ผลยับยั้งของสารสกัดจากผลดีปลีต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วง

Inhibitory Effect of Java Long Pepper Fruit Extracts on *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Anthracnose Disease of Mango Fruit

วนัสนันท์ สะอาดล้วน[1/] และ พิทยา สรวมศิริ[1/]

Wanassanan Sa-ardluan[1/] and Pittaya Sruamsiri[1/]

Abstract: Fruits of Java long pepper (*Piper retrofractum* Vahl.) were extracted with 95% ethanol. The percentage yield is 12.1%DW. In order to confirm the active ingredients, the crude extract was separated by TLC (Thin layer chromatography) in many proportions of mobile phase system; hexane:ethyl acetate:methanol, then determined with TLC- bioassay method using *Cladosporium cladosporioides* as an indicator. Two clear zones of fungal inhibition were found at R_f 0.12-0.36 and 0.51-0.72. To examine and purify the active compound, the crude extract were fractioned based on R_f-value by CC (Column chromatography). Obtained liquid were mixed together called "dp" and analyzed by GC-MS to identify the chemical structure, chemical component and amount of the substances. It was found that piperine was the major component in crude extract with the amount of 39.17%. Efficiency of "dp" to inhibit growth of *Colletotrichum gloeosporioides* was tested by comparing 5 concentrations of 0, 250, 500, 1000 and 2000 ppm and compare to 500 ppm of benomyl. The result revealed that dp at the concentration 500 ppm and higher concentrations could completely (100%) inhibit the growth of fungus as same as benomyl 500 ppm, where as dp at the concentration of 250 ppm showed 89.91% inhibition.

Keywords: *Piper retrofractum* Vahl., *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose

[1/] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1/] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

บทคัดย่อ: ทำการศึกษาโดยสกัดสารออกฤทธิ์จากผลดีปลีแห้ง Java long pepper (*Piper retrofractum* Vahl.) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทธานอล 95% ได้ปริมาณสารสกัดหยาบเท่ากับ 12.1% หลังจากนั้นทำการแยกสารองค์ประกอบในสารสกัดหยาบด้วย TLC (Thin layer chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ คือ hexane : ethyl acetate : methanol ในอัตราส่วนต่าง ๆ ก่อนตรวจสอบทางชีววิทยา (TLC-bioassay) โดยใช้เชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* พบบริเวณต้านเชื้อรา (clear zone) ที่ชัดเจนที่สุด 2 บริเวณ คือบริเวณที่มีค่าเท่ากับ 0.12-0.36 และ 0.51-0.72 เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส ทำการแยกสารองค์ประกอบบริเวณที่ออกฤทธิ์ดีข้างต้นเพื่อให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธี Column chromatography ได้กลุ่มสารที่เรียกว่า dp ทำการวิเคราะห์สารองค์ประกอบด้วยวิธี GC-MS พบว่าประกอบด้วยสาร piperine เป็นองค์ประกอบหลัก 39.17% และสารอื่น ๆ อีก เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยเปรียบเทียบที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ppm และเปรียบเทียบกับสารเคมี benomyl เข้มข้น 500 ppm พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ 100 % เท่ากับสาร benomyl และที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm สามารถยับยั้งได้ 89.91%

คำสำคัญ: ดีปลี *Colletotrichum gloeosporioides* โรคแอนแทรคโนส

คำนำ

ดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl.) เป็นพืชเครื่องเทศและสมุนไพรชนิดหนึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Piperaceae เช่นเดียวกับพริกไทย (Weiss, 2002) ดีปลีนอกจากจะมีฤทธิ์ทางยารักษาโรคแล้ว ยังมีฤทธิ์ป้องกันกำจัดแมลงได้หลายอย่าง เช่น ฆ่าลูกน้ำและตัวเต็มวัยยุงลาย (*Aedes aegypti*) (โสภา, 2537) นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากผลดีปลีด้วยเมทานอลและน้ำสามารถใช้ควบคุมหนอนกระทู้ผัก ด้วงหมัดผัก และเพลี้ยอ่อนในแปลงปลูกคะน้าได้ดี (รัตติยา, 2542) และสารสกัดหยาบจากผลดีปลีด้วยเอทธานอลยังสามารถควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงได้อีกด้วย (กฤษณา, 2546) และในปัจจุบันมีการห้ามใช้สารเคมีทางการเกษตรบางชนิด เนื่องจากปัญหาการตกค้างของสารเคมีในผลผลิตและเป็นอันตรายต่อมนุษย์ ดังนั้นจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะนำสารสกัดดีปลีมาทดสอบในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง ซึ่งเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย อันจะเป็นแนวทางในการนำมาปรับใช้ เพื่อลดการใช้สารเคมีเกษตรในการจัดการโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวในมะม่วงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

