ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากพืชบางชนิดในสกุล *Cassia* ทับทิม และว่านน้ำ

Antimicrobial Activities of Crude Extracts from Some Species of *Cassia* , *Punica granatum* Linn. and *Acorus calamus* Linn.

นงค์เยาว์ ภู่เจนจบ

Nongyao Pujenjob

...er Key 25813
...ib Key 170996

ก
เลขหมู่ QR97.A62 น22
เลขทะเบียน 2542 ฉ.2
28 มี.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Microbiology
Prince of Songkla University

2542

ชื่อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากพืชบางชนิดในสกุล *Cassia* ทับทิม และว่านน้ำ
ผู้เขียน นางสาวนงค์เยาว์ ภู่เงินจบ
สาขาวิชา จุลชีววิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..............................ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

..............................กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล)

คณะกรรมการสอบ

..............................ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

..............................กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล)

..............................กรรมการ
(ดร.เมตตา องค์สกุล)

..............................กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ถนอมจิต สุภาวิตา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากพืชบางชนิดในสกุล *Cassia* ทับทิม และว่านน้ำ

ผู้เขียน นางสาวนงค์เยาว์ ภู่เจนจบ

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2542

บทคัดย่อ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบเมธานอลจากใบพืชสกุล *Cassia* 7 ชนิด เปลือกผลทับทิม (*Punica granatum* Linn.) และ AWE3 จากส่วนของเหง้าว่านน้ำ (*Acorus calamus* Linn.) ที่ผ่านกระบวนการทางโครมาโทกราฟี ต่อแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่ก่อโรค พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านราก่อโรคกลาก (*Trichophyton rubrum* และ *Microsporum gypseum*) และ *Penicillium marneffei* แต่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยีสต์ต่ำ

สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีที่สุด สามารถยับยั้ง methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, enteroinvasive *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.62, 1.25 และ1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดว่านน้ำ AWE3 สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* Linn.) ใบชัยพฤกษ์ (*C. fistula* Linn.) ใบทรงบาดาล (*C. surattensis* Burm.f.) และใบกาลพฤกษ์ (*C. grandis* Linn.f.) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่ำ มีค่า MIC 5 ถึงมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านยีสต์มีเพียงชนิดเดียว คือสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 สามารถยับยั้ง *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.12 - 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดจากพืชทั้ง 9 สาร มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 สามารถยับยั้งการเจริญของสายรา *Trichophyton rubrum, Microsporum gypseum* และ *Penicillium marneffei* ได้ดีที่สุดและยับยั้งได้ใกล้เคียงกัน

มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.18, 0.12 และ 0.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ยับยั้ง *T. rubrum* และ *M. gypseum* รองลงมา มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.49 และ 0.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ยับยั้ง *P. marneffei* ได้ไม่ดี มีค่า EC_{50} เท่ากับ 6.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำAWE3 สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมและใบชุมเห็ดเทศสามารถยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ได้ใกล้เคียงกันมีค่า EC_{50} ระหว่าง 0.08-0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนชนิดส่องกราด พบว่าสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 และใบชุมเห็ดเทศมีผลทำให้สายราทั้ง 3 ชนิด และ macroconidia ของ *M. gypseum* มีลักษณะผิดปกติ หดตัวเหี่ยวย่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดทำให้เกิดการรั่วไหลของของเหลวภายในเซลล์

Thesis Title	Antimicrobial Activities of Crude Extracts from Some Species of *Cassia*, *Punica granatum* Linn. and *Acorus calamus* Linn.
Author	Miss Nongyao Pujenjob
Major Program	Microbiology
Academic Year	1999

Abstract

The crude methanolic extracts of leaves of 7 *Cassia* species, pericarp of *Punica granatum* Linn., and AWE3, a chromatographic fraction of the crude methanolic extract of *Acorus calamus* Linn. rhizomes were investigated for their antimicrobial activities on several pathogenic microorganisms including bacteria, yeasts and filamentous fungi. Most of the extracts exhibited high activity against filamentous fungi; dermatophytic fungi and *Penicillium marneffei* but showed low activity against bacteria and yeasts.

The extract of *P. granatum* pericarp was found to be the most effective against bacteria. It inhibited methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, enteroinvasive *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* with the MIC values of 0.62, 1.25, and 1.25 mg/ml, respectively. In contrast the AWE3 of *A. calamus* and the leaf extracts of *Cassia alata* Linn., *C. fistula* Linn., *C. surattensis* Burm.f. and *C. grandis* Linn.f. demonstrated low antibacterial activity with the MIC values of 5 to more than 10 mg/ml.

AWE3 of *A. calamus* was the only extract that presented activity against yeasts; *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with the MIC of 0.12 to 1.00 mg/ml.

The most effective extract against *Trichophyton rubrum, Microsporum gypseum* and *Penicillium marneffei* was AWE3. The 50 % effective concentration (EC_{50}) of the

mycelial growth inhibition of the three fungi were 0.18, 0.12 and 0.41 mg/ml, respectively. The second most effective extract against *T. rubrum* and *M. gypseum* was the leaf extract of *C. alata,* however, it exhibited low activity against *P. marneffei* with the EC_{50} of 6.60 mg/ml. In addition , it was found that AWE3 , extracts of *P. granatum* pericarp and *C. alata* leaves inhibited the macroconidia germination of *M. gypseum* with the EC_{50} values of 0.08 to 0.09 mg/ml. The inhibition of hyphal growth and macroconidia germination were observed by scanning electron microscope. The treated mycelia and macroconidia with AWE3 and the *C. alata* leaf extracts were shrunken and collapsed which might due to the cell leakage.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งต่อ รศ.ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาในการศึกษาวิจัย การเขียนและการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ ดร.เมตตา องค์สกุล และ รศ.ถนอมจิต สุภาวิตา กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้ถ่ายทอดความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำการวิจัย และเพื่อนๆ ทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์

ขอบคุณน้องชายทั้งสองที่ช่วยทั้งกำลังกายและกำลังใจ และที่สำคัญขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังกาย และกำลังใจจนสำเร็จการศึกษา

นงค์เยาว์ ภู่เจนจบ

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ.. (3)
Abstract.. (5)
กิตติกรรมประกาศ.. (7)
สารบาญ.. (8)
รายการตาราง.. (9)
รายการภาพประกอบ.. (10)
บทที่
1. บทนำ.. 1
บทนำต้นเรื่อง.. 1
การตรวจเอกสาร.. 2
วัตถุประสงค์.. 22
2. วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ.. 23
วัสดุ.. 23
อุปกรณ์.. 25
วิธีการ.. 27
3. ผลการทดลอง 39
4. วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง.. 80
บรรณานุกรม.. 90
ภาคผนวก.. 100
ประวัติผู้เขียน.. 120

รายการตาราง

ตาราง หน้า

1. พืชสมุนไพร และร้อยละของสารที่สกัดได้.. 40
2. การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยวิธี disc diffusion......... 42
3. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรีย และยีสต์ของสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ โดยวิธี disc diffusion.. 48
4. ค่า MIC และ MBC หรือ MFC ของสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ และยาต้านจุลินทรีย์ โดยวิธี agar dilution.. 56
5. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum, M. gypseum* และ *P.marneffei*.. 59
6. ค่า EC_{50} ของสารสกัด และยามาตรฐานในการยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum, M. gypseum* และ *P.marneffei*.. 60
7. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งการงอกของ macroconidia และความยาว germ tube ของ macroconidia ของ *M. gypseum* ของสารสกัดและยามาตรฐาน.. 65
8. ค่า EC_{50} ของสารสกัด และยามาตรฐานในการยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum*.. 66
9. ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืช และยา miconazole ต่อความอยู่รอดของของ macroconidia ของ *M. gypseum*.. 69

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า

1. ว่านน้ำ (*Acorus calamus* Linn.)........ 3
2. ทับทิม (*Punica granatum* Linn.)........ 4
3. ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* Linn.)........ 6
4. ชุมเห็ดไทย (*C. tora* Linn.)........ 8
5. ชัยพฤกษ์ (*C. fistula* Linn.)........ 10
6. ขี้เหล็ก (*C. siamea* Britt.)........ 12
7. ทรงบาดาล (*C. surattensis* Burm.f.)........ 13
8. กัลปพฤกษ์ (*C. bakeriana* Craib.)........ 14
9. กาลพฤกษ์ (*C. grandis* Linn.f.)........ 15
10. การเตรียมสไลด์หลุม........ 33
11. การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยวิธี disc diffusion........ 43
12. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดว่านน้ำ AWE3 โดยวิธี disc diffusion........ 49
13. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้าน Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)ของสารสกัดจากทับทิม ชุมเห็ดเทศ และทรงบาดาล โดยวิธี disc diffusion........ 53
14. ขนาดโคโลนีของเชื้อราในสไลด์หลุม เมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศ เหง้าว่านน้ำ AWE3........ 61
15. ขนาดโคโลนีของเชื้อราในสไลด์หลุม เมื่อทดสอบกับยา miconazole... 62
16. ลักษณะ macroconidia ของ *M. gypseum* ย้อมสี lactophenol cotton blue........ 67
17. ลักษณะ macroconidia ของ *M. gypseum* เมื่อย้อมสี MTT........ 70

18. โคโลนีของ *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P.marneffei* เมื่อทดสอบ
กับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 และใบชุมเห็ดเทศ..................... 72
19. ลักษณะของสายรา *T. rubrum* ย้อมด้วย lactophenol cotton blue........... 73
20. ลักษณะของสายรา *M. gypseum* ย้อมด้วย lactophenol cotton blue.........74
21. ลักษณะของสายรา *P.marneffei* ย้อมด้วย lactophenol cotton blue......... 75
22. ลักษณะของสายรา *T. rubrum* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน
ชนิดส่องกราด... 76
23. ลักษณะของสายรา *M. gypseum* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน
ชนิดส่องกราด... 77
24. ลักษณะของสายรา *P.marneffei* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน
ชนิดส่องกราด... 78
25. ลักษณะ macroconidia ของ *M. gypseum* เมื่อดูด้วยกล้อง
จุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด.. 79

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันปัญหาเรื่องโรคติดเชื้อยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญในการรักษาโรคของผู้ป่วยในโรงพยาบาลต่างๆ จากการศึกษาในโรงพยาบาลหลายแห่งพบว่าค่าใช้จ่ายสำหรับยาปฏิชีวนะมีมูลค่าสูงถึงร้อยละ 20-40 ของมูลค่ายาทั้งหมด (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2535) และมีแนวโน้มจะเพิ่มสูงขึ้นตลอดเวลา ยาปฏิชีวนะ และสารเคมีสังเคราะห์ต่างๆที่ใช้รักษาโรคติดเชื้ออยู่ในปัจจุบันมีโอกาสชักนำให้เกิดการดื้อยา และเกิดอันตรายจากผลข้างเคียงของยาด้วย ดังนั้นจึงมีการหันมาสนใจและทำการศึกษาเกี่ยวกับสมุนไพรไทยรวมถึงการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆมากขึ้น ซึ่งสมุนไพรที่ใช้ส่วนใหญ่จะอ้างอิงข้อมูลจากตำรายาแผนโบราณ แต่พบว่าผลการรักษาไม่แน่นอน และต้องใช้พืชสมุนไพรในปริมาณมาก เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อก่อโรคติดเชื้อที่มีในสมุนไพรนั้นมีปริมาณน้อย การศึกษาการใช้พืชสมุนไพรไทยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคนี้ได้มีรายงานการศึกษามานานแล้ว สำหรับพืชในสกุล *Cassia* ที่รู้จักกันดีคือ ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* Linn.) ซึ่งใช้รักษาโรคกลากได้ผลดี และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วย Crockett และคณะ (1992) รายงานว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Candida albicans* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในคนไข้โรคเอดส์ได้ สารสกัดจากใบชัยพฤกษ์ (*Cassia fistula* Linn.) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* ได้ (นันทวัน, 2534 a) ส่วนสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ และเปลือกผลทับทิมก็มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Anesini and Perez, 1993; Grosvenor *et al.*, 1995) พืชที่กล่าวมาแล้วข้างต้นพบทั่วไปในประเทศไทย และมีสรรพคุณทางตำรายาแผนโบราณด้วย (วิทย์, 2531; นันทวัน, 2534 a และ b) จึงน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคติดเชื้อ ข้อมูลจากการศึกษาที่ได้จะเป็น

ประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาการผลิตยาสมุนไพรไทย และการส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพรไทยให้แพร่หลายมากขึ้น

การตรวจเอกสาร

การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสมุนไพรไทยในครั้งนี้ เลือกศึกษาเฉพาะว่านน้ำ (*Acorus calamus* Linn.) โดยศึกษาส่วนของเหง้า ส่วนทับทิม (*Punica granatum* Linn.) ทำการศึกษาส่วนของเปลือกผล และพืชในสกุล *Cassia* 7 ชนิดได้แก่ *C. alata, C. tora, C. fistula, C. siamea, C. surattensis, C. bakeriana* และ *C. grandis* โดยทำการศึกษาเฉพาะส่วนของใบเท่านั้น เนื่องจากสามารถหาใบได้ง่าย และมีปริมาณมาก

1. พืชสมุนไพร

1.1 ว่านน้ำ

ว่านน้ำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Acorus calamus* Linn. วงศ์ Araceae อาจเรียกว่า กะส้มชื่น คาเจี้ยงจี้ ผมผา หรือ แปะเชียง (จีน)

ว่านน้ำเป็นพืชล้มลุก มีเหง้าเจริญตามยาวขนานกับผิวดินเป็นเส้นกลมหนา มีกลิ่นหอม ใบเป็นเส้นตรงยาว ปลายใบแหลม ดอกออกเป็นช่อลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอก (ภาพประกอบ 1) พบขึ้นอยู่ตามริมหนองน้ำที่ชื้นแฉะ หรือบ่อบึงที่เป็นดินเลน (วิทย์, 2531; สมสุข, 2534; พร้อมจิต, 2535; พเยาว์, 2537 และ วีระชัย, 2540)

ภาพประกอบ 1 ว่านน้ำ (*Acorus calamus* Linn.) (พร้อมจิต, 2535)

สรรพคุณตามตำรายาแผนโบราณ มีดังนี้ (วิทย์, 2531; พเยาว์, 2534; สมสุข, 2534; พร้อมจิต, 2535 และวีระชัย, 2540)

- เหง้า : ยาขับลม แก้ธาตุพิการ ขับเสมหะ แก้ท้องอืดเฟ้อ แก้ปวดท้อง ท้องเสีย ปวดฟัน เลือดออกตามไรฟัน โรคบิด ไอ ปวดตามข้อ แผลมีหนอง ขับพยาธิ บำรุงโลหิต
- น้ำมันจากต้น : แก้อาการชัก ระงับปวด
- ราก : แก้ปวดฟัน แก้หวัดลงคอ หลอดลมอักเสบ
- ใบ : ตำสุมกระหม่อมเด็ก แก้หวัดคัดจมูก, แก้อาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ

Grosvenor และคณะ (1995) พบว่าสารสกัดจากใบ และเหง้า สามารถยับยั้งการเติบโตของ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ และสามารถแยกสาร phenylpropane ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบได้

มีการศึกษาพบว่าเหง้าว่านน้ำมีน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 2-4 ที่ประกอบด้วยสารประเภท sesquiterpene เช่น shyobunones, acorones, acoramone, asarylaldehyde,

asarone, calamene, calamol, eugenol, camphene calamendiol, camphor, acoronone, acorin, γ-asarone, *cis*-asarone, *trans*-asarone และ *β*-asarone (2,4,5-trimethoxypropenylbenzenes) ซึ่งสาร *β*-asarone นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ และการใช้อาหารของ cutworm นอกจากนี้สารตัวนี้ยังมีฤทธิ์ต้านราอีกด้วย (อรุณพร, 2532; สมพร, 2536; Patra and Mitra, 1981; Ohmoto and Sung, 1982; Keller and Stahl, 1983; Koul *et al.*, 1990; Risha *et al.*, 1990)

1.2 ทับทิม

ทับทิม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Punica granatum* Linn. วงศ์ Punicaceae อาจเรียกว่า มะเก๊าะ (ภาคเหนือ) พิลา (หนองคาย) หรือ เซียะลิ้ว (จีน)

ทับทิมเป็นไม้พุ่มขนาดกลาง ตามกิ่งและยอดเป็นเหลี่ยม หรือมีหนามแหลม ใบเรียวเป็นมันมีขนาดเล็ก ขอบใบเรียบ ยอดอ่อนมีสีแดง ดอกออกเป็นช่อหรือเดี่ยว กลีบดอกสีส้ม (ภาพประกอบ 2) ผลค่อนข้างกลม ผิวเปลือกหนา ปลูกเป็นไม้ประดับในบริเวณบ้าน (วิทย์, 2531; สมสุข, 2534; พร้อมจิต, 2535; พเยาว์, 2537; มาโนช, 2537 และวันดี, 2539)

ภาพประกอบ 2 ทับทิม (*Punica granatum* Linn.)

สรรพคุณตามตำรายาแผนโบราณ มีดังนี้ (วิทย์, 2531; สมสุข, 2534; พร้อมจิต, 2535; ภูมิพิชญ์, 2536; มาโนช, 2537 และวันดี, 2539)

- เปลือกต้น : ยาถ่ายพยาธิตัวตืดและตัวกลม
- ใบสด : ใช้ล้างแผลหนองเรื้อรังบนหัว ใช้พอกแผลถลอก
- ดอก : แก้หูชั้นในอักเสบ โรยบาดแผลที่มีเลือดออก
- เปลือกผล : ใช้แก้ท้องเสีย ถ่ายเป็นมูกเลือด ถ่ายพยาธิ ตกขาว กลากเกลื้อน
- เปลือกราก : ยาถ่ายพยาธิตัวตืด แก้ระดูขาว ตกเลือด ท้องเสีย โรคบิด
- เนื้อหุ้มเมล็ด : แก้โรคลักปิดลักเปิด
- เมล็ด : แก้จุกแน่น แก้ท้องร่วง ทำให้เจริญอาหาร

ผลของทับทิมนอกจากจะรับประทานได้แล้ว ยังสามารถนำส่วนเปลือกของผลมาใช้ประโยชน์ได้อีกโดย De-Amorim และ Borba (1993) พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกผลทับทิม ราก และเปลือกไม้มีฤทธิ์ต้านพยาธิตัวตืดได้ Anesini และ Perez (1993) รายงานว่าสารสกัดจากเปลือกของผลทับทิมด้วยน้ำ สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, E. coli* และ *Aspergillus niger* ได้ สารสกัดจากเปลือกราก และเปลือกผลด้วยแอลกอฮอล์นั้นยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa, S. aureus* และ *E. coli* ได้อีกด้วย (วิทย์, 2531)

สารประกอบในเปลือกผลทับทิมเป็นพวกแทนนิน และกรดแทนนิก (อรุณพร, 2532; พร้อมจิต, 2535และวันดี, 2539) Zhang และคณะ (1995) พบว่าสารแทนนิน จากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ต้าน herpes virus

1.3 ชุมเห็ดเทศ

ชุมเห็ดเทศ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cassia alata* Linn. วงศ์ Caesalpiniaceae ชื่อพื้นเมืองเรียก ขี้คาก ลับมืนหลวง หรือ หมากกะลิงเทศ

ชุมเห็ดเทศเป็นไม้พุ่มสูง มีช่อดอกซ้อนกันหลายชั้นสีเหลืองคล้ายเทียนบูชาพระ ใบเป็นใบประกอบ ใบย่อยเป็นรูปไข่ มีขอบขนานกันรูปรี โคนใบ และปลายใบมน ขอบใบเรียบ (ภาพประกอบ 3) ผลเป็นฝักยาวมีครีบ 4 ครีบ ภายในมีเมล็ดเป็นรูปสามเหลี่ยม

พบขึ้นอยู่ทั่วไปตามที่ชุ่มชื้น มักนิยมปลูกเป็นไม้ประดับ (วิทย์, 2531; นันทวัน, 2534 a; พร้อมจิต, 2535; ภูมิพิชญ์, 2536 และวันดี, 2537)

ภาพประกอบ 3 ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* Linn.)

สรรพคุณตามตำรายาแผนโบราณ มีดังนี้ (วิทย์, 2531; นันทวัน, 2534 a; สมสุข, 2534; ภูมิพิชญ์, 2536 และวันดี, 2537)

- ราก : แก้หิดและสิว แก้โรคผิวหนัง แก้กลากเกลื้อน ยาระบาย ขับปัสสาวะ ขับเสมหะ
- ต้น : แก้คุดทะราด กลากเกลื้อน ขับพยาธิ แก้กษัยเส้น แก้ท้องผูก ขับปัสสาวะ
- ใบ : แก้กลากเกลื้อน แก้กษัยเส้น ขับปัสสาวะ ขับเสมหะ ยาระบาย รักษาผิวหนังอักเสบ กระเพาะอาหารอักเสบ ฝี และแผลพุพอง
- ดอก : ยาระบาย ขับเสมหะ
- ฝัก : ขับพยาธิ รักษากลาก
- เมล็ด : แก้ท้องผูก แก้โรคผิวหนัง ขับพยาธิ รักษากษัยเส้น รักษาหิดและเหา ขับเสมหะ เป็นยาระบาย ช่วยให้เจริญอาหาร

- ทั้งต้น : รักษาซาง โรคผิวหนัง ขับเสมหะ รักษาริดสีดวง ฟกบวม ขับพยาธิ รักษาดีซ่าน ฝี ถ่ายพิษตานซาง
- เปลือกต้น : ขับน้ำเหลืองเสีย

การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์นั้น มีรายงานว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ความเข้มข้น 20%w/v สามารถยับยั้งเชื้อราชนิดก่อโรคกลาก (dermatophytes) ได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum* และ *Microsporum gypseum* ได้ดีกว่าเชื้อราชนิดอื่นๆ เช่น *Fusarium solani, Aspergillus niger, Cladosporium werneckii, Penicillium* sp. และสารสกัดใบชุมเห็ดเทศ ด้วยน้ำความเข้มข้น 5% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. mentagrophytes* ได้เช่นกัน (นันทวัน, 2534 a; Palanichamy and Nagarajan, 1990; Ibrahim and Osman, 1995) และสารสกัดจากใบสามารถรักษาโรคเกลื้อนได้ดี และไม่มีผลข้างเคียง (Damodaran and Venkataraman, 1994)

นอกจากนี้แล้วสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศก็ยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *S. aureus, Bacillus subtilis, Serratia marcescens, E. coli, Klebsiella pneumoniae* และยีสต์ คือ *C.albicans* ได้ด้วย (นันทวัน, 2534 a; Crockett *et al.*, 1992; Grosvenor *et al.*, 1995)

มีการศึกษาเกี่ยวกับสารประกอบของใบชุมเห็ดเทศ พบว่าประกอบด้วย rhein, chrysophanol, emodin และ aloe-emodin (Hauptmann and Nazario, 1950 และอรุณพร, 2532) นอกจากนี้ยังพบสารอื่นๆได้แก่ สาร kaempferol, sitosterol, physion monoglucoside, isochrysophanol, 4,5-dihydroxy-2-hydroxymethylanthraquinone, 4,5-dihydroxy-1-hydroxymethylanthraquinone และ deoxycoeluatin (นันทวัน, 2534 a) Palanichamy และ Nagarajan (1990) รายงานว่าฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลากของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศน่าจะเป็นผลมาจากสาร chrysophanol ที่มีอยู่ในใบ

1.4 ชุมเห็ดไทย

ชุมเห็ดไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cassia tora* Linn. วงศ์ Caesalpiniaceae ชื่อพื้นเมืองเรียก ชุมเห็ดควาย ชุมเห็ดนา หรือ ชุมเห็ดเล็ก

ชุมเห็ดไทยเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก จัดเป็นพืชเขตร้อน ใบเป็นใบประกอบ ใบย่อยมีขนาดเล็กรูปกลมมน ดอกสีเหลือง (ภาพประกอบ 4) ผลเป็นฝักรูปทรงกระบอกค่อนข้างโค้ง เมล็ดรูปทรงกระบอกรูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน พบทั่วไปในประเทศไทยบริเวณที่ราบ (วิทย์, 2531; นันทวัน, 2534 b; เสรี, 2534 และ ภูมิพิชญ์, 2536)

ภาพประกอบ 4 ชุมเห็ดไทย (*Cassia tora* Linn.) (พร้อมจิต, 2535)

สรรพคุณตามตำรายาแผนโบราณ มีดังนี้ (วิทย์, 2531; นันทวัน, 2534 b; เสรี, 2534; พร้อมจิต, 2535 และภูมิพิชญ์, 2536)

- ทั้งต้น : ยาระบาย ขับปัสสาวะ แก้โรคผิวหนัง แก้ไข้ แก้ตานซาง แก้คุดทะราด แก้เสมหะ
- ต้น : ยาระบาย แก้ไอ
- ใบ : ยาระบาย แก้โรคผิวหนังต่าง ๆ ขับปัสสาวะ บำรุงประสาท แก้อาการเมาเห็ด แก้จุกเสียด บิดตกมูกเลือด แก้ไอ แก้หืดหอบ แก้ฟกบวม

แก้ตานซาง ช่วยให้เจริญอาหาร

- ผล : แก้ฟกบวม กลากเกลื้อน ริดสีดวง ผมร่วง อาการคัน
- เมล็ด : บำรุงหัวใจ ขับพยาธิในเด็ก แก้ไข้ แก้เสมหะ แก้หืด แก้คุดทะราด รักษาโรคผิวหนัง แก้ท้องผูก แก้ฟกบวม ขับปัสสาวะ บำรุงไต ยาระบาย รักษาโรคความดันโลหิตสูง
- ราก : แก้ตานขโมย มูกเลือด รักษาโรคผิวหนัง ขี้กลากทุกชนิด แก้ไข้ ขับปัสสาวะ
- เปลือก : แก้โรคผิวหนัง คุดทะราด กลาก หิด

Mukherjee และคณะ (1996) พบว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดไทย สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans*, *A. niger*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *T. mentagophytes*

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบ พบว่าประกอบด้วย 1,6,8-trihydroxy-3-methylanthraquinone, emodin, chrysophanic acid, proteins (นันทวัน, 2534 b)

1.5 ชัยพฤกษ์ หรือคูน

ชัยพฤกษ์ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cassia fistula* Linn. วงศ์ Caesalpiniaceae ชื่อพื้นเมืองเรียก ลมแล้ง ราชพฤกษ์ ลักเคย หรือ ปูโย

ชัยพฤกษ์เป็นไม้ยืนต้น ใบเป็นใบประกอบ ใบย่อยเป็นรูปไข่ปลายใบแหลม ดอกออกเป็นพวงสีเหลืองเป็นช่อห้อยระย้าลงมา ผลเป็นฝักรูปทรงกระบอกยาว ผิวเรียบไม่มีขน (ภาพประกอบ 5) (วิทย์, 2531; นันทวัน, 2534 a; สมสุข, 2534; เสรี, 2534; พร้อมจิต, 2535; มาโนช, 2537 และวันดี, 2539)

ภาพประกอบ 5 ชัยพฤกษ์ (*Cassia fistula* Linn.)

สรรพคุณตามตำรายาแผนโบราณ มีดังนี้ (วิทย์, 2531; นันทวัน, 2534 a; สมสุข, 2534; เสรี, 2534; พร้อมจิต, 2535; มาโนช, 2537 และวันดี, 2539)

- ราก : แก้ลงท้อง ฝีเปื่อย บวม ตกโลหิต แก้ไข้ รักษาโรคหัวใจ อาการหายใจขัด ขับพยาธิ รักษากลากเกลื้อน ยาถ่าย ยาระบาย แก้คุดทะราด แก้ปวดข้อและลมเข้าข้อ
- เปลือกต้น : ยาคุมธาตุ ฝาดสมานแก้ท้องร่วง ขับพยาธิ แก้ไข้ คุดทะราด โรคในทรวงอก แก้ปวดเบ่ง บิดมูกเลือด บำรุงโลหิต ยาสมานแผล ยาช่วยเร่งคลอด
- แก่น : ขับพยาธิไส้เดือน แก้ธาตุพิการ ท้องเสีย รักษาโรคผิวหนัง และใช้เป็นยานอนหลับ
- กระพี้ : แก้รำมะนาด
- ใบ : ฆ่าเชื้อโรค ขับพยาธิ แก้เส้นพิการ อัมพาต และโรคเกี่ยวกับสมอง ยาถ่าย รักษากลากวงแหวน ฆ่าเชื้อโรคที่ผิวหนัง
- ดอก : รักษาบาดแผลเรื้อรัง แก้ไข้ แก้ลงท้อง ฝีเปื่อยบวม ขับพยาธิ แก้อาการตกโลหิต ยาระบาย
- เปลือกฝัก : ใช้สมานแผล แก้อาการเบื่อเมา

- ฝัก : ใช้เป็นยาถ่าย แก้ลงท้อง ฝีเปื่อย แก้อาการตกเลือด แก้ร้อนในกระหายน้ำ ถ่ายลม จุกเสียด ถ่ายเลือดเสีย ถ่ายพิษไข้ แก้กษัย ขับเสมหะ ถ่ายน้ำเหลืองเสีย รักษาโรคลมเพลมพัด รักษาโรคหนองใน กามโรค ฝีหนอง ขับพยาธิ รักษาโรคตานขโมย และโรคมาลาเรีย
- เมล็ด : ทำให้อาเจียนแก้อาการเบื่อเมา ยาระบาย
- เปลือกราก : ยาระบาย รักษาโรคไข้มาลาเรีย

มีรายงานว่าสารสกัดจากใบคูนด้วยอัลกอฮอล์ 95% สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *S. albus*, *S. aureus* และ *Salmonella typhimurium* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* (นันทวัน, 2524 a)

การศึกษาเกี่ยวกับสารประกอบในใบคูน พบว่ามีสารประกอบ chitorin, kaempferol-3-O-β-D-glucoside, kaempferol-3-O-β-D-neohesperidoside, rhein, rhein glucoside, sennoside, chrysophanic acid, vicenin (6,8-di-C-glucosylapigenin), kaempferol-3-glucoside, kaempferol-3-rhamnoside, kaempferol-3-robinobioside-7-rhamnoside, myricetin, quercetin, quercetin-3-rutinoside, quercetin-3-xyloside, 3-neohesperidoside, steroides, phenolic esters, pigment, D-xylose, cellulose และ tannins (ประภาศรี, 2523 และนันทวัน, 2534 a)

1.6 ขี้เหล็ก

ขี้เหล็ก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cassia siamea* Britt. วงศ์ Caesalpiniaceae ชื่อพื้นเมืองเรียกว่า ขี้เหล็กบ้าน ขี้เหล็กใหญ่ ผักจี้ลี้ หรือ ยะหา

ขี้เหล็กเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ใบเป็นใบประกอบ ใบย่อยรูปขอบขนาน ปลายมนหยักเว้าเล็กน้อย ดอกเป็นช่อสีเหลือง (ภาพประกอบ 6) ผลเป็นฝักแบนหนา นิยมปลูกทั่วไปในประเทศไทย (วิทย์, 2531; ภูมิพิชญ์, 2536; พเยาว์, 2537; มาโนช, 2537 และวีระชัย, 2540)

ภาพประกอบ 6 ขี้เหล็ก (*Cassia siamea* Britt.) (พร้อมจิต, 2535)

สรรพคุณตามตำรายาแผนโบราณ มีดังนี้ (วิทย์, 2531; สมสุข, 2534; เสรี, 2534; พร้อมจิต, 2535 และมาโนช, 2537)

- ดอกตูม และใบอ่อน	: ช่วยระบายท้อง ขับปัสสาวะ รักษานิ่ว
- ดอกตูม	: ทำให้นอนหลับ เจริญอาหาร ลดความดันโลหิต แก้หืด
- ใบ	: แก้ระดูขาว แก้นิ่ว ขับปัสสาวะ
- ฝัก	: แก้ท้องร่วง
- แก่น	: ยาระบาย แก้ไข้ รักษากามโรค แก้โรคผิวหนัง เป็นยานอนหลับ
- ราก	: ใช้ระงับอาการชัก

จากการตรวจเอกสารไม่ปรากฏรายงานการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในคน ขวัญใจ และคณะ (2537) ได้ศึกษาสารสกัดจากลำต้น ดอก และใบขี้เหล็กบ้านด้วย ethanol พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งก่อโรคแอนแทรคโนสมะม่วงได้

ใบอ่อนของขี้เหล็กประกอบด้วย barakol (ชัยโย, 2522) chrysophanic acid, rhein, aloe-emodin, physion และ kaempferol (อรุณพร, 2532)

1.7 ทรงบาดาล

ทรงบาดาล มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cassia surattensis* Burm.f. วงศ์ Caesalpiniaceae อาจเรียก Kalamona หรือ Scrambled Eggs.

ทรงบาดาลเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ใบเป็นใบรวม ดอกเป็นแบบช่อตั้งสีเหลืองเข้ม (ภาพประกอบ 7) ฝักแบนยาวคล้ายฝักส้มป่อย นิยมปลูกเป็นไม้ประดับริมทาง และสวนสาธารณะ (สมสุข, 2534 และภูมิพิชญ์, 2536)

ภาพประกอบ 7 ทรงบาดาล (*Cassia surattensis* Burm.f.) (วีระชัย, 2540)

สรรพคุณตามตำรายาแผนโบราณ มีดังนี้ (สมสุข, 2534 และ ภูมิพิชญ์, 2536)

- ราก : รักษาไข้ แก้สะอึก
- ทั้งต้น,ใบ : รักษาอาการบวม ถอนพิษจากแมลงสัตว์กัดต่อย ปวดศีรษะ ตาแดง ท้องผูก บรรเทาอาการไอ หอบ
- ฝัก, เมล็ด : ยาระบาย แก้ปวดท้อง ยาบำรุงกระเพาะ

จากการตรวจเอกสารไม่ปรากฏรายงานการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในคน ขวัญใจ และคณะ (2537) ได้ศึกษาสารสกัดจากลำต้น ดอก และใบทรงบาดาล

ด้วย ethanol พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ และไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารประกอบที่มีในใบทรงบาดาล

1.8 กัลปพฤกษ์

กัลปพฤกษ์ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cassia bakeriana* Craib. วงศ์ Caesalpiniaceae

กัลปพฤกษ์เป็นไม้ขนาดย่อม ใบเป็นใบประกอบคล้ายขนนก ดอกเมื่อแรกบานมีสีชมพูแล้วสีจะค่อยจางลงจนเป็นสีขาวเมื่อใกล้โรย (ภาพประกอบ 8) (ภูมิพิชญ์, 2540)

ภาพประกอบ 8 กัลปพฤกษ์ (*Cassia bakeriana* Craib.)

สรรพคุณตามตำรายาแผนโบราณ มีดังนี้ (ภูมิพิชญ์, 2540)

- ใบ, เมล็ด : ยาระบาย
- ราก : ฆ่าเชื้อคุดทะราด

ขวัญใจ และคณะ (2537) ได้ศึกษาพบว่าสารสกัดจากลำต้น ดอก และใบกัลปพฤกษ์ด้วย ethanol สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides*

การศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีในใบ พบว่าสามารถแยกสาร aloe-emodin (วันดี, 2522 และอรุณพร, 2532) ซึ่งเป็น anthraquinone genin

1.9 กาลพฤกษ์

กาลพฤกษ์ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cassia grandis* Linn.f. วงศ์ Caesalpiniaceae ชื่อพื้นเมือง เปลือกขม กาลส์

กาลพฤกษ์เป็นไม้ยืนต้น ใบเป็นใบเล็ก ๆ คล้ายแคฝรั่งหรือขี้เหล็ก ใบอ่อนมีสีแดง ดอกออกเป็นช่อสีชมพูแกมส้ม ผลเป็นฝักกลมสีดำผิวขรุขระ (ภาพประกอบ 9) นิยมปลูกทั่วไปตามบ้าน วัด และสวนสาธารณะ (วิทย์, 2531; สมสุข, 2534 และภูมิพิชญ์, 2540)

ภาพประกอบ 9 กาลพฤกษ์ (*Cassia grandis* Linn.f.)

สรรพคุณตามตำรายาแผนโบราณ มีดังนี้ (วิทย์, 2531; สมสุข, 2534 และ ภูมิพิชญ์, 2540)

- เนื้อในฝัก : ยาระบายอ่อน ๆ แก้พิษไข้
- เปลือก, เมล็ด : ทำให้อาเจียน ยาถ่ายพิษไข้

Caceres และคณะ (1991) พบว่าสารสกัดจากใบกาลพฤกษ์ด้วยน้ำ สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Epidermophyton floccosum, M. gypseum, T. mentagrophytes, T. mentagrophytes var. granulare* และ *T. rubrum* ได้ และยังไม่ปรากฏรายงานเกี่ยวกับสารประกอบที่มีในใบของพืชชนิดนี้

2. จุลินทรีย์

2.1 แบคทีเรีย

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus อยู่ใน Family Micrococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1.2 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นกลุ่ม ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ pH 4.8-7.4 โคโลนีมีลักษณะกลมนูน ทึบแสง เป็นมัน ขนาด 1-2 มิลลิเมตร มีสีเหลืองทอง สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆได้ดี มักพบบริเวณผิวหนังและเยื่อบุเมือก หรือบริเวณลำคอส่วน oropharynx และ nasopharynx

S. aureus ทำให้เกิดโรคในอวัยวะต่างๆ และเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของร่างกาย ที่พบบ่อยคือ ทำให้เกิดโรคฝีหนอง เช่น ฝีตามรูขุมขน (furuncle) ฝีฝักบัว (carbuncle) กล้ามเนื้ออักเสบ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น และยังทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษด้วย (Prescott *et al.*, 1993; Mahon, 1995; Marshall, 1995)

S. aureus ที่ไม่สร้างเอนไซม์ penicillinase จะมีความไวต่อยา penicillin แต่ในปัจจุบันพบว่า *S. aureus* ดื้อต่อยา penicillin เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบ *S. aureus* ที่ดื้อยา methicillin (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) MRSA ก่อให้เกิดปัญหาโรคติดเชื้อที่เกิดทั้งในและนอกโรงพยาบาล (Saravalatz *et al.*, 1982) มีรายงานการติดเชื้อนี้ในทุกภูมิภาคของโลก (Bulger, 1976; Haley *et al.*, 1982; French *et al.*, 1988 และ Jamulitrat *et al.*, 1988) MRSA ยังดื้อยาต้านจุลินทรีย์อื่นๆที่มีฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus* ทำให้เป็นปัญหาในการรักษา (Thornsberry, 1988) ยาที่ใช้ได้ผลคือ vancomycin ซึ่งมีราคาแพง และมีผลข้างเคียงสูง (Sorrell *et al.*, 1982) ต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง

2.1.2 *Enterococcus* sp.

Enterococcus เป็นแบคทีเรียใน Family Micrococcaceae ติดสีแกรมบวกรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 ไมโครเมตร เรียงตัวต่อกันเป็นสาย ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ดีในอาหารที่มีเลือดหรือซีรั่มผสมอยู่ โคโลนีของเชื้อมีขนาดเล็กประมาณ 1-2 มิลลิเมตร มีลักษณะกลมใสและไม่มีสี

Enterococcus faecalis และ *E. faecium* เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของคน แต่สามารถก่อโรคร้ายแรงได้ เช่น เยื่อบุหัวใจอักเสบ (endocarditis) ทางเดินปัสสาวะอักเสบ และ bacteremia

การรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *Enterococcus* ยุ่งยาก เนื่องจากเชื้อมักดื้อยาต้านจุลินทรีย์หลายชนิด (Shlaes, 1989; Johnson *et al.*, 1990; Chayakul, 1992; Willy *et al.*, 1992)

2.1.3 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis จัดอยู่ใน Family Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.7-0.8 x 2-3 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นสาย สร้าง endospore 1 อันต่อ1 เซลล์ ขนาด 0.5x1.5-1.8 ไมโครเมตร เชื้อสร้างเอกโซเอนไซม์ ใช้แป้ง pectin และเคซีนได้ ชอบอุณหภูมิปานกลาง อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45-55 องศาเซลเซียส (Kingsbury and Wagner, 1990; Prescott *et al.*, 1993; Holt *et al.*, 1994)

โดยทั่วไปเชื้อนี้จะไม่ก่อโรคในคนปกติ

2.1.4 *Escherichia coli*

E. coli จัดอยู่ใน Family Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง มีขนาด 0.3-1.0 x 1.0-6.1 ไมโครเมตร *E. coli* สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้ เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา ปกติเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ โดยไม่ทำให้เกิดโรค แต่มีบางสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรค (Kingbury and Wagner, 1990; Prescott *et al.*, 1993; Holt *et al.*, 1994) ได้แก่

- Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) สามารถบุกรุกเซลล์เยื่อบุของลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดอาการคล้ายโรคบิด คือท้องร่วง ถ่ายเป็นมูกเลือด เป็นตะคิวและมีไข้
- Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในเด็กทารกตามสถานรับเลี้ยงเด็ก ส่วนในผู้ใหญ่จะทำให้เกิด traveller's diarrhea

- Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) ทำให้เกิดท้องร่วงในทารกแรกคลอด ในสถานรับเลี้ยงเด็ก

-Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ทำให้เกิด hemorrhagic colitis

-Enteroautoagglutinate *E. coli* (EAggEC) ทำให้เกิดท้องร่วงในเด็กอายุต่ำกว่า 6 เดือน

E. coli มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin และ chloramphenicol

2.1.5 *Pseudomonas aeruginosa*

จัดอยู่ใน Family Pseudomonadaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เจริญได้ทั้งในที่ที่มีและไม่มีออกซิเจน เชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆได้ดี มีกลิ่นเฉพาะของเชื้อคล้ายกลิ่นองุ่น และสามารถทำลายเม็ดเลือดแดงในอาหารแบบ β-hemolysis

P. aeruginosa ทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล และผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยแผลไฟไหม้ มะเร็งระยะสุดท้าย และ cystic fibrosis (Kingsbury and Wagner, 1990; Prescott *et al.*, 1993)

เชื้อนี้ดื้อยาหลายชนิด การรักษาใช้ยาในกลุ่ม quinolone (ciprofloxacin, enoxacin) และ aminoglycoside

2.2 ยีสต์

2.2.1 *Candida albicans*

C. albicans เป็น imperfect yeasts รูปร่างกลมรีรูปไข่ขนาด 2-3x4-6 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ

เชื้อนี้เป็นเชื้อประจำถิ่น จะอาศัยอยู่บริเวณเยื่อบุในปาก ทางเดินอาหาร และช่องคลอด และสามารถสร้างคลาไมโดคอนิเดียเมื่อเลี้ยงบน cornmeal tween agar และงอก germ tube เมื่อเลี้ยงในซีรั่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Frey *et al.*, 1979) การทำให้เกิดโรคมักเป็นการติดเชื้อจากภายในร่างกาย (endogenous infection) ส่วนใหญ่เกิดจากการที่ภูมิต้านทานของร่างกายลดลง คนไข้โรคเอดส์ คนที่

ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน การคาสายสวนปัสสาวะ และสายหลอดเลือด ทำให้เชื้อในร่างกายแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น ทำให้เกิดอาการเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ โลหิตเป็นพิษ ไต และกรวยไตอักเสบ (phelonephritis) (พรรณกร, 2535; Frey *et al.*, 1979; Kingsbury and Wagner, 1990)

2.2.2 *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans เป็น basidiosporogenous yeasts มี teleomorph คือ *Filobasidiella neoformans* อยู่ใน Family Filobasidiaceae

ยีสต์มีรูปร่างกลม หรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-12 ไมโครเมตร ในธรรมชาติพบเชื้อในมูลนก เช่น นกพิราบ นกเขา เชื้อที่แยกจากผู้ป่วยใหม่ ๆ จะมีแคปซูล ซึ่งเป็นสารพวกพอลิแซคคาไรด์ เชื้อนี้จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อฉวยโอกาส มักจะพบในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือมีความต้านทานต่ำ เช่นเอดส์ (พรรณกร, 2535; Frey *et al.*, 1979; Kingsbury and Wagner, 1990)

C. neoformans ทำให้เกิดโรค pulmonary cryptococcosis ซึ่งเกิดจากการหายใจเอาเชื้อเข้าไปในปอด ผู้ป่วยมักจะไม่มีอาการของโรคปรากฏให้เห็น หรืออาจเกิด central nervous system cryptococcosis ในผู้ป่วย cryptococcosis หลังติดเชื้อที่ปอดแล้วเชื้อแพร่สู่ระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ผู้ป่วยอาจมีอาการทางผิวหนัง ริมฝีปาก จมูก และอวัยวะสืบพันธุ์โดยเกิดตุ่มหนอง ฝีปุ่มเล็ก ๆ เรียกว่า osseous cryptococcosis ผู้ป่วยมีอาการปวดบวมบริเวณข้อ กระโหลกศีรษะ และกระดูกสันหลัง cutaneous และ mucocutaneous cryptococcosis ส่วน visceral cryptococcosis เกิดจากเชื้อแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ เช่นหัวใจ, ตา โดยจะเห็นเชื้อเป็นจุด ๆ (foci) ในเนื้อเยื่อของอวัยวะเหล่านั้น

2.2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

S.cerevisiae เป็น ascosporogenous yeasts ใน Family accharomycetaceae

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดประมาณ 20-50 ไมโครเมตร สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งจะเจริญเป็นโคโลนีลักษณะกลม

นูนเยิ้ม เชื้อจะสร้าง ascospore และอาจสร้าง pseudohyphae แต่ไม่มีผนังกั้นเส้นใย (Kingsbury and Wagner, 1990; Marshall, 1995)

เชื้อสามารถหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส, ฟรักโทส, ซูโครส และมอลโทสได้ โดยเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และแอลกอฮอล์ สามารถแยกเชื้อได้จากอุจจาระของคน ดิน และผลไม้

โดยทั่วไปเชื้อนี้จะไม่ก่อโรค และจะนำเชื้อนี้มาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเซลล์ยีสต์ขนมปัง ผลิตภัณฑ์ขนมปัง เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ได้แก่ ไวน์, เบียร์ ,สุรา และเอทิลแอลกอฮอล์

2.3 เชื้อรา

2.3.1 *Trichophyton rubrum*

Trichophyton มี teleomorph อยู่ใน genus *Arthroderma* Family Arthrodermataceae (Alexopoulos *et al*., 1996)

T. rubrum มีโคโลนีสีแดง ผิวหน้าโคโลนีเป็นผง ตรงกลางมักย่น และมีร่อง แผ่เป็นรัศมีออกจากจุดกลางโคโลนี ด้านหลังมีสีแดง แต่บางครั้งโคโลนีอาจมีผิวเรียบ สีแดงอมน้ำตาล มีสายราแบบมีผนังกั้น เชื้อสร้างโคนิเดีย 2 ชนิด คือ macroconidia มีขนาดใหญ่หลายเซลล์ ผนังบางรูปทรงกระบอก มักพบในเชื้อที่แยกได้จากคนไข้ใหม่ๆ เชื้อที่เลี้ยงไว้นานในห้องปฏิบัติการจะสร้าง macroconidia น้อย โคนิเดียอีกชนิดหนึ่ง คือ microconidia มีขนาดเล็ก รูปหยดน้ำตา ขนาด 2-4 ไมโครเมตร อยู่ข้างๆสายรา จัดเป็นเชื้อก่อโรคกลากที่พบในคน (anthropophilic dermatophyte) (Emmons, 1997)

T. rubrum ทำให้เกิดโรคกลากที่ผิวหนัง เส้นผม หนังศรีษะ และเล็บ (Frey *et al*., 1979; Mahon, 1995) เป็นเชื้อสาเหตุโรคกลากที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทย (พรรณกร, 2535)

Central Library
Prince of Songkhla University

2.3.2. *Microsporum gypseum*

Microsporum มี teleomorph อยู่ใน genus *Arthroderma* เช่นเดียวกันกับ *Trichophyton* เชื้อนี้พบอยู่ในดิน จัดเป็น geophilic dermatophytes

M. gypseum มีผิวหน้าโคโลนีเป็นผงสีน้ำตาล เกิดสายราขาวได้ง่าย เจริญเร็ว ขึ้นได้ง่าย จัดเป็นเชื้อกลากที่อยู่ในดิน พบทั่วไป มีโคนิเดีย 2 ชนิด macroconidia มีขนาดใหญ่ รูปกระสวย ผนังบาง ผิวไม่เรียบ ขนาดเฉลี่ย 10x50 ไมโครเมตร ภายในแบ่งเป็น 3-9 เซลล์ microconidia มีขนาดเล็ก รูปรีอยู่ข้าง ๆ สายรามีขนาด 2-5 ไมโครเมตร

M. gypseum ก่อโรคกลากที่ผิวหนัง เส้นผม และหนังศีรษะ (พรรณกร, 2535; Frey *et al.*, 1979; Mahon, 1995; Marshall, 1995)

2.3.3 *Penicillium marneffei*

Penicillium มี teleomorph อยู่ใน Family Trichocomaceae

P. marneffei มีโคโลนีสีแดง สายรามีผนังกั้นและไม่มีสี มีก้านชู ปลายก้านชูมีติ่งรูปขวดหลายๆอันรูปร่างคล้ายนิ้วมือ โคนิเดียอ่อนจะอยู่ที่ปลายกิ่ง ส่วนโคนิเดียแก่จะอยู่ปลายสุด โดยโคนิเดียจะต่อกันเป็นสาย

เชื้อนี้ทำให้เกิดโรค penicillosis marneffei ซึ่งผู้ป่วยด้วยโรคนี้มักมีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย หรือเป็นโรคอื่นๆอยู่ก่อนแล้ว เช่น ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเอดส์ ผู้ป่วยวัณโรค เชื้อที่อยู่ในร่างกายผู้ป่วยหรือเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายยีสต์ ที่สืบพันธุ์โดยการ fission จัดเป็นราสองรูป (dimorphic fungi) (Jayanetra *et al.*, 1984; Sekhon *et al.*, 1992; Hilmarsdottir *et al.*, 1993)

ยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อรามีไม่มากนัก และมีราคาแพง เช่น amphotericin B, 5-fluorocytosine และยากลุ่ม imidazole (ketoconazole, miconazole) เชื้อที่ก่อโรคในคนไข้โรคเอดส์มักเป็นเชื้อที่ดื้อยา

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากพืชในสกุล *Cassia* 7 ชนิด, เปลือกผลทับทิม และเหง้าว่านน้ำ ต่อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ยีสต์ และราก่อโรค
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพืชต่อการงอก และความอยู่รอดของ macroconidia ของเชื้อก่อโรค เช่น *M. gypseum*

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. สารสกัดจากพืชสมุนไพร

1.1 สารสกัดจากพืชสกุล *Cassia* ได้แก่ ชุมเห็ดเทศ, ชุมเห็ดไทย, ทรงบาดาล, ขี้เหล็ก, ชัยพฤกษ์, กัลปพฤกษ์, กาฬพฤกษ์ โดยเก็บตัวอย่างใบพืชจากอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

1.2 สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม

1.3 สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3

สารสกัด 1.1 ทำการสกัดที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์

สารสกัด 1.2 และ 1.3 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ

2.1 แบคทีเรีย

2.1.1 แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่

-*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [c]

-Methicillin resistant *S. aureus* SK1 (MRSA) [a]

-*Bacillus subtilis* [c]

-*Enterococcus* sp.[a]

2.1.2 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่

-*Escherichia coli* ATCC 25922 [c]

-Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) [a]

-Pseudomonas aeruginosa [a]

2.2 เชื้อรา

2.2.1 Filamentous fungi ได้แก่

-Trichophyton rubrum [b]

-Microsporum gypseum [b]

-Penicillium marneffei [b]

2.2.2 Yeasts ได้แก่

-Candida albicans PSU[a]

-C. albicans SH[b]

-Cryptococcus neoformans PSU[a]

-C. neoformans SH[b]

-Saccharomyces cerevisiae [c]

หมายเหตุ a : ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์, b : ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, c : จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.1 Sabouraud dextrose agar (SDA, Difco)

3.2 Sabouraud dextrose broth (SDB, Difco)

3.3 Mueller Hinton agar (MHA, Difco)

3.4 Mueller Hinton broth (MHB, Difco)

3.5 Potato dextrose agar (PDA, Difco)

4. สารเคมี

- methanol (Merck)
- absolute ethanol (Merck)

- แผ่นยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน : amikacin, ampicillin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, penicillin G, tetracycline, vancomycin (Difco)

- ยาต้านแบคทีเรีย : gentamicin (Lek), tetracycline (Sigma), vancomycin (Abbott Labs.N. Chicago)

-ยาต้านรา : amphotericin B (Bristrol-Myers), miconazole (Sigma)

- dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma)

- glutaraldehyde

- osmium tetroxide (OsO_4)

- poly-L-Lysine (Sigma)

- tetrazolium bromide (MTT) (Sigma)

- sodium phosphate monobasic

- sodium phosphate dibasic

- sodium chloride

อุปกรณ์

- เครื่องระเหยแบบหมุนพร้อมลดความดัน (Rotary evaporator)

- ตู้อบไอร้อน (hot air oven)

- หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

- เครื่องชั่ง

- เครื่องบด

- อุปกรณ์งานครัว

- เตาแม่เหล็ก (stirring heating plate)

- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)

- ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

- water bath

- micropipette

- sterile cotton swab

- แผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Schleicher & Schuell)
- ปากคีบ
- loop
- กระดาษกรอง
-แผ่นกรอง membrane filter ที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 และ0.22 ไมโครเมตร
- กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- กล้องสเตอริโอซูม (zoom stereo microscope)
-กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)
-เครื่อง SAMDRAI (Polaron CPD7501 Critical point drier)
-เครื่อง SPI-MODULE Sputter Coater
- เครื่องนับเซลล์ (hemacytometer)
- vernier caliper
- vortex mixer

เครื่องแก้ว

- จานเพาะเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6, 9 และ 15 เซนติเมตร
- สไลด์หลุม
- สไลด์
- กระจกปิดสไลด์
- บีกเกอร์
- กระบอกตวง
- flask
- หลอดทดลอง
- pasteur pipette
- eppendorf tube
- แท่งแก้วรูปตัววี
- glass bead

วิธีการ

1. การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

1.1 การสกัดสารจากพืชสกุล *Cassia*

ขั้นตอนการสกัดสาร : อบใบแก่ของพืชสกุล *Cassia* ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดให้ละเอียดและชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำมาทำการสกัดเย็นด้วย methanol ในอัตราส่วนพืชสมุนไพร 1 กิโลกรัม ต่อ methanol 8 ลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วกรองเอาส่วนที่เป็นกากออก และนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนพร้อมลดความดัน (rotary evaporator) นำสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก และนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดสารจากเปลือกผลทับทิม และเหง้าว่านน้ำ

สารสกัดทั้ง 2 สาร ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยมีขั้นตอนการสกัดดังนี้

ขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือกผลทับทิม :

สับเปลือกผลทับทิมแห้งให้ละเอียด และชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำมาทำการสกัดเย็นด้วย methanol เป็นเวลา 3 วัน แล้วกรองเอาส่วนที่เป็นกากออก และนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator นำสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก และนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการสกัดสารจากเหง้าว่านน้ำ

บดเหง้าว่านน้ำแห้งให้ละเอียด และชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำมาทำการสกัดเย็นด้วย methanol ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน แล้วกรองเอาส่วนที่เป็นกากออก นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator นำสารที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก ละลายสารสกัดที่ได้ด้วย ethyl acetate จะได้สาร 2 ส่วน คือ ส่วนที่ละลาย กับส่วนที่ไม่ละลายใน ethyl acetate นำส่วนที่ละลายได้มาแยกด้วย quick column chromatography ชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง petroleum ether dichloromethane, ethyl acetate และ methanol ใน

สัดส่วนต่างๆกัน แยกได้ 9 ส่วน ส่วนที่ 3 เป็นของเหลวสีน้ำตาล คือ AWE3 เป็นส่วนที่นำไปทดสอบ

2. การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์ โดยวิธีวางแผ่นยามาตรฐาน (Lorian, 1996)

2.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร MHA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเลี้ยงยีสต์บนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยเชื้อมา 2 หรือ 3 โคโลนี ใส่ใน 0.85% NaCl ไร้เชื้อ และปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard

2.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ใช้ cotton swab ไร้เชื้อ จุ่มแบคทีเรียและยีสต์จากข้อ 2.1 มาป้ายให้ทั่ววุ้นอาหาร MHA และ SDA ตามลำดับ จากนั้นวางแผ่นยามาตรฐาน โดยแต่ละแผ่นวางห่างกันประมาณ 15-20 มิลลิเมตร และห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิเมตร

-*S. aureus* ATCC 25923 และ MRSA SK1 วางแผ่นยา Amikacin, Ampicillin, Erythromycin, Gentamicin, Kanamycin, Tetracycline และ Vancomycin

-*B. subtilis* วางแผ่นยา Amikacin, Gentamicin และ Tetracycline

-*Enterococcus* sp.วางแผ่นยา Ampicillin, Erythromycin, Penicillin G, Tetracycline และ Vancomycin

-*E. coli* ATCC 25922 และ EIEC วางแผ่นยา Ampicillin, Amikacin, Gentamicin, Kanamycin และ Tetracycline

-*P. aeruginosa* วางแผ่นยา Amikacin, Gentamicin และ Tetracycline

การทดสอบเชื้อในกลุ่มยีสต์นั้นจะใช้แผ่นยา Amphotericin B ซึ่งมีวิธีการเตรียมแผ่นยาดังนี้ :

-ผสมน้ำกลั่นไร้เชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดที่มียา Amphotericin B ผง 50 มิลลิกรัม จะได้ยาที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดมา 10 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางแผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นนำ

ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้แผ่นยาที่มีความเข้มข้นของยา 50 ไมโครกรัมต่อแผ่น

นำจานเพาะเชื้อที่วางแผ่นยาแล้วไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.3 การอ่านผล

สังเกตการเกิดวงใสรอบแผ่นยา (clear zone) และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วยเวอร์เนีย คาลิเปอร์ นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐาน (Lorian, 1996) ซึ่งจะแสดงผลออกมา 3 ลักษณะดังนี้

-susceptible (S) : เชื้อมีความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

-intermediate susceptible (I) : เชื้อให้ผลการทดสอบไวต่อยาปานกลาง

-resistant (R) : เชื้อดื้อยาที่ใช้ทดสอบ

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัด โดยวิธี disc diffusion (ดัดแปลงวิธีจาก Lorian, 1996)

3.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

ทำการเตรียมเชื้อเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.1.

