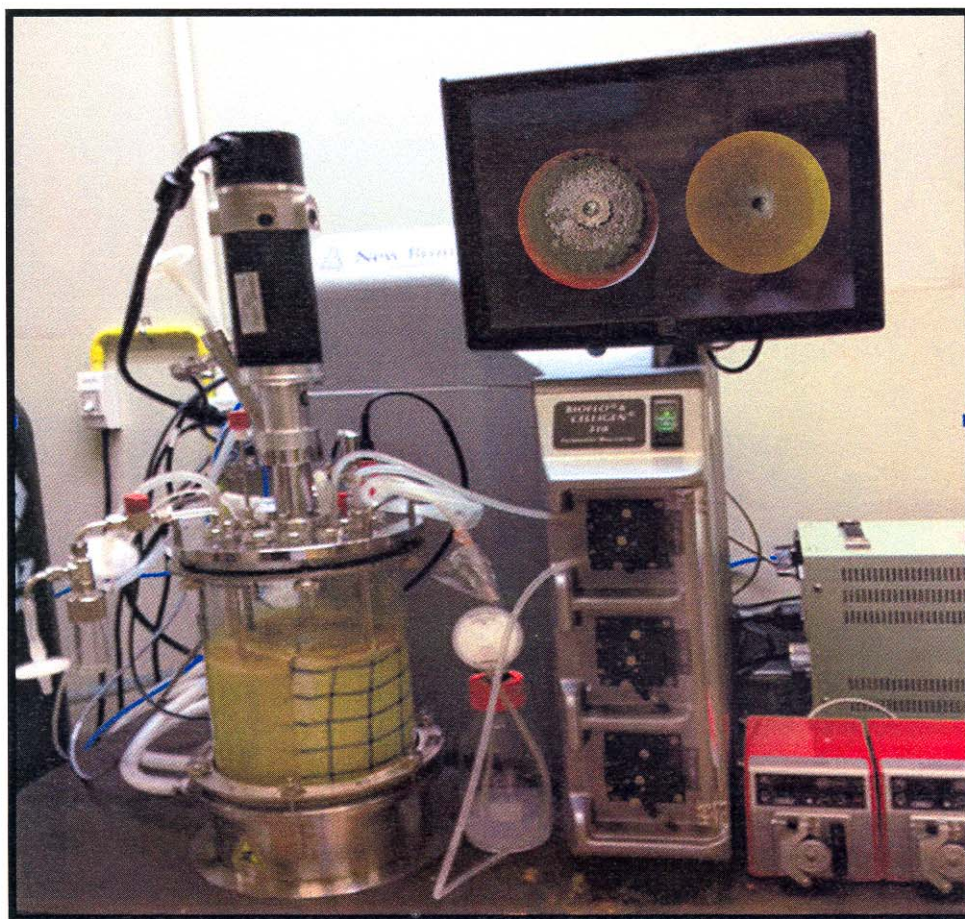




โครงการวิจัยที่ ภ. 54-05 / ย. 2 / รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การวิจัยราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพร เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางเภสัช



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ. 54-05

การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการผลิตสารสกัดปรับมาตรฐานจากผลิตภัณฑ์

ธรรมชาติระดับกึ่งอุตสาหกรรม: ส่วนที่ 1

โครงการย่อยที่ 2

การวิจัยราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางเภสัช

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การวิจัยราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางเภสัช

โดย

อนวัช สุวรรณกุล

ปพิชญา กองจินดา	ประไพภัทร คลังทรัพย์
ศิริเพ็ญ จริเกษม	กฤติยา ทิสยากร
ภูษิตา วรรณิสสร	ปิ่นณธร ทวีเทพไทกุล
คณิงนิจ บุศราคำ	บวร ตันติวรชัย

บรรณาธิการ

นฤมล รื่นไวย์

บุญเรียม น้อยชุมแพ

สลิลดา พัฒนศิริ

วว., ปทุมธานี 2558

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย



(นายจวุฒิ เสาवพฤษ์)
ผู้ว่าการ

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการรักษาโรคหลายชนิด พืชสมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญที่สร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยทั่วไปการสกัดสารสำคัญจากพืชนั้นต้องใช้วัตถุดิบปริมาณมากและใช้ระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณวัตถุดิบให้เพียงพอต่อการสกัดในแต่ละครั้ง ดังนั้น จึงมีแนวคิดในการหาวิธีการผลิตสารออกฤทธิ์ที่เพียงพอต่อความต้องการ. ราเอโนโดไฟต์ในพืชสมุนไพรนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาและทำการวิจัย เนื่องจากสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ราเอโนโดไฟต์สร้างขึ้นนั้นส่วนใหญ่แล้วมีคุณสมบัติคล้าย หรือเหมือนกับสารออกฤทธิ์ของพืชอาศัย ดังนั้น การเลี้ยงเชื้อราเพื่อสกัดเอาสารสำคัญนั้น จึงเป็นวิธีที่สะดวก, ประหยัด และได้ปริมาณสารสำคัญที่คุ้มค่าต่อการผลิตมากกว่าที่จะสกัดจากพืชวัตถุดิบโดยตรง.

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์แหล่งสำคัญที่สร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรค ราเอโนโดไฟต์เจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิต โดยไม่ก่อให้เกิดโรคและเป็นที่ยูจิกกันมานาน จากการศึกษาอย่างจริงจังในระยะ 30 ปีมานี้ พบว่า ราเอโนโดไฟต์เป็นแหล่งสำคัญของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง.

ปัจจุบันโรคมะเร็งยังเป็นปัญหาสำคัญในวงการแพทย์ทั่วโลก และเป็นสาเหตุการตายอันดับต้นๆ ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้มีอัตราการตายสูง คือ ยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งยังไม่สามารถรักษาได้แบบครอบคลุมและมีความเป็นพิษสูง ซึ่งการรักษาโรคมะเร็งต้องให้ยาาร่วมกันหลายชนิดเนื่องจากความแตกต่างและการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง ดังนั้น การค้นคว้าหาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการแพทย์และสาธารณสุขไทย รวมทั้งประเทศต่างๆ ทั่วโลก.

ผลการวิจัยครั้งนี้ จะได้ข้อมูลความปลอดภัยของสารสกัดราเอโนโดไฟต์จากพืชสมุนไพร ถ้าพบว่า ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อ DNA จะสามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนในการทำการวิจัยที่สำคัญต่อไป เพื่อนำไปสู่การพัฒนาศักยภาพของสารสกัดราเอโนโดไฟต์ เพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ และใช้ในทางการแพทย์ เป็นการทดแทนการนำเข้าสารชีวภาพ (bioactive compounds) จากต่างประเทศ และเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบจากสมุนไพรไทย ตอบสนองยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554) คือ ยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุลและยั่งยืน เป็นการปรับโครงสร้างการผลิตเพื่อเพิ่มผลิตภาพ และคุณค่าของสินค้าและบริการบนฐานความรู้และความเป็นไทย และตรงตามนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ (พ.ศ. 2551-2553) ในการสร้างศักยภาพและความสามารถในการพัฒนาทางสังคม เป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาสุขภาพอนามัยและคุณภาพชีวิต. แผนงานนี้ดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับสารชีวภาพจากสมุนไพรเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และสาธารณสุข ตรงกับกลยุทธ์การพัฒนาและการคุ้มครองภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย, การแพทย์พื้นบ้าน, การแพทย์ทางเลือก และสมุนไพร.

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาราเอนโดไฟต์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.
2. ศึกษาวิธีการหรือกระบวนการเลี้ยงราเอนโดไฟต์ให้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ.
3. การตรวจสอบการตอบสนองฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารออกฤทธิ์ที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการวิจัยราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรรเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางเภสัชสำเร็จลุล่วงได้ ขอขอบคุณฝ่ายเทคโนโลยีการเกษตร, ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความร่วมมือในการดำเนินการวิจัยร่วมกันจนแล้วเสร็จ ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำโครงการวิจัยนี้ และสุดท้ายนี้ต้องขอขอบคุณสวนสมุนไพรที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรรเพื่อนำมาใช้ในการวิจัย.

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
วัตถุประสงค์ของโครงการ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ช
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	3
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	8
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	42
4. สรุปผลการทดลอง	90
5. ข้อเสนอแนะ	93
6. เอกสารอ้างอิง	95

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1. ข้อมูล และลำดับเบสของ Universal primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	19
ตารางที่ 2. สัดส่วนของสารต่างๆ ในหลอดทดลอง PCR 1 ทิวบ์	19
ตารางที่ 3. ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ที่ใช้กับเครื่อง Thermo Hybrid เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเย็น /TS ในหลอดทดลอง	19
ตารางที่ 4. จำนวนสารสกัดเอทิลเอซีเตตจากราเอนโดไฟต์ 11 ตัวอย่าง และตัวอย่างควบคุม (PDB) จำนวน 1 ตัวอย่าง	30
ตารางที่ 5. จำนวนสารสกัดหยาบเอทิลเอซีเตตจากราเอนโดไฟต์ 36 ตัวอย่าง ของ crude ethyl acetate จากราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ	30
ตารางที่ 6. เซลล์ที่ใช้ทดสอบและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับเซลล์แต่ละชนิด	35
ตารางที่ 7. รหัสสารทดสอบและความเข้มข้นของ stock ที่ใช้ในการทดสอบ	40
ตารางที่ 8. ชื่อ, รหัสตัวอย่าง, primer ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับเบส, ผลจาก Blast N จำแนกสายพันธุ์ราในแต่ละตัวอย่าง และเปอร์เซ็นต์ Identity ของตัวอย่างราเอนโดไฟต์จากบัวบก	44
ตารางที่ 9. ชื่อ, รหัสตัวอย่าง, primer ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับเบส, ผลจาก Blast N จำแนกสายพันธุ์ราในแต่ละตัวอย่าง และเปอร์เซ็นต์ Identity ของตัวอย่างราเอนโดไฟต์จากยอ	46
ตารางที่ 10. ชื่อ, รหัสตัวอย่าง, primer ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับเบส, ผลจาก Blast N จำแนกสายพันธุ์ราในแต่ละตัวอย่าง และเปอร์เซ็นต์ Identity ของตัวอย่างราเอนโดไฟต์จากสะเดา	48
ตารางที่ 11. สารสกัดหยาบจากเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ได้เลี้ยงในอาหารเหลว PDB (ปริมาตร 600 มิลลิลิตร) สกัดด้วยตัวทำละลาย EtOAc	48
ตารางที่ 12. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (capacity against superoxide radicals) ของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ ด้วยวิธี Photochemiluminescence (PCL)	51
ตารางที่ 13. เปรียบเทียบผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (L929 fibroblasts), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco ₂) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ (ละลายในเอทานอล 80%)	54
ตารางที่ 14. ขนาด inhibition zones ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ ต่อเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ	56
ตารางที่ 15. สารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบ	58

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 16. เปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (L929), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ (ตัวอย่าง LY-MC-22, MK-CA1-1, MK-CA1-6 และ NP-CA3-2 ละลายในเอทานอล 80%) โดยวิธี WST assay ทดสอบนาน 24 ชั่วโมง	80
ตารางที่ 17. Classification of the cytotoxicity for natural ingredients	81
ตารางที่ 18. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ Rat Ear Edema Model ของสารสกัดหยาบเชื้อรา NPCA3-2 ใน acetone เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Phenylbutazone และ Acetone ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม	86
ตารางที่ 19. การเจริญของเชื้อบนแผ่น Millipore membrane ที่วางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ MA-CA-1-6 ต่างๆ กัน	87
ตารางที่ 20. การเจริญของเชื้อบนแผ่น Millipore membrane ที่วางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ MA-CA-1-1 ต่างๆ กัน	87
ตารางที่ 21. การเจริญของเชื้อบนแผ่น Millipore membrane ที่วางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ LY-MC-22 ต่างๆ กัน	88
ตารางที่ 22. การเจริญของเชื้อบนแผ่น Millipore membrane ที่วางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ NP-CA3-2 ต่างๆ กัน	88
ตารางที่ 23. สรุปค่า MIC ของสารทดสอบต่อเชื้อทดสอบแต่สายพันธุ์	89
ตารางที่ 24. กลุ่มเป้าหมายการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ รูปแบบการนำไปใช้ประโยชน์ และผลลัพธ์และผลกระทบที่คาดว่าจะเกิดขึ้น	93

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1. บัวบก	8
รูปที่ 2. ยอ	10
รูปที่ 3. สะเดา	12
รูปที่ 4. ราเอนโดไฟต์ที่เจริญออกมาจากใบยอที่วางลงบนอาหาร PDA อายุ 2 วัน	17
รูปที่ 5. ขั้นตอนการสกัดสารจากเชื้อราเอนโดไฟต์	21
รูปที่ 6. วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 โดยใช้ WST-1 reagent	24
รูปที่ 7. ขั้นตอนการสกัดสารจากเชื้อราเอนโดไฟต์	28
รูปที่ 8. ขั้นตอนการสกัดสารจากเชื้อราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในข้าวสารสุก	29
รูปที่ 9. องค์ประกอบภายในเซลล์ และส่วนที่เรียกว่า Mitochondria	32
รูปที่ 10. หลักการ MTT assay เกิดจากปฏิกิริยาที่ผลึก tetrasodium salt (MTT) ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดซัคซิเนสดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) ใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิต (viable) เท่านั้น เกิดผลึกสีม่วง-ชมพู ซึ่งไม่ละลายน้ำ	33
รูปที่ 11. หลักการ WST-1 assay: ผลึก tetrasolium salt (MTT) จะถูกย่อยด้วย เอนไซม์ชนิดซัคซิเนสดีไฮโดรจีเนส (succinate-tetrazolium reductase system) ใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิต (viable) เท่านั้น เกิดผลึก formazan สีแดงเข้ม (dark red) ซึ่งละลายน้ำได้	34
รูปที่ 12. แผนภูมิสรุปขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัดหยาบเชื้อราเอนโดไฟต์ ด้วยเทคนิค WST-1 assay	36
รูปที่ 13. การนำตัวอย่างเซลล์ทดสอบ (อยู่ใน 96-well plate) เข้าวัดในเครื่อง Microplate Reader	37
รูปที่ 14. การแสดงผลการทดสอบ WST-1 assay บนจอเครื่อง Microplate Reader	37
รูปที่ 15. กราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และ %viability (แกน Y) และวิธีการหาค่า IC ₅₀ (median inhibitory concentration)	38
รูปที่ 16. ราเอนโดไฟต์ที่เจริญออกมาจากตัวอย่างพืชที่วางลงบนอาหาร PDA อายุ 2 สัปดาห์ A: เส้นใยราเอนโดไฟต์ที่เจริญออกจากส่วนใบ	42
รูปที่ 17. ตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากบัวบก ที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐม และจังหวัดมหาสารคาม	43
รูปที่ 18. ตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากยอ ที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดเลย	45

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 19. ตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากสะเดา ที่เก็บตัวอย่างจาก จังหวัดเลย	47
รูปที่ 20. กราฟแสดงผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) ของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ (ละลายในเอทานอล 80%) ด้วยวิธี Photochemiluminescence (PCL) ในระบบ ACW	52
รูปที่ 21. กราฟแสดงผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) ของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ (ละลายในเอทานอล 80%) ด้วยวิธี Photochemiluminescence (PCL) ในระบบ ACL	52
รูปที่ 22. เชื้อราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA และ MEA ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 14 วัน	59
รูปที่ 23. เชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA และ MEA ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 14 วัน	59
รูปที่ 24. เชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA และ MEA ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 14 วัน	60
รูปที่ 25. เชื้อราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA และ MEA ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 14 วัน	60
รูปที่ 26. อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน	61
รูปที่ 27. อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน	62
รูปที่ 28. อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน	62
รูปที่ 29. อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน	63
รูปที่ 30. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปของเชื้อราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน	64
รูปที่ 31. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปของเชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน	64
รูปที่ 32. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปของเชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน	65

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 33. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปของเชื้อราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน	65
รูปที่ 34. ราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลต ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB วางตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน	66
รูปที่ 35. ราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลต ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่เลี้ยงใน incubation shaker อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน	67
รูปที่ 36. ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ใน Fermenter ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน	68
รูปที่ 37. ราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ใน Incubation shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน	69
รูปที่ 38. ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 เลี้ยงในอาหารเหลว PDB วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน	70
รูปที่ 39. ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 เลี้ยงในอาหารแข็ง (ข้าวสารหุงสุก) วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน	71
รูปที่ 40. ราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 เลี้ยงในอาหารแข็ง (ข้าวสารหุงสุก) วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน	72
รูปที่ 41. ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์เรียงจากซ้ายไปขวา ได้แก่ NP-CA3-2, MK-CA1-6 , LY-MC-22 และ MK-CA1-1	73
รูปที่ 42. Thin-layer chromatography of extracts from <i>Centella asiatica</i> fungal endophytic medium	74
รูปที่ 43. Thin-layer chromatography of extracts from <i>Centella asiatica</i> fungal endophytic medium	76
รูปที่ 44. Thin-layer chromatography of extracts from <i>Centella asiatica</i> fungal endophytic medium	78
รูปที่ 45. เปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ (ตัวอย่าง LY-MC-22, MK-CA1-1, MK-CA1-6 และ NP-CA3-2) ต่อเซลล์ปกติ (L929), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) นาน 24 ชั่วโมง	82
รูปที่ 46. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ปกติ (L929), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) หลังทดสอบกับสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 นาน 24 ชั่วโมง	83

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 47. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ปกติ (L929), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) หลังทดสอบกับสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 นาน 24 ชั่วโมง	84
รูปที่ 48. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ปกติ (L929), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) หลังทดสอบกับสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 นาน 24 ชั่วโมง	84
รูปที่ 49. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ปกติ (L929), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) หลังทดสอบกับสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 นาน 24 ชั่วโมง	85

STUDY ON ENDOPHYTIC FUNGI FROM THAI MEDICINAL PLANT FOR PHARMACEUTICAL BIOACTIVE PRODUCTION

Anawat Suwanagul, Papitchaya Kongchinda, Prapaipat Klungsupya,
Siripen Jarikasem, Krittiya Thisayakorn, Bhusita Wannissorn,
Punnathorn Thaveethaptaikul, Kanungnid Busarakam and Borwon Tontiworachai

ABSTRACT

The objective of this study is to investigate the potential of endophytic fungi for the production of bioactive compounds and its pharmaceutical properties. A total of 35 isolates of endophytic fungi were isolated from 3 medicinal plants by surface sterilization method. Among those, 11 isolates were from *Centella asiatica* (L.) Urban. from Nakorn Pathom and Mahasarakam provinces; 13 isolates from *Azadirachta indica* A. Juss. var. *siamensis* Valeton. and 11 isolates from *Morinda citrifolia* L. both from Loei province. All isolates were cultured on either potato dextrose broth (PDB) or solid medium using steamed rice. Crude bioactive compounds were extracted from culturing medium using ethyl acetate and tested for pharmaceutical properties. Anti-oxidative property was performed by Photochemiluminescence (PCL) method. Cytotoxicity to normal and HepG2, MCF-7, HeLa and Caco2 human cancer cells were performed by WST-1 assay. Anti-microbial activities were observed by Agar dilution method. Anti-inflammatory property was done by Rat Ear Edema Model. The best performing pharmaceutical activities was observed from “NP-CA3-2” endophyte isolate. The “NP-CA3-2” isolate was identified by DNA sequence using an internal transcribes spacer (ITS) as *Stemphylium* sp.

การวิจัยราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางเภสัช

อนวัช สุวรรณกุล¹, ปพิชญา กองจินดา¹, ประไพภัทร คลังทรัพย์², ศิริเพ็ญ จริเกษม²,
กฤติยา ทิสยากร², ภูษิตา วรรณิสร์³, ปณณธร ทวีเทพไทกุล³, คณิงนิจ บุศราคำ¹
และ บวร ตันติวรชัย¹

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาราเอนโดไฟต์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางเภสัช โดยทำการแยกราเอนโดไฟต์โดยวิธีฆ่าเชื้อที่ผิวหน้าจากพืชสมุนไพร 3 ชนิด ได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 35 ไอโซเลต คือ บั๊บบกจากจังหวัดนครปฐมและจังหวัดมหาสารคามได้ราเอนโดไฟต์ 11 ไอโซเลต สะเดาจากจังหวัดเลยได้ราเอนโดไฟต์ 13 ไอโซเลต และยอจากจังหวัดเลยได้ราเอนโดไฟต์ 11 ไอโซเลต จากนั้น นำราเอนโดไฟต์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) และในอาหารแข็ง (ข้าวสารหุงสุก) นำไปสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ประกอบด้วย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Photochemiluminescence (PCL), ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (L929), เซลล์มะเร็งตับมนุษย์ (HepG2), เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco₂) โดยวิธี WST-1 assay. ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี Agar dilution assay และฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยวิธี Rat Ear Edema Model พบว่า ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต NP-CA3-2 มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดีที่สุดในการทดสอบ เมื่อจัดจำแนกราเอนโดไฟต์โดยการวิเคราะห์ลำดับ DNA บริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) พบว่า ราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 คือ *Stemphylium* sp.

¹ ฝ่ายเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

² ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, วว.

³ ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ, วว.

1. บทนำ

ราเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มใหญ่ที่มีความหลากหลาย พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในน้ำ, ดิน, อากาศ, พืช และยังเป็นแหล่งสำคัญแหล่งหนึ่งที่สร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่และสามารถพัฒนาไปใช้เป็นยารักษาโรคได้ ต้นไม้เป็นแหล่งสำคัญแหล่งหนึ่งที่นำสนใจนำมาทำการศึกษาหาราสายพันธุ์ใหม่ และราที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยรานั้นอาศัยอยู่กับพืชได้ทั้งภายใน (endophyte) และภายนอก (epiphyte) เนื้อเยื่อพืช.

ราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) หมายถึง ราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้พืชอาศัยแสดงอาการของโรค โดยมีความสัมพันธ์กันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis). ปัจจุบันมีการศึกษาราเอนโดไฟท์กันมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาราสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ราเอนโดไฟท์ผลิตขึ้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชนั้นเป็นสารที่ทราบโครงสร้าง 49 เปอร์เซ็นต์, ส่วนที่ยังไม่ทราบโครงสร้างนั้นมีมากถึง 51 เปอร์เซ็นต์ (Barbara *et al.* 2002) นั่นหมายถึงสารจำนวน 51 เปอร์เซ็นต์ ที่ยังไม่ทราบว่าออกฤทธิ์ทางด้านใดบ้าง มีการรายงานการศึกษาราสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากราเอนโดไฟท์พบได้ทั่วไปในพืชทุกชนิดมากกว่า 300 ชนิด ทั้งพืชดอก (angiosperms), พืชเปลือยเมล็ด (gymnosperms), สาหร่ายน้ำเค็ม (marine macro algae), มอส และเฟิร์น (Schulz, Draeger and Aust 1993).

เนื่องจากสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ราเอนโดไฟท์สร้างขึ้น ส่วนใหญ่นั้นมีคุณสมบัติคล้าย หรือเหมือนกับสารออกฤทธิ์ของพืชอาศัยจึงทำให้มีความสนใจในการศึกษาราเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ภายในพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ในด้านต่างๆ โดยปกติแล้วการสกัดสารสำคัญจากพืชนั้นต้องใช้วัตถุดิบปริมาณมากและใช้ระยะเวลาอันยาวนานกว่าจะเพิ่มปริมาณวัตถุดิบให้เพียงพอต่อการสกัดในแต่ละครั้ง. ดังนั้น การเลี้ยงเชื้อราเพื่อสกัดเอาสารสำคัญนั้นจึงเป็นวิธีที่สะดวก, ประหยัด และได้ปริมาณสารสำคัญที่คุ้มค่าต่อการผลิตมากกว่าที่จะสกัดจากพืชวัตถุดิบโดยตรง โดยฤทธิ์ทางชีวภาพที่ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรที่สำคัญ ได้แก่ antifungal, antibacterial, antiviral, antitumour, antioxidant, antibiotic, neurotoxicity agents, immunosuppressive agent, cytotoxicity agents, phytotoxicity agents และ anticancer (Strobel *et al.* 2002; Strobel *et al.* 2004; Lu *et al.* 2000).

โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติการเป็น anticancer นั้นสามารถพบได้หลายชนิดในราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร ตัวอย่างเช่น สาร cytochalasin D จากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นพลวง ป่าเต็งรัง จังหวัดน่าน สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร และสาร mycoepoxydiene จากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากต้นกระเบาใหญ่ มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี, มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปาก, มะเร็งปากมดลูก, มะเร็งเต้านม, มะเร็งปอด และยังมี

ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค. สาร radicinin จากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นแคตซึ่งมีคุณสมบัติเป็น phytotoxin และสาร radicinol มีฤทธิ์ต่อต้าน *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นสาเหตุโรค มาลาเรีย และมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งหลายชนิด อันได้แก่ มะเร็งท่อน้ำดี, มะเร็งเยื่อบุช่องปาก, มะเร็งปากมดลูก, มะเร็งเต้านม, มะเร็งปอด และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น.

การศึกษาราเอนโดไฟต์นั้นเริ่มต้นประมาณ 30 ปีที่แล้ว แต่การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ราเอนโดไฟต์ผลิตขึ้นเพิ่งเริ่มศึกษาเมื่อ 15 ปีผ่านมา โดยพบว่าราเอนโดไฟต์นั้นสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ทางเภสัชที่สำคัญหลายกลุ่ม ได้แก่ สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial Agents) คือ สารต้านเชื้อรา (antifungi) เช่น cryptocandin จากราเอนโดไฟต์ที่แยกมาจากต้น *Tripterideum wilfordii*, สารต้านแบคทีเรีย (antibacteria) เช่น kakadumycin จากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้น *Grevillea pteridiflora* (Castillo *et al.* 2002) และสารต้านไวรัส (antivirus) เช่น cytonic A and B จากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้น *Quercus* sp. (Kantorova *et al.* 2002), สารที่มีฤทธิ์ต้านเนื้องอก (Antitumour Agents) เช่น sequiatones A และ B จากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากไม้เนื้อแดง (red wood) (Noble *et al.* 1991) สารแอนติออกซิแดนซ์ (Antioxidant Agents) เช่น Isopestacin จากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้น *Terminalia moro* (Strobel *et al.* 2002), สารที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท (Neurotoxicity Agents) เช่น ergot alkaloid จากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้น *Festusa arundinacea* (Bush, Wilkiinson and Schardl 1997) สารที่มีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive Agents) เช่น subglutininol A และ B จากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้น *Taxus wilfordii* (Lee *et al.* 1995), สารที่เป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity Agents) เช่น terreanic acid จากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้น *Torreya taxifolia* (Lee *et al.* 1996), สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anticancer Agents) เช่น paclitaxel จากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้น *Taxomyces andreance* (Strobel *et al.* 2004).

โดยเฉพาะสาร paclitaxel มีชื่อทางการค้าว่า taxol ซึ่งมีฤทธิ์ป้องกันการเกิด depolymerization ของ tubulin ในระหว่างกระบวนการแบ่งเซลล์ ทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Strobel *et al.* 2004) ซึ่งต้น *Taxomyces andreance* นั้นเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง. นอกจากนี้ ยังมีรายงานเพิ่มเติมว่ามีราเอนโดไฟต์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเหมือนพืชอาศัย คือ รา *Entrophospora infrequens* จากต้น *Nothapodytes foetiba* (ต้นจันทน์ดำ) ซึ่งสารออกฤทธิ์ คือ Camptothecin (a pentacyclic quinoline alkaloid), มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (human cancer cell line) (A-549 lung cancer, HEP-2 for liver cancer, OVCAR-5 for ovarian cancer) (Chander *et al.* 2005) และ *Fusarium chlamydosporium* จากต้น *Brucea javanica* (ต้นราชดัด) พืชชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง leukemia, colon, melanoma1 และ ovary โดยสารที่ได้จากรา *F. chlamydosporium* นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Kumala *et al.* 2007).

สำหรับประเทศไทยได้มีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของพืชสมุนไพรหลายชนิด โดยศึกษาจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเป็นหลัก เนื่องจากมะเร็งเป็นโรคร้ายแรงทางสาธารณสุขที่ทำให้คนไทยเสียชีวิตเป็นอันดับหนึ่ง. สถาบันมะเร็งแห่งชาติได้ศึกษาพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งออกเป็นสองแนวทาง คือ เน้นผลเชิงป้องกันและเชิงรักษา โดยได้ทำการวิจัยสมุนไพรไทย พบว่าขมิ้นชันมีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมและลำไส้ใหญ่ โดยพืชสมุนไพรที่ทำการศึกษามีคุณสมบัติต้านมะเร็ง เช่น เหงือกปลาหมอ, ว่านนางคำ, ผักแพว และผักชีฝรั่ง ซึ่งกำลังอยู่ในขั้นทดลองในระดับห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง แต่ยังไม่ถึงขั้นทดลองทางคลินิกกับคนไข้.

การศึกษาราดิซินจากพืชสมุนไพรไทยได้มีการศึกษาในพืชหลายชนิด โดยพบว่าราเอนโดไฟต์ที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญและมีฤทธิ์ต่างๆ นั้น ได้แก่ ราในสกุล *Phomopsis* sp. ตัวอย่างเช่น *Phomopsis* sp. Ctom12 จากต้นแคต (*Caunaregam tomentosa*) สามารถสร้างสาร radicinin ซึ่งมีคุณสมบัติ เป็น phytotoxin และ radicinol มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี, เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก, เซลล์มะเร็งปากมดลูก, เซลล์มะเร็งเต้านม, เซลล์มะเร็งปอด และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว *Phomopsis* sp. Usia5 จากต้นเสน (*Urobotrya siamensis*) สร้างสาร nitropropionic CID (3-NPA) ซึ่งเป็น neurotoxin และมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคดีมาก และ *Phomopsis* sp. Hant25 แยกได้จากต้นกระเบาใหญ่ (*Hydnocarpus anthelminthicus*) สร้างสาร mycoepoxydiene ซึ่งมีฤทธิ์ดีในการฆ่าเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี, เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก, เซลล์มะเร็งปากมดลูก, เซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งปอด รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค.

นอกจากนั้น ยังได้ศึกษาปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน (Oxidation reaction) เป็นขบวนการทางชีวเคมีตามปกติในเซลล์ทุกอวัยวะทั่วร่างกาย และมีบทบาทสำคัญในขบวนการเผาผลาญต่างๆ ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งขบวนการดังกล่าวจะก่อให้เกิดของเสียที่เรียกว่า “อนุมูลอิสระ (Free radical)” ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่อยู่ตัวเพราะมีประจุลบซึ่งเกิดจากการสูญเสียอิเล็กตรอนวงนอกของออกซิเจน (Reactive Oxygen Species, ROS) เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^{\bullet}), อนุมูลไฮดรอกซีแรดิคัล ($\bullet OH$), อนุมูลไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ($H_2O_2^{\bullet}$), อนุมูลเพอร์ออกซีแรดิคัล (ROO^{\bullet}) ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะพยายามแย่งชิงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นๆ เพื่อให้ตัวเองเสถียร โมเลกุลที่ถูกแย่งอิเล็กตรอนไปก็จะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการแย่งชิงอิเล็กตรอนต่อไปเรื่อยๆ จึงเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ ปรากฏการณ์นี้ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นมากมายในเซลล์ทั่วร่างกาย.

