

ประสิทธิภาพของสารสกัดกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงแต่ละเฉดสี ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* spp.

Efficacy of the Extracts from Different Color Roselle Calyxes on Growth Inhibition of *Aspergillus* spp.

ภาคพร สาทลาลัย¹ อุทัยวรรณ ต้วงเงิน² อรวรรณ ชวนตระภูม¹ มณี ตันติรุ่งกิจ¹
และสุรัตน์วดี จิระจินดา¹

Pakaporn Sathalalai¹ Uthaiwan Doung-ngern² Orawan Chountragoon¹ Manee Tantirungkij¹
and Suratwadee Jiwajinda¹

Abstract: According to breeding program of roselle by Tropical Vegetable Research Center Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, several lines of roselle were obtained. Those lines have different shades of calyx color that are ranging from dark red, red, pink and white. Therefore, the effect of various concentrations of calyx extract on the growth inhibition of *Aspergillus flavus* and *A. niger* was studied. At concentration of 40 mg/mL, all extracts completely inhibited the growth of *A. flavus* and the inhibition rate was declined upon the decreasing of concentration of the extracts. Moreover, the inhibitory effect of white line extracts at all concentrations was higher than that of pink, red and dark red lines, respectively. On the other hand, the percentage of growth inhibition on *A. niger* was less than 50% at concentration of 40 mg/mL for all line extracts.

Keywords: Roselle, Roselle Calyxes, *Aspergillus* spp., Growth Inhibition

บทคัดย่อ: จากการปรับปรุงพันธุ์กระเจี๊ยบแดงของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ได้ผลผลิตกระเจี๊ยบแดงที่มีกลีบเลี้ยงเฉดสีต่างกันจากสีแดงเข้ม แดง ชมพู ไปจนถึงสีขาว คณะผู้วิจัยจึงสนใจทำการศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงแต่ละเฉดสีต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. niger* ซึ่งพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกเฉดสีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์ โดยอัตราการยับยั้งลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลดลง สำหรับสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ดีกว่าสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีอื่น ในทุกๆ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกเฉดสีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ได้ต่ำกว่าร้อยละ 50

คำสำคัญ: กระเจี๊ยบแดง กลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง เชื้อรา *Aspergillus* spp. ยับยั้งการเจริญ

¹ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยและบริการวิชาการ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

¹Central Laboratory and Greenhouse Complex, Research and Academic Service Center, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

²Tropical Vegetable Research Center, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

* Corresponding author: rdispsa@ku.ac.th

คำนำ

กระเจี๊ยบแดงเป็นสมุนไพรที่นิยมนำมาทำเป็นเครื่องดื่ม เพราะนอกจากจะมีสีแดงสวยและรสชาติที่ดีแล้ว ยังมีสรรพคุณอีกหลายอย่าง เช่น ช่วยให้สดชื่นเพราะมีกรดซิตริก (citric acid) ช่วยลดความดันโลหิตและไขมันในเส้นเลือด ช่วยต้านอนุมูลอิสระ เพราะมีสารแอนโทไซยานิน (anthocyanins) มีฤทธิ์ขับปัสสาวะ และเป็นยาระบายอ่อนๆ มีการวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) และ High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่ามีสาร quercetin luteolin glycoside และ chlorogenic acid และยังพบสารอื่นๆ ที่เคยมีรายงานไว้ด้วยเช่นกัน คือ anthocyanins delphinidin-3-sambubioside และ cyanidin-3-sambubioside (Salah *et al.*, 2002) ในกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงแห้ง พบว่ามีสารกลุ่ม flavonoids gossypetine, hibiscetine และ sabdaretine และสารกลุ่ม alkaloids β -sitosterol anthocyanin citric acid cyanidin-3-rutinoside delphinidin galactose pectin protocatechuic acid quercetin stearic acid และ wax (Hirunpanich *et al.*, 2005) ในปี พ.ศ. 2551 มีงานวิจัยของกรมวิชาการเกษตรเกี่ยวกับการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินโดยใช้พืชสมุนไพร พบว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงอยู่ในกลุ่มที่ไม่สามารถยับยั้งทั้งการเจริญของเส้นใยและการสร้างสารอะฟลาทอกซินได้ (อมรา และคณะ, 2551) ต่อมา มีรายงานการวิจัยว่า สารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* (El-Nagerabi *et al.*, 2012) ซึ่งสารอะฟลาทอกซินที่พบมากตามธรรมชาติมีอยู่ 4 ชนิด คือ Aflatoxin B₁, Aflatoxin B₂, Aflatoxin G₁ และ Aflatoxin G₂ ซึ่งสารอะฟลาทอกซินนั้นนอกจากจะเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดมะเร็งแล้ว ยังก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และทำให้เกิดลูกวิรูปในสัตว์ (Teratogenic) ด้วย (Giray *et al.*, 2005) โดยสารพิษ Aflatoxin B₁ มีความเป็นพิษร้ายแรงมากที่สุด เป็นสารพิษที่ทำให้