นำผลดีปลีแห้งมาบดให้ละเอียด แช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทธานอล 95% นาน 2-3 วัน กรองเอากากออก และนำสารละลายที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกจนหมดโดยใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40°C ได้สารสกัดหยาบ จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทำการแยกสารออกฤทธิ์โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (developing solvent) เป็น hexane ผสมกับ ethyl acetate และ methanol ในอัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อหาอัตราส่วนตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับแยกสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Column chromatography (CC) ต่อไป ทำการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ โดยนำแผ่น TLC ที่ได้มาพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ความเข้มข้น 1 x10^6 สปอร์/มิลลิลิตร บันทึกค่า R_f ของแถบที่ต้านเชื้อรา จากวงใส (clear zone) ที่เห็น เมื่อทราบตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราจากวิธี TLC-bioassay แล้วจึงทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี CC จากนั้นวิเคราะห์หาสารด้วยเครื่อง Gas chromatograph-Mass spectrometer (GC-MS) โดย

1. GC 6890 Agilent Technologies

Inlet : 250 °C split ratio 250 : 1

Oven : 70 °C(1 min) – 8°C/min-->230°C(2min) -10 °C/min-->250 °C(25 min)

Carrier : Helium 1.0 ml / min

Column : Alltech AT-1MS 30 m x 0.25 mm ID ฟิล์มหนา 0.25 μm

2. MSD 5973(EI) Hewlett Packard

MS Quardrupole : 150 °C

MS Source : 230 °C

ตรวจสอบการออกฤทธิ์ควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี Poison food technique โดยเตรียมสารสกัดที่ได้จาก CC ให้มีความเข้มข้น 0, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ppm และเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารเคมีเกษตรปกติโดยใช้ benomyl ในอัตราแนะนำคือ 500 ppm ผสมในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

ผลการทดลอง

จากการแช่ผลดีปลีแห้งบดละเอียดในตัวทำละลายเอทธานอลแล้วกรองเอากากออก เมื่อระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนจนหมด จะได้สารสกัดหยาบจากดีปลีที่มีสีแดงคล้ำ ใสและข้นหนืด มีกลิ่นเผ็ดร้อนของดีปลี เมื่อสัมผัสผิวอ่อน ๆ จะรู้สึกแสบร้อน มีปริมาณเท่ากับ 12.1 % ของน้ำหนักดีปลีแห้งที่ใช้ในการสกัด

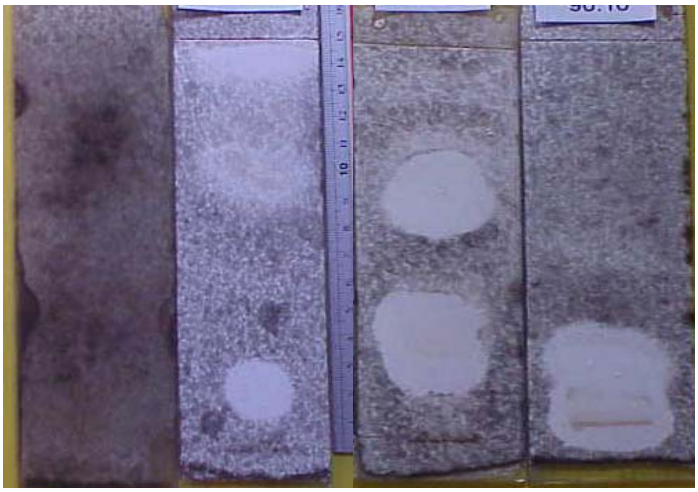
จากการแยกสารสกัดด้วยวิธี TLC โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ เป็นระบบผสมที่ประกอบด้วย hexane ผสมกับ ethyl acetate และ methanol ในอัตราส่วน 60:40:1, 70:30:0, 70:30:1, 75:23:2, 85:15:0, 85:15:1 และ 90:10:0 และทำการตรวจสอบโดยวิธี TLC-bioassay ด้วยเชื้อรา *C. cladosporioides* พบว่าทุกอัตราส่วนของ hexane : ethyl acetate : methanol ที่ทดสอบ สามารถแยกสารองค์ประกอบที่แสดงความสามารถยับยั้งหรือต้านทานการเจริญ (inhibited zone) ของเชื้อรา *C. cladosporioides* นั่นคือพบบริเวณแถบที่ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ให้เห็นเป็นวงสีใส (clear zone) (ภาพที่ 1) และมีค่า R_f ของวงสีใสที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ซึ่งอัตราส่วนที่ดีที่สุดที่มองเห็นวงใสกว้างที่สุด และแยกออกจากกันได้ชัดเจนคืออัตราส่วน 75:23:2 จากนั้นนำอัตราส่วนนี้ไปใช้ เป็นตัวชะ (eluting solvent) ในการแยกสารด้วยวิธี CC โดยได้สารทั้งหมด 12 fraction นำแต่ละ fraction มาทดสอบยืนยันสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี TLC- bioassay อีกครั้ง และรวบรวม fraction ที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อราและมีค่า R_f ที่อยู่ในช่วงเดียวกัน แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออก เรียกสารนี้ว่า dp มีลักษณะเป็นของเหลวคล้ายน้ำมัน สีแดงคล้ำ