3.2 วิธีการเตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

ละลายสารสกัดจากพืชสกุล *Cassia* และทับทิมใน DMSO และละลายสารสกัดว่านน้ำ AWE3 ใน 95% ethanol ให้มีความเข้มข้น 100 และ1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นๆละ 10 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น disc ไร้เชื้อที่วางบนแผ่นตะแกรงดังนี้

ก. แบบเปียก : หลังหยดสารสกัดแล้วให้นำไปทดสอบทันที

ข. แบบแห้ง : หลังหยดสารสกัดแล้วให้นำไปผึ่งในตู้ถ่ายเชื้อ จนแผ่น disc แห้ง จึงนำไปทดสอบ

สำหรับแผ่น disc ชุดควบคุมจะใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ DMSO และ 95% ethanol แทนสารสกัด

3.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ใช้ cotton swab ไร้เชื้อ จุ่มแบคทีเรียและยีสต์จากข้อ 2.1 มาป้ายให้ทั่ววุ้นอาหาร MHA และSDA ตามลำดับ วางแผ่น disc ชุบสารสกัด และแผ่น disc ชุดควบคุม แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ *C. albicans* ส่วน *C. neoformans* และ *S. cerevisiae* บ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

3.4 การอ่านผล

สังเกตการเกิดวงใส และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วยเวอร์เนีย คาลิเปอร์

4. การทดสอบหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC) / Minimum fungicidal concentration (MFC) โดยวิธี agar dilution

ทำการทดสอบโดยดัดแปลงวิธีจาก Lorian, 1996

4.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร MHA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเลี้ยงยีสต์บนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยเชื้อมา 3 หรือ 4 โคโลนีใส่ในอาหาร MHB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และอาหาร SDB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร สำหรับเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางต่อด้วย 0.85% NaCl ไร้เชื้อ ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard แล้วเจือจางต่อด้วยอาหาร MHB และอาหาร SDB สำหรับเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ ในอัตราส่วน 1 : 200 เท่า (ได้เชื้อประมาณ 5 X 10^5 CFU / ml)

4.2 วิธีการเตรียมสารสกัด และยาต้านจุลินทรีย์ ที่ใช้ในการทดสอบ

4.2.1 สารสกัด

ละลายสารสกัดจากพืชสกุล *Cassia* และทับทิมใน DMSO และละลายสารสกัดว่านน้ำ AWE3 ใน 95% ethanol ให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น

เจือจางสารสกัดแบบลำดับสอง (Serial 2-fold dilution) ในน้ำกลั่นไร้เชื้อให้ได้สารสกัดชนิดละ 8 ความเข้มข้น (100-0.781 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

4.2.2 ยาต้านจุลินทรีย์

ละลายยา Gentamicin, Vancomycin และ Amphotericin B ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ ส่วนยา Tetracycline นั้นจะละลายใน 0.1 N HCl ให้ได้ความเข้มข้น 4, 4, 5 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเจือจางยาแบบลำดับสอง โดยเจือจางยา Gentamicin, Vancomycin และ Amphotericin B ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ ส่วนยา Tetracycline จะเจือจางใน 0.1 M phosphate buffer pH 4.5 ให้ได้ยาชนิดละ 10 ความเข้มข้น โดยยา Gentamicin, Vancomycin และ Tetracycline มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 400-0.781 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของยา Amphotericin B อยู่ระหว่าง 500-0.976 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3 วิธีการทดสอบเพื่อหาค่า MIC

4.3.1 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับอาหาร MHA หลอมเหลวปริมาตร 6 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 : 100) สำหรับแบคทีเรีย ส่วนยีสต์ใช้อาหาร SDA จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารอยู่ระหว่าง 1-0.0078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หากไม่สามารถหาค่า MIC ในช่วงความเข้มข้นของสารตามวิธีนี้ได้ ให้ใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับอาหาร MHA และ SDA หลอมเหลวปริมาตร 5.4 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 : 10) จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารอยู่ระหว่าง 10-1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3.2 ใช้ไมโครปิเปตดูดยาต้านจุลินทรีย์แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับอาหาร MHA และ SDA หลอมเหลวปริมาตร 6 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 : 100) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของยา Gentamicin, Vancomycin และ Tetracycline อยู่ระหว่าง 4-0.0078 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยา Amphotericin B อยู่ระหว่าง 5-0.0097 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3.3 เทอาหารที่ได้ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้เย็น ทำความเข้มข้นละ 3 จาน จากนั้นวางแผ่น membrane filter ไร้เชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร และหยดเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 เชื้อละ 1 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น

membrane filter และนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ *C. albicans* ส่วน *C. neoformans* จะบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ส่วนชุดควบคุม จะใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ DMSO และ 95% ethanol แทนสารสกัด

4.4 การอ่านผล

สังเกตและบันทึกระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MIC

4.5 วิธีการทดสอบเพื่อหาค่า MBC หรือ MFC

นำแผ่น membrane filter ที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้จากการหาค่า MIC ในข้อ 4.3 วางบนอาหาร MHA และ SDA จานใหม่ (สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ ตามลำดับ) จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.6 การอ่านผล

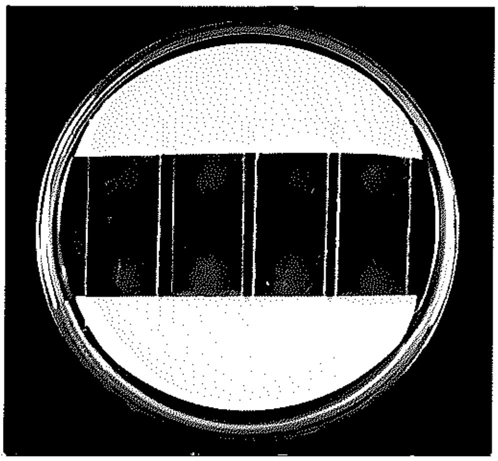
สังเกตและบันทึกระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ เป็นค่า MBC สำหรับแบคทีเรีย และค่า MFC สำหรับยีสต์

5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุม

ทำการทดสอบตามวิธีของ Picman และคณะ (1990)

5.1 วิธีเตรียมสไลด์หลุม

วางกระดาษกรองบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ ใช้ปากคีบจุ่ม 95% ethanol ลนไฟ ทิ้งไว้ให้เย็น คีบสไลด์หลุมที่ปราศจากเชื้อวางบนกระดาษกรอง โดยวางสไลด์ 4 แผ่นต่อจานเพาะเชื้อ (ภาพประกอบ 10) จากนั้นหยดน้ำกลั่นไร้เชื้อลงบนแผ่นกระดาษกรองให้ชุ่ม



ภาพประกอบ 10 การเตรียมสไลด์หลุม

5.2 วิธีการเตรียมอาหารผสมยามาตรฐาน

5.2.1 ละลายยา miconazole ในสาร DMSO ให้มีความเข้มข้น 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางยาในน้ำกลั่นไร้เชื้อแบบลำดับสองจำนวน 9 ความเข้มข้น (3.2 - 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

5.2.2 ใช้ไมโครปิเปตดูดยาความเข้มข้นละ 10 ไมโครลิตร ผสมกับอาหาร PDA หลอมเหลวอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 990 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1 : 100) ดูดผสมให้เข้ากันแล้วใช้ไมโครปิเปตดูดมา 100 ไมโครลิตร หยดลงในสไลด์แต่ละหลุม เกลี่ยให้อาหารกระจายเต็มหลุม ปล่อยให้วุ้นแข็งตัว จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของยาเป็น 32-0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 8 หลุม

5.3 วิธีการเตรียมอาหารผสมสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ละลายสารสกัดแต่ละชนิดใน SDA หลอมเหลว จากนั้นทำเช่นเดียวกับข้อ 5.2.2 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัด 0.1, 1, 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.4 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยง *M. gypseum* และ *P. marneffei* เป็นเวลา 7 วัน และเลี้ยง *T. rubrum* เป็นเวลา 10 วัน แล้วใช้ pasteur pipette ไร้เชื้อเจาะเชื้อบริเวณขอบโคโลนี (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ1.25 มิลลิเมตร)

5.5 วิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสไลด์หลุม

ใช้เข็มเขี่ยชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราที่เตรียมไว้ (ข้อ 5.4) ไปวางที่จุดกึ่งกลางของวุ้นในแต่ละหลุม ให้ด้านที่มีเส้นใยสัมผัสกับอาหารวุ้น ทำภายใต้กล้องสเตอริโอซูม นำจานทดสอบทั้งหมดใส่ถุงพลาสติก นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

5.6 การอ่านผล

ตรวจผลทุกวันจนกว่าโคโลนีของเชื้อราในชุดควบคุมจะโตเต็มหลุม (*T. rubrum* 5 วัน, *M. gypseum* และ *P. marneffei* 4 วัน) จากนั้นจึงวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราด้วยไมโครมิเตอร์ที่เทียบค่าแล้ว ภายใต้กล้องสเตอริโอซูม โดยในแต่ละหลุมจะวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี 2 ค่าที่ตั้งฉากกัน และหาค่าเฉลี่ย นำค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของชุดทดสอบแต่ละความเข้มข้นไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเพื่อหาค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา จากสูตร (Gamliel *et al.*,1989)

ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา = 100 - (r^2/R^2 X 100)

r = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราจากชุดทดสอบ

R = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราจากชุดควบคุม

และหาค่า EC_{50} (50% Effective Concentration) คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของสายราได้ร้อยละ 50 ซึ่งหาได้จากการทดสอบตามข้อ 5.1-5.4 โดยพิจารณาเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของสายราในช่วงร้อยละ 20-80 และนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่แกน X และค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายราที่แกน Y และคำนวณหาค่า EC_{50} จากสมการ linear regression, Y = a + bX เมื่อแทนค่า Y = 50

6. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการงอกของโคนิเดีย *M. gypseum*

6.1 วิธีการเตรียมอุปกรณ์

ขีดสไลด์ด้วยดินสอเขียนแก้วเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สไลด์ละ 2 วง และวางลงบนแท่งแก้วสามเหลี่ยมในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่มีสำลีนำไปทำให้ปราศจากเชื้อ

6.2 วิธีการเตรียม conidial suspension

เลี้ยงเชื้อ *M. gypseum* บนอาหาร SDA และนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นใส่ glass bead ไร้เชื้อลงไป 10-15 เม็ด และกลิ้ง glass bead ไปมาบนโคโลนีของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงไว้ จนเส้นใยแบนราบ ใส่น้ำกลั่นไร้เชื้อ 5 มิลลิลิตร และใช้ pasteur pipette ไร้เชื้อดูดน้ำขึ้นลงบนโคโลนีของเชื้อ นำ conidial suspension ที่ได้มานับจำนวนโคนิเดีย (ชนิด macroconidia) ด้วย hemacytometer แล้วปรับความเข้มข้นของโคนิเดียให้เป็น 1 X 10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

6.3 วิธีการเตรียมยามาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ

ละลายยา miconazole ในสาร DMSO ให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางยาในน้ำกลั่นไร้เชื้อแบบลำดับสอง (ความเข้มข้น 100-1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

6.4 วิธีการเตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

เจือจางสารสกัดที่ต้องการทดสอบจาก stock solution ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบบลำดับสอง (ความเข้มข้น 100-1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

6.5 วิธีการทดสอบ

6.5.1 หยด conidial suspension ที่เตรียมไว้ในข้อ 6.2 ปริมาตร 90 ไมโครลิตร และยาหรือสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมในวงกลมที่ขีดบนสไลด์ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วดูดน้ำกลั่นไร้เชื้อใส่สำลี นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

6.5.2 นำแผ่นสไลด์จากข้อ 6.5.1 ไปตากให้แห้งภายใต้ Laminar flow จากนั้นหยดสี lactophenol cotton blue ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ และนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

6.6 การอ่านผล

ตรวจนับจำนวนโคนิเดียที่งอก และไม่งอกรวมกันจำนวน 300 โคนิเดีย (ทำ 2 ซ้ำ) นำมาคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งการงอกของโคนิเดียจากสูตร : (Surrender *et al.*,1987 อ้างตาม Mukherjee *et al.*,1996)

ร้อยละการยับยั้งการงอกของโคนิเดีย= 100-ร้อยละการงอกของโคนิเดียชุดทดสอบ X100
ร้อยละการงอกของโคนิเดียชุดควบคุม

กำหนดให้การงอก คือ โคนิเดียที่งอก germ tube มีความยาวเกินครึ่งหนึ่งของความกว้างของโคนิเดีย (Manandhar *et al.*, 1995)

วัดขนาดของ germ tube จำนวน 30 โคนิเดียด้วย ocular micrometer ที่เทียบค่าแล้ว นำมาหาค่าเฉลี่ย

หาค่า EC_{50} เป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียได้ร้อยละ 50 ซึ่งหาได้จากการทดสอบตามข้อ 6.1-6.6 โดยพิจารณาเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการงอกโคนิเดียในช่วงร้อยละ 20-80 นำมาเขียนกราฟเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่แกน X และค่าร้อยละการยับยั้งการงอกของโคนิเดียที่แกน Y และคำนวณหาค่า EC_{50} จากสมการเช่นเดียวกับข้อ 5.6

6.7 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อความอยู่รอดของโคนิเดีย โดยการย้อมสี Tetrazolium bromide (MTT)

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 6.1-6.6 แต่ทำการทดสอบใน Eppendorf tube แทนการทำบนสไลด์ ใช้ pasteur pipette ดูดโคนิเดียมาหยดลงบนสไลด์แล้วหยดสี MTT (Sigma 2128) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ท่วม นำสไลด์ไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การอ่านผล

เซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีม่วง ส่วนเซลล์ที่ตายจะใสไม่มีสี

นับจำนวนโคนิเดียทั้งที่มีชีวิต และไม่มีชีวิตรวม 150 โคนิเดีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำมาคำนวณหาร้อยละการอยู่รอดของโคนิเดีย

กำหนดให้ - โคนิเดียที่มีเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่า หรือเท่ากับ 1 เซลล์ เป็นโคนิเดียที่ยังไม่ตาย สามารถงอกได้ (Sridhar and Barlocher, 1994)

- โคนิเดียที่ไม่มีเซลล์ที่มีชีวิตเลย เป็นโคนิเดียที่ตายไม่สามารถงอกได้

7. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

7.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างจุลินทรีย์

7.1.1 แบคทีเรีย และยีสต์

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และยีสต์ในสารสกัดที่เจือจางด้วยอาหาร MHB และ SDB (ตามลำดับ) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5 X 10^5 CFU/ml ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำมาปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง

7.1.2 สายรา

เพาะเลี้ยงเชื้อ *T. rubrum, M. gypseum* และ *P. marneffei* บนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสโดยเลี้ยงเชื้อ *T. rubrum* เป็นเวลา 6 วัน *M. gypseum* และ *P. marneffei* เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นเจาะวุ้น (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร) ห่างจากบริเวณขอบโคโลนีรา 0.5 เซนติเมตร

นำตัวทำละลาย และสารสกัดความเข้มข้น 100 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ทดสอบหยดลงไปในหลุม นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นตัดสายราบริเวณขอบโคโลนีมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา โดยย้อมดูด้วย lactophenol cotton blue และนำสายราที่ได้อีกส่วนไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด

7.1.3 โคนิเดีย *M. gypseum*

นำโคนิเดียของ *M. gypseum* จากข้อ 6.2 โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1 X 10^6 CFU/ml ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นที่สารสกัดสามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียได้ร้อยละร้อยซึ่งได้จากผลการทดลองในข้อ 6 ใน Eppendorf tube ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง

7.2 วิธีการเตรียมตัวอย่างจุลินทรีย์เพื่อใช้กับกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

7.2.1 นำเชื้อจากข้อ 7.1 มาทำ primary fixation โดยใส่ 2.5% glutaraldehyde ลงในหลอดทดลองที่มีเชื้อ ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างเชื้อด้วย 0.1 M Phosphate buffer pH 7.3 จำนวน 3 ครั้งๆละ 5 นาที ใช้ pasteur pipette ดูดเชื้อมาหยดลงบนแผ่นสไลด์ที่เคลือบด้วย Poly-L-Lysine ความเข้มข้น 0.1%

7.2.2 ตัวอย่างแบคทีเรีย ยีสต์ สาหร่าย และโคนิเดียรา นำมาทำ post fixation โดยใส่ 1% OsO_4 ลงไป ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.1 M Phosphate buffer pH 7.3 อีก 2 ครั้งๆละ 10 นาที

-ทำการ dehydration ใน ethanol 50%, 70%, 80% และ 90% อย่างละ 2 ครั้งๆละ 15 นาที และใน ethanol 100% จำนวน 2 ครั้งๆละ 30 นาที

-นำตัวอย่างเชื้อที่ได้เข้าเครื่อง SAMDRAI (Polaron CPD7501 Critical point drier) ทำให้ตัวอย่างแห้งสนิท

-นำตัวอย่างเชื้อติดบนแท่นทองเหลือง

-นำตัวอย่างเชื้อไปเคลือบโดยทอง วิธี ion sputter ด้วยเครื่อง SPI-MODULE Sputter Coater

-นำตัวอย่างเชื้อที่ได้ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (JSM-5800 LV Scanning electron microscope) ที่ศูนย์เครื่องมือมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. สารสกัดที่ได้จากพืช

ตัวอย่างพืชสมุนไพรสกุล *Cassia* 7 ชนิด (ตาราง 1) ได้จากอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และทำการเทียบเคียงชนิดกับตัวอย่าง Herbarium ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สารสกัดที่ผ่านขั้นตอนการสกัดต่างๆ และน้ำหนักร้อยละของสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักพืชที่ใช้ แสดงไว้ในตาราง 1 โดยพบว่าร้อยละของสารสกัดที่ได้มีค่าตั้งแต่ 2.22 ถึง 61.34

สารที่สกัดจากใบพืชสกุล *Cassia* ทั้ง 7 ชนิดมีลักษณะเป็นของหนืดข้นสีดำ ส่วนสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมจะมีสีน้ำตาล และสารสกัดจากว่านน้ำ AWE3 จะเป็นของเหลวสีน้ำตาล

ตาราง 1 พืชสมุนไพร และร้อยละของสารที่สกัดได้

ชื่อพืช (สารสกัด)	ชื่อวิทยาศาสตร์ (Voucher specimen number)*	ส่วนของพืช	ลักษณะของสารสกัด	ร้อยละของสารที่สกัดได้
ว่านน้ำ (AWE3)	*Acorus calamus* Linn.	เหง้าแห้ง	ของเหลวสีน้ำตาล	12.70
ทับทิม	*Punica granatum* Linn.	เปลือกผลแห้ง	ของหนืดสีน้ำตาล	61.34
ชุมเห็ดเทศ	*Cassia alata* Linn. (No.185216)	ใบแห้ง	ของหนืดสีดำ	6.36
ชุมเห็ดไทย	*Cassia tora* Linn. (No.185259)	ใบแห้ง	ของหนืดสีดำ	2.22
ชัยพฤกษ์ หรือ คูน	*Cassia fistula* Linn. (No.185224)	ใบแห้ง	ของหนืดสีดำ	4.48
ขี้เหล็ก	*Cassia siamea* Britt. (No.185246)	ใบแห้ง	ของหนืดสีดำ	7.78
ทรงบาดาล	*Cassia surattensis* Burm.f. (No.185254)	ใบแห้ง	ของหนืดสีดำ	6.80
กัลปพฤกษ์	*Cassia bakeriana* Craib. (No.185223)	ใบแห้ง	ของหนืดสีดำ	4.48
กาลพฤกษ์	*Cassia grandis* Linn.f. (No.185229)	ใบแห้ง	ของหนืดสีดำ	6.60

* : ตัวอย่าง Herbarium ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยวิธี disc diffusion

ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน (ตาราง 2 และภาพประกอบ 11) พบว่าเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 จะไวต่อยาต้านจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ Amikacin, Gentamicin, Kanamycin และ Tetracycline และดื้อยา Ampicillin และ Erythromycin แต่ Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) จะไวต่อยา Vancomycin และดื้อยา Amikacin, Ampicillin, Erythromycin, Gentamicin, Kanamycin และ Tetracycline ส่วนเชื้อ *B. subtilis* จะไวต่อยาทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Amikacin, Gentamicin และ Tetracycline และเชื้อ *Enterococcus* sp. ไวต่อยา 2 ชนิด ได้แก่ Ampicillin, Vancomycin และไวปานกลางต่อยา Erythromycin, Penicillin G สำหรับการทดสอบเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ พบว่า *E. coli* ATCC 25922 และ Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) จะไวต่อยาทั้ง 5 ชนิดที่ทดสอบได้แก่ Amikacin, Ampicillin, Gentamicin, Kanamycin และ Tetracycline *P. aeruginosa* จะไวต่อยา Tetracycline แต่ดื้อยา Amikacin และ Gentamicin

ส่วนการทดสอบยาต้านเชื้อรา Amphotericin B กับเชื้อในกลุ่มยีสต์นั้น พบว่าสามารถยับยั้งยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ได้แก่ *C. albicans* SH, *C. albicans* PSU, *C. neoformans* SH, *C. neoformans* PSU และ *S. cerevisiae* ได้ใกล้เคียงกันโดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 14.0-15.5 มิลลิเมตร

ภาพประกอบ 11 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยวิธี disc diffusion

SA : *S. aureus* ATCC 25923

MRSA : Methicillin resistant *S. aureus*

BS : *B. subtilis*

En : *Enterococcus* sp.

1 : Amikacin 2 : Ampicillin

3 : Erythromycin 4 : Gentamicin

5 : Kanamycin 6 : Penicillin G

7 : Tetracycline 8 : Vancomycin

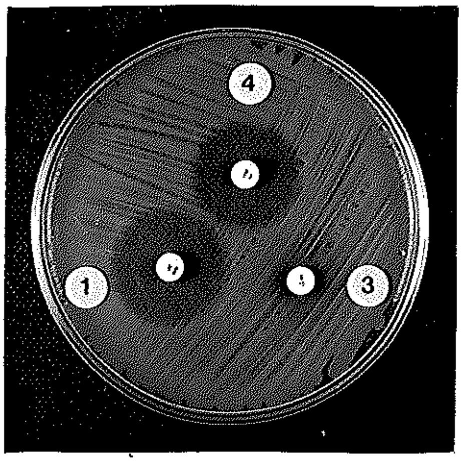
ตาราง 2 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยวิธี disc diffusion

ยามาตรฐาน	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm ± S.D.) (ความไว)						
ยาต้านแบคทีเรีย	**SA**	**MRSA**	**BS**	**En**	**EC**	**EIEC**	**PA**
Amikacin (30 mcg)	23.75±0 (S)	0 (R)	29.62±0.28 (S)	-	23.12±0.03 (S)	21.62±0.03 (S)	0 (R)
Ampicillin (10 μg)	13.34±0.29 (R)	7.38±0.28 (R)	-	22.25±0 (S)	17.38±0.78 (S)	14.5±1.12 (S)	-
Erythromycin (15 mcg)	9.88±0.03 (R)	0 (R)	-	16.88±0.03 (I)	-	-	-
Gentamicin (10 mcg)	21.75±0.5 (S)	0 (R)	28.0±0 (S)	-	20.12±0.03 (S)	20.5±0 (S)	0 (R)
Kanamycin (30 mcg)	21.50±0.12 (S)	0 (R)	-	-	20.0±0 (S)	19.0±0.5 (S)	-
Penicillin G (10 units)	-	-	-	19.0±0.12 (I)	-	-	-
Tetracycline (30 mcg)	24.62±0.78 (S)	0 (R)	28.0±0 (S)	0 (R)	25.0±0.5 (S)	21.25±0.12 (S)	19.41±0.18 (S)
Vancomycin (30 mcg)	-	16.25±2.0 (S)	-	18.88±0.03 (S)	-	-	-
ยาต้านรา	**CaSH**	**CaPSU**	**CnSH**	**CnPSU**	**Sc**		
Amphotericin B (50 μg)	14.62±0.03	15.0±0	15.5±0	14.0±0	14.62±0.03		

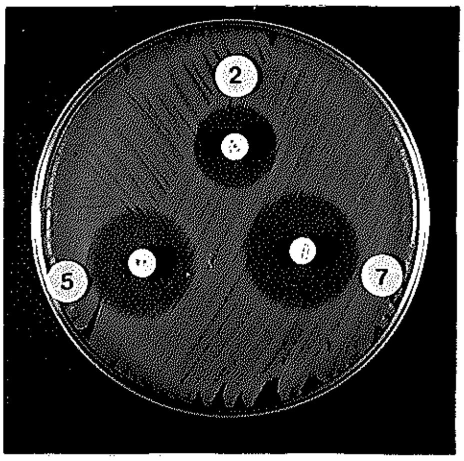
SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA = Methicillin resistant *S.aureus* SK1, BS = *Bacillus subtilis*, En = *Enterococcus* sp., EC =*Escherichia coli* ATCC 25922, EIEC = Enteroinvasive *E.coli*, PA = *Pseudomonas aeruginosa*, CaSH = *Candida albicans* SH, CaPSU = *C.albicans* PSU, CnSH = *Cryptococcus neoformans* SH, CnPSU = *C.neoformans* PSU, Sc = *Saccharomyces cerevisiae*

- ไม่ได้ทำการทดสอบ

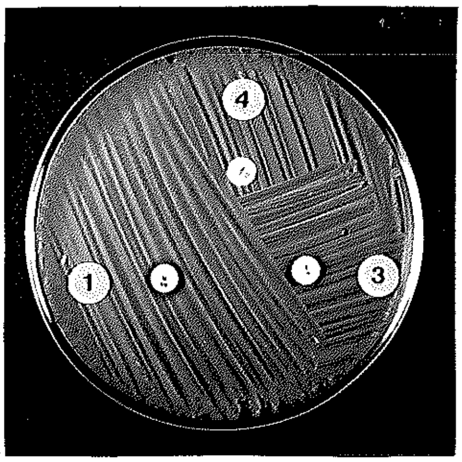
S = susceptible (ไวต่อยา), I = intermediate susceptible (ไวปานกลาง), R = resistant (ดื้อยา)



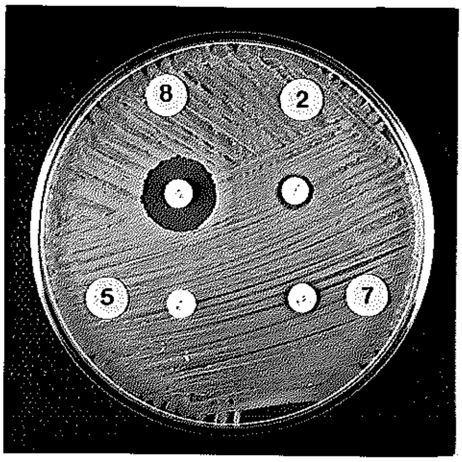
SA



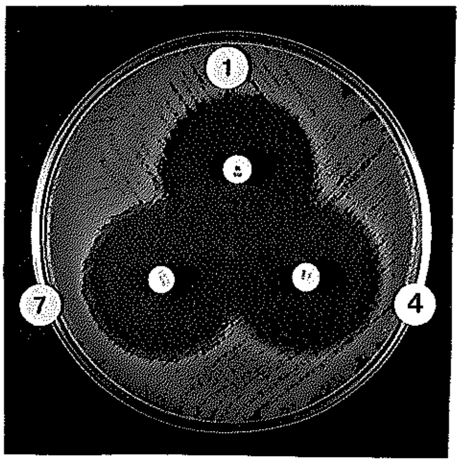
SA



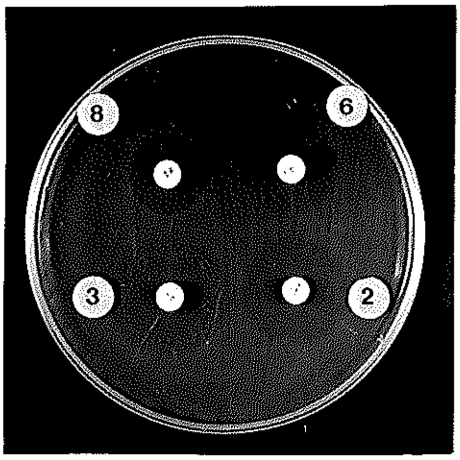
MRSA



MRSA



BS



En

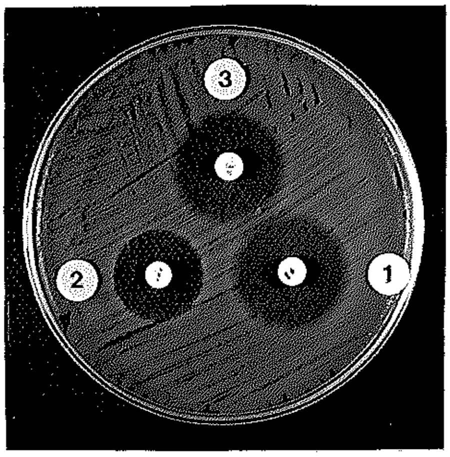
ภาพประกอบ 11 (ต่อ) การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยวิธี disc diffusion

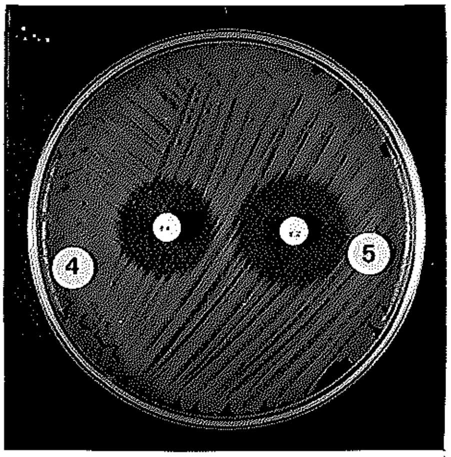
EC : *E. coli* ATCC 25922

EIEC : Enteroinvasive *E. coli*

PA : *P. aeruginosa*

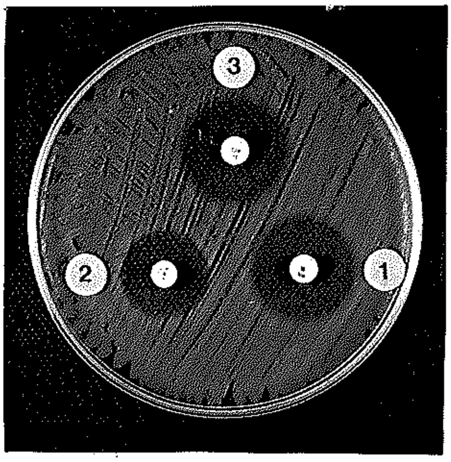
1. Amikacin
2. Ampicillin
3. Gentamicin
4. Kanamycin
5. Tetracycline

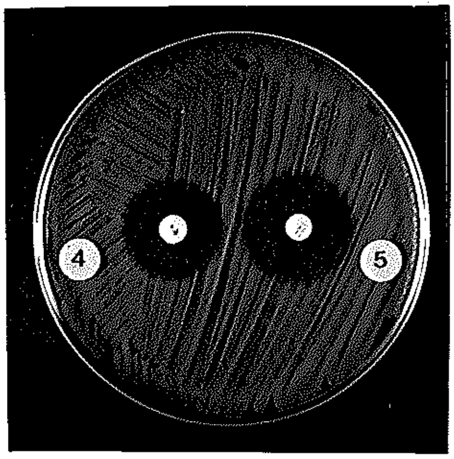




EC

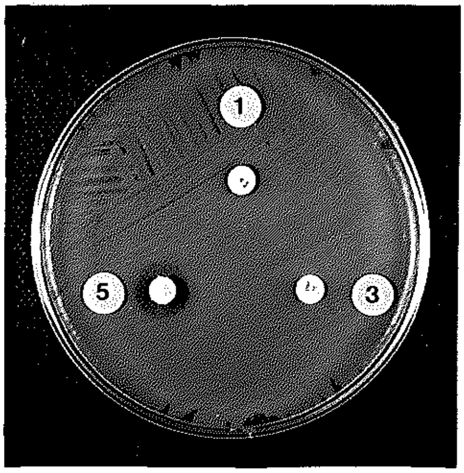
EC





EIEC

EIEC



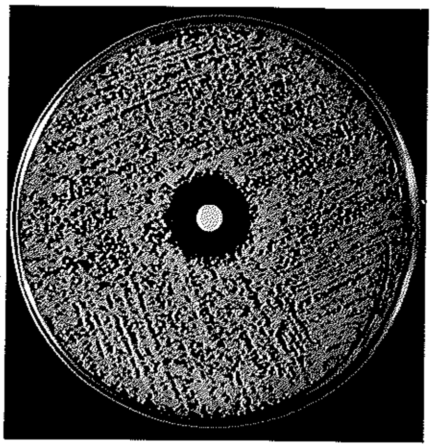
PA

ภาพประกอบ 11 (ต่อ) การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน (Amphotericin B) โดยวิธี disc diffusion

