ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa*)

Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from Kratom (*Mitragyna speciosa*)

กฤษณะ บุญมี

เกวลิน ปูเงิน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปีการศึกษา 2565

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM KRATOM (*MITRAGYNA SPECIOSA*)

KRITSANA BOONME

KELVALIN POONGERN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMY YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานวิจัย ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa*)
Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from Kratom (*Mitragyna speciosa*)

ชื่อนักศึกษา นายกฤษณะ บุญมี รหัสนักศึกษา 62050566
นางสาวเกวลิน ปูเงิน รหัสนักศึกษา 62050571

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการ	ลายมือชื่อ
รศ. ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการ	
รศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการ	
ผศ.ดร. ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานวิจัย ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa*)

ชื่อนักศึกษา นายกฤษณะ บุญมี รหัสนักศึกษา 62050566

นางสาวเกวลิน ปูเงิน รหัสนักศึกษา 62050571

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

บทคัดย่อ

ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากพืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) จากตัวอย่าง 7 แหล่ง ในเขตจังหวัดฉะเชิงเทรา ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้จำนวนทั้งหมด 347 ไอโซเลท โดยเป็นราเอนโดไฟท์ที่มาจากใบ กิ่ง และรากจำนวน 170, 95 และ 82 ตามลำดับ คัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา (morphotype) จำนวน 92 ไอโซเลทมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากน้ำเลี้ยงเชื้อราในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ด้วยวิธีการ Agar well diffusion กับแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่ามีราเอนโดไฟท์จำนวน 11 ไอโซเลทมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียอย่างน้อย 1 ชนิด จากนั้นนำเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ 5 ไอโซเลทที่มีผลยับยั้งดีที่สุด (รหัส L1-01, R3-14, L5-10, R5-09 และ R6-04) มาเพาะเลี้ยงใน PDB ปริมาณ 2 ลิตร และสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลอะซิเตท (Ethyl Acetate, EtAOc) และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธีการ Disk diffusion ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/แผ่นดิสก์ สารสกัดหยาบในไอโซเลท R5-09 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. subtilis* ได้ดีที่สุดขนาด 21.3±0.91 มิลลิเมตร และ L5-10 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ดีที่สุดที่ขนาด 17.51±0.75 มิลลิเมตร เมื่อนำราเอนโดไฟท์รหัส L5-10, R5-09 และ R6-04 ไปทำการจัดจำแนกเบื้องต้นโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นเชื้อในสกุล *Aspergillus* ทำให้เห็นว่าการศึกษาราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากพืชกระท่อมมีความหลากหลายและประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค จึงมีความเหมาะสมในการนำไปต่อยอดหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นต่อไป

คำสำคัญ : พืชกระท่อม, ราเอนโดไฟท์, ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย, สารสกัดหยาบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from Kratom (*Mitragyna speciosa*)	
Students	Mister. Kritsana Boonme	Student ID 62050566
	Miss. Kelvalin Poongern	Student ID 62050571
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)	
Department	Biology	
School	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2022	
Advisor	Asst.Prof. Dr. Nattawut Rungjindamai	

Abstract

This research aims to study the antibacterial activity of endophytic fungi Isolated from Kratom (*Mitragyna speciosa*) collected from 7 locations in Chachoengsao province. A total of 347 isolates of endophytic fungi were obtained from three parts of plant including 170, 95 and 82 were endophytic fungi from leaves, branches and roots, respectively. A total of 92 isolates were randomly selected based on different morphotypes and they were screened for antibacterial activity against 4 strains of bacteria were *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using an agar well diffusion method. The results showed that 11 isolates of endophytic fungi had antibacterial activity against at least one bacterial species. Then, four most effective isolates (the code L1-01, R3-14, L5-10, R5-09 and R6-04) were cultured in 2 L of PDB and the culture broth was extracted using ethyl acetate (EtAOc) and the crude extracts were tested for antibacterial activity using a disk diffusion method (concentration at 1 mg/disk). The crude extract in code R5-09 had the strongest inhibitory activity against *B. subtilis* at 21.3±0.91 mm and L5-10 had the strongest inhibitory activity on *S. aureus* at 17.51 ±0.75 mm. Three isolates of the most promising endophytic fungi were identified based on morphological characteristics as *Aspergillus*. This study shows that endophytic fungi isolated from Kratom are diverse and effective in inhibiting pathogenic bacteria. Therefore, it should

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

be further studied especially searching for bioactive compounds to inhibit other microorganisms.

Keyword: Kratom, Endophytic, Antibacterial activity, Crude extract

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของทุก ๆ ท่าน ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย ที่คอยให้คำปรึกษา การดูแลอย่างใกล้ชิด ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่ดีในการปรับปรุงข้อบกพร่องในการทำโครงงานพิเศษ และขอขอบคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล และ รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ ตลอดจนให้คำแนะนำเพิ่มเติมในการดำเนินโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บิดา-มารดา และครอบครัวของผู้ดำเนินงาน ที่คอยช่วยเหลือ ให้ได้รับการศึกษา ตลอดจนเลี้ยงดูและอบรมสั่งสอน เป็นกำลังใจและแรงผลักดันในการทำโครงงานพิเศษให้ลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมไปถึงเพื่อน ๆ และบุคคลอื่น ๆ ที่ไม่ได้กล่าวนามมา ผู้จัดทำโครงงานขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

กฤษณะ บุญมี
เกวลิน ปูเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ง
สารบัญ.....จ
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2
2.1 พืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) 2
2.1.1 ลักษณะและชนิดของพืชกระท่อม 2
2.1.2 สารที่อยู่ในพืชกระท่อม 4
2.1.3 สรรพคุณทางยาของพืชกระท่อม 5
2.1.4 การเสพติดพืชกระท่อม 5
2.1.5 กฎหมายพืชกระท่อมของประเทศไทย 6
2.2 ราเอนโดไฟท์ 6
2.3 สารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 7
2.3.1 ที่มาของสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 7
2.3.2 การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย 7
2.3.3 การนำสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดลอง 9
2.4.1 *Bacillus subtilis* 9
2.4.2 *Staphylococcus aureus* 9
2.4.3 *Escherichia coli* 10
2.4.4 *Pseudomonas aeruginosa* 11
บทที่ 3 **วิธีการดำเนินงานวิจัย 4**
3.1 การเก็บตัวอย่างพืชกระท่อม 4
3.2 การคัดแยกราเอนโดไฟท์จากพืชกระท่อม 15
3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ 16
3.3.1 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว 16
3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion 16
3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อรา 17
3.4.1 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว 17
3.4.2 การสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ (ดัดแปลงจาก: ณัฐวุฒิ, 2549) 17
3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Disk diffusion method 18
3.5 การจำแนกชนิดราเอนโดไฟท์ 19
3.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 19
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 13
4.1 การเก็บตัวอย่างพืชกระท่อม 13
4.2 การคัดแยกราเอนโดไฟท์จากพืชกระท่อม 13
4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธีการ Agar well diffusion .. 23
4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดน้ำเลี้ยงจากราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Disk diffusion 29
4.5 การจำแนกชนิดราเอนโดไฟท์ 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 38

5.1 สรุปผลการวิจัย..... 38

5.1.1 การเก็บตัวอย่างพืชกระท่อมและคัดแยกราเอนโดไฟท์..... 38

5.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Agar well diffusion . 38

5.1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Disk diffusion method..... 39

5.1.4 การจำแนกชนิดราเอนโดไฟท์ 39

5.2 ข้อเสนอแนะ..... 39

เอกสารอ้างอิง.....36

ภาคผนวก.....39

ภาคผนวก ก.....40

ภาคผนวก ข.....41

ภาคผนวก ค.....42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างพืชกระท่อมเพื่อนำมาแยกราเอนโดไฟท์.....13

4.1 จำนวนราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชกระท่อมจากแหล่งพื้นที่ต่าง ๆ.....22

4.2 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิดของน้ำเลี้ยงจากเชื้อราเอนโดไฟท์ในอาหาร PDB ที่การเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ด้วยวิธีการทดสอบ Agar well diffusion.....26

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตต และทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion.....31

4.4 ตารางสรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ไอโซเลทต่าง ๆ.....33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะของใบกระท่อมแต่ละสายพันธุ์.... 4
3.1 ลักษณะโดยรวมของต้นกระท่อมที่นำมาศึกษาในการวิจัยครั้งนี้....14
3.2 ลักษณะการวางตัวอย่างบนอาหาร PDA เพื่อทำการคัดแยกราเอนโดไฟท์....15
3.3 ลักษณะการแยกชั้นของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์และ EtAOc ในกรวยแยก....18
3.4 ลักษณะและตำแหน่งการวางแผ่นดิสก์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบ ด้วยวิธี disk diffusion method....19
4.1 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืชกระท่อม....23
4.2 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ....23
4.3 ร้อยละราเอนโดไฟท์จากส่วนต่าง ๆ ที่นำไปศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย....23
4.4 ฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* จากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธีการ Agar well diffusion....27
4.5 ฤทธิ์ต้าน *S. aureus* จากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Agar well Diffusion....27
4.6 ฤทธิ์ต้าน *E. coli* จากน้ำเลี้ยงราเอนไฟท์ด้วยวิธี Agar well diffusion....28
4.7 ฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* จากน้ำเลี้ยงราเอนไฟท์ด้วยวิธี Agar well diffusion ในไอโซเลท S1-01....28
4.8 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบชนิดใดชนิดหนึ่งที่มีจากส่วนต่าง ๆ ของพืช....29
4.9 ฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* จากสารสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Disk diffusion....31
4.10 ฤทธิ์ต้าน *S. aureus* จากสารสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Disk diffusion....32
4.11 ฤทธิ์ต้าน *E. coli* จากสารสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Disk diffusion....32
4.12 ภาพแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ *Aspergillus* sp. L5-10....34
4.13 ภาพแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ *Aspergillus* sp. R5-09....35
4.14 ภาพแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ *Aspergillus* sp. R6-04....36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันการใช้ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งจุลินทรีย์มีแนวโน้มในการยับยั้งได้ยากมากขึ้น อันเป็นผลมาจากการที่จุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้สามารถดื้อยาปฏิชีวนะได้ โดยอาจมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น การรับประทานยาไม่ครบจำนวนหรือระยะเวลาตามที่แพทย์สั่ง การที่จุลินทรีย์พัฒนากลไกในการทำลายยา ดังนั้นจึงมีความต้องการค้นหาแหล่งการผลิตยาปฏิชีวนะหรือสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ๆ เพื่อตอบสนองต่อความต้องการที่มีเพิ่มมากขึ้น

ราเอนโดไฟท์ เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบ ลำต้น ราก ดอก และผล โดยมีความสัมพันธ์กับพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Mutualism) ซึ่งราเอนโดไฟท์จะไม่ก่อให้เกิดความเสียหายหรืออาการของโรคใด ๆ ให้กับพืช อีกทั้งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยการช่วยดูซึมแร่ธาตุ (ศิริลักษณ์และภาวิณี, 2565) ซึ่งราเอนโดไฟท์หลายชนิดอาจสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compound) โดยในปัจจุบันมีรายงานการวิจัยจำนวนมากในการศึกษาสารดังกล่าวว่าเป็นสารที่มีคุณสมบัติด้านต่าง ๆ เช่น การต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial) การฆ่าแมลง (Insecticidal) และการต้านเชื้อรา (Antifungal) และสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) (Hafiza., et al, 2023)

พืชกระท่อม หรือ *Mitragyna speciosa* (Korth.) เป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ *Rubiaceae* มีถิ่นกำเนิดและสามารถพบได้ทั่วไปในกลุ่มประเทศเขตร้อน เช่น ประเทศไทย มาเลเซีย เมียนมา และฟิลิปปินส์ เป็นต้น (La-Up, A., et al, 2022) โดยลักษณะทั่วไปของพืชกระท่อมคือ เป็นไม้ยืนต้น ใบมีลักษณะคล้ายใบกาแฟ มีการเจริญในพื้นที่ชุ่มชื้น เป็นพืชที่คุณสมบัติในการกระตุ้นร่างกายให้รู้สึกกระปรี้กระเปร่า เพิ่มพลังงานทำให้สามารถทำงานได้เป็นระยะเวลาที่นานขึ้น โดยสารที่สำคัญในพืชกระท่อมคือ ไมทราไจนีน (Mytraginine) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของแอลคาลอยด์ มีผลออกฤทธิ์โดยจะไปกดในประสาทส่วนกลาง (กองควบคุมวัตถุเสพติด, 2566) และสารเซเว่น ไฮดรอกซี่ ไมทราไจนีน (7-Hydroxy Mitragynine) ที่มีฤทธิ์ระงับปวดคล้ายมอร์ฟีน แต่มีฤทธิ์ต่ำกว่าโดยจะไม่กดระบบทางเดินหายใจ (อำนวย, 2565)

กระท่อมเคยถูกบรรจุให้เป็นที่อยู่ในกลุ่มของสารเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 จนเมื่อเดือนสิงหาคม 2564 ได้รับการปลดออกจากการเป็นสารเสพติดให้โทษจึงทำให้บุคคลทั่วไปสามารถทำการเพาะปลูก บริโภค และทำการจำหน่ายได้ทั่วไป ในการบริโภคกระท่อมสามารถบริโภคได้ในทั้งรูปแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบสด ผงแห้ง ยางท่อม หรือแม้กระทั่งน้ำต้มใบ โดยผลการบริโภคกระท่อมจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพในด้านต่าง ๆ เช่น เกิดอาการท้องผูกเนื่องจากกากของกระท่อม ความอยากอาหารลดลง อีกทั้งส่งผลต่อสมาธิและความจำ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม มีรายงานวิจัยหลายฉบับหรือตำรายาพบว่ากระท่อมสามารถระงับอาการปวดท้อง การปวดเมื่อย รักษาโรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง มีผลต่อการต้านการอักเสบ รวมไปถึงการต้านแบคทีเรีย

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการนำส่วนต่าง ๆ ของต้นพืชกระท่อมมาทำการคัดแยกราเอนโดไฟท์ เพื่อศึกษาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ โดยมุ่งเน้นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและนำไปต่อยอดในอนาคตได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อทำการคัดแยกราเอนโดไฟท์จากพืชกระท่อมจากตัวอย่างจำนวน 7 แหล่ง
2. เพื่อเพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของราเอนโดไฟท์
3. เพื่อระบุชนิดของราเอนไฟท์ที่มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ดีที่สุด 3 ไอโซเลท

