยังเพิ่มความปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค ซึ่งสารเคมี imazalil มีบทบาทต่อเชื้อรา โดยการซึมเข้าสู่เส้นใยเชื้อรา *Penicillium italicum* และทำให้โคนิเดียมีความผิดปกติ บวมพอง และ germ tube ผิดรูป (Siecel and Racs bale, 1978) และ Bus (1992) พบว่า imazalil สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* มีค่า $ED_{50} = 0.88$ mg/L สอดคล้องกับการทดลองของบุรณี (2548) พบว่า การจุ่มผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ร่วมกับการใช้สารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm นาน 2 นาที สามารถควบคุมการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้อย่างสมบูรณ์ และจากระดับความ

เข้มข้นดังกล่าว ในการทดลองนี้ยังพบว่า สามารถชะลอการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ 4 วัน ที่เกิดโรคในวันที่ 6 หลังจากปลูกเชื้อ โดยมีขนาดของแผล 12 ตารางเซนติเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม คือ น้ำ ที่เกิดโรคในวันที่ 2 หลังจากปลูกเชื้อ โดยมีขนาดของแผล 34 ตารางเซนติเมตร

ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในสารสกัดขมิ้นชันผงที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้แล้วนั้น ยังสามารถยืดอายุในการเก็บรักษาผลผลิตส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้นานกว่าผลส้มที่ไม่ได้จุ่ม โดยที่ลักษณะของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังจากจุ่มในชุดการทดลองดังกล่าวนั้น พบว่า สีของเปลือกผลส้มไม่มีความแตกต่างไปจากสีของเปลือกส้มตามโดยทั่วไปมากนัก อีกทั้งผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งมีความมันเงาเล็กน้อย จากการผลการทดลองนี้ พบว่า หลังจากปลูกเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งแล้วทดสอบจุ่มในสารสกัดดังกล่าว เป็นระยะเวลา 6 วัน โดยพบการเกิดโรค 5% มีความแน่นเนื้อของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง โดยเฉลี่ย 0.76 g/mm^2 และมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 13°Brix ในขณะที่ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่จุ่มในน้ำ ซึ่งเป็นชุดควบคุม พบการเกิดโรค 85% มีความแน่นเนื้อผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งโดยเฉลี่ย 0.42 g/mm^2 และมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 15.7°Brix ผลส้มที่มีลักษณะส่วนหนึ่งนั้นมาจากลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งทางบาดแผล เกิดจากเอนไซม์ exopolysaccharuronase (exo-PG) จากเชื้อรา และเอนไซม์ pectinmethylesterase (PME) ที่มีในผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ทำหน้าที่ย่อยสลายเพกตินในชั้น middle lamella และสร้าง galacturonic acid ขึ้นมีผลต่อการยุบตัวของไซโต-พลาสซึมของส้ม (บุรณิ, 2548) จึงทำให้อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา และเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ เป็นผลทำให้เกิดโรคได้ง่าย และในส่วนของลักษณะการอ่อนนุ่มของผลนั้น พบว่า ผลไม้ส่วนใหญ่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและการสลายตัวของส่วนของเพกตินบริเวณ middle lamella และ primary cell wall (อรุณี, 2537) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการอ่อนตัวของเนื้อเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของ CO_2 และ C_2H_4 ที่มีผลต่อ pectic enzyme ที่เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเพกติน พบว่าเพิ่มมากขึ้นในระหว่างเก็บรักษาผลไม้ (รมณีย์, 2532) นอกจากนี้โดยกลูโคสของส้มเกิดในส่วนช่องว่างระหว่างเซลล์สามารถทำให้เปลือกของผลส้มอ่อนตัวได้เช่นกัน (จริงแท้, 2550) El-Otmani and Coggins (1991) กล่าวว่า ในระหว่างการเก็บรักษาผลส้มนั้น พบว่า ผลส้มจะเกิดการอ่อนนุ่มของผลและทำให้ง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์รวมถึงความผิดปกติต่างๆ นอกจากนี้ผลส้มที่ถูกเก็บรักษาไว้นั้นพบว่าการเปลี่ยนแปลงต่างๆ เกิดขึ้น เช่น ผลส้มมีความหวานมากขึ้น ซึ่งพบได้ในผลส้มแทนเจอริน, โลม์ และส้มในกลุ่ม orange

การนำสารสกัดจากขมิ้นชันผงไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสัมนั้น จำเป็นที่จะต้องคำนึงถึงสภาพการเก็บรักษาสารสกัดขมิ้นชันผงที่สามารถนำไปใช้ได้จริง สะดวกและยังคงประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ดังนั้นจึงได้ศึกษาถึงการเก็บรักษาสารสกัดขมิ้นชันผงที่อุณหภูมิต่างๆ คือ อุณหภูมิห้อง คือ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คือ อุณหภูมิของตู้เย็น และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาสารสกัดที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ คือ -20 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิและระยะเวลา คือ การเก็บรักษาสารสกัดขมิ้นชันผงไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 13 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 เดือน ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* บนแผ่น TLC ได้ถึงแม้จะพบการเปลี่ยนแปลงของสารสกัดขมิ้นชันผง หลังจากพ่นด้วย anisaldehyde reagent บนแผ่น TLC ที่ค่า $R_f = 0.62$ และ 0.48 ก็ตาม จากการรายงานของ Subhadhirasakul *et al.*, (2007) รายงานว่า คุณภาพของปริมาณสารออกฤทธิ์ curcuminoids ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์หลักในขมิ้นชัน เพื่อที่จะนำไปใช้เป็นยาหรืออาหาร สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 15 เดือน ในรูปของขมิ้นชันแห้งและในสภาพมืด จากการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่าสามารถนำสารสกัดขมิ้นชันมาประยุกต์ในได้จริงในอุตสาหกรรมได้ แม้เป็นอุตสาหกรรมขนาดเล็ก โดยไม่มีการลดประสิทธิภาพในการควบคุมโรค ณ อุณหภูมิและระยะเวลาดังกล่าว

จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากขมิ้นชันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ หลังจากนั้นได้นำสารสกัดจากขมิ้นชันผงมาแยกสารตามความสามารถการละลายของสาร โดยวิธี column chromatography ซึ่งสามารถแยกได้ 18 fractions แล้วนำสารสกัดจากขมิ้นชันผงและ fractions ต่างๆ มาทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ด้วยวิธี Bio-activity assay ได้แก่ การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum*, *Cladosporium herbarium* บนแผ่น TLC และวิเคราะห์หาชนิดของสารออกฤทธิ์ของสารสกัดจากขมิ้นชันผงในการยับยั้งเชื้อรา โดยใช้เครื่อง HPLC และ GC-MS นอกจากนี้ยังนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radial scavenging assay และฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดของคน MTT cell cytotoxic assay และหลังจากนั้นจึงได้ทำการศึกษา

ประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันผงและ fraction ต่างๆ ได้แก่ สารสกัดขมิ้นชันผง คือ sample A ที่นำมาทดสอบ Bio-activity assay ควบคู่กับ fraction VII₁, VII₂, VII₃ ค่า $R_f = 0.29$ คือ sample B, fraction II₂ ค่า $R_f = 0.89$ คือ sample C, fraction IV₁+IV₂+V₁ ค่า $R_f = 0.67$ คือ sample D,

fraction $IV_1+IV_2+V_1$ ค่า $R_f = 0.37$ คือ sample E, fraction $IV_1+IV_2+V_1$ ค่า $R_f = 0.8$ คือ sample F และ fraction $IV_1+IV_2+V_1$ ค่า $R_f = 0.63$ คือ sample G ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* และ *C. herbarium* บนแผ่น TLC พบว่า sample C คือ fraction II_2 ที่ค่า $R_f = 0.89$ เกิด clear zone ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* ได้และเมื่อพ่นด้วย anisaldehyde reagent เกิดสีน้ำตาลของ polyacetylene และหลังจากทำการวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่า เป็นสาร *ar* - turmerone ซึ่งสารนี้เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่มีอยู่ในขมิ้นชันผงและมีผลต่อเชื้อ *P. digitatum* ของสัมพันธ์สายน้ำผึ้ง จากการรายงานของ Jayaprakasha *et al.*, (2005) ว่าเมื่อทำการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันและ fractions ต่างๆของขมิ้นชัน โดยใช้เครื่อง GC และ GC-MS พบสาร *ar* - turmerone, turmerone และ curlone เป็นสารออกฤทธิ์หลักที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้และแยกสารสกัดขมิ้นชันผงเป็น fraction ต่างๆ พบว่าในแต่ละ fraction ที่แยกได้นั้นมีผลต่อการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium moniliforme* และ *Penicillium digitatum*

นอกจากนี้ sample B คือ fraction VII_1 , VII_2 , VII_3 ที่ค่า $R_f = 0.29$ เกิด clear zone ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* ได้ และหลังจากทำการวิเคราะห์หาชนิดของสารออกฤทธิ์ พบว่า สารออกฤทธิ์หลัก คือ demethoxycurcumin ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในกลุ่มของสาร curcuminoids ที่พบมากในขมิ้นชัน และสามารถตรวจสอบภายใต้ UV ระหว่าง 420-430 nm ในตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ เมทานอล, acetonitrile และ tetrahydrofuran ซึ่งวิธีการแยกสารออกฤทธิ์ (separation) โดยทั่วไปมักใช้ TLC (thin-layer chromatography) และ HPLC (high-pressure liquid chromatography) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสภาพในการแยกสารออกฤทธิ์ (the chromatographic conditions) (Jayaprakasha *et al.*, 2005) โดยการทดลองนี้ได้ทำการเปรียบเทียบค่า UV spectra ของ sample B ดังกล่าวกับสาร standard คือ demethoxycurcumin โดยใช้เครื่อง HPLC จากการทดลองตรวจพบสารที่คาดว่าเป็นสารในกลุ่ม demethoxycurcumin ภายใต้ UV-DAD detection ที่ค่าการดูดกลืนแสง UV 400 nm ช่วง retention time เท่ากับ 17.699 นาที ซึ่งสารออกฤทธิ์ดังกล่าวนี้มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* และเช่นเดียวกับการทดลองของ Péret-Almeida *et al.*, (2005) ที่สามารถแยกสารออกฤทธิ์ demethoxycurcumin ได้จากขมิ้นชันผง (*Curcuma longa* Linn.) โดยใช้เครื่อง HPLC ภายใต้ UV-DAD detection ที่ค่าการดูดกลืนแสง 424 nm ช่วง retention time เท่ากับ 3.41 นาที malting point 172 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่า malting point ใกล้เคียงกับ Buckingham *et al.*, (1994) ที่ระบุไว้ใน dictionary of natural product ว่า สาร demethoxycurcumin มี malting point 168 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบสารออกฤทธิ์อื่นๆ

คือ terpenoids, sesquiterpenes (He *et al.*, 1998) และ demethoxycurcumin (Ravindran *et al.*, 2007) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์หลักที่พบในขมิ้นชัน ซึ่ง terpenoids และ sesquiterpenes จัดเป็นสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* และ *Alternaria dianthi* ที่เข้าทำลายคาร์เนชั่น เชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* และ *Curvularia trifolii* f. sp. *gladioli* ที่เข้าทำลายต้นแกลดิโอลัส (Babu *et al.*, 2007)

