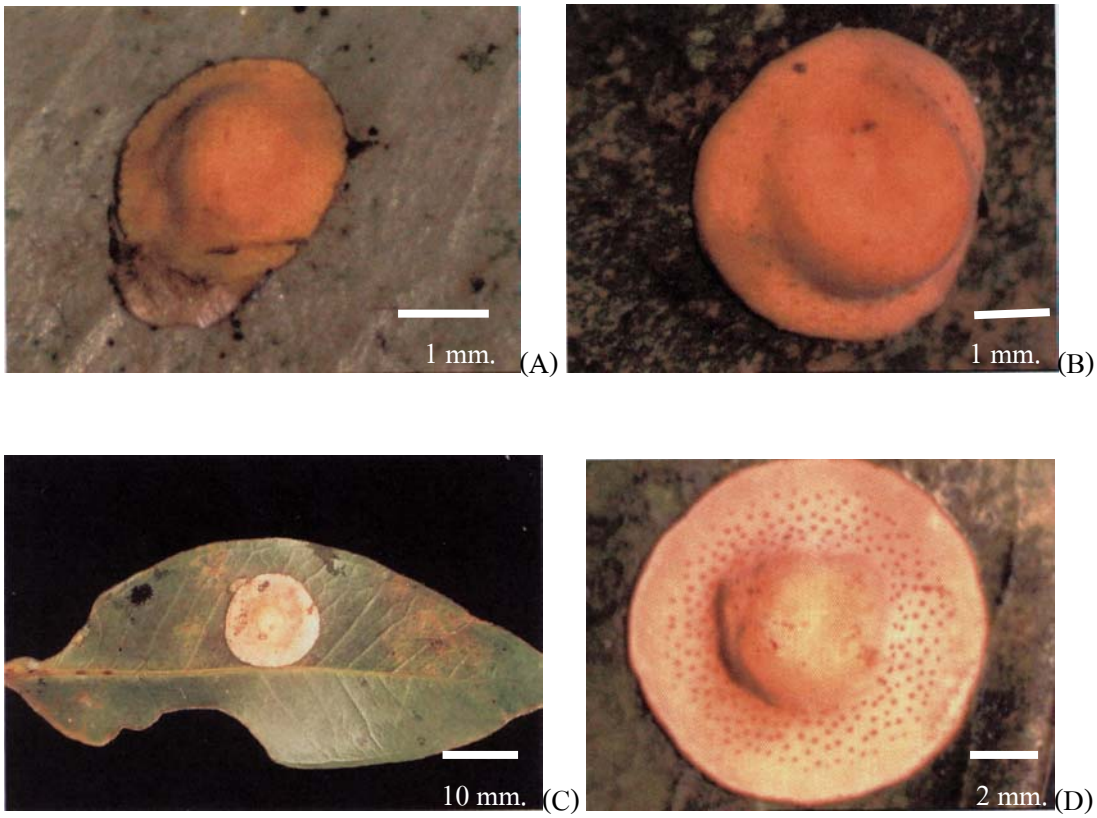
บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อรา *H. scutata* และการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

จากการเก็บตัวอย่างเชื้อรา *H. scutata* จากป่าพรุสิรินธร อำเภอสุไหงโกลก จังหวัดนราธิวาส ในวันที่ 22 กรกฎาคม 2545 ได้ stroma ของเชื้อรา *H. scutata* จำนวน 46 ตัวอย่าง จากใบหว้าหิน (*S. tumida)* และหว้าน้ำ (*S. oblatum)* เมื่อนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถแยกเชื้อได้จำนวน 31 isolates คิดเป็นร้อยละ 67.39

ลักษณะเชื้อรา *H. scutata* บนใบไม้จากการเก็บตัวอย่างเรียกว่า stroma (ภาพที่ 6) ซึ่งเกิดจากเส้นใยที่อัดตัวกันแน่น มีขอบบางตรงกลางนูน ลักษณะคล้ายโล่ มีสีส้มเหลือง เส้นผ่านศูนย์กลางของ stroma ที่เก็บมานี้มีขนาดประมาณ 0.3-1.0 เซนติเมตร stroma ที่เจริญเต็มที่ (mature stroma) (ภาพที่ 6 C และ 6 D) ที่บริเวณขอบบางเป็นที่อยู่ของ perithecium สามารถมองเห็นบริเวณปากเปิดของ perithecium ด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน มีลักษณะเป็นจุดเล็กๆ (ภาพที่ 6 D) เมื่อนำ mature stroma มาแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยให้สปอร์ชนิด ascospore ถูกปล่อยออกมาบนอาหาร PDA ที่ผสมยาปฏิชีวนะและบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA ดังภาพที่