จากนั้นนำสาร dp ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ ด้วยวิธี GC-MS พบว่าสารที่ได้มีองค์ประกอบของสารหลายชนิดปนกัน ซึ่งสาร ที่เวลา (retention time) เท่ากับ 32.91 วินาที มีปริมาณมากที่สุดคิดเป็น 39.17% และจาก Library search ของเครื่อง GC-MS พบว่าสารที่มีปริมาณมากที่สุดนี้คือ piperine (1-[5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4-pentadienyl]) นอกจากนี้ในสาร dp ยังประกอบด้วยสารองค์ประกอบอื่น ๆ อีกหลายชนิดโดยมีเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

เมื่อนำสาร dp มาทดสอบประสิทธิภาพต่อการเจริญของเส้นใย *C. gloeosporioides* โดยวิธี Poison food technique บนอาหาร PDA พบว่าสาร dp ให้ผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 100 % ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ขึ้นไปเช่นเดียวกับสารเคมี benomyl ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm ยับยั้ง ได้ 89.91 % (ตารางที่ 3)

Table 1 The R_f-value of fungal inhibiting zone.

hexane	:	ethyl acetate	:	methanol	band	R_f -value
60		40		1	1	0.06-0.23
					2	0.6-0.7
					3	0.9-1
70		30		0	1	0.04-0.22
					2	0.56-0.75
70		30		1	1	0.04-0.14
					2	0.45-0.56
75		23		2	1	0.12-0.36
					2	0.51-0.72
85		15		0	1	0-0.16
					2	0.33-0.55
85		15		1	1	0-0.16
					2	0.38-0.66
90		10		0	1	0-0.31



control 60:40:1 75:23:2 90:10:0

Figure 1 Chromatogram showed the clear zone on TLC bioassay plate by using *Cladosporium cladosporioides* as indicator with different proportions of hexane : ethyl acetate : methanol mobile phase system.

Table 2 The other constituents in “dp”(crude extract from *Piper retrofractum* Vahl.) by GC-MS analysis.

Compound No.	RT (second)	Name	Quantity (%)
1	9.28	Benzenepropaoic acid	0.38
2	10.51	Ethyl 3-phenylpropionate	0.77
3	12.11	trans-Caryophyllene	0.71
4	13.11	1-Ethyl-2 methyl cyclododecane	1.14
5	13.36	Pentadecane	1.86
6	13.58	Selina-3, 7(11)-diene	0.33
7	15.90	Heptadecane	1.50
8	16.01	8-Heptadecene	1.13
9	18.63	1-Nonaadecene	1.18

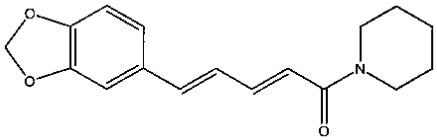


Figure 2 Structure of piperine.

Table 3 Percentage of mycelial growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* on PDA with different concentration of dp.

