



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย เรื่อง การต้านเชื้อราก่อโรคสายพันธุ์ *Alternaria* ในพืชวงศ์

มะเขือด้วยสารสกัดจากหัวบัวบกป่า

(Antifungal activities of *Alternaria* sp. in Solanaceae using
tuber extracts of *Stephania pierrei*)

ศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ์ หัวหน้าโครงการวิจัย

ขวัญใจ หรุพิทักษ์

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

เอกรัฐ คำเจริญ

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 23389

สัญญาเลขที่ 3/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย เรื่อง การต้านเชื้อราก่อโรคสายพันธุ์ *Alternaria* ในพืช

วงศ์มะเขือด้วยสารสกัดจากหัวบัวบกป่า

(Antifungal activities of *Alternaria* sp. in Solanaceae using
tuber extracts of *Stephania pierrei*)

ศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ์ หัวหน้าโครงการวิจัย

ขวัญใจ หรุพิทักษ์ ผู้ร่วมโครงการวิจัย

เอกรัฐ คำเจริญ ผู้ร่วมโครงการวิจัย

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่ สัญญา 3/2562

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 3/2562)

บทคัดย่อ

การศึกษากิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria alternata* ของสารสกัดหยาบของส่วนหัวของต้น *S. pierrei* โดยสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ คลอโรฟอร์ม เอทานอล เอทิลอะซิเตตและน้ำ ด้วยวิธี agar plate พบว่า สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้ดีกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นๆ เมื่อนำสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มไปศึกษากิจกรรมการยับยั้งและฆ่าเชื้อรา พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (MFC) เท่ากับ 2.5 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การศึกษารั้วนี้ประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดจากหัวบัวบกป่าเพื่อควบคุมโรคใบจุดในมะเขือเทศและพริกสองพันธุ์ภายใต้สภาพโรงเรือนและสภาพแปลง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำ 3 ซ้ำ ทั้งสองการทดลอง ทรีตเมนต์ประกอบด้วย 1) ชุดควบคุม 2) ปลุกเชื้อราสาเหตุโรค 3) ฉีดพ่นสารสกัดจากหัวบัวบกป่า 4) ฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา (mancozeb) 5) ปลุกเชื้อราและฉีดพ่นสารสกัดจากหัวบัวบกป่า และ 6) ปลุกเชื้อราและฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา (mancozeb) ผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า ทรีตเมนต์ที่ป้ายสารสกัดจากบัวบกป่าหลังจากป้ายเชื้อก่อโรคทำให้ระดับของการเกิดโรคมีค่าลดลงหลังป้ายสารสกัดเท่ากับ 8.0% และ 3.8% ในมะเขือเทศพันธุ์พวงชมพูและพันธุ์สีดา ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างจากทรีตเมนต์ที่ป้ายสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหลังจากป้ายเชื้อก่อโรคในสภาพโรงเรือนและแปลง ประสิทธิภาพของสารสกัดขึ้นอยู่กับพันธุ์กรรมพืช ชนิดของพืช และสภาพแวดล้อม ในขั้นต่อไปควรมีการศึกษาวิธีการใช้ภายใต้สภาพแปลงเกษตรกร

คำสำคัญ: บัวบกป่า การต้านเชื้อรา พืชวงศ์มะเขือ อัลเทอเนเรีย

Abstract

Antifungal activity of crude extract of the tuber of *Stephania pierrei* against *Alternaria alternata* using agar plate technique was examined. Chloroform, ethanol, ethyl acetate and water were used as the extraction solvents. The results showed that the chloroform extract from the tuber of *S. pierrei* was more the percentage of inhibition (%) than the other solvents. Moreover, the crude chloroform extract could inhibit *A. alternata* TIRTR 3435 with MIC and MBC at 2.5 and 4.0 mg/ml, respectively.

This study evaluated the efficacy of *Stephania pierrei* tuber extract for control of leaf spot disease in two cultivars of tomatoes and chili under greenhouse and field condition. The experiment was conducted Both experiments were conducted in Completely Randomized Design with 3 replications. Treatments included 1) control, 2) fungal, 3) *Stephania pierrei* tuber extract, 4) fungicide (mancozeb), 5) fungal with *Stephania pierrei* tuber extract and 6) fungal with fungicide (mancozeb). The results showed that tomatoes plants treated with the fungal with *Stephania pierrei* tuber extract decreased the disease severity to 8.0% and 3.8% in Puang-chom-poo and Sida cultivar, respectively after prevention but not differed from chemical fungicide under greenhouse and field condition. The efficacy of extracts depends on plant genotype, plant species and environmental factors. Further studies are needed to find out the way to use under conventional condition.

Keywords: *Stephania pierrei*, Antifungal activity, Solanaceae, *Alternaria* sp

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	9
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย	18
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	27
ผลผลิต (output) ที่เกิดขึ้นในช่วงที่ได้รับทุน	28
รายงานการเงิน	38
เอกสารอ้างอิง	39
ประวัตินักวิจัย	42

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	องค์ประกอบทางเคมีของหัวบัวบกป่า	18
4.2	ปริมาณสารสกัดที่พบจากหัวบัวบกป่า	19
4.3	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา <i>A. alternata</i> TISTR 3435	21
4.4	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา <i>A. alternata</i> TISTR 3435	21
4.5	ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคใบจุด (%) บนใบพืชในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลง ทั้งก่อนและหลังจากเพาะเชื้อ	25

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
3.1 การเตรียมตัวอย่างพืชก่อนนำไปสกัด	9
3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดของหัวบัวบกป่า	10
3.3 การเตรียมเชื้อรา <i>A. alternata</i> บนอาหาร PDA	11
3.4 ต้นกล้ามะเขือเทศ และพริก	14
3.5 ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดในสภาพแปลงปลูก	15
3.6 การประเมินการเกิดโรคของต้นมะเขือเทศ	16
4.1 1 การยับยั้งการเจริญด้วยวิธี Agar plate ของรา <i>A. alternata</i> TISTR 3282 และ <i>A. alternata</i> TISTR 3435	20
4.2 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	22
4.3 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	23

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เชื้อราเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พืชผัก และผลไม้มีความเสียหาย ซึ่งจะสามารถสังเกตพบได้ก็ต่อเมื่อแสดงอาการของโรค ทั้งในแปลงปลูกจนกระทั่งเก็บเกี่ยวและหลังเก็บเกี่ยว เชื้อราบางชนิดมีการเข้าทำลายแบบแฝงโดยไม่แสดงอาการอยู่ที่ผิวของผลไม้ (Pane *et al.*, 2016) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราในสกุล *Alternaria* ซึ่งสามารถก่อให้เกิดความเสียหายให้กับผลผลิตทางการเกษตร เช่น เชื้อรา *Alternaria alternata* เป็นสาเหตุการเกิดโรคในมะเขือเทศทั้งในแปลงและหลังการเก็บเกี่ยว และก่อให้เกิดโรคใบจุดของมะนาว เชื้อรา *Alternaria solani* เป็นสาเหตุของการก่อให้เกิดโรคใบจุดสีน้ำตาลในมันฝรั่ง มะเขือยาว และมะเขือเทศ โรคที่เกิดจากราในกลุ่ม *Alternaria* นี้สามารถทำลายพืชได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และแพร่ระบาดของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว (Yen *et al.*, 2014) นอกจากนี้ การเก็บพืชผลทางการเกษตรในสภาวะที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้มีการเจริญของเชื้อราและทำให้เชื้อรานั้นสามารถสร้างสารพิษ ซึ่งส่งผลให้เกิดความเสียหายทางด้านสุขภาพของผู้บริโภคทั้งในมนุษย์และสัตว์ (Placinta *et al.*, 1999)

พืชตระกูลมะเขือ เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย พืชในตระกูลนี้ได้แก่ มะเขือเทศ มะเขือยาว พริก เป็นต้น พืชเหล่านี้มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะ มะเขือเทศ เป็นแหล่งของวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น วิตามินซี วิตามินเอ วิตามินบี1 และวิตามินบี 2 พืชตระกูลมะเขือเป็นพืชที่มีความต้องการสูง แต่เนื่องจากพืชตระกูลนี้มีโรคจากเชื้อราและแมลงเข้าทำลายได้ง่าย และเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกได้ตลอดทั้งปี โรคที่สำคัญในพืชตระกูลมะเขือได้แก่ โรคใบจุดวง (Early blight) ที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria alternata* และ *Alternaria solani* (Wang *et al.*, 2010) ดังนั้นเพื่อการผลิตผักตระกูลมะเขือให้ปลอดภัยจากการเข้าทำลายของโรค เชื้อราเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พืชผัก และผลไม้มีความเสียหาย ซึ่งจะสามารถสังเกตพบได้ก็ต่อเมื่อแสดงอาการของโรค ทั้งในแปลงปลูกจนกระทั่งเก็บเกี่ยวและหลังเก็บเกี่ยว เชื้อราบางชนิดมีการเข้าทำลายแบบแฝงโดยไม่แสดงอาการอยู่ที่ผิวของผลไม้ (Pane *et al.*, 2016) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราในสกุล *Alternaria* ซึ่งสามารถก่อให้เกิดความเสียหายให้กับผลผลิตทางการเกษตร เช่น เชื้อรา *Alternaria alternata* เป็นสาเหตุการเกิดโรคในมะเขือเทศทั้งในแปลงและหลังการเก็บเกี่ยว และก่อให้เกิดโรคใบจุดของมะนาว เชื้อรา *Alternaria solani* เป็นสาเหตุของการก่อให้เกิดโรคใบจุดสีน้ำตาลในมัน

ฝรั่ง มะเขือยาว และมะเขือเทศ โรคที่เกิดจากราในกลุ่ม *Alternaria* นี้สามารถทำลายพืชได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และแพร่ระบาดของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว (Yen *et al.*, 2014) นอกจากนี้ การเก็บพืชผลทางการเกษตรในสภาวะที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้มีการเจริญของเชื้อราและทำให้เชื้อรานั้นสามารถสร้างสารพิษ ซึ่งส่งผลให้เกิดความเสียหายทางด้านสุขภาพของผู้บริโภคทั้งในมนุษย์และสัตว์ (Placinta *et al.*, 1999)

พืชตระกูลมะเขือ เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย พืชในตระกูลนี้ได้แก่ มะเขือเทศ มะเขือยาว พริก เป็นต้น พืชเหล่านี้มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะ มะเขือเทศ เป็นแหล่งของวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น วิตามินซี วิตามินเอ วิตามินบี1 และวิตามินบี 2 พืชตระกูลมะเขือเป็นพืชที่มีความต้องการสูง แต่เนื่องจากพืชตระกูลนี้มีโรคจากเชื้อราและแมลงเข้าทำลายได้ง่าย และเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกได้ตลอดทั้งปี โรคที่สำคัญในพืชตระกูลมะเขือได้แก่ โรคใบจุดวง (Early blight) ที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria alternata* และ *Alternaria solani* (Wang *et al.*, 2010) ดังนั้นเพื่อการผลิตผักตระกูลมะเขือให้ปลอดภัยจากการเข้าทำลายของโรค เพื่อให้ได้ผลผลิตมีปริมาณและคุณภาพสูง จึงมีการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคในปริมาณมาก ซึ่งการใช้สารเคมีปริมาณมากทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีอยู่ในผลผลิต แต่ปัจจุบันผู้บริโภคได้ตระหนักถึงความปลอดภัยและคุณค่าของสภาพแวดล้อมมากขึ้น

จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ในปี พ.ศ. 2553-2559 พบว่ามีปริมาณและการนำเข้าของสารเคมีป้องกันและกำจัดโรคพืช (fungicide) มูลค่า 3,860 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2553 เพิ่มขึ้นเป็น 4,503 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2559 คิดเป็นมูลค่า 643 ล้านบาท เนื่องจากการใช้สารเคมีเพื่อใช้ในการป้องกันและกำจัดโรคพืชเป็นวิธีการที่สามารถปฏิบัติได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคอย่างต่อเนื่องได้สร้างปัญหาแก่การผลิตในระยะยาว เช่น ปัญหาด้านเศรษฐกิจ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ปัญหาด้านโรคและแมลงศัตรูพืชที่มักเกิดความต้านทานต่อสารเคมี ปัญหาสุขภาพอนามัยของเกษตรกรผู้ใช้ รวมถึงปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตซึ่งมีผลกระทบต่อผู้บริโภคและปัญหาสารพิษตกค้าง หรือปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมได้ ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีการใหม่ๆ ในการป้องกันและกำจัดโรคพืช ทดแทนการใช้สารเคมี เช่น การใช้พืชที่มีความสามารถในการต้านทานโรค การใช้วิธีการเขตกรรม และการใช้วิธีการป้องกันควบคุมโรคด้วยวิธีการทางชีวภาพ ได้แก่ การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ เป็นต้น และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า สารสกัดจากหัวของบัวบกป่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสกุล *Alternaria* ได้ ดังนั้น การ

ศึกษาวิจัยครั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อใช้สารสกัดจากบวบก่ำทดแทนหรือลดปริมาณการใช้สารเคมีที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria*

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อราสายพันธุ์ *Alternaria* ด้วยสารสกัดที่ได้จากบวบก่ำ
- 2.2 เพื่อศึกษาผลของการใช้สารสกัดจากบวบก่ำ เพื่อทดแทนสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดเชื้อราสกุล *Alternaria* ในพืชตระกูลมะเขือ

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการทดลองโดยการเก็บตัวอย่างพืชจากพื้นที่ภาคตะวันออก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว มาวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีเบื้องต้น และสกัดสารสำคัญโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน นำสารสำคัญที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยวิธีการต่างๆ

4. ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

4.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันเกษตรกรได้มีการใช้ยากำจัดศัตรูพืชกันอย่างแพร่หลาย เมื่อมีการใช้สารเคมีย่อมก่อให้เกิดผลเสียตามมา เช่น ก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของเกษตรกรที่เป็นผู้ใช้ และมีผลเสียต่อผู้บริโภคด้วย เชื้อราเป็นหนึ่งในปัญหาของการก่อให้เกิดโรคในพืชผัก และผลไม้ โดยเฉพาะเชื้อที่ทำให้เกิดโรคใบจุดสีน้ำตาล เช่น เชื้อรา *Alternaria alternata* พบได้ในพืชตระกูลมะเขือ เช่น มะเขือเทศ มะนาว พริก เป็นต้น พืชเหล่านี้ล้วนแต่เป็นพืชเศรษฐกิจ