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. สามารถคัดแยกราเอนโดไฟท์จากการเก็บตัวอย่าง 7 แหล่งได้จำนวน 100 ไอโซเลท
2. มีไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้อย่างน้อย 10 ไอโซเลท
3. สามารถทำการระบุราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ดีที่สุด 3 ไอโซเลท

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชกระท่อม

2. เพื่อเป็นแนวทางในการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa*)

2.1.1 ลักษณะและชนิดของพืชกระท่อม

พืชกระท่อมเป็นพืชในวงศ์เข็ม หรือ *Rubiaceae* เช่นเดียวกับต้นเข็มและต้นกาแฟ กระท่อมเป็นไม้ยืนต้นขนาดปานกลางไปจนถึงใหญ่ มีแก่นเป็นไม้เนื้อแข็ง สูง 10-15 เมตร ลำต้นกว้างได้ถึง 5 เมตร ใบมีสีเขียวเข้ม ลักษณะใบคล้ายใบกาแฟ เป็นใบเดี่ยวสีเขียวเรียงตัวเป็นคู่ ตรงข้าม มีชนิดก้านใบแดงและก้านใบเขียว ดอกกลมโตขนาดเท่าผลพุทรา แผ่นใบขนาดกว้างประมาณ 5-10 ซม. ยาวประมาณ 8-14 ซม. ดอกมีสีขาวอมเหลืองออกเป็นช่อตุ้มกลมขนาด 3-5 ซม.กระท่อมมีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน ชื้นแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะภาคใต้ของประเทศไทย และภาคเหนือของมาเลเซีย เติบโตได้ดีในที่ชุ่มชื้น ความชื้นสูง ดินอุดมสมบูรณ์ และมีแสงแดดปานกลาง ในไทยมีอยู่ 3 พันธุ์ คือ พันธุ์แตงกวา (ก้านเขียว) พันธุ์ยักษาใหญ่ (รูปใบใหญ่) และพันธุ์ก้านแดง (รูปที่ 2.1) พบมากในป่าธรรมชาติบริเวณภาคใต้ (Food and Drug Administration, 2021) โดยแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะดังนี้

1. พันธุ์แตงกวา หรือก้านเขียว มีเส้นใบสีเขียวอ่อนกว่าแผ่นใบ นิยมใช้เคี้ยวใบสด เพราะมีรสขมอ่อน และก้านใบนิ่ม

2. พันธุ์ยักษาใหญ่ ยักษ์ใหญ่ หรือหางกั้ง มีใบขนาดใหญ่กว่าพันธุ์อื่นและส่วนบนของขอบใบเป็นหยัก

3. พันธุ์ก้านแดง มีก้านและเส้นใบสีแดง มีรสชาติขมกว่ากระท่อมก้านเขียวและมีฤทธิ์ยาวนานกว่า ประมาณ 30 นาที นิยมใช้ต้มสกัดตัวยา ไม่นิยมใช้เคี้ยวใบสดเพราะมีก้านใบแข็ง (BBC News Thai, 2021

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์แตงกวา พันธุ์ยักษาใหญ่ พันธุ์ก้านแดง

รูปที่ 2.1 ลักษณะของใบกระท่อมแต่ละสายพันธุ์

ที่มา: กระท่อม ประโยชน์ การใช้ มีกี่พันธ์ ทุกเรื่องเกี่ยวกับกระท่อม – farm:suksabuy.com (farmssb.com)

2.1.2 สารที่อยู่ในพืชกระท่อม

พืชกระท่อมสามารถสร้างและสะสมสารหลากหลาย กลุ่มสารเคมีที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืชกระท่อมประกอบด้วยแอลคาลอยด์มากกว่า 40 ชนิด และมีกลุ่มสารอื่น ๆ ได้แก่ flavonoids, terpenoid saponins, polyphenols และ various glycosides ซึ่งในปัจจุบันสารแอลคาลอยด์ได้ถูกแยกออกมาโดยมีปริมาณที่แตกต่างกันไปตามภูมิภาคและฤดูกาล สารแอลคาลอยด์หลักที่อยู่ในใบ คือ mitragynine และ analogues, speciogynine, paynantheine, speciociliatine และ 7-hy droxy-7H-mitragyine เมื่อนำใบแก่มาสกัดกับเมธานอลได้สารแอลคาลอยด์หลายชนิดคือ mitrag- ynaline, pinoresinol, mitralac- tonal, mitrasulgynine และ 3,4,5,6-tetradehydromitragy- nine (Takayama et al., 1998) ในสารสกัด ethyl acetate แยกสาร indole alkaloids ชนิด corynanthe ได้ 9 ชนิด ได้แก่ mitragynine, speciogynine, speciociliatine, paynantheine, 7-HMG, mitragynaline, corynantheidaline, corynantheidine และ isocorynoxein ส่วน ประกอบที่ออกฤทธิ์ทางประสาทที่สกัดได้จากในใบคือ mitragynine และ 7-hydroxymitragynine ซึ่งทั้งสองอย่างนี้พบในพืชกระท่อมเท่านั้น

สารกลุ่ม indole alkaloids เป็นสารกลุ่มที่พบมากที่สุดในพืชกระท่อม สารที่อยู่ในกลุ่ม indole alkaloids ที่พบมากที่สุดคือ mitragynine ที่พบในใบกระท่อมของไทยจะมีสูงถึง 66% โดยน้ำหนักเมื่อเทียบกับปริมาณสารสกัดแอลคาลอยด์และเป็นแอลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์มากที่สุด โดยแอลคาลอยด์เป็นสารประเภทเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ ในโครงสารโมเลกุลจะประกอบด้วยไนโตรเจนอย่างน้อย 1 อะตอม มีสภาวะเป็นด่าง พบมากในพืช ส่วนใหญ่แอลคาลอยด์จะเป็นสารที่มีพิษและมีฤทธิ์ที่สามารถนำไปใช้ในทางการแพทย์หรือทางเภสัชวิทยาได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 สรรพคุณทางยาของพืชกระท่อม

พืชกระท่อมสายพันธุ์เอเชีย 6 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ African Mitragyna 4 สายพันธุ์ ถูกนำมาใช้ในยาแผนโบราณ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ใบกระท่อมถูกใช้เป็นยาแก้ท้องร่วง ยาระงับอาการไอ ยาต้านเบาหวาน ยาถ่ายพยาธิในลำไส้ และยาพอกแผล เช่นเดียวกับการเลิกเสพเฮโรอีน นอกจากเอเชียแล้วยังมีรายงานการใช้กระท่อมเล็กน้อยสำหรับการรักษาอาการปวดเรื้อรังและอาการขาดฝิ่นด้วยตนเอง และเพื่อทดแทนยาแก้ปวดกลุ่มฝิ่น อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการอนุมัติการใช้พืชกระท่อมหรือสารแอลคาลอยด์ในยาแผนปัจจุบัน

จากงานวิจัยพบว่าสารในพืชกระท่อมสามารถทำปฏิกิริยากับร่างกายโดยมีผลต่อเซลล์ประสาทบางชนิดในร่างกาย ซึ่งสารจะเข้าไประงับการทำงานของระบบประสาทบางส่วนทำให้ช่วยบรรเทาอาการเจ็บปวดในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้ การศึกษาทางเภสัชวิทยาแสดงให้เห็นว่า mitragynine และ 7-hydroxymitragynine มีฤทธิ์ในการจับกับ Mu-Opioid agonist พืชกระท่อมได้รับการอธิบายว่าก่อให้เกิดผลกระตุ้นและยากล่อมประสาท ในปริมาณที่ต่ำ จะก่อให้เกิดผลกระตุ้น โดยผู้ใช้รายงานว่ามีความตื่นตัวเพิ่มขึ้น มีพลังงานทางกาย มีความช่างพูด และพฤติกรรมชอบเข้าสังคม ในปริมาณที่สูง จะเกิดผล opioid นอกเหนือไปจากผลกดประสาทและทำให้รู้สึกกระปรี้กระเปร่า ผลกระทบจะเกิดขึ้นภายใน 5 ถึง 10 นาทีหลังการกลืนกินและคงอยู่เป็นเวลา 2 ถึง 5 ชั่วโมง ผลข้างเคียงเฉียบพลัน ได้แก่ คลื่นไส้ คัน เหงื่อออก ปากแห้ง ท้องผูก ปัสสาวะมากขึ้น และเบื่ออาหาร

2.1.4 การเสพติดพืชกระท่อม

การบริโภคพืชกระท่อมอาจนำไปสู่การเสพติดได้ ในการศึกษาผู้ติดใบกระท่อมในประเทศไทยพบว่าผู้ติดบางรายเคี้ยวใบกระท่อมทุกวันเป็นเวลา 3 ถึง 30 ปี (เฉลี่ย 18.6 ปี) การใช้กระท่อมเป็นเวลานานทำให้เบื่ออาหาร น้ำหนักลด นอนไม่หลับ ผิวคล้ำ ปากแห้ง ปัสสาวะบ่อย และท้องผูก สังเกตอาการถอนยาซึ่งประกอบด้วยอาการของความเป็นปรปักษ์ ก้าวร้าว อารมณ์ไม่ดี น้ำมูกไหล ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อและกระดูก และแขนขาเคลื่อนไหวกระตุก นอกจากนี้ ยังพบผู้ป่วยโรคจิตจากพืชกระท่อมหลายกรณี โดยผู้ติดกระท่อมจะแสดงอาการทางจิต ได้แก่ ประสาทหลอน หลงผิด และสับสน ในสหรัฐอเมริกาการใช้กระท่อมเกี่ยวข้องกับการใช้ยาเกินขนาดและการเสียชีวิตจำนวนมาก

นอกจากนี้ยังพบว่าการเสพกระท่อมโดยเสพใบที่ไม่ได้เอาก้านใบออก อาจจะทำให้เกิดอาการถุงท่อมในลำไส้ได้ เนื่องจากก้านใบของพืชกระท่อมไม่สามารถย่อยได้ จึงตกตะกอนติดค้างอยู่ภายในลำไส้ ทำให้ขับถ่ายออกมาได้ยาก เกิดพังผืดขึ้นมาหุ้มรัดกากกระท่อม ทำให้เกิดเป็นก้อนถุงขึ้นมาในลำไส้ บางรายจะมีอาการทางจิตคือ อาการโรคจิตหวาดระแวง เห็นภาพหลอน คิดว่าคนจะมาทำร้ายตน และพูดไม่ค่อยรู้เรื่อง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่จะส่งผลต่ออาการดังกล่าวข้างต้น เช่น ระยะเวลาในการใช้พืชกระท่อม ปริมาณที่ใช้ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5 กฎหมายพืชกระท่อมของประเทศไทย

ปี พ.ศ. 2486 ประเทศไทยเป็นประเทศแรกที่ประกาศควบคุมการใช้พืชกระท่อม โดยตราพระราชบัญญัติพืชกระท่อม พ.ศ. 2486 ระบุห้ามปลูกและครอบครองรวมทั้งห้ามจำหน่ายและเสพใบกระท่อมปี พ.ศ. 2522 กระท่อมเป็นพืชเสพติดให้โทษประเภท 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522ปี พ.ศ. 2564 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 8) พ.ศ. 2564 และประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2564 เป็นการกำหนดยกเลิกพืชกระท่อมจากการเป็นยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ซึ่งมีผลใช้บังคับตั้งแต่วันที่ 24 สิงหาคม 2564 เป็นต้นไป ทั้งนี้การนำพืชกระท่อมมาแปรรูปหรือนำมาใช้เป็นวัตถุดิบหรือเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์สมุนไพร ยา อาหาร เครื่องสำอาง ผู้ผลิตจะต้องดำเนินการตามกฎหมายที่เกี่ยวข้องของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ด้วย ปี พ.ศ. 2565 พระราชบัญญัติพืชกระท่อม พ.ศ. 2565 กำหนดการควบคุมพืชกระท่อมเป็นการเฉพาะ โดยอยู่ในความรับผิดชอบของกระทรวงยุติธรรม (กองควบคุมวัตถุเสพติด สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2566)

2.2 ราเอนโดไฟท์

เอนโดไฟท์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์เอนโดซิมไบโอติก อาศัยอยู่ตามระหว่างเซลล์พืช (Pimentel et al., 2011; Singh and Dubey, 2015 ซึ่งมักเป็นแบคทีเรียหรือเชื้อรา วงจรชีวิตของเอนโดไฟท์ทั้งหมดหรือบางส่วนเกิดขึ้นภายในโฮสต์ โดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคใด ๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพึ่งพาอาศัยกัน การเป็นปรปักษ์กัน และไม่เป็นปรสิต (Nair and Padmavathy, 2014) เป็นที่ทราบกันดีว่าเอนโดไฟท์ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของโฮสต์และเพิ่มสารอาหาร พวกเขาอาจปรับปรุงความสามารถของพืชในการทนต่อความเครียดทางชีวภาพและชีวภาพประเภทต่าง ๆ และเพิ่มความต้านทานของพืชต่อแมลงและศัตรูพืช พวกเขาผลิตไฟโตฮอร์โมนและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่น่าสนใจทางเทคโนโลยีชีวภาพ (เอนไซม์และยาทางเภสัชกรรม) (Joseph and Priya, 2011; Parthasarathi et al., 2012) โดยเอนโดไฟท์ทำหน้าที่เป็นแหล่งกักเก็บของสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ เช่น อัลคาลอยด์ กรดฟีนอล ควิโนน สเตียรอยด์ ซาโปนิน แทนนิน และเทอร์พีนอยด์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารในการต้านจุลชีพ ต้านแมลง ต้านมะเร็ง และคุณสมบัติอื่น ๆ อีกมากมาย ปัจจุบันเอนโดไฟท์จากพืชต่าง ๆ จึงเป็นที่นิยมในการค้นหาเพื่อที่จะค้นพบสารเคมีใหม่ ๆ เพื่อวัตถุประสงค์ในการรักษาโรค จุลินทรีย์เอนโดไฟท์ยังเป็นแหล่งสำคัญสำหรับการค้นพบยาอีกด้วย

