



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาการใช้สารสกัดจากอบเชยในการป้องกันและ
ควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงน้ำดอกไม้

โดย ดร. เนตรนภิส เขียวขำ และคณะ

พฤษภาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาการใช้สารสกัดจากอบเชยในการป้องกันและ
ควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงน้ำดอกไม้

Development of bioactive cinnamon extract for control
postharvest disease of Nam Dok Mai mango and quality

คณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการ ดร. เนตรนภิส เขียวขำ
 ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา รศ.ดร. สมศิริ แสงโชติ
 ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 รศ.ดร. สรัญญา วัชรโรทัย
 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณนักวิจัยที่ปรึกษา รศ.ดร. สมศิริ แสงโชติ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ รศ.ดร. สรัญญา วัชรโรทัย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและให้เวลาอย่างเต็มที่ในการให้คำปรึกษาในการทำวิจัย ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุนทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : สัญญาเลขที่ MRG5180278
(รหัสโครงการ)

Project Title : การพัฒนาการใช้สารสกัดจากอบเชยในการป้องกันและควบคุมโรคหลัง(ชื่อโครงการ) การเก็บเกี่ยวของมะม่วงน้ำดอกไม้

**Development of bioactive cinnamon extract for control
postharvest disease of Nam Dok Mai mango and quality**

Investigator : ดร. เนตรนภิส เขียวขำ
(ชื่อนักวิจัย) ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail Address : agrnpk@ku.ac.th

Project Period : 3 ปี
(ระยะเวลาโครงการ)

สารสกัดหยาบ lipophilic phase จากอบเชย 5 ชนิด คือ เปลือกต้นอบเชยไทย (*Cinnamomum aromaticum*) เปลือกต้นอบเชยเทศ (*C. verum*) เปลือกต้นอบเชยญวน (*C. loureirii*) เปลือกต้นและใบเซียด (*C. iners*) และเปลือกต้นและใบจวง (*C. porrectum*) ซึ่งสารสกัดหยาบจากเปลือกต้นอบเชยเทศและเปลือกต้นอบเชยญวนแสดงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium herbarum* อย่างชัดเจน ด้วยวิธี Bioautography โดยมีสารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอลเพียงชนิดเดียวที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส มีค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) เท่ากับ 625 µg/ml ที่เวลา 24 ชม. และมีค่า MIC เท่ากับ 1,250 µg/ml ที่เวลา 48 ชม. โดยไม่มีสารสกัดหยาบอบเชยชนิดใดที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* สาเหตุโรคขั้วผลเน่า การแยกสารประกอบจากสารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอลด้วยวิธี Dry column chromatography ควบคู่กับการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี Bioautography ทำให้ได้สารประกอบที่ละลายในสารละลายเฮกเซน 25 เปอร์เซ็นต์ในไดเอทิลอีเทอร์ (Fraction VI₁ ตำแหน่งที่ 1; sample A) ที่มีบริเวณการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากที่สุด และเมื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผล

มะม่วง พบว่ากรรมวิธีที่พ่น ด้วยสารสกัดหยาบที่ละลายด้วยเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm และทิ้งไว้เป็นเวลา 5 ชม. ก่อนการปลูกเชื้อเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธีการพ่น มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคลดลง 11.11 เปอร์เซ็นต์เทียบกับชุดควบคุม และมีความรุนแรงของการเกิดโรค 21.56 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และพบว่ากรรมวิธีที่ใช้สารประกอบ Sample A ที่ละลายในเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 10,000 ppm หยดลงบนกระดาดทรงวงบนบริเวณที่มีการปลูกเชื้อแบบไม่ทำแผล มีการเกิดโรคน้อยที่สุด 19.45 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีการพ่นหรือจุ่มด้วยสารสกัดหยาบบอบเชยญวนไม่มีผลต่อ ลักษณะปรากฏ สีเปลือก กลิ่น รสชาติ การยอมรับโดยรวมของมะม่วง

คำหลัก: *Cinnamomum* โรคแอนแทรคโนส MIC

Crude extracts of five cinnamon species (stem barks of *Cinnamomum aromaticum*, *C. verum* and *C. loureirii*, stem barks and leaves of *C. iners* and *C. porrectum*) were tested for inhibitory activity against mango fruit diseases. The lipophilic crude extracts of *C. verum* and *C. loureirii* had strongest inhibitory effect against *Cladosporium herbarum* on bioautography assay. Only crude extract of *C. loureirii* which dissolving in MeOH showed antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* cause anthracnose by minimum inhibitory concentration (MIC) value at 625 µg/ml at 24 hr and 1,250 µg/ml at 48 hr. All crude extracts could not inhibit spore germination of *Lasiodiplodia theobromae* cause stem end rot. A crude extract of *C. loureirii* which dissolving in MeOH was separated by dry column chromatography and correspondingly, their bioautography showed antifungal activity. Fraction eluted with 25% hexane in EtOAc (Fraction VI₁ position 1; sample A) showed separately inhibition zone indicating antifungal compounds. Study of antifungal ability to control anthracnose, spraying 10,000 ppm of crude extract in 5% EtOH in sterile water on mango fruits after 5 hr spray with inoculated with *C. gloeosporioides* showed decrease disease incidence at 11.11% and 21.56% of disease severity as lowest but not significant. Unwound inoculate mango fruits were dropped 10,000 ppm of Sample A in 5% EtOH in sterile water. The result showed lowest 19.45% of disease incidence compare with control but not significant. Treatments with crude extract of *C. loureirii* which dissolving in MeOH by dipping and spraying did not effect on appearance, color of peel, flavor, odor, taste and acceptance quality of mango fruits.

Keywords: *Cinnamomum*, anthracnose, MIC

บทนำ

ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มีศักยภาพสูงในการส่งออกเนื่องจากมีรูปทรงและสีสวย มีรสชาติเป็นที่นิยมอย่างมาก แต่ปัญหาที่พบในการส่งออก คือ อาการผลเน่าเนื่องจากโรคแอนแทรกโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นส่วนมาก รองลงมาคือโรคขั้วผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ในระหว่างการส่งออกหรือเมื่อสินค้าถึงประเทศปลายทาง ซึ่งสามารถทำความเสียหายทั้งปริมาณและคุณภาพของผลผลิตมะม่วง เชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถเข้าทำลายได้เกือบทุกส่วนของมะม่วง เช่น ต้นกล้า ยอดอ่อน ใบอ่อน ช่อดอก ดอก ผลอ่อน จนถึงผลแก่ ซึ่งการเข้าทำลายของเชื้อราชนิดดังกล่าวที่ผลจะไม่แสดงอาการที่ผลดิบ แต่จะแสดงอาการเมื่อผลสุก เนื่องจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีความสามารถในการเข้าทำลายแบบแฝง (latent infection) เมื่อสภาพแวดล้อมภายหลังการเก็บเกี่ยวเหมาะสมอาการของโรคก็จะแสดงออก เช่น ผลสุกจึงมีปริมาณอาหารที่เหมาะสม การสลายตัวของสารต้านเชื้อรา หรือมีความชื้นสูง ในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งจะเป็นผลเสียหายต่อการส่งมะม่วงไปจำหน่ายต่างประเทศ ลักษณะอาการของโรคแอนแทรกโนสจะเป็นจุดสีดำ มีรูปร่างกลม ขนาดตั้งแต่เล็กเท่าหัวเข็มหมุด จนถึงขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 - 4 ซม. แล้วแต่ความรุนแรง เมื่อมะม่วงเริ่มแก่ในระหว่างการบ่มหรือขนส่ง จุดแผลเหล่านี้จะขยายใหญ่ขึ้นและลุกลามออกไปทำให้ผลเน่าได้ทั้งผล ส่วนโรคขั้วผลเน่า ผลมะม่วงแสดงอาการเน่าสีน้ำตาลลุกลามจากรอยตัดของขั้วผล ทำให้ผลเน่าและเน่าอย่างรวดเร็ว เกิดการสูญเสียหลังการเก็บเกี่ยว ทั้งในแง่ของต้นทุนการผลิต การขนส่ง และคุณภาพของผลผลิต ในปัจจุบันจึงมีการควบคุมและป้องกันโรคทั้งสอง โดยมีการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด เช่น สารเคมีประเภทดูดซึม benomyl ฉีดพ่นในช่วงผลใกล้เก็บเกี่ยว เพราะจะมีผลต่อคุณภาพของผลผลิตหลังเก็บเกี่ยวด้วย ช่วยลดความเสียหายจากการเกิดผลเน่าได้ หรือการจุ่มในสารละลายโซอาเบนดาโซล (พรอนโต 40) ผสมน้ำที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 5 นาที หรือแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 5 นาทีเพียงอย่างเดียว แล้วผึ่งให้แห้งเพื่อกำจัดเชื้อ (*C. gloeosporioides*) ที่แฝงอยู่ผลมะม่วงที่เก็บเกี่ยวแล้ว ส่วนโรคขั้วผลเน่าเชื้อราจะเจริญเข้าทำลายทางแผลรอยตัดขั้วผลและบาดแผลบนผล การฉีดพ่นสารเคมี carbendazim ก่อนการเก็บเกี่ยวจะช่วยลดการเกิดโรคในระยะหลังเก็บเกี่ยว หรือการทาแผลรอยตัดขั้วผลด้วยปูนแดงสามารถป้องกันโรคได้ ซึ่งในประเทศที่พัฒนาแล้วและมีศักยภาพสูงในการนำเข้าสินค้าทางการเกษตรส่วนใหญ่จะมีการออกมาตรการควบคุมการใช้สารเคมีบางชนิด งานวิจัยในยุคปัจจุบันจึงมีความพยายามที่จะใช้วิธีทางกายภาพและชีวภาพ เช่น การใช้ความร้อน การใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุม และการใช้สารจากธรรมชาติที่ปลอดภัย เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมโรคอย่างยั่งยืน

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อบเชย (cinnamon) จัดอยู่ในวงศ์ Lauraceae ส่วนที่ใช้เป็นเครื่องเทศ ได้จากเปลือกต้นของพืช น้ำมันหอมระเหยจากน้ำมันอบเชยจะมีสารจำพวกอัลดีไฮด์ (Aldehyde volatile oil) เป็นองค์ประกอบหลัก อบเชยมีหลายชนิด แต่ที่มีการนำมาค้าขายในเชิงเศรษฐกิจมีเพียง 4 ชนิดเท่านั้น คือ

1) อบเชยเทศ *Cinnamomum verum* J.S. Presl. ชื่อพ้อง *C. zeylanicum* Garc. ex Bl. ปลูกมากในศรีลังกา อินเดียตอนใต้ หมู่เกาะชิลี และบราซิล มักตัดแขนงในฤดูฝน นำมาขูดเปลือกนอกออกและลอกเปลือกในนำมา ซ่อนกันต่อเป็นแท่งแล้วตากในที่ร่ม 3 วัน เปลือกอบเชยกลั่นจะได้ น้ำมันอบเชยเทศร้อยละ 0.5-1 มี cinnamaldehyde, eugenol, benzaldehyde, methyl amyl ketone, phellandrene, pinene, cymene, nonylaldehyde, linalool, cumicaldehyde ใช้แต่งกลิ่น ลูกกวาด เหล้า ขนม สบู่ ยา ส่วนน้ำมันจากใบจะมีปริมาณ eugenol เท่ากับในน้ำมันกานพลู Ustaa *et al.* (2002) พบว่า cinnamaldehyde และ eugenol กระตุ้นให้เกิด ATP Hydrolysis และยับยั้ง NADH oxidase ในกระบวนการหายใจ

2) อบเชยจีน *Cinnamomum aromaticum* Nees ชื่อพ้อง *C. cassia* Nees Bl. และ *C. cassia* Presl. ต่างจากอบเชยเทศ คือ เปลือกหนาหยาบ สีเข้ม กลิ่นฉุน ขมเล็กน้อย ราคาถูกกว่า และมีแบ่งอยู่ ใช้เป็นยาขับลม บำรุงธาตุ ฝาดสมาน แต่งกลิ่นยา อาหาร เหล้า ลูกกวาด เยลลี่และอาหารประเภทเนื้อ

3) อบเชยญวน *Cinnamomum loureirii* Nees ชื่อพ้อง *C. obtusifolium* Nees var. *loureirii* Perr. et. Eb. เป็นไม้ป่าขึ้นเองตามภูเขาแถบมณฑลอันนัม คล้ายอบเชยจีน มีรสหวาน ส่วนประกอบและประโยชน์คล้ายอบเชยอื่น

4) อบเชยขวา *Cinnamomum burmanii* Blume เป็นไม้ใหญ่สุด ในบรรดาอบเชยทั้งหมด ใช้แต่งกลิ่นอาหารใส่แกงมัสมั่น ข้าวหมกไก่ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2544)

น้ำมันหอมระเหยและสารผสมระหว่างน้ำมันและยางไม้ (oleoresin) ซึ่งพบได้ตามธรรมชาติของ *C. zeylanicum* พบว่ามีสาร antioxidant (Kitazurua *et al.*, 2004; Mathew and Abraham, 2006) สารต้านเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา (Tabak *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2001; Soliman and Badeaa 2002; Velluti *et al.*, 2003; Matan *et al.*, 2006) โดยมีรายงานว่าประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Penicillium citrinum* และ *P. viridicatum* เปลือกลำต้นอบเชยมีสารประกอบ 13 ชนิด โดยมี (E)-cinnamaldehyde เป็นสารหลัก และ d-cadinene (0.9%) (Singh *et al.*, 2007) และ cinnamaldehyde เป็นสารประกอบหลักในใบและเปลือกลำต้นของอบเชย ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราที่ดีที่สุด Jayatilaka *et al.* (1995) เมื่อเทียบสารประกอบชนิดอื่นๆ เช่น Eugenol,

Coumarin, Terpeneol, Benzaldehyde, Linalool, Geranial และ Cinnamyl alcohol โดยที่ โดยที่ สามารถยับยั้งเชื้อรา *Coriulus versicolor* และ *Laetiporus sulphureus* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่า MIC เท่ากับ 50 และ 75 ppm ตามลำดับ (Sheng-Yang *et al.*, 2005) สอดคล้องกับการศึกษาของ Sivakuma *et al.* (2002) พบว่าการใช้ cinnamaldehyde ความเข้มข้น 30 ppm สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *L. theobromae* *C. gloeosporioides* และ *Gliocephalotrichum microchlamydosporum* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเชื้อราดังกล่าวเป็นเชื้อราสาเหตุโรคข้าวผลเน่า แอนแทรกโนส และโรคเน่าสีน้ำตาลของผลเงาะหลังการเก็บเกี่ยว ตามลำดับ สารสกัดหยาบเปลือกลำต้นอบเชย (*C. zeylanicum*) ส่วน lipophilic จากการทดสอบด้วยวิธี bioautography พบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และให้ผลที่สอดคล้องกันเมื่อทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Botrytis cinerea* โดยวิธีของ Hadacek and Greger (2000) มีค่า EC₅₀ เท่ากับ 112 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) เท่ากับ 312.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 162 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีค่า EC₅₀ เท่ากับ 894 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MIC เท่ากับ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ 1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Khewkhom, 2006) สารสกัดอบเชย 5 g/L มีคุณสมบัติในการยับยั้งการงอกของสปอร์ และการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum musae*, *Fusarium* spp. และ *Lasiodiplodia theobromae* ได้ และเมื่อปลูกเชื้อก่อนจุ่มผลกล้วยด้วยสารสกัดอบเชยความเข้มข้นดังกล่าวทำให้ความรุนแรงของการเกิดโรคต่ำกว่าการจุ่มผลด้วยสารเคมี cabendazim อย่างมีนัยสำคัญ และไม่มีผลเสียต่อคุณภาพของผลกล้วยหอมทอง (Kyu Kyu Win *et al.*, 2007) ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกันเมื่อทดลองกับผลมะเขือเทศและสตอเบอรี่ ไม่เปลี่ยนแปลงคุณภาพเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในด้านการสูญเสียน้ำหนัก (percentage weight loss) ปริมาณกรดอินทรีย์ (organic acid content) ค่าความหวาน และปริมาณสารฟีนอลิก (phenolic content) (Tzortzakakis, 2007) นอกจากนี้การใช้น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย (*C. zeylanicum*) ผสม wax เคลือบกระดาษบรรจุภัณฑ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* และ *A. flavus* ได้เป็นเวลา 7 วัน และ เมื่อทดลองบรรจุผลสตอเบอรี่ สามารถควบคุมโรคได้เป็นเวลา 7 วันที่อุณหภูมิ 4 ° C (Rodriguez *et al.*, 2007) และการใช้ cinnamaldehyde ควบคุมโรคผลเน่าของผลเงาะหลังการเก็บเกี่ยว พบว่ากรรมวิธีที่ใช้กระดาษรองดูดซับ cinnamaldehyde ความเข้มข้น 30 ppm สามารถควบคุมการเกิดโรคผลเน่าและความรุนแรงของโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีควบคุม โดยที่รสชาติ กลิ่น สีของเปลือกไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Sivakuma *et al.*, 2002)

Cinnamaldehyde ถูกอนุญาตให้อยู่ในรายการ granted A ของยุโรป ซึ่งอาจจะใช้กับอาหารได้ (Council of Europe, 2000) และได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา

(Food and Drug Administration-FDA) ให้เป็น GRAS (21CFR 182.60) ซึ่ง FEMA (Flavor and Extract Manufacturers' Association) ได้รับรองว่าส่วนประกอบใน flavor มีความปลอดภัย (FEMA, 1965) แต่ JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) ยังไม่มีการรับรองปริมาณ cinnamaldehyde ที่อนุญาตให้ใส่ในอาหาร (JECFA, 2000)

เพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว งานวิจัยนี้จึงเล็งเห็นความสำคัญของการพัฒนาใช้สารสกัดจากอบเชย ในการป้องกันและควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงน้ำดอกไม้ เพื่อพัฒนารูปแบบการใช้สารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพร่วมกับวิธีการอื่นที่ช่วยเพิ่มคุณภาพผลิตผลได้อย่างปลอดภัยแก่ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมเป็นประโยชน์ต่อผู้ประกอบการ เกษตรกร ลดต้นทุนการผลิต และลดการใช้สารเคมี

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อศึกษาการสกัดสารหยาบและส่วนสารประกอบตามความสามารถการละลายของอบเชย 4 ชนิด เพื่อทดสอบสารออกฤทธิ์ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค จำแนกประเภทหรือชนิดสารออกฤทธิ์
- 2) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรค
- 3) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยต่อการควบคุมโรคบนผล และศึกษาคุณภาพของผลิตผลหลังการเก็บรักษา
- 4) เพื่อพัฒนารูปแบบการใช้สารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพร่วมกับวิธีการอื่นที่ช่วยเพิ่มคุณภาพผลิตผลได้อย่างปลอดภัย ลดต้นทุนการผลิต และลดการใช้สารเคมี

อุปกรณ์และวิธีการ

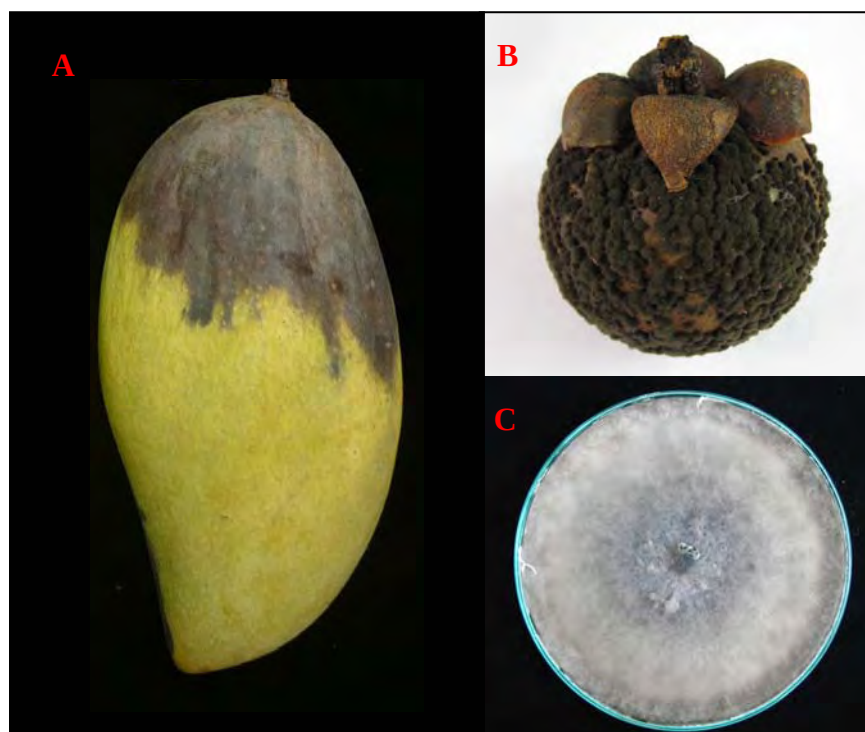
1) การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรคและคัดเลือกสายพันธุ์ที่แยกได้จากผลมะม่วง และเก็บรักษาเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

การเตรียมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

แยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสด้วยวิธี Tissue Transplanting Method โดยตัดชิ้นส่วนบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อที่ติดกับเนื้อเยื่อที่เป็นโรคออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 5x5 มิลลิเมตร ด้วยใบมีดที่ลงไฟฆ่าเชื้อ แล้วนำชิ้นส่วนเหล่านี้มาฆ่าเชื้อภายนอก (surface disinfection) ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ Clorox ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1% sodium hypochlorite) เป็นเวลา 5 นาที ในจานเลี้ยงเชื้อ รินน้ำยาฆ่าเชื้อออกโดยไม่ต้องเปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำชิ้นพืชไปวางบนกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อ เมื่อชิ้นพืชแห้งแล้วนำไปวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อ จานละ 4 ชิ้น บ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลาระยะเวลา 3-4 วัน เมื่อเชื้อเจริญขึ้น จึงแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่เจริญอย่างรวดเร็วและสร้างสปอร์จำนวนมาก ย้ายสปอร์ลงในหลอดอาหาร PDA เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบในการทดลองต่อไป ซึ่งในการแยกเชื้ออาจเติมสารปฏิชีวนะ streptomycin 200 ppm เพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรียขึ้นปะปนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

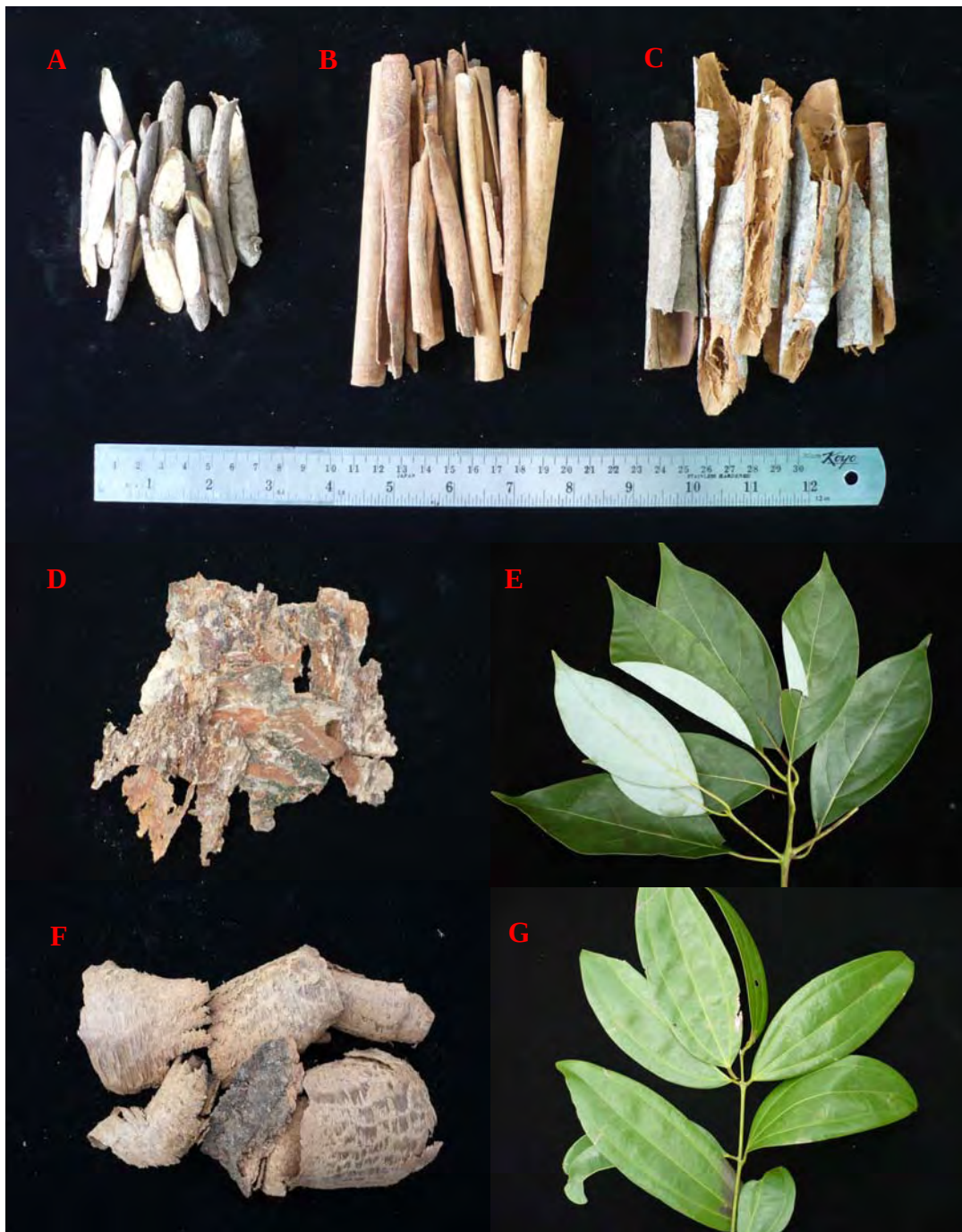
การเกิดโรคขั้วผลเน่าบนผลมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* จะไม่สร้างสปอร์บนผลมะม่วงและอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จึงต้องเตรียมจากผลมังคุด (ภาพที่ 1) โดยบ่มผลที่แสดงอาการของโรค ภายใต้สภาพชื้น บรรจุลงในภาชนะบรรจุที่กรุด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-20 วัน เมื่อมีการสร้างสปอร์ จึงใช้ฟู่กันปัดสปอร์ออกมาเก็บรักษาไว้ในขวดแก้วฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป และทดสอบการเกิดโรคขั้วผลเน่าบนผลมะม่วง โดยการปลูกเชื้อด้วยสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงบนขั้วผลมะม่วง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลาระยะเวลา 7 วัน สังเกตอาการขั้วผลเน่า



ภาพที่ 1 ลักษณะของโรคขั้วผลเน่าบนผลมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* (A), โรคผลเน่าของผลมังคุดที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* ที่มีการสร้างสปอร์บนผล (B) และเชื้อรา *L. theobromae* บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน ที่ไม่มีการสร้างสปอร์ (C)

2) การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากอบเชย 5 ชนิด

นำอบเชยไทย (*Cinnamomum aromaticum*) อบเชยเทศ (*Cinnamomum verum* หรือ *C. zeylanicum*) อบเชยญวน (*C. loureirii*) จากร้านขายยาเจ้ากรมเปือ กรุงเทพมหานคร เชียด (*C. iners*) และ จวง (*C. porrectum* หรือ *C. bejolghota*) จากสวนพฤกษศาสตร์ทุ่งค่าย จ.ตรัง (ภาพที่ 2) มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วผึ่งในที่ร่มให้แห้งประมาณ 2-3 วัน เพื่อให้น้ำระเหยออก แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นหยาบ หลังจากนั้นนำมาบรรจุลงในขวดสีชาเติมตัวทำละลายเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เก็บในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน กรองสารสกัดหยาบด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (evaporator) หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้ มาแยกคุณสมบัติการละลายด้วยน้ำและคลอโรฟอร์ม (ในการทดลองนี้ต้องปฏิบัติในตู้ดูดควัน) โดยละลายสารสกัดหยาบด้วยคลอโรฟอร์ม จากนั้นเทลงในกรวยแยก และละลายสารสกัดหยาบที่เหลือด้วยน้ำในอัตราส่วนที่เท่ากัน เทลงในกรวยแยก จากนั้นปิดฝากรวยแยกแล้วเขย่าให้คลอโรฟอร์มและน้ำเข้ากัน เปิดฝากรวยแยกและทิ้งไว้ให้สารแยกชั้นอย่างชัดเจน ประมาณ 20 นาที นำสารละลายที่แยกชั้นอยู่ด้านล่างของกรวยแยกซึ่งเป็นสารที่ละลายในคลอโรฟอร์ม เป็นส่วนที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วต่ำ (lipophilic phase) จากนั้นแยกตัวทำละลายคลอโรฟอร์มออกด้วยเครื่อง evaporator หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบที่ได้ และเติมเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นตัวทำละลาย ใส่ในขวดสีชา เก็บรักษาสารสกัดหยาบในที่มืด อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2 ลักษณะเปลือกลำต้นและใบของอบเชยต่างๆ : เปลือกต้นอบเชยไทย (*Cinnamomum aromaticum*) (A), เปลือกต้นอบเชยเทศ (*Cinnamomum verum* หรือ *C. zeylanicum*) (B), เปลือกต้นอบเชยญวน (*C. loureirii*) (C), เปลือกต้นและใบเซียด (*C. iners*) (D,E) และเปลือกต้นและใบจวง (*C. porrectum* หรือ *C. bejolghota*) (F,G)

3) ทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี Bioautography

การเตรียมเชื้อรา *Cladosporium herbarum*

นำเชื้อรา *Cladosporium herbarum* ที่แยกได้จากดินมาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นเมื่อเชื้อราที่ต่อเชื้อไว้เจริญเติบโตบนผิวหน้าของอาหารแล้ว นำไปเตรียม spore suspension โดยใช้สารละลาย dimethyl sulfoxide 5 เปอร์เซ็นต์ (DMSO) เพื่อรักษาสภาพของสปอร์เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เท DMSO ลงในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้แท่งแก้วฆ่าเชื้อเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าจานเพาะเชื้อ กรองเอาวุ้นและเส้นใยออกโดยใช้ผ้าขาวบางฆ่าเชื้อ ใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 4-5 จานต่อการทำแผ่น TLC 1 แผ่น เมื่อได้สปอร์มากพอเก็บใส่ในภาชนะที่มีกระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์หุ้ม เก็บรักษา spore suspension ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ในการจำแนกชนิดของสารโดยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) จะเป็นตัวพาสารที่ต้องการทดสอบขึ้นไปตามเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) สารต่างชนิดกันที่มีขนาด น้ำหนักโมเลกุล และความสามารถในการละลายในตัวพาที่แตกต่างกันจะเคลื่อนที่ไปได้ด้วยความเร็ว และระยะทางที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกสารต่างชนิดกันออกมาได้ แม้ว่าสารนั้นจะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นก็ตาม นำแผ่น TLC (Merck, aluminum sheets 20x20 cm silica gel 60 F₂₅₄) มาทำเครื่องหมาย โดยใช้ไม้บรรทัดวัดแผ่น TLC จากขอบทั้งด้านบนและด้านล่างเข้ามาด้านละ 1 เซนติเมตร และใช้ดินสอทำเครื่องหมายเป็นจุดไว้ตามจำนวนของสารสกัดที่จะนำมาทดสอบบนเส้นจากขอบด้านล่างที่วัดไว้ โดยในแต่ละจุดจะมีระยะห่างที่เท่าๆ กัน หลังจากนั้นนำสารสกัดอบเชยชนิดต่างๆ มาหยดบนจุดที่ใช้ดินสอทำเครื่องหมายไว้ โดยใช้ capillary tube จุ่มลงในสารสกัดแล้วนำไปหยดลงบนแผ่น TLC ทำซ้ำตัวอย่างสารสกัดละ 3 ครั้ง เมื่อสารสกัดบนแผ่น TLC แห้งแล้ว จึงนำไปวางตั้งในโถแก้วที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ (mobile phase) อิมัตวอยู่ (ในการทดลองนี้ต้องปฏิบัติในตู้ดูดควัน) การเตรียม mobile phase โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เฮกเซนและไดเอซิลอีเทอร์ ในอัตราส่วน 6 : 4 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในโถแก้วแล้วปิดฝาทิ้งไว้ประมาณครึ่งชั่วโมง เพื่อให้โถแก้วอิมัตวไปด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อนำแผ่น TLC มาตั้งในโถแก้วแล้วปิดฝาโถแก้วให้สนิท ทิ้งไว้จนกระทั่งสารสกัดเคลื่อนที่ถึงขอบบนของแผ่น TLC โดยห่างจากขอบบนประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำแผ่น TLC ออกมา เมื่อตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยจนแผ่น TLC แห้งแล้ว จึงนำมาส่องภายใต้แสง long-wave Ultra Violet (UV) โดยใช้ UV lamp ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะเห็นสารสกัดหยาบแยกชั้น และบางส่วนจะมีการเรืองแสงเป็นสีต่างๆ ตามความสามารถในการละลาย จากนั้น เตรียมพ่น spore suspension ของเชื้อรา *C. herbarum* ลงบนแผ่น TLC โดย

ผสม spore suspension ความเข้มข้น 10^{12} สปอร์ต่อมิลลิลิตร กับอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.7% Malt broth ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นใช้เครื่องพ่นสาร (airbrush รุ่น Model 200 Bottom Feed บริษัท Badger air-brush Co.) พ่นให้เป็นละอองฝอยอย่างสม่ำเสมอ โดยเริ่มพ่นจากแนวนอนหรือแนวตั้ง เพื่อให้ spore suspension กระจายทั่วบนแผ่น TLC เมื่อพ่นครั้งแรกแล้วรอแห้งแล้วจึงพ่นซ้ำอีกครั้งในแนวตรงกันข้ามกับครั้งแรก เมื่อแผ่น TLC แห้งแล้วเก็บในกล่องพลาสติกขนาด 24 x 24 x 1.5 เซนติเมตร เพื่อเป็น moist chamber โดยรองกระดาษทิชชูที่ก้นกล่องเกลี่ยกระดาษทิชชูให้เรียบ แล้วหยดด้วยน้ำฆ่าเชื้อให้เปียกชื้นพอหมาด ใช้ผ้าขาว 4 ผารองแผ่น TLC เพื่อป้องกันไม่ให้แผ่น TLC สัมผัสน้ำโดยตรง ปิดฝากล่อง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน เชื้อรา *C. herbarum* จะเจริญเต็มแผ่น TLC และแสดงบริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone)

ปฏิบัติซ้ำเหมือนข้างต้นบนแผ่น TLC อีก 1 แผ่น เพื่อสังเกตกลุ่มของสารประกอบต่างๆ แยกชั้น (fraction) บนแผ่น TLC โดยที่เมื่อถึงขั้นตอนที่เอาแผ่น TLC ออกจากโถแก้วแล้ว นำไปพ่นด้วย anisaldehyde reagent จากนั้นนำไปเข้าตู้อบลมร้อนอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที จะปรากฏสีตามชนิดของกลุ่มสาร

4) ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยที่มีผลต่อเชื้อราสาเหตุโรค โดยศึกษาการยับยั้งการออกของสปอร์ด้วยวิธี Micro Dilution Assay เพื่อหา Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และวิเคราะห์สารสกัดหยาบด้วยวิธี GC-MS