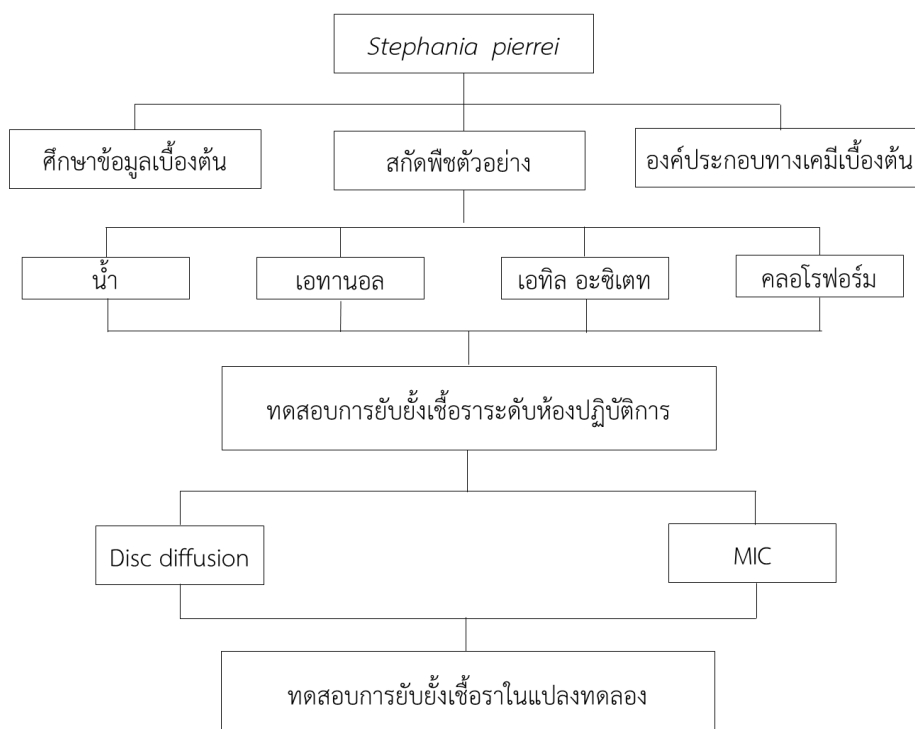
พืชตระกูลมะเขือ เป็นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เช่น วิตามินซี วิตามินเอ วิตามินบี1 และวิตามินบี 2 พืชตระกูลมะเขือเป็นพืชที่มีความต้องการสูง แต่เนื่องจากพืชตระกูลนี้มีโรคจากเชื้อราและแมลงเข้าทำลายได้ง่าย และเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกได้ตลอดทั้งปี โรคที่สำคัญในพืชตระกูลมะเขือได้แก่ โรคใบจุดวง (Early blight) ที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria alternata* (Wang et al., 2010) นอกจากนี้ *Alternaria alternata* ยังก่อให้เกิดโรคในพืชและผลไม้ชนิดอื่นได้ด้วย ดังนั้นเพื่อการผลิตพืชผักให้ปลอดภัยจากการเข้าทำลายของโรค เพื่อให้ได้ผลผลิตมีปริมาณและคุณภาพสูง จึงมีการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคในปริมาณมาก ซึ่งการใช้สารเคมีปริมาณมากทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีอยู่ในผลผลิต แต่ปัจจุบันผู้บริโภคได้ตระหนักถึงความปลอดภัยและคุณค่าของสภาพแวดล้อมมากขึ้น

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีการต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการป้องกันและกำจัดโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมี เช่น การใช้พืชที่มีความสามารถในการต้านทานโรค การใช้วิธีการเกษตรกรรม การใช้วิธีการป้องกันควบคุมโรคด้วยวิธีการทางชีวภาพ การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพร รวมทั้งได้มีการนำสารประกอบที่มีการย่อยสลายตามธรรมชาติที่ได้จากสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็งเช่น ปูและกุ้ง พบว่ามีผลส่งเสริมทำให้สามารถฆ่าเชื้อราในธรรมชาติได้ หรือมีการนำไคโตซาน และ essential oil มาใช้ในการต้านเชื้อรา *Alternaria alternata* ด้วย (Banos et al. 2012)

4.2 สมมุติฐาน

- 4.2.1 สารสกัดสามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อราสายพันธุ์ *Alternaria* ได้ในความเข้มข้นที่ต่ำ
- 4.2.2 ได้ความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมที่สามารถฆ่าเชื้อราในแปลงปลูกพืชได้
- 4.2.3 สารสกัดที่ได้สามารถนำไปใช้ทดแทนสารเคมีที่ใช้กำจัดโรคพืชได้

4.3 กรอบแนวคิดของการวิจัย



5. วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป

5.1 เก็บตัวอย่างบัวบกป่า จากพื้นที่มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

5.2 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยวิเคราะห์โปรตีนหยาบ ไขมัน, เกล็ด, ส่วนเยื่อใยหยาบ และ การวิเคราะห์เยื่อใยโดยดีเทอเจน ได้แก่ เยื่อใยที่ไม่ละลายในดีเทอเจนที่เป็นกลาง เยื่อใยที่ไม่ละลายในดีเทอเจนที่เป็นกรด (ADF) และ ADL

5.3 ศึกษาการศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อรา

5.3.1 โดยการทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Disc Diffusion

5.3.2 นำเชื้อที่ได้ไปทดสอบ MIC และ MFC โดยเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน

5.3.3 ศึกษาโครงสร้างของเชื้อราที่ได้รับสารสกัด โดย SEM และ TEM

5.4 การทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อราโรงเรือนทดลองและแปลงทดลอง

5.4.1 การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบการเกิดโรคในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

โดยนำเมล็ดมะเขือเทศ 2 สายพันธุ์ คือ พวงชมพู 2 และ สีดา และเมล็ดพริกพันธุ์พริกหนุ่ม ได้แบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม

T1 - ชุดควบคุม ไม่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคและไม่ฉีดพ่นสารใดๆ

T2 - ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค

T3 - ฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (mancozeb) อัตรา 35 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

T4 - ฉีดพ่นสารสกัดความเข้มข้น 2 mg/ml ใน 1% dimethyl sulfoxide (DMSO)

T5 - ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค + สารสกัดความเข้มข้น 2 mg/ml ใน 1% dimethyl sulfoxide (DMSO)

T6 - ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค + สารป้องกันกำจัดเชื้อรา mancozeb

5.4.2 การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบการเกิดโรคในสภาพแปลงปลูก

ปลูกเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์พวงชมพู 2 และสีดา และเมล็ดพริกพันธุ์พริกหนุ่ม จากข้อมูลประสิทธิภาพของสารสกัดในสภาพโรงเรือน คัดเลือกความเข้มข้นสารสกัดที่เหมาะสม มาทดสอบในสภาพแปลงปลูก ย้ายต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 4 สัปดาห์ลงในแปลงโดดเดี่ยว (isolation field) จากพืชชนิดอื่นที่เชื้อสามารถก่อโรคได้ (เช่น พริก มะเขือ เป็นต้น) โดยใช้ระยะระหว่างแถว 75 เซนติเมตร ระยะระหว่างต้น 50 ซม. ได้แบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม

T1 - ชุดควบคุม ไม่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคและไม่ฉีดพ่นสารใดๆ

T2 - ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค

T3 - ฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (mancozeb) อัตรา 35 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

T4 - ฉีดพ่นสารสกัดความเข้มข้น 2 mg/ml ใน 1% dimethyl sulfoxide (DMSO)

T5 - ปลุกเชื้อราสาเหตุโรค + สารสกัดความเข้มข้น 2 mg/ml ใน 1% dimethyl sulfoxide (DMSO)

T6 - ปลุกเชื้อราสาเหตุโรค + สารป้องกันกำจัดเชื้อรา mancozeb

5.4.3 ประเมินการเกิดโรค

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อให้เกษตรกรนำไปใช้ทดแทนสารเคมี หรือลดการใช้สารเคมีที่ใช้ในการควบคุมการเกิดโรคจากเชื้อรา *Alternaria*
2. ได้วิธีการเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตร

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อรา *Alternaria* เป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ทำให้เกิดโรคใบไหม้และใบจุดกับพืชหลายชนิด และเป็น seed-borne pathogen ด้วย เชื้อรา *Alternaria* โดยมีลักษณะ conidia รูปร่างคล้ายกระบอง (obclavate) สีนํ้าตาล มี beak ซึ่งเป็นเซลล์ส่วนปลายของ conidia อ้วนสั้นหรือยาวมากคล้ายเส้นด้าย (filiform) มีผนังกันเซลล์ทั้งตามขวาง (transverse septa) และตามยาว หรือเอียง (longitudinal septa) อาจเกิดเดี่ยวๆ หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ conidiophore สีนํ้าตาล ไม่แตกแขนง เกิดเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม (Estiarte *et al.*, 2017)

โรคใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* อาการบนใบเป็นแผลกลม ขนาดค่อนข้างใหญ่ มักเกิดรอยแผลเป็นวงเรียงกันเป็นชั้นๆ สีนํ้าตาลเข้มหรือดำบนแผล (zonate หรือ concentricring) เนื้อเยื่อรอบๆ แผลเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แผลอาจเชื่อมต่อกันทำให้ใบไหม้ (blight) ได้ และเนื่องจากเชื้อราติดไปกับเมล็ด ดังนั้นต้นอ่อนอาจแสดงอาการแห้งตาย (seedling blight) ได้ ด้วย โรคซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Alternaria* มีชื่อเรียกต่างๆ กันไป เช่น โรคใบกรอบของพืชตระกูลกะหล่ำ สาเหตุจาก *A. brassicae* และ *A. brassicicola* โรคใบจุดสีม่วง (Purple blotch) ของหอม กระเทียม สาเหตุจาก *A. porri* โรคใบจุดสีนํ้าตาล (Early blight) ของมะเขือเทศ สาเหตุจาก *A. solani* และ *A. alternata* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคใบจุดของมะนาว (Timmer *et al.*, 2003) ดังนั้นเชื้อรา *Alternaria* เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนได้ในพืชผลทางการเกษตรที่ปลูกในแปลง และเป็นสาเหตุของการก่อให้เกิดการเน่าเสียในผลไม้ พืชเมล็ดพืช และผัก ตลอดจนขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยวและขั้นตอนการขนส่งพืชผลทางการเกษตรซึ่งเชื้อราชนิดนี้เป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของพืชวัตถุดิบได้ตั้งแต่ขั้นตอนการปลูกจนตลอดการเกี่ยว

เชื้อรา *Alternaria* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารพิษได้ สารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้นนี้อาจส่งผลเสียได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ที่ได้รับประทานพืชผลทางการเกษตรชนิดนั้นได้ สารพิษที่ถูกสร้างขึ้นโดย เชื้อรา *Alternaria* ได้แก่ alternariol, alternariol methyl ether (AME), tentoxin, tenuazonic acid, altenuene and altertoxins

เชื้อรา *Alternaria alternata* เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคที่พบมากในผัก และผลไม้หลังเก็บเกี่ยว ปัจจุบันพบว่า เชื้อรา *A. alternata* นี้สามารถสร้างสารพิษหลักได้ถึง 5 ชนิด คือ alternariol, alternariol methyl ether (AME), altenuene, tenuazonic acid และ altertoxin-I และยังพบอีกว่า ยังมีเชื้อรา *Alternaria* สายพันธุ์อื่นก็มีการสร้างสารพิษได้ เช่น *A. tenuissima*, *A. brassicae*, *A. capsici-annui*, *A. citri*, *A. cucumerina*, *A. longipes*, *A. porri* และ *A. solani* สร้างสาร alternariol และ alternariol monomethyl ether ได้ (EFSA, 2011; Logrieco *et al.*, 2009; Ostry, 2008)

ปัจจุบันวิธีการควบคุมจะใช้สารเคมีในควบคุมหรือฆ่าเชื้อราที่ก่อโรคในพืช วิธีการควบคุมจึงต้องมีการควบคุมอย่างเข้มงวดเนื่องจากว่าอาจจะมีผลต่อการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรและต่อผู้บริโภคได้ นอกจากนี้ยังอาจมีผลต่อการดื้อยาของเชื้อราอีกด้วย (Wilson et al., 1994) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้เพื่อลดหรือควบคุมการเกิดโรคจากเชื้อราที่จะก่อให้เกิดความเสียหายในพืชผัก ผลไม้ รวมไปถึงสุขภาพของผู้บริโภค ปัจจุบันนี้นักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสำคัญต่อการเกิดโรคจากสารเคมีจึงได้ค้นหาและนำสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ เช่น พืช และสัตว์ มาใช้ทดแทนสารเคมี เพื่อช่วยต่อการควบคุม ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมได้

จากรายงานได้มีการนำไคโตซานที่ได้จากปูและกุ้งมาใช้ทดสอบการเจริญของเชื้อราพบว่าไคโตซานสามารถฆ่าเชื้อราที่ก่อโรคในพืช (Rabea et al., 2003; Banos et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ไคโตซานที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *A. alternata* ได้ (Zivkovic et al., 2018) เนื่องจากว่าไคโตซานมีกลไกการทำลายเมมเบรนและผนังเซลล์ของเส้นใยราได้ (Benhamou et al., 1992; Ghaouth et al., 1992)

ผลิตภัณฑ์ essential oils ที่ได้จากพืชเป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่ามีความสามารถในการฆ่าเชื้อราที่ก่อโรคได้ จากการรายงานของ Banos et al. (2012) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการต้านเชื้อรา *A. alternata* ของไคโตซาน และ essential oils พบว่า เมื่อใช้ไคโตซานร่วมกับ essential oils สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *A. alternata* ได้

Zaker et al. (2010) จากการศึกษาโดยใช้สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเมทานอลและเมทานอลน้ำในการสกัดพืชหลายชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญของเส้นใยราและสปอร์ *A. alternata* พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลให้ผลต่อการยับยั้ง *A. alternata* ได้ดีกว่าที่สกัดด้วยเมทานอลน้ำ โดย peppermint (15%) lavandula (15%) peppermint (10%) และ eucalyptus (15%) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดมีความสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *A. alternata* ได้เท่ากับ 0.13, 0.40, 0.43 และ 0.50 เซนติเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลยังสามารถลดจำนวนสปอร์ของ *A. alternata* ได้อย่างชัดเจน สารสกัดที่ลดจำนวนสปอร์ลงได้คือ eucalyptus (15%) และ peppermint (10%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้ Mancozeb (0.2%)