ราเอนโดไฟท์เป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตแบบเฮเทอโรโทรฟิคที่มีวงจรชีวิตที่หลากหลาย ซึ่งรวมถึงความสัมพันธ์ทางชีวภาพกับสิ่งมีชีวิตออโตโทรฟิคที่หลากหลาย (Dayle et al., 2001) เชื้อราเอนโดไฟท์ถูกจำแนกออกเป็นสองกลุ่มกว้าง ๆ ตามลักษณะทางพันธุกรรมและลักษณะการเป็นอยู่ในธรรมชาติ รวมถึง *clavicipitaceous* ซึ่งอยู่ในหญ้าบางชนิดที่อยู่ในบริเวณที่มีอากาศเย็นและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

endophytes ที่ไม่ใช่ *clavicipitaceous* ซึ่งมาจากเนื้อเยื่อที่ไม่แสดงอาการของพืชที่ไม่มีท่อลำเลียง เช่น เฟิร์น ต้นสนและพืชดอก และจัดอยู่เฉพาะกลุ่ม Ascomycota หรือ Basidiomycota (Jalgaonwala et al., 2011; Bhardwaj และ Agrawal, 2014) ราเอนโดไฟท์ผลิตยาปฏิชีวนะและยาต้านมะเร็งบางชนิดที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย Penicillenols ที่สกัดจาก *Penicillium sp*. เป็นพิษต่อเซลล์จำนวนมาก Taxol ซึ่งแยกได้จาก *Taxomyces andreanae* เป็นยาต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพและประสบความสำเร็จมากที่สุดที่สกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์จนถึงปัจจุบัน Clavatol (*Torreya mairei*), sordaricin (*Fusarium sp.*), jesterone (*Pestalotiopsis jesteri*) และ javanicin (*Chloridium sp.*)

การศึกษาราเอนโดไฟท์และการนำไปใช้ประโยชน์ ในปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจมากเนื่องจากราเอนโดไฟท์ มีศักยภาพในการใช้ควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช ทางการเกษตร โดยการค้นพบราเอนโดไฟท์ *Coniochaeta ligniaria* จากเปลือกต้นสนทราย มีฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora palmivora*, *Sclerotium rolfsii* และ *Rhizoctonia oryzae* ได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์บางชนิดสามารถสร้างสารต้านจุลชีพที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดกับมนุษย์ได้ โดยการค้นพบราเอนโดไฟท์ *Streptomyces* spp. (TQR12-4) ที่แยกได้จากส้ม มีฤทธิ์ต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Colletotrichum truncatum*, *Geotrichum candidum*, *F. oxysporum*, and *F.udum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.3 สารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

2.3.1 ที่มาของสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

สารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เป็นสารที่ออกฤทธิ์ฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย อาจจะได้มาจากธรรมชาติ (antibiotics) สารกึ่งสังเคราะห์ หรือสารสังเคราะห์ โดยยาต้านจุลชีพนั้นรวมถึง ยาต้านแบคทีเรีย (antibacterial) ยาต้านเชื้อรา (antifungal) และยาต้านปรสิต (antiparasitic) หลายปีที่ผ่านมาเกิดการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรค ทำให้ต้องมีการค้นหายาปฏิชีวนะใหม่ ๆ เพื่อใช้ในการรักษา โดยมุ่งเน้นค้นหาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ซึ่งราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชต่าง ๆ มีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เชื้อรา และโปรโตซัวในมนุษย์ สัตว์ และพืชได้

2.3.2 การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย

การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย (antibiotic resistance) เกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียมีการปรับตัวต่อยาโดยวิธีการต่าง ๆ เพื่อการอยู่รอด โดยการดื้อยาอาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติของเชื้อนั้น ๆ หรือเกิดจากยาปฏิชีวนะ การดื้อยาต้านจุลชีพในแบคทีเรียก่อโรคเป็นความท้าทาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั่วโลกที่เกี่ยวข้องกับการเจ็บป่วยและเสียชีวิตสูง รูปแบบการดื้อยาหลายชนิดในแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบส่งผลให้เกิดการติดเชื้อที่รักษายากหรือแม้แต่รักษาไม่ได้ด้วยยาต้านจุลชีพทั่วไป เนื่องจากการระบุเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในระยะแรกและรูปแบบความไวต่อยาต้านจุลชีพในผู้ป่วยที่มีภาวะแบคทีเรียในกระแสเลือดและการติดเชื้อร้ายแรงอื่น ๆ ยังขาดอยู่ในสถานพยาบาลหลายแห่ง ยาปฏิชีวนะในวงกว้างจึงถูกใช้อย่างเสรีและโดยส่วนใหญ่ไม่จำเป็น การดื้อยาที่เกิดขึ้นใหม่เพิ่มขึ้นอย่างมาก และเมื่อควบคู่ไปกับการปฏิบัติควบคุมการติดเชื้อที่ไม่ดี แบคทีเรียที่ดื้อยาสามารถแพร่กระจายไปยังผู้ป่วยรายอื่น ๆ และสิ่งแวดล้อมได้อย่างง่ายดาย

2.3.3 การนำสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

การนำสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมาผลิตเป็นยาปฏิชีวนะ เพื่อใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกิดจากจุลินทรีย์ ในปัจจุบันมียาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นมากมาย เช่น เพนิซิลลิน อะมิโนไกลโคไซด์ เซฟาโลสปอริน แมคโครไลด์ เตตราไซคลีน ควิโนโลน เป็นต้น มีงานวิจัยค้นหาเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพดังนี้

จากงานวิจัยพบว่าสารอะลิฟาติกที่ชื่อว่า chaetomugilin A และ chaetomugilin D ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราถูกแยกได้จากเชื้อราเอนโดไฟท์ *C. globosum* ที่แยกได้จากแปะก๊วย และ Cytosporone B และ Cytosporone C ถูกแยกได้จากเชื้อราเอนโดไฟท์ *Phomopsis sp.* ที่แยกได้จากป่าชายเลน ราเอนดดไฟท์ทั้ง *C. globosum* และ *Phomopsis sp.* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. albicans* และ *F. oxysporum* ได้ (Wang et al. 2006).

จากงานวิจัยพบว่า *Ampelomyces sp.* ซึ่งเป็นเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร *Urospermum picroides* แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *Enterococcus* ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย altersolanol A อาจไม่ได้เกิดจากฤทธิ์ที่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่สำหรับสารประกอบนี้ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในเยื่อหุ้มแบคทีเรียและยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Haraguchi et al. 1992; Aly et al. 2008)

จากงานวิจัยพบว่าสาร Sesquiterpenes, diterpenoids และ triterpenoids เป็น terpe- noids ที่สำคัญที่แยกได้จากเอนโดไฟท์ sesquiterpenes บางชนิดได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นสารประกอบต้านจุลชีพที่ใช้จนถึงปัจจุบัน ได้แก่ Guanancastepene A (20) , guanacastepene (21), periconicin A (22) และ perieoniein B (23) เป็นยาปฏิชีวนะ diterpenoid ชนิดใหม่ที่แยกได้จากเอนโดไฟท์ (Brady et al., 2000, Brady et al., 2001; Kim et al. 2004). สาร cadinane sesquiterpenes 5 ชนิด (24-28) ที่แยกได้จาก *Phomopis cassiae* ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จาก *Cassia spectabilis* ทำการทดสอบกับ *Cladosporium sphaerospermum* และ *C. cladosporioides* ซึ่งผลที่ได้คือสาร cadinane sesquiterpenes (28) เป็นสารประกอบที่ออกฤทธิ์มากที่สุด (Silva et al. 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดลอง

2.4.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) จัดอยู่ในวงศ์ *Bacillaceae* ลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง โดยทั่วไปจะก่อตัวเป็นกลุ่มก้อนเล็ก ๆ เป็นสายโซ่สั้น ๆ หรือเป็นเซลล์เดียว โคโลนีมีสีขาวขุ่นหรือสีเหลืองอ่อน เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา มีทั้งชนิดที่ใช้และไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน (thermoduric bacteria) สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (spore forming bacteria) และสปอร์แบคทีเรีย (bacterial spore) ที่ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ดี เป็น proteolytic bacteria และมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารให้เป็นกรดอะมิโน เป็นจุลินทรีย์สาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียและทำให้อาหารที่เน่าเสียเกิดกลิ่นเหม็นได้

B. subtilis ที่พบได้ในธรรมชาติโดยอาศัยอยู่ในดิน รากของพืช สภาพแวดล้อมในน้ำ และสามารถเติบโตได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ แต่ก็ไม่ถือว่าเป็นเชื้อโรคในมนุษย์ นอกจากนี้ *B. subtilis* ยังถูกนำไปใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพอย่างแพร่หลาย เช่น การผลิตเอนไซม์ จึงได้ถือว่าเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญนอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการผลิตอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์หมัก สารเพิ่มรสชาติ สารให้ความหวาน และสารเติมแต่งอาหารสัตว์ ผงซักฟอกในครัวเรือน ยาปฏิชีวนะ และวิตามิน และในการพัฒนาวัคซีน อุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพได้ช่วยขับเคลื่อนการวิจัยอณูพันธุศาสตร์และชีววิทยาของเซลล์ไปข้างหน้า โดยใช้ *B. subtilis* เป็นผลงานที่ยิ่งใหญ่ที่สุดชิ้นหนึ่ง

2.4.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) ที่ก่อให้เกิดโรค รูปร่างกลม จัดเรียงเป็นกลุ่มที่เรียกว่า "คล้ายองุ่น" ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โคโลนีมีสีเหลืองทอง สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจน เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 18-40 องศาเซลเซียส การทดสอบทางเคมีได้แก่ แคทาเลสที่ให้ผลบวก โคอะกูเลสให้ผลบวก โนโวไบโอซินที่ไวต่อยา และการหมักแมนนิทอลในเชิงบวก

การติดเชื้อ *S. aureus* พบได้ทั่วไปทั้งในแหล่งชุมชนและในโรงพยาบาล การรักษายังคงมีความท้าทายเนื่องจากการเกิดขึ้นของเชื้อดื้อยาหลายชนิด เช่น MRSA (เชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยาเมธิซิลลิน) โดย *S. aureus* จะก่อโรคได้เมื่อผิวหนังมีบาดแผลที่ทำให้เชื้อสามารถเข้าไปสู่เนื้อเยื่อภายในหรือกระแสเลือดได้ โดยเป็นปรสิตที่ผิวหนังและเยื่อเมือกของคนและสัตว์ ทำให้เกิดลิ่มเลือดเป็นสาเหตุทำให้เกิดฝี แผลพุพองและเกิดการติดเชื้อหลังผ่าตัด ซึ่งเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (Coagulase) ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับตัวกระตุ้นในเลือด ทำให้เลือดแข็งตัวโดยการเปลี่ยนไฟบริโนเจน (Fibrinogen) ให้เป็นไฟบริน (Fibrin) และไฟบรินจะไปเคลือบตามผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น การอ้างอิงถึงเอกสารนี้ต้องมีการอ้างอิงถึงแหล่งที่มาของเอกสารนี้ด้วย

แบคทีเรียไม่ถูกทำลายด้วยเม็ดเลือดขาวเป็นกลไกการหลีกเลี่ยงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์รวมถึงการผลิตแอนติฟาโกไซติกแคปซูลและยังทำให้เส้นเลือดอุดตัน นอกจากนั้นยังสร้าง Deoxyribonuclease (DNases) ทำลายและย่อย DNA

Staphylococcus aureus สร้างสารพิษที่ชื่อว่า enterotoxin ที่อาจก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษต่อผู้ที่บริโภคเข้าไป เมื่อได้รับสารพิษจากเชื้ออาจทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องกะทันหันและอ่อนเพลีย ปวดศีรษะ เป็นตะคริว และมีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิต ส่วนใหญ่มักเกิดจากการปนเปื้อนข้ามของอาหารพร้อมรับประทานกับอาหารดิบ หรือเป็นไปได้มากว่าเป็นการปนเปื้อนจากผู้สัมผัสอาหารที่มีเชื้อ เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารปนเปื้อน ควรปฏิบัติตามหลักปฏิบัติด้านความปลอดภัยของอาหาร เช่น ฝึกการล้างมือบ่อย ๆ สวมถุงมือเมื่อจับต้องอาหาร และแยกระหว่างบริเวณที่จับต้องของดิบและของปรุงสุก

2.4.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli อยู่ในตระกูล *Enterobacteriaceae* เป็นแบคทีเรียเป็นแกรมลบ (Gram negative bacteria) รูปร่างเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ด้วย peritrichous flagella หรือไม่เคลื่อนไหว และเจริญเติบโตบน MacConkey agar โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มม. *E. coli* ที่เจริญเติบโตบนบน EMB จะมีลักษณะกลมสีเขียว มันเงา ที่เรียกว่า metallic sheen แต่ถ้าเป็นโคโลนีที่ขึ้น บนอาหาร MC จะมีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีชมพูและหากเป็นโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร NA จะมีลักษณะกลม ขอบเรียบ โปร่งแสง สามารถเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน และไม่ผลิตสารเอนเทอโรทอกซินได้ เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) ประเภท fecal coliform ซึ่งเป็นโคลิฟอร์มที่พบในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น จึงใช้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขลักษณะของอาหารและน้ำเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์สามารถสร้างโปรไบโอติกที่มีผลดีต่อสุขภาพ อย่างไรก็ตาม บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคได้ ทำให้เกิดการติดเชื้อในลำไส้และนอกลำไส้ในคนและสัตว์ โดยทำให้เกิดอาการท้องเสียเฉียบพลัน ถ่ายเป็นปริมาณมาก และถ่ายเป็นน้ำ อุจจาระอาจมีเลือดปนหรือมีเมือก มีอาการปวดบิดในลำไส้ อาจมีไข้ต่ำ ๆ มีอาการคลื่นไส้และอาเจียน ในรายที่มีอาการรุนแรงจะทำให้เกิดความผิดปกติที่ไตซึ่งอาจถึงแก่ชีวิตได้ โดยเฉพาะในเด็กและคนชรา

