

บทนำ

โรคติดเชื้อเป็นปัญหาที่สำคัญทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากเชื้อดื้อยา ซึ่งได้ก่อให้เกิดปัญหาในการรักษาเป็นอย่างมาก จึงมีความจำเป็นที่จะต้องแสวงหายาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ มาใช้ทดแทนยาเดิมที่ใช้รักษาไม่ได้ผล เชื้อราเป็นแหล่งของสารต้านจุลินทรีย์ที่รู้จักกันมานานตั้งแต่มีการค้นพบยาเพนนิซิลลิน ราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่จะอยู่ร่วมกับพืชในลักษณะ symbiosis โดยพืชจะเป็นแหล่งที่อยู่และให้อาหารแก่เชื้อรา ในขณะที่เชื้อราจะผลิตสารออกมาเพื่อป้องกันตัวเองจากศัตรูพืช สัตว์ แมลง และจุลินทรีย์ ซึ่งพืชจะได้รับประโยชน์ด้วย (Huang *et al.*, 2001) มีรายงานการศึกษาพบว่า 27-75% ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากราเอนโดไฟท์เป็นสารใหม่ (Schulz *et al.*, 2002; Strobel *et al.*, 2003) โดยสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ด้านอนุมูลอิสระ ลดปริมาณน้ำตาลในเลือด และฤทธิ์อื่น ๆ (Sterile *et al.*, 1993 and 1995; Li *et al.*, 1996; Strobel *et al.*, 1996; Strobel *et al.*, 1999; Li and Strobel, 2001; Li *et al.*, 2001; Strobel, 2003, Strobel and Daisy, 2003; Sette *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2008) การศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จึงน่าที่จะเป็นแนวทางในการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ การเกษตรและการอุตสาหกรรม (Bacon and White, 2000; Strobel and Daisy, 2003)

สำหรับในประเทศไทยมีผู้รายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์หลายท่านด้วยกันเช่น Wiyakrutta *et al.* (2004) รายงานว่า ราเอนโดไฟท์หลายชนิดที่แยกได้จากสมุนไพรไทย มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเซลล์มะเร็ง และเชื้อมาลาเรีย Phongpaichit *et al.* (2006) ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ จากเนื้อเยื่อพืชสกุล *Garcinia* 5 ชนิดจากภาคใต้ของประเทศไทย ได้เชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันทั้งหมด 377 isolates เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ พบว่า 70 isolates (18.6%) มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคน้อย 1 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากราเอนโดไฟท์ *Botryosphaeria* sp. มีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC25923, methicillin-resistant *S. aureus* และ *Micrococcus gypseum* ได้ดี โดยมีค่า MIC เท่ากับ 32, 64 และ 2 µg/ml ตามลำดับ Laorpaksa *et al.* (2008) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกจากสมุนไพรไทย พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ได้ 106 isolates จากพืชสมุนไพร 35 ชนิด และเมื่อนำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการแพร่จากแผ่นกระดาษกลมบนอาหารแข็ง พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ จำนวน 54 isolates (50.94%) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด โดยมีเชื้อที่สร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Bacillus cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC6538P, *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC27253 และ *Escherichia coli* ATCC25922 จำนวน 33 (61.11%), 23 (42.59%), 14 (25.93%) และ 4 isolates (7.41%) ตามลำดับ นอกจากนั้นยังมีแบคทีเรียเอนโคไฟท์ 14 isolates (25.93%) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Candida albicans* ATCC10231 ได้

ต้นจิกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Barringtonia acutangula* L. Gaertn. อยู่ในวงศ์ Barringtoniaceae มีผู้ศึกษาสรรพคุณทางยาของพืชในวงศ์นี้หลายคณะด้วยกัน โดยพบว่าพืชในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ต้านเซลล์มะเร็ง และต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างการศึกษาดังกล่าว ได้แก่

Jutiviboonsook *et al.* (2007) ศึกษาสารสกัดจากใบของต้น *B. maunwongyathiae* ที่ขึ้นในป่าจังหวัดกระบี่ ได้สาร triterpenes 10 ชนิด, steroids 3 ชนิด และอนุพันธ์ของวิตามินอีอีก 1 ชนิด จากการทดสอบสารดังกล่าวพบว่าสาร taraxerol, 3-(E)-coumaroyltaraxerol และ α -tocopherylquinone มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและมีศักยภาพในการต้านมะเร็ง

Burton *et al.* (2003) รายงานว่าผลของ *B. asiatica* (Linnaeus) Kurz มีสาร oleanane glycoside และ ranuncoside ซึ่งมีความเป็นพิษต่อปลา (piscicidal activity) ซึ่งสอดคล้องกับ Huang *et al.* (2004) ที่รายงานว่าผลของ *B. asiatica* (Linnaeus) Kurz สามารถใช้ในการเบื่อปลาได้ นอกจากนั้นยังใช้ผลิตเป็นแป้ง และน้ำมันในผลยังสามารถใช้เป็นสารเรืองแสง (illuminant) ได้

Rahman *et al.* (2005) พบว่าสารสกัดจากเปลือกของต้น *B. acutangula* มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และรา โดยมีฤทธิ์เทียบเท่ากับยาปฏิชีวนะ kanamycin และ fluconazole

Mojica and Micor (2007) ศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากผลของ *B. asiatica* ซึ่งประกอบด้วยสาร terpenoids และ saponins มีฤทธิ์ในการฆ่า brine shrimp (*Artemia salina* L.) ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ผู้วิจัยจึงเสนอว่าสารสกัดดังกล่าวที่น่าที่จะนำมาพัฒนาเป็นสารต้านเนื้องอก และเซลล์มะเร็งได้

ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราเอนโคไฟท์จากต้นจิก โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และคาดว่าจะสามารถตรวจพบเชื้อราเอนโคไฟท์จากต้นจิกที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และพัฒนาให้เกิดคุณค่าทางเศรษฐกิจต่อไปได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกเชื้อ และคัดเลือกราเอนโคไฟท์จากต้นจิก ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบจากเส้นใยรา
3. เพื่อจำแนกชนิดราที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุด

วิธีการทดลอง

1. การเก็บพืชตัวอย่าง

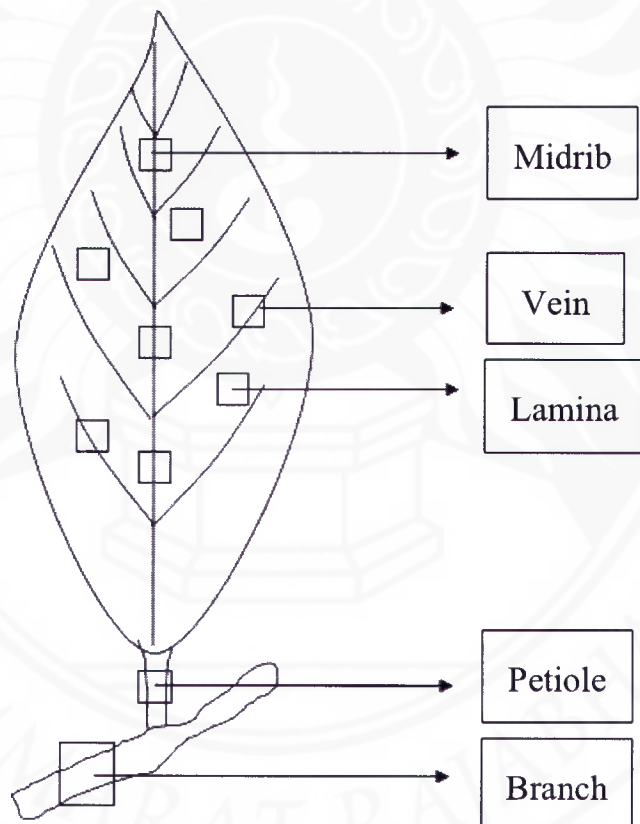
ทำการเก็บตัวอย่างพืช ในจังหวัดนครศรีธรรมราช ชุมพร และสุราษฎร์ธานี โดยเก็บตัวอย่างต้นละ 5 ใบ และ 5 กิ่ง โดยในแต่ละจังหวัด จะเก็บตัวอย่างจังหวัดละ 3 ต้น (ตารางที่ 1) ตัวอย่างใบพืชที่เก็บมีลักษณะสมบูรณ์ สีเขียวเข้ม และไม่มีลักษณะอาการของโรค (ภาพที่ 1) นำตัวอย่างพืชกลับมาแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ทันที โดยนำตัวอย่างพืชมาล้างด้วย detergent ผึ่งให้แห้งภายใต้ laminar air flow เมื่อตัวอย่างพืชแห้งแล้ว ใช้ใบมีดผ่าตัดจุ่ม 95% ethanol นำไปผ่านเปลวไฟแล้วตัดส่วนของ vein, midrib, lamina ให้มีขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร, petiole ให้มีความยาว 1 เซนติเมตร และ branch ให้มีความหนา 0.3 เซนติเมตร เป็นจำนวน 2, 3, 3, 4 และ 10 ชิ้น ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างต้นจิก ที่นำมาแยกราเอนโดไฟต์

จังหวัด	ตำบล อำเภอ	รหัสพืช	วันที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะของพืช
นครศรีธรรมราช	ต.ท่าดี อ. ลานสกา	1NK	22 ส.ค. 2552	ต้นสูง 8 เมตร อายุประมาณ 25 ปี
	ต.ท่าจั่ว อ. เมือง	2NK	22 ส.ค. 2552	ต้นสูง 5 เมตร อายุประมาณ 15 ปี
	ต.ท่าช้าง อ.ท่าศาลา	3NK	22 ส.ค. 2552	ต้นสูง 4 เมตร อายุประมาณ 10 ปี
ชุมพร	ต.ละแม อ. ละแม	1CH	27 ส.ค. 2552	ต้นสูง 9 เมตร อายุประมาณ 35 ปี
	ต.ทุ่งหลวง อ. ละแม	2CH	27 ส.ค. 2552	ต้นสูง 4 เมตร อายุประมาณ 10 ปี
	ต.ทุ่งควัค อ. ละแม	3CH	27 ส.ค. 2552	ต้นสูง 3 เมตร อายุประมาณ 10 ปี
สุราษฎร์ธานี	ต.กันตูลี อ. ท่าชนะ	1SR	27 ส.ค. 2552	ต้นสูง 3 เมตร อายุประมาณ 10 ปี
	ต.ป่าแ อ.ไชยา	2SR	27 ส.ค. 2552	ต้นสูง 8 เมตร อายุประมาณ 25 ปี
	ต.เสวียด อ. ท่าฉาง	3SR	27 ส.ค. 2552	ต้นสูง 7 เมตร อายุประมาณ 25 ปี



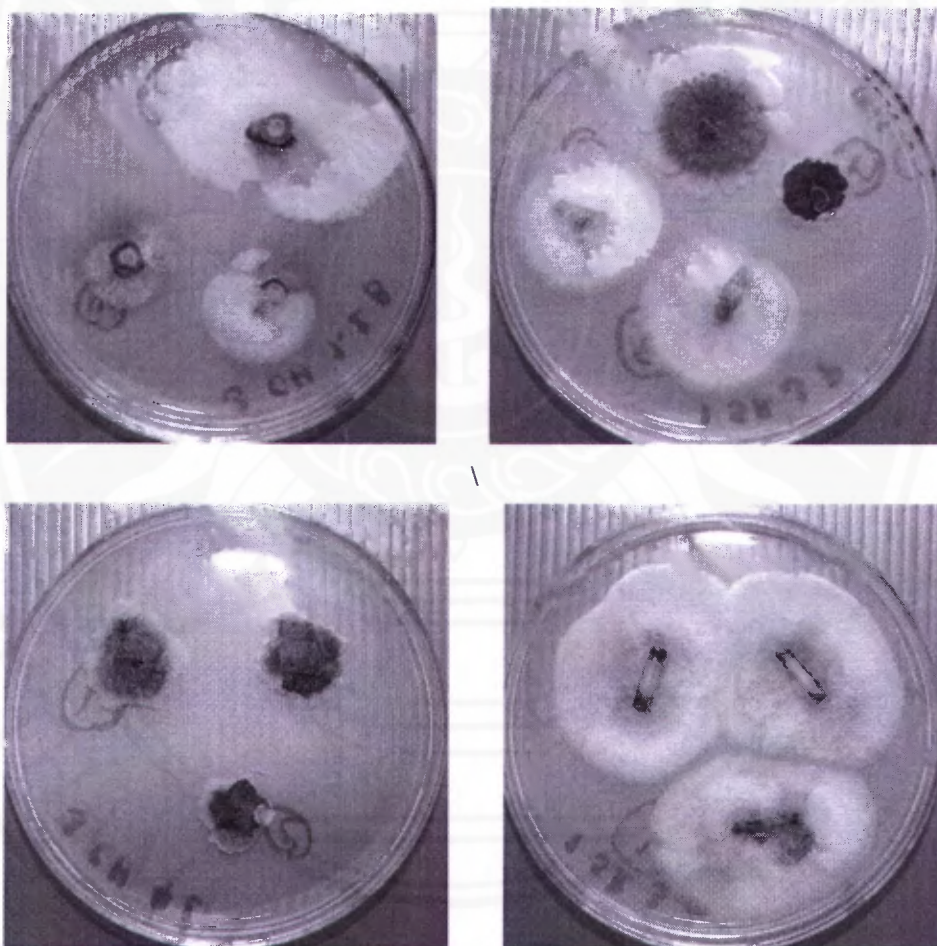
ภาพที่ 1 ตัวอย่างใบและกิ่งของต้นจิก



ภาพที่ 2 ตำแหน่งการตัดชิ้นส่วนตัวอย่างจากใบพืชเพื่อใช้ในการแยกกราเอนโดไฟท์

2. การแยกเชื้อรา

นำตัวอย่างพืชที่ตัดเป็นชิ้น ๆ มากำจัดเชื้อบริเวณผิว โดยแช่ใน 95% ethanol นาน 30 วินาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน 5% sodium hypochlorite นาน 5 นาที แล้วนำไปแช่ใน 95% ethanol อีกครั้ง นาน 30 วินาที นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นาน 3-5 วินาที แล้วจึงนำตัวอย่างพืชไปวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่เติมยา tetracycline และ ampicillin ความเข้มข้น 50 mg/L นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตผลทุกวัน เมื่อพบว่าการเจริญของเชื้อราออกมาจากชิ้นส่วนตัวอย่างพืช (ภาพที่ 3) ทำการตัดส่วน hyphal tip ของเชื้อรา ภายใต้กล้อง stereo zoom นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ โดยทำการเก็บตัวอย่างเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน นับจากวันแรกที่พบการงอกของเชื้อราจากชิ้นส่วนตัวอย่าง เมื่อแยกเชื้อราได้บริสุทธิ์แล้ว (ภาพที่ 4) ทำการเก็บเชื้อราใน PDA slant ที่อุณหภูมิ 4 °C



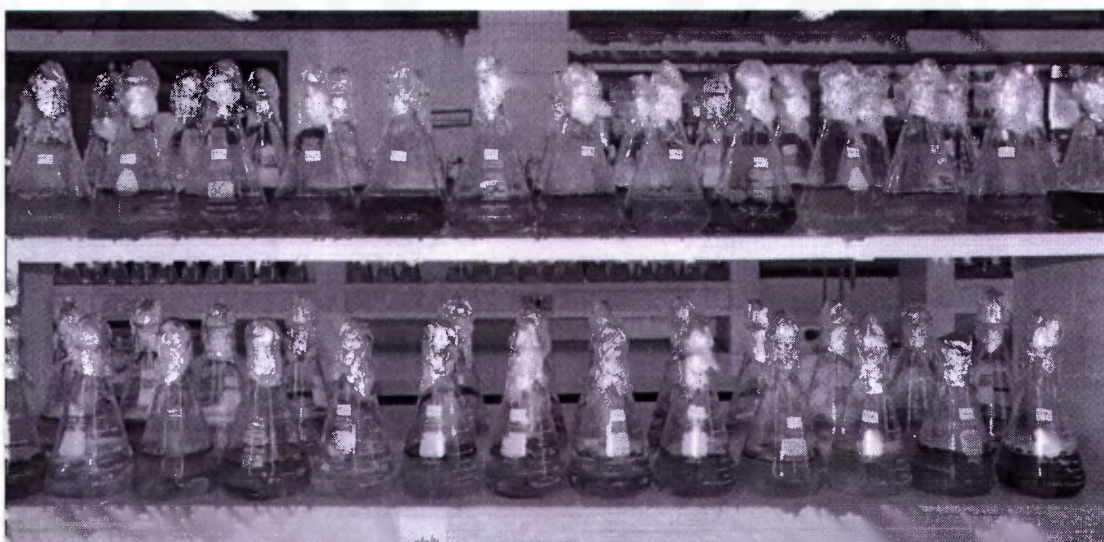
ภาพที่ 3 ตัวอย่างราเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืช



ภาพที่ 4 ตัวอย่างราเอนโดไฟท์ที่แยกได้

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลวเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

คัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ ซึ่งมีลักษณะของโคโลนี ที่แตกต่างกัน มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 3-4 วัน หรือจนกว่าจะพบว่าการเจริญของโคโลนีของเชื้อราใช้ใบมีดผ่าตัดจุ่ม 95% ethanol นำไปผ่านเปลวไฟ แล้วรอให้เย็น หลังจากนั้นนำไปตัดชิ้นส่วนบริเวณขอบโคโลนี ให้มีขนาดชิ้นละ 1x1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 300 ml ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 ml นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 5) แล้วเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อรา เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น



ภาพที่ 5 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลว

4. การสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราและเส้นใยราด้วยตัวทำละลายทางเคมี

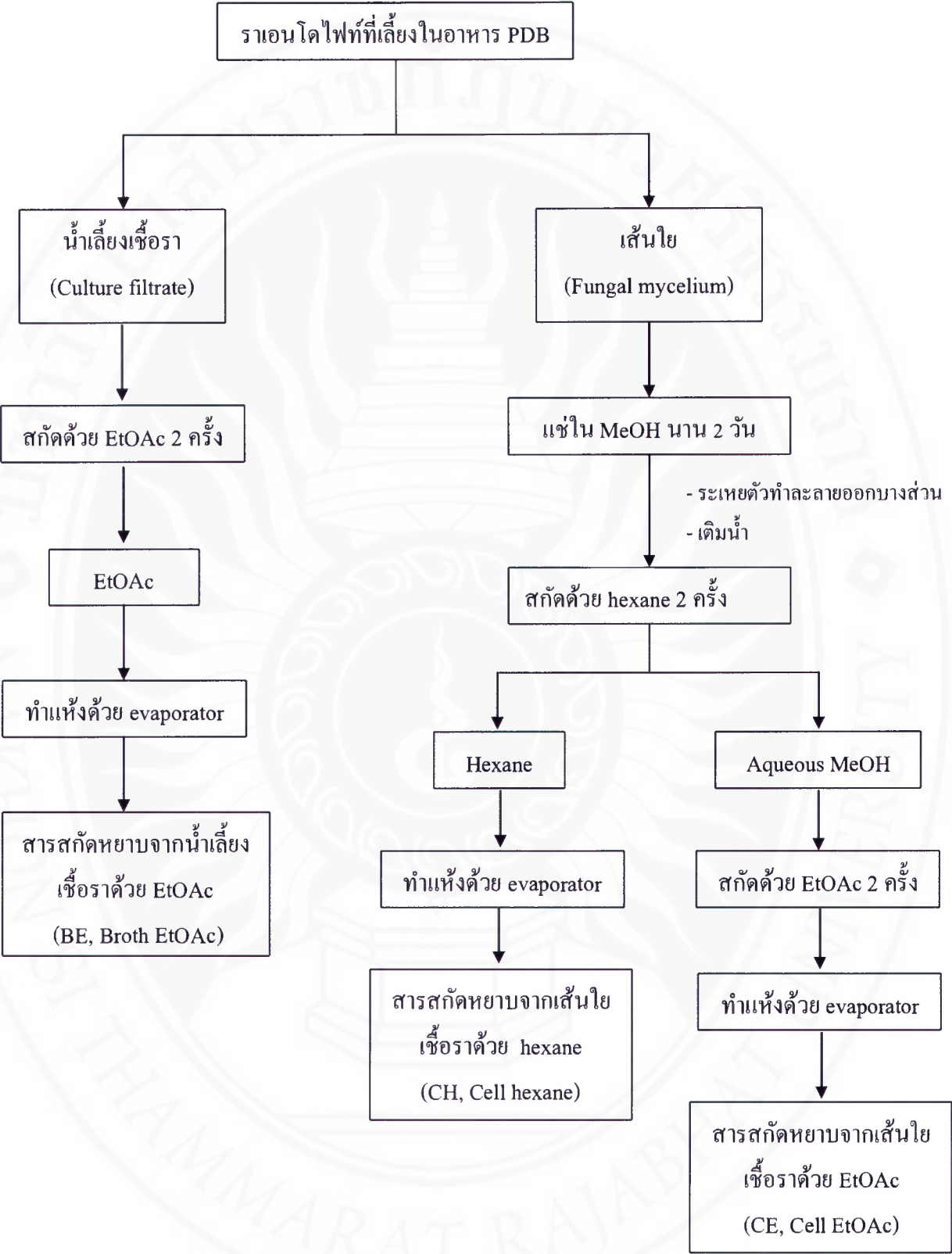
นำน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้จากการทดสอบเบื้องต้น ไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เพื่อแยกส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยออกจากกัน จากนั้นจึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราไปสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี เพื่อหาสารต้านจุลินทรีย์ที่เชื้อราเอนโดไฟท์ชนิดนั้น ๆ สร้างขึ้น ดังนี้คือ