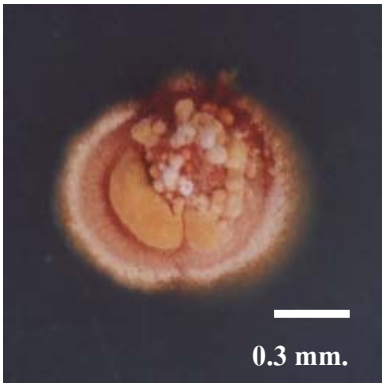


ภาพที่ 6 Stroma ของ *H. scutata* บนใบหว้าหิน (*S. tumida)*

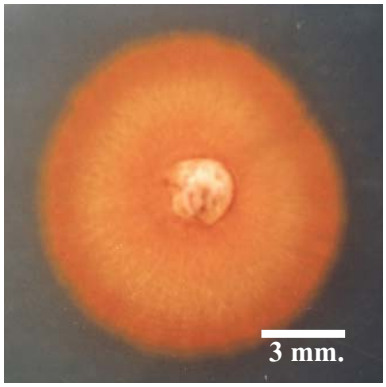
(A) และ (B) Young stroma (C) และ (D) Mature stroma

Figure 6 *H. scutata* stroma on the upper surface of *S. tumida* leaf

(A) and (B) Young stroma (C) and (D) Mature stroma



(A)



(B)

ภาพที่ 7 โคโลนีของเชื้อรา *H. scutata* ที่แยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

(A) P14 เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (B) P36 เลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

Figure 7 Colonies of *H. scutata* pure isolates on PDA at 25 °C

(A) P14 after 4 week incubation (B) P36 after 8 week incubation

2. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *H. scutata*

2.1 สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *H. scutata* บนอาหารแข็ง

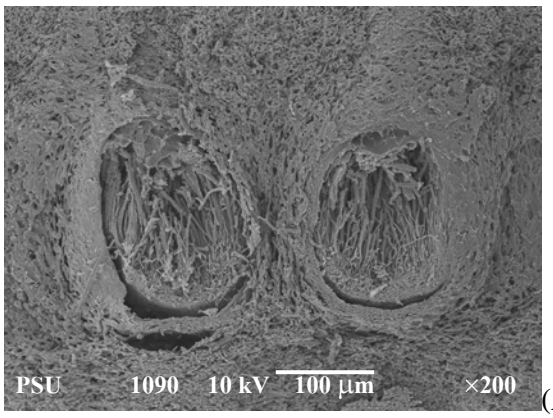
จากการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยการให้สปอร์ถูกปล่อยออกมาจาก stroma บนอาหาร PDA ที่ผสมยาปฏิชีวนะ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในวันที่ 3-5 จะสังเกตเห็นลักษณะเส้นใยเล็กๆ สีส้มแดงเกิดขึ้น เมื่อเวลาผ่านไปเส้นใยเล็กๆ นี้ จะเริ่มอัดตัวกันแน่นนูนขึ้น และเมื่อเลี้ยงจนครบ 4 สัปดาห์ จะมีลักษณะโคโลนีแข็งกลม นูนไม่สม่ำเสมอ ผิวไม่เรียบ สีส้มเหลือง (ภาพที่ 7 A) ในบาง isolates จะมีเส้นใยบางส่วนเจริญแทรกลงไปในวุ้นอาหารกระจายรอบโคโลนี บางครั้งอาจพบสารสีรอบโคโลนี เชื้อรา *H. scutata* เจริญช้ามากบนอาหารแข็ง จากการถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่หลายๆ ครั้ง พบว่าบาง isolates จะหยุดการเจริญเติบโต และอาจมีลักษณะโคโลนีเปลี่ยนแปลงไป เช่น โคโลนีมีสีน้ำตาล หยัก ย่น หรือมีเส้นใยสีขาวเกิดขึ้น

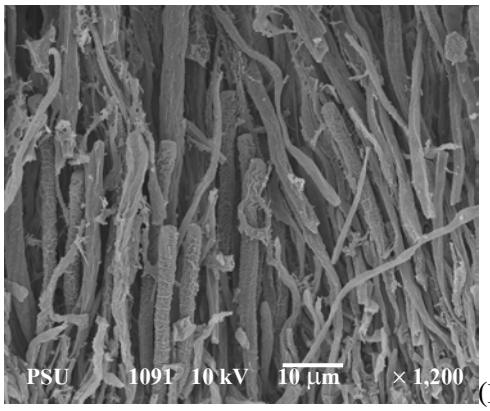
2.2 สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *H. scutata* จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

