รายงานการวิจัย

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสกุล *Cassia* sp.

Antimicrobial Activities of Extracts from *Cassia* sp.

โดย

รศ. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร

รศ. วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2542

สมอ
เลขหมู่ QK495.C153
Order Key
Bib Key 203453
19 ต.ค. 2543

บทคัดย่อ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบเมธานอลจากใบพืชสกุล *Cassia* 7 ชนิด ต่อแบคทีเรีย ยีสต์และราที่ก่อโรค พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านราก่อโรคกลาก (*Trichophyton rubrum* และ *Microsporum gypseum*) และ *Penicillium marneffei* มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่ำ และไม่ยับยั้งยีสต์

สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* Linn.) ใบทรงบาดาล (*C. surattensis* Burm.f.) และใบกาลพฤกษ์ (*C. grandis* Linn.f.) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่ำ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration, MIC) เท่ากับ 5 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดจากพืชทั้ง 7 สาร มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดี สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ยับยั้ง *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้ดีที่สุด มีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของสายราได้ร้อยละ 50 (50 % effective concentration, EC_{50}) เท่ากับ 0.49 และ 0.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ยับยั้ง *P. marneffei* ได้ต่ำ มีค่า EC_{50} เท่ากับ 6.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากใบชัยพฤกษ์ยับยั้ง *P. marneffei* ได้ดีที่สุด มีค่า EC_{50} 0.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศสามารถยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ได้ดี มีค่า EC_{50} 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด พบว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศมีผลทำให้สายราทั้ง 3 ชนิด และ macroconidia ของ *M. gypseum* มีลักษณะผิดปกติ หดตัวเหี่ยวย่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดทำให้เกิดการรั่วไหลของของเหลวภายในเซลล์

Abstract

The crude methanolic extracts of leaves of 7 *Cassia* species 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 (*Trichophyton rubrum* and *Microsporum gypseum*) and *Penicillium marneffei* but showed low activity against bacteria and no activity on yeasts.

The leaf extracts of *Cassia alata* Linn., *C. surattensis* Burm.f., and *C. grandis* Linn.f. demonstrated low antibacterial activity with the minimum inhibitory concentration (MIC) values of 5 to 10 mg/ml.

The most effective extract against mycelial growth of *T. rubrum* and *M. gypseum* was the leaf extract of *C. alata* with the 50% effective concentrations (EC_{50}) of 0.49 and 0.81 mg/ml. respectively, however, it exhibited low activity against *P. marneffei* with the EC_{50} of 6.60 mg/ml. The extract of *C. fistula* exhibited the highest inhibition activity on *P. marneffei* with the EC_{50} of 0.94 mg/ml. In addition , it was found that the extract of *C. alata* leaves inhibited the macroconidia germination of *M. gypseum* with the EC_{50} values of 0.09 mg/ml. The inhibition of hyphal growth and macroconidia germination were observed by scanning electron microscope. The treated mycelia and macroconidia with the *C. alata* leaf extracts were shrunken and collapsed which might be due to the cell leakage.

สารบาญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบาญเรื่อง	iv
สารบาญตาราง	v
สารบาญภาพ	vi
บทนำ	1
วัสดุและอุปกรณ์	12
วิธีการดำเนินการวิจัย	14
ผลการวิจัย	22
วิจารณ์ผลการวิจัย	40
สรุป	46
บรรณานุกรม	47

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	พืชสมุนไพร และร้อยละของสารที่สกัดได้	22
2	การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยวิธี disc diffusion	23
3	การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรีย และยีสต์ของสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ โดยวิธี disc diffusion	24
4	ค่า MIC ของสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆและยาต้านแบคทีเรียโดยวิธี agar dilution	25
5	การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P.marneffei*	27
6	ค่า EC_{50} ของสารสกัด และยามาตรฐานในการยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P.marneffei*	28
7	การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งการงอกของ macroconidia และความยาว germ tube ของ macroconidia ของ *M. gypseum* ของสารสกัด และยามาตรฐาน	31
8	ค่า EC_{50} ของสารสกัด และยามาตรฐานในการยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum*	33
9	ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืช และยา miconazole ต่อความอยู่รอดของ macroconidia ของ *M. gypseum*	34

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* Linn.)	2
2	ชุมเห็ดไทย (*Cassia tora* Linn.)	4
3	ชัยพฤกษ์ (*Cassia fistula* Linn.)	5
4	ขี้เหล็ก (*Cassia siamea* Britt.)	7
5	ทรงบาดาล (*Cassia surattensis* Burm.f.)	8
6	กัลปพฤกษ์ (*Cassia bakeriana* Craib.)	9
7	กาลพฤกษ์ (*Cassia grandis* Linn.f.)	10
8	ขนาดโคโลนีของเชื้อราในสไลด์หลุม เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ	29
9	ลักษณะ macroconidia ของ *M. gypseum* ย้อมสี lactophenol cotton blue	32
10	ลักษณะของสายรา *T. rubrum* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด	36
11	ลักษณะของสายรา *M. gypseum* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด	37
12	ลักษณะของสายรา *P.marneffei* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด	38
13	ลักษณะ macroconidia ของ *M. gypseum* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด	39

บทนำ

ปัจจุบันปัญหาเรื่องโรคติดเชื้อยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญในการรักษาโรคของผู้ป่วยในโรงพยาบาลต่างๆ จากการศึกษาในโรงพยาบาลหลายแห่งพบว่าค่าใช้จ่ายสำหรับยาปฏิชีวนะมีมูลค่าสูงถึงร้อยละ 20-40 ของมูลค่ายาทั้งหมด (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2535) และมีแนวโน้มจะเพิ่มสูงขึ้นตลอดเวลา ยาปฏิชีวนะ และสารเคมีสังเคราะห์ต่างๆที่ใช้รักษาโรคติดเชื้ออยู่ในปัจจุบันมีโอกาสชักนำให้เกิดการดื้อยา และเกิดอันตรายจากผลข้างเคียงของยาด้วย ดังนั้นจึงมีการหันมาสนใจและทำการศึกษาเกี่ยวกับสมุนไพรไทย รวมถึงการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆมากขึ้น ซึ่งสมุนไพรที่ใช้ส่วนใหญ่จะอ้างอิงข้อมูลจากตำรายาแผนโบราณ แต่พบว่าผลการรักษาไม่แน่นอนและต้องใช้พืชสมุนไพรในปริมาณมาก 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) พืชสกุล *Cassia* พบทั่วไปในประเทศไทย และมีสรรพคุณทางตำรายาแผนโบราณด้วย (วิทย์, 2531; นันทวัน, 2534 a และ b) จึงน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคติดเชื้อ ข้อมูลจากการศึกษาที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาการผลิตยาสมุนไพรไทย และการส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพรไทยให้แพร่หลายมากขึ้น

การศึกษาในครั้งนี้ โดยการนำสารสกัดหยาบจากใบพืชในสกุล *Cassia* 7 ชนิดได้แก่ ชุมเห็ดเทศ (*C. alata* Linn.) ชุมเห็ดไทย (*C. tora* Linn.) ชัยพฤกษ์ (*C. fistula* Linn.) ขี้เหล็ก (*C. siamea* Britt.) ทรงบาดาล (*C. surattensis* Burm.f.) กัลปพฤกษ์ (*C. bakeriana* Craib) และ กาลพฤกษ์ (*C. grandis* Linn.f.) มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อรา

พืชที่นำมาศึกษามีรายงานการศึกษามาก่อน ดังนี้

1. ชุมเห็ดเทศ

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

ชุมเห็ดเทศเป็นไม้พุ่มสูง มีช่อดอกซ้อนกันหลายชั้นสีเหลืองคล้ายเทียนบูชาพระ ใบเป็นใบประกอบ ใบย่อยเป็นรูปไข่ มีขอบขนานกันรูปรี โคนใบ และปลายใบมน ขอบใบเรียบ (ภาพที่ 1) ผลเป็นฝักยาวมีครีบ 4 ครีบ ภายในมีเมล็ดเป็นรูปสามเหลี่ยม พบขึ้นอยู่ทั่วไปตามที่ชุ่มชื้น มักนิยมปลูกเป็นไม้ประดับ (วิทย์, 2531; นันทวัน, 2534 a; พร้อมจิต, 2535; ภูมิพิชญ์, 2536 และวันดี, 2537)

ภาพที่ 1 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 รักษาหิด และเหา ขับเสมหะ เป็นยาระบาย ช่วยให้เจริญอาหาร
- ทั้งต้น :รักษาซาง โรคผิวหนัง ขับเสมหะ รักษาริดสีดวง ฟกบวม ขับพยาธิ รักษาดีซ่าน ฝี ถ่ายพิษตานซาง
- เปลือกต้น : ขับน้ำเหลืองเสีย

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

นอกจากนี้แล้วสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศก็ยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *S. aureus, Bacillus subtilis, Serratia marcescens, E. coli, Klebsiella pneumoniae* และยีสต์ คือ *C.albicans* ได้ด้วย (นันทวัน, 2534a; 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

2. ชุมเห็ดไทย

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

ชุมเห็ดไทยเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก จัดเป็นพืชเขตร้อน ใบเป็นใบประกอบ ใบย่อยมีขนาดเล็ก รูปกลมมน ดอกสีเหลือง (ภาพที่ 2) ผลเป็นฝักรูปทรงกระบอกค่อนข้างโค้ง เมล็ดรูปทรงกระบอก

รูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน พบทั่วไปในประเทศไทยบริเวณที่ราบ (วิทย์, 2531; นันทวัน, 2534 b; เสรี, 2534 และ ภูมิพิชญ์, 2536)

ภาพที่ 2 ชุมเห็ดไทย (*Cassia tora* Linn.)

