ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบสาบเสือในการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในขิง
EFFICIENCY OF *EUPATORIUM ODORATUM* L. EXTRACTS TO INHIBIT WILT DISEASE IN GINGER CAUSED BY *RALSTONIA SOLANACEARUM*

สุพัฒนา จันทา[1]
supattana.jan@gmail.com
นฤมล พินเนียม ชนะไพฑูรย์[2]
napin2008@yahoo.co.th
[1]นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนายั่งยืน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
[2]รองศาสตราจารย์ ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนายั่งยืน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบสาบเสือ 3 ช่วงอายุ คือ ใบสาบเสือแก่ ใบสาบเสืออ่อน และใบสาบเสือผสม โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำกลั่น และเอทานอล 95% ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวในขิง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอน แล้วนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวน (ANOVA) ตามวิธีการทดลองแบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS ในขั้นตอนที่ 1 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Inhibition Zone) ด้วยวิธี Paper disc agar diffusion บนอาหาร Tetrazolium chloride พบว่า สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือทั้ง 3 ชุดช่วงอายุที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ แต่สารสกัดจากใบสาบเสือแก่ อ่อน และใบสาบเสือผสมด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 100,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ 4.0, 3.2 และ 3.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) ด้วยวิธี Broth dilution technique พบว่า สารสกัดจากใบสาบเสืออ่อน ใบสาบเสือผสม และใบสาบเสือแก่ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *R. solanacearum.* ได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และขั้นตอนที่ 3 ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Bactericidal Concentration: MBC) ด้วยวิธี Spread plate พบว่า สารสกัดจากใบสาบเสือแก่ และใบสาบเสือผสมที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีประสิทธิภาพฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum.* ได้ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ: สารสกัด, ใบสาบเสือ, *Ralstonia solanacearum*

Abstract

Study on the efficiency of the extract from Bitter bush leaves (Siam weed: *Eupatorium odoratum* L./ *Chromolaena odorata*), a widely distributed weed in Thailand, to

inhibit wilt disease in ginger caused by *R. solanacearum.* Fresh and mature leaves of Bitter bush were set up to three different types of sample in the experiment: mature, fresh and the mixtures of the leaves. Analysis of variance (ANOVA) and comparison of mean difference between treatments were performed using Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) at a 95% confidence level and was conducted using SPSS. The process has separated to three parts which each type of leaf was firstly extracted by distilled water and 95% ethanol for its antimicrobial activity against *R. solanacearum.* The inhibition zone by Paper disc agar diffusion on Tetrazolium chloride revealed that leaf extract by 95% ethanol had better activity than the distilled water which has shown no clear zone. However, the extract of mature, fresh and the mixed leaves by 95% ethanol solvent at a concentration of 100,000 mg/l presented the inhibition zone of bacteria growth at 4.0, 3.2 and 3.0 mm, respectively. The second part was to evaluate the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by Broth dilution technique. It was found that the extraction of fresh, mixture and mature leaves by 95% ethanol were effective in inhibiting *R. solanacearum* with the maximum concentrations at 25 mg/ml. The third part was to determine the Minimal Bactericidal Concentration (MBC) by Spread plate method. It was found that the extract of mature and mixed leaves of Bitter bush by 95% ethanol were effective against *R. solanacearum* at the concentrations of 50 mg/ml.

Keywords: Extraction, Bitter bush leaves, *Ralstonia solanacearum*

บทนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรทางด้านสมุนไพรที่มีความหลากหลาย และยังมีองค์ความรู้ในด้านสมุนไพรและภูมิปัญญาท้องถิ่นที่เป็นรากฐานสำคัญ เช่นการใช้สมุนไพรรักษาบาดแผล การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดได้ จากการรายงานของ ศศิธร และสุพจน์, 2548 ได้ศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร 89 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* พบว่ามี 19 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ได้แก่ สมอพิเภก กระทิง มะขามป้อม ยูคาลิปตัส โกศพุงปลา ฝรั่ง มะม่วง มังคุด ผลมะปริง เมล็ดมะปริง สมอไทย เบญจกานี หญ้าแห้วหมู ทับทิม เงาะ สารภี ชา ทองพันชั่ง และขมิ้นชัน อย่างไรก็ตามการนำสมุนไพรท้องถิ่นมาใช้ในภาคการเกษตรยังมีความยุ่งยากและเสียเวลามาก ทำให้เกษตรกรหันไปใช้สารเคมีในการควบคุมโรคทางด้านพืช ซึ่งอาจก่อให้เกิดพิษต่อสภาพแวดล้อมและต่อผู้บริโภค แลรวมทั้งเป็นข้อจำกัดในการส่งออกผลผลิตไปจำหน่ายในต่างประเทศ