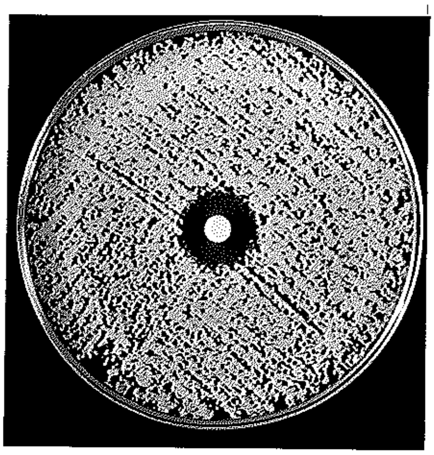
CaSH : *C. albicans* SH　　CaPSU : *C. albicans* PSU

CnSH : *C. neoformans* SH　　CnPSU : *C. neoformans* PSU

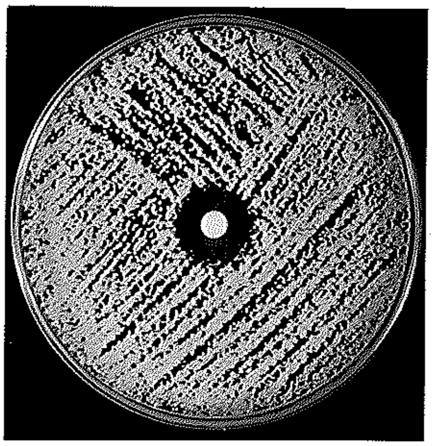
Sc : *S. cerevisiae*



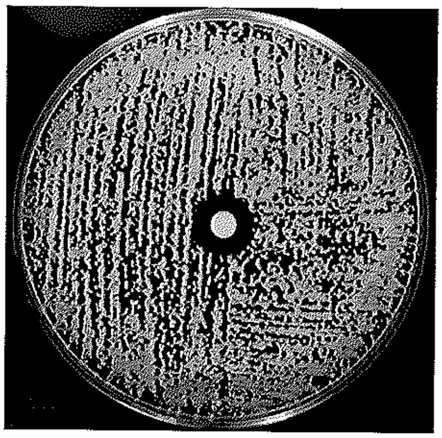
CaSH



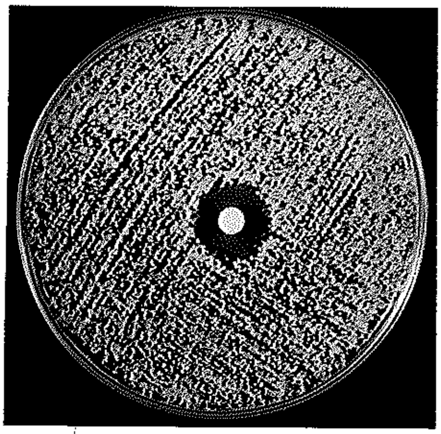
CaPSU



CnSH



CnPSU



Sc

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัดจากพืช โดยวิธี disc diffusion

จากการนำแผ่น disc ที่มีสารสกัดที่ละลายใน DMSO (ยกเว้นสารสกัดจากว่านน้ำ AWE3 ละลายใน 95% Ethanol) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น ทั้งแบบแผ่นเปียกและแผ่นแห้งมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดที่นำมาทดสอบได้ (ตาราง 3) โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดจากแผ่นเปียก มีค่าอยู่ในช่วง 6.5-24.8 มิลลิเมตร ซึ่งจะมีขนาดกว้างกว่าวงใสที่เกิดจากแผ่นแห้งซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 6.05-22.5 มิลลิเมตรเพียงเล็กน้อย ในขณะที่แผ่น disc ควบคุมซึ่งบรรจุตัวทำละลาย DMSO และ 95%ethanol ทั้งแบบแผ่นเปียก และแห้ง ไม่ทำให้เกิดวงใส (ภาพประกอบ 12-13)

สารสกัดว่านน้ำ AWE3 มีฤทธิ์กว้างสุดสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *S. aureus* ทั้งสายพันธุ์มาตรฐานที่ไวต่อยา (ATCC 25923) MRSA และ *B. subtilis* แบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *E. coli* ทั้งสายพันธุ์มาตรฐาน (ATCC 25922) และ EIEC ยีสต์ได้แก่ *C. albicans*, *C. neoformans* (สายพันธุ์ SH และ PSU) และ *S. cerevisiae* โดยจะยับยั้ง *C. neoformans* ได้ดีที่สุด ทำให้เกิดวงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างที่สุดคือ 24.8 มิลลิเมตร (แผ่นเปียก) ส่วนสารสกัดจากทับทิม ชุมเห็ดเทศ ชัยพฤกษ์ ทรงบาดาล และกาลพฤกษ์ มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเท่านั้น ไม่ยับยั้งยีสต์ และสารสกัดส่วนใหญ่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ

* สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียโดยให้ผลกับทั้งชนิดแกรมบวก และแกรมลบ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ได้ดีที่สุด ทั้งแบบแผ่นเปียก และแผ่นแห้ง โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อแบคทีเรียกว้างมากที่สุดเท่ากับ 19.2 และ18.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29523 รองลงมาได้แก่ *Enterococcus* sp., *P. aeruginosa* และ *B. subtilis* และยับยั้งเชื้อ EIEC ได้น้อย *

สำหรับสารสกัดจากใบพืชสกุล *Cassia* 7 ชนิดนั้น มีเพียง 4 ชนิดคือ ชุมเห็ดเทศ ชัยพฤกษ์ ทรงบาดาล และกาลพฤกษ์ ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยสารสกัดจากทรงบาดาลสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ MRSA, *B. subtilis* และ *Enterococcus* sp. และแบคทีเรียแกรมลบคือ EIEC และ *P. aeruginosa* ส่วนสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ กาลพฤกษ์ และชัยพฤกษ์ มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเพียงชนิดเดียว สารสกัดจาก

ชุมเห็ดเทศยับยั้ง MRSA *B. subtilis* และ *Enterococcus* sp. ได้ดีกว่ากาลพฤกษ์ ส่วนชัยพฤกษ์มีฤทธิ์อ่อนสุด ยับยั้ง *B. subtilis* เพียงชนิดเดียว สารสกัดจากชุมเห็ดไทย ขี้เหล็ก และกัลปพฤกษ์ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และยีสต์

ตาราง 3 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรีย และยีสต์เบื้องต้นของสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ โดยวิธี disc diffusion

สารสกัด[a]		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm. ± S.D.)												
		Control	SA	MRSA	BS	En	EC	EIEC	PA	CaSH	CaPSU	CnSH	CnPSU	Sc
ว่านน้ำ	ป	-[c]	9.2±0.18	10.8±0.4	15.3±1.4	-	6.8±0	7.25±0.18	-	9.25±0.35	8.88±0.53	24.8±1.77	23.3±1.41	12.4±2.3
AWE3[b]	ห	-	8.3±0	9.9±0.2	13.1±1.2	-	-	6.75±0.2	-	7.75±0.35	7.75±0.71	19.2±0.35	22.5±0.71	10.0±0.35
ทับทิม	ป	-	-	19.2±1.06	12.5±0.71	16.5±0.2	-	8.9±0.18	14.5±0.35	-	-	-	-	-
	ห	-	-	18.0±0	10.1±3.35	14.4±1.51	-	7.13±0.18	12.12±0.2	-	-	-	-	-
ชุมเห็ดเทศ	ป	-	-	11.0±0.71	12.4±1.59	8.38±0.88	-	-	-	-	-	-	-	-
	ห	-	-	10.4±0.18	10.91±0.2	6.75±0.71	-	-	-	-	-	-	-	-
ชุมเห็ดไทย	ป	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ห	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ชัยพฤกษ์	ป	-	-	-	9.75±0.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ห	-	-	-	8.0±1.41	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ขี้เหล็ก	ป	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ห	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ทรงบาดาล	ป	-	-	9.75±1.06	7.38±0.18	10.6±0.88	-	7.63±0.18	6.5±0	-	-	-	-	-
	ห	-	-	8.25±0.35	6.75±0	9.63±1.24	-	6.5±0.35	6.05±0	-	-	-	-	-
กัลปพฤกษ์	ป	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ห	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กาพพฤกษ์	ป	-	-	7.0±0	11.38±1.8	7.62±2.4	-	-	-	-	-	-	-	-
	ห	-	-	6.25±0.12	7.88±1.9	7.0±1.1	-	-	-	-	-	-	-	-

ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ 10 mg/แผ่น, แผ่น disc มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ละลายใน 95% Ethanol สารสกัดอื่นๆละลายใน DMSO

- ไม่เกิด clear zone

ป : แผ่นเปียก

ห : แผ่นแห้ง

ภาพประกอบ 12 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดว่านน้ำ AWE3 โดยวิธี disc diffusion (ซ้าย-แบบเปียก, ขวา-แบบแห้ง)

1 : ชุดควบคุม

2 : สารสกัดความเข้มข้น 1 mg/disc

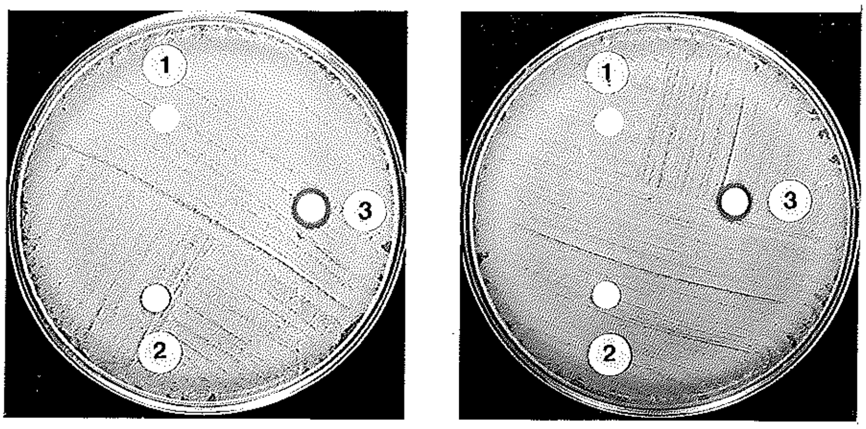
3 : สารสกัดความข้มข้น 10 mg/disc

SA : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

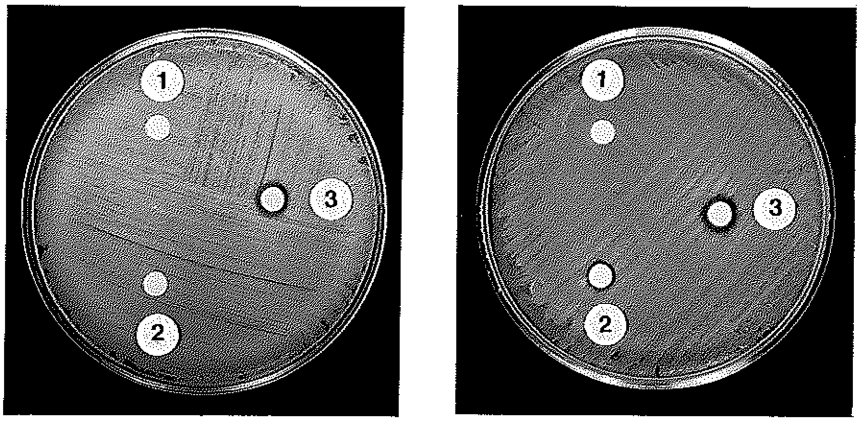
MRSA : Methicillin resistant *S. aureus* SK1

BS : *Bacillus subtilis*

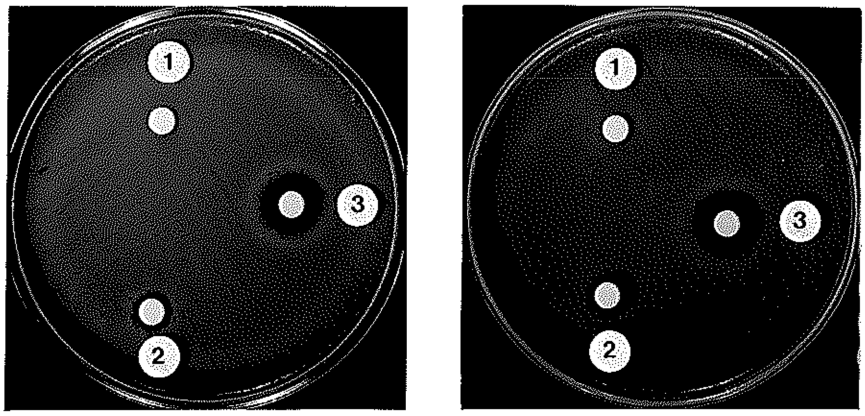
En : *Enterococcus* sp.



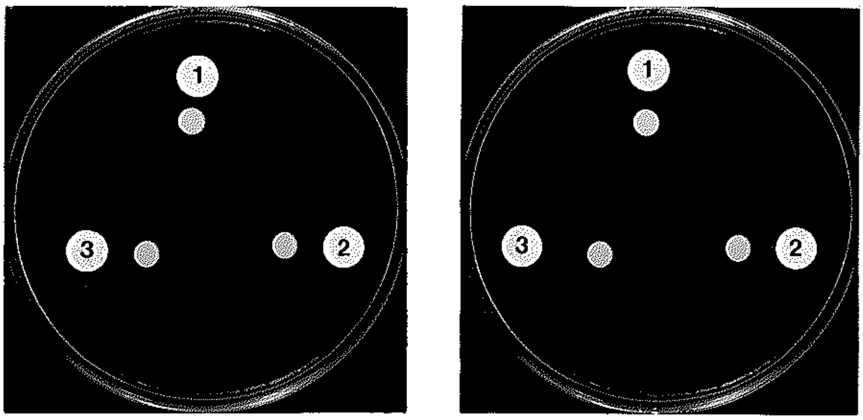
SA



MRSA



BS



En

ภาพประกอบ 12 (ต่อ) การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดว่านน้ำ AWE3 โดยวิธี disc diffusion

(ซ้าย-แบบเปียก, ขวา-แบบแห้ง)

1 : ชุดควบคุม

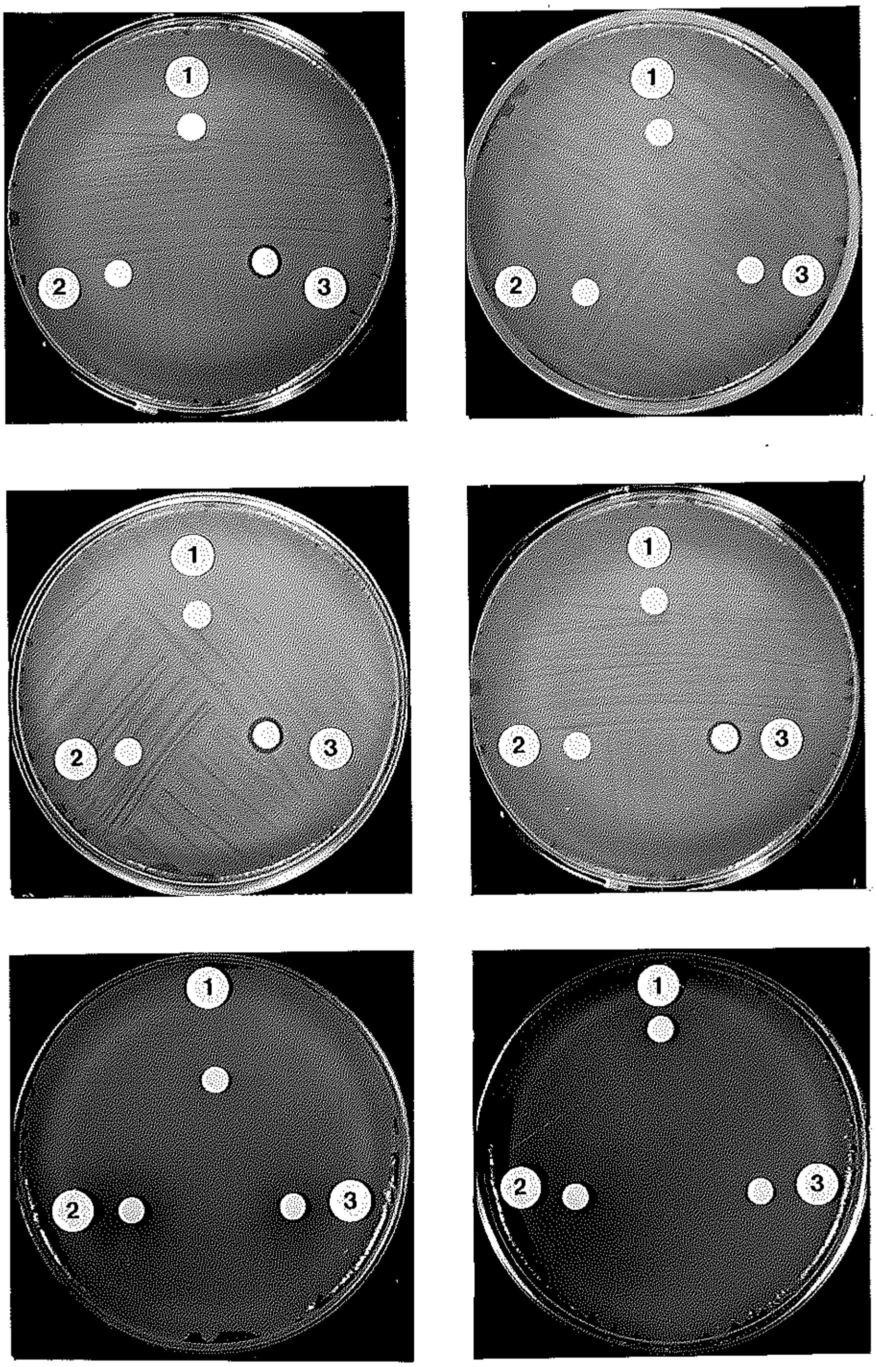
2 : สารสกัดความเข้มข้น 1 mg/disc

3 : สารสกัดความเข้มข้น 10 mg/disc

EC : *Escherichia coli* ATCC 25922

EIEC : Enteroinvasive *E. coli*

PA : *Pseudomonas aeruginosa*



EC

EIEC

PA

ภาพประกอบ 12 (ต่อ) การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านยีสต์ของสารสกัดว่านน้ำ AWE3 โดยวิธี disc diffusion (ซ้าย-แบบเปียก, ขวา-แบบแห้ง)

1 : ชุดควบคุม

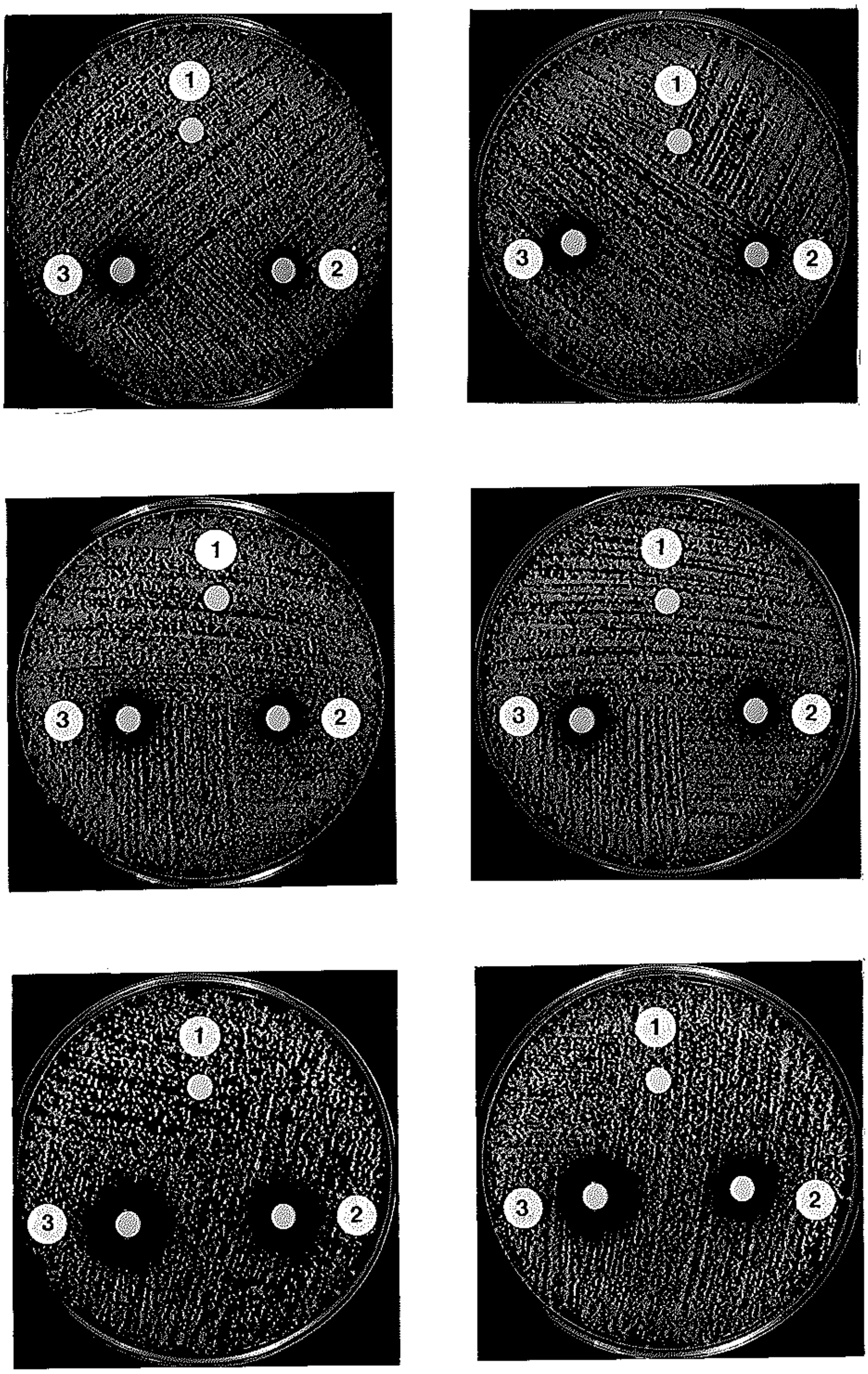
2 : สารสกัดความเข้มข้น 1 mg/disc

3 : สารสกัดความเข้มข้น 10 mg/disc

CaSH : *Candida albicans* SH

CaPSU : *Candida albicans* PSU

Sc : *Saccharomyces cerevisiae*



CaSH

CaPSU

Sc

ภาพประกอบ 12 (ต่อ) การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านยีสต์ของสารสกัดว่านน้ำ AWE3 โดยวิธี disc diffusion (ซ้าย-แบบเปียก, ขวา-แบบแห้ง)

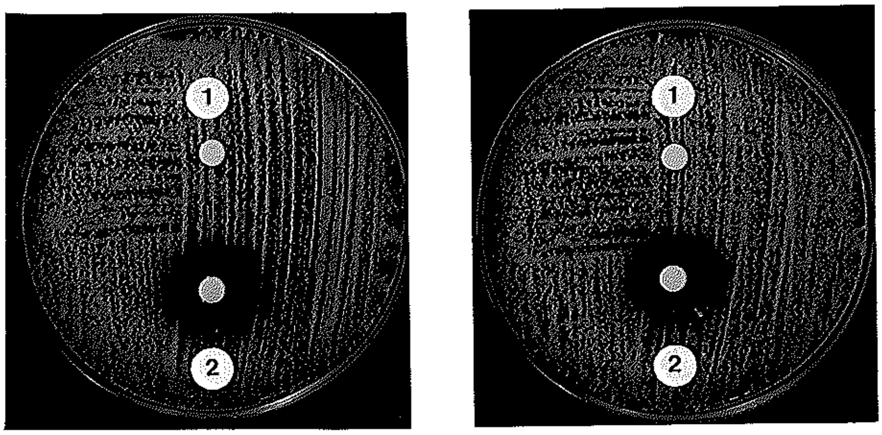
1 : ชุดควบคุม

2 : สารสกัดความเข้มข้น 1 mg/disc

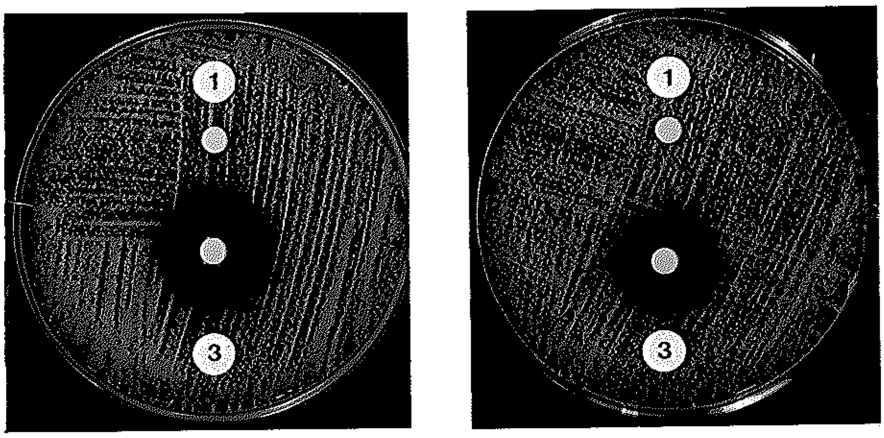
3 : สารสกัดความเข้มข้น 10 mg/disc

CnSH : *Cryptococcus neoformans* SH

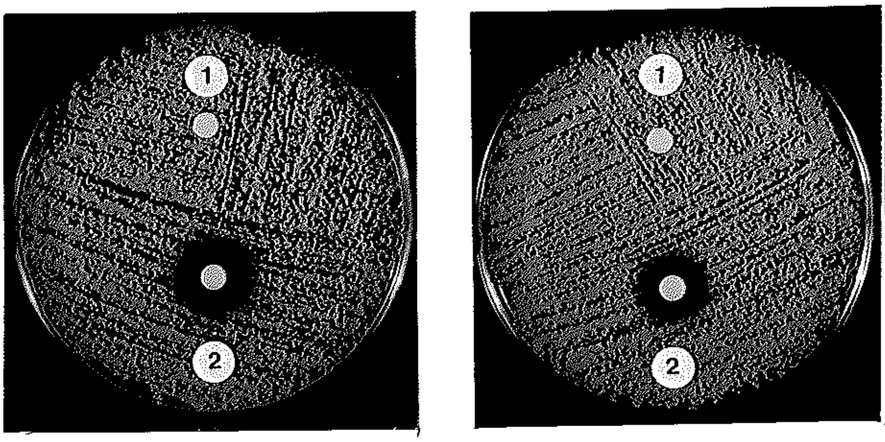
CnPSU : *Cryptococcus neoformans* PSU



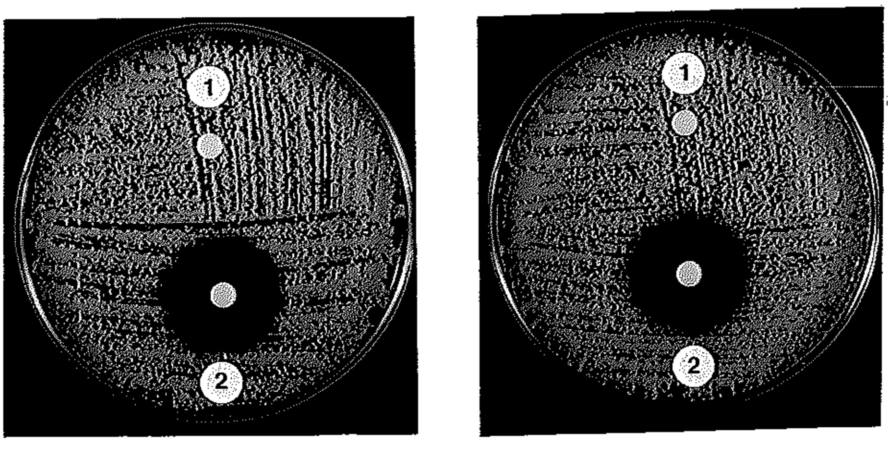
CnSH



CnSH



CnPSU



CnPSU

ภาพประกอบ 13 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้าน Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) ของสารสกัดทับทิม ชุมเห็ดเทศ และทรงบาดาล โดยวิธี disc diffusion

(ซ้าย-แบบเปียก, ขวา-แบบ แห้ง)