E. coli จึงเป็นแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ธรรมชาติหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ก็มีลักษณะเฉพาะของตัวเอง เนื่องจากคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ เช่น การกำจัดที่ง่าย ความพร้อมใช้งานของลำดับจีโนมทั้งหมด และความสามารถในการเติบโตทั้งในสภาวะที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน จึงเป็นแบคทีเรียที่ได้รับความนิยมสำหรับการวิจัยในห้องปฏิบัติการและเทคโนโลยีชีวภาพ ดังนั้น *E. coli* จึงถูกพิจารณาว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางที่สุดในด้านเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ และใช้ในอุตสาหกรรมและการแพทย์ที่หลากหลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติเช่นในดิน และน้ำ จัดเป็นเชื้อโรคฉวยโอกาส มีลักษณะเป็นรูปท่อนหรือโค้งเล็กน้อย มีแคปซูล เคลื่อนไหวได้ (polar flagella) ซึ่งมีลักษณะพิเศษคือผลิตเม็ดสีที่ละลายน้ำได้ซึ่งแพร่กระจายผ่านตัวกลาง ที่รู้จักกันดีคือ pyocyanin (สีน้ำเงินอมเขียว), pyoverdine (สีเหลืองอมเขียว, เรืองแสง) และ pyorubin (สีน้ำตาลแดง ซึ่งผลิตโดยสายพันธุ์ส่วนน้อย) มักพบอาศัยอยู่อย่างอิสระในสภาพแวดล้อมที่ชื้น เป็นพาหะนำโรคของพืช สัตว์ และมนุษย์ด้วย *P. aeruginosa* ทนทานต่อยาหลายชนิดและสามารถใช้สารอินทรีย์หลายชนิดในเลือดของสัตว์เป็นอาหาร ก่อโรคได้ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ อาการของผู้ที่ติดเชื้อชนิดนี้มีการบวม การเกิดโคโลนีในอวัยวะสำคัญของร่างกาย เช่น ปอด ท่อปัสสาวะ และ ไต อาจส่งผลอันตรายถึงชีวิตได้ แบคทีเรียชนิดนี้เจริญเติบโตได้ดีบนพื้นผิวที่เปียกแฉะ จึงสามารถพบได้บนอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น สายสำหรับสอดท่อ ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ในโรงพยาบาล และคลินิก แบคทีเรียนี้ยังสามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและถูกนำมาใช้ในการสลายทาร์บอลล์และน้ำมันจากภัยพิบัติน้ำมันรั่ว *P. aeruginosa* ไม่ได้มีความสามารถก่อโรคสูงมากนักหากเทียบกับสปีชีส์แบคทีเรียก่อโรคอื่น ๆ อย่าง *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus pyogenes* ดังนั้น *P. aeruginosa* ก็สามารถเกิดโคโลนีขนาดใหญ่ และสามารถรวมกันเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างพืชกระท่อม

ทำการเก็บตัวอย่างราก ใบ และก้านที่มีลักษณะสมบูรณ์ไม่เป็นโรคจากต้นพืชกระท่อมจากแหล่งที่มาที่ต่างกัน 7 แหล่ง โดยรายละเอียดแสดงในตารางที่ 3.1 โดยเป็นต้นกระท่อมที่ปลูกเองเพื่อใช้ในการบริโภคและใช้เป็นยา ในการคัดเลือกจะใช้พืชกระท่อมที่มีอายุประมาณ 2 ปี ความสูงประมาณ 2-4 เมตร ตัวอย่างที่ทำการเก็บมาจากตำบลบางโรง อำเภอคลองเขื่อน จังหวัดฉะเชิงเทรา เก็บในเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน 2565 โดยทำการเก็บตัวอย่างลงในถุงพลาสติกที่สะอาดมิดชิด ทำการติดฉลากระบุรายละเอียดและทำบรรจุลงในกล่องที่มีอุณหภูมิเย็นก่อนนำมาคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่ห้องปฏิบัติการภายใน 48 ชั่วโมง

ลักษณะโดยรวมของตัวอย่างพืชกระท่อมที่นำมาศึกษา แสดงในรูปที่ 3.1 โดยเลือกลำต้นที่เป็นต้นโตเต็มที่ และมีลักษณะสูงโปร่ง ความสูงประมาณ 2-4 เมตร ใบมีขนาดความยาวประมาณ 10-12 เซนติเมตร มีสีเขียวสด ไม่มีจุดดำ จุดขาว หรืออาการของโรค ไม่มีรอยฉีกขาดจากศัตรูพืช ก้านมีลักษณะสมบูรณ์ มีสีเขียวแก่และสีน้ำตาลอ่อน ก้านไม่อ่อนและไม่แก่เกินไป ไม่มีอาการของโรคพืชใด ๆ ปรากฏ และส่วนราก เลือกรากที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีร่องรอยจากการถูกกัดแทะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างพืชกระท่อมเพื่อนำมาแยกราเอนโดไฟท์

ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	พิกัด GPS	วันที่เก็บ
แหล่งที่ 1	หมู่ที่ 6 ตำบลบางโรง อำเภอคลองเขื่อน	13°49’55.3”N 101°08’14.1”E	10 ตุลาคม 2565
แหล่งที่ 2	หมู่ที่ 6 ตำบลบางโรง อำเภอคลองเขื่อน	13°49’50.4”N 101°08’18.3”E	10 ตุลาคม 2565
แหล่งที่ 3	หมู่ที่ 7 ตำบลบางโรง อำเภอคลองเขื่อน	13°49’48.5”N 101°07’48.1”E	27 ตุลาคม 2565
แหล่งที่ 4	หมู่ที่ 4 ตำบลบางโรง อำเภอคลองเขื่อน	13°49’08.3”N 101°08’17.4”E	27 ตุลาคม 2565
แหล่งที่ 5	หมู่ที่ 1 ตำบลบางโรง อำเภอคลองเขื่อน	13°49’51.0”N 101°09’31.5”E	27 ตุลาคม 2565
แหล่งที่ 6	หมู่ที่ 6 ตำบลบางโรง อำเภอคลองเขื่อน	13°49’52.6”N 101°08’27.6”E	24 พฤศจิกายน 2565
แหล่งที่ 7	หมู่ที่ 5 ตำบลบางโรง อำเภอคลองเขื่อน	13°50’52.0”N 101°08’47.6”E	24 พฤศจิกายน 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) ลำต้น (ข) กิ่ง

(ค) ราก (ง) ใบ

รูปที่ 3.1 ลักษณะโดยรวมของต้นกระท่อมที่นำมาศึกษาในการวิจัยครั้งนี้

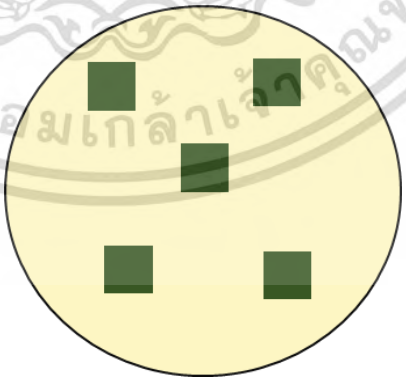
(ที่มา: ไทยรัฐออนไลน์, 2564)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การคัดแยกราเอนโดไฟท์จากพืชกระท่อม

ทำการล้างพื้นผิวของตัวอย่างพืชกระท่อมด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดคราบสกปรก ต่าง ๆ ที่อาจติดอยู่บริเวณพื้นผิวของตัวอย่าง ทิ้งเอาไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการตัดตัวอย่างด้วยกรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยให้มีขนาดต่าง ๆ คือ ส่วนใบขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร ส่วนรากและก้านความยาว 1 เซนติเมตร จำนวนอย่างละ 10 ชิ้น ทำการฆ่าเชื้อบนผิวของตัวอย่าง (surface sterilization) ตามวิธีของ สินทวี (2547). โดยนำตัวอย่างชิ้นพืชทั้งหมดใส่ในที่กรองชาสแตนเลสปลอดเชื้อแล้วทำการแช่ในสาร 95% เอทานอลเป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 5% โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ (NaClO) เป็นเวลา 5 นาที ทำการแช่ด้วย 95% เอทานอลอีกครั้งเป็นเวลา 30 วินาทีและทำการล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 นาทีอีก 2 ครั้ง ซับของเหลวบนผิวหน้าตัวอย่างให้หมาดด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

นำตัวอย่างจำนวน 5 ชิ้นวางลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ดังแสดงในรูปที่ 3.2) ที่มีการเติม Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำจานตัวอย่างไปบ่มที่ 27 °C เป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเจริญของราเอนโดไฟท์จากชิ้นตัวอย่างพืช โดยตรวจผลทุกวัน เมื่อพบการเจริญของราเอนโดไฟท์ จึงทำการถ่ายเชื้อด้วยวิธี hyphal tip method โดยเขี่ยเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีแล้วนำไปวางบนอาหาร PDA จานใหม่ที่ไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะ จนได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยทำการแยกเชื้อนาน 7 วัน โดยนับตั้งแต่วันแรกที่ราเอนโดไฟท์งอกมาจากตัวอย่างพืช ทำการเก็บรักษาราเอนโดไฟท์ได้บนอาหาร PDA slant แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อรอนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 3.2 ลักษณะการวางตัวอย่างบนอาหาร PDA เพื่อทำการคัดแยกราเอนโดไฟท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์

3.3.1 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว

เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นใช้ใบมีดจุ่ม 95% แอลกอฮอล์นำไปผ่านไฟ แล้วทำการตัดเส้นใยของราเอนโดไฟท์โดยทำการตัดบริเวณของขอบโคโลนีเชื้อราเป็นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5×0.5 ตารางเซนติเมตร หลังจากนั้นใช้มีดผ่าตัดถ่ายราเอนโดไฟท์จำนวน 4 ชิ้นลงในขวดอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion

ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียในการทดสอบลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) ด้วยวิธี Cross streak นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาทำการทดสอบ โดยใช้แบคทีเรียแกรมบวกในการทดสอบ 2 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดคือ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหารเหลวNutrient broth (NB) ปริมาตร 10 มล. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง โดยไม่ต้องเขย่า

หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้นด้วยสารละลายน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ($1.5x10^8$ CFU/มล.) โดยในการทดสอบจะทำการดัดแปลงบางส่วนมาจากงานวิจัยของ อรอนงค์ และคณะ (2562) โดยทำการใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ (Cotton swab) ชุบเชื้อทดสอบ บิดให้หมาด แล้วทำการ swab ลงทั่วบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ทิ้งไว้นาน 15 นาที เพื่อให้หน้าอาหารแห้ง ทำการเจาะหลุมวุ้นด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรจำนวนจานละ 7 หลุม เติมน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟท์ลงในหลุมปริมาตรหลุมละ 80 ไมโครลิตร โดยใช้ Kanamycin ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้อาหารเหลว PDB เป็นตัวควบคุมเชิงลบ นำจานอาหาร MHA ไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการวัดโซนใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้นด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier Calipers) ทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ (3 จานอาหาร MHA) ทำการบันทึกรูปและหาค่าเฉลี่ยโซนใสที่เกิดขึ้นในแต่ละไอโซเลทของราเอนโดไฟท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อรา

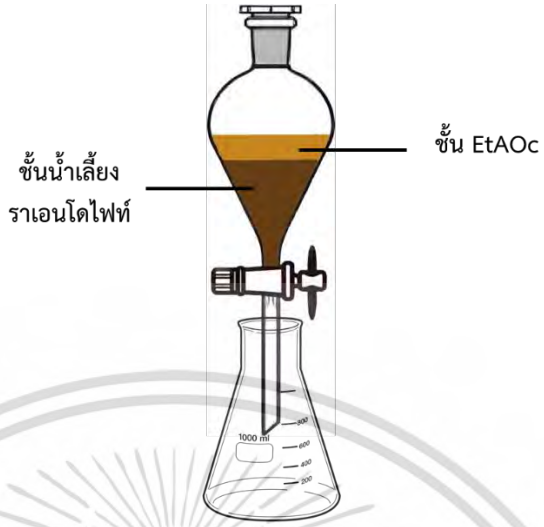
3.4.1 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว

ทำการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลบวกในข้อ 3.3.2 ลงในบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นใช้ใบมีดจุ่ม 95% แอลกอฮอล์นำไปผ่านไฟ แล้วทำการตัดเส้นใยของราเอนโดไฟท์บริเวณของขอบโคโลนีเชื้อราเป็นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5×0.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น ถ่ายเชื้อลงในขวดอาหารเหลว PDB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร/ขวด (จำนวนทั้งหมด 8 ขวด/ตัวอย่างรวมทั้งหมด 2 ลิตร) ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยไม่มีการเขย่า

3.4.2 การสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ (ดัดแปลงจาก: ณัฐวุฒิ, 2549)

เมื่อครบเวลาเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ทำการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อราโดยทำการกรองเพื่อแยกส่วนเส้นใยด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปสกัดด้วยตัวละลายทางเคมีโดยใช้ Ethyl Acetate (EtAOc, AG grade) ในอัตราส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อราต่อตัวทำละลายที่ 2:1 (V/V) ในกรวยแยก (Separator funnel) ทำการเขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาทีจนเกิดการแยกชั้น (ดังรูปที่ 3.3) โดยน้ำเลี้ยงเชื้อราจะอยู่ด้านล่างและส่วนของ EtAOc จะลอยแยกชั้นอยู่บริเวณด้านบน ไขส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อออกมาแล้วทำการเก็บส่วนของชั้น EtAOc ไว้ใน flask อีกใบ จากนั้นทำการนำน้ำเลี้ยงเชื้อรามาทำการสกัดซ้ำอีกรอบด้วยตัวทำละลายและอัตราส่วนเดิม นำส่วนของ EtAOc ที่ได้จากการสกัดทั้งสองรอบรวมลงในขวดรูปลูกแพร์ (Evaporating flask) และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 °C หลังจากสารแห้งทำการเก็บสารลงในหลอด Eppendorf ที่สะอาด ทำการเก็บสารไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) จนสารแห้งสนิท จะได้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์แล้วจึงนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธีการ Disk diffusion method ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

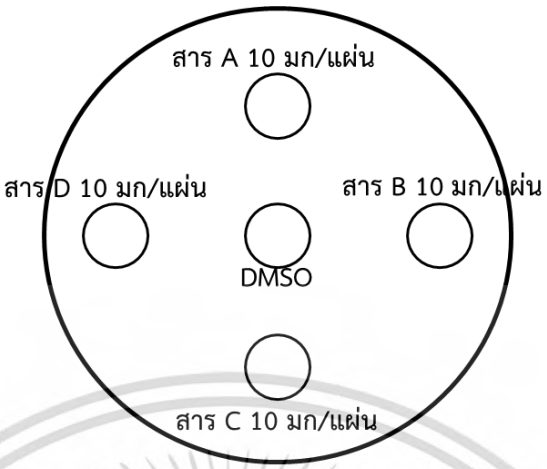


รูปที่ 3.3 ลักษณะการแยกชั้นของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์และ EtAOc ในกรวยแยก

3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Disk diffusion method (ดัดแปลงจาก: ณัฐวุฒิ, 2549)

ทำการเตรียมสารสกัดหยาบเพื่อใช้ในการทดสอบโดยการนำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 3.4.2 ละลายกับ DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 1 กรัม/มิลลิลิตร (ก./มล.) เก็บไว้เพื่อเป็น stock solution เก็บรักษาที่ -20 °C เตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ชนิดเช่นเดียวกับการทดสอบในข้อ 3.3.2 หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้นด้วยสารละลายน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ทำการ swab เชื้อแบคทีเรียลงบนบริเวณผิวหน้าอาหาร MHA ทิ้งไว้ 15 นาทีเพื่อให้ผิวหน้าอาหารหมาด จากนั้นใช้ forceps ปลอดเชื้อนำแผ่น sterile blank disk ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรวางบนผิวหน้าอาหารและกดแผ่น disk ให้แนบสนิทกับผิวหน้าอาหาร แล้วทำการหยดสารสกัด 1 กรัม/มิลลิลิตรปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนแผ่น disk ทดสอบทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัด 10 มิลลิกรัม/แผ่น (มก./แผ่น) โดยใช้ DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (รูปที่ 3.4) นำจานอาหาร MHA ไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการวัดโซนใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้นด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier Calipers) ทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.4 ลักษณะและตำแหน่งการวางแผ่นดิสก์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบด้วยวิธี disk diffusion method