ขิง (*Zingiber officinale* Roscoe.) เป็นพืชประเภทเครื่องเทศที่มีความสำคัญของประเทศไทย ซึ่งอุปสรรคสำคัญในการผลิตคือโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียในดิน แล้วระบาดลุกลามเข้าทำลายพืชอย่างรวดเร็ว สร้างความเสียหายต่อปริมาณและคุณภาพของขิงเป็นอย่างมาก (บูรณี และคณะ, 2525) โดยมีอาการลุกลามจากส่วนล่างของลำต้นไปสู่ส่วนปลายยอด จนแห้งตายทั้งต้น ซึ่งบริเวณโคนต้นและหน่อที่แตกออกมาใหม่จะมีลักษณะฉ่ำน้ำ แล้วเน่าเปื่อยหักหลุดออกมาจากหัวขิงโดยง่าย (ศศิธร, 2525) สาเหตุของโรคเกิดจาก *Ralstonia solanacearum* (*Pseudomonas solanacearum* E.F.Smith) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน เซลล์หัวท้ายมนขนาดเฉลี่ย 0.5-1.0x1.5-4.0 ไมโครเมตร สามารถเคลื่อนที่โดยหางแบบ polar

flagella 1-4 เส้นที่ติดอยู่ที่ขั้วของเซลล์ ลักษณะ virulent colony (wide type) ของเชื้อที่เจริญบนอาหาร Triphenyl tetrazolium chloride (TZC) อายุ 48 ชั่วโมง ไม่ค่อยกลม (irregularly round) สีขาวขุ่น ตรงกลางโคโลนีสีชมพูอ่อน กระจายตัวได้ดีในน้ำ (Kelman, 1954) จากรายงานของ พรทิพย์ และคณะ, 2540 พบว่า สารสกัดดิบจากคูณ ชุมเห็ดเทศ และขมิ้นขัน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas solanacearum* และ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* โดยสารสกัดดิบจากขมิ้นชันยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้ 80-100% และมีค่า ED_{50} ต่ำกว่า 30,000 ppm ซึ่งเทียบเท่าหรือดีกว่า copper oxychloride ส่วนสารสกัดดิบจากชุมเห็ดเทศมีค่า ED_{50} ต่อเชื้อ *E. carotovora*, และ *X. campestris* pv. *vesicatoria* 100,000 ppm และต่อเชื้อ *P. solanacearum* 300,000 ppm

ผู้วิจัยได้ตระหนักถึงการพัฒนาการใช้ใบสาบเสือ ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* อันเป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวในขิง และหากงานวิจัยนี้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ ทั้งผู้วิจัยและผู้เกี่ยวข้องจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันรักษาโรคพืช เพื่อลดความรุนแรงของโรคบางชนิดลง และพัฒนาการใช้สมุนไพรทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อวงการเกษตรกรรมของประเทศต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*
2. ศึกษาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากใบสาบเสือที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum*
3. ศึกษาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากใบสาบเสือที่สามารถสามารถฆ่าทำลายเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum*

ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยนี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดของใบสาบเสือ (*Eupatorium odoratum* L.) ในการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวในขิง ดังนี้

1. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *R. solanacearum* ด้วยวิธี Paper disc agar diffusion
2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ด้วยวิธี Broth dilution technique
3. การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าทำลายแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ด้วยวิธี Spread plate

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยมีการแบ่งกลุ่มการทดลอง วิธีการวิจัย และการเก็บข้อมูลดังนี้

1.1 การเตรียมพืชทดสอบ

เก็บรวบรวมใบสาบเสือ จากต้นลักษณะสมบูรณ์ที่มีความสูงตั้งแต่ 100 เซนติเมตรขึ้นไป แล้วแยกใบสาบเสือ ออกเป็น 2 ส่วน คือ ใบสาบเสืออ่อน (ใบที่ 1-10 นับจากยอดลงมา) ใบสาบเสือแก่ (ใบที่ 11 จนถึงปลายกิ่ง) การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือ 3 ชุดช่วงอายุ คือ แบ่งกลุ่มการทดลองจำนวน 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 ใบสาบเสืออ่อน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ
กลุ่มการทดลองที่ 2 ใบสาบเสือผสม ที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ
กลุ่มการทดลองที่ 3 ใบสาบเสือแก่ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ
กลุ่มการทดลองที่ 4 ใบสาบเสืออ่อน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95%
กลุ่มการทดลองที่ 5 ใบสาบเสือผสม ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอานอล 95%
กลุ่มการทดลองที่ 6 ใบสาบเสือแก่ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95%

