



โครงการวิทยาศาสตร์

เรื่อง การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราไรโซปัส โดยลิโมนีน

โดย

นาย ชุณหวัต ชูวัฒนกุล
นางสาว สุพิชญา กาวงศ์

โรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย

รายงานเป็นส่วนประกอบของการนำเสนอโครงงานห้องเรียนพิเศษวิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์
เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม ตามหลักสูตรของ สพฐ. ระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 สาขาชีววิทยา

วันที่ 23 - 25 กรกฎาคม 2566

ณ โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย



โครงการวิทยาศาสตร์

เรื่อง Growth inhibition efficacy studies of *Rhizopus* sp.

by Limonene

โดย

นาย ชุณหวัต ชูวัฒนกุล

นางสาว สุพิชญา กาวงศ์

โรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย

รายงานเป็นส่วนประกอบของการนำเสนอโครงการห้องเรียนพิเศษวิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์
เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม ตามหลักสูตรของ สพฐ. ระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 สาขาชีววิทยา

วันที่ 23 - 25 กรกฎาคม 2566

ณ โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	การศึกษาประสิทธิภาพวิธีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. โดยLimonene	
ชื่อผู้จัดทำโครงการ	1. นายชุมหวัด ชูวัฒนกุล	
	2. นางสาวสุพิชญา กาวงศ์	
อาจารย์ที่ปรึกษา	คุณครู นันทวัน โชติวนาวรรณ	
โรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย	เลขที่ 230 ถ.พหลโยธิน ต.หัวเวียง อ.เมือง จ.ลำปาง	
ปีการศึกษา	2565	

บทคัดย่อ

โครงการวิทยาศาสตร์เรื่องการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizopus* sp. โดยLimonene มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารLimoneneในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา*Rhizopus* sp. ซึ่งสารLimonene พบได้ในเปลือกของพืชตระกูลส้ม (Citrus) เช่น มะนาว ส้มโอ ส้มเกลี้ยง มะกรูด เป็นต้น เชื้อรา*Rhizopus* sp. เป็นที่รู้จักกันในชื่อ ราดำ ซึ่งเป็นฟงไจในไฟลัมZygomycota เป็นราแบบเส้นใยไม่มีผนังกันและมักสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศคือ สปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospore) ซึ่งทำให้ อาหารเสีย / เกิดโรคเน่าในพืช และเป็นอันตรายต่อร่างกายหากรับประทาน

ในการทดลองประกอบด้วย การทำอาหารเลี้ยงเชื้อ pdaใส่ขวดชมพู นำไปอบฆ่าเชื้อ แล้วนำใส่เพลทที่ฆ่าเชื้อ นำลิโมนีนมาผสมกับน้ำมันให้ความเข้มข้นที่75% v/v , 50% v/v , 25% v/vโดยใช้กระบอกตวง และ ผสมยากับรา *Rhizopus* sp. 2g กับน้ำ5ml นำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลมจุ่มสปอร์แขวนลอยของ เชื้อรา *Rhizopus* sp. และวางตรงกลางเพลท นำลิโมนีนความเข้มข้นต่างๆมาจุ่มด้วยกระดาษกรองวางด้านขวา pda ปิดฝาและคว่ำเพลท

จากการทดลองพบว่าเมื่อครบเวลาในการบันทึกผล สารLimoneneที่ความเข้มข้น 75% v/v , 50% v/v , 25% v/v เชื้อรา*Rhizopus* sp. ซึ่งจากการทดลองพบว่าลิโมนีนที่ความเข้มข้นมากสามารถยับยั้งเชื้อรา *Rizopus* sp. ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นน้อยกว่า โดยที่ 100% v/v มีประสิทธิภาพสูงสุด เพราะฉะนั้นเราควรเลือกใช้ความเข้มข้นนี้ในการยับยั้งเชื้อรา

คำสำคัญ : *Rhizopus* sp. , Limonene , Zygomycota ,สปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospore) , Autoclave

Title Growth inhibition efficacy studies of *Rhizopus* sp. by Limonene

Name 1. Mr. Chunhawat Chuwattanakul
2. Ms. Supitchaya Kawong

Advisor Mrs. Nantawan Chotiwanawan

Bunyawat Witthayalai School 230 Lampang-Mae the road, Hua Wiang
subdistrict, Mueang Lampang district, Lampang

Years 2023

Abstract

This scientific project on the growth inhibition efficiency of *Rhizopus* sp. by Limonene aims to study the efficiency of Limonene in inhibiting the growth of *Rhizopus* sp. Found in the bark of citrus plants such as lemons, grapefruits, tangerines, kaffir limes, etc. *Rhizopus* sp. is known as black mold, which is a fungi in the phylum Zygomycota. It is a filamentous fungi that produces asexual spores. Rangiopores spores (sporangiospore) which causes food spoilage / rot disease in plants and harmful to the body if eaten.

In the experiment consisted of agar food pda in chompoo bottle to be sterilized and then placed on a sterilized plate Limonene was mixed with oil to a concentration of 75 %v/v , 50 %v/v , 25 %v/v using a measuring cylinder and mixed with *Rizopus* sp. 2g with 5ml of water, filter paper. circular cut Dip the spores suspension of *Rhizopus* sp. and place in the center of the plate. Different concentrations of limonene were dipped in filter paper, placed on the right side of the pda, covered and turned upside down.

From the experiment, it was found that when the time to record the results Limonene at the concentration of 75% v/v , 50% v/v , 25% v/v *Rhizopus* sp. Less concentrated, with 100% v/v being the most effective. Therefore, we should choose to use this concentration to inhibit mold.

Keywords : *Rhizopus* sp. , Limonene , Zygomycota , Rangiopores (sporangiospore) , Autoclave

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้เป็นโครงการวิทยาศาสตร์ เรื่องการศึกษาประสิทธิภาพวิธีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizopus* sp. โดยLimonene ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาจากท่านผู้อำนวยการโรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย นายนิรันดร์ หมั่นสุข ที่ได้ให้ส่งเสริม สนับสนุน และความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ในการศึกษาค้นคว้า รวมถึงอุปกรณ์ต่างๆ ขอขอบพระคุณ คุณครูณัฏฐ์วันโชติวันวารรณ ครูที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำวิธีทำโครงการที่ถูกต้องตามหลักการ และชี้แนะ อีกทั้งแนะนำแนวทางการแก้ไขปัญหาต่างๆตลอดการทำโครงการจนสามารถสำเร็จลุล่วง รวมถึงขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง ที่ได้เื้ออำนวยความสะดวก อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆที่ในการทำโครงการนี้

ตลอดจน บิดา มารดา ครอบครัวอันเป็นที่รัก ที่คอยสนับสนุน ส่งเสริม ผลักดัน และเป็นกำลังสำคัญยิ่งในทุกด้าน ขอขอบคุณสมาชิกในกลุ่มและเพื่อนๆทุกคนที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือเกื้อกูลกันและกัน จนโครงการครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีทุกประการ คณะผู้จัดทำโครงการขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้จัดทำ