3.5 การจำแนกชนิดราเอนโดไฟท์

3.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด มาจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA นำไปบ่มที่ 27 °C นาน 7 วัน บันทึกข้อมูลของลักษณะโคโลนีและถ่ายรูป จากนั้นนำราเอนโดไฟท์มาทำการเพาะเลี้ยงต่อด้วยวิธี Slide culture โดยการใช้ใบมีดผ่าตัดตัดชิ้นวุ้นอาหาร PDA ให้มีขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตรด้วยวิธีปลอดเชื้อ แล้วนำไปวางบนกระจกสไลด์ที่วางอยู่บนแท่งแก้วงอในจานเพาะเชื้อ จากนั้นทำการใช้ Hook เขี่ยบริเวณขอบโคโลนีแล้วนำมาวางที่ชิ้นวุ้นที่ขอบทั้ง 4 ด้าน จากนั้นทำการใช้ Forceps คีบกระจกปิดสไลด์วางทาบบนชิ้น PDA เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในกระดาษทิชชู่และทำการปิดจานเพาะเลี้ยงด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (Parafilm) ทำการบ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 27 °C เป็นเวลา 14 วัน โดยสังเกตการเจริญของเชื้อราทุกวัน เมื่อครบ 14 วัน ทำการนำตัวอย่างไปทำการย้อมสีด้วย Lactophenol เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของสปอร์และเส้นใยของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) และถ่ายภาพบันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การเก็บตัวอย่างพืชกระท่อม

จากทำการเก็บตัวอย่างพืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) ทั้งหมด 7 แหล่งในพื้นที่ตำบลบางโรง อำเภอคลองเขื่อน จังหวัดฉะเชิงเทรา ข้อมูลแสดงในตารางที่ 4.1 โดยทำการบันทึกข้อมูลวันที่เก็บและพิกัดตำแหน่ง GPS ในแต่ละแหล่งที่เก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างพืช 3 ส่วนเพื่อใช้ในการศึกษาได้แก่ ใบ กิ่ง และราก โดยกำหนดรหัสเป็น L, S และ R ตามลำดับ ในการเก็บตัวอย่างอย่างจะทำการเก็บตัวอย่างพืชที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่เป็นโรค และไม่พบร่องรอยจากการถูกกัดแทะจากศัตรูพืช ทำการเก็บพืชและคัดแยกราเอนโดไฟท์ในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2565

4.2 การคัดแยกราเอนโดไฟท์จากพืชกระท่อม

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถทำการคัดแยกราเอนโดไฟท์ได้รวม 347 ไอโซเลท จากทั้งหมด 7 แหล่ง เมื่อพิจารณาถึงแหล่งที่เก็บตัวอย่าง พบว่าในสามารถแยกราเอนโดไฟท์จากได้ต่ำที่สุด และสูงที่สุดเท่ากับ 25 และ 64 ไอโซเลท จากแหล่งที่ 1 และ แหล่งที่ 6 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาถึงชิ้นส่วนของตัวอย่างพืชที่นำมาแยกราเอนโดไฟท์ พบว่าสามารถแยกราเอนโดไฟท์จากกิ่งและรากจำนวน 95 และ 82 ไอโซเลทตามลำดับ และพบว่าสามารถแยกราเอนโดไฟท์จากชิ้นส่วนของใบได้มากที่สุด สูงถึง 170 ไอโซเลท

แต่อย่างไรก็ตาม ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมด 347 ไอโซเลท พบว่าราเอนโดไฟท์บางส่วนมีลักษณะของโคโลนีคล้ายคลึงกัน จึงได้ทำการจัดแบ่งกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น (morphotype grouping) แล้วทำคัดเลือกแบบสุ่มจากแต่ละลักษณะโคโลนีประมาณ 1-3 ไอโซเลท จากแต่ละลักษณะ ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกราเอนโดไฟท์จากใบ กิ่ง และ ราก จำนวน 51, 21 และ 20 ไอโซเลท ตามลำดับ (รูปที่ 4.3) เพื่อนำราเอนไฟท์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในลำดับถัดไป เมื่อพิจารณาถึงสัดส่วนของจำนวนไอโซเลทที่นำไปศึกษาต่อ (รูปที่ 4.2) พบว่ามีสัดส่วนจากใบมากที่สุด เท่ากับร้อยละ 49 ในขณะที่กิ่งและรากเท่ากับร้อยละ 27 และ 24 ตามลำดับ ทำการคัดเลือกราเอนโดไฟท์จากใบไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเป็นร้อยละสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากราเอนโดไฟท์จากใบ จำนวนไอโซเลทมากที่สุด และมีความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยามากที่สุด

งานวิจัยของ สุชาดา และ โสภณ (2565) ได้ศึกษาราเอนโดไฟท์จากส่วนต่าง ๆ ของพืชสมุนไพรจำนวน 9 ชนิดจากจังหวัดศรีสะเกษ ได้แก่ กะตังใบ, กำลังถึกควาย ผักปลัง กระโดน ลูกใต้ใบ สาบเสือ ชะมวง สะเดา และเครือหมาน้อย ได้ทำการแยกราเอนโดไฟท์จากการคัดแยกราเอนโดไฟท์จากใบ ราก และลำต้น จำนวน 405 ชิ้นของตัวอย่าง พบว่าสามารถทำการคัดแยกราเอนโดไฟท์จากส่วนของใบพืชได้จำนวน 97 ไอโซเลท ส่วนลำต้นจำนวน 24 ไอโซเลทและจากรากได้จำนวน 39 ไอโซเลท งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของวรีรัตน์ และคณะ (2562) ที่แยกราเอนโดไฟท์จากกล้วยไม้ป่า 8 ชนิด พบว่า สามารถคัดแยกราเอนโดไฟท์ได้จากส่วนของใบพืชได้สูงที่สุดที่จำนวน 52 ไอโซเลท จากลำต้นจำนวน 33 ไอโซเลทและจากรากที่ 20 ไอโซเลท จากจำนวนราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ 105 ไอโซเลท สอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งพบว่าราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ที่แยกได้มาจากส่วนใบมากที่สุด และส่วนรากพบน้อยที่สุด อาจเนื่องมาจากว่าในใบพืชมีหน้าที่หลักในการสังเคราะห์แสง ทำให้ใบพืชมีน้ำและสารอาหารมากกว่าส่วนรากและส่วนอื่น ๆ ของพืช จึงอาจส่งผลให้มีเชื้อราอาศัยอยู่มากกว่าส่วนอื่น ๆ ของพืช

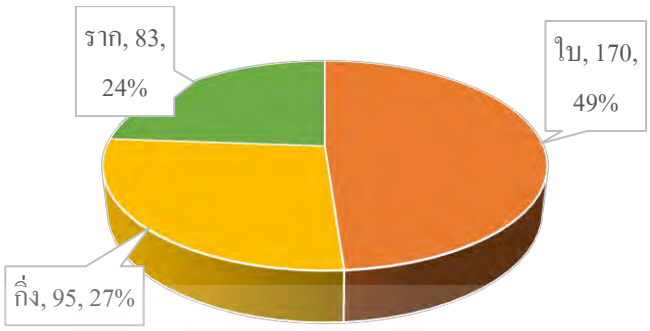
เมื่อพิจารณาถึงร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่มาทดสอบ (รูปที่ 4.2) แหล่งที่ 1 มีสัดส่วนน้อยที่สุดคือ ร้อยละ 7 ของเชื้อทั้งหมดที่แยกได้ เนื่องจากในแหล่งนี้พบราเอนโดไฟท์จำนวนไม่มากนัก ส่วนแหล่งที่ 2-7 มีสัดส่วนใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงร้อยละ 11-19 โดยรวมพบว่าสามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้จากต้นกระท่อมทั้ง 7 แหล่ง แต่อย่างไรก็ตามสามารถพบราเอนโดไฟท์ได้ในทุกตัวอย่างของพืชกระท่อมที่นำมาศึกษา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าต้นกระท่อมเป็นเป็นแหล่งที่ดี ซึ่งสามารถพบราเอนโดไฟท์ที่มีความหลากหลาย และมีศักยภาพในการนำไปศึกษาด้านฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

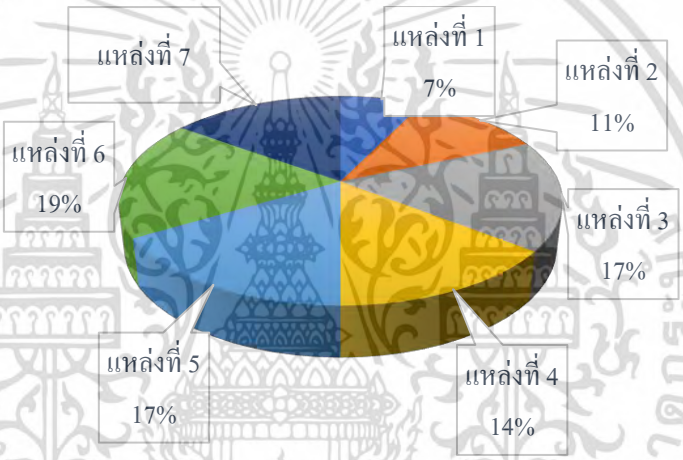
ตารางที่ 4.1 จำนวนราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชกระท่อมจากแหล่งพื้นที่ต่าง ๆ

แหล่งพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างพืชกระท่อม	พิกัด GPS	วันที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนราเอนโดไฟท์ทั้งหมดที่แยกได้ / จำนวนที่คัดเลือก			รวม
			ใบ (L)	กิ่ง (S)	ราก (R)	
แหล่งที่ 1: หมู่ที่ 6 ตำบลบางโรง	13°49’55.3” N 101°08’14.1” E	10 ตุลาคม 2565	11 / 4	7 / 3	7 / 1	25 / 8
แหล่งที่ 2: หมู่ที่ 6 ตำบลบางโรง	13°49’50.4” N 101°08’18.3” E	10 ตุลาคม 2565	18 / 4	10 / 5	11 / 2	39 / 11
แหล่งที่ 3: หมู่ที่ 7 ตำบลบางโรง	13°49’48.5”N 101°07’48.1” E	24 ตุลาคม 2565	30 / 8	14 / 1	15 / 1	59 / 10
แหล่งที่ 4: หมู่ที่ 4 ตำบลบางโรง	13°49’08.3” N 101°08’17.4” E	24 ตุลาคม 2565	26 / 10	14 / 2	10 / 3	50 / 15
แหล่งที่ 5: หมู่ที่ 1 ตำบลบางโรง	13°49’51.0” N 101°09’31.5” E	24 ตุลาคม 2565	32 / 14	14 / 2	12 / 1	58 / 18
แหล่งที่ 6: หมู่ที่ 6 ตำบลบางโรง	13°49’52.6” N 101°08’27.6” E	27 พฤศจิกายน 2565	23 / 5	22 / 1	19 / 7	64 / 14
แหล่งที่ 7: หมู่ที่ 5 ตำบลบางโรง	13°50’52.0” N 101°08’47.6” E	27 พฤศจิกายน 2565	30 / 6	14 / 7	8 / 5	52 / 18
รวม (ร้อยละ)			170 / 51 (49.00)	95 / 21 (27.37)	82 / 20 (23.63)	347 / 92 (100)

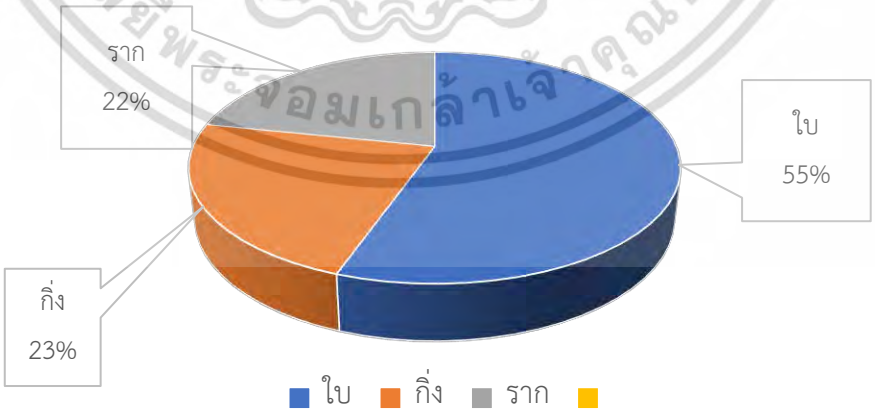
หมายเหตุ L = ตัวอย่างจากใบ ,S = ตัวอย่างที่มาจากกิ่ง R = ตัวอย่างที่มาจากราก



รูปที่ 4.1 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืชกระท่อม



รูปที่ 4.2 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ



รูปที่ 4.3 ร้อยละราเอนโดไฟท์จากส่วนต่าง ๆ ที่นำไปศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธีการ Agar well diffusion

จากการคัดเลือกราเอนโดไฟท์จำนวนทั้งหมด 347 ไอโซเลท โดยทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีลักษณะแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาและนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของราเอนโดไฟท์จำนวน 92 ไอโซเลท และทดสอบกับแบคทีเรียจำนวน 4 ชนิด ทำการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหาร PDB เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และนำน้ำเลี้ยงเชื้อรา (culture broth) มาทำการทดสอบด้วยวิธีการ Agar well diffusion บนอาหาร Muller Hinton Agar (MHA) ดังในรูปที่ 4.3 ถึง 4.6 พบว่ามีราเอนโดไฟท์ที่สามารถในการผลิตสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียอย่างน้อย 1 ชนิด จำนวนทั้งหมด 11 ไอโซเลท ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 12 โดยทำการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ด้วยเวอร์เนียคาร์ลิบเปอร์ โดยแสดงรายละเอียดค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ของราเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งได้ในตารางที่ 4.2 และรายละเอียดผลทดสอบของราเอนโดไฟท์ทั้งหมดจะแสดงในตารางที่ 1ค. ในภาคผนวกเมื่อพิจารณาราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียจากส่วนต่าง ๆ ของพืช จากจำนวน 11 ไอโซเลท พบว่าเป็นราเอนโดไฟท์จากส่วนใบจำนวน 5 ไอโซเลท ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 46 จากราเอนโดไฟท์จากกิ่งและจากรากมีจำนวนเท่ากันอยู่ที่ละ 3 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 27 แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์จากใบมีแนวโน้มจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่าราเอนโดไฟท์จากส่วนอื่น ๆ ของพืช