ต้นบัวบกป่า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Stephania pierrei* Craib เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae เป็นพืชมีหัวใต้ดินที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-8 เซนติเมตร ต้นบัวบกป่าเป็นไม้ที่พบได้ในป่าดิบชื้นแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทยและมาเลเซีย (Prawat et al., 1982) ในทางแพทย์แผนโบราณได้นำต้นบัวบกป่ามาใช้เป็นยาสมุนไพรเพื่อใช้ในการบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อและยาระงับปวด (นันทวัน, 2541)

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาบัวบกป่า มีสารสำคัญที่พบจากส่วนหัวใต้ดินคือ มีสาร cepharanthine และ homoaromoline (Prawat et al., 1982) สาร cepharanthine มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งช่องปาก มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งตับ

มะเร็งท่อน้ำดี (Seubwai *et al.*, 2010) และยังพบอีกว่าจากส่วนหัวใต้ดินมีสาร bisbenzylisoquinoline alkaloids ซึ่งมีศักยภาพในการยับยั้งต่อ *Plasmodium falciparum* ได้ (Cindy *et al.*, 1999) จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนหัวใต้ดินของต้น บัวบกป่าที่สกัดด้วยเมทานอล โดยใช้ thin-layer chromatography (TLC) plate และใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) ฉีดพ่นลงบนแผ่น TLC พบว่าสารสกัดหยาบมีผลการต้านอนุมูลอิสระได้ (Patnibul *et al.*, 2008)

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียจากสารสกัดส่วนหัวของ *S. glabra* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 5 สปีชีส์คือ *Staphylococcus aureus*, *S. mutans*, *Microsporum gypseum*, *M. canis* และ *Trichophyton rubrum* (Semwal and Rawat, 2009a,b) และสารสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์การต้านเชื้อราได้ 6 สปีชีส์คือ *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Penicillium citranum*, *M. gypseum*, *M. canis* และ *T. rubrum* (Semwal *et al.*, 2009) จนถึงปัจจุบัน จากการศึกษาข้อมูลข้างต้น *S. pierrei* ยังขาดข้อมูลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น และฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Alternaria* ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อรา *Alternaria* ของสารสกัดบัวบกป่า

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบ

1.1 การสกัดสารสำคัญจากตัวอย่างพืช

1.1.1 ตัวอย่างพืช *S. pierrei*

เก็บตัวอย่างพืช *S. pierrei* จากพื้นที่มหาวิทยาลัยบูรพาวิทยาเขตสระแก้ว นำมาล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นทำการหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปทำแห้งโดยการอบด้วยเครื่องอบลมร้อนแบบถาด (tray dryer) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บไว้ในถุงพลาสติก



ภาพที่ 3.1 การเตรียมตัวอย่างพืชก่อนนำไปสกัด

1.1.2 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

โดยวิเคราะห์ (Proximate Analysis) (AOAC, 1990) โดยวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ คือ วัตถุแห้ง (Dry matter (DM), โปรตีนหยาบ (Crude protein, CP), ไขมัน (Ether extract), เถ้า (Ash) ส่วนเยื่อใยหยาบ (Crude fiber, CF) และ การวิเคราะห์เยื่อใยโดยดีเทอเจน (Detergent analysis) (Georing and VanSoest, 1970) ได้แก่ เยื่อใยที่ไม่ละลายในดีเทอเจนที่เป็นกลาง (Neutral detergent fiber, NDF) เยื่อใยที่ไม่ละลายในดีเทอเจนที่เป็นกรด (Acid detergent fiber, ADF) และ Acid detergent lignin, ADL

1.1.3 การสกัดสารสกัดจากส่วนหัวของพืช *S. pierrei*

1.1.3.1 การสกัดสารสกัดหยาบโดยวิธีการต้มด้วยน้ำ

นำตัวอย่างแห้งของ 60 กรัม เติมน้ำปริมาณ 500 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาแยกส่วนของพืชที่สกัดแล้ว (retentate) โดยใช้ผ้าขาวบาง และนำสารละลายที่ได้ไปกรองอีกครั้งหนึ่งด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำสารละลายที่ได้หลังจากการกรอง (filtrate) ไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำสารรวมกันแล้วซึ่งน้ำหนัก จะได้ crude extract แล้วคำนวณหาปริมาณ yield ของสารสกัด

1.1.3.2 การสกัดสารสกัดหยาบโดย Soxhlet extraction

นำตัวอย่างแห้งของ 20 กรัม เติมตัวทำละลาย ได้แก่ เอทานอล เอทิลอะซิเตต และ คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยชุดสกัด Soxhlet เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้ทำให้แห้งเช่นเดียวกับข้อ 1.1



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดของหัวบัวบกป่า

1.2 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา คือ เชื้อรา *Alternaria alternata* TISTR 3282 และ *Alternaria alternata* TISTR 3435 โดยซื้อเชื้อจุลินทรีย์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1.3 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

1.3.1 เชื้อรา *A. alternata* TISTR 3282 และ *A. alternata* TISTR 3435 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borer เจาะเชื้อราบนอาหารขนาด 5 มิลลิเมตร เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อราด้วยวิธี agar plate

1.3.2 เชื้อรา *A. alternata* TISTR 3282 และ *A. alternata* TISTR 3435 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose agar (PDA) ในขวดแบน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อลง นำสปอร์ที่ได้ไปนับโดยใช้ haemocytometer และเจือจางให้มีสปอร์ 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (minimal inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (minimal fungicidal concentration, MFC)



ภาพที่ 3.3 การเตรียมเชื้อรา *A. alternata* บนอาหาร PDA

2. วิธีการดำเนินการวิจัยในห้องปฏิบัติการ

2.1 การทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อราด้วยวิธี agar plate

นำสารสกัดมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารทดสอบปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารแข็ง potato dextrose agar ในจานเพาะเชื้อและกระจายสารสกัดให้ทั่วๆ จานเพาะเชื้อโดยใช้ spreader นำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราที่เจริญขนาด 5 มิลลิเมตร (จากข้อ 1.3.1) วางบนอาหารที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ จานอาหารเพาะเชื้อชุดควบคุมไม่มีสารสกัดหยาบผสมอยู่ บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดหยาบความเข้มข้นต่างๆ ผสมอยู่ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดหยาบอยู่ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Percentage of Inhibition) ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

โดย R_1 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

R_2 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดทดลองที่มีสารสกัดหยาบความเข้มข้นต่างๆ

2.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC) และ การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (MFC)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC) ด้วยวิธี broth dilution method โดยการปิเปตอาหาร PDB ปริมาตร 160 ไมโครลิตร ใส่ลงหลุมของ 96 well plate จากนั้นปิเปตสารสกัดที่ละลายในสารละลาย DMSO ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ให้มีความเข้มข้นของสารสกัด เป็น 0.5, 1, 2, 2.5, 4, 5, และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบผลของสารสกัดและยาฆ่าเชื้อรา ได้แก่ Fluconazole และ Ketoconazole โดยใช้ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.8, 1, 1.6 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา (จากข้อ 1.3.2) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดย

Positive control คือ มีสารละลาย DMSO + อาหารเลี้ยงเชื้อ

Negative control คือ มีสารละลาย DMSO + อาหารเลี้ยงเชื้อ + สปอร์เชื้อรา

จากนั้นนำ 96-well plate ไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน อ่านผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยสังเกตหลุมสุดท้ายที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ นั่นคือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) บันทึกหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นำสารละลายในหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อราไปเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ ก็จะไม่พบการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเชื้อราไม่ตายก็จะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และรายงานค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ทั้งหมด (MFC) ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 2 หลุม

2.3 ศึกษาโครงสร้างของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM)

2.3.1 การเตรียมเชื้อรา

นำเชื้อราเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลา จากนั้นเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไปและ เทสปอร์แขวนลอย ลงในบีกเกอร์ที่อบฆ่าเชื้อ (spore suspension) ลงในบีกเกอร์ที่อบฆ่าเชื้อ และปิเปตสารสกัดที่เป็นค่า MIC ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร จากนั้นทำการใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยของเชื้อราใส่ในอาหารเหลว PDB ที่อยู่ในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.3.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง SEM

1. Fixation

นำส่วน cell pellet มาเติม 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1M phosphate buffer, pH 7.2 เก็บไว้ข้ามคืนที่ 4 C ล้างด้วย buffer เดิม 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที

2. Post-fixation

เติม 1% osmium tetroxide เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำ 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที

3. Dehydration

เติม acetone series เริ่มจาก 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 100%, และ 100% ความเข้มข้นละ 15 นาที จากนั้นทำให้ตัวอย่างแห้งโดยใช้วิธี CPD (critical point drying) ติดตัวอย่างลงบน stub ฉาบตัวอย่างด้วยทอง นำไปถ่ายภาพด้วยเครื่อง SEM

2.4 ศึกษาโครงสร้างของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

(Transmission electron microscope; TEM)

2.4.1 การเตรียมเชื้อรา

นำเชื้อราเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลา จากนั้นเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไปและ เทสปอร์แขวนลอย ลงในบีกเกอร์ที่อบฆ่าเชื้อ (spore suspension) ลงในบีกเกอร์ที่อบฆ่าเชื้อ และปิเปตสารสกัดที่เป็นค่า MIC ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร จากนั้นทำการใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยของเชื้อราใส่ในอาหารเหลว PDB ที่อยู่ในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.4.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง TEM

1. Fixation

นำส่วน cell pellet มาเติม 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1M phosphate buffer, pH

7.2 เก็บไว้ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วย buffer เติม 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที

2. Post-fixation

เติม 1% osmium tetroxide เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำ 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที

3. Dehydration

เติม acetone series เริ่มจาก 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 100%, และ 100% ความเข้มข้นละ 15 นาที

4. Infiltration

เติมสารผสมของ acetone : epoxy resin เริ่มจากอัตราส่วน 2:1 , 1:1 , และ 1:2 ความเข้มข้นละ 2 ชั่วโมง

5. Penetration

เติม pure epoxy resin 2 ครั้งๆ ละ 3 ชั่วโมง

6. Embedding

ย้ายตัวอย่างลง embedding capsule

7. Polymerization

อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. วิธีการดำเนินการวิจัยในโรงเรือนทดลองและแปลงทดลอง

วิธีการดำเนินการวิจัย

นำเชื้อรา *Alternaria* ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เทน้ำกลั่นหนึ่งขวดเชื้อบนโคโลนีในขวดเลี้ยงเชื้อรา จากนั้นทำการขูดผิวหน้าโคโลนีเบาๆ เทสปอร์แขวนลอย ลงในปิเก็ตเตอร์ที่อบฆ่าเชื้อ (spore suspension) ลงในปิเก็ตเตอร์ที่อบฆ่าเชื้อ และนำมานับสปอร์ด้วย haemocytometer ปรับความเข้มข้นให้ได้ 1×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร

1.การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

ปลูกเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์พวงชมพู 2 และสีดา และเมล็ดพริกพันธุ์พริกหนุ่มด้วยพีทมอสในถาดเพาะขนาด 104 หลุม เมื่อต้นกล้ามะเขือเทศทั้ง 2 พันธุ์และพริกมีอายุ 4 สัปดาห์ ย้ายกล้าใส่ถุงเพาะชำขนาด 7 นิ้ว ใช้วัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของขุยมะพร้าว : ทราย ในอัตรา 1 : 1 ถุงเพาะชำละ 1 ต้น วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น ย้ายต้นกล้าทั้งหมดใส่ในโรงเรือนที่สร้างแยกตัวออกจากการเพาะปลูกพืชโดยทั่วไป มีการคลุมพื้นที่ด้วยแผ่นพลาสติกใสโดยรอบ และปิดด้วยตาข่ายกรองแสง (สแลน) ด้านบนและด้านข้างอีกชั้น เพื่อให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรคราภายหลังจากการปลูกเชื้อ



ภาพที่ 3.4 ต้นกล้ามะเขือเทศ และพริก

โดยแบ่งกลุ่มทดลองดังนี้

- T1 - ชุดควบคุม ไม่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคและไม่ฉีดพ่นสารใดๆ
- T2 - ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค
- T3 - ฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (mancozeb) อัตรา 35 กรัม/น้ำ 20 ลิตร
- T4 - ฉีดพ่นสารสกัดความเข้มข้น 2 mg/ml ใน 1% dimethyl sulfoxide (DMSO)
- T5 - ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค + สารสกัดความเข้มข้น 2 mg/ml ใน 1% dimethyl sulfoxide (DMSO)
- T6 - ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค + สารป้องกันกำจัดเชื้อรา mancozeb

2.การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดในสภาพแปลงปลูก

ปลูกเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์พวงชมพู 2 และสีดา และเมล็ดพริกพันธุ์พริกหนุ่มด้วยพีทมอสในถาดเพาะขนาด 104 หลุม เมื่อต้นกล้าขุยมะพร้าวกับทรายในอัตรา 1 : 1 มาใส่กระถางๆ ละ 1 ต้น เตรียมวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของขุยมะพร้าว : ขี้เถ้าแกลบ ในอัตรา 1 : 1 (หรือพีทมอส) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และบรรจุใส่กระถาง นำต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 4 สัปดาห์ ที่เพาะด้วยขุยมะพร้าวกับทรายในอัตรา 1 : 1 ในถาดเพาะขนาด 104 หลุม มาใส่กระถางๆ ละ 1 ต้น วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 กระถาง ย้ายกระถางทั้งหมดใส่ในโรงเรือนที่สร้างแยกตัวออกจากการเพาะปลูกพืชโดยทั่วไป จากข้อมูลประสิทธิภาพของสารสกัดในสภาพโรงเรือน คัดเลือกความเข้มข้นสารสกัดที่เหมาะสม มาทดสอบในสภาพแปลงปลูก ย้ายต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 4 สัปดาห์ลงในแปลงโดดเดี่ยว (isolation field) จากพืชชนิดอื่นที่เชื้อสามารถก่อโรคได้ (เช่น พริก มะเขือ เป็นต้น) โดยใช้ระยะระหว่างแถว 75 เซนติเมตร ระยะระหว่างต้น 50 ซม. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำ 3 ซ้ำ เก็บข้อมูลกลุ่มการทดลองละ 5 ต้นต่อซ้ำ โดยมีกลุ่มการทดลอง ดังนี้