ศึกษาการยับยั้งการออกของสปอร์เชื้อราด้วยวิธี Micro Dilution Assay เพื่อหาความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) (Hadacek และ Greger, 2000; Engelmeier *et al.*, 2000) ของสารสกัดอบเชยทุกชนิดทั้ง 8 ตัวอย่าง โดยเตรียม stock solution โดยใช้สารสกัดหยาบอบเชย 20 มิลลิกรัม acetone p.a. 250 ไมโครลิตร malt broth 4,750 ไมโครลิตร และ tween 80 1 หยด ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (รุ่น super-mixer Lab-line instruments, Inc.) และชุดควบคุม ทำ serial dilution โดยในช่องแรกของทุกแถว (A1-H1) ใช้สารสกัดหยาบ (stock solution) 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีโดยการดูดเข้าและปล่อยออก ส่วนช่องที่เหลือเติมอาหารเหลว malt broth ช่องละ 50 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 4 ซ้ำคือ แถวที่ A-D เป็นชุดควบคุม และ แถวที่ E-H เป็นสารสกัด ทำ serial dilution ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ multipipette เริ่มแรกความเข้มข้น 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลาย 50 ไมโครลิตร จากช่องแรก แล้วปล่อยลงช่องถัดไป ผสมให้เข้ากันดี แล้วทำซ้ำในช่องถัดไปเรื่อยๆ จนถึงช่องสุดท้ายที่มีความเข้มข้น 1.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติม spore suspension ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อ

มิลลิลิตร ทุกช่องๆ ละ 50 ไมโครลิตร เก็บชุดทดสอบที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 24 48 และ 120 ชั่วโมง ตรวจสอบความงอกของสปอร์ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดีที่สุดไปวิเคราะห์สารออกฤทธิ์โดยวิธี GC-MS ที่บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขากรุงเทพ

5) วิเคราะห์และแยกสารสกัดตามความสามารถการละลายของสารสกัดอบเชย โดยวิธี Dry Column Chromatography

คัดเลือกชนิดของสารสกัดหยาบอบเชยจากข้อ 4 และ 5 ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคมะเร็งแยกสารสกัดตามความสามารถของการละลายโดยวิธี Dry Column Chromatography เตรียมหลอดคอลัมน์โดยใส่สำลีลงไปก่อนแล้วใช้แท่งแก้วดันลงไปให้ถึงด้านล่างสุดของปลายคอลัมน์ จากนั้นเทซิลิกาเจล 60 (silica gel 60 ขนาด 0.2-0.5 mm สำหรับ column chromatography, Merck) ปริมาตร 60 กรัม ลงในหลอดคอลัมน์ หลังจากนั้นละลายสารสกัดหยาบที่ระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่อง evaporator แล้วเทด้วยสารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย เฮกเซน เอธิลอะซิเตต และเมทานอล (ตารางที่ 1) สารละลายอินทรีย์เหล่านี้จะสามารถแยกส่วนสารประกอบ (fraction) ต่างๆ โดยชะสารสกัดหยาบผ่านคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล โดยเก็บแต่ละ fraction ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้ทั้งหมด 24 fractions เมื่อเก็บสารละลายครบทุก fractions แล้ว นำมาระเหยสารละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่อง evaporator แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นเติมเมทานอลเพื่อเป็นตัวทำละลาย แล้วเก็บรักษาไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 อัตราส่วนต่างๆ ของสารละลายอินทรีย์สำหรับ Dry Column Chromatography

Fraction No.	Hexane	EtOAc	MeOH
I	100	-	-
II	95	5	-
III	90	10	-
IV	75	25	-
V	50	50	-
VI	25	75	-
VII	-	100	-
VIII	-	95	5
IX	-	90	10
X	-	75	25
XI	-	50	50
XII	-	-	100

6) ทดสอบความสามารถของ fractions ต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี

Bioautography

นำแผ่น TLC (Merck aluminum sheets 20x20 cm silica gel 60 F₂₅₄) มาทำเครื่องหมายโดยใช้ไม้บรรทัดวัดแผ่น TLC จากขอบทั้งด้านบนและด้านล่างเข้ามาด้านละ 1 เซนติเมตร และใช้ดินสอทำเครื่องหมายเป็นจุดไว้ตามจำนวนของสารสกัดที่จะนำมาทดสอบบนเส้นจากขอบด้านล่างที่วัดไว้ โดยในแต่ละจุดจะมีระยะห่างที่เท่าๆ กัน หลังจากนั้นนำสารสกัดอบเชยชนิดต่างๆ มาหยดบนจุดที่ใช้ดินสอทำเครื่องหมายไว้ โดยใช้ capillary tube จุ่มลงในสารสกัดแล้วนำไปหยดลงบนแผ่น TLC ทำซ้ำ fractions ละ 3 ครั้ง เมื่อสารสกัดบนแผ่น TLC แห้งแล้ว จึงนำไปตั้งในโถแก้วที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ (mobile phase) อิมัตวอยู่ (ในการทดลองนี้ต้องปฏิบัติในตู้ดูดควัน) โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เฮกเซน : ไดเอทิล อีเทอร์ ในอัตราส่วน 6 : 4 (โดย ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในโถแก้ว แล้วปิดฝาทิ้งไว้ประมาณครึ่งชั่วโมงเพื่อให้โถแก้วอิมัตวไปด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อนำแผ่น TLC มาตั้งในโถแก้วแล้วปิดฝาโถแก้วให้สนิท ทิ้งไว้จนกระทั่งสารสกัดเคลื่อนที่ถึงขอบบนของแผ่น TLC โดยห่างจากขอบบนประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำแผ่น TLC ออกมา เมื่อตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยจนแผ่น TLC แห้งแล้ว จึงนำมาส่องภายใต้แสง long-wave Ultra Violet (UV) โดยใช้ UV lamp ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะเห็นสารที่เคลื่อนย้ายเป็นสีต่างๆ ตามความสามารถในการละลาย จากนั้น เตรียมพ่น spore suspension ของเชื้อรา *C. herbarum* ลงบนแผ่น TLC โดยผสม spore suspension ความเข้มข้น 10^{12} สปอร์ต่อมิลลิลิตร กับอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.7% Malt broth ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นใช้เครื่องพ่นสาร (airbrush รุ่น Model 200 Bottom Feed บริษัท Badger air-brush Co.) พ่นให้เป็นละอองฝอยอย่างสม่ำเสมอ โดยเริ่มพ่นจากแนวนอนหรือแนวตั้ง เพื่อให้ spore suspension กระจายทั่วบนแผ่น TLC เมื่อฉีดครั้งแรกแล้วรอแห้งแล้วจึงฉีดซ้ำอีกครั้งในแนวตรงกันข้ามกับครั้งแรก เมื่อแผ่น TLC แห้งแล้วเก็บในกล่องพลาสติกขนาด 24 x 24 x 1.5 เซนติเมตร (moist chamber) ที่มีกระดาษทิชชูรองอยู่ก้นกล่องเกลี่ยกระดาษทิชชูให้เรียบ แล้วหยดด้วยน้ำฆ่าเชื้อให้เปียกพอหมาด ใช้ฝาขวด 4 ฝารองแผ่น TLC เพื่อป้องกันไม่ให้แผ่น TLC สัมผัสน้ำโดยตรง ปิดฝากล่อง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน เชื้อรา *C. herbarum* จะเจริญเต็มแผ่น TLC และแสดงบริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone)

ปฏิบัติซ้ำเหมือนข้างต้นบนแผ่น TLC อีก 1 แผ่น เพื่อสังเกตกลุ่มของสารต่างๆ ที่เคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC โดยที่เมื่อถึงขั้นตอนที่เอาแผ่น TLC ออกจากโถแก้วแล้ว นำไปพ่นด้วย anisaldehyde reagent จากนั้นนำไปเข้าตู้อบรมร้อนอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที จะปรากฏสีตามชนิดของกลุ่มสาร

7) วิเคราะห์และแยกสารออกฤทธิ์จากสารประกอบ (Fraction) ด้วยวิธี Thin Layer Column เพื่อให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และวิเคราะห์ทางพิษเคมีด้วยเครื่อง High Performance Liquid Column Chromatography (HPLC)

นำ fraction ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากข้อ 6 มาแยกสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Thin Layer Column โดยทำให้สารออกฤทธิ์ของ fraction มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยหดยดสารสกัดลงบน preparative layer chromatography (PLC) plates (PLC silica gel 60 F₂₅₄, 0.5 mm, 20 Glass plates 20x20 cm, Merck) แล้วจึงนำไปตั้งในโถแก้วที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ (mobile phase) อิมตัวอยู่ โดยใส่ตัวทำละลายอินทรีย์ เฮกเซน : ไดเอซิล อีเทอร์ ในอัตราส่วน 6 : 4 (โดย ปริมาตร/ ปริมาตร) หลังจากนั้นจึงขูดซิลิกาออกจากแผ่น TLC plates บริเวณแถบที่แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarum* ที่ได้จากข้อ 6) โดยวัดจากค่า R_f แล้วนำซิลิกามาละลายในตัวทำละลายเมทานอล หลังจากนั้นจึงกรองด้วยกรวยกรอง (Filter funnels, Artikel-Nr.21504 Inhalt/ME 1 ST, Filternutsche 50 ml Por. 4 บริษัท ROBU Glasfilter-Geräte GmbH) นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ทางพิษเคมีด้วยเครื่อง High Performance Liquid Column Chromatography (HPLC)

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

การวิเคราะห์สารประกอบด้วยเครื่อง HPLC

- HPLC รุ่น Agilent 1100 Series with UV-VIS DAD
- Column: Agilent Hypersil BDS C18, 250x4,6mm, 5µm
- Mobile phase: ortho-phosphoric acid 0.015 mol/L และ 0.0015mol/L Tetrabutylammoniumhydroxid
- Flow rate: 0.5 ml/min for 35 min
- Stop time: 35 min

8) ทดสอบผลของสารออกฤทธิ์ของ fraction ต่อสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของผลมะม่วง โดยส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)

นำ fraction ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากข้อ 6) มาเตรียม stock solution โดยใช้สารสกัดหยาบ 20 มิลลิกรัม acetone p.a. 250 ไมโครลิตร malt broth 4,750 ไมโครลิตร และ tween 80 1 หยด ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร และชุดควบคุม โดยใช้ acetone p.a. 250 ไมโครลิตร malt broth 4,750 ไมโครลิตร และ tween 80 1 หยด ผสมให้เข้ากัน เติม spore suspension ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทั้ง 2 ชุดกรรมวิธี เก็บที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างไปทำ SEM ที่ศูนย์ปฏิบัติการกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเพื่อเก็บสปอร์ จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีสปอร์อยู่ด้านบนไปรมด้วย osmium tetra oxide 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยแช่ในเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ (alcohol series: 10 20 50 75 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นละ 10 นาที แล้วแช่ใน absolute alcohol 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และดึงแอลกอฮอล์ออกจากเซลล์พืชด้วย critical point dried ใน liquid carbon dioxide นำชิ้นตัวอย่างวางลงบน aluminum stub แล้วนำไปเคลือบด้วยทอง (Balzers SCD 040) จากนั้นจึงนำตรวจด้วยกล้อง SEM ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5410LV

9) ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชย ในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้

การเตรียมผลมะม่วง

มะม่วงที่ใช้ในการทดลองเป็นมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองในระยะแก่เต็มที่ นำผลมะม่วงที่จะใช้ในการทดลองมาจุ่มน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วจุ่มด้วยน้ำเย็นทันที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เพื่อฆ่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เข้าทำลายแบบแฝง (latent infection) มาตั้งแต่ในแปลงปลูก และทาสีผลด้วยสารเคมี carbendazim ความเข้มข้น 1,500 ppm เพื่อควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae*

9.1 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบอบเชยที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ในข้อ 4 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคบนผลมะม่วง โดยในการ

ทดลองจะนำมะม่วงที่ผ่านการฆ่าเชื้อราที่เข้าทำลายแบบแฝงแล้วมาปลูกด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยใช้ spore suspension ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และใช้สารสกัดหยาบที่ละลายด้วยเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm พ่นด้วย เครื่องพ่นสาร (airbrush) พ่นให้เป็นละอองฝอยอย่างสม่ำเสมอ ระยะห่างของหัวพ่นและผลมะม่วง ประมาณ 1 ฟุต แบ่งการทดลองเป็น 6 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นเชื้อรา *C. gloeosporioides*

กรรมวิธีที่ 2 พ่นสารสกัดหยาบอบเชยฉนวน

กรรมวิธีที่ 3 จุ่มสารสกัดหยาบอบเชยฉนวน

กรรมวิธีที่ 4 พ่นเชื้อรา *C. gloeosporioides* 5 ซม. แล้วพ่นเมทานอล 5 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 5 พ่นเชื้อรา *C. gloeosporioides* 5 ซม. แล้วพ่นสารสกัดหยาบอบเชยฉนวน

กรรมวิธีที่ 6 พ่นสารสกัดหยาบ 5 ซม. แล้วพ่นเชื้อรา *C. gloeosporioides*

จากนั้นบรรจุผลมะม่วงลงตะกร้าที่ปูด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ พ่นด้วยสารละลาย ethyphon ความเข้มข้น 100 ppm เพื่อบ่มมะม่วงให้สุกสม่ำเสมอ (ภาพที่ 3) เก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ศึกษาการเกิดโรคและความรุนแรงของการเกิดโรค

9.2 ทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสารประกอบ (fraction)

นำ fraction ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากข้อ 6) มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคบน ผลมะม่วง โดยในการทดลองจะนำมะม่วงที่ผ่านการฆ่าเชื้อราที่เข้าทำลายแบบแฝงแล้วมาปลูกด้วย เชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยไม่ทำแผลก่อนปลูกเชื้อ นำชิ้นวุ้นที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน มาวางบนผลมะม่วงแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นวุ้นออก แล้วหยดสารประกอบ sample A ที่ละลายในเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 10,000 ppm ลงบนกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลมขนาด 0.5 เซนติเมตร วางลงบนบริเวณเดียวกันกับที่เอาชิ้นวุ้นออก จากนั้นบรรจุผลมะม่วงลงตะกร้าที่ปูด้วย กระดาษหนังสือพิมพ์ พ่นด้วยสารละลาย ethyphon ความเข้มข้น 100 ppm เพื่อบ่มมะม่วงให้สุก สม่ำเสมอ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ศึกษาการเกิดโรคและความ รุนแรงของการเกิดโรคแอนแทรคโนส



ภาพที่ 3 ผลมะม่วงที่ผ่านกรรมวิธีทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาดก่อนการเก็บรักษา

10) ทดสอบการใช้ประสาทสัมผัสกับผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ใช้สารสกัดหยาบอบเชยญวนในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส

นำผลมะม่วงจากข้อ 9.1 หลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7 วัน ในกรรมวิธีที่ฟ้นและจุ่มด้วยสารสกัดหยาบอบเชยญวนสารประกอบ sample A ที่ละลายในเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 10,000 ppm มาทดสอบการใช้ประสาทสัมผัส โดยทำแบบประเมินการยอมรับทางประสาทสัมผัสโดยใช้ Unstructured hedonic scale (ISO 4121:1987) แบบ 9 ระดับ โดยแบ่งเป็น 3 ตัวอย่าง ไม่ระบุรายละเอียดให้ผู้ทดสอบทราบ โดยตัวอย่างหมายเลข 1 คือ ชุดควบคุม (ฟ้นน้ำ) ตัวอย่างหมายเลข 2 คือ ฟ้นสารสกัดหยาบตัวอย่างหมายเลข 3 คือ จุ่มสารสกัดหยาบ

ประเมินการยอมรับทางประสาทสัมผัสโดยใช้ Unstructured hedonic scale (ISO 4121:1987) แบบ 9 ระดับ

ตัวอย่างมะม่วงน้ำดอกไม้

ตัวอย่างหมายเลข ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3

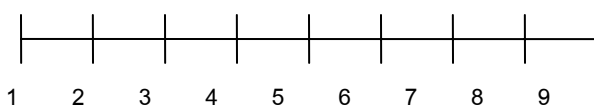
ผู้ทดสอบ ชื่อ-สกุล วันที่ เม.ย. 2553

โปรดทำเครื่องหมาย ✕ ลงบนเส้นแสดงระดับการยอมรับ

1. ลักษณะปรากฏ

ไม่ยอมรับมากที่สุด

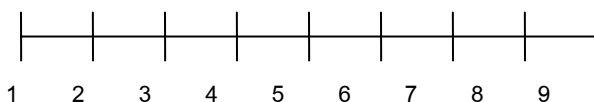
ยอมรับมากที่สุด



2. สีเปลือก

ไม่ยอมรับมากที่สุด

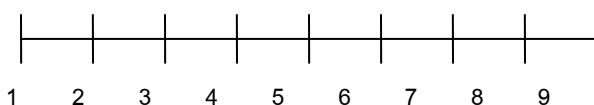
ยอมรับมากที่สุด



3. กลิ่น

ไม่ยอมรับมากที่สุด

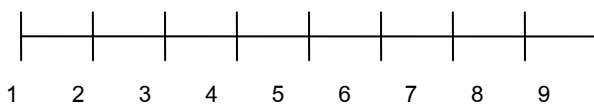
ยอมรับมากที่สุด



4. รสชาติ

ไม่ยอมรับมากที่สุด

ยอมรับมากที่สุด



5. การยอมรับโดยรวม

ไม่ยอมรับมากที่สุด

ยอมรับมากที่สุด



ผลการทดลองและวิจารณ์

1) การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากอบเชย 5 ชนิด วิเคราะห์ และแยกสารสกัดตามความสามารถการละลายของสารสกัดอบเชย