เมื่อพิจารณาถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่ามีราเอนโดไฟท์จำนวน 8 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone อยู่ในช่วงระหว่าง 8.78-18.42 มม. โดยราเอนโดไฟท์ที่ยับยั้งได้ดีที่สุดได้แก่ ไอโซเลท R5-09 (รูปที่ 4.3) สำหรับราเอนโดไฟท์ที่ยับยั้ง *S. aureus* พบว่ามีราเอนโดไฟท์จำนวน 4 ไอโซเลท ที่ยับยั้งได้ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone อยู่ในช่วงระหว่าง 11.13-14.13 มม. และไอโซเลทที่ยับยั้งได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท S5-10 (รูปที่ 4.4)

สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* พบว่ามีราเอนโดไฟท์จำนวน 3 ไอโซเลท โดยที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์ inhibition zone อยู่ในช่วงระหว่าง 7.53-8.63 มม. และไอโซเลท L1-04 สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ดีที่สุด (รูปที่ 4.5) แต่พบว่ามีราเอนโดไฟท์เพียง 1 ไอโซเลทเท่านั้น (S1-01) ที่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 6.74 มม.(รูปที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาถึงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก (*S. aureus* และ *B. subtilis*) และแกรมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*) พบว่าราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งได้จำนวน 8 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าราเอนโดไฟท์ที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ และในทางตรงกันข้ามราเอนโดไฟท์ที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ ก็ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้เลย

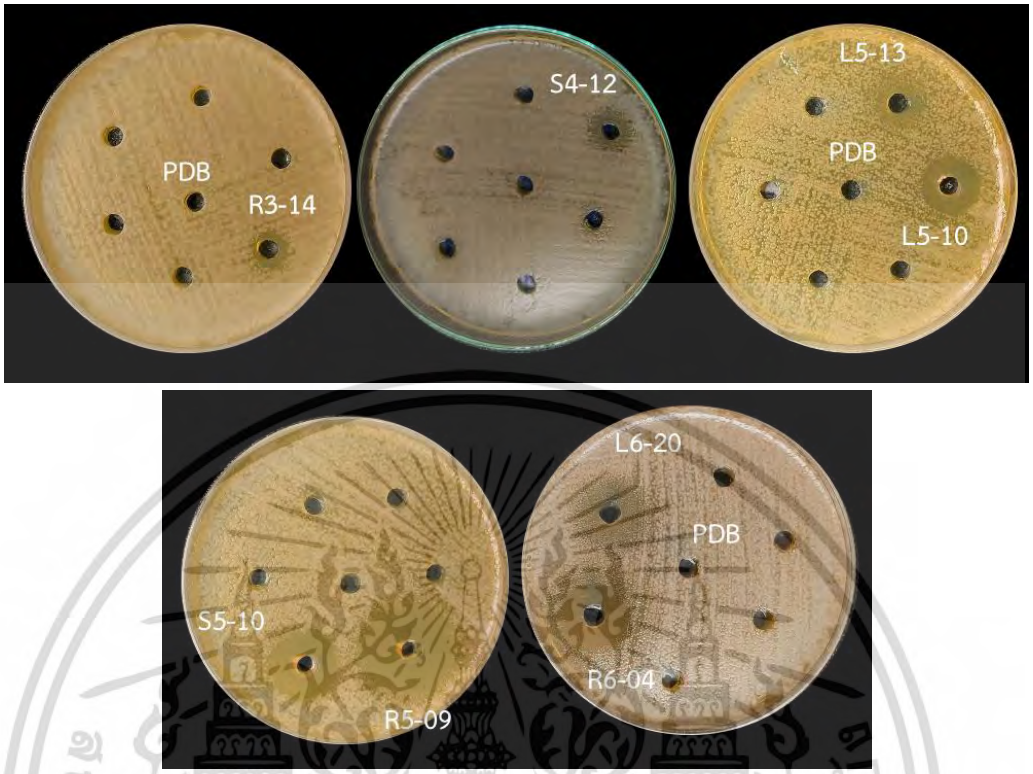
ผลการศึกษาครั้งนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของอามีนา (2561) ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากสาหร่ายทะเล ผลการวิจัยพบว่าราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยทั่วไปสามารถแบ่งแบคทีเรียตามองค์ประกอบของผนังเซลล์ได้เป็น 2 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก (gram positive bacteria) และแบคทีเรีย แกรมลบ (gram negative bacteria) โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะประกอบด้วยชั้น peptidoglycan ซ้อนทับกันหลายชั้น แต่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อนกว่าคือประกอบด้วยชั้นของ peptidoglycan ที่บางกว่าของแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ยังมีชั้นของ lipopolysaccharide (LPS) เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งโครงสร้างและลักษณะของผนังเซลล์แบคทีเรียที่แตกต่างกันมีผลต่อการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะและการดื้อยา (อารยา, 2562) ซึ่ง Lipopolysaccharide มีคุณสมบัติ Permeability barrier คือ เป็นโครงสร้างที่ป้องกันการซึมผ่านได้โดยง่ายจากสารภายนอกต่าง ๆ (Romano and Hung, 2023) และมีกลไกในการขับยาออกจากเซลล์หรือ Drug efflux pump (Xu., et al, 2012) จึงทำให้แบคทีเรียแกรมลบมีแนวโน้มที่จะมีความทนทานต่อการยับยั้งได้มากกว่าแบคทีเรีแกรมบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิดของน้ำเลี้ยงจากเชื้อราเอนโดไฟท์ในอาหาร PDB ที่การเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ด้วยวิธีการทดสอบ Agar well diffusion

รหัสไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มม.±SD)			
	B. subtilis	*S. aureus*	*E. coli*	*P. aeruginosa*
L1-01	-	-	7.53$^{\#}$±0.00	-
L1-04	-	-	8.63$^{\#}$±0.00	-
S1-01	-	-	7.56$^{\#}$±0.00	6.74±0.09
R3-14	8.78$^{\#}$±0.98	-	-	-
S4-12	12.53$^{*\#}$±0.00	-	-	-
L5-10	14.99±0.75	11.13±0.41	-	-
L5-13	11.07*±0.82	-		
S5-10	16.87±0.12	17.13±0.19	-	-
R5-09	18.42±0.45	15.63±0.29	-	-
L6-20	16.60*±0.82	-	-	-
R6-04	17.06±0.12	15.12±0.76	-	-
Control (PDB)	0.00	0.00	0.00	0.00

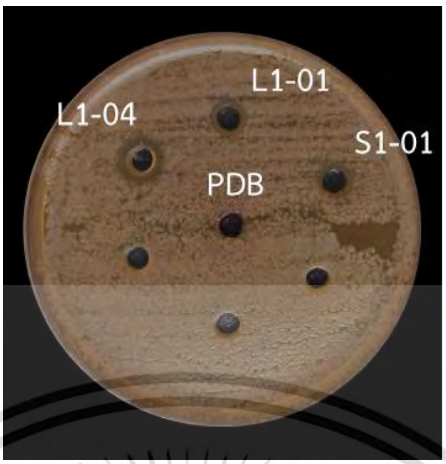
หมายเหตุ: * คือราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการยับยั้งบางส่วน, # คือ ไอโซเลทที่มีการเฉลี่ยไม่ครบ 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.4 ฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* จากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Agar well diffusion ในไอโซเลทต่าง ๆ; R3-14 (8.78 มม..), S4-12 (12.53 มม.), L5-10 (14.99 มม.), S5-10 (16.87 มม.), R5-09 (18.42 มม.), L6-20 (16.60 มม.) และ R6-04 (17.02 มม.)

รูปที่ 4.5 ฤทธิ์ต้าน *S. aureus* จากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Agar well diffusion ในไอโซเลทต่าง ๆ ; L5-10 (11.13 มม.), S5-10 (17.13 มม.), R5-09 (15.63 มม.) และ R6-04 (15.12 มม.)

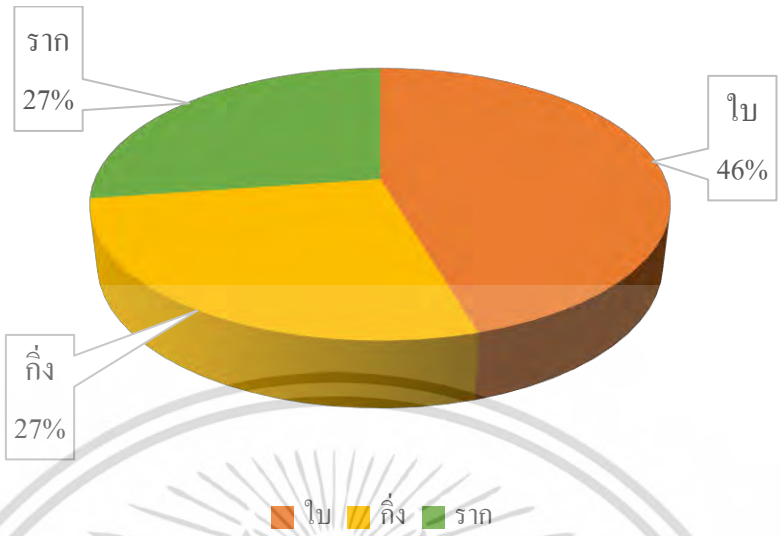
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ฤทธิ์ต้าน *E. coli* จากน้ำเลี้ยงราเอนไฟท์ด้วยวิธี Agar well diffusion ในไอโซ-เลทต่าง ๆ ; L1-01 (7.53 มม.), L1-04 (8.63 มม.) และ S1-01 (7.56 มม.)

รูปที่ 4.7 ฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* จากน้ำเลี้ยงราเอนไฟท์ด้วยวิธี Agar well diffusion ในไอโซเลท S1-01 (6.74 มม.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบชนิดใดชนิดหนึ่งที่มีจากส่วนต่าง ๆ ของพืช

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดน้ำเลี้ยงจากราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Disk diffusion

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์จำนวน 5 ไอโซเลทได้แก่ L1-01, R3-14, L5-10, R5-09 และ R6-04 โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB ปริมาตร 2 ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นนำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อราไปทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท (Ethyl acetate, EtAOc) พบว่าสารสกัดของราเอนโดไฟท์รหัส L1-01, R3-14 และ L5-10 มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้ม เกิดเป็นผลึกแข็ง มีน้ำหนัก 0.45, 1.25 และ 2.14 กรัม ตามลำดับ และสารสกัดราเอนโดไฟท์ R5-09 และ R6-04 มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลแดง ข้นหนืด มีน้ำหนัก 1.98 และ 1.26 กรัม ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดไปละลายด้วยสาร DMSO และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disk diffusion ที่ความเข้มข้น 1 มก./แผ่นดิสก์ โดยมีสารละลาย DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบ ดังแสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.8-4.10 (โดยรายละเอียดเพิ่มเติมจะแสดงในภาคผนวกดังรูปที่ 10ค.-14ค. และตารางที่ 2ค.)

การทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1 มก./แผ่นดิสก์ (ตารางที่ 4.3, รูปที่ 4.8-4.10) พบว่าตัวควบคุมเชิงลบ (DMSO) ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อทุกชนิด ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ของสารสกัด 4 ชนิด (รูปที่ 4.8 พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์รหัส R5-09 มีการยับยั้งได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ 21.3 มม. และสารอีก 3 ชนิด (R3-14, L5-10 และ R6-04) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 8.14-13.85 มม. ตามลำดับ การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* จากสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สกัด 3 ชนิด พบว่าสารสกัดจากไอโซเลท L5-10 สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด ที่ขนาด 17.51 มม. ตามด้วยสารสกัดจากไอโซเลท R5-09 และ R6-04 ที่ขนาด 14.1 และ 8.23 มม. ตามลำดับ (รูปที่ 4.12) และการทดสอบเพื่อยับยั้ง *E. coli* สารสกัดจากไอโซเลท L1-01 มีขนาดอยู่ที่ 8.28 มม. ดังแสดงที่รูปที่ 4.10

โดยในรายงานการวิจัยของ พฤทฐิภร (2564) ได้ศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์และการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดราเอนโดไฟท์จากบัวเผื่อน โดยมีการสกัดสารด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ และมีการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยเอทิล อะซิเตท (Broth Ethyl acetate: BE) เช่นเดียวกับงานวิจัยครั้งนี้ พบว่า คณะนักวิจัยพบว่าสารสกัดที่ได้ให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และยีสต์ได้ทั้งหมด และให้ค่า MIC และ MBC/MFC ที่ 500 และ 250 ไมโครกรัม/มล. นอกจากนี้ ในงานวิจัยของ กมลวรรณ และคณะ (2557) ได้มีการนำสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตทไปทำการทดสอบการยั้งเชื้อราก่อโรคในพืชได้เช่นเดียวกัน ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ที่พบว่าสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเอนโดไฟท์โดยเอทิล อะซิเตทมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดี แสดงให้เห็นว่าเอทิล อะซิเตทเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการนำมาเพื่อใช้สกัดสาหารออฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสกัดหาสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

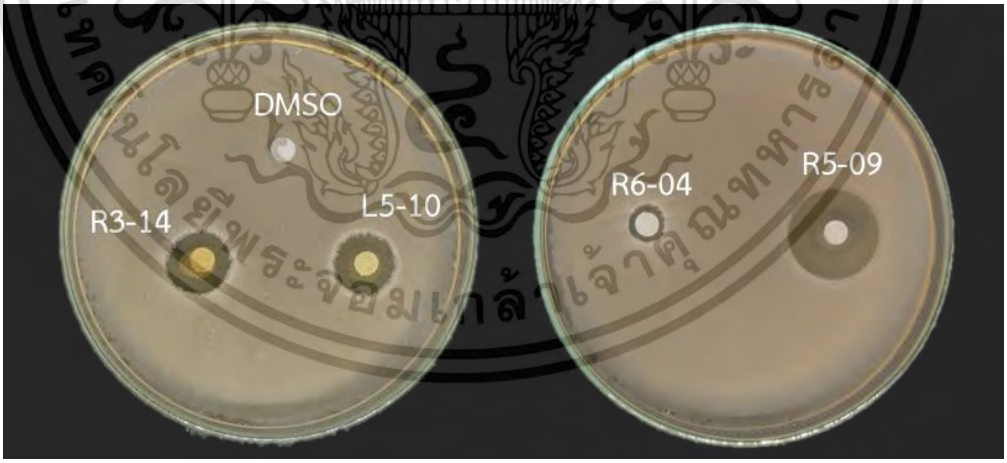
ผลการทดสอบจากวิธี Disk diffusion สารสกัดส่วนใหญ่มีผลการยับยั้งผลสอดคล้องกับการทดสอบในขั้นตอน Agar well diffusion โดยสารสกัดที่ได้ ยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียเช่นเดิม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอทิล อะซิเตทเป็นตัวลำลายที่ดี ที่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ออกมาได้เป็นจำนวน จึงทำให้ได้ผลการยับยั้งที่มีความสม่ำเสมอ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์รหัส R6-04 มีฤทธิ์การยับยั้งที่ลดลง อาจเป็นผลมาจากชนิดและความเหมาะสมของตัวทำละลายที่เลือกใช้ในการสกัด สารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ อาจไม่ได้ถูกสกัดออกมา เมื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท เพราะฉะนั้นหากต้องการสกัดสารออกฤทธิ์ของราเอนโดไฟท์ R6-04 ควรเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ เช่น เอทานอล หรือ เฮกเซน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตต และทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion ที่ความเข้มข้น 1 มก./แผ่นดิสก์

