บทที่ 4

วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสกัดสารจากเชื้อรา

ทำการสกัดสารจากเชื้อราทั้งในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อและส่วนมวลชีวภาพ โดยสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเธน เอธิลอะซิเตท และเมธานอลตามลำดับ ซึ่งแยกสารออกมาได้ตามลำดับขั้ว สำหรับการสกัดสารจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ ในช่วงแรกของการศึกษาได้ใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ปิโตรเลียมอีเธอร์ และเอธิลอะซิเตทตามลำดับ แต่สารสกัดที่ได้จากสารละลายปิโตรเลียมอีเธอร์มีปริมาณน้อยมากและไม่เพียงพอที่จะนำมาทดสอบ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการสกัดด้วยสารละลายเอธิลอะซิเตทเท่านั้น ในการสกัดสารส่วนมวลชีวภาพใช้สารละลายทั้ง 3 ชนิด แต่จะทำให้เซลล์แตกก่อนด้วยวิธีการ sonication หรือการบดโดยการแช่เซลล์ในไนโตรเจนเหลว วิธีการดังกล่าวทำให้สามารถสกัดสารออกมาง่ายขึ้น เนื่องจากผนังเซลล์ของเชื้อราเป็นโครงสร้างที่มีความแข็งแรง ซึ่งประกอบด้วยไคติน (chitin) เป็นองค์ประกอบหลัก (Bartnicki-Garcia, 1968) จากนั้นนำเซลล์ที่แตกไปแยกส่วนน้ำออกจากส่วนกากเซลล์ ทั้งนี้เพื่อให้สามารถสกัดสารได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากสารที่ละลายอยู่ในส่วนน้ำและสารที่อยู่ในส่วนกากเซลล์อาจมีความสามารถในการละลายต่างกัน

หลังจากสกัดสารแล้ว ได้นำสารที่ได้มาตรวจสอบบนโครมาโทกราฟีแผ่นบาง พบว่าสารสกัดจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยเอธิลอะซิเตทให้ลักษณะโครมาโทแกรมที่เห็นการแยกชัดเจนมากกว่าสารสกัดจากส่วนมวลชีวภาพ ระบบที่เหมาะสม คือ 60% EtOAc/Petrol นอกจากนี้ระบบ 100% EtOAc ก็สามารถแยกสารบนโครมาโทแกรมแผ่นบาง ได้เช่นกัน แต่สารแยกออกจากกันได้น้อยกว่าระบบ 60% EtOAc/Petrol ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดที่มีลักษณะโครมาโทแกรมที่มีการแยกสารชัดเจน ร่วมกับสารที่มีน้ำหนักร้อยละค่อนข้างสูงเป็นเกณฑ์ในการเลือกสารสกัดที่จะนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากสารที่มีลักษณะโครมาโทแกรมดังกล่าว สามารถนำมาแยกสารให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปได้ง่ายขึ้น

เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาหาน้ำหนักร้อยละของสารสกัดทั้งจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อและจากส่วนมวลชีวภาพ พบว่าในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อมีน้ำหนักร้อยละอยู่ในช่วง 0.001-0.046 ซึ่งนับว่าเป็นปริมาณที่น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ได้จากส่วนมวลชีวภาพ ซึ่งมีน้ำหนักร้อยละอยู่ใน

ช่วง 0.393-14.520 แต่ในการหาน้ำหนักร้อยละของสารสกัดจากส่วนมวลชีวภาพ ได้ศึกษาหาน้ำหนักร้อยละจากสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งได้แก่ สารสกัดจากราน้ำ T002/4 ส่วนน้ำที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเธน และสารสกัดจากเห็ดโคนส่วนน้ำที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเธนและส่วนมวลที่สกัดด้วยเมธานอล

ในการสกัดสารจากเห็ดได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ และได้นำเส้นใย (mycelium) ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อทำการสกัดสารต่อไป การเลี้ยงเส้นใยเห็ดดังกล่าวเป็นวิธีหนึ่งที่เริ่มมีการนำมาใช้มาก เพราะเป็นวิธีที่ทำให้เห็ดสร้างสารได้เร็วขึ้นในพื้นที่จำกัด พร้อมทั้งสามารถสกัดสารบริสุทธิ์ได้อีกด้วย (พวงเพชร, ม.ป.ป.) ทั้งนี้การศึกษาในดอกเห็ดมักต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะเห็ดจนกระทั่งสกัดสารนานเป็นเดือน นอกจากนี้การเลี้ยงเส้นใยเห็ดยังสามารถควบคุมสภาวะต่างๆได้