จากการสกัดตัวอย่างพืชอบเชย 5 ชนิด คืออบเชยไทย อบเชยเทศ อบเชยญวน ใช้ส่วนเปลือกต้น ส่วนเขียดย และจวง ใช้ส่วนเปลือกต้นและใบ พบว่าสารสกัดหยาบของอบเชยที่ได้มีความสามารถในการละลายในสารอินทรีย์ต่างๆ กัน ทำให้ได้สารสกัดหยาบจากอบเชยทั้งหมด 8 ตัวอย่าง คือ สารสกัดหยาบจากเปลือกจวงส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม สารสกัดหยาบจากใบจวงส่วนที่ละลายในเมทานอล สารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอล สารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม สารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยเทศส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม สารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยไทยส่วนที่ละลายในไดเอทิลอีเธอร์ สารสกัดหยาบจากเปลือกเขียดยส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม และสารสกัดหยาบจากใบเขียดยส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 2)

2) ทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี Bioautography

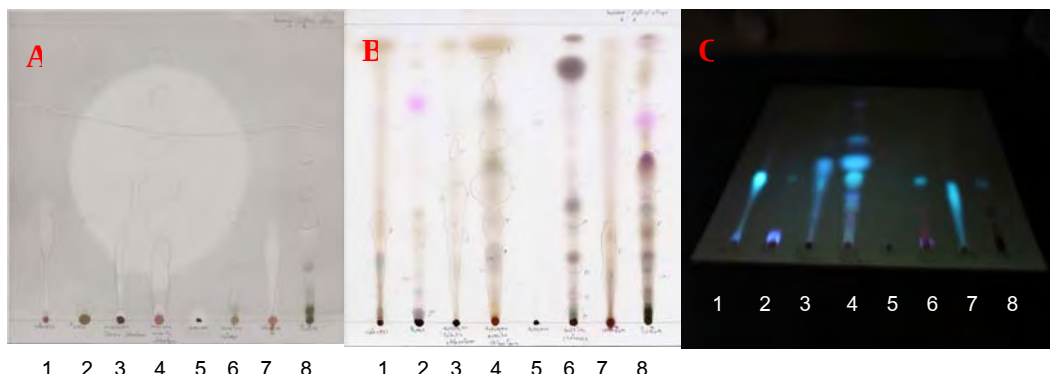
จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบอบเชย 8 ตัวอย่าง คือ สารสกัดหยาบจากเปลือกจวงส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม สารสกัดหยาบจากใบจวงส่วนที่ละลายในเมทานอล สารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอล สารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม สารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยเทศส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม สารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยไทยส่วนที่ละลายในไดเอทิลอีเธอร์ สารสกัดหยาบจากเปลือกเขียดยส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม และสารสกัดหยาบจากใบเขียดยส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี Bioautography พบว่า สารสกัดหยาบอบเชย 5 ตัวอย่าง แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium herbarum* คือ สารสกัดหยาบจากเปลือกจวงส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม สารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอล สารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม สารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยเทศส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม และสารสกัดหยาบจากเปลือกเขียดยส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม โดยไม่มีสารสกัดใดในใบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (ภาพที่ 4) โดยจะเลือกสารสกัดจากเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอล จุดที่ 3 และคลอโรฟอร์ม จุดที่ 4 มีขนาดของบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (clear zone) ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ซึ่งจะนำไปใช้ใน

การทดลองต่อไป สารสกัดอบเชยทั้ง 5 ตัวอย่างที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium herbarum* อาจเกิดจากประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย (essential oils) หรือน้ำมันอบเชย (cinnamon oil) ในสารสกัดหยาบอบเชย สอดคล้องกับงานทดลองของ Azzouz and Bullerman (1982) ที่พบว่าน้ำมันอบเชยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ และเมื่อผสมน้ำมันอบเชย 2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* *Aspergillus parasiticus* *Aspergillus ochraceus* *Penicillium* sp. *Penicillium roqueforti* *Penicillium patulum* และ *Penicillium citrinum* 100 เปอร์เซ็นต์ ได้ถึง 21 วัน Rodríguez et al. (2007) พบว่าน้ำมันหอมระเหยของอบเชยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* *Eurotium repens* *Penicillium nalgiovense* และ *Penicillium roqueforti* ได้

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของพืชและปริมาณของสารสกัดหยาบจากอบเชย 5 ชนิด

Plant material	ส่วนที่ใช้สกัด	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนัก lipophilic phase (มิลลิกรัม)	แหล่งที่เก็บ
<i>Cinnamomum verum</i> J.S. Presl. ชื่อพ้อง: <i>C. zeylanicum</i> Garc. Ex Bl ชื่อสามัญ: อบเชยญวน	เปลือกต้น	1,000	1. 2,297.3 mg ละลายใน คลอโรฟอร์ม 2. 35824.1 mg ละลายในเมทานอล	ร้านขายยา เจ้ากรมเปือ
<i>C. loureirii</i> Nees ชื่อพ้อง: <i>C. obtusifolium</i> Nees var. <i>loureirii</i> Perr. et. Eb. ชื่อสามัญ: อบเชยเทศ	เปลือกต้น	1,000	3. 33,453.6 mg ละลายใน คลอโรฟอร์ม	ร้านขายยา เจ้ากรมเปือ
<i>C. aromaticum</i> ชื่อสามัญ: อบเชยไทย	เปลือกต้น	1,000	4. 17,463.2 mg ละลายในไดเอทิลอีเธอร์	ร้านขายยา เจ้ากรมเปือ
<i>C. iners</i> Reinw. ex Blume ชื่อสามัญ: เขียด	ใบ เปลือกต้น	500 1,000	5. ใบ 4,425.9 mg ละลายใน คลอโรฟอร์ม 6. เปลือก 1,239 mg	สวนพฤกษ ศาสตร์ทุ่ง ค่าย จ. ตรัง

Plant material	ส่วนที่ใช้สกัด	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนัก lipophilic phase (มิลลิกรัม)	แหล่งที่เก็บ
			ละลายในคลอโรฟอร์ม	
<i>C. porrectum</i> Kosterm ชื่อสามัญ: จวง	ใบ เปลือกต้น	1,500 750	7. ใบ 5,225.95 mg ละลายในเมทานอล 8. เปลือก 3,390 mg ละลายในคลอโรฟอร์ม	สวนพฤกษศาสตร์ทุ่งค่าย จ. ตรัง



ภาพที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดเหยาบจากอบเชย (ตัวอย่างพืชในตารางที่ 2) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium herbarum* บนแผ่น TLC (bioautography) (A), สีของกลุ่มสารต่างๆ ที่เกิดหลังจากการพ่นด้วย anisaldehyde reagent (B) และ การสะท้อนแสงของสารสกัดเหยาบ ภายใต้ UV-Lamp ที่ความยาวคลื่น 254 nm (C)

สารสกัดเหยาบอบเชยที่ทดสอบจากซ้ายไปขวา

1. เปลือกจวง ส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม
2. ใบจวง ส่วนที่ละลายในเมทานอล
3. เปลือกอบเชยญวน ส่วนที่ละลายในเมทานอล
4. เปลือกอบเชยญวน ส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม
5. เปลือกอบเชยเทศ ส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม

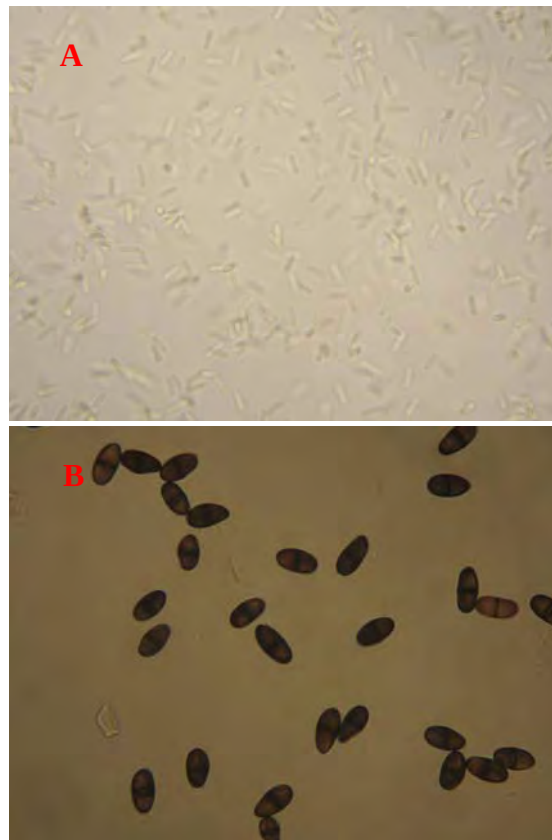
6. เปลือกอบเชยไทย ส่วนที่ละลายในไดเอทิลอีเธอร์
7. เปลือกเชียด ส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม
8. ใบเชียด ส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม

3) ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยที่มีผลต่อเชื้อราสาเหตุโรค โดยศึกษาการยับยั้งการงอกของสปอร์ด้วยวิธี Micro Dilution Assay เพื่อหา Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และวิเคราะห์สารสกัดหยาบด้วยวิธี GC-MS

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบอบเชย 8 ตัวอย่างสารสกัดหยาบเปลือกจวงส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม สารสกัดหยาบใบจวงส่วนที่ละลายในเมทานอล สารสกัดหยาบเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอล สารสกัดหยาบเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม สารสกัดหยาบเปลือกอบเชยเทศส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม สารสกัดหยาบเปลือกอบเชยไทยส่วนที่ละลายในไดเอทิลอีเธอร์ สารสกัดหยาบเปลือกเชียดส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม และสารสกัดหยาบใบเชียดส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์มด้วยวิธี Micro Dilution Assay พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอลเพียงชนิดเดียวที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 5) โดยมีค่า MIC เท่ากับ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีค่า MIC เท่ากับ 1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยไม่มีสารสกัดหยาบใดใน 8 ตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae* (ภาพที่ 5) ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Khewkhom (2006) สารสกัดหยาบเปลือกลำต้นอบเชย (*C. zeylanicum* หรือ *C. verum*) ส่วน lipophilic จากการทดสอบด้วยวิธี bioautography พบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และให้ผลที่สอดคล้องกันเมื่อทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยวิธีของ Hadacek and Greger (2000) โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 894 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) เท่ากับ 1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Botrytis cinerea* มีค่า EC_{50} เท่ากับ 112 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MIC เท่ากับ 312.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 162 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MIC เท่ากับ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจากการศึกษาของ Lee *et al.*, 2007 พบว่า สารสกัดจากอบเชยจีน (*Cinnamomum cassia*) ที่ใช้เมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *Phyllosticta caricae* ได้ที่ค่า MIC 13.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้อะซิโตนในการสกัด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *Glomerella cingulata* ได้ที่ค่า MIC 8.3 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และงานวิจัย

ของ Sivakuma *et al.* (2002) ที่พบว่าการใช้ cinnamaldehyde ความเข้มข้น 30 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae* *C. gloeosporioides* และ *Gliocephalotrichum microchlamydosporum* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเชื้อราดังกล่าวเป็นเชื้อราสาเหตุโรคข้าวผลเน่า แอนแทรกโนส และโรคเน่าสีน้ำตาลของผลเงาะหลังการเก็บเกี่ยว ตามลำดับ

จากการนำสารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยฉนวนส่วนที่ละลายในเมทานอลไปวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) พบว่าสารสกัดหยาบมีความคล้ายคลึงกับสาร Cyclotetrasiloxane, octamethyl- มากที่สุด 91 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่า retention time 7.99 นาที (ตารางที่ 4) ซึ่งยังมีร้อยละของความคล้ายคลึงในระดับต่ำ (ภาพที่ 6) โดยสารหลักที่พบมากที่สุดใฉอบเชยคือสาร cinnamaldehyde โดยมีค่า retention time 16.32 นาที โดยวิธี HS-GC/MS (Shih-Shen *et al.*, 2011)



ภาพที่ 5 ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (A) และเชื้อรา *L. theobromae* (B)

ตารางที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยที่มีผลต่อเชื้อราสาเหตุโรค โดยศึกษาการยับยั้งการออกของสปอร์ ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

สารสกัดหยาบ	Minimum inhibitory concentration (MIC) µg/ml					
	<i>L. theobromae</i>			<i>C. gloeosporioides</i>		
	24 hr.	48 hr.	120 hr.	24 hr.	48 hr.	120 hr.
Control (Acetone pa. + Maltbroth + Tween80)	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
เปลือกอบเชยส่วนที่ละลายในเมทานอล	>2500	>2500	>2500	625	1250	2500
เปลือกอบเชยส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
เปลือกจวงส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
ใบจวงส่วนที่ละลายในเมทานอล	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
เปลือกเขียวส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
เปลือกอบเชยเทศส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม	>2500	>2500	>2500	2500	>2500	>2500
ใบเขียวส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยฉนวนส่วนที่ละลายในเมทานอลโดยวิธี GC-MS

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ			วิธีทดสอบ อ้างอิง
	RT	% Area	% Match	
Sym-Tetramethyldimethoxydisiloxane	4.66	7.67	78	In house method based on GC-MS
Silane, Trimethyl (phenylmethoxy) -	4.96	11.84	64	
Cyclotetrasiloxane, octamethyl -	7.99	10.39	91	
Cyclotetrasiloxane, dodecamethyl -	25.25	2.25	74	
Hexadecanoic acid, methyl ester	57.07	3.73	81	
15-Octadecenoic acid, methyl ester	60.69	3.26	81	
Octadecenoic acid, methyl ester	61.24	1.11	80	



ภาพที่ 6 Cyclotetrasiloxane, octamethyl-

(<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=556-67-2>)

Synonyms: Oktamethylcyklotetrasiloxan; NUC Silicone VS 7207; CO9810; O9810; Octamethyltetrasiloxane; 2,2,4,4,6,6,8,8-Octamethyl-1,3,5,7,2,4,6,8-tetraoxatetrasiloxane; Octamethylcyclotetrasiloxane

CAS Registry Number: 556-67-2

Formula: C₈H₂₄O₄Si₄

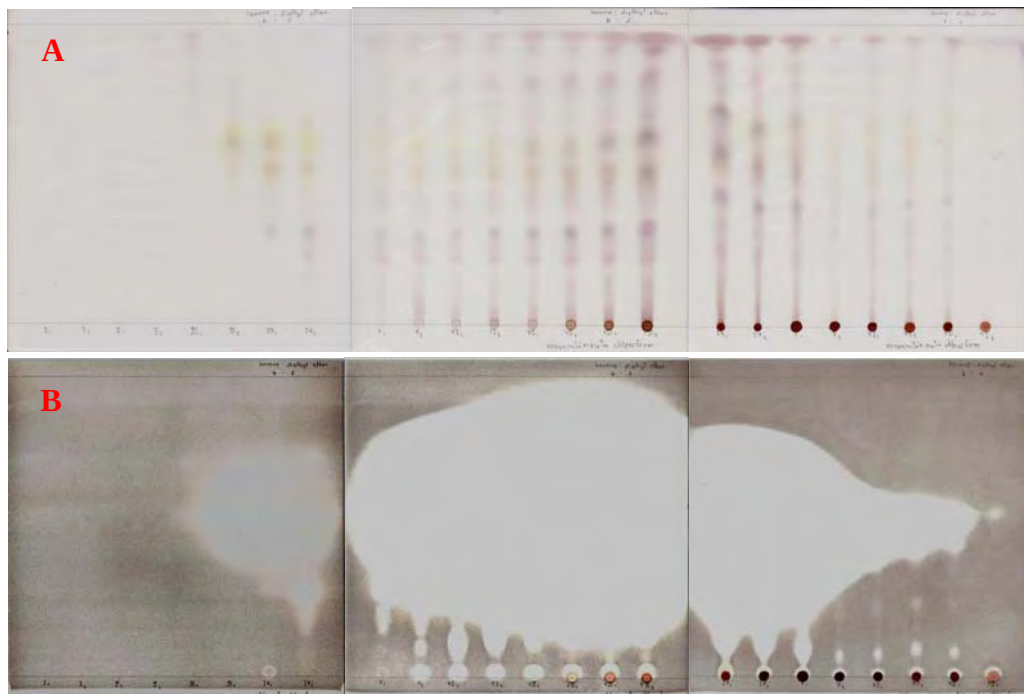
Molecular Weight: 296.6158

4) วิเคราะห์และแยกสารสกัดตามความสามารถการละลายของสารสกัดอบเชยญวน โดยวิธี Column Chromatography (CC) และทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบและ fraction ต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี Bioautography