4.1 การสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์

ทำการสกัดโดยใช้ ethyl acetate (EtOAc, AR grade) โดยใช้อัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อราต่อ EtOAc เท่ากับ 2:1 ทำการสกัดทั้งหมด 2 ครั้ง แล้วนำ EtOAc ที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมารวมกันแล้วใส่สารกำจัดน้ำ (dehydrating agent) คือ sodium sulphate anhydrous ลงไป หลังจากนั้นกรองแล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิประมาณ 40-45 °C ได้สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ (BE, Broth EtOAc) (ภาพที่ 6) แล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และตรวจองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC และ ^1H NMR

4.2 การสกัดเส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟท์

ทำการสกัดคล้ายกับการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อรา โดยนำเส้นใยของเชื้อราแช่ใน methanol (MeOH, commercial grade) เป็นเวลา 2 วัน นำสารละลาย MeOH ไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหยตัวทำละลายบางส่วนออกไป จากนั้นเติมน้ำลงไป แล้วนำไปสกัดด้วย hexane (AR grade) ในอัตราส่วน 2:1 โดยทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำ hexane ที่ได้จากการสกัดไประเหยแห้ง หลังจากนั้นนำสารละลาย aqueous MeOH ที่ผ่านการสกัดด้วย hexane แล้ว นำไปสกัดต่อด้วย EtOAc ในอัตราส่วน 2:1 เช่นกัน โดยสกัดด้วย EtOAc 2 ครั้ง ซึ่งจากการสกัดดังกล่าวจะได้สารสกัด 2 ส่วน คือ CH (Cell hexane) และ CE (Cell EtOAc) ตามลำดับ (ภาพที่ 6) นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และตรวจองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วย TLC และ ^1H -NMR



ภาพที่ 6 แผนภาพการสกัดสารทางเคมีของราเอนโคไฟท์ ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

5.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น สำหรับน้ำเลี้ยงเชื้อรา ด้วยวิธี agar well diffusion (Lorian, 1996)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

เตรียม inoculum ด้วยการ streak เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC29523, Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) SK1, *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas. aeruginosa* ATCC27853 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) และเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC90028 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabourod dextrose agar (SDA) และบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ATCC90012 จะ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA เช่นเดียวกับ *C. albicans* แต่จะบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง เชื้อเชื้อ 3-5 single colonies ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) สำหรับแบคทีเรีย และ Sabourod dextrose broth (SDB) สำหรับยีสต์ นำไป incubate ไว้ที่ 35 °C นาน 3-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 และ 2.0 Mcfarland standard สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับด้วย normal saline solution (NSS) ทำการลงเชื้อโดยใช้ sterile cotton swab จุ่มเชื้อ แล้วบิดให้หมาด ทำการ swab ให้ทั่วจานอาหารที่มีความหนา 4 mm โดยแบคทีเรียใช้อาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) และยีสต์ใช้ Sabourod dextrose agar (SDA) ทำการเจาะรูอาหาร ด้วยปลายที่จับของ Pasteur's pipette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm โดยทำทั้งหมด 17 หลุมต่อจาน หลังจากนั้นหยดน้ำเลี้ยงเชื้อของราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงใน PDB ที่อายุ 3 สัปดาห์ ปริมาตร 80 μ l ลงไปในหลุมที่เจาะไว้แล้ว โดยชุดควบคุมทดสอบด้วยแผ่นยาปฏิชีวนะ สำหรับแบคทีเรีย *S. aureus* ใช้ยา vancomycin 30 μ g/แผ่น *E. coli* ATCC25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 ใช้ยา gentamicin 10 μ g/แผ่น ส่วนยีสต์ใช้ amphotericin B 10 μ g/แผ่น นำไป incubate ที่ 35 °C 18-24 ชั่วโมง สำหรับ *C. neoformans* ATCC90012 นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการอ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone โดยใช้ vernier caliper หน่วยการวัดเป็น มิลลิเมตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา (ดัดแปลงจากวิธีการของ Huang et al., 2000)

เตรียม inoculum ของเชื้อรา โดยเลี้ยง *M. gypseum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA นำไป incubate ที่ 25°C 3-4 วัน ให้ได้ colony ที่มีลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 cm หลังจากนั้น ใช้ pasteur's pipette เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่รอบ ๆ โคโลนี ของเชื้อราที่กำลังเจริญเติบโต โดย

เจาะห่างจากขอบของ colony ประมาณ 0.5 cm แล้วหยอดน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงใน PDB ที่อายุ 3 สัปดาห์ ปริมาตร 80 μ l ลงไปในหลุมที่เจาะไว้แล้ว โดยชุดควบคุมทดสอบด้วยแผ่นยาปฏิชีวนะ miconazole nitrate 30 μ g/แผ่น นำไป incubate ที่ 25 °C 3-4 วัน สังเกตผลการยับยั้งเชื้อทุกวัน หากมีการยับยั้งจะพบ inhibition zone เป็นรอยเว้าหรือพบว่าเชื้อจะไม่สามารถเจริญผ่านหลุมไปได้

5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ สำหรับสารสกัดหยาบจากเชื้อราเอนโดไฟท์ โดยวิธี broth microdilution

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานโดยการ streak เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC29523, MRSA SK1, *E. coli* ATCC25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC90028 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA และบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *C. neoformans* ATCC90012 จะ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA เช่นเดียวกับ *C. albicans* แต่จะบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนด เชื้อเชื้อ 3-5 single colonies ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) สำหรับแบคทีเรีย และ อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 สำหรับเชื้อยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 และ 2.0 Mcfarland standard สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับด้วย normal saline solution (NSS)

สำหรับเชื้อรา *M. gypseum* จะเตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ หรือจนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์ ทำการเก็บสปอร์โดยการใส่ลูกแก้วที่ปราศจากเชื้อกลิ้งบนผิวโคโลนีเชื้อราเพื่อให้สปอร์หลุดออกจากเส้นใย เติมน้ำ NSS แล้วปรับความขุ่นของ spore suspension ให้ได้ความเข้มข้น $4 \times 10^3 - 5 \times 10^4$ spore/ml โดยใช้ haemocytometer

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 μ g/ml (ดัดแปลงจาก CLSI, 2000)

นำสารสกัดหยาบจากเชื้อราเอนโดไฟท์มาละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/ml เก็บไว้เป็น stock solution ที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อจะใช้ทำการทดสอบ นำสารละลายที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว มาละลายต่อด้วย DMSO ในอัตราส่วน 1:10 และละลายต่ออีกครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton broth (MHB) ในอัตราส่วน 1:25 ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 400 μ g/ml ชุดสารสกัดหยาบ 50 μ l ใส่ในแต่ละหลุมของ sterile

96-well microtiter plate ความเข้มข้นละ 2 หลุม จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน (0.5 MF) มาเจือจางด้วย NSS ในอัตราส่วน 1:200 ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นของแบคทีเรียมาตรฐานประมาณ 5×10^5 CFU/ml คูดสารละลายแบคทีเรียมาตรฐาน 50 μ l ใส่ในแต่ละหลุม ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ 200 μ g/ml บ่ม plate ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม 10 μ l ของ 0.18% resazurin indicator ลงไปในแต่ละหลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ อ่านผลการทดสอบเมื่อครบเวลาที่กำหนด

ใช้ยา vancomycin และ gentamicin ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 4 μ g/ml เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกและใช้ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดสำหรับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 μ g/ml (ดัดแปลงจาก CLSI, 2002a)

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อยีสต์ เช่นเดียวกับแบคทีเรีย เพียงแต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 และบ่ม microtiter plate ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. albicans* และ 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง สำหรับเชื้อ *C. neoformans* เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงเติม 10 μ l ของ 0.18% resazurin indicator ลงไปในแต่ละหลุม และทำการอ่านผลการทดสอบหลังจากที่บ่ม plate ไว้ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

ใช้ยา amphotericin B ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 4 μ g/ml เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกในการยับยั้งยีสต์และใช้ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัด

การทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 μ g/ml (ดัดแปลงจาก CLSI, 2002b)

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อรา เช่นเดียวกับแบคทีเรีย เพียงแต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 และบ่ม microtiter plate ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 6 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงเติม 10 μ l ของ 0.18% resazurin indicator ลงไปในแต่ละหลุม และทำการอ่านผลการทดสอบหลังจากที่บ่ม plate ไว้ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 25 °C

ใช้ยา miconazole ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 4 μ g/ml เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกในการยับยั้งราและใช้ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัด

ในการอ่านผลการทดสอบ สังเกตการเปลี่ยนสีของ resazurin ตามวิธีของ Drummond and Waigh (2000) ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อได้ (ผลบวก) resazurin จะมีสีน้ำเงินหรือสีม่วงเหมือนเดิม แต่ถ้าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (ผลลบ) เชื้อจะสามารถเติบโตและเปลี่ยนสี resazurin ให้เป็นสีชมพู

นำสารสกัดซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml ไปทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) หรือ minimal fungicidal concentration (MFC)

5.3 การหาค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์

การหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบใช้วิธี broth microdilution ที่ดัดแปลงจาก CLSI M7 - A4 (CLSI, 2000) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ดัดแปลงจาก CLSI MA27 - A2 (CLSI, 2002c) สำหรับเชื้อยีสต์ และดัดแปลงจาก CLSI M38 - A (CLSI, 2002b) สำหรับเชื้อรา โดยทำการเจือจางสารสกัดหยาบด้วยวิธี serial dilution โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 128 µg/ml และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 64, 32, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 µg/ml ตามลำดับ

หลังจากบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ซึ่งจะแสดงผลเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วง คือค่า MIC

สำหรับสารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 128 µg/ml จะรายงานว่ามีค่า MIC เท่ากับ 200 µg/ml

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียหรือรา (MBC หรือ MFC) ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์จะทำโดยนำสารละลายจากหลุม microtiter plate ที่มีค่าความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับค่า MIC ไป streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA สำหรับเชื้อยีสต์และรา นำไปบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหาร คือค่า MBC และความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อยีสต์หรือราเจริญบนอาหาร คือค่า MFC

6. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH[•] ของสารสกัด

นำสารสกัดแต่ละชนิดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น โดยการทดสอบความสามารถกำจัดอนุมูล DPPH[•] (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ที่มีสมบัติคงตัวตามวิธีการของ Yamazaki *et al.* (1994) โดยเจือจางสารสกัดใน 95% ethanol ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ แล้วนำมาผสมกับสารละลาย 50 μ M DPPH[•] ในเอทานอล ปริมาตรเท่ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐานคือ BHT (butylated hydroxytoluene) และชุดควบคุมซึ่งเดิม 95% ethanol ลงไปแทนสารสกัด นำค่าเฉลี่ยที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดไปหา % scavenging จากสูตร

$$\% \text{ scavenging} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

จากนั้นคำนวณหาค่า IC₅₀ (ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูล DPPH[•] ไป 50%) จากการทำ linear regression analysis ของ dose-response curve หรือกราฟระหว่าง % scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัด

6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล OH[•] ของสารสกัด

ทำการทดสอบความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูล OH[•] ซึ่งเป็นอนุมูลที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ชีวโมเลกุลต่าง ๆ ได้มากที่สุด (Halliwell, 1999) ตามวิธีการของ Aruoma (1994) โดยนำสารสกัดที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน มาผสมกับสารละลายของ 12 μ M deoxyribose, 100 μ M ascorbic acid และ 100 μ M FeCl₃ ใน PBS (phosphate buffer-saline), pH 7.4 หลังจากบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที เติม 1% (w/v) thiobarbituric acid ใน 50 mM NaOH ที่มี 2.8% (w/v) trichloroacetic acid อยู่ด้วยลงไป ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปราศจากสารสกัด นำค่าเฉลี่ยที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดไปหา % scavenging จากสูตร

$$\% \text{ scavenging} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

จากนั้นคำนวณหาค่า IC₅₀ (ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูล OH[•] ไป 50%) ในทำนองเดียวกับข้อ 6.1

7. การจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา

เลือกศึกษาเฉพาะราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ที่ดี หรือสร้างสารที่มี NMR profile ที่น่าสนใจ โดยการนำเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) เมื่อราเจริญและมีลักษณะโคโลนีที่เด่นชัด นำมาบันทึกภาพ บันทึกลักษณะ วัดขนาดการเจริญ และทำ slide culture เพื่อดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้าง สืบพันธุ์ทั้งชนิดมีเพศและไม่มีเพศภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำไปจำแนกเปรียบเทียบกับขนาด และลักษณะใน Compendium of Soil Fungi Volume I (Domsch et al., 1993) และ Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett and Hunter, 1998)

ผลการทดลอง

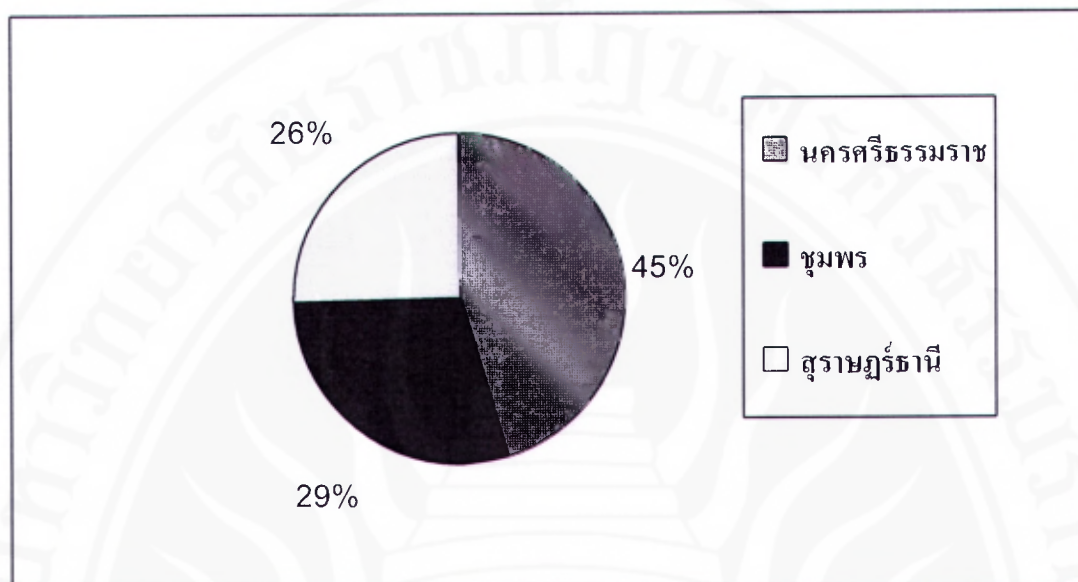
1. การแยกราเอนโดไฟท์จากต้นจิก

ในการแยกราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างต้นจิก จากจังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี และชุมพร จังหวัดละ 3 ต้น รวม 9 ต้น พบว่า สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ 392 ไอโซเลต เป็นเชื้อที่แยกได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราชมากที่สุดเป็นจำนวน 178 ไอโซเลต (45%) รองลงมาคือ จากจังหวัดชุมพรจำนวน 114 ไอโซเลต (29%) และจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีน้อยที่สุด จำนวน 100 ไอโซเลต (26%) (ตารางที่ 2 และภาพที่ 7)

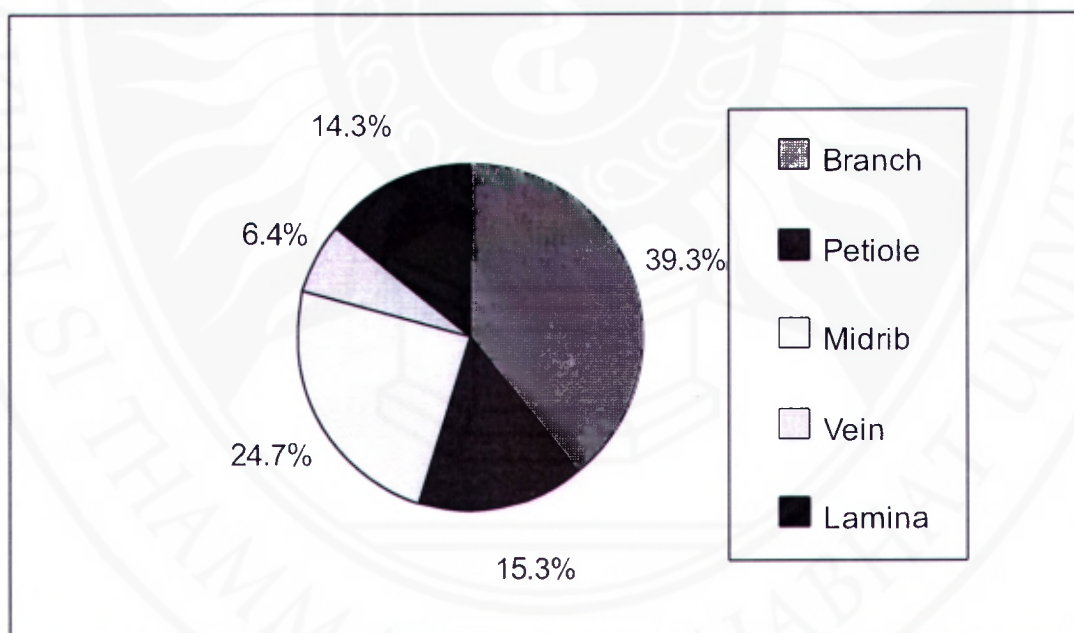
เมื่อพิจารณาถึงชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยกราเอนโดไฟท์ พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ เป็นเชื้อราที่ได้มาจากส่วนของกิ่ง (branch) มากที่สุด จำนวน 154 ไอโซเลต รองลงมาคือ จากส่วนของเส้นกลางใบ (midrib) ก้านใบ (petiole) ผิวใบ (lamina) และเส้นใบ (vein) ซึ่งมีจำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ จำนวน 97 (24.7%), 60 (15.3%), 56 (14.3%) และ 25 (6.4%) ไอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 8)

ตารางที่ 2 จำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นจิก

จังหวัด	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นจิก					
	Branch	Petiole	Vein	Lamina	Midrib	รวม
นครศรีธรรมราช	76	23	20	23	36	178
ชุมพร	38	22	2	17	35	114
สุราษฎร์ธานี	40	15	3	16	26	100
รวม	154	60	25	56	97	392



ภาพที่ 7 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราเอนโคไฟท์ที่แยกได้จากต้นจิก จำแนกตามจังหวัด