อนุมูลอิสระก่อให้เกิดทั้งประโยชน์และโทษ ในด้านที่มีประโยชน์ ได้แก่ ทำให้เกิดพลังงานการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยเม็ดเลือดขาว, การเจริญเติบโตของเซลล์, การส่งสัญญาณระหว่างเซลล์, การสร้างสารชีวโมเลกุลต่างๆ เป็นต้น และในส่วนของก่อให้เกิดโทษ คือ อนุมูลอิสระจะไปเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับไขมันที่ผนังเซลล์ ตลอดจนสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโปรตีน, เอนไซม์,

คาร์โบไฮเดรต และ DNA มีผลทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายและทำให้โครงสร้างของโปรตีน และ DNA หรือสารพันธุกรรม ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคมะเร็ง (cancer) โดยเซลล์มะเร็งจะมีการเจริญเติบโตรวดเร็วและมากกว่าปกติ จึงทำให้เกิดก้อนเนื้อผิดปกติ และในที่สุดก็จะทำให้เกิดการตาย (necrosis) ของเซลล์ในก้อนเนื้อนั้นเนื่องจากขาดเลือดไปเลี้ยง และพยาธิสภาพอื่นๆ ที่พบในผู้ป่วยมะเร็ง คือ การอักเสบเรื้อรัง และความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้น ผู้ป่วยมะเร็งจึงมักติดเชื้อได้ง่าย.

ปกติร่างกายของมนุษย์จะมีขบวนการป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระ คือ มีระบบต้านปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน (anti-oxidation) หรือระบบแอนติออกซิแดนต์ (anti-oxidant) ซึ่งได้จาก 2 ทาง คือ จากที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione, peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) และกลุ่มที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น glutathione, lipoic acid, ceruloplasmin, albumin, transferrin, haptoglobin, hemopexin, uric acid, bilirubin, cysteine. อย่างไรก็ตาม สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสามารถสร้างขึ้นมีปริมาณจำกัด จึงไม่เพียงพอสำหรับป้องกันอนุมูลอิสระซึ่งเกิดขึ้นอย่างมหาศาลต่อวัน รวมทั้งที่ร่างกายได้รับจากภายนอก เพื่อลดผลเสียหายที่เกิดจากการทำลายโดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเป็นประจำและมีเกือบตลอดช่วงชีวิตคน จึงมีความจำเป็นที่ร่างกายต้องได้สารต้านอนุมูลอิสระจากอาหารที่รับประทานเพิ่มเติม ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหารและไม่จัดเป็นเอนไซม์ เช่น tocopherols, carotenoids, ascorbic acid, steroids, ubiquinones, thiols, inosine, taurine, pyruvate, gallic acid, flavonoids, trolox, BHT และ BHA สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกในการลดและทำลายอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่างๆ เช่น โดยการจับกับอนุมูลอิสระ ลดการเกิดปฏิกิริยา ณ จุดตั้งต้น หรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือกระตุ้นให้ร่างกายผลิตเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น เป็นต้น.

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในภูมิประเทศแบบเขตร้อน ทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและจุลินทรีย์สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาหลายชนิด. ดังนั้น การศึกษาราคาเอนโดไฟต์ในพืชสมุนไพรจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง ในการค้นพบราสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเภสัช โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไปใช้รักษาหรือบำบัดโรคมะเร็งที่ไม่สามารถใช้ยารักษาชนิดเดียวที่รักษาได้ครอบคลุม รวมทั้งด้านอุตสาหกรรม และการเกษตร เพื่อนำไปสู่การพัฒนาประเทศให้ยั่งยืน.

ผลงานวิจัยจำนวนมากชี้ให้เห็นว่าอนุมูลอิสระ (free radical) เป็นสาเหตุหนึ่งของโรคมะเร็ง เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลของออกซิเจนที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอนวงนอกไป จึงมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับชีวโมเลกุลอื่นๆ ภายในเซลล์ โดยเฉพาะสารพันธุกรรม

หรือ DNA มีผลทำให้เกิดความผิดปกติหรือกลายพันธุ์ของ DNA ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และเกิดการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องมากกว่าปกติ โดยที่กลไกของร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ เซลล์มะเร็งจะมีการเจริญเติบโตรวดเร็ว จึงทำให้เกิดก้อนเนื้อผิดปกติ (cancer) และแพร่กระจาย (metastasis) ไปยังอวัยวะใกล้เคียงหรือห่างไกลออกไปได้โดยทางกระแสเลือด และระบบน้ำเหลือง การใช้สารต้านอนุมูลอิสระ หรือแอนติออกซิแดนต์ (anti-oxidant) เช่น วิตามิน A, วิตามิน E, วิตามิน C เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดความรุนแรงของอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้.

ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้หากสามารถพิสูจน์ได้ว่าสารสกัดราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรที่สนใจ คือ สะเดา, ยอ และใบบัวบก มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ได้ รวมทั้งคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ต้านการอักเสบ จะทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญในการวิจัยขั้นต่อไป เพื่อพัฒนาการใช้ราเอนโดไฟต์เป็นสารชีวภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร, อาหาร และเครื่องสำอาง ซึ่งจะก่อประโยชน์ต่อผู้ป่วยมะเร็งได้.

วัตถุประสงค์ในการทำวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาราเอนโดไฟต์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและหาวิธีการหรือกระบวนการเลี้ยงราเอนโดไฟต์ให้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ยา, สมุนไพร, อาหารเสริมหรือเวชสำอางค์.

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุ

ตัวอย่างพืชสมุนไพร 3 ชนิด โดยเลือกเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรงไม่เป็นโรคได้แก่:

2.1.1 บัวบก ดังแสดงในรูปที่ 1 เก็บตัวอย่างที่สวนบัวบก วัดบึงลาดสวาย อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม และสวนบัวบก อำเภอนาคร จังหวัดมหาสารคาม.



รูปที่ 1. บัวบก.

ที่มา : บัวบก (2557)

- ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Centella asiatica* (L.) Urban.
ชื่อสามัญ : Asiatic pennywort, Indian pennywort.
วงศ์ : Apiaceae (Umbelliferae).
ชื่ออื่น : ผักหนอก (ภาคเหนือ) ผักแว่น (ภาคใต้).
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นไหลทอดเลื้อยไปตามดินที่ชื้นแฉะ, ขึ้นง่าย, มีรากฝอยออกตามข้อ, ใบชูตั้งขึ้น, มีไหลงอกออกจากต้นเดิม, ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ รูปไต ขนาดกว้างและยาว 2-5 เซนติเมตร, ปลายใบกลม, โคนใบเว้า, ขอบใบหยัก, แผ่นใบสีเขียวมีขนเล็กน้อย, ก้านใบยาว, ดอกออกเป็นช่อแบบซี่ร่ม ตามซอกใบ มีดอกย่อย 2-3 ดอก, กลีบดอกมี 5 กลีบ สีม่วงอมแดงกลีบกัน, ผลเป็นผลแห้งแตกแบน, เมล็ดสีดำ.
ส่วนที่ใช้ : ทั้งต้นสด.

สรรพคุณ:

ใบ

ทั้งต้นสด

- มีสาร Asiaticoside ทำยาทาแก้แผลโรคเรื้อน.
- เป็นย่ำบ่ำรุงกำลัง, บำรุงหัวใจ, แก้อ่อนเพลีย, เมื่อยล้า.
- รักษาแผลไฟไหม้, น้ำร้อนลวก หรือมีการชอกช้ำจากการกระแทก, แก้พิษงูกัด.
- ปวดศีรษะข้างเดียว.
- ขับปัสสาวะ.
- แก้เจ็บคอ.
- เป็นยาห้ามเลือด, ทาแผลสด, แก้โรคผิวหนัง.
- ลดความดัน, แก้ไข้.
- แก้บิด, แก้ไข้, ปวดศีรษะ

เมล็ด

ที่มา: กลุ่มยาแก้ไข้ลดความร้อน สะเดา (สะเดาไทย) (ม.ป.ป.)

2.1.2 ยอ ดังแสดงในรูปที่ 2 เก็บตัวอย่างที่ ตำบลหนองบัว อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย.



รูปที่ 2. ยอ.

ที่มา: ยอ (2557)

- ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Morinda citrifolia* L.
ชื่อสามัญ : Indian Mulberry.
วงศ์ : Rubiaceae.
ชื่ออื่น : ยอบ้าน (ภาคกลาง) มะตาเสือ (ภาคเหนือ)
ยอ แยใหญ่ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน).
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ต้น สูง 2-6 เมตร เปลือกต้นสีน้ำตาล แตกเป็นสะเก็ดแล้ว
หลุดออก, กิ่งอ่อนเป็นสีเหลี่ยม, ใบเป็นใบเดี่ยว, ออกตรงข้าม,
รูปรี, กว้าง 8-15 เซนติเมตร, ยาว 10-20 เซนติเมตร,
ขอบใบเรียบ, แผ่นใบเรียบ, สีเขียวเข้มเป็นมัน, ดอกออกเป็นช่อ.
ส่วนที่ใช้ : ใบ, ราก, ผลดิบ, ผลสุก.

สรรพคุณ:

ใบ

- มีวิตามินเอ 40,000 กว่ายูนิตสากลต่อ 100 กรัม มีคุณสมบัติในการบำรุงสายตา, หัวใจ, คั้นน้ำทาแก้โรคเกาต์, ปวดตามข้อเล็กๆ, ของนิ้วมือ, นิ้วเท้า, หรือคั้นน้ำสระผมฆ่าเหา, แก้กระษัย, ใช้ใบปรุงเป็นอาหาร และแก้ท้องร่วง.

ราก

- ใช้เป็นยาระบาย, แก้กระษัย, ใช้สกัดสีออกมา, เป็นสีย้อมผ้าได้ โดยผสมส่วนของเกลือต่างๆ สามารถเปลี่ยนเป็นสีต่างๆ ได้ ตามต้องการ ซึ่งสีเดิมของรากจะมีสีเหลือง หรือเหลืองปนแดง หากผสมตามส่วนด้วยเกลือ อาจจะได้สีแดง, ชมพู, น้ำตาลอ่อน, สีม่วงแดง หรือสีดำ เป็นต้น.

ผลโตเต็มที่แต่ไม่สุก

- จีมน้ำผึ้งรับประทาน มีคุณสมบัติเป็นยาขับลม, บำรุงธาตุ, เจริญอาหาร, ขับลมในลำไส้, กระจายอาหาร, แก้เหงือก เปื่อยเป็นขุยบวม, ขับเลือดลม, ขับโลหิตประจำเดือน.

ผลดิบ

- ต้มน้ำรับประทานกับรากผักชี แก้อาการอาเจียนของหญิง มีครรภ์.

ที่มา: กลุ่มยาแก้ไข้ลดความร้อน สะเดา (สะเดาไทย) (ม.ป.ป.)

2.1.3 สะเดา ดังแสดงในรูปที่ 3 เก็บตัวอย่างที่ ตำบลหนองบัว อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย



รูปที่ 3. สะเดา.

ที่มา: สะเดา (2533)

- ชื่อวิทยาศาสตร์** : *Azadirachta indica* A. Juss. var. *siamensis* Valetton.
- ชื่อสามัญ** : Siamese neem tree, Nim , Margosa, Quinine.
- วงศ์** : Meliaceae.
- ชื่ออื่น** : สะเลียม (ภาคเหนือ), กะเดา (ภาคใต้).
- ลักษณะทางพฤกษศาสตร์** : ไม้ต้น สูง 5-10 เมตร เปลือกต้นแตกเป็นร่องลึกตามยาว ยอดอ่อนสีน้ำตาลแดง, ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ออกเรียงสลับรูปใบหอก กว้าง 3-4 เซนติเมตร, ยาว 4-8 เซนติเมตร, โคนใบมนไม่เท่ากัน, ขอบใบจักเป็นฟันเลื่อย, แผ่นใบเรียบ, สีเขียวเป็นมัน, ดอกออกเป็นช่อที่ปลายกิ่งขณะแตกใบอ่อน, ดอกสีขาวนวล, กลีบเลี้ยงมี 5 แฉก, โคนติดกัน, กลีบดอกโคนติดกัน, ปลายแยกเป็น 5 แฉก ผลรูปทรงรี ขนาด 0.8-1 เซนติเมตร ผิวเรียบ, ผลอ่อนสีเขียว, สุกเป็นสีเหลืองส้ม, เมล็ดเดี่ยว, รูปรี.
- ผล** : มีสารรสขม ใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ และยาระบาย.
- ส่วนที่ใช้** : ดอกช่อดอก, ขนอ่อน, ยอด, เปลือก, ก้านใบ, กระพี้, ยาง, แก่น, ราก, ใบ, ผล, ต้น, เปลือกราก, น้ำมันจากเมล็ด.

สรรพคุณ:

ดอก ยอดอ่อน

- แก้วพิชโลहित, กำเดา, แก้วริดสีดวงในลำคอ, คันดุมมีตัวโตอยู่, บำรุงธาตุ, ขับลม, ใช้เป็นอาหารผักได้ดี.

ขนอ่อน

- ถ่ายพยาธิ, แก้วริดสีดวง, แก้วบิดมูกเลือด.

ก้านใบ

- แก้วไข้, ทำยารักษาไข้มาลาเรีย, ปัสสาวะพิการ.

เปลือกต้น

- แก้วไข้, เจริญอาหาร, แก้วท้องเดิน.

กระพี้

- แก้วถุ่น้ำดีอีกเสบ.

ยาง

- ดับพิษร้อน.

แก่น

- แก้วอาเจียน, ขับเสมหะ.

ราก

- แก้วโรคผิวหนัง, แก้วเสมหะ, ซึ่งเกาะแน่นอยู่ในทรวงอก.

ใบ, ผล

- ใช้เป็นยาฆ่าแมลง, บำรุงธาตุ, โรคหัวใจเดินผิดปกติ.

เปลือกกราก

- เป็นยาฝาดสมาน, แก้วไข้, ทำให้อาเจียน, แก้วโรคผิวหนัง.

น้ำมันจากเมล็ด

- ใช้รักษาโรคผิวหนัง และยาฆ่าแมลง.

ที่มา: กลุ่มยาแก้ไข้ลดความร้อน สะเดา (สะเดาไทย) (ม.ป.ป.)

2.2 อุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 อุปกรณ์

1. กระดาษกรอง เบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 และ 125 มิลลิเมตร (Whatman, UK).
 2. กล้องจุลทรรศน์ (Leica, Germany).
 3. กล้องสเตอริโอ (Nikon รุ่น SMZ 800, Japan).
 4. ขวดรูปชมพู่ปริมาตร 100, 250, 500, 1,000 และ 5,000 มิลลิลิตร (ISOLAB, Germany)
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany).
5. เครื่องวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส (YSI, USA).
 6. งานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร (Sterilin[®], UK).
 7. ชุดกรองสาร (Kimax, USA).
 8. ชุดสกัดสำเร็จรูป Dneasy Plant Mini Kit ของบริษัท QIAGEN.
 9. ตู้บ่มเชื้อ (Mettler, Germany).
 10. ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Sanyo, Thailand).
 11. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (Thailand).
 12. ตู้เลี้ยงเชื้อ (Laminar flow Streamline[®], USA).
 13. โถดูดความชื้น (desicator).
 14. น้ำดื่มสัตว์ทดลองเป็นน้ำกรอง.
 15. ผ้าขาวบาง.
 16. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) (HICLAVE[™] รุ่น HVE-50, Japan).
 17. อาหารหนูทดลอง (บริษัท โภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด, ประเทศไทย).
 18. Auto Pipette ขนาด 20 ไมโครลิตร (Nishiyo, Japan).
 19. Centrifuge (Hettich, Germany).
 20. Centrifuge (Sorvall, USA).
 21. Gel Documentation (SynGene, USA).
 22. Hot air Oven (Termark, Germany).
 23. Photochem[®] (Analytic gena, Germany).
 24. Pocket Thickness Gauge (Mitutoyo, Japan).
 25. Rotary evaporator (Buchi, Switzerland)
 26. Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).
 27. TLC visualize (Camag, Switzerland).
 28. Ultrasonic bath (Elma S60-H, Switzerland).
 29. UV cabinet (Camag, Switzerland).
 30. Vortex mixer (Labnet, USA).
 31. Waterbath (Mettler, Germany).

2.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Brucella broth ยี่ห้อ Difco™.
2. Malt Extract ยี่ห้อ Difco™.
3. Mueller-Hinton Agar ยี่ห้อ Difco™.
4. Nutrient Agar (NA) ยี่ห้อ Difco™.
5. Nutrient Broth (NB) ยี่ห้อ Difco™.
6. Potato Dextrose Agar (PDA) ยี่ห้อ Difco™.
7. Potato Dextrose Broth (PDB) ยี่ห้อ Difco™.
8. Sabouraud Dextrose Agar (SDA).
9. Yeast Extract ยี่ห้อ Difco™.
10. ข้าวกล้องหอม ยี่ห้อแสนดี.

2.2.3 สารเคมี

1. Acetic acid, AR grade (Merck, Germany).
2. Acetone, AR grade (Merck, Germany).
3. Chloroform, AR grade (BDH, England).
4. Dichloromethane, AR grade (Labscan Asia, Thailand).
5. Dimethyl sulfoxide (DMSO), AR grade (Merck, Germany).
6. EDTA (Usb, USA).
7. Ethanol (BDH, England).
8. Ethyl acetate, AR grade (Labscan Asia, Thailand).
9. Ethyl phenylpropiolate (EPP) (Fluka Chemika, Switzerland).
10. Hexanes, AR grade (Labscan Asia, Thailand).
11. Iron (II) chloride hexahydrate, AR grade (Merck, Germany).
12. Isoamyl Alcohol (BDH, England).
13. Isopropanol, AR grade (Merck, Germany).
14. Methanol, AR grade (Labscan Asia, Thailand).
15. 0.9% Normal saline.
16. Phenylbutazone (Sigma, U.S.A.).
17. Silica gel 60 GF₂₅₄ (TLC aluminium sheets) (Merck, Germany).
18. Sodium Chloride (Sigma, Germany).
19. Sulfuric acid, AR grade (Merck, Germany).
20. Tris-HCl (Vivantis, U.S.A.).
21. Wetting agent.

2.2.4 สารมาตรฐานเปรียบเทียบ

1. Ascorbic acid (vitamin C).
2. Asiatic acid.
3. Asiaticoside.
4. Chlorogenic acid.
5. Glucose.
6. Madecassoside.
7. Madecassic acid.
8. Mc. Farland No. 0.5 (Biomerieux).
9. Oleanolic acid.
10. Potassium Ferrocyanide.
11. Quercetin.
12. Rutin.
13. β -sitosterol.
14. Trolox (vitamin E).

2.2.5 สัตว์ทดลอง

หนูขาว พันธุ์ Wista น้ำหนัก 140 ± 10 กรัม เพศผู้ จำนวน 30 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม.

2.3 วิธีการ

2.3.1 การแยกราจากพืช

1. นำพืชส่วนใบ, ก้านและกิ่ง มาล้างน้ำทำความสะอาดโดยเปิดให้น้ำไหลผ่าน จากนั้นตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร แล้วแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮเพอร์คลอไรต์ที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที และสุดท้ายแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วซับให้แห้งบนกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว.

2. นำส่วนใบ, ก้านและกิ่ง ของพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วสังเกตการงอกของเส้นใยของราออกมาจากบริเวณขอบใบหรือขอบก้านและกิ่งของพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์เตอริโอ ดังแสดงในรูปที่ 4.

3. เมื่อพบว่าเส้นใยของราเอนโดไฟต์ออกมาจากชิ้นส่วนของใบ, ก้านและกิ่งของพืช จึงแยกชิ้นส่วนของเส้นใยราไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใหม่ ทำเช่นนี้หลายครั้งจนกระทั่งได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.



รูปที่ 4. ราเอนโดไฟต์ที่เจริญออกมาจากใบยอที่วางลงบนอาหาร PDA อายุ 2 วัน.

2.3.2 การจัดจำแนกราเอนโดไฟต์

นำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ไปเลี้ยงให้บริสุทธิ์ จากนั้นจัดจำแนกราเอนโดไฟต์ที่ได้โดยการวิเคราะห์ลำดับ DNA โดยเลี้ยงราเอนโดไฟต์ในอาหารแข็ง PDA นาน 7 วัน จากนั้นแยกเอาส่วนเส้นใยของราเอนโดไฟต์มาสกัด DNA โดยปรับปรุงวิธีการสกัดจากวิธีของ To-anun, Takamatsu and Kunoh (1999) และใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Dneasy Plant Mini Kit ของบริษัท QIAGEN.

2.3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป

ทำการสกัดดีเอ็นเอ Unknown ราโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Dneasy Plant Mini Kit ของบริษัท QIAGEN ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยทำตาม Protocol ที่แนบมากับชุดสกัดดีเอ็นเอ ส่วนตัวอย่าง Unknown ราที่ไม่สามารถสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปดังกล่าว ให้ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ปรับปรุงวิธีการจากวิธีของ To-anun, Takamatsu and Kunoh (1999).

2.3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอปรับปรุงวิธีการจากวิธีของ To-anun Takamatsu and Kunoh (1999)

1. ใช้เส้นใยรานักประมาณ 1-2 กรัม ใส่โกร่งที่อบฆ่าเชื้อแล้วเติมไนโตรเจนเหลว เพื่อให้เซลล์ของเส้นใยแข็งตัว บดให้เป็นผงละเอียด.
2. ตั้งโกร่งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อตัวอย่างเริ่มหลอมละลาย เติม 2X CTAB buffer (1.4 โมลาร์ NaCl, 100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, 20 มิลลิโมลาร์ EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร.

3. คนส่วนผสมให้เข้ากัน ถ้ายใส่หลอดทดลองพลาสติกขนาด 40 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ใน water bath เป็นเวลา 20 นาที (ผสมสารให้เข้ากันโดยการกลับหลอดเป็นครั้งคราว).

4. เติม Chloroform:Isoamyl Alcohol (24:1) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที.

5. ดูดสารละลายส่วนใส (supernatant) ใส่หลอดใหม่ เติม 10% CTAB buffer ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่ดูมาผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที.

6. เติม Chloroform:Isoamyl Alcohol (24:1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที.

7. ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol (อุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที.

8. เทของเหลวส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที.

9. เทสารละลายส่วนใสทิ้งไป นำหลอดทดลองไปใส่ใน Desiccator เพื่อดูความชื้นออกจากหลอดจนแห้งสนิท ละลายดีเอ็นเอใน TE Buffer หรือ dH₂O ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ถ้าตะกอนละลายยากให้นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส.

10. ดูดสารละลายดีเอ็นเอไปใส่ทิวบขนาด 1.5 มิลลิลิตร แบ่งตัวอย่างส่วนหนึ่งไปวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอโดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส.

2.3.2.3 PCR (Polymerase chain reaction)

เลือก Universal primer ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีน ITS โดยอ้างอิงลำดับเบสของ primer จาก CCDB Protocol (White 2014) ทำการส่งลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ไปสังเคราะห์ primer ที่บริษัท WARD MEDIC โดย primer มีข้อมูลพื้นฐาน ดังแสดงในตารางที่ 1 นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ของ Unknown รา มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน ITS โดยวิธี PCR โดยผสมสารต่างๆ ในหลอดทดลองตามสัดส่วน ดังแสดงในตารางที่ 2 ควบคุมปฏิกิริยา PCR โดยจัดการตั้งอุณหภูมิ, เวลา และจำนวนรอบของเครื่อง Thermo hybrid ให้มีลำดับการทำงานสำหรับยีน ITS ดังแสดงในตารางที่ 3 หลังจากปฏิกิริยา PCR เสร็จสมบูรณ์ให้เก็บตัวอย่าง PCR product ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี Eletrophoresis ดังวิธีในหัวข้อต่อไป.

ตารางที่ 1. ข้อมูล และลำดับเบสของ Universal primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

Marker	Primer	Sequence of primer (5' → 3')	Reference
ITS	ITS1-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	
	ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

ตารางที่ 2. สัดส่วนของสารต่างๆ ในหลอดทดลอง PCR 1 ทิวบ์

ชื่อสาร	ปริมาตรต่อ 1 ตัวอย่าง (ไมโครลิตร)
dH ₂ O	17.25
10X buffer <i>Taq</i> DNA polymerase	2.5
dNTP (10 mM)	0.5
MgCl ₂ (25 mM)	1.5
Forward primer (10 μM)	1.0
Reverse primer (10 μM)	1.0
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 unit/ μl)	0.25
template DNA	1.0
ปริมาตรสารรวมทั้งหมด	25

ตารางที่ 3. ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ที่ใช้กับเครื่อง Thermo Hybrid เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน ITS ในหลอดทดลอง

Stage	อุณหภูมิ (°C.)	เวลา	
1. Initial denature	94	5 นาที	} 30 รอบ
2. Denature	94	30 วินาที	
3. Annealing	55	30 วินาที	
4. Extension	72	45 วินาที	
5. Final extension	72	5 นาที	
6. Hold	25	∞	

2.3.2.4 Electrophoresis

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวี เตรียม Agarose ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งสารปริมาณ 0.48 กรัม แล้วเติม 1X TAE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร หลอมสารละลายให้ร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 1 นาที เขย่าให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน.

2. รอ 5 นาที เท Agarose ลงในถาดเจลที่เตรียมไว้ เสียบหรือลงไป ปล่อยให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัว ดึงหรือออก นำเจลที่ได้ไปใส่เครื่อง eletrophoresis หลังจากนั้นใส่ 1X TAE buffer ให้ปริมาตรสูงกว่าเจลประมาณ 2 มิลลิเมตร.

3. นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading buffer ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร แล้วโหลดตัวอย่างลงในเจล เปิดเครื่อง eletrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 55 นาที ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ระยะทางที่เหมาะสมในเจล.

4. นำเจลไปย้อมด้วยสาร gel star เป็นเวลา 50 นาที ตักเจลไปวางไว้ในเครื่อง Gel Documentation เพื่อถ่ายภาพเจลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์และบันทึกผลการทดลอง.

2.3.2.5 การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล

เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธี Eletrophoresis จนได้ PCR product ที่ต้องการให้ทำการตัดเจลในตำแหน่งดังกล่าวของแต่ละตัวอย่าง เก็บไว้ในทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิเมตร นำเจลที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดเจลสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction kit ของบริษัท QIAGEN วิธีการตาม Protocol ที่แนบมา เมื่อได้ดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการออกมา แบ่งตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี Eletrophoresis วิธีการดังข้อที่ 2.3.2.4.

2.3.2.6 การวิเคราะห์ลำดับเบส

นำตัวอย่างดีเอ็นเอ (PCR product) จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน ITS ของ Unknown ราที่ได้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณดังกล่าวกับบริษัท Macrogen ที่ประเทศเกาหลี หลังจากบริษัท Macrogen ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสเสร็จเรียบร้อยแล้วก็ส่งข้อมูลกลับมา จึงทำการดาวน์โหลดข้อมูลลำดับเบสที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI โดยโปรแกรม BlastN ใน Unknown ราแต่ละตัวอย่าง เพื่อระบุสายพันธุ์ Unknown รา โดยเปรียบเทียบจากความเหมือนกันของลำดับเบสราที่ทราบสายพันธุ์แน่นอนในฐานข้อมูล NCBI.

2.3.3 การสกัดสารจากเชื้อราเอนโดไฟต์

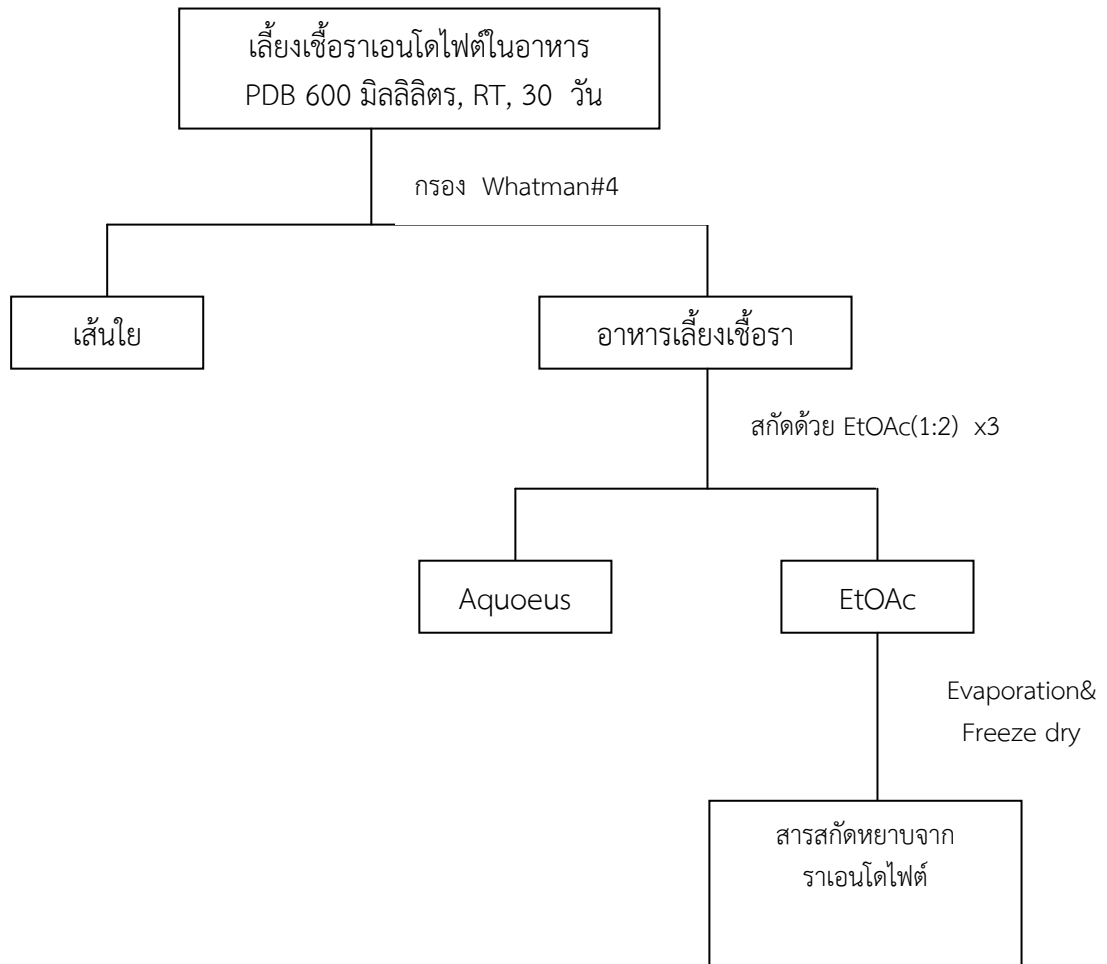
2.3.3.1 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์

นำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมด มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง. จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) เป็นจำนวน 600 มิลลิเมตร โดยแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 500 มิลลิเมตร โดยใส่แต่ละขวดให้มีปริมาตร 200 มิลลิเมตร เजाะขึ้นวันที่มีราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร จำนวน 10 ชิ้น โดยแต่ละชิ้นมีขนาดเท่าๆ กัน ลงในแต่ละขวด นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 วัน.

2.3.3.2 การแยกสารเมแทบอลิต์ของราเอนโดไฟต์

นำราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงได้ในข้อ 2.3.4.2 มากรองแยกด้วยผ้าขาวบางก่อน และนำมากรองแยกอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ซึ่งจะได้ส่วนของเส้นใยราและส่วน

ของอาหารเลี้ยงเชื้อรา นำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อรามาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอสีเตตในอัตราส่วน 1:2 ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำไประเหยให้แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักแห้ง ดังแสดงในรูปที่ 5.