2. **การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และยีสต์ของสารสกัดจากเชื้อรา โดยวิธี** disc diffusion **และ** agar microdilution

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเชื้อรา จุลินทรีย์ที่นำมาศึกษามีความสำคัญทางการแพทย์ โดยก่อให้เกิดโรคติดเชื้อ ซึ่งจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบนั้นเป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่ม แบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ เชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 สายพันธุ์มาตรฐานที่ไวต่อยา และ Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้และเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม penicillin แบคทีเรียแกรมลบได้แก่ เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 สายพันธุ์มาตรฐานที่ไวต่อยา และ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากคนไข้ซึ่งดื้อยาหลายชนิด และเป็นเชื้อสำคัญที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล สำหรับเชื้อยีสต์ที่นำมาทดสอบได้แก่ เชื้อ *C. albicans* และ *C. neoformans* ซึ่งเป็นเชื้อที่มักก่อปัญหาในคนไข้โรคเอดส์ เชื้อทั้งสองสายพันธุ์แยกได้จากคนไข้ในโรงพยาบาลเช่นเดียวกัน

การทดสอบความไวในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดในเบื้องต้นได้ใช้วิธี disc diffusion โดยเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบแผ่น disc พื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดชนิดต่างๆ ซึ่งจะให้วงใสขนาดแตกต่างกันไป วิธีนี้เป็นวิธีเบื้องต้นในการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ สารสกัดใดที่ทำให้เกิดวงใสรอบแผ่น disc จะนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อไป แผ่น disc ที่ใช้ในการทดสอบจะเป็นแบบแผ่นเปียก ซึ่งจะนำมาทดสอบทันทีเมื่อหยดสารสกัดลงไป ข้อดีของการใช้แผ่น disc แบบเปียก คือ ถ้าสารละลายมีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ จะทำให้สารแพร่ซึมในวุ้นได้ไม่ดี ดังนั้นถึงแม้สารสกัดดังกล่าวจะมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์แต่อาจไม่ทำให้เกิดวงใสรอบแผ่น disc ในกรณีนี้การใช้แผ่นเปียก ตัวทำละลาย

ในแผ่นเปียกจะเป็นตัวช่วยพาสารให้แพร่ซึมไปได้บ้าง วิธีการทดสอบโดยการวางแผ่น disc มีทั้งข้อดีและข้อเสีย กล่าวคือวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวก ใช้สารสกัดเพียงเล็กน้อยในการทดสอบ สามารถเห็นผลการทดลองได้ชัดเจน และเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากไม่ต้องใช้เทคนิคที่ซับซ้อน แต่ก็มีข้อเสีย คือวิธีนี้เป็นวิธีการตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ แต่ไม่สามารถระบุความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้อย่างเฉพาะเจาะจง

การทดสอบโดยวางแผ่น disc เมื่อทำกับเชื้อ *C. albicans* จะใช้อาหาร RPMI glucose agar ตามวิธีของ NCCLS แทนอาหาร SDA เนื่องจากให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและเที่ยงตรง เมื่อทำซ้ำก็ให้ผลการทดสอบเหมือนเดิม และอาหารชนิดนี้มีความเหมาะสมกับเชื้อยีสต์ที่เจริญเติบโตเร็ว (http://www.mycology.adelaide.edu.au/mycology/myc) แต่สำหรับเชื้อ *C. neoformans* ใช้อาหาร SDA เพราะเชื้อดังกล่าวเจริญเติบโตได้ไม่ดีในอาหาร RPMI

เมื่อทำการทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี disc diffusion แล้วจะนำสารสกัดที่ทำให้เกิดวงใสรอบแผ่น disc ไปทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดต่อจุลินทรีย์ต่อไปโดยวิธี agar microdilution ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดบางส่วนเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution เมื่อผสมสารสกัดกับอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จะทำให้อาหารขุ่นไม่สามารถอ่านผลการทดลองได้ แต่วิธี agar microdilution สามารถอ่านผลการทดลองได้ชัดเจนถึงแม้อาหารที่ผสมสารสกัดจะขุ่นก็ตาม นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ใช้ปริมาณสารสกัดน้อย