Concentration (ppm)	Percent inhibition[1/]
control	0 c
250	89.91 b
500	100 a
1000	100 a
2000	100 a
benomyl	100 a

[1/] means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5 % level. ($P \leq 0.05$)

วิจารณ์

จากการทดลอง เมื่อนำสารสกัดหยาบจากดีปลีมาแยกสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี TLC-bioassay พบว่าอัตราส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ดีที่สุด คือ 75:23:2 โดยแสดงแถบสารต้านเชื้อรา เป็นวงใสชัดเจน 2 บริเวณ มีค่า R_f เท่ากับ 0.12-0.36 และ 0.51-0.72 ซึ่งค่า R_f ที่ได้นี้ใกล้เคียงกับค่า R_f จากการทดลองของเนตรนภา (2541) ที่ศึกษาสารต้านเชื้อราจากดีปลีที่สกัดจากไดคลอ-โรมีเทน โดยมีค่าเท่ากับ 0.00-0.33 และ 0.40-0.47 และวิเคราะห์สารสกัดโดยเทคนิคทางสเปคโทรสโคปี พบว่าสารต้านเชื้อราประกอบด้วย piperine และ methyl piperate แต่จากการทดลองครั้งนี้ไม่พบสาร methyl piperate อาจเนื่องมาจากการใช้สารละลายเริ่มต้นที่ใช้ในการสกัดต่างกัน อีกทั้งการแยกสารก็อาจจะแตกต่างกันทำให้ได้สารที่ต่างกัน ซึ่ง piperine เป็นแอลคาลอยด์ที่พบในพืชวงศ์ Piperaceae เช่นในผลและเมล็ดพริกไทยและผลดีปลี มีรสเผ็ดร้อน มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์มากมายเช่น รักษาโรคเกี่ยวกับระบบย่อยอาหารแก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และเป็นยาขับลมเป็นต้น นอกจากนี้พบว่า piperine เป็นสารที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมแร่ธาตุ ที่สำคัญต่อร่างกายด้วยเช่น coenzyme Q_{10} และ beta-carotene ซึ่งปัจจุบันประเทศสหรัฐอเมริกาได้ผลิต piperine เป็นผลิตภัณฑ์ภายใต้เครื่องหมายการค้าคือ Bioperine (Mills, 2005) แต่ทางด้านการเกษตรนั้นมีการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการนำสารสกัดจากพืชที่ประกอบด้วยสาร piperine พบว่ามีฤทธิ์ฆ่าแมลง (วันดี, 2534) ได้แก่ หนอนกระทู้ผัก ด้วงหมัดผัก ลูกน้ำและตัวเต็มวัยยุงลาย (โสภา, 2537, รัตติยา, 2542) และจากการทดลองนำสาร dp จากดีปลีมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ 100 % เช่นเดียวกับการใช้สารเคมี benomyl แสดงให้เห็นว่าสารสกัดดังกล่าวมี ศักยภาพในควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้ดี ซึ่งกระบวนการและกลไกในการออกฤทธิ์ของสารนี้ไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งอาจต้องมีการศึกษาในขั้นต่อไป

สรุป

อัตราส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ดีที่สุดสำหรับแยกสารออกฤทธิ์จากสารสกัดหยาบดีปลีด้วยวิธี TLC-bioassay คือ 75:23:2 โดยแสดงแถบสารต้านเชื้อราเป็นวงใสชัดเจน 2 บริเวณ มีค่า R_f เท่ากับ 0.12-0.36 และ 0.51-0.72 และเมื่อวิเคราะห์หาสารองค์ประกอบในสาร dp พบว่าประกอบด้วยสารหลายชนิดโดยมี piperine เป็นสารองค์ประกอบหลัก และจากการนำสาร dp จากดีปลีมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ 100 % เช่นเดียวกับการใช้สารเคมี benomyl

เอกสารอ้างอิง

กฤษณา วงศ์ปัญญา. 2546. ผลของสารสกัดหยาบจากดีปลีต่อโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 49 หน้า.

เนตรนภา พรหมสวรรค์. 2541. การศึกษาสารต้านเชื้อราจากผลดีปลี. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 41 หน้า.

รัตติยา นวลหล้า. 2542. การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อป้องกันกำจัดแมลงศัตรูในคะน้า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 91 หน้า.

วันดี กฤษณพันธ์. 2534. พฤษเคมีเบื้องต้น. หน้า 25-27. *ใน*: ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. ภาควิชาวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

โสภา หวั่นเส้ง. 2537. โครงสร้างและฤทธิ์ควบคุมแมลงของสารประกอบจากต้น *Aglaia oligophylla* Miq. และการคัดเลือกต้นดีปลี *(Piper retrofractum* Vahl.) กับพริกไทย (*Piper nigrum* L.) เพื่อใช้ควบ

คุมแมลง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 142 หน้า.

Mills, R. 2005. Piperine multiplies the strength of many supplements and drugs. (Online). Available: http://www.delano.com/Articles/piperine-multiplies.html [2005, June 15]

Weiss, E. A.(ed.). 2002. Spice Crop. CABI Publishing, New York. 432 pp.