1.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากขิงที่เป็นโรค

1. เก็บตัวอย่างของขิงที่เกิดโรคเหี่ยว เพื่อนำแบคทีเรียจากแง่งขิงมา Cross streak บนอาหาร TZC จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

2. เลือกโคโลนีก่อโรค (virulent colony) ที่มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่นเยิ้ม ตรงกลางมีสี ชมพู ใช้ห่วงที่ผ่านการฆ่าเชื้อเขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

3. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

4. วัดค่า Optical Density (O.D.) 0.2 (10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร) เพื่อเตรียมความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย และนำไปทดสอบต่อไป

2. ขั้นตอนการวิจัย

การวิจัยนี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดของใบสาบเสือ (*Eupatorium odoratum* L.) ในการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวในขิง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *R. solanacearum* ด้วยวิธี Paper disc agar diffusion

1. นำไม้พันสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อชุบแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นโดยมีปริมาณเชื้อ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ป้ายเชื้อแบคทีเรียให้ทั่วบนผิวอาหาร TZC ในจานเพาะเลี้ยง ทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหาร ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที เพื่อให้ส่วนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

2. ใช้ปิเปตต์ดูดสารสกัดหยาบ 10 ไมโครลิตร จากสารสกัดของใบสาบเสือที่ละลายในตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด (น้ำกลั่นและเอทานอล 95%) ซึ่งมีความเข้มข้น 10, 100, 1,000, 10,000 และ 100,000 มิลลิกรัมต่อลิตร หยดลงบนกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

3. คีบกระดาษกรองลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีกระดาษกรองที่หยดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอล 95% เป็นตัวเปรียบเทียบ (Positive control) ทำ 5 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ตรวจการเกิดบริเวณยับยั้งโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งหาค่าเฉลี่ยและบันทึกภาพ คัดเลือกสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือทั้ง 3 ชุดช่วงอายุ ที่ให้ผลดีไปทดสอบต่อไป

การทดลองที่ 2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อสารสกัดหยาบ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ด้วยวิธี Broth dilution technique ดังนี้

1. นำหลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิเมตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ และทำให้แห้ง จำนวน 12 หลอด เขียนกำกับหมายเลขไว้ที่หลอด ใช้ปิเปตต์ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ใส่ลงในหลอดที่ 2-12 หลอดละ 1 มิลลิลิตร เจือจางสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดจากน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ใช้ปิเปตต์ดูดสารสกัดลงในหลอดที่ 1 และ 2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมสารในหลอดที่ 2 ให้เข้ากัน ใช้ปิเปตต์ดูดสารในหลอดที่ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 3 ทำซ้ำไปจนถึงหลอด 11

3. เมื่อผสมสารละลายในหลอดที่ 11 ให้เข้ากันแล้วใช้ปิเปตต์ดูดสารละลาย ทิ้งไป 1 มิลลิลิตร หลอดที่ 12 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว ไม่มีสารสกัด จึงใช้เป็น Negative control และหลอดที่ 1 มีสารสกัดเพียงอย่างเดียวเป็น Positive control

4. ใช้ปิเปตต์ดูดเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาณเชื้อ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ลงในทุกหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้อีกครั้ง โดยเปลี่ยนเป็นสารสกัดจากใบสาบเสือด้วยเอทานอล 95%

5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผล จากความขุ่นของหลอดทดลองทั้ง 12 หลอด อ่านปริมาณของสารทดสอบนี้ เป็นค่า MIC บันทึกหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดลองที่ 3 การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าทำลายแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ด้วยวิธี Spread plate

การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียต่อสารสกัดด้วยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Broth dilution technique โดยการนำหลอดที่ทดสอบการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดไป Spread plate บนอาหาร TZC ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดสามารถฆ่าเชื้อที่ศึกษาได้จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีขั้นตอน ดังนี้

1. นำหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำสุด รวมทั้งหลอดที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียทุกหลอดจากการทดลองค่า MIC และหลอดที่เป็นชุดควบคุมในการทดลองที่ 2

2. ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดหยดบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ TZC และ Spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