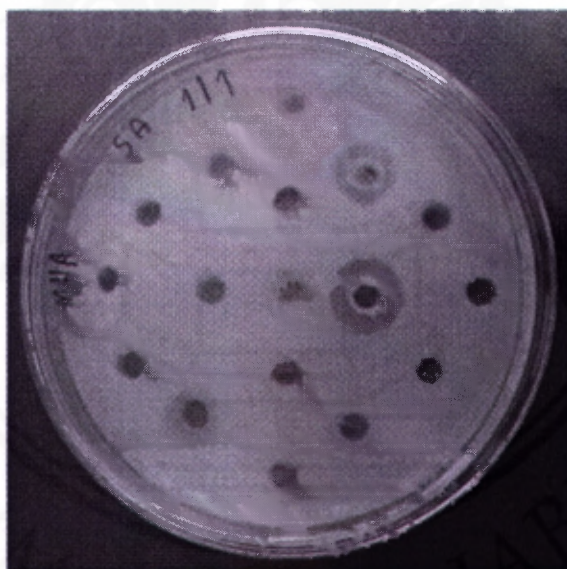


ภาพที่ 8 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราเอนโคไฟท์ที่แยกได้จากต้นจิก จำแนกตามส่วนของพืช

2. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion

จากการนำราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นจิก จำนวนทั้งสิ้น 392 ไอโซเลต ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยวิธี agar well diffusion (ภาพที่ 9) พบว่า มีเชื้อราจำนวน 182 ไอโซเลต (46.4%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งแยกเป็นเชื้อราจากจังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 86 ไอโซเลต จังหวัดชุมพร จำนวน 60 ไอโซเลต และจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 36 ไอโซเลต ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 48.3, 52.6 และ 36 ของเชื้อราที่แยกได้ในแต่ละจังหวัด ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 10)

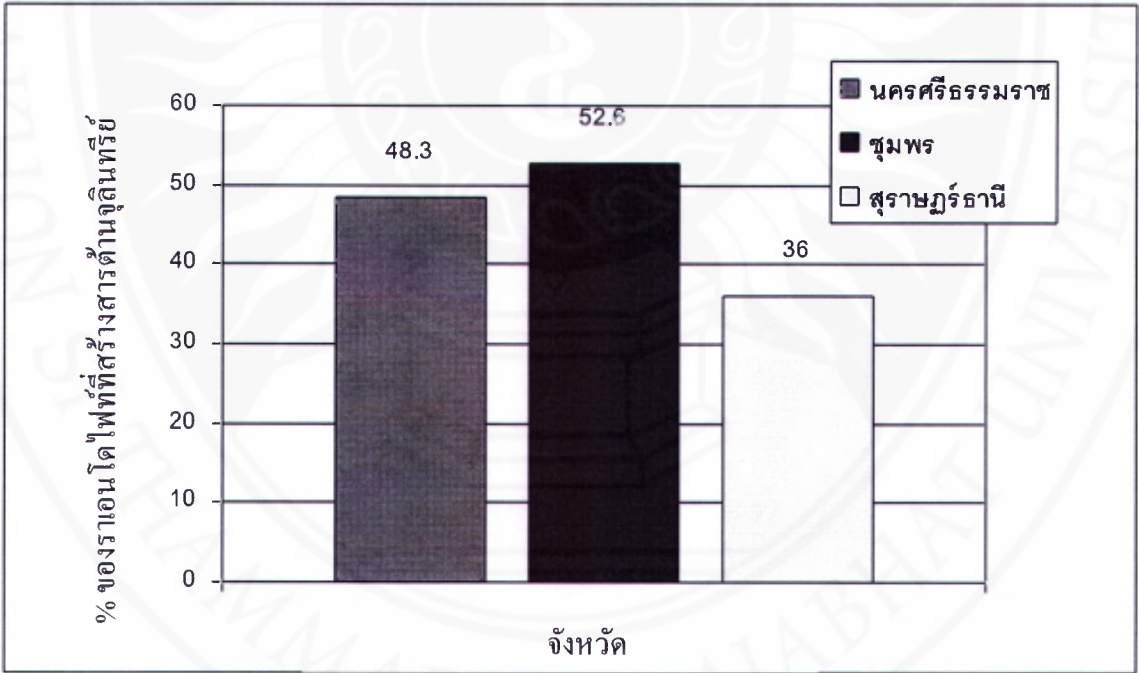
เมื่อพิจารณาถึงจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้งด้วยน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ พบว่าน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์จากต้นจิกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 1-4 ชนิด และน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคเพียงชนิดเดียว โดยมีน้ำเลี้ยงจากราเอนโดไฟท์จำนวน 135 ไอโซเลต (34.4%) ที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 1 ชนิด ในขณะที่มีน้ำเลี้ยงจากราเอนโดไฟท์เพียง 33 (8.4%), 13 (3.3%) และ 1 (0.3%) ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 2, 3 และ 4 ชนิดตามลำดับ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 11)



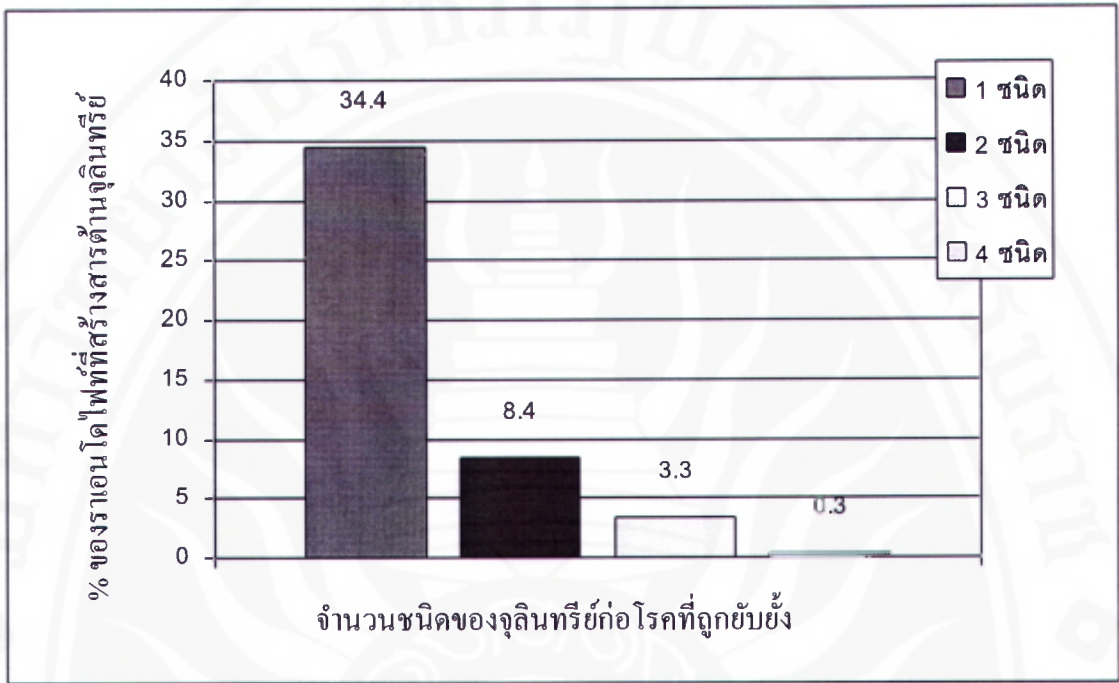
ภาพที่ 9 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น โดยวิธี agar well diffusion

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ตัวอย่างต้นจิกจากจังหวัด	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟท์ที่นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค				
		1 ชนิด	2 ชนิด	3 ชนิด	4 ชนิด	รวม
นครศรีธรรมราช	178	63	19	4	0	86
ชุมพร	114	43	7	9	1	60
สุราษฎร์ธานี	100	29	7	0	0	36
รวม	392	135	33	13	1	182



ภาพที่ 10 เปอร์เซนต์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ จำแนกตามจังหวัด

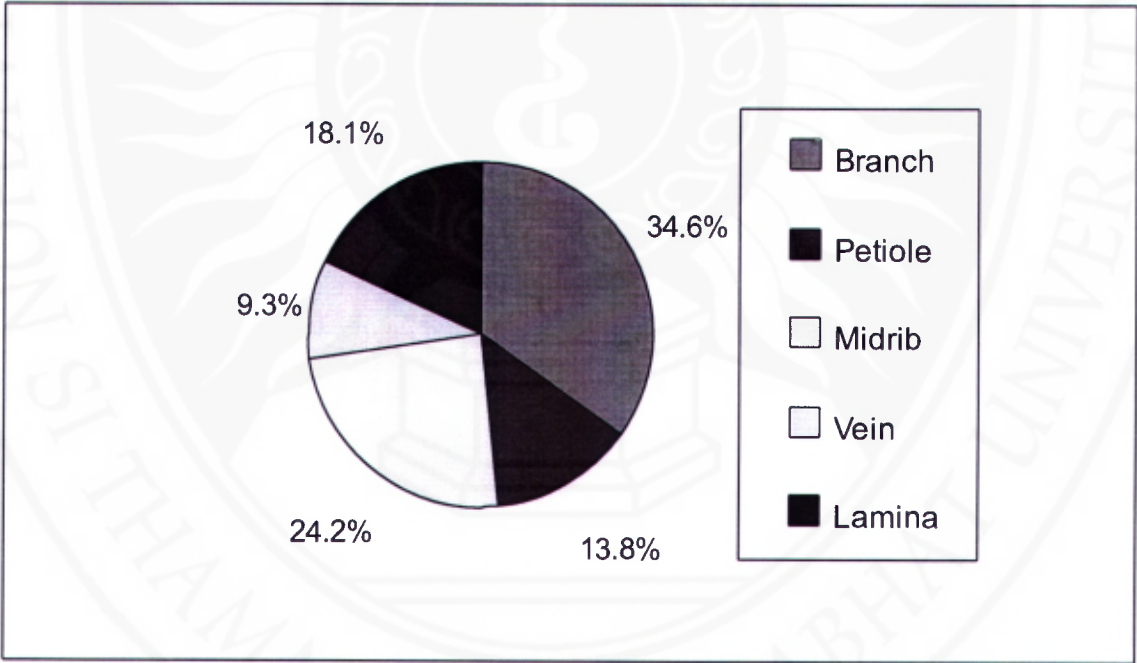


ภาพที่ 11 เปอร์เซนต์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารด้านจุลินทรีย์ จำแนกตามจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง

เมื่อพิจารณาถึงส่วนของพืชที่นำมาแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ พบว่า สามารถแยกราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารด้านจุลินทรีย์ได้จากทุกส่วนของพืช แต่จำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารด้านจุลินทรีย์จากพืชแต่ละส่วนมีความแตกต่างกัน โดยพบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารออกฤทธิ์แยกได้จากส่วนของกิ่งมากที่สุดคือ 63 ไอโซเลต (34.6%) รองลงมาคือจากส่วนของเส้นกลางใบ 44 ไอโซเลต (24.2%) ผิวใบ 33 ไอโซเลต (18.1%) ก้านใบ 25 ไอโซเลต (13.8%) และจากเส้นใบพบน้อยที่สุด คือ 17 ไอโซเลต (9.3%) (ตารางที่ 4 และภาพที่ 12)

ตารางที่ 4 จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามส่วนของพืชที่นำมาแยกเชื้อ

ตัวอย่างต้นจิก จากจังหวัด	จำนวนไอโซเลต เชื้อราเอนโดไฟต์ที่ นำมาทดสอบฤทธิ์ ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์ก่อโรค					
		Branch	Petiole	Vein	Lamina	Midrib	รวม
นครศรีธรรมราช	178	32	10	13	13	18	86
ชุมพร	114	21	9	2	10	18	60
สุราษฎร์ธานี	100	10	6	2	10	8	36
รวม	392	63	25	17	33	44	182



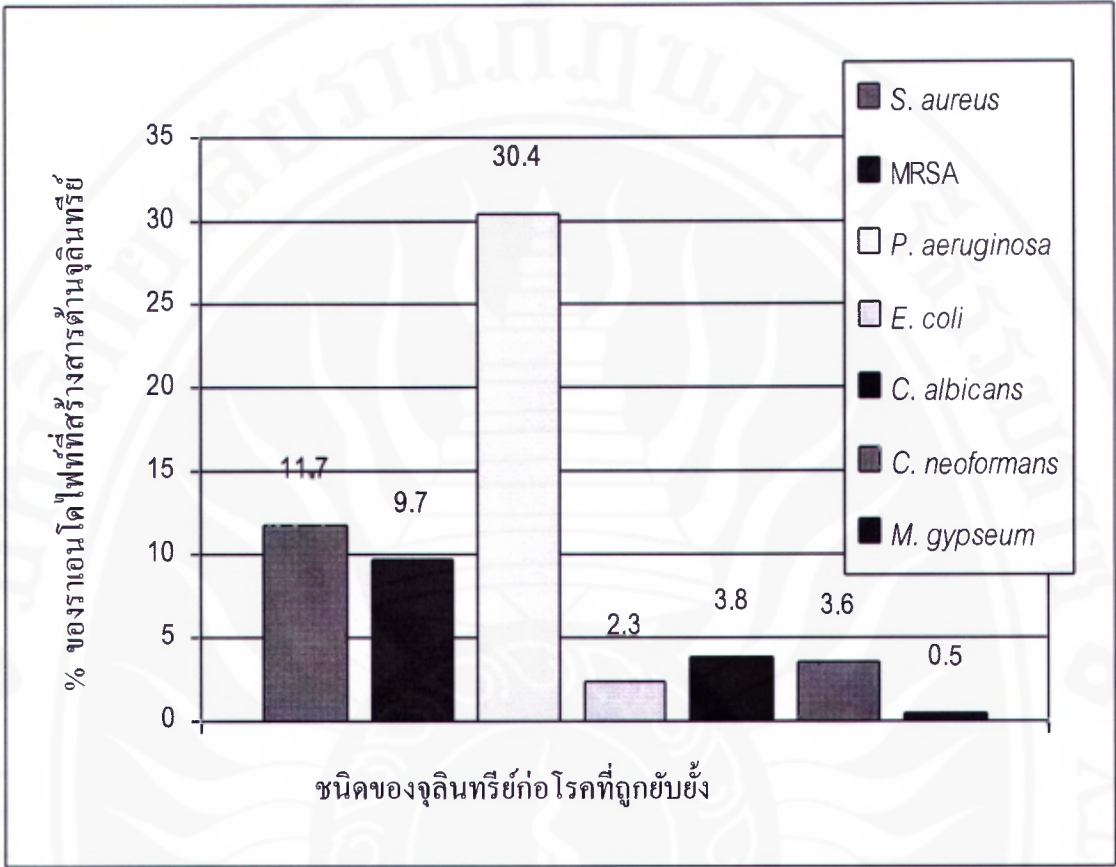
ภาพที่ 12 เปอร์เซนต์ของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ จำแนกตามส่วนของพืชที่นำมาแยกเชื้อ

เมื่อพิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้งโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ พบว่า ราเอนโดไฟท์จากต้นจิกมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* ATCC27853 ได้ดีที่สุด โดยมีเชื้อราเอนโดไฟท์ 119 ไอโซเลต จากเชื้อราที่นำมาทำการทดสอบทั้งสิ้น 392 ไอโซเลต (30.4%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดนี้ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ทำการทดสอบอีกชนิดหนึ่ง คือ *E. coli* ATCC25922 ได้น้อย โดยมีเชื้อราเอนโดไฟท์เพียง 9 ไอโซเลต (2.3%) ที่สามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC25922 ได้ เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จำนวน 46 และ 38 ไอโซเลต (11.7% และ 9.7%) มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC25923 และ MRSA SK1 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อยีสต์ที่ทดสอบทั้งสองชนิดได้ใกล้เคียงกัน โดยมีเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 15 และ 14 ไอโซเลต (3.8% และ 3.6%) ที่สามารถยับยั้ง *C. albicans* ATCC90028 และ *C. neoforman* ATCC90012 ได้ตามลำดับ เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *M. gymseum* ได้น้อยมาก โดยมีเชื้อราเอนโดไฟท์เพียง 2 ไอโซเลต (0.5%) ที่สามารถยับยั้งเชื้อรานี้ได้ (ตารางที่ 5 ภาพที่ 13)

ตารางที่ 5 จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรค

ตัวอย่างต้นจิก จากจังหวัด	จำนวนไอโซเลต เชื้อราเอนโดไฟท์ ที่นำมาทดสอบ	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์ก่อโรค						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
นครศรีธรรมราช	178	22	19	52	7	5	7	1
ชุมพร	114	17	15	47	0	2	5	1
สุราษฎร์ธานี	100	7	4	20	1	8	2	0
รวม	392	46	38	119	8	15	14	2

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922, CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012, MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย



ภาพที่ 13 เปอร์เซนต์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรค

สำหรับการทดสอบควบคุมในการศึกษาครั้งนี้ใช้ยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน vancomycin ความเข้มข้น 30 µg/disc สำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC25923 และ MRSA ซึ่งให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 16.4 และ 15.0 mm และใช้ยา gentamicin ความเข้มข้น 10 µg/disc สำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* ATCC27853 และ *E. coli* ATCC25922 ซึ่งให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 16.4 และ 15.0 mm และใช้ยา amphotericin B ความเข้มข้น 10 µg/disc สำหรับเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC90028 และ *C. neoformans* ATCC90012 ซึ่งให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 15.7 และ 15.2 mm สำหรับเชื้อรา *M. gypseum* เมื่อทดสอบกับยา miconazole ความเข้มข้น 30 µg/disc พบว่าถูกยับยั้งด้วยยาชนิดนี้ (ตารางที่ 6) ซึ่งผลจากการทดสอบควบคุมทั้งหมด แสดงว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบทั้งหมดไวต่อยามาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 6ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบโดยวิธี agar disc diffusion

ราเอนโคไฟท์	ความเข้มข้น ของยา	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
Vancomycin	30 µg/disc	16.4	15.0					
Gentamicin	10 µg/disc			20.8	20.3			
Amphotericin B	10 µg/disc					15.7	15.2	
Miconazole	30 µg/disc							+

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922, CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012, MG = *Microsporum gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ + = มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ชุมพรและสุราษฎร์ธานีแสดงผลดังตารางที่ 7, 8, และ 9 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าราเอนโดไฟท์ทุกไอโซเลตที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของ *S. aureus* ATCC25923, MRSA, *P. aeruginosa* ATCC27853 และ *E. coli* ATCC25922 อยู่ในช่วง 6.1-11.2, 6.1-11, 6.1-15.6 และ 6.2-8.1 mm ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่ายาต้านจุลินทรีย์มาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ

สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของเชื้อยีสต์นั้น พบว่า ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 6.3-21.2 mm สำหรับเชื้อ *C. albicans* ATCC90028 และ 6.2-32.3 mm สำหรับเชื้อ *C. neoformans* ATCC90012 ซึ่งมีราเอนโดไฟท์บางไอโซเลต ที่ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone มากกว่ายาต้านยีสต์มาตรฐาน amphotericin B โดยเชื้อราเอนโดไฟท์ 2 ไอโซเลต ที่ให้ inhibition zone ของเชื้อ *C. albicans* ATCC90028 มากกว่ายาด้านรามาตรฐานได้แก่ 3CH2L1 และ 1SR4M2 ที่ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เท่ากับ 18.2 และ 21.2 mm ตามลำดับ และมีเชื้อราเอนโดไฟท์ 4 ไอโซเลต ที่ให้ขนาด inhibition zone ของเชื้อ *C. neoformans* ATCC90012 มากกว่ายาด้านยีสต์มาตรฐาน เชื้อราเอนโดไฟท์ดังกล่าวได้แก่ 2NK5V1, 3CH2M1, 1SR4M2, 2SR1M2 ซึ่งให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เท่ากับ 17.9, 24.3, 32.3 และ 21.2 mm ตามลำดับ จะเห็นได้ว่ามีราเอนโดไฟท์ 1SR4M2 ที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์ทั้งสองชนิดได้ดี โดยให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของเชื้อยีสต์ทั้งสองชนิดมากกว่ายาด้านรามาตรฐาน