28 มิถุนายน 2566

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก-ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 ขอบเขตของโครงการ	2
1.4 สมมติฐาน	2
1.5 ตัวแปรที่ศึกษา	3
1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ	3
1.7 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4-6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง	7-9
บทที่ 4 ผลการทดลอง	10-14
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	15
เอกสารอ้างอิง	16
ภาคผนวก	17-20

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1 ภาพนำไปเข้าเครื่องAutoclave ที่อุณหภูมิ 121°C 15 psi 30 นาที	7
รูปที่ 2 ภาพแสดงผลการทดลองในวันที่ 6 กรกฎาคม พ.ศ. 2566	8
รูปที่ 3 ภาพแสดงผลการทดลองในวันที่ 7 กรกฎาคม พ.ศ. 2566	9
เรียกตามความเข้มข้น 25% 50% 75% 100% (v/v) ใส่ยาฆ่าเชื้อรา และใส่DMSOเป็นตัวควบคุม	
รูปที่ 4 ภาพแสดงผลการทดลองในวันที่ 1	11
รูปที่ 5 ภาพแสดงผลการทดลองในวันที่ 9 กรกฎาคม พ.ศ. 2566	12
เรียกตามความเข้มข้น 25% 50% 75% 100% (v/v) กับใส่ยาฆ่าเชื้อรา(m/v) และใส่DMSOเป็นตัวควบคุม	
รูปที่ 6 ภาพแสดงผลการทดลองในวันที่ 2	13

สารบัญตารางและกราฟ

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 การหาค่าเฉลี่ยของระยะห่างระหว่างสารและเชื้อรา ในวันที่ 1	11
กราฟที่ 1 กราฟแสดงผลการยับยั้งเชื้อราโดยLimoneneในวันที่ 1	11

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ

เชื้อรามีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหาร เชื้อราจะทำให้ลักษณะภายนอกของอาหารเปลี่ยนแปลงไป เช่น อาหารเปลี่ยนสี หรือนิ่มลง เป็นต้น เชื้อราจะผลิตสปอร์ออกมาเพื่อใช้สืบพันธุ์ โดยสปอร์จะมีลักษณะเล็กมากคล้ายฝุ่น พุ้งกระจายอยู่ในอากาศและไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งสปอร์เหล่านี้เองที่เป็นตัวทำให้เชื้อรามีสีต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นสีขาว เหลือง เขียวหรือดำ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรานั้น ๆ ทำให้เกิดเกิดการเสื่อมเสียของอาหาร อย่างรวดเร็วและปรากฏเห็นได้อย่างชัดเจน เชื้อราบางชนิดยังก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคโดยสารพิษที่สร้างขึ้นจากเชื้อรา ผลิตภัณฑ์ขนมอบ เบเกอรี่ต่างๆ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมสูงจากผู้บริโภคในปัจจุบันซึ่งบางชนิดเกิดการเสียหายของผลิตภัณฑ์ได้อย่างรวดเร็ว การคงสภาพเดิมของผลิตภัณฑ์ได้ในระยะเวลาอันสั้นประมาณ 3-5 วัน เชื้อราที่พบในขนมปังส่วนใหญ่คือราขนมปัง *Rhizopus Stolonifer* ได้ชื่อนี้จากโครงสร้างที่เรียกว่าสโตนอน (stolon) ราขนมปัง (bread mold) เจริญบนแผ่นขนมปังโดยการดูดซึมน้ำตาลที่อยู่ในขนมปัง และสร้างอวัยวะคล้ายรากที่เรียกว่า Rhizoid ซอนไชเข้าไปในเนื้อขนมปัง พร้อมทั้งขยายโคโลนีด้วยการสร้างเส้นใยสโตนอน USDA (หน่วยงานซึ่งมีหน้าที่รับรองอาหารและผลิตภัณฑ์ออร์แกนิกของสหรัฐอเมริกา) แนะนำว่า ควรทิ้งขนมปังเมื่อพบเห็นเชื้อราบนนั้น แม้ว่าเราจะเห็นเพียงจุดเล็ก ๆ ของเชื้อราบนแผ่นขนมปัง แต่เส้นใยของพวกมันจะแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปตามรูของขนมปัง นอกจากนี้เชื้อราบางชนิดยังสามารถผลิตสารที่เป็นพิษที่เรียกว่า mycotoxins ซึ่งพิษนี้สามารถออกฤทธิ์ในสัตว์ได้อีกด้วย ดังนั้นจึงไม่ควรนำขนมปังขึ้นราไปให้สัตว์กินเด็ดขาด ทางคณะผู้จัดทำจึงศึกษาหาวิธีการยับยั้งเชื้อรา *Rhizopus* sp. โดยLimonene

สุดท้ายนี้เพื่อที่จะหวังการลดสารเคมีมาใช้ในการผลิตอาหาร ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาต่างๆ ได้แก่ การแพ้สารเคมีในผู้บริโภค การก่อให้เกิดอันตรายต่างๆจากการบริโภค เช่น เกิดผื่นแพ้แดง หายใจติดขัด เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการนำมาใช้ลดนมอาหาร โดย Limoneneเป็นสารที่ได้จากพืชตระกูลส้มโดยเป็นสารประเภทไฮโดรคาร์บอนมีลักษณะเป็นของเหลวใส จัดเป็นสารประเภทเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) และอยู่ในกลุ่มโมโนเทอร์พีน (monoterpenes)

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาว่าLimoneneสามารถยับยั้งเชื้อรา *Rhizopus* sp. ได้
2. เพื่อลดการใช้สารเคมีที่อันตรายโดยใช้สารสกัดจากธรรมชาติแทน
3. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของLimonene ที่มีความเข้มข้นต่างๆ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizopus* sp. ได้

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ Limonene ที่ความเข้มข้น 100 75 50 25% (v/v) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายและใช้ยาฆ่าเชื้อรา(m/v) เป็นตัวควบคุมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizopus* sp.

1.4 สมมติฐานการทดลอง

สารLimoneneในความเข้มข้นที่ 100 (v/v) มีประสิทธิภาพที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizopus* sp. ได้ดีกว่าความเข้มข้นที่ 75 > 50 > 25 (v/v)

1.5 ตัวแปรการศึกษา

ตัวแปรต้น	ความเข้มข้นของLimonene
ตัวแปรตาม	1.ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราที่เกิดขึ้น 2.ความหนาแน่นของเชื้อราที่เกิดขึ้น
ตัวแปรควบคุม	1.อาหารเลี้ยงเชื้อรา (PDA) 2.ชนิดของรา 3.ชนิดของ Limonene 4.ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาดรอง 5.ระยะเวลาในการบ่ม/เพาะ เชื้อรา

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

Rhizopus sp. เป็นสกุลของราที่สร้างเส้นใย พบในดิน ผักและผลไม้ที่ขนมปังเก่า เป็นราที่พบในลูกแป้ง และมีบทบาทในการทำข้าวหมาก

Limonene เป็นอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนเหลวไม่มีสี จัดเป็นโมโนเทอร์พีนแบบไซคลิก และเป็นส่วนประกอบหลักในน้ำมันจากเปลือกผลไม้รสเปรี้ยว D-isomer ซึ่งพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในฐานะกลิ่นหอมของส้ม เป็นสารแต่งกลิ่นรสในการผลิตอาหาร นอกจากนี้ยังใช้ในการสังเคราะห์ทางเคมีเป็นสารตั้งต้นของ carvone

