

การควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum*  
โดยใช้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากขมิ้น และไคโตแซน  
Control of green mold rot of citrus caused by *Penicillium digitatum*,  
with partial purified extract of curcuma and chitosan

สมศิริ แสงโชติ<sup>1</sup> เนตรนภิส เขียวขำ<sup>1</sup> และศศิวิมล ลักษณพิสุทธิ์<sup>1</sup>  
Somsiri Sangchot<sup>1</sup> Netnapis Knewhom<sup>1</sup> and Sasivimol Luxanapisuth<sup>1</sup>

#### Abstract

Crude extracts of curcumin obtained from different extract solvents including hexane, ethanol, methanol and methanol: ethanol: hexane at 1:1:1 (by w/v). They were separated into 13 fractions by column chromatography. The active compounds showed an inhibition zone and brown color of polyacetylene group at  $R_f = 0.89$  when tests with *Cladosporium herbarium* and anisaldehyde respectively. Crude extracts of curcumin from methanol extract applied on citrus fruit showed the reduction of green mold rot. Green mold rot on treated fruits was 8% whereas 30% on untreated fruit. The combination of crude extract from curcumin and chitosan, disease incidence was 26.8% whereas untreated fruit was 32.2% .

**Keywords:** extract of curcuma chitosan green mold

#### บทคัดย่อ

สารสกัดจากขมิ้นที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และ เมทานอล: เอทานอล: เฮกเซน ในอัตราส่วน 1:1:1 (w/v) พบว่า การแยกสารออกฤทธิ์จากขมิ้น โดยวิธีการ Column Chromatography แยก fraction ได้ 13 fraction หลังจากจึงนำมาทำการทดสอบสารออกฤทธิ์ในขมิ้นบนแผ่น TLC แต่ละส่วนโดยใช้เชื้อรา *Cladosporium herbarium* และทดสอบสารออกฤทธิ์โดยการฉีดพ่นด้วย Anisaldehyde เพื่อทดสอบ activity ของแต่ละส่วน พบว่า สารสกัดขมิ้นที่สามารถยับยั้งโดยเกิด clear zone และเกิดสีน้ำตาลของ polyacetylene มีค่า  $R_f = 0.89$  สารสกัดหยาบจากขมิ้นที่ใช้ตัวทำละลาย methanol ให้ผลในการควบคุมโรคเน่าราสีเขียวผลส้มหลังการเก็บเกี่ยวได้ดีกว่าตัวทำละลายอื่นๆ โดยพบว่า สารสกัดหยาบจากขมิ้นผงเมื่อนำมาใช้กับผลส้ม ทำให้การเกิดโรคลดลง โดยที่ผลส้มที่ได้รับสารสกัดหยาบจากขมิ้นเป็นโรค 8% ในขณะที่ผลส้มที่ไม่ได้รับสารสกัดหยาบจากขมิ้นเป็นโรค 30% เมื่อนำสารสกัดหยาบจากขมิ้นผสมกับไคโตแซนเป็นโรค 26.8% ในขณะที่ผลส้มที่ไม่ได้รับสารสกัดหยาบจากขมิ้นผสมกับไคโตแซนเป็นโรค 32.3%

**คำสำคัญ:** สารสกัดจากขมิ้น ไคโตแซน โรคผลเน่าราสีเขียว

#### คำนำ

โรคเน่าราสีเขียวของส้ม มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* ซึ่งเป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวของส้มที่สำคัญโรคหนึ่ง (Ortuño et al., 2006) ในปัจจุบันวิธีที่มีประสิทธิภาพเพื่อควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว คือ การใช้สารเคมีสังเคราะห์ อย่างไรก็ตาม มีสารเคมีออกฤทธิ์เพียงไม่กี่ชนิดที่มีใช้อยู่ตามท้องตลาด (Gullino and Kuijpers, 1994; Ragsdale and Sisler, 1994) ประกอบกับปัญหาสารเคมีตกค้างในผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม และความสามารถในการต้านทานของเชื้อราสาเหตุโรคต่อสารเคมีที่ใช้อยู่ประจำเพิ่มขึ้น จึงมีความต้องการอย่างมากในการหาวิธีการต่างๆ เพื่อเป็นทางเลือกที่ปลอดภัยมาใช้ในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว การใช้สารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยจากพืช ซึ่งมีรายงานการใช้สารสกัดและสารบริสุทธิ์ชนิดใหม่จากพืชเพื่อควบคุมเชื้อโรคและศัตรูพืชโดยที่มีความปลอดภัยมากขึ้น (Wisniewski et al., 2001)