ตารางที่ 7ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ที่แยกได้จากต้นจิก จังหวัดนครศรีธรรมราช ทดสอบโดยวิธี agar diffusion

ราเอนโดไฟท์	รหัสสำหรับสารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1NK1B3	N1	8.9						
1NK1B5	N2			6.1				
1NK1B6	N3			6.2				
1NK1P1	N4			7				
1NK1P2	N5			6.1				
1NK1V1	N6			9.4				
1NK1L1	N7	6.5	8.4					
1NK1M3	N8					11.6*		
1NK2B1	N9						10.1	
1NK2B5	N10			8.1				
1NK2V2	N11			7.2				
1NK3B1	N12			7				
1NK3B5	N13			6.1				
1NK3B6	N14			6.2				
1NK3B7	N15			6.7				
1NK3B9	N16			6.9				
1NK3B10	N17			6.9				
1NK3B11	N18			6.4				
1NK3V2	N19			8				
1NK4B5	N20		9					

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ * = Inhibition zone ว่างๆ

ตารางที่ 7ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ที่แยกได้จากต้นจิก จังหวัดนครศรีธรรมราช ทดสอบ โดยวิธี agar diffusion (ต่อ)

ราเอนโดไฟท์	รหัสสำหรับสารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1NK4B8	N21			8.3				
1NK4B11	N22			7.2				
1NK4B12	N23			11.6	7			
1NK4P1	N24			7.1				
1NK4V1	N25	7.4	11					
1NK4L1	N26	9						
1NK4L2	N27	8.8				10.1*		
1NK4L3	N28	8.3						
1NK4M1	N29			7.3				
1NK5B1	N30						8.7*	
1NK5B3	N31			10.6				
1NK5V2	N32	6.8	7.9	6.4				
1NK5V3	N33			6				
1NK5L1	N34		6.8	6.1				
1NK5L3	N35				7.1			
1NK5M1	N36			15.6	7.2			
1NK5M2	N37			6.9	6			
1NK5M4	N38			6.9	7			
2NK1B4	N39			10.8				
2NK1P1	N40			6.3				

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922, CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012, MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ * = Inhibition zone จางๆ

ตารางที่ 7ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ที่แยกได้จากดินจิก จังหวัดนครศรีธรรมราช ทดสอบโดยวิธี agar diffusion (ต่อ)

ราเอนโดไฟท์	รหัสสำหรับสารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
2NK1P3	N41			9.9				
2NK1V1	N42			7.5				
2NK1L1	N43			7.1				
2NK1M2	N44	8.6	9.1					
2NK1M3	N45			8.3				
2NK2B2	N46			10.1				
2NK2B4	N47			12				
2NK2M1	N48			7.6				
2NK3B2	N49				6.7			
2NK3B3	N50			7				
2NK3B4	N51			7.1				
2NK3P2	N52	7.1	7.6					
2NK3V1	N53			6.7				
2NK3M2	N54	7.7*						
2NK4B2	N55					15*		
2NK4M2	N56	8.9*			6.6		9.1*	
2NK5B2	N57	11.2*						
2NK5B3	N58	10.9*						
2NK5P1	N59			6.4				
2NK5V1	N60						17.9*	

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922, CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012, MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ * = Inhibition zone จางๆ

ตารางที่ 7ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโคไฟที่อายุ 3 สัปดาห์ที่แยกได้จากต้นจิก จังหวัด
ทดสอบโดยนครศรีธรรมราช วิธี agar diffusion (ต่อ)

ราเอนโคไฟท์	รหัสสำหรับ สารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
2NK5L1	N61	10.4*						
2NK5M2	N62	9.2*				10.5*		
2NK5M3	N63						10.2	
3NK1P1	N64						11.2	
3NK1V1	N65	7.4	7.1					
3NK1L1	N66			7.9				
3NK1L2	N67			6.2				+
3NK1M1	N68	7.5	7.3					
3NK1M2	N69	7.2	6.6	8.8				
3NK1M3	N70	8.1*	8.7*	7				
3NK2B1	N71			13.3				
3NK2B2	N72	7.7*	7.5*					
3NK2B3	N73	7.5*						
3NK2P1	N74	8.7*	7.1*					
3NK2V1	N75			6.9				
3NK3B2	N76		7.5*					
3NK3L1	N77		6.1	9.2				
3NK3M3	N78			8.8				
3NK4B1	N79			7.4				
3NK4P1	N80			8.9				

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ * = Inhibition zone จางๆ + = มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

ตารางที่ 7ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ที่แยกได้จากต้นจิก จังหวัดนครศรีธรรมราช ทดสอบ โดยวิธี agar diffusion (ต่อ)

ราเอนโดไฟท์	รหัสสำหรับสารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
3NK4V1	N81		6.2					
3NK4L1	N82		7.9					
3NK4M1	N83		9.7	7.9				
3NK5V1	N84		6.2					
3NK5L1	N85			6.3				
3NK5M1	N86					12.1*	11.5*	

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922, CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012, MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ * = Inhibition zone จางๆ

ตารางที่ 8ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ที่แยกได้จากต้นจิก จังหวัด
ชุมพร ทดสอบโดยวิธี agar diffusion

ราเอนโดไฟท์	รหัสสำหรับ สารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1CH1P1	C1	7.1*	7.3*	7				
1CH1P2	C2		7*					
1CH1M2	C3	9.4*	10.3*	8.1			6.2	
1CH1M3	C4			6.2				
1CH2B1	C5			13.5				
1CH2B2	C6						9.2	
1CH2P2	C7						10.5	
1CH2M1	C8	7.1*						
1CH3B1	C9	6.1						
1CH3P2	C10		6.1*	6.2				
1CH3L1	C11			6.3				
1CH3L2	C12	9.6	9.7					
1CH3M3	C13	8.6*	6.6*	6.2				
1CH4B1	C14			8.3				
1CH4P1	C15			9.6				
1CH4L3	C16	7.3*						
1CH4M1	C17	7.7*						
1CH4M2	C18	8.5*	7.3					
1CH5M2	C19	7.8	6.3	8.1				
1CH5M3	C20			7.2				

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ * = Inhibition zone จางๆ

ตารางที่ 8ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ที่แยกได้จากต้นจิก จังหวัดชุมพร ทดสอบโดยวิธี agar diffusion (ต่อ)

ราเอนโดไฟท์	รหัสสำหรับสารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
2CH1B3	C21			7.4				
2CH1P1	C22			7.7				
2CH1V1	C23			6.8				
2CH2B1	C24					9.7*		
2CH2L1	C25			6.4				
2CH2M4	C26			7.7				
2CH3B1	C27			11.7				
2CH3B2	C28			6.5				
2CH3L1	C29			8				
2CH3M1	C30	10.6	6.2	15.6				
2CH3M2	C31			6.2				
2CH4P1	C32			7.4				
2CH4L1	C33	6.8	7.6					
2CH4M1	C34	7.3	7.5	7.2				
2CH4M4	C35			7				
2CH5B1	C36			10.5				
2CH5B2	C37			6.2				
2CH5B3	C38			8.1				
2CH5B4	C39			7.3				
2CH5B5	C40			6.4				

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922, CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012, MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ * = Inhibition zone จางๆ

ตารางที่ 8ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ที่แยกได้จากต้นจิก จังหวัด
ชุมพร ทดสอบโดยวิธี agar diffusion (ต่อ)

ราเอนโดไฟท์	รหัสสำหรับ สารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
2CH5B6	C41			6.2			11.5	
2CH5P1	C42			8.8				
2CH5V1	C43			10.9				
2CH5M1	C44	6.1	6.3	14.7				
3CH1B2	C45			6.4				
3CH1B3	C46			6.3				
3CH1B4	C47			6.2				
3CH1L1	C48			6.8				
3CH1M1	C49	6.1	6.1	7.6				
3CH1M2	C50	6.1	6.2*	7.7				
3CH1M3	C51			6.7				
3CH2B1	C52			6.9				+
3CH2B2	C53			7.3				
3CH2B3	C54			16.8				
3CH2P1	C55			8.2				
3CH2L1	C56			6.2		18.2*		
3CH2L2	C57	7.3	6.5	8.3				
3CH2M1	C58						24.3	
3CH5B1	C59			6.6				
3CH5L2	C60				6.9*			

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporum gypseum* จากผู้ป่วย

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ * = Inhibition zone จางๆ + = มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

ตารางที่ 9ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโคไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ที่แยกได้จากต้นจิก จังหวัดสุราษฎร์ธานี ทดสอบโดยวิธี agar diffusion

ราเอนโคไฟท์	รหัสสำหรับสารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1SR1B3	S1			6.4				
1SR1P3	S2			6.4				
1SR1L1	S3			6.4				
1SR2V1	S4					9.5		
1SR2L1	S5	6.6						
1SR2L2	S6			6.4				
1SR2M1	S7	7.5						
1SR2M2	S8			6.3				
1SR3P1	S9	7.5						
1SR3P4	S10	7						
1SR4B1	S11		7.9*					
1SR4M2	S12					21.2	32.3	
1SR5L3	S13	7.2						
2SR1L1	S14	7.8	6.6					
2SR1L2	S15	5.9						
2SR1M2	S16					6.3	17.9	
2SR2B2	S17			8.1				
2SR2B5	S18			8.1				
2SR2L1	S19			10.3				
2SR2M1	S20			6.7				

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ * = Inhibition zone ว่างๆ

ตารางที่ 9ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ที่แยกได้จากต้นจิก จังหวัดสุราษฎร์ธานี ทดสอบโดยวิธี agar diffusion (ต่อ)

ราเอนโดไฟท์	รหัสสำหรับสารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
2SR5M2	S21			7.2				
2SR5M3	S22			11.7				
3SR1B1	S23			7				
3SR1L1	S24			6.8				
3SR1M4	S25			6.6				
3SR2B2	S26		7.3	6.3				
3SR2L2	S27			6.6				
3SR2L3	S28					12.9*		
3SR2V1	S29			7.6		7.3*		
3SR3B1	S30			11.5				
3SR3B2	S31			9.5				
3SR3P1	S32					7.2*		
3SR3P2	S33			6.3		7*		
3SR3P3	S34					7.3*		
3SR4B3	S35				8.1			
3SR5B2	S36	9.3	11.8					

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922, CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012, MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ * = Inhibition zone จางๆ

3. การสกัดเชื้อรา

จากการนำเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ในการทดสอบเบื้องต้น จำนวน 182 ไอโซเลตไปทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate และสกัดเส้นใยด้วย hexane และ ethyl acetate พบว่า จากจำนวนสารสกัดที่ได้ทั้งหมด 546 สาร จะได้สารสกัดหยาบที่มีน้ำหนักไม่น้อยกว่า 1.0 mg ซึ่งมีปริมาณมากพอที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ จำนวน 443 สารสกัด โดยแยกเป็นสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate (BE) จำนวน 159 สาร สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย hexane (CH) จำนวน 146 สาร และสารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย ethyl acetate (CE) จำนวน 138 สาร และสารสกัดที่นำไปทดสอบฤทธิ์ที่สกัดได้น้ำหนักอยู่ในช่วง 1.0 -143.7 mg (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 น้ำหนักสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์

รหัส สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)			รหัส สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
	BE	CH	CE		BE	CH	CE
N1	9.4	10	9.9	N24	2.7	3.2	7.6
N2	7.3	6.5	5.3	N25	6.5	3.7	8.4
N3	3.8	4.9	17.2	N26	17.9	5.7	< 1.0
N4	8.7	7.3	5.1	N27	7.1	4.9	1.3
N5	6.5	8.2	4.9	N28	6.9	3.5	5.1
N6	9.1	8.2	2.8	N29	6.3	5.9	< 1.0
N7	4.8	6	1.5	N30	15.9	4.4	18.0
N8	< 1.0	< 1.0	< 1.0	N31	8.1	< 1.0	< 1.0
N9	< 1.0	8.7	< 1.0	N32	4.8	1.0	< 1.0
N10	< 1.0	11	4.9	N33	7.0	2.7	< 1.0
N11	< 1.0	6.3	6.5	N34	3.9	3.4	2.3
N12	< 1.0	3.3	< 1.0	N35	< 1.0	< 1.0	< 1.0
N13	6.4	1.5	1.0	N36	3.8	4.0	< 1.0
N14	7.5	9.3	< 1.0	N37	5	2.8	< 1.0
N15	3.5	2.6	13.6	N38	< 1.0	< 1.0	4.6
N16	14.2	10.5	3.9	N39	< 1.0	< 1.0	< 1.0
N17	5.9	< 1.0	6.5	N40	7.5	25.4	18.4
N18	3	4.9	< 1.0	N41	5.3	2.6	< 1.0
N19	3.7	4.9	6.4	N42	12	6.9	12.9
N20	17.5	3	4.4	N43	27.6	< 1.0	1.1
N21	3.2	< 1.0	< 1.0	N44	< 1.0	44.7	< 1.0
N22	4.5	1.6	7.2	N45	28.4	5.7	< 1.0
N23	3.2	6.3	< 1.0	N46	3.7	< 1.0	18.7

BE = สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate CH = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย hexane
CE = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย ethyl acetate

ตารางที่ 10 สารสกัดหยาบราเอนโดไฟท์ (ต่อ)

รหัส สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)			รหัส สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
	BE	CH	CE		BE	CH	CE
N47	14.2	2.5	2	N70	4.3	5.9	4.2
N48	10	4.2	3.6	N71	14.5	4.8	8.8
N49	3.4	< 1.0	12.5	N72	25.3	2.8	19.6
N50	1	3.1	9.0	N73	1.0	17.6	22.4
N51	5.4	4.8	2.1	N74	< 1.0	< 1.0	< 1.0
N52	1.0	< 1.0	9.7	N75	5.9	< 1.0	2.5
N53	13.9	1.7	29.3	N76	14.1	29.5	24.3
N54	4.5	< 1.0	< 1.0	N77	4.6	< 1.0	6
N55	8.7	1.8	< 1.0	N78	19.6	49.9	13.8
N56	43.2	7.1	2.5	N79	27.1	9.3	22.4
N57	6.5	2.6	3.8	N80	< 1.0	< 1.0	< 1.0
N58	12.5	1.6	3.3	N81	3.3	4.6	6.4
N59	67.6	< 1.0	4.7	N82	5.3	2.5	16.5
N60	< 1.0	< 1.0	< 1.0	N83	4.4	10.6	< 1.0
N61	21.9	4.5	13.3	N84	4.5	< 1.0	< 1.0
N62	7.4	1.2	2.3	N85	66	< 1.0	< 1.0
N63	12.6	< 1.0	6.3	N86	17.8	2.9	11.2
N64	2.8	7.1	24.2	C1	12.7	22.9	22.3
N65	5.7	7.3	10	C2	5.6	2.3	3.7
N66	24.9	1.0	4.5	C3	25	2.2	< 1.0
N67	< 1.0	1.0	< 1.0	C4	19.3	40.1	8.5
N68	6	11.5	8.7	C5	11.4	3.5	82.3
N69	6.8	8.9	18.2	C6	< 1.0	6.6	10.1

BE = สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate CH = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย hexane
CE = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย ethyl acetate

ตารางที่ 10 สารสกัดหยาบราเอนโดไฟท์ (ต่อ)

รหัส สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)			รหัส สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
	BE	CH	CE		BE	CH	CE
C7	< 1.0	< 1.0	< 1.0	C30	6.3	12	16.7
C8	7.6	5.2	< 1.0	C31	4.2	1.0	2.1
C9	< 1.0	1.9	11.9	C32	14.8	7.3	6.7
C10	4.2	4.2	2.2	C33	17.2	5.0	12.8
C11	5.4	2.8	11.1	C34	3.4	8.2	1.0
C12	2.2	2.6	6.6	C35	54.7	2.4	4.6
C13	26.2	19.3	21.5	C36	10.3	4.3	25.2
C14	10.6	3.8	36.6	C37	30.5	1	2.5
C15	19.2	< 1.0	16.1	C38	17.6	5.9	7.7
C16	2.8	3.0	6.3	C39	42.0	50.1	< 1.0
C17	< 1.0	< 1.0	< 1.0	C40	72.0	90.6	1.4
C18	4.2	9.7	9.4	C41	9.2	15.6	20.3
C19	5.8	< 1.0	13.9	C42	18.8	< 1.0	32.5
C20	26.9	3	9.1	C43	65.1	< 1.0	7.7
C21	8.8	2.5	1.6	C44	4.6	< 1.0	9.4
C22	84.8	2.8	20	C45	32.5	1.9	4.2
C23	62.3	4.4	24.1	C46	60.4	5.4	19.0
C24	11	0.8	3.3	C47	82.2	4.6	20.2
C25	< 1.0	< 1.0	< 1.0	C48	7.9	2.6	4.3
C26	39.2	2.9	7.8	C49	5.8	4.1	1.0
C27	4.6	< 1.0	< 1.0	C50	< 1.0	< 1.0	< 1.0
C28	14.5	8.9	6.7	C51	1.2	30.7	13.6
C29	9.5	< 1.0	< 1.0	C52	22.6	5.4	6.2

BE = สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate CH = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย hexane
CE = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย ethyl acetate

ตารางที่ 10 สารสกัดหยาบราเอนโดไฟท์ (ต่อ)

รหัส สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)			รหัส สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
	BE	CH	CE		BE	CH	CE
C53	8.9	1.5	3.4	S15	2.3	7.4	2.5
C54	119.6	3.0	13.8	S16	25.9	24.4	< 1.0
C55	2.6	< 1.0	8.00	S17	3.0	11.6	3.4
C56	9.6	6	21.5	S18	1.8	8.4	2.0
C57	143.7	5.2	6.1	S19	2.6	4.4	< 1.0
C58	< 1.0	< 1.0	< 1.0	S20	8.9	25.0	9.5
C59	12.3	11.5	16.9	S21	5.3	4.1	15.7
C60	31.7	6.9	< 1.0	S22	4.7	17.9	< 1.0
S1	4.9	< 1.0	8.5	S23	2.5	2.8	6.3
S2	15.7	< 1.0	6.8	S24	2.8	7.4	13.7
S3	12.6	13.8	13.6	S25	23.1	14.9	6.3
S4	1.3	6.9	18.7	S26	11.3	5.4	< 1.0
S5	1.4	5.1	4.3	S27	8.8	50.4	14.6
S6	7.3	9.7	14.8	S28	17.3	28.3	6.3
S7	5.5	3.7	1.0	S29	17.5	32.4	12.1
S8	7.1	2.5	5.9	S30	10.1	5.8	34.6
S9	4.2	3.4	20	S31	6.7	4.2	3.2
S10	1.0	2.7	6.4	S32	15.9	9.1	12.9
S11	< 1.0	5.3	5.3	S33	8.8	10.4	5.0
S12	13.2	5.5	< 1.0	S34	22.7	25	24
S13	< 1.0	3.3	11.9	S35	49.5	7.3	1.0
S14	2.5	5.8	3.6	S36	11.5	10.9	1.0

BE = สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate

CH = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย hexane

CE = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย ethyl acetate

4. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี broth microdilution

เนื่องจากปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้มีปริมาณน้อย ในการนำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ จึงทำการทดสอบสารสกัดแต่ละชนิดเฉพาะกับจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้งจากการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อราเท่านั้น ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่า มีสารสกัดหยาบจำนวน 174 สาร จากสารสกัดหยาบ 443 สาร (39.3%) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดยพบว่าสารสกัด CH สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากที่สุด โดยมีสารสกัดจำนวน 62 สาร จากจำนวนสารสกัดหยาบที่นำมาทดสอบ 146 สาร (42.5%) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ส่วนสารสกัด BE และ CE นั้น พบว่า สารสกัดทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้เท่ากัน โดยมีสารสกัดหยาบ BE จำนวน 60 สาร จาก 159 สาร (37.7%) และ สารสกัดหยาบ CE 52 สาร จาก 138 สาร (37.7%) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (ตารางที่ 11 และ ภาพที่ 14)