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. mentagrophytes*

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

3. ชัยพฤกษ์ หรือคูน

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

ชัยพฤกษ์เป็นไม้ยืนต้น ใบเป็นใบประกอบ ใบย่อยเป็นรูปไข่ปลายใบแหลม ดอกออกเป็นพวงสีเหลืองเป็นช่อห้อยระย้าลงมา ผลเป็นฝักรูปทรงกระบอกยาว ผิวเรียบไม่มีขน (ภาพที่ 3) (วิทย์, 2531; นันทวัน, 2534 a; สมสุข, 2534; เสรี, 2534; พร้อมจิต, 2535; มาโนช, 2537 และวันดี, 2539)

ภาพที่ 3 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)

4. ขี้เหล็ก

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

ขี้เหล็กเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ใบเป็นใบประกอบ ใบย่อยรูปขอบขนาน ปลายมนหยักเว้าเล็กน้อย ดอกเป็นช่อสีเหลือง (ภาพที่ 4) ผลเป็นฝักแบนหนา นิยมปลูกทั่วไปในประเทศไทย (วิทย์, 2531; ภูมิพิชญ์, 2536; พเยาว์, 2537; มาโนช, 2537 และวีระชัย, 2540)

ภาพที่ 4 ขี้เหล็ก (*Cassia siamea* Britt.)

สรรพคุณตามตำรายาแผนโบราณ มีดังนี้ (วิทย์, 2531; สมสุข, 2534; เสรี, 2534; พร้อมจิต, 2535 และ มาโนช, 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)

5. ทรงบาดาล

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

ทรงบาดาลเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ใบเป็นใบรวม ดอกเป็นแบบช่อตั้งสีเหลืองเข้ม (ภาพที่ 5) ฝักแบนยาวคล้ายฝักส้มป่อย นิยมปลูกเป็นไม้ประดับริมทาง และสวนสาธารณะ (สมสุข, 2534 และภูมิพิชญ์, 2536)

ภาพที่ 5 ทรงบาดาล (*Cassia surattensis* Burm.f.)

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 และใบทรงบาดาลด้วย ethanol พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ และไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารประกอบที่มีในใบทรงบาดาล

6. กัลปพฤกษ์

กัลปพฤกษ์ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cassia bakeriana* Craib วงศ์ Caesalpiniaceae

กัลปพฤกษ์เป็นไม้ขนาดย่อม ใบเป็นใบประกอบคล้ายขนนก ดอกเมื่อแรกบานมีสีชมพู แล้วสีจะค่อยจางลงจนเป็นสีขาวเมื่อใกล้โรย (ภาพที่ 6) (ภูมิพิชญ์, 2540)

ภาพที่ 6 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

7. กาลพฤกษ์

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

กาลพฤกษ์เป็นไม้ยืนต้น ใบเป็นใบเล็ก ๆ คล้ายแคฝรั่งหรือขี้เหล็ก ใบอ่อนมีสีแดง ดอกออกเป็นช่อสีชมพูแกมส้ม ผลเป็นฝักกลมสีดำผิวขรุขระ (ภาพที่ 7) นิยมปลูกทั่วไปตามบ้าน วัด และสวนสาธารณะ (วิทย์, 2531; สมสุข, 2534 และภูมิพิชญ์, 2540)

ภาพที่ 7 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

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากพืชในสกุล *Cassia* 7 ชนิด ต่อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ยีสต์ และราก่อโรค
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพืชต่อการงอกและความอยู่รอดของ macroconidia ของ *M. gypseum*

วัสดุและอุปกรณ์

1. พืชสมุนไพร ได้แก่ ชุมเห็ดเทศ, ชุมเห็ดไทย, ทรงบาดาล, ขี้เหล็ก, ชัยพฤกษ์, กัลปพฤกษ์ และกาลพฤกษ์ โดยเก็บตัวอย่างใบพืชจากอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา นำมาอบแห้ง

2. จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ

2.1 แบคทีเรีย

2.1.1 แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่

-*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [c]

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

2.1.2 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่

-*Escherichia coli* ATCC 25922 [c]

-*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]

<u>หมายเหตุ</u> เชื้อจุลินทรีย์ได้รับความอนุเคราะห์จาก

a) ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์,

b) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล,

c) ภาควิชาจุลชีววิทยา 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

4.1 Methanol (Merck)

4.2 แผ่นยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน : amikacin, ampicillin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, tetracycline, vancomycin (Difco)

4.3 ยาต้านแบคทีเรีย : gentamicin (Lek), tetracycline (Sigma), vancomycin (Abbott Labs)

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

4.5 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma)

4.8 Poly-L-Lysine (Sigma)

4.9 Tetrazolium bromide (MTT) (Sigma)

5. แผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Schleicher & Schuell)

6. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่าง ๆทางจุลชีววิทยาและทางเคมี

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

นำใบแก่ของพืชสกุล *Cassia* 7 ชนิด มาอบที่อุณหภูมิ 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

2. การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์โดยวิธีวางแผ่นยามาตรฐาน (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 มาป้ายให้ทั่วหน้าอาหาร 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

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

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

การทดสอบเชื้อในกลุ่มยีสต์นั้นจะใช้แผ่นยา Amphotericin B ที่เตรียมเองที่มีความเข้มข้นของยา 50 ไมโครกรัมต่อแผ่น โดยเตรียมสารละลายยาในน้ำกลั่นไร้เชื้อให้ได้ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายยา 10 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางแผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

นำจานเพาะเชื้อที่วางแผ่นยาแล้วไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.3 การอ่านผล

สังเกตการเกิดวงใสรอบแผ่นยา (clear zone) และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐาน (Lorian, 1996)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดโดยวิธี disc diffusion

ดัดแปลงวิธีจาก Lorian, 1996

3.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

ทำการเตรียมเชื้อเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.1

3.2 วิธีการเตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

ละลายสารสกัดใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 100 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นๆละ 10 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น disc ไร้เชื้อ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ที่วางบนแผ่นตะแกรงดังนี้

ก. แบบเปียก : หลังหยดสารสกัดแล้วให้นำไปทดสอบทันที

ข. แบบแห้ง : หลังหยดสารสกัดแล้วให้นำไปผึ่งในตู้ถ่ายเชื้อ จนแผ่น disc แห้ง จึงนำไปทดสอบ

สำหรับแผ่น disc ชุดควบคุมจะใช้ตัวทำละลาย คือ DMSO แทนสารสกัด

3.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ใช้ cotton swab ไร้เชื้อ จุ่มแบคทีเรียและยีสต์จากข้อ 2.1 มาป้ายให้ทั่วอุ้นอาหาร MHA และ SDA ตามลำดับ วางแผ่น disc ชุบสารสกัด และแผ่น disc ชุดควบคุม แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย และ *C. albicans* ส่วน *C. neoformans* บ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

3.4 การอ่านผล

สังเกตการเกิดวงใสและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์

4. การทดสอบหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) โดยวิธีagar 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 5×10^5 CFU / ml)

4.2 วิธีการเตรียมสารสกัด และยาต้านจุลินทรีย์ ที่ใช้ในการทดสอบ

4.2.1 สารสกัด

ละลายสารสกัดใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารสกัดแบบลำดับสอง (Serial 2-fold dilution) ในน้ำกลั่นไร้เชื้อให้ได้สารสกัดชนิดละ 8 ความเข้มข้น (100-0.781 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

4.2.2 ยาต้านจุลินทรีย์

ละลายยา Gentamicin, Vancomycin และAmphotericin B ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ ส่วนยา Tetracycline นั้นจะละลายใน 0.1 N HCl โดยเจือจางยา Gentamicin, Vancomycin และAmphotericin 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

ผสมสารสกัด หรือยาต้านจุลินทรีย์แต่ละความเข้มข้นกับอาหาร MHA หลอมเหลวปริมาตร 6 มิลลิลิตร ใน อัตราส่วน 1 : 100 สำหรับแบคทีเรีย ส่วนยีสต์ใช้อาหาร SDA เทอาหารที่ได้ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง ทำความเข้มข้นละ 3 จาน หยดเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 เชื้อละ 1 ไมโครลิตร ลงบนวุ้นอาหาร และนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ*C. albicans* ส่วน *C. neoformans* จะบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชุดควบคุม จะใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ DMSO แทนสารสกัด

4.4 การอ่านผล

บันทึกระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MIC

5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุม

ทำการทดสอบตามวิธีของ Picman และคณะ (1990)

5.1 วิธีเตรียมสไลด์หลุม

เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ที่มีแผ่นกระดาษกรองวางไว้ แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave จากนั้นคีบสไลด์หลุมที่ปราศจากเชื้อวางบนกระดาษกรอง โดยวางสไลด์ 4 แผ่นต่อจานเพาะเชื้อ แล้วหยดน้ำกลั่นไร้เชื้อลงบนแผ่นกระดาษกรองให้ชุ่ม

5.2 วิธีการเตรียมอาหารผสมยามาตรฐาน

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

ผสมยากับอาหาร PDA หลอมเหลว (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) ในอัตราส่วน 1 : 100 ดูดผสมให้เข้ากันแล้วใช้ไมโครปิเปตดูดมา 100 ไมโครลิตร หยดลงในสไลด์แต่ละหลุม เกลี่ยให้อาหารกระจายเต็มหลุม ปล่อยให้วุ้นแข็งตัว จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของยาเป็น 32-0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 8 หลุม

5.3 วิธีการเตรียมอาหารผสมสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ละลายสารสกัดแต่ละชนิดใน DMSO และผสมกับอาหาร SDA หลอมเหลว เช่นเดียวกับข้อ 5.2 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 1, 10 และ100 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 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.25 มิลลิเมตร)