รูปที่ 5. ขั้นตอนการสกัดสารจากเชื้อราเอนโดไฟต์.

2.3.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน (Oxidation reaction) เป็นขบวนการทางชีวเคมีตามปกติในเซลล์ทุกอวัยวะทั่วร่างกาย และมีบทบาทสำคัญในขบวนการเผาผลาญต่างๆ ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งขบวนการดังกล่าวจะก่อให้เกิดของเสียที่เรียกว่า “อนุมูลอิสระ” (Free radical) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่อยู่ตัวเพราะมีประจุลบซึ่งเกิดจากการสูญเสียอิเล็กตรอนวงนอกของออกซิเจน (Reactive Oxygen Species, ROS) เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$), อนุมูลไฮดรอกซีแรดิคัล ($\cdot OH$), อนุมูลไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2), อนุมูลเพอร์ออกซีแรดิคัล (ROO_2^{\cdot}) ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะพยายามแย่งชิงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นๆ เพื่อให้ตัวเองเสถียร โมเลกุลที่ถูกแย่งชิงอิเล็กตรอนไปก็จะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการแย่งชิงอิเล็กตรอนต่อไปเรื่อยๆ จึงเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ ปรากฏการณ์นี้ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นมากมายในเซลล์ทั่วร่างกาย.

อนุมูลอิสระก่อให้เกิดทั้งประโยชน์และโทษ ในด้านที่มีประโยชน์ ได้แก่ ทำให้เกิดพลังงาน, การกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยเม็ดเลือดขาว, การเจริญเติบโตของเซลล์, การส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ และในส่วนของก่อให้เกิดโทษ คือ อนุมูลอิสระจะไปเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับไขมันที่ผนังเซลล์ ตลอดจนสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโปรตีน, เอนไซม์, คาร์โบไฮเดรต และ DNA มีผลทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายทำให้โครงสร้างของโปรตีน และ DNA เกิดการเปลี่ยนแปลง เป็นสาเหตุให้เกิดความเสื่อมชรา (Aging) ของเซลล์ และโรคสำคัญหลายชนิด เช่น หัวใจ, เส้นเลือดอุดตัน, ต้อกระจก, เบาหวาน, ความจำเสื่อม และมะเร็ง.

2.3.4.1 การตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ชนิด superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม water soluble compounds (ACW)

โดยใช้น้ำยาตรวจสำเร็จรูปชนิด ACW: Antioxidant Capacity Water Soluble compound (บริษัท Analytik Jena, ประเทศเยอรมนี) ประกอบด้วยสารละลาย R1 ตัวทำละลายตัวอย่าง (ACW-Diluent), สารละลาย R2-บัฟเฟอร์ทำปฏิกิริยา (Reaction buffer), สารละลาย R3-สารไวแสง (photo sensitizer and detection reagent) และสารละลาย R4-สารมาตรฐาน คือ ascorbic acid อนุมูลอิสระ (superoxide anion radicals) จะถูกสร้างให้เกิดขึ้นในระบบโดยการกระตุ้นสารไวแสง (photo sensitizer) เพื่อให้เกิดการเรืองแสง อนุมูลอิสระบางส่วนจะถูกกำจัดโดยสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อนุมูลส่วนที่เหลือจะถูกวัดโดยตัวจับสัญญาณและทำให้เกิดสารเรืองแสงและส่งสัญญาณเข้าสู่ระบบและถูกคำนวณเป็นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับ ascorbic acid.

การวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นจากสารเรืองแสงนั้นจะดำเนินอยู่ในช่วง 1-3 นาที ในการวัด ACW ช่วงของ lag phase เป็นช่วงที่ไม่เกิดสัญญาณเป็นช่วงที่อนุมูลอิสระเริ่มถูกจับโดยสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง และเมื่อสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในตัวอย่างเริ่มหมดความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระที่เหลือจะทำให้สัญญาณสูงขึ้นจนถึงมากที่สุดช่วงระยะเวลาของ lag phase ที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างแสดงผลเป็นหน่วย ascorbic acid equivalent.

2.3.4.2 การตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ชนิด superoxide anion radical ($O_2^{\cdot -}$) ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม lipid soluble compounds (ACL)

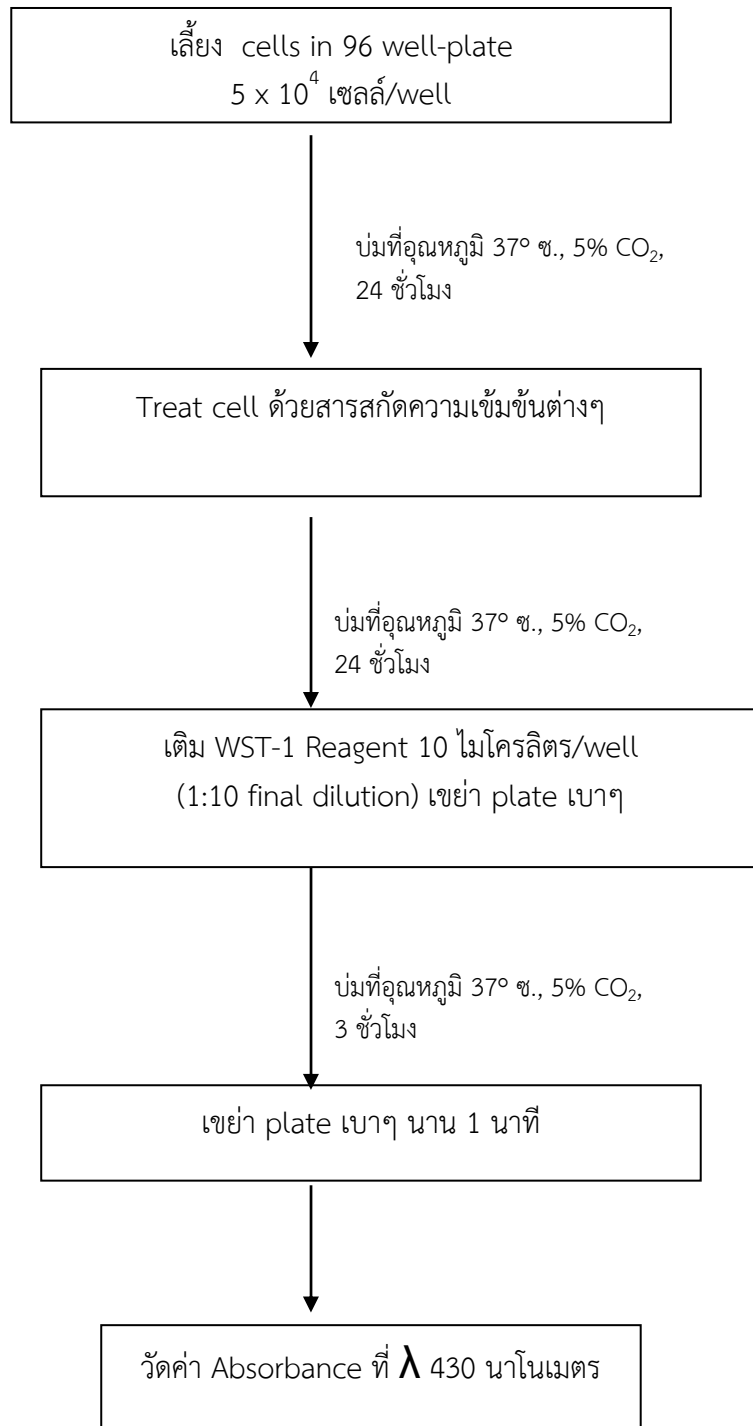
ใช้ Reagent kit ชนิด ACL: Antioxidant Capacity Lipid Soluble compound (บริษัท Analytik Jena, ประเทศเยอรมนี) และทำการเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการงานเช่นเดียวกันกับวิธีการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ ACW ดังที่อธิบายในหัวข้อ 2.3.4.1 ข้างต้น ยกเว้นการเปลี่ยนสารมาตรฐานที่ใช้จาก ascorbic acid (vitamin C) มาเป็น Trolox (vitamin E) และผลความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (inhibition) ของตัวอย่างจะถูกเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานและแสดงผลเป็นหน่วย Trolox[®] equivalent ในลักษณะเดียวกับที่ปฏิบัติสำหรับการใช้ ACW system ที่อธิบายข้างต้น.

2.3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยเทคนิค MTT assay

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colon carcinoma cells, Caco₂) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma cells, HeLa) ใช้เซลล์ปกติจากหนู (Mouse fibroblast cells, L929) เป็นเซลล์เปรียบเทียบ โดยใช้ WST-1 reagent ดังแสดงในรูปที่ 6.

การเตรียมเซลล์

1. เลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate (flat bottom) โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์ 5×10^4 เซลล์/well โดย final volume ของ culture medium (MEM + 10% horse serum) เป็น 200 ไมโครลิตร/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ บ่มนาน 24 ชั่วโมง.
2. ดูด medium ออก แล้วเปิดต่อ medium ที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ลงหลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ บ่มนาน 24 ชั่วโมง.
3. ดูด medium ออก แล้วเติม RPMI 1640 (ไม่มี phenol red) ลงไป 100 ไมโครลิตร/well จากนั้นเติม WST-1 reagent 10 ไมโครลิตร/well (1:10 final dilution) เขย่า plate เบาๆ
4. บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ นาน 3 ชั่วโมง.
5. วัดค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (เขย่าให้เข้ากันนาน 1 นาที ก่อนวัด) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเทียบกับ Blank (medium 100 ไมโครลิตร + WST-1 10 ไมโครลิตร, ไม่มีเซลล์) และ negative Control (medium 100 ไมโครลิตร + WST-1 10 ไมโครลิตร, มีเซลล์ที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัด).



รูปที่ 6. วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 โดยใช้ WST-1 reagent.

2.3.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ โดยวิธี Disc diffusion assay.

2.3.6.1 การเตรียมสารละลายทดสอบ

ละลายในเอทานอล 80% ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่าน Millipore filter 0.22 μ เก็บสารละลายตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้.

2.3.6.2 การเตรียมแผ่นทดสอบ

หยดสารละลายทดสอบลงบนแผ่น antibiotic assay disc ขนาด 9 มิลลิเมตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร/แผ่น จากนั้นนำไปทำให้แห้งภายใต้ Lamina flow ประมาณ 20 นาที ก่อนนำไปใช้ทดสอบ.

2.3.6.3 เชื้อทดสอบ

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
3. *Escherichia coli* ATCC 25922.
4. *Streptococcus pyrogenes* DMST 17020.
5. *Bacillus cereus*.
6. *Salmonella Typhimurium* DMST.
7. *S. Enteritidis* DMST 15676.
8. *Helicobacter pylori* PT 30*.
9. *H. pylori* PT 32(Metronidazole resistant strain)*.
10. *Candida albicans* ATCC 10231.
11. *Trichophyton mentagrophytes**.
12. *T. rubrum**.

หมายเหตุ : * เป็น clinical isolates.

2.3.6.4 วิธีทดสอบ

การเตรียม inoculum:

1. Bacterial inoculums และ *C. albicans* (ยกเว้น *S. pyrogenes* และ *H. pylori*)
 - 1) ใช้ loop แตะเชื้อจากหลอด working stock นำมา streak บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง.
 - 2) จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ 1 โคโลนี เพาะลงใน nutrient broth 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง.
 - 3) เตรียม inoculum โดยปรับความขุ่นของเชื้อด้วย normal saline (0.85% NaCl) ให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc. Farland No. 0.5 (Biomerieux).
2. Inoculums *S. pyrogenes* และ *H. pylori*
 - 1) ใช้ loop แตะเชื้อจาก frozen stocks นำมา streak บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% Columbia blood agar (สำหรับ *S. pyrogenes*) และ 7% Columbia blood

agar agar (สำหรับ *H. pylori*) บ่มในสภาวะ microaerophilic ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง.

2) จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ 2-3 โคโลนี เพาะลงใน Brucella broth 5 มิลลิลิตร supplement ด้วย Isovitalax (สำหรับ *S. pyroli*) บ่มในสภาวะ microaerophilic ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง.

3) เตรียม inoculum โดยปรับความขุ่นของเชื้อ Brucella broth 5 มิลลิลิตร ให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc. Farland No. 0.5.

3. Fungal inoculums

1) เพาะเชื้อราจาก stock ลงบนผิวหน้าของหลอด Sabouraud Dextrose Agar (SDA) slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน.

2) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลาย wetting agent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเชื้อรา ใช้เข็มเขี่ยปราศจากเชื้อขูดราออกจากผิวหน้าอาหาร แล้วเติม normal saline ลงในหลอดเชื้อราปริมาณ 3 มิลลิลิตรต่อหลอด เขย่าหลอดเบาๆ 3-5 ครั้ง ถ่ายสารละลายเชื้อราลงในหลอดปราศจากเชื้อที่มี glass beads จากนั้นปั่นหลอดด้วย vortex mixer อย่างแรงประมาณ 3-5 นาที แบบต่อเนื่องเพื่อให้ glass beads ตีเส้นใยและสปอร์ให้กระจายอย่างทั่วถึง.

3) เตรียม inoculum โดยปรับความขุ่นของเชื้อด้วย normal Saline (0.85% NaCl) ให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc. Farland No.5 (Biomerieux).

การเตรียมอาหารทดสอบ:

1. อาหารทดสอบสำหรับแบคทีเรียและยีสต์ เทอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% Columbia blood agar (สำหรับ *S. pyrogenes*) และ 7% Columbia blood agar (สำหรับ *S. pyroli*) และ Mueller-Hinton Agar (สำหรับแบคทีเรียอื่นๆ และยีสต์) ซึ่งหลอมละลายอย่างทั่วถึงและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อ (90 มิลลิเมตร) ปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อจาน ตั้งทิ้งไว้จนอาหารทดสอบแข็ง จากนั้นใช้ cotton swab ปราศจากเชื้อจุ่ม inoculum ป้ายลงบนผิวหน้าอาหารทดสอบให้ทั่วถึงทั้ง 3 ระบาย.

2. อาหารทดสอบสำหรับราเทอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ซึ่งหลอมจนละลายอย่างทั่วถึงและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อ (90 มิลลิเมตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อจาน รอจนอาหารแข็ง จึงเททับผิวหน้าด้วย SDA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี inoculum เชื้อราผสมอยู่ 100 ไมโครลิตร ตั้งไว้จนอาหารแข็งประมาณ 10-15 นาที.

2.3.7 การเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางเภสัชของราเอนโดไฟต์

2.3.7.1 การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางเภสัชของราเอนโดไฟต์ นำราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลต คือ LY-MC-22 NP-CA3-2, MK-CA1-1 และ MK-CA1-6 (เนื่องจากราทั้ง 4 ไอโซเลต มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด จากการทดลองดังกล่าวข้างต้น) นำมาเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA และ MEA นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิห้องเพื่อดูการเจริญเติบโต.

2.3.7.2 การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางเภสัชของราเอนโดไฟต์

นำราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลต คือ LY-MC-22, NP-CA3-2, MK-CA1-1 และ MK-CA1-6 (เนื่องจากราทั้ง 4 ไอโซเลต มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด จากการทดลองดังกล่าวข้างต้น) มาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB โดยแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใส่แต่ละขวดให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร เจาะขึ้นรู้นที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร จำนวน 5 ขึ้น โดยแต่ละขึ้นมีขนาดเท่าๆ กัน ลงในแต่ละขวด นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 1 เดือน เก็บตัวอย่างราทุกวัน อย่างละ 2 ข้ว นำมากรองแยกส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงรา, จากนั้นนำส่วนเส้นใยราไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วชั่งน้ำหนักแห้งจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ เขียนกราฟอัตราการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์ ระหว่างน้ำหนักแห้ง (กรัม) และระยะเวลาการเจริญเติบโตของรา (วัน) ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อรานำมาวัดค่าปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสในข้อถัดไป.

2.3.7.3 การศึกษาการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือก

นำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ที่กรองแยกได้ในข้อ 2.3.7.2 มาวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพื่อวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยดูดตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อราแต่ละตัวอย่างปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ใน 96 well จากนั้นนำไปวัดค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยทำการวัดตัวอย่างละ 2 ข้ว ซึ่งใช้วิธีการวัดแบบ Biochemistry analyzer โดยเครื่อง YSI มีวิธีการดังต่อไปนี้:

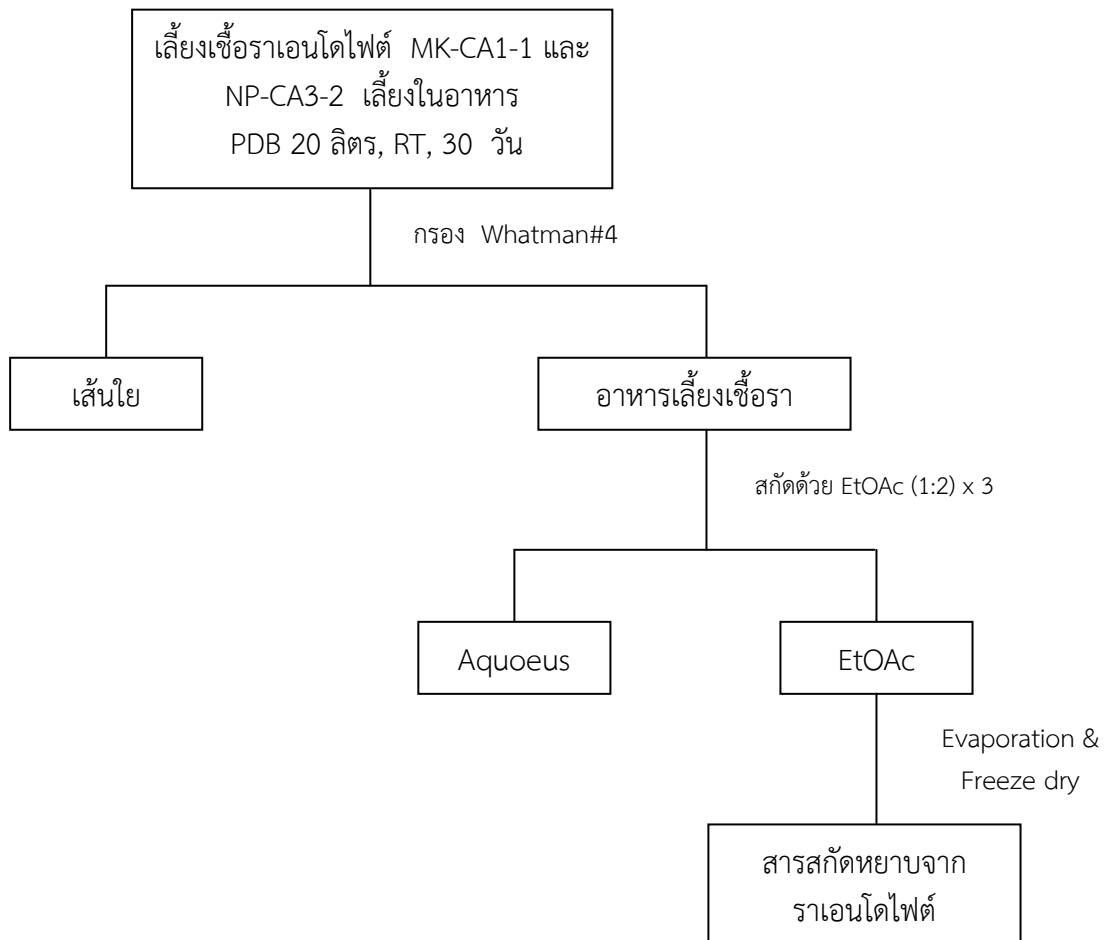
1. เปิดเครื่องทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ค่ากระแสไฟฟ้านิ่ง ต่ำกว่า 6 มิลลิโวลต์.
2. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ YSI 2357 ในอัตราส่วน 1 ของ/น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ลงในขวดบัฟเฟอร์และเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส 2.50 กรัมต่อลิตร ลงในขวดสารละลายมาตรฐาน.
3. ใส่สารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายมาตรฐานกลูโคส 2.50 กรัมต่อลิตร ในสายยางซิลิโคนให้เต็มสาย ตรวจสอบรอยรั่วของสายยางซิลิโคนและไล่ฟองอากาศออกให้หมด.
4. สอบเทียบเครื่องโดยใช้สารละลายมาตรฐานกลูโคส 2.50 กรัมต่อลิตร จนค่าที่วัดได้นิ่งและอยู่ในเกณฑ์.
5. ทดสอบความสมบูรณ์ของเมมเบรน โดยใช้สารละลายมาตรฐาน Potassium Ferrocyanide เป็นตัวทดสอบ ค่าความเข้มข้นที่วัดได้ไม่เกิน 0.05 กรัมต่อลิตร แสดงว่าเมมเบรนสามารถใช้งานได้ตามปกติ.
6. ทดสอบช่วงการวัดค่าความเข้มข้น (Linearity test) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการวัดโดยใช้สารละลายมาตรฐาน Glucose 9.00 กรัมต่อลิตร โดยค่าที่วัดได้ต้องอยู่ในช่วง $\pm 5\%$ ของความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน (8.55-9.45 กรัมต่อลิตร).
7. เตรียมตัวอย่างโดยนำสารละลายส่วนใส (supernatant) ใส่ในถาดหลุม (micro plate 96 well) หลุมละ 150 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง YSI 2900 ตั้งค่าตำแหน่งการเก็บตัวอย่างของเข็ม (sipper) แล้วกด RUN เพื่อให้เครื่องดำเนินการวัดค่าน้ำตาลจนเสร็จ.

2.3.8 การศึกษาวิธีเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางเภสัชของเชื้อราเอนโดไฟต์

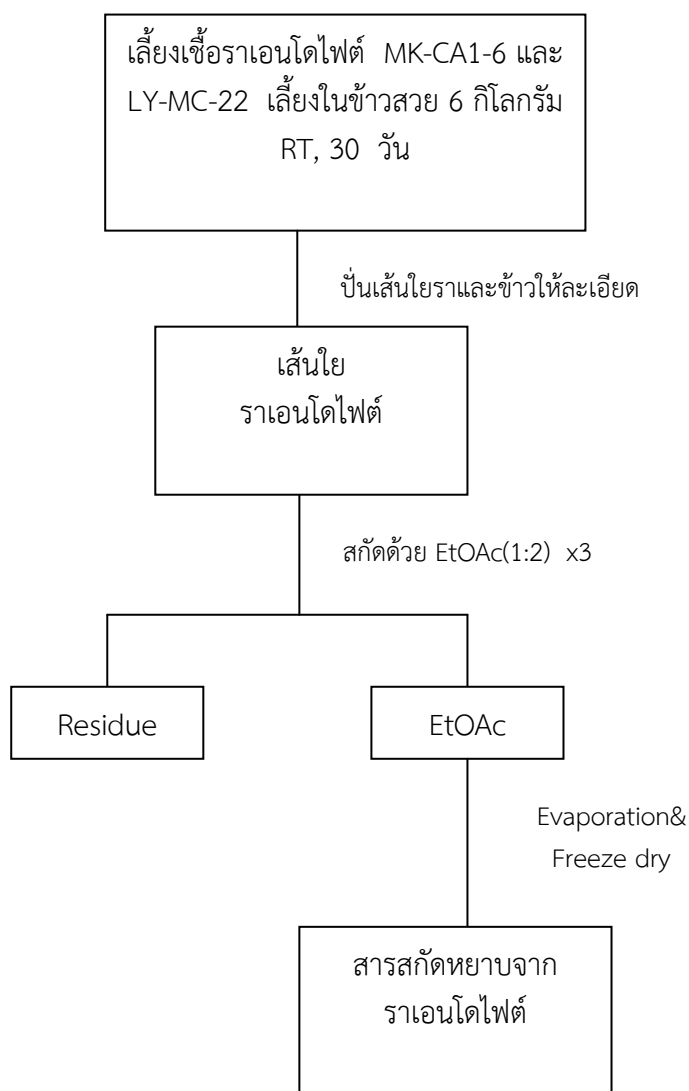
ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงราเอนโดไฟต์เพื่อให้สร้างสารออกฤทธิ์ทางเภสัชให้ได้ปริมาณมากเพื่อพัฒนามาใช้ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งได้ทดลองเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ในอาหารต่างชนิดกันทั้งอาหารเหลว (PDB และ MEB) อาหารแข็ง (PDA, MEA และ ข้าวสวย) และทดลองเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์โดยวางตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เลี้ยงใน incubation shaker และเลี้ยงใน fermenter.

2.3.9 การตรวจหาสารสำคัญจากสารสกัดเอทิลแอสีเตตจากเชื้อราเอนโดไฟต์

ทำการศึกษาคู่ประกอบทางเคมี (TLC fingerprint) ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ ดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8 ตรวจหาสารไตรเทอปีนส์ asiaticoside, และ madecassic acid ในสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ โดยวิธีรังคเลขฉิวบาง.



รูปที่ 7. ขั้นตอนการสกัดสารจากเชื้อราเอนโดไฟต์.



รูปที่ 8. ขั้นตอนการสกัดสารจากเชื้อราเอ็นโดไฟต์ที่เลี้ยงจากข้าวสารสุก.

ตัวอย่างสารสกัดหยาบของราเอ็นโดไฟต์ที่ได้ทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5 นำมา ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีรงค์เลขนิ้วบาง (TLC fingerprint) ดังวิธีทำที่จะกล่าวต่อไป.

ตารางที่ 4. จำนวนสารสกัดเอทิลแอสีเตตจากราเอนโดไฟต์ 11 ตัวอย่าง และตัวอย่างควบคุม (PDB) จำนวน 1 ตัวอย่าง

ลำดับ	เชื้อรา	น้ำหนักสารสกัด (มิลลิกรัม)
1	MK-CA-1	71.98
2	MK-CA-2	290.10
3	MK-CA-3	63.91
4	MK-CA-5	81.10
5	MK-CA-7	103.79
6	MK-CA1-1	593.38
7	MK-CA1-2	1305.75
8	MK-CA1-3	59.60
9	MK-CA1-6	83.88
10	NP-CA3-1	53.42
11	NP-CA3-2	125.35
12	Control (PDB)	29.35

สรุป: เลือกตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 8 เพราะพบแถบสีที่เป็นลักษณะของสารกลุ่มไตรเทอพีนส์ โดยตัวอย่างที่ 8 พบแถบสีที่เด่นชัดกว่าตัวอย่างอื่นๆ

ตารางที่ 5. จำนวนสารสกัดเอทิลแอสีเตตจากราเอนโดไฟต์ 36 ตัวอย่าง ของ crude ethyl acetate จากราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ

ลำดับ	สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (มิลลิกรัม)
1	Crude EtOAc ข้าวสุก	10.33
2	Crude EtOAc ราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 ข้าวสุก	10.76
3	Crude EtOAc ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6-22 ข้าวสุก	10.95
4	Crude EtOAc PDB	20.00
5	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 (shake), PDB, Lot.1	12.32
6	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 (Shake), PDB, Lot.1	11.33
7	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 (Fermenter), PDB, Lot.1	10.44
8	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 (Not shake), PDB, Lot.2	11.03
9	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 (Not shake), PDB, Lot.1	11.48
10	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 (Not shake), PDB, Lot.1	11.20
11	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 (Shake), PDB, Lot.1	10.63
12	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 (Shake), PDB, Lot.1	10.95
13	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 (Shake), MEB, Lot.2	
14	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 (Shake), MEB, Lot.2	
15	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 (Fermenter), PDB, Lot.1	10.01

ตารางที่ 5. (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (มิลลิกรัม)
16	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 (Fermenter), PDB, Lot.1	14.98
17	Crude EtOAc MEB	50.00
18	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 (Not shake), PDB, Lot.1	
19	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 (Not shake), PDB, Lot.1	12.03
20	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 (Not shake), PDB, Lot.1	12.88
21	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 (Not shake), PDB, Lot.1	13.31
22	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 (Shake), PDB, Lot.1	13.42
23	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 (Shake), PDB, Lot.1	6.45
24	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 (Shake), MEB, Lot.3	11.87
25	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 (Shake), MEB, Lot.3	18.75
26	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 (Not shake), PDB, Lot.1	12.21
27	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 (NotnShake), PDB, Lot.1	12.7
28	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 (Shake), PDB, Lot.1	6.83
29	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 (Shake), PDB, Lot.1	14.39
30	Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 (Shake), MEB, Lot.4	14.40
31	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 (Shake), MEB, Lot.4	16.78
32	Crude EtOAc น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 (Fermenter), PDB, Lot.1	9.21
33.	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 (Shake), PDB, Lot.3	13.46
34	Crude EtOAc น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 (Fermenter), PDB, Lot.1	11.66
35	Crude EtOAc เส้นใยราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 (Fermenter), PDB, Lot.1	17.09
36	Crude EtOAc น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 (Fermenter), PDB, Lot.2	17.92

สรุป: เลือกตัวอย่างที่ 8 (ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 ข้าวสุก), 26 (ราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 ข้าวสุก) เพราะพบแถบสีที่เป็นลักษณะของสารกลุ่มไตรเทอพินส์

ซึ่งสารตัวอย่าง 50 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปหยดลงบนแผ่น TLC แถบละ 5.0 ไมโครลิตร.

สารมาตรฐาน ละลายในเมทานอล ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปหยดลงบนแผ่น TLC การเตรียม TLC Chamber สำหรับใช้แยกสารโดยใช้ระบบตัวทำละลาย 2 ระบบ ได้แก่:

1. Solvent system I for medium polar compounds: Dichloromethane-Methanol, 9+1.
2. Solvent system II for polar compounds: Dichloromethane-Methanol Water, 20+6.5+0.5.

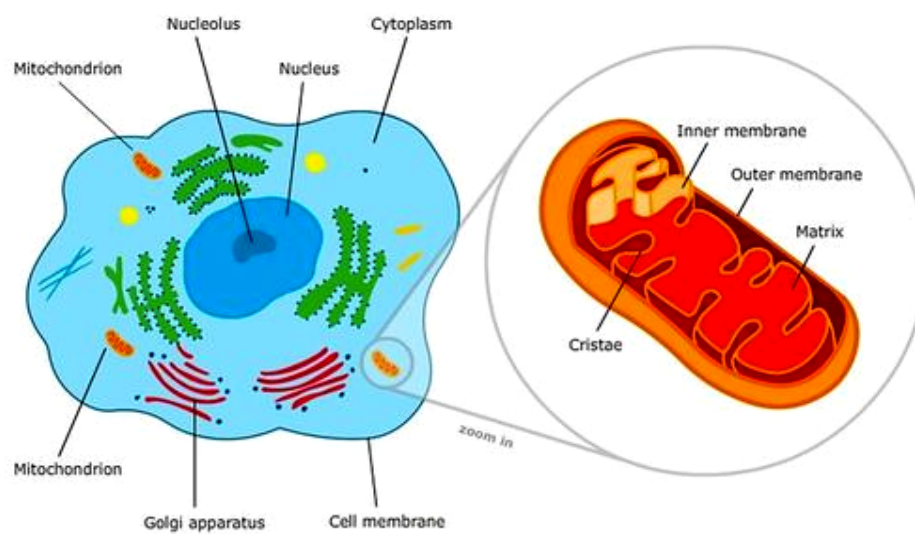
การแยกสารบนแผ่นรงคเลขผิวบาง

นำแผ่น TLC ใส่แทงก์ รอให้ตัวทำละลายนำพาสารเคลื่อนไปบนแผ่น TLC จนถึงระยะทางที่กำหนดไว้ (solvent front) จึงนำแผ่น TLC ออก มาผึ่งให้ตัวทำละลายระเหยแห้ง แล้วนำไปตรวจสอบชนิดของสารด้วยน้ำยาฟ่น.