Autoclave หม้อนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเครื่องจักรที่ใช้ในการดำเนินกระบวนการทางอุตสาหกรรม และวิทยาศาสตร์ซึ่งต้องการอุณหภูมิและความดันที่สูงขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับความดันและ/หรืออุณหภูมิ โดยรอบ Autoclaves ถูกใช้ก่อนขั้นตอนการฆ่าตัดเพื่อทำการฆ่าเชื้อและในอุตสาหกรรมเคมีเพื่อบ่มผิวเคลือบและวัลคาไนซ์ยาง และสำหรับการสังเคราะห์ด้วยความร้อนด้วยความร้อน หม้อนึ่งฆ่าเชื้อทางอุตสาหกรรมใช้ในงานอุตสาหกรรมโดยเฉพาะในการผลิตคอมโพสิต

1.7 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการหาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อรา *Rhizopus* sp. โดยLimonene
2. ได้แนวทางในการศึกษา ในการศึกษาสมุนไพร หรือสารจากธรรมชาติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizopus* sp.
3. ลดการใช้สารเคมี และใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติให้มากที่สุด การแพ้สารเคมีในผู้บริโภค การก่อให้เกิดผลกระทบต่างๆจากการบริโภคอาหารที่มีเชื้อรา

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Rhizopus sp. นั้นเป็นฟังไจในไฟลัม Zygomycota ซึ่งพบในที่อยู่อาศัยหลายชนิด ทั้งในดิน พืชที่เน่าเปื่อย และอาหาร นอกจากนี้ยังแพร่หลายในสภาพแวดล้อมในร่ม และสามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็วบนอาหารเลี้ยงที่เหมาะสม โดยมักสังเกตเห็นการเจริญเติบโตภายใน 24 ถึง 48 ชั่วโมง และ Limonene นั้นเป็นสารที่ได้จากพืชตระกูลส้มโดยเป็นสารประเภทไฮโดรคาร์บอนมีลักษณะเป็นของเหลวใสจัดเป็นสารประเภท เทอร์พีนอยด์ (terpenoid) และอยู่ในกลุ่มของโมโนเทอร์พีน (monoterpenes) ทางคณะผู้จัดทำจึงได้ทำการศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

2.1 สายสมร ลาลอง และ พงษ์นรินทร์ ยอดสิงห์ เรื่องการใช้น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่พบแผ่นยางพารา พบว่าอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 4 ชนิดได้ดีที่สุด ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ของน้ำมันหอมระเหยอบเชย กับเชื้อรา *Penicillium* sp. (NY1 รหัส 40), *Aspergillus* sp. (T2 รหัส 23) *Aspergillus* sp. (K2 รหัส 27) และ T3 รหัส 23 คือ 25,000 ppm สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ผิวมะกรูด ตะไคร้หอม มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้เท่ากับ 100,000 ppm ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราบนยางแผ่นทำได้โดยการฉีดสเปรย์น้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้น ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ลงบนยางแผ่น แล้วหยดเชื้อราบนยางแผ่น สังเกตการเกิดเชื้อรา สำหรับชุดควบคุมคือ แผ่นยางที่ไม่ได้สเปรย์ด้วยน้ำมันหอมระเหย พบว่ามีเชื้อราขึ้นหลังบ่มเพาะ 1 วัน ส่วนยางแผ่นที่สเปรย์ด้วยน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย ผิวมะกรูด กานพลู ตะไคร้หอม สามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. (T2 รหัส 23) ได้มากกว่าชุดควบคุมเป็นเวลา 28, 28, 3 และ 1 วันตามลำดับ สำหรับยางแผ่นที่สเปรย์ด้วยน้ำมันหอมระเหยอบเชย กานพลู ผิวมะกรูด ตะไคร้หอม สามารถยับยั้งเชื้อรา T3 รหัส 23 ได้มากกว่าชุดควบคุมเป็นระยะเวลาที่เท่ากัน คือ 28 วัน

2.2 ผศ.ดร.ณัฐรา เลหากุลจิตต์ และคณะ เรื่องการศึกษาวินิจฉัยน้ำมันหอมระเหยสำหรับเป็นสารยับยั้งเชื้อราในกระดาศ เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อรา ยืดอายุการใช้งาน และการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์กระดาศ ทดแทนการใช้สารเคมีอันตรายในผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ พบว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชย และกานพลู สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger*, *A. terreus* และ เชื้อรา *Rhizopus stolonifer* ส่วนเชื้อรา *A. fumigatus* และ *Cladosporium herbarum* น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีกว่า และน้ำมันหอมระเหยอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากกระดาศ และเชื้อราย่อยสลาย cellulose ทั้ง 8 ชนิด คือ *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium* sp. และ *Hemicola* sp. อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยทั้ง 4 ชนิด ทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการ

สร้างสปอร์ และยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราทุกชนิดได้ แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Penicilium* sp. ต่ำกว่าเชื้อราชนิดอื่น เมื่อน้ำมันหอมระเหยอบเชยเข้มข้น 100 ppm มาใช้ทดสอบในผลิตภัณฑ์กระดาษ 3 ชนิด คือ กล่องสบู่ ที่รองแก้วน้ำ และกล่องขนม พบว่า การเคลือบน้ำมันหอมระเหยอบเชย โดยวิธีการจุ่ม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 8 ชนิดดีที่สุด และผลิตภัณฑ์ที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยนาน 3 เดือน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 8 ชนิด และมีความปลอดภัย สีสัน และความชอบไม่แตกต่างจากกระดาษ control (ไม่จุ่มน้ำมันหอมระเหย)

2.3 บุญญวดี จิระวุฒิ,เนตรรา สมบูรณ์แก้ว,สุพิ วนศิริกุล, อังราพร ศรีจุฑานุ และ อมรา ชินภูติ เรื่องการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินโดยสารออกฤทธิ์จากกระเทียม งานวิจัยนี้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียมในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และลดการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินในพริกป่น พบว่า น้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 5% ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และน้ำคั้นกระเทียมความเข้มข้น 2.5% ขึ้นไป สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้สมบูรณ์ เมื่อนำกระเทียมผง น้ำคั้นกระเทียม และสารสกัดหยาบจากกระเทียมสดมาทำการแยกสารสำคัญบนแผ่น TLC พบว่า สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือ สารอัลลิซิน (allicin) ซึ่งแสดงค่า $R_f = 0.812$ ตรงกับสารอัลลิซินมาตรฐานเมื่อนำพริกป่นมาคลุกกับน้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 100 และ 75% พบว่า สามารถลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนอยู่ในพริกป่นได้ 73.67 และ 69.71 %