คุณสมบัติของสารสกัดขมิ้นชันผงและ samples ต่างๆ คือ sample B sample C sample D sample E sample F และ sample G ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเบื้องต้นได้ทดสอบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* ด้วยวิธี Bio-activity assay บนแผ่น TLC จึงนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radial scavenging assay พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 50 µg/mL สารสกัดขมิ้นชันผง (sample A) มี antioxidant activity เท่ากับ 77.89% และ IC₅₀ เท่ากับ 54.82 µg/mL ซึ่งมีค่า antioxidant activity มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ samples อื่นๆ Singh *et al.*, (2010) รายงานว่า สารสกัดน้ำมันหอมระเหยและ ethanol oleoresin ของขมิ้นชันสดมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาก และได้ทำการวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ GC-MS พบสารออกฤทธิ์หลัก คือ aromatic-turmerone (24.4%), alpha-turmerone (20.5%) และ beta-turmerone (11.1%) นอกจากนี้ ยังมีรายงานชนิดของสารออกฤทธิ์เพิ่มเติมว่าสาร curcumin, demethoxycurcumin, bis-demethoxycurcumin และ diacetyl curcumin มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน โดยคาดว่าสารออกฤทธิ์ดังกล่าวน่าจะเป็นตัวกลางในการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes) ได้แก่ superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase (Ravindran *et al.*, 2007) ซึ่งสารสกัดขมิ้นชันนั้นมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า tocopherol (Jayaprakasha *et al.*, 2005) นอกจากนี้ สารสกัดจากขมิ้นชันและสารประกอบ curcumin พบว่า มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ได้แก่ superoxide anions, อนุมูลของไฮดรอกซิล (hydroxyl radicals) (Jayaprakasha *et al.*, 2005) และยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสังเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และอนุมูลไนไตรต์ (nitrite radical) (Chattopadhyay *et al.*, 2004) เทียบเท่ากับวิตามินซีและวิตามินอี (Sliver, 1997) demethoxycurcumin พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ในขณะที่ curcumin มีประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูล superoxide anion (Sirijaroonwong *et al.*, 2007) ดังนั้นผลที่ได้จากการที่พบสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดขมิ้นชันจากการทดลองนี้ ทำให้มีแนวโน้มที่จะช่วยกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการวัยและการหลุดร่วง รวมถึงการเสื่อมสภาพของของผลิตผลสดที่เก็บเกี่ยวมาแล้วนั้นลดลง (จริงแท้, 2550)

ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันผงและ samples ต่างๆ คือ sample B sample C sample D sample E sample F และ sample G ที่ได้ทำการทดสอบแล้วว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* ด้วยวิธี Bio-activity assay บนแผ่น TLC ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดของคน โดยวิธี MTT cell cytotoxic assay พบว่า สารสกัดขมิ้นชันผง (sample A) มีค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งมากที่สุด คือ 95.71% และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.97 $\mu\text{g/mL}$ และมีรายงานว่า สาร curcumin ที่พบในขมิ้นชัน มีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านเซลล์มะเร็ง และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งของคน (Jain *et al.*, 2007) ซึ่ง curcumin มีหน้าที่ไปขัดขวางการทำงานของ lipid peroxidation และความเสียหายของ DNA โดยที่จะไปลดปริมาณ Fe-NTA และ hydrogen peroxide ที่เป็นสาเหตุของการเกิดเซลล์มะเร็ง (Ravindran *et al.*, 2007) Zhang *et al.*, (2008) พบว่า สารในกลุ่ม curcuminoids ได้แก่ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิด nitric oxide (NO) ที่ถูกผลิตขึ้นในกระบวนการเสื่อมของเซลล์มะเร็งในสมองของคน จากการทดลองกับหนูทดลอง พบว่า สาร curcumin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดมะเร็งที่ผิวหนังของหนูทดลองได้ รวมถึงมี ประสิทธิภาพในการสมานแผลและการลดขนาดของเซลล์มะเร็งของหนูได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากขมิ้นชันสามารถยับยั้งสารก่อมะเร็งได้ (mutagens) (Jayaprakasha *et al.*, 2005)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

สารสกัดขมิ้นชันผง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium digitatum* โดยความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดขมิ้นชันผงที่สามารถยับยั้งการงอก (MIC: Minimum inhibitory concentration) ของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* คือ สารสกัดขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) คือ 6250 97.7 1562.5 และ 12500 ppm ตามลำดับ ค่า ED_{50} คือ 52.53 51.14 52.03 และ 51.23 ppm ตามลำดับ และค่า ED_{90} คือ 92.53 91.14 92.03 และ 91.23 ppm ตามลำดับ

สารสกัดจากขมิ้นชันผงที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 20% เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง สารสกัดขมิ้นชันผงสามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ดีกว่าสารสกัดขมิ้นชันสด โดยพบการเกิดโรค 25% และสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm สามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ดีกว่าการใช้สารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) หรือใช้ไคโตแซน 2% เพียงอย่างเดียว และเมื่อนำสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ดีที่สุดนั้นและเหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง อีกทั้งยังช่วยในการชะลอการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ได้ 4 วัน หลังจากปลูกเชือบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังการเก็บเกี่ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลผลิตส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังการเก็บเกี่ยวได้นานกว่าผลส้มที่ไม่ได้จุ่ม และพบว่า ภายหลังจากจุ่มผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งแล้วเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน มีความแน่นเนื้อของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง 0.76 g/mm^2 และมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 13°Brix และสีของเปลือกส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งไม่มีความแตกต่างไปจากสีของเปลือกส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งตามธรรมชาติมากนัก อีกทั้งผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังจากผ่านการจุ่มยังเกิดความมันเงาเล็กน้อย