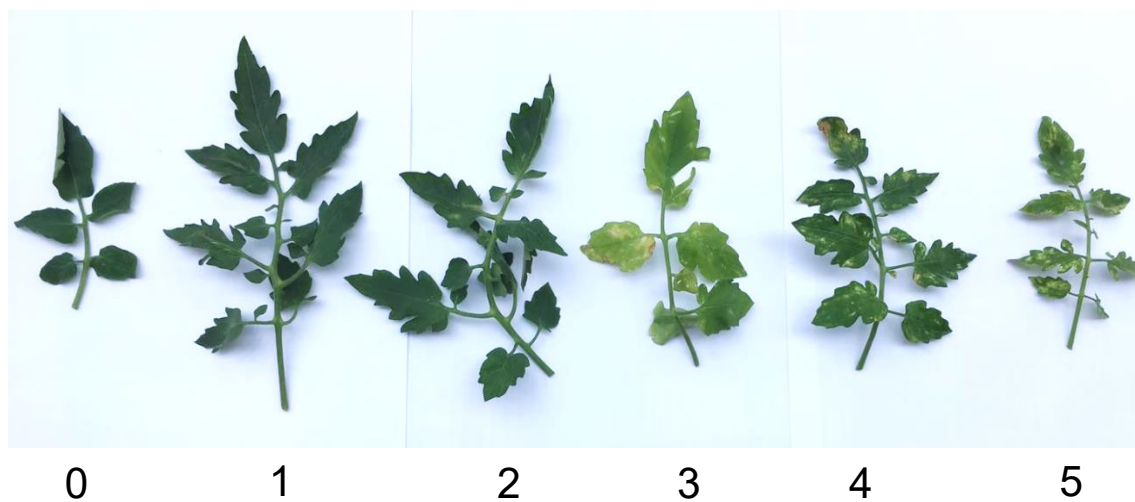
- T1 - ชุดควบคุม ไม่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคและไม่ฉีดพ่นสารใดๆ
- T2 - ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค
- T3 - ฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (mancozeb) อัตรา 35 กรัม/น้ำ 20 ลิตร
- T4 - ฉีดพ่นสารสกัดความเข้มข้น 2 mg/ml ใน 1% dimethyl sulfoxide (DMSO)
- T5 - ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค + สารสกัดความเข้มข้น 2 mg/ml ใน 1% dimethyl sulfoxide (DMSO)
- T6 - ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค + สารป้องกันกำจัดเชื้อรา mancozeb



ภาพที่ 3.5 ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดในสภาพแปลงปลูก

3. ประเมินการเกิดโรค (Disease incidence)

บันทึกลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น โดยประเมินจากพื้นที่ใบที่เป็นโรคต่อต้น โดยให้คะแนนการเกิดโรคคือ คือ 0 = ไม่มีอาการของโรค, 1 = พื้นที่เกิดโรค 10-20%, 2 = พื้นที่ใบเกิดโรค 20-30%, 3 = พื้นที่ใบเกิดโรค 30-40%, 4 = พื้นที่ใบเกิดโรค 40-50% และ 5 = พื้นที่ใบเกิดโรคมากกว่า 50%



ภาพที่ 3.6 การประเมินการเกิดโรคของต้นมะเขือเทศ

นำค่าที่ได้จากการประเมินมาคำนวณดัชนีการเข้าทำลาย

$$\% \text{ดัชนีการเข้าทำลาย} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่เก็บข้อมูล}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของความรุนแรง}}$$

ประเมินให้คะแนนการเกิดโรค 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ก่อนการป้ายสารสกัดบัวบกป่า โดยนับจากการป้ายเชื้อราก่อนโรคใบจุดไปแล้ว 10 วัน และเริ่มเห็นอาการใบจุดปรากฏ ครั้งที่สอง หลังการป้ายสารสกัดบัวบกป่าไปแล้ว 7 วัน วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยการเกิดโรคแต่ละทรีตเมนต์ด้วย one-way ANOVA (analysis of variance) test เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test และวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งโรคของสารสกัดบัวบกป่าจากการเปรียบเทียบดัชนีการเข้าทำลายก่อนและหลังการป้ายสารสกัดบัวบกป่าด้วย Pair t-test

4. สถานที่ทำการวิจัย

อาคารวิจัยการเกษตรและเทคโนโลยี คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์การทดลอง

1. ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหัวบัวบกพบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความชื้น โปรตีน ไขมัน แก้วคาร์โบไฮเดรตและแป้ง พบว่ามีค่าเท่ากับ 12.20, 8.01, 0.50, 11.22, 68.07 และ 37.53% (w/w) ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของหัวบัวบก

องค์ประกอบทางเคมี	% (w/w)
ความชื้น	12.20±0.52
โปรตีน	8.01±0.11
ไขมัน	0.5±0.05
แก้ว	11.22±0.21
คาร์โบไฮเดรต	68.07±0.67
แป้ง	37.53±0.16

การพบแก้วในพืชตัวอย่างเป็นการชี้วัดถึงปริมาณแร่ธาตุได้ จากผลการวิเคราะห์แก้วที่พบในหัวบัวบกพบว่า มีปริมาณเท่ากับ 11.22% ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าพืชชนิดอื่นที่อยู่ในวงศ์ Menispermaceae (3.26-9.61%) เช่น ต้น *Tinospora cordifolia* (Chavan et al., 2014; Mahima et al., 2014) ต้น *T. malabarica* (Hedge et al., 2015) ต้น *T. sinensis* (Chavan et al., 2014) ราก *Sphenocentrum jollyanum* (Ekpone et al., 2018) นอกจากนี้ยังพบว่า ไขมันที่พบจากส่วนหัวบัวบกมีค่าเท่ากับ 0.5% ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าพืชชนิดอื่นๆ ในวงศ์นี้เช่นกัน ส่วนโปรตีนมีค่าเท่ากับ 8.01% ซึ่งใกล้เคียงกับต้น *T. cordifolia* มีค่าเท่ากับ 7.74% (Mahima et al., 2014) และรากของ *S. jollyanum* มีค่าโปรตีนเท่ากับ 7.35% (Ekpone et al., 2018) และคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 68.07% ขณะเดียวกันพบว่า รากของ *Sphenocentrum jollyanum* มีคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 77.26% ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเล็กน้อย (Ekpone et al., 2018) และสูงกว่า *Tinospora* sp. (Chavan et al., 2014)

2. ปริมาณสารสกัด (% Yield)

จากการนำตัวอย่างไปสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่ามีปริมาณสารสกัดที่ได้แตกต่างกันดังตารางที่ 2 จากการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันในการสกัดหัวบัวบกพบว่า การใช้น้ำในการสกัดได้ปริมาณสารออกมามากที่สุด รองลงมาคือเอทานอล คลอโรฟอร์ม และเอทิลอะซิเตต ซึ่งมีปริมาณสารเท่ากับ 35.70, 8.46, 3.19 และ 0.69 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารสกัดที่พบจากหัวบัวบกป่า

ตัวทำละลาย	(% Yield
น้ำ	35.70
เอทานอล	8.467
เอทิลอะซิเตต	0.693
คลอโรฟอร์ม	3.19

3. การศึกษากิจกรรมการต้านเชื้อรา

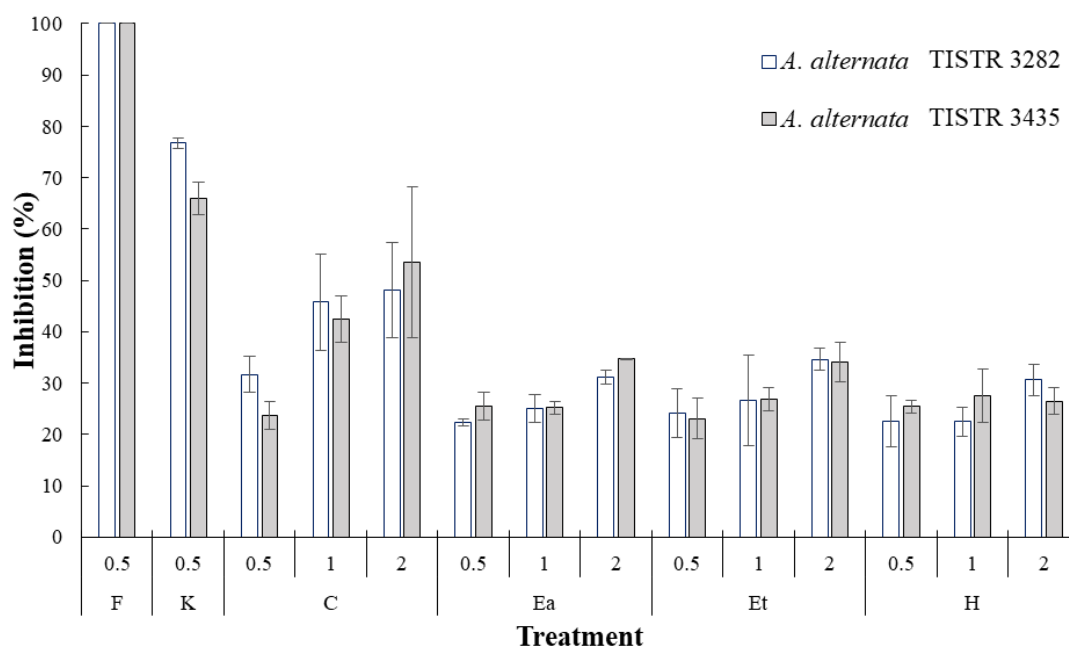
3.1 การทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อราด้วยวิธี agar plate

การทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อราด้วยวิธี agar plate โดยใช้สารสกัดจากส่วนหัวของต้นบัวบกป่า (*Stephania pierrei*) โดยนำมาสกัดที่ด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ คลอโรฟอร์ม เอทานอล เอทิลอะซิเตต และน้ำ จากนั้นนำสารสกัดมาละลายด้วยสารละลาย Dimethylsulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารสกัดที่ 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัม สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. alternata* TISTR 3282 ได้ 22.37-48.04 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้ง *A. alternata* TISTR 3435 ได้ 23.08-53.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจาก 0.5 เป็น 1 และ 2 มิลลิกรัม พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. alternata* ทั้งสองสายพันธุ์ได้เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4.1)

เมื่อเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลายต่อการยับยั้งเชื้อรา พบว่า สารสกัดจากส่วนหัวของบัวบกป่าด้วยคลอโรฟอร์มสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. alternata* TISTR 3282 และ TISTR 3435 ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล เอทิลอะซิเตต และน้ำ โดยสารสกัดจากส่วนหัวของบัวบกป่าด้วยคลอโรฟอร์มที่ 2 มิลลิกรัมสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. alternata* TISTR 3282 และ TISTR 3435 ได้ 48.04 และ 53.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Polygonum maritimum* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. alternata* (34.3%) (Jovanovic et al., 2018) และสารสกัดจากวอลนัท (*Juglans regia*) สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. alternata* ได้น้อยกว่า 45% (Wianowska et al., 2016)

อย่างไรก็ตาม การยับยั้งการเจริญของเชื้อรายังน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับยาต้านเชื้อรา Floconazole และ Ketoconazole ที่ 0.5 มิลลิกรัม โดยยาต้านเชื้อรา Floconazole สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. alternata* TISTR 3282 และเชื้อรา *A. alternata* TISTR 3435 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ Ketoconazole สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. alternata* TISTR 3282 และ *A. alternata* TISTR 3435 ได้ 76.73 และ 66.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แม้ว่าสารสกัดจากหัวบัวบกป่า

ด้วยคลอโรฟอร์มจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. alternata* TISTR 3282 และ TISTR 3435 ได้ไม่แตกต่างกัน แต่การเจริญของ *A. alternata* TISTR 3282 และ TISTR 3435 บนอาหาร PDA พบว่า TISTR 3435 เจริญเติบโตได้เร็วกว่า TISTR 3282 ดังนั้น จึงเลือก TISTR 3435 เพื่อใช้ในการศึกษาค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากหัวบักปาด้วยคลอโรฟอร์มต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราต่อไป



ภาพที่ 4.1 การยับยั้งการเจริญด้วยวิธี Agar plate ของรา *A. alternata* TISTR 3282 และ *A. alternata* TISTR 3435 โดยสารสกัดจากส่วนหัวของพืช *S. pierrei* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

- F = Fluconazole
 K = Ketoconazole
 C = Chloroform extract
 Ea = Ethanol extract
 Et = Ethyl-acetate extract
 H = Aqueous extract

3.2 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Minimal inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (Minimal fungicidal concentration, MFC)

จากการคัดเลือกผลโดยวิธี agar plate technique พบว่า สารสกัดจากส่วนหัวของต้น *Staphania pierrei* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. alternata* TISTR 3435 ได้ดีกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ จึงทำการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC) *A. alternata* TISTR 3435 โดยวิธี micro dilution technique พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 2.5, 4, 5 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการตกตะกอนของสารสกัด สารละลายใส และไม่มีการเจริญของเชื้อราเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงว่า *A. alternata* TISTR 3435 ไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดจากส่วนหัวของต้น *S. pierrei* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มในการยับยั้งการเจริญของ *A. alternata* TISTR 3435 เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของยาฆ่าเชื้อรา Floconazole และ Ketonazole ในการยับยั้งการเจริญของ *A. alternata* TISTR 3435 เท่ากับ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *A. alternata* TISTR 3435

Extract	Control	Minimal inhibitory concentration (MIC) (mg/ml)
Tuber extract	-	2.5
-	Fluconazole	1.6
-	Ketoconazole	1.6