เมื่อพิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งโดยสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml พบว่าสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้มากที่สุด โดยมีสารสกัดหยาบจำนวน 39 สาร จาก 41 สาร (95.1%) และสารสกัดหยาบจำนวน 33 จาก 40 สาร (82.5%) ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC90028 และ *C. neoformans* ATCC90012 ได้ตามลำดับ มีสารสกัดหยาบ 47 สาร จาก 105 สาร (44.8%) และ 40 สาร จาก 127 สาร (31.5%) ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก MRSA และ *S. aureus* ATCC25923 ได้ ตามลำดับ สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้น้อย โดยพบว่ามีสารสกัดหยาบเพียง 37 สาร จาก 318 สาร (11.6%) และ 3 สาร จาก 20 สาร (15.0%) ที่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ATCC27853 และ *E. coli* ATCC25922 ได้ ตามลำดับ สำหรับฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านเชื้อรา *M. gypseum* นั้น พบว่ามีสารสกัดหยาบจำนวน 2 สาร จากจำนวนที่นำมาทดสอบ 3 สาร (66.7%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราดังกล่าว (ตารางที่ 11 และ ภาพที่ 15)

ตารางที่ 11ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml

สารสกัดหยาบ	จำนวนสารสกัดที่นำมาทดสอบ / จำนวนสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (เปอร์เซ็นต์สารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง)							
	SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG	รวม*
BE	43/10 (23.3)	35/11 (31.4)	112/20 (17.9)	8/2 (25.0)	14/14 (100.0)	14/10 (71.4)	1/1 (100)	159/60 (37.7)
CH	44/20 (45.5)	36/17 (47.2)	106/9 (8.5)	7/0 (0)	14/13 (92.9)	14/12 (85.7)	1/1 (100)	146/62 (42.5)
CE	40/10 (25.0)	34/19 (55.9)	100/8 (8.0)	5/1 (20.0)	13/12 (92.3)	12/11 (91.7)	1/0 (0)	138/52 (37.7)
รวม	127/40 (31.5)	105/47 (44.8)	318/37 (11.6)	20/3 (15.0)	41/39 (95.2)	40/33 (82.5)	3/2 (66.7)	443/174 (39.3)

BE = สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate

CE = สารสกัดหยาบจากเส้นใยราด้วย ethyl acetate

MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

EC = *Escherichia coli* ATCC25922

CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

: * มีสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟที่บางสารที่สามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่า 1 ชนิด

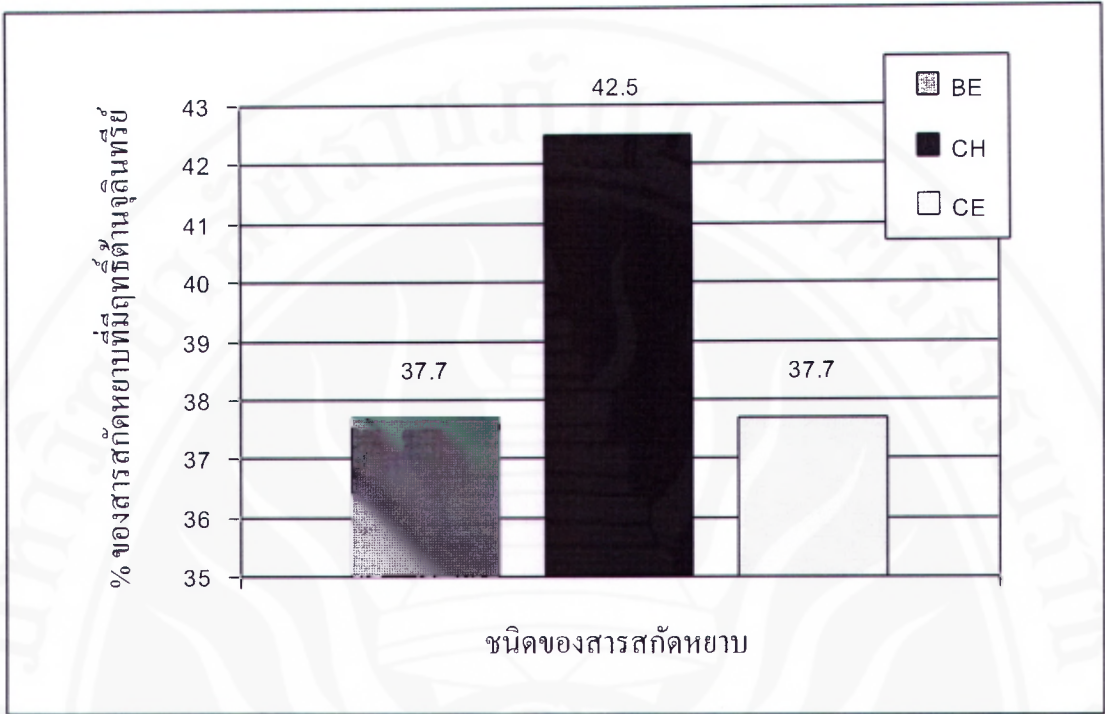
CH = สารสกัดหยาบจากเส้นใยราด้วย hexane

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923

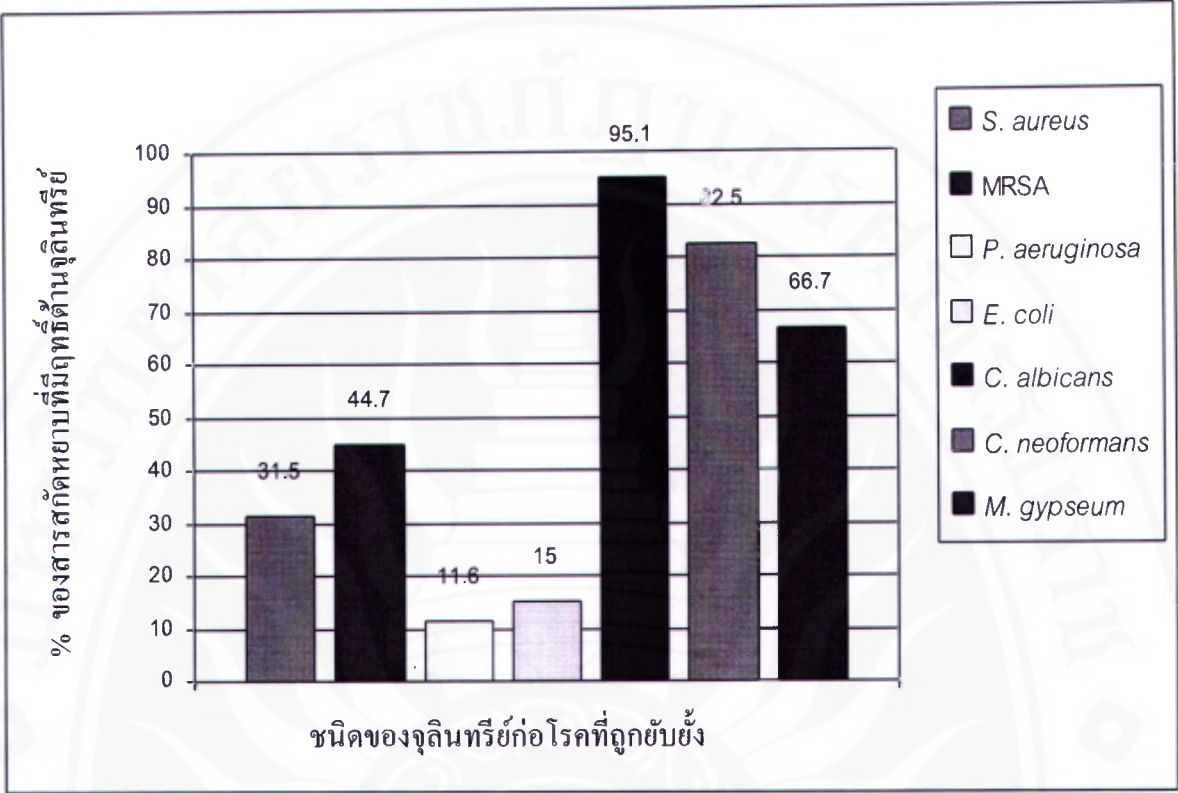
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

CA = *Candida albicans* ATCC90028

MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย



ภาพที่ 14 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml จำแนกตามชนิดของสารสกัดหยาบ



ภาพที่ 15 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดเห็บที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง

สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 4 µg/ml พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมดถูกยับยั้งโดยยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 4 µg/ml โดยวิธี broth microdilution

ยาปฏิชีวนะมาตรฐาน	ฤทธิ์การยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 4 µg/ml						
	SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
Vancomycin	+	+					
Gentamicin			+	+			
Amphotericin B					+	+	
Miconazole							+

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,

CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,

MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ + = มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

5. การทดสอบหาค่า MIC, MBC และ MFC

เมื่อทำการทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ พบว่า ยาปฏิชีวนะ vancomycin ให้ค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC25923 และ MRSA SK1 ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเท่ากับ 1 และ 2 µg/ml ตามลำดับ ส่วนยาปฏิชีวนะมาตรฐาน gentamicin ที่ใช้ในการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบนั้น ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC27853 สูงกว่าเชื้อ *E. coli* ATCC25922 โดยให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC27853 เท่ากับ 4 µg/ml และให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* ATCC25922 เท่ากับ 0.5 µg/ml

ส่วนการทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อยีสต์และรา นั้น พบว่า ยาปฏิชีวนะ amphotericin B ให้ค่า MIC ต่อเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC90028 และ *C. neoformans* ATCC90012 เท่ากับ 0.5 และ 1 µg/ml ตามลำดับ ส่วนยา miconazole ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* เท่ากับ 1 µg/ml ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานและช่วงค่า MIC ของสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบโดยวิธี broth microdilution

Test Microorganism	Antibiotics	MIC range (µg/ml)	
		Antibiotics	Crude extracts
<i>S. aureus</i> ATCC25923	Vancomycin	1	16-200
MRSA SK1		2	32-200
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	Gentamicin	2	4-200
<i>E. coli</i> ATCC25922		0.5	200
<i>C. albicans</i> ATCC90028	Amphotericin B	0.5	0.5-200
<i>C. neoformans</i> ATCC90012		1	0.5-200
<i>M. gypseum</i>	Miconazole nitrate	1	200

เมื่อนำสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml ไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 128 µg/ml แล้วนำไปเจือจางต่อแบบ 2 fold dilution ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดในช่วง 128 - 0.25 µg/ml เมื่อนำไปทดสอบหาค่า MIC พบว่าสารสกัดหยาบ จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ชุมพร และสุราษฎร์ธานี ให้ค่า MIC ดังแสดงในตารางที่ 14, 15 และ 16 ตามลำดับ จากผลการทดสอบพบว่า สารสกัดส่วนใหญ่ให้ค่า MIC เท่ากับ 200 µg/ml โดยมีสารสกัดจำนวน 133 สาร จากจำนวน 201 สาร (66.2%) ที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 200 µg/ml

จากจำนวนสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC25923 รวม 40 สาร พบว่า มีสารสกัดหยาบที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 200 µg/ml จำนวน 32 สาร และให้ค่า MIC น้อยกว่า 200 µg/ml จำนวน 8 สาร โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 128 µg/ml จำนวน 6 สาร ให้ค่า MIC เท่ากับ 64 µg/ml จำนวน 1 สาร คือ สารสกัด C16CH และมีสารสกัด 1 สาร คือ C9CH ที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC25923 ในการทดสอบต่ำที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 16 µg/ml ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่า MIC ของยาปฏิชีวนะมาตรฐาน vancomycin ที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 1 µg/ml

มีสารสกัดจำนวน 40 สารจากสารสกัดที่ทำการทดสอบทั้งหมด 47 สารที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ MRSA เท่ากับ 200 µg/ml และมีสารสกัดจำนวน 7 สารที่ให้ค่า MIC น้อยกว่า 200 µg/ml โดยแยกเป็นสารสกัดที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 128 µg/ml จำนวน 4 สาร สารสกัดที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 64 µg/ml จำนวน 1 สาร คือ C18CH และสารสกัดที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 32 µg/ml จำนวน 2 สาร คือ N76CE และ C3CH ซึ่งสูงกว่ายาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ คือ vancomycin ซึ่งให้ค่า MIC ในการทดสอบกับเชื้อ MRSA เท่ากับ 2 µg/ml

จากผลการหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบ ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC27853 พบว่าจากจำนวนสารสกัดที่ทดสอบทั้งหมด 37 สารสกัด มีสารสกัดจำนวน 28 สารสกัดที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 200 µg/ml สารสกัดจำนวน 6 สารที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 128 µg/ml และสารสกัด 2 สาร คือ N59BE และ C46CH ที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 64 µg/ml และสารสกัด N45BE ที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC27853 ต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 4 µg/ml ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ของยาปฏิชีวนะมาตรฐาน gentamicin ที่ใช้ในการทดสอบเพียง 2 เท่า

จากสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* ATCC25922 จำนวน 3 สาร คือ C60BE, C60CE และ S35BE พบว่า สารสกัดทั้งหมดให้ค่า MIC ต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบเท่ากับ 200 µg/ml ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ของยาปฏิชีวนะมาตรฐาน gentamicin ที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* ATCC25922 เท่ากับ 0.5 µg/ml

ผลการทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อ *C. neoformans* ATCC90012 พบว่า สารสกัดส่วนใหญ่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อชนิดนี้ เท่ากับ 200 µg/ml เช่นเดียวกัน โดยมีสารสกัดจำนวน 28

สาร จากสารสกัดที่นำมาทดสอบทั้งหมด 33 สารที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 200 $\mu\text{g/ml}$ และมีสารสกัดจำนวน 5 สารที่ให้ค่า MIC น้อยกว่า 200 $\mu\text{g/ml}$ โดยเป็นสารสกัดที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 128 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 1 สาร สารสกัดที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 32 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 3 สาร คือ N56BE, N86CE และ C41CE และสารสกัดที่ให้ค่า MIC ต่ำสุดจำนวน 1 สาร คือ C57CH ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมีค่าต่ำกว่ายาปฏิชีวนะมาตรฐาน amphotericin B ที่ใช้ในการทดสอบ ที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 1 $\mu\text{g/ml}$

สำหรับผลการทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อ *C. albicans* ATCC90028 นั้นพบว่าให้ค่าแตกต่างจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบชนิดอื่น โดยมีสารสกัดเพียง 1 สาร จากสารสกัดที่นำมาทดสอบทั้งหมด 39 สาร ที่มีค่า MIC เท่ากับ 200 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนสารสกัดที่เหลือจำนวน 38 สาร ให้ค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 64 $\mu\text{g/ml}$ โดยเป็นสารสกัดที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 64, 32, 16 และ 8 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 2, 11, 4 และ 5 สาร ตามลำดับ และสารสกัดที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 4 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 6 สาร คือ N62CE, C56CH, S29CH, S32CH, S32CE และ S33CH สารสกัดที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 2 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 5 สาร คือ N27CH, N55CH, C24BE, S33CE และ S34CH สารสกัดที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 1 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 1 สาร คือ S28CH และสารสกัด จำนวน 4 สาร คือ S4CH, S12CH, S16CH และ S28CE ที่ให้ค่า MIC ต่ำสุดจำนวน 4 สาร มีค่า เท่ากับ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมีค่าเท่ากับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน amphotericin B ที่ใช้ในการทดสอบ ที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ เช่นเดียวกัน

จากสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* จำนวน 2 สารคือ C52BE และ C52CH พบว่า สารสกัดทั้ง 2 สาร ให้ค่า MIC ต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบเท่ากับ 200 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ของยาปฏิชีวนะมาตรฐาน miconazole ที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* เท่ากับ 1 $\mu\text{g/ml}$

ช่วงค่า MIC ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ แสดงดังตารางที่ 13 และ ชนิดของสารสกัดหายที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดแสดงดังตารางที่ 17

ตารางที่ 14 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ทดสอบ
โดยวิธี broth microdilution

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC (µg/ml)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	N9BE						200	
2	N9CH						200	
3	N9CE						200	
4	N14BE			200				
5	N17CH			200				
6	N25CH	200						
7	N26BE	200						
8	N27BE					64		
9	N27CH					2		
10	N27CE					8		
11	N28BE	200						
12	N30BE						200	
13	N30CH						200	
14	N30CE						200	
15	N32CH	128	128					
16	N34CH		128					
17	N40BE			200				
18	N41BE			128				
19	N44CH		200					
20	N45BE			4				

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporum gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ 14 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ทดสอบ
โดยวิธี broth microdilution (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC (µg/ml)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
21	N47BE			200				
22	N47CE			128				
23	N48CH			200				
24	N54BE	200						
25	N55BE					64		
26	N55CH					2		
27	N56BE						200	
28	N56CH						32	
29	N56CE						200	
30	N57BE	200						
31	N58CH	200						
32	N59BE			64				
33	N61BE	200						
34	N62BE					16		
35	N62CH	200				32		
36	N62CE					4		
37	N63BE						200	
38	N63CH						200	
39	N63CE						200	
40	N64BE						200	

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ 14 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ทดสอบ
โดยวิธี broth microdilution (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC (µg/ml)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
41	N64CH						200	
42	N64CE						200	
43	N68CE	200						
44	N69CH	200	200					
45	N69CE	200	200					
46	N70BE	200						
47	N70CH	200						
48	N70CE	200	200					
49	N71BE			200				
50	N72BE	200	200					
51	N72CH	200	200					
52	N72CE		200					
53	N73CH	200						
54	N74BE		200					
55	N75BE			200				
56	N76BE		200					
57	N76CH		200					
58	N76CE		32					
59	N77CE		200					
60	N78BE			200				

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ 14 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ทดสอบ
โดยวิธี broth microdilution (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC (µg/ml)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
61	N79BE			200				
62	N79CH			200				
63	N80CH			200				
64	N81CH		200					
65	N82BE		200					
66	N82CH		200					
67	N82CE		200					
68	N83BE		200					
69	N83CH		200					
70	N83CE		200					
71	N84CH		200					
72	N86BE						200	
73	N86CH						200	
74	N86CE						32	

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ 15 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ จากจังหวัดชุมพร ทดสอบโดยวิธี
broth microdilution

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC (µg/ml)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	C1BE	200	200					
2	C2CH		200					
3	C2CE		200					
4	C3BE						200	
5	C3CH		32				200	
6	C4CH			200				
7	C5CE			200				
8	C6CH						200	
9	C6CE						200	
10	C8CH	200						
11	C9CH	16						
12	C9CE		200					
13	C10BE		200	200				
14	C10CE		200	200				
15	C11BE			200				
16	C12CH	200	200					
17	C12CE	200	200					
18	C13CH	200	200					
19	C13CE		200					
20	C15BE			200				

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ 15 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ จากจังหวัดชุมพร ทดสอบโดยวิธี
broth microdilution (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC (µg/ml)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
21	C16CH	64						
22	C18BE	200						
23	C18CH	200	64					
24	C20CE			200				
25	C22BE			128				
26	C24BE					2		
27	C24CH					32		
28	C24CE					8		
29	C30CE		200	200				
30	C32CE			200				
31	C33BE		200					
32	C33CH	200						
33	C33CE		200					
34	C34CH	200						
35	C35CH			128				
36	C41BE						200	
37	C41CH						128	
38	C41CE						32	
39	C46CH			64				
40	C46CE			200				

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ 15 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโคไฟท์ จากจังหวัดชุมพร ทดสอบโดยวิธี
broth microdilution (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC (µg/ml)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
41	C47CH			128				
42	C49CH		200					
43	C49CE		200					
44	C50BE		200					
45	C50CH		200					
46	C50CE	200	200					
47	C52BE							200
48	C52CH							200
49	C54BE			200				
50	C54CH			200				
51	C56BE					32		
52	C56CH					4		
53	C56CE					8		
54	C57BE						200	
55	C57CH						0.5	
56	C57CE		200				200	
57	C60BE				200			
58	C60CE				200			

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922, CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012, MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ 16 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ทดสอบโดยวิธี
broth microdilution