การเก็บรักษาสารสกัดจากขมิ้นชันผงไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ คือ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คือ อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คือ อุณหภูมิของตู้เย็น เป็นระยะเวลา 4 เดือน และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาสารสกัดที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ คือ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 13 เดือน นั้นยังสามารถคงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* สาเหตุโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดขมิ้นชันผง ด้วยวิธี Bio-activity assay พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* และ *Cladosporium herbarium* ได้ นอกจากนี้สารสกัดจากขมิ้นชันผงนั้นยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยมีค่า antioxidant activity เท่ากับ 54.83% และ IC_{50} เท่ากับ 77.89 $\mu\text{g/mL}$ อีกทั้งยังมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดของคนได้ โดยมีค่ายับยั้งเซลล์มะเร็ง เท่ากับ 95.71% และ IC_{50} เท่ากับ 2.97 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ชนิดของสารออกฤทธิ์หลักของสารสกัดขมิ้นชันผง ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* โดยใช้เครื่อง HPLC และ GC-MS พบว่าเป็นสาร *ar* – turmerone และคาดว่าเป็นสาร demethoxycurcumin, terpenoids และ sesquiterpene ซึ่งจัดว่าเป็นสารออกฤทธิ์หลักที่พบในขมิ้นชัน

ข้อเสนอแนะ

การนำสารสกัดจากขมิ้นชันผง มาประยุกต์ใช้เคลือบผิวผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง โดยวิธีจุ่ม พบว่า การเคลือบผิวผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งไม่มีความสม่ำเสมอของสารสกัดขมิ้นชันผง ดังนั้นควรเปลี่ยนวิธีการจุ่มผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งลงในสารสกัดขมิ้นชันเป็นการใช้เครื่องมือที่สามารถเคลือบผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งด้วยละอองสารสกัดขมิ้นชันผงที่มีความละเอียด เพื่อความสม่ำเสมอของสารสกัดขมิ้นชันผง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการ ศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของส้ม. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรุงเทพฯ.
- จรัสแท้ ศิริพานิช. 2550. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการร่วงของพืช (Postharvest Biology and Plant Senescence). ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.
- ธวัช หะหมาน. 2548. ผลของไคโตแซนต่อการชักนำความต้านทานของผลมะม่วงต่อโรคแอนแทรกคโนส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บุรณี พัวพงษ์แพทย์. 2548. การควบคุมโรคเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* ด้วยการใช้ความร้อนและสารเคมีควบคุมเชื้อรา imazalil หลังการเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มงคล แซ่หลิม. 2528. การผลิตส้ม. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- รมณีย์ เจริญทรัพย์. 2532. ความสัมพันธ์ระหว่างความแฉะกับโครงสร้าง ปริมาณแคลเซียม ความเข้มข้นของ CO_2 และ C_2H_4 และเอนไซม์ pectin methylesterase ของเนื้อผลส้มโอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วินศ ภูมินาถ. 2549. ส้มเขียวหวาน ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำส้มเกล็ดหิมะ. อาหาร (Food Journal). สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2548. สรีรวิทยาพืช (Plant Physiology). ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สรวงสรรค์ เนียมแข็ง. 2549. การคัดเลือกและเพิ่มประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิชีวนะในการควบคุมโรค ราสีเขียว (*Penicillium digitatum*) บนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุคคณิง พุ่มชัย. 2547. ผลของไคโตซานต่อการชักนำความต้านทานและการควบคุมโรคแอนแทรก โนสในมะม่วงน้ำดอกไม้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี.

สุภัทรา จามกระโทก ชัยณรงค์ รัตนกริฑากุล ชลิดา เล็กสมบูรณ์ นวลวรรณ ฟารุ่งแสง กวิศรวานิช กุล และ อุดม ฟารุ่งแสง. 2547. ผลของสารสกัดจากกระชาย ขมิ้นและขิงต่อราสาเหตุโรค พืชหลังการเก็บเกี่ยว, น. 521-528. ใน เรื่องเต็มประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 (สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. ข้อมูลพื้นฐาน เศรษฐกิจการเกษตร. ศูนย์สารสนเทศ การเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. ข้อมูลพื้นฐาน เศรษฐกิจการเกษตร. ศูนย์สารสนเทศ การเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

อรุณี สวัสดิ์พูน. 2537. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของผนังเซลล์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในเนื้อ สัมไอระเหยระหว่างการเก็บรักษา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอียน คิลาย้อย. 2536. โรคพืช ไม้ผล สมุนไพร และการป้องกันกำจัด. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

Aggarwal B.B., A. Kumar, M.S. Aggarwal and S. Shishodia. 2005. Curcuma derived from turmeric (*Curcuma longa*): a spice for all season, pp. 349-387. In H. Press and B. Debasis, eds. **Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention**. CRC Press LLC, Sturbridge, Massachusetts.