เมื่อคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชที่มีฤทธิ์ที่ดีแล้ว ได้นำราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชอีกครึ่งหนึ่ง ดังวิธีต่อไปนี้:

2.3.10 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค WST assay

ทั้งการทดสอบ MTT และ WST assays เป็นการวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณ โดยทดสอบหาอัตราการอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) โดยอาศัยหลักการที่ว่าเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้เอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจิเนส (succinate dehydrogenase) ที่อยู่ในองค์ประกอบภายในเซลล์ส่วนที่เรียกว่าไมโทคอนเดรีย (mitochondria, ดังแสดงในรูปที่ 9 ทำปฏิกิริยากับสาร MTT หรือ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltertrazolium bromide ซึ่งเป็นเป็นสีย้อมชนิดหนึ่งเข้าไป และเปลี่ยน MTT เป็นผลึก formazan ที่มีสีม่วง-น้ำเงินและไม่ละลายน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11.

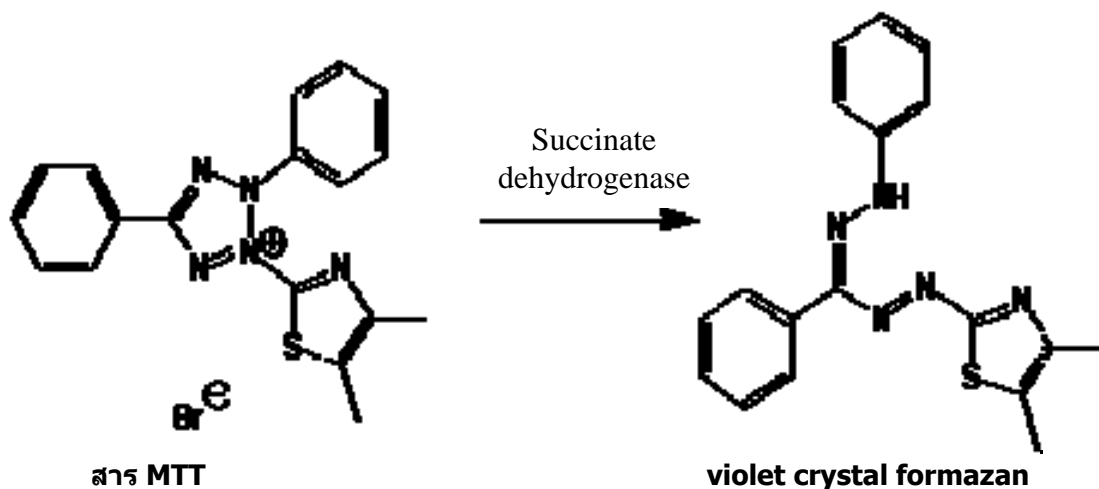


© 2007-2011 The University of Waikato | www.sciencelearn.org.nz

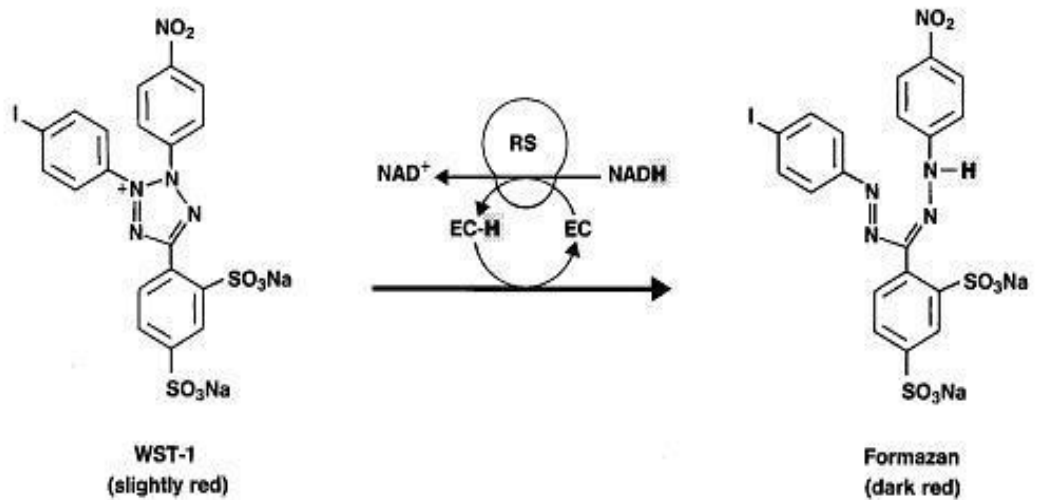
รูปที่ 9. องค์ประกอบภายในเซลล์ และส่วนที่เรียกว่า Mitochondria.

สำหรับขั้นตอนของวิธี MTT assay ในจุดนี้จะใช้การเติม dimethylsulfoxide (DMSO) ลงไปเพื่อละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้น ทำให้สามารถวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้นได้ โดยการวัดค่าความเข้มการดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่ความยาวคลื่นที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer แต่สำหรับวิธี WST assay จะแตกต่างจาก MTT assay ตรงที่ไม่จำเป็นต้องเติม DMSO ลงไป เนื่องจาก tetrazolium salt ที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็นผลึก formazan ที่ละลายน้ำได้ (soluble formazan).

ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะแปรผันตรงกับเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อคำนวณและเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ในกลุ่มควบคุมก็จะทำให้ทราบว่าสารตัวอย่างมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบหรือไม่ เพราะฉะนั้นเทคนิคนี้จึงมีประโยชน์ในเรื่องการหาปริมาณของเซลล์ที่รอดชีวิตซึ่งสามารถบอกได้โดยวิธีอ้อมจากปริมาณ crystal formazan ที่เกิดขึ้นนั่นเอง.



รูปที่ 10. หลักการ MTT assay เกิดจากปฏิกิริยาที่ผลึก tetrasodium salt (MTT) ถูกย่อยด้วย เอนไซม์ซันดิซซิงเนสดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) ใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิต (viable) เท่านั้น เกิดเป็นผลึกสีม่วง-ชมพู ซึ่งไม่ละลายน้ำ.



รูปที่ 11. หลักการ WST-1 assay: ผลึก tetrasolium salt (MTT) จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดซักซิเนตไฮโดรจีเนส (succinate-tetrazolium reductase system) ใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิต (viable) เท่านั้น เกิดเป็นผลึก formazan สีแดงเข้ม (dark red) ซึ่งละลายน้ำได้.

ขั้นตอนการทดสอบ WST-1 assay

2.3.10.1 เซลล์และการเลี้ยง (Cell culture and maintenance)

เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ ประกอบด้วยเซลล์ปกติ (non-transformed cell line, L929 mouse connective tissue) และเซลล์มะเร็ง (transformed cell line) อีก 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับมนุษย์ (HepG2 human hepatocellular carcinoma cells) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 human breast adenocarcinoma cells) เซลล์ทั้ง 3 cell lines สั่งซื้อจาก American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา นำมาเลี้ยงในอาหารชนิด MEM และ DMEM ที่เติมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) และ/หรือ horse serum (HS) ในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5% โดยเซลล์เจริญเติบโตในลักษณะ adhesion คือ การเกาะและเจริญเติบโตแบบ monolayer บนผิวภาชนะที่ใช้เลี้ยง (tissue culture flasks) ซึ่งในการ sub-culture หรือก่อนการทดสอบแต่ละครั้งจะต้องทำให้เซลล์อยู่ในลักษณะแขวนลอยโดยการย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsinisation) ก่อน สำหรับการทดสอบ จะทำการเลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate (flat bottom) โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์ 2 x 10⁵ เซลล์/มิลลิลิตร โดย final volume ของอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเหลว (culture medium) เป็น 200 ไมโครลิตร/well (ความหนาแน่นสุดท้ายของเซลล์ = 4x 10⁴ เซลล์/well) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (CO₂) นาน 24 ชั่วโมง ชนิดของเซลล์ที่ใช้ทดสอบและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับเซลล์แต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 6.

ตารางที่ 6. เซลล์ที่ใช้ทดสอบและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับเซลล์แต่ละชนิด

ชนิดเซลล์	เนื้อเยื่อที่มาของเซลล์	Culture medium
L929	Mouse subcutaneous connective tissue	MEM + 10% horse serum (HS)
HepG2	Human liver hepatocellular carcinoma	DMEM + 10% fetal bovine serum* (FBS)
MCF-7	Human breast adenocarcinoma cell	DMEM + 10% fetal bovine serum* (FBS)

หมายเหตุ : * เป็น fetal bovine serum ที่ไม่ได้ผ่านการ heat-inactivation อาหารเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดจะเติม 1%

Penicillin/Streptomycin ลงไปด้วย

MEM = Minimal eagle medium DMEM = Dulbaco minimal eagle medium

2.3.10.2 การเตรียม Cell proliferation reagent WST-1

ผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่เปิดใช้ควรเก็บที่ -15 ถึง -20 องศาเซลเซียส หลีกเลี้ยงแสง ถ้ามีตะกอน หรือขุ่นเมื่อจะทำให้ละลาย (thaw) ให้อุ่นสารที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-10 นาที และเขย่าเพื่อละลายตะกอน ห้าม centrifuge เพราะจะทำให้ working concentration ลดลง.

สำหรับการ thaw ใช้ในช่วงสั้นๆ เมื่อ thaw แล้ว ให้เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส หลีกเลี้ยงแสงจะเก็บได้นาน 4 สัปดาห์ แต่สารละลายอาจจะเข้มข้น แก้ไขโดยอุ่นสารละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-10 นาที แล้วเขย่าให้เข้ากัน (การเก็บในระยะยาว ควร aliquots แล้วเก็บรักษาที่ -15 ถึง -20 องศาเซลเซียส หลีกเลี้ยงแสง).

2.3.10.3 วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้ WST-1 reagent

1. การเตรียมเซลล์ (รายละเอียด ดังอธิบายในข้อ 2.3.9.2).

2. เลี้ยงเซลล์ (L929, HepG2 และ MCF-7) ใน 96-well plate (flat bottom)

โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์ที่ 4×10^4 เซลล์/well โดย final volume ของ culture medium (DMEM+10% fetal bovine serum) เป็น 200 ไมโครลิตร/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ บ่มนาน 24 ชั่วโมง

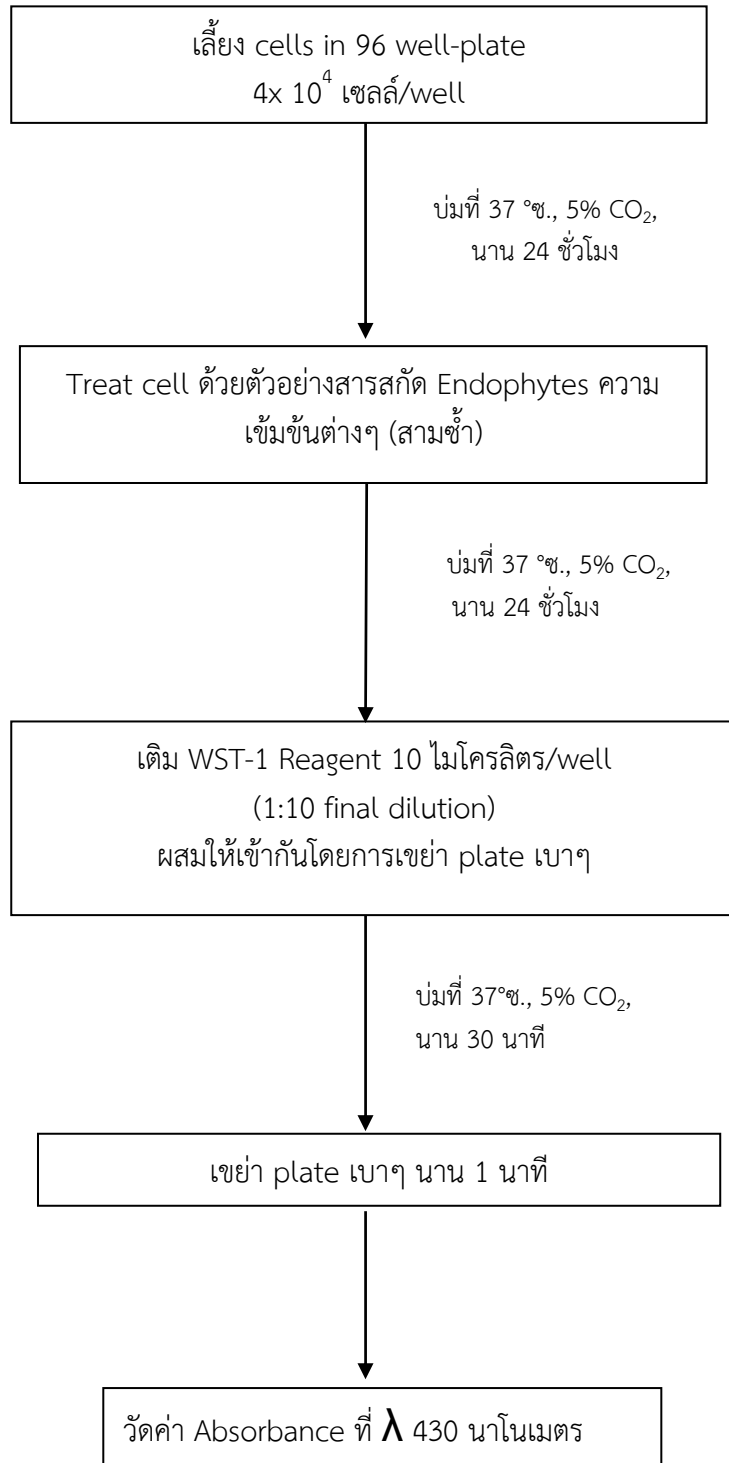
3. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ดูด media ออก แล้วเปิด media ที่มีสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ ทั้ง 4 ตัวอย่าง (LY-MC-22, MK-CA1-1, MK-CA1-6 และ NP-CA3-2) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลง หลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วนำเซลล์กลับไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ ต่ออีก 24 ชั่วโมง.

4. เมื่อครบกำหนดเวลา เตรียมสารละลาย WST-1 โดยละลาย WST-1 reagent ด้วย MEM (สำหรับเซลล์ L929) หรือ DMEM (สำหรับเซลล์ HepG2 และ MCF-7) ในอัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร จากนั้นดูดสารทดสอบใน 96-well plate ทิ้งไป แล้วเติมสารละลาย WST-1 ลงไป 100 ไมโครลิตร/หลุม แล้วนำเซลล์กลับไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ นาน 30 นาที ในภาวะมืด (dark condition).

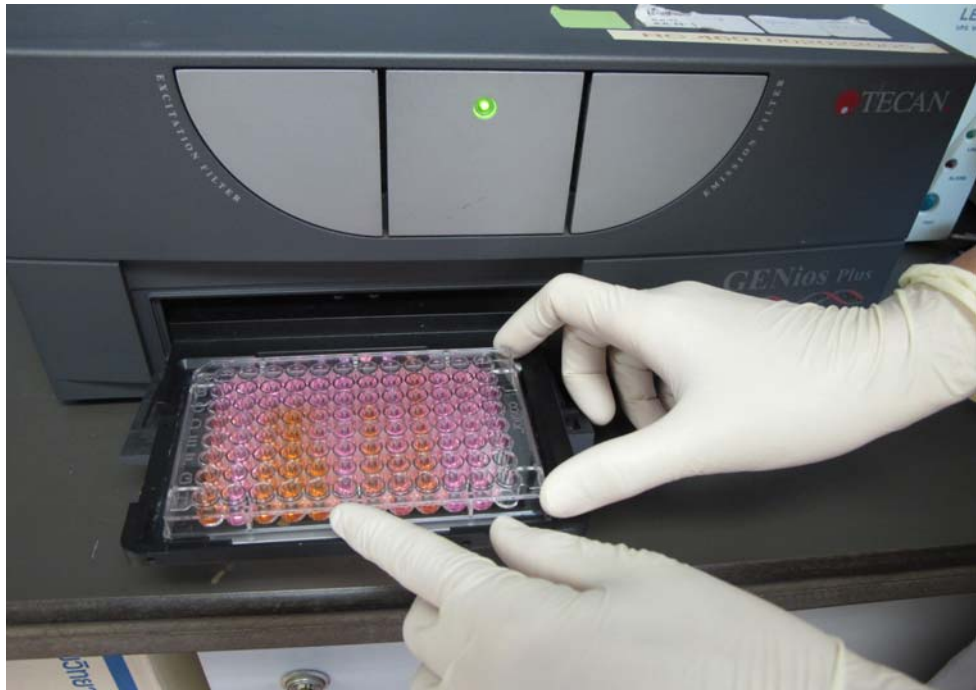
5. เมื่อครบกำหนด นำเซลล์ใน 96-well plate ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (ตั้งโปรแกรมเขย่านาน 1 นาที ก่อนวัด) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเทียบกับ Blank (medium 100 ไมโครลิตร

+ WST-1 10 ไมโครลิตร, ไม่มีเซลล์) และ negative control (medium 100 ไมโครลิตร + WST-1 10 ไมโครลิตร, มีเซลล์ที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัด).

6. นำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต (% viability) เทียบกับกลุ่มควบคุม.



รูปที่ 12. แผนภูมิสรุปขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัดหยาบ เชื้อราเอนโดไฟต์ ด้วยเทคนิค WST-1 assay.



รูปที่ 13. การนำตัวอย่างเซลล์ทดสอบ (อยู่ใน 96-well plate) เข้าวัดในเครื่อง Microplate Reader.

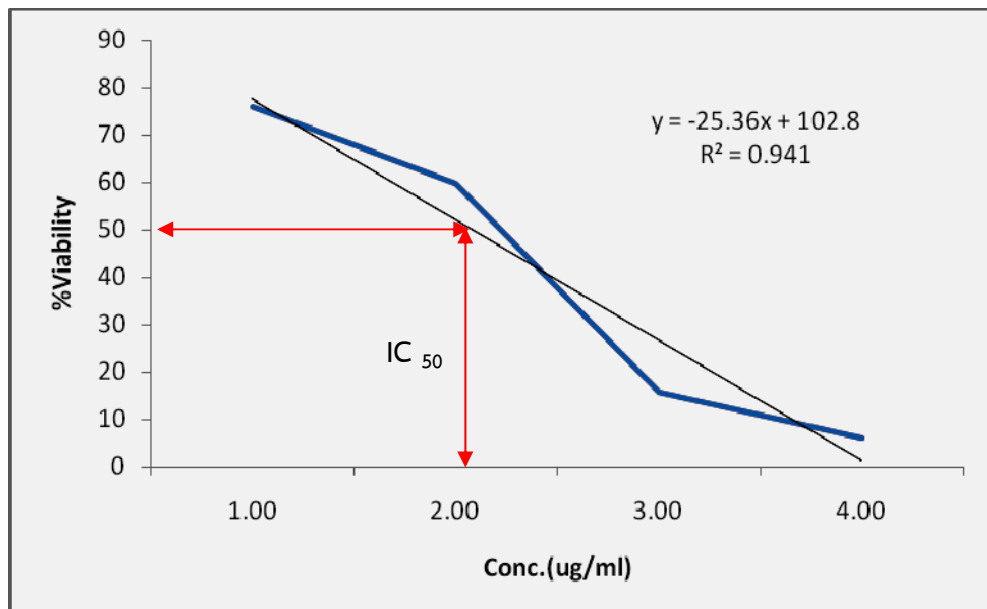


รูปที่ 14. การแสดงผลการทดสอบ WST-1 assay บนจอเครื่อง Microplate Reader.

2.3.10.4 วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต (%Viability)

คำนวณค่า % Viability ของสารแต่ละความเข้มข้นตามสมการด้านล่าง นำค่า % viability ของแต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และ % viability (แกน Y) แล้วหาค่า IC₅₀ (median inhibitory concentration) จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ ดังแสดงในรูปที่ 15 ซึ่งก็คือ ความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนของแสงลดลงครึ่งหนึ่ง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ทดสอบหรือกลุ่มควบคุม (control).

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของสารที่ทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม}}$$



รูปที่ 15. กราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และ % viability (แกน Y) และวิธีการหาค่า IC₅₀ (median inhibitory concentration).

$$\begin{aligned} Y &= -25.361X + 102.87 \\ 50 &= -25.361X + 102.87 \\ X &= (50 - 102.87) / -25.361 \\ &= 2.0847 \end{aligned}$$

ดังนั้น ค่า IC₅₀ ของสารที่ใช้ทดสอบมีค่าเท่ากับ 2.0847 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.3.11 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วย Rats Ear Edema Model

2.3.11.1 การเตรียมสารละลายสำหรับสารทดสอบ

เตรียมสารทดสอบ คือ เชื้อรา NPCA3-2 ให้อยู่ในรูปสารละลายใน acetone ที่ขนาดความเข้มข้น เป็น 0.1, 1, และ 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/ปริมาตร.

2.3.11.2 การเตรียมสารละลายของสารเหนียวทำให้เกิดอาการอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammation)

EPP ซึ่งเป็นสารเหนียวทำให้เกิดการอักเสบ โดยก่อให้เกิดการระคายเคือง และเพิ่มความหนาของใบหูหนู นำมาเตรียมให้อยู่ในรูปสารละลายใน acetone ที่ขนาด 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร/ปริมาตร.

2.3.11.3 การเตรียมผลิตภัณฑ์สารมาตรฐาน (Standard drug)

เตรียมสารมาตรฐาน phenylbutazone ให้อยู่ในรูปของสารละลายใน acetone ที่ขนาด 5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/ปริมาตร

2.3.11.4 สัตว์ทดลอง

นำหนูทดลองมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนการทดสอบนาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อม ซึ่งมีอุณหภูมิระหว่าง 24 ± 10 องศาเซลเซียส อดอาหาร หนูอย่างน้อย 16 ชั่วโมง ก่อนทำการทดสอบ แต่ให้ได้รับน้ำตามปกติ.

2.3.11.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วย Rats Ear Edema Model

ประยุกต์ใช้วิธีการของ Brattsand *et al.* (1982) โดยแบ่งหนูทดลอง เป็น 9 กลุ่มๆ ละ 3 ตัว วัดความหนาของใบหูข้างขวาของหนูทุกตัว ด้วยเครื่อง Pocket thickness gauge จดบันทึกไว้ แล้วดำเนินการตามข้างล่าง โดยให้สารทดสอบแก่หนูทุกกลุ่มในขนาด 20 ไมโครลิตร/หู (ด้านในของใบหู 10 ไมโครลิตร และด้านนอกของใบหู 10 ไมโครลิตร) ดังต่อไปนี้ :

1. กลุ่มควบคุม ได้รับ acetone.
2. กลุ่มสารมาตรฐาน ได้รับสารละลายของสารมาตรฐาน phenylbutazone.
3. กลุ่มทดสอบที่ 1 ได้รับสารละลายของเชื้อรา NPCA3-2 ใน acetone ขนาด 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/ปริมาตร.
4. กลุ่มทดสอบที่ 2 ได้รับสารละลายของเชื้อรา NPCA3-2 ใน acetone ขนาด 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/ปริมาตร.
5. กลุ่มทดสอบที่ 3 ได้รับสารละลายของเชื้อรา NPCA3-2 ใน acetone ขนาด 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/ปริมาตร หลังจากให้สารทดสอบ 30 นาที ให้สารละลาย EPP ที่ใบหู หนูข้างเดียวกับที่ได้รับสารทดสอบในขนาด 20 ไมโครลิตร หลังจากนั้นบันทึกการเปลี่ยนแปลงของขนาดความหนาของใบหูหนูโดยวัดที่เวลา 30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง.

สถิติที่ใช้ในการทดสอบ

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ โดยใช้ One-way ANOVA และ Tukey post-hoc test (ขำนิจารกิจ 2531).

2.3.12 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งและความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์

เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (Minimum inhibitory concentration, MIC) และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum bactericidal concentration, MBC)

สารทดสอบ: มีจำนวนทั้งสิ้น 4 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 7.

ตารางที่ 7. รหัสสารทดสอบและความเข้มข้นของ stock ที่ใช้ในการทดสอบ

ลำดับ	รหัสเชื้อราที่ใช้สกัดสาร	ความเข้มข้นของ stock (มก./มล.)
1	MA-CA-1-6	4
2	MA-CA-1-1	4
3	LY-MC-22	4
4	NP-CA3-2	4

การเตรียม stock สารละลายทดสอบ :

ละลายในเอทานอล 80% ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่าน Millipore filter 0.22 ไมครอน เก็บสารละลายตัวอย่างไว้ในที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ ยกเว้น LY-MC-22 ที่ละลายใน DMSO.

การเตรียมอาหารทดสอบ:

ผสม stock สารละลายทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 0.015 - 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.

เชื้อทดสอบ:

1. *Streptococcus pyogenes* DMST 17020.
2. *Helicobacter pylori* clinical isolates จำนวน 11 ไอโซเลต.

วิธีทดสอบ: Agar dilution assay (CLSI 2009)

การเตรียม inoculum ของ *S. pyogenes* และ *H. pylori*

1. ใช้ loop ตะแฉะเชื้อจาก frozen stocks นำมา streak บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% Columbia blood agar (สำหรับ *S. pyogenes*) และ 7% Columbia blood agar (สำหรับ *H. pylori*) บ่มในสภาวะ microaerophilic ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง.

2. จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ 2-3 โคโลนี เพาะลงใน Brucella broth 5 มิลลิลิตร (สำหรับ *S. pyogenes*) และ Brucella broth 5 มิลลิลิตร ผสมด้วย Isovitalex (สำหรับ *H. pylori*) บ่มในสภาวะ microaerophilic ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง.

3. เตรียม inoculum โดยปรับความเข้มข้นของเชื้อ Brucella broth 5 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc. Farland No. 0.5 (Biomerieux).

การทดสอบ:

1. การหาค่า MIC

ใช้ forceps ปราศจากเชื้อหีบแผ่น Millipore membrane (13 มิลลิเมตร) วางลงผิวหน้าอาหารทดสอบตามจำนวนเชื้อทดสอบที่ใช้ ใช้ปลาย forceps กดแผ่น Millipore membrane เบาๆ เพื่อให้แผ่นดังกล่าวสัมผัสกับอาหารทดสอบอย่างทั่วถึง.

หยด inoculum ลงบนผิวหน้าแผ่น Millipore membrane (1 เชื้อ/3 แผ่น) แผ่นละ 5 ไมโครลิตร นำจานอาหารทดสอบไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสม.

การอ่านผล:

เมื่อครบเวลาบ่ม บันทึกการเจริญของเชื้อในแต่ละความเข้มข้น ค่า MIC เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อบนแผ่น Millipore membrane

2. การหาค่า MBC

ใช้ forceps ปราศจากเชื้อหีบแผ่น Millipore membrane ที่ไม่มีการเจริญของเชื้อใส่ลงในหลอดที่มี Brucella broth 10 มิลลิลิตร (สำหรับ *S. pyogenes*) และ Brucella broth 10 มิลลิลิตร ผสมด้วย Isovitalax (สำหรับ *H. pylori*) จำนวน 1 แผ่น/หลอด นำหลอดทั้งหมดบ่มในสภาวะ microaerophilic ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 -48 ชั่วโมง.

การอ่านผล:

เมื่อครบเวลาบ่ม บันทึกการเจริญของเชื้อในแต่ละหลอด ความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่ไม่ทำให้เชื้อเจริญใน Brucella broth หรือ Brucella broth 10 มิลลิลิตร ผสมด้วย Isovitalax ถือเป็นค่า MBC.

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การแยกราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพร

การแยกราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ พบว่า ราเอนโดไฟต์จะเจริญออกมาจากท่อลำเลียงของพืชมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวเมื่อส่องดูภายใต้กล้องสเตอริโอ ดังแสดงในรูปที่ 16, จากนั้นทำการถ่ายสายใยไปเลี้ยงในอาหาร PDA ใหม่เลี้ยงจนได้ราเอนโดไฟต์ที่บริสุทธิ์.



รูปที่ 16. ราเอนโดไฟต์ที่เจริญออกมาจากตัวอย่างพืชที่วางลงบนอาหาร PDA อายุ 2 สัปดาห์ A: เส้นใยราเอนโดไฟต์ที่เจริญออกจากส่วนใบ.

3.1.1 ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากบัวบก จังหวัดนครปฐม และจังหวัดมหาสารคาม

ผลจากการแยกราเอนโดไฟต์จากบัวบก จังหวัดนครปฐม ได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 2 ไอโซเลต และเมื่อทำการจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับ DNA ได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 2 สายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 17 คือ 1) *Colletotrichum higginsianum* ได้แก่ ไอโซเลต NP-CA3-1 และ 2) *Stemphylium* sp. ได้แก่ ไอโซเลต NP-CA3-2 ส่วนบัวบกที่เก็บจาก จังหวัดมหาสารคาม แยกราเอนโดไฟต์ได้ 9 ไอโซเลต ดังแสดงในรูปที่ 17. เมื่อทำการจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับ DNA ได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 8 คือ 1) *Talaromyces stipitatus* ได้แก่ ไอโซเลต MK-CA1-1 2) *Nodulisporium* sp. ได้แก่ ไอโซเลต MK-CA1-2 3) *Colletotrichum gloeosporioides* ได้แก่ ไอโซเลต MK-CA1-3 4) *Thielavia terricola* ได้แก่ ไอโซเลต MK-CA1-6 5) *Colletotrichum acutatum* ได้แก่ ไอโซเลต MK-CA-1 6) *Xylaria feejeensis* ได้แก่ ไอโซเลต MK-CA-2 7) *Nigrospora sphaerica* ได้แก่ ไอโซเลต MK-CA-3 และ MK-CA-7 8) *Nigrospora* sp. ได้แก่ ไอโซเลต MK-CA-5.



รูปที่ 17. ตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากบัวบก ที่เก็บตัวอย่างจาก จังหวัดนครปฐม และจังหวัดมหาสารคาม.