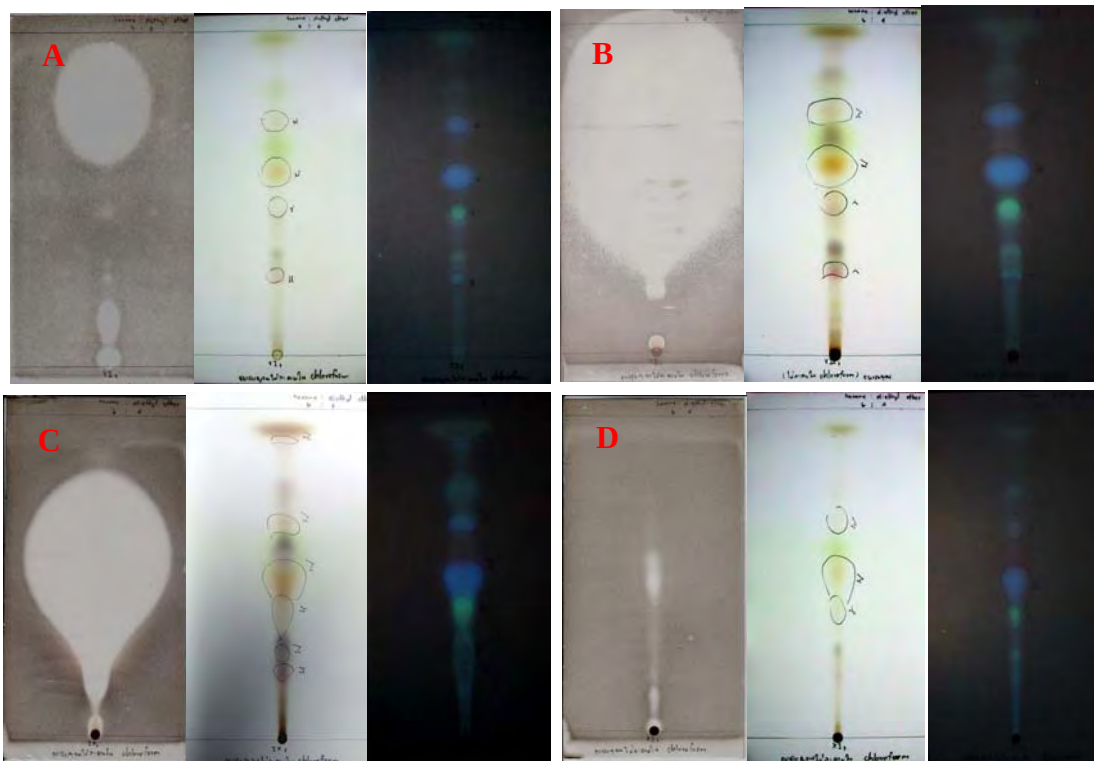
เมื่อแยกส่วนสารประกอบ (Fraction) ต่าง ๆ ของสารสกัดอบเชยญวน โดยชะสารสกัดผ่าน คอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล ด้วยสารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในอัตราส่วนต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วย เฮกเซน เอธิลอะซิเตต และเมทานอล ทำให้แยกสารได้ตามความสามารถการละลาย (ตารางที่ 5) และเมื่อนำมาแยกด้วย TLC พบการแยกกลุ่มสารต่าง ๆ จากการพ่นด้วย anisaldehyde reagent ซึ่งจะปรากฏสีที่แตกต่างกัน รวมทั้งเมื่อทดสอบด้วยวิธี Bioautography จะสามารถแยกสารออกฤทธิ์ในตำแหน่งที่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (ภาพที่ 7A) มีสารประกอบหลายส่วนที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarum* (ภาพที่ 7B) โดยจะเลือก fraction ที่มีประสิทธิภาพจำนวน 4 fractions คือ VI1 สารประกอบที่ละลายในสารละลาย Hexane:EtOAc อัตราส่วน 25:75, VIII1 สารประกอบที่ละลายในสารละลาย EtOAc:MeOH อัตราส่วน 95:5, IX1 สารประกอบที่ละลายในสารละลาย EtOAc:MeOH อัตราส่วน 90:10 และ XI1 สารประกอบที่ละลายในสารละลาย EtOAc:MeOH อัตราส่วน 50:50 เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี Bioautography อีกครั้ง (ภาพที่ 8A-D) สามารถเลือก สารประกอบที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ Fraction VI1 (ภาพที่ 8A) โดยกำหนดให้เป็น Sample A นำไปวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Column Chromatography (HPLC)

ตารางที่ 5 ปริมาณสาร (มิลลิกรัม) ของส่วนสารประกอบ (fraction) ต่างๆ ของสารสกัด
อบเชยญวน ในส่วนที่ละลายในเมทานอล

fraction	ปริมาณสารที่ 50 มก.	ปริมาณสารที่ 50 มก.
	แรก	หลัง
I	44.5	50.4
II	20.9	46.2
III	89.2	130.1
IV	179.7	230.1
V	192.4	309.9
VI	112.8	112.1
VII	163.4	224.5
VIII	371.0	349.4
IX	920.2	1748.5
X	4287.3	5336.6
XI	4171.5	1227.0
XII	309.0	76.5



ภาพที่ 7 การปรากฏสีตามชนิดของกลุ่มสาร จากการแยกสารสกัดตามความสามารถการละลายของสารประกอบ (fraction) ต่างๆ จากสารสกัดอบเชยญวนในส่วนที่ละลายในเมทานอล (A) และ Bioautography test (B)



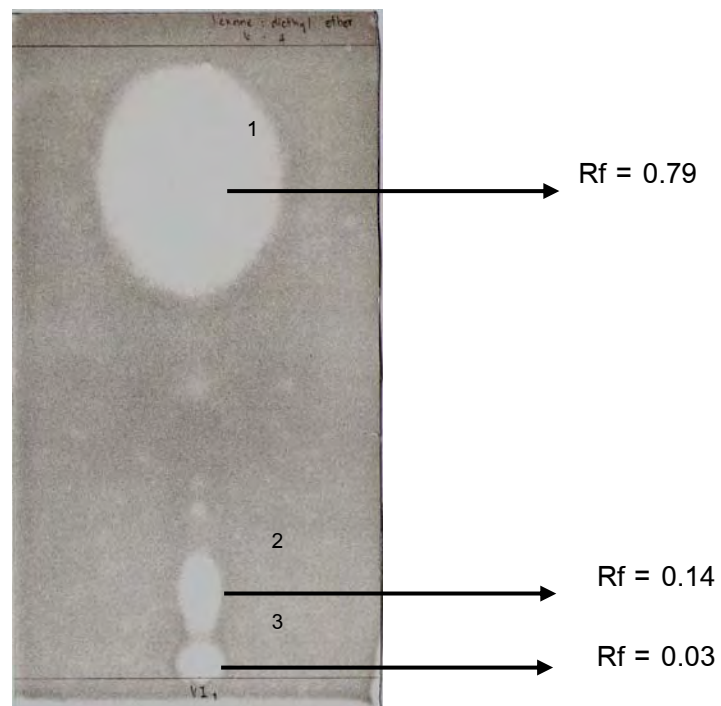
ภาพที่ 8 การแยกสารสกัดตามความสามารถการละลายของสารประกอบต่างๆ ของสารสกัดเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอล: Fraction ที่ VI1 ละลายในสารละลาย Hexane:EtOAc อัตราส่วน 25:75 (A), fraction ที่ VIII1 ละลายในสารละลาย EtOAc:MeOH อัตราส่วน 95:5 (B), fraction ที่ IX1 ละลายในสารละลาย EtOAc:MeOH อัตราส่วน 90:10 (C) และ Fraction ที่ XI1 ละลายในสารละลาย EtOAc:MeOH อัตราส่วน 50:50 (D)

5) วิเคราะห์และแยกสารออกฤทธิ์ออกจากสารสกัดหยาบของ fraction VI1 ด้วยวิธี Thin Layer Column เพื่อให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และวิเคราะห์ทางพิษเคมีด้วยเครื่อง High Performance Liquid Column Chromatography (HPLC)

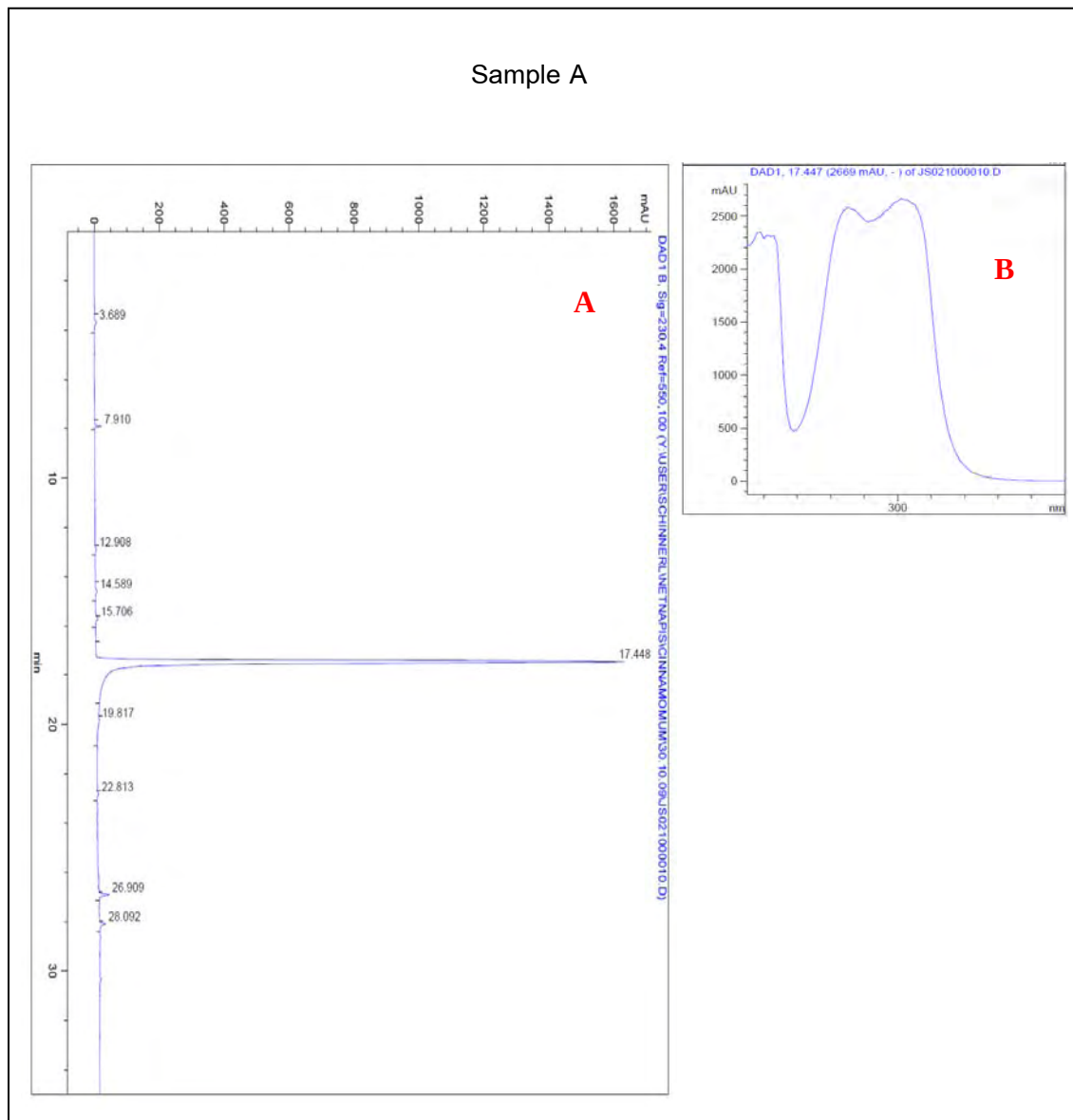
จากผลการทดลองในข้อ 4) พบว่า Fraction VI1 ของอบเชยญวนแสดง Inhibition zone ตำแหน่งที่ 1 2 และ 3 (ภาพที่ 9) ที่แยกจากกันอย่างชัดเจน จึงนำมาแยกสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Thin Layer Column เพื่อให้สารออกฤทธิ์ของ fraction VI1 มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยหดยดสารสกัดลงบน preparative layer chromatography (PLC) plates (PLC silica gel 60 F₂₅₄, 0.5 mm, 20 Glass plates 20x20 cm, Merck) แล้วจึงนำไปตั้งในโถแก้วที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ (mobile phase) อิ่มตัวอยู่ โดยใส่ตัวทำละลายอินทรีย์ เฮกเซน : ไดเอซิล อีเทอร์ ในอัตราส่วน 6:4 (โดย ปริมาตร/ ปริมาตร) หลังจากนั้นจึงขูดซิลิกาออกจากแผ่น TLC plates ที่ตำแหน่งที่ 1 2 และ 3 ที่ค่า 0.79 0.14 และ 0.03 ตามลำดับ ซึ่งเป็นแถบที่แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarum* แล้วนำซิลิกามาละลายในตัวทำละลายเมทานอล หลังจากนั้นจึงกรองด้วยกรวยกรวง (Filter funnels, Artikel-Nr.21504 Inhalt/ME 1 ST, Filternutsche 50 ml Por. 4 บริษัท ROBU Glasfilter-Geräte GmbH) นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ทางพิษเคมีด้วยเครื่อง HPLC โดยที่ fraction VI1 ตำแหน่งที่ 1 มีปริมาณสาร 538 มิลลิกรัม (sample A) fraction VI1 ตำแหน่งที่ 2 มีปริมาณสาร 522 มิลลิกรัม (sample B) fraction VI1 ตำแหน่งที่ 3 มีปริมาณสาร 746 มิลลิกรัม (sample C)

เมื่อนำส่วนของสารออกฤทธิ์ที่พบตำแหน่งที่มีการยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) ของ Fraction VI ที่ค่า Rf = 0.79 คือ Sample A มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยเครื่อง HPLC พบว่า สามารถแยกสารได้หลาย peak แต่มี peak ที่เด่นชัด 1 peak ที่ retention time เท่ากับ 17.448 นาที (ภาพที่ 10A) ซึ่งมี UV-spectra ที่ peak เท่ากับ 2350 mAU 2620 mAU และ 2669 mAU (ภาพที่ 10B) fraction VI ที่ค่า Rf = 0.14 คือ sample B ซึ่งมี peak ที่ชัดเจน 13 peak แสดงว่ามีสารประกอบหลายชนิด (ภาพที่ 11) เช่นเดียวกับ fraction VI1 ที่ค่า Rf = 0.03 คือ sample C มี peak มากมาย (ภาพที่ 12) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับงานทดลองของ Shih-Shen *et al.* (2011) รายงานการวิเคราะห์ cinnamaldehyde (ภาพที่ 13) ในน้ำมันหอมระเหยจากใบของอบเชย *C. osmophloeum* โดยวิธี HPLC พบว่ามีค่า retention time 14.73 นาที และสารเทียบมาตรฐาน (Standard reagent) ของ trans-cinnamaldehyde มีค่า retention time 14.7 นาที ซึ่งมีค่าแตกต่างจากงานทดลองนี้ ดังนั้นสารออกฤทธิ์ของ Sample A อาจจะไม่ใช่อะไร cinnamaldehyde แต่ก็อาจมีความคลาดเคลื่อนเนื่องจากมีความแตกต่างในวิธีการวิเคราะห์ HPLC ในส่วนของ Mobile phase ซึ่งเดิมคาดว่าจะเป็นสารดังกล่าวหรือสารกลุ่มใกล้เคียง

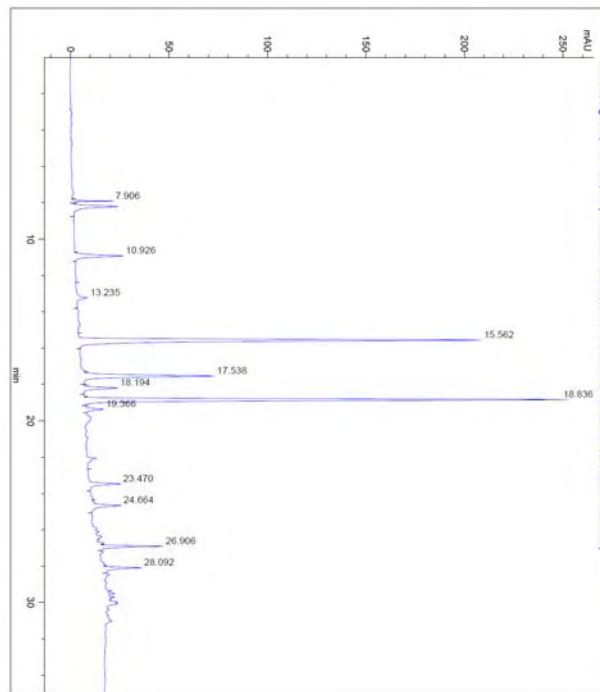
เปลือกอบเชยกลั่นจะได้น้ำมันอบเชยเทศร้อยละ 0.5-1 มี cinnamaldehyde, eugenol ส่วนน้ำมันจากใบจะมีปริมาณ eugenol เท่ากับในน้ำมันกานพลู (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2544) Usta *et al.* (2002) พบว่า cinnamaldehyde และ eugenol กระตุ้นให้เกิด ATP Hydrolysis และยับยั้ง NADH oxidase ในกระบวนการหายใจ Myint *et al.*, (1995) รายงานว่าสามารถแยก eugenol ออกจากกานพลูที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ และวิเคราะห์ได้ด้วย HPLC (reversed-phase chromatography on low-polarity μ Bondapak C₁₈) มีค่า retention time 5.54 นาที อย่างไรก็ตาม cinnamaldehyde มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี และมีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยและสารผสมระหว่างน้ำมันและยางไม้ (oleoresin) ซึ่งพบได้ตามธรรมชาติของ *C. zeylanicum* พบว่ามีสาร antioxidant (Kitazurua *et al.*, 2004; Mathew and Abraham, 2006) สารต้านเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา (Tabak *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2001; Soliman and Badeaa 2002; Velluti *et al.*, 2003; Matan *et al.*, 2006.) Singh *et al.* (2007) รายงานว่าเปลือกลำต้นอบเชยมีสารประกอบ 13 ชนิด โดยมี (E)-cinnamaldehyde เป็นสารหลัก และ d-cadinene (0.9%) ซึ่ง Jayatilaka *et al.* (1995) รายงานว่า cinnamaldehyde ซึ่งสารประกอบหลักของน้ำมันอบเชย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ และจากการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC ของ sample B และ C พบว่ามี peak ที่เด่นชัดเกิดขึ้นหลาย peak (ภาพที่ 11 และ 12) อาจเนื่องมาจาก sample ทั้งสองยังไม่มี ความบริสุทธิ์มากพอ จึงทำให้พบสารประกอบหลายชนิด และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราน้อยกว่า sample A (ภาพที่ 9) สอดคล้องกับงานทดลองของ Sheng-Yang *et al.* (2005) cinnamaldehyde เป็นสารประกอบหลักในใบของ *Cinnamomum osmophloeum* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราดีที่สุดเมื่อเทียบสารประกอบชนิดอื่นๆ เช่น Eugenol, Coumarin, Terpeneol, Benzaldehyde, Linalool, Geranial และ Cinnamyl alcohol โดยที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Coriolus versicolor* และ *Laetiporus sulphureus* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่า MIC เท่ากับ 50 และ 75 ppm ตามลำดับ