- Arcas, M.C., J.M. Botía, A.M. Ortuño and J.A. Del Río. 2000. UV irradiation alters the levels of flavonoids involved in the defence mechanism of *Citrus aurantium* fruits against *Penicillium digitatum*. **Eur. J. Plant Pathol.** 106: 617–622.
- Babu, G.D. Kiran, V. Shanmugam, S. D. Ravindranath and V. P. Joshi. 2007. Comparison of chemical composition and antifungal activity of *Curcuma longa* L. leaf oils produced by different water distillation techniques. **Flavour Fragr. J.** 22: 191-196.
- Ballester, A.R., M.T. Lafuente, L. Gonz'alez-Candelas. 2006. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit–*Penicillium digitatum* interaction. **Postharvest Biol. Technol.** 39: 115–124.
- Bautista-Baños, S., A.N. Hernández-Lauzardo, M.G. Velázquez-del Valle, M. Hernández-López, E. Ait Barkab, E. Bosquez-Molina and C.L. Wilson. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protect.** 25: 108–118.
- Borrás, A.D. and R.V. Aguilar. 1990. Biological control of *Penicillium digitatum* by *Trichoderma viride* on postharvest citrus fruits. **Int. J. Food Microbiol.** 11: 179-184.
- Brown, G.E. and M. Chambers. 1999. Evaluation of polyhexamethylene biguanide for control of postharvest diseases of florida citrus. **Proc. Fla. State Hort. Soc.** 112: 118-121.
- Buckingham J. and 15 others. 1994. **Dictionary of Natural Product A-C (A-00001-C-02529)**. Chapman & Hall, London.
- Bus, V.G. 1992. ED₅₀ levels of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* with reduced sensitivity to thiabendazole, benomyl and imazalil. **Postharvest Biol. Technol.** 1: 305-315.

- Cãnamás, T.P., I. Viñas, J. Usall, C. Casals, C. Solsona and N. Teixidó. 2008. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 Part I. Study of different formulation strategies to improve survival of cell in unfavourable environmental conditions. **Postharvest Biol. Technol.** 49: 86-95.
- Chang, Li-Hsun., Ting-Ting Jong, Ho-Shin Huang, Yung-Feng Nien, Chieh-Ming J. Changa. 2006. Supercritical carbon dioxide extraction of turmeric oil from *Curcuma longa* Linn and purification of turmerones. **Separ. Purif. Tech.** 47: 119–125.
- Chang, Woo-Nang and Bay-Petersen J. 2003. **Citrus Production: A Manual for Asian Farmers.** Food and fertilizer technology center for the asian and pacific region, Taipei.
- Chattopadhyay, I., K. Biswas, U. Bandyopadhyay and R.K. Banerjee. 2004. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. **Curr. Sci.** 87: 44-53.
- Chien, Po-Jung., F. Sheu and Hung-Ren Lin. 2007. Coating citrus (*Murcott tangor*) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. **Food Chem.** 100: 1160–1164.
- Chillet, M., O. Hubert, L. de Lapeyre de Bellaire. 2007. Relationship between physiological age, ripening and susceptibility of banana to wound anthracnose. **Crop Protect.** 26: 1078–1082.
- Devlieghere, F., A. Vermeulen and J. Debevere. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiol.** 21: 703–714.

- Droby, S., A. Eick, D. Macarisin, L. Cohen, G. Rafael, R. Stange, G. McColum, N. Dudai, A. Nasser, M. Wisniewski and R. Shapira. 2008. Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **Postharvest Biol. Technol.** 49: 386-396.
- E1-Otmani, M. and C.W. Coggins, Jr. 1991. Growth regulator effects on retention of quality of stored citrus fruits. **Sci. Hortic.** 45: 261-272.
- FRAC (fungicide resistance action committee). 2007. **Frac Code List[®] : Fungicides Sorted By Mode of Action.**
- Freimoser, F. M., Claude A. Jakob, M. Aebi and U. Tuor. 1999. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 3727-3729.
- He, Xian-Guo, Long-Ze Lin, Li-Zhi Lian and M. Lindenmaier. 1998. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa*). **J. Chromatogr.** 818: 127-132.
- Hejazi, R. and M. Amiji. 2003. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **J. Controlled Release** 89: 151-165.
- Jain, S., S. Shrivastava, S. Nayak and S. Sumbhate. 2007. Recent trends in *Curcuma longa* Linn. **Phcog. Rev.** 1: 119-128.
- Janisewicz, J.W. and L. Korsten. 2002. Biological control of postharvest disease of fruits. **Annu. Rev. Phytopath.** 40: 411-441.

- Jayaprakasha, G.K., L. Jagan, M. Rao and K.K. Sakariah. 2005. Chemistry and biological activities of *C. longa*. **J. Food Sci. Tech.** 16: 533-548.
- Kanetis, L., H. Förster and J.E. Adaskaveg. 2008. Baseline sensitivities for new postharvest fungicides against *Penicillium* spp. on citrus and multiple resistance evaluations in *P. digitatum*. **Plant Dis.** 92: 301-310.
- Kiney, P., M.F. Mansour, F. M. Gabler, D.A. Margosan and J.L. Smilanick. 2007. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. **Crop Protect.** 26: 647-656.
- Ladaniya, M.S. 2008. **Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation**. 1st ed. Academic Press, San Diego.
- Leelasuphakul, W., P. Hemmanee and S. Chuenchitt. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biol. Technol.** 48: 113–121.
- Liu, J., S. Tian, X. Meng and Y. Xu. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biol. Technol.** 44: 300–306.
- Majhenic, L., M.S. Kerget and Z. Knez. 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chem.** 104: 1258–1268.
- Maruyama, T., C. Komatsu, J. Michizoe, S. Sakai and M. Goto. 2007. Laccase-mediated degradation and reduction of toxicity of the postharvest fungicide imazalil. **Process Biochem.** 42: 459–461.