รูปที่ 17. (ต่อ)

ตารางที่ 8. ชื่อ, รหัสตัวอย่าง, primer ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับเบส, ผลจาก Blast N จำแนกสายพันธุ์ราในแต่ละตัวอย่าง และเปอร์เซ็นต์ Identity ของตัวอย่างราเอนโดไฟต์จากบัวบก

Name	Primer name	Blast N Result	Identify
NP-CA3-1	ITS1-F	<i>Colletotrichum higginsianum</i>	99%
NP-CA3-2	ITS1-F	<i>Stemphylium</i> sp.	99%
MK-CA1-1	ITS1-F	<i>Talaromyces stipitatus</i>	99%
MK-CA1-2	ITS1-F	<i>Nodulisporium</i> sp.	98%
MK-CA1-3	ITS1-F	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%
MK-CA1-6	ITS1-F	<i>Thielavia terricola</i>	99%
MK-CA-1	ITS4-R	<i>Colletotrichum acutatum</i>	99%
MK-CA-2	ITS1-F	<i>Xylaria feejeensis</i>	99%
MK-CA-3	ITS1-F	<i>Nigrospora sphaerica</i>	99%
MK-CA-5	ITS1-F	<i>Nigrospora</i> sp.	99%
MK-CA-7	ITS4-R	<i>Nigrospora sphaerica</i>	99%

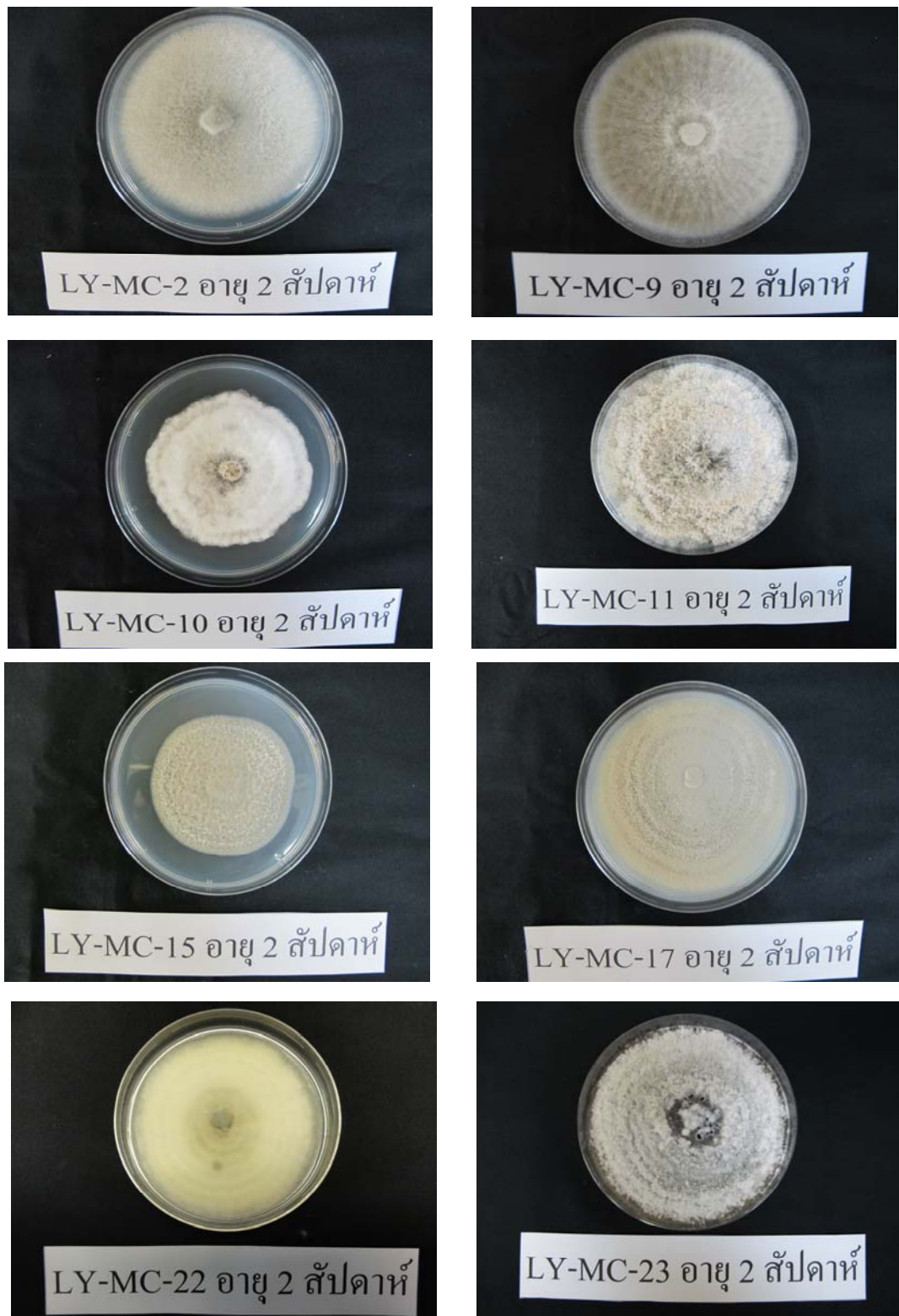
หมายเหตุ: NP หมายถึง จังหวัดนครปฐม

MK หมายถึง จังหวัดมหาสารคาม

CA หมายถึง *Centella asiatica* (L.) Urban. (ชื่อวิทยาศาสตร์ของบัวบก)

3.1.2 ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากยอ จังหวัดเลย

ผลจากการแยกราเอนโดไฟต์จากยอได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 11 ไอโซเลต และเมื่อทำการจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับ DNA ได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 18 และตารางที่ 9 คือ 1) *Colletotrichum acutatum* ได้แก่ ไอโซเลต LY-MC-22 2) *Colletotrichum gloeosporioides* ได้แก่ ไอโซเลต LY-MC-2, LY-MC-12, LY-MC-16 และ LY-MC-21 3) *Fusarium* sp. ได้แก่ ไอโซเลต LY-MC-9 4) *Pestalotiopsis* sp. ได้แก่ ไอโซเลต LY-MC-10 5) *Phomopsis asparagi* ได้แก่ ไอโซเลต LY-MC-11 6) *Altemaria* sp. ได้แก่ ไอโซเลต LY-MC-15 7) *Letendreaa helminthicola* ได้แก่ ไอโซเลต LY-MC-17 8) *Sordariomycetes* sp. ได้แก่ ไอโซเลต LY-MC-23.



รูปที่ 18. ตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากยอ ที่เก็บตัวอย่างจาก จังหวัดเลย.

ตารางที่ 9. ชื่อ, รหัสตัวอย่าง, primer ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับเบส, ผลจาก Blast N จำแนกสายพันธุ์ราในแต่ละตัวอย่าง และเปอร์เซ็นต์ Identity ของตัวอย่างราเอนโดไฟต์จากยอ

Name	Primer name	Blast N Result	Identify
LY-MC-2	ITS1-F	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%
LY-MC-9	ITS1-F	<i>Fusarium</i> sp.	99%
LY-MC-10	ITS1-F	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	99%
LY-MC-11	ITS1-F	<i>Phomopsis asparagi</i>	99%
LY-MC-12	ITS1-F	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98%
LY-MC-15	ITS1-F	<i>Alternaria</i> sp.	99%
LY-MC-16	ITS1-F	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%
LY-MC-17	ITS1-F	<i>Letendreaa helminthicola</i>	99%
LY-MC-21	ITS1-F	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%
LY-MC-22	ITS1-F	<i>Colletotrichum acutatum</i>	99%
LY-MC-23	ITS1-F	<i>Sordariomyces</i> sp.	98%

หมายเหตุ: LY หมายถึง จังหวัดเลย

MC หมายถึง *Morinda citrifolia* L. (ชื่อวิทยาศาสตร์ของยอ)

3.1.3 ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากสะเดา จังหวัดเลย

ผลจากการแยกราเอนโดไฟต์จากสะเดาได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 13 ไอโซเลต และเมื่อทำการจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับ DNA ได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 19 และตารางที่ 10 คือ 1) *Colletotrichum gloeosporioides* ได้แก่ ไอโซเลต LY-AI-1, LY-AI-7, LY-AI-8, LY-AI-11 และ LY-AI-13 2) *Phomopsis* sp. ได้แก่ ไอโซเลต LY-AI-5 และ LY-AI-15 3) *Diaporthe phaseolorum* ได้แก่ ไอโซเลต LY-AI-2 4) *Nigrospora sphaerica* ได้แก่ ไอโซเลต LY-AI-3 5) *Xylaria badia* ได้แก่ ไอโซเลต LY-AI-6 6) *Corynespora cassicola* ได้แก่ ไอโซเลต LY-AI-9 7) *Coniothyrium aleuritis* ได้แก่ ไอโซเลต LY-AI-14 8) *Colletotrichum boninense* ได้แก่ ไอโซเลต LY-AI-17.



รูปที่ 19. ตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากสะเดา ที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดเลย.

ตารางที่ 10. ชื่อ, รหัสตัวอย่าง, primer ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับเบส, ผลจาก Blast N จำแนกสายพันธุ์ราในแต่ละตัวอย่าง และเปอร์เซ็นต์ Identity ของตัวอย่างราเอนโดไฟต์จากสะเดา

Name	Primer name	Blast N Result	Identify
LY-AI-1	ITS1-F	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%
LY-AI-2	ITS1-F	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	99%
LY-AI-3	ITS1-F	<i>Nigrospora sphaerica</i>	99%
LY-AI-5	ITS1-F	<i>Phomopsis sp.</i>	99%
LY-AI-6	ITS1-F	<i>Xylaria badia</i>	96%
LY-AI-7	ITS1-F	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%
LY-AI-8	ITS1-F	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%
LY-AI-9	ITS1-F	<i>Corynespora cassicola</i>	99%
LY-AI-11	ITS1-F	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98%
LY-AI-13	ITS1-F	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%
LY-AI-14	ITS1-F	<i>Coniothyrium aleuritis</i>	93%
LY-AI-15	ITS1-F	<i>Phomopsis sp.</i>	99%
LY-MC-23	ITS1-F	<i>Sordariomycetes sp.</i>	98%

หมายเหตุ: LY หมายถึง จังหวัดเลย

AI หมายถึง *Azadirachta indica* A. Juss. var. *siamensis* Valetton (ชื่อวิทยาศาสตร์ของสะเดา)

3.2 การคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชขั้นต้น

3.2.1 การสกัดสารจากเชื้อราเอนโดไฟต์

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการสกัดสารจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมด โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDB ตัวอย่างละ 600 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 สัปดาห์ จากนั้นกรองแยกส่วนเส้นใยและอาหารเลี้ยงเชื้อ นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอสีเตต อัตราส่วน 1:2 ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง evaporation และ freeze dry จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 11 แล้วส่งทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา.

ตารางที่ 11. สารสกัดหยาบจากเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ได้เลี้ยงในอาหารเหลว PDB (ปริมาตร 600 มิลลิลิตร) สกัดด้วยตัวทำละลาย EtOAc

ลำดับ	เชื้อรา	นน. แห้ง (มิลลิกรัม)	% yeild	มิลลิกรัม/ลิตร
1	LY-AI-1	26.52	4.42	44.2
2	LY-AI-2	47.2	7.87	78.67
3	LY-AI-3	27.3	4.55	45.5
4	LY-AI-5	66.75	11.13	111.3
5	LY-AI-6	174.21	29.04	290.4
6	LY-AI-7	33.68	5.61	56.1
7	LY-AI-8	31.25	5.08	50.8

ตารางที่ 11. (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อรา	นน.แห้ง (มิลลิกรัม)	% yeild	มิลลิกรัม/ลิตร
8	LY-AI-9	63.69	10.62	106.2
9	LY-AI-11	59.74	9.97	99.7
10	LY-AI-13	47.73	7.96	79.6
11	LY-AI-14	32.35	5.39	53.9
12	LY-AI-15	51.31	8.55	85.5
13	LY-AI-17	55.38	9.23	92.3
14	LY-MC-2	24.1	4.02	40.2
15	LY-MC-9	30.26	5.04	50.4
16	LY-MC-10	73.96	12.33	123.3
17	LY-MC-11	409.91	68.32	683.2
18	LY-MC-12	37.1	6.18	61.8
19	LY-MC-14	53.09	8.85	88.5
20	LY-MC-15	40.42	6.74	67.4
21	LY-MC-16	56.38	9.40	94.0
22	LY-MC-17	79.9	13.32	133.2
23	LY-MC-21	36.28	6.05	60.5
24	LY-MC-22	37.53	6.26	62.6
25	LY-MC-23	49.73	8.29	82.9
26	MK-CA-1	115.72	19.29	192.9
27	MK-CA-2	257.16	42.86	428.6
28	MK-CA-3	34.74	5.79	57.9
29	MK-CA-5	38.72	6.45	64.5
30	MK-CA7	69.03	11.51	115.1
31	MK-CA1-1	602.43	100.41	1004.1
32	MK-CA1-2	672.77	112.13	1121.3
33	MK-CA1-3	46.97	7.83	78.3
34	MK-CA1-6	38.64	6.44	64.4
35	NP-CA3-1	59.54	9.92	99.2
36	NP-CA3-2	148.09	24.68	246.8

หมายเหตุ: LY : จังหวัดเลย

MK: จังหวัดมหาสารคาม

N: จังหวัดนครปฐม

AI: แยกจากสะเดา

CA: แยกจากบัวบก

MC: แยกจากยอ

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide (O_2^{\bullet}) ของตัวอย่างสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่ศึกษาจำนวน 18 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Photochemiluminescence ด้วยเครื่อง Photochem[®] สรุปได้ ดังนี้:

สารต้านอนุมูลอิสระ ในกลุ่มที่เป็น Water soluble compound (ACW)

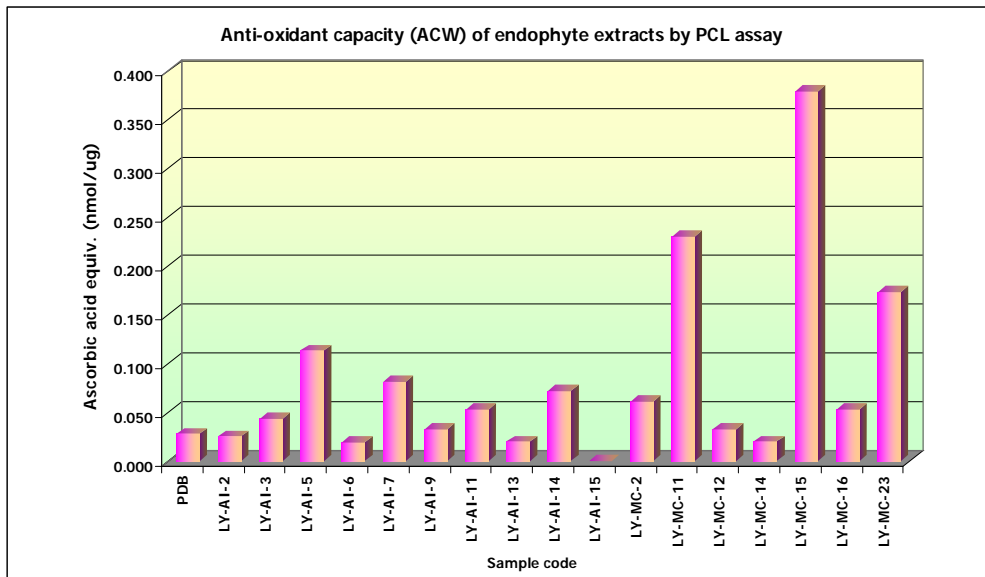
- ทั้ง 17 ตัวอย่าง ของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลในกลุ่มสารที่เป็น polar compound ซึ่งเป็นสารที่ละลายได้ในน้ำ.
- ตัวอย่าง LY-AI-15 ไม่สามารถวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ (ฤทธิ์ต่ำมาก).
- ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ละลายน้ำและที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (superoxide anion) สูงสุดที่น่าสนใจ 3 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 12 คือ LY-MC-15 > LY-MC-11 > LY-MC-23 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับ vitamin C (ascorbic acid equivalent) จากมากไปน้อยเท่ากับ 0.3792, 0.2309 และ 0.1734 นาโนโมล/ไมโครกรัม ตามลำดับ, ดังแสดงในรูปที่ 20.

สารต้านอนุมูลอิสระ ในกลุ่มที่เป็น Lipid soluble compound (ACL)

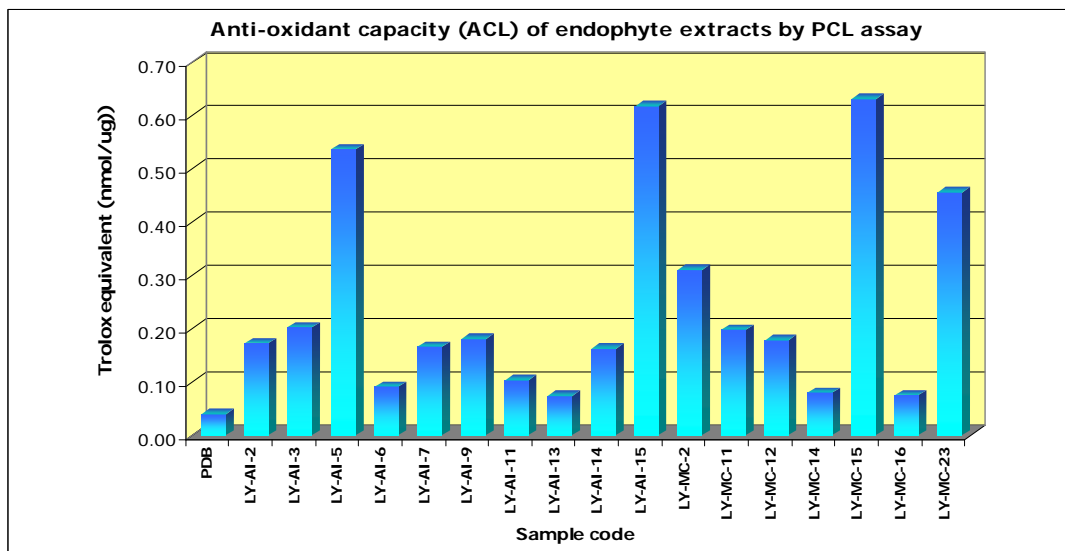
- ทั้ง 18 ตัวอย่าง ของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลในกลุ่มสารที่เป็น non-polar compound ซึ่งเป็นสารที่ละลายได้ในไขมัน.
- ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ละลายน้ำและที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (superoxide anion) สูงสุดที่น่าสนใจ 4 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 11 คือ LY-MC-15 > LY-AI-15 > LY-AI-5 > LY-MC-23 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับ vitamin E (Trolox equivalent) จากมากไปน้อยเท่ากับ 0.6316, 0.6168, 0.5364 และ 0.4561 นาโนโมล/ไมโครกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 21.

ตารางที่ 12. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (capacity against superoxide radicals) ของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ ด้วยวิธี Photochemiluminescence (PCL)

No.	Sample code	Anti-oxidant capacity of water soluble compound (ACW) Ascorbic acid equivalent (nmol/ μ g)	Anti-oxidant capacity of water lipid compound (ACL) Trolox equivalent (nmol/ μ g)
1	PDB	0.0279	0.0391
2	LY-AI-2	0.0254	0.1724
3	LY-AI-3	0.0434	0.2026
4	LY-AI-5	0.1134	0.5364
5	LY-AI-6	0.0192	0.0910
6	LY-AI-7	0.0813	0.1657
7	LY-AI-9	0.0323	0.1811
8	LY-AI-11	0.0534	0.1033
9	LY-AI-13	0.0198	0.0737
10	LY-AI-14	0.0719	0.1619
11	LY-AI-15	0.0000	0.6168
12	LY-MC-2	0.0615	0.3104
13	LY-MC-11	0.2309	0.1979
14	LY-MC-12	0.0323	0.1784
15	LY-MC-14	0.0197	0.0790
16	LY-MC-15	0.3792	0.6316
17	LY-MC-16	0.0533	0.0749
18	LY-MC-23	0.1734	0.4561



รูปที่ 20. กราฟแสดงผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion (O_2^-) ของสารสกัดเหยาบราเอนโดไฟต์ (ละลายในเอทานอล 80%) ด้วยวิธี hotochemiluminescence (PCL) ในระบบ ACW.



รูปที่ 21. กราฟแสดงผลการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion (O_2^-) ของสารสกัดเหยาบราเอนโดไฟต์ (ละลายในเอทานอล 80%) ด้วยวิธี otochemiluminescence (PCL) ในระบบ ACL.

เมื่อพิจารณาผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการวัดทั้ง 2 ระบบ คือ ACW และ ACL บ่งชี้ว่าตัวอย่างสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่ออกฤทธิ์สูงในทั้ง 2 ระบบ คือ ตัวอย่าง LY-MC-15 และ LY-MC-23 โดย ตัวอย่าง LY-MC-15 มีฤทธิ์สูงกว่า LY-MC-23 ประมาณ 2-3 เท่า แต่ตัวอย่าง LY-MC-15 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ (TK6 human lymphoblast cells) สูงกว่า LY-MC-23 โดยมีค่า IC_{50} (ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 85.62 และ 218.99 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ.

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Cytotoxicity activity)

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ จำนวน 36 ตัวอย่าง โดยทดสอบกับเซลล์ 3 ชนิด คือ เซลล์ปกติ 1 ชนิด คือ L929 fibroblast และเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco₂) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ดังผลแสดงเป็นค่า IC_{50} (inhibitory concentration) ซึ่งหมายถึงระดับความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัด Endophytes ที่มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเซลล์ที่ใช้ หากตัวอย่างทดสอบใดมีค่า IC_{50} ต่ำกว่า แสดงว่าตัวอย่างทดสอบนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง คือ สามารถฆ่าเซลล์ได้เพียงใช้ปริมาณเล็กน้อย.

ผลจากค่า IC_{50} ของตัวอย่างสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 13. ข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างที่น่าสนใจในการนำไปใช้ประโยชน์ มี 3 ตัวอย่าง เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่มีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ปกติ แต่มีพิษสูงต่อเซลล์มะเร็ง ทั้ง 3 ตัวอย่าง ดังกล่าว ได้แก่:

- ตัวอย่างที่ 7 (LY-AI-9).
- ตัวอย่างที่ 16 (LY-MC-15).
- ตัวอย่างที่ 18 (LY-MC-23).
- พบว่าสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด คือ LY-MC-15 และ LY-MC-23.

ตารางที่ 13. เปรียบเทียบผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (L929 fibroblasts), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco₂) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ (ละลายในเอทานอล 80%)

No.	Sample code	Conc. of stock solution (mg/ml)	IC ₅₀ [mg/ml] (24 h treatment time)		
			L929	Caco ₂	HeLa
1	PDB	13.0	0.08525	0.1552	0.9049
2	LY-AI-1	62.02	728.94	> 886.00	467.57
3	LY-AI-2	28.1	0.11920	1.0537	0.3691
4	LY-AI-3	23.1	0.15800	0.5761	0.3358
5	LY-AI-5	49.73	0.75150	0.9410	1.6453
6	LY-AI-6	129.0	0.12347	0.2934	0.3036
7	LY-AI-7	14.1	0.09645	0.1951	0.1909
8	LY-AI-9	31.5	0.21170	0.1005	0.1089
9	LY-AI-11	10.3	0.09476	0.2530	0.1533
10	LY-AI-13	28.5	0.30342	0.5477	0.5159
11	LY-AI-14	26.2	0.12467	0.1870	0.2018
12	LY-AI-15	32.6	0.39246	0.9869	0.8098
13	LY-AI-17	61.38	> 876.86	> 876.86	731.26
14	LY-MC-2	88.0	0.05384	0.7908	0.1548
15	LY-MC-9	34.24	103.87	335.94	203.61
16	LY-MC-10	76.66	62.47	462.48	655.50
17	LY-MC-11	31.3	0.04544	0.0743	0.1722
18	LY-MC-12	12.2	0.09016	0.1154	0.0748
19	LY-MC-14	12.2	0.01450	0.0497	0.0203

ตารางที่ 13. (ต่อ)

No.	Sample code	Conc. of stock solution (mg/ml)	IC ₅₀ [mg/ml] (24 h treatment time)		
			L929	Caco ₂	HeLa
20	LY-MC-15	21.3	0.08562	0.0306	0.1252
21	LY-MC-16	18.6	0.14230	0.9266	0.3111
22	LY-MC-17	79.60	312.89	362.40	646.46
23	LY-MC-21	50.49	458.13	> 721.29	605.02
24	LY-MC-22	44.70	277.34	435.93	365.39
25	LY-MC-23	28.3	0.21899	0.1586	0.6881
26	MK-CA-1	98.60	273.00	417.48	397.74
27	MK-CA-2	159.68	198.75	304.11	183.46
28	MK-CA-3	60.82	> 868.86	> 868.86	641.50
29	MK-CA-5	62.58	> 894.00	> 894.00	699.45
30	MK-CA-7	56.64	440.08	723.71	484.14
31	MK-CA1-1	67.89	141.38	899.44	553.11
32	MK-CA1-2	195.40	368.15	925.91	665.18
33	MK-CA1-3	105.79	725.00	1605.23	697.58
34	MK-CA1-6	93.37	25.46	51.96	< 23.34
35	NP-CA3-1	57.56	675.35	> 822.29	> 822.29
36	NP-CA3-2	50.63	19.31	4.74	29.90

หมายเหตุ: L929 = Mouse fibroblast cells (เซลล์ปกติ)
 Caco₂ = Human colon carcinoma cells (เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่)
 HeLa = Human cervical caecinoma cells (เซลล์มะเร็งปากมดลูก)

3.2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

พบว่า มีสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์เพียง 15 ตัวอย่าง ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 14-15 แบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม คือ:

1. สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อได้ 1 ชนิด ได้แก่ LY-AI-6, LY-AI-9 และ LY-MC-17.
2. สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อได้ 2 ชนิด ได้แก่ LY-AI-14, MK-CA-1 และ MK-CA-2.
3. สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อได้ 3 ชนิด ได้แก่ LY-MC-9, LY-MC-11, MK-CA1-2, MK-CA1-6 และ MK-CA3-2.
4. สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อได้ 4 ชนิด ได้แก่ LY-MC-14, LY-MC-15.
5. สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อได้ 5-8 ชนิด ได้แก่ LY-MC-22 และ MK-CA1-1.

มีแนวโน้มว่า สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ของใบบัวบกสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ของสะเดา และยอ.

เมื่อเปรียบเทียบขนาดของ inhibition zone และจำนวนสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง พบว่า *S. pyogenes* DMST 17020 เป็นเชื้อที่ไวต่อการถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์มากกว่าเชื้อชนิดอื่น.

ตารางที่ 14. ขนาด inhibition zones ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ ต่อเชื้อทดสอบ ชนิดต่างๆ

รหัส	ขนาด inhibition zone (มิลลิเมตร)											
	Sa	Pa	Ec	Sp	Bc	ST	SE	PT30	PT32	Ca	Tm	Tr
LY-AI-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-AI-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-AI-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-AI-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-AI-6	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-AI-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-AI-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-AI-9	0	0	0	22	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-AI-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-AI-13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-AI-14	25	20R	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0
LY-AI-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-AI-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-MC-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-MC-9	12	13	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0
LY-MC-10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-MC-11	17	12	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0
LY-MC-12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 14. (ต่อ)

รหัส	ขนาด inhibition zone (มิลลิเมตร)											
	Sa	Pa	Ec	Sp	Bc	ST	SE	PT30	PT32	Ca	Tm	Tr
LY-MC-14	0	11	0	0	11	0	0	12	15	0	0	0
LY-MC-15	20	24	0	0	20	25	0	0	0	0	0	0
LY-MC-16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-MC-17	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-MC-21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LY-MC-22	20	13	0	20	17	0	0	19	15	12	0	0
LY-MC-23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MK-CA-1	0	0	0	12	12	0	0	0	0	0	0	0
MK-CA-2	0	0	0	17	12	0	0	0	0	0	0	0
MK-CA-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MK-CA-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MK-CA-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MK-CA1-1	22	14	11	21	0	0	13	12	14	14	0	0
MK-CA1-2	17	11	0	23	13	0	0	0	0	0	0	0
MK-CA1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MK-CA1-6	14	12	0	18	12	0	0	0	0	0	0	0
MK-CA3-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MK-CA3-2	20	18	0	24	14	0	0	0	0	0	0	0
PDB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ampicillin	48	30	22	42	13	25	24	32	28	ND	ND	ND
Tetracyclin	28	30	27	19	25	25	25	36	28	ND	ND	ND
Vancomycin	17	20	0	21	15	0	0	24	18	ND	ND	ND
80% ETOH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ: Sa = *S. aureus* ATCC 6538; Pa = *P. aeruginosa* ATCC 27853; Ec = *E. coli* ATCC 25922; Sp = *S. pyogenes* DMST 17020;
 Bc = *B. cereus*; ST = *S. Typhimurium* ATCC 13311; SE = *S. Enteritidis* DMST 15676; PT 30 = *H. pylori* PT 30;
 PT32 = *H. pylori* PT 32; Ca = *C. albicans* ATCC 10231; Tm = *T. mentagrophytes* และ Tr = *T. rubrum*

ตารางที่ 15. สารสกัดยับยั้งจากราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบ

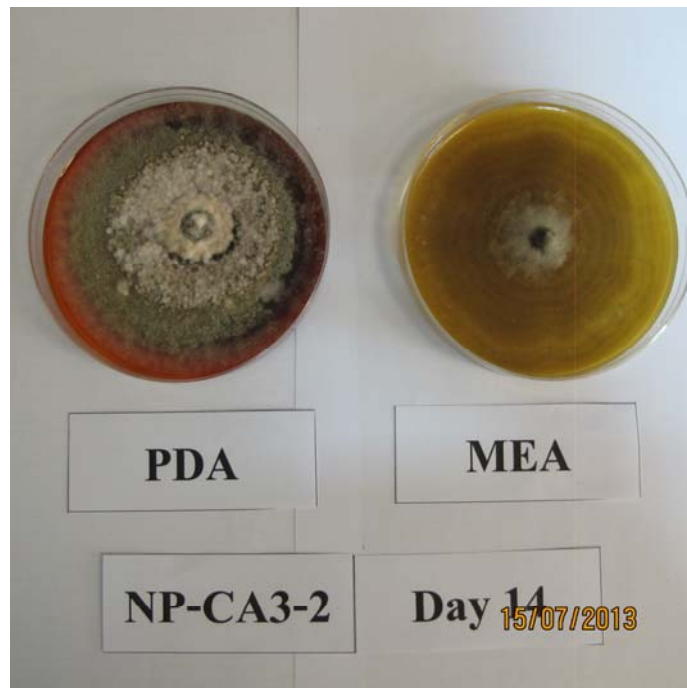
รหัส	ขนาด inhibition zone (มิลลิเมตร)									
	Sa	Pa	Ec	Sp	Bc	ST	SE	PT30	PT32	Ca
LY-AI-6				13						
LY-AI-9				22						
LY-AI-14	25	20R								21
LY-MC-9	12	13			13					
LY-MC-11	17	12			14					
LY-MC-14		11			11			12	15	
LY-MC-15	20	24			20	25				
LY-MC-17				12						
LY-MC-22	20	13		20	17			19	15	12
MK-CA-1				12	12					
MK-CA-2				17	12					
MK-CA1-1	22	14	11	21			13	13	12	14
MK-CA1-2	17	11		23	13					
MK-CA1-6	14	12		18	12					
MK-CA3-2	20	18		24	14					

หมายเหตุ: Sa = *S. aureus* ATCC 6538; Pa = *P. aeruginosa* ATCC 27853; Ec = *E. coli* ATCC 25922; Sp = *S. pyogenes* DMST 17020; Bc = *B. cereus*; ST = *S. Typhimurium* ATCC 13311; SE = *S. Enteritidis* DMST 15676; PT 30 = *H. pylori* PT 30; PT32 = *H. pylori* PT 32; และ Ca = *C. albicans* ATCC 10231

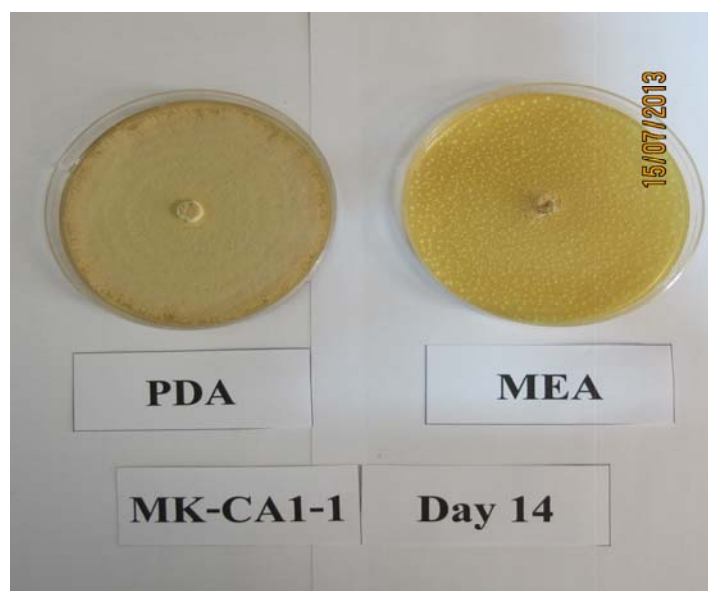
3.3 การเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางเภสัชของราเอนโดไฟต์

3.3.1 การเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางเภสัชของราเอนโดไฟต์

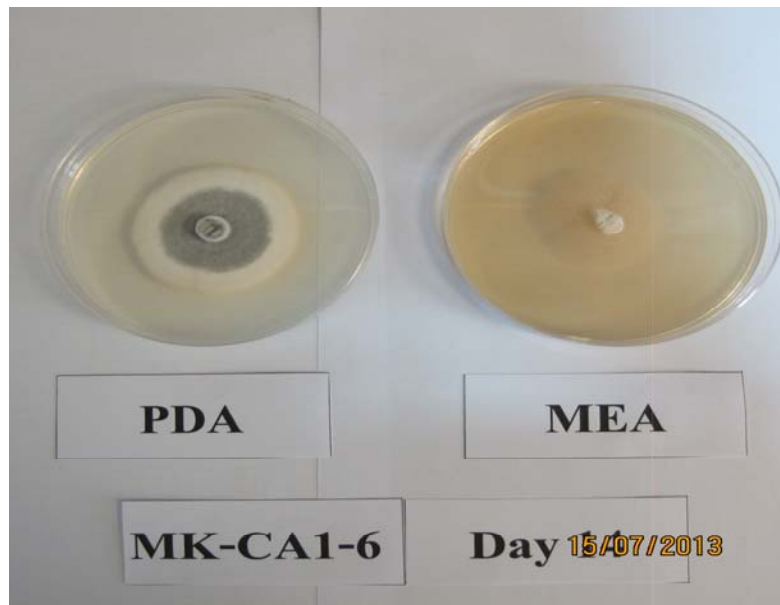
จากผลการทดลองดังที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้คัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด 4 ไอโซเลต คือ NP-CA3-2, MK-CA1-1, MK-CA1-6 และ LY-MC-22 จากนั้นนำร่าทั้ง 4 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA และ MEA พบว่า ราเอนโดไฟต์จะเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร PDA ดังแสดงในรูปที่ 22-25.