ขมิ้นชัน (turmeric) *Curcuma longa* Linn. ในสกุล Zingiberaceae เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน สารสกัดขมิ้นทั้งในรูปแบบสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว *Colletotrichum capsici* *C.gloeosporioides* *Dothiorella* sp. *Lasiodiplodia theobrom*, *Pestalotiopsis* sp. และ

<sup>1</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร / ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

<sup>1</sup> Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture / Postharvest Technology Innovation Center, Kasetsart University, Bangkok 10900

*Pythium aphanidermatum* ด้วยวิธี Poisoned Food Technique (สุภัทรา และคณะ 2547) นอกจากนี้ยังมีส้มออกสีส้มอ่อนก็จะช่วยทำให้สีของผลส้มสวยขึ้น แต่ขมมันยังมีกลิ่นเล็กน้อยเมื่อใช้กับผลส้ม โดยที่ในผิวส้มมีน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด ซึ่งมีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืชได้ดี (Ortuño *et al.*, 2006; Stange *et al.*, 2002.) เพื่อให้การใช้สารสกัดจากขมมันและสารระเหยจากผลส้ม สามารถใช้ควบคู่กันได้อย่างเหมาะสม การนำเอาสารทั้งสองมาใช้ร่วมกับไคโตแซน โดยใช้ในลักษณะเคลือบผลส้มก็เป็นสิ่งที่จะช่วยทำให้ผลส้มดูสวยเช่นเดียวกับการใช้ wax ที่สั่งจากต่างประเทศ สารไคโตแซนมีรายงานว่าใช้เคลือบผิวผลไม้ได้ดี และยังมีคุณสมบัติที่กระตุ้นความต้านทานในพืชหลายชนิด (Bhaskara *et al.*, 2000; Bautista-Baños *et al.*, 2003; Chien *et al.*, 2005) ฉะนั้นจากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นการนำเอาสารสกัดจากขมมัน น้ำมันหอมระเหยจากผิวส้มและไคโตแซนมารวม และพัฒนาเป็นสูตรสำหรับเคลือบผิวส้มเพื่อป้องกันการเน่าเสียจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* จึงเป็นสิ่งที่มีความเป็นไปได้สูง และจากการทดสอบในเบื้องต้นก็พบว่าในขมมันมีสาร dehydrotumerone เป็นสารหลักที่ยับยั้งเชื้อรา *Penicillium digitatum* ได้ดี ส่วนสารไคโตแซนนั้นจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารนี้มีลักษณะคล้าย wax เมื่อใช้กับมะม่วง กระตุ้นความต้านทานพืชหลังเก็บเกี่ยวได้เล็กน้อย (ธวัช, 2548) ฉะนั้นการการนำมาใช้เคลือบผลส้มร่วมกับสารกึ่งบริสุทธิ์จากขมมันและน้ำมันหอมระเหยจากผิวส้ม เพื่อทดแทนการนำเข้า wax และสารเคมีจากต่างประเทศและลดอันตรายแก่ผู้บริโภค และยังช่วยให้อุตสาหกรรมที่มีการใช้ไคโตแซนมีแนวทางเพิ่มขึ้นในการนำมาใช้ทางด้านการเกษตร

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### 1. การเตรียมตัวอย่างสกัดจากพืช วิเคราะห์และแยกสารตามความสามารถการละลายของสารสกัด

โดยเตรียมตัวอย่างขมมันลงใน เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และ เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน ในอัตราส่วน 1:1:1 (w/v) เก็บในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้มาแยกสารออกฤทธิ์ที่ละลายน้ำและคลอโรฟอร์ม ออกจากกัน โดยใช้ separating funnel สารสกัดหยابที่ละลายในคลอโรฟอร์มซึ่งเป็น lipophilic phase ระเหยคลอโรฟอร์มออกด้วยเครื่อง evaporator ซึ่งน้ำหนักแห้งสารสกัดหยاب แล้วเก็บรักษาในที่มืด อุณหภูมิ -20 °C

การวิเคราะห์และแยกสารตามความสามารถการละลายของสารสกัด โดยใช้ Column Chromatography (CC) จะได้ fraction ต่างๆ ซึ่งแยกตามความสามารถการละลาย โดยชะสารสกัดผ่านคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล โดยใช้สารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล นำสารสกัดหยابและ fraction ต่างๆ ที่แยกได้ ทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี bioautography เมื่อได้สารออกฤทธิ์ที่ดี จึงนำมาแยกสารออกฤทธิ์ขึ้นด้วยวิธี Thin Layer Column Chromatography (TLC) โดยเตรียมสารสกัดหยاب fraction ต่างๆ หรือ สารออกฤทธิ์ เพื่อวิเคราะห์ทางพิษเคมีด้วยเครื่อง High Performance Liquid Column Chromatography (HPLC)