เกิดมะเร็งตับของสัตว์ทดลองได้ดีที่สุด และเชื้อรา *A. flavus* สามารถผลิตสารพิษ Aflatoxin B₁ ได้ในปริมาณที่สูงกว่าชนิดอื่นๆ (ศุภกิจ และคณะ, 2520) สารพิษอะฟลาทอกซินมักพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกษตรทั้งที่เป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ ส่งผลเสียต่อสุขภาพผู้บริโภค ทำให้ผลิตผลเกษตรเสียหาย คุณภาพไม่ได้มาตรฐาน ราคาตกต่ำ เนื่องจากการค้าสินค้าเกษตรระหว่างประเทศมีการตกลงใช้มาตรการด้านความปลอดภัยของอาหารเป็นข้อกำหนดในการค้า โดยคำนึงถึงสุขภาพผู้บริโภคเป็นสำคัญ อันตรายจากการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินจึงเป็นประเด็นหนึ่งที่มีการเฝ้าระวังตรวจสอบ โดยเฉพาะสินค้าที่มีความเสี่ยง ได้แก่ ถั่วลิสง เครื่องเทศ ผลิตภัณฑ์อาหารแห้ง และผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบเกษตร เช่น ข้าวโพด ปัจจุบันมาตรฐานระหว่างประเทศโดย CODEX ระบุปริมาณและชนิดของสารพิษอะฟลาทอกซิน กำหนดให้ปนเปื้อนได้ในถั่วลิสงไม่เกิน 15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ดวงจันทร์ และวนิดา, 2545) ในขณะที่ประเทศไทยให้มีการปนเปื้อนไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2548) ผู้ผลิตจึงต้องคำนึงถึงการป้องกันหรือลดการปนเปื้อนของสารพิษชนิดนี้ วิธีการยับยั้งการเจริญหรือการสร้างพิษของเชื้อราในสกุล *Aspergillus* นี้โดยทั่วไปจะใช้กรดแก่และเบสแก่ หรือใช้สารเคมี เช่น thiabendazole benomyl hydrogen peroxide และ formaldehyde ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมเชื้อรานี้ อาจมีเหลือตกค้างในผลิตภัณฑ์ จึงเกิดแนวคิดที่จะนำเอาสมุนไพรไทยมาใช้เพื่อลดการใช้สารเคมี และเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และจากรายงานการวิจัยที่พบว่า สารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงมีความเป็นพิษต่ำ (Hopkins *et al.* 2013) และเครื่องดื่มน้ำกระเจี๊ยบแดง (zobo drinks) ความเข้มข้น 15% จากกลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดงสีต่างๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* *Klebsiella pneumonia* *Escherichia coli* และ *Streptococcus* spp. ได้ โดย zobo drinks จากกลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดงสีแดงอ่อน (light red)

สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ดีกว่าเชื้ออื่น ๆ (Obadina and Oyewole, 2007) นอกจากนี้ยังพบรายงานการวิจัยศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ด้วยกรดอินทรีย์บางชนิด (กรดอะซิติก กรดเบนโซอิก กรดบิวทิริก กรดซิตริก และกรดโฟลิก) พบว่ากรดอะซิติกและกรดบิวทิริกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. KUCL01 ได้ดีที่สุด โดยที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ทำการทดสอบ คือ ร้อยละ 0.1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับกรดซิตริกพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อได้ร้อยละ 70-100 ในขณะที่กรดโฟลิกมีประสิทธิภาพในการลดการสร้างสารอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 94-100 แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (ธนภูมิ และชนัญญา, 2556) เนื่องจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อนได้ปรับปรุงพันธุ์กระเจี๊ยบแดงและได้กระเจี๊ยบแดงที่มีกลีบเลี้ยงสีแดงต่างๆ กันจากสีแดงเข้ม สีมชมพู ไปจนถึงสีขาว ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำผลผลิตกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์นั้นมาใช้ประโยชน์ โดยศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงแต่ละสีต่างๆ (จากสีแดงเข้ม ไปจนถึงสีขาว) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ในระดับห้องปฏิบัติการ ผลจากการศึกษาสามารถจะพัฒนาต่อยอดไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ควบคุมเชื้อราและลดการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีโอกาสเกิดเชื้อราได้ง่าย เช่น ถั่วลิสงคั่วป่น พริกป่น เมล็ดข้าวโพดป่น เป็นต้นได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสกัดสารจากกลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดง

เก็บรวบรวมตัวอย่างกระเจี๊ยบแดงพันธุ์กำแพงแสนจัมโบ้ที่มีกลีบเลี้ยงในเฉดสีต่างๆ กัน ทั้งหมด 4 เฉดสี คือ สีแดงเข้ม (dark red; DR) สีแดง (red; R) สีมชมพู (pink; P) และสีขาว (white; W) ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน

สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน จากนั้นทำการคัดเลือก ล้างทำความสะอาด และทำให้แห้งโดยแบ่งเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และชุดที่ 2 นำไปตากกลางแจ้ง เป็นเวลา 5 วัน บดกลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแห้งให้มีขนาดเล็กลงทั้ง 2 ชุด แร่สกัดในตัวทำละลายเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 250 g/L (W/V) เป็นเวลา 1 สัปดาห์กรองผ่านสำลีเพื่อแยกกากออก นำสารสกัดในเอทานอลที่ได้ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้และคำนวณหาร้อยละของสารสกัดหยาบกระเจี๊ยบแดงแต่ละเฉดสี จากกลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแห้งที่แยกได้จากการสกัดครั้งที่ 1 นำมาแช่สกัดซ้ำครั้งที่ 2 โดยทำเหมือนการสกัดครั้งที่ 1 จนได้สารสกัดหยาบกระเจี๊ยบแดงแต่ละเฉดสี

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงแต่ละเฉดสีต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* โดยวิธี Poisoned Food Technique

นำสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงแต่ละเฉดสีมาละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 10 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นกรองสารละลายด้วยแผ่นเมมเบรน (pore size = 0.45 μ m) โดยชุดควบคุมในการทดลองนี้ ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เป็น negative control เพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* บนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เติมสารละลาย Tween 20 เข้มข้น 0.02% (w/v) ลงในจานเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใช้ช้อนแบนหรือแท่งแก้วดูดสปอร์ให้หลุดออกจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วดูดสปอร์เก็บใส่ในหลอดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เจือจางและนับจำนวนสปอร์จนได้ความเข้มข้นที่มีจำนวนสปอร์ของเชื้อเท่ากับ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เติมสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงแต่ละเฉดสีที่มีความเข้มข้นต่างๆ (5 10 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในอาหารแข็ง Yeast Extract Sucrose (YES) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ในอัตราส่วน 111 มิลลิลิตรต่อลิตร (V/V) ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน เทลงในจานเลี้ยงเชื้อแล้วปล่อยให้อาหารที่ผสมสารสกัดแล้วแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง นั่นคือ ความเข้มข้นของสารสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ YES จะเท่ากับ 5 10 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยอด spore suspension เชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* (ที่มีจำนวนสปอร์ของเชื้อเท่ากับ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร YES ผสมสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจียบแดงแต่ละเฉดสี นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ตรวจสอบผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม บันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างกระเจียบแดงที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์ จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน สามารถคัดเลือกกระเจียบแดงที่มีกลีบเลี้ยงเฉดสีต่างๆ กันได้ 4 เฉดสี คือ สีแดงเข้ม (dark red; DR) สีแดง (red; R) สีชมพู (pink; P) และสีขาว (white; W) จากนั้นนำไปทำให้แห้งและสกัดสารด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% พบว่ากลีบเลี้ยงกระเจียบแดงที่ทำให้แห้งโดยการอบจะได้สารสกัดหยาบในปริมาณที่มากกว่าการตากแดด (Table 1) โดยมีร้อยละของสารสกัดหยาบจากการอบมากกว่าตากแดดเท่ากับ 11 และ 1 ในการสกัดครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

Table 1 Yield of different color roselle calyx extracts with different drying methods

Roselle calyxes's extracts from each color	Yield of roselle calyxes's extracts (%)			
	Hot air drying		Sun drying	
	The first of extraction	The second of extraction	The first of extraction	The second of extraction
Dark red (DR)	23.6	8.0	14.6	7.2
Red (R)	26.2	8.9	15.8	8.0
Pink (P)	29.9	8.5	16.2	7.4
White (W)	26.9	8.8	15.5	7.6

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจียบแดงแต่ละเฉดสีต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* โดยวิธี Poisoned Food Technique โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจียบแดงแต่ละเฉดสีเท่ากับ 5 10 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อตรวจสอบผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (negative control) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกเฉดสีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 100% ดังแสดงใน Figure 1 ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด

20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกเฉดสีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้โดยมีค่าอยู่ในช่วง 60-70% โดยสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาว (W) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 71% ส่วนสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีชมพู (P) และสีแดง (R) สามารถยับยั้งการเจริญได้ 63% และสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม (DR) สามารถยับยั้งการเจริญได้ 57% ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกเฉดสีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้อยู่ในช่วง 30-40% โดยสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาว (W) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 43%

ส่วนสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีชมพู (P) สีแดง (R) และสีแดงเข้ม (DR) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 32% 31% และ 28% ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้อยู่ในช่วง 10-20% โดยสาร

สกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาว (W) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 17% ส่วนสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีชมพู (P) และสีแดง (R) สามารถยับยั้งการเจริญได้ 14% และสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม (DR) สามารถยับยั้งการเจริญได้ 13%

Growth inhibition of *A. flavus* (%)

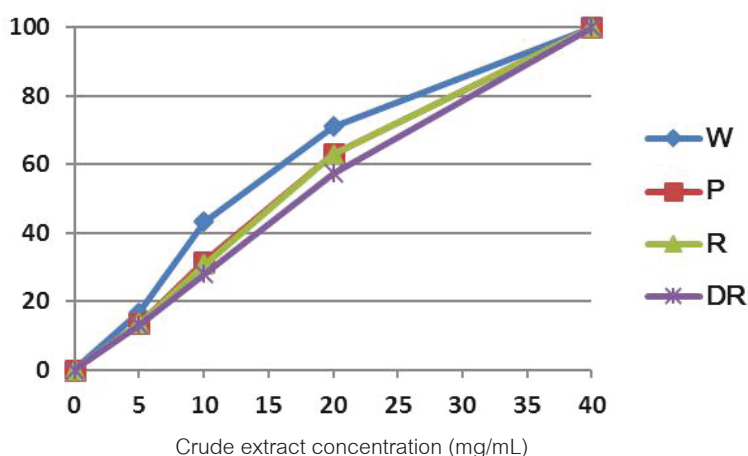


Figure 1 Efficacy of the extracts from different color roselle calyxes on growth inhibition of *A. flavus* at 5 10 20 and 40 mg/mL of extracts

สำหรับประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของ *A. niger* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีประโยชน์และไม่สร้างอะฟลาทอกซิน เมื่อทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (negative control) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ได้ต่ำกว่า 50% โดยสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาว (W) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ได้ 45% ส่วนสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม (DR) สีแดง (R) และสีชมพู (P) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ได้ 39% 36% และ 33% ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 2 ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกชนิดสามารถยับยั้ง

การเจริญของเชื้อรา *A. niger* ได้อยู่ในช่วง 10-30% โดยสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาว (W) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ได้ 26% ส่วนสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม (DR) สีแดง (R) และสีชมพู (P) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ได้ 19% 18% และ 13% ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 10 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ได้ประมาณ 10% ซึ่งถือว่าเป็นคุณลักษณะที่ดีของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงนี้ ที่มีความสามารถสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซิน แต่มีผลการยับยั้งการเจริญของ *A. niger* ได้ต่ำ ซึ่ง *A. niger* นี้เป็นเชื้อราที่มีประโยชน์และไม่สร้างอะฟลาทอกซิน

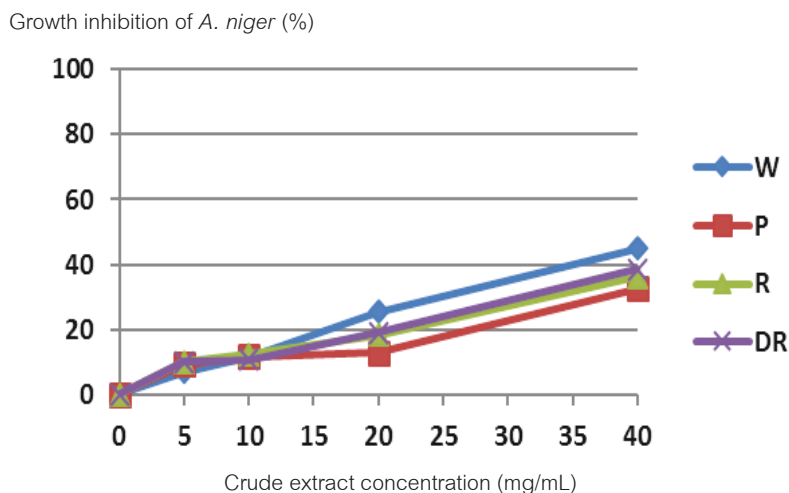


Figure 2 Efficacy of the extracts from different color roselle calyxes on growth inhibition of *A. niger* at 5 10 20 and 40 mg/mL of extracts

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ได้ 100% ที่ระดับความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองนี้ แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 100% และที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้อยู่ในช่วง 60-70% จึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกเฉดสีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้อยู่ในช่วง 80-100% โดยสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาว (W) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 100% ส่วนสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีชมพู (P) สีแดง (R) และสีแดงเข้ม (DR) สามารถยับยั้งการเจริญได้ 94% 80% และ 77% ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 3 ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกเฉดสีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้อยู่ในช่วง 70-90% โดยสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาว (W) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 90% ส่วนสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีชมพู (P) สีแดง (R) และสี

แดงเข้ม (DR) สามารถยับยั้งการเจริญได้ 79% 72% และ 71% ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกเฉดสีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้อยู่ในช่วง 60-70% โดยสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาว (W) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 72% ส่วนสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีชมพู (P) สีแดง (R) และสีแดงเข้ม (DR) สามารถยับยั้งการเจริญได้ 70% 68% และ 63% ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกเฉดสีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้อยู่ในช่วง 50-60% โดยสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาว (W) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 66% ส่วนสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีชมพู (P) สีแดง (R) และสีแดงเข้ม (DR) สามารถยับยั้งการเจริญได้ 62% 58% และ 53% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาว สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ดีกว่ากลีบเลี้ยงสีอื่นๆ ในทุกๆ ระดับความเข้มข้น โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงสีชมพู สีแดง และสีแดงเข้ม มีระดับความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์คือ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

