Agricultural Sci. J. 42 : 3 (Suppl.) : 196-199 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 3 (พิเศษ) : 196-199 (2554)

# ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของฟิล์มบริโภคได้จากผงบุกผสมสารสกัดจากสมุนไพรไทย

# Antifungal (*Colletotrichum gloeosporioides*) performance of edible film from Konjac powder added with Thai herb extracts

**จุพาพันธุ์ รัตนนิล[1] ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล[1] และ รชา เทพษร[2]**

Jupapan Rattananin[1] , Chaleeda Borompichaichartkul[1] and Racha Tepsorn[2]

## Abstract

*Colletotrichum gloeosporioides* is the cause of anthracnose disease on mango CV. Nam Dok Mai during storage after harvesting. This research was aimed to study the effect of using herbal crude extracts (*Boesenbergia pandurata*, *Alpinia galanga* and *Zingiber officinal*) on prevention of anthracnose disease. The extracts from zingiberaceous plants using ethanolic and water extraction could inhibit growth of *C. gloeosporioides*, especially the ethanolic extracts of *B. pandurata* and *A. galanga* which had the most antifungal activity against *C. gloeosporioides*. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) values of plant extracts were at 2,500 µg/ml. *B. pandurata* and *A. galanga* extracts were then added into Konjac solution to form edible film at concentration range of 2,500 - 30,000 µg/ml. After that antifungal activity of the film solution and film were tested. It was found that for Konjac film solution required minimum amount of *A. galanga* and *B. pandurata* extracts of 10,000 µg/ml to inhibit *C. gloeosporioides*. However, for Konjac film, the minimum concentration of *B. pandurata* and *A. galanga* extracts to inhibit *C. gloeosporioides* were 10,000 and 20,000 µg/ml, respectively.

**Keywords**: antimicrobial edible film, Konjac film, Thai herb extract

## บทคัดย่อ

เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสที่มักพบบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ระหว่างการเก็บรักษาหลังจากการเก็บเกี่ยว งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยวงศ์ขิง 3 ชนิด คือ กระชาย ข่า และ ขิง สกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอล และน้ำกลั่น เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรทุกชนิดในทุกตัวทำละลาย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่นำมาทดสอบ โดยสารสกัดจากกระชายและข่าที่สกัดด้วยเอทานอล มีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อ (MFC) ที่ดีที่สุดต่อเชื้อราดังกล่าวเท่ากัน (MIC = 2,500 µg/ml และ MFC = 2,500 µg/ml) เมื่อนำสารสกัดจากสมุนไพรที่เลือก (กระชาย และ ข่า ที่สกัดด้วยเอทานอล) มาผสมในฟิล์มบุกที่ระดับความเข้มข้น 2,500 - 30,000 µg/ml และศึกษาผลการต้านเชื้อราของสารละลายบุกและแผ่นฟิล์มบุก โดยพิจารณาจากการเกิดบริเวณยับยั้ง (clear zone) พบว่าสารละลายบุกที่ผสมสารสกัดจากกระชาย และ ข่า ความเข้มข้น 10,000 µg/ml เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เกิดบริเวณยับยั้ง ส่วนการยับยั้งของแผ่นฟิล์ม พบว่าฟิล์มบุกผสมสารสกัดจากข่าที่ความเข้มข้น 10,000 µg/ml เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ในขณะที่ฟิล์มบุกผสมสารสกัดจากกระชายความเข้มข้น 20,000 µg/ml เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้

**คำสำคัญ**: ฟิล์มบริโภคได้ต้านจุลินทรีย์ ฟิล์มบุก สารสกัดจากสมุนไพรไทย

[1] สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

[1] Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok, 10330

[2] สาขาเทคโนโลยีการอาหาร คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จ.สกลนคร อ.เมือง จ.สกลนคร 47000

[2] Department of Food Technology, Faculty of Natural Resources and Agro-Industry, Kasetsart University, Chalermphrakiat Sakon Nakhon Province Campus, Maung District, Sakonnakhon, 47000