2.4 ญาณิกา วัชรเทวินทร์กุล และ ชุตติมา ไทยประดิษฐ์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม เรื่องประสิทธิภาพของสารสกัดจากกะลามะพร้าวในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคยอดเน่า และโรคใบจุด การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากกะลามะพร้าวด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ก่อโรคยอดเน่า (heart leaf rot) และใบจุด (*Helminthosporium leaf spot*) ที่คัดแยกจากต้นมะพร้าวด้วยวิธี Tissue transplanting สามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลท จากผลพิสูจน์การก่อโรคพบว่าเชื้อรา 2 ไอโซเลท ได้แก่ Pt1 และ Ha1 ทำให้เกิดลักษณะอาการของโรคยอดเน่าและใบจุดบนใบมะพร้าว การศึกษาลักษณะ สันฐานวิทยาพบว่า ลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราไอโซเลท Pt1 และ Ha1 มีความสอดคล้องกับเชื้อรา *Pythium* sp. และ *Helminthosporium* sp. ตามลำดับ ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากกะลามะพร้าว เปรียบเทียบกับคาร์เบนดาซิมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคด้วยเทคนิค Poisoned food โดยผสม สารสกัดในอาหาร PDA ให้ได้ระดับความเข้มข้น 10100 1000 10000 และ 100000 ppm พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากกะลามะพร้าว 100000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Pt1 และ Ha1 โดยแสดงร้อยละการยับยั้งการเจริญเท่ากับร้อยละ 100 ในขณะที่คาร์เบนดาซิม 100000 ppm แสดงร้อยละการยับยั้งการ เจริญของเชื้อรา Pt1 และ Ha1 คิดเป็นร้อยละ 73.94 และ 100 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม

ตามทีระดับความเข้มข้น 10000 ppm สารสกัดจากกะลามะพร้าวและคาร์เบนดาซิม ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Pt1 ได้ต่ำกว่าร้อยละ 30 แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Ha1 ได้มากกว่า ร้อยละ 50 โดยสารสกัดจากกะลามะพร้าวมีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Ha1 สูงกว่าคาร์เบนดาซิมที่อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือพิเศษ

3.1.1. วัสดุอุปกรณ์

- ปีกเกอร์ ขนาด 1,000 ml 2 ใบ
- ปีกเกอร์ ขนาด 250 ml 2 ใบ
- ผ้าขาวบาง จำนวน 2 ผืน
- แผ่นพอยล์
- hot plate 1 เครื่อง
- เพลทเพาะเชื้อ จำนวน 18 เพลท
- ขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 ml จำนวน 1 ขวด
- ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml จำนวน 3 ขวด
- แท่งแก้วคนสาร จำนวน 6 แท่ง
- เครื่องชั่งสาร 1 เครื่อง
- สำลี

3.1.2 เครื่องมือพิเศษ

- เครื่องชั่งสาร 1 ตัว
- ตู้อบความดัน(Autoclave) 1 เครื่อง

3.2 สารเคมี

- | | |
|----------------------------------|-------------------|
| 1. สารLimonene 1 ขวด ขนาด 100 ml | 5. ผงวุ้น 16 กรัม |
| 2. ยาฆ่าเชื้อรา 100 มิลลิกรัม | 6. น้ำกลั่น 1ลิตร |
| 3. มันฝรั่ง 200 กรัม | 7. สาร DMSO |
| 4. น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม | |

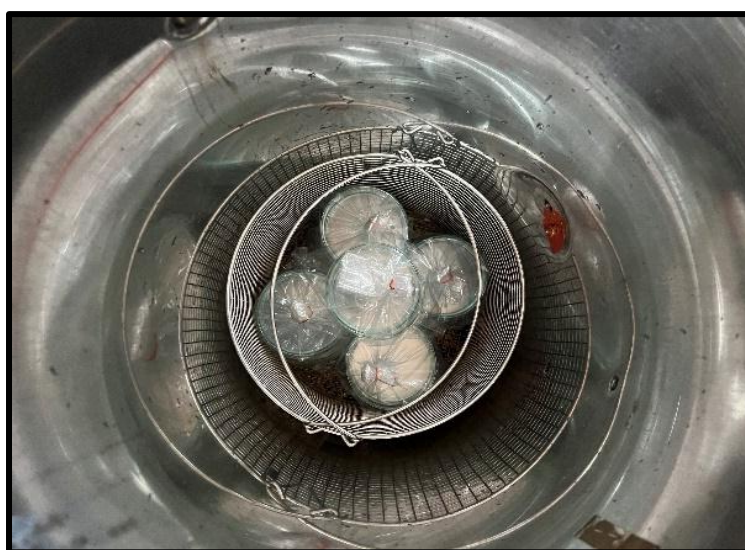
3.3 สิ่งมีชีวิตที่ใช้ศึกษา

- เชื้อราไรโซปัส (*Rhizopus* sp.)

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

ตอนที่ 1 การทำอาหารเลี้ยงเชื้อ pda

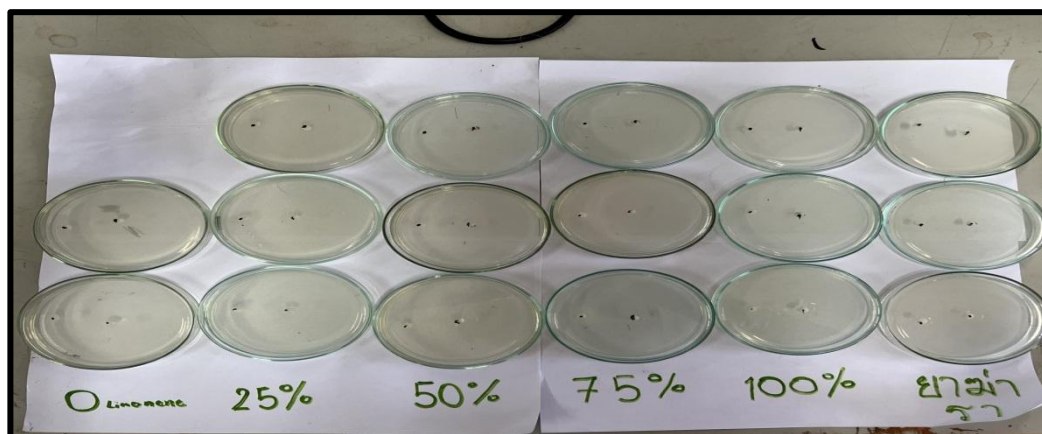
- 1.1 น้ำมันฝรั่ง มาล้างด้วยน้ำสะอาด
- 1.2 น้ำมันฝรั่งที่ได้ มาปอกเปลือก
- 1.3 แล้วนำไปหั่นขนาดเท่าๆกัน
- 1.4 น้ำมันฝรั่งที่หั่นแล้ว ไปต้มในน้ำเดือด ประมาณ 30 นาที
- 1.5 นำมากรองด้วยผ้าขาวบางเอาแต่น้ำมันฝรั่ง
- 1.6 เติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
- 1.7 แล้วนำไปต้มต่ออีก 10 นาที
- 1.8 เติมน้ำตาล 16 กรัม และน้ำตาลกลูโคส 20 กรัม ลงในบีกเกอร์ที่ต้มอยู่ แล้วคนให้ละลาย
- 1.9 นำมาพักให้เย็น แล้วใส่ขวดรูปชมพู่ตามขนาดต่างๆ
- 1.10 นำสำลีอุดปากขวด แล้วนำแผ่นฟอยล์มาปิดทับให้สนิท
- 1.11 นำไปอบด้วยเครื่องอบความดัน(Autoclave)เพื่อฆ่าเชื้อ 30 นาที