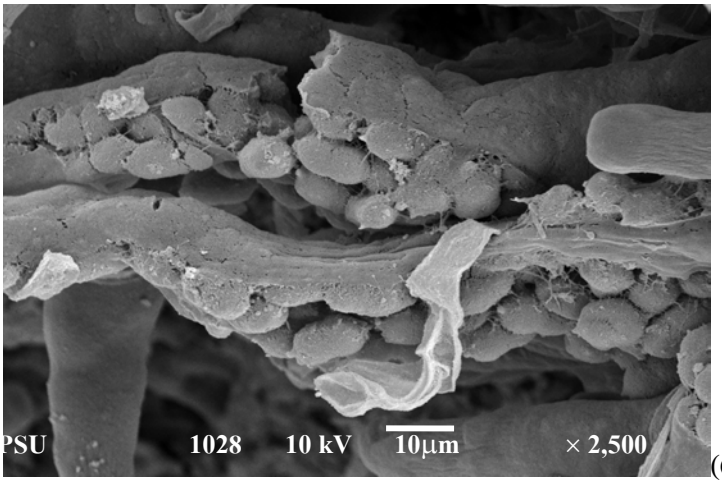
จากการนำ stroma และโคโลนีเชื้อรา *H. scutata* ที่เลี้ยงไว้เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหาร PDA ซึ่งให้ผลการเจริญดีที่สุดไปไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด เพื่อสังเกตลักษณะ stroma พบ perithecium และมี ascospore อยู่ภายใน (ภาพที่ 8) ลักษณะเส้นใยและสปอร์จากโคโลนีของเชื้อรา *H. scutata* บนอาหาร PDA พบว่าลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *H. scutata* สานกันแน่น (ภาพที่ 9) มีความกว้าง 1.5–3 ไมโครเมตร มีผนังกั้นและแตกแขนง เส้นใยจากกลางโคโลนี (ตำแหน่ง 3) มีลักษณะเป็นปม ขนาดเส้นใยใหญ่ไม่สม่ำเสมอ ผนังเส้นใยเริ่มมีการสลายตัว เนื่องจากเป็นเส้นใยที่อายุมาก ถัดจากกลางโคโลนี (ตำแหน่ง 2) เส้นใยมีขนาดใหญ่สม่ำเสมอกัน ผนังเส้นใยเรียบ พบเส้นใยจำนวนมากอยู่อย่างหนาแน่น ส่วนเส้นใยที่ขอบโคโลนี (ตำแหน่ง 1) มีลักษณะเป็นเส้นเล็กและยาว อยู่กันหลวมๆ

จากการสังเกตทั้ง 3 ตำแหน่ง พบการสร้างโคนิเดีย (conidia) ซึ่งมีขนาด 1-1.5×5-6 ไมโครเมตร มีรูปร่างรี ปลายด้านหนึ่งมน อีกด้านหนึ่งเป็นลักษณะที่หลุดออก

จากขั้วของก้าน conidiphores (ภาพที่ 11 B) ในตำแหน่ง 1 จะพบโคนิเดียจำนวนน้อย ส่วนใหญ่อยู่ติดกับ conidiophores ในตำแหน่ง 2 จะพบโคนิเดียที่หลุดออกจาก conidiophores จำนวนมาก อยู่กระจายเป็นกลุ่มๆ และในตำแหน่ง 3 พบโคนิเดียอยู่รวมกันหนาแน่นเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 10)



(A)


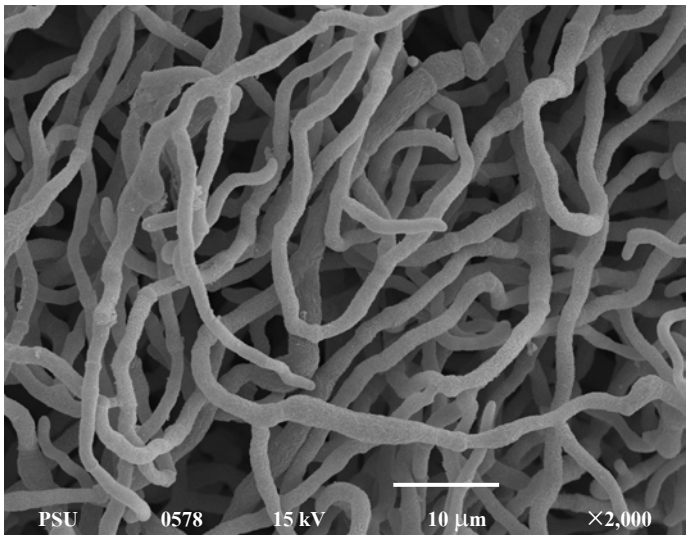
(B)


(C)

ภาพที่ 8 ลักษณะ stroma ของเชื้อรา *H. scutata* เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด

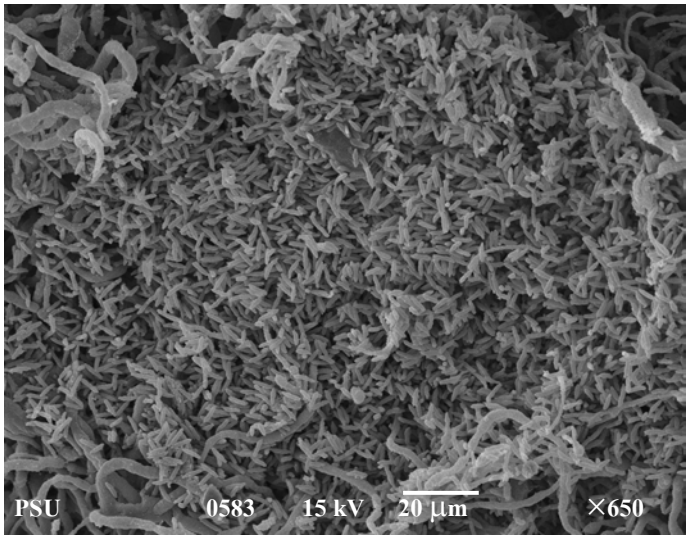
Figure 8 SEM micrograph of *H. scutata* stroma

(A) perithecia (B) asci (C) ascospores



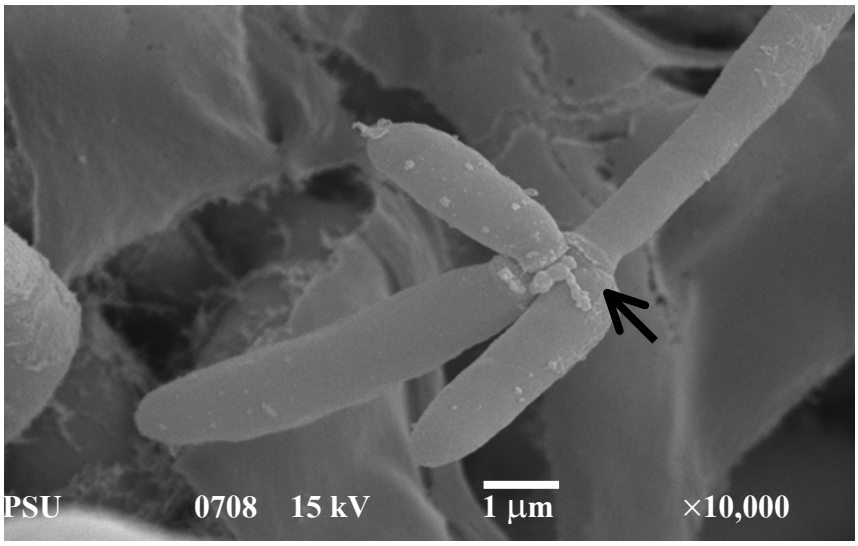
ภาพที่ 9 ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *H. scutata* P36 (ตำแหน่ง 2) เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด

Figure 9 SEM micrograph of *H. scutata* P36 mycelia (position 2)

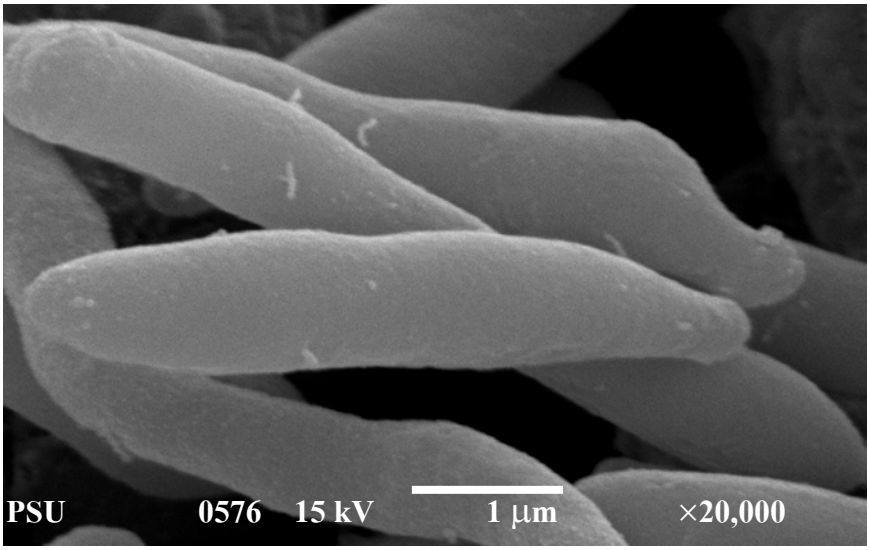


ภาพที่ 10 ลักษณะโคนิเดียของเชื้อรา *H. scutata* P36 (ตำแหน่ง 3) อยู่รวมกันหนาแน่นเป็นกลุ่ม

Figure 10 SEM micrograph of *H. scutata* P36 (position 3) showing cluster of conidia



(A)



(B)

ภาพที่ 11 ลักษณะโคนิเดียของเชื้อรา *H. scutata* P36 (ตำแหน่ง 2) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรนศ์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (A) ติดอยู่กับ conidiophores (ศรชี้) (B) โคนิเดียขยายใหญ่ รูปรี ปลายมน

Figure 11 SEM micrograph of *H. scutata* P36 conidia (position 2) (A) Conidia attached to conidiophore (arrow), (B) Blunted end fusiform conidium in high magnification