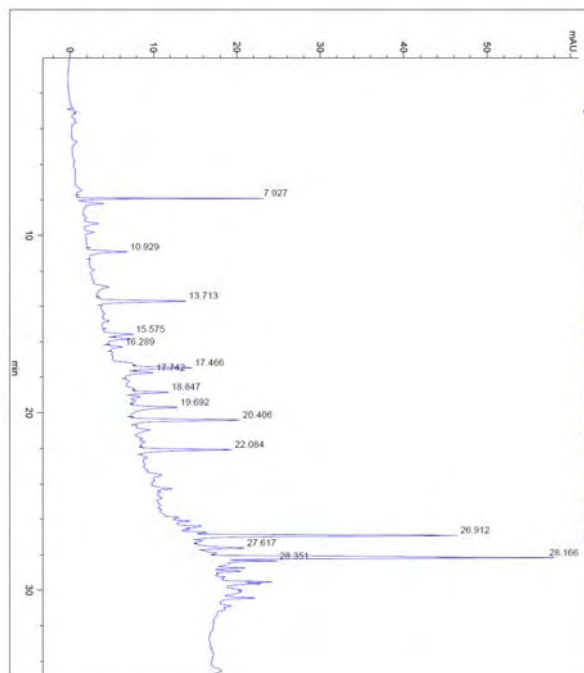
ภาพที่ 9 Bioautography test ของสารประกอบ Fraction VI ของสารสกัดอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอล แสดง inhibition zone ที่ fraction ตำแหน่งที่ 1 (sample A) 2 (sample B) และ 3 (sample C)



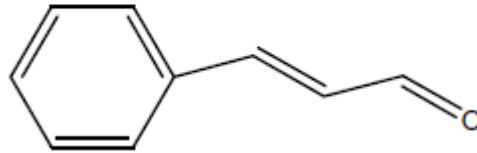
ภาพที่ 10 peak ของสารออกฤทธิ์ที่ทำการแยกได้จากตัวอย่าง sample A ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC ที่ retention time เท่ากับ 17.448 นาที (A) เปรียบเทียบกับ UV-spectra ที่ retention time เท่ากับ 17.447 ที่ค่าดูดกลืนแสง 230 nm (B)



ภาพที่ 11 peak ของสารออกฤทธิ์ที่ทำการแยกได้จากตัวอย่าง sample B ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC



ภาพที่ 12 peak ของสารออกฤทธิ์ที่ทำการแยกได้จากตัวอย่าง sample C ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC



ภาพที่ 13 Cinnamaldehyde (Cocchiara *et al.*, 2005)

Synonyms: Cinnamal, Cinnamic aldehyde, Phenylacrolein, 3-Phenylpropenal, 3-Phenyl-2-propen-1-al, 2-Propenal, 3-phenyl

CAS Registry Number: 104-55-2

EINECS Number: 203-213-9

Formula: C₉H₈O

Molecular Weight: 132.16

Council of Europe: Cinnamaldehyde ถูกอนุญาตให้อยู่ในรายการ granted A ของยุโรป ซึ่งอาจจะใช้กับอาหารได้ (COE No.102) (Council of Europe, 2000).

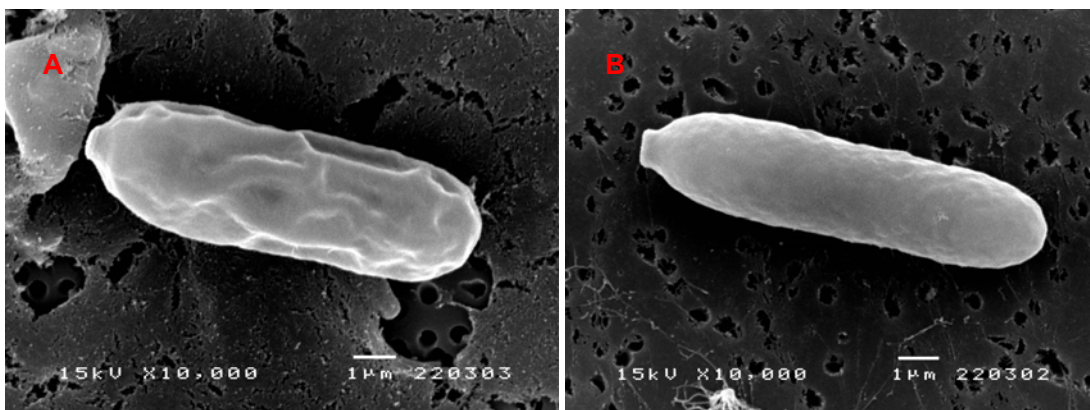
FDA: Cinnamaldehyde ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration-FDA) ให้เป็น GRAS (21CFR 182.60)

FEMA: FEMA (Flavor and Extract Manufacturers' Association) ได้รับการรับรองว่าส่วนประกอบใน flavor มีความปลอดภัย (FEMA, 1965)

(JECFA): JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) ไม่มีการรับรองปริมาณ cinnamaldehyde ที่อนุญาตให้ใส่ในอาหาร (JECFA, 2000)

6) ทดสอบผลของสารออกฤทธิ์ของ Sample A ต่อสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของผลมะม่วง โดยส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)

ทดสอบผลของสารออกฤทธิ์ของ fraction VI1 ตำแหน่งที่ 1 (sample A) ของสารสกัด อบเชยญวน ต่อสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของผลมะม่วง พบว่าผิวของสปอร์มีลักษณะเหี่ยว (ภาพที่ 14) จึงทำให้ประสิทธิภาพในการงอกและการสร้างเส้นใย ลดลง เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม อาจเป็นผลเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์ของ fraction VI1 ตำแหน่ง ที่ 1 (sample A) โดยที่ Jayatilaka *et al.* (1995) รายงานว่าสารประกอบหลักของน้ำมันอบเชย ที่มี ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ คือสาร cinnamaldehyde สอดคล้องกับการศึกษา ของ Sivakuma *et al.* (2002) พบว่าการใช้ cinnamaldehyde ความเข้มข้น 30 ppm สามารถยับยั้ง การงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *L. theobromae* *C. gloeosporioides* และ *Gliocephalotrichum microchlamydosporum* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเชื้อราดังกล่าวเป็นเชื้อรา สาเหตุโรคขั้วผลเน่า แอนแทรกโนส และโรคเน่าสีน้ำตาลของผลเงาะหลังการเก็บเกี่ยว ตามลำดับ ในปัจจุบันมีรายงานว่าสาร cinnamaldehyde สามารถลดอัตราการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* (Valero and Giner, 2006) และ *Escherichia coli* ATCC 33456, *Pseudomonas* strains (Niu and Gilbert, 2004) โดยที่เข้าไปออกฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งการแบ่ง เซลล์ของแบคทีเรียนั้นถูกควบคุมโดย FtsZ และ FtsZ จะรวบรวมอยู่ใน Z-ring ที่บริเวณที่มีการแบ่ง เซลล์ ซึ่ง Prerna *et al.* (2007) รายงานว่า cinnamaldehyde ไปรบกวนการทำงานของ Z-ring และ ลดความยืดหยุ่นของเซลล์ของ *Escherichia coli* และไปยับยั้งอัตราการไฮโดรไลซิสของ GTP ด้วย



ภาพที่ 14 การทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ fraction VI1 ตำแหน่งที่ 1 (sample A) ของสารสกัดอบเชยญวนต่อสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วง (A) และ กรรมวิธีควบคุม (B) ส่องภายใต้กล้อง SEM กำลังขยาย 10,000 เท่า

7) ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอล ในการควบคุม การเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง

7.1 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบอบเชยญวนต่อการควบคุมโรคแอนแทรก โนสบนผลมะม่วง

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบอบเชยญวนต่อการควบคุมโรคแอนแทรก โนสบนผลมะม่วง พบว่าในกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารสกัดหยาบ 5 ชั่วโมง ก่อนพ่นด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุด 88.89 เปอร์เซ็นต์ และมีความรุนแรงของการ เกิดโรค 21.56 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (พ่น เชื้อรา *C. gloeosporioides*) และพบว่ากรรมวิธีควบคุม (พ่นด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* + เมทานอล 5 เปอร์เซ็นต์) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์ และมีความรุนแรงของการเกิดโรค มากที่สุด 30.33 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (พ่นเชื้อรา *C. gloeosporioides*) (ตารางที่ 6) แสดงว่าการใช้เอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ในการละลาย สารสกัดหยาบอบเชยญวนเพื่อมาใช้ในการควบคุมโรค พบว่าเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ไม่มี ความสามารถในการฆ่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยที่กรรมวิธีที่พ่นหรือจุ่มด้วยสารสกัดหยาบ เพียงอย่างเดียวไม่พบโรคแอนแทรกโนส (ภาพที่ 15) เนื่องจากก่อนทำการทดลองได้ฆ่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากการจุ่มน้ำร้อน และไม่พบความเสียหายของ lenticels บนผลมะม่วงจากการใช้ สารสกัด

7.2 ทดสอบประสิทธิภาพของ Sample A ต่อการควบคุมโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วง

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยญวน Sample A (Fraction VI1 ตำแหน่งที่ 1) ต่อการควบคุมโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วง พบว่ากรรมวิธีที่ใช้ Sample A มีการเกิดโรคน้อย ที่สุด 19.45 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (เอทานอล 5%) แสดงว่าการใช้เอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ในการละลายสารสกัดหยาบอบเชยญวนเพื่อมา ใช้ในการควบคุมโรค พบว่าเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ไม่มีความสามารถในการฆ่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* (ตารางที่ 7) (ภาพที่ 16)

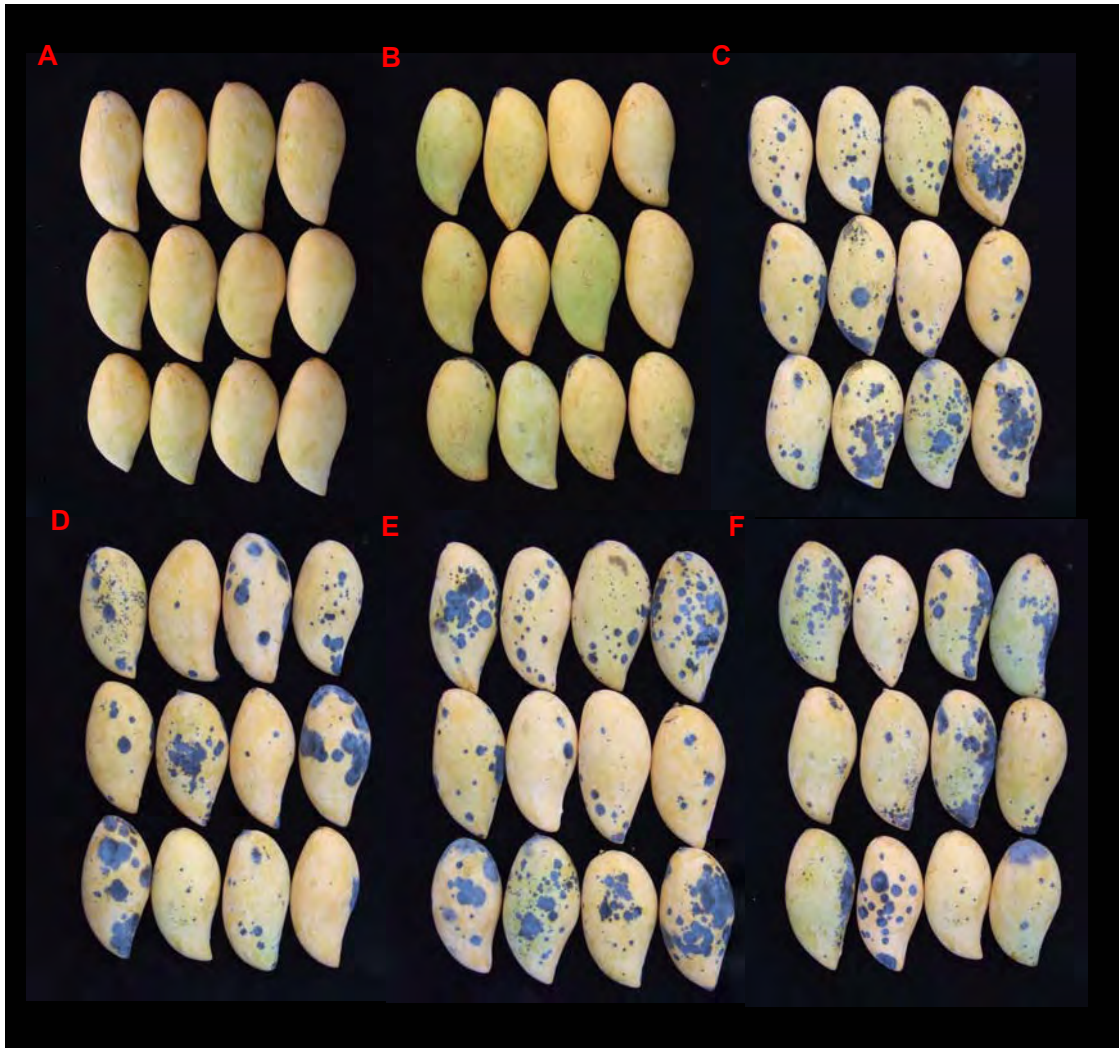
การนำสารสกัดจากพืชมาใช้ในการควบคุมโรคให้มีประสิทธิภาพอาจต้องใช้วิธีการอื่นร่วม ด้วย เช่น Matan *et al.* (2006) รายงานว่าการใช้น้ำมันอบเชยให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ต้องใช้ควบคู่กับสภาพดัดแปลงบรรยากาศคือ ลด O_2 ลง

เหลือ <0.05 เปอร์เซ็นต์ และ เพิ่ม CO₂ เป็น 40 เปอร์เซ็นต์ และได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ
การใช้น้ำมันอบเชยแบบสารละลายกับแบบสารระเหย พบว่าการใช้แบบสารละลายมีประสิทธิภาพ
ในการป้องกันการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับ Soliman and Badeaa (2002)
ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันอบเชยต่อการเจริญของเชื้อราที่สามารถสร้างสารพิษได้ พบว่าการ
ใช้น้ำมันอบเชยน้อยกว่า 500 ppm ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ
รา *Aspergillus flavus* *Aspergillus parasiticus* *Aspergillus ochraceus* และ *Fusarium moniliforme*
ได้ Sivakuma *et al.* (2002) ได้ทำการทดลองใช้ cinnamaldehyde ควบคุมโรคผลเน่าของผลเงาะ
หลังการเก็บเกี่ยว พบว่ากรรมวิธีที่ใช้กระดาษกรองดูดซับ cinnamaldehyde ความเข้มข้น 30 ppm
สามารถควบคุมการเกิดโรคผลเน่าและความรุนแรงของโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีควบคุม และไม่ทำให้ผล
เป็นสีน้ำตาล ซึ่งกรรมวิธีที่ใช้กระดาษกรองดูดซับ cinnamaldehyde ความเข้มข้น 50 ppm และการ
ใช้ cinnamaldehyde ชุบผลโดยตรงที่ความเข้มข้น 30 และ 50 ppm ก็มีประสิทธิภาพในการควบคุม
โรคเช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ใช้กระดาษกรองดูดซับ cinnamaldehyde ความเข้มข้น 30 ppm แต่
กรรมวิธีดังกล่าวทำให้ผลเงาะเป็นสีน้ำตาล การศึกษาการควบคุมโรคของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวที่
เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *L. theobromae* ของ González-Aguilar (2007) โดยใช้
UV-C (250–280 nm) พบว่ากรรมวิธีที่ฉาย UV-C สามารถลดการเกิดโรคทั้ง 2 โรคได้เมื่อเทียบกับ
ชุดควบคุม และกรรมวิธีที่ฉาย UV-C นาน 10 นาที สามารถลดการเสื่อมของผลมะม่วงได้ดีกว่า
กรรมวิธีที่ฉาย UV-C นาน 5 นาที

ตารางที่ 6 การเกิดโรค และความรุนแรงของการเกิดโรคแอนแทรกโนส (%) ของมะม่วงพันธุ์ น้ำดอกไม้สีทองโดยใช้สารสกัดหยาบจากอบเชยญวนในการควบคุม และปมที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	การเกิดโรค (%)	ความรุนแรงของการเกิดโรค (%)
พ่นด้วยสารสกัดหยาบ	0 c	0 b ^{1/}
จุ่มด้วยสารสกัดหยาบ	0 c	0 b
พ่นด้วยเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> + สารสกัดหยาบ	100.00 a	23.33 a
พ่นด้วยสารสกัดหยาบ + พ่นด้วยเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i>	88.89 b	21.56 a
ชุดควบคุม (พ่นด้วยเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> + เอทานอล 5%)	100.00 a	30.33 a
ชุดควบคุม (พ่นด้วยเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i>)	100.00 a	26.45 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี DMRT

