Thesis Title Formulation Development of Extracts from Galanga (*Alpinia galanga* Sw.), Sweetflag (*Acorus calamus* L.) and *Rhinacanthus nasutus* (Kurz.) for Controlling Anthracnose Postharvest Disease of Mango

Author Mr. Janya Jariyanusorn

Docter of Philosophy Horticulture

Examining Committee

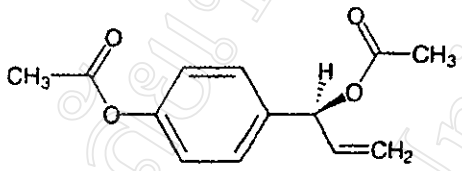
Asst. Prof. Dr. Pittaya	Sruamsiri	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Danai	Boonyakiat	Member
Asst. Prof. Dr. Vicha	Sardsud	Member
Asst. Prof. Dr. Vichian	Pooswang	Member

ABSTRACT

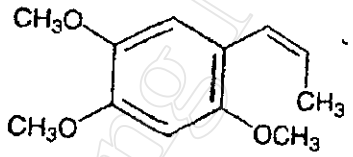
Formulation of active substance from galanga, sweetflag and *Rhinacanthus nasutus* (Kurz.) were studied to control anthracnose postharvest fruit rot in mango, which caused by fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.. The results revealed that this fungus has the identity characteristics, for which hypha spread out in many layer of ring form, compiled of conidiomata. Colony consisted of aerial mycelium, the colour varied from grey to dark grey. Sporemass was orange in colour. Conidia form was rod shape with the average size of 3.23 x 13.45 μm and acervulus size 39.5 x 41.2 μm.

The best solvent to extract the active ingredient was dichloromethane, which gave the higher oleoresin yield and also the less water residue in the product, which required less Na_2SO_4 anhydrous for dehydration. However dichloromethane crude extract from *Rhinacanthus nasutus* Kurz. showed a relative low efficiency to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., whereas those from galanga and sweetflag showed a very high efficiency.

Separation and purification of active substance from crude extracts were made by TLC and test for their antifungal efficiency by TLC-bioassay. It was found that the effective antifunngal substance remained at the R_f value of 0.38 – 0.45, 0.50 – 0.83, and 0.87 – 0.97 for the crude extract from galanga and R_f value 0.67 – 0.96 for crude extract from sweetflag. The antifungal substances were also studied for chemical structure by spectroscopy method both GC-MS and IR-resonance. Data file confirmed that the active ingredient from galanga is 1′ – acetoxychavicol acetate (ACA) with molecular structure $C_{13}H_{14}O_4$ and structural formula as followed :



In the case of sweetflag, the active ingredient was cis- β - asarone with molecular structure $C_{12}H_{16}O_3$ and structural formula



By comparing the effectiveness to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. of both substances by poison food technique and by direct application to mango fruit (dipping method), both substances showed a similar high antifungal efficiency. However β - asarone caused negative side- effect on fruit ripening by enhanced the respiration rate, which consequently decreased fruit firmness and also increased the fruit weight loss. So that ACA supposed to be the substance with very high potential for application in mango postharvest treatment. By studying on the mode of action using light microscope (LM) and transmission electron microscope (TEM). it was found that ACA strongly disturbed the membrane development in especially the tonoplast of vacuole and septate of the hyphae. More over hyphae

treated to ACA showed relative darker color of methylene blue when compared with the normal one in especially at the membrane and cytoplasm part of the fungus hyphae.

Therefore, the formulation was carried out only on ACA. It was found out that the best formulation of ACA must be in the form of emulsifiable concentrate. The best formula consists of active ingredient 23.8 % mixed with Triton X-100 3.5%, Agrisol P-135 3.2%, and Xylene 69.5%. This formulation showed the best antifungal efficiency to inhibit *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. when apply at the concentration of 570 ppm. It gave the better efficiency than benomyl, which is the conventional synthetic agrochemical normally used for dipping mango fruit before export.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาสูตรผสมสารสกัดจากข่า ว่านน้ำ และทองพันชั่ง เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว

ชื่อผู้เขียน นายจรรยา จริยานุสรณ์

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร.พิทยา	สรวมศิริ	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. คนัย	บุณยเกียรติ	กรรมการ
ผศ. ดร.วิชชา	สอาดสุด	กรรมการ
ผศ. ดร.วิเชียร	ภู่สว่าง	กรรมการ