5.5 วิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสไลด์หลุม

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

5.6 การอ่านผล

ตรวจผลทุกวันจนกว่าโคโลนีของเชื้อราในชุดควบคุมจะโตเต็มหลุม (*T. rubrum* 5 วัน, *M. gypseum* และ *P. marneffei* 4 วัน) จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราด้วยไมโครมิเตอร์ที่เทียบค่าแล้วภายใต้กล้องสเตอริโอซูม โดยในแต่ละหลุมจะวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี 2 ค่าที่ตั้งฉากกัน และหาค่าเฉลี่ย นำค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของชุดทดสอบแต่

ละความเข้มข้นไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เพื่อหาค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา 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 คำนวณหาค่า 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 ที่มีสำลี นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ

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

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

นำแผ่นสไลด์ไปตากให้แห้งภายใต้ 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)

$$\text{ร้อยละการยับยั้งการงอกของโคนิเดีย} = 100 - \frac{\text{ร้อยละการงอกของโคนิเดียชุดทดสอบ}}{\text{ร้อยละการงอกของโคนิเดียชุดควบคุม}} \times 100$$

เกณฑ์การงอก 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

7. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อความอยู่รอดของโคนิเดียโดยการย้อมสี Tetrazolium bromide (MTT)

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 6.1-6.6 แต่ทำการทดสอบใน Eppendorf tube แทนการทำบนสไลด์ ใช้ pasteur pipette ดูดโคนิเดียมาหยดลงบนสไลด์แล้วหยดสี MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้ท่วม นำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

เซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีม่วง ส่วนเซลล์ที่ตายจะใสไม่มีสี

นับจำนวนโคนิเดียทั้งที่มีชีวิต และไม่มีชีวิตรวม 150 โคนิเดีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำมาคำนวณหาร้อยละการอยู่รอดของโคนิเดีย

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

- โคนิเดียที่ไม่มีเซลล์ที่มีชีวิตเลย เป็นโคนิเดียที่ตายไม่สามารถงอกได้

8. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

8.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างเชื้อรา

8.1.1 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 และ1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหยดลงไปในหลุม นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นตัดสายราบริเวณขอบโคโลนี (ชุดทดสอบอยู่ใกล้สารสกัด ชุดควบคุมอยู่ใกล้ตัวทำละลาย) มาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา โดยย้อมดูด้วย lactophenol cotton blue และนำสายราที่ได้อีกส่วนไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (JSM-5800 LV Scanning electron microscope) ที่ศูนย์เครื่องมือมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

8.1.2 โคนิเดีย *M. gypseum*

ผสมโคนิเดียของ *M. gypseum* จากข้อ 6.2 โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1 X 10^6 CFU/ml กับสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นที่สารสกัดสามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียได้ร้อยละร้อย (ได้จากผลการทดลองในข้อ 6) ใน Eppendorf tube ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที รวม 3 ครั้ง

8.2 วิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

นำเชื้อจากข้อ 8.1 มาทำ primary fixation ด้วย 2.5% glutaraldehyde ในหลอดทดลอง 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% แล้วนำมาทำ post fixation โดยใส่ 1% OsO_4 ลงไป ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.1 M Phosphate buffer pH

7.3 อีก 2 ครั้งๆละ 10 นาที แล้วทำการ dehydration ใน ethanol 50%, 70%, 80% และ90% อย่างละ 2 ครั้งๆละ 15 นาที และใน ethanol 100% จำนวน 2 ครั้งๆละ 30 นาที

นำตัวอย่างเชื้อที่ได้เข้าเครื่อง SAMDRAI (Polaron CPD7501 Critical point drier) เพื่อทำให้ตัวอย่างแห้งสนิท ติดตัวอย่างเชื้อบนแท่นทองเหลือง และนำไปเคลือบทองโดย ion sputter ด้วยเครื่อง SPI-MODULE Sputter Coater

ผลการวิจัย

1. สารสกัดที่ได้จากพืช

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

สารสกัดที่ผ่านขั้นตอนการสกัดต่างๆและน้ำหนักร้อยละของสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักพืชที่ใช้แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยพบว่าร้อยละของสารสกัดที่ได้มีค่าตั้งแต่ 2.22 ถึง 7.78 สารที่สกัดได้มีลักษณะเป็นของหนืดข้นสีดำ

ตารางที่ 1 พืชสมุนไพร และร้อยละของสารที่สกัดได้

ชื่อพืช (สารสกัด)	ชื่อวิทยาศาสตร์ (Voucher specimen number)*	ส่วนของพืช	ลักษณะของสารสกัด	ร้อยละของสารที่สกัดได้
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 (ตารางที่ 2) 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 สำหรับการทดสอบเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ พบว่า *E. coli* ATCC 25922 จะไวต่อยาทั้ง 5 ชนิดที่ทดสอบได้แก่ Amikacin, Ampicillin, Gentamicin, Kanamycin และ Tetracycline ส่วน *P. aeruginosa* จะไวต่อยา Tetracycline แต่ดื้อยา Amikacin และ Gentamicin

การทดสอบยาต้านเชื้อรา Amphotericin B กับเชื้อในกลุ่มยีสต์นั้น พบว่าสามารถยับยั้งยีสต์ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* SH, *C. albicans* PSU, *C. neoformans* SH และ *C. neoformans* PSU ได้ใกล้เคียงกันโดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 14.0-15.5 มิลลิเมตร

ตารางที่ 2 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยวิธี disc diffusion

ยามาตรฐาน	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส มม ± SD (ความไว)			
ยาต้านแบคทีเรีย	**SA**	**MRSA**	**EC**	**PA**
Amikacin (30 μg)	23.75±0 (S)	0 (R)	23.12±0.03 (S)	0 (R)
Ampicillin (10 μg)	13.34±0.29 (R)	7.38±0.28 (R)	17.38±0.78 (S)	-
Erythromycin (15 μg)	9.88±0.03 (R)	0 (R)	-	-
Gentamicin (10 μg)	21.75±0.5 (S)	0 (R)	20.12±0.03 (S)	0 (R)
Kanamycin (30 μg)	21.50±0.12 (S)	0 (R)	20.0±0 (S)	-
Tetracycline (30 μg)	24.62±0.78 (S)	0 (R)	25.0±0.5 (S)	16.41±0.18 (S)
Vancomycin (30 μg)	-	16.25±2.0 (S)	-	-
ยาต้านรา	**CaSH**	**CaPSU**	**CnSH**	**CnPSU**
Amphotericin B (50 μg)	14.62±0.03	15.0±0	15.5±0	14.0±0

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA = Methicillin resistant *S.aureus* SK1, EC =*Escherichia coli* ATCC 25922, PA = *Pseudomonas aeruginosa*, CaSH = *Candida albicans* SH, CaPSU = *C.albicans* PSU, CnSH = *Cryptococcus neoformans* SH, CnPSU = *C.neoformans* PSU

- ไม่ได้ทำการทดสอบ

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

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัดจากพืช โดยวิธี disc diffusion

จากการนำแผ่น disc ที่มีสารสกัดที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น ทั้งแบบแผ่นเปียกและแผ่นแห้งมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบได้ (ตารางที่ 3) มีเพียงสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ ทรงบาดาล และกาลพฤกษ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดจากแผ่นเปียก มีค่าอยู่ในช่วง 6.5-11.0 มิลลิเมตร ซึ่งจะมีขนาดกว้างกว่าวงใสที่เกิดจากแผ่นแห้งเพียงเล็กน้อย ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 6.05-10.4 มิลลิเมตร ส่วนแผ่น disc ควบคุมซึ่งบรรจุตัวทำละลาย DMSO ทั้งแบบแผ่นเปียกและแห้งไม่ทำให้เกิดวงใส สารสกัดจากทรงบาดาลสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ MRSA และแบคทีเรียแกรมลบคือ *P. aeruginosa* ส่วนสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ และกาลพฤกษ์มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเพียงชนิดเดียวโดยสารสกัดจากชุมเห็ดเทศยับยั้ง MRSA ได้ดีกว่ากาลพฤกษ์

สารสกัดทั้ง 7 สารไม่มีฤทธิ์ต้านยีสต์

ตารางที่ 3 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรีย และยีสต์ของสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ โดยวิธี disc diffusion

สารสกัด		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มม. ± SD)								
		C	SA	MRSA	EC	PA	CaSH	CaPSU	CnSH	CnPSU
ชุมเห็ดเทศ	ป	-	-	11.0±0.71	-	-	-	-	-	-
	ห	-	-	10.4±0.18	-	-	-	-	-	-
ชุมเห็ดไทย	ป	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ห	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ชัยพฤกษ์	ป	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ห	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ขี้เหล็ก	ป	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ห	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ทรงบาดาล	ป	-	-	9.75±1.06	-	6.5±0	-	-	-	-
	ห	-	-	8.25±0.35	-	6.05±0	-	-	-	-
กัลปพฤกษ์	ป	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ห	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กาลพฤกษ์	ป	-	-	7.0±0	-	-	-	-	-	-
	ห	-	-	6.25±0.12	-	-	-	-	-	-

C : control, - : ไม่เกิดวงใส (clear zone), ป : แผ่น disc เปียก, ห : แผ่น disc แห้ง

4. การทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี agar dilution

นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ที่ทำให้เกิดวงใส เมื่อทดสอบโดยวิธี disc diffusion มาหาค่า MIC โดยวิธี agar dilution ได้ผลดังตารางที่ 4 พบว่า สารสกัดจากใบทรงบาดาลสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (MRSA) และแกรมลบ (*P. aeruginosa*) ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากัน คือ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดจากชุมเห็ดเทศและกาลพฤกษ์มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียกรัมบวก (MRSA) เท่านั้นมีค่า MIC 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