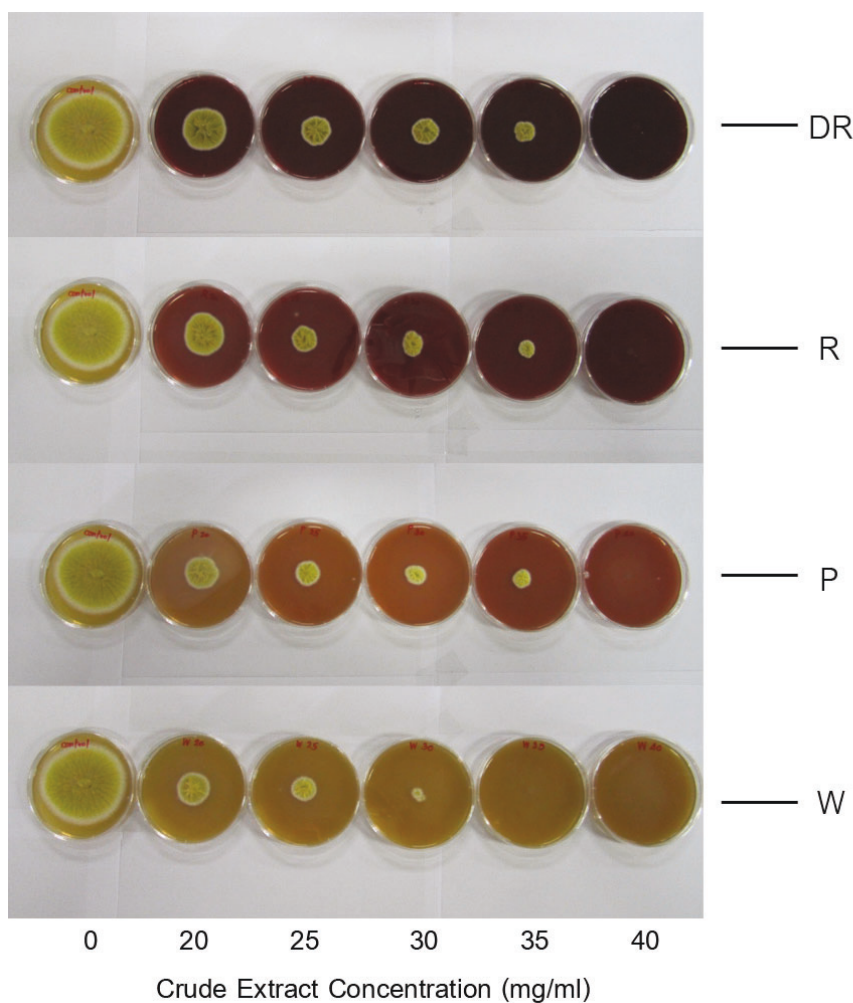


Figure 3 Growth of *A. flavus* on YES agar supplemented with roselle calyx extracts at the different concentrations (DR=dark red, R=red, P=pink, W=white)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงสีขาวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ได้ดีกว่าสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีอื่น ๆ ผู้วิจัยจึงคิดว่าสารสำคัญออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* spp. นี้ น่าจะเป็นสารอื่นที่ไม่ใช่แอนโทไซยานิน

สรุปและเสนอแนะ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงแต่ละชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* spp. พบว่ากรรมวิธีที่

เหมาะสมในการทำให้กลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงแห้งก่อนทำสกัด คือ การอบแห้งจะได้สารสกัดหยาบในปริมาณที่มากกว่าการตากแดด และสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์นั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ซึ่งสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ดีกว่าสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีอื่น ๆ โดยมีระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 100% คือ 35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีอื่น ๆ (ชมพูแดง และแดงเข้ม) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