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC (µg/ml)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	S4BE					32		
2	S4CH					0.5		
3	S4CE					8		
4	S5CH	200						
5	S5CE	128						
6	S10CE	200						
7	S11CE		200					
8	S12BE					32		
9	S12CH					128	200	
10	S12CE					32	200	
11	S13CH	200						
12	S13CE	200						
13	S14CH	128						
14	S14CE	128						
15	S15CH	128						
16	S15CE	200						
17	S16BE					16	200	
18	S16CH					0.5	200	
19	S16CE					32	200	
20	S22BE			200				

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ 16 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ทดสอบโดยวิธี
broth microdilution (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC (µg/ml)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
21	S23BE			200				
22	S23CE			200				
23	S25BE			200				
24	S26BE		128	200				
25	S26CE		200					
26	S28BE					32		
27	S28CH					1		
28	S28CE					0.5		
29	S29BE			128		32		
30	S29CH					4		
31	S29CE					16		
32	S32BE					32		
33	S32CH					4		
34	S32CE					4		
35	S33BE					32		
36	S33CH					4		
37	S33CE					128		
38	S34BE					16		
39	S34CH					2		
40	S34CE					8		

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ 16 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอน โคไฟท์ จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ทดสอบโดยวิธี
broth microdilution (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC (µg/ml)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
41	S35BE				200	200		
42	S36BE	128	128					

SA = *Staphyl ococus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922,
CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90012,
MG = *Microsporium gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ 17 สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด

จุลินทรีย์ทดสอบ	สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด		ยาปฏิชีวนะ	
	สารสกัดหยาบ	MIC (µg/ml)	ยาปฏิชีวนะ	MIC (µg/ml)
<i>S. aureus</i>	C9CH	16	vancomycin	1
MRSA	N76CE, C3CH	32		2
<i>P. aeruginosa</i>	N45BE	4	Gentamicin	2
<i>E. coli</i>	C60BE, C60CE, S35BE	200		0.5
<i>C. neoformans</i>	C57CH	0.5	Amphotericin B	1
<i>C. albicans</i>	S4CH, S12CH, S16CH, S28CH	0.5		0.5
<i>M. gypseum</i>	S52BE, C52CH	200	Miconazole	1

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ ที่มีความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับค่า MIC ไป streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อหาค่า MBC หรือ MFC พบว่า สารสกัดหยาบที่นำมาทดสอบเกือบทั้งหมดไม่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบได้ กล่าวคือ มีสารสกัดจากส่วนของเส้นใยราเพียง 5 สาร เท่านั้นที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ โดยสารดังกล่าวจัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC25923 ได้ 1 สาร คือ C9CH ซึ่งมีค่า MBC ต่อเชื้อชนิดนี้ เท่ากับ 64 µg/ml และสารสกัดที่มีฤทธิ์ฆ่ายีสต์ *C. albicans* ATCC90028 อีก 4 สาร คือ N86CE, S12CH, และ S33CE ที่ให้ค่า MFC เท่ากับ 128 µg/ml และ S4CE ที่ให้ค่า MFC ต่อเชื้อชนิดนี้ต่ำสุด เท่ากับ 16 µg/ml (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 ค่า MIC และ MBC หรือ MFC ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบ

Tested microorganism	Crude extracts	MIC/MBC or MFC (µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC25923	C9CH	16/64
<i>C. albicans</i> ATCC90028	N86CE	32/128
	S12CH	0.5/128
	S33CE	2/128
	S4CE	8/16

6. การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วย TLC และ ¹H-NMR

เนื่องจากมีสารสกัดที่ให้ค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 200 µg/ml จำนวนมาก จึงได้ทำการเลือกสารสกัดที่ให้ค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 128 µg/ml ไปทำการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วย TLC และเลือกสารสกัดที่ให้ค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 128 µg/ml และมีน้ำหนักของสารสกัดที่เหลือมากกว่า 2.5 mg ไปตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วย ¹H-NMR และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อนำสารสกัดที่ให้ค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 128 µg/ml จำนวน 70 สาร ไปตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วย TLC พบว่า มีสารสกัดจำนวน 36 สาร ที่ให้โครมาโทแกรมที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือมองเห็นได้ใน UV ที่ความยาวคลื่น 256 และ 366 nm ซึ่งโครมาโทแกรมที่ได้จะแสดงให้เห็นเป็น 1, 2 หรือ 3 จุด (ตารางที่ 19) และพบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อการมองเห็นจุดปรากฏใน TLC ชัดเจนกว่าสารสกัดจากเส้นใยรา

ตารางที่ 19 โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟท์จากต้นจิก ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับหรือต่ำกว่า 128 µg/ml

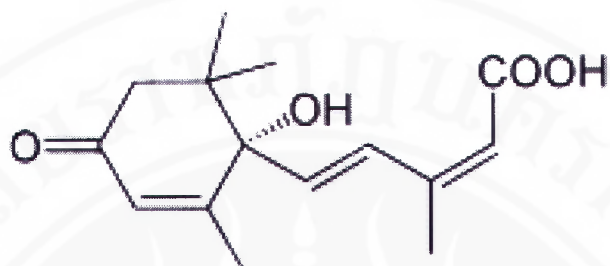
รหัสรา	สารสกัด	น้ำหนักสารที่เหลือ (mg)	ลักษณะสาร	โครมาโทแกรม		
				ตาเปล่า	UV	
					256 nm	366 nm
N27	BE	2.4	สีน้ำตาลเข้ม, หนืด			
	CH	2.2	สีเหลืองอ่อน, ผลึก			
	CE	2.0	สีเหลืองอ่อน, ผลึก			
N32	CH	2.0	สีเหลือง, ผลึก		*	*
N34	CH	2.0	สีขาวขุ่น, ผลึก			
N41	BE	2.0	สีน้ำตาลปนเหลือง, หนืด		*	
N45	BE	2.9	สีน้ำตาลปนเหลือง, หนืด			
N47	CE	2.0	สีน้ำตาล, หนืด		*	
N55	BE	2.0	สีน้ำตาลปนแดง, หนืด			
	CH	1.2	สีขาวขุ่น, ผง			
N56	CH	2.2	สีเหลืองอ่อน, หนืด		*	*
N59	BE	2.7	สีน้ำตาลปนเหลือง, หนืด	*	*	*
N62	BE	3.8	สีน้ำตาลปนเหลือง, หนืด			
	CH	1.3	สีขาวขุ่น, ผง			
	CE	2.0	สีเหลือง, หนืด			
N63	BE	2.9	สีน้ำตาลปนเหลือง, หนืด			
	CE	2.1	สีเหลืองปนแดง, หนืด		**	*
N64	BE	2.0	สีเหลือง, หนืด			
	CH	2.0	สีเหลืองอ่อน, หนืด			
	CE	2.6	สีเหลืองอ่อน, หนืด	*สีชมพู		

หมายเหตุ * = โครมาโทแกรมแสดง 1 จุด
 ** = โครมาโทแกรมแสดง 2 จุด
 *** = โครมาโทแกรมแสดง 3 จุด

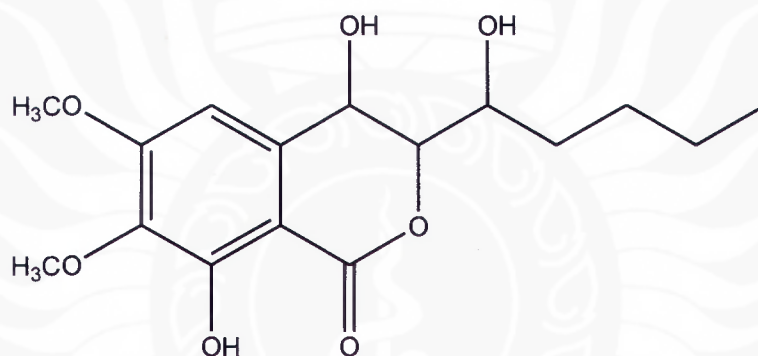
จากการนำสารสกัดที่มีน้ำหนักสารที่ส่งทดสอบองค์ประกอบทางเคมีมากกว่า 2.5 mg จำนวน 20 สาร ไปบันทึกข้อมูล ¹H-NMR ได้ผลดังตารางที่ 18 จากจำนวนสารสกัดทั้งหมด พบว่ามีสารสกัดจำนวน 2 สารที่จัดเป็นสารบริสุทธิ์ คือ S12BE ซึ่งเป็นสารที่มีการบันทึกข้อมูล ¹H-NMR แล้ว จัดเป็นสาร abscisic acid (ภาพที่ 16) ส่วนสารบริสุทธิ์อีกหนึ่งสารคือ S28BE หลังการวิเคราะห์โครงสร้างโดย ¹H-NMR และ ¹³C-NMR พบว่าเป็นอนุพันธ์ของสารประเภท isochromanone (ภาพที่ 17) นอกจากนั้นยังพบว่ามีสารที่มีสารหลักเหมือนกับ S28BE อีก 2 สาร คือ S29BE และ S34BE และได้สารสกัดหยาบที่มีสัญญาณ ¹H-NMR ที่น่าสนใจ 2 สาร คือ N59BE และ C41CE ส่วนสารสกัดที่เหลืออีก 14 จัดเป็นกลุ่มสารที่ให้สัญญาณ ¹H-NMR ที่ไม่น่าสนใจ (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 20 ข้อมูลสารสกัดหยาบจากต้นจิกที่ส่งบันทึกข้อมูล ¹H-NMR

กลุ่มที่	กลุ่มสาร	สารสกัดหยาบ
1	สารบริสุทธิ์	S12BE (abscisic acid) S28BE (อนุพันธ์ของสารประเภท isochromanone)
2	สารสกัดหยาบที่มีสารหลักเหมือนกับ S28BE	S29BE, S34BE
3	สารสกัดหยาบที่มีสัญญาณ ¹ H-NMR ที่น่าสนใจ	N59BE, C41CE
4	สารสกัดหยาบในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสัญญาณ ¹ H NMR ที่ไม่น่าสนใจ	N45BE, N62BE, N63BE, C22BE, C56BE, S16BE, S26BE, S32BE, S36BE,
5	สารสกัดหยาบในส่วนของเซลล์ที่มีสัญญาณ ¹ H NMR ที่ไม่น่าสนใจ	N64CE, N76CE, C56CE, S4CE, S12CE



ภาพที่ 16 สูตรโครงสร้างของ abscisic acid จากสารสกัด S12BE



ภาพที่ 17 สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ของสารประเภท isochromanone จากสารสกัด S34BE

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อนำสารสกัดที่ให้ค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 128 $\mu\text{g/ml}$ และมีปริมาณสารเหลือมากกว่า 2.5 mg จำนวน 20 สาร ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH $\cdot$ และ OH $\cdot$ พบว่าสารสกัดทุกสารมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล OH $\cdot$ ให้ค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.02-2.80 mg/ml และมีสารสกัดจำนวน 14 สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล DPPH $\cdot$ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.03-0.24 mg/ml ในจำนวนนี้มีสารสกัดจำนวน 7 สาร คือ N45BE, N64CE, N76CE, C56BE, C56CE, S4CE และ S12CE ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล OH $\cdot$ ดี (IC_{50} = 0.02-0.04 mg/ml) ซึ่งมีค่าต่ำกว่า tannin ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ (IC_{50} = 2.10-2.35 mg/ml) และมีสารสกัดจำนวน 4 สาร คือ N45BE, N64CE, N76CE และ S12CE ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH $\cdot$ ได้ดี มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.03-0.04 mg/ml ซึ่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน BHT ที่ใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบ (IC_{50} = 0.02-0.05 mg/ml) (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 21ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์

รหัสรา	สารสกัด	Antioxidant IC ₅₀ (mg/ml)			
		DPPH [•]	Activity	OH [•]	Activity
N45	BE	0.04	+++	0.02	+++
N59	BE	0.15	+	2.70	+
N62	BE	-	-	2.80	+
N63	BE	-	-	2.60	+
N64	CE	0.03	+++	0.02	+++
N76	CE	0.04	+++	0.04	+++
C22	BE	0.21	+	2.60	+
C41	CE	0.15	+	1.25	++
C56	BE	0.20	+	0.02	+++
	CE	0.11	+	0.02	+++
S4	CE	0.16	+	0.04	+++
S12	BE	0.15	+	2.10	+
	CE	0.04	+++	0.03	+++
S16	BE	-	-	2.30	+
S26	BE	0.24	+	2.25	+
S28	BE	-	-	2.30	+
S29	BE	-	-	2.10	+
S32	BE	-	-	2.05	+
S34	BE	0.17	+	2.30	+
S36	BE	0.17	+	2.30	+
BHT		0.02-0.05			
Tannin				2.10-2.35	

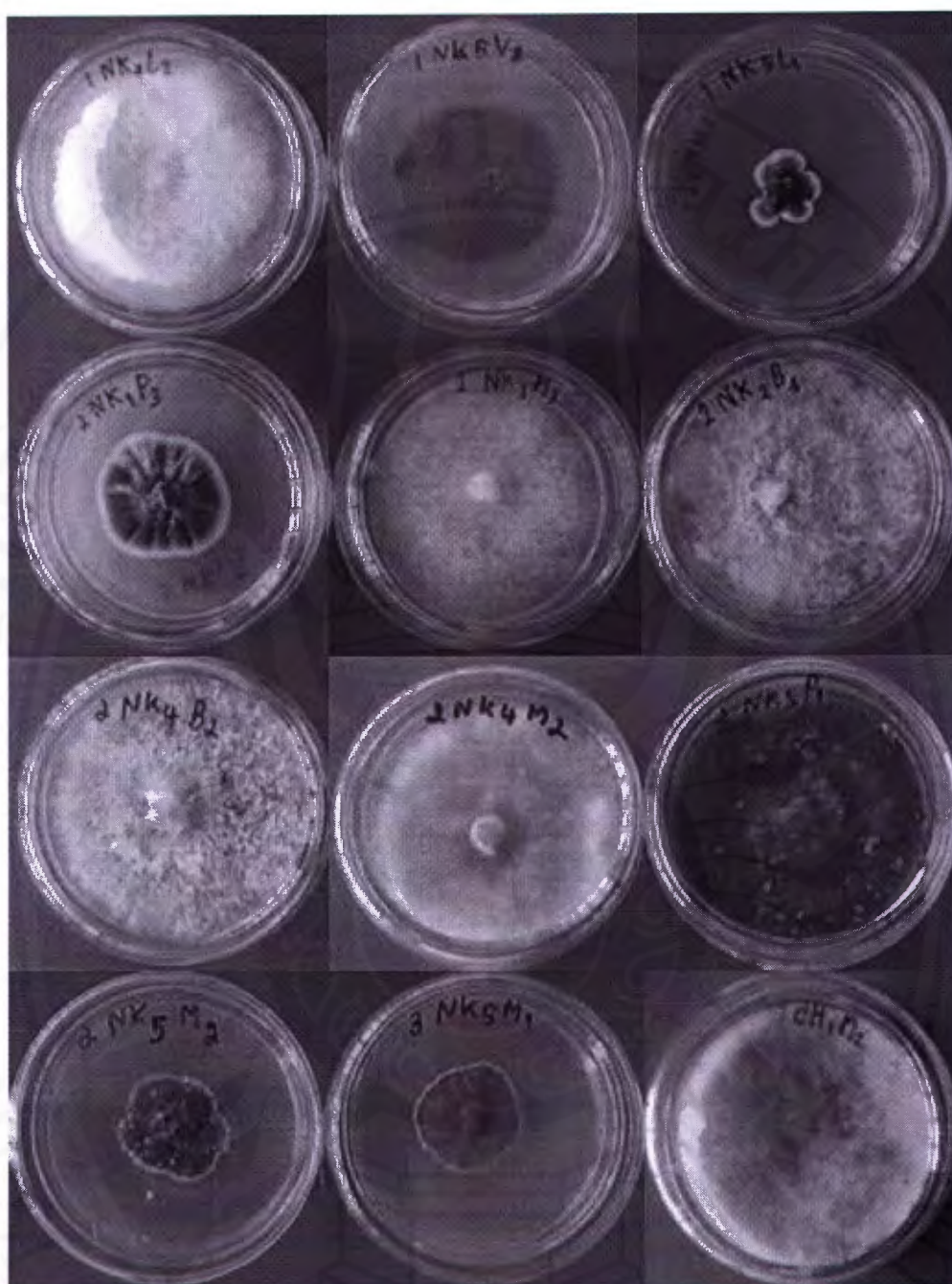
++++ = very good extivity, +++ = good activity, ++ = fair activity, + = weak activity, - = no activity

8 การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ โดยใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

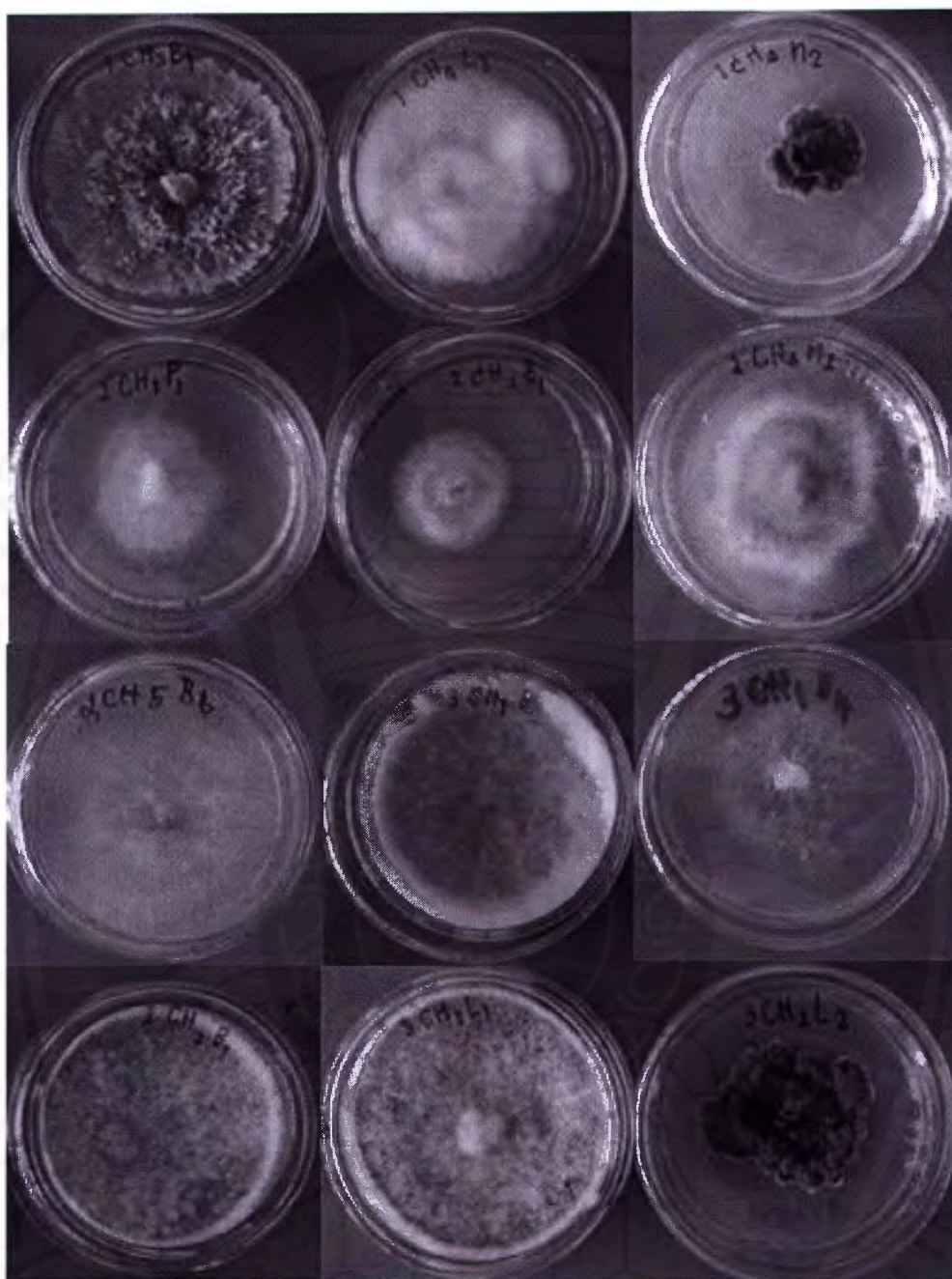
เมื่อนำราเอนโดไฟท์ทั้ง 38 ไอโซเลต ที่ให้สารสกัดหยาบที่มีค่า MIC ต่อจุลินทรีย์ก่อโรค $\leq 128 \mu\text{g/ml}$ ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อมีอายุ 7-14 วัน พบว่ามีลักษณะของโคโลนี และลักษณะของเส้นใยแสดงดังในตารางที่ 20 โดยเชื้อราทั้ง 38 ไอโซเลต มีเส้นใยแบบมีผนังกันราเอนโดไฟท์จำนวน 29 ไอโซเลต (76.3%) ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้าง stomata จึงจัดอยู่ในกลุ่ม mycelia sterilia (ตัวอย่างดังภาพที่ 18) จากลักษณะของ stomata และ conidia ที่ราเอนโดไฟท์กลุ่มที่เหลือสร้าง พบว่าจัดเป็นเชื้อราใน division Eumycota ทั้งหมด โดยจัดอยู่ใน subdivision Deuteromycota 7 ไอโซเลต และอยู่ใน subdivision Ascomycota 2 ไอโซเลต