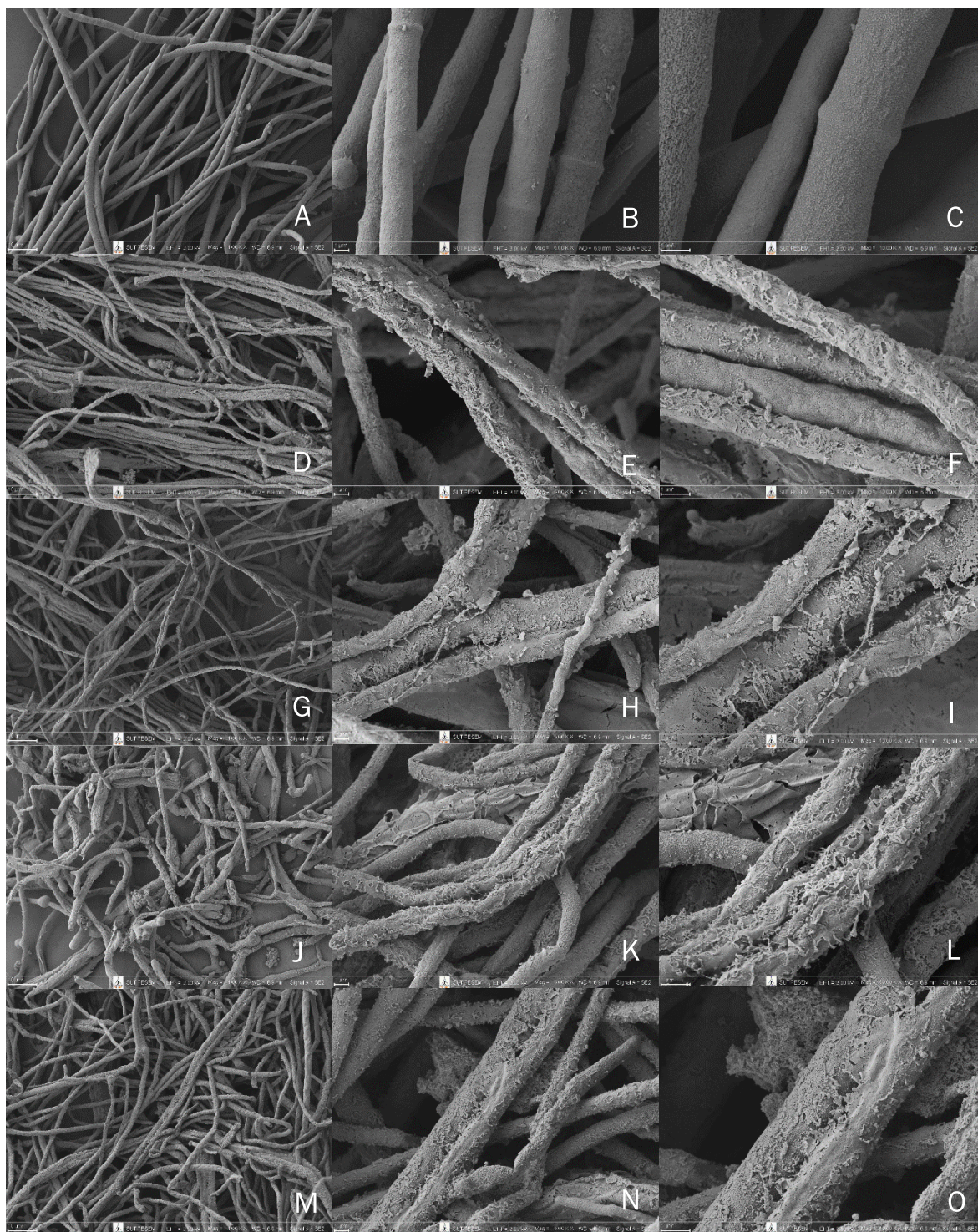
เมื่อนำหลอดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อราจากการหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากส่วนหัวของต้น *S. pierrei* ด้วย คลอโรฟอร์มในการยับยั้งการเจริญของ *A. alternata* ด้วยวิธี micro dilution technique ไปทำการ spread plate บนอาหาร PDA พบว่า ที่ความเข้มข้นต่ำตั้งแต่ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปนั้นเชื้อราสามารถเจริญได้ แสดงว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา *A. alternata* ได้ คือ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4) ซึ่งมีค่ามากกว่า MIC ที่ได้จากสารสกัดหยาบจากใบของ *pequi* (*Caryocar brasiliense*) ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Breda et al., 2016) เมื่อพิจารณาสัดส่วนของค่า MFC:MIC พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.6:1 ซึ่งมีค่าอยู่

ระหว่าง 1-2:1 จึงจัดว่าสารสกัดจากส่วนหัวของต้น *S. pierrei* มีกลไกในการฆ่าเชื้อรา (fungicidal agent)

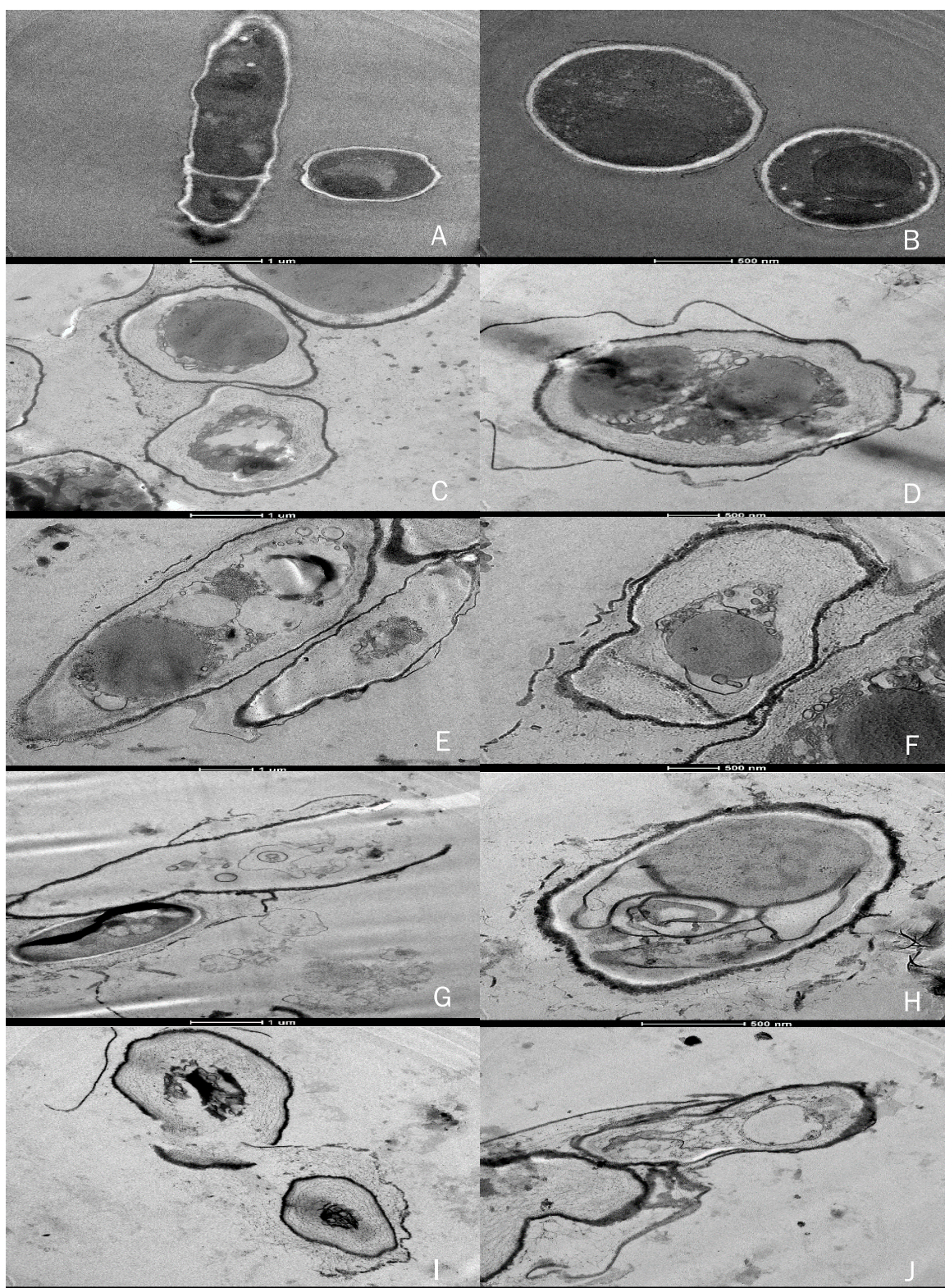
ตารางที่ 4.4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา *A. alternata* TISTR 3435

Extract	Control	Minimal fungicidal concentration (MFC) (mg/ml)
Tuber extract	-	4
-	Fluconazole	>2
-	Ketoconazole	>2

4. การศึกษาโครงสร้างของเชื้อราด้วย SEM และ TEM



ภาพที่ 4.2 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)
 หมายเหตุ: A-C; เป็นกลุ่มควบคุม, D-F; เชื้อราได้รับสารสกัด 1mg, G-I; เชื้อราได้รับสารสกัด 2.5 mg, J-L; เชื้อราได้รับยา Fluconazole, M-O; เชื้อราได้รับยา Ketoconazole



ภาพที่ 4.3 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)
 หมายเหตุ: A-B; เป็นกลุ่มควบคุม, C-D; เชื้อราได้รับสารสกัด 1mg, E-F; เชื้อราได้รับสารสกัด 2.5 mg,
 G-H; เชื้อราได้รับยา Fluconazole, I-J; เชื้อราได้รับยา Ketoconazole

การศึกษาผลของลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา *Alternaria alternata* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ตามภาพที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ ได้มีการแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัด กลุ่มที่ได้รับสารสกัด และกลุ่มที่ได้รับยามาตรฐาน โดยกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใช้ค่า MIC (2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MIC (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และเปรียบเทียบกับยามาตรฐานอีก 2 ชนิด คือ Fluconazole และ Ketoconazole จากการทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MIC นั้น สารสกัดทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อราเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเมื่อดูจากการนำเชื้อไปทำ SEM และค่า MIC ของสารสกัดที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ของเชื้อราได้มากกว่าค่าความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ

จากการทำ SEM เมื่อนำสารสกัดที่มีความเข้มข้น ความเข้มข้น 1 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบกับเชื้อราโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและยามาตรฐาน ดังภาพที่ 4.2 พบว่า โครงสร้างของเส้นใยของเชื้อรากลุ่มควบคุมโดยเฉพาะที่ผิวของเส้นใยไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ที่ความเข้มข้น 1 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในกลุ่มนี้พบว่าเมื่อได้รับสารสกัดที่มีความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า MIC พบว่าเส้นใยเริ่มมีความเสียหายเกิดขึ้นโดยมีการหลุดลอกน้อย ดังภาพที่ C และ D และเมื่อนำค่า MIC คือ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัด พบว่าโครงสร้างของเส้นใยมีความเสียหายเพิ่มมากขึ้นโดยมีการหลุดลอก เส้นใยมีการบิดเบี้ยวและบวม ดังภาพที่ E และ F เมื่อเปรียบเทียบกับยามาตรฐานทั้ง Fluconazole (G และ H) และ Ketoconazole (I และ J) (Banos et al.,2012)

เมื่อนำสารสกัดที่มีความเข้มข้น 1 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไปทดสอบกับเชื้อรา *Alternaria alternata* และนำไปทำ TEM ดังภาพที่ 4.3 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของเชื้อราที่เป็นกลุ่มควบคุม เห็นได้ว่าสารสกัดเริ่มทำให้ผนังเซลล์เส้นใยมีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามภาพที่ C และ D และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC ที่ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นเห็นได้ชัดเจนมากขึ้นจากภาพที่ E และ F ทำให้ทราบว่าสารสกัดสามารถสร้างความเสียหาย และมีผลต่อการทำลายของผนังเซลล์ของเส้นใยได้ โดยสารสกัดทำให้ผนังเซลล์ของเส้นใยมีการบวม ทำให้ลักษณะโครงสร้างเปลี่ยนแปลงโดยทำให้บิดเบี้ยว และทำให้เซลล์แตกได้ (Banos et al.,2012)

5. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกป่าในการยับยั้งโรคใบจุด

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคใบจุด (%) บนใบพืชในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลง ทั้งก่อนและหลังจากเพาะเชื้อ

ชนิดพืช	Times	T1	T2	T3	T4	T5	T6	P-value
สภาพโรงเรือน								
มะเขือเทศ	After	4.89c	10.44ab	8.00bc	6.67bc	13.78a	7.33bc	*
พวงชมพู	Before	5.56c	10.22abc	6.89bc	8.44abc	11.78a	11.33ab	*
	Pair t-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
มะเขือเทศ	After	7.33	7.78	6.00	6.89	7.56	5.33	ns
สิดา	Before	5.56	14.89	10.67	13.11	12.00	13.33	ns
	Pair t-test	**	*	ns	ns	ns	*	
พริกหนุ่ม	After	1.11	2.44	2.89	2.22	3.56	3.56	ns
	Before	1.78	4.67	2.00	2.22	5.11	4.89	ns
	Pair t-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
สภาพแปลง								
มะเขือเทศ	After	7.56	11.78	6.00	9.78	8.00	7.78	ns
พวงชมพู	Before	2.44b	9.78ab	4.67b	8.89ab	14.67a	6.22ab	***
	Pair t-test	*	ns	ns	ns	*	ns	
มะเขือเทศ	After	7.11	7.11	5.56	7.33	3.78	4.22	ns
สิดา	Before	6.44	9.33	11.33	8.22	11.33	11.78	ns
	Pair t-test	ns	ns	ns	ns	*	*	
พริกหนุ่ม	After	3.56	5.11	4.89	2.44	5.33	4.00	ns
	Before	2.89	4.44	2.67	2.67	5.78	4.89	ns
	Pair t-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันแถวแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วิเคราะห์โดย

Duncan's Multiple Range Test

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ยของดัชนีการเข้าทำลายของโรคต่อใบพืชภายใต้สภาพโรงเรือนและสภาพแปลง มะเขือเทศพันธุ์พวงชมพูแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างระหว่างแต่ละทรีตเมนต์ทั้งก่อนและหลังการป้ายสารสกัดในสภาพโรงเรือนและก่อนการป้ายสารสกัดในสภาพแปลง แต่ไม่พบว่ามี ความแตกต่างระหว่างแต่ละทรีตเมนต์ในมะเขือเทศพันธุ์สิดา และพริกพันธุ์พริกหนุ่ม โดยพันธุ์กรรมของพืชน่าจะมีผลต่อความอ่อนแอต่อเชื้อโรค อนึ่งได้ทดลองป้ายสาร dimethyl sulfoxide (DMSO) ซึ่งเป็นสารละลายที่ใช้สกัดสารจากบัวบกป่า พบว่า ไม่ส่งผลกระทบต่อใบพืช

เมื่อพิจารณาทรีตเมนต์ที่ป้ายสารสกัดจากบัวบกป่าหลังจากป้ายเชื้อก่อโรค (T5) พบว่า ระดับของการเกิดโรคหลังการป้ายสารสกัดมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับก่อนป้ายสารสกัดในมะเขือเทศทั้งสองพันธุ์ในสภาพแปลงแต่ไม่พบความแตกต่างในพริกพันธุ์พริกหนุ่ม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากบัวบกป่าสามารถลดอาการของโรคใบจุดลงได้ ถึงแม้ว่าจะพบว่ามีประสิทธิภาพในสภาพแปลงทดลองเท่านั้นอาจเป็นเพราะว่าสภาพภูมิอากาศ เช่น ความชื้นและอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงในโรงเรือนส่งผลให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดี (Talley et al, 2002) สารสกัดจึงไม่แสดงผลในเชิงบวกเช่นใน