A. flavus ได้ 100% ที่ระดับความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด ต่อการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกลีบเลี้ยงทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ได้ต่ำกว่า 50% และสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาวก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ได้ดีกว่าสารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีอื่นๆ เช่นกัน จากงานสืบค้นงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง ความเข้มข้นสูงสุด 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ (El-Nagerabi *et al.*, 2012) ผู้วิจัยจึงคิดว่าสายพันธุ์ของกระเจี๊ยบแดงน่าจะมีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งกระเจี๊ยบแดงที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ จึงเป็นสายพันธุ์กระเจี๊ยบแดงที่น่าสนใจ และสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ควบคุมเชื้อราในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีโอกาสเกิดเชื้อราได้ง่าย เพราะสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงไม่มีกลิ่นเฉพาะตัว มีความเป็นพิษต่ำ และสารแอนโทไซยานินในกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงที่มีสีแดงนั้น เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาจทำให้สีของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไปจากเดิม ไม่เป็นที่พอใจของผู้บริโภค แต่การใช้สารสกัดจากกลีบเลี้ยงสีขาวที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์นี้จะสามารถลดปัญหาเรื่องการรบกวนของสีในผลิตภัณฑ์ และสามารถขยายผลจากการปรับปรุงพันธุ์กระเจี๊ยบแดงมาใช้ประโยชน์และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ดวงจันทร์ สุขประเสริฐ และวนิดา ยุธยาติ. 2545. สารอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในเครื่องเทศ. วารสารสุขภาพอาหาร 4(2): 33-37.
- ธนภูมิ มณีบุญ และชนัญญา ช่วยศรีนวล. 2556. ผลยับยั้งของกรดอินทรีย์บางชนิดต่อการเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* sp. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 44: (3; พิเศษ): 343-346.
- ศุภกิจ อังศุภากร, วิทยาธรรมวิทย์ และสมพงศ์ สหพงศ์. 2520. โรคของสัตว์เศรษฐกิจที่เกิดจากพิษของเชื้อรา. เวชศาสตร์สัตวแพทย์. คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 7(2): 127-143.
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2548. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่องหนังสือรับรองมาตรฐานของอาหารที่นำเข้า. เล่ม 12 ตอนพิเศษ 56ง.
- อมรา ชินภูติ ศุภรา อัครศาระกุล ลิลลี่ พรานุสร ชวลิต ตรีกรราสวัสดิ์ สมคิด รื่นภาควุฒิ และไพศาล รัตนเสถียร. 2551. การควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินโดยใช้พืชสมุนไพร. 8 ผลงานเด่น 36 ปี กรมวิชาการเกษตร. รายงานผลงานวิจัยและพัฒนา ปี 2551-2560. คลังผลงานวิจัย กรมวิชาการเกษตร: 21-22.
- El-Nagerabi, S.A.F., S.N. Al-Bahry, A.E. Elshafie and S. Alhilali. 2012. Effect of *Hibiscus sabdariffa* extract and *Nigella sativa* oil on the growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains. Food Control 25: 59-63.
- Giray, B., G. Girgin, A.B. Engin, S. Aydin and G. Sahin. 2005. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. Food Control 18: 23-29.
- Hirunpanich, V., A. Utaipat, N.P. Morales, N. Bunyaphatsara, H. Sato, A. Herunsalee and C. Suthisisang. 2005. Antioxidant effects of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn.

- (Roselle) in vitro using rat low-density lipoprotein (LDL). Biological and Pharmaceutical Bulletin 28(3): 481-484.
- Hopkins, A.L., M.G. Lamm, J.L. Funk and C. Ritenbaugh. 2013. *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: A comprehensive review of animal and human studies. Fitoterapia 85: 84-94.
- Obadina, A.O. and O.B. Oyewole. 2007. Assessment of the antimicrobial potential of roselle juice (zobo) from different varieties of roselle calyx. Journal of Food Processing and Preservation 31: 607-617.
- Salah A.M., J. Gathumbi and W. Vierling. 2002. Inhibition of intestinal motility by methanolic extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) in rats. Phytotherapy Research 16: 283-285.