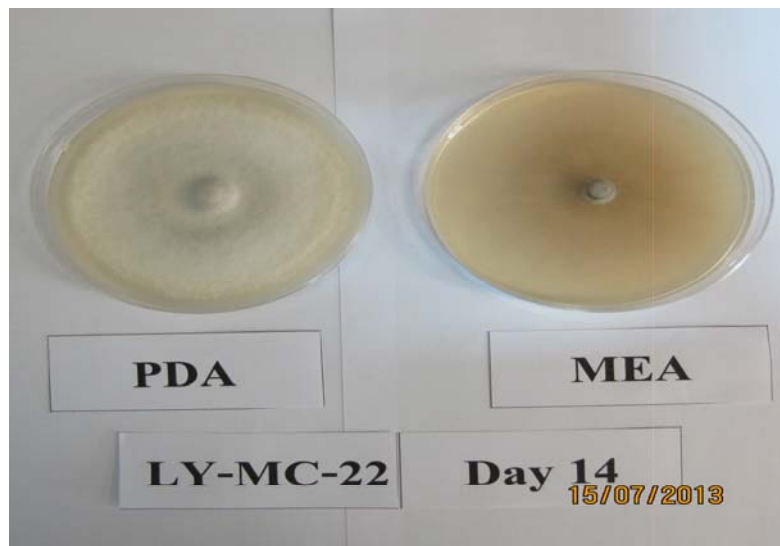
รูปที่ 22. เชื้อราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA และ MEA ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 14 วัน.



รูปที่ 23. เชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA และ MEA ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 14 วัน.



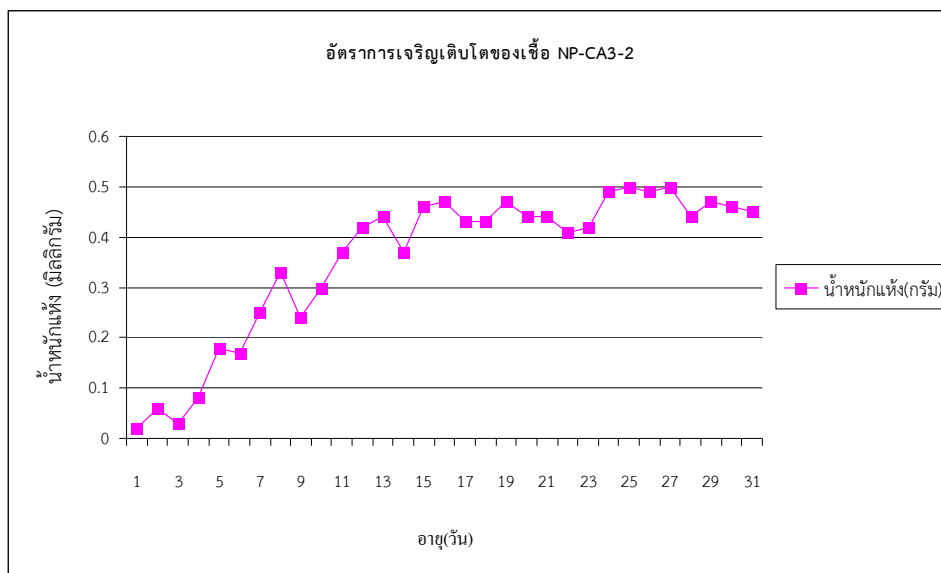
รูปที่ 24. เชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA และ MEA ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 14 วัน.



รูปที่ 25. เชื้อราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA และ MEA ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 14 วัน.

3.3.2 การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางเภสัชของราเอนโดไฟต์

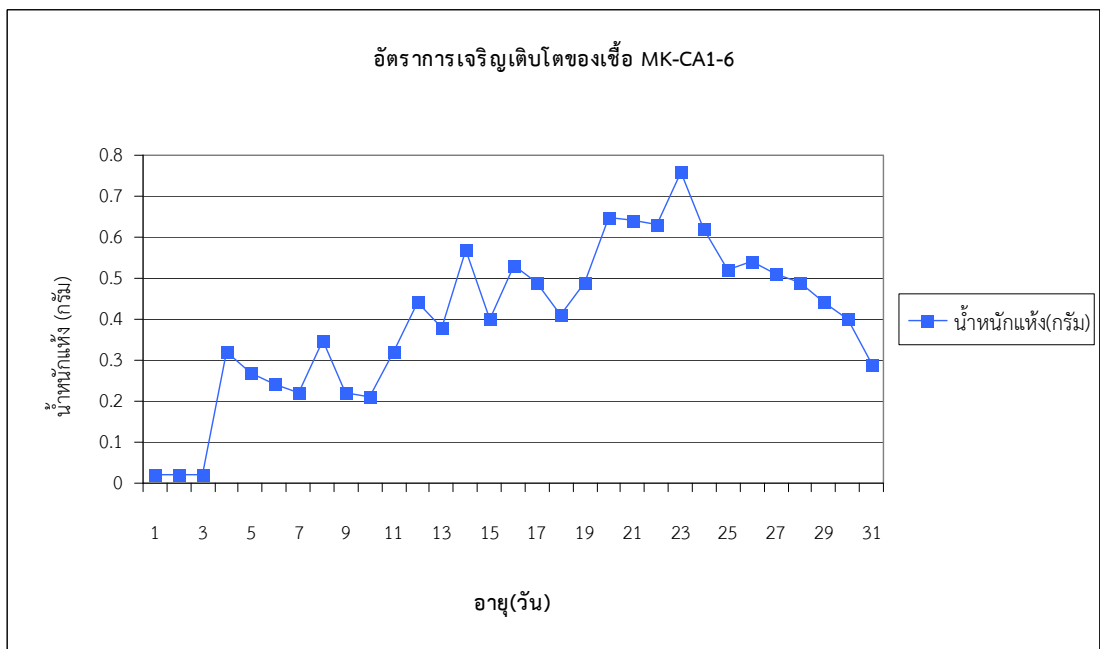
เมื่อนำราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลต มาศึกษาอัตราการเจริญเติบโต โดยชั่งน้ำหนักแห้งของเส้นใยรากทุกวัน ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ พบว่า รา NP-CA3-2 ช่วงวันแรกถึงวันที่ 13 ราเอนโดไฟต์มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่หลังจากวันที่ 14 ถึงวันที่ 30 ราเอนโดไฟต์จะมีอัตราการเจริญเติบโตคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 26. รา MK-CA1-1 ช่วงวันแรกถึงวันที่ 9 ราเอนโดไฟต์มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่หลังจากวันที่ 9 ถึงวันที่ 17 ราเอนโดไฟต์จะมีอัตราการเจริญเติบโตคงที่ และหลังจากวันที่ 17 ราเอนโดไฟต์จะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง ดังแสดงในรูปที่ 27. รา MK-CA1-6 ช่วงวันแรกถึงวันที่ 3 ราเอนโดไฟต์มีอัตราการเจริญเติบโตคงที่ แต่หลังจากวันที่ 4 ราเอนโดไฟต์จะมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นแต่ไม่คงที่ และหลังจากวันที่ 26 ราเอนโดไฟต์จะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง ดังแสดงในรูปที่ 28 และราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 ช่วงวันแรกถึงวันที่ 3 ราเอนโดไฟต์มีอัตราการเจริญเติบโตคงที่ แต่หลังจากวันที่ 4 ราเอนโดไฟต์จะมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นแต่ไม่คงที่ และหลังจากวันที่ 26 ราเอนโดไฟต์จะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง ดังแสดงในรูปที่ 29.



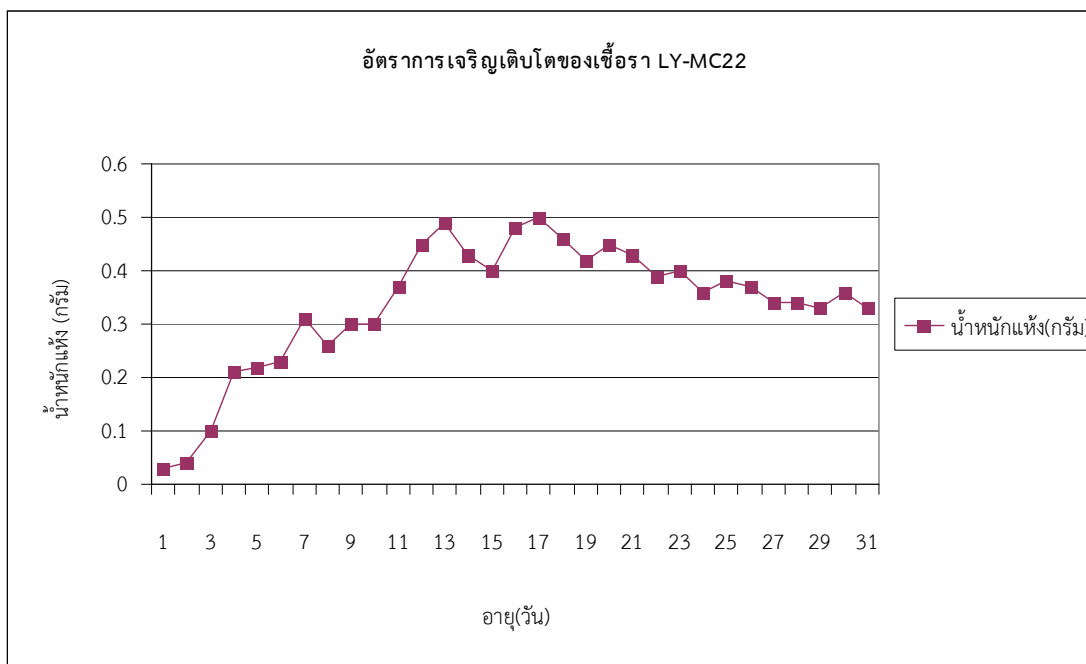
รูปที่ 26. อัตราการผลิตของเชื้อราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน.



รูปที่ 27. อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน.



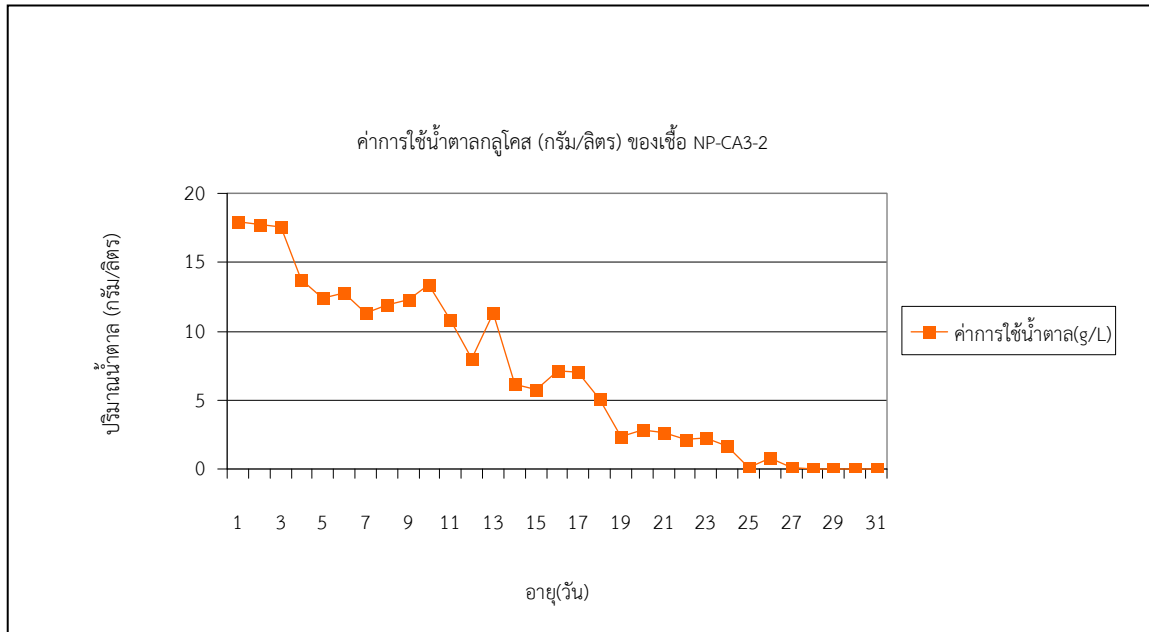
รูปที่ 28. อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน.



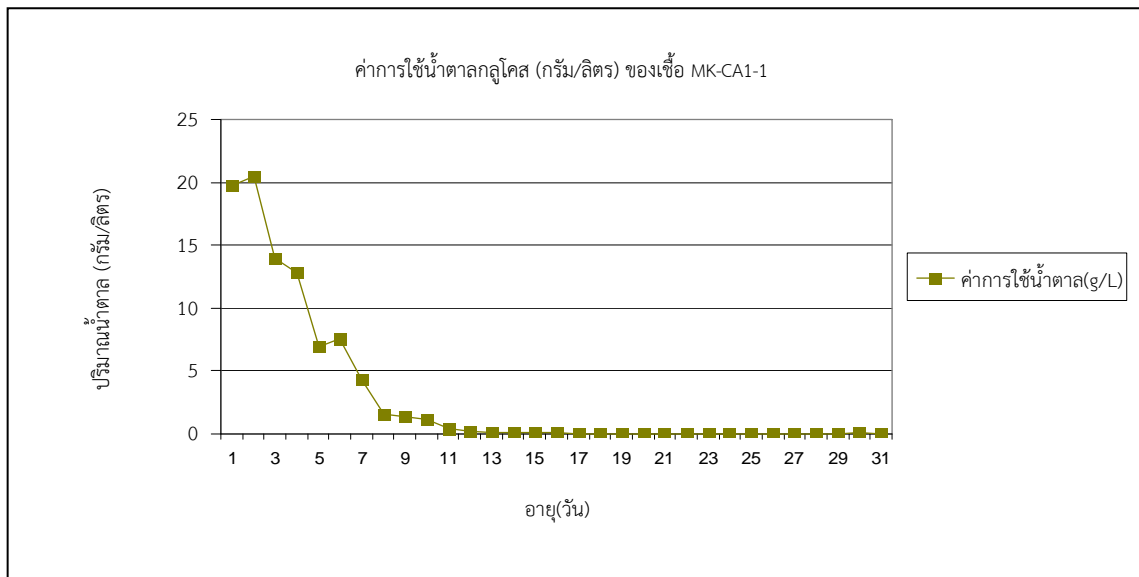
รูปที่ 29. อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน.

3.3.3 การศึกษาการใช้น้ำตาลกลูโคสของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือก

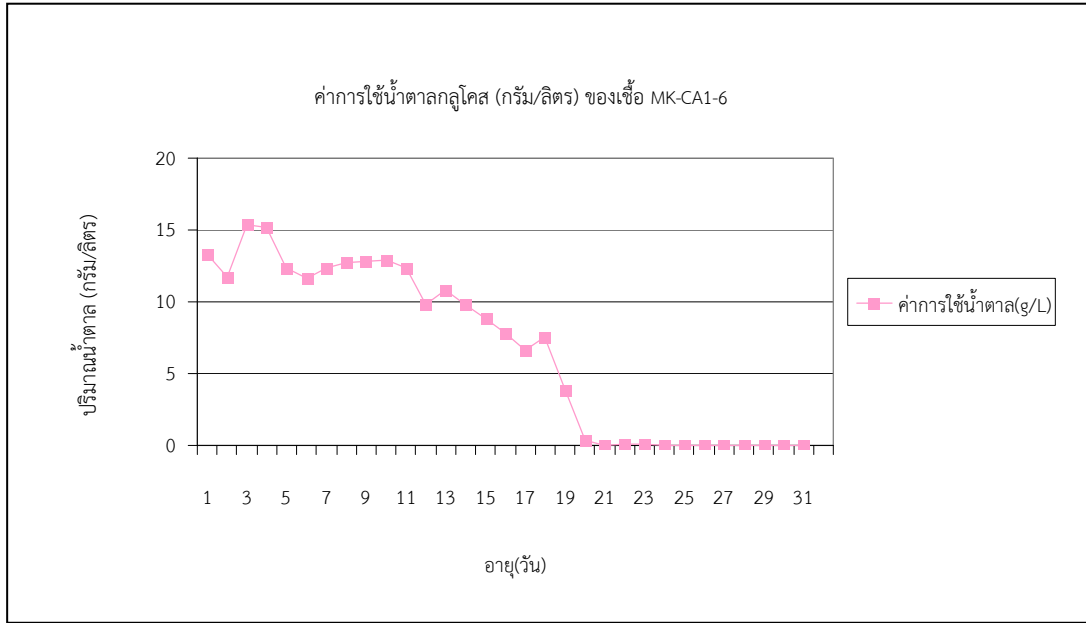
ผลการทดลองจากการวัดค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสของราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลต ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB โดยทำการวัดตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ซึ่งใช้วิธีการวัดแบบ Biochemistry analyzer โดยเครื่อง YSI พบว่า ราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 มีค่าการใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 หลังจากนั้นปริมาณการใช้น้ำตาลของเชื้อราจะลดลง จนถึงวันที่ 25 ปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงหมด ดังแสดงในรูปที่ 30 ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 และ LY-MC-22 มีการเจริญเติบโตเร็วมาก โดยปริมาณการใช้น้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ถึง วันที่ 9 และหลังจากวันที่ 9 ปริมาณน้ำตาลลดลงจนหมด ดังแสดงในรูปที่ 31 และ 33. ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 มีการเจริญเติบโตช้ากว่าราเอนโดไฟต์ไอโซเลตอื่น ดูได้จากค่าปริมาณการใช้น้ำตาลลดลงอย่างช้าในวันที่ 1 ถึง วันที่ 20 และหลังจากวันที่ 20 ปริมาณน้ำตาลถึงลดลงจนหมด ดังแสดงในรูปที่ 32.



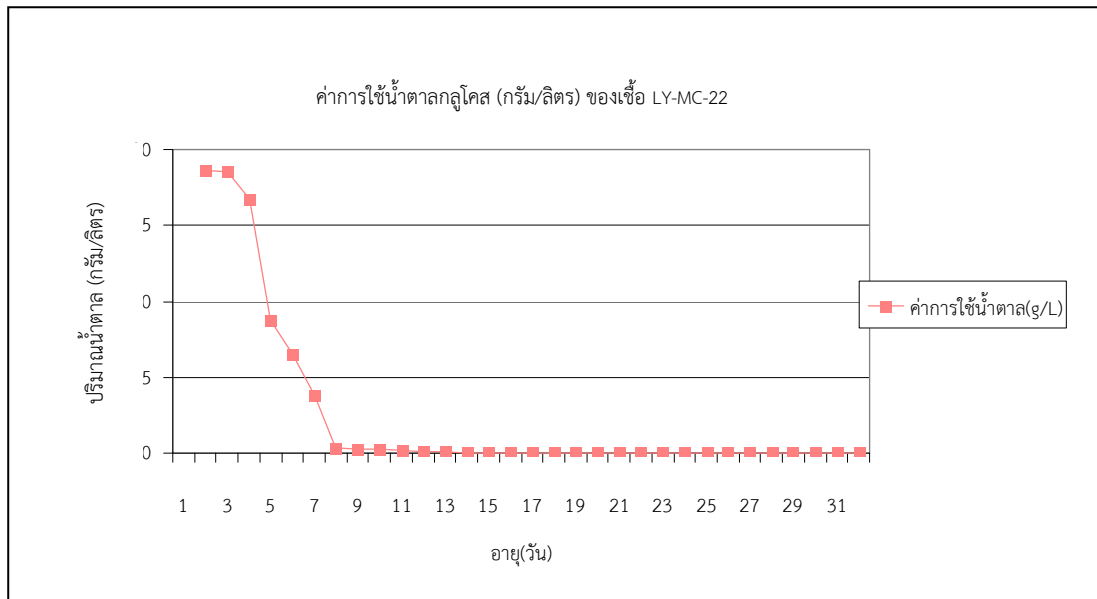
รูปที่ 30. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปของเชื้อราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน.



รูปที่ 31. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปของเชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน.



รูปที่ 32. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปของเชื้อราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน.



รูปที่ 33. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปของเชื้อราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน.

3.4 การศึกษาวิธีเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางเภสัชของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือก

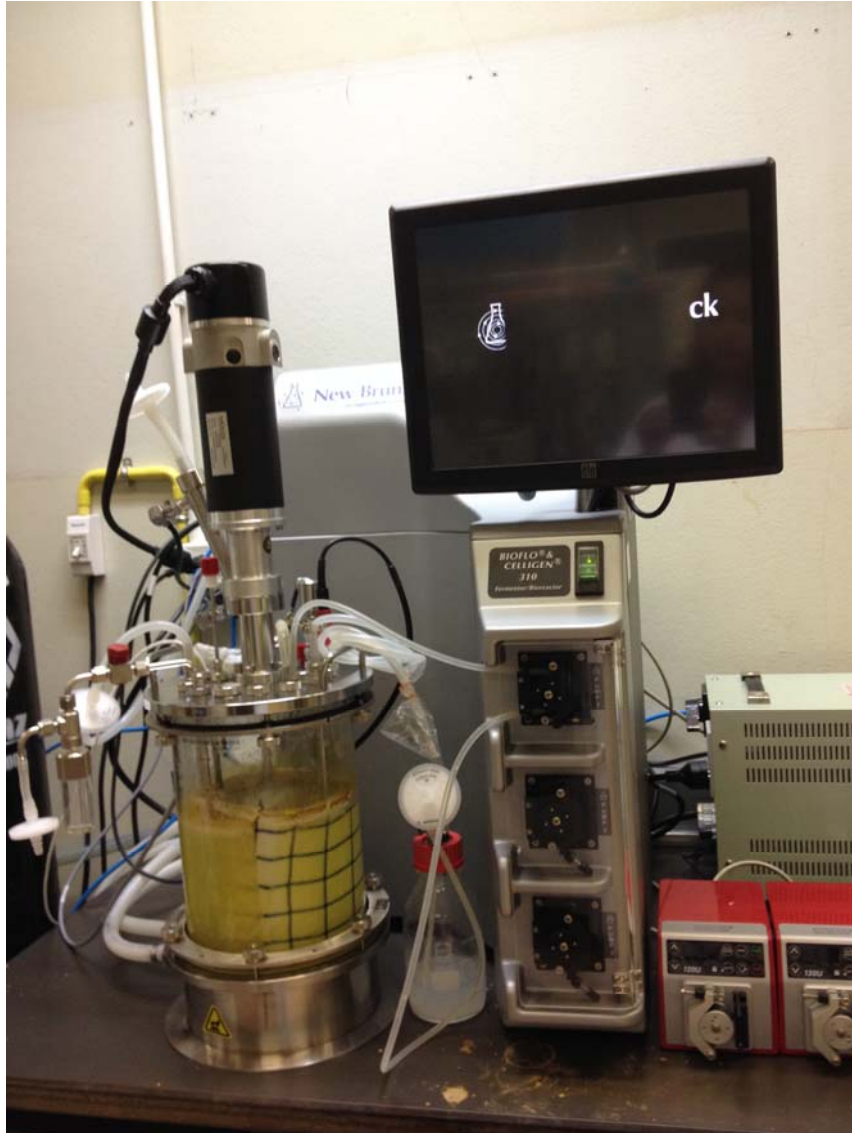
จากผลการทดลองข้างต้นดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ได้นำราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลต มาเลี้ยงในสภาวะที่ต่างกัน วางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ดังแสดงในรูปที่ 34 เลี้ยงใน Incubation shaker ดังแสดงในรูปที่ 35 และเลี้ยงใน Fermenter ดังแสดงในรูปที่ 36. เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางเภสัชให้ได้สารสกัดหยาบมากที่สุด พบว่า ราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่เลี้ยงใน incubation shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน ดังแสดงในรูปที่ 37 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ได้ปริมาณมากที่สุด ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน ดังแสดงในรูปที่ 38 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ได้ปริมาณมากที่สุด, ส่วนราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 และ LY-MC-22 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยใช้ข้าวสารหุงสุกสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ได้ปริมาณมากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 39 และ 40.



รูปที่ 34. ราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลต ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB วางตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน.



รูปที่ 35. ราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลต ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่เลี้ยงใน incubation shaker อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน.



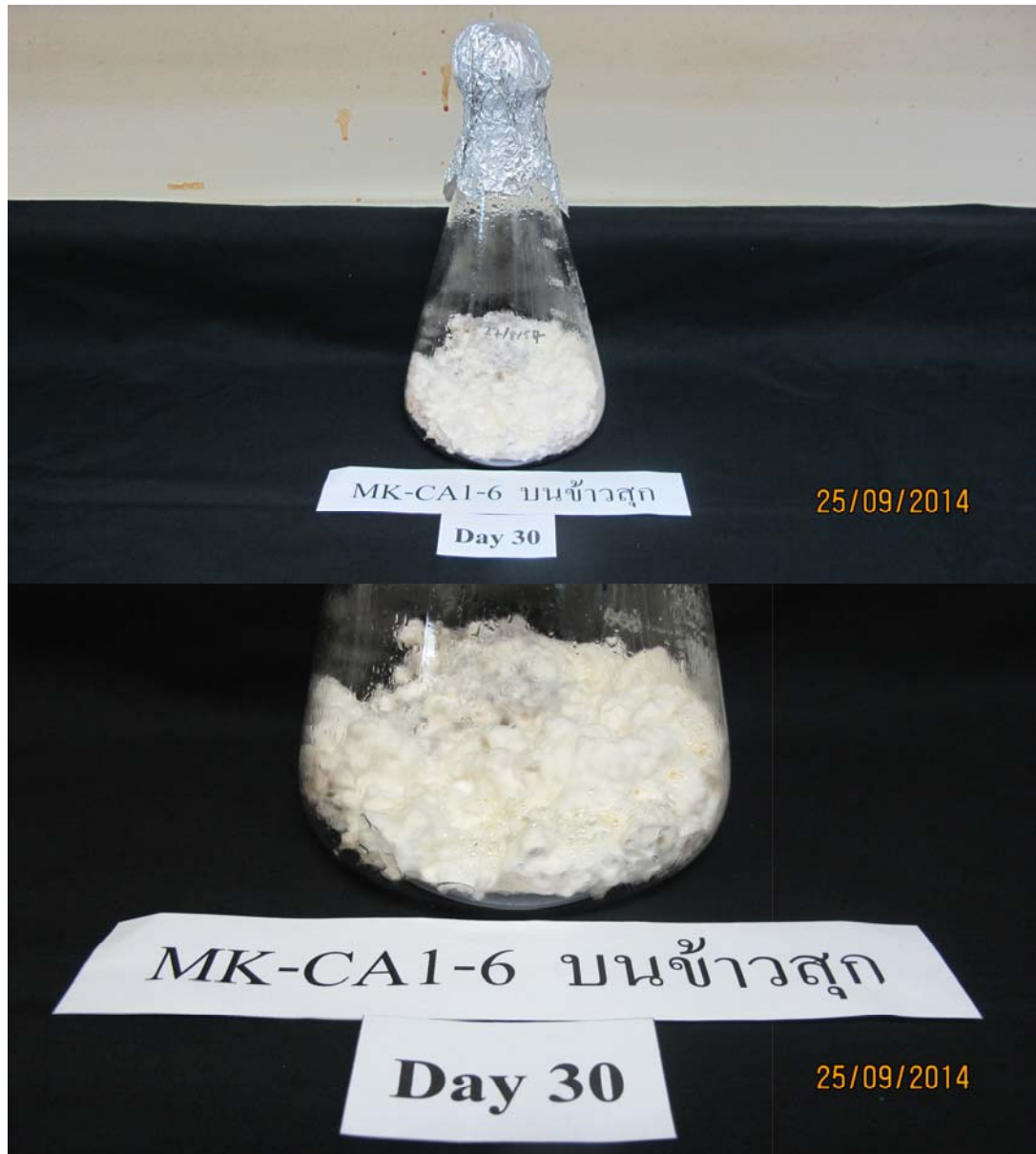
รูปที่ 36. ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ใน Fermenter ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน.