สำหรับยาต้านแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Gentamicin, Tetracycline และ Vancomycin พบว่ามีค่า MIC ต่ำกว่าสารสกัดทุกชนิดที่ทดสอบ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5 - 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4 ค่า MIC ของสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ และยาต้านแบคทีเรียโดยวิธี agar dilution

สารสกัด	MIC (mg/ml)			
	SA	**MRSA**	**EC**	**PA**
ชุมเห็ดเทศ		5		
ทรงบาดาล		5		5
กาลพฤกษ์		10		
ยาต้านแบคทีเรีย	**MIC (µg/ml)**			
	SA	**MRSA**	**EC**	**PA**
Gentamicin			0.5	
Tetracycline	0.5			4
Vancomycin		1		

5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุม

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุม (ภาพที่ 8) จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดชนิดต่างๆที่ระดับความเข้มข้น 1, 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* ในสไลด์หลุมซึ่งแสดงผลไว้ในตารางที่ 5 สารสกัดทั้ง 7 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของสายราทั้ง 3 ชนิดได้ โดยที่สารสกัดความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้ง *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้ร้อยละ 31.05 - 71.38 และ *P. marneffei* ร้อยละ 3.27 - 53.84 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารเป็น 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของสายราได้เพิ่มมากขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้ง *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้ร้อยละร้อย และความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้ง *P. marneffei* ได้ร้อยละร้อย ซึ่งสอดคล้องกับค่า EC_{50} ที่คำนวณได้จากกราฟเส้นตรงระหว่างร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา และระดับความเข้มข้นของสารที่ทดสอบดังตารางที่ 6 สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ยับยั้ง *T. rubrum* ได้ดีที่สุด มีค่า EC_{50} 0.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดอื่นๆมีค่า EC_{50} ต่อ *T. rubrum* ใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 0.78-1.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการยับยั้งเชื้อ *M. gypseum* เป็นไปในทำนองเดียวกับ *T. rubrum* การทดสอบกับเชื้อ *P. marneffei* พบว่าค่า EC_{50} ของสารสกัดอยู่ในช่วง 0.94 - 7.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่า *M. gypseum* และ *T. rubrum* ซึ่งมีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 0.49 - 1.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากใบชัยพฤกษ์ และชุมเห็ดไทยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.94 และ1.79 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากขี้เหล็ก กาลพฤกษ์ ทรงบาดาล ชุมเห็ดเทศ และกัลปพฤกษ์ มีค่า EC_{50} มากกว่า 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับผลของยาต้านรามาตรฐาน Miconazole ต่อการยับยั้งการเจริญของสายรานั้น พบว่าความเข้มข้น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยาสามารถยับยั้งการเจริญของสายราทั้ง 3 ชนิดได้ดี โดยสามารถยับยั้งการเจริญของสายราได้ร้อยละ 83.75 – 100 (ตารางที่ 5) และเมื่อพิจารณาจากค่า EC_{50} พบว่า Miconazole ยับยั้งสายรา *P. marneffei* ได้ดีกว่า *T. rubrum* และ *M. gypseum* โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.95, 1.43 และ10.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 6)

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

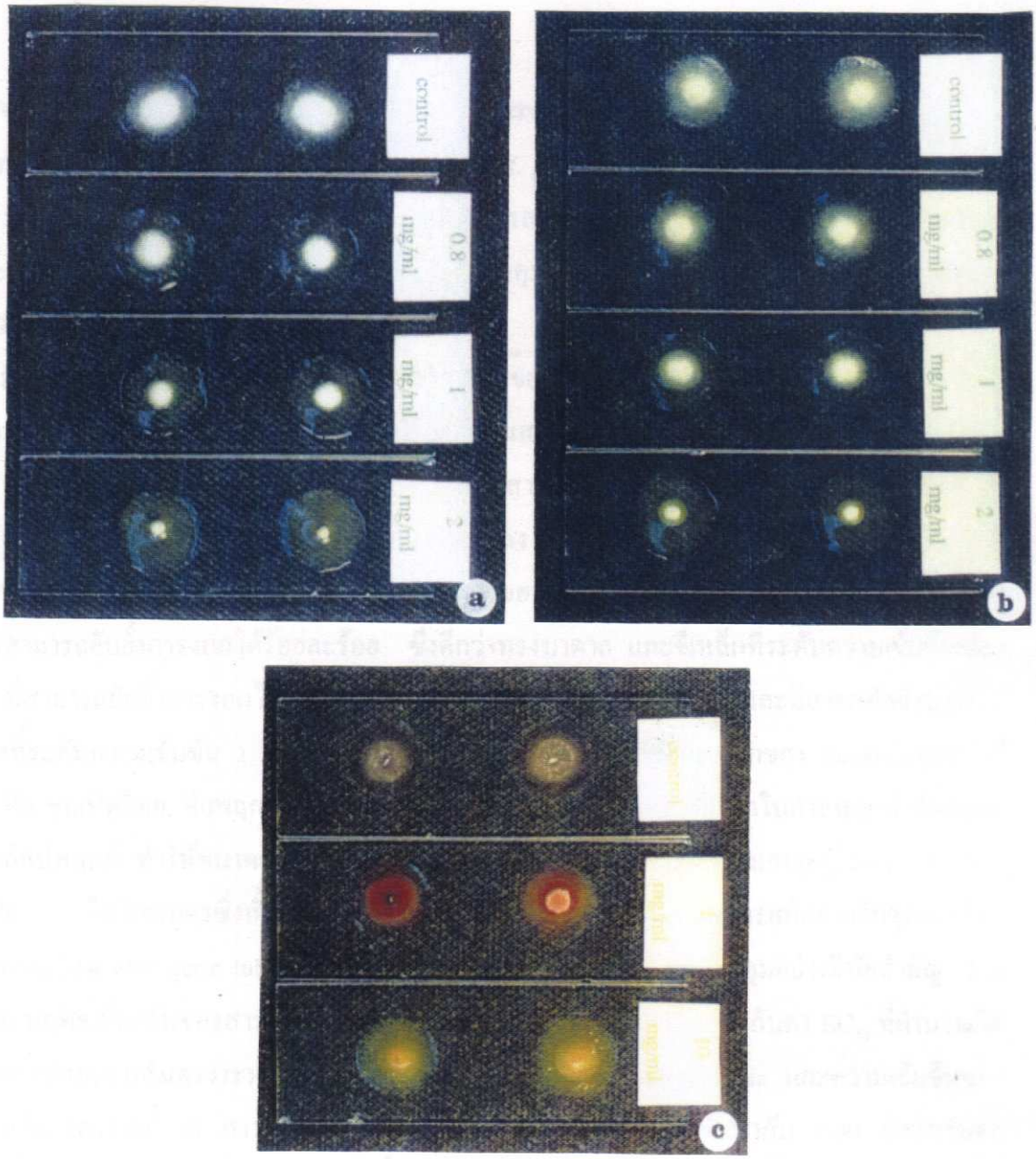
สารสกัด (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา								
	T. rubrum			*M. gypseum*			*P. marneffei*		
	1	10	100	1	10	100	1	10	100
ชุมเห็ดเทศ	71.38	100	100	66.27	100	100	3.27	77.01	100
ชุมเห็ดไทย	40.11	100	100	42.16	100	100	46.19	100	100
ชัยพฤกษ์	61.07	100	100	42.13	100	100	53.84	100	100
ขี้เหล็ก	46.30	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
กาลพฤกษ์	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

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

สารสกัด	EC_{50} (mg/ml)		
	T. rubrum	***M. gypseum***	***P. marneffei***
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



ภาพที่ 8 ขนาดโคโลนีของเชื้อราในสไลด์หลุมเมื่อทดสอบกับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ

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

7. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum*

ทำการทดสอบการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ในสารละลาย DMSO (ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดจากพืช พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของ macroconidia *M. gypseum* macroconidia ชุดควบคุมเจริญได้ตามปกติ งอก germ tube มีขนาด 49.95 ไมโครเมตร (ตารางที่ 7, ภาพที่ 9b)

เมื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1 และ10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงผลไว้ในตารางที่ 7 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนั้น สารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้งการงอกได้ดี โดยจะสามารถยับยั้งการงอกได้ร้อยละร้อย แต่เมื่อลดระดับความเข้มข้นลง 10 เท่า คือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดชุมเห็ดเทศ (ภาพที่ 9c) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *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 ไมโครเมตรซึ่งสั้นกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสารสกัดจากใบชุมเห็ดไทย macroconidia งอก germ tube ยาว 60.14 ไมโครเมตร ซึ่งยาวกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อการงอกของ macroconidia สอดคล้องกับค่า EC_{50} ที่คำนวณได้จากกราฟสมการเส้นตรงระหว่างร้อยละการยับยั้งการงอกของ macroconidia และความเข้มข้นของสารสกัด (ตารางที่ 8) สารสกัดชุมเห็ดเทศมีค่า EC_{50} ต่ำที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรรองลงมาได้แก่ ทรงบาดาล, ขี้เหล็ก, กัลปพฤกษ์ และ กาลพฤกษ์ มีค่า EC_{50} อยู่ในช่วงระหว่าง 1.78 - 2.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากใบชัยพฤกษ์ และชุมเห็ดไทยมีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ต่ำสุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 4.03 และ 4.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดยิ่งสูงขึ้นก็ยิ่งยับยั้งการงอกของโคนิเดียได้เพิ่มขึ้น และทำให้ความยาวของ germ tube สั้นลงกว่าชุดควบคุมด้วย