สภาพแปลง และเมื่อพิจารณาทรีตเมนต์ที่ป้ายสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา (mancozeb) หลังจากป้ายเชื้อก่อโรค (T6) พบว่า ระดับของการเกิดโรคหลังการป้ายสารป้องกันกำจัดเชื้อรามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับก่อนป้ายสารป้องกันกำจัดเชื้อราในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทั้งสภาพโรงเรือนและสภาพแปลง แต่ไม่พบความแตกต่างในพริกพันธุ์พริกหนุ่มและมะเขือเทศพันธุ์พวงชมพู แสดงให้เห็นว่าสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรามีประสิทธิภาพเฉพาะกับบางสปีชีส์และบางสายพันธุ์พืช

เมื่อพิจารณาเฉพาะมะเขือเทศพันธุ์สีดาภายใต้สภาพแปลง สารสกัดบัวบกปาลดอาการโรคได้ 7.55% ในขณะที่สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราลดอาการโรคได้ 7.56% จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกปามีค่าใกล้เคียงกับสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา อย่างไรก็ตามสารสกัดบัวบกปายังไม่สามารถควบคุมอาการของโรคใบจุดได้ในทุกสปีชีส์ของพืชและทุกจีโนไทป์ภายใต้สภาพโรงเรือนและแปลงทดลอง การศึกษาต่อไปควรค้นหาวิธีการที่จะใช้สารสกัดบัวบกปภายใต้การเพาะปลูกปกติทั่วไปของเกษตรกร เพื่อเป็นทางเลือกแก่ผู้เพาะปลูกพืชผักระบบเกษตรอินทรีย์

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหัวบวบกบ่าพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า คาร์โบไฮเดรตและแป้ง พบว่ามีค่าเท่ากับ 12.20, 8.01, 0.50, 11.22, 68.07 และ 37.53% (w/w) ตามลำดับ
2. จากการศึกษากิจกรรมการต้านเชื้อรา *A. alternata* ของสารสกัดหยาบของส่วนหัวของต้น *S. pierrei* โดยสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยวิธี agar plate technique สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าการสกัดด้วยเอทานอล เอทิลอะซิเตต และน้ำ
3. เมื่อนำสารสกัดจากส่วนหัวของต้น *S. pierrei* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. alternata* TISTR 3435 พบว่า สารสกัดหยาบจากส่วนหัวของต้น *S. pierrei* สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อราได้ โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 2.5 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
4. การศึกษาโครงสร้างของเส้นใยของเชื้อราเมื่อได้รับสารสกัดโดยใช้ค่า MIC ได้ศึกษาผ่าน SEM และ TEM พบว่าลักษณะโครงสร้างของเส้นใยมีการเปลี่ยนแปลงมีลักษณะบวม และผนังเซลล์แตก เมื่อเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน
5. การศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดจากหัวบวบกบ่าเพื่อควบคุมโรคใบจุดในมะเขือเทศและพริกสองพันธุ์ภายใต้สภาพโรงเรือนและสภาพแปลง แสดงให้เห็นว่า ทริตเมนต์ที่ป้ายสารสกัดจากบวบกบ่าหลังจากป้ายเชื้อก่อโรคทำให้ระดับของการเกิดโรคมียาลดลงหลังป้ายสารสกัดเท่ากับ 8.0% และ 3.8% ในมะเขือเทศพันธุ์พวงชมพูและพันธุ์สีดา ตามลำดับ
6. แต่ไม่พบความแตกต่างจากทริตเมนต์ที่ป้ายสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหลังจากป้ายเชื้อก่อโรคในสภาพโรงเรือนและแปลง ประสิทธิภาพของสารสกัดขึ้นอยู่กับพันธุ์กรรมพืช ชนิดของพืช และสภาพแวดล้อม ในขั้นต่อไปควรมีการศึกษาวิธีการใช้ภายใต้สภาพแปลงเกษตรกร

ผลผลิต (Output)

1. การนำเสนอผลงานและวารสารเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ:

Sirilak Kamonwannasit, Quanjai Rupitak and Agarat Kamcharoen, 2019. Antifungal and antioxidant activities of the extract of *Stephania pierrei* tubers. In Proceeding of the 4th RSU International Research Conference on Science and Technology, Social Science, and Humanities (RSUSSH 2019). 26 April, 2019. Rungsit University, Pathum Thani, Thailand, pp 610-615.

2. เผยแพร่ข้อมูลความรู้แก่เกษตรกรในชุมชนและบุคคลที่สนใจ โดยจัดทำเอกสารให้ความรู้แก่เกษตรกรในงานประชุมสัมพันธเกษตรกรยั่งยืนสระแก้ว ครั้งที่ 2/2562 วันที่ 20 สิงหาคม พ.ศ. 2562 ณ ศูนย์ฝึกและพัฒนาอาชีพราษฎรไทยบริเวณชายแดนสระแก้ว



Antifungal and antioxidant activities of the extract of *Stephania pierrei* tubers

Sirilak Kamonwannasit, Quanjai Rupitak and Agarat Kamcharoen*

Faculty of Agricultural Technology, Burapha University Sakaeo Campus 254, Watthananakhon, Sakaeo, 27160, Thailand

E-mail: agratk@go.buu.ac.th (Corresponding author)



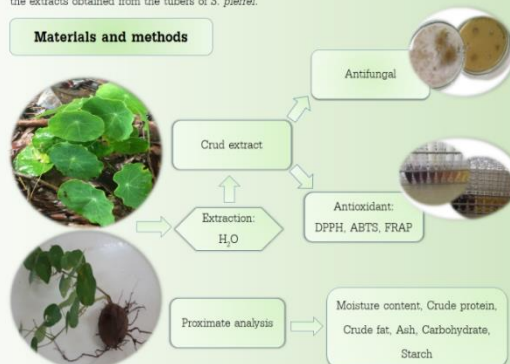
Abstract

Stephania pierrei (Menispermaceae) was climbers with membranous and peltate leaves, and especially distributed in the East of Thailand. The plant tubers had been used for the treatment of body migraine, heart disease and oedema. In this work, *S. pierrei* tubers were collected and prepared into the powder. The powder was extracted with water, evaporated and freeze-dried for analysis of biological activities. The tuber extract of *S. pierrei* was tested the in vitro antifungal activity against three fungi including *Aspergillus niger*, *A. flavus* and *Alternaria alternata*, and also studied antioxidant activity using 2, 2'-azino-bis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. The result showed that moisture, protein, fat, ash, carbohydrate and starch contents of the tuber powder were 12.20, 8.01, 0.50, 11.22, 68.07 and 37.53% (w/w), respectively. All of tested strains were not inhibited by the extract at concentration of 6 mg/mL. *Alternaria alternata* was more sensitive to the extract at concentration of 12 mg/mL than the other strains. The IC_{50} values determined based on ABTS, DPPH and FRAP (293 μ g/mL, 412 μ g/mL and 0.17 μ mol Fe^{2+} /mg dried extract, respectively) assays were low and showed the antioxidant activity.

Introduction

Nowadays, an increase in the incidence of fungal infections is due to the pathogens resistant to multiple antifungal agents. The increased usage of antifungal agents in recent years has resulted in the development of resistance to drugs. Several plant extracts have been used traditionally as antifungal agents against human, animal and plant pathogens. Researchers have been interested to search for a new bioactive compounds from plants for new antioxidant and antifungal agents. Natural products have been a source of traditional herbal medicine for the treatment of human diseases. Alkaloids, flavonoids, lignans, steroids, terpenoids and coumarins had been identified and evaluated for biological activity. *Stephania pierrei* Diels was a species recorded from the Indo-Chinese Peninsula. The tuber is traditionally used in Cambodia for the treatment of body oedema, migraine and heart disease. Its tuber extract possesses antibacterial, antimalarial and anticancer activities. Nevertheless, the antioxidant activity and chemical compositions in this plant were not reported. The objective of this study was to determine the nutritional value, antifungal and antioxidant activities of the extracts obtained from the tubers of *S. pierrei*.

Materials and methods



Results

Table 1 Chemical compositions of powder of *S. pierrei* tubers

Compositions	% (w/w)
Moisture content	12.20±0.52
Crude protein	8.01±0.11
Crude fat	0.5±0.06
Ash	11.22±0.21
Carbohydrate	68.07±0.67
Starch	37.53±0.16

Table 2 Antifungal activity (inhibition zone) of *S. pierrei* tuber extract at various concentrations

Fungal strains	Inhibition zone in diameter (mm)		
	Concentration of the extract		
	6	12	24
<i>Aspergillus niger</i>	ND	ND	8.67±1.52
<i>Aspergillus flavus</i>	ND	ND	12.5±0.70
<i>Alternaria alternata</i>	ND	11.75±1.5	17.75±1.70

ND: not detected; Values are expressed as means ± standard deviation (n=3)

Table 3 Antioxidant activity of *S. pierrei* tuber extract

Methods	Standards	Aqueous extract
ABTS assay (IC_{50} μ g/mL)	BHT	108.12±8.41
		293.68±11.42
DPPH assay (IC_{50} μ g/mL)	Ascorbic acid	1.86±0.12
		412.09±19.40
FRAP assay (μ mol Fe^{2+} /mg extract)	-	-
		0.17±0.02

Conclusion

The results showed that the tubers of *S. pierrei* contained moderate amount of protein, fat, ash, carbohydrate cellulose, hemicellulose and starch. The extract of *S. pierrei* tubers have been shown to possess antifungal and antioxidant activities, which promoted by health benefits. Thus, it can be concluded that the presence of antifungal and antioxidant activities in the aqueous extract from *S. pierrei* tubers suggests that the plant may be a source of bioactive compounds with multi-bioactivity and a material for functional food development.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 3/2562).

References

- Bor, J.Y., Chen, H.Y., & Yen, G.C. (2006). Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1680-1686.
- Chavan, T., Nandhare, A., Kulkarni, O., & Kuvalekar, A. (2014). Nutritional evaluation of Satwa, an ayurvedic formulation of three *Tinospora* species from India. *VRI Phytomedicine*, 2(2), 53-58.
- Dordevic, T.M., Marinkovic, S.S.S., & Brankovic, S.I.D. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, 119, 967-963.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Evans, C.R. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Semwal, D.K., & Rawat, U. (2009). Antimicrobial hasubanalactam alkaloid from *Stephania glabra*. *Planta Medica*, 75, 378-380.
- Thangaveeru, R., Devi, P.G., Gopi, M., & Mustafa M.M. (2013). Management of Eumusae leaf spot disease of banana caused by *Mycosphaerella eumusae* with Zimmu (*Allium sativum* x *Allium cepa*) leaf extract. *Crop Protection*, 46, 100-105.



Antifungal and antioxidant activities of the extract of *Stephania pierrei* tubers

Sirilak Kamonwannasit, Quanjai Rupitak and Agarat Kamcharoen*

Faculty of Agricultural Technology, Burapha University Sakaeo Campus, Thailand

*Corresponding Author, E-mail: agratk@go.buu.ac.th

Abstract

Stephania pierrei (Menispermaceae) was climbers with membranous and peltate leaves and especially distributed in the East of Thailand. The plant tubers had been used for the treatment of body migraine, heart disease, and oedema. In this work, *S. pierrei* tubers were collected and prepared into the powder. The powder was extracted with water, evaporated, and freeze-dried for analysis of biological activities. The tuber extract of *S. pierrei* was tested the *in vitro* antifungal activity against three fungi including *Aspergillus niger*, *A. flavus*, and *Alternaria alternata*, and also studied antioxidant activity using 2, 2'-azino-bis (3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. The result showed that moisture, protein, fat, ash, carbohydrate, and starch contents of the tuber powder were 12.20, 8.01, 0.50, 11.22, 68.07, and 37.53% (w/w), respectively. All of the tested strains were not inhibited by the extract at a concentration of 6 mg/mL. *Alternaria alternata* was more sensitive to the extract at a concentration of 12 mg/mL than the other strains. The IC₅₀ values determined based on ABTS, DPPH, and FRAP (293 µg/mL, 412 µg/mL, and 0.17 µmol Fe²⁺/mg dried extract, respectively) assays were low and showed the antioxidant activity.

Keywords: Proximate analysis, antioxidant activity, antifungal activity, aqueous extract, *stephania pierrei*, *alternaria alternata*

1. Introduction

Nowadays, an increase in the incidence of fungal infections is due to the pathogens resistant to multiple antifungal agents. The antifungals comprise a large and diverse group of drugs used to treat fungal infections. The increased usage of antifungal agents in recent years has resulted in the development of resistance to drugs. In fact, the resistance to antibiotics during prolonged treatment with several antifungal drugs has been the reason for an extended search for newer drugs to treat fungal infections (Kalidindi et al., 2015). Several plant extracts have been used traditionally as antifungal agents against human, animal and plant pathogens (Barhouchi, Aouadi, & Abdi, 2018). Approximately 20% of known plants have been used in pharmaceutical studies, impacting the healthcare system such as treating cancer, invasive aspergillosis and harmful diseases (Altemimi et al., 2017; Lan et al., 2018). Not only fungal pathogens but also free radicals could be a cause of diseases in human. Free radicals are fundamentals to biochemical process, represent an essential part of aerobic life and metabolism, and link to oxidative stress resulting in many diseases. An antioxidant is a molecule capable of slowing or preventing the oxidation of other molecules and may protect cells from damage caused by unstable molecules known as free radicals. Low level of antioxidants has shown to be associated with many disorders including cancer, inflammation, coronary heart disease and diabetes (Rashed, 2014). Many plants have been also found to possess free radical scavenging activity (polyphenols, alkaloids, and terpenoids).

Researchers have interested to search for new bioactive compounds from plants for new antioxidant and antifungal agents. Natural products have been a source of traditional herbal medicine for the treatment of human diseases. Drugs from the plants are easily available, less expensive, safe and efficient, and rarely have side effects (Yadev & Agarwala, 2011). The plants genus *Stephania* distributed in tropical and subtropical Asia, tropical Africa, and Oceania (Dary et al., 2015). These plants had been used in folk medicine for the treatment of various ailments. Alkaloids, flavonoids, lignans, steroids, terpenoids, and coumarins had been identified and evaluated for biological activity (Semwal et al., 2010). Many researchers searched for biological activity from the extract of the genus *Stephania* sp. such as *S. cepharantha* (Rogosnitsky & Danks, 2011), *S. epigaea* (Lv et al., 2013), *S. glabra* (Semwal & Rawat, 2009; Semwal et al., 2012), *S. pierrei* (Kamonwannasit & Kamcharoen, 2018), *S. rotunda* (Baghdikian et al., 2013; Gulcin et al., 2010), *S. sinica* (Xie et al., 2014), *S. venosa* (Bunluepuetch & Tewtrakul, 2011), and *S. yunnanensis* (Shi et al., 2015). *Stephania pierrei* Diels was a species recorded from the Indo-Chinese Peninsula. The tuber is



traditionally used in Cambodia for the treatment of body oedema, migraine, and heart disease. Its tuber extract possesses antibacterial (Kamonwannasit & Kamcharoen, 2018), antimalarial, and anticancer activities (Semwal et al., 2010). Nevertheless, the antioxidant activity and chemical compositions in this plant were not reported.