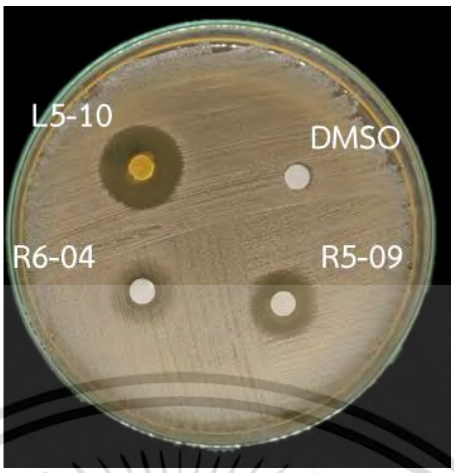
สารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Inhibition zone (มม. ± SD)			
	B. subtilis	*S. aureus*	*E. coli*	*P. aeruginosa*
L1-01	ND	ND	8.28 ± 0.15	ND
R3-14	13.5 ± 0.55	ND	ND	ND
L5-10	13.85±0.25	17.51±0.75	ND	ND
R5-09	21.3±0.91	14.1±0.10	ND	ND
R6-04	8.14±0.74	8.23±0.91	ND	ND
DMSO	0.00	0.00	0.00	ND

หมายเหตุ: ND คือ Not Determined (ไม่ได้ทำการตรวจสอบ)



รูปที่ 4.9 ฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* จากสารสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Disk diffusion ที่ความเข้มข้น 1 มก./แผ่นดิสก์; R3-14 (13.5 ± 0.55 มม.), L5-10 (13.85±0.25 มม.), R5-09 (21.3±0.91 มม.) และ R6-04 (8.14±0.74 มม.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ฤทธิ์ต้าน *S. aureus* จากสารสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Disk diffusion ที่ ความเข้มข้น 1 มก./แผ่นดิสก์; L5-10 (7.07±0.19 มม.), R5-09 (6.81±0.16 มม.) และ R6-04 (6.47±0.08 มม.)

รูปที่ 4.11 ฤทธิ์ต้าน *E. coli* จากสารสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Disk diffusion ที่ความเข้มข้น 1 มก./แผ่นดิสก์; CL1-01 (7.79 ± 0.35 มม.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การจำแนกชนิดราเอนโดไฟท์

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ของราเอนโดไฟท์ในรหัส L5-10, R5-09 และ R6-04 โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 7 วันทำการบันทึกภาพลักษณะโคโลนีบนจานอาหาร และนำราเอนโดไฟท์ไอโซเลทดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงในชุด Slide culture เป็นเวลา 7-14 วันที่อุณหภูมิห้อง รายละเอียดของลักษณะดังแสดงในตารางที่ 4.5 หลังจากนั้นนำราเอนโดไฟท์ไปทำการย้อมสีด้วย Lactophenol cotton blue ทำการบันทึกลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะแสดงในภาพที่ 4.12-4.14

ตารางที่ 4.4 ตารางสรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ไอโซเลทต่าง ๆ

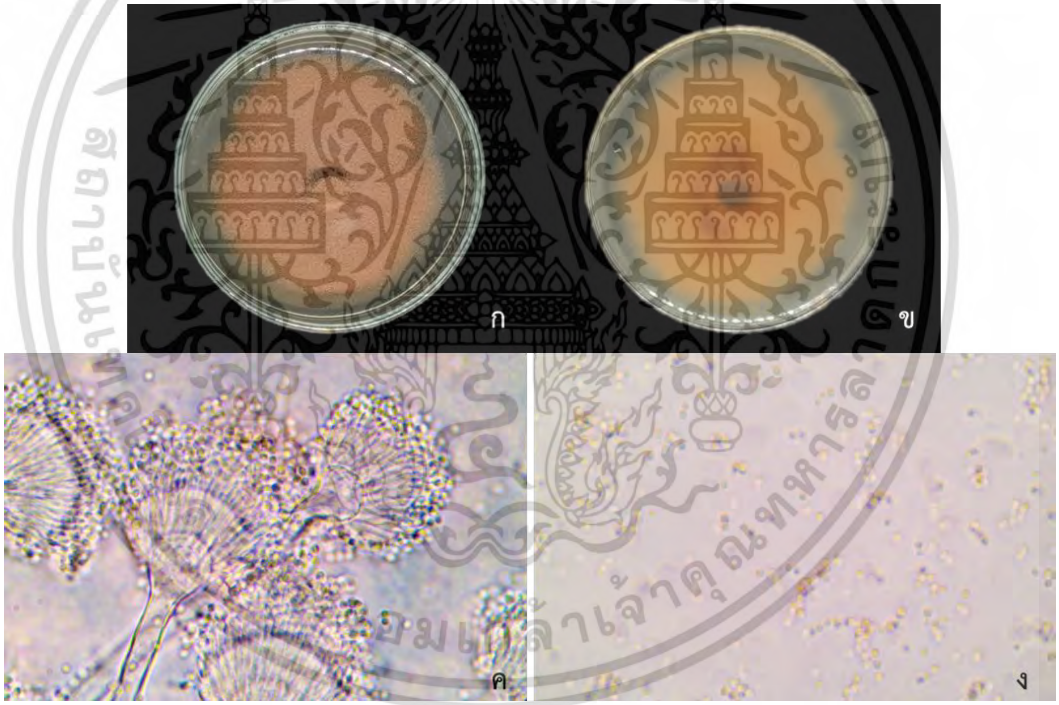
ไอโซเลท	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา							ผลการจัดจำแนกเบื้องต้น
	ผิวหน้า	การยกตัว	รูปร่างโคโลนี	ขอบ	สี	ขนาด (มม.)	ลักษณะใต้กล้อง	
L5-10	เรียบ	ราบกับผิวหน้าอาหาร	กลม	เรียบ	น้ำตาล	43.4	conidia และ conidiophore	*Aspergillus* sp.
R5-09	วงแหวน	ยกตัวเล็กน้อย	ไม่สม่ำเสมอ	รอยหยัก	ขาว	32.2	conidia และ conidiophore	*Aspergillus* sp.
R6-04	เรียบ	ราบกับผิวหน้าอาหาร	กลม	เรียบ	เขียว	44.25	conidia และ conidiophore	*Aspergillus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

***Aspergillus* sp. ไอโซเลท L5-10**

โคโลนีราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่ระยะ 7 วัน มีลักษณะของผิวหน้า (Colony surface) เป็นผิวเรียบ (Smooth) การยกตัวของโคโลนี (Colony Elevation) มีลักษณะแบนราบ (Flat) ไปกับผิวหน้าอาหาร รูปร่างโคโลนี (Colony form) มีลักษณะกลม (Circular) ขอบโคโลนี (Margin colony) มีลักษณะเรียบ (Entire) กลุ่มของเส้นใย (Mycelium) มีสีส้มแกมน้ำตาล และมีกลุ่มของสปอร์ (Spore) สีน้ำตาลกระจายอัดแน่นทั่วโคโลนี มีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ที่ 43.4 มม.

เมื่อนำราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงในชุด Slide culture ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า กลุ่มของเส้นใยมีลักษณะใสไม่มีสี (hyaline) พบก้านชูโคนิเดีย (Conidiophore) และโคนิเดีย (Conidia) ที่มีลักษณะกลมโปร่งใส



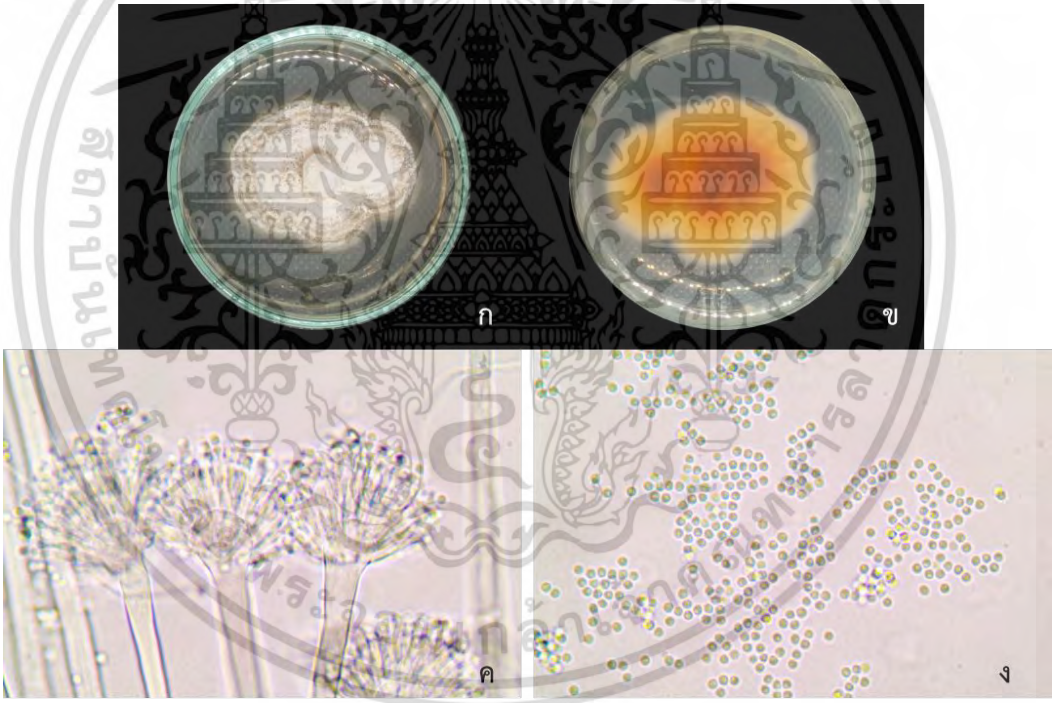
รูปที่ 4.12 ภาพแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ *Aspergillus* sp. L5-10; ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA นาน 7 วัน (ก: ลักษณะบริเวณด้านหน้า, ข: ลักษณะบริเวณด้านหลัง), ลักษณะของใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ค: ก้านชูโคนิเดีย, ง: ลักษณะโคนิเดีย)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

***Aspergillus* sp. ไอโซเลท R5-09**

โคโลนีราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่ระยะ 7 วัน มีลักษณะของผิวหน้าเป็นวงแหวนซ้อนกันเป็นชั้น (Concentric) การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะการยกตัว (Raised) เหนืออาหารเล็กน้อย รูปร่างโคโลนีมีลักษณะไม่สม่ำเสมอ (Irregular) ขอบโคโลนีเป็นซี่หยัก ไม่สม่ำเสมอกัน กลุ่มเส้นใยมีลักษณะสีขาว และมีกลุ่มของสปอร์สีขาวกระจายทั่วโคโลนี และด้านหลังของโคโลนีเป็นสีเหลืองส้ม โคโลนีบนอาหาร PDA มีขนาด 32.2 มม.

เมื่อนำราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงในชุด Slide culture ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า กลุ่มของเส้นใยมีลักษณะโปร่งใส พบก้านชูโคนิเดียและโคนิเดียที่มีลักษณะกลม สีเขียวโปร่งใส



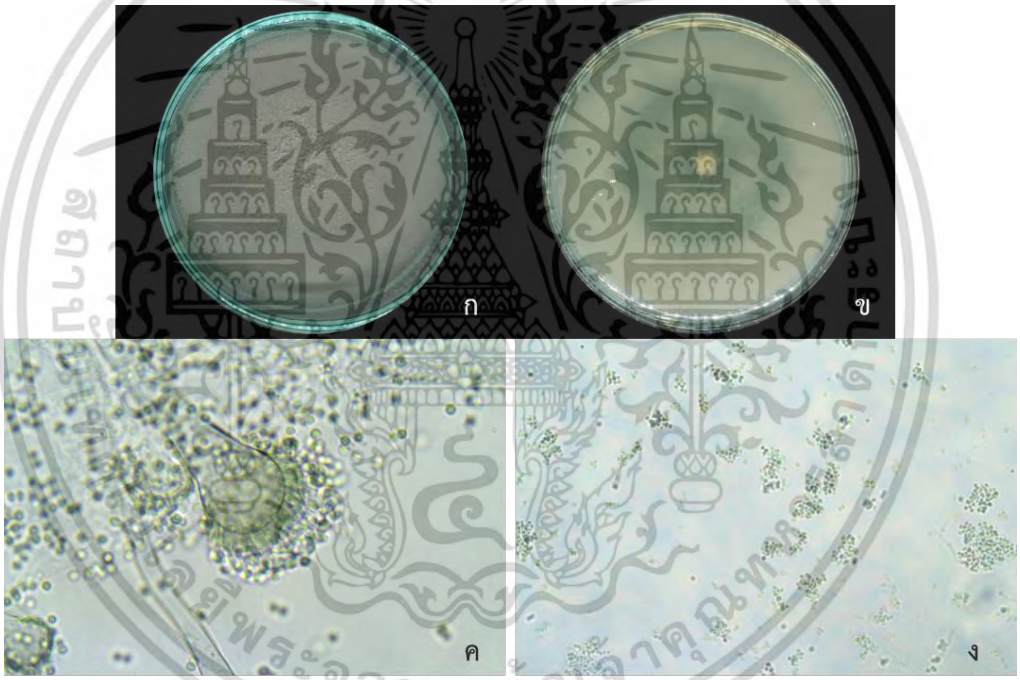
รูปที่ 4.13 ภาพแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ *Aspergillus* sp. R5-09; ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA นาน 7 วัน (ก: ลักษณะบริเวณด้านหน้า, ข: ลักษณะบริเวณด้านหลัง), ลักษณะของใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ค: ก้านชูโคนิเดีย, ง: ลักษณะโคนิเดีย)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

***Aspergillus* sp. ไอโซเลท R6-04**

โคโลนีราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่ระยะ 7 วัน มีลักษณะของผิวหน้าเป็นผิวเรียบ การยกตัวของโคโลนีมีลักษณะแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร รูปร่างโคโลนีมีลักษณะกลม ขอบโคโลนีมีลักษณะเรียบ กลุ่มของเส้นใยมีสีขาวและมีกลุ่มของสปอร์สีเขียวกระจายอัดแน่นทั่วโคโลนี โคโลนีบนอาหาร PDA มีขนาด 44.25 มม.