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

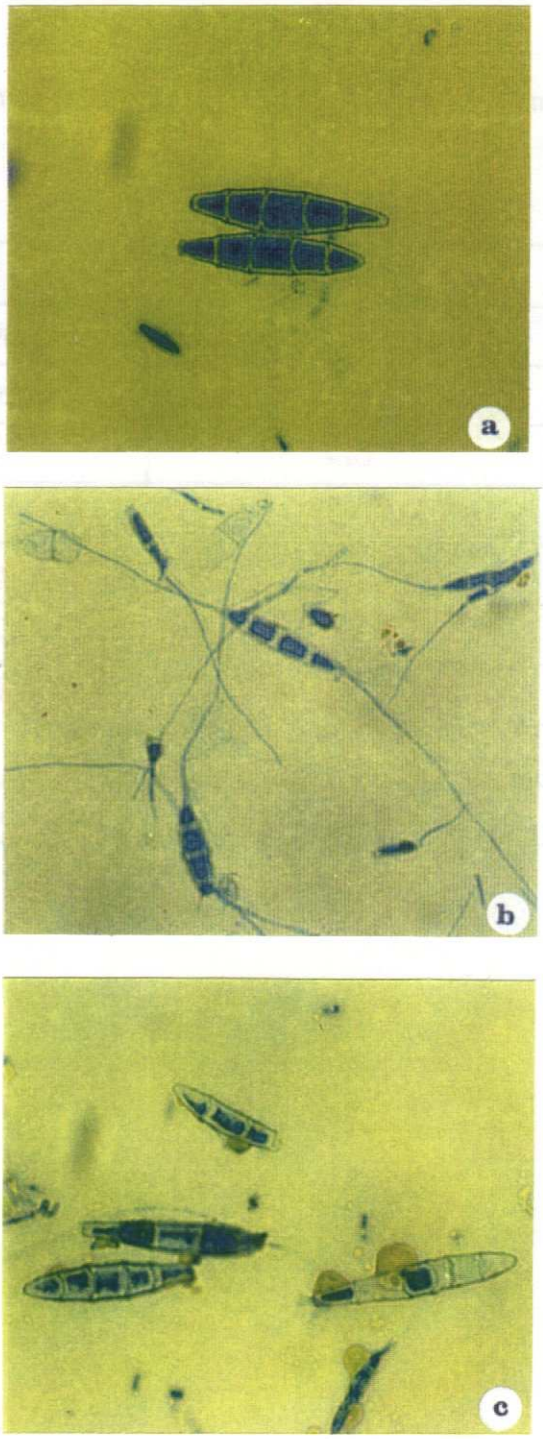
ตารางที่ 7 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งการงอกของ macroconidia และความยาว germ tube ของ macroconidia ของ *M. gypseum* ของสารสกัด และยามาตรฐาน

สารสกัด/ยา	ร้อยละการยับยั้ง					ความยาว germ tube (μm.)				
(mg/ml)	0.001	0.01	0.1	1	10	0.001	0.01	0.1	1	10
DMSO control	-	-	0	-	-	-	-	49.95±1.88	-	-
ชุมเห็ดเทศ	-	-	61.48	100	100	-	-	-	0	0
ชุมเห็ดไทย	-	-	-	0	100	-	-	-	60.14*±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
กาลพฤกษ์	-	-	-	0	100	-	-	-	25.22*±0.19	0
Miconazole	100	100	-	-	-	0	0	-	-	-

- : ไม่ได้ทดสอบ

* : ความยาว germ tube สั้นกว่าชุดควบคุม DMSO

x : ความยาว germ tube ยาวกว่าชุดควบคุม DMSO



ภาพที่ 9 ลักษณะ macroconidia ของ *M. gypseum* ย้อมสี lactophenol cotton blue (กำลังขยาย 400 เท่า)

a) ชุดควบคุม ที่เวลา 0 ชั่วโมง

b) ชุดควบคุม ที่เวลา 18 ชั่วโมง

c) ทดสอบกับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง

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

สารสกัด	EC_{50} (mg/ml)
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

8. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อความอยู่รอดของ macroconidia ของ *M. gypseum*

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อความอยู่รอดของ macroconidia ของ *M. gypseum* ที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการงอกของ macroconidia ได้ พบว่าสารสกัดที่ใช้ทดสอบทุกตัวไม่มีฤทธิ์ทำลาย macroconidia หรือทำลายได้น้อยมาก (ตารางที่ 9)

สำหรับยา Miconazole มีฤทธิ์ทำลาย macroconidia ได้ดีกว่าสารสกัดจากพืช โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถทำลาย macroconidia ได้ร้อยละร้อย ส่วนที่ความเข้มข้น 0.1-0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่ามี macroconidia ที่มีชีวิตร้อยละ 75.33 – 11.0

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

สารสกัด/ยา	ร้อยละของ macroconidia ที่มีชีวิต									
(mg/ml)	0.1	0.4	0.6	0.8	1	2	4	6	8	10
DMSO	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
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

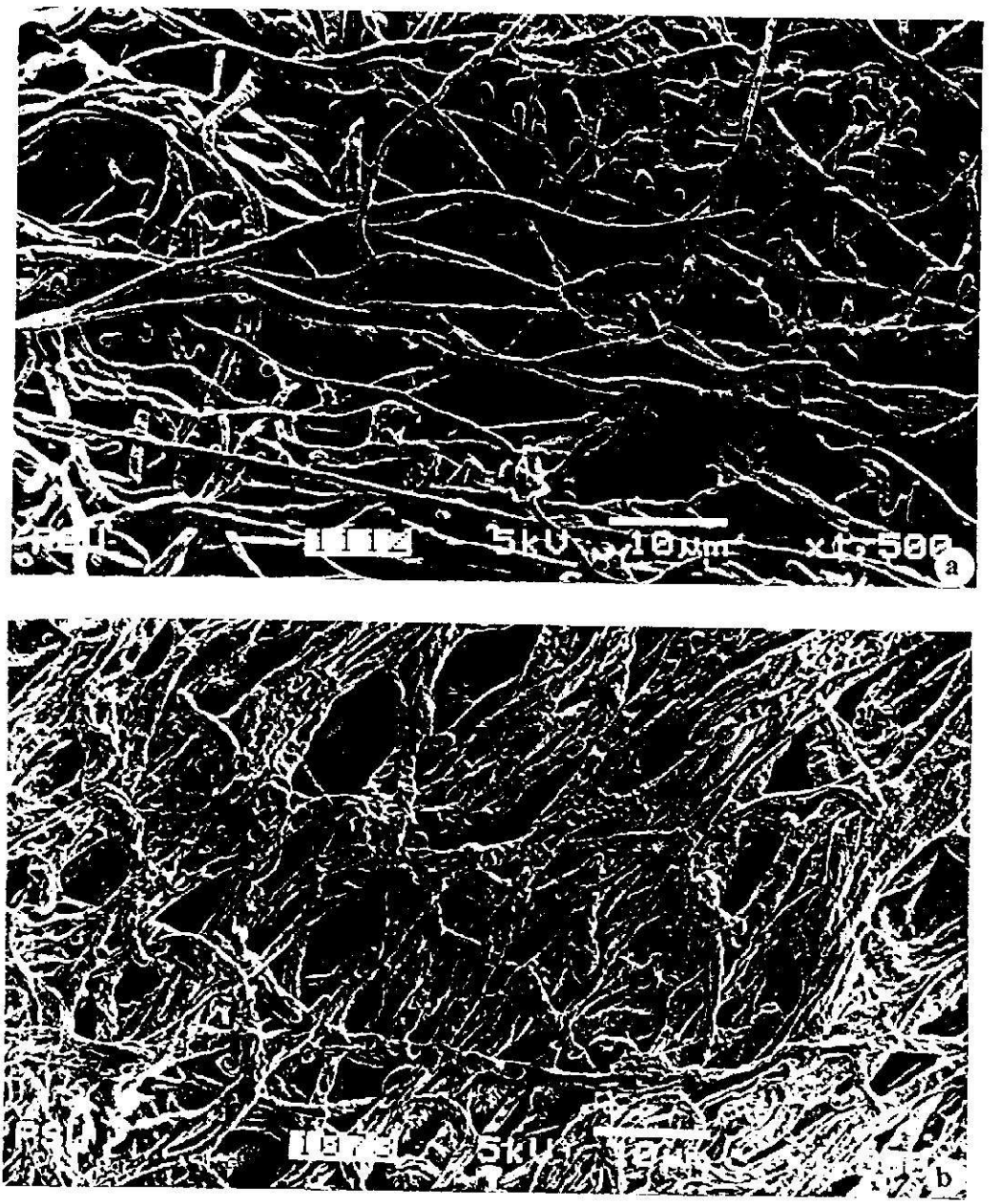
9. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศต่อเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเลค ตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศต่อสายรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *P. marneffei* เมื่อนำสายรามาย้อมดูด้วย lactophenol cotton blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะเห็นขนาดสายราทั้ง 3 ชนิดในชุดควบคุมโตกว่าชุดทดสอบเล็กน้อย แต่ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างของสายรา เมื่อนำมาศึกษาด้วย SEM จะสังเกตพบการเปลี่ยนแปลงของสายราแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน โดยที่สายราชุดควบคุมมีผนังเรียบ คล้ายท่อกลวงสม่ำเสมอ (ภาพที่ 10a, 11a และ 12a) ส่วนชุดทดสอบสายรามีลักษณะเหี่ยวย่น มีการหดตัวและยุบตัวลง (ภาพที่ 10b, 11b และ 12b)