2. Objectives

The objective of this study was to determine the nutritional value, antifungal, and antioxidant activities of the extracts obtained from the tubers of *S. pierrei*.

3. Materials and Methods

3.1 Plant Material

The tubers were washed 3–4 times with tap water and cut into small pieces. The plant material was dried at 50 °C in a hot air oven and ground into the powder. *S. pierrei* extract was prepared by boiling 50 g of dried plant powder in 500 mL of distilled water for 30 min. The aqueous extract of *S. pierrei* was filtered through cotton gauze and centrifuged at 2,500 g for 10 min. The supernatant was collected and concentrated at 40 °C using a rotary evaporator under reduced pressure. The residue was freeze-dried in a lyophilizer.

3.2 Proximate analysis of the tubers of *S. pierrei*

The chemical compositions of the tuber powder of *S. pierrei* consisting of moisture content, crude protein, crude fat, and ash were analyzed according to the standard methods of Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2016). Carbohydrate was calculated by subtracting the sum of moisture, protein, fat, and ash from 100. Protein content was determined by the Kjeldahl method with a conversion factor of 6.25. Fat content was determined by extraction with petroleum ether using a Soxhlet apparatus. Ash content was determined by incinerating the sample in a muffle furnace at 600 °C for 3 hr. Starch was measured by the polarimetric method.

3.3 Antioxidant activities

ABTS radical cation scavenging activity assay

The ABTS (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) assay method was carried out according to Re et al. (1999). Briefly, ABTS radical cation (ABTS^{•+}) was produced by the reaction between 5 mL of 14 mM ABTS and 5 mL of 4.9 mM potassium persulfate (K₂S₂O₈). The mixture was kept in the dark to react for 16 hr at room temperature so that it reached a stable oxidative state. The working solution was prepared by diluting the mixture with ethanol to achieve the absorbance of 0.700±0.020 at 734 nm. The extract (50 µL) at various concentrations was added to 950 µL of ABTS^{•+} solution and mixed well. The reaction mixture was performed at room temperature for 6 min. The absorbance was measured at 734 nm comparing to the butylated hydroxyl toluene (BHT) as standard.

DPPH radical scavenging activity assay

The free radical scavenging capacity of the extract was measured using the DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay method described by Bor et al. (2006). The extract of 100 µL with various concentration (0–50 µg/mL) was added to 4.0 mL of 50 µM DPPH in methanol solution, and the final volume was adjusted to 5.0 mL with deionized water. The mixture was incubated in the dark at room temperature for 30 min. The absorbance of the reaction mixture was measured with a spectrophotometer at 517 nm. Antioxidant activity was expressed as IC₅₀, which was defined as the concentration of the extract required to inhibit the formation of DPPH radicals by 50%.

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay

The FRAP assay was carried out by the method as described by Dordevic et al. (2010). The FRAP reagent consists of 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine) in 40 mM HCl and 20 mM FeCl₃ in the ratio of 10:1:1 (v/v). The extract of 50 µL was added to 1.5 mL of FRAP reagent, which was freshly prepared and warmed to 37 °C before use. The mixture was measured its absorbance at 593 nm using a UV spectrophotometer after 4 min of incubation. The ferrous sulfate (FeSO₄) was used as a standard solution. The FRAP results were expressed as µmol Fe²⁺/mg dry extract.

3.4 Antifungal activities

Antifungal activities of the extract were tested against three fungi including *Alternaria alternata* TISTR 3435, *Aspergillus niger* TISTR 3012 and *A. flavus* TISTR 3135. The strains were obtained from the Thailand Institute of Scientific and Technological Research.

The antifungal activity of the extracts against *A. alternata*, *A. niger* and *A. flavus* was determined by using agar well diffusion method (Thangavelu et al. 2013). The fungi suspensions were 6×10^4 spores/mL in sterilized saline solution (0.85%) and 100 μ L of the fungal suspension was spread onto the surface of the potato dextrose agar (PDA) in Petri dishes. Holes with diameters of 5 mm were punched with a sterilized cork borer. The extracts were added to each well with different concentrations (6, 12 and 24 mg/well). Subsequently, the plates were incubated at 30 $^{\circ}$ C for 72 hr. The diameters of the inhibition zones were measured in millimeters and all tests were performed in duplicate.

4. Results and Discussion

The proximate analysis showed the percentage of moisture content, crude protein, crude fat, ash, carbohydrate and starch of *S. pierrei* tuber powder as 12.20, 8.01, 0.50, 11.22, 68.07 and 37.53% (w/w), respectively (Table.1).

Table 1 Chemical compositions of powder of *S. pierrei* tubers

Compositions	% (w/w)
Moisture content	12.20 $\pm$ 0.32
Crude protein	8.01 $\pm$ 0.11
Crude fat	0.5 $\pm$ 0.05
Ash	11.22 $\pm$ 0.21
Carbohydrate	68.07 $\pm$ 0.67
Starch	37.53 $\pm$ 0.16

Ash content is an index of mineral content in the sample. In this study, ash content of 11.22% in *S. pierrei* tubers was measured in the sample, which was higher than other plants in Menispermaceae family (3.26-9.61%) such as *Tinospora cordifolia* stem (Chavan et al., 2014; Mahima et al., 2014), *T. malabarica* stem (Hedge et al., 2015), *T. sinensis* stem (Chavan et al., 2014), *Sphenocentrum jolijianum* root (Ekpone et al., 2018). However, the fat content of *S. pierrei* tubers (0.5%) was lower than other plants in this family. The protein content of *S. pierrei* tubers (8.01%) was closed to *T. cordifolia* stem (7.74%) (Mahima et al., 2014) and *S. jolijianum* root (7.35%) (Ekpone et al., 2018). The carbohydrate content of *S. pierrei* tubers 68.07% was slightly lower than *Sphenocentrum jolijianum* root (77.26%) (Ekpone et al., 2018), and was higher than *Tinospora* sp. (Chavan et al., 2014).

The aqueous extract of the tubers of *S. pierrei* was assessed for antifungal activity using agar well diffusion method by measuring the diameter of growth inhibition zones at different concentrations. The antifungal activity is presented in Table 2. The inhibition zone of *A. alternata* was 11.75 $\pm$ 1.5 mm, whereas *A. niger* and *A. flavus* were not inhibited by the extract at concentration 12 mg/well. *A. alternata* (17.75 $\pm$ 1.70 mm) was more sensitive to the extract than *A. flavus* (12.5 $\pm$ 0.7 mm) at concentration 24 mg/well and *A. niger* (8.67 $\pm$ 0.52 mm) at the same concentration of the extract. Semwal et al. (2009) reported that the tubers of *Stephania glabra* were found to be inhibitory for *A. niger*, *A. fumigatus*, *P. citranum*, *M. gypseum*, *M. canis*, and *T. rubrum*. Plants that are a rich source of bioactive compounds such as tannins, terpenoids, saponins, alkaloids, and flavonoids are reported to have *in vitro* antifungal properties (Arif et al., 2009). Consistent with Kamonwannasit and Kamcharoen (2018) reported that *S. pierrei* tuber contains alkaloids and tannins. However, the antifungal activity of the extract depends on the concentration of extract and strains of fungi.

Table 2 Antifungal activity (inhibition zone) of *S. pierrei* tuber extract at various concentrations

Fungal strains	Inhibition zone in diameter (mm)		
	Concentration of the extract		
	6	12	24
<i>Aspergillus niger</i>	ND	ND	8.67±1.52
<i>Aspergillus flavus</i>	ND	ND	12.5±0.70
<i>Alternaria alternata</i>	ND	11.75±1.5	17.75±1.70

ND: not detected; Values are expressed as means ± standard deviation (n=3)

Antioxidant activity of the aqueous extract of *S. pierrei* tubers was studied *in vitro* in three different radical models (ABTS, DPPH, and FRAP). The scavenging effects of the extract and standard (BHT and ascorbic acid) on the ABTS and DPPH radicals, respectively, were expressed as half maximum inhibitory concentration (IC₅₀) value. ABTS, DPPH, and FRAP assays are widely used to determine the antioxidant capacity in plant extracts because of their simplicity, stability, and accuracy (Reddy et al. 2010). The antioxidant activity of the extract was determined as seen in Table 3.

Table 3 Antioxidant activity of *S. pierrei* tuber extract

Methods	Standards	Aqueous extract
ABTS assay (IC ₅₀ µg/mL)	BHT 108.12±8.41	293.68±11.42
DPPH assay (IC ₅₀ µg/mL)	Ascorbic acid 1.86±0.12	412.09±19.40
FRAP assay (µmol Fe ²⁺ /mg extract)	-	0.17±0.02

The IC₅₀ value of BHT and the extract were 108.12 µg/mL and 293.68 µg/mL, respectively. The extract could seem to be slow and low efficient scavengers of the ABTS^{•+} radical. In DPPH assay, the antioxidant activity was obtained from ascorbic acid and the extract with IC₅₀ values of 1.86 µg/mL and 412.09 µg/mL, respectively. The FRAP assay was used to evaluate the antioxidant properties of the extract based on their ability to reduce ferric (III) to ferrous (II) (Akter et al. 2016). The antioxidant activity of 0.17 µmol Fe²⁺/mg extract was obtained from the FRAP assay. The result of ABTS, DPPH and FRAP assays showed that the extract was low effective on antioxidant activity. This result might be due to the differences in solvent extraction leading to low antioxidant activity. In addition, Naczek and Shahidi (2006) suggested that the polarity of the solvent illustrated a significant role in increasing the solubility of phenolic compounds. Srikong et al. (2017) studied the differential solvent extractions such as methanol, ethanol, dichloromethane, and hexane on antioxidant activity of the green seaweed *Ulva intestinalis*. They found that dichloromethane extract of *U. intestinalis* showed the highest antioxidant activity of the DPPH radical followed by the ethanol, methanol, and hexane, respectively. Pratap et al. (2013) reported that the aqueous extract exhibited strong DPPH radical scavenging ability (IC₅₀ value of 82.05 µg/mL) than the methanolic extract (IC₅₀ value of 987.51 µg/mL).

5. Conclusion

The results showed that the tubers of *S. pierrei* contained a moderate amount of protein, fat, ash, carbohydrate cellulose, hemicellulose, and starch. The extract of *S. pierrei* tubers has been shown to possess antifungal and antioxidant activities, which promoted by health benefits. Thus, it can be concluded that the presence of antifungal and antioxidant activities in the aqueous extract from *S. pierrei* tubers suggests that the plant may be a source of bioactive compounds with multi-bioactivity and material for functional food development.

6. Acknowledgements

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 3/2562).



7. References

- Akter, K., Barnes, E.C., & Brophy, J.J. (2016). Phytochemical profile and antibacterial and antioxidant activities of medicinal plants used by Aboriginal people of New South Wales, Australia. *Evid-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1-14.
- Altemimi, A., Lakhsassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6(42), 1-23.
- Arif, T., Bhosale, J. D., Kumar, N., Mandal, T. K., Bendre, R. S., Lavekar, G. S., & Debur, R. (2009). Natural products - antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11, 621-638.
- A.O.A.C. (2010). Association of Official Analytical Chemists, 18th Ed, Revision 3, Official Methods of Analysis. Washington DC, USA.
- Baghdikian, B., Mahsou-Leddet, V., & Bory S. (2013). New antiplasmodial alkaloids from *Stephania rotunda*. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(1), 381-385.
- Barhouchi, B., Aouadi, S., & Abdi, A. (2018). Preparations based on minerals extracts of *Calicotome villosa* roots and bovine butyrate matter: Evaluation in vitro of their antibacterial and antifungal activities. *Journal of Mycologie Medicale*, 28, 473-481.
- Bor, J. Y., Chen, H. Y., & Yen, G. C. (2006). Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1680-1686.
- Bunluepuech, K., & Tewtrakul, S. (2011). Anti-HIV-1 integrase activity of Thai medicinal plants in longevity preparations. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 33(6), 693-697.
- Chavan, T., Nandhare, A., Kulkarni, O., & Kuvalekar, A. (2014). Nutritional evaluation of Satwa, an ayurvedic formulation of three *Trigonotis* species from India. *VRI Phytochemistry*, 2(2), 53-58.
- Dary, C., Hul, S., Kim, S., & Jabbeur, F. (2015). Lactotypification of *Stephania pierrei* (Menispermaceae). *Edinburgh Journal of Botany*, 72(3), 423-428.
- Dordovic, T. M., Marinkovic, S. S. S., & Brankovic, S. I. D. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, 119, 957-963.
- Ekpene, E. U., Aja, P. M., Okechukwu, U. P. C., Udezor, P. A., Clementina, U. U., & Lynda, N. O. (2018). Phytochemical and proximate analysis of *Sphenocentrum jolayanum* ethanol root extract and dry sample collected from Ebonyi state, Nigeria. *IDOSR Journal of Biology Chemistry and Pharmacy*, 2(1), 8-17.
- Gulcin, I., Elias, R., Gepdiremen, A., Chea, A., & Topal, F. (2010). Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania rotunda*: cepharanthine and fangchinoline. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25(1), 44-53.
- Hedge, S., Jayaraj, M., & Ehandarkar, A. V. (2015). Pharmacognostic and preliminary phytochemical studies of cold and hot extracts of stem of *Trigonotis malabarica* Mires. An important medicinal plant. *International Journal Pharma Bio Sciences*, 6(2), 47-54.
- Kalidindi, N., Thimmashah, N. V., Jagadeesh, N. V., Nandee, R., Swetha, S., & Kalidindi, B. (2015). Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extract of *Annona squamosa* Linn. Leaves. *Journal of food and drug analysis*, 23, 795-802.
- Kamonwansat, S., & Kamcharoen, A. (2018). Phytochemical screening and antibacterial activities of tuber extract of *Stephania pierrei* Diels. *Chiang Mai Journal Science*, 45(3), 1396-1406.
- Lan, H., Wu, L., Sun, R., Yang, K., Liu, Y., Wu, J., Geng, L., Huang, C., & Wang, S. (2018). Investigation of *Aspergillus flavus* in animal virulence. *Toxicon*, 145, 40-47.
- Lu, J. J., Xu, M., & Wang, D. (2013). Cytotoxic bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania epigaea*. *Journal Natural Products* 76, 926-932.
- Mahima, R. A., Prakash, A., Verma, A. K., Kumar, V., & Roy, D. (2014). Proximate and elemental analyses of *Trigonotis cordifolia* stem. *Pakistan Journal Biological Sciences*, 17(5), 744-747.
- Naczek, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.