สารสกัดจากราน้ำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตทที่นำมาทดสอบทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารสกัดจากราน้ำ T002/4 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ที่นำมาทดสอบ สารสกัดจาก *B. rhombica* ทำให้เกิดรอยจางรอบแผ่น disc ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 2 สายพันธุ์และต่อเชื้อยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในขณะที่ *Volutella* sp. V06 ทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพียง 6.6 มิลลิเมตร ต่อเชื้อ *C. neoformans* และทำให้เกิดรอยจางรอบแผ่น disc ต่อเชื้อ *S. aureus* แต่เมื่อนำไปหาค่า MIC กลับพบว่าสารสกัดจาก *B. rhombica* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ดี โดยให้ค่า MIC ค่อนข้างต่ำอยู่ในช่วง 0.98-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเฉพาะค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* ที่มีค่าเพียง 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่า MIC ต่ำที่สุดในการทดสอบครั้งนี้ เช่นเดียวกับสารสกัดจาก *Volutella* sp. V06 ที่มีค่า MIC ต่ำโดยอยู่ในช่วง 31.25-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดทั้ง 2 ชนิดนี้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อนำมาทดสอบหาค่า MIC พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดี และให้ค่า MIC ค่อนข้างต่ำ อาจเป็นเพราะว่าสารดังกล่าวมี

ความสามารถในการละลายต่ำมากทำให้ซึมผ่านวุ้นได้น้อย เมื่อวางแผ่น disc แบบเปียกซึ่งอาจช่วยให้การซึมผ่านวุ้นได้ดีขึ้น แต่ก็มีการซึมผ่านวุ้นเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงทำให้เกิดเพียงรอยจางรอบแผ่น disc แต่เมื่อนำทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี agar microdilution ซึ่งเป็นวิธีที่ผสมอาหารกับสารสกัดเข้าด้วยกันทำให้เชื้อสัมผัสกับสารสกัดโดยตรง ดังนั้นจึงทำให้สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีขึ้น

สารสกัดจากเห็ดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดสอบมี 8 ชนิด พบว่าสามารถทำให้เกิดวงใสรอบแผ่น disc เพียงเล็กน้อย โดยสารสกัดจากเห็ดขอนขาว *P. sanguineus* และ *Xylaria* sp. 2 ทำให้เกิดวงใสรอบแผ่น disc ต่อเชื้อ *S. aureus* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6.25-7.75 มิลลิเมตร และเมื่อนำมาไปหาค่า MIC ก็ให้ค่า MIC ที่ค่อนข้างสูง โดยมีค่ามากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ สำหรับเห็ด *P. sanguineus* มีรายงานการทดลองโดย Smania และคณะ (1995) ซึ่งได้ทำการเลี้ยงหัวเชื้อในอาหาร PDB ก่อนแล้วจึงนำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ไปเลี้ยงในอาหาร PDB ชุดใหม่ต่อ แล้วได้ทำการ lyophilize ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อไว้เพื่อนำไปสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ *n*-hexane และอะซิโตน ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าสารที่สกัดด้วยอะซิโตนสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมถึง *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* โดยให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.156-1.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ แต่อย่างไรก็ตามสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกันและวิธีการเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน อาจทำให้ได้สารที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันได้เช่นกัน

สำหรับสารสกัดส่วนมวลชีวภาพที่นำมาทดสอบทั้งหมด 17 สารสกัด ซึ่งเป็นสารสกัดจากราน้ำ 10 สารสกัด และสารสกัดจากเห็ด 7 สารสกัด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีสารสกัดเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ส่วนสารสกัดจากราน้ำมีเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ทำให้เกิดวงใสรอบแผ่น disc ได้แก่ สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ จากราน้ำ T002/4 สารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ค่อนข้างกว้าง โดยสามารถทำให้เกิดวงใสรอบแผ่น disc ต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบทุกชนิดยกเว้นเชื้อ *P. aeruginosa* โดยให้ขนาดวงใสที่ค่อนข้างกว้างในแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ โดยเฉพาะต่อเชื้อ *C. neoformans* ซึ่งมีขนาดวงใสรอบแผ่น disc กว้างที่สุด และเมื่อนำไปหาค่า MIC โดยวิธี agar microdilution พบว่าให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *C. neoformans* ค่อนข้างต่ำ คือ 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบเบื้องต้นเพราะสารสกัดดังกล่าวที่ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสกว้างกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น เช่นเดียวกับค่า MIC ของ *E. coli* ที่มีค่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผล

การทดลองเบื้องต้นมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสน้อยที่สุด นอกจากสารสกัดจากราน้ำ T002/4 แล้วยังมีสารสกัดจากเห็ดโคนอีก 2 สารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ (B.1) และสารสกัดด้วยเมธานอลส่วนมวลชีวภาพส่วนมวล (B.5) ในการทดสอบเบื้องต้นสารสกัดส่วน B.1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดจากส่วน B.5 โดยสามารถยับยั้งเชื้อที่ทดสอบได้ทุกชนิดยกเว้นเชื้อ *P. aeruginosa* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและค่า MIC รูปแบบเดียวกันกับสารสกัดจากราน้ำ T002/4 ซึ่งเป็นสารที่สกัดจากตัวทำละลายชนิดเดียวกันและเป็นสารสกัดส่วนน้ำเช่นเดียวกัน สำหรับสารสกัดส่วน B.5 ทำให้เกิดวงใสรอบแผ่น disc ต่อเชื้อ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* และ *C. neoformans* แต่เมื่อนำไปทดสอบหาค่า MIC พบว่าให้ค่า MIC สูง โดยมีค่ามากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบหาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยีสต์ พบว่าสารสกัดหลายๆชนิดให้ค่า MIC ค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับยาต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบก็ยังมีค่า MIC ที่สูงกว่า แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดที่ใช้ในครั้งนี้เป็นเพียงสารสกัดอย่างหยาบเท่านั้น ดังนั้นสารสกัดหลายๆส่วน เช่น สารสกัดจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตทจากราน้ำ *B. rhombica*, สารสกัดจากมวลชีวภาพส่วนน้ำด้วยไดคลอโรมีเธนจากราน้ำ T002/4 และเห็ดโคน (*T. cylindricus*) จึงมีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อเพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

ปัจจุบันการศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากเห็ดรามีมากขึ้น พบว่าเห็ดกลุ่มโพลิพอร์ (polypore) ประมาณร้อยละ 75 มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Suay *et al.*, 2000) นอกจากสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์แล้ว ก็ยังพบว่าสารสกัดจากผนังเซลล์ เช่น สารโพลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ดังเช่น PSK จาก *Trametes versicolor* ซึ่งสามารถยับยั้ง *C. albicans* และสารโพลิแซคคาไรด์ที่เป็นสารต้านมะเร็ง ก็มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* (Tsukagoshi *et al.*, 1984; Sakami *et al.*, 1991, 1993)

สารสกัดส่วนใหญ่ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เป็นสารในกลุ่มต่างๆ เช่น สารกลุ่มแนพโทควิโนน (naphthoquinone) จากเห็ด *Kirschsteiniothelia* sp. ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* และ *S. aureus* (Poch and Gloer, 1992) กลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloid) จากเห็ด *Sporormiella teretispora* ซึ่งสามารถยับยั้ง *B. subtilis*, *S. aureus* และ *C. albicans* (Wang and Gloer, 1995) กลุ่มสเตียรอยด์ (steroids) จากเห็ด *Fomitopsis pinicola* (Keller *et al.*, 1996) และกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) จากราน้ำ *Massarina tunicata* (Oh *et al.*, 1999a) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis*

เหมือนกัน รวมถึงสารในกลุ่มอีเธอร์ (ether) จากราน้ำ *Dendrospora tenella* ซึ่งสามารถยับยั้ง *S. aureus* (Oh *et al.*, 1999b)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านรา