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของเชื้อรา *H. scutata* โดยวิธี agar diffusion

จากการนำเชื้อรา *H. scutata* 31 isolates ที่แยกได้และเชื้อราอีก 3 isolates (SSC18, SSC47 และ SSC55) ที่แยกโดย Srichan (2003) มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น โดยวิธี agar diffusion ผลแสดงในตารางที่ 4. พบว่ามีเชื้อรา *H. scutata* จำนวน 25 isolates จาก 34 isolates คิดเป็นร้อยละ 73.53 ที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยมี *H. scutata* จำนวน 18 isolates คิดเป็นร้อยละ 52.94 สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคกลาก *M. gypseum* ได้เพียงชนิดเดียว (ภาพที่ 12) มีเชื้อ 1 isolate คิดเป็นร้อยละ 2.94 ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ และมีเชื้อรา *H. scutata* 6 isolates คิดเป็นร้อยละ 17.65 ที่ยับยั้งได้ทั้ง *M. gypseum*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp.

เชื้อรา *H. scutata* ทั้ง 34 isolates ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่นำมาทดสอบ (*S. aureus* ATCC25923, MRSA SK1, *E. coli* ATCC25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853) และเชื้อรา (*C. albicans* NCPF3153, *C. neoformans* PSU, *P. marneffei, A. flavus, A. niger, Rhizopus* sp., *Mucor* sp.) ได้

จากผลการทดสอบ ได้ทำการคัดเลือกเชื้อรา *H. scutata* จำนวน 4 isolates คือ SSC18, P36 ซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้ง *M. gypseum, Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ดีที่สุด และ P30 และ P37 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรารองลงมา มาศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา *H. scutata* ต่อไป

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของ *H. scutata* โดยวิธี agar diffusion

Table 4 Antimicrobial activity of insect fungus *H. scutata* by agar diffusion method

H. scutata isolates	Antimicrobial activity														
	SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG	PM	AN	AF	Cl	Al	Cu	Rh	Mu
P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P14	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P15	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P19	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P22	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P23	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P24	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P25	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P26	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P27	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P28	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
P30	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
P31	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P32	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P34	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P36	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+	+	+	-	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Table 4 (continued)

H. scutata isolates	Antimicrobial activity														
	SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG	PM	AN	AF	Cl	Al	Cu	Rh	Mu
P37	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
P38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P42	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
P43	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P44	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
P45	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SSC18	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+	+	+	-	-
SSC47	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SSC55	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Standard drug	Inhibition zone (mm.)														
Va 30 μg	16	16.5													
Am 10 μg	28		14												
Ak 30 μg	23		20.5												
Gen 10 μg			19.5												
Tet 30 μg			20.4	9.5											
Amp B 10 μg					15	19									

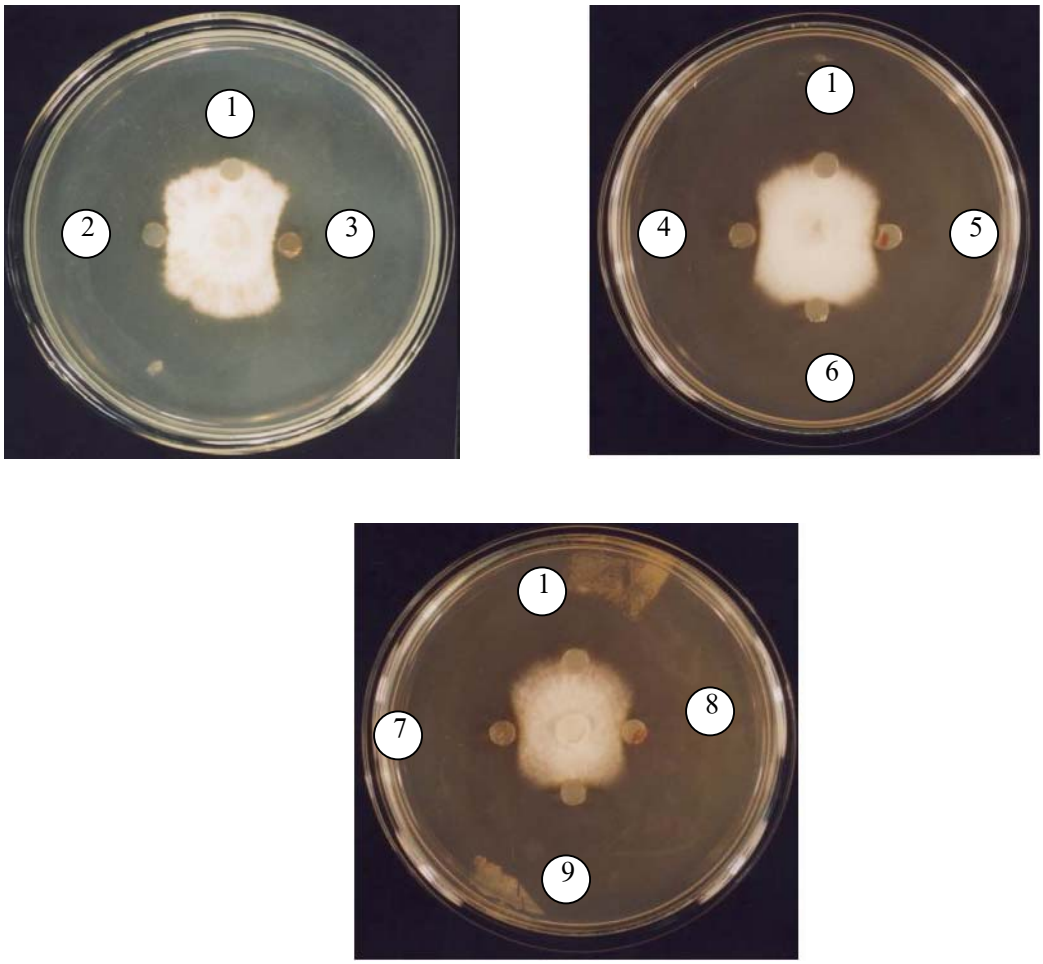
++ good inhibition, + moderate inhibition, - no inhibition