3. อ่านผล โดยสังเกตจานเพาะเลี้ยงเชื้อจะไม่พบการเจริญของเชื้อ บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุด บันทึกหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวน (ANOVA) หาค่า F-test ตามวิธีการทดลองแบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลอง (Treatment) โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistical Package for the Social Science for Window (SPSS)

ผลการวิจัย

จากการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูลสรุปการวิเคราะห์ข้อมูลสรุปผลการวิจัยได้ ดังนี้

1. ผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดจากใบสาบเสือ

การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* จากสารสกัดจากใบสาบเสืออ่อน ใบสาบเสือผสม และใบสาบเสือแก่ ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอล 95% ด้วยวิธี paper disc agar diffusion ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 100,0000, 10,000, 1,000, 100 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *R. solanacearum* ของสารสกัดจากใบสาบเสืออ่อน ใบสาบเสือผสม และใบสาบเสือแก่ โดยใช้ตัวทำละลายด้วยเอทานอล 95% ความเข้มข้นของสารสกัด 100,000 มิลลิกรัม

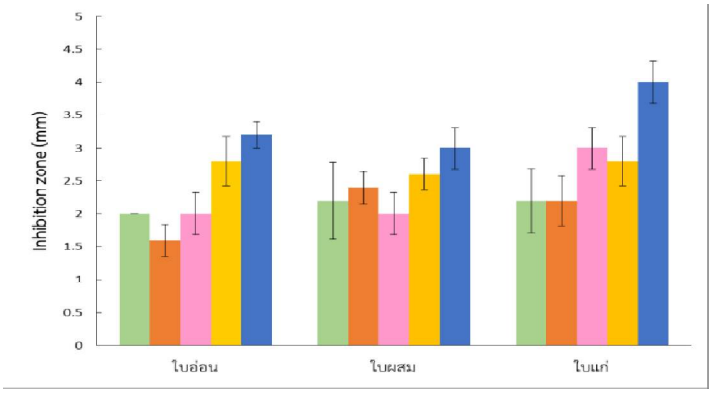
ต่อลิตร สารสกัดจากใบสาบเสือแก่ ใบสาบเสืออ่อน และใบสาบเสือผสม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ 4.0, 3.2 และ 3.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่สารสกัดจากใบสาบเสือทั้ง 3 ชุดช่วงอายุ ที่ใช้น้ำกลั่น เป็นตัวทำละลายไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความชื่อมั่น 95% ดังภาพที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

2. ผลการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC)

ในการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) ของสารสกัดจากใบสาบเสืออ่อน ใบสาบเสือผสม และใบสาบเสือแก่ โดยการศึกษาหาค่า MIC ของสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอล 95% โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.08 และ 0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยวิธี Broth dilution technique พบว่า สารสกัดจากใบสาบเสืออ่อน ใบสาบเสือผสม และใบสาบเสือแก่ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ความเข้มเข้น 100, 50 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการตกตะกอนของสารสกัด และสารละลายด้านบนมีลักษณะใส แสดงว่าเชื้อ *R. solanacearum* ไม่สามารถเจริญได้ เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่น้อยกว่า 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารละลายขุ่นทั้งหลอด แสดงว่าเชื้อ *R. solanacearum* สามารถเจริญได้ ค่าความเข้มข้นต่ำสุด(MIC) ของสารสกัดจากใบสาบเสืออ่อน ใบสาบเสือผสม และใบสาบเสือแก่ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% สามารถยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สารสกัดจากใบสาบเสือทั้ง 3 ชุดช่วงอายุ ที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย พบว่า สารละลายขุ่นทุกหลอด แสดงว่าสารสกัดจากใบสาบเสือที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายทั้ง 3 ชุดช่วงอายุ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ได้

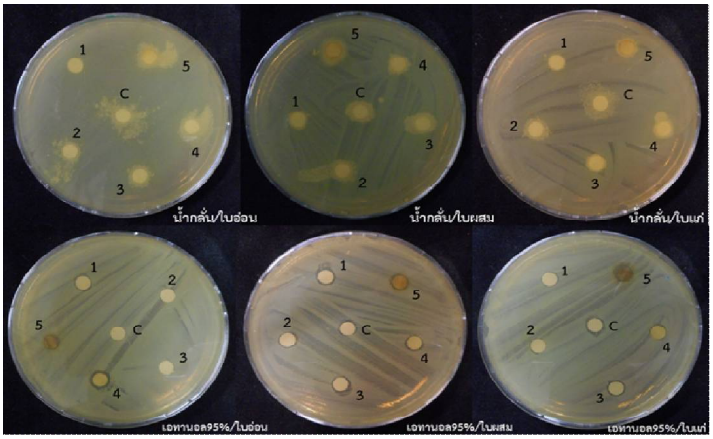
3. ผลการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC)