## คำนำ

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่มีผู้นิยมบริโภค นอกเหนือจากการผลิตเพื่อบริโภคในประเทศแล้ว มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ยังส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ ซึ่งมีมูลค่าการส่งออกที่สูงมาก แต่ปัญหาที่สำคัญภายหลังการเก็บเกี่ยวคือการเน่าเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ โดยสาเหตุหลักมาจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส จึงมักใช้สารเคมีบางชนิดจุ่มผลก่อนการบรรจุลงภาชนะ ซึ่งสารเคมีสามารถแทรกซึมเข้าไปในผลิตผลได้ ทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและผู้ปฏิบัติงาน อีกทั้งประเทศผู้สั่งซื้อมะม่วงจากประเทศไทยได้ตั้งข้อจำกัดปริมาณการใช้สารในการควบคุมโรคกับผลผลิต และงดการนำเข้ามะม่วงเมื่อพบว่ามีการใช้สารเคมี มีรายงานว่าสารสกัดจากพืชวงศ์ขิงหลายชนิดสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ (สุภัทรา และคณะ, 2549) การนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการใช้เพื่อควบคุมโรคพืช อีกทั้งเมื่อมีการนำมาใช้ผสมร่วมกับฟิล์มบริโภคได้จากบุก ซึ่งบุกมีองค์ประกอบของกลูโคแมนแนนซึ่งเป็นสารโพลีเซคคาไรด์ สามารถนำมาผลิตเป็นฟิล์มบริโภคได้ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของผลมะม่วงให้ได้นานขึ้น ซึ่งผลงานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์จากหัวบุกและประยุกต์ใช้ฟิล์มบริโภคได้จากบุกต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย 3 ชนิด ได้แก่ กระชาย ข่า และ ขิง สกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอล และน้ำกลั่น โดยนำสมุนไพรแห้งบดละเอียดแช่ด้วยตัวทำละลาย ในปริมาตร 1:5 (w/v) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองแยกกาก ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วนำมาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ความเข้มข้น 6 Log CFU/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อรา (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อรา (Minimum Fungicidal Concentration; MFC) ของสารสกัดจากสมุนไพร ด้วยวิธี Micro dilution method

เตรียมสารละลายบุกความเข้มข้น 1.0% w/v กวน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เติม KOH 0.5 M ความเข้มข้น 0.14% v/v กวน 15 นาที เติม glycerol 0.3% w/v กวนต่ออีก 20 นาที แล้วเติมสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เติม tween 80 1% v/v ประเมินความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของสารละลายบุกและแผ่นฟิล์มบุก ที่ผสมสารสกัดจากสมุนไพรด้วยวิธี disc diffusion method โดยใช้แผ่น sterile paper disc ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร จุ่มลงในสารละลายบุกที่ผสมและไม่ผสมสารสกัดจากสมุนไพร แล้ววางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีการเกลี่ยสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 6 Log CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นำสารละลายบุกที่ผสมสารสกัดจากสมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ อีกส่วนหนึ่งมาเทลงบนถาดอะลูมิเนียมเพื่อขึ้นรูปฟิล์ม อบแห้งฟิล์มด้วยตู้อบลมร้อน 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จนฟิล์มแห้งและสามารถลอกเป็นแผ่นได้ ตัดแผ่นฟิล์มเป็นวงกลมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร แล้ววางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีการเกลี่ยเชื้อไว้แล้ว บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา สามารถวัดจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง ตัวอย่างควบคุมคือตัวอย่างสารละลายบุกและฟิล์มบุกที่ไม่ใส่สารสกัดจากสมุนไพร