SA= *S. aureus* ATCC25923, MRSA= Methicillin-resistant *S. aureus* SK1,

EC= *E. coli* ATCC25922, PA= *P. aeruginosa* ATCC27853, CA= *C. albicans* NCPF3153,

CN= *C. neoformans* PSU, MG= *M. gypseum*, PM= *P. marneffei,* AN= *A. niger*, AF= *A. flavus*, Cl= *Cladosporium* sp., Al= *Alternaria* sp., Cu= *Curvularia* sp., Rh= *Rhizopus* sp. และ

Mu= *Mucor* sp.



ภาพที่ 12 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *M. gypseum* เบื้องต้น บนอาหาร SDA ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

Figure 12 Screening of antifungal activity against *M. gypseum* on SDA at 25°C for 5 days

1. control (sterile PDA)
2. *H. scutata* P37
3. *H. scutata* P36
4. *H. scutata* SSC18
5. *H. scutata* P44
6. *H. scutata* P45
7. *H. scutata* P30
8. *H. scutata* P31
9. *H. scutata* P32

4. การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา *H. scutata*

จากผลการทดลองที่ 3 ได้คัดเลือกเชื้อรา *H. scutata* จำนวน 4 isolates คือ SSC18, P30, P36 และ P37 มาทำการศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิด และอุณหภูมิ 2 อุณหภูมิ (25 และ 35 องศาเซลเซียส) ต่อการเจริญของเชื้อรา *H. scutata* ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *H. scutata* ทั้ง 4 isolates สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนอาหารทุกชนิดที่ทดสอบ แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 13-16)

เชื้อรา *H. scutata* เจริญช้ามากบนวุ้นอาหารทั้ง 6 ชนิด โดยส่วนใหญ่จะมีอัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 6–8 (ภาพที่ 17-20) ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ โคโลนีราแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 1 โดยเชื้อราแมลง *H. scutata* ทั้ง 4 isolates สามารถเจริญบนอาหาร PDA ได้ดีที่สุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในสัปดาห์ที่ 8 อยู่ในช่วง 9.07-16.77 มิลลิเมตร แตกต่างจากอาหารชนิดอื่นๆ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในสัปดาห์ที่ 8 อยู่ในช่วง 3.96-11.95 มิลลิเมตร อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 5) เชื้อรา *H. scutata* SSC 18 มีอัตราการเจริญสูงสุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในสัปดาห์ที่ 8 บนอาหารทั้ง 6 ชนิดเป็น 5.57-16.77 มิลลิเมตร และมีขนาดโคโลนีบนอาหาร PDA ใหญ่ที่สุด คือ 16.77±5.62 มิลลิเมตรแตกต่างจากอาหารชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 5) รองลงมาคืออาหาร SPDA, GYM และ PDA+YE ให้ขนาดโคโลนี 11.47± 0.06, 11.18±3.35 และ 11.04±2.13 มิลลิเมตร ตามลำดับ พบว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 1-4 อัตราการเจริญของเชื้อรา *H. scutata* SSC18 บนอาหาร PDA ใกล้เคียงกับอาหารอื่นๆ แต่ในสัปดาห์ที่ 5-7 อัตราการเจริญบนอาหาร PDA จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่น (ภาพที่ 17) ส่วนบนอาหาร PuDA พบว่ามีการเจริญต่ำที่สุด

H. scutata P30 มีอัตราการเจริญต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ isolates อื่นๆ (ตารางที่ 5) พบว่าผลการเจริญในช่วงสัปดาห์ที่ 1-6 บนอาหาร PDA และ SPDA ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 18) ในสัปดาห์ที่ 8 บนอาหาร PDA ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 9.07± 2.58 มิลลิเมตร และบนอาหาร SPDA ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 6.84±0.08 มิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ส่วนบนอาหาร PDA+YE, PuDA, PuDA+YE และ GYM มีการเจริญช้ามาก ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลใน