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรานั้น ได้ทำการทดสอบกับเชื้อราก่อโรค 2 กลุ่ม คือ dermatophytes ได้แก่ *M. gypseum* และ *T. rubrum* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคกลาก และ *P. marneffei* ซึ่งก่อโรค Penicilliosis marneffei ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบภูมิกันของร่างกาย โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเอดส์ การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราเบื้องต้นของสารสกัดจะเลือกใช้วิธี disc diffusion ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ใช้สารสกัดปริมาณไม่มาก วิธีการทดสอบไม่ซับซ้อน อ่านผลการทดสอบได้ง่าย และเหมาะสมสำหรับการทดสอบที่มีสารสกัดหลายชนิด แผ่น disc ที่ใช้เป็นแผ่น disc แบบเปียก ซึ่งช่วยในการแพร่ซึมของสารสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่วิธีการดังกล่าวไม่สามารถระบุความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างเฉพาะเจาะจง ดังนั้นสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี disc diffusion จึงควรที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไปสำหรับการทดลองในครั้งนี้ได้เลือกวิธีทดสอบ 2 วิธี วิธีแรก คือ broth microdilution ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานตามวิธีของ NCCLS ซึ่งใช้ทดสอบเพื่อหาค่า MIC ต่อเชื้อ dermatophytes ทั้ง 2 สายพันธุ์ และเลือกใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุมกับเชื้อ *P. marneffei* การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี broth microdilution มีข้อดีคือ วิธีการทดสอบและวิธีการอ่านผลง่ายกว่าการทดสอบในสไลด์หลุม แต่เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อ *P. marneffei* ไม่สามารถอ่านผลได้เนื่องจากเชื้อในหลุมควบคุมไม่เจริญในอาหาร RPMI ในเวลา 7 วันที่ทำการทดสอบ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุม เนื่องจากวิธีนี้เห็นผลการทดลองได้ชัดเจน ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารสกัดในการทดสอบน้อยมาก เหมาะจะใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดที่มีปริมาณน้อย แต่วิธีการนี้มีขั้นตอนการทดสอบที่ค่อนข้างยุ่งยาก การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราต้องทำภายใต้กล้องสเตอริโอซูม

การศึกษาฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นของสารสกัดโดยวิธี disc diffusion จากสารสกัดจำนวน 28 ชนิด มีสารสกัดเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญของสายรา คือ สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนสกัดจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ จากราน้ำ T002/4 และ เห็ดโคน (*T. cylindricus*) สารสกัดทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ เนื่องจากสารสกัดทั้ง 2 ชนิดนี้

ได้สกัดจากส่วนของเชื้อราที่เหมือนกันและใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกัน ดังนั้นสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ อาจเป็นสารสกัดที่มีสถานะขั้วที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งตัวทำละลายไดคลอโรมีเธนจัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำสุดในการทดสอบครั้งนี้

สารสกัดทั้ง 2 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของราด้วยวิธีการทดสอบเบื้องต้น จะถูกนำไปทดสอบเพื่อหาค่า MIC ต่อไปโดยวิธี broth microdilution สำหรับ dermatophytes ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. gypseum* และ *T. rubrum* จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากราน้ำ T002/4 ให้ค่า MIC เท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อราทั้ง 2 สายพันธุ์ สำหรับสารสกัดจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*) มีค่า MIC ต่อ *M. gypseum* สูงกว่า *T. rubrum* คือ 256 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่า MIC ของยาต้านรามาตรฐาน miconazole 64 และ 32 เท่าตามลำดับ (ค่า MIC ของ miconazole ต่อเชื้อ *M. gypseum* และ *T. rubrum* เท่ากับ 4 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ)

การหาค่า EC_{50} ของสารสกัดต่อเชื้อ *P. marneffei* ซึ่งได้เลือกใช้วิธีการทดสอบในสไลด์หลุมดังที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยใช้ระดับความเข้มตั้งแต่ 500-0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากราน้ำ T002/4 ให้ค่า EC_{50} เท่ากับ 284.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสารสกัดจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*) ที่ให้ค่า EC_{50} เท่ากับ 210.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อหาค่า EC_{50} ของยา miconazole ต่อเชื้อราด้วยวิธีเดียวกัน ไม่สามารถหาค่า EC_{50} ได้เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นของยาสูง ได้แก่ ที่ระดับความเข้มข้น 32-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อราไม่สามารถเจริญได้เลย และเมื่อทดสอบที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่านั้น เชื้อราสามารถเจริญได้ดีเมื่อนำไปหาค่าร้อยละการยับยั้ง ก็ให้ค่าเท่ากับและต่ำกว่าร้อยละ 20 ซึ่งไม่สามารถนำไปหาค่า EC_{50} ได้ ดังนั้นจึงเลือกระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ราไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MIC ซึ่งเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การที่ราไม่สามารถเจริญได้เลยในระดับความเข้มข้นสูงอาจเป็นเพราะว่ายา miconazole ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อราที่ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสร้าง sterol 14-α-demethylase ทำให้รบกวนการสังเคราะห์ ergosterol ซึ่งมีความสำคัญกับโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา และเมื่อใช้ยานี้ในความเข้มข้นสูงก็จะออกฤทธิ์เป็นยาฆ่าเชื้อรา ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ (ยุพินและคณะ, 2541) แต่อย่างไรก็ตามค่า MIC ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่า EC_{50} ของ miconazole ต่อเชื้อ *P. marneffei* ที่ทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน โดยนงค์เยาว์ (2542) โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อ *P. marneffei* ก็เป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกับที่นงค์เยาว์ (2542) ใช้ทดสอบ และเชื้อนี้ถูกเก็บไว้ใต้ mineral oil ประมาณ 2 ปี เมื่อนำมาถ่ายเชื้อและเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่พบว่าเชื้อมีการเติบโตช้าลง