จากจำนวนเชื้อรา 7 ไอโซเลตที่จัดอยู่ใน subdivision Deuteromycota เชื้อรา 3NK3B2 มีการสร้าง stroma จึงจัดอยู่ในกลุ่ม *Xylaria* sp. (ภาพที่ 19) เชื้อรา 1NK4L2 และ 3SR3P3 สร้าง conidia แบบ *Colletotrichum* sp. (ภาพที่ 20) เชื้อรา 1CH4L3 สร้าง conidia แบบ *Fusarium* sp. (ภาพที่ 21) เชื้อรา 2CH5B6 สร้าง conidia แบบ *Acremonium* sp. (ภาพที่ 22) เชื้อรา 3CH2B1 สร้าง conidia แบบ *Sporothrix* sp. (ภาพที่ 23) และเชื้อรา 3SR3P2 สร้าง conidia แบบ *Pestalotiopsis* sp. (ภาพที่ 24)

เชื้อราใน subdivision Ascomycota ทั้ง 2 ไอโซเลต (2NK1P3 และ 3NK5M1) มีการสร้าง conidia แบบ *Penicillium* sp. (ภาพที่ 25)



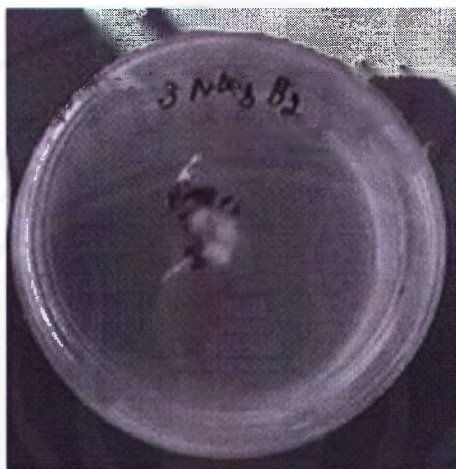
ภาพที่ 18 ตัวอย่างโคโลนีราเอนโคไฟท์ที่ไม่มีการสร้าง conidia (mycelia sterilia)



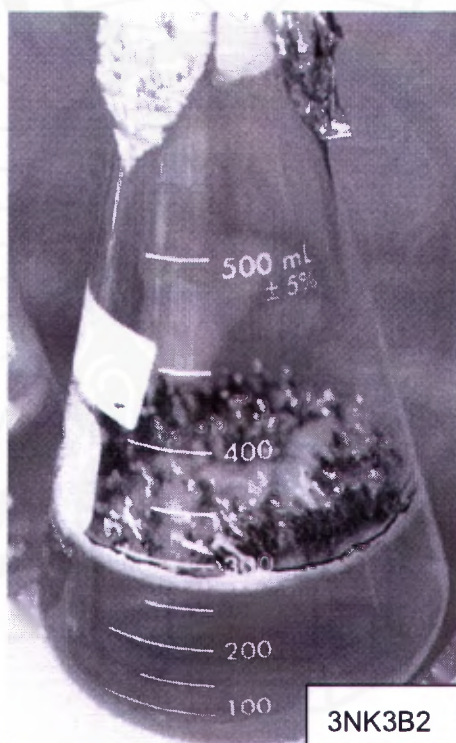
ภาพที่ 18 ตัวอย่างโคโลนีราเอนโดไฟท์ที่ไม่มีการสร้าง conidia (mycelia sterilia) (ต่อ)



ภาพที่ 18 ตัวอย่างโคโลนีราเอนโดไฟท์ที่ไม่มีการสร้าง conidia (mycelia sterilia) (ต่อ)



(a)

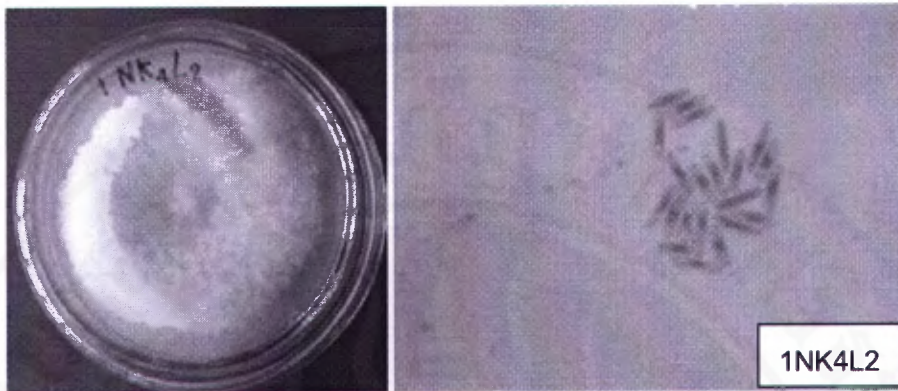


(b)

ภาพที่ 19 ลักษณะโคโลนีและstoma ของราเอนโดไฟท์ *Xylaria* sp.

(a) เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน

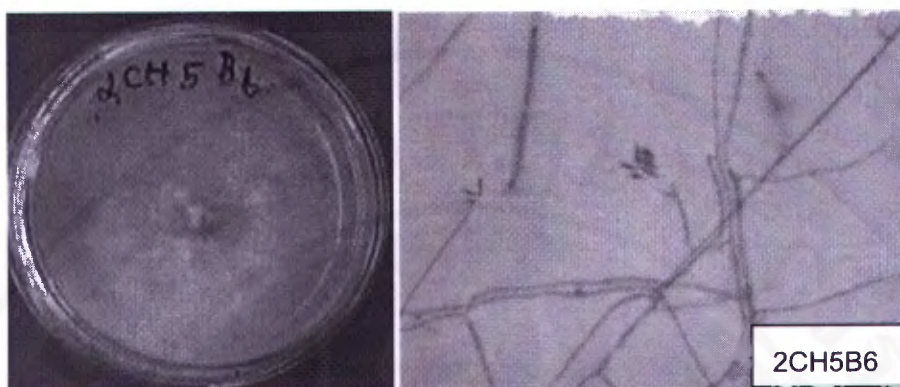
(b) เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB เป็นเวลา 3 สัปดาห์



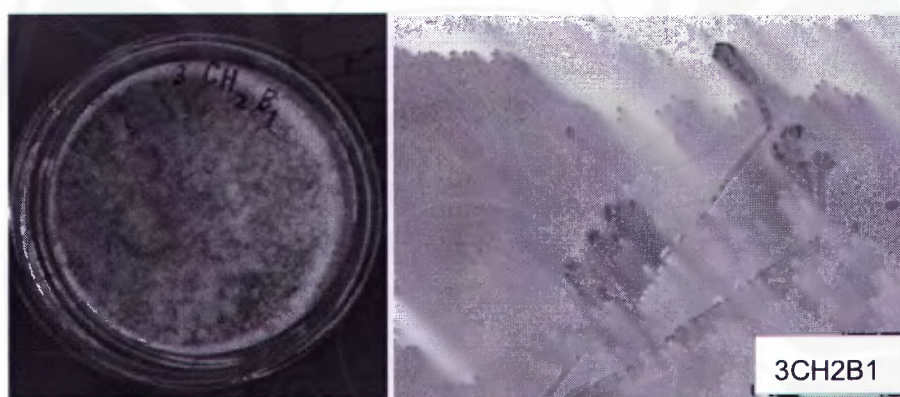
ภาพที่ 20 ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* sp.



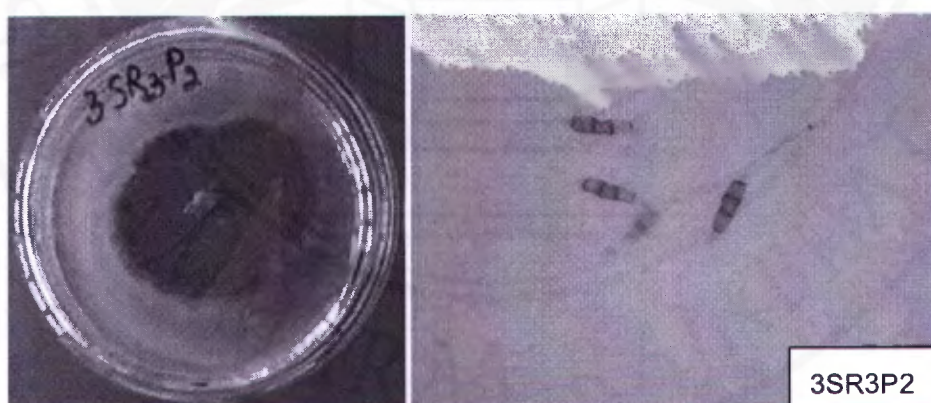
ภาพที่ 21 ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp.



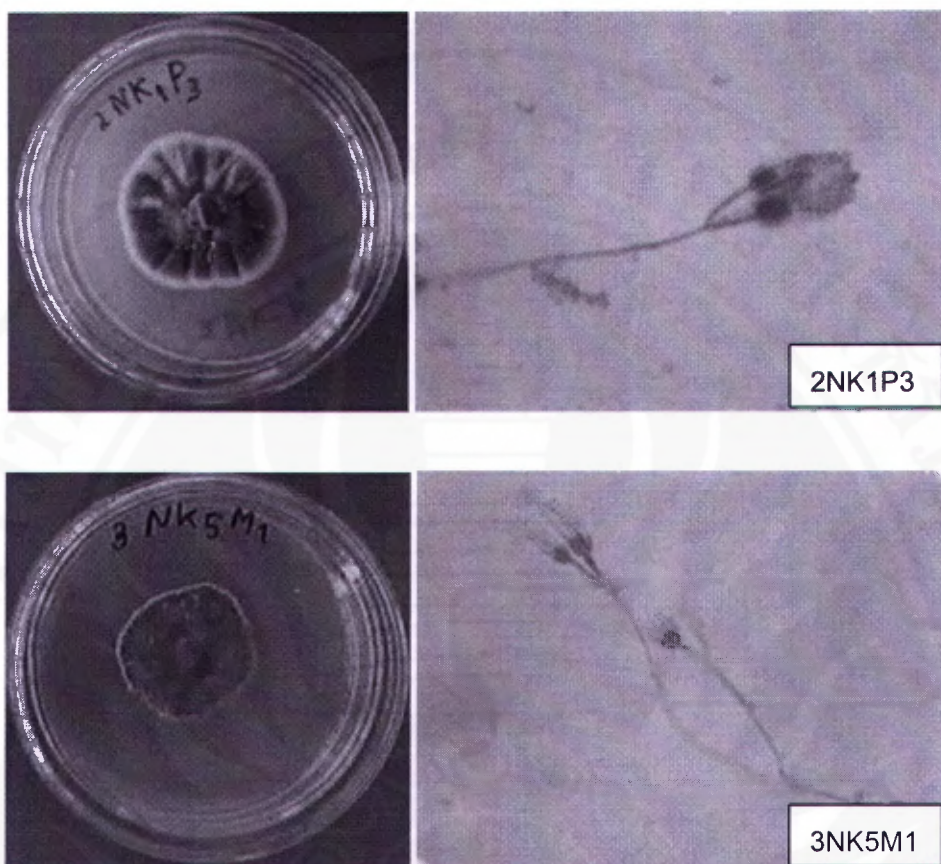
ภาพที่ 22 ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของราเอนโดไฟท์ *Acremonium* sp.



ภาพที่ 23 ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของราเอนโดไฟท์ *Sporothrix* sp.



ภาพที่ 24 ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis* sp.



ภาพที่ 25 ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของราเอนโดไฟท์ *Penicillium* sp.

วิจารณ์ผลการทดลอง

เนื่องจากราที่อยู่บริเวณชั้นส่วนพืชประกอบไปด้วยราที่อยู่บริเวณผิว (epiphyte) และราที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) ในการศึกษาเฉพาะรากลุ่มเอนโดไฟท์จึงต้องมีการตรวจสอบทุกครั้งว่าราที่แยกได้ไม่ได้เป็นราอีพิไฟท์ การศึกษาครั้งนี้ได้ทำให้ผิวนั้นส่วนพืชปราศจากเชื้อโดยใช้วิธีการของ Phongpaichit *et al* (2006) และทดสอบว่าผิวพืชปราศจากราอีพิไฟท์ โดยการนำน้ำสุดท้ายที่ใช้ล้างชั้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงเชื้อ การที่ไม่เชื้อใดเจริญภายหลังจากเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์ นอกจากแสดงให้เห็นว่าวิธีการที่ใช้ในการกำจัดเชื้อในครั้งนี้จะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพแล้ว ยังแสดงว่าราที่แยกได้จากชั้นส่วนพืชเป็นราเอนโดไฟท์ที่แท้จริง

จากจำนวนราเอนโดไฟท์ 392 ไอโซเลต ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของต้นจิก จาก 3 จังหวัด ในภาคใต้ของประเทศไทย พบว่าจำนวนเชื้อราที่แยกได้แตกต่างกันไปตามพื้นที่และชั้นส่วนพืชที่นำมาแยก เมื่อพิจารณาถึงพื้นที่พบว่าสามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราชมากที่สุด รองลงมาคือจังหวัดชุมพร และจากจังหวัดสุราษฎร์ คิดเป็น 45, 29 และ 26% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงชั้นส่วนพืชที่นำมาแยกเชื้อ พบว่าสามารถแยกได้จากส่วนของกิ่งมากที่สุด รองลงมาคือ เส้นกลางใบ ก้านใบ ผิวใบ และเส้นใบ คิดเป็น 39.3, 24.7, 15.3, 14.3 และ 6.4% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม จำนวนเชื้อที่แยกได้มากน้อยต่างกันนี้ อาจเนื่องมาจากจำนวนชั้นของพืชที่นำมาแยกมีความแตกต่างกัน จำนวนราที่แยกเชื้อได้จากกิ่งที่มากที่สุดในครั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้จำนวนชั้นของกิ่งในการแยกมากที่สุด เมื่อนำจำนวนเชื้อที่แยกได้จากพืชแต่ละส่วนมาคำนวณหาอัตราการแยกเชื้อ (isolation rate) โดยใช้สูตรของ Jordann *et al* (2006)

$$\text{อัตราการแยกเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนไอโซเลตของเชื้อราที่แยกได้}}{\text{จำนวนชั้นส่วนพืชที่นำมาแยก}}$$

จากจำนวนชั้นส่วนพืชที่นำมาแยกทั้งหมด 990 ชั้น จะพบว่าอัตราการแยกราเอนโดไฟท์จากต้นจิกมีค่าเท่ากับ 0.39 ไอโซเลตต่อชั้น ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ 0.49, 0.36 และ 0.35 ซึ่งเป็นอัตราการแยกราเอนโดไฟท์จาก *Colophospermum mopane* (Cowan, 1999), *Camptotheca acuminata* (Lin *et al.*, 2007) และ *Azadirachta indica* (Mahesh *et al.*, 2005) แต่มีค่าต่ำกว่า 0.78 และ 4.2 ซึ่งเป็นอัตราการแยกราเอนโดไฟท์จาก *Hevea brasiliensis* (Gazis and Chaverri, 2010) และ *Rhodomyrtus tomentosa* (Jeenkaewpieam, 2010) เมื่อพิจารณาถึงอัตราการแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อต่างๆ ของพืช พบว่ามีอัตราการแยกเชื้อสูงสุดจากเส้นกลางใบ รองลงมาคือ แผ่นใบ กิ่ง ก้านใบ และเส้น

ใบ โดยมีอัตราการแยกเท่ากับ 0.72, 0.41, 0.34, 0.33 และ 0.28 ไอโซเลตต่อชิ้น ตามลำดับ ซึ่งมีลำดับใกล้เคียงกับรายงานของ Jeenkaewpieam (2010) ที่พบว่าอัตราการแยกเชื้อจากต้นโทะมีค่าสูงสุดจากส่วนของเส้นกลางใบ รองลงมาคือ แผ่นใบ กิ่ง เส้นใบ และก้านใบ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Cannon and Simmons (2002) และ Helander *et al.* (1993) ที่รายงานว่าในพืชที่มีแผ่นใบกว้างมักจะพบราเอนโดไฟท์ในบริเวณที่ใกล้กับส่วนฐานของเส้นกลางใบมากกว่าแผ่นใบ Saikkonen (2007) อธิบายว่า อาจเป็นเพราะบริเวณส่วนดังกล่าวมีปริมาณน้ำมากกว่าแผ่นใบ จึงทำให้สปอร์ของราเอนโดไฟท์งอกได้ดีกว่า

อัตราการแยกราเอนโดไฟท์ที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อและชนิดของพืชที่ต่างกัน อาจเนื่องมาจากมีเชื้อราเอนโดไฟท์บางชนิดที่มีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ (Sieber *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1995; Barengo *et al.*, 2000; Photita *et al.*, 2000d and de Siqueira *et al.*, 2011) หรือจำเพาะกับชนิดของพืชอาศัย (Guo *et al.*, 1998 and Gennaro *et al.*, 2003; Arnold and Lutzoni, 2007) หากเนื้อเยื่อใดหรือพืชชนิดใดมีอาหารและมีสภาพที่เหมาะสมกับชนิดของราเอนโดไฟท์มากกว่า หรือมีกลไกการป้องกันการเข้าอยู่อาศัยของราเอนโดไฟท์น้อยกว่า โอกาสที่จะตรวจพบราเอนโดไฟท์ก็จะมากกว่า อายุของใบพืชมีผลต่ออัตราการแยกเชื้อเช่นเดียวกัน โดยอัตราการแยกราเอนโดไฟท์จะสูงในใบพืชที่มีอายุมากกว่า (Fisher *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1999; brown *et al.*, 1998 and Photita, 2000) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีระยะเวลาในการสะสมเชื้อจากสิ่งแวดล้อมได้มากกว่า (Fröhlich *et al.*, 2000 และ Photita, 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสภาวะแวดล้อมที่พืชเจริญ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน และแหล่งของจุลินทรีย์รอบต้นพืช จะมีผลต่ออัตราการเข้าอยู่อาศัยในต้นพืช (Carroll, 1995 and Photita, 2000) ดังนั้นอัตราการแยกเชื้อจากราเอนโดไฟท์ที่แตกต่างกันในแต่ละจังหวัด อาจเป็นผลเนื่องมาจากการแยกเชื้อจากต้นพืชที่ขึ้นอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน

เนื่องจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ในครั้งนี้เป็นรากลุ่มที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (cuturable fungi) เท่านั้น เชื้อราเอนโดไฟท์ชนิดอื่นที่ไม่สามารถโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (uncuturable fungi) จะไม่ถูกคัดเลือก จำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จึงมีค่าน้อยกว่าจำนวนที่มีอยู่เป็นจริง ซึ่งหมายถึงโอกาสที่จะตรวจพบราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ดีก็จะน้อยลงด้วย มีรายงานว่าการใช้เทคนิคในการตรวจหาราเอนโดไฟท์ที่ไม่ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Johnson *et al.*, 1982), การตรวจหา (1-3)- β -D-glucan ในผนังเซลล์ของรา (Johnston *et al.*, 2006), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Duong *et al.*, 2006 and Tao *et al.*, 2008) Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP)