สัปดาห์ที่ 8 อยู่ในช่วง 5.66-4.52 มิลลิเมตร ซึ่งผลการเจริญบนอาหารทั้ง 4 ชนิดนี้ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันกับการเจริญบนอาหาร PDA อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

การเจริญของเชื้อรา *H. scutata* P36 บนอาหารทดสอบทั้ง 6 ชนิด พบว่า ในช่วงสัปดาห์ที่ 2-5 เชื้อรา *H. scutata* P36 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร SPDA เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดสอบอื่นๆ โดยในสัปดาห์ที่ 5 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 9.21±0.04 มิลลิเมตร แต่ในสัปดาห์ที่ 6-8 อัตราการเจริญบนอาหาร PDA จะเพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 19) และในสัปดาห์ที่ 8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหาร PDA เป็น 15.20±0.05 มิลลิเมตร สูงกว่าบนอาหาร SPDA ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 11.95±0.06 มิลลิเมตร และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) เชื้อรา *H. scutata* P36 มีอัตราการเจริญสูงรองจาก *H. scutata* SSC18

ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *H. scutata* P37 พบว่าเป็นเช่นเดียวกับการเจริญของเชื้อรา *H. scutata* P36 คือในช่วงสัปดาห์ที่ 3-5 การเจริญบนอาหาร SPDA จะให้ผลดีกว่าอาหารทดสอบอื่น แต่ในช่วงสัปดาห์ที่ 6-8 อัตราการเจริญบนอาหาร PDA จะดีกว่าอาหารทดสอบอื่นๆ (ภาพที่ 20) ในสัปดาห์ที่ 8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหาร PDA เท่ากับ 11.89±3.68 มิลลิเมตร และบนอาหาร SPDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 9.03±0.04 มิลลิเมตร (ตารางที่ 5) การเจริญบนอาหารทั้งสองนี้ในสัปดาห์ที่ 8 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และจะมีความแตกต่างกันกับการเจริญบนอาหารทดสอบอีก 4 ชนิด (PDA+YE, PuDA, PuDA+YE และ GYM) อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ด้วย

H. scutata ทั้ง 4 isolates สร้าง pigment สีส้มออกมารอบๆโคโลนีบนอาหารทุกชนิด โดยเฉพาะ isolate P36 บนอาหาร SPDA สังเกตเห็นขอบของ pigment ที่เชื้อปล่อยออกมาในวุ้นอาหารชัดเจนเป็นวงกว้างที่สุด (ภาพที่ 15)

7. การทดสอบฤทธิ์ของสารที่สกัดได้จากเชื้อรา *H. scutata* SSC18 และ P36

7.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดเส้นใยของสารสกัดโดยวิธี disc diffusion

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี agar diffusion ในการทดลองที่ 2 นั้นพบว่าเชื้อรา *H. scutata* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *M. gypseum* *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ดังนั้นสารสกัดที่ได้จาก *H. scutata* SSC18 และ P36 จึงนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อราทั้ง 4 ชนิดเช่นกัน ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 7 พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 8 สารนั้น ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *M. gypseum* ได้เพียงเล็กน้อย และไม่ยับยั้ง *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. แต่สารที่ได้จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผ่านการสกัดและผ่านการสกัดแล้ว นำมาทำ freeze-dried 4 สาร ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *M. gypseum* ได้ดีกว่า และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ดีเช่นกัน

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดเส้นใยของสารสกัดจาก *H. scutata* SSC18 และ P36 โดยวิธี disc diffusion

Table 7 Antifugal activity of crude extracts of *H. scutata* SSC18 and P36 against filamentous fungi by disc diffusion assay

Crude extracts (100 μg/disc)	Test fungus			
	M. gypseum	*Cladosporium* sp.	*Alternaria* sp.	*Curvularia* sp.
SSC18/CF/EtOAc	+	-	-	-
SSC18/CF/BuOH	+	-	-	-
SSC18/Bm/EtOAc	+	-	-	-
SSC18/Bm/MeOH	+	-	-	-
SSC18/CF/AE/FD	++	++	++	++
SSC18/CF/NE/FD	++	++	++	++
P36/CF/ EtOAc	+	-	-	-
P36/CF/BuOH	+	-	-	-
P36/Bm/EtOAc	+	-	-	-
P36/Bm/MeOH	+	-	-	-
P36/CF/AE/FD	++	++	++	++
P36/CF/NE/FD	++	++	++	++
DMSO	-	-	-	-

++ good inhibition

+ moderate inhibition

- no inhibition

7.2 การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อราชนิดเส้นใยโดยวิธี broth microdilution