#### 2. ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากขมมัน

ทำ Bioautography บนแผ่น TLC และศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium herbarium* เพื่อเป็นการทดสอบในเบื้องต้น เพื่อหาส่วนของสารสกัดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราได้ดี โดยนำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากขมมัน แต่ละ fraction มา spot บน TLC plate หลังจากนั้นจึงพ่นเชื้อรา *Cladosporium herbarium* แล้วบ่มไว้ในสภาพชื้น เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบ Clear zone of inhibition และบันทึกค่า  $R_f$

และทดสอบสารออกฤทธิ์โดยการฉีดพ่นด้วย Anisaldehyde เพื่อทดสอบ activity ของแต่ละส่วน โดยนำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากขมมัน แต่ละ fraction มา spot บน TLC plate หลังจากนั้นจึงพ่นสาร Anisaldehyde แล้วนำมาให้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 100-110 °C เป็นเวลา 10 นาที จะปรากฏสีตามกลุ่มของสาร ตรวจสอบกลุ่มสีของสาร จึงบันทึกชนิดและค่า  $R_f$

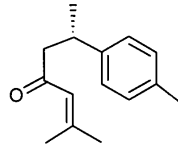
#### 3. การทดสอบการควบคุมโรคบนผลส้มด้วยสารสกัดจากขมมันและไคโตแซน

ศึกษาผลในการยับยั้งการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากขมมันและไคโตแซน โดยนำสารสกัดจากขมมันและไคโตแซน ที่ระดับต่างๆและนำมาทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้ม โดยการทำให้ผลแล้วปลูกเชื้อ *Penicillium digitatum* โดยใช้ spore suspension  $1 \times 10^6$  spore/ml ปริมาณ 10  $\mu$ l ที่ผิวผล หลังจากนั้นใช้สารสกัดที่เจือจางกับตัวทำละลาย คือ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และ เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1 (v/v) หยดในปริมาณ 10  $\mu$ l ที่ผิวผลซึ่งสารสกัดที่เจือจางด้วยไคโตแซนใช้วิธีป้ายเนื่องจากสารสกัดมีความเข้มข้นมากไม่สามารถกำหนดปริมาณที่หยดได้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นระยะเวลา 4-5 วันจึงเก็บผลการทดลอง

## ผลและวิจารณ์

### 1. วิเคราะห์และแยกสารตามความสามารถการละลายของสารสกัด

เมื่อวิเคราะห์และแยกสารตามความสามารถการละลายของสารสกัด โดยวิธีการ Column Chromatography แยก fraction ได้ 13 fraction หลังจากนั้นจึงนำมาทำการทดสอบสารออกฤทธิ์ในขมึ้นบนแผ่น TLC แต่ละส่วนโดยใช้เชื้อรา *Cladosporium herbarium* และทดสอบสารออกฤทธิ์โดยการฉีดพ่นด้วย Anisaldehyde เพื่อทดสอบ activity ของแต่ละส่วนพบว่า สารสกัดหยาบเมื่อนำมาแยกส่วนและศึกษาสารออกฤทธิ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium herbarium* โดยเกิด clear zone และเกิดสีน้ำตาลของ polyacetylene มีค่า  $R_f = 0.89$  และเมื่อนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างพบว่า คือ สาร Curcumin สารนี้เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่มีอยู่ในขมึ้นและมีผลต่อเชื้อของส้มด้วย



ar-Turmerone or  
Dehydroturmerone or  
1,3,5,10-Bisabolatetraen-9-one

Fig.1. Structure of Curcumin

### 2. ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยสารสกัดกิ่งบริสุทธิ์จากขมึ้น

สารสกัดกิ่งบริสุทธิ์จากขมึ้นที่สกัดด้วยเมทานอลให้ผลในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียว ที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium digitatum* ผลส้มหลังการเก็บเกี่ยวได้ดีกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ โดยพบว่า สารสกัดจากขมึ้นเมื่อนำมาใช้กับผลส้ม ทำให้การเกิดโรคลดลง โดยที่ผลส้มที่ได้รับสารสกัดจากขมึ้นเป็นโรค 8% ในขณะที่ผลส้มที่ไม่ได้รับสารสกัดจากขมึ้นเป็นโรค 30% ซึ่งมีรายงานพบว่า สารสกัดขมึ้นทั้งในรูปสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว *Colletotrichum capsici* *C.gloeosporioides* *Dothiorella* sp. *Lasiodiplodia theobrom*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Pythiumaphanidermatum* ด้วยวิธี Poisoned Food Technique (สุภัทรา และคณะ 2547)