- Meng, X., B. Li, J. Liu and S. Tian. 2008. Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. **Food Chem.** 106: 501–508.
- Merck E. 1980. **Dyeing reagents for Thin Layer Chromatography and Paper Chromatography.** E. Merck, Darmstadt.
- Meziane, H., S. Gavriel, Z. Ismailov, I. Chet, L. Chernin and M. Höfte. 2006. Control of green and blue mould on orange fruit by *Serratia plymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action. **Postharvest Biol. Technol.** 39: 125–133.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 26: 211-219.
- Montesinos-Herrero, C., M.A. del Río, C. Pastor, O. Brunetti and L. Palou. 2008. Evaluation of brief potassium sorbate dips to control postharvest penicillium decay on major citrus species and cultivars. **Postharvest Biol. Technol.** 52: 117-125.
- Mukhopadhyay, S. 2004. **Citrus: Production, Postharvest, Disease and Pest Management.** Science Publishers, Plymouth.
- Obagwu, J. and L. Korsten. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. **Postharvest Biol. Technol.** 28: 187-194.
- Obagwu, J. and L. Korsten. 2003. Control of citrus green and blue molds with garlic extracts. **Eur. J. Plant Pathol.** 109: 221–225.

- Ortuño, A., A. Báidez, P. Gómez, M.C. Arcas, I. Porras, A. García-Lidón and J.A. Del Río, 2006. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. **Food Chem.** 98: 351-358.
- Pacheco, N., C.P. Larralde-Corona, J. Sepulveda, S. Trombotto, A. Domard and K. Shirai. 2008. Evaluation of chitosans and *Pichia guilliermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. **Int. J. Biol. Macromol.** 43: 20-26.
- Pal, A. and A.K. Pal, 2000. Studies on the genotoxicity of turmeric extracts in bacterial system. **Int. J. Antimicrob. Agents** 16: 415-417.
- Péret-Almeida, L., A.P.F. Cherubino, R.J. Alves, L. Dufossé and M.B.A. Glória. 2005. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **Food Res. Int.** 38: 1039-1044.
- Pitt, I.J. 1979. **The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces***. Academic Press Inc, London.
- Plaza, P., J. Usall, R. Torres, N. Lamarca, À. Asensio and I. Viñas. 2003. Control green and blue mould by curing on oranges during ambient and cold storage. **Postharvest Biol. Technol.** 23: 195-198.
- Ploetz, R.C. 2003. **Diseases of Tropical Fruits Crops**. CABI Publishing, Florida.
- Qin, C., H. Li, Q. Xiao, Y. Liu, J. Zhu and Y. Du. 2006. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydr. Polymer.** 63: 367-374.

- Quiles, J., M.D. Mesa, C.L. Ramírez-Tortosa, C.M. Aguilera, M. Battino, Á. Gil and M.C. Ramírez-Tortosa. 2002. *Curcuma longa* extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 22: 1225-1231.
- Ravindran, P.N., K.N. Babu and K. Sivaraman. 2007. **Turmeric: The Genus Curcuma.** CRC Press Taylor&Francis Group, Boca Raton, Florida.
- Romanazzi, G., O.A. Karabulut and J.L. Smilanick. 2007. Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes. **Postharvest Biol. Technol.** 45: 134–140.
- Ross, I.A. 2003. **Medicinal Plants of The World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses.** Humana Press, New Jersey.
- Roy, P.S. and E.E. Goldschmidt. 1996. **Biology of Citrus.** Cambridge University, Cambridge.
- Siecel, M.R. and N.N. Racsbaile. 1978. Antifungal mode of action of imazalil. 1978. **J. Biochem. Physiol.** 9: 48-56.
- Singh, G., I.P.S Kapoor, P. Singh, C.S. de Heluani, M.P. de Lampasona and C.A.N. Catalan. 2010. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). **Food Chem. Toxicol.** 48: 1026-1031.
- Sirijaroonwong, S., S. Unchern, N.P. Morales and C. Phisalaphong. 2007. P08 free radical scavenging activity of curcumin and its derivatives. **Thai J. Pharmacol.** 29: 60-63.
- Sliver, R.J. 1997. **Ayurvedic Veterinary Medicine.** St. Louis.

- Smilanick, J.L., M.F. Mansour, F.M. Gabler and W.R. Goodwine., 2006. The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control citrus green mold after harvest. **Postharvest Biol. Technol.** 42: 75–85.
- _____, _____, _____ and D. Sorenson. 2008. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. **Postharvest Biol. Technol.** 47: 226-238.
- Stange R.R., S.L. Midland, J.L. Sims and T.G. McCollum. 2002. Differential effects of citrus peel extracts on growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *P. expansum*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 61: 303-311
- Subhadhirasakul, S., *et al.*, 2007. Content of active constituents of tumeric and zedoary rhizomes. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 1: 1527-1536.
- Taqarort, N., A. Echairi, R. Chaussod, R. Nouaim, H. Boubaker, A.A. Benaoumar and E. Boudyach. 2008. Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits. **World J. Microbiol Biotechnol.** 24: 3031-3038.
- Teixid'o, N., J. Usall, L. Palou, A. Asensio, C. Nunes and I. Viñas. 2001. Improving control of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. **Eur. J. Plant Pathol.** 107: 685-694
- Torres, R., C. Nunes, J.M.García, M. Abadias, I. Viñas, T. Manso, M. Olmo and J. Usall. 2007. Application of *Pantoea agglomerans* CPA-2 in combination with heated sodium bicarbonate solutions to control the major postharvest diseases affecting citrus fruit at several mediterranean locations. **Eur. J. Plant Pathol.** 118: 73-83.