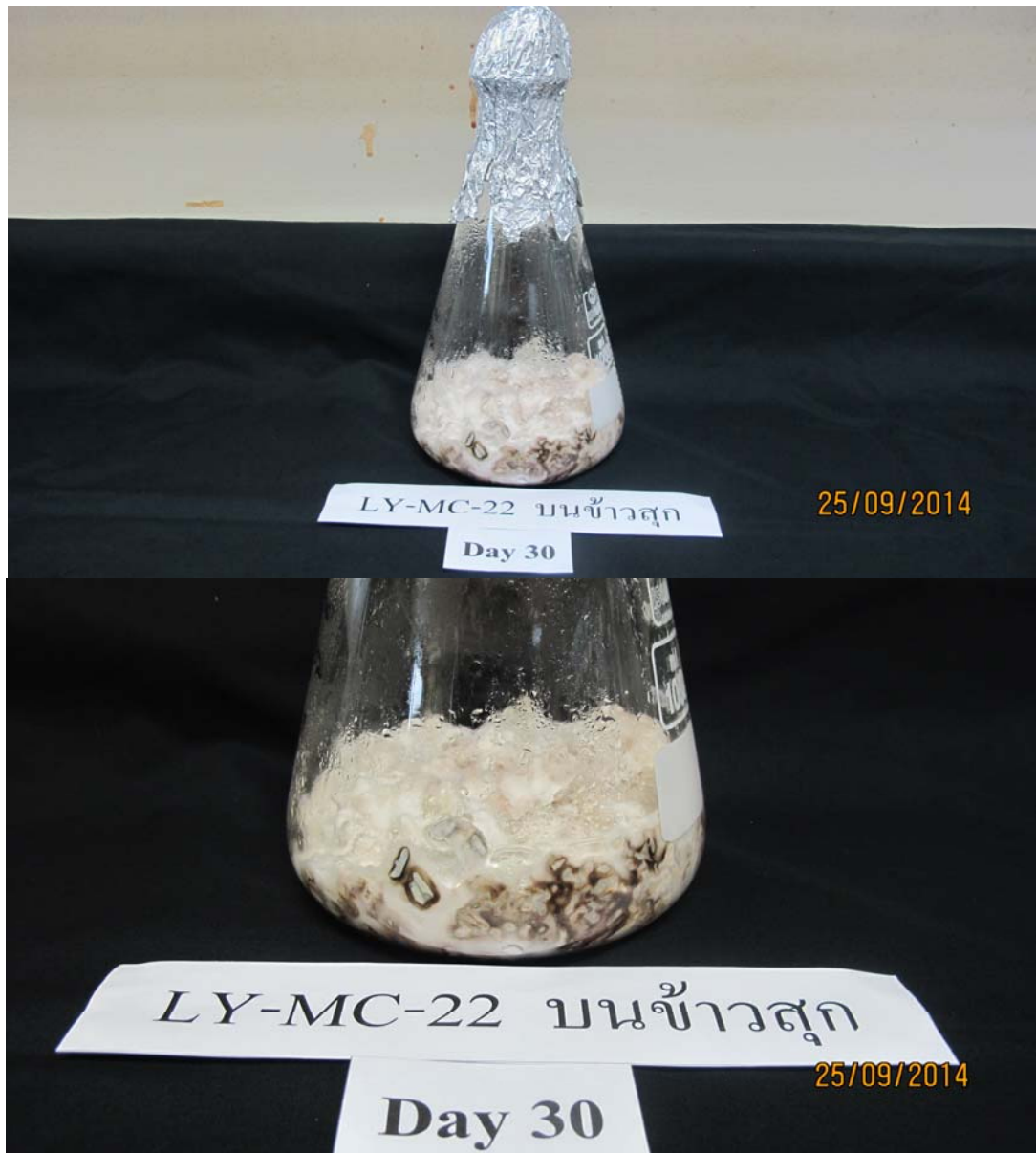
รูปที่ 37. ราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ใน Incubation shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน.



รูปที่ 38. ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 เลี้ยงในอาหารเหลว PDB วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วัน.



รูปที่ 39. ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 เลี้ยงในอาหารแข็ง (ข้าวสารหุงสุก)
วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน.



รูปที่ 40. ราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 เติบโตในอาหารแข็ง (ข้าวสารหุงสุก)
วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน.

3.5 การตรวจหาสารสำคัญจากสารสกัดหยาบเอทิลแอสีเตตจากเชื้อราเอนโดไฟต์

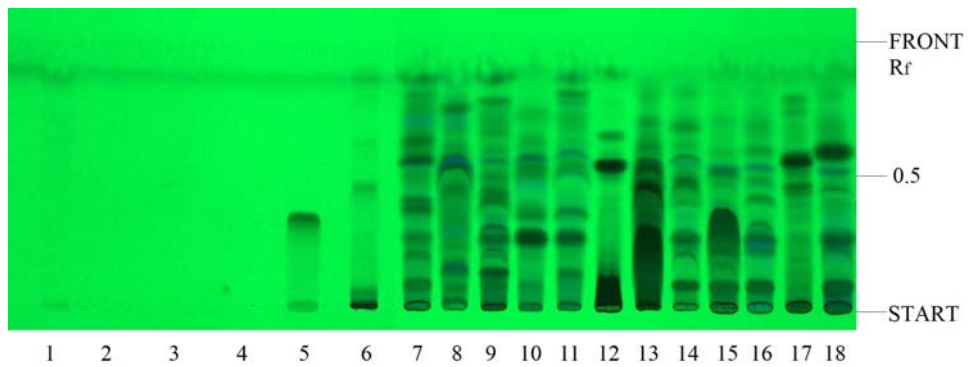
นำราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอสีเตตตามวิธีการสกัดที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จะได้สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ ดังแสดงในรูปที่ 41, จากนั้นนำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (TLC fingerprint).



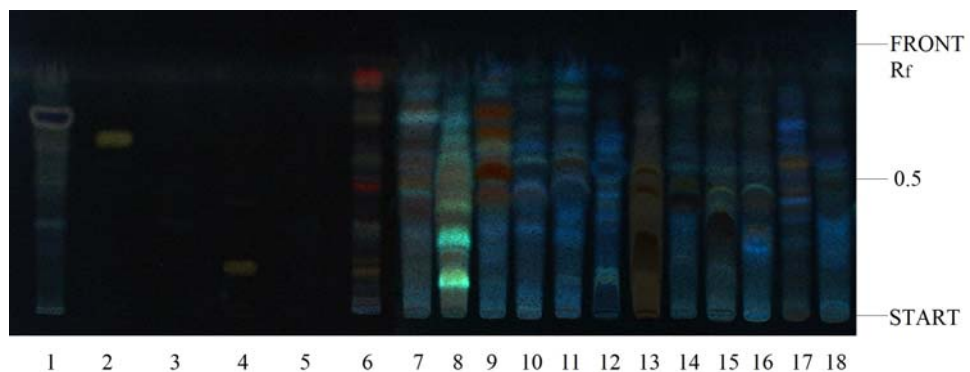
รูปที่ 41. ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์เรียงจากซ้ายไปขวา ได้แก่ NP-CA3-2, MK-CA1-6, LY-MC-22 และ MK-CA1-1 [รูปบน: สารสกัด (ด้านหน้า) รูปล่าง : สารสกัด (ด้านหลัง)].

TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกจากบัวบก ตรวจพบว่า มีแถบสารสีม่วงที่มีค่า Rf ในตำแหน่งที่คล้ายคลึงกันกับสารมาตรฐาน asiatic acid และ madecassic acid ซึ่งจะเห็นได้ว่า เป็นแถบสารที่เด่นในสารสกัด ถือเป็นสารหลักในพืชชนิดนี้ ยังพบว่า มีแถบสีที่เป็นลักษณะของสารกลุ่มไตรเทอปีนส์อีกด้วย ดังแสดงในรูปที่ 42-44.

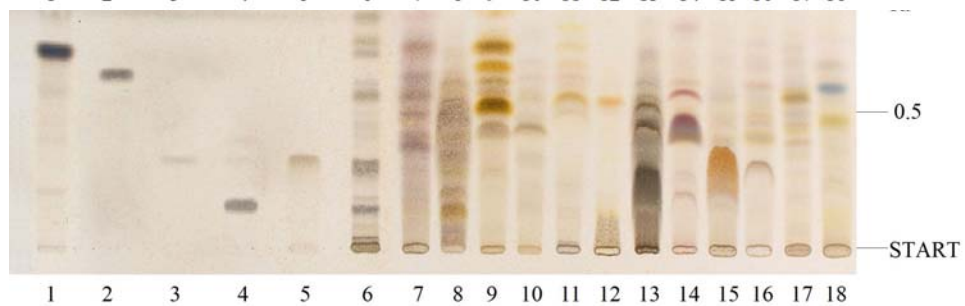
A



B



C

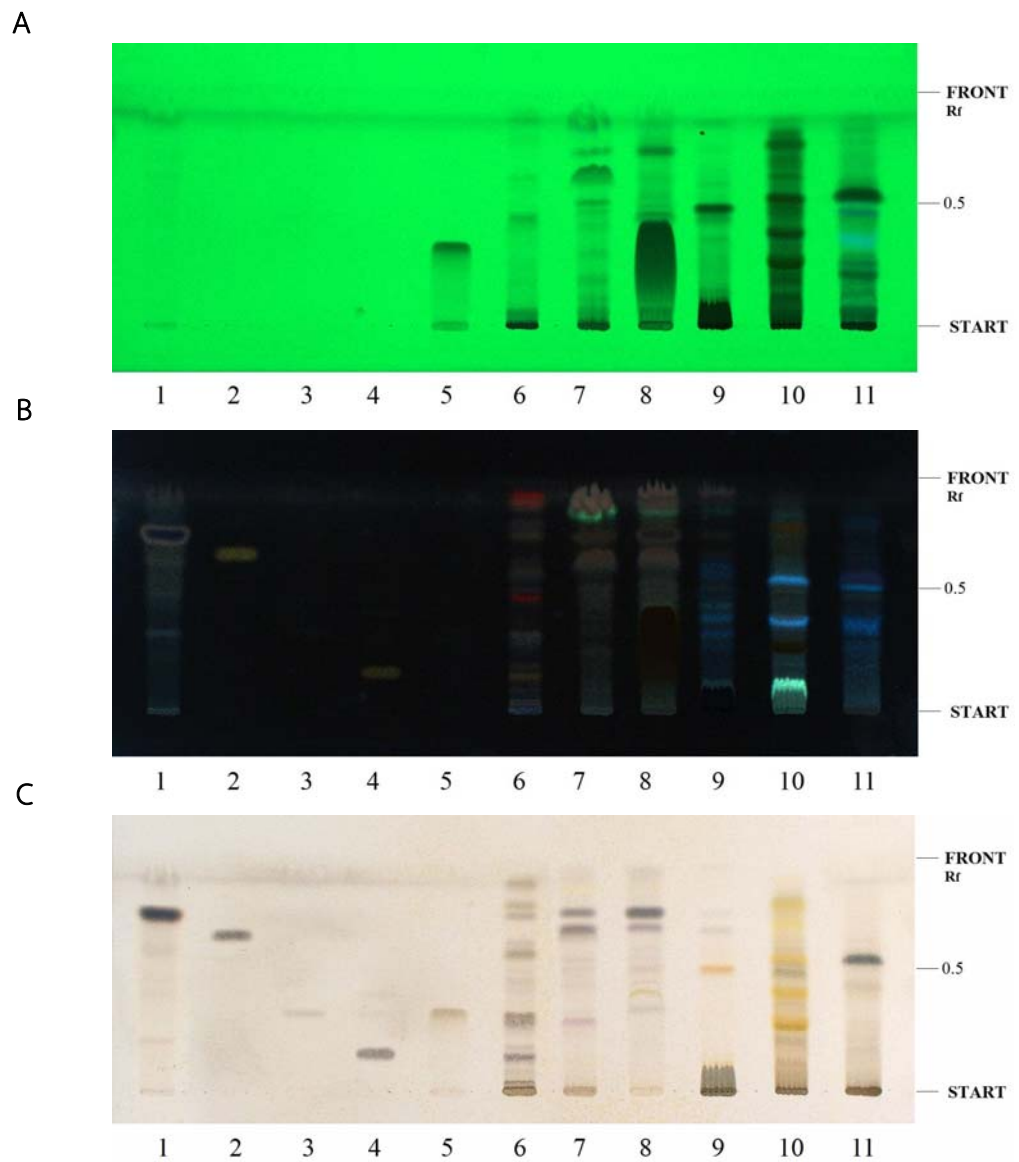


รูปที่ 42. Thin-layer chromatography of extracts from *Centella asiatica* Fungal endophytic medium.

β

Adsorbent: Silica gel 60 GF₂₅₄
Solvent system: Dichloromethane Methanol (9:1)
Detection: 10% sulfuric acid in ethanol, then heated on the hot plate until the colors develop
A = 254 nm
B = 366 nm (detection 1% FeCl₃ in ethanol and 10% H₂SO₄ in ethanol)
C = White R (detection 1% FeCl₃ in ethanol and 10% H₂SO₄ in ethanol)

1 = β -sitosterol	10 = TS4
2 = Oleanolic acid	11 = TS5
3 = Asiatic acid	12 = TS6
4 = Madecassic acid	13 = TS7
5 = Quercetin	14 = TS8
6 = 70% extracts from <i>centella asiatica</i>	15 = TS9
7 = TS1	16 = TS10
8 = TS2	17 = TS11
9 = TS3	18 = Control PDB



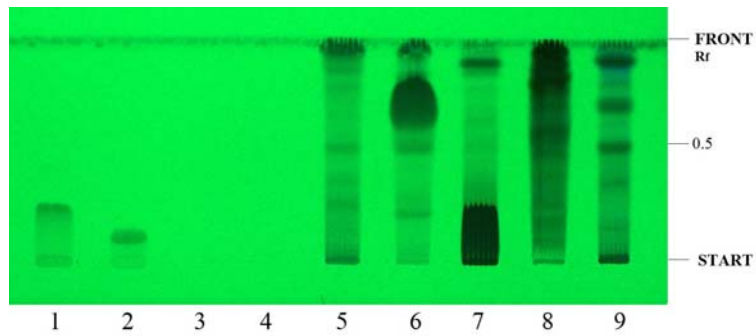
รูปที่ 43. Thin-layer chromatography of extracts from *Centella asiatica* fungal endophytic medium.

Adsorbent: Silica gel 60 GF₂₅₄
 Solvent system: Dichloromethane Methanol (9:1)
 Detection: 10% sulfuric acid in ethanol, then heated on the hot plate until the colors develop
 Detection: 10% sulfuric acid in ethanol, then heated on the hot plate until the colors develop

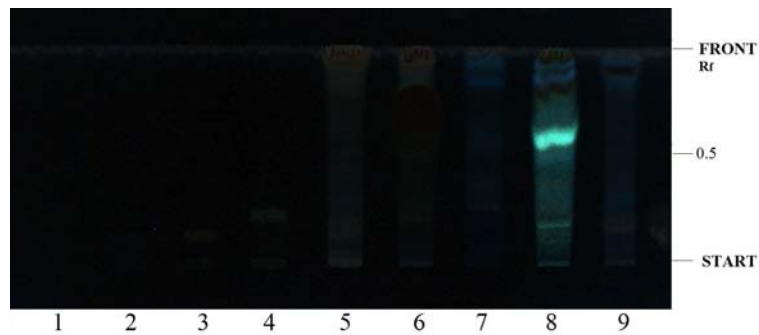
- A = 254 nm
B = 366 nm (detection 1% FeCl₃ in ethanol and 10% H₂SO₄ in ethanol)
C = White R (detection 1% FeCl₃ in ethanol and 10% H₂SO₄ in ethanol)

- | | |
|--|--|
| 1 = β -sitosterol | 7 = ราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 ข้าวสุก |
| 2 = Oleanolic acid | 8 = ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6-22 ข้าวสุก |
| 3 = Asiatic acid | 9 = อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 (Not shake), PDB, Lot.2 |
| 4 = Madecassic acid | 10 = อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 (Not shake), PDB, Lot.1 |
| 5 = Quercetin | 11 = Control PDB |
| 6 = 70% extracts from <i>centella asiatica</i> | |

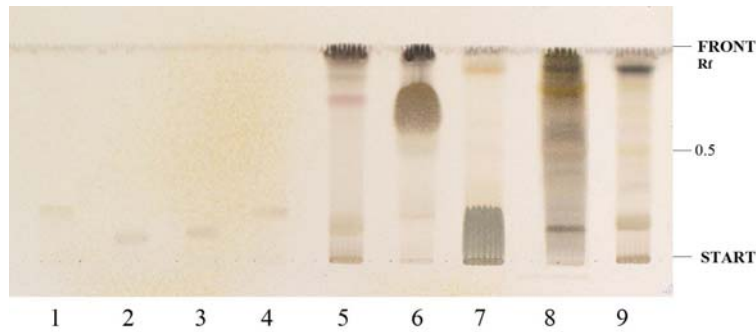
A



B



C



รูปที่ 44. Thin-layer chromatography of extracts from *Centella asiatica* fungal endophytic medium.

Adsorbent: Silica gel 60 GF₂₅₄

Solvent system: Dichloromethane Methanol Water (20:6.5:0.5)

Detection: 10% sulfuric acid in ethanol, then heated on the hot plate until the colors develop

- A = 254 nm
- B = 366 nm (detection 1% FeCl₃ in ethanol and 10% H₂SO₄ in ethanol)
- C = White R (detection 1% FeCl₃ in ethanol and 10% H₂SO₄ in ethanol)

- 1 = Rutin
- 2 = Chlorogenic acid
- 3 = Madecassoside
- 4 = Asiaticoside

- 5 = Crude EtOAc ราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 ข้าวสุก

- 6 = Crude EtOAc ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6-22 ข้าวสุก
- 7 = Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 (Not shake), PDB, Lot.2
- 8 = Crude EtOAc อาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 (Not shake), PDB, Lot.1
- 9 = Control PDB

สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกจากบวบก ตรวจสอบว่ามีแถบสารสีม่วงที่มีค่า Rf ในตำแหน่งที่คล้ายคลึงกันกับสารมาตรฐาน asiatic acid, และ madecassic acid ดังแสดงในรูปที่ 42-43.

เอทิลแอสีเตตแฟรกชันจากอาหารที่เลี้ยงเชื้อราชนิดต่างๆ ที่พบแถบสีที่เป็นลักษณะของสารกลุ่มไตรเทอพีนส์ ได้แก่ 1, 2, 3, 8 โดยตัวอย่างที่ 8 ดังแสดงในรูปที่ 42 พบแถบสีที่เด่นชัดกว่าตัวอย่างอื่นๆ.

ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ ที่พบแถบสีที่เป็นลักษณะของสารกลุ่มไตรเทอพีนส์ ได้แก่ ตัวอย่างสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6-22 ข้าวสุกและสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 (Not shake), PDB, Lot.1 ดังแสดงในรูปที่ 43 ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่น่าสนใจ.

ตรวจสอบสารที่มีลักษณะคล้ายคลึงสารฟีนอลิกจากสารสกัด และราเอนโดไฟต์ ซึ่งมีแถบสารสีเขียวที่มีค่า Rf ในตำแหน่งที่คล้ายคลึงกันกับสารมาตรฐาน Rutin, Chlorogenic acid ดังแสดงในรูปที่ 44 ในตัวอย่างสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 (Not shake), PDB, Lot. 2.

3.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบเข็ราเอนโดไฟต์ด้วยเทคนิค WST assay

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ LY-MC-22, MK-CA1-1, MK-CA1-6 และ NP-CA3-2 ซึ่งละลายในเอทานอล 80% โดยทดสอบกับเซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ L929 ซึ่งจัดเป็นเซลล์ปกติ (normal หรือ non-transformed cells) ได้จาก mouse connective tissue และเซลล์มะเร็ง (cancerous หรือ transformed cells) อีก 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับมนุษย์ ชนิด HepG2 (Human hepatocellular carcinoma cells) และเซลล์มะเร็งเต้านมมนุษย์ ชนิด MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cells) ใช้วิธีการทดสอบ WST-1 assay และเวลาทดสอบนาน 24 ชั่วโมง. ผลการทดสอบโดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ดังแสดงในตารางที่ 16 พบว่า สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ตัวอย่าง LY-MC-22, MK-CA1-1 และ MK-CA1-6 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 3 ชนิด คือ L929, HepG2 และ MCF-7 โดยจัดเป็นสารที่อาจเป็นอันตราย (potentially harmful: ค่า IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ไม่เกิน 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)/หรือสารที่มีแนวโน้มไม่เป็นพิษ (potentially non-toxic: ค่า IC_{50} สูงกว่า 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ทั้งนี้โดยอาศัยเกณฑ์การจำแนกระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารธรรมชาติ ดังแสดงในตารางที่ 17.

ตารางที่ 16. เปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (L929), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ (ตัวอย่าง LY-MC-22, MK-CA1-1, MK-CA1-6 และ NP-CA3-2 ละลายในเอทานอล 80%) โดยวิธี WST assay ทดสอบนาน 24 ชั่วโมง

สารสกัดหยาบ ราเอนโดไฟต์	L929	HepG2	MCF-7	ระดับความ เป็นพิษ*
LY-MC-22	844.18	762.97	953.88	Harmful
MK-CA1-1	774.30	898.43	1666.84	Harmful
MK-CA1-6	1294.28	1120.02	1110.80	Non-toxic
NP-CA3-2	41.21	26.06	25.70	Toxic

หมายเหตุ:

L929 = Mouse fibroblast cells from subcutaneous connective tissue (เซลล์ปกติ)

HepG2 = Human liver, hepatocellular carcinoma (เซลล์มะเร็งตับ)

MCF-7 = Human breast adenocarcinoma cells (เซลล์มะเร็งเต้านม)

ตารางที่ 17. Classification of the cytotoxicity for natural ingredients

Category	IC ₅₀
Potentially very toxic	IC ₅₀ < 10 µg/ml
Potentially toxic	10 µg/ml < IC ₅₀ < 100 µg/ml
Potentially harmful	100 µg/ml < IC ₅₀ < 1,000 µg/ml
Potentially non-toxic	IC ₅₀ > 1,000 µg/ml

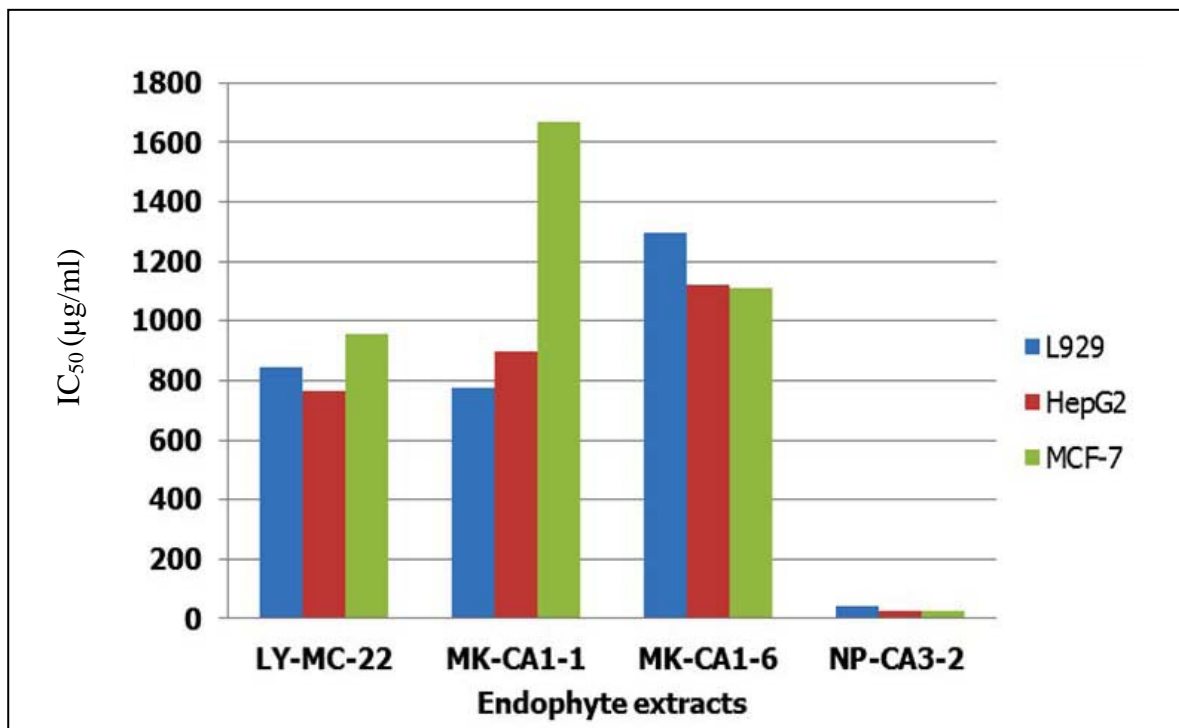
ในรูปที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ต่อการเกิดพิษของตัวอย่าง LY-MC-22, MKCA1-1, MK-CA1-6 และ NP-CA3-2 ต่อเซลล์ L929, HepG2 และ MCF-7 พบว่า ทั้ง 3 ตัวอย่าง ของสารสกัด endophytes ได้แก่ LY-MC-22, MK-CA1-1, MK-CA1-6 มีแนวโน้มเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (HepG2 และ MCF-7) สูงกว่าเซลล์ปกติ (L929) แต่เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะเซลล์มะเร็งด้วยกัน พบว่า เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ตอบสนองต่อสารสกัด LY-MC-22, MK-CA1-1, MK-CA1-6 สูงกว่าเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) จากผลการทดลองที่ได้ สามารถเรียงลำดับความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ ต่อเซลล์ทดสอบทั้ง 3 cell lines โดยสามารถเรียงลำดับความเป็นพิษจากมากไปน้อย ได้ดังนี้:

ตัวอย่าง LY-MC-22: ความเป็นพิษต่อ HepG2 > L929 > MCF-7

ตัวอย่าง MK-CA1-1: ความเป็นพิษต่อ L929 > HepG2 >> MCF-7

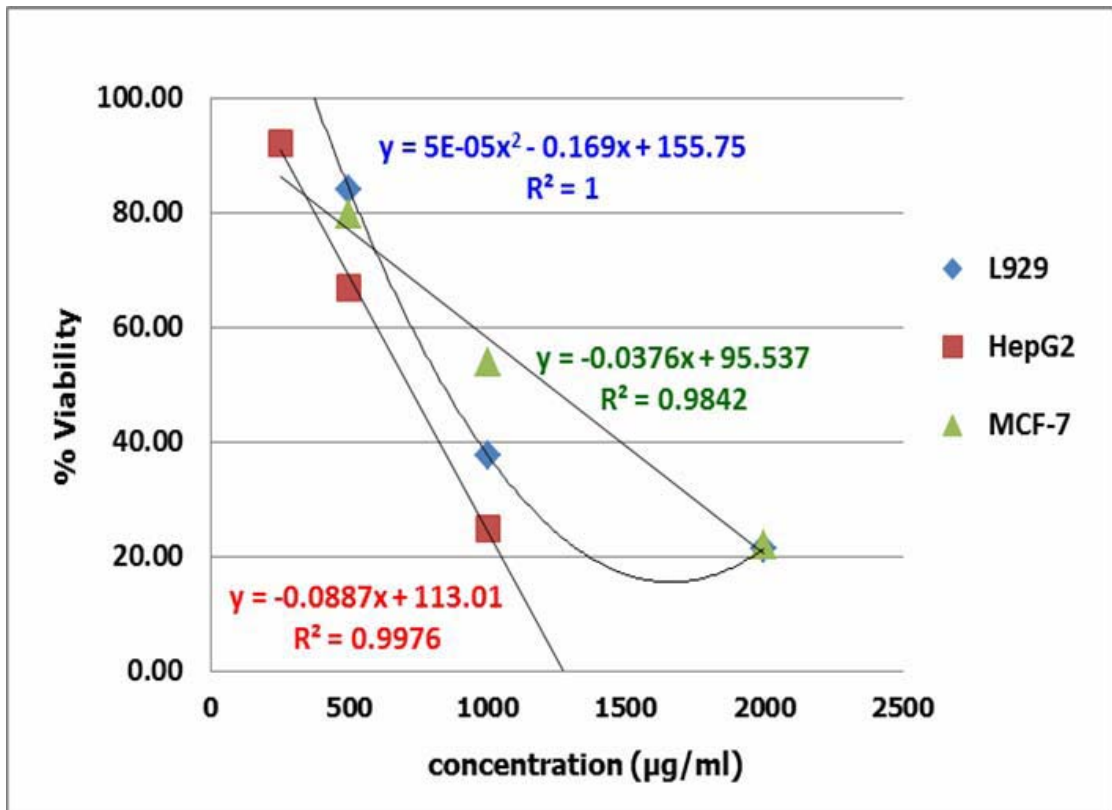
ตัวอย่าง MK-CA1-6: ความเป็นพิษต่อ MCF-7 ≥ HepG2 > L929

ตัวอย่าง NP-CA3-2: ความเป็นพิษต่อ MCF-7 ≥ HepG2 > L929

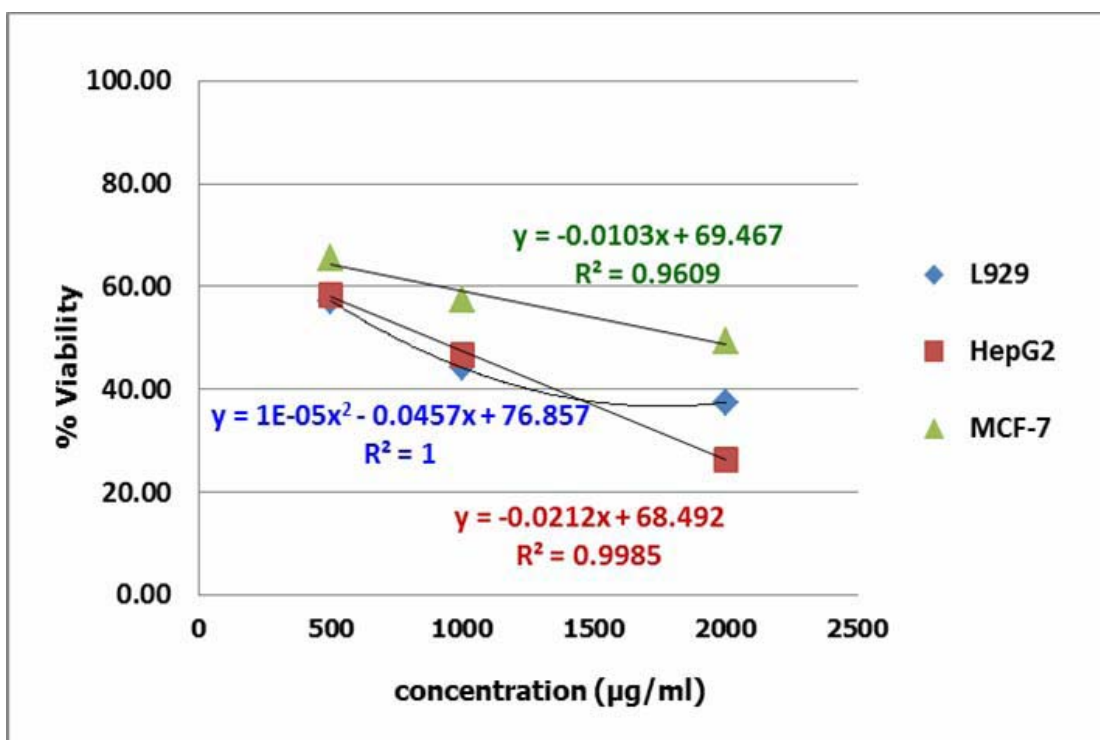


รูปที่ 45. เปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ (ตัวอย่าง LY-MC-22, MK-CA1-1, MK-CA1-6 และ NP-CA3-2) ต่อเซลล์ปกติ (L929), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) นาน 24 ชั่วโมง.