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี Micro dilution method พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรทุกชนิดในทุกตัวทำละลาย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่นำมาทดสอบ โดยสารสกัดจากกระชายและข่าที่สกัดด้วยเอทานอล มีค่า MIC และ MFC ที่น้อยที่สุดเท่ากัน (MIC = 2,500 µg/ml และ MFC = 2,500 µg/ml) แสดงว่าสารสกัดจากกระชายและข่าที่สกัดด้วยเอทานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราที่นำมาทดสอบได้ดีที่สุดเท่ากัน (Table 1) สารสกัดจากสมุนไพรทุกชนิดที่สกัดด้วยเอทานอล มีค่า MIC และ MFC ที่น้อยกว่าสารสกัดจากสมุนไพรทุกชนิดที่สกัดด้วยน้ำกลั่น เพราะองค์ประกอบส่วนใหญ่ของสารสกัดสามารถละลายได้ในเอทานอลได้ดีกว่าน้ำกลั่น เนื่องจากสารเหล่านั้นเป็นกลุ่ม lipophilic compounds จึงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี โดยอาศัยความไม่มีขั้วหรือความสามารถในการละลายได้ในไขมัน สามารถผ่านผนังเซลล์ เข้าไปใน mitochondria และรบกวนส่วนประกอบภายในของ mitochondria เกิดการปลดปล่อยองค์ประกอบต่างๆ ในเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Burt, 2004)

**Table 1** Antimicrobial activity of plant extracts against *C. gloeosporioides*

| Plant extracts | Solvents | MIC (µg/ml) | MFC (µg/ml) |
|---|---|---|---|
| Ginger | Distilled water | 80,000 | 160,000 |
| | Ethanol | 20,000 | 40,000 |
| Galangal | Distilled water | 80,000 | 160,000 |
| | Ethanol | 2,500 | 2,500 |
| Kra-chai | Distilled water | 80,000 | 80,000 |
| | Ethanol | 2,500 | 2,500 |

ผลการประเมินความสามารถในการต้านเชื้อราของสารละลายบุกและแผ่นฟิล์มบุก ที่ผสมสารสกัดจากกระชายและข่า ที่สกัดด้วยเอทานอล (เมื่อพิจารณาเลือกจากค่า MIC และ MFC ที่น้อยที่สุด) โดยแปรระดับความเข้มข้น 2,500 - 30,000 µg/ml พบว่าสารละลายบุกที่ผสมสารสกัดจากข่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าสารละลายบุกที่ผสมสารสกัดจากกระชายในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบเมื่อพิจารณาจากความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง โดยสารละลายบุกที่ผสมสารสกัดจากกระชายและข่าเริ่มเกิดบริเวณยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 10,000 µg/ml ขึ้นไป (Table 2) แสดงว่าสารสกัดจากกระชายและ ข่าความเข้มข้น 10,000 µg/ml เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เมื่อผสมลงในสารละลายบุกแล้วสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราดังกล่าวได้

**Table 2** Antimicrobial activity of Konjac film solution added with plant extracts against *C. gloeosporioides*

| Plant extracts in ethanol | Concentration (µg/ml) | Inhibition zone diameter (cm) |
|---|---|---|
| Galangal | 2,500 | 0 |
| | 10,000 | 1.203±0.151[b] |
| | 20,000 | 1.451±0.104[c] |
| | 30,000 | 1.884±0.200[d] |
| Kra-chai | 2,500 | 0 |
| | 10,000 | 1.042±0.070[a] |
| | 20,000 | 1.177±0.069[b] |
| | 30,000 | 1.372±0.192[c] |
| Control solution | 0 | 0 |

Averages in the same column followed by different letters are significantly at $p \leq 0.05$ according to Duncan's New Multiple Range Test