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดเส้นใยของสารสกัดโดยวิธี disc diffusion ได้นำสารทั้ง 12 สารมาทดสอบเพื่อหาค่า MIC ต่อเชื้อรา *M. gypseum* และส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่นำมาทำ freeze dried 4 สารทดสอบกับเชื้อ *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. พบว่าสาร P36/CF/AE/FD สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 4 ชนิดโดยให้ค่า MIC เท่ากัน คือ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสาร P36/CF/NE/FD ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* และ *Alternaria* sp. เท่ากัน คือ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ต่อเชื้อ *Cladosporium* sp. และ *Curvularia* sp. เท่ากัน คือ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ SSC18/CF/AE/FD ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum*, *Cladosporium* sp. และ *Curvularia* sp. เท่ากัน คือ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ต่อเชื้อ *Alternaria* sp. เท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร SSC18/CF/NE/FD ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum, Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. เท่ากับ 64, 32, 16 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 8) ส่วนสารสกัดอื่นๆ ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* สูงกว่า อยู่ในช่วง 625-2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด SSC18/Bm/EtOAc, P36/CF/EtOAc และ P36/Bm/EtOAc ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* เท่ากับ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด SSC18/CF/EtOAc, SSC18/Bm/MeOH, P36/CF/BuOH และ P36/Bm/MeOH ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* เท่ากับ 1,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด SSC18/CF/BuOH ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* เท่ากับ 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับยามาตรฐาน miconazole ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* และ *Cladosporium* sp. เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 8 ค่า MICs ของสารสกัดจากเชื้อรา *H. scutata* SSC18 และ P36 ต่อเชื้อราชนิดเส้นใยโดยวิธี broth microdilution

Table 8 MICs of crude extracts of *H. scutata* SSC18 and P36 against filamentous fungi by broth microdilution

Crude extracts	MIC (μg/ml)			
	M. gypseum	*Cladosporium* sp.	*Alternaria* sp.	*Curvularia* sp.
SSC18/CF/EtOAc	1,250	ND	ND	ND
SSC18/CF/BuOH	2,500	ND	ND	ND
SSC18/Bm/EtOAc	625	ND	ND	ND
SSC18/Bm/MeOH	1,250	ND	ND	ND
SSC18/CF/AE/FD	64	64	32	64
SSC18/CF/NE/FD	64	32	16	32
P36/CF/ EtOAc	625	ND	ND	ND
P36/CF/BuOH	1,250	ND	ND	ND
P36/Bm/EtOAc	625	ND	ND	ND
P36/Bm/MeOH	1,250	ND	ND	ND
P36/CF/AE/FD	128	128	128	128
P36/CF/NE/FD	128	64	128	64
miconazole	4	4	2	2

ND = Not done

7.3 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษเบื้องต้นต่อเซลล์ไรสีน้ำตาล (Brine shimp cytotoxicity test)

ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษเบื้องต้นต่อเซลล์ไรสีน้ำตาล ดังตารางที่ 9พบว่าสาร SSC18/CF/AE/FD, SSC18/CF/NE/FD และ P36/CF/NE/FD มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไรสีน้ำตาลต่ำที่สุด โดยให้ค่า LC_{50} มากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด P36/CF/BuOH ให้ค่า LC_{50} ต่ำที่สุด เท่ากับ 60.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จัดเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับปานกลาง และสารสกัดอื่นๆ อีก 8 สารให้ค่า LC_{50} อยู่ระหว่าง 101.16–768.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่า LC_{50} ที่ต่ำกว่า 1,000 แสดงว่าสารสกัดทั้ง 8 สารนี้มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ

สำหรับชุดควบคุม (DMSO) ไม่ทำให้ไรสีน้ำตาลตาย

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษเบื้องต้นต่อเซลล์ไรสีน้ำตาลของสารสกัดจากเชื้อรา *H. scutata* SSC18 และ P36

Table 9 Brine shrimp cytotoxic assay of crude extracts from *H. scutata* SSC18 and P36

Crude extracts	LC_{50} (µg/ml)	Cytotoxic activity *
SSC18/CF/EtOAc	313.89	L
SSC18/CF/BuOH	153.95	L
SSC18/Bm/EtOAc	255.45	L
SSC18/Bm/MeOH	284.02	L
SSC18/CF/AE/FD	**>1,000**	**L**
SSC18/CF/NE/FD	**>1,000**	**L**
P36/CF/ EtOAc	101.16	L
P36/CF/BuOH	**60.09**	**I**
P36/Bm/EtOAc	768.48	L
P36/Bm/MeOH	563.98	L
P36/CF/AE/FD	755.16	L
P36/CF/NE/FD	**>1,000**	**L**

* cytotoxic activity (กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ, 2544)

- Low cytotoxic (L) LC_{50}< 1,000 µg/ml
- Intermediate cytotoxic (I) LC_{50}< 100 µg/ml
- High cytotoxic (H) LC_{50}< 10 µg/ml