เมื่อนำราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงในชุด Slide culture ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า กลุ่มของเส้นใยมีลักษณะโปร่งใส พบก้านชูโคนิเดียและโคนิเดียที่มีลักษณะกลม สีเขียวเข้มโปร่งใส



รูปที่ 4.14 ภาพแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ *Aspergillus* sp. R6-04; ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA นาน 7 วัน (ก: ลักษณะบริเวณด้านหน้า, ข: ลักษณะบริเวณด้านหลัง), ลักษณะของใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ค: ก้านชูโคนิเดีย, ง: ลักษณะโคนิเดีย)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาและจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ไอโซเลทด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยา พบว่าราเอนโดไฟท์จัดอยู่ในสกุล *Aspergillus* เนื่องจากลักษณะภายใต้กล้องพบลักษณะเส้นใยใส ไม่มีสี มีก้านชูโคนิเดียที่บริเวณส่วนปลายโป่งออกเป็นเวสิเคิล (Vesicle) และพบโคนีเดียบริเวณส่วนปลายของสเตอริคมา (Sterigma) ที่มีลักษณะกลม สีเขียวโปร่งใส โดยในงานวิจัยของ Rajendran, S. et al. (2023) ได้ทำการคัดแยกราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรมะลิดิน โดยผลการศึกษาพบว่า สามารถคัดแยกราเอนโดไฟท์หลายชนิด รวมทั้ง *Aspergillus niger* ซึ่งในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี disk diffusion *A. niger.* ให้ผลการยับยั้ง *Bacillus cereus* และ *S. aureus* ได้ดีที่ขนาด 28.0 ± 0.1 มม. และ 27.3 ± 0.6 มม. ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ จำเนียร และคณะ (มปป.) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์จากพืชสกุลไมทราซีอี้ เมื่อทำการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาจากราเอนโดไฟท์จำนวน 19 ไอโซเลท พบว่าเป็น *A. niger* จำนวน 6 ไอโซเลท รองลงมาคือ *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. จำนวนชนิดละ 4 ไอโซเลท จึงทำให้เห็นว่า เชื้อราในสกุล *Aspergillus* sp. มีความสำคัญและสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งสามารถพบได้บ่อยและเป็นกลุ่มที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การเก็บตัวอย่างพืชกระท่อมและคัดแยกราเอนโดไฟท์

(I) ทำการเก็บตัวอย่างพืชกระท่อมจำนวน 7 แหล่ง เพื่อนำมาแยกราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Surface Sterilization สามารถแยกราเอนไฟท์ได้ทั้งหมด 347 ไอโซเลท โดยเป็นราเอนโดไฟท์จากใบ กิ่ง และราก จำนวน 170, 95 และ 82 ตามลำดับ

(II) ทำการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์บนอาหาร Potato Dextrose Agar และคัดเลือกราเอนโดไฟท์จำนวน 92 ไอโซเลท เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

5.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Agar well diffusion

(I) ทำการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *B. subtitis, S. aureus, E. coli* และ *P. aeruginosa* พบว่ามีราเอนโดไฟท์จำนวน 11 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคเรียทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด

(II) ราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* ได้ดีที่สุด 3 อันดับแรกได้แก่ R5-09, R6-04 และ S5-10 โดยมีขนาด inhibition zone เท่ากับ 18.42, 17.06และ 16.87 มม. ตามลำดับ

(III) ราเอนโดไฟท์ที่ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด 3 อันดับแรกได้แก่ S5-10, R5-09 และ R6-04 โดยมีขนาด inhibition zone เท่ากับ 17.13, 15.63 และ 15.12 มม. ตามลำดับ

(IV) ราเอนโดไฟท์ที่ยับยั้ง *E. coli* ได้แก่ L1-01, L1-04 และ S1-01 โดยมีขนาด inhibition zone เท่ากับ 7.63, 8.53 และ 7.56 มม. ตามลำดับ

(V) ราเอนโดไฟท์ที่ยับยั้ง *P. aeruginosa* มีเพียงไอโซเลท S1-01 ที่สามารถยับยั้งได้ โดยมีขนาด inhibition zone เท่ากับ 6.74 มม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Disk diffusion method

(I) ทำคัดเลือดเฉพาะราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียนจากหัวข้อ 5.1.2 จำนวน 5 ไอโซลท ได้แก่ L1-01, R3-14, L5-10, R5-09 และ R6-04 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในในอาหาร Potato dextrose Broth ปริมาตร 2 ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และสกัดสารจากน้ำเลี้ยงราด้วย Ethyl Acetate (EtOAc) ได้สารสกัดทั้งหมด 5 สาร

(II) จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารกัด 5 สาร ด้วยวิธีการ disk diffusion method ที่ความเข้มข้น 100 มก./มล. พบว่าสารสกัดจากรหัส R5-09 สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้ดีที่สุด โดยมี Inhibition zone ขนาด 21.3±0.91 มม. ตามด้วยรหัส L5-10 ที่ 13.85±0.25 มม. และ ราเอนโดไฟท์ในรหัส L5-10 สามารถยับยั้ง S. aureus ได้ที่สุด ตามด้วย R5-09 ที่ขนาด 17.51±0.75 มม. และ 14.1±0.10 มม. ตามลำดับ

5.1.4 การจำแนกชนิดราเอนโดไฟท์

(I) ทำการราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ดีที่สุดจากหัวข้อ 5.1.3 โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยวิธี slide culture method พบว่า ราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ไอโซเลท คือ L5-10, R5-09 และ R6-04 เป็นราในสกุล *Aspergillus sp*.

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากพืชกระท่อมชี้ให้เห็นว่า ราเอนโดไฟท์กลุ่มนี้มีศักยภาพสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ ซึ่งมีประโยชน์และสามารถนำไปต่อยอดได้สำหรับการศึกษาในอนาคต ดังต่อไปนี้

(I) ทำการเก็บตัวอย่างและคัดแยกราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ที่มีความน่าสนใจทางเศรษฐกิจ เช่น กัญชา กัญชง ฟ้าทะลายโจร เป็นต้น

(II) ศึกษาและแยกราเอนโดไฟท์จากส่วนอื่น ๆ ของต้นกระท่อม ได้แก่ ส่วนดอก ลำต้น เป็นต้น เพื่อเพิ่มองค์ความรู้ด้านราเอนโดไฟท์พืชกระท่อม

(III) ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งแบคเรียของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อรา และเส้นใย ที่ได้จากการเลี้ยงเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth, malt extract broth และ cornmeal broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(IV) ศึกษาเปรียบเทียบกับการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอาโดไฟท์ โดยใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ ethanol, methanol, ethyl acetate, hexane, butanol เพื่อคัดเลือกตัวทำละลายที่สกัดสารออกฤทธิ์ได้มากที่สุด

(V) ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้ ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช เพื่อเพิ่มความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

(VI) ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น ๆ ของสารสกัดที่ได้ เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านไวรัส และฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

(VII) ศึกษาคุณสมบัติ และองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ โดยการนำไปวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPLC, GCMS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กมลวรรณ ศรีต๊ะ, ธิดา เดชฮวบ, ณรงค์ สิงห์บุระอุดม และ อเนก กิจเจา. (2557). “ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลนในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการ”. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52: สาขาพืช. หน้าที่ 372-379

จำเนียร กิ้วเส้ง, สุมาลี เลี่ยมทอง และ ศุภวรรณ พรหมเพรา. (ม.ป.ป). “ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสกุลไมร์ทราซีอี้ที่พบในพื้นที่ป่าพรุควนเคร็ง”. วารสารวิชาการและวิจัย มทร. พระนคร.ฉบับพิเศษ การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 5. หน้า 320-330.

ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย. 2549. **ราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์จากพืชสกุล *Garcinia*.** วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไทยรัฐออนไลน์. 2564. *ยาฆ่าแมลงกับใบกระท่อม*. ค้นจาก https://www.thairath.co.th/news/local/2271931

พฤทธิภร ศุภพล. (2564). “การประเมินฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากบัวเผื่อน”. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 23(*3*). หน้าที่ 34-43

วรีรัตน์ คะหะปะนะ, คฑาวุธ โสภาลุน, วันนเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์, อัญลักษณ์ วชิรไชยการ และ ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม. (2562). “การแยกและการตรวจสอบกิจกรรมการทา งานของเอนไซม์จากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วยไม้ป่า 8 ชนิด”. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 8: หน้าที่ 40-53

ศิริลักษณ์ ภูมิขุนทด และ ภาวิรี สุทธิวิริยะ. (2565). “ประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส โรคเหี่ยวโรคใบติด และส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว”. วารสารแก่นเกษตร 1: 161-168

สินทวี สิงห์วงศ์วัฒนะ. 2547. **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากกระท่อม *Mitragyna speciosa* Korth**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุชาดา มังษา และ โสภณ บุญลือ. (2565). “การคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโรคเห็ด *Trichoderma simmonsii*”. การประชุมวิชาการเสนองานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาระดับชาติ ครั้งที่ 23. หน้าที่ 545-555

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กองควบคุมวัตุเสพติด, 2566. สืบค้นจาก https://mnfda.fda.moph.go.th/narcotic/?p=6063

อามีนา สาแม. (2561). **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะบางชนิดจากราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากสาหร่ายทะเล**. วิทยานิพนธ์ ปรัชชาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยทักษิณ

อารยา ข้อค้า. (2562). “ยาปฏิชีวนะและการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย”. J Med Health Sci. 27(2): หน้าที่ 125-139

อรอนงค์ สมทรัพย์, กรกนก พิบูลย์ผล, ค่อลิฟ ปะหยังหลี และ จารุวรรณ แดงโรจน์. (2562). “ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะเปรียง”. Princess of Naradhiwas University Journal. 11(2): 156-165.

อำนวย ธัญรัตน์ศรีสกุล. 2565. “พืชกระท่อมกับการดูแลสุขภาพของคนไทย”. วารสารวิจัยและนวัตกรรมทางสุขภาพ. 5(1): 1-9

Adkins, J. E., Boyer, E. W., and McCurdy, C. R. (2011). “Mitragyna speciosa, a psychoactive tree from Southeast Asia with opioid activity”. Current Topics in Medicinal Chemistry. Volume 11. pp. 1165–1175.

Arndt, T., Claussen, U., Güssregen, B. et al. (2011), “Kratom alkaloids and O-desmethyltramadol in urine of a "Krypton" herbal mixture consumer”. Forensic Science International. Volume 208, pp. 47–52.

Assanangkornchai, S., Muekthong, A., Sam-angsri, N., and Pattanasattayawong, U. (2007). “The use of Mitragynine [sic] speciosa ("Krathom"), an addictive plant, in Thailand”. Substance Use & Misuse. Volume 42. pp. 2145–2157.

Azizi, J., Ismail, S., Mordi, M. N. et al. (2010). “In vitro and in vivo effects of three different Mitragyna speciosa Korth leaf extracts on Phase II drug metabolizing enzymes–Glutathione transferases (GSTs)”. Molecules, Volume 15. pp. 432–441.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bartholomew Saanu Adeleke and Olubukola Oluranti Babalola (2021). “Pharmaco logical Potential of Fungal Endophytes Associated with Medicinal Plants: A Review”. J Fungi (Basel). 2021 Feb; 7(2): 147.

Food Safety. Staphylococcal (Staph) Food Poisoning. 2023. แหล่งที่มา: https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/staphyl

Hafiza farhat., Faizah Urooj., Nida Sohail., Shahid Ullah and Muhammad Shaiq Ali. (2023). “Plant disease management with amelioration of systemic resistance in soybean by endophytic fungi associated with GC-MS metabolic profiling of Chaetomium sp.”. Physiological and Molecular Plant Pathology. 126: 1-12

Hongsheng Yu, Lei Zhang, Lin Li, Chengjian Zheng, Lei Guo, Wenchao Li, Peixin Sun and Luping Qin (2009). “Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes”. Microbiological Research 165 (2010): 437-449

J. Kokaew, L. Manoch, J. Worapong, C. Chamswarng, N. Singburaudom, N. Visarath anonth, O. Piasai and G. Strobel (2011). “Coniochaeta ligniaria an Endophytic Fungus from Baeckea frutescens and Its Antagonistic Effects Against Plant Pathogenic Fungi”. Thai Journal of Agricultural Science 2011, 44(2): 123-131

La-up A., Wongrith P., Chaichan W., Aramrattana, A. and Saengow, U. (2022). “Association between kratom (*Mitragyna speciosa*) use and metabolic syndrome”. Heliyon. 8: 1-5

Marianne Frieri, Krishan Kumar and Anthony Boutin (2017). “Antibiotic resistance”. Journal of Infection and Public Health (2017) 10: 369-378

M. Basavaraju and B.S. Gunashree (2021). “*Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics”. chapter metrics overview722 Chapter Downloads

P.J. Piggot (2009). “Bacillus Subtilis”. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition) 2009, Pages: 45-56

Rajendran, S., Robertson, L.K., Kosgahakum, L., Fernando, C., and Gunasekera, S. (2023). “Antibacterial eremophilane sesquiterpenoids from *Xylaria feejeensis*, an endophytic fungi of the medicinal plant *Geophila repens*”. Fitoterapia 167: 105496.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Romano, K.P. and Hung, D.T. (2023). “Targeting LPS biosynthesis and transport in gram-neg ative bacteria in the era of multi-drug resistance”. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. Page 1-12

Sashanto G., Gitishree D., Sandeep K., Han-Seung S. and Jayanta K.(2016).“Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importanc”. Endophytes as Source of Bioactive Compounds. Volume 7: 1538

Xu, Y., Moeller, A., Jun, S.Y., Le, M., Yoon, B.Y., Kim, J.S., Lee, K. and Ha, N.C. (2012). “Assembly and Channel Opening of Outer Membrane Protein in Tripartite Drug Efflux Pumps of Gram-negative Bacteria”. Journal of biological chemistry. 282(*15*): 11740-11750.

Zurina H. et al (2012). “From Kratom to mitragynine and its derivatives: Physiological and behavioural effects related to use, abuse, and addiction” Neuroscience and Biobehavioral Reviews 37 (2013): 138–151

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