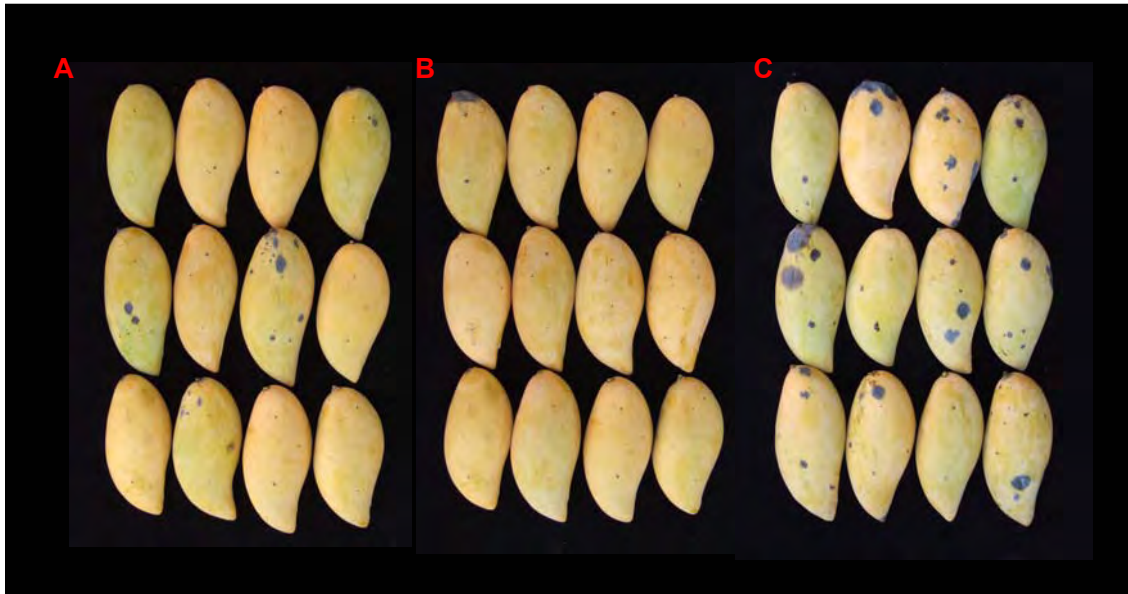


ภาพที่ 15 การเกิดโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง ภายหลังทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบอบเชยส่วนที่ละลายในเมทานอล โดยพ่นด้วยสารสกัดหยาบ (A), จุ่มด้วยสารสกัดหยาบ (B), พ่นด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ตามด้วยเอทานอล 5% (C), พ่นด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ตามด้วยสารสกัดหยาบ (D), พ่นด้วยสารสกัดหยาบ ตามด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* (E) และ พ่นด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* (F) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 7 การเกิดโรค และขนาดแผลของโรคแอนแทรกโนส (มม) ของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง โดยใช้สารสกัดอบเชยญวน fraction VI1 ตำแหน่งที่ 1 (sample A) ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส และบ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	ขนาดแผล (มม)	การเกิดโรค (%)
Fraction VI ₁ ตำแหน่งที่ 1	4.28 b	19.45 b ^{1/}
ชุดควบคุม (เมทานอล 5%)	2.76 b	25.00 b
ชุดควบคุม (น้ำ)	9.87 a	69.45 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 16 การเกิดโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง ภายหลังทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเอทานอล Sample A (fraction VI1 ตำแหน่งที่ 1, A), ชุดควบคุม (เอทานอล 5%) (B) และ ชุดควบคุม (น้ำ) (C) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

8) ทดสอบการใช้ประสาทสัมผัสกับผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ใช้สารสกัดหยาบอบเชยญวนในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส

จากการทดสอบการใช้ประสาทสัมผัสกับผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ใช้สารสกัดหยาบอบเชยญวนในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส พบว่ากรรมวิธีที่พ่นและจุ่มด้วยสารสกัดหยาบอบเชยญวนไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม ทั้ง 5 ข้อทดสอบ คือ ลักษณะปรากฏ สีเปลือก กลิ่น รสชาติ การยอมรับโดยรวม (ตารางที่ 8) Sivakuma *et al.* (2002) ได้ทำการทดลองใช้ cinnamaldehyde ควบคุมโรคผลเน่าของผลเงาะหลังการเก็บเกี่ยว พบว่ากรรมวิธีที่ใช้กระดาษกรองดูดซับ cinnamaldehyde ความเข้มข้น 30 ppm สามารถควบคุมการเกิดโรคผลเน่าและความรุนแรงของโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีควบคุม โดยที่รสชาติ กลิ่น สีของเปลือกไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

ตารางที่ 8 การใช้ประสาทสัมผัสกับผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ใช้สารสกัดหยาบอบเชยญวนในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	ลักษณะปรากฏ	สีเปลือก	กลิ่น	รสชาติ	การยอมรับโดยรวม
ชุดควบคุม (พ่นน้ำ)	6.2 a	7.0 a	6.4 a	4.8 a	6.4 a ^{1/}
พ่นสารสกัดหยาบ	5.4 a	7.0 a	7.2 a	5.0 a	6.4 a
จุ่มสารสกัดหยาบ	6.6 a	7.8 a	6.8 a	6.6 a	7.6 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี DMRT

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. สารสกัดหยาบอบเชยทั้งหมด 8 ตัวอย่างคือ เปลือกจวงส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม ใบจวงส่วนที่ละลายในเมทานอล เปลือกอบเชยฉนวนส่วนที่ละลายในเมทานอล เปลือกอบเชยฉนวนส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม เปลือกอบเชยเทศส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม เปลือกอบเชยไทยส่วนที่ละลายในไดเอทิลอีเธอร์ เปลือกเชียดส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม และใบเชียดส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม พบสารสกัดหยาบอบเชย 5 ตัวอย่าง แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium herbarum* คือ เปลือกจวงส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม เปลือกอบเชยฉนวนส่วนที่ละลายในเมทานอล เปลือกอบเชยฉนวนส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม เปลือกอบเชยเทศส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม และเปลือกเชียดส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม แต่สารสกัดจากเปลือกอบเชยฉนวนส่วนที่ละลายในเมทานอลจะมีประสิทธิภาพดีที่สุด

2. สารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยฉนวนส่วนที่ละลายในเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* มีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เท่ากับ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อป่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีค่า MIC เท่ากับ 1,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยไม่มีสารสกัดหยาบใดใน 8 ตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

3. สารออกฤทธิ์ของอบเชยฉนวนส่วนที่ละลายในเมทานอลมีผลต่อสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของผลมะม่วง ซึ่งทำให้สปอร์มีลักษณะเหี่ยว จึงทำให้ประสิทธิภาพในการงอกและการสร้างเส้นใยลดลง เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

4. การควบคุมโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วง พบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยสารสกัดหยาบ 5 ชั่วโมง ก่อนพ่นด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุด 88.89 เปอร์เซ็นต์ และมีความรุนแรงของการเกิดโรค 21.56 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และไม่พบความเสียหายของ lenticels บนผลมะม่วงจากการใช้สารสกัด และพบว่ากรรมวิธีที่ใช้ sample A (fraction VI₁ ตำแหน่งที่ 1) มีการเกิดโรคน้อยที่สุด 19.45 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

5. จากการทดสอบการใช้ประสาธน์ผสมกับผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ใช้สารสกัดหยาบอบเชยฉนวนในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส พบว่ากรรมวิธีที่พ่นและจุ่มด้วยสารสกัดหยาบอบเชยฉนวนไม่

มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม ทั้ง 5 คุณลักษณะ คือ ลักษณะปรากฏ สีเปลือก กลิ่น รสชาติ และการยอมรับโดยรวม

6. งานวิจัยในอนาคตควรต่อยอดงานวิจัยโดยอาจใช้วิธีควบคุมโรคแอนแทรกซ์ด้วยสารสกัดจากอบเชยร่วมกับกรรมวิธีอื่นๆ และวิเคราะห์ชนิดสารออกฤทธิ์ที่แยกได้จากการทดลองให้แน่ชัดต่อไป อาจสามารถสร้างสารสังเคราะห์ที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมออกมาใช้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2544.
http://www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_bc.asp?i1=64&i2=12
- Azzouz, M. A. and L. B. Bullerman. 1982. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. **Journal of Food Protection** 45: 1298– 1301.
- Cocchiara, J., C.S. Letizia, J. Lalko, A. Lapczynski and A.M. Api. 2005. Fragrance material review on cinnamaldehyde. **Food and Chemical Toxicology** 43: 867–923
- Council of Europe. 2000. Partial Agreement in the Social and Public Health Field. Chemically-defined Flavouring Substances. Group 5.2 aromatic aldehydes, page 119, number 102. Council of Europe Publishing, Strasbourg.
- FEMA (Flavor and Extract Manufacturers Association). 1965. Recent progress in the consideration of flavoring ingredients under the food additives amendment III. GRAS Substances. **Food Technology** 19: 151–197
- González-Aguilar, G. A., R. Zavaleta-Gatica and M. E. Tiznado-Hernández. 2007. Improving postharvest quality of mango 'Haden' by UV-C treatment. **Postharvest Biology and Technology** 45: 108–116.
- Hadacek, F. and H. Greger. (2000). Susceptibility testing against filamentous fungi to detect antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemistry Analysis** 11: 137-147.
- Hsieh, P. C., J. L. Mau and S. H. Huang. 2001. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology** 18: 35-43
- Jayatilaka, A., S. K. Poole, C. F. Poole and T. M. Chichila 1995. Simultaneous micro steam distillation/solvent extraction for the isolation of semivolatile flavor compounds from cinnamon and their separation by series coupled-column gas chromatography. **Analytica Chimica Acta** 302: 147– 162.
- JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives). 2000. Cinnamyl alcohol and related flavouring agents. Who Food Additives Series: 46. Prepared by the Fifty-fifth meeting of the Joint FAO/WHO Expert committee on Food Additives. June 6– 15, Geneva, Switzerland. World Health Organization.

- Khewkhom, N. 2006. Bioassay-based phytochemistry of selected tropical plants to discover natural pesticides. Dissertation, University of Vienna, Austria. 118 p.
- Kitazurua, E. R., A. V. Moreirac, B. J. Mancini-Filhoc, H. Delinceed and A. L. C. H. Villavicencia. 2004. Effects of irradiation on natural antioxidants of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* N.) **Radiation Physics and Chemistry** 71: 37–39
- Kyu Kyu Win, N., Jitareerat, P., Kanlayanarat, S., and Sangchote, S. 2007. Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana fruit. **Postharvest Biology and Technology** 45:333–340.
- Lee, S. H., K. S. Chang, M. S. Su, Y. S. Huang and H. D. Jang. 2007. Effects of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. **Food Control** 18: 1547–1554.
- Matan, N., H. Rimkeeree, A. J. Mawson, P. Chompreeda, V. Haruthaithanasan and M. Parker. 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology** 107: 180 – 185.
- Mathew, S. and T. E. Abraham. 2006. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. **Food Chemistry** 94: 520–528
- Myint, S. W.R.W. Daud, A.B. Mohamad and A.A.H. Kadhum. 1995. Separation and identification of eugenol in ethanol extract of cloves by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of the American oil chemists' society** 72(10):1231-1233.
- Niu, C, and E. S. Gilbert. 2004. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. **Appl Environ Microbiol** 70: 6951–6
- Prerna, D., S. Sanjay, B. Anirban, J. Sivaraman and D. Debjani. 2007. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. **Biochemical Pharmacology** 74: 831–840.

- Rodríguez, A., R. Batlle and C. Nerín. 2007. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. **Progress in Organic Coatings** 60: 33–38.
- Sheng-Yang, W., C. Pin-Fun and C. Shang-Tzen. 2005. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresource Technology** 96: 813–818
- Shih-Shen, C. L., L. Tsong-Ming, C. Pei-Chun, L. Ya-Yun, T. Hsiu-Ting, C. Chung-Shih, L. Yi-Pang, C. Shu-Chen, C. Ming-Chih and Y. Chi-Chiang. 2011. In Vivo Cytokine Modulatory Effects of Cinnamaldehyde, the Major Constituent of Leaf Essential Oil from *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. **Phytother. Res.** Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI:10.1002/ptr.3419
- Sivakuma, D., R. S. Wilson Wijeratnam, R. L. C. Wijesundera and M. Abeyesekere. 2002. Control of postharvest diseases of rambutan using cinnamaldehyde. **Crop Protection** 21: 847–852.
- Singh, G., S. Maurya, M. P. deLampasona and C. A. N. Catalan. 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and Chemical Toxicology** 45:1650–1661.
- Soliman, K. M. and R. I. Badeaa 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology** 40: 1669– 1675.
- Tabak, M., R. Armon and I. Neeman. 1999. Cinnamon extracts' inhibitory effect on *Helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology** 67: 269–277
- Tzortzakis, N. G. 2007. Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 8: 111–116
- Ustaa, J., S. Kreydiyyehb, K. Bajakiana and H. Nakkash-Chmaissec. 2002. In vitro effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. **Food and Chemical Toxicology** 40: 935–940

- Valero, M. and M. J. Giner. 2006. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. **Int J Food Microbiol** 106: 90–4
- Velluti, A., V. Sanchis, A. J. Ramos, J. Egido and S. Marin. 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology** 89: 145–154

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ ตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
เรื่อง Bioactive cinnamon extract for control postharvest disease of Nam Dok Mai mango
ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ POSTHARVEST BIOLOGY AND TECHNOLOGY (ค่า impact
factor 2006: 1.892)

2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ และการเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ
Khewkhom, N., Sangchote, S., Vajarodaya, S. and Srilaong, V. 2009 Development of
bioactive cinnamon extract for control postharvest disease of Nam Dok Mai mango.
Agricultural Science Journal 40(3)(Suppl.): 260-264.

ในการประชุมและเสนอผลงานวิจัยพืชเขตร้อนและกึ่งร้อน ครั้งที่ 3 ขึ้น ระหว่างวันที่ 3-4
กันยายน 2552 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ภาคผนวก

การพัฒนาการใช้สารสกัดจากอบเชยในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงน้ำดอกไม้

Development of Bioactive Cinnamon Extract for Control Postharvest Disease of Nam Dok Mai Mango

เนตรนภิส เขียวขำ¹ สมศิริ แสงโชติ¹ สรัญญา วัชรโรทัย² และ วาริช ศรีละออง³

Khewkhom N.¹, Sangchote, S.¹, Vajarodaya, S.² and Srilaong, V.³

Abstract

The objectives of this research were to evaluate the *in vitro* fungicidal effect of cinnamon extract in lipophilic phases as stem bark of *Cinnamomum aromaticum*, *C. zeylanicum*, *C. loureirii* and stem bark and leaves of *C. iners* and *C. porrectum* on the development of *Colletotrichum gloeosporioides*, which causes anthracnose and *Botryodiplodia theobromae*, which causes stem end rot on mango. Crude extract of *C. loureirii* dissolving in chloroform and methanol showed biggest inhibition zone of *Cladosporium* sp by bioautography method. Spore germination of *C. gloeosporioides* at 10^5 CFU/ml can be inhibited by crude extract of *C. loureirii* dissolving in methanol and exhibited MIC of 625 µg/ml at 24 hr. Extracts did not show any spore inhibition while testing with *B. theobromae*. Separated fraction of *C. loureirii* dissolving in methanol by column chromatography showed fungicidal effect on four of mixture solutions as hexane:ethylacetate 25:75 (VI) ethylacetate:methanol 95:5 (VIII) 90:10 (IX) and 50:50 (XI). For control of anthracnose disease on Nam dok mai mango showed 33% of disease incidence with 5,000 and 10,000 ppm spraying water dissolved of crude extract of *C. loureirii*, equally with dipping of 500 ppm carbendazim. Compare with control treatment by dipping in water showed 92% of disease incidence and dip in hot water treatment in 55 °C for 5 min showed 22% of disease incidence.