1 : ชุดควบคุม

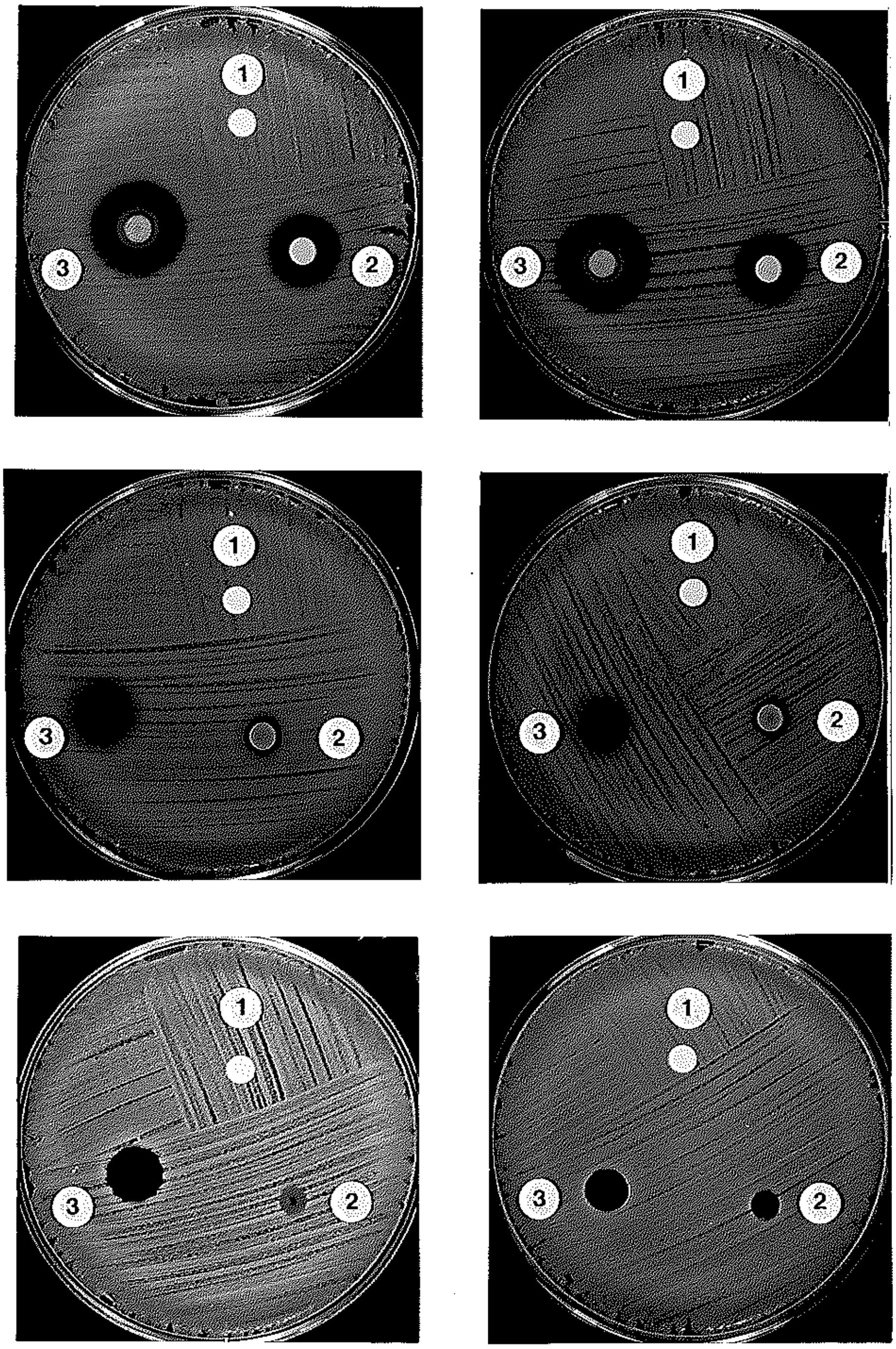
2 : สารสกัดความเข้มข้น 1 mg/disc

3 : สารสกัดความเข้มข้น 10 mg/disc

A : ทับทิม

B : ชุมเห็ดเทศ

C : ทรงบาดาล



A

B

C

4. การทดสอบหาค่า MIC และ MBC หรือ MFC โดยวิธี agar dilution

นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และยีสต์ที่ทำให้เกิดวงใส เมื่อทดสอบโดยวิธี disc diffusion มาหาค่า MIC และ MBC หรือ MFC โดยวิธี agar dilution ได้ผลดังตาราง 4 พบว่า ว่านน้ำAWE3 มีฤทธิ์กว้างสุดสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ โดยมีค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรียอยู่ในช่วง 5-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5 ถึงมากกว่า10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนค่า MIC และ MFC ต่อยีสต์ อยู่ในช่วง 0.12-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.25-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารสกัดที่มีฤทธิ์รองลงมาได้แก่ ทับทิม และทรงบาดาล สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.62 ถึงมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC อยู่ในช่วง 1.25 ถึงมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารสกัดจากชุมเห็ดเทศ กาลพฤกษ์ และชัยพฤกษ์ มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้นมีค่า MIC 5 ถึงมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC 10 ถึงมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ได้นั้นมีเพียงว่านน้ำ AWE3 เท่านั้น มีค่า MIC 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC มากกว่า10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA ได้ดีที่สุดคือ ทับทิมมีค่า MIC และ MBC 0.62 และ2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ รองลงมาได้แก่ ทรงบาดาล ว่านน้ำAWE3 ชุมเห็ดเทศ และกาลพฤกษ์ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* พบว่า *B. subtilis* ไวต่อสารสกัดทุกตัว สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด คือ ทับทิม มีค่า MIC 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *Enterococcus* sp. พบว่าทรงบาดาลมีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด มีค่า MIC และ MBC เท่ากัน คือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดทับทิม, ชุมเห็ดเทศ และกาลพฤกษ์มีค่า MIC และ MBC มากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทดสอบสารสกัดกับเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 พบว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 นั้นมีเพียงว่านน้ำ AWE3 เท่านั้น โดยมีค่า MIC เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC มากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง EIEC มี 3 สารสกัด คือว่านน้ำ AWE3, ทับทิม และทรงบาดาล โดยสารที่ยับยั้งได้ดีที่สุด คือ ทับทิม มีค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

รองลงมาคือ ทรงบาดาล และว่านน้ำ AWE3 ซึ่งจะมีค่า MIC 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า MBC เท่ากันคือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารสกัดทับทิมยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบทรงบาดาล โดยมีค่า MIC และ MBC 1.25 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทรงบาดาล มีค่า MIC และ MBC เท่ากัน คือ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับยาต้านจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ Gentamicin, Tetracycline, Vancomycin และ Amphotericin B พบว่ามีค่า MIC, MBC หรือ MFC ต่ำกว่าสารสกัดทุกชนิดที่ทดสอบ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.06-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า MBC อยู่ในช่วง 0.25-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MFC อยู่ในช่วง 0.1-0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง 4 ค่า MIC และ MBC หรือ MFC ของสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ และยาต้านจุลินทรีย์ โดยวิธี agar dilution

สารสกัด	MIC / MBC (mg/ml)							MIC / MFC (mg/ml)				
	SA	**MRSA**	**BS**	**En**	**EC**	**EIEC**	**PA**	**CaSH**	**CaPSU**	**CnSH**	**CnPSU**	**Sc**
ว่านน้ำ AWE3	5/>10	5/>10	5/5		10/>10	10/10		0.12/0.25	1/1	0.5/0.5	0.5/1	1/1
ทับทิม		0.62/2.5	1.25/5	>10/>10		1.25/1.25	1.25/5					
ชุมเห็ดเทศ		5/>10	5/10	>10/>10								
ชัยพฤกษ์			5/>10									
ทรงบาดาล		5/10	5/10	10/10		5/10	5/5					
กาฬพฤกษ์		10/>10	10/>10	>10/>10								
ยาต้านจุลินทรีย์	**MIC / MBC (µg/ml)**							**MIC / MFC (µg/ml)**				
	SA	**MRSA**	**BS**	**En**	**EC**	**EIEC**	**PA**	**CaSH**	**CaPSU**	**CnSH**	**CnPSU**	**Sc**
Gentamicin					0.5/0.5	0.5/0.5						
Tetracycline	0.5/1		0.06/0.25				4/4					
Vancomycin		1/1		1/4								
Amphotericin B								0.1/0.1	0.1/0.1	0.1/0.2	0.1/0.2	0.1/0.1

5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุม

จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดชนิดต่างๆที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* ในสไลด์หลุมซึ่งแสดงผลไว้ในตาราง 5 (ภาพประกอบ 14) สารสกัดทั้ง 9 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของสายราทั้ง 3 ชนิดได้ โดยพบว่าสารสกัดว่านน้ำ AWE3 มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด สารสกัดความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้งการเจริญของสายราได้ ร้อยละ 20.51-39.75 และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า คือที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้ร้อยละร้อย และยับยั้ง *P. marneffei* ได้ร้อยละ 65.96 ซึ่งดีกว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม และใบพืชสกุล *Cassia* ทั้ง 7 ชนิดที่ยับยั้ง *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้เพียงร้อยละ 31.05-71.38 และ *P. marneffei* ร้อยละ 0-53.84 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารเป็น 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของสายราได้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่า EC_{50} ที่คำนวณได้จากกราฟเส้นตรงระหว่างร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา และระดับความเข้มข้นของสารที่ทดสอบดังตาราง 6 สารสกัดว่านน้ำ AWE3 มีค่า EC_{50} ต่อเชื้อราทั้ง 3 ชนิดต่ำ คือ 0.18-0.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ว่านน้ำ AWE3 ยับยั้ง *T. rubrum* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} ต่ำสุดเท่ากับ 0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ มีค่า EC_{50} 0.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดอื่นๆอีก 7 สาร มีค่า EC_{50} ต่อ *T. rubrum* ใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 0.78-1.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการยับยั้งเชื้อ *M. gypseum* เป็นไปในทำนองเดียวกับ *T. rubrum* โดยสารสกัดว่านน้ำ AWE3 ยับยั้งได้ดีที่สุด และมีค่า EC_{50} ใกล้เคียงกันกับของเชื้อ *T. rubrum* คือ 0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบกับเชื้อ *P. marneffei* พบว่าค่า EC_{50} ของสารสกัดอยู่ในช่วง 0.41-19.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่า *M. gypseum* และ *T. rubrum* ซึ่งมีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 0.18-1.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ประมาณ 2-10 เท่า สารสกัดว่านน้ำAWE3 มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด มีค่า EC_{50} 0.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ ชัยพฤกษ์ และชุมเห็ดไทย มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.94 และ1.79 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากขี้เหล็ก กาลพฤกษ์

ทรงบาดาล ชุมเห็ดเทศ กัลปพฤกษ์ และทับทิม มีค่า EC_{50} มากกว่า 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ยับยั้งต่ำที่สุด

สำหรับผลของยาต้านรามาตรฐาน Miconazole ต่อการยับยั้งการเจริญของสายรานั้น พบว่าความเข้มข้น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยาสามารถยับยั้งการเจริญของสายราทั้ง 3 ชนิดได้ดี โดยสามารถยับยั้งการเจริญของสายราได้ร้อยละร้อย (ภาพประกอบ 15) และเมื่อนำมาคำนวณค่า EC_{50} (ตาราง 6) พบว่า Miconazole ยับยั้งสายรา *P. marneffei* ได้ดีกว่า *T. rubrum* และ *M. gypseum* โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.95, 1.43 และ 10.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ตาราง 5 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum, M. gypseum* และ *P. marneffei*

สารสกัด (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา											
	T. rubrum				***M. gypseum***				***P. marneffei***			
	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100
ว่านน้ำAWE3	39.75	100	100	-	37.33	100	100	-	20.51	65.96	100	-
ทับทิม	-	45.73	100	100	-	39.52	100	100	-	0	46.63	100
ชุมเห็ดเทศ	-	71.38	100	100	-	66.27	100	100	-	3.27	77.01	100
ชุมเห็ดไทย	-	40.11	100	100	-	42.16	100	100	-	46.19	100	100
ชัยพฤกษ์	-	61.07	100	100	-	42.13	100	100	-	53.84	100	100
ขี้เหล็ก	-	46.30	100	100	-	51.11	100	100	-	42.05	84.81	100
ทรงบาดาล	-	42.66	100	100	-	31.05	100	100	-	18.79	80.33	100
กัลปพฤกษ์	-	53.61	100	100	-	49.75	100	100	-	26.95	58.81	100
กาฬพฤกษ์	-	52.92	100	100	-	41.01	100	100	-	33.43	91.76	100

ยา (µg/ml)	***T. rubrum***		***M. gypseum***		***P. marneffei***	
	0.12	32	0.12	32	0.12	32
Miconazole	0	100	0	83.75	0	100

-: ไม่ได้ทดสอบ

ตาราง 6 ค่า EC_{50} ของสารสกัดและยามาตรฐานในการยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum, M. gypseum* และ *P. marneffei*

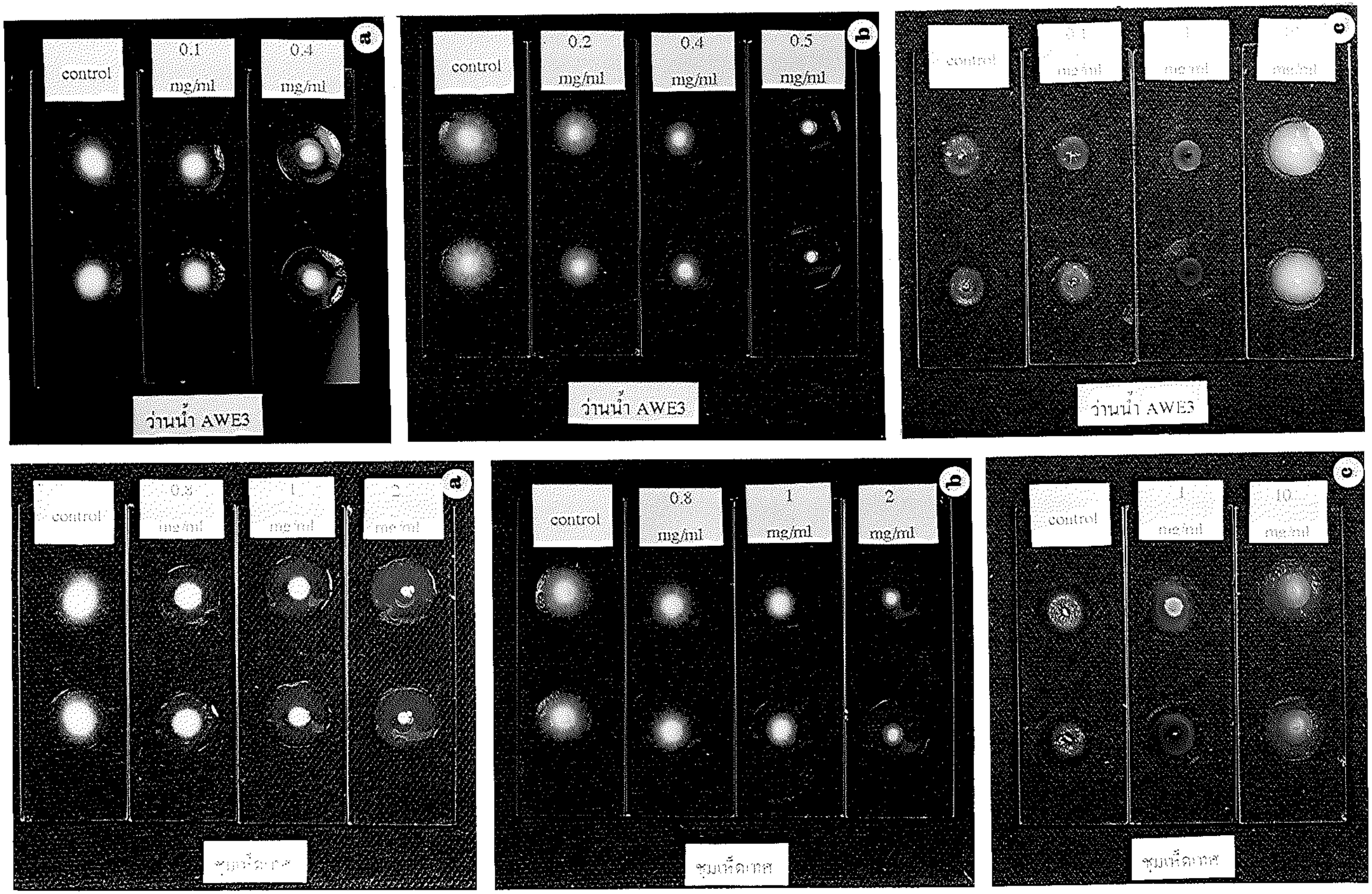
สารสกัด	EC_{50} (mg/ml)		
	T. rubrum	***M. gypseum***	***P. marneffei***
ว่านน้ำAWE3	0.18	0.21	0.41
ทับทิม	1.04	1.44	19.15
ชุมเห็ดเทศ	0.49	0.81	6.60
ชุมเห็ดไทย	1.18	1.77	1.79
ชัยพฤกษ์	0.78	1.77	0.94
ขี้เหล็ก	1.18	0.98	2.77
ทรงบาดาล	1.28	1.61	5.69
กัลปพฤกษ์	0.89	1.11	7.74
กาลพฤกษ์	0.98	1.58	3.06
ยา	**EC_{50} (μg/ml)**		
	T. rubrum	***M. gypseum***	***P. marneffei***
Miconazole	1.43	10.65	0.95

ภาพประกอบ 14 ขนาดโคโลนีของเชื้อราในสไลด์หลุม เมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศ (ซ้าย) และเหง้าว่านน้ำ AWE3 (ขวา)

a) *T. rubrum* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

b) *M. gypseum* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

c) *P. marneffei* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

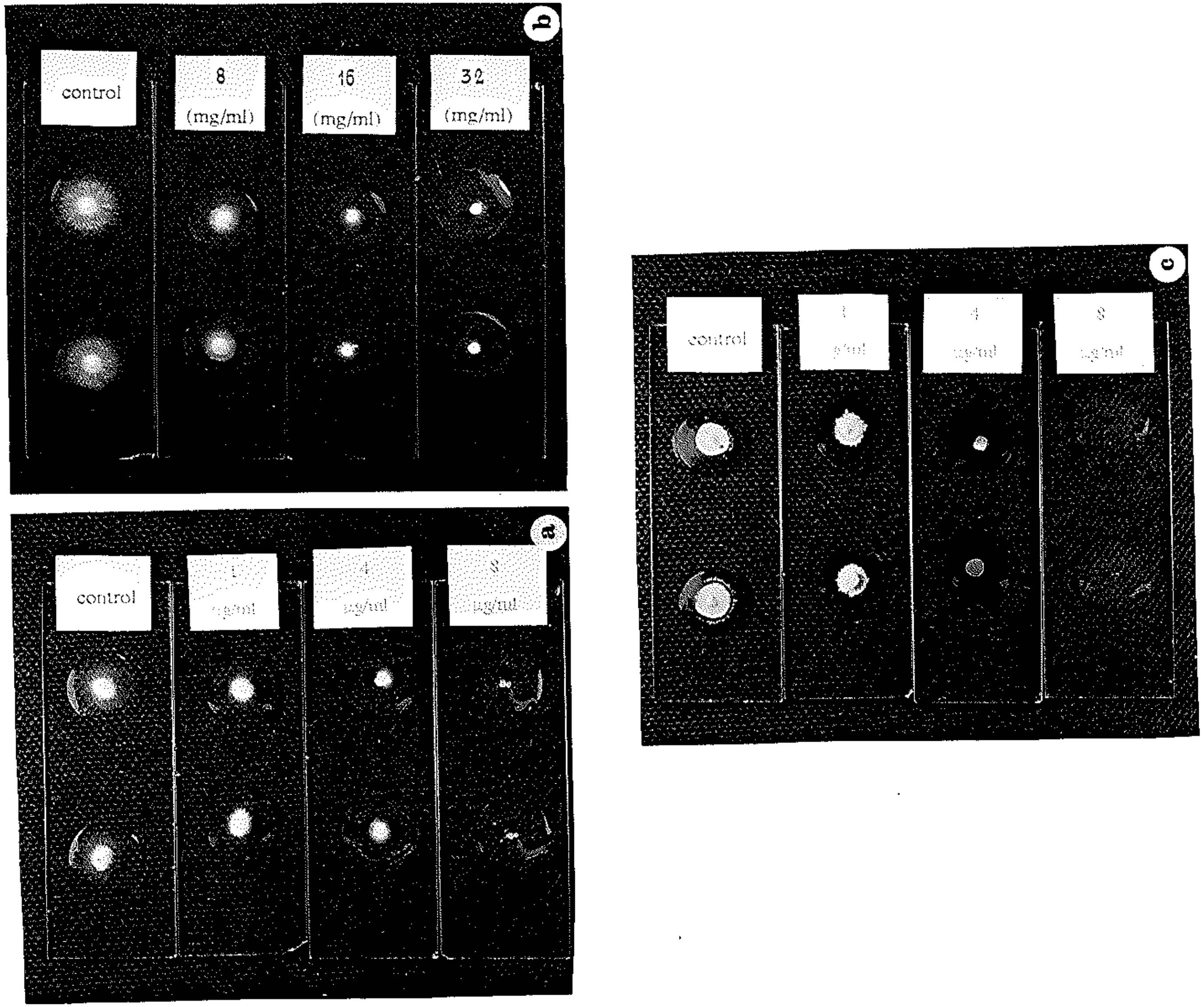

a
control
0.1 mg/ml
0.4 mg/ml
ว่านน้ำ AWE3
b
control
0.2 mg/ml
0.4 mg/ml
0.5 mg/ml
ว่านน้ำ AWE3
c
control
ว่านน้ำ AWE3
a
control
0.8 mg/ml
1 mg/ml
2 mg/ml
b
control
0.8 mg/ml
1 mg/ml
2 mg/ml
ชุมเห็ดเทศ
c
control
1 mg/ml
10 mg/ml
ชุมเห็ดเทศ

ภาพประกอบ 15 ขนาดโคโลนีของเชื้อราในสไลด์หลุม เมื่อทดสอบกับยา miconazole

a) *T. rubrum* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

b) *M. gypseum* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

c) *P. marneffei* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน


b
control
8
(mg/ml)
16
(mg/ml)
32
(mg/ml)
a
control
c
control

7. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum*

ทำการทดสอบการงอกของ macroconidia *M. gypseum* ในสารละลาย DMSO และ Ethanol (ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดจากพืช พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของ macroconidia *M. gypseum* macroconidia ชุดควบคุมเจริญได้ตามปกติ งอก germ tube มีขนาด 49.34-49.95 ไมโครเมตร (ตาราง 7 และภาพประกอบ 16b)

เมื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อการงอกของ macroconidia *M. gypseum* ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงผลไว้ในตาราง 7 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนั้น สารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้งการงอกได้ดี โดยจะสามารถยับยั้งการงอกได้ร้อยละร้อย แต่เมื่อลดระดับความเข้มข้นลง 10 เท่า คือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดว่านน้ำAWE3, ทับทิม และชุมเห็ดเทศ (ภาพประกอบ 16c - h) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของ macroconidia *M. gypseum* ได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการงอกได้ร้อยละร้อย ซึ่งดีกว่าทรงบาดาล และขี้เหล็กที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ที่สามารถยับยั้งการงอกได้เพียงร้อยละ 27.46 และ 10.02 ตามลำดับ และมีสารสกัดจำนวน 4 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ไม่สามารถยับยั้งการงอกของ macroconidia ได้เลย คือ ชุมเห็ดไทย, ชัยพฤกษ์, กัลปพฤกษ์ และกาลพฤกษ์ แต่สารสกัดจากใบกาลพฤกษ์ ชัยพฤกษ์ และกัลปพฤกษ์ ทำให้ขนาดความยาวของ germ tube สั้นลง มีขนาดความยาวอยู่ในช่วง 25.22-32.78 ไมโครเมตร ซึ่งสั้นกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในสารสกัดจากใบชุมเห็ดไทย macroconidia งอก germ tube ยาว 60.14 ไมโครเมตร ซึ่งยาวกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อการงอกของ macroconidia สอดคล้องกับค่า EC_{50} ที่คำนวณได้จากกราฟสมการเส้นตรงระหว่างร้อยละการยับยั้งการงอกของ macroconidia และความเข้มข้นของสารสกัด (ตาราง 8) สารสกัดว่านน้ำAWE3 , ทับทิม และชุมเห็ดเทศมีค่า EC_{50} ต่ำ และมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.08, 0.07 และ0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ รองลงมาได้แก่ ทรงบาดาล ขี้เหล็ก กัลปพฤกษ์ กาลพฤกษ์ มีค่า EC_{50} อยู่ในช่วงระหว่าง 1.78-2.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากใบชัยพฤกษ์ และชุมเห็ดไทยมีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของ macroconidia *M. gypseum* ต่ำสุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 4.03 และ 4.13 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดยิ่งสูงขึ้นก็ยิ่งยับยั้งการงอกของโคนิเดียได้เพิ่มขึ้น และทำให้ความยาวของ germ tube สั้นลงกว่าชุดควบคุมด้วย

การทดสอบฤทธิ์ของยาต้านรามาตรฐาน Miconazole ต่อการยับยั้งการงอกของ macroconidia นั้นพบว่ามีประสิทธิภาพดีมาก ระดับความเข้มข้นของยาเพียง 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการงอกของ macroconidia ได้อย่างสมบูรณ์ และมีค่า EC_{50} ต่ำมากเท่ากับ 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง 7 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งการงอกของ macroconidia และความยาว germ tube ของ macroconidiaของ *M. gypseum* ของสารสกัด และยามาตรฐาน

สารสกัด/ยา (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้ง					ความยาว germ tube ± S.D. (µm)				
	0.001	0.01	0.1	1	10	0.001	0.01	0.1	1	10
DMSO control	-	-	0	-	-	-	-	49.95± 1.88	-	-
Ethanol control	-	-	0	-	-	-	-	49.34± 0.84	-	-
ว่านน้ำAWE3	-	-	77.89	100	100	-	-	15.86± 0.24	0	0
ทับทิม	-	-	83.94	100	100	-	-	14.97± 0.07	0	0
ชุมเห็ดเทศ	-	-	61.48	100	100	-	-	8.95± 0.15	0	0
ชุมเห็ดไทย	-	-	-	0	100	-	-	-	60.14[x]± 3.40	0
ชัยพฤกษ์	-	-	-	0	100	-	-	-	32.78*± 0.22	0
ขี้เหล็ก	-	-	-	10.02	100	-	-	-	31.0*± 1.33	0
ทรงบาดาล	-	-	-	27.46	100	-	-	-	15.26*± 0.26	0
กัลปพฤกษ์	-	-	-	0	100	-	-	-	33.01*± 0.71	0
กาฬพฤกษ์	-	-	-	0	100	-	-	-	25.22*± 0.19	0
Miconazole	100	100	-	-	-	0	0	-	-	-

- : ไม่ได้ทดสอบ

x : ความยาว germ tube ยาวกว่าชุดควบคุม DMSO และethanol

* : ความยาว germ tube สั้นกว่าชุดควบคุม DMSO และethanol

ตาราง 8 ค่า EC_{50} ของสารสกัด และยามาตรฐานในการยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum*

สารสกัด	EC_{50} (mg/ml)
ว่านน้ำAWE3	0.08
ทับทิม	0.07
ชุมเห็ดเทศ	0.09
ชุมเห็ดไทย	4.13
ชัยพฤกษ์	4.03
ขี้เหล็ก	2.13
ทรงบาดาล	1.78
กัลปพฤกษ์	2.31
กาลพฤกษ์	2.46
ยา	**EC_{50} (μg/ml)**
Miconazole	0.04

ภาพประกอบ 16 ลักษณะ macroconidia ของ *M. gypseum* ย้อมสี lactophenol cotton blue (กำลังขยาย 400 เท่า)

a) ชุดควบคุม (Ethanol) ที่เวลา 0 ชั่วโมง

b) ชุดควบคุม (Ethanol) ที่เวลา 18 ชั่วโมง

c) ทดสอบกับว่านน้ำ AWE3 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง

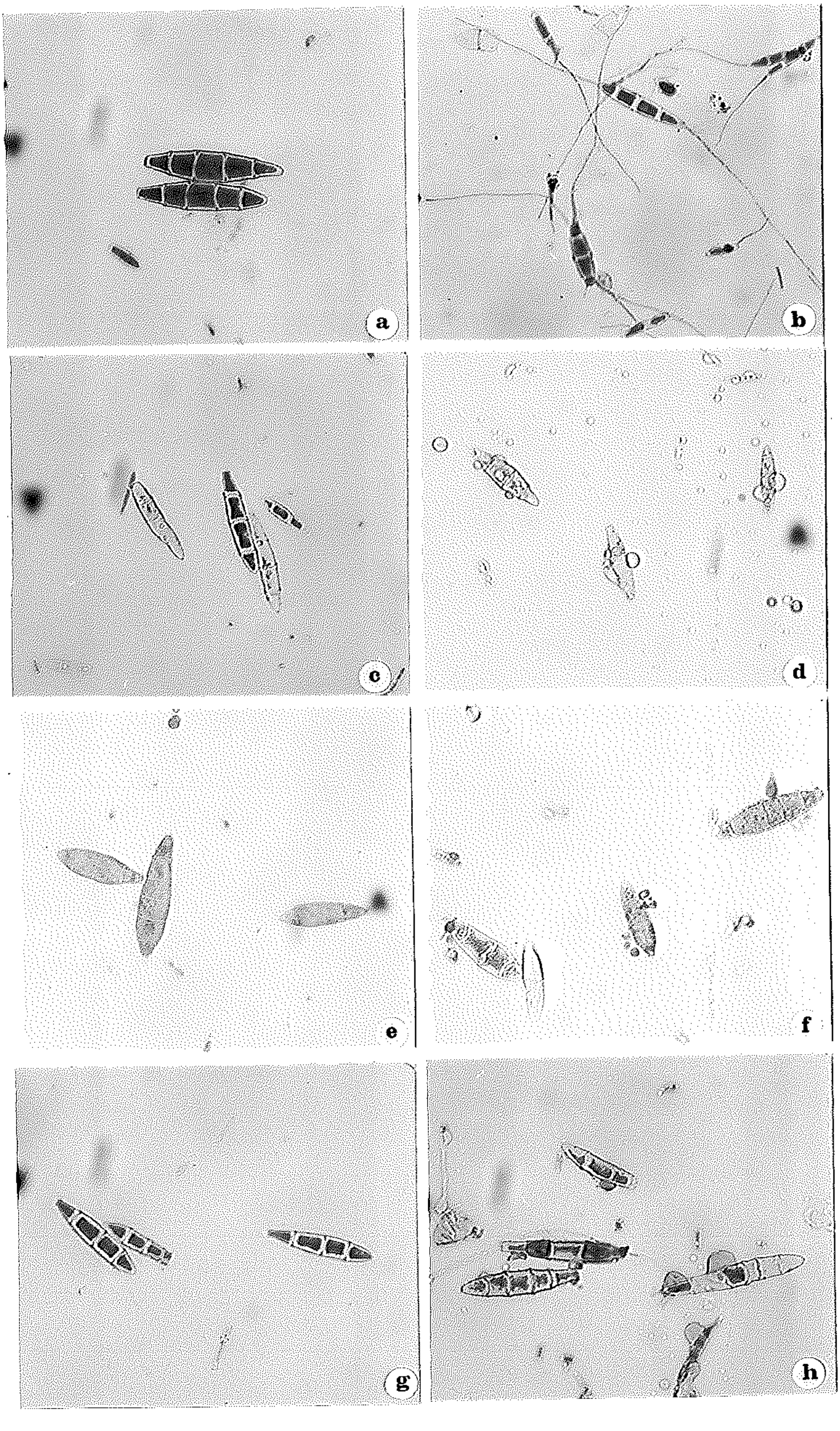
d) ทดสอบกับว่านน้ำ AWE3 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง

e) ทดสอบกับทับทิม 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง

f) ทดสอบกับทับทิม 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง

g) ทดสอบกับชุมเห็ดเทศ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง

h) ทดสอบกับชุมเห็ดเทศ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง


a
b
c
d
e
f
g
h

8. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อความอยู่รอดของ macroconidia ของ *M. gypseum*