สรุปผลการทดลอง

1. สารสกัดจากรา 24 ชนิด เมื่อผ่านขั้นตอนการสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตท พบว่ามีราเพียง 11 isolates เท่านั้นที่สามารถนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ จากราทั้ง 11 isolates ให้สารสกัดทั้งหมด 28 สารสกัด ซึ่งเป็นสารสกัดจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ 11 สารสกัด และจากส่วนมวลชีวภาพ 17 สารสกัด
2. สารสกัดจากส่วนมวลชีวภาพให้น้ำหนักร้อยละของสารสกัดมากกว่าสารสกัดจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยน้ำหนักร้อยละของสารสกัดอยู่ในช่วง 0.395-14.520 และ 0.001-0.046 ตามลำดับ แต่สารสกัดจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อให้ลักษณะโครมาโทแกรมที่มีการแยกของสารชัดเจนกว่า
3. จากสารสกัดจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบทั้งหมด พบว่าสารสกัดจากราน้ำ *B. Rhombica* มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์กว้างที่สุด สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
4. สารสกัดส่วนมวลชีวภาพจากราน้ำ T002/4 และสารสกัดจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*) ส่วนที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเธนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์กว้างที่สุด โดยสามารถยับยั้ง *S. aureus* และยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ แต่ค่า MIC ที่ได้ยังมีค่าค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากยาต้านรามาตรฐาน
5. จากสารสกัดทั้งหมด 28 สารสกัด พบว่าไม่มีสารสกัดใดที่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการทดลองหาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบ (crude extracts) จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหลายชนิดสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี โดยเฉพาะสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อจากราน้ำ *B. rhombica* ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์กว้างและให้ค่า MIC ต่อ *S. aureus* ค่อนข้างต่ำ คือ 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ค่า MIC ต่อยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ค่อนข้างต่ำเช่นกัน สารสกัดดังกล่าวเป็นสารที่น่าสนใจในการนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากสารสกัดชนิดนี้ให้โครมาโทแกรมที่มีการแยกของสารค่อนข้างชัดเจน จึงเป็นสารสกัดที่มีความน่าสนใจทั้งในแง่ของฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด นอกจากสารสกัดจากราน้ำ *B. rhombica* แล้ว ก็ยังมีสารสกัดส่วนมวลชีวภาพสกัดด้วยไดคลอโรมีเธนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำจากราน้ำ T002/4 และสารสกัดจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*) ซึ่งเป็นสารที่น่าสนใจเช่นเดียวกัน เพราะสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ด้วย

การศึกษาครั้งนี้เป็นแค่การศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น และเป็นการศึกษาในส่วนของสารสกัดหยาบ ซึ่งยังไม่ทราบว่าสารประกอบส่วนใดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด และยัง

ไม่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ดังนั้นการศึกษาให้ลึกลงไปจนสามารถหาส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารที่มีประสิทธิภาพ ตลอดจนสามารถผลิตสารสกัดให้ได้ปริมาณมากขึ้น จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

เนื่องจากสารสกัดดังกล่าวเป็นสารสกัดที่ได้จากราน้ำ ซึ่งเป็นสิ่งที่มีชีวิต การสกัดสารในแต่ละครั้งก็อาจให้ผลต่างกัน และการเลี้ยงเชื้อนานๆ ก็อาจส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของสารและประสิทธิภาพของสาร ดังนั้นควรมีการศึกษาให้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์และทราบองค์ประกอบทางเคมี เพื่อลดปัญหาดังกล่าว