- Treichel J.L., M.M. Henry, C.M.B. Skumatz, J.T. Eells and J.M. Burke. 2003. Formate, the toxic metabolite of methanol, in cultured ocular cells. **Neuro Toxicology** 24: 825–834.
- Usall, J., J. Smilanick, L. Palou, N. Denis-Arrue, N. Teixido, R. Torres and I. Vinas. 2008. Preventive and curative activity of combined treatments of sodium carbonates and *Pantoea agglomerans* CPA-2 to control postharvest green mold of citrus fruit. **Postharvest Biol. Technol.** 50: 1–7.
- Watanabe, E., Y. Yoshimura, Y. Yuasa and H. Nakazawa. 2001. Immunoaffinity column clean-up for the determination of imazalil in citrus fruits. **Anal. Chim. Acta.** 433: 199–206.
- Whiteside, J.O., S.M. Garnsey and L.W. Timmer. 1989. **Compendium of Citrus Diseases**. 2nd ed. The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota.
- Wojciech, J. Janisiewicz and L. Korsten. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annu. Rev. Phytopathol.** 40: 411–441.
- Yahyazadeh M., R. Omidbaigi, R. Zare and H. Taheri. 2007. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24: 1445–1450.
- Yang, Tsui-Chu., Cheng-Chun Chou and Chin-Fung Li. 2005. Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. **Int. J. Food Microbiol.** 97: 237–245.
- Yong-cai, LI., SUN Xiao-juan, BI Yang, GE Yong-hong and WANG Yi. 2009. Antifungal activity of chitosan on *Fusarium sulphureum* in relation to dry rot of potato tuber. **Agr. Sci. China.** 8: 597–604.

Zhang L.J., C.F. Wu, X.L. Meng, D. Yuan, X.D. Cai, Q.L. Wang and J.Y. Yang. 2008.

Comparison of inhibitory potency of three different curcuminoid pigments on nitric oxide and tumor necrosis factor production of rat primary microglia induced by lipopolysaccharide. **Neurosci. Lett.** 447: 48–53.

Zhang, J. 2007. The potential of a new fungicide fludioxonil for stem-end rot and green mold control on Florida citrus fruit. **Postharvest Biol. Technol.** 46: 262-270.

_____ and P.P. Swingle, 2005. Effect of curing on green mold and stem-end rot of citrus fruit and its potential application under florida packing system. **Plant Dis.** 89: 834-840.

Zhang, Z., Z. Zhu, Z. Ma and H. Li. 2009. A molecular mechanism of azoxystrobin resistance in *Penicillium digitatum* UV mutants and a PCR-based assay for detection of azoxystrobin-resistance strains in packing- or store-house isolates. **Int. J. Food Microbiol.** 131: 157-161.





ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่งสด	200 กรัม
Dextrose	20 กรัม
วุ้น	15 กรัม
น้ำ	1000 มิลลิลิตร

1.2 potato dextrose broth (PDB)

มันฝรั่งสด	200 กรัม
Dextrose	20 กรัม
น้ำ	1000 มิลลิลิตร

1.3 malt extract broth (MEB)

malt extract powder	20 กรัม
น้ำ	1000 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลาย Anisaldehyde reagent

Anisaldehyde	0.5 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10 มิลลิลิตร
เมทานอล	85 มิลลิลิตร
Sulfuric acid	8 มิลลิลิตร

ทำการละลาย Anisaldehyde ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใน Glacial acetic acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมเมทานอล 85 มิลลิลิตร และ Sulfuric acid 8 มิลลิลิตร เมื่อผสมสารละลายทั้งหมดแล้วทำการเก็บไว้ในขวดสีชา จึงเก็บไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

3. การเตรียม MTT reagent

MTT	5 กรัม
PBS	1000 มิลลิลิตร

ชั่ง MTT ปริมาณ 5 กรัม ละลายใน PBS ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 800 มิลลิลิตร คนสารละลายจนละลายเข้ากันดีจึงเติม PBS 200 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองก่อนนำไปใช้





ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ ข1 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการงอกของโคนิเดียเชื้อรา

P. digitatum (%) ต่อตัวทำลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:
เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับ
ความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร PDA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
เป็นระยะเวลา 21 ชั่วโมง

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	24	119947.697	4997.821	101.974*
Error	75	3675.811	49.011	
Total	99	123623.508		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
CV = 20.924

ตารางผนวกที่ ข2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการงอกของโคนิเดียเชื้อรา

P. digitatum (%) ต่อสารสกัดขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำลายเมทานอล ที่ระดับ
ความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร PDA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	21	14922.193	710.581	543.749*
Error	66	86.250	1.307	
Total	87	15008.443		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
CV = 2.648

ตารางผนวกที่ ข3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการรอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* (%) ต่อสารสกัดขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร PDA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	21	27431.193	1306.247	232.849*
Error	66	370.250	5.610	
Total	87	27801.443		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
CV = 6.345

ตารางผนวกที่ ข4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการรอกของโคนิเดียเชื้อรา *P. digitatum* (%) ต่อสารสกัดขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายเฮกเซน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร PDA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	21	21017.148	1000.817	230.354*
Error	66	286.750	4.345	
Total	87	21303.898		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
CV = 5.119

ตารางผนวกที่ ข5 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการงอกของโคนิเดียเชื้อรา

P. digitatum (%) ต่อสารสกัดขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล:

เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับ

ความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร PDA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	21	9678.500	460.881	163.538*
Error	66	186.000	2.818	
Total	87	9864.500		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

CV = 3.71

ตารางผนวกที่ ข6 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของ

เชื้อรา *P. digitatum* (%) บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันผงที่

ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:

เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้น

0, 10000, 20000, 30000, 40000 และ 50000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศา

เซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	24	7524.711	313.530	6092.212*
Error	75	3.860	.051	
Total	99	7528.571		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

CV = 1.134

ตารางผนวกที่ ข7 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของจำนวนผลที่เป็นโรคผลเน่าราสี
 เชี่ยวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำ
 ละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน
 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) 20% ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10000,
 20000, 30000, 40000 และ 50000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
 เป็นระยะเวลา 7 วัน