ภาพนำไปเข้าเครื่องAutoclave ที่อุณหภูมิ 121°C 15 psi 30 นาที

ตอนที่ 2 ทดสอบความเข้มข้นของลิโมนีนในการยับยั้งเชื้อรา

- 1.1 นำเพลทไปใส่ในเครื่องAutoclaveเพื่อฆ่าเชื้อ
- 1.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มาเทใส่เพลทในปริมาตรที่เท่าๆกัน และรอให้เย็น
- 1.3 นำLimoneneมาเจือจางด้วยDMSO ให้มีความเข้มข้นที่ 25 50 75 และ 100% (v/v)
- 1.4 นำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. ไปใส่ในเครื่อง Autoclaveเพื่อฆ่าเชื้อ และนำมาจุ่มลิโมนีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามลำดับ
- 1.5 นำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. ไปใส่ในเครื่อง Autoclaveเพื่อฆ่าเชื้อ และนำมาจุ่มสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Rhizopus* sp.
- 1.6 เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ใส่ DMSOเป็นกรรมวิธีควบคุม
- 1.7 เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ใส่ยาฆ่าเชื้อราเป็นกรรมวิธีควบคุม
- 1.8 นำกระดาษกรองที่จุ่มสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Rhizopus* sp. มาวางตรงกลาง ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวางไว้ในระยะห่าง 4.5 ซม.จากกระดาษกรองที่จุ่มลิโมนีนใน ความเข้มข้นต่างๆ และจากกระดาษกรองที่จุ่มยาฆ่าเชื้อรา และจุ่ม DMSO โดยบ่มไว้ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน
- 1.9 บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Rhizopus* sp. และความหนาแน่นของเชื้อราที่เกิดขึ้น เป็นเวลา 2 วัน ทุกๆ 24 ชั่วโมง

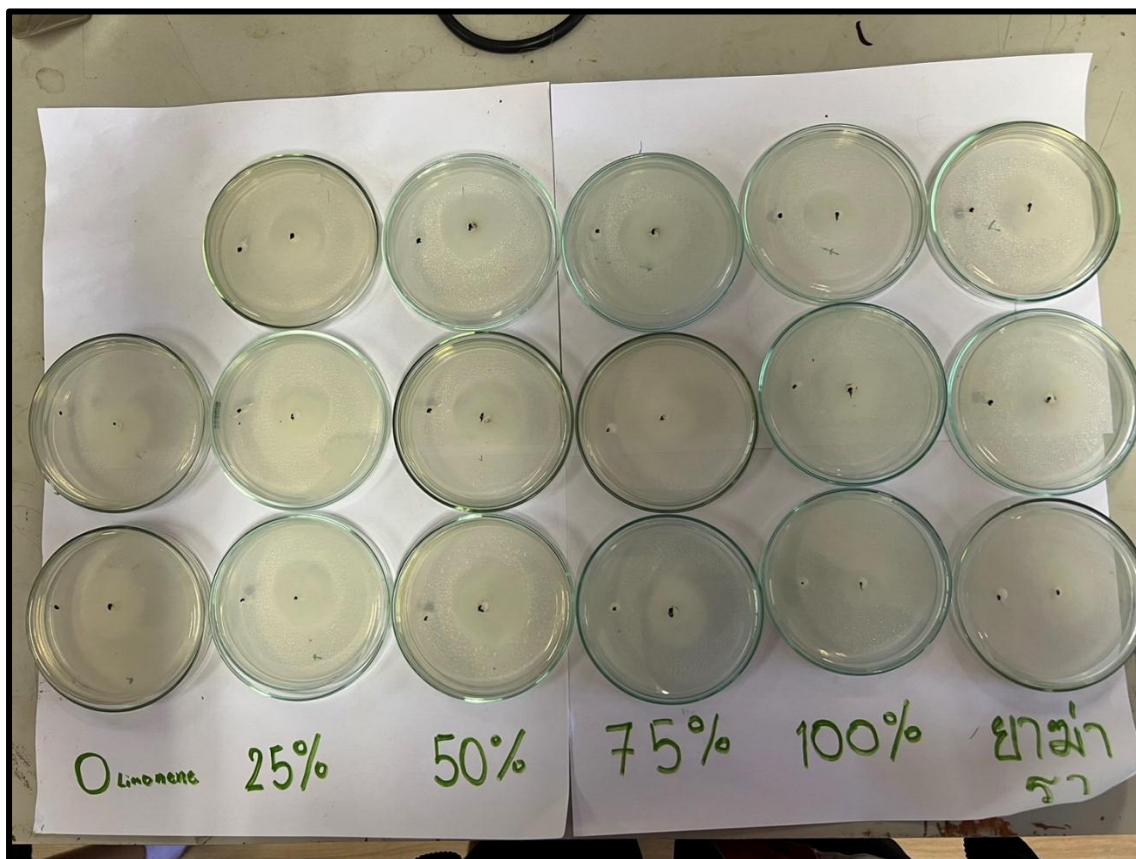


ภาพแสดงผลการทดลองในวันที่ 6 กรกฎาคม พ.ศ. 2566

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อรา *Rhizopus* sp. โดยนำ Limonene ที่สกัดแล้วมาเปลี่ยนความเข้มข้น และ ใช้ยาฆ่าเชื้อรา มาทดสอบกับเชื้อรา *Rhizopus* sp. ได้ผลว่า Limonene ความเข้มข้นต่างๆสามารถยับยั้งเชื้อรา *Rhizopus* sp. ได้ดังรูป



ภาพแสดงผลการทดลองในวันที่ 7 กรกฎาคม พ.ศ. 2566 เรียงตามความเข้มข้น 25% 50% 75%

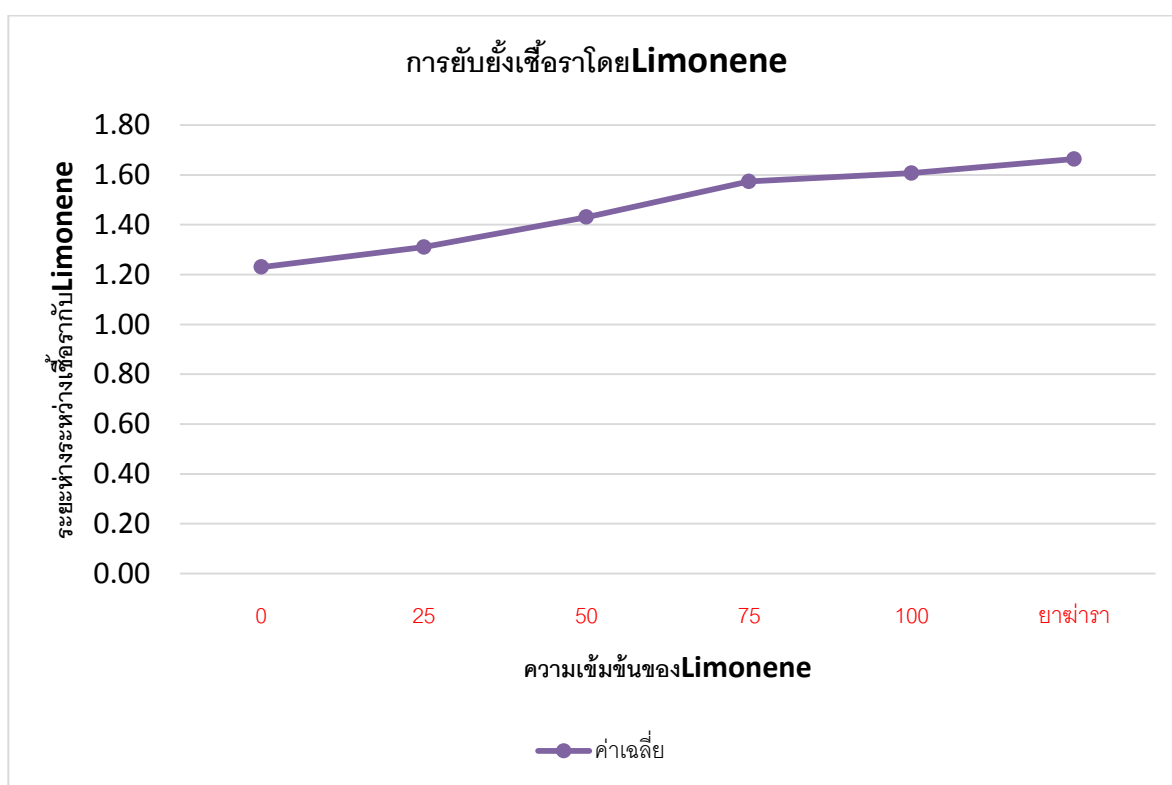
100% (v/v) ใส่ยาฆ่าเชื้อรา และใส่DMSOเป็นตัวควบคุม