- Pratap, C. R., Vysakhi, M. V., Manju, S., Kannan, M., Budul, K. S., & Sreekumaran, N. A. (2013). *In vitro* free radical scavenging activity of aqueous and methanolic leaf extracts of *Aegle tamilnadensis* Abudi Kader (Rutaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 819-823.
- Rashed, K. (2014). Medicinal plants with antioxidant potential: A review. *Hygeia: Journal of Drugs and Medicines*, 6(1), 106-111.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Evans, C. R. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Reddy, C. V. K., Sreeramulu, D., & Raghunath, M. Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International*, 43, 285-288.
- Rogosnitzky, M., & Danks, R. (2011). Therapeutic potential of biscochlorine alkaloid, cepharanthine, for a range of clinical conditions. *Pharmacological Reports*, 63, 337-347.
- Semwal, D. K., Badoni, R., & Semwal, R. (2010). The genus *Stephania* (Menispermaceae): Chemical and pharmacological perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 369-383.
- Semwal, D. K., & Rawat, U. (2009). Antimicrobial hasubanalactam alkaloid from *Stephania glabra*. *Planta Medica*, 75, 378-380.
- Semwal, D. K., Rawat, U., Bamola, A., & Semwal, R. (2009). Antimicrobial activity of *Phoebe lanceolata* and *Stephania glabra*; preliminary screening studies. *Journal of Scientific Research*, 1(3), 662-666.
- Semwal, D. K., Semwal, R. B., & Samwal, R. (2012). Antibacterial activity of 8-(4'-methoxybenzyl)-xylopinine from *Stephania glabra* tubers. *Pharmacologia*, 3(10), 539-541.
- Shi, X., Li, X., & Zou, M. (2015). Chemical constituents and biological activities of *Stephania yunnanensis* H.S.Lo. *Biomed Research*, 26(4), 715-720.
- Srikong, W., Bovornreungroj, N., Mittraparthorn, P., & Bovornreungroj, P. (2017). Antibacterial and antioxidant activities of differential solvent extracts from the green seaweed *Ulva intestinalis*. *ScienceAsia*, 43, 88-95.
- Thangaveelu, R., Devi, P. G., Gopi, M., & Mustafa M. M. (2013). Management of Eumusae leaf spot disease of banana caused by *Mycosphaerella eumusae* with Zimmu (*Allium sativum* x *Allium cepa*) leaf extract. *Crop Protection*, 46, 100-105.
- Xie, D. T., Wang, Y. Q., & Kang, Y. (2014). Microwave-assisted extraction of bioactive alkaloids from *Stephania sinica*. *Separation Purification Technology*, 130, 173-181.
- Yadav, R., & Agarwala, M. (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytochemistry*, 3(12), 10-14.



เชื้อราเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พืชผัก และผลไม้มีความเสียหาย สามารถสังเกตพบได้ก็ต่อเมื่อแสดงอาการของโรคที่ใบเปลี่ยนสีจากเขียวทั้งใบเป็นสีน้ำตาลทั้งใบเหี่ยวเหี่ยว ใบชดสีมีการเข้าทำลายแบบเน่าโสมไม่แสดงอาการอยู่ชั่วขณะ (Pais et al., 2018) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราในสกุล *Aspergillus* ซึ่งสามารถก่อให้เกิดความเสียหายให้กับผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น เชื้อรา *Aspergillus* สังกะยง เป็นสาเหตุการเกิดโรคในมะเขือเทศทั้งใบเน่าและเน่าทั้งใบทั้งการเก็บเกี่ยว และก่อให้เกิดโรคในจุดของผลพวง โรคที่เกิดจากราในกลุ่ม *Aspergillus* นี้สามารถทำลายพืชได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และแพร่ระบาดของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว (Yes et al., 2014) นอกจากนี้ การเก็บพืชผลทางการเกษตรในสภาวะที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้เกิดการเจริญของเชื้อรา และทำให้เชื้อราสามารถสร้างสารพิษ ซึ่งส่งผลให้เกิดความเสียหายทางด้านสุขภาพของผู้บริโภคทั้งในมนุษย์และสัตว์ (Ponkiet et al., 1999)

ปัจจุบันการใช้สารเคมีเพื่อใช้ในการป้องกันและกำจัดโรคพืชเป็นวิธีการที่สามารถปฏิบัติได้บ้าง แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืชอย่างต่อเนื่องได้สร้างปัญหาแก่การปนเปื้อนในธรรมชาติ เช่น ปัญหาด้านเศรษฐกิจ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ปัญหาด้านโรคและแมลงศัตรูพืชที่มีภูมิต้านทานต่อสารเคมี ปัญหาสุขภาพอนามัยของเกษตรกรผู้ใช้ รวมถึงปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตซึ่งมีผลกระทบต่อผู้บริโภคและปัญหาสารพิษตกค้าง หรือปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมได้ ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีการใหม่ ๆ ในการป้องกันและกำจัดโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมี เช่น การใช้พืชที่มีความสามารถในการต้านทานโรค การใช้วิธีการเขตกรรม และการใช้วิธีการป้องกันควบคุมโรคด้วยวิธีการทางชีวภาพ ได้แก่ การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ เป็นต้น

ต้นป๊อบก้า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ornithogloss plant* Craib เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ *Menispermaceae* เป็นพืชที่มีหัวใต้ดินที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6-8 เซนติเมตร ต้นป๊อบก้าเป็นไม้ที่พบได้ในพื้นที่ป่าดิบชื้นและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า โดยเฉพาะประเทศไทยและมาเลเซีย (Prasat et al., 1982)



รูปที่ 1 ลักษณะ ต้น ป๊อบ และส่วนหัวของป๊อบก้า

ในทางแพทย์แผนโบราณได้ใช้หัวต้นป๊อบก้ามาใช้เป็นยาสมุนไพรเพื่อใช้ในการบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อและฉวยจับปวด (นันทวัน, 2541)

จากสาเหตุดังกล่าว อาจารย์ศิริลักษณ์ กษววรรณสิทธิ์ อาจารย์สาขาพัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จึงได้ทำการศึกษาวิจัย เรื่องการต้านเชื้อราของโรคสายพันธุ์ *Aspergillus* ในพืชวงศ์มะเขือด้วยสารสกัดจากหัวป๊อบก้า โดยได้ดำเนินการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

นำสารสกัดจากส่วนหัวของป๊อบก้ามาทดสอบทั้งให้ห่อปฏิบัติการใช้และโรงเรือน การทดสอบเชื้อให้ห่อปฏิบัติการใช้พบว่า เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบกับเชื้อ *Aspergillus alternatus* มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ได้ดีในความเข้มข้นต่ำ จึงได้ทำการศึกษาต่อโดยนำมาทดสอบกับต้นมะเขือเทศที่เพาะเลี้ยงในโรงเรือนแบบปลอดปลูก ที่มีอาการติดเชื้อรา *Aspergillus alternatus* และทำการเปรียบเทียบกับสารเคมี พบว่าผลการทดลองสามารถยับยั้งเชื้อราได้สามพันธุ์



รูปที่ 2 ลักษณะการเกิดเชื้อราของใบมะเขือ

ดังนั้นสารสกัดของป๊อบก้า จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาทดแทนการใช้สารเคมีที่ใช้ยับยั้งเชื้อรา ซึ่งทำให้เกษตรกรมีต้นทุนการเพาะปลูกลดลง มีความปลอดภัย และยังส่งผลที่ดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค

เรียบเรียงโดย ศิริลักษณ์ กษววรรณสิทธิ์



รูปเกษตรกรที่เข้าในงานประชุมสหพันธ์เกษตรกรย้งอีสานสระแก้ว

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 23389 สัญญาเลขที่ 3/2562

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การต้านเชื้อราก่อโรคสายพันธุ์ Alternaria ในพืชวงศ์มะเขือด้วยสารสกัดจากหัวบัวบก
ป่า

ชื่อหัวหน้าโครงการ ดร.ศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2562

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	117,850	บาท	เมื่อวันที่ 27 ธันวาคม 2561
งวดที่ 2 (40%)	94,280	บาท	เมื่อวันที่ 4 มีนาคม 2562
งวดที่ 3 (10%)	23,570	บาท	เมื่อวันที่ กันยายน 2562

รายจ่าย

รายจ่าย	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1. ค่าตอบแทน	20,000	20,000.00	0
2. ค่าจ้าง	45,000	45,000	0
3. ค่าวัสดุ	83,130.00	83,130.00	0
4. ค่าใช้สอย	64,000.00	64,000.00	0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	23,570.00	23,570.00	0
6.1 ค่าสาธารณูปโภค			
รวม	235,700	235,700	0

นางสาวศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ์

หัวหน้าโครงการผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

- นันทวัน บุญยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. 2541. สมุนไพรพื้นบ้าน. เล่ม 2. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด.
- Angerhofer C.K., Guinaudeau H., Wongpanich V., Pezzuto J.M., Cordell G.A. (1999). Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids. *J. Nat. Prod.*: 62; 59-66.
- Barkai-Golan, R. and Paster N. 2008. *Mycotoxins in Fruits and Vegetables* San Diego, USA: Elsevier. 395 p.
- Banos, B.A.N., Hernandez-Lauzardo, M.G., Velazquez del Valle, M., Hernandez-Lopez, E. Ait
Barka, E. and Bosquez-Molina, C.L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre-and postharvest diseases of horticultural commodities. 25: 108-118.
- Benhamou, N. (1992). Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radices-lycopersici* agent o tomato cown and root rot. *Phytopathology*. 82: 1185-1193.
- Breda, C.A., Gasperini, A.M., Garcia, V.L., Monteiro, K.M., Bataglion, G.A., Eberlin, M.N. & Duarte, M.C.T. (2016). Phytochemical analysis and antifungal activity of extracts from leaves and fruit residues of Brazilian savanna plants aiming its use as save fungicides. *Nat Prod Bloprospect*. 6, 195-204.
- EFSA. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA J*. 2011: 9; 2407-2504.
- Estiarte N., Crespo-Sempere, Marin S., Sanchis V., Ramos A.J. Exploring polyamine metabolism
of *Alternaria alternate* to target new substances to control the fungal infection. *Food Microbiology*. 2017: 65; 193-204.
- Ghaouth, El. A., Arul, J. and Benhamou, N. (1992). Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens. Induction of morphologval and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research*. 96: 769-779.
- Jovanovic, M., Srdic-Rajic, T., Svirces, E., Jasnic, N., Nikolic, B., Bojic, S., Stevic, T., Knezevic-Vukcevic, J. & Mitic-Culafic, D. (2018). Evaluation of anticancer and

- antimicrobial activities of the *Polygonum maritimum* ethanol extract. *Arch Biol Sci.* 70(4), 665-673.
- Liu H., Qiu N., Ding., Yao R. Polyphenol contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbs suitable for medical or food uses. *Food Res. Int.* 2008: 41; 363-370.
- Logrieco A., Moretti A., Solfrizzo M. Alternaria toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World mycotoxin J.* 2009: 2; 129-140.
- Ostry V. Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin J.* 2008: 1; 175-188.
- Pane C., Fratianni F., Parisi M., Nazzaro F. Control of Alternaria post-harvest infections on cherry tomato fruits by wild pepper phenolic-rich extracts. *Crop Protection.* 2016: 84; 81-87.
- Patnibul S., Puangmalai S., Moun-on A., Sriprang S. Screening for antioxidant activity in eighteen local northeastern vegetables using silica gel thin-layer chromatography followed by spraying with DPPH. *NU Science Journal.* 2008: 5(1); 1-6.
- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F. and Macdonald, A.M.C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Anim Feed Sci Technol.* 1999: 78; 21-37.
- Prawat U.M., Wiriyachitra P., Lojanapiwatna V., Nimgirawath S. Alkaloids of *Stephania erecta* Craib. *J. Sci. Soc.* 1982: 8; 65-68.
- Rabea E.A., Badawy, ME-T, Stevens, C.V., Smagghe, G. and Sterbault, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules.* 4: 1457-1465.
- Semwal D.K., Rawat U., Antimicrobial hasubanalactam alkaloid from *Stephania glabra*. *Planta Medica.* 2009a: 75; 378-380.
- Semwal D.K., Rawat U., Gindarudine, a novel morphine alkaloids from *Stephania glabra*. *Chinese Chemical Letters.* 2009b: 20; 823-826.
- Semwal D.K., Badoni R., Semwal R., Kothiyal S.K., Singh G.J.P., Rawat U. J. The genus

- Strphanina (Menispermaceae): Chemical and pharmacological perspectives. Ethnopharmacology. 2010: 132; 369-383.
- Seubwai W., Vaeteewoottacharn K., Hiyoshi M., Suzu S., Puapairoj A., Wongkham C., Okada S., Wongkham S. Cepharanthine exerts antitumor activity on cholangiocarcinoma by inhibiting NF-kB. Cancer Sci. 2010: 101(7); 1590-5.
- Talley S M, Coley P D, Kursar T A. The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. BMC Ecology. 2002; 2:7. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1472-6785/2/7>.
- Timmer L.W., Peever T.L., Solel Z., Akimitsu K., Alternaria disease of citrus-novel pathosystems. Phytopathol. Mediterr. 2003: 42; 99-112.
- Wianowska, D., Garbaczewska, S., Cieniecka-Roslonkiewicz, A., Dawidowicz, A.L. & Jankowska, A. (2016). Comparison of antifungal activity of extracts from different *Juglans regia* cultivars and juglone. *Microbial Pathogenesis*. 100, 263-267.
- Wilson C.L., El Ghaouth, A., Chalutz, E., Droby, S., Stevens, S., Lu, J.Y., Khan, V. and Arul, J. (1994). Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. Plant Disease. 78: 837-844.
- Yan F., Xu S., Chen Y., Zheng X. Effect of rhamnolipids on *Rhodotorula glutinis* biocontrol of *Alternaria alternata* infection in cherry tomato fruit. Postharvest Biol Technol. 2014: 97; 32-35.
- Zaker M. and Mosallanejad. (2010). Antifungal activity of some plant extracts on *Alternaria alternata*, the causal agent of alternaria leaf spot of potato. Pakistan Journal of Biological Sciences. 13(21): 1023-1029.
- Zivkovic S., Stevanovic M., Durovic S., Ristic D. and Stosic S. (2018). Antifungal activity of chitosan against *Alternaria alternata* and *colletotrichum gloeosporioides*. Pestic. Phytomed. (Belgrade). 33(3-4): 197-204.