Keywords: Cinnamon, mango, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae*

บทคัดย่อ

ในการศึกษาและประเมินผลการกำจัดเชื้อราของสารสกัดหยาบอบเชย lipophilic phase ได้แก่เปลือกต้นอบเชยไทย (*Cinnamomum aromaticum*) เปลือกต้นอบเชยเทศ (*C. zeylanicum*) เปลือกต้นอบเชยญวน (*C. loureirii*) เปลือกต้นและใบเหี้ยด (*C. iners*) และเปลือกต้นและใบจวง (*C. porrectum*) ต่อการเจริญของ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส และ *Botryodiplodia theobromae* สาเหตุโรคช้ำผลเน่าของมะม่วง พบว่าสารสกัดหยาบเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์มและในเมทานอล แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium* sp. ด้วยวิธี bioautography โดยมีบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากที่สุด สารสกัดอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอลแสดงคุณสมบัติยับยั้งการงอก ของสปอร์ *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml มีค่า MIC เท่ากับ 625 µg/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่มีสารสกัดหยาบอบเชยชนิดใดที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. theobromae* เมื่อแยกส่วนสารประกอบ (fraction) ของอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอล ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี มี 4 ส่วน ที่แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้แก่ ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน:เอทิลอะซิเตต 25:75 (VI) เอทิลอะซิเตต:เมทานอล 95:5 (VIII) 90:10 (IX) และ 50:50 (XI) เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้พ่นด้วยสารสกัดอบเชยญวนละลายด้วยน้ำ 5,000 และ 10,000 ppm มีร้อยละของการเกิดโรคเท่ากับ 33 เท่ากับจุ่มในสารเคมี carbendazim 500 ppm เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมมีร้อยละของการเกิดโรคเท่ากับ 92 และที่แช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ร้อยละของการเกิดโรคเท่ากับ 22

คำสำคัญ: อบเชย มะม่วง *Colletotrichum gloeosporioides* *Botryodiplodia theobromae*

¹ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900

²ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

²Department of Botany, Faculty of Science, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900

³คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี ท่าข้าม บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

³School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University Thonburi, Tha-knam, Bankhuntein, Bangkok 10150

คำนำ

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มีศักยภาพสูงในการส่งออกเนื่องจากมีรูปทรงและสีสวย มีรสชาติเป็นที่นิยมอย่างมาก แต่เมื่อผลสุกแก่ปัญหาที่มักพบเสมอ คืออาการผลเน่า เนื่องจากโรคแอนแทรกโนสจากเชื้อราสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นส่วนมาก รองลงมาคือโรคขั้วผลเน่าจากเชื้อราสาเหตุ *Lasiodiplodia theobromae* (นิพนธ์, 2542) ทำให้เกิดการสูญเสียหลังการเก็บเกี่ยว ทั้งในแง่ของต้นทุนการผลิต การขนส่ง และคุณภาพของผลผลิต ในปัจจุบันการควบคุมและป้องกัน มีการใช้สารเคมีในการกำจัด เช่น สารเคมีประเภทดูดซึม เช่น carbendazime benomyl หรือ thiabendazole ผลผสมน้ำที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 5 นาที ในประเทศที่พัฒนาและมีศักยภาพสูงในการนำเข้าสินค้าทางการเกษตรส่วนใหญ่ มีการออกมาตรการควบคุมการใช้สารเคมีบางชนิด งานวิจัยปัจจุบันจึงมีความพยายามที่จะใช้วิธีทางกายภาพและชีวภาพ เช่น สารจากธรรมชาติที่ปลอดภัย เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมโรคอย่างยั่งยืน เพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว อบเชย (cinnamon) จัดอยู่ในวงศ์ Lauraceae ส่วนที่ใช้เป็นเครื่องเทศ ได้จากเปลือกต้นของพืช น้ำมันหอมระเหยจากน้ำมันอบเชยจะมีสารจำพวกอัลดีไฮด์ (aldehyde volatile oil) เป็นองค์ประกอบหลัก อบเชยมีหลายชนิด แต่ที่มีการนำมาค้าขายในเชิงเศรษฐกิจมีเพียง 4 ชนิดเท่านั้น คือ 1. อบเชยเทศ *Cinnamomum verum* J.S. Presl. ชื่อพ้อง *C. zeylanicum* Garc. ex Bl. ปลูกมากในศรีลังกา อินเดียน้ำมันอบเชยเทศร้อยละ 0.5-1 มีสารสำคัญได้แก่ cinnamaldehyde, eugenol, benzaldehyde Ustaa และคณะ (2002) พบว่า cinnamaldehyde และ eugenol กระตุ้นให้เกิด ATP hydrolysis และยับยั้ง NADH oxidase ในกระบวนการหายใจ 2. อบเชยจีน *C. aromaticum* Nees ชื่อพ้อง *C. cassia* Nees Bl. ต่างจากอบเชยเทศ คือ เปลือกหนา 3. อบเชยญวน *C. loureirii* Nees ชื่อพ้อง *C. obtusifolium* Nees var. *loureirii* Perr. et. Eb. 4. อบเชยขาว *C. burmanii* Blume เป็นไม้ใหญ่ที่สุดในบรรดาอบเชยทั้งหมดใช้แต่งกลิ่นอาหาร (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2544) น้ำมันหอมระเหยและสารผสมระหว่างน้ำมันและยางไม้ซึ่งพบได้ตามธรรมชาติ (oleoresin) ของ *C. zeylanicum* พบว่ามีสาร antioxidant (Kitazurua และคณะ, 2004; Mathew และ Abraham, 2006) สารต้านเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา (Hsieh และคณะ, 2001; Velluti และคณะ, 2003; Matan และคณะ, 2006.) โดยมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Penicillium citrinum* และ *P. viridicatum* เปลือกลำต้นอบเชยมีสารประกอบ 13 ชนิด โดยมี (E)-cinnamaldehyde เป็นสารหลัก (Singh และคณะ, 2007) งานวิจัยนี้จึงเห็นความสำคัญของการพัฒนาใช้สารสกัดจากอบเชย ในการป้องกันและควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงน้ำดอกไม้ เพื่อพัฒนารูปแบบการใช้สารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพร่วมกับวิธีการอื่นที่ช่วยเพิ่มคุณภาพผลผลิตอย่างปลอดภัยแก่ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *B. theobromae* แยกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธี Tissue Transplanting Method

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากอบเชย 7 ตัวอย่าง คือ เปลือกลำต้นของอบเชยไทย อบเชยเทศ และอบเชยญวน เปลือกและใบของเชียดและจวง โดยสกัดตัวอย่างพืชที่บดหยาบในตัวทำละลายเมทานอล เก็บในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน กรองสารละลายแล้วนำสารละลายที่ได้มาแยกคุณสมบัติการละลายด้วยน้ำและคลอโรฟอร์ม โดยจะใช้สารสกัดหยาบที่ละลายในคลอโรฟอร์มซึ่งเป็น lipophilic phase แยกตัวทำละลายคลอโรฟอร์มออกด้วยเครื่อง evaporator ซึ่งน้ำหนักแห้งสารสกัดหยาบ จากนั้นเติมเมทานอลเพื่อเป็นตัวทำละลาย เก็บรักษาในที่มืด อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิเคราะห์และแยกสารสกัดตามความสามารถการละลายของสารสกัดอบเชยญวน โดยวิธี Column Chromatography (CC) จะได้แยกส่วนสารประกอบ (fraction) ต่างๆ โดยจะสารสกัดผ่านคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล ด้วยสารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล

ทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบและ fraction ต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium* sp. ด้วยวิธี bioautography สังเกตบริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone)

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยที่มีผลต่อเชื้อราสาเหตุโรค โดยศึกษาการยับยั้งการงอกของสปอร์ด้วยวิธี Micro Dilution Assay เพื่อหา Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (Hadacek และ Greger, 2000)

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชย ในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้

นำมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ระยะสุกแก่เต็มที่ผลยังเป็นสีเขียวมาปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยการใช้ spore suspension ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ หยดลงบนแผ่น disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร (Whatman เบอร์ 01) บรรจุลงตะกร้าที่บุด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ จากนั้นพ่นสารสกัดอบเชยซึ่งละลายในน้ำความเข้มข้น 1,000 5,000

และ 10,000 ppm จุ่มสารเคมี Carbendazim 500 ppm จุ่มน้ำร้อนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และในชุดควบคุมใช้น้ำพ่นแทนสารละลายตำแหน่งที่ปลูกเชื้อ แล้วพ่นสารละลาย ethyphon เพื่อบ่มมะม่วงให้สุก โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ศึกษาการเกิดโรคและความรุนแรงของการเกิดโรค

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี Bioautography บนแผ่น TLC

พบสารสกัดจากอบเชย แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา คือ เปลือกจวงส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม เปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอล เปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม เปลือกอบเชยเทศส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม และเปลือกเชียดส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม โดยจะเลือกสารสกัดจากเปลือกอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอลที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดเพื่อทดสอบต่อไป (Figure 1)

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยที่มีผลต่อเชื้อราสาเหตุโรค

โดยศึกษาการยับยั้งการออกของสปอร์ด้วยวิธี Micro Dilution Assay เพื่อหา Minimum Inhibitory Concentration (MIC) พบว่าสารสกัดจากเปลือกอบเชยญวน (*C. loureirii*) ส่วนที่ละลายในเมทานอล แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml มีค่า MIC เท่ากับ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีค่า MIC เท่ากับ 1,250 $\mu\text{g/ml}$ ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยไม่มีสารสกัดหยาบใดที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการออกของสปอร์เชื้อรา *B.theobromae* ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml (Table 1) สารสกัดหยาบเปลือกลำต้นอบเชยเทศ (*C. zeylanicum*) ส่วน lipophilic จากการทดสอบด้วยวิธี bioautography พบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และให้ผลที่สอดคล้องกันเมื่อทดสอบการยับยั้งการออกของสปอร์เชื้อรา *Botrytis cinerea* ค่า EC_{50} เท่ากับ 112 $\mu\text{g/mL}$ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) เท่ากับ 312.5 $\mu\text{g/mL}$ และยับยั้งการออกของสปอร์เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 162 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีค่า EC_{50} เท่ากับ 894 $\mu\text{g/mL}$ และค่า MIC เท่ากับ 625 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ 1250 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Khewkhom, 2006)

วิเคราะห์และแยกสารสกัดตามความสามารถการละลายของสารสกัดอบเชยญวน โดยวิธี CC และทดสอบ

ความสามารถของสารสกัดหยาบและ fraction ต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี bioautography

เมื่อแยกส่วนสารประกอบ (fraction) ของสารสกัดหยาบอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอล โดยชะสารสกัดผ่านคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล ด้วยสารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล และเมื่อทดสอบสารออกฤทธิ์ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค พบว่ามีหลายส่วนประกอบที่แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยเลือกส่วนประกอบที่ดีที่สุด คือ VI1 VIII1 IX1 และ XI1 (Figure 2)

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอล ในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบอบเชยญวนต่อการควบคุมโรคแอนแทรกโนสบนผลที่ไม่ได้ปลูกเชื้อที่พ่นด้วยอบเชยญวนส่วนที่ละลายในเมทานอล 5,000 และ 10,000 ppm และจุ่มในสารเคมี carbendazim 500 ppm มีร้อยละของการเกิดโรคเท่ากับ 33 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม มีร้อยละของการเกิดโรคเท่ากับ 92 และมะม่วงที่แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที มีร้อยละของการเกิดโรคเท่ากับ 22 (Table 3) มีรายงานว่าสารสกัดอบเชย 5 g/L มีคุณสมบัติในการยับยั้งการออกของสปอร์ และการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. musae*, *Fusarium* spp. และ *B. theobromae* ได้ และเมื่อปลูกเชื้อก่อนจุ่มผลกล้วยด้วยสารสกัดอบเชยความเข้มข้นดังกล่าวทำให้ความรุนแรงของการเกิดโรคต่ำกว่าการจุ่มผลด้วยสารเคมี cabendazim อย่างมีนัยสำคัญ และไม่มีผลเสียต่อคุณภาพของผลกล้วยหอมทอง (Kyu และคณะ, 2007) ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกันเมื่อทดลองกับมะเขือเทศและสตรอเบอรี่ ไม่เปลี่ยนแปลงคุณภาพเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในด้านการสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณกรดอินทรีย์ ค่าความหวาน และปริมาณสารฟีนอลิก (Tzortzakakis, 2007) นอกจากนี้การใช้น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย (*C. zeylanicum*) ผสม wax เคลือบกระดาษบรรจุภัณฑ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* และ *A. flavus* ได้เป็นเวลา 71 วัน และ เมื่อทดลองบรรจุผลสตรอเบอรี่ สามารถควบคุมโรคได้เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C (Rodriguez และคณะ, 2007)

สรุปผล

สารสกัดหยาบของอบเชยทั้ง 7 ตัวอย่าง แสดงคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยสารสกัดจากเปลือกอบเชยญวนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากที่สุด และยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ความเข้มข้น 625 µg/mL ที่ 24 ชั่วโมง และสามารถควบคุมโรคบนมะม่วงน้ำดอกไม้พบการเกิดโรคร้อยละ 33 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมร้อยละ 92

คำขอบคุณ

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- นิพนธ์ วิสารวานนท์, 2542, โรคมะม่วง, เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการหลักสูตร หมอพืช-ไม้ผล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร หน้า 38-39
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย [สืบค้น], http://www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_bc.asp?i1=64&i2=12
- Hadacek, F. and Greger, H., (2000), Susceptibility Testing Against Filamentous Fungi to Detect Antifungal Natural Products: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice, *Phytochemistry Analysis*, 11, 137-147.
- Hsieh P.C., Mau, J.L. and Huang, S.H., 2001, Antimicrobial Effect of Various Combinations of Plant Extracts, *Food Microbiology*, 18: 35-43
- Khewkhom, N., 2006, Bioassay-based Phytochemistry of Selected Tropical Plants to Discover Natural Pesticides, Dissertation, University of Vienna, Austria, 118 p.
- Kitazurua, E.R., Moreirac, A.V., Mancini-Filhoc, B.J., Delinceed, H. and Villavicencioa, A.L.C.H, 2004, Effects of Irradiation on Natural Antioxidants of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* N.), *Radiation Physics and Chemistry*, 71: 37-39.
- Kyu, K. W., N., Jitareerat, P., Kanlayanarat, S. and Sangchote, S., 2007, Effects of Cinnamon Extract, Chitosan Coating, Hot water Treatment and Their Combinations on Crown Rot Disease and Quality of Banana Fruit, *Postharvest Biology and Technology*, 45: 333-340.
- Matan N., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V. and Parker, M., 2006, Antimicrobial Activity of Cinnamon and Clove Oils under Modified Atmosphere Conditions, *International Journal of Food Microbiology*, 107: 180-185.
- Mathew, S. and Abraham, T.E. 2006. Studies on the Antioxidant Activities of Cinnamon (*Cinnamomum verum*) Bark Extracts, through Various in vitro Models, *Food Chemistry*, 94: 520-528.
- Rodriguez, A., Battle, R. and Nerin, C, 2007, The Use of Natural Essential Oils as Antimicrobial Solutions in Paper Packaging. Part II, *Progress in Organic Coatings*, 60: 33-38.
- Singh, G., Maurya, S., deLampasona, M.P. and Catalan, C.A.N., 2007, A Comparison of Chemical, Antioxidant and Antimicrobial Studies of Cinnamon Leaf and Bark Volatile Oils, Oleoresins and their Constituents, *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1650-1661.
- Tzortzakos, N.G., 2007, Maintaining Postharvest Quality of Fresh Produce with Volatile Compounds, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 111-116.
- Ustaa, J., Kreydiyyehb, S., Bajakiana, K. and Nakkash-Chmaissec H., 2002, In vitro Effect of Eugenol and Cinnamaldehyde on Membrane Potential and Respiratory Chain Complexes in Isolated Rat Liver Mitochondria, *Food and Chemical Toxicology*, 40: 935-940.
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Egido, J. and Marin, S, 2003, Inhibitory Effect of Cinnamon, Clove, Lemongrass, Oregano and Palmarose Essential Oils on Growth and Fumonisin B1 Production by *Fusarium proliferatum* in Maize Grain, *International Journal of Food Microbiology*, 89: 145-154.

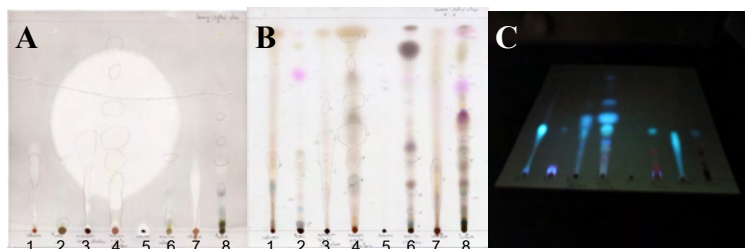


Figure 1

A: Antifungal activity observed by direct spraying of conidia suspension mixture was hexane: diethyl ether (3:2)

B: Corresponding TLC crude extracts from different crude extract of x sprayed with anisaldehyde reagent

C: Observation under a CAMAG UV-Lamp at wavelengths of 254 nm

1. stem bark of *C. porrectum* in chloroform
2. leave of *C. porrectum* in methanol
3. stem bark of *C. zeylanicum* in methanol
4. stem bark of *C. zeylanicum* in chloroform
5. stem bark of *C. loureirii* in chloroform
6. stem bark of *C. aromaticum* in diethyl ether
7. stem bark of *C. iners* in chloroform
8. leave of *C. iners* in chloroform

Table 1 MIC values ($\mu\text{g/ml}$) of plant extracts of *Cinnamomum* against *B. theobromae* and *C. gloeosporioides* at 10^5 CFU/ml determined by microdilution bioassay

Crude extract	Minimum inhibitory concentration (MIC) $\mu\text{g/ml}$					
	<i>B. theobromae</i>			<i>C. gloeosporioides</i>		
	24 hr.	48 hr.	120 hr.	24 hr.	48 hr.	120 hr.
Control (Acetone pa. + Maltbroth + Tween80)	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
stem bark of <i>C. zeylanicum</i> in methanol	>2500	>2500	>2500	625	1250	2500
stem bark of <i>C. zeylanicum</i> in chloroform	>2500	>2500	>2500	2500	>2500	>2500
stem bark of <i>C. loureirii</i> in chloroform	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
stem bark of <i>C. porrectum</i> in chloroform	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
leave of <i>C. porrectum</i> in methanol	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
stem bark of <i>C. iners</i> in chloroform	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
leave of <i>C. iners</i> in chloroform	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500

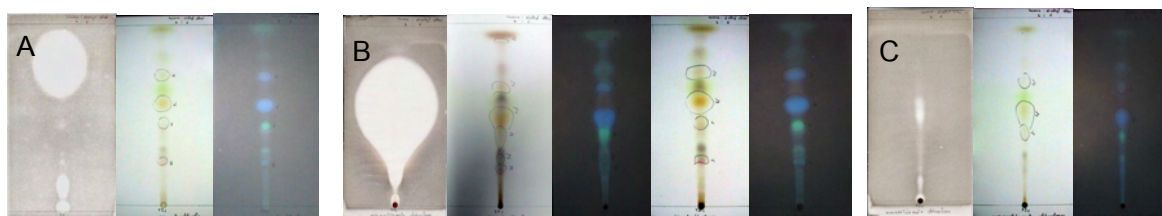


Figure 2 TLC and corresponding antifungal activity of stem bark of *C. loureirii* extract observed by direct spraying of a conidia suspension of *Cladosporium* sp. TLC solvent mixture was hexane: diethyl ether (3:2)

A: Fraction VI1 (Hexane:EtOAc, 25:75) B: Fraction IX1 (EtOAc:MeOH, 90:10) and fraction VIII1 (EtOAc:MeOH, 95:5)

C: Fraction XII2 (EtOAc:MeOH, 50:50)

Table 2 Disease incidence of Anthracnose on 'Nam Dok Mai' mango.

treatment	% disease incidence
<i>C. loureirii</i> extract in methanol 1,000 ppm	42
<i>C. loureirii</i> extract in methanol 5,000 ppm	33
<i>C. loureirii</i> extract in methanol 10,000 ppm	33
carbendazim 500 ppm	33
Hot water treatment 55 °C 5 min	22
control	92