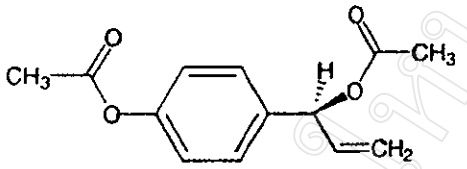
บทคัดย่อ

การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดจากข่า ว่านน้ำ และทองพันชั่ง เพื่อควบคุมโรคแอนแทรค-โนส สาเหตุโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. พบว่าเชื้อราดังกล่าวมีเอกลักษณ์ที่สำคัญคือ โคโลนี มีการเจริญเติบโตเป็นลักษณะวงแหวนหลายชั้น เส้นใยมีสีเทาอ่อนจนเทาแก่ กลุ่มของสปอร์สีส้ม โคนิเดียรูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมนหรือแหลม ขนาดเฉลี่ย 3.23 x 13.4 ไมโครเมตร เกิดบนก้านชูสปอร์ภายในโครงสร้างที่เรียกว่า acervulus ซึ่งมีขนาด 39.5 x 41.2 ไมโครเมตร

การสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชทั้ง 3 สามารถทำได้ดีที่สุด โดยใช้ dichloromethane ซึ่งจะให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดหยาบที่มี oleoresin สูงสุด และมีน้ำคงเหลือในสารสกัดหยาบน้อยที่สุด ทำให้สามารถลดการใช้ Na_2SO_4 anhydrous ดึงน้ำออกจากสารสกัดหยาบได้ อย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบใน dichloromethane จากทองพันชั่งไม่สามารถควบคุมเชื้อราได้ผลดีเท่ากับสารสกัดหยาบจากข่าและว่านน้ำ

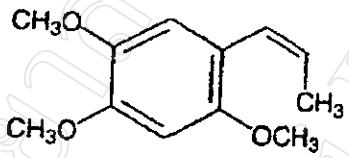
จากการศึกษาเพื่อทำสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบ และตรวจสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราโดยวิธี TLC-bioassay พบว่าสารออกฤทธิ์ควบคุมเชื้อราได้ดีจะอยู่ที่ค่า R_f 0.38 – 0.45, 0.50 – 0.83 และ 0.87 – 0.97 สำหรับสารสกัดหยาบจากข่า และค่า R_f 0.67 – 0.96 สำหรับสารสกัดหยาบจากว่านน้ำ

ซึ่งเมื่อตรวจสอบสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยวิธี spectroscopy ทั้ง GC-MS และ IR-resonance พบว่าสารออกฤทธิ์จากข่าคือ 1′ – acetoxychavicol acetate (ACA) มีสูตรโมเลกุล $C_{13}H_{14}O_4$ และสูตร



โครงสร้างทางเคมี คือ

ส่วนสารออกฤทธิ์จากว่านน้ำคือ cis - β - asarone มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{12}H_{16}O_3$ และสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ



เมื่อนำสารทั้งสองชนิดไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการโดยวิธี poison food technique และโดยวิธีจุ่มผลมะม่วง พบว่าสารทั้งสองชนิดสามารถควบคุมเชื้อราดังกล่าวได้ดีใกล้เคียงกัน แต่สาร β - asarone จะมีผลข้างเคียงต่อการสุกของผล โดยไปเร่งอัตราการหายใจ ทำให้เปลือกและเนื้อผลนิ่มเร็วกว่าปกติ นอกจากนี้ยังทำให้น้ำหนักของผลสูญหายเร็วกว่าปกติอีกด้วย ดังนั้นสาร 1′ – acetoxychavicol acetate (ACA) จึงมีแนวโน้มการใช้ประโยชน์ดีที่สุด ซึ่งสารชนิดนี้จะออกฤทธิ์ทำลายเชื้อราได้ดี โดยเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่าไปมีผลทำให้พัฒนาการของส่วน membrane ผิดปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนของ tonoplast และส่วนของผนังกั้นเซล (septate) เชื้อราที่ได้รับสาร ACA จะติดสีย้อม methylene blue เข้มกว่าปกติทั้งในส่วนของ membrane และส่วนของ cytoplasm

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ (formulation) จึงดำเนินการเฉพาะสาร ACA พบว่า ผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์ที่ดีที่สุดจะต้องอยู่ในรูปของ emulsifier concentrate (EC) โดยมีส่วนผสมหลักได้แก่เนื้อสารออกฤทธิ์ 23.8% ผสมกับ Triton X-100 3.5%, Agrisol P-135 3.2%, และ Xylene 69.5% สารผสมที่ได้นี้จะมีอัตราการใช้ที่เหมาะสมที่ระดับความเข้มข้น 540 ส่วนต่อล้าน ซึ่งจะควบคุมเชื้อรา

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Sacc. ได้ดีมากโดยผลมะม่วงมีค่าความเสียหายเนื่องจากเชื้อราดังกล่าว ลดลงต่ำกว่าการใช้สาร benomyl ซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้ควบคุมเชื้อราชนิดนี้กับมะม่วงเพื่อการส่งออกในปัจจุบัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University