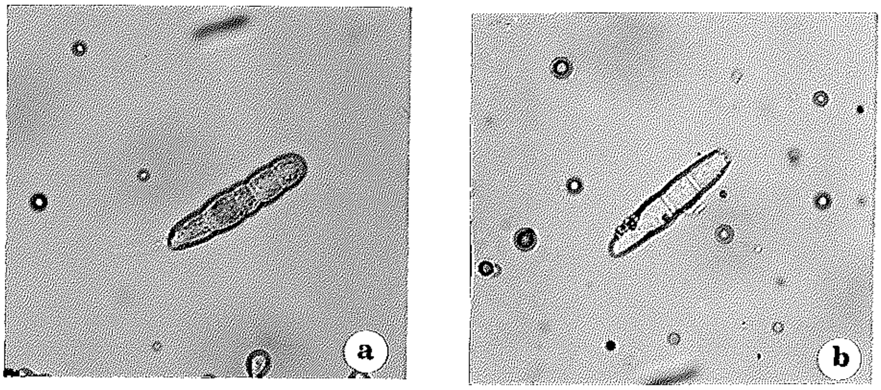
จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อความอยู่รอดของ macroconidia ของ *M. gypseum* ที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการงอกของ macroconidia ได้ พบว่าสารสกัดที่ใช้ทดสอบส่วนใหญ่มีฤทธิ์ทำลาย macroconidia ได้น้อยมาก (ตาราง 9) โดยว่านน้ำ AWE3 จะมีฤทธิ์ทำลาย macroconidia ได้ดีที่สุด มีจำนวน macroconidia ที่มีชีวิตจากการย้อมด้วยสี MTT (ภาพประกอบ 17) ใกล้เคียงกัน และใกล้เคียงกับชุดควบคุมซึ่งอยู่ในช่วงร้อยละ 72.33-100 โดยฤทธิ์การทำลายโคนิเดียจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น และต้องใช้สารสกัดในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าการยับยั้งการงอก สารสกัดจึงจะสามารถทำลาย macroconidia ได้

สำหรับยา Miconazole มีฤทธิ์ทำลาย macroconidia ได้ดีกว่าสารสกัดจากพืชทุกชนิดที่ทดสอบ โดยพบว่าเหลือ macroconidia ที่มีชีวิตร้อยละ 0-75.33

ตาราง 9 ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืช และ ยา miconazole ต่อความอยู่รอดของ macroconidia ของ *M. gypseum*

สารสกัด/ยา (mg/ml)	ร้อยละของ macroconidia ที่มีชีวิต									
	0.1	**0.4**	**0.6**	**0.8**	**1**	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**
DMSO	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ว่านน้ำAWE3		98.67	97.67	95.67	92.33	81.33	72.33	-	-	-
ทับทิม	-	-	-	-	100	96.00	93.33	90.00	85.33	81.00
ชุมเห็ดเทศ	-	-	100	100	100	99.67	97.33	-	-	-
ชุมเห็ดไทย	-	-	-	-	100	100	100	99.33	98.67	98.33
ชัยพฤกษ์	-	-	-	-	100	100	99.67	98.00	96.67	94.33
ขี้เหล็ก	-	-	-	-	100	100	99.76	97.33	95.00	93.33
ทรงบาดาล	-	-	-	-	100	100	100	100	100	98.33
กัลปพฤกษ์	-	-	-	-	100	100	100	100	100	98.33
กาลพฤกษ์	-	-	-	-	100	100	100	100	98.41	96.33
ยา (µg/ml)	**0.1**	**0.2**	**0.4**	**0.8**	**1**	**2**	**4**			
Miconazole	75.33	60.33	41.00	11.00	0	0	0			

- : ไม่ได้ทำการทดสอบ



ภาพประกอบ 17 ลักษณะ macroconidia ของ *M. gypseum* เมื่อย้อมสี MTT
(กำลังขยาย 400 เท่า)
a) macroconidia ที่มีชีวิต มีเซลล์ที่ย้อมติดสี MTT อย่างน้อย 1 เซลล์
b) macroconidia ที่ไม่มีชีวิต ไม่ติดสี MTT

9. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และยีสต์ ของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราดนั้นเลือกใช้ *B. subtilis* เป็นตัวแทนเชื้อในกลุ่มแบคทีเรีย และ *C. neoformans* เป็นตัวแทนเชื้อในกลุ่มยีสต์ ผลการศึกษาตรวจไม่พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั้งสองชนิด

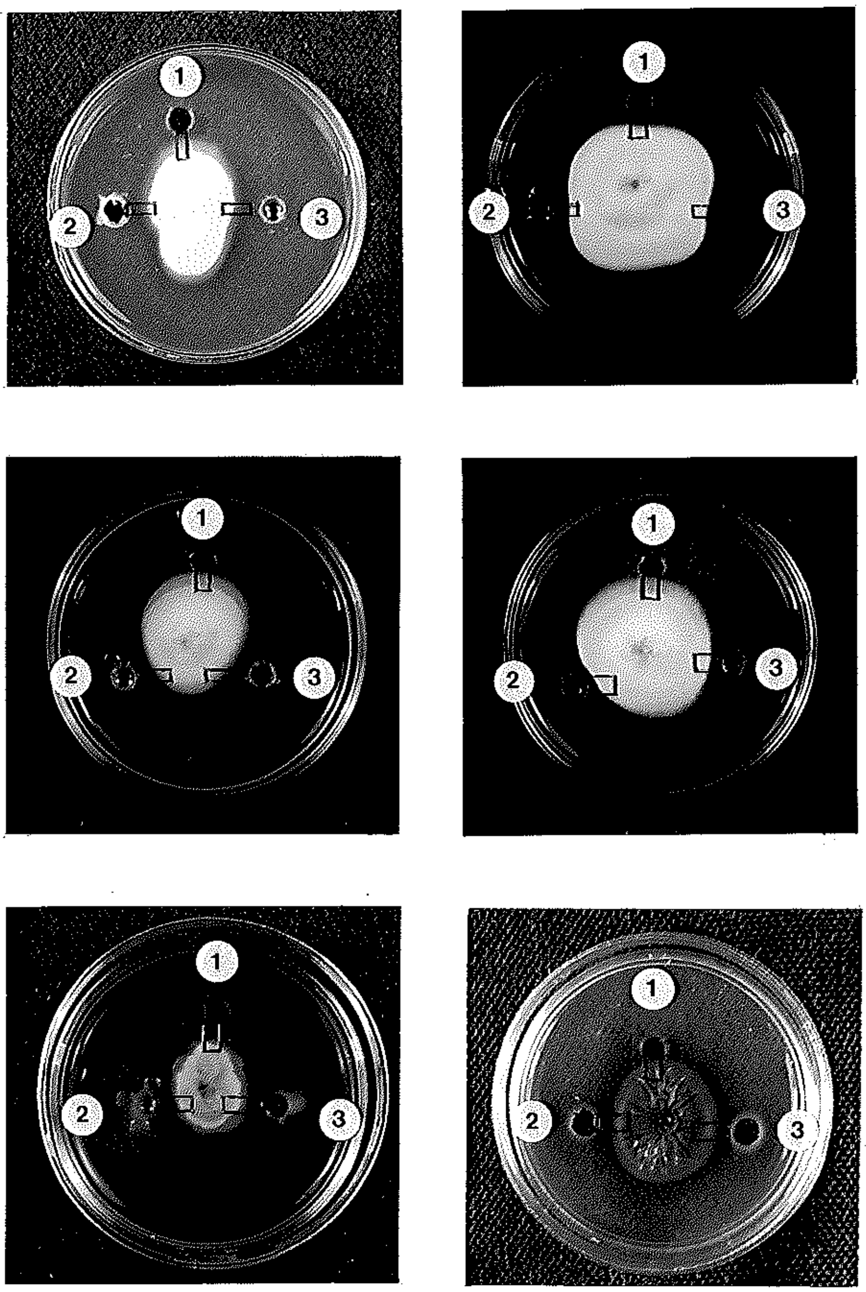
ส่วนการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 และใบชุมเห็ดเทศต่อสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* (ภาพประกอบ 18) เมื่อนำสายรามาย้อมดูด้วย lactophenol cotton blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะเห็นขนาดสายราทั้ง 3 ชนิดในชุดควบคุมโตกว่าชุดทดสอบเล็กน้อย (ภาพประกอบ 19-21) แต่ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างของสายรา สังเกตพบสายรา *M. gypseum* และ *P. marneffei* ที่ทดสอบกับว่านน้ำ AWE3 มีการติดสีน้อยลง (ภาพประกอบ 20b และ 21b) เมื่อนำมาศึกษาด้วยกล้อง SEM จะสังเกตการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างลักษณะสายราแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน สายราชุดควบคุมมีผนังเรียบ รูปร่างสม่ำเสมอ (ภาพประกอบ 22a, 23a และ 24a) ส่วนชุดทดสอบกับสารสกัดทั้ง 2 สารนั้นสายรามีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ มีรอยย่น มีการหดตัวและยุบตัวลง (ภาพประกอบ 22-24)

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 และใบชุมเห็ดเทศต่อ macroconidia ของ *M. gypseum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และย้อมด้วย lactophenol cotton blue พบว่า macroconidia ในชุดควบคุมมีผนังเรียบ รูปร่างสม่ำเสมอ ติดสีน้ำเงินของ lactophenol cotton blue อย่างชัดเจน (ภาพประกอบ 16a) แต่ macroconidia ในชุดทดสอบจะมีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ บางเซลล์ใสขึ้น ติดสีน้อยลง บางเซลล์ไม่ติดสี (ภาพประกอบ 16c, d และ h) และเห็นการเปลี่ยนแปลงชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อศึกษาด้วยกล้อง SEM macroconidia ในชุดควบคุม รูปทรงกระบอกผิวเรียบ (ภาพประกอบ 25a) ในขณะที่ macroconidia ในชุดทดสอบกับสารสกัดทั้ง 2 สารจะหดตัวเหี่ยวย่น และยุบตัวลง (ภาพประกอบ 25b และ 25c)

ภาพประกอบ 18 โคโลนีของ *T. rubrum* อายุ 6 วัน (a), *M. gypseum* อายุ 4 วัน (b) และ *P. marneffei* อายุ 4 วัน (c) เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 (ซ้าย) และใบชุมเห็ดเทศ (ขวา)

1. ชุดควบคุม
2. สารสกัดความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. สารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ : ▭ ชิ้นส่วนเชื้อที่ตัดไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์



a

b

c

ว่านน้ำ AWE3 ชุมเห็ดเทศ

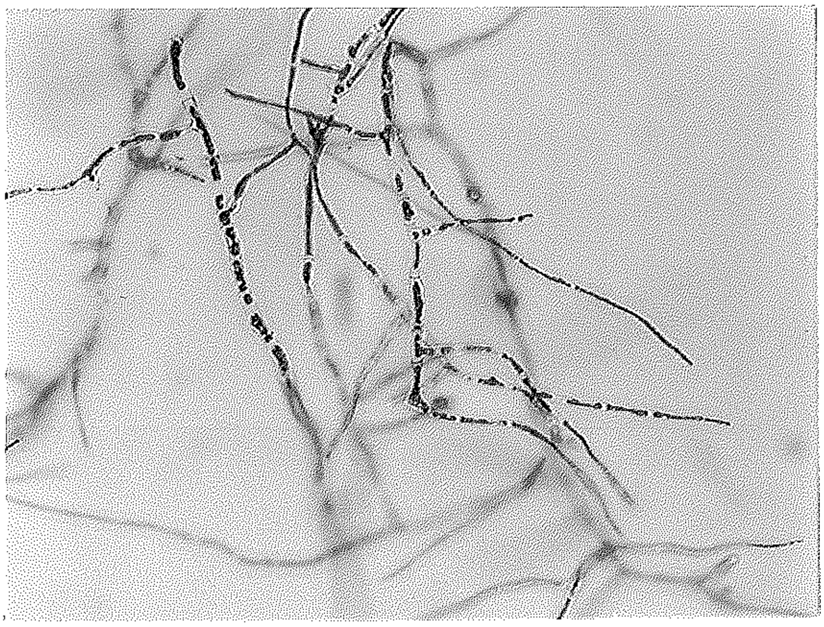
ภาพประกอบ 19 ลักษณะของสายรา *T. rubrum* ย้อมด้วย lactophenol cotton blue (กำลังขยาย 400 เท่า)

a : ชุดควบคุม

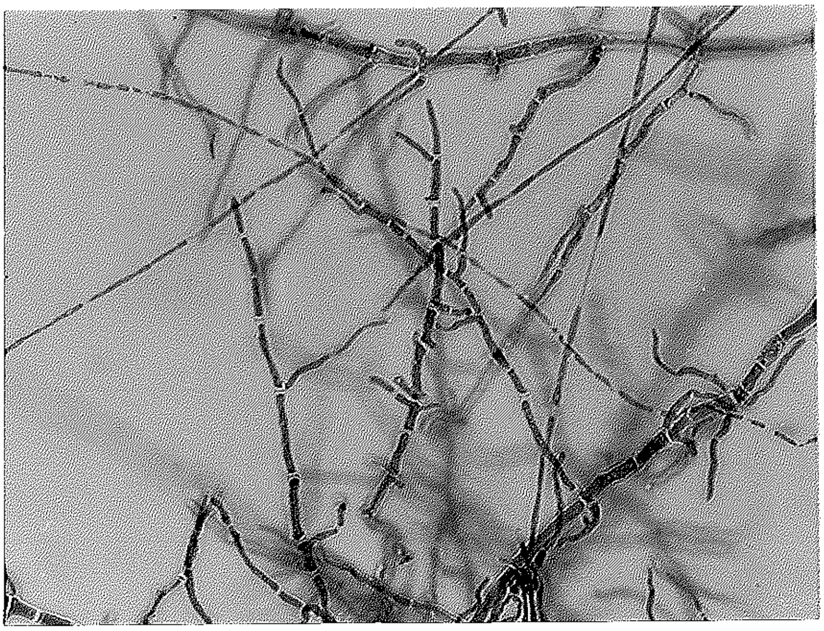
b : สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

c : สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

a



b



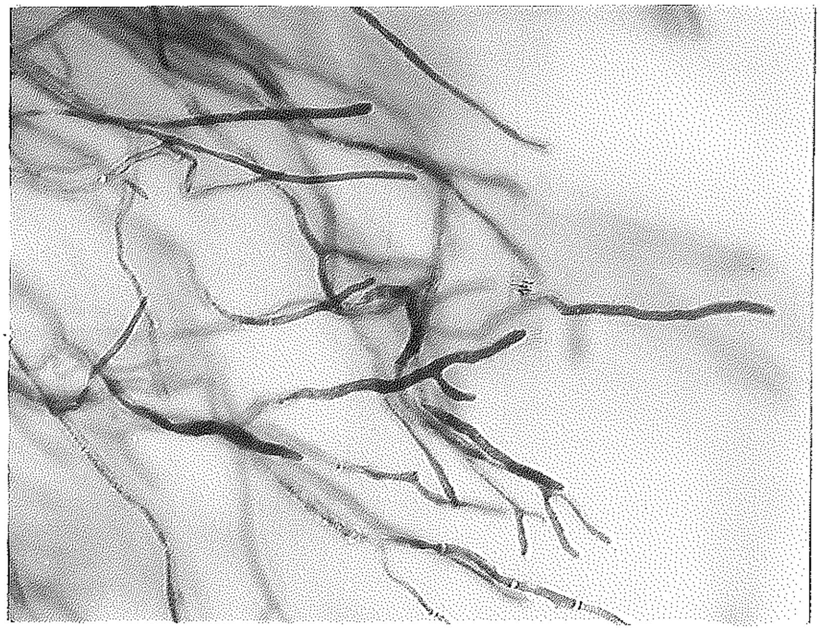
c

ภาพประกอบ 20 ลักษณะสายราของ *M. gypseum* ย้อมด้วย lactophenol cotton blue (กำลังขยาย 400 เท่า)

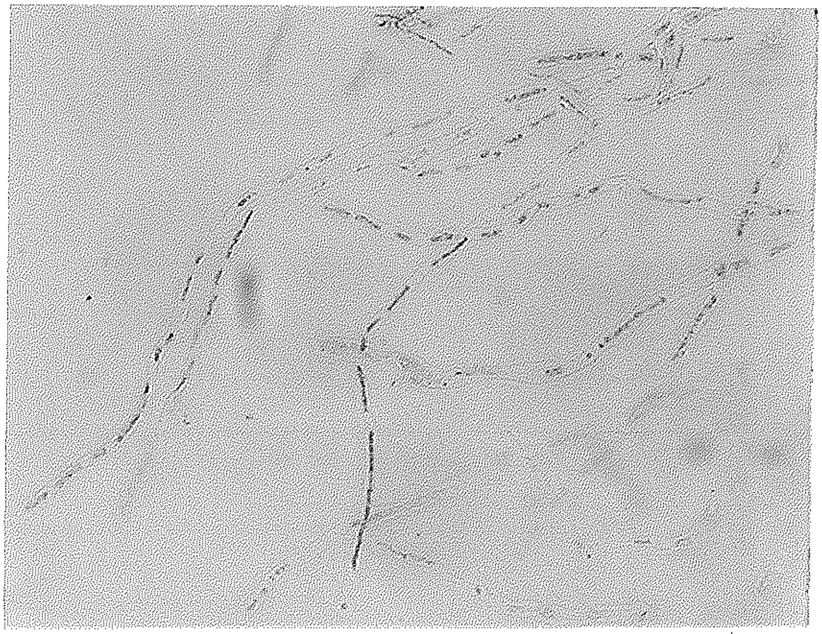
a : ชุดควบคุม

b : สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

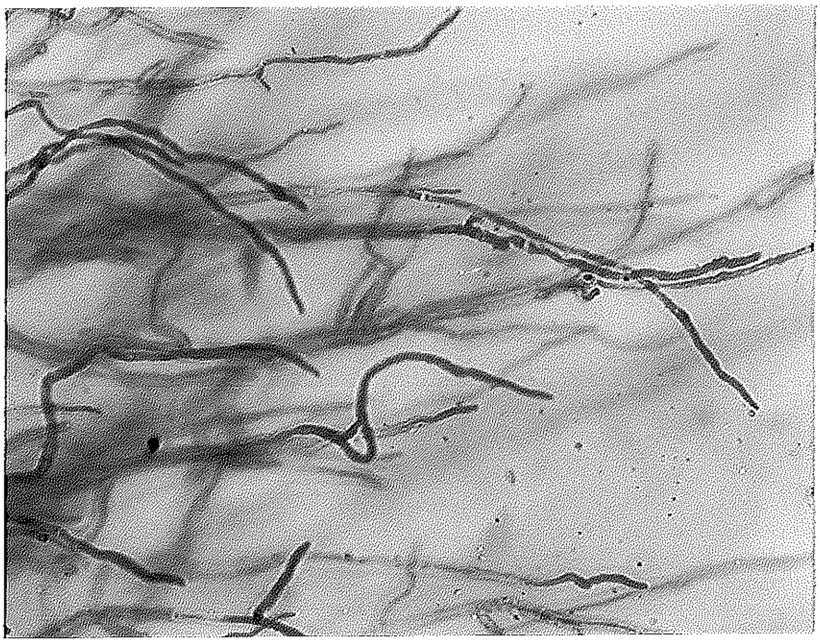
c : สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



a



b



c

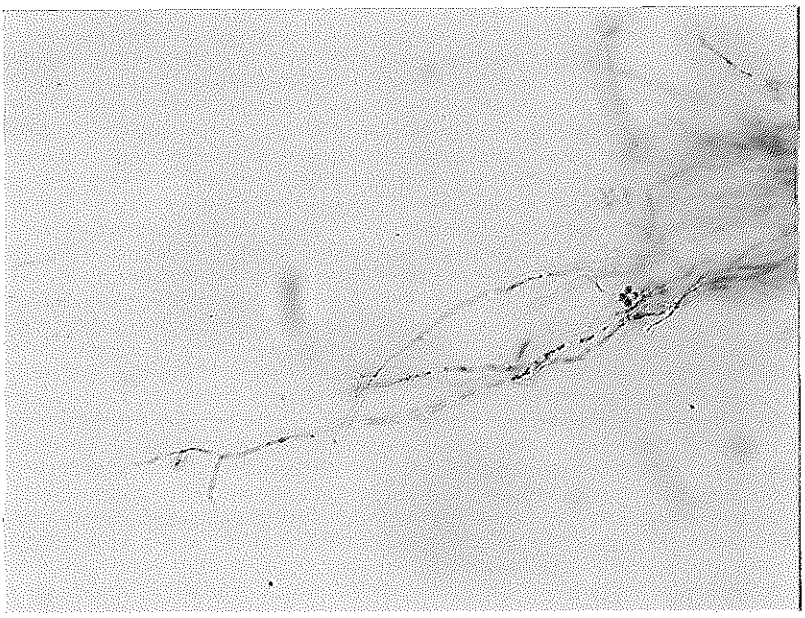
ภาพประกอบ 21 ลักษณะของสายรา *P. marneffei* ย้อมด้วย lactophenol cotton blue (กำลังขยาย 400 เท่า)

a : ชุดควบคุม

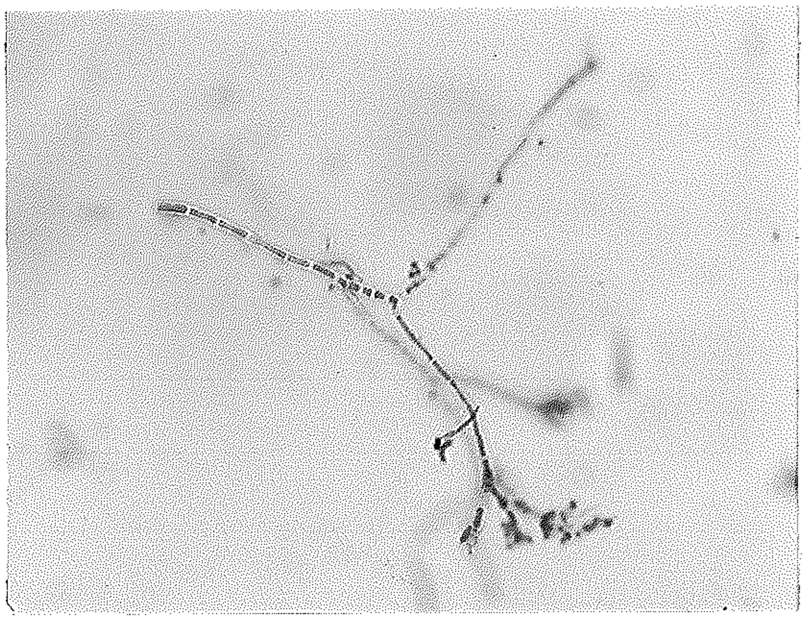
b : สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

c : สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

a



b



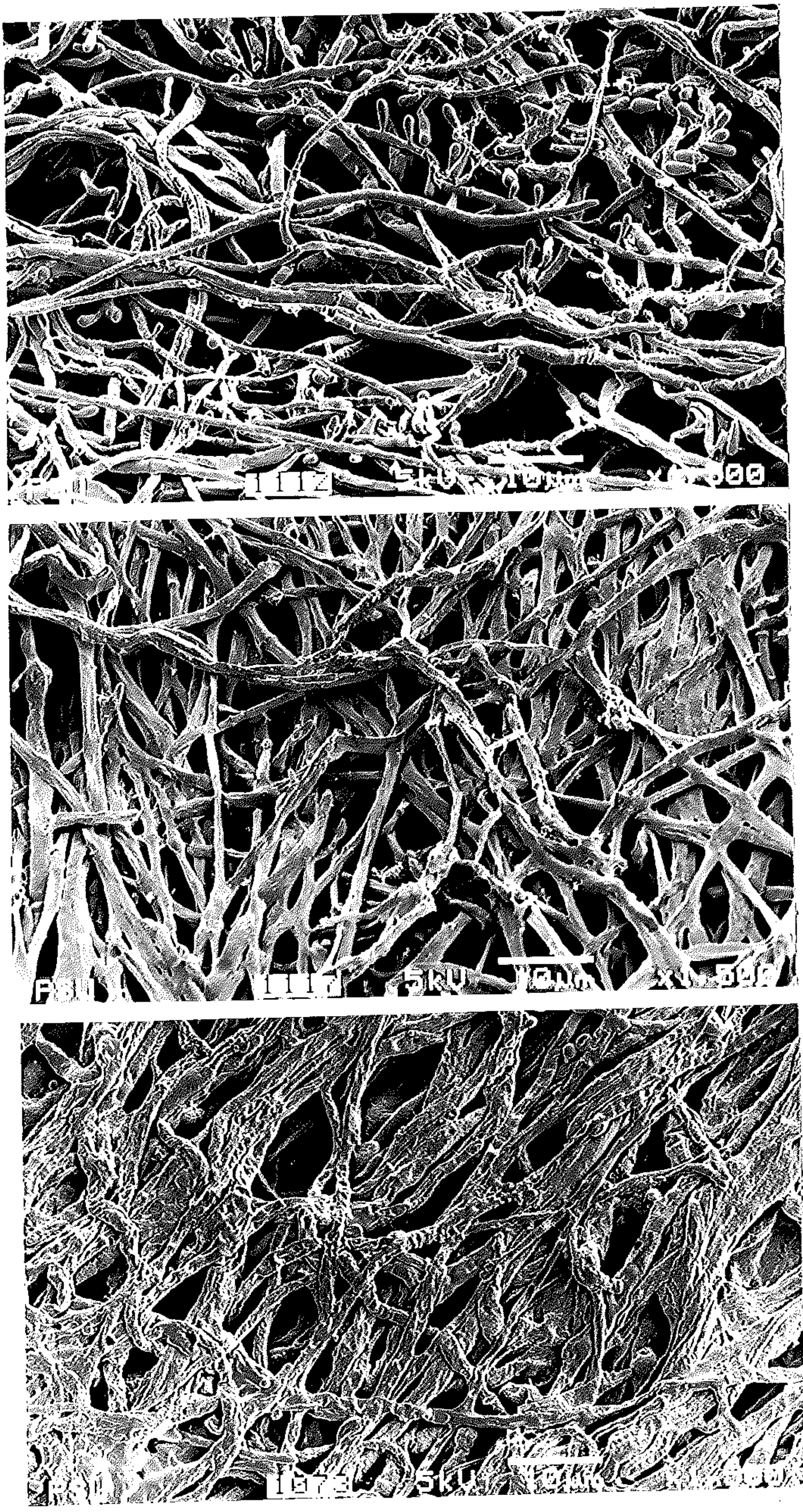
c

ภาพประกอบ 22 ลักษณะของสายรา *T. rubrum* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (กำลังขยาย 1,500 เท่า)

a : ชุดควบคุม

b : สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

c : สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



a

b

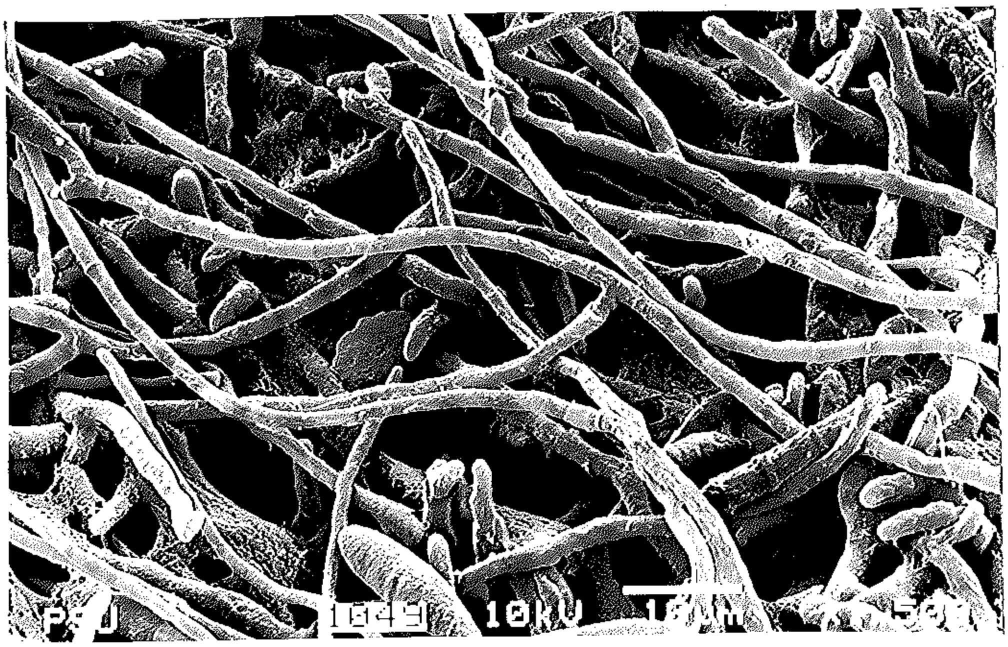
c

ภาพประกอบ 23 ลักษณะของสายรา *M. gypseum* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (กำลังขยาย 1,500 เท่า)