(Nikolcheva and Bärlocher, 2004, 2005) หรือการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย DNA (Guo *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001 and Seena *et al.*, 2008) จะทำให้ตรวจพบชนิดของเอนโดไฟต์มากขึ้น

จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อของราเอนโดไฟต์จำนวน 392 ไอโซเลตที่แยกได้ ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในคน 7 ชนิด คือ *S. aureus* ATCC25923, MRSA SK1, *P. aeruginosa* ATCC27853, *E. coli* ATCC25922, *C. albicans* ATCC90028, *C. neoformans* ATCC90012 และ *M. gypseum* มีเชื้อราจำนวน 182 ไอโซเลต (46.4%) ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่นำมาทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด ซึ่งมีค่าสูงกว่าการศึกษาของ Phongpaichit *et al.* (2006) ที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากพืชกลุ่ม *Garcinia* sp. แล้วพบว่า จากจำนวนราเอนโดไฟต์ที่นำมาทดสอบทั้งหมด 377 ไอโซเลต มีราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคลักษณะเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด จำนวน 70 ไอโซเลต (18.6%) น้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์จากต้นจิกสามารถยับยั้งเชื้อได้ 1-4 ชนิด โดยยับยั้งเชื้อ 1 ชนิดได้มากที่สุด (34.4%) รองลงมาคือ 2, 3 และ 4 ชนิด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 8.4, 3.3 และ 0.3% ตามลำดับ แสดงว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นจิกมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแคบ (narrow spectrum)

น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้มากที่สุด (30.4%) รองลงมาคือ *S. aureus* และ MRSA (11.7 และ 9.7%) และยับยั้งจุลินทรีย์ที่เหลือได้น้อย (0.5-3.8%) เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่พบบ่อยว่าทำให้เกิดการติดเชื้อกับผู้ป่วยภายหลังการผ่าตัดหรือผู้ที่มิภูมิคุ้มกันต่ำ เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบที่มีความต้านทานต่อสารออกฤทธิ์มาก สารธรรมชาติส่วนใหญ่ไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้หรือหากยับยั้งได้ก็มักพบว่าต้องใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูง (Anzai *et al.*, 2003; and Marinho *et al.*, 2005; Phongpaichit *et al.*, 2006) การพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์จากหลายไอโซเลตสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดได้ จึงเป็นการค้นพบที่น่าสนใจและควรศึกษาถึงชนิดของสารออกฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ต่อไป

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงเชื้อในครั้งนี้ ใช้วิธี agar well diffusion test ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบที่ทำได้ง่ายและเหมาะที่จะใช้คัดกรองสารทดสอบที่มีปริมาณมาก เป็นวิธีที่เหมาะสมจะใช้ทดสอบสารที่มีความเป็นขั้วสูง ละลายน้ำได้ดี และมีขนาดโมเลกุลเล็ก สามารถทำให้ละลายและแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี ทำให้เกิดการยับยั้งที่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามมีสารออกฤทธิ์บางชนิดที่มีความเป็นขั้วต่ำหรือมีขนาดโมเลกุลใหญ่ ทำให้ได้ขนาด inhibition zone แคบหรือไม่เกิด inhibition zone ซึ่งทำให้การคัดเลือกราเอนโดไฟต์ผิดพลาดไป ส่งผลให้ได้จำนวนราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารออกฤทธิ์น้อยกว่าที่เป็นจริง

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อราและเส้นใยที่มีฤทธิ์ในการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อ ไปสกัดด้วยตัวทำละลาย แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์กับจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งจากการทดสอบกับน้ำเลี้ยงเชื้อรา พบว่ามีสารสกัดหายาจำนวน 174 สารจากสารสกัดหายาทั้งหมด 443 สาร (39.3%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL โดยสารสกัดหายาจากเส้นใยด้วย hexane (CH) มีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่าสารสกัดหายาจากเส้นใยด้วย ethyl acetate (CE) และสารสกัดหายาจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate (BE) ซึ่งให้ผลเหมือนกับการศึกษาของ Buatong *et al.*, (2011) และ Jeenkeawpieam (2010) แสดงว่าสารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่เป็นสารมีขั้วต่ำที่เชื้อราสร้างแล้วเก็บไว้ในเซลล์

สารสกัดหายาให้ฤทธิ์ในการทดสอบกับยีสต์ใกล้เคียงกับน้ำเลี้ยงเชื้อมากที่สุด โดยมีสารสกัด 95.1 และ 82.5% ที่ยังสามารถยับยั้ง *C. albicans* และ *C. neoformans* ได้เช่นเดียวกับน้ำเลี้ยงเชื้อ และมีสารสกัด 44.8 และ 31.5% ที่ยังสามารถยับยั้ง MRSA และ *S. aureus* ได้ สารสกัดหายาให้ฤทธิ์ในการทดสอบกับ *P. aeruginosa* ต่างจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาก โดยมีสารสกัดเพียง 11.6% ที่ยังคงให้ผลทดสอบกับเชื้อชนิดนี้เหมือนกับน้ำเลี้ยงเชื้อ แสดงให้เห็นว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. aeruginosa* ในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหายาเป็นสารต่างชนิดกัน โดยสารออกฤทธิ์ในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นสารที่มีขั้วสูง ในขณะที่สารออกฤทธิ์ในสารสกัดหายาเป็นสารที่มีขั้วต่ำกว่า หรืออาจเป็นได้ว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อมีสารหลายชนิดที่ออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้ง *P. aeruginosa* เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วยตัวทำละลายจะเป็นการแยกเฉพาะสารบางตัวออกมาทดสอบฤทธิ์ จึงทำให้ฤทธิ์ที่ได้ด้อยลงไป อย่างไรก็ตามในบางครั้งการนำสารสกัดหายามาทำให้บริสุทธิ์จะทำให้สารที่ได้มีฤทธิ์ดีขึ้น เช่นการศึกษาของ Maria *et al.* (2005) พบว่า สารสกัดหายาจากเชื้อ *Aspergillus* sp. 3 และ MS1 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Cryptococcus albidus* ได้ แต่เมื่อนำสารสกัดหายาไปทำให้บริสุทธิ์ กลับพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะในสารสกัดหายามีสารออกฤทธิ์น้อยหรือมีสารหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ต้านกัน เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์จึงได้สารที่มีความเข้มข้นมากขึ้นและออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น เนื่องจากในการศึกษารั้งนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหายาเฉพาะกับจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้งโดยน้ำเลี้ยงเชื้อ หากนำสารสกัดหายามาทดสอบกับจุลินทรีย์ทั้ง 7 ชนิดอีกครั้ง จำนวนสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์น่าจะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น

จากการทดสอบหาค่า MIC พบว่าสารสกัดหายาบางสารมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีมาก โดยให้ค่า MIC ต่อจุลินทรีย์ทดสอบต่ำกว่าหรือใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน สารดังกล่าวได้แก่ C57CH ที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *C. neoformans* เท่ากับ 0.5 µg/ml ซึ่งต่ำกว่าค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ amphotericin B (1 µg/ml) สาร S4CH, S12CH, S16CH และ S28CH ที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ

C. albicans เท่ากับ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเท่ากับค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ amphotericin B และ สารสกัด N45BE ที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* เท่ากับ 4 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ gentamicin เพียง 2 เท่า จึงควรทำการแยกเพื่อหาสารออกฤทธิ์หรือศึกษาถึงกลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเหล่านี้ต่อไป และเนื่องจากมีสารสารสกัดหยาบเพียง 5 สารที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบ แสดงว่าสารส่วนใหญ่มีฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH $^{\cdot}$ และ OH $^{\cdot}$ ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ ได้แสดงว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ดีในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดหยาบทั้ง 20 สารที่ทดสอบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล OH $^{\cdot}$ (IC_{50} = 0.02-2.80 mg/mL) และสารสกัด 14 สาร มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล DPPH $^{\cdot}$ (IC_{50} = 0.03-0.24 mg/mL) แม้ว่าในครั้งนี้จะไม่ได้ทำการศึกษาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ แต่ Huang *et al.* (2007, 2008) รายงานว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชชั้นสูงเป็นแหล่งที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดีและมีปริมาณสารมาก จำนวน 20 สาร พบว่ามีสารสกัดหยาบ 2 สาร ที่เป็นสารบริสุทธิ์ คือ สารสกัดหยาบ S12BE จากราเอนโดไฟท์ 1SR4M2 และสารสกัดหยาบ S28BE จากราเอนโดไฟท์ 3SR2L3 ซึ่งเป็นกรด abscisic และอนุพันธ์ของสารประเภท isochromanone ตามลำดับ

กรด abscisic เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเพื่อช่วยให้พืชทนต่อสภาพความเครียดต่าง ๆ ได้ดี (Bohnert *et al.*, 1995) การตรวจพบว่าราเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารชนิดนี้ได้เช่นเดียวกับพืช จะเป็นข้อมูลสนับสนุนบทบาทของราเอนโดไฟท์ต่อพืชอาศัยที่กล่าวว่า “บทบาทหนึ่งของราเอนโดไฟท์ต่อพืชอาศัยคือช่วยให้พืชอยู่รอดได้ภายใต้ความเครียดทั้งจากปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพ” (Arechavaleta *et al.*, 1889; Redman *et al.*, 2002 and Bae *et al.*, 2008) การที่ราเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารชนิดเดียวกันกับพืชได้ อาจจะเนื่องมาจากในระหว่างการอยู่อาศัยร่วมกันราเอนโดไฟท์กับพืช ราเอนโดไฟท์กับพืชอาศัยจะมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างกัน จนทำให้ทั้งพืชและราเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารชนิดเดียวกันได้ (Strobel, 2002) การค้นพบว่าราเอนโดไฟท์และพืชอาศัยสามารถสร้างสารชนิดเดียวกันที่รู้จักกันดีและเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟท์กันอย่างมากมายในปัจจุบัน คือ การค้นพบว่าราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis microspore* สามารถสร้างสารต้านมะเร็ง taxol ได้เช่นเดียวกับพืชอาศัย *Taxus brevifolia* (Stierle *et al.*, 1993)

ตัวอย่างการค้นพบอนุพันธ์ของสาร isochromanone จากราเอนโดไฟท์ ได้แก่ งานวิจัยของ Vatcharin *et al.* (2010) ที่แยกสาร 3-isochromanone ได้จากรา *Nigrospora* sp. PSU-F12 ที่แยกได้จากกัลปังหา *Annella* sp. และจากงานวิจัยของ Schamedia-Hirshchman, *et al.* (2005) ที่แยกสาร isochromanone mellein ได้จากราเอนโดไฟท์ E-3 ที่แยกได้จากท่อลำเลียงอาหารของ *Prumnopitys*

andina (Lleuque) แต่ไม่มีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารชนิดนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสาร S28BE ที่เป็นอนุพันธ์ของสาร isochromanone และสารสกัดหยาบ S29BE และ S34BE ที่มีโครงสร้างหลักจากการบันทึกข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ เหมือนกับสาร S28BE มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. neoformans* ทั้ง 3 สาร โดยให้ค่า MIC ต่อเชื้อชนิดนี้เท่ากับ 16-32 $\mu\text{g/ml}$ แสดงว่าอนุพันธ์ของสาร isochromanone ที่เชื้อราเอนโดไฟต์สร้างขึ้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. neoformans* ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยโรค AIDS ได้ดี

ปัญหาหนึ่งที่พบในการศึกษาครั้งนี้และเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ (Yu *et al.*, 2010) คือ สารที่เอนโดไฟต์สร้างขึ้นมีปริมาณน้อย ไม่สามารถนำไปศึกษาหาค่าประกอบทางเคมี หรือนำไปทดสอบสารออกฤทธิ์ของสารนั้นได้ ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณและชนิดของสารที่ราเอนโดไฟต์สร้าง ได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ปริมาณอากาศ และระยะเวลาที่ใช้เลี้ยง (Bode *et al.*, 2002; Strobel *et al.*, 2004 และ Maria *et al.*, 2005) การศึกษาเพื่อหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อ และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เพื่อให้ราเอนโดไฟต์สร้างสารออกฤทธิ์ให้ได้ปริมาณมาก จึงเป็นอีกหัวข้อหนึ่งที่น่าสนใจศึกษา

จากการนำเชื้อราเอนโดไฟต์ 38 ไอโซเลต ที่ให้สารสกัดหยาบที่มีค่า MIC ต่อจุลินทรีย์ก่อโรค $\leq 128 \mu\text{g/ml}$ ไปจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และลักษณะการสร้างสปอร์บน slide culture พบว่าราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่ (76.3%) ไม่สร้างสปอร์ จึงจัดอยู่ในกลุ่ม mycelia sterilia (76.3%) ส่วนราที่เหลือมีการสร้างสปอร์หรือ stomata จัดอยู่ในกลุ่ม *Penicillium* sp. และ *Colletotrichum* sp. กลุ่มละ 2 ไอโซเลต *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Sporothrix* sp., *Pestalotiopsis* sp. และ *Xylaria* sp. ชนิดละ 1 ไอโซเลต จากชนิดของราที่จำแนกได้พบว่า ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นจิกเป็นกลุ่มของราเอนโดไฟต์ที่พบได้บ่อยและมีการสร้างสารออกฤทธิ์ที่ดี สอดคล้องกับการรายงานของ Bérdy (2005) ที่รายงานว่า ในจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 6,450 ชนิด มากกว่าร้อยละ 30 มาจากเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* และ *Aspergillus* Phongpaichit *et al* (2006) ที่รายงานว่า เชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จาก *Garcenia* sp. ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีเป็นเชื้อราที่จัดอยู่ในจีนัส *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Eutypella*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Penicillium*, *Phomopsis* และ *Xylaria* และ Yu *et al.* (2010) ที่ได้ศึกษางานวิจัยจากคณะผู้วิจัยมากกว่า 20 คณะ แล้วรายงานว่าราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis* sp., *Streptomyces* sp. และ *Phomopsis* sp. เป็นกลุ่มสร้างสารออกฤทธิ์ที่คณะผู้วิจัยแยกได้มากที่สุด

การศึกษาในครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับรายงานการวิจัยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์จากพืชชนิดอื่น ที่พบว่าราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นราในกลุ่ม

mycelia sterilia (Kumaresan and Suryanarayanan, 2001; Ananda and Sridhar, 2002; and Maria *et al.*, 2005; Phongpaichit *et al.*, 2006; Hormazabal and Piontelli, 2009) ถึงแม้ว่าในบางครั้งการเปลี่ยนสถานะในการเพาะเลี้ยง เช่น การเปลี่ยนสูตรอาหาร อุณหภูมิ ความเข้มแสง ระยะเวลาการให้แสง หรือการเติมชิ้นส่วนพืช จะสามารถกระตุ้นให้เชื้อบางชนิดสร้างโครงสร้างที่ใช้ในการจัดจำแนกได้ แต่ก็พบไม่บ่อยนัก อีกทั้งการใช้วิธีการทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกเชื้อ เป็นวิธีการที่ต้องใช้เวลา และแรงงานมาก จึงพบได้บ่อยว่าในปัจจุบันผู้วิจัยจะเปลี่ยนมาใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลในการจำแนกเชื้อ และพบว่าเป็นวิธีที่มีความไว มีความจำเพาะ และมีประสิทธิภาพในการจำแนกดี (Guo *et al.*, 2001; Gao, *et al.*, 2005; Davis *et al.*; Schwarz *et al.*, 2004; Phongpaichit *et al.*, 2006 and Sette *et al.*, 2006; Xing and Guo, 2011) จึงควรที่จะใช้วิธีทางชีวโมเลกุลในการจำแนกชนิดของราเอนโดไฟท์จากต้นจิกที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์จากต้นจิกเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจอีกแหล่งหนึ่ง ควรที่จะแยกสาร วิเคราะห์สูตร โครงสร้าง ตลอดจนทำการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่น ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. จากระาเอนโคไฟท์ 392 ไอโซเลต มีเชื้อราเอนโคไฟท์ 182 ไอโซเลต (46.4%) ที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เชื้อราเอนโคไฟท์ดังกล่าวเป็นเชื้อที่แยกได้จากต้นจิก จากทั้ง 3 จังหวัด และจากทุกส่วนของพืช

2. สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดในแต่ละการทดสอบมีดังนี้ คือ

สารสกัด C9CH มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC25923 ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 16 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ของยาปฏิชีวนะทดสอบ vancomycin ที่มีค่า MIC เท่ากับ 1 $\mu\text{g/mL}$

สารสกัด N76CE, C3CH มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย MRSA SK1 ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 32 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ของยาปฏิชีวนะทดสอบ vancomycin ที่มีค่า MIC เท่ากับ 2 $\mu\text{g/mL}$

สารสกัด N45BE มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC25923 ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 4 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ของยาปฏิชีวนะทดสอบ gentamicin เพียง 2 เท่า

สารสกัด E60BE, C60CE และ S35BE มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E. coli* ATCC25922 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 200 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ของยาปฏิชีวนะทดสอบ gentamicin ที่มีค่า MIC เท่ากับ 0.5 $\mu\text{g/mL}$

สารสกัด C57CH มีฤทธิ์ต้านยีสต์ *C. neoformans* ATCC90012 ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งต่ำกว่าค่า MIC ของยาปฏิชีวนะทดสอบ amphotericin B ที่มีค่า MIC เท่ากับ 1 $\mu\text{g/mL}$

สารสกัด S4CH, S12CH, S16CH และ S28CH มีฤทธิ์ต้านยีสต์ *C. albicans* ATCC90028 ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งเท่ากับค่า MIC ของยาปฏิชีวนะทดสอบ amphotericin B

สารสกัด S52BE และ S52CH มีฤทธิ์ต้านรา *M. gypseum* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 200 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ของยาปฏิชีวนะทดสอบ miconazole ที่มีค่า MIC เท่ากับ 1 $\mu\text{g/mL}$

3. มีสารสกัดเพียง 5 สารที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบ โดยสารสกัด 1 สาร คือ C9CH มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC25923 โดยมีค่า MBC เท่ากับ 64 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนสารสกัดอีก 4 สารมีฤทธิ์ฆ่ายีสต์ *C. albicans* ATCC90028 โดยสารสกัด 3 สาร คือ N86CE, S12CH และ S33CE ให้ค่า MFC เท่ากับ 128 $\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่สารสกัด S4CE ให้ค่า MFC ต่อเชื้อชนิดนี้ต่ำกว่า คือมีค่า MFC เท่ากับ 8 $\mu\text{g/mL}$

4. จากการนำสารสกัดที่ให้ค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 128 $\mu\text{g/mL}$ และมีปริมาณสารเหลือมากกว่า 2.5 mg จำนวน 20 สาร ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH $\cdot$ และ OH $\cdot$ พบว่าสารสกัดทุกสารมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล OH $\cdot$ ให้ค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 0.02-2.80 mg/mL และมีสารสกัดจำนวน 14 สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล DPPH $\cdot$ โดยมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 0.03-0.24 mg/mL

5. จากจำนวนสารที่นำไปตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ พบว่ามีสารสกัดจำนวน 2 สารที่จัดเป็นสารบริสุทธิ์ คือสารสกัด S12BE เป็นสาร abscisic acid และสารสกัด S28BE เป็นอนุพันธ์ของสารประเภท isochromanone

6. จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราจำนวน 38 ไอโซเลตที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดี โดยให้ค่า MIC ต่อเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งต่ำกว่าหรือเท่ากับ 128 พบว่าเชื้อรา 29 ไอโซเลต ไม่สร้างสปอร์ จึงจัดอยู่ในกลุ่ม mycelia sterilia ส่วนเชื้อราอีก 9 ไอโซเลตที่เหลือ จัดอยู่ในกลุ่ม Deuteromycota 7 ไอโซเลต และจัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycota 2 ไอโซเลต