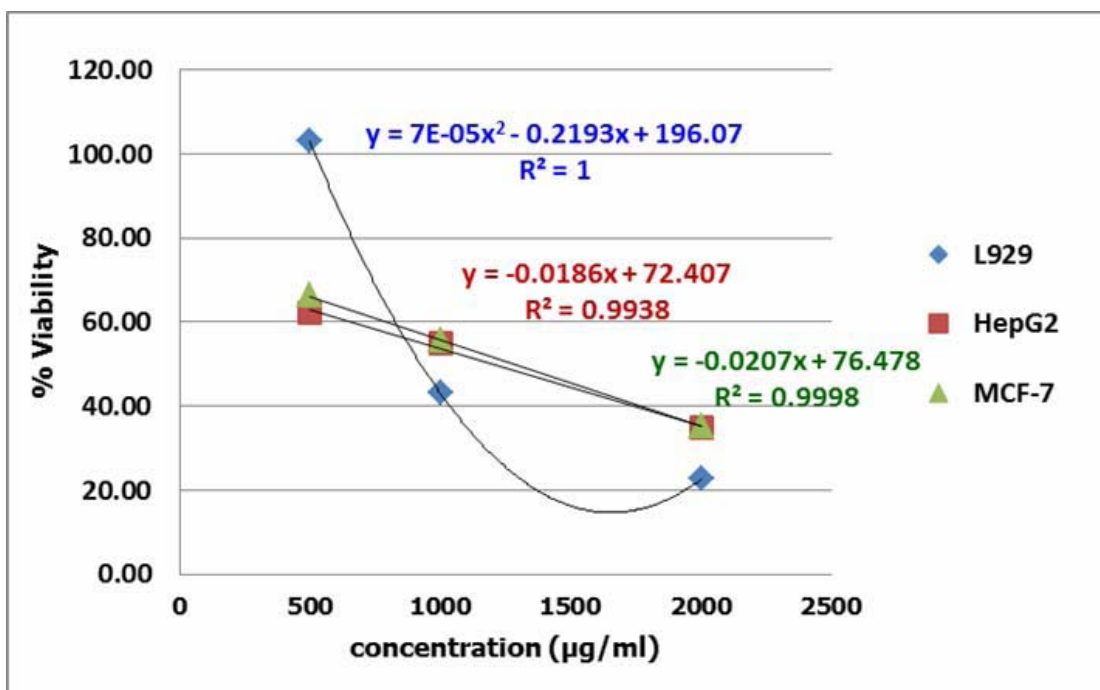
เป็นที่น่าสนใจว่า สำหรับตัวอย่าง NP-CA3-2 มีความเป็นพิษสูงมากเมื่อเทียบกับตัวอย่าง LY-MC-22, MK-CA1-1 และ MK-CA1-6 ซึ่งเกิดขึ้นทั้งต่อเซลล์ L929, HepG2 และ MCF-7 ดังแสดงในรูปที่ 45 โดยมีค่า IC_{50} ต่ำกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับทั้ง 3 cell lines. อย่างไรก็ตาม ตัวอย่าง NP-CA3-2 มีความไวในการเกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2; IC_{50} เท่ากับ 26.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7: IC_{50} เท่ากับ 25.70 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สูงกว่าเซลล์ปกติ (L929: IC_{50} เท่ากับ 41.21 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ประมาณ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของตัวอย่าง NP-CA3-2 กับตัวอย่าง LY-MC-22, MK-CA1-1 และ MK-CA1-6 พบว่าความเป็นพิษของตัวอย่าง NP-CA3-2 ดังแสดงในรูปที่ 49 สูงกว่า LY-MC-22 ดังแสดงในรูปที่ 46, MK-CA1-1 ดังแสดงในรูปที่ 47 และ MK-CA1-6 ดังแสดงในรูปที่ 48 ราว 40-50 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 45.



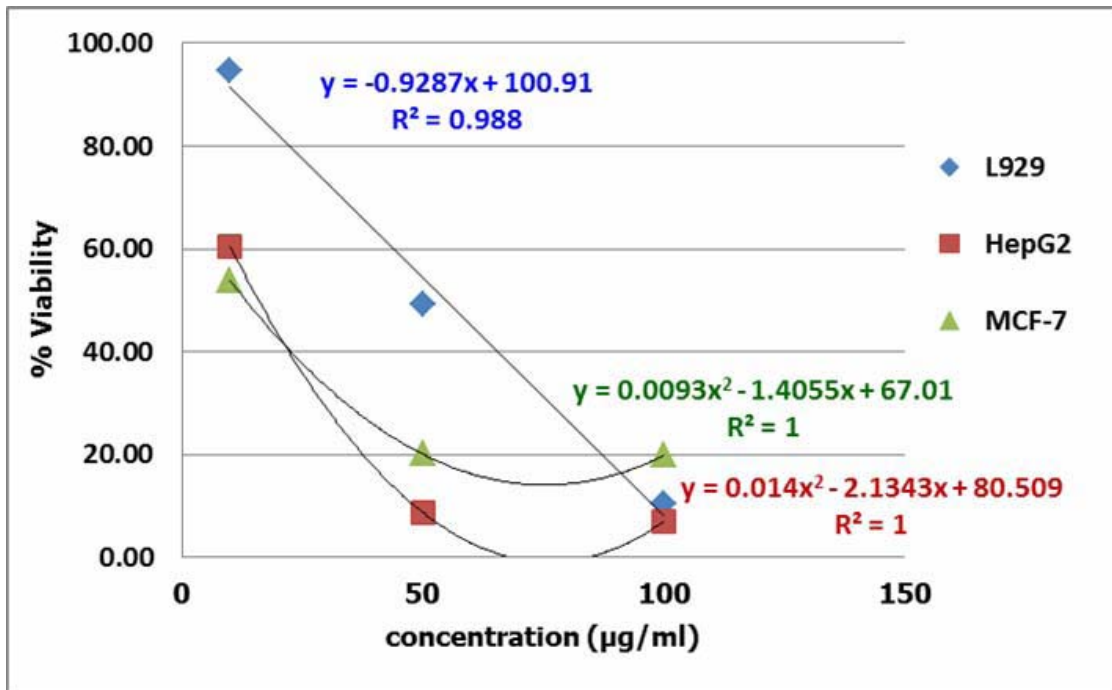
รูปที่ 46. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ปกติ (L929), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) หลังทดสอบกับสารสกัดหยาดบราเอนโดไฟต์ ตัวอย่าง LY-MC-22 นาน 24 ชั่วโมง.



รูปที่ 47. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ปกติ (L929), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) หลังทดสอบกับสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 นาน 24 ชั่วโมง.



รูปที่ 48. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ปกติ (L929), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) หลังทดสอบกับสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 นาน 24 ชั่วโมง.



รูปที่ 49. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ปกติ (L929), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) หลังทดสอบกับสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 นาน 24 ชั่วโมง.

3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ด้วยเทคนิค Rats Ear Edema Model

หลังจากให้สารเหนียวทำให้เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน (EPP) ที่ใบหูข้างขวาของหนูทุกกลุ่ม แล้ววัดความเปลี่ยนแปลงของขนาดความหนาของใบหูหนูที่เวลา 30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง พบว่า เชื้อรา NPCA3-2 ใน acetone แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเฉียบพลันที่ใบหูหนูได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้ง 3 ความเข้มข้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อรา NPCA3-2 ใน acetone ขนาด 0.1 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/ปริมาตร ที่แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญทั้ง 3 ช่วงเวลาของการทดสอบ และผลที่ได้นี้เป็นไปในทางเดียวกับสารมาตรฐาน Phenylbutazone ดังแสดงในตารางที่ 18.

ตารางที่ 18. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ Rat Ear Edema Model ของสารสกัดหยาบเชื้อรา NPCA3-2 ใน acetone เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Phenylbutazone และ Acetone ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม

กลุ่มสารทดสอบ	จำนวน หนู	ปริมาตรการบวม (mean)			% การยับยั้งการอักเสบ		
		30 นาที	1 ชม.	2 ชม.	30 นาที	1 ชม.	2 ชม.
กลุ่มควบคุม	6	12.2±0.5	9.5±0.8	6.0±0.6	-	-	-
กลุ่มสารมาตรฐาน	6	5.7±0.6*	5.0±0.5*	3.5±0.5	53.3	47.4	41.7
กลุ่มทดสอบที่ 1	6	6.5±0.8*	4.0±0.7*	2.3±0.9*	46.7	57.9	61.7
กลุ่มทดสอบที่ 2	6	6.8±0.3*	4.8±0.5*	2.8±0.3*	44.3	49.5	53.3
กลุ่มทดสอบที่ 3	6	6.3±0.5*	5.0±0.4*	3.3±0.7	48.4	47.4	45.0

หมายเหตุ : *p<0.05

3.8 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งและความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์

เมื่อพิจารณาจากค่า MIC ดังแสดงในตารางที่ 19-22 พบว่า สารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดอื่นๆ ในขณะที่สารสกัดหยาบ LY-MC-22 ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อทดสอบเลย เป็นที่สังเกตว่า MIC และ MBC มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่า mode of action ของสารสกัดเหล่านี้แสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อมากกว่าการยับยั้งเชื้อ.

ตารางที่ 19. การเจริญของเชื้อบนแผ่น Millipore membrane ที่วางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ MA-CA-1-6 ต่างๆ กัน

เชื้อทดสอบ	การเจริญของเชื้อบนอาหารผสมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)							
	0.015	0.037	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2
1. <i>S. pyogenes</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
2. <i>H. pylori</i>								
2.1 AT96	+	+	+	+	-	-	-	-
2.2 P2R	+	-	-	-	-	-	-	-
2.3 PT96	+	+	+	+	+	+	+	+
2.4 PT4R	+	+	+	+	-	-	-	-
2.5 Y32R	+	+	+	+	-	-	-	-
2.6 PT45R	+	+	+	+	+	+	+	+
2.7 PT19R	+	+	+	+	+	+	+	+
2.8 3G28R	+	+	+	+	+	+	+	+
2.9 AY67	+	+	+	+	+	+	+	+
2.10 PJ48R	+	+	+	+	-	-	-	-
2.11 PJ41R	+	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 20. การเจริญของเชื้อบนแผ่น Millipore membrane ที่วางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ MA-CA-1-1 ต่างๆ กัน

เชื้อทดสอบ	การเจริญของเชื้อบนอาหารผสมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)							
	0.015	0.037	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2
1. <i>S. pyogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
2. <i>H. pylori</i>								
2.1 AT96	+	+	+	+	+	+	+	+
2.2 P2R	+	+	+	+	+	+	+	+
2.3 PT96	+	+	+	+	+	+	+	+
2.4 PT4R	+	+	+	+	+	+	+	-
2.5 Y32R	+	+	+	+	+	+	-	-
2.6 PT45R	+	+	+	+	+	+	+	-
2.7 PT19R	+	+	+	+	+	+	+	-
2.8 3G28R	+	+	+	+	+	+	+	-
2.9 AY67	+	+	+	+	+	+	+	-
2.10 PJ48R	+	+	+	+	+	+	-	-
2.11 PJ41R	+	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 21. การเจริญของเชื้อบนแผ่น Millipore membrane ที่วางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ LY-MC-22 ต่างๆ กัน

เชื้อทดสอบ	การเจริญของเชื้อบนอาหารผสมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)							
	0.015	0.037	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2
1. <i>S. pyogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
2. <i>H. pylori</i>								
2.1 AT96	+	+	+	+	+	+	+	+
2.2 P2R	+	+	+	+	+	+	+	+
2.3 PT96	+	+	+	+	+	+	+	+
2.4 PT4R	+	+	+	+	+	+	+	+
2.5 Y32R	+	+	+	+	+	+	+	+
2.6 PT45R	+	+	+	+	+	+	+	+
2.7 PT19R	+	+	+	+	+	+	+	+
2.8 3G28R	+	+	+	+	+	+	+	+
2.9 AY67	+	+	+	+	+	+	+	+
2.10 PJ48R	+	+	+	+	+	+	+	+
2.11 PJ41R	+	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 22. การเจริญของเชื้อบนแผ่น Millipore membrane ที่วางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ NP-CA3-2 ต่างๆ กัน

เชื้อทดสอบ	การเจริญของเชื้อบนอาหารผสมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)							
	0.015	0.037	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2
1. <i>S. pyogenes</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
2. <i>H. pylori</i>								
2.1 AT96	+	+	+	+	-	-	-	-
2.2 P2R	+	+	+	+	+	+	+	+
2.3 PT96	+	+	+	+	+	+	-	-
2.4 PT4R	+	+	+	+	+	+	-	-
2.5 Y32R	+	+	+	+	-	-	-	-
2.6 PT45R	+	+	+	+	+	+	-	-
2.7 PT19R	+	+	+	+	-	-	-	-
2.8 3G28R	+	+	+	+	+	+	+	-
2.9 AY67	+	+	+	+	+	-	-	-
2.10 PJ48R	+	+	+	+	+	-	-	-
2.11 PJ41R	+	+	+	+	+	-	-	-

ตารางที่ 23. สรุปค่า MIC ของสารทดสอบต่อเชื้อทดสอบแต่สายพันธุ์

เชื้อทดสอบ	ค่า MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)							
	MA-CA-1-6		MA-CA-1-1		LY-MC-22		NP-CA3-2	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1. <i>S. pyogenes</i>	1	1	2	2	>2	ND	0.25	0.25
2. <i>H. pylori</i>								
2.1 AT96	0.25	0.25	>2	ND	>2	ND	0.25	0.25
2.2 P2R	0.037	0.0625	>2	ND	>2	ND	>2	ND
2.3 PT96	>2	ND	>2	ND	>2	ND	1	1
2.4 PT4R	0.25	0.25	2	2	>2	ND	1	1
2.5 Y32R	0.25	0.25	1	2	>2	ND	0.25	0.25
2.6 PT45R	>2	ND	2	2	>2	ND	1	1
2.7 PT19R	>2	ND	2	2	>2	ND	0.25	0.25
2.8 3G28R	>2	ND	2	2	>2	ND	2	2
2.9 AY67	>2	ND	2	2	>2	ND	0.5	1
2.10 PJ48R	0.25	0.25	1	1	>2	ND	0.5	0.5
2.11 PJ41R	>2	ND	>2	ND	>2	ND	0.5	0.5

หมายเหตุ: ND = not done

4. สรุปผลการทดลอง

การแยกราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 34 ไอโซเลต บั๊บกจากจังหวัดมหาสารคาม แยกราเอนโดไฟต์ ได้ 2 ไอโซเลต, บั๊บกจากจังหวัดนครปฐม ได้ราเอนโดไฟต์ 8 ไอโซเลต, สะเดาจากจังหวัดเลยแยกราเอนโดไฟต์ได้ 13 ไอโซเลต, และยอจากจังหวัดเลยแยกราเอนโดไฟต์ได้ 11 ไอโซเลต จากนั้นจัดจำแนกราเอนโดไฟต์ที่ได้โดยการวิเคราะห์ลำดับ DNA นำราเอนโดไฟต์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB นาน 30 วัน กรองแยกส่วนเส้นใยและน้ำเลี้ยง นำส่วนน้ำเลี้ยงมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ แล้วไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชเพื่อคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชดีที่สุด ประกอบด้วย 1) การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการวัดทั้ง 2 ระบบ คือ ACW และ ACL บ่งชี้ว่าตัวอย่างสารสกัดยับยั้งการออกฤทธิ์สูงในทั้ง 2 ระบบ คือ ตัวอย่าง LY-MC-15 และ LY-MC-23 โดยตัวอย่าง LY-MC-15 มีฤทธิ์สูงกว่า LY-MC-23 ประมาณ 2-3 เท่า แต่ตัวอย่าง LY-MC-15 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ (TK6 human lymphoblast cells) สูงกว่า LY-MC-23 โดยมีค่า IC_{50} (ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 85.62 และ 218.99 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ 2) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดยอบราเอนโดไฟต์โดยทดสอบกับเซลล์ 3 ชนิด คือ เซลล์ปกติ 1 ชนิด คือ L929 fibroblast และเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco₂) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ดังผลแสดงเป็นค่า IC_{50} (inhibitory concentration) สามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างที่น่าสนใจในการนำไปใช้ประโยชน์ มี 5 ตัวอย่าง เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่มีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ปกติ แต่มีพิษสูงต่อเซลล์มะเร็ง ทั้ง 5 ตัวอย่าง ดังกล่าว NP-CA3-2, MK-CA1-6, LY-AI-9, LY-MC-15 และ LY-MC-23 3) การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า สารสกัดจากราเอนโดไฟต์ของใบบั๊บกสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ของสะเดา และยอ. สารสกัดยอบราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 และ MK-CA1-1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์มากถึง 5-8 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบขนาดของ inhibition zone และจำนวนสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง พบว่า *S. pyogenes* DMST 17020 เป็นเชื้อที่ไวต่อการถูกยับยั้งด้วยสารสกัดจากราเอนโดไฟต์มากกว่าเชื้อชนิดอื่น ผลจากการคัดเลือกได้ราเอนโดไฟต์มา 4 ไอโซเลต ที่มีการออกฤทธิ์ทางเภสัชดีที่สุด คือ NP-CA3-2 (*Stemphylium* sp.), MK-CA1-1 (*Talaromyces stipitatus*), MK-CA1-6 (*Thielavia terricola*) และ LY-MC-22 (*Colletotrichum acutatum*).

จากการทดลองนำส่วนสกัดยอบราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์แล้วนำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (TLC fingerprint) พบว่า สารสกัดยอบราเอนโดไฟต์ที่แยกจากบั๊บก มีแถบสารสีม่วงที่มีค่า Rf ในตำแหน่งที่คล้ายคลึงกันกับสารมาตรฐาน asiatic acid และ madecassic acid. สารสกัดยอบราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ พบแถบสีที่เป็นลักษณะของสารกลุ่มไตรเทอพินส์ ได้แก่ 1, 2, 3, 8 โดยตัวอย่างที่ 8 พบแถบสีที่เด่นชัดกว่าตัวอย่างอื่นๆ ตัวอย่างสารสกัดยอบราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ ที่พบแถบสีที่เป็นลักษณะของสารกลุ่มไตรเทอพินส์ ได้แก่ ตัวอย่างสารสกัดยอบราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 และ LY-MC-22 ที่เลี้ยงในข้าวสุก และสารสกัดยอบราเอนโดไฟต์จากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NP-CA3-2 ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่น่าสนใจ.

ตรวจพบสารที่มีลักษณะคล้ายคลึงสารพินอลิกจากสารสกัด และราเอนโดไฟต์ ซึ่งมีแถบสารสี เขียวที่มีค่า Rf ในตำแหน่งที่คล้ายคลึงกันกับสารมาตรฐาน Rutin, Chlorogenic acid ในตัวอย่าง สารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1.

นำราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลต มาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางเภสัช พบว่า NP-CA3-2 จะสร้างสารออกฤทธิ์ทางเภสัชได้มากที่สุด ในอาหารเหลว PDB เมื่อเลี้ยงใน Incubation shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-1 จะ สร้างสารออกฤทธิ์ทางเภสัชได้มากที่สุด ในอาหารเหลว PDB เมื่อวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วัน ราเอนโดไฟต์ MK-CA1-6 และราเอนโดไฟต์ LY-MC-22 จะสร้างสารออกฤทธิ์ทางเภสัชได้มากที่สุด ในอาหารแข็ง (ข้าวสารหุงสุก) เมื่อวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วัน.

จากนั้นนำราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลต มาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชอีกครั้ง ประกอบด้วย 1) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยทดสอบกับเซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ปกติ 1 ชนิด คือ L929 fibroblast และเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ประเมินผลจากค่า IC_{50} ของแต่ละตัวอย่าง สรุปได้ว่า LY-MC-22 มีคุณสมบัติเป็น “สารที่อาจเป็น อันตราย (potentially harmful)” ต่อเซลล์ทั้ง 3 ชนิด คือ เซลล์ L929, HepG2 และ MCF-7 โดยมี ค่า IC_{50} ใกล้เคียงกันเท่ากับ 844.18, 762.97 และ 953.88 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ตัวอย่าง MK-CA1-1 มีคุณสมบัติเป็น “สารที่อาจเป็นอันตราย (potentially harmful)” เฉพาะต่อเซลล์ L929 (IC_{50} = 774.30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเซลล์ HepG2 (IC_{50} = 898.43 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แต่มี แนวโน้มไม่เป็นพิษ (potentially non-toxic) ต่อเซลล์ MCF-7 (IC_{50} = 1,666.484 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร). ตัวอย่าง MK-CA1-6 มีคุณสมบัติเป็น “สารที่อาจเป็นพิษ (potentially non-toxic)” ทั้ง ต่อเซลล์ L929, HepG2 และ MCF-7 โดยมีค่า IC_{50} เกินกว่า 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อทั้ง 3 cell lines ตัวอย่าง NP-CA3-2 มีคุณสมบัติเป็น “สารที่มีความเป็นพิษ-พิษสูง (potentially Toxic-very toxic)” ทั้งต่อเซลล์ L929, HepG2 และ MCF-7 โดยมีค่า IC_{50} ต่ำกว่า 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ต่อทั้ง 3 cell lines. สรุปลำดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ จากมากไปน้อยได้ ดังนี้ NP-CA3-2 >>> LY-MC-22 > MK-CA1-1 > MK-CA1-6 2) การทดสอบฤทธิ์ ด้านการอักเสบของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ด้วยเทคนิค Rat Ear Edema Model พบว่า เชื้อรา NPCA3-2 สามารถแสดงฤทธิ์ในการต้านการอักเสบแบบเฉียบพลันใน rat ear edema model ได้ อย่างเป็นไปในทางเดียวกับสารมาตรฐาน phenylbutazone ได้ทั้ง 3 ความเข้มข้น แม้แต่ที่ความ เข้มข้นต่ำสุด คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/ปริมาตร จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า หากมีการนำเอา เชื้อราชนิดนี้มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป สามารถใช้ในขนาดต่างๆ ก็สามารถแสดงฤทธิ์ด้านการ อักเสบได้เป็นอย่างดี 3) การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งและความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่า เชื้อจุลินทรีย์พบว่า สารสกัดรหัส NP-CA3-2 มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดอื่นๆ ในขณะที่

สารสกัด LY-MC-22 ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อทดสอบเลย เป็นที่สังเกตว่า MIC และ MBC มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่า mode of action ของสารสกัดเหล่านี้แสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อมากกว่าการยับยั้งเชื้อ.

จากเชื้อราเอนโดไฟต์ที่จำแนกได้จากสมุนไพรรัง 3 ชนิด พบว่า เชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบบัวบก คือ NP-CA3-2 (*Stemphylium* sp.) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ และน่าจะมีการพัฒนาต่อยอด เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์ยา หรือเวชสำอางในโอกาสต่อไปในอนาคต.

5. ข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้เพื่อเสริมสร้างศักยภาพและขีดความสามารถในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยา, ยาสมุนไพร, อาหารเสริม หรือเวชสำอางของประเทศและเป็นการลดปริมาณการนำเข้าผลิตภัณฑ์ยาและเวชสำอางจากต่างประเทศ.

5.1 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากผลการทดลองจำแนกราเอ็นโดไฟต์จากพืชสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ บัวบก, สะเดา และยอ เพื่อศึกษากรรมวิธีการเลี้ยง, ศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และคุณสมบัติของสารสกัดหยาบทางในทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Photochemiluminescence, ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ, มะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้และมะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ ด้วยวิธี WST-assay ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 12 ชนิด ด้วยวิธี Agar dilution assay และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี Rat Ear Edema Model พบว่า จากราเอ็นโดไฟต์ที่จำแนกได้ทั้งหมด 34 ไอโซเลต สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางเภสัชที่ให้ผลแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อรา ที่มาและแหล่งผลิตของสมุนไพรแต่ละชนิด โดยสารสกัดหยาบจากราเอ็นโดไฟต์ไอโซเลต NP-CA3-2 ที่จำแนกได้จากบัวบกจากจังหวัดนครปฐม สามารถแสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิดในระดับสูง เหมาะที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาเพื่อรักษาโรคมะเร็งต่างๆ นอกจากนี้ ยังให้ผลในการลดการอักเสบสูงกว่าสารสกัดจากราเอ็นโดไฟต์อื่นๆ เมื่อจัดจำแนกราเอ็นโดไฟต์นี้โดยการวิเคราะห์ลำดับ DNA พบว่า ราเอ็นโดไฟต์ NP-CA3-2 คือ *Stemphylium* sp.

5.2 กลุ่มเป้าหมายการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ตารางที่ 24. กลุ่มเป้าหมายการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ รูปแบบการนำไปใช้ประโยชน์ และผลลัพธ์และผลกระทบที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

กลุ่มเป้าหมาย (ภาคอุตสาหกรรม/ บริการ/สังคมชุมชน)	หน่วยงานที่ เกี่ยวข้องกับการนำ ผลงานวิจัยไปใช้ ประโยชน์	รูปแบบการนำไปใช้ ประโยชน์/การนำไป ต่อยอดให้เกิด มูลค่าเพิ่ม	ผลลัพธ์จากการ นำไปใช้ประโยชน์	ผลกระทบที่คาดว่าจะ เกิดขึ้นทาง เศรษฐกิจ, สังคม และสิ่งแวดล้อม
บริษัทยา	มหาวิทยาลัยและ หน่วยงานวิจัยที่ เกี่ยวข้องกับ การแพทย์และ เภสัชศาสตร์	นำข้อมูลพื้นฐานจาก ผลงานวิจัยที่ได้มา ศึกษาเพิ่มเติมทาง เภสัชวิทยา เพื่อให้ สามารถขึ้นทะเบียน เป็นยา	ได้ยารักษาโรคมะเร็ง ได้ผลิตภัณฑ์ลด อาการอักเสบ	ลดมูลค่าการนำเข้า ยาจากต่างประเทศ
เกษตรกรและกลุ่ม เกษตรกรผู้ปลูก สมุนไพร	กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์	ส่งเสริมการ เพาะปลูกสมุนไพรที่ ศึกษา	เกษตรกรมีรายได้	เกษตรกรมีความ เป็นอยู่ดีขึ้น

นอกจากนั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสายพันธุ์ของเชื้อราเอนโดไฟต์, กรรมวิธีการเพาะเลี้ยงเพื่อให้สารออกฤทธิ์มีฤทธิ์คงที่ยาวนาน, การสกัดและแยกสารออกฤทธิ์ให้บริสุทธิ์ทั้งฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งและฤทธิ์ต้านการอักเสบเพื่อที่จะให้ทราบถึงสารที่ออกฤทธิ์อย่างเด่นชัด เพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ยา, ยาสมุนไพร, ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมหรือเวชสำอางค์ต่อไปในอนาคต.

6. เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มยาแก้ไข้ลดความร้อน สะเดา (สะเดาไทย). ม.ป.ป. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs_09_15.htm,
[เข้าถึงเมื่อ 16 มิถุนายน 2557].
- ชำนาญการกิจ, เต็มศรี. 2531. สถิติประยุกต์ทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บัวบก. 2557. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://ไทยสมุนไพร.net/wp-content/uploads/2012/09/บัวบก.jpg>, [เข้าถึงเมื่อ 6 พฤษภาคม 2557].
- มิติใหม่ ต้านมะเร็ง ด้วยสารราเอนโดไฟต์จากสมุนไพร. 2551. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
<http://www.phtnet.org/news51/view-news.asp?nID=403>,
[เข้าถึงเมื่อ 6 พฤษภาคม 2557].
- ยอ. 2557. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.panmai.com/Direction/Tree_SE_2.shtml,
[เข้าถึงเมื่อ 16 มิถุนายน 2557].
- สะเดา. 2533. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://tree76provincial.blogspot.com/2010_12_01_archive.html, [เข้าถึงเมื่อ 16 มิถุนายน 2557].
- Barbara, S.H., Christine, B., Siegfried, D. and Anne-KARSTEN, K., 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* **106**(9), pp. 996-1004.
- Brattsand R., Thalen A., Roempke K., Kallstrom, L. and Gruvstad, E., 1982. Influence of 16 α , 17 α - acetal substitution and steroid nucleus fluorination on the topical to systemic activity ratio of glucocorticoids. *J. Steroid Biochem.* **16**, pp. 779-786.
- Bruns T., Lee S and Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J, and White, T. J, eds. PCR Protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, pp. 315-322.
- Bush, L.P., Wilkiinson, H.H. and Schardl, C.L., 1997. Bioprotective Alkaloids of Grass-Fungal Endophytes Symbiosis. *Plant Physiol.* **114**, pp. 1-7.
- Castillo, U., Strobel, G.A., Ford, E.J., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, H., Albert, K., Robinson, R., Condrón, M.A., Teplow, D.B., Stevens, D. and Yaver, D., 2002. Munubicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces munumbi*, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiol.* **148**, pp. 2675-2685.

- Chander P. S., Verma, V. Amna, T., Nabi, Q. G. and Spiteller, M., 2005. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces Camptothecin. *J. Nat. Prod.* **68**(12), pp. 1717-1719.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Kantorova, M., Kolinska, R., Pazoutova, S., Honzatko, A., Havlicek, V. and Flieger, M., 2002. Ergot alkaloids produced by submerged cultures of *Claviceps ziziniiae*. *J. Nat. Prod.* **65**, pp. 1039-1040.
- Kim, S.K., Ryu, S.Y., No, J., Choi, S.U. and Kim, S.U., 2001. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata* Thunb. *Arch. Pharm. Res.* **24**(6), pp. 518-521.
- Kumala, S., Utji, R., Sudarmono, P. and Kardono, L.B.S., 2007. Cytotoxicity secondary metabolites from fermentation broth of *Brucea javanica* endophyte fungus 1.2.11. *Research Journal Microbiology.* **2**(8), pp. 625-631
- Lee, J., Lobkovsky, E., Pliam, N.B., Strobel, G.A. and Clardy, J., 1995. Subglutinols A and B: Immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *J. Org. Chem.* **60**, pp. 7076-7077.
- Lee, J.C., Strobel, G.A., Lobkovsky, E. and Clardy, J., 1996. Torreyanic acid: A selectively cytotoxic quinine dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *J. Org. Chem.* **61**, pp. 3232-3233.
- Lu, H., Zou, W.X., Meng, J.C., Hu, J. and Tan, R.X., 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Sci.* **151**, pp. 67-73.
- Nobel, H.M., Langley, D., Sidebottom, P.J., Lane, S.J. and Fisher, P.J., 1991. An echinocandin from an endophytic *Cryptosporiopsis* sp. and *Pezizula* sp. in *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. *Mycol. Res.* **95**(12), pp. 1439-1440.
- Roche. 2014. [online]. Available at: <http://www.roche-applie science.com/shop/products/cell-proliferation-reagent-wst-1>, [accessed 5 March 2014].
- Okane, I., Nakagiri A., and Ito, T., 1996. *Discostroma tricellulare*, 2 endophytic ascomycete with a *Seimatosporium* anamorph isolated from *Rhododendron*. *Can. J. Bot.* **74**, pp. 1338-1344.

- Ozdemir, K.G., Yilmaz, H., and Yilmaz, S., 2008. *In Vitro* Evaluation of Cytotoxicity of SoftLining Materials on L929 Cells by MTT Assay. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterial*, pp. 82-86.
- Plumb, J.A., 2004. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods in Molecular Medicine: Cytotoxic Drug Resistance Mechanisms*. **28**, pp. 25-30.
- Popovang G. 1999. Antioxidative Homeostasis: Characterization by Means of Chemiluminescent Technique. In Packer, L., ed. *Methods in Enzymology Volume 300. Oxidants and antioxidants Part B*. New York: Academic Press, pp. 437-456.
- Schulz, B., Draeger, W.S. and Aust, H.J., 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness surface sterilization methods. *Mycol. Res.* **97**(12), pp. 1447-1450.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J., 2004. Natural product from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* **67**, pp. 257-268.
- Strobel, G., Ford, E.J., Worapong, J., Harper, J.K., Arif, A.M., Grant, D.M., Fung, P.C.W. and Chua, R.M.W., 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*. **60**, pp. 179-183.
- To-anun, C, Takamatsu, S. and Kunoh, H., 1999 . Hydrolysates released from fungal cell wall induced changes in tomato leaves. *Proceedings of The 1 st HSA Symposium on Science and Technology*, 124 p.
- White T.J., 2014. CCDB Protocol. [online]. Available at: <http://www.ccdb.ca/docs/CCDBPrimerSets-Plants.pdf> / White TJ, [accessed 5 March 2014].