จาก Table 3 ผลการต้านเชื้อราของแผ่นฟิล์มบุก พบว่าฟิล์มบุกที่ผสมสารสกัดจากข่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าฟิล์มบุกที่ผสมสารสกัดจากกระชายในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยฟิล์มบุกที่ผสมสารสกัดจากกระชายความเข้มข้น 20,000 µg/ml เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ในขณะที่ฟิล์มบุกผสมสารสกัดจากข่าที่ความเข้มข้น 10,000 µg/ml เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ และเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารสกัดข่าเป็น 30,000 µg/ml จะเกิดบริเวณยับยั้งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.757 เซนติเมตร ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในระดับมาก (Ponce *et al*., 2003) รายงานว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่มีขนาดน้อยกว่า 0.8 เซนติเมตร ถือว่าไม่ยับยั้ง (-) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.9 – 1.4 เซนติเมตร ถือว่ายับยั้งได้ (+) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 – 1.9 เซนติเมตร ถือว่ายับยั้งได้มาก (++) และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่กว้างกว่า 2.0 เซนติเมตร ถือว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้สูงที่สุด (+++) โดยส่วนประกอบหลักของสารสกัดจากข่าประกอบด้วย 1,8-cineole (20.95%), b-bisabolene (13.16%), b-caryophyllene (17.95%) และ b-selinene (10.56%) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม terpenes (Mayachiew and Devahastin, 2008) โดยมีกลไกการออกฤทธิ์เกี่ยวข้องในการรบกวน cytoplasmic membrane และทำให้เกิดการรวมตัวจับกันเป็นก้อนขององค์ประกอบในเซลล์ของจุลินทรีย์ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ได้ (Oonmetta-aree *et al*., 2006)

**Table 3** Antimicrobial activity of Konjac film added with plant extracts against *C. gloeosporioides*

| Plant extracts in ethanol | Concentration (µg/ml) | Inhibition zone diameter (cm) |
|---|---|---|
| Galangal | 2,500 | 0 |
| | 10,000 | 1.038±0.096[b] |
| | 20,000 | 1.325±0.090[c] |
| | 30,000 | 1.757±0.134[d] |
| Kra-chai | 2,500 | 0 |
| | 10,000 | 0 |
| | 20,000 | 0.848±0.076[a] |
| | 30,000 | 1.048±0.109[b] |
| Control film | 0 | 0 |

Averages in the same column followed by different letters are significantly at $p \leq 0.05$ according to Duncan's New Multiple Range Test

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของฟิล์มบุกกับสารละลายบุกที่ผสมสารสกัดสมุนไพร พบว่าสารละลายบุกที่ผสมสารสกัดสมุนไพรมีประสิทธิภาพการยับยั้งที่สูงกว่าฟิล์มบุกที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเดียวกัน เนื่องจากสารสกัดสมุนไพรที่ผสมลงในสารละลายบุกสามารถเคลื่อนที่ออกมาได้ง่ายกว่าเมื่ออยู่ในฟิล์มบุก เพราะสารละลายบุกมีสถานะเป็นของเหลวแต่ฟิล์มบุกมีสถานะเป็นของแข็ง ดังนั้นประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในรูปสารละลายจึงมีมากกว่าที่อยู่ในรูปฟิล์มที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเดียวกัน

## สรุปผลการทดลอง

สารสกัดจากกระชายและข่าที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด ผลการยับยั้งเชื้อราของสารละลายบุกที่ผสมสารสกัดจากกระชายและข่า ความเข้มข้น 10,000 µg/ml เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เกิดบริเวณยับยั้ง ส่วนการยับยั้งของฟิล์มบุกที่ผสมสารสกัดจากข่าที่ความเข้มข้น 10,000 µg/ml เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ในขณะที่ฟิล์มบุกผสมสารสกัดจากกระชายความเข้มข้น 20,000 µg/ml เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้

## คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว) สำหรับทุนที่ใช้ในการวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

สุภัทรา จามกระโทก ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล ชลิดา เล็กสมบูรณ์ นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง และอุดม ฟ้ารุ่งสาง. 2549. ผลของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรวงศ์ขิงในการต่อต้านราสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 37(2): 98-101.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223-253.

Mayachiew, P. and S. Devahastin. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 40: 1153–1159.

Oonmetta-aree, J., T. Suzuki, P. Gasaluck and G. Eumkeb. 2006. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galangal* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 39: 1214–1220.

Ponce, A., R. Fritz, C. Del Valle and S. Roura. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissencharft und- Technologie 36: 679-684.