### 3. การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคบนผลส้มของสูตรต่างๆ ของสารสกัดกิ่งบริสุทธิ์จากขมึ้นร่วมกับไคโตแซน

เมื่อนำสารสกัดจากขมึ้นผสมกับไคโตแซน แล้วนำมาใช้กับผลส้ม ทำให้การเกิดโรคลดลง โดยมีผลส้มที่ได้รับสารสกัดจากขมึ้น เป็นโรค 26.8% ในขณะที่ผลส้มที่ไม่ได้รับสารสกัดจากขมึ้น เป็นโรค 32.3% สารไคโตแซนเป็นสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นความต้านทานในพืชได้และยังมีคุณสมบัติเป็น wax ตามธรรมชาติ ซึ่งจะช่วยในการเคลือบผลิตผลได้ดี การใช้สารสกัดจากขมึ้นมาใช้ร่วมกับไคโตแซน สารไคโตแซนมีรายงานว่าใช้เคลือบผิวผลไม้ไม่ได้ดี และยังมีคุณสมบัติที่กระตุ้นความต้านทานในพืชหลายชนิด (Bhaskara *et al.*, 2000; Bautista-Baños *et al.*, 2003; Chien *et al.*, 2005)

## สรุป

สารสกัดจากขมึ้นเมื่อผสมกับไคโตแซนให้ผลควบคุมโรคได้ดี การเพิ่มประสิทธิภาพโดยนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้ร่วมด้วยอยู่ในระหว่างดำเนินการ นอกจากนี้ได้ทดสอบการรวมตัวของสารทั้งสาม ในแบบต่างๆ พบว่า การรวมตัวระหว่างสารสกัดจากขมึ้นและไคโตแซน ยังไม่สามารถรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกันได้ดี

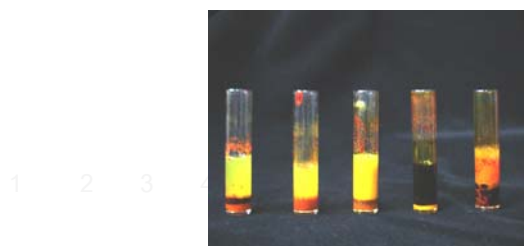


Fig 2. Turmeric mix in water(1), turmeric mix in chitosan (2), turmeric mix in chitosan and tween 20 (3), turmeric mix in mathanol (4) and turmeric mix in methanol , chitosan and tween 20 (5)

### เอกสารอ้างอิง

- ธวัช หะหมาน 2548. ผลของไคโตแซนต่อการชักนำความต้านทานของผลมะม่วงต่อโรคแอนแทรกโนส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุภัทรา จามกระโทก ชัยณรงค์รัตน์กริฑากุล ชลิดา เล็กสมบุญ นวลวรรณ ฟ้างู่งสง กวิศร์วานิชกุล และ อุดม ฟ้างู่งสง 2547. ผลของสารสกัดจากกระชาย ขมิ้นและขิงต่อราสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว. <http://kucon.lib.ku.ac.th/FullText/KC4201065.pdf>.
- Gullino, M.L., Kuijpers, L.A.M., 1994. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 559–579.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E., and Wilson C. L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22(9): 1087-1092.
- Bhaskara Reddy, M.VBelkacemi, K., Corcuff, R., Castaigne, F., and Arul, J. 2000. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 20(1): 39-51.
- Chien, P.J., Sheu, F., and Yang, F.H. 2005. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*, In Press, Corrected Proof, Available online 8 November.
- Ortuño, A., Báidez, A., Gómez, P., Arcas, M.C., Porrás, I., García-Lidón, A., and Del Río, J.A. 2006. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry* 98(2): 351-358.
- Ragsdale, N.N., Sisler, H.D., 1994. Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 545–557.
- Stange, R.R., Midland, S.L., Sims, J.J., and McCollum, T.G. 2002. Differential effects of citrus peel extracts on growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, and *P. Expansum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61(5): 303-311.
- Wisniewski, W., Wilson, C., El Ghaouth, A., and Droby, S. 2001. Non-chemical approaches to postharvest disease control. *Proc. 4<sup>th</sup> Int. Conf. on Postharvest Eds. R. Ben-Arie&S. Philosop-Hadas. Acta Horticulture* 553: 407-412