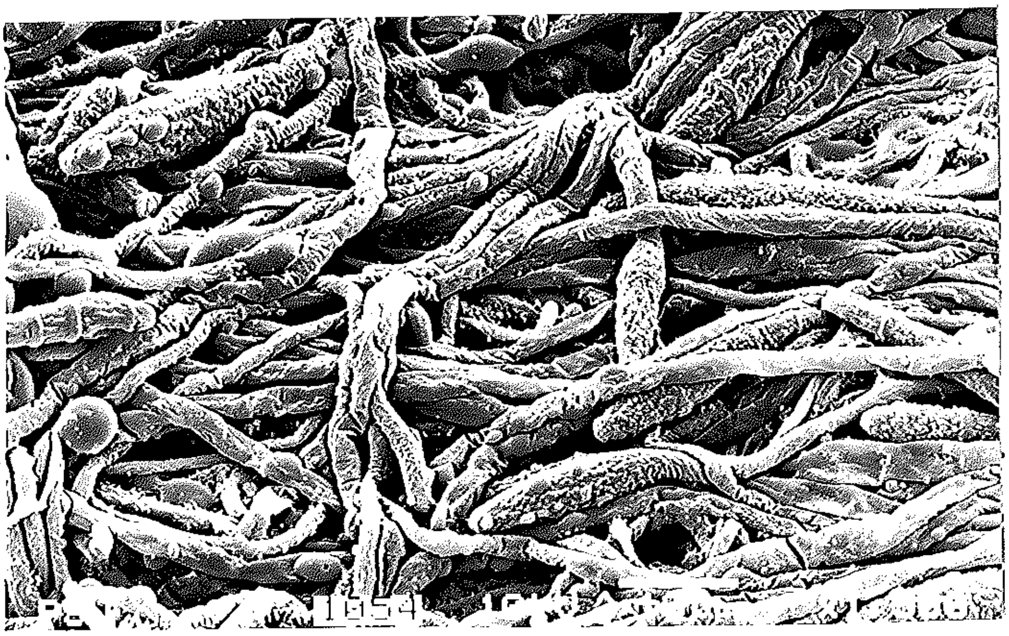
a : ชุดควบคุม

b : สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

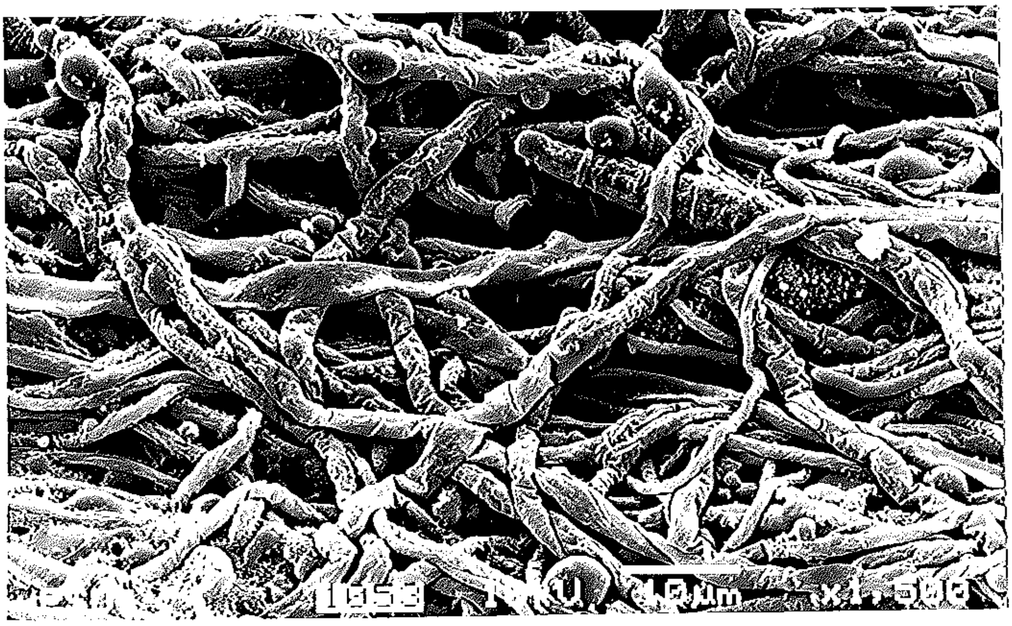
c : สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



a



b



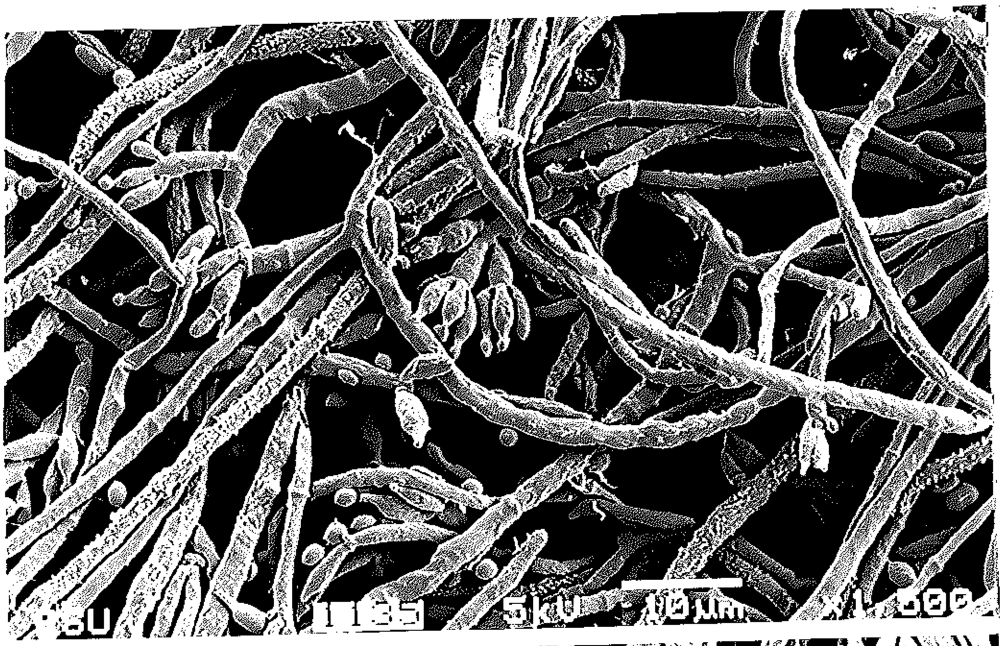
c

ภาพประกอบ 24 ลักษณะของสายรา *P. marneffei* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (กำลังขยาย 1,500 เท่า)

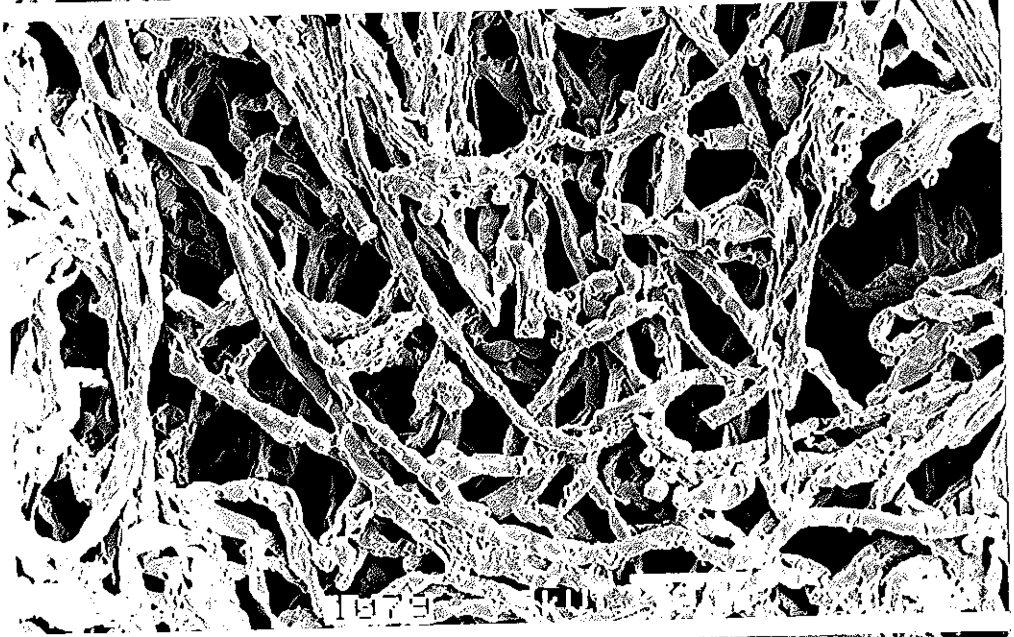
a : ชุดควบคุม

b : สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

c : สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



a



b

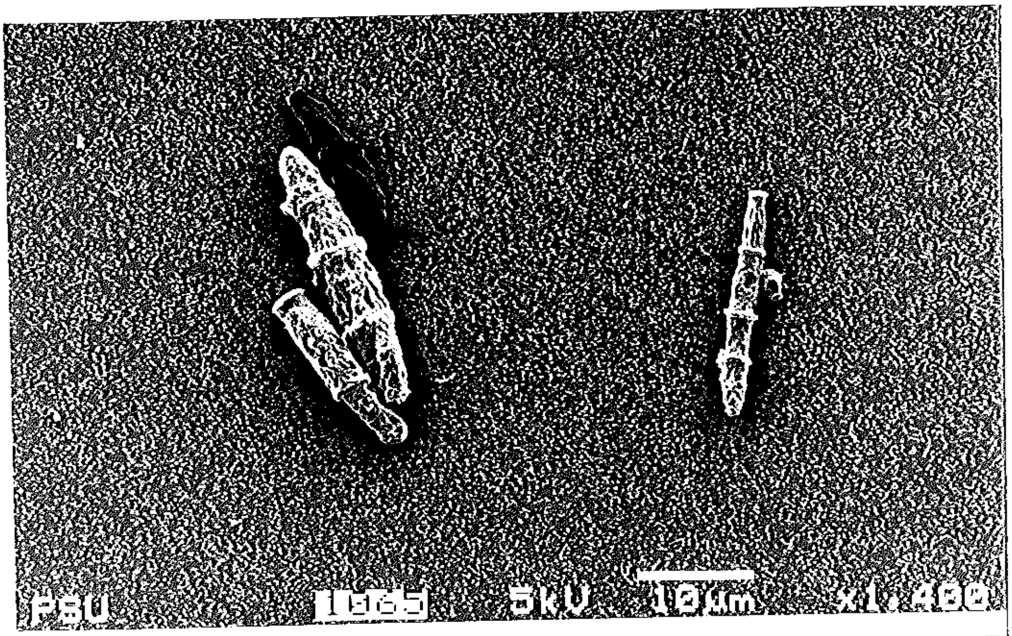
c

ภาพประกอบ 25 ลักษณะ macroconidia ของ *M. gypseum* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนชนิดส่องกราด

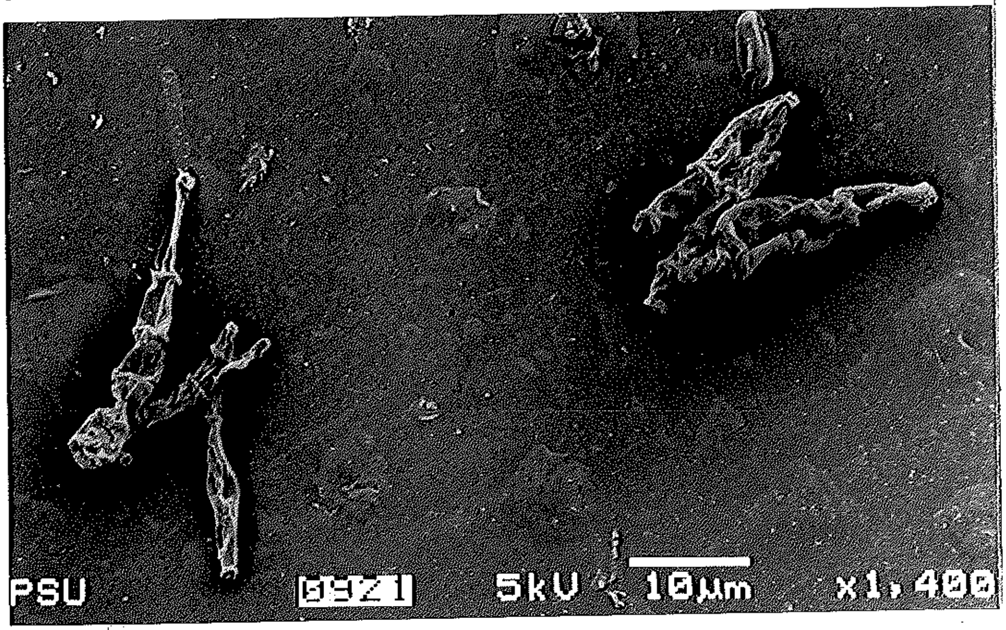
a : ชุดควบคุม (กำลังขยาย 1,400 เท่า)

b : ว่านน้ำ AWE3 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กำลังขยาย 1,500 เท่า)

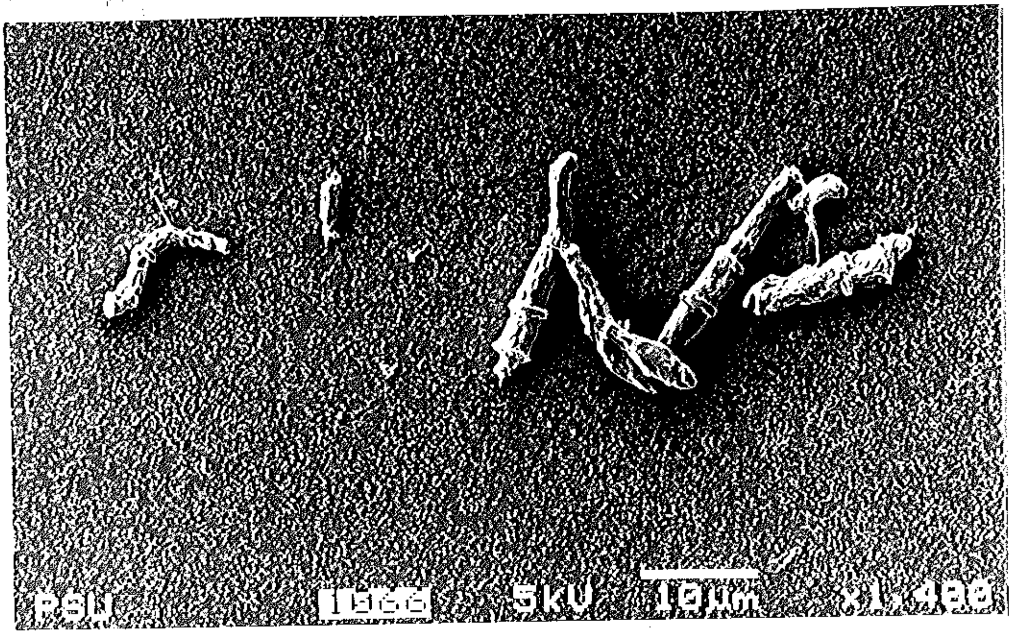
c : ชุมเห็ดเทศ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กำลังขยาย 1,400 เท่า)



a



b



c

บทที่ 4

วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสกัดสารจากพืช

ทำการสกัดสารจากเหง้าว่านน้ำ เปลือกผลทับทิม และใบพืชในสกุล *Cassia* 7 ชนิด ได้แก่ ชุมเห็ดเทศ ชุมเห็ดไทย ชัยพฤกษ์ ขี้เหล็ก ทรงบาดาล กัลปพฤกษ์ และกาลพฤกษ์ โดยเลือกใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย ทั้งนี้เนื่องจากก่อนหน้านี้มีรายงานเกี่ยวกับการใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆสกัดสาร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารที่สกัดได้จากพืชชนิดต่างๆที่ศึกษาด้วย methanol แล้ว พบว่า methanol เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารขั้วแตกต่างกันได้ และเป็นตัวทำละลายที่หาซื้อได้ง่าย อีกทั้งยังมีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอื่นๆ (ขวัญใจ และคณะ, 2537; Bandara *et al.*, 1990; Palanichamy and Nagarajan, 1990; Ibrahim and Osman, 1995; Navarro *et al.*, 1996)

ในการสกัดสารจากว่านน้ำนั้นเลือกสกัดสารจากส่วนของเหง้า ทั้งนี้เนื่องมาจากก่อนหน้านี้มีรายงานว่าเหง้าว่านน้ำมีสารออกฤทธิ์ต้านราคือ β-asarone (Ohmoto and Sung, 1982) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้นำส่วนย่อย AWE3 ที่ได้จากการแยกสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำโดยวิธีโครมาโตกราฟี มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากข้อมูลของ NMR spectrum บ่งชี้ว่า AWE3 ประกอบด้วยสารหลักคือ β-asarone (วัชรินทร์, unpublished data; รัช และดวงแข, 2539) AWE3 มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล ปริมาณสารที่สกัดได้เท่ากับ 12.70%

ส่วนการศึกษาเปลือกผลทับทิม และใบพืชในสกุล *Cassia* ทั้ง 7 ชนิดนั้นจะศึกษาในส่วนสกัดหยาบ โดยไม่ทำการแยกสารสกัดหยาบออกเป็นส่วนๆ และทำการสกัดสารจากเปลือกผลทับทิมด้วย methanol สามารถสกัดสารจากเปลือกผลทับทิมได้ 61.34% มีลักษณะเป็นของหนืดสีน้ำตาล สารสกัดจากใบพืชในสกุล *Cassia* ทั้ง 7 ด้วย methanol มีลักษณะเป็นของหนืดสีดำ โดยปริมาณสารที่สกัดได้จากพืชแต่ละชนิดนั้น ส่วนใหญ่มีค่า

ใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วง 4.48-7.78% และสกัดสารจากใบชุมเห็ดไทยได้น้อยที่สุด มีปริมาณสารที่สกัดได้ 2.22% ซึ่งจากการศึกษาพบว่ามีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ ชัยพฤกษ์ ขี้เหล็ก ทรงบาดาล และกัลปพฤกษ์ (ขวัญใจ และคณะ, 2537; Ibrahim and Osman, 1995) แต่ไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากใบกาลพฤกษ์ โดยมีรายงานการศึกษาสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศมากที่สุด และทำการสกัดสารด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น 95% ethanol, เฮกเซน และ petroleum ether (Ibrahim and Osman, 1995; Palanichamy and Nagarajan, 1990; ขวัญใจ และคณะ, 2537) ส่วนสารสกัดจากใบชัยพฤกษ์ ขี้เหล็ก ทรงบาดาล และกัลปพฤกษ์นั้น ก่อนหน้านี้มีรายงานการสกัดสารจากใบด้วยเฮกเซนเท่านั้น (ขวัญใจ และคณะ, 2537)

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และ ยีสต์ของสารสกัดจากพืช โดยวิธี disc diffusion และ agar dilution

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดชนิดต่างๆนั้น เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ส่วนใหญ่มีความสำคัญทางการแพทย์ โดยก่อให้เกิดปัญหาโรคติดเชื้อ มีเพียงบางตัวเท่านั้น เช่น *B. subtilis* ที่ไม่ก่อโรคติดเชื้อ แต่เป็นเชื้อที่ค่อนข้างไวต่อยา และสารเคมีต่างๆ โดยจะให้วงใสรอบแผ่นยากว้างกว่าเชื้ออื่นๆ จึงนำมาทดสอบด้วย เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัด จุลินทรีย์ที่นำมาศึกษานั้นเป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่ม แบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยา ส่วน Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) และ *Enterococcus* sp. เป็นเชื้อที่แยกได้จากคนไข้ซึ่งมักจะดื้อต่อยาที่ใช้รักษา และ *B. subtilis* ซึ่งค่อนข้างไวต่อยา แบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *E.coli* ATCC 25922 สายพันธุ์มาตรฐานที่ไวต่อยา Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ *P. aeruginosa* มักก่อปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาลต่างๆ ส่วนยีสต์ได้แก่ *C. albicans* และ *C. neoformans* แยกได้จากตัวอย่างคนไข้ในโรงพยาบาล มักก่อปัญหาโรคติดเชื้อในคนไข้โรคเอดส์ สำหรับ *S. cerevisiae* ไม่ก่อโรคในคน แต่จะไวต่อยาจึงนำมาใช้เป็นตัวทดสอบด้วย

การศึกษาความไวต่อสารต้านจุลินทรีย์ในเบื้องต้นนั้น เลือกใช้วิธี disc diffusion โดยการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบแผ่น disc

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดชนิดต่างๆ ที่ศึกษา และนำไปพิจารณาเลือกสารสกัดที่มีศักยภาพในการต้านจุลินทรีย์ เพื่อหาค่า MIC, MBC หรือ MFC ต่อไป การทดสอบจะใช้แผ่น disc ชุบสารสกัด 2 แบบคือ แบบแผ่นเปียก และแบบแผ่นแห้ง เนื่องจากในสารสกัดมีทั้งสารที่ละลายน้ำได้ดี และสารที่ละลายในน้ำได้น้อย สารที่ละลายน้ำได้ดีจะสามารถแพร่ซึมในวุ้นได้ทั้งจากแผ่นเปียกและแผ่นแห้ง ส่วนสารที่ละลายในน้ำได้น้อยจะแพร่ซึมผ่านได้ไม่ดี ถ้ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ ตัวทำละลายในแผ่นเปียกจะเป็นตัวช่วยพาสารให้แพร่ซึมไปได้บ้าง ทำให้สังเกตเห็นวงใสได้ดีกว่าในแผ่นแห้ง แต่ถ้าสารสกัดเป็นสารที่ระเหยง่าย อาจไม่สามารถทดสอบโดยวิธีนี้ได้ วิธีนี้มีทั้งข้อดี และข้อเสีย กล่าวคือวิธีนี้จะเห็นผลการทดลองได้ชัดเจน ใช้สารสกัดในปริมาณน้อย และวิธีการทดสอบไม่ยุ่งยาก แต่วิธีนี้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นเท่านั้นว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้หรือไม่ แต่ไม่สามารถระบุระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะเจาะจง

ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC, MBC หรือ MFC ของสารสกัดจากพืชต่อจุลินทรีย์ที่ทดสอบนั้น เลือกใช้วิธี agar dilution ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดส่วนใหญ่มีการละลายต่ำ หากทำการทดสอบด้วยวิธี broth dilution เมื่อผสมสารสกัดกับอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว พบว่าอาหารขุ่นไม่สามารถอ่านผลการทดลองได้ แต่วิธี agar dilution สามารถอ่านผลการทดลองได้ชัดเจนถึงแม้อาหารที่ผสมสารสกัดจะขุ่นก็ตาม แต่วิธีนี้มีข้อเสียที่มีวิธีการทดสอบหาค่า MBC หรือ MFC ที่ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงกว่า และใช้เวลาในการเตรียมการทดสอบมากกว่าวิธี broth dilution

สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 มีฤทธิ์ยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* ATCC 25923 และ MRSA) แกรมลบ (*E. coli* ATCC 25922 และ EIEC) โดยยับยั้ง MRSA และ EIEC ได้ดีกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน นอกจากนี้ยังยับยั้งยีสต์ (*C. albicans, C. neoformans* และ *S. cerevisiae*) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Grosvenor และคณะ (1995) ที่พบว่าสารสกัดจากใบ ราก และเหง้าว่านน้ำด้วย methanol มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* แต่มีผลการทดลองบางส่วนที่ต่างกัน คือ Grosvenor และคณะ (1995) พบว่าสารสกัดว่านน้ำไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* แต่จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่าสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำสามารถยับยั้ง

การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากในการทดลองนี้ใช้สารสกัดส่วน AWE3 ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่าสารสกัดหยาบ methanol สารสกัดส่วนนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดี ซึ่งน่าจะเป็นฤทธิ์ของ β-asarone (Ohmoto and Sung, 1982) เมื่อทดสอบหาค่า MIC และ MBC หรือ MFC พบว่าสารสกัดว่านน้ำ AWE3 มีฤทธิ์ต้านยีสต์ได้ดีกว่าแบคทีเรีย โดยมีค่า MIC ต่อยีสต์อยู่ในช่วง 0.12-1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 4) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่า MIC ต่อแบคทีเรีย (5-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 5-40 เท่า และค่า MIC และ MFC ต่อยีสต์แต่ละตัวมีค่าใกล้เคียงกัน ต่างกันไม่เกิน 4 เท่า แสดงว่าสารสกัดนี้น่าจะมีฤทธิ์ fungicidal (Lorian, 1991)

เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 ต่อเซลล์ของ *B. subtilis* และ *C. neoformans* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนชนิดส่องกราด พบว่าสารสกัดไม่ได้ทำให้รูปร่างลักษณะของเซลล์ทั้งสองชนิดแตกต่างไปจากเซลล์ในชุดควบคุม แสดงว่าสารสกัดไม่มีผลต่อผนังเซลล์ หรือต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และยีสต์ ทำให้เห็นเซลล์มีลักษณะปกติ แต่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้โดยอาจจะไปทำลายหรือรบกวนกระบวนการบางอย่างที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตภายในเซลล์ ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญต่อไปได้ สารสกัดจะไม่มีผลต่อผนังเซลล์ของเชื้อที่ทดสอบทำให้เห็นเซลล์มีลักษณะปกติ

สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม และใบพืชสกุล *Cassia* 4 ชนิดได้แก่ ชุมเห็ดเทศ ชัยพฤกษ์ (คูน) ทรงบาดาล และกาลพฤกษ์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเท่านั้น ไม่ยับยั้งยีสต์

การศึกษาในครั้งนี้ พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด มีค่า MIC ต่อแบคทีเรียแกรมบวก (MRSA และ *B. subtilis*) และแบคทีเรียแกรมลบ (EIEC และ *P. aeruginosa*) อยู่ในช่วง 0.62-1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าสารสกัดจากพืชชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ (ตาราง 4) ค่า MIC ต่อ MRSA ใกล้เคียงกับการทดลองของ Navarro และคณะ (1996) ที่พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ค่า MIC ต่อ EIEC และ *P. aeruginosa* มีค่าต่ำกว่ารายงานของ Navarro และคณะ ประมาณ 8 เท่า

สารสกัดจากพืชสกุล *Cassia* ทั้ง 7 ชนิดที่นำมาศึกษา มีเพียง 4 ชนิด ได้แก่ ชุมเห็ดเทศ ชัยพฤกษ์ ทรงบาดาล และกาลพฤกษ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแต่ไม่ยับยั้งยีสต์ พืชในกลุ่มนี้มีเพียงชุมเห็ดเทศเท่านั้นที่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในคนอย่างกว้างขวาง (Palanichamy and Nagarajan, 1990; Crockett *et al.*, 1992; Anesini and Perez, 1993; Damodaran and Venkataraman, 1994; Ibrahim and Osman, 1995) ส่วนพืชชนิดอื่นๆมีเพียงรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืช (ขวัญใจ และคณะ, 2537) และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ เช่นใบชุมเห็ดไทย และขี้เหล็กมีฤทธิ์เป็นยาระบาย (วิทย์, 2531)

อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบจากพืชทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่ำ เนื่องจากมีค่า MIC ตั้งแต่ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง ไม่เหมาะที่จะนำไปพัฒนาเป็นยาต้านแบคทีเรีย ซึ่งต่างจากการทดลองของ Crockett และคณะ (1992) ที่พบว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศด้วยน้ำสามารถยับยั้ง *E. coli* และ *C. albicans* ได้มีค่า MIC 1.6 และ 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ส่วนสารสกัดจากใบชัยพฤกษ์ (คูน) นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยที่สุด สามารถยับยั้งได้เฉพาะ *B. subtilis* ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากนันทวัน (2534 a) ที่พบว่าสารสกัดจากใบคูนด้วยแอลกอฮอล์ 95% ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa* แต่มีผลการทดลองบางส่วนต่างกันที่สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ แต่จากการทดลองในครั้งนี้ที่สารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ และเมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้กับยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน พบว่าต้องใช้สารสกัดในปริมาณความเข้มข้นที่สูงกว่ายา ดังนั้นหากจะทำการศึกษาสารสกัดเหล่านี้เพื่อพัฒนาปรับปรุงเป็นยา หรือสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคต่อไป จะต้องทำการแยกสารที่มีในสารสกัดให้บริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปทดสอบก็จะได้ค่า MIC และ MBC หรือ MFC ที่ลดต่ำลง

3. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรานั้น ได้ทำการทดสอบกับเชื้อราก่อโรค 2 กลุ่ม คือ dermatophytes ได้แก่ *T. rubrum* และ *M. gypseum* ซึ่งก่อโรคกลากที่บริเวณต่างๆของร่างกาย และ *P. marneffei* ซึ่งก่อโรค penicillosis marneffei ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งการศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากพืช

ชนิดต่างๆต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. rubrum* และ *M. gypseum* นั้นได้มีผู้ทำการศึกษาไว้บ้างแล้ว (นันทวัน, 2534 b; ไพลิน, 2536; สุรภี, 2536; อรุณรุ่ง, 2537; Palanichamy and Nagarajan, 1990; Caceres *et al.*, 1991) แต่ยังไม่มีผู้ทำการศึกษากับเชื้อ *P. marneffei*

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดนั้นจะเลือกใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุม เนื่องจากวิธีนี้เห็นผลการทดลองได้ชัดเจน ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารสกัดในการทดสอบน้อยมาก เหมาะจะใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารที่มีปริมาณน้อย แต่วิธีการนี้มีขั้นตอนการทดสอบที่ค่อนข้างยุ่งยาก การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราต้องทำภายใต้กล้องสเตอริโอซูม

จากการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของสายราที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทดสอบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสายราหรือไม่ และนำผลที่ได้ไปพิจารณาเลือกระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่จะนำมาทดสอบหาค่า EC_{50}ต่อไป พบว่าสารสกัดทั้ง 9 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของสายราทั้ง 3 ชนิดได้ โดยยับยั้งเชื้อ *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้ใกล้เคียงกัน และดีกว่าการยับยั้ง *P. marneffei* และค่า EC_{50} ที่ได้นั้นให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของสายรา โดยสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 สามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด และใกล้เคียงกัน โดยมีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 0.18-0.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดจากใบพืชสกุล *Cassia* ทั้ง 7 ชนิดมีฤทธิ์ต้านรา โดยสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ต้าน *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้ดีที่สุดในกลุ่ม มีค่า EC_{50} 0.49-0.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานส่วนใหญ่ที่พบว่าสามารถยับยั้งราก่อโรคกลากได้เป็นอย่างดี (นันทวัน, 2534 b; Fuzellier *et al.*, 1982; Palanichamy and Nagarajan, 1990; Ibrahim and Osman, 1995) สารสกัดใบชุมเห็ดเทศที่ใช้ในการทดสอบนี้มีประสิทธิภาพดีกว่าในรายงานอื่นๆ โดยสารสกัดด้วย methanol ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งสายรา *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้ร้อยละร้อย ซึ่งมีความเข้มข้นต่ำกว่ารายงานของ Ibrahim และ Osman (1995) ที่พบว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศด้วย 95% ethanol ความเข้มข้น 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้ง *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้ และรายงานของ Palanichamy และ Nagarajan (1990) ที่พบว่าสาร

สกัดจากใบชุมเห็ดเทศด้วย petroleum ether ความเข้มข้น 20% w/v หรือ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อราทั้งสองได้ ทั้งนี้มีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้ผลการทดลองแตกต่างกัน ได้แก่ การใช้ตัวทำละลายในการสกัดสาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน เช่น petroleum ether และ methanol ทำให้องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดที่ได้แตกต่างกันทั้งชนิด และปริมาณ ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่ง คือ เชื้อราที่ใช้เป็นตัวทดสอบ เป็นคนละสายพันธุ์กัน ซึ่งอาจมีความไวต่อสารสกัดแตกต่างกัน

สารสกัดจากพืชสกุล *Cassia* อีกชนิดหนึ่งที่มีรายงานว่ายับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคกลากได้ คือ สารสกัดจากใบกาลพฤกษ์ (*C. grandis*) (Caceres *et al.*, 1991) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสารสกัดจากใบกาลพฤกษ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้ มีค่า EC_{50} 0.98 และ 1.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศประมาณ 2 เท่า ส่วนสารสกัดจากใบชุมเห็ดไทย ชัยพฤกษ์ ขี้เหล็ก ทรงบาดาล และกัลปพฤกษ์ ยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลากมาก่อน สำหรับชุมเห็ดไทยนั้น มีรายงานว่าสารสกัดจากเมล็ดด้วยเบนซินมีฤทธิ์ยับยั้ง *T. rubrum* และ *M. gypseum* (นันทวัน, 2534 b) ส่วนสารสกัดจากใบชัยพฤกษ์ ขี้เหล็ก ทรงบาดาล และกัลปพฤกษ์ มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านราก่อโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง (ขวัญใจ และคณะ, 2537)

สารสกัดจากใบพืชสกุล *Cassia* ทั้ง 7 ชนิดมีฤทธิ์ต้าน *T. rubrum* และ *M. gypseum* อาจเป็นไปได้ว่าใบพืชเหล่านี้อาจมีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน และมีฤทธิ์ต้านรา ซึ่งอาจเป็นสารพวก chrysophanol (นันทวัน, 2534 a) ควรที่จะมีการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดเหล่านี้ และศึกษาฤทธิ์ต้านราต่อไปในอนาคต

สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมก็มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคกลาก (*T. rubrum* และ *M. gypseum*) ได้ใกล้เคียงกับพืชในสกุล *Cassia* โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 1.04 และ 1.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านราก่อโรคกลากมาก่อน โดยสารในเปลือกผลทับทิมส่วนใหญ่เป็นพวกแทนนิน (อรุณพร, 2532) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้

สำหรับเชื้อ *P. marneffei* นั้นจัดเป็นเชื้อก่อโรค systemic mycoses ที่สำคัญในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Capponi *et al.*, 1996) ในประเทศไทยมีรายงานการติดเชื้อนี้สูงขึ้นตามอัตราการติดเชื้อเอดส์ในหมู่ประชากร โดยเฉพาะทางภาคเหนือของประเทศ

กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยจึงได้จัดโรค disseminated penicillosis marneffei เป็นโรคหนึ่งใน indicator diseases ในการวินิจฉัยโรคเอดส์ (Supparatpinya *et al.*, 1992) เพิ่มเติมจากที่องค์การอนามัยโลกกำหนดไว้ ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านรานี้ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดว่านน้ำ AWE3 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของสายรา *P. marneffei* โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่ามากกว่าที่ใช้ในการยับยั้ง dermatophytes 2 เท่า สารสกัดจากใบพืชสกุล *Cassia* ทั้ง 7 ชนิดก็มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. marneffei* โดยสารสกัดจากใบชัยพฤกษ์มีประสิทธิภาพดีที่สุดในกลุ่ม ส่วนสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ มีค่า EC_{50} สูงกว่าชัยพฤกษ์ถึง 6 เท่า สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้ง dermatophytes แต่มีประสิทธิภาพต่ำสุดในการยับยั้ง *P. marneffei* จะเห็นได้ว่าสารสกัดทุกชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคทั้ง 3 ชนิดได้แตกต่างกัน สารสกัดจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้มากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด ระดับความเข้มข้น และชนิดของเชื้อที่ทดสอบ (พรรณิภา, 2521) นอกจากนี้สารชนิดเดียวกันยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแต่ละชนิดได้แตกต่างกันด้วย ขึ้นอยู่กับปริมาณสารนั้นด้วย (บัญญัติ, 2518) และจากการศึกษาจะพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม ใบชุมเห็กเทศ ชุมเห็ดไทย และชัยพฤกษ์ต่างก็มีฤทธิ์ต้านราก่อโรคกลาก (*T. rubrum* และ *M. gypseum*) ซึ่งสอดคล้องกับตำรายาแผนโบราณ ส่วนสารสกัดที่เหลือไม่มีรายงานเกี่ยวกับการใช้รักษาโรคกลากในตำรายาแผนโบราณ (วิทย์, 2531; อรุณพร, 2532; นันทวัน, 2534a; และ b; สมสุข, 2534; เสรี, 2534; ภูมิพิชญ์, 2536 และวันดี, 2537)

เมื่อนำสายราที่ทดสอบกับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 และใบชุมเห็ดเทศมาศึกษาจุลสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา สังเกตพบว่าสายราชุดทดสอบมีขนาดเล็กกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย แต่ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างสายรา เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (SEM) จะเห็นสายราชุดทดสอบหดตัวเหี่ยวย่นแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน แสดงว่าสารสกัดทั้ง 2 สารทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเส้นใย โดยสารสกัดอาจไปทำลายผนังเซลล์ให้รั่วแตกออก หรือทำให้ membrane permeability เสียไป มีการสูญเสียของเหลวที่อยู่ภายในทำให้เส้นใยเหี่ยวย่น

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดต่อการงอกของโคนิเดียรา โดยทดสอบกับ macroconidia ของ *M. gypseum* ซึ่งมีมาก และมีขนาดใหญ่ สังเกตผลการทดลองได้

ง่าย สารสกัดทั้ง 9 สาร ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการงอกของ macroconidia ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งมีค่าต่ำกว่า Ibrahim และ Osman (1995) ที่รายงานว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้ง macroconidia ของ *M. gypseum* สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 เปลือกผลทับทิม และใบชุมเห็ดเทศยับยั้งได้ดีที่สุด มีค่า EC_{50} ในการยับยั้งการงอกของ macroconidia ใกล้เคียงกัน (0.08-0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งต่ำกว่าค่า EC_{50} ที่ยับยั้งการเจริญของสายรา 2.5 เท่า อย่างไรก็ตามสารสกัดเหล่านี้เพียงแต่ยับยั้งการงอกเท่านั้น โดยอาจทำลายเซลล์ของ macroconidia บางเซลล์ แต่มี macroconidia ที่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ เช่นเดียวกับยามาตรฐาน miconazole ที่มีประสิทธิภาพดีมากในการรักษาโรคกลาก (ตาราง 9) การทำลาย macroconidia นั้นจะใช้สารสกัด และยา miconazole ในปริมาณความเข้มข้นที่สูงกว่าการยับยั้งการงอกของ macroconidia และใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงกว่ายา miconazole ด้วย โดยที่ประสิทธิภาพในการทำลายนั้นจะเพิ่มสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอก และการทำลาย macroconidia นั้นมีประโยชน์ช่วยชะลอการติดเชื้อ หรือการแพร่กระจายของเชื้อได้ เมื่อศึกษาภายใต้ SEM พบว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ และว่านน้ำ AWE3 มีผลทำให้ macroconidia เหี่ยว ทำให้ไม่สามารถงอก germ tube ได้ เช่นเดียวกับที่ Ibrahim และ Osman (1995) รายงานผลของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศต่อ macroconidia ของ *M. gypseum* โดยที่สารสกัดอาจมีผลทำลายผนังเซลล์ หรือทำให้ membrane permeability เปลี่ยนแปลง ทำให้มีการรั่วไหลของ cytoplasm เช่นเดียวกับผลต่อสายรา

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม และสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศมีศักยภาพที่น่าจะพัฒนาเพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และราต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งว่านน้ำ AWE3 ซึ่งมีฤทธิ์กว้างที่สุด แม้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จะมีค่าสูงกว่ายามาตรฐานหลายเท่าก็ตาม หากมีการศึกษาแยกหาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น จะทำให้ปริมาณที่ใช้น้อยลงกว่าการใช้สารสกัดหยาบ และควรมีการศึกษาทางด้านพิษวิทยาด้วย เพื่อความปลอดภัยในการใช้

สรุปผลการทดลอง

1. สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์กว้างที่สุด สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ยีสต์ และรา แต่มีฤทธิ์ต้านราได้ดีกว่าแบคทีเรีย
2. สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 ยับยั้งยีสต์ก่อโรค *C. albicans* และ *C. neoformans* โดยมีค่า MIC 0.12-1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยับยั้งเชื้อราก่อโรค *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* ได้ดีที่สุด มีค่า EC_{50} 0.18-0.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมยับยั้งแบคทีเรีย Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) *B. subtilis* Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC 0.62-2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
4. สารสกัดจากใบพืชสกุล *Cassia* ทั้ง 7 ชนิดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่ำ มีฤทธิ์ต้านราได้ดี โดยสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศยับยั้ง *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้ดีที่สุดในกลุ่ม *Cassia* และมีฤทธิ์รองจากสารสกัดว่านน้ำ AWE3 มีค่า EC_{50} 0.49 และ 0.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ยับยั้ง *P. marneffei* ได้ปานกลาง (EC_{50} 6.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

   สารสกัดจากใบชัยพฤกษ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. marneffei* ดีที่สุดในกลุ่ม *Cassia* และมีฤทธิ์รองจาก AWE3 มีค่า EC_{50} 0.94 มิลลิกรัมติอมิลลิลิตร
5. สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม และสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ได้ดีใกล้เคียงกัน มีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 0.08-0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่ใช้ยับยั้งสายรา และสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ AWE3 และใบชุมเห็ดเทศ มีฤทธิ์เพียงยับยั้งการงอกของ macroconidia ไม่ได้ฆ่า macroconidia
6. สารสกัดว่านน้ำ AWE3 และชุมเห็ดเทศ ทำให้สายราของ *T.* rubrum, *M. gypseum* และ *P. marneffei* และ macroconidia ของ *M. gypseum* เหี่ยวแฟบตัวลง โดยอาจทำให้เกิดการรั่วไหลของของเหลวภายในเซลล์

บรรณานุกรม

กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2535. สถิติการค้า และเครื่องชี้ภาวะเศรษฐกิจของไทยปี 2534. กรุงเทพฯ : กระทรวงพาณิชย์.

ขวัญใจ กนกเมธากุล. 2537. การทดสอบสารสกัดจากพืชบางชนิดในสกุล *Cassia* L. ต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporiodes*. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ปี20-22(3-3) (ฉบับพิเศษ) : 112-119.

ชัยโย ชัยชาญทินยุทธ. 2522. การศึกษาทางพฤกษเคมีของใบขี้เหล็ก และใบขี้เหล็กอเมริกัน, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นันทวัน บุณยะประภัศร. 2534 a. ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม 1. กรุงเทพฯ : ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหิดล.

นันทวัน บุณยะประภัศร. 2534 b. ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม 3. กรุงเทพฯ : ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหิดล.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2518. ประสิทธิภาพของเครื่องเทศบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประภาศรี อุยยามฐิติ. 2523. การแยกไรน์จากใบ และฝักคูน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2534. สมุนไพรก้าวใหม่. กรุงเทพฯ : เมดิคัลมีเดีย.

พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2537. สมุนไพรก้าวใหม่. กรุงเทพฯ : เมดิคัลมีเดีย.

พรรณกร อิ่มวิทยา. 2535. เชื้อราก่อโรคในคน. กรุงเทพฯ : สารมวลชน.

พรรณิภา ชุมศรี. 2521. การตรวจสอบสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : สภาวิจัยแห่งชาติ.

พร้อมจิต ศรลัมพ์. 2535. สมุนไพรสวนสิริรุขชาติ. กรุงเทพฯ : บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้งกรุ๊ฟ.

ไพลิน เพียรพิจิตร. 2536. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของกระชาย พญายอ ฟ้าทะลายโจร มังคุด รงทอง ว่านดอกดิน และสารสังเคราะห์อนุพันธ์โพลีเอมีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ภูมิพิชญ์ สุชาวรรณ. 2536. พืชสมุนไพรใช้เป็นยา2. กรุงเทพฯ : องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

ภูมิพิชญ์ สุชาวรรณ. 2540. พืชสมุนไพรใช้เป็นยา10. กรุงเทพฯ : องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

มาโนช วามานนท์. 2537. ยาสมุนไพร สำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. กรุงเทพฯ : องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

รัช มูเก็ม และดวงแข มณีนวล. 2539. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของว่านน้ำ*Acorus calamus*. รายงานวิชาโครงงานวิจัยทางเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วันดี กฤษณพันธ์. 2522. การศึกษาทางพฤกษเคมีของใบขี้เหล็กเลือด และใบกัลปพฤกษ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วันดี กฤษณพันธ์. 2537. สมุนไพรน่ารู้. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย มหิดล.

วันดี กฤษณพันธ์. 2539. สมุนไพรน่ารู้. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย มหิดล.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2531. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ : โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮาส์.

วีระชัย ณ นคร. 2540. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม3. กรุงเทพฯ : โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮาส์.

สมพร หิรัญรามเดช. 2536. ตำราการตรวจเอกลักษณ์พืชสมุนไพรเล่ม5. กรุงเทพฯ : กรุงสยามการพิมพ์.

สมสุข มัจฉาชีพ. 2534. พืชสมุนไพร. กรุงเทพฯ : แพร่พิทยา.

สุรภี แซ่อ๋อง. 2536. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านราของสารพิราเมนจากพืชตระกูล *Kaempferia.* รายงานวิชาโครงงานวิจัยทางจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เสรี อาจสารี. 2534. การใช้ยาสมุนไพร. กรุงเทพฯ : พิทยาคาร.

อรุณพร อิฐรัตน์. 2532. สมุนไพรไทยเทศ เล่ม1. สงขลา : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรุณรุ่ง ใจรังษี. 2537. ฤทธิ์ต้านราสาเหตุโรคกลากของน้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดขาว (*Melaleuca leucadendron*) และสารสกัดจากใบกระดูกไก่ (*Measa ramentacea*) รายงานวิชาโครงงานวิจัยทางจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W. and Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. 4th ed. USA. : John Wiley & Sons,.Inc.

Anesini, C. and Perez, C. 1993. Scanning of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol. 39 : 119-128.

Bandara, K.A.N.P.; Peries, I.D.R.; Kumar, V.; Karunaratne, V. and Ranasinghe, M.A.S.K. 1990. Insecticidal activity of *Acorus calamus* L. and *Glycosmis mauritiana* (Lim.) tanaka against *Aphis craccivora* (Homoptera : Aphididae). Trop. Agric. (Trinidad). 67 : 223-228.

Bulger, R.J. 1976. A methicillin resistant strain of *Staphylococcus aureus* : clinical and laboratory experience. Ann. Med. 67 : 81-89.

Caceres, A.; Lopez, B.R.; Giron, M.A. and Logemann, H. 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. J. Ethnopharmacol. 31 : 263-276.

Capponi, M.; Sureau, P. and Segretain, G. 1996. Penicilliosis marneffei in *Rhizomys sinensis*. Bull. Soc. Patho. Exp. 49 : 481-412.

Chayakul, P. 1992. Enterococcus infection : a growing problem. Songkla Med. J. 10 : 347-353.

Crockett, C.O.; Guede-Guina, F.;Pugh, D.; Vangah-Manda M.; Robinson, T.J.; Qlubadewo, J.O. and Ochillo, R.F. 1992. *Cassia alata* and the preclinical search for therapeutic agents for the treatment of opportunistic infections in aids patients. Cell Mole. Bio. 38(5) : 505-511.

Damodaran, S. and Venkataraman, S. 1994. A study on the therapeutic efficacy of *Cassia* Linn. leaf extract against *Pityriasis versicolor*. J. Ethnopharmacol. 42 : 19-23.

De-Amorim, A. and Borba, H.R. 1993. Anthelmintic action of plants. Part 7. Screening of 14 crude extracts of *Vampirolepis nana* from mice. Rev-Bras-Farm. 74 (Jan-Mar) : 12-3.

Emmons, C.W. 1997. Medical Mycology. 3rd ed. Philadelphia : Lea & Febiger.

French, G.L.; Ling, J.; Ling, T. and Hui, Y.W. 1988. Susceptibility of Hong Kong isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to antimicrobial agents. J. Antimicrob. Chemother. 21 : 581-588.

Frey, D.; Oldfield, R.J. and Bridger, R.C. 1979. Pathogenic Fungi. Holland : Wolfe Medical Publications Ltd.

Fuzellier, M.C., Mortier, F. and Lectard, P. 1982. Antifungal activity of *Cassia alata* L. Ann. Pharm. Fr. 40 : 357-363.

Gamliel, A.; Katan, J. and Cohen, E. 1989. Toxicity of chloronitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as related to their structure. Phytoparasitica. 17 : 101-105.

Grosvenor, P.W.; Superiono, A. and Gray, D.O. 1995. Medicinal plants from Riau province, Sumatra, Indonesia. Part 2: Antibacterial and antifungal activity. J. Ethnopharmacol. 45 : 97-111.

Haley, R.W.; Hightower, A.W.; Khabbaz, R.F.; Thornsberry, C.; Martone, W.J.; Allen, J.R. and Hughes, J.M. 1982. The emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in United States hospitals. Ann. Intern. Med. 97 : 297-308.

Hauptmann, H. and Nazario, L.L. 1950. Some constituents of the leaves of *Cassia alata* L. Phytochem. 72 : 1492-1494.

Hilmarsdottir, I.; Meynard, J.L.; Rogeaux, O.; Guermonprez, G.; Datry, A.; Katlama, C.; Brucker, G.; Coutellier, A.; Danis, M. and Gentilini, M. 1993. Disseminated *Penicillium marneffei* infection associated with human immunodeficiency virus : A report of two cases and a review of 35 published cases. J. Acquired. Immune. Defic. 6 : 366-471.

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Maryland : Williams & Wilkins.

Ibrahim, D. and Osman, H. 1995. Antimicrobial activity of *Cassia alata* from Malaysia. J. Ethnopharmacol. 45 : 151-156.

Jamulitrat, S.; Thongpiyapoom, S.; Varindsathien, P.; Ngo, U. and Promplook, S. 1988. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital. J. Inf. Dis. Antimicrob. Agents. 5 : 103-110.

Jayanetra, P.; Nitiyanant, P. and Ajello, L. 1984. Penicilliosis marneffei in Thailand : report of five human cases. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33 : 637-644.

Johnson, A.P.; Uttley, A.H.C.; Woodford, N. and George, R.C. 1990. Resistance to vancomycin and teicoplanin : an emerging clinical problem. Clin. Microbiol. Rev. 3 : 280-289.

Keller, X. and Stahl, E. 1983. Zusammensetzung des atherischen oles von β-asaronefreiem kalamus. Planta Med. 47 : 71-74.

Kingsbury, D.T. and Wagner, G.E. 1990. Microbiology. Baltimore : Williams & Wilkins.

Koul, O.; Smirle, M.J.; Isman, M.B. and Szeto, Y.S. 1990. Synergism of a natural insect growth inhibition is mediated by bioactivation. Experientia. 46(10) : 1082-1083.

Lorian, V. 1991. Antibiotics in Laboratory Medicine. 1st ed. Baltimore : Williams & Wilkins.

Lorian, V. 1996. Antibiotics in Laboratory Medicine. 3rd ed. Baltimore : Williams & Wilkins.

Mahon, R. 1995. Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia : W.B. Saunders.

Manandhar, J.B.; Hartman, G.L. and Wang, T.C. 1995. Conidial germination and appressorial formation of *Colletotrichum capsici* and *C.gloeosporioides* isolate from pepper. Plant Dis. 79 : 361-366.

Marshall, J.R. 1995. Microbiology. New York : Delmar.

Mukherjee, P.K.; Saha, K.; Saha, B.P. and Pal, M. 1996. Antifungal activities of the leaf extract of *Cassia tora* Linn. (Fam. Leguminosae). Phytother. Res. 10 : 521-522.

Navarro, V.; Villarreal, M.L.; Rojas, G. and Lozoya, X. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. J. Ethnopharmacol. 53 : 143-147.

Ohmoto, T. and Sung, Y.I. 1982. Shoyakugaku Zasshi. 3 6(4) : 307-314.

Palanichamy, S. and Nagarajan, S. 1990. Antifungal activity of *Cassia alata* leaf extract. J. Ethnopharmacol. 29 : 337-340.

Patra, A. and Mitra, A.K. 1981. Constituents of *Acorus calamus* : structure of acoramone carbon-13 nmr spectra of *cis*-and *trans*-asarone. Phytochem. 22 : 110-113.

Picman, A.K.; Schneider, E.F. and Gershenzon, J. 1990. Antifungal activities of sunflower terpenoid. Biochem. Sys. Ecol. 18 : 325-328.

Prescott, L.M.; Harley, J.P. and Klein, D.A. 1993. Microbiology. 2nd ed. USA : Wm. C. Brow Publishers.

Risha, E.M.; EL-Nahal, A.K.M. and Schmidt, G.H. 1990. Toxicity of vapours of *Acorus calamus* L. oil to the immature stages of some stored-product coleoptera. J. Stored Prod Res. 26 : 133-137.

Saravalatz, L.D.; Pholod, D.J. and Arking, L.M. 1982. Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections : a new source from nosocomial outbreaks. Ann. Intern. Med. 97 : 325-329.

Sekhon, A.S.; Padhye, A.A. and Garg, A.K. 1992. In vitro sensitivity of *Penicillium marneffei* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. J. Ethnopharmacol. 8 : 427-432.

Shlaes, D.M. 1989. Antibiotic-resistant enterococci. Inf. Dis. Newsl. 8 : 53-54.

Sorrell, T.C.; Packham, D.R.; Shanker, S.; Folders, T.C. and Muro, R. 1982. Vancomycin therapy for methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Ann. Intern. Med. 97 : 344-450.

Sridhar, K.R. and Barlocher, F. 1994. Viability of aquatic hyphomycete conidia in foam. Can. J. Bot. 7 2 : 106-110.

Supparatpinyo, K.; Chiewchanvit, S. and Hirunsri, P. 1992. *Penicillium marneffei* infection in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin. Infect Dis. 14 : 871-874.

Surrender, P.; Janalah, C.; Reddy, V.K. and Reddy, S.M. 1987. Antifungal activity of secretions of scent glands from heteropteram bugs. Indian J. Exp. Biol. 25 : 233-234.

Thornsberry, C. 1988. The development of antimicrobial resistance staphylococci. J. Antimicrob. Chemother. 21 (Suppl-C) : 9-16.

Willy, B.M.; Kreiswirth, B.N.; Simor, A.E.; Williams, S.; Scriver, S.R.; Phillips, A. and Low, D.E. 1992. Detection of vancomycin resistance in *Enterococcus* species. J. Clin. Microbiol. 30 : 1621-1624.

Zhang, J.; Zhan, B.Y.; Yao, X.J. and Gao, Y.X. 1995. Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital herpes virus in vitro. J-Chin-Mater-Med-Zhongguo-Zhongyao-Zazhi. 20 : 556-558.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวก 1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* ของสารสกัดว่านน้ำ AWE3 ในสไลด์หลุม

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา		
	T. rubrum	*M. gypseum*	*P. marneffei*
0.1	**39.75**	**37.33**	**20.51**
0.2	**55.13**	**44.41**	-
0.4	**66.14**	**77.32**	**47.46**
0.5	79.60	94.21	**55.30**
0.8	100	100	**59.52**
1	100	100	65.96
2	-	-	76.70
สมการ*	83.264x+34.245	137.76x+20.875	26.438x+39.112
r^2	0.9207	0.9724	0.8087

* สมการ Linear regression ที่ได้จากการเขียนกราฟเส้นตรงระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา (ตัวเลขทึบ) กับความเข้มข้นของสารสกัด

- ไม่ได้ทดสอบ

ตารางภาคผนวก 2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* ของสารสกัดทับทิม ในสไลด์หลุม

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา		
	T. rubrum	*M. gypseum*	*P. marneffei*
1	45.73	39.52	0
2	67.44	64.12	0
4	84.18	94.65	0.11
5	93.50	95.73	9.53
8	97.58	98.47	40.35
10	100	100	46.63
50	-	-	61.55
100	-	-	100
สมการ	12.181x+37.36	17.932x+24255	0.6219x+37.865
r^2	0.9316	0.9837	0.9941

ตารางภาคผนวก 3 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* ของสารสกัดชุมเห็ดเทศ ในสไลด์หลุม

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา		
	T. rubrum	*M. gypseum*	*P. marneffei*
0.2	-	0	-
0.4	**43.50**	27.56	-
0.5	50.38	**35.83**	-
0.8	**59.74**	**40.30**	-
1	**71.38**	**66.27**	3.27
2	**94.58**	85.12	15.69
4	100	-	29.93
5	-	-	**38.52**
8	-	-	**58.81**
10	-	-	**77.01**
สมการ	y = 30.987x+34.764	y = 57.25x+3.575	y = 7.6242x-0.3389
r^2	0.9641	0.7683	0.993

ตารางภาคผนวก 4 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* ของสารสกัดชุมเห็ดไทย ในสไลด์หลุม

ความเข้มข้น	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา		
(mg/ml)	*T. rubrum*	*M. gypseum*	*P. marneffei*
0.5	-	10.07	-
0.8	-	**32.72**	**41.16**
1	**40.11**	**42.16**	**46.19**
2	**73.02**	**53.27**	**54.47**
4	**87.48**	**82.12**	**62.0**
5	90.15	92.66	70.40
8	96.33	97.60	80.11
10	100	100	100
สมการ	y = 14.567x+32.88	y = 14.515x+24.264	y = 6.0045x+39.245
r^2	0.8401	0.9844	0.9163

ตารางภาคผนวก 5 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* ของสารสกัด ชัยพฤกษ์ ในสไลด์หลุม

ความเข้มข้น	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา		
(mg/ml)	*T. rubrum*	*M. gypseum*	*P. marneffei*
0.1	13.30	5.4	-
0.2	26.24	18.13	11.52
0.4	29.16	23.81	21.93
0.5	35.01	28.25	33.54
0.8	51.69	32.72	41.88
1	61.07	42.13	53.84
2	-	53.27	58.06
4	-	82.12	-
สมการ	y = 52.395x+9.0874	y = 14.519x+24.248	y = 39.589x+12.735
r^2	0.9979	0.9846	0.9534

ตารางภาคผนวก 6 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* ของสารสกัดขี้เหล็ก ในสไลด์หลุม

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา		
	T. rubrum	*M. gypseum*	*P. marneffei*
0.4	0	-	-
0.5	17.39	-	-
0.8	37.50	47.96	35.82
1	46.30	51.11	42.05
2	73.88	66.45	48.16
4	91.36	91.73	55.82
5	-	95.04	65.53
8	-	100	76.51
10	-	100	-
สมการ	y = 29.434x+15.277	y = 9.245x+36.683	y = 5.5519x+34.636
r^2	0.994	0.8735	0.9043

ตารางภาคผนวก 7 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* ของสารสกัดทรงบาดาล ในสไลด์หลุม

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา		
	T. rubrum	*M. gypseum*	*P. marneffei*
0.4	0	-	-
0.5	0	-	-
0.8	32.31	-	-
1	42.66	31.05	18.79
2	73.93	67.84	29.53
4	94.89	94.34	37.50
5	-	96.28	49.51
8	-	97.49	62.51
10	-	100	80.33
สมการ	y = 33.582x+7.0958	y = 19.976x+17.8	y = 5.8096x+16.919
r^2	0.9928	0.9216	0.9348

ตารางภาคผนวก 8 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* ของสารสกัดกัลปพฤกษ์ ในสไลด์หลุม

ความเข้มข้น	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา		
(mg/ml)	*T. rubrum*	*M. gypseum*	*P. marneffei*
0.1	25.27	7.25	-
0.2	27.65	24.16	-
0.4	35.64	31.97	-
0.5	37.24	39.37	-
0.8	46.38	42.09	-
1	53.61	49.75	26.95
2	87.0	67.56	32.77
4	-	-	38.70
5	-	-	44.28
8	-	-	46.27
10	-	-	58.81
สมการ	$y = 33.362x+20.193$	$y = 20.123x+27.644$	$y = 2.7289x+28.865$
r^2	0.9997	0.9802	0.7601

ตารางภาคผนวก 9 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* ของสารสกัดกาฬพฤกษ์ ในสไลด์หลุม

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา		
	T. rubrum	*M. gypseum*	*P. marneffei*
0.1	0	-	-
0.2	0	-	-
0.4	16.18	-	-
0.5	24.41	14.71	-
0.8	33.68	32.23	-
1	52.92	41.01	33.43
2	71.19	62.47	42.68
4	-	89.92	53.44
5	-	95.80	68.64
8	-	100	77.85
10	-	-	91.76
สมการ	y = 61.735x-10.832	y = 17.331x+22.613	y = 8.118x+25.194
r^2	0.966	0.9746	0.9598

ตารางภาคผนวก 10 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* ของยา miconazole ในสไลด์หลุม

ความเข้มข้น (μg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา		
	T. rubrum	*M. gypseum*	*P. marneffei*
0.25	0	0	0
0.5	**0**	0	**30.16**
1	**45.72**	0	**50.22**
2	**70.16**	14.31	61.32
4	91.64	**20.59**	74.11
8	100	**45.04**	100
16	100	**69.04**	100
32	100	83.75	100
สมการ	y = 43.583x-12.2	y = 3.8893x+8059	y = 63.126-10.03
r^2	0.8736	0.9623	0.9094

ตารางภาคผนวก 11 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ของสารสกัด ว่านน้ำ AWE3

ความเข้มข้น (μg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการงอกของmacroconidia
10	0
20	0
40	7.43
60	29.88
80	57.34
100	77.89
สมการ	y = 1.2003x-40.983
r^2	0.9931

* สมการ Linear regression ที่ได้จากการเขียนกราฟเส้นตรงระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ M. *gypseum* (ตัวเลขทึบ) กับความเข้มข้นของสารสกัด

- ไม่ได้ทดสอบ

ตารางภาคผนวก 12 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ของสารสกัดทับทิม

ความเข้มข้น (μg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการงอกของmacroconidia
10	0
20	0
40	0.34
60	29.53
80	64.59
100	83.94
สมการ	y = 1.36.3x-49.467
r^2	0.973

ตารางภาคผนวก 13 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ของสารสกัดชุมเห็ดเทศ

ความเข้มข้น (μg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการงอกของmacroconidia
10	0
20	0
40	0
60	**16.75**
80	**43.31**
100	**61.48**
สมการ	y = 1.1183x-49.28
r^2	0.9932

ตารางภาคผนวก 14 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ของสารสกัดชุมเห็ดไทย

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการงอกของmacroconidia
1	0
2	8.64
4	43.01
6	86.87
8	100
10	100
สมการ	y = 14.248x-8.8583
r^2	0.9116

ตารางภาคผนวก 15 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ของสารสกัดชัยพฤกษ์

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการงอกของmacroconidia
1	0
2	8.84
4	38.86
5	76.81
6	100
8	100
10	100
สมการ	y = 16.993x-26.467
r^2	0.9955

ตารางภาคผนวก 16 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ของสารสกัดขี้เหล็ก

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการงอกของmacroconidia
1	**10.02**
2	**58.55**
4	**98.44**
6	100
8	100
10	100
สมการ	y = 28.112x-9.925
r^2	0.9405

ตารางภาคผนวก 17 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ของสารสกัดทรงบาดาล

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการงอกของmacroconidia
1	27.46
2	65.80
4	88.60
6	91.54
8	100
10	100
สมการ	y = 19.097x+16.06
r^2	0.8914

ตารางภาคผนวก 18 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ของสารสกัดกัลปพฤกษ์

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการงอกของmacroconidia
1	0
1.5	47.76
2	63.90
4	89.46
6	98.44
8	100
10	100
สมการ	y = 15.566x+28.126
r^2	0.959

ตารางภาคผนวก 19 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ของสารสกัดกาลพฤกษ์

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการงอกของmacroconidia
1	0
2	39.38
4	80.66
6	100
8	100
10	100
สมการ	y = 15.155x+12.727
r^2	0.9582

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวนงค์เยาว์ ภู่เจนจบ
วัน เดือน ปี	10 เมษายน 2516

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์ (ศึกษาศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2539