จะสังเกตได้ว่า เชื้อราที่เกิดขึ้นขึ้นบริเวณกลางเพลทและมีความหนาแน่นของเส้นใยที่น้อยและยังไม่เริ่มที่จะเกิดสปอร์ และเมื่อวัดระยะห่างจากจุดศูนย์กลางถึงบริเวณกระดาศที่ใสสารสามารถวัดได้เป็นแนวโน้มนั้ดังตารางต่อไปนี้

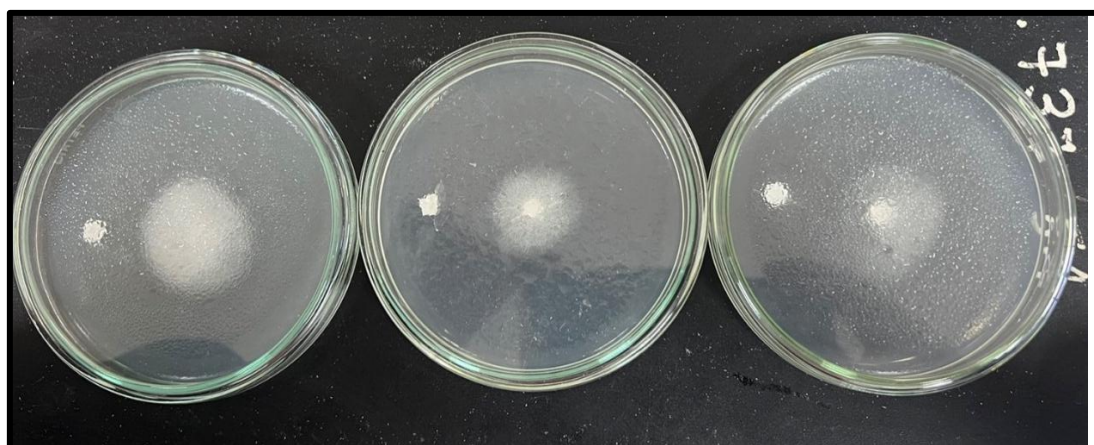
ตารางที่ 1 การหาค่าเฉลี่ยของระยะห่างระหว่างสารและเชื้อรา ในวันที่ 1

	0	25	50	75	100	ยาฆ่าเชื้อรา
1	1.21	1.23	1.40	1.54	1.61	1.67
2	1.25	1.34	1.43	1.60	1.59	1.65
3		1.36	1.46	1.58	1.62	1.67
ค่าเฉลี่ย	1.23	1.31	1.43	1.57	1.61	1.66

จากตารางจะสรุปผลได้ว่า ยังมีระยะห่างมากจะแสดงว่าสารที่ใส่ สามารถยับยั้งเชื้อราได้มาก และที่ 75% 100% (v/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ใกล้เคียงกับยาฆ่ารา



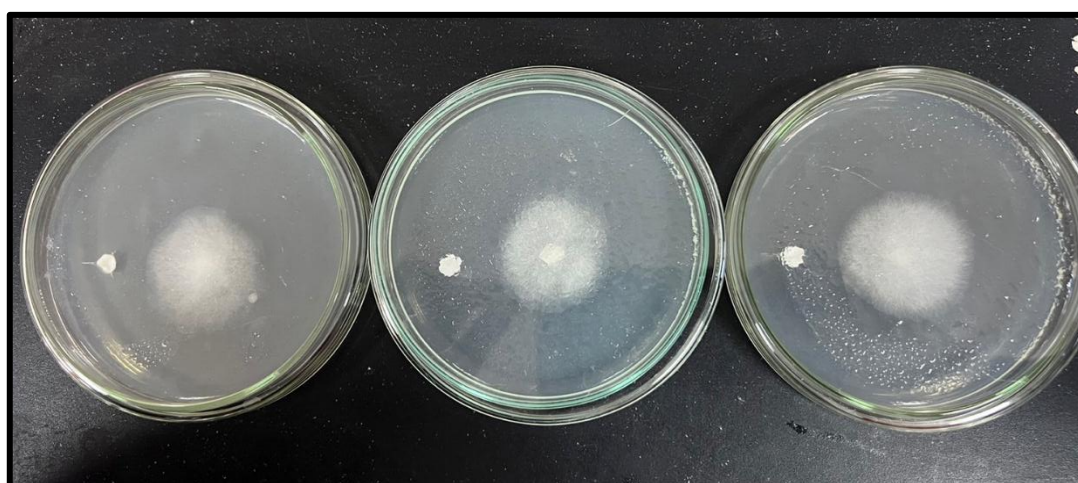
กราฟที่ 1 กราฟแสดงผลการยับยั้งเชื้อราโดยLimoneneในวันที่ 1