เมื่อนำผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) ที่ได้ในการทดลองที่ 2 ของสารสกัดจากใบสาบเสืออ่อน ใบสาบเสือผสม และใบสาบเสือแก่ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอล 95% ในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* มาทำการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) พบว่า ค่าMBC ของสารสกัดจากใบสาบเสือ ทั้ง 3 ชุดช่วงอายุ ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น และไม่สามารถฆ่าเชื้อ *R. solanacearum* และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ของสารสกัดจากใบสาบเสืออ่อน ไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ สารสกัดจากใบสาบเสือผสม สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ มีค่าเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากใบสาบเสือแก่ สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 3 ตามลำดับ



ภาพที่ 1 แผนภูมิเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบสาบเสืออ่อน ใบสาบเสือผสม และใบสาบเสือแก่ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum*

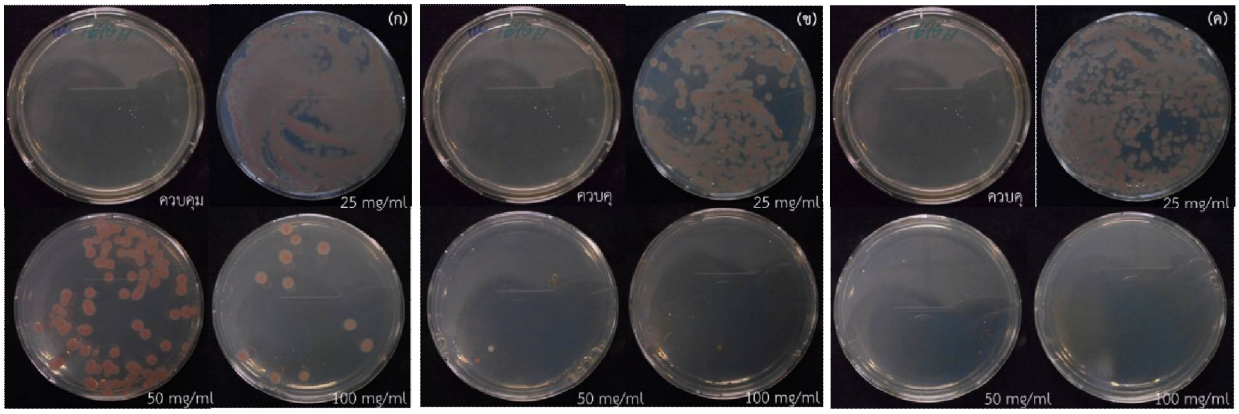
(= 10 ppm = 100 ppm = 1000 ppm = 10000 ppm = 100000 ppm)



ภาพที่ 2 วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *R. solanacearum* ของสารสกัดใบสาบเสืออ่อน ใบสาบเสือผสม และใบสาบเสือแก่ ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอล 95% (C = น้ำกลั่น หรือ เอทานอล 95%

1 = 10 mg/ml 2 = 100 mg/ml 3 = 1,000 mg/ml 4 = 10,000 mg/ml

5 = 100,000 mg/ml)



ภาพที่ 3 แสดงค่า MBC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum*
(ก) สารสกัดใบสาบเสืออ่อน ที่สกัดด้วยเอทานอล 95%
(ข) สารสกัดใบสาบเสือผสม ที่สกัดด้วยเอทานอล 95%
(ค) สารสกัดใบสาบเสือแก่ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95%

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบสาบเสือในการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวในขิง จากใบสาบเสือ 3 ชุดช่วงอายุ คือ ใบสาบเสืออ่อน ใบสาบเสือแก่ และใบสาบเสือผสม ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำกลั่นและเอทานอล 95% โดยสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำกลั่น มีลักษณะสีเขียวเข้ม และเป็นตัวทำละลายที่หาได้ง่ายและราคาถูก เหมาะสำหรับการสกัดสารที่มีขั้วที่สามารถละลายน้ำได้ แต่มีข้อจำกัดสำหรับสมุนไพรบางชนิดที่มีองค์ประกอบเป็นคอมเพล็กซ์โพลีแซคคาไรด์ (Complex polysaccharide) ทำให้สารสกัดที่ได้มีลักษณะข้นเหนียวยากต่อการแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัด ตัวทำละลายเอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายออกจากสารสกัดได้ง่าย และลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในสารสกัด สามารถเก็บสารสกัดได้นานขึ้น แต่มีราคาแพง และมีความเป็นพิษสูงกว่าการใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