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศต่อ macroconidia ของ *M. gypseum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และย้อมด้วย lactophenol cotton blue พบว่า macroconidia ในชุดควบคุมมีผนังเรียบ รูปร่างสม่ำเสมอ ติดสีน้ำเงินของ lactophenol cotton blue อย่างชัดเจน (ภาพที่ 9a) แต่ macroconidia ในชุดทดสอบจะมีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ บางเซลล์ใสขึ้น ติดสีน้อยลง บางเซลล์ไม่ติดสี (ภาพที่ 9c) และเห็นการเปลี่ยนแปลงชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อศึกษาด้วยกล้อง SEM macroconidia ในชุดควบคุม รูปทรงกระบอกผิวเรียบ (ภาพที่ 13a) ในขณะที่ macroconidia ในชุดทดสอบกับสารสกัดจะหดตัวเหี่ยวย่น และยุบตัวลง (ภาพที่ 13b)

10. การทดสอบฤทธิ์ต้านราของส่วนสกัดจากใบชัยพฤกษ์ที่ทำการแยกให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

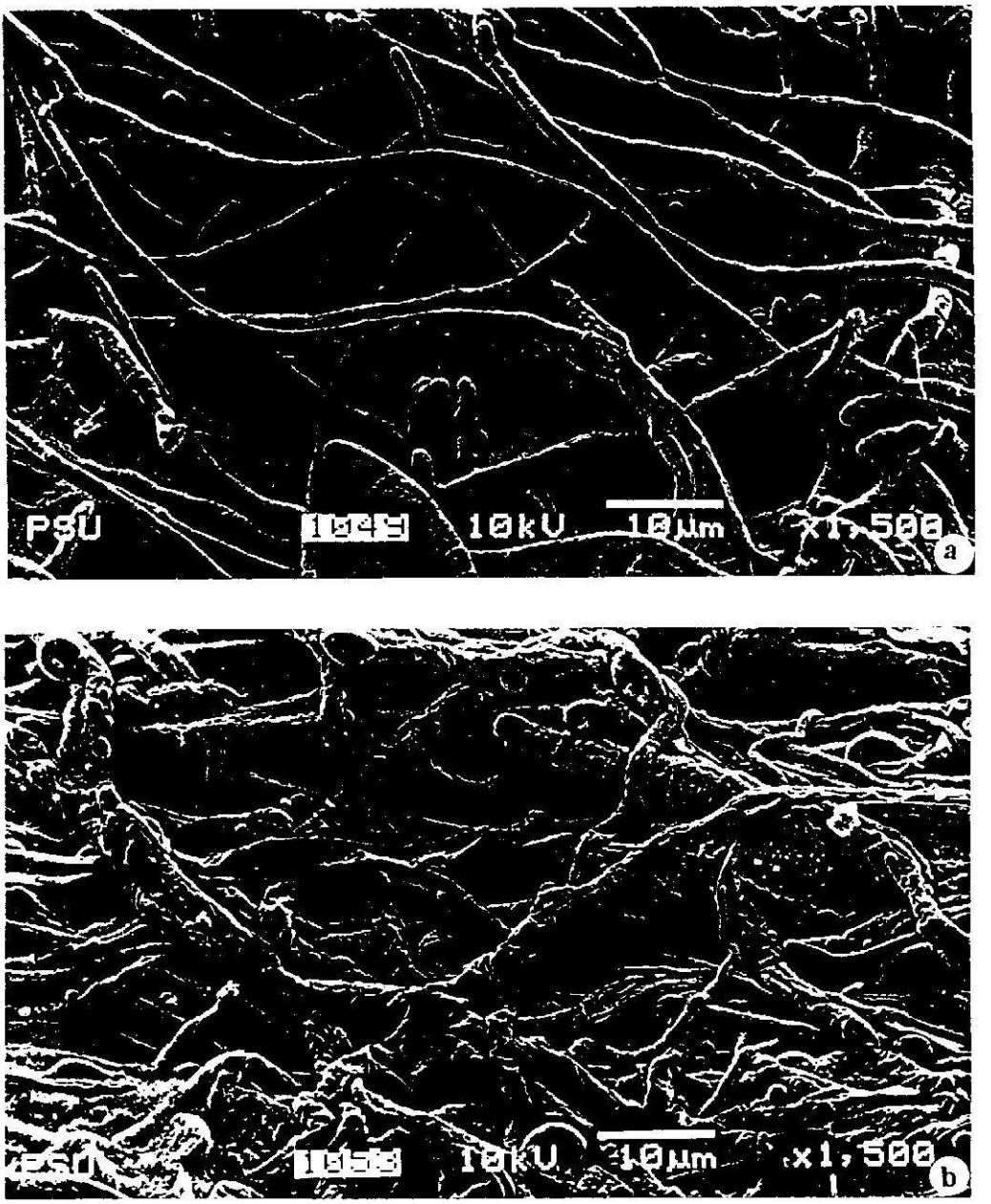
นำสารสกัดจากใบชัยพฤกษ์ไปทำการสกัดแยกให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี เริ่มชะด้วยคลอโรฟอร์ม และเพิ่มขั้วด้วยตัวทำละลาย methanol จนกระทั่งใช้ methanol บริสุทธิ์ รวมส่วนที่แยกได้ซึ่งมีลักษณะโครมาโทแกรมเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 11 ส่วนสกัดย่อย แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายราที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าทุกส่วนสกัดย่อยไม่สามารถยับยั้งการเจริญของสายรา *T. rubrum*, *M. gypseaum* และ *P. marneffei* ได้



ภาพที่ 10 ลักษณะของสายรา *T. rubrum* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (กำลังขยาย 1,500 เท่า)

a) ชุดควบคุม

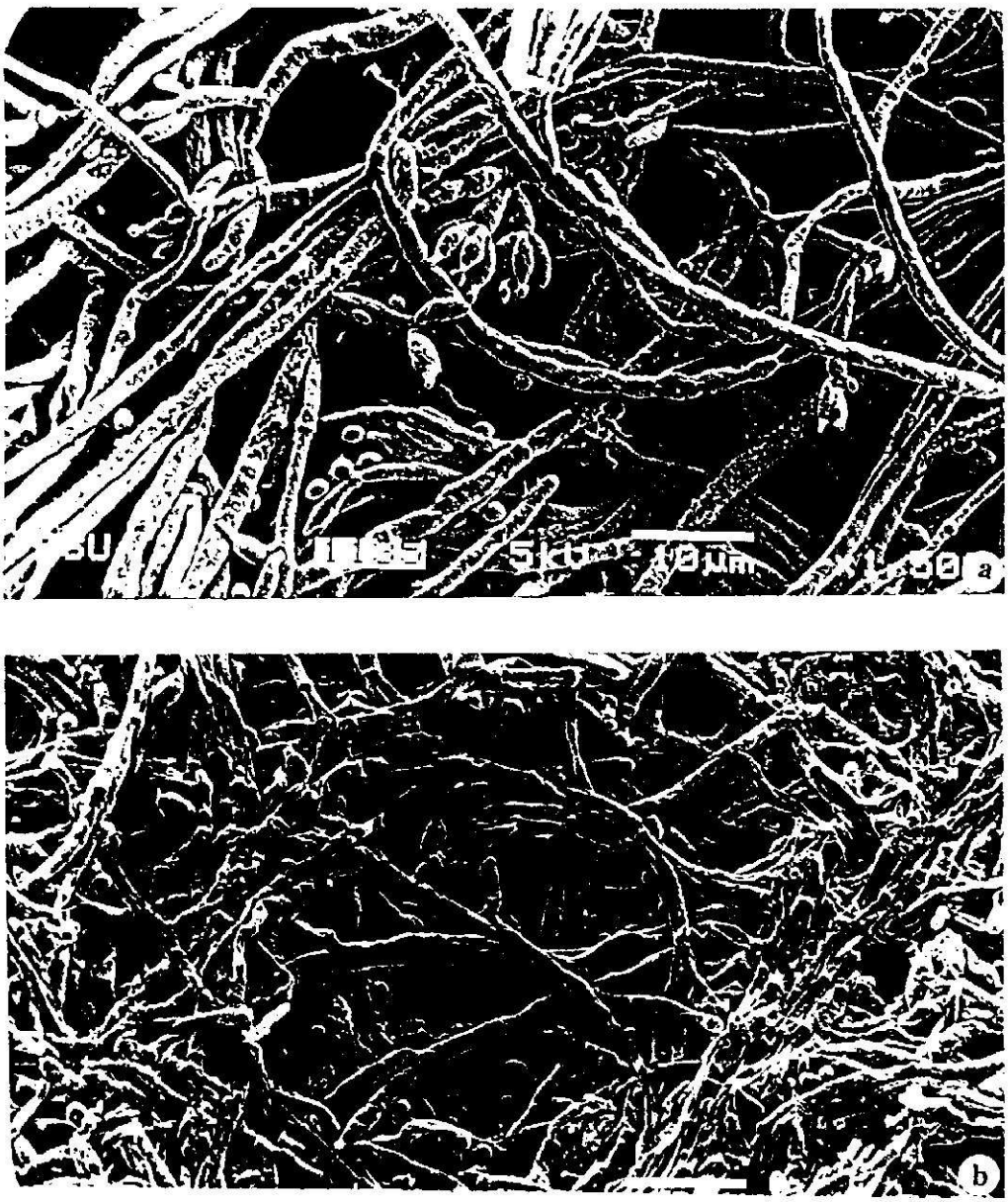
b) ทดสอบกับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 11 ลักษณะของสายรา *M. gypseum* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (กำลังขยาย 1,500 เท่า)