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	24	2096.000	87.333	2.729*
Error	75	2400.000	32.000	
Total	99	4496.000		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
 CV = 38.22

ตารางผนวกที่ ข8 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความรุนแรงของโรคผลเน่าราสี
 เชี่ยวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันผงที่ละลายในตัวทำ
 ละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และเมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน
 1:1:1 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) 20% ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10000,
 20000, 30000, 40000 และ 50000 ppm หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
 เป็นระยะเวลา 7 วัน

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	24	31943.238	1330.968	2.668*
Error	75	37409.090	498.788	
Total	99	69352.328		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
 CV = 45.937

ตารางผนวกที่ ข9 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของจำนวนผลที่เป็นโรคผลเน่าราสี
 เชี่ยวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผงที่
 ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm หลังจาก
 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	904.688	301.563	64.333*
Error	12	56.250	4.688	
Total	15	960.938		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
 CV = 11.358

ตารางผนวกที่ ข10 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความรุนแรงของโรคผลเน่าราสี
 เชี่ยวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผง
 ที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm
 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	16568.000	5522.667	36.373*
Error	12	1822.000	151.833	
Total	15	18390.000		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
 CV = 17.603

ตารางผนวกที่ ข11 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของจำนวนผลที่เป็นโรคผลเน่าราสี
 เจียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผง
 ที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm
 ร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25
 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	5	1733.333	346.667	23.771*
Error	18	262.500	14.583	
Total	23	1995.833		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
 CV = 22.354

ตารางผนวกที่ ข12 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความรุนแรงของโรคผลเน่าราสี
 เจียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผง
 ที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ที่ระดับความเข้มข้น 30000 ppm
 ร่วมกับไคโตแซน 2% (ที่ละลายใน 0.5% acetic acid) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25
 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	5	47356.208	9591.242	109.632*
Error	18	1574.750	87.486	
Total	23	449530.958		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
 CV = 17.334

ตารางผนวกที่ ข13 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของจำนวนผลที่เป็นโรคผลเน่าราสี
 เชี่ยวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผง
 ที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ระดับความเข้มข้น 10000 และ 30000
 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 750 ppm
 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	122	3301.923	275.160	20.440*
Error	39	525.000	13.462	
Total	51	3826.923		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
 CV = 43.362

ตารางผนวกที่ ข14 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความรุนแรงของโรคผลเน่าราสี
 เชี่ยวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (%) ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันสดและขมิ้นชันผง
 ที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 20% ระดับความเข้มข้น 10000 และ 30000
 ppm ร่วมกับสารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 750 ppm
 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	12	59647.692	4970.641	52.624*
Error	39	3683.750	94.455	
Total	51	63331.442		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
 CV = 38.608

ตารางผนวกที่ ข15 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของ antioxidant activity (%) ของสารสกัดจากขมิ้นชันผง ที่ระดับความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ของ α -Tocopherol sample A sample B sample C sample D sample E sample F และ sample G

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	7	.026	.004	92.837*
Error	16	.001	.000	
Total	23	.026		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
CV = 0

ตารางผนวกที่ ข16 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดของคน (%) ของสารสกัดจากขมิ้นชันผง ที่ระดับความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ของ sample A sample B sample C sample D sample E sample F และ sample G

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	6	.425	.071	22.080*
Error	14	.045	.003	
Total	20	.470		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
CV = 17.132

ตารางผนวกที่ ข17 ระดับในการประเมินความรุนแรงโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

ระยะการ เกิดโรค	เปอร์เซ็นต์ความ รุนแรงของโรค	ลักษณะอาการของโรค	ภาพ
1	0%	- ไม่เกิดโรค	
2	5%	- ผลส้มเป็นโรค - แสดงอาการช้าแต่ไม่พบการ ปรากฏของเส้นใย	
3	10%	- ผลส้มเป็นโรค - พบเส้นใยฟู สีขาวเล็กน้อย	
4	25%	- ผลส้มเป็นโรค 1 ใน 4 ของผล ส้ม - พบเส้นใยฟู มีโคนเดียวสีเขียว	
5	50%	- ผลส้มเป็นโรค 2 ใน 4 ของผล ส้ม - พบเส้นใยฟู มีโคนเดียวสีเขียว	
6	75%	- ผลส้มเป็นโรค 3 ใน 4 ของผล ส้ม - พบเส้นใยฟู มีโคนเดียวสีเขียว	
7	100%	- ผลส้มเป็นโรคทั้งผล	

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ์
 เกิดวันที่ 10 พฤษภาคม พ.ศ. 2528
 สถานที่เกิด อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว
 ประวัติการศึกษา วท.บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยแม่โจ้
 ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยนักวิจัย
 สถานที่ทำงานปัจจุบัน ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

- สมศิริ แสงโชติ, เนตรนภิส เขียวขำ และศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ์. การควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* โดยใช้สารสกัดกิ่งบริสุทธิ์จากขมิ้น และไคโตแซน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 39 ฉบับที่ 3 (พิเศษ) กันยายน - ธันวาคม 2551. 23-26.
- สมศิริ แสงโชติ, วนิดา สีหาไชย และศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ์. ผลของกรดเปอร์ซิกตริกต่อโรคเน่าราสีเขียวของส้มและโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 39 ฉบับที่ 3 (พิเศษ) กันยายน - ธันวาคม 2551. 206-208.
- สมศิริ แสงโชติ, เนตรนภิส เขียวขำ และศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ์. การควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* โดยใช้สารสกัดกิ่งบริสุทธิ์จากขมิ้น และไคโตแซน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 41 ฉบับที่ 1 (พิเศษ1) มกราคม - เมษายน 2553. 158-161.