สารสกัดจากใบสาบเสืออ่อน ใบสาบเสือผสม และใบสาบเสือแก่ ที่ได้จากสารสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด จะมีลักษณะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับส่วนที่นำมาทำสารสกัด โดยสารสกัดจากใบจะมีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ โดยเฉพาะสารสกัดที่ใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย ซึ่งสามารถละลายสารสี (pigment) ออกมาได้มากกว่าตัวทำละลายน้ำกลั่น ดังนั้น ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดจากตัวทำละลายเอทานอล 95% จึงมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากสาบเสือที่สกัดจากน้ำกลั่น สอดคล้องกับรายงานของ จันทนา และคณะ, 2548 พบว่า สารสกัดเหง้าหน่อกะลาที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำ ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม (1 mg/disc) ทำให้เกิดวงใสขนาด 11-16 มิลลิเมตรต่อเชื้อ *S. aureus* และ *S. Typhimutium* และค่าความเข้มข้นต่ำสุดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิด คือ 2.64 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ การสกัดสารจากใบกระเบากลักด้วยเอทานอลยังออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืช *Xanthomonas campestris* และ *Fusarium axyporum* (นภัสวรรณ์ และจันทร์เพ็ญ, 2550) แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการเจริญของเชื้อได้ดี

เชื้อ *R. solanacearum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีโครงสร้างของผนังเซลล์ซับซ้อนกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (นงลักษณ์ และปรีชา, 2541) โดยแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มเซลล์สองชั้นและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีโครงสร้างที่ไม่สมมาตร เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในเป็นสารฟอสโฟไลปิด (phospholipids) ในขณะที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วยสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) โครงสร้างดังกล่าวทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีประโยชน์ในการช่วยปกป้องเซลล์ จึงต้องใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงในการยับยั้งแบคทีเรีย

ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้สามารถนำไปพัฒนาเพื่อศึกษาการปลูกพืช และควบคุมการป้องกันและกำจัดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากสารสกัดจากใบสาบเสือ เป็นการใช้สารสกัดจากสมุนไพรแทนการใช้สารเคมี เพื่อลดการตกค้างของสารเคมีต่อสิ่งแวดล้อม

2. การวิจัยพบว่า สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียบางชนิด ดังนั้นจึงสามารถนำมาศึกษาต่อในเรื่ององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้

เอกสารอ้างอิง

จันทนา กาญจน์กมล, รินรดา พรมศิริ และรัชนก เชื้อเดชะ. (2548). การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากหน่อกะลา. สืบค้นเมื่อ สิงหาคม 12, 2561, จาก http://www.scisoc.or.th/stt/31/sec_b/paper/stt31.pdf.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2541). การแยกเชื้อบริสุทธิ์และลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภัสวรรณ์ หัตถกิจพาณิชกุล และจันทร์เพ็ญ ตั้งจิตรเจริญกุล. (2550). การสกัดสารจากใบกระเบาเพื่อยับยั้งการเจริญขอเชื้อโรคพืช *Xanthomonas campestris* และ *Fusarium oxysporum.* สืบค้น เมื่อ สิงหาคม 12, 2561, จาก http://www.scisoc.or.th/stt/32/sec_o/paper/stt3.pdf

บูรณี พั่ววงษ์แพทย์, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, ทิพวรรณ กันหาญาติ, รุ่งนภา ทองเครั่ง, ลัดดาวัลย์ อินทร์สังข์ และจิตอาภา ชมเชย. (2556). การจัดการโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* แบบผสมผสาน. ในรายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556, สำนักงานวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว, ศุภลักษณ์ ฮอกะวัต และวรรณทนา สินสิริ. (2540). การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบางชนิด. แก่นเกษตร. 25(1), 25-29.

ศศิธร จันทรโอทาน. (2525). การศึกษาโรคเหี่ยวหรือแง่งเน่าของขิงที่เกิดจากบักเตรี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. (2546). การจัดการดินโดยใช้น้ำสกัดหยาบและกากของพืชเพื่อลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดเขียวปลี. วิทยาสารกำแพงแสน. (1), 10-18.

สุพจน์ ศุภนันธร. (2548). การสกัดและการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Kelman, A. (1954). The Bacteria Wilt caused by *Pseudomonas solanacearum.* N. Carolina Agricultural Experiment Station. Technical Bul. 99: 5-1954.