Limonene 0

25

50



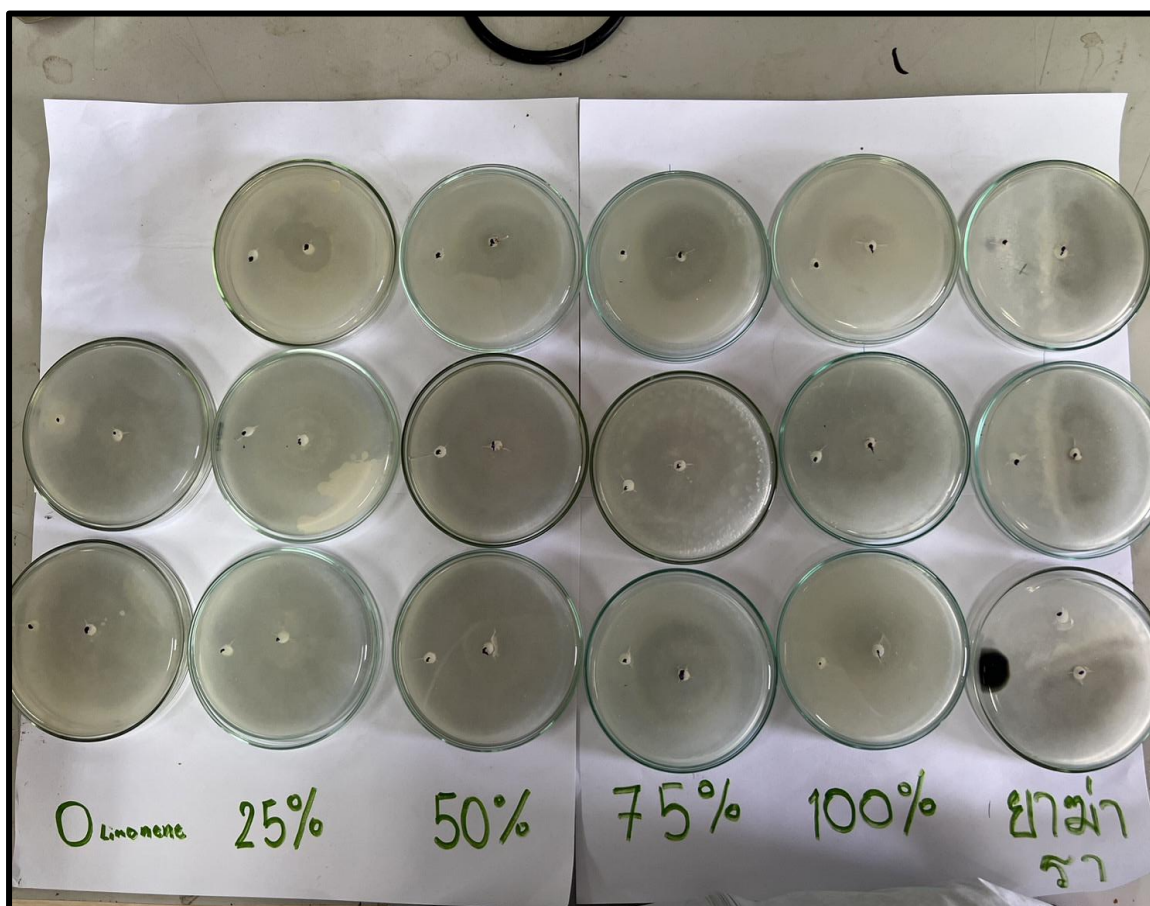
75

100

ยาฆ่าเชื้อรา

รูปแสดงผลการทดลองในวันที่ 1

และในวันที่ 2 เชื้อราขึ้นเต็มเพลททำให้ไม่สามารถวัดระยะห่างได้เหมือนวันแรกเราจึงดูจาก
ความหนาแน่นของสปอร์เชื้อราแทนและจะสังเกตเห็นได้ว่าที่ 0% 25% 50% (v/v) จะเห็นสปอร์ขึ้น
เต็มเพลทซึ่งหมายความว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ ต่างกับ 75% 100% (v/v) ที่สปอร์ของเชื้อรายัง
ไม่ขึ้นถึงบริเวณที่มี Limonene และยาฆ่าเชื้อรา สามารถยับยั้งได้ทั้งสปอร์ และไฮฟา



ภาพแสดงผลการทดลองในวันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ. 2566 เรียงตามความเข้มข้น 25% 50% 75%

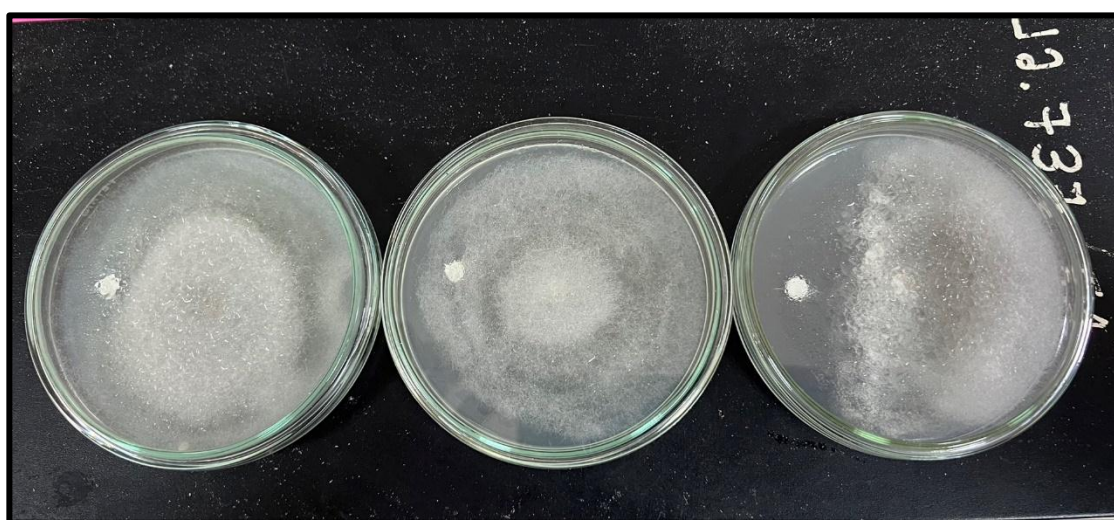
100% (v/v) กับใส่ยาฆ่าเชื้อรา(m/v) และใส่DMSOเป็นตัวควบคุม



Limonene 0

25

50



75

100

ยาฆ่าเชื้อรา

รูปแสดงผลการทดลองในวันที่ 2

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสามารถสรุปผลความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อราได้ คือ 75% และ 100%

(v/v) และที่ความเข้มข้นอื่นยังไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้

5.2 อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองในตอนที่ 1 ในการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้Limoneneในการยับยั้งเชื้อรา *Rhizopus* sp. เราได้ทดลองเปลี่ยนความเข้มข้นของLimoneneเป็น 25 50 75 100% (v/v) จึงได้ผลว่าLimoneneสามารถยับยั้งเชื้อรา *Rhizopus* sp. ได้ดีตั้งแต่ความเข้มข้น 75 % ขึ้นไป และดีที่สุดที่ 100% (v/v)

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ทดสอบกับเชื้อราชนิดอื่นๆ เพื่อขยายขอบเขตให้ครอบคลุมมากขึ้น
2. ศึกษาข้อมูลในการทำขนมปัง เพื่อทดสอบวิธีใช้Limoneneให้มีประสิทธิภาพสูงสุด
3. ทดสอบกับขนมปังจริงๆ ในกรรมวิธีต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

สายสมร ลาลอง และ พงษ์นรินทร์ ยอดสิงห์. **เรื่องการใช้น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่พบแผ่นยางพารา.** (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก :

https://li01.tci-thaijo.org/index.php/sci_ubu/article/view/86479 (วันที่สืบค้นข้อมูล:2 มิถุนายน 2566)

ผศ. ดร. ญัฐฐา เลาทกุลจิตต์และคณะ. **เรื่องการศึกษาวิจัยน้ำมันหอมระเหยสำหรับเป็นสารยับยั้งเชื้อราในกระดาษ.**(ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก

https://digital.library.tu.ac.th/tu_dc/frontend/Info/item/dc:69477 (วันที่สืบค้นข้อมูล:4 มิถุนายน 2566)

บุญญวดี จิระวุฒิ,เนตรรา สมบูรณ์แก้ว,สุพี วนศิริกุล, อัคราพร ศรีจุฑานุ และ อมรา ชินภูติ. **การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และลดปริมาณสารแอฟลาทอกซิน โดยสารออกฤทธิ์จากกระเทียม.**(ออนไลน์).เข้าถึงได้จาก

<https://li01.tci-thaijo.org/index.php/thaiagriculturalresearch/article/view/78356/62769> (วันที่สืบค้นข้อมูล : 4 มิถุนายน 2566)

ญาณีภา วัชรเทวินทร์กุล และ ชุติมา ไทยประดิษฐ์. **เรื่องประสิทธิภาพของสารสกัดจากกะลามะพร้าวในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคยอดเน่า และโรคใบจุด The efficiency of coconut shell extracts against the heart leaf rot and leaf spot diseases 2562.** (ออนไลน์).