a) ชุดควบคุม

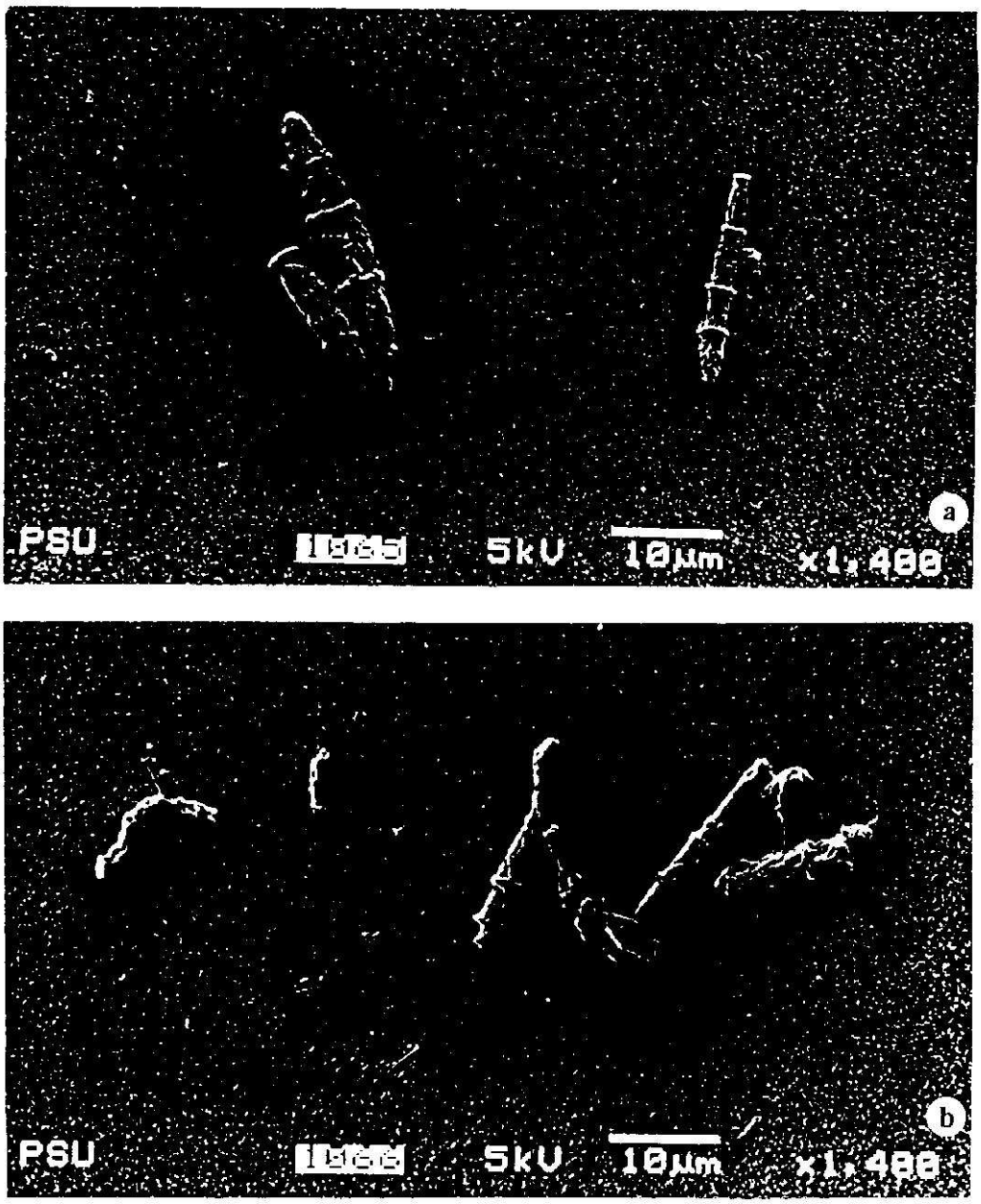
b) ทดสอบกับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 12 ลักษณะของสายรา *P. marneffei* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (กำลังขยาย 1,500 เท่า)

a) ชุดควบคุม

b) ทดสอบกับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 13 ลักษณะ macroconidia ของ *M. gypseum* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (กำลังขยาย 1,400 เท่า)

a) ชุดควบคุม

b) ทดสอบกับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. การสกัดสารจากพืช

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

สารสกัดจากใบพืชในสกุล *Cassia* ทั้ง 7 ชนิด มีลักษณะเป็นของหนืดสีดำ โดยปริมาณสารที่สกัดได้จากพืชแต่ละชนิดนั้น ส่วนใหญ่มีค่าใกล้เคียงกัน 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 (ขวัญใจ และคณะ, 2537; Palanichamy and Nagarajan, 1990; Ibrahim and Osman, 1995) ส่วนสารสกัดจากใบชัยพฤกษ์ ขี้เหล็ก ทรงบาดาล และกัลปพฤกษ์นั้น ก่อนหน้านี้มีรายงานการสกัดสารจากใบด้วยเฮกเซนเท่านั้น (ขวัญใจ และคณะ, 2537)

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และ ยีสต์ของสารสกัดจากพืช โดยวิธี disc diffusion และ agar dilution

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดชนิดต่างๆนั้น เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ส่วนใหญ่มีความสำคัญทางการแพทย์ โดยก่อให้เกิดปัญหาโรคติดเชื้อ จุลินทรีย์ที่นำมาศึกษานั้นเป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่ม แบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยา ส่วน Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) เป็นเชื้อที่แยกได้จากคนไข้ซึ่งมักจะดื้อต่อยาที่ใช้รักษา แบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *E.coli* ATCC 25922 สายพันธุ์มาตรฐานที่ไวต่อยา และ *P. aeruginosa* มักก่อปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาลต่างๆ ส่วนยีสต์ได้แก่ *C. albicans* และ *C. neoformans* แยกได้จากตัวอย่างคนไข้ในโรงพยาบาล มักก่อปัญหาโรคติดเชื้อแบบฉวยโอกาสในคนไข้โรคเอดส์

การศึกษาความไวต่อสารต้านจุลินทรีย์ในเบื้องต้นนั้น เลือกใช้วิธี disc diffusion โดยการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบแผ่น disc เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดชนิดต่างๆที่ศึกษา และนำไปพิจารณาเลือกสารสกัดที่มีศักยภาพในการต้านจุลินทรีย์เพื่อหาค่า MIC ต่อไป การทดสอบจะใช้แผ่น disc ชุบสารสกัด 2 แบบคือ แบบแผ่นเปียก และแบบแผ่นแห้ง เนื่องจากในสารสกัดมีทั้งสารที่ละลายน้ำได้ดี และสารที่ละลายในน้ำได้น้อย สารที่ละลายน้ำได้ดีจะสามารถแพร่ซึมในวุ้นได้ทั้งจากแผ่นเปียก และแผ่นแห้ง ส่วนสารที่ละลายในน้ำได้น้อยจะแพร่ซึมผ่านได้ไม่ดี ถ้ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ ตัวทำละลายในแผ่นเปียกจะเป็นตัวช่วยพาสารให้แพร่ซึมไปได้บ้าง ทำให้สังเกตเห็นวงใสได้ดีกว่าในแผ่นแห้ง แต่ถ้าสารสกัดเป็นสารที่ระเหยง่าย อาจไม่สามารถทดสอบโดยวิธีนี้ได้ วิธีนี้มีทั้งข้อดี และข้อเสีย กล่าวคือวิธีนี้จะเห็นผลการทดลองได้ชัดเจน ใช้สารสกัดในปริมาณน้อย และวิธีการทดสอบไม่ยุ่งยาก แต่วิธีนี้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นเท่านั้นว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้หรือไม่ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการหาค่า MIC แต่ไม่สามารถระบุระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะเจาะจง

ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC ของสารสกัดจากพืชต่อจุลินทรีย์ที่ทดสอบนั้น เลือกใช้วิธี agar dilution ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดส่วนใหญ่มีการละลายต่ำหากทำการทดสอบด้วยวิธี broth dilution เมื่อผสมสารสกัดกับอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว พบว่าอาหารขุ่นไม่สามารถอ่านผลการทดลองได้ แต่วิธี agar dilution สามารถอ่านผลการทดลองได้ชัดเจนถึงแม้อาหารที่ผสมสารสกัดจะขุ่นก็ตาม แต่วิธีนี้มีข้อเสียที่มีวิธีการทดสอบที่ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงกว่า และใช้เวลาในการเตรียมการทดสอบมากกว่าวิธี broth dilution

สารสกัดจากพืชสกุล *Cassia* ทั้ง 7 ชนิดที่นำมาศึกษา มีเพียง 3 ชนิด ได้แก่ ชุมเห็ดเทศ 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 3 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) นั้นไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากนันทวัน (2534 a) ที่พบว่าสารสกัดจากใบคูนด้วยแอลกอฮอล์ 95% ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa* แต่มีผลการทดลองบางส่วนต่างกันที่สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ แต่จากการทดลองในครั้งนี้ที่สารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้

เมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้กับยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน พบว่าต้องใช้สารสกัดในปริมาณความเข้มข้นที่สูงกว่ายา ดังนั้นหากจะทำการศึกษาสารสกัดเหล่านี้เพื่อพัฒนาปรับปรุงเป็นยา หรือสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคต่อไป จะต้องทำการแยกสารที่มีในสารสกัดให้บริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปทดสอบ อีกครั้งหนึ่ง

3. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรานั้น ได้ทำการทดสอบกับเชื้อราก่อโรค 2 กลุ่ม คือ dermatophytes ได้แก่ *T. rubrum* และ *M. gypseum* ซึ่งก่อโรคกลากที่บริเวณต่างๆของร่างกาย และ *P. marneffei* ซึ่งก่อโรค penicillosis marneffei ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งการศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *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 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัดในการทดสอบน้อยมาก เหมาะจะใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารที่มีปริมาณน้อย แต่วิธีการนี้มีขั้นตอนการทดสอบที่ค่อนข้างยุ่งยาก การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราต้องทำภายใต้กล้องสเตอริโอซูม

จากการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของสายราที่ระดับความเข้มข้น 1, 10 และ100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทดสอบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสายราหรือไม่ และนำผลที่ได้ไปพิจารณาเลือกระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่จะนำมาทดสอบหาค่า EC_{50} ต่อไป พบว่าสารสกัดทั้ง 7 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของสายราทั้ง 3 ชนิดได้ โดยยับยั้งเชื้อ *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้ใกล้เคียงกัน และดีกว่าการยับยั้ง *P. marneffei* และค่า EC_{50} ที่ได้นั้นให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของสายรา โดยสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ต้าน *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้ดีที่สุด 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 โดยสาร

สกัดด้วย 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) ที่พบว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศด้วย petroleum ether ความเข้มข้น 20% w/v หรือ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อราทั้งสองได้ ทั้งนี้มีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้ผลการทดลองแตกต่างกัน ได้แก่ พืชสมุนไพรจากคนละแหล่ง 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* อาจเป็นไปได้ว่าใบพืชเหล่านี้อาจมีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกันและมีฤทธิ์ต้านราซึ่งอาจเป็นสารพวก chrysophanol (นันทวัน, 2534 a)

สำหรับเชื้อ *P. marneffei* นั้นจัดเป็นเชื้อก่อโรค systemic mycoses ที่สำคัญในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Capponi *et al.*, 1996) ในประเทศไทยมีรายงานการติดเชื้อนี้สูงขึ้นตามอัตราการติดเชื้อเอดส์ในหมู่ประชากรโดยเฉพาะทางภาคเหนือของประเทศ กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยจึงได้จัดโรค disseminated penicillosis marneffei เป็นโรคหนึ่งใน indicator diseases ในการวินิจฉัยโรคเอดส์ (Supparatpinyo *et al.*, 1992) เพิ่มเติมจากที่องค์การอนามัยโลกกำหนดไว้ ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านรานี้ สารสกัดจากใบพืชสกุล *Cassia* ทั้ง 7 ชนิดก็มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. marneffei* โดยสารสกัดจากใบชัยพฤกษ์มีประสิทธิภาพดีที่สุดในกลุ่ม ส่วนสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ มีค่า EC_{50} สูงกว่าชัยพฤกษ์ถึง 6 เท่า

จะเห็นได้ว่าสารสกัดทุกชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคทั้ง 3 ชนิดได้แตกต่างกัน สารสกัดจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้มากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด ระดับความเข้มข้น และชนิดของเชื้อที่ทดสอบ (พรรณิภา, 2521) นอกจากนี้สารชนิดเดียวกันยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแต่ละชนิดได้แตกต่างกันด้วย ขึ้นอยู่กับปริมาณสารนั้นด้วย (บัญญัติ, 2518) และจากการศึกษาจะพบว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ ชุมเห็ดไทย และชัยพฤกษ์ต่างก็มีฤทธิ์ต้านราก่อโรคกลาก (*T. rubrum* และ *M. gypseum*) ซึ่งสอดคล้องกับตำรายาแผนโบราณ ส่วนสารสกัดที่เหลือไม่มีรายงานเกี่ยวกับการใช้รักษาโรคกลากในตำรายาแผนโบราณ (วิทย์, 2531; อรุณพร, 2532; นันทวัน, 2534 a; และ b; สมสุข, 2534; เสรี, 2534; ภูมิพิชญ์, 2536 และวันดี, 2537)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำสารสกัดหยาบจากใบชัยพฤกษ์ซึ่งมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของสายราทั้ง 3 ชนิดมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ได้ทั้งหมด 11 ส่วนสกัดย่อย แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายราอีกครั้ง ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าทุกส่วนสกัดย่อยไม่สามารถยับยั้งการเจริญของสายราได้เลย ทั้งนี้ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบอาจจะต่ำไป ซึ่งต่ำกว่าค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบที่ยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ประมาณ 10-17 เท่า เนื่องจากส่วนสกัดย่อยที่แยกได้มีปริมาณน้อยมาก และในการทดสอบต้องทำการเจือจางสารสกัดในอาหารเหลวถึง 100 เท่า เพื่อเจือจาง DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายทำให้ไม่มีผลต่อการทดสอบ จึงไม่สามารถทดสอบได้ว่าส่วนสกัดใดที่เป็นองค์ประกอบหลักที่มีฤทธิ์ต้านรา

เมื่อนำสายราที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศมาศึกษาจุลสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา สังเกตพบว่าสายราชุดทดสอบมีขนาดเล็กกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย แต่ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างสายรา เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (SEM) จะเห็นสายราชุดทดสอบหดตัวเหี่ยวย่น แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน แสดงว่าสารสกัดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเส้นใย โดยสารสกัดอาจไปทำลายผนังเซลล์ให้รั่วแตกออก หรือทำให้ membrane permeability เสียไป มีการสูญเสียของเหลวที่อยู่ภายในทำให้เส้นใยเหี่ยวย่น

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดต่อการงอกของโคนิเดียราโดยทดสอบกับ macroconidia ของ *M. gypseum* ซึ่งมีมาก และมีขนาดใหญ่ สังเกตผลการทดลองได้ง่าย สารสกัดทั้ง 7 สาร ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการงอกของ macroconidia ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งมีค่าต่ำกว่า Ibrahim และ Osman (1995) ที่รายงานว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้ง macroconidia ของ *M. gypseum* สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศยับยั้งได้ดีที่สุด มีค่า EC_{50} ในการยับยั้งการงอกของ macroconidia 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่า EC_{50} ที่ยับยั้งการเจริญของสายรา 9 เท่า อย่างไรก็ตามสารสกัดเหล่านี้เพียงแต่ยับยั้งการงอกเท่านั้น โดยอาจทำลายเซลล์ของ macroconidia บางเซลล์ แต่มี macroconidia ที่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ เช่นเดียวกับยามาตรฐาน miconazole ที่มีประสิทธิภาพดีมากในการรักษาโรคกลาก (ตารางที่ 9) การทำลาย

macroconidia นั้นจะใช้สารสกัด และยา miconazole ในปริมาณความเข้มข้นที่สูงกว่าการยับยั้งการงอกของ macroconidia และใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงกว่ายา miconazole ด้วย โดยที่ประสิทธิภาพในการทำลายนั้นจะเพิ่มสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอก และการทำลาย macroconidia นั้นมีประโยชน์ช่วยชะลอการติดเชื้อ หรือการแพร่กระจายของเชื้อได้ เมื่อศึกษาภายใต้ SEM พบว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ 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

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากใบพืชสกุล *Cassia* หลายชนิด โดยเฉพาะ ชัยพฤกษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. marnaffei* ได้ดีที่สุด มีศักยภาพที่น่าจะพัฒนาเพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อราต่อไปในอนาคต แม้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จะมีค่าสูงกว่ายามาตรฐานหลายเท่าก็ตาม ควรมีการศึกษาทางด้านพิษวิทยาต่อไป เพื่อความปลอดภัยในการใช้

สรุปผลการวิจัย

1. สารสกัดจากใบพืชสกุล *Cassia* ทั้ง 7 ชนิดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่ำ มีฤทธิ์ต้านราได้ดี โดยสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศยับยั้ง *T. rubrum* และ *M. gypseum* ได้ดีที่สุด มีค่า EC_{50} 0.49 และ 0.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ยับยั้ง *P. marneffei* ได้ปานกลาง (EC_{50} 6.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

   สารสกัดจากใบชัยพฤกษ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. marneffei* ดีที่สุด มีค่า EC_{50} 0.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของ macroconidia ของ *M. gypseum* ได้ดีที่สุด มีค่า EC_{50} 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่ใช้ยับยั้งสายรา และ มีฤทธิ์เพียงยับยั้งการงอกของ macroconidia เท่านั้น ไม่ได้ทำลาย macroconidia
3. สารสกัดชุมเห็ดเทศทำให้สายราของ *T.* rubrum, *M. gypseum* และ *P. marneffei* และ macroconidia ของ *M. gypseum* เหี่ยวแฟบตัวลง โดยอาจทำให้เกิดการรั่วไหลของของเหลวภายในเซลล์

บรรณานุกรม

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

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

ชัยโย ชัยชาญทินยุทธ. 2522. การศึกษาทางพฤกษเคมีของใบขี้เหล็ก และใบขี้เหล็กอเมริกัน, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย.

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. 2537. สมุนไพรก้าวใหม่. กรุงเทพฯ : เมดิคัลมีเดีย.

พรรณิภา ชุมศรี. 2521. การตรวจสอบสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : สภาวิจัยแห่งชาติ.

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

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

ภูมิพิชญ์ สุชาวรรณ. 2536. พืชสมุนไพรใช้เป็นยา 2. กรุงเทพฯ : องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

ภูมิพิชญ์ สุชาวรรณ. 2540. พืชสมุนไพรใช้เป็นยา 10. กรุงเทพฯ : องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

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

วันดี กฤษณพันธ์. 2522. การศึกษาทางพฤกษเคมีของใบขี้เหล็กเลือด และใบกัลปพฤกษ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย.

วันดี กฤษณพันธ์. 2537. สมุนไพรน่ารู้. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วันดี กฤษณพันธ์. 2539. สมุนไพรน่ารู้. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2531. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ : โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮาส์.

วีระชัย ณ นคร. 2540. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 3. กรุงเทพฯ : โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮาส์.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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

Lorian, V. 1996. Antibiotics in Laboratory Medicine. 4th ed. Baltimore : Williams & Wilkins.

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.

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.

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

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

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.