เข้าถึงได้จาก : <https://ph02.tci-thaijo.org/index.php/past/article/view/242953> (วันที่สืบค้นข้อมูล : 4 มิถุนายน 2566)

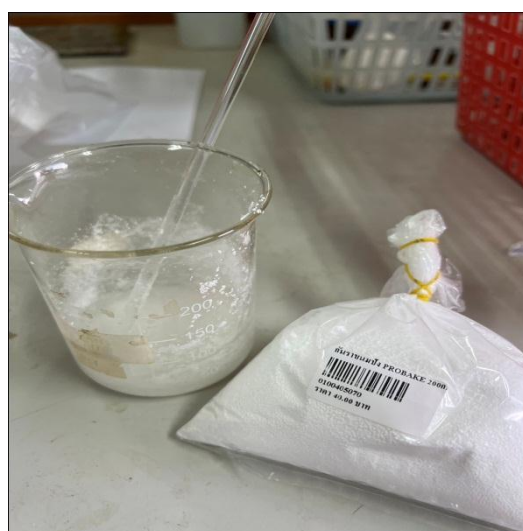
ภาคผนวก



D-LIMONENE ESSENTIAL OIL Natural



เตรียมกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม.



เตรียมยาฆ่าเชื้อรา ปริมาณ 100 มล.ก



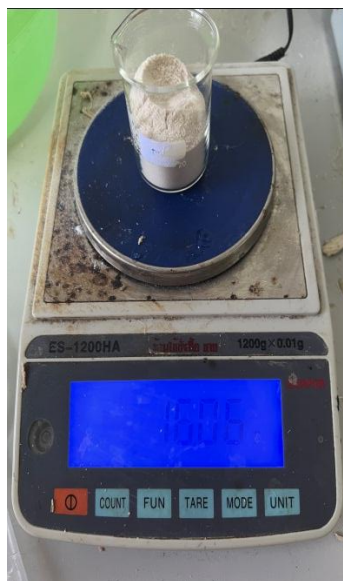
หั่นมันฝรั่งขนาดเท่าๆกัน ปริมาณ 200 ก.



น้ำมันฝรั่งไปต้ม 30 นาที



กรองเอาน้ำออก



นำน้ำที่ต้มฝรั่งและเติมผงวุ้น 16 ก. และน้ำตาลกลูโคส 20 ก.

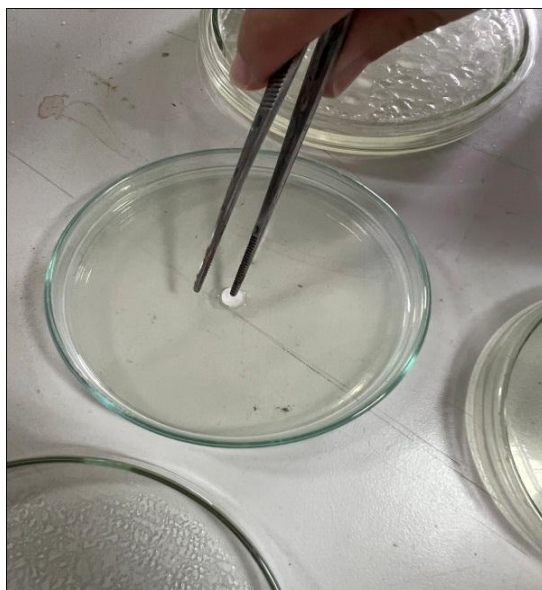
โดยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มล.



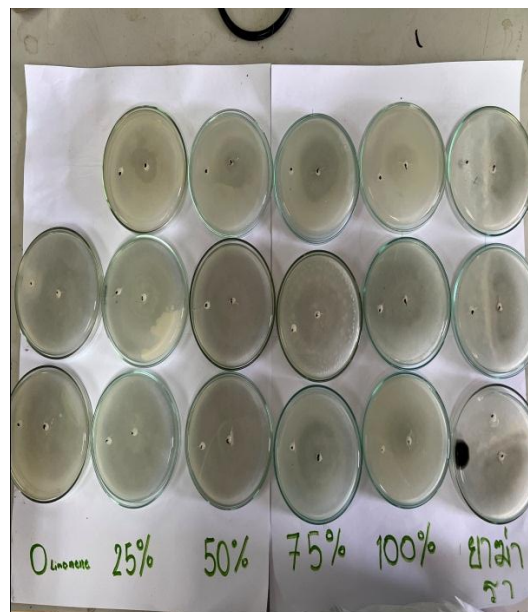
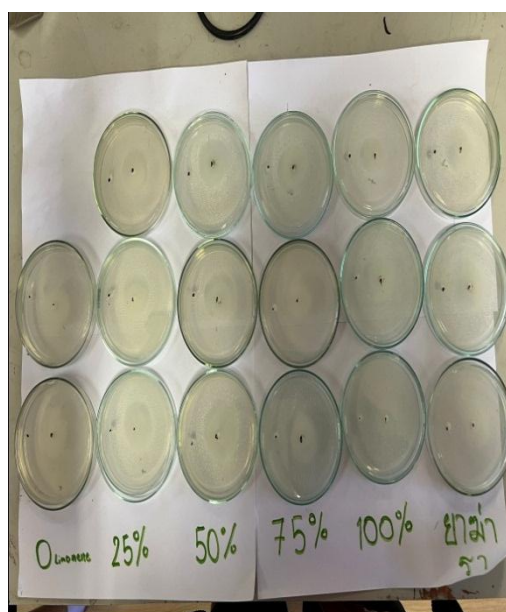
ใช้สำลีอุดปากขวดนำฟอยล์ปิดปากขวดให้สนิท



นำเพลท pda และอุปกรณ์ต่างๆไปเข้าเครื่องAutoclave ที่อุณหภูมิ 121°C 15 psi 30 นาที



เท pda ใส่เพลททิ้งให้เย็น จากนั้นนำกระดาษกรองที่จุ่มสปอร์แขวนลอยของรามาวางตรงกลางเพลท และนำกระดาษกรองที่จุ่มสารทดสอบต่างๆ มาวางให้มีระยะห่าง 4.5 ซม.



รูปแสดงผลการทดลองในวันที่ 1 และ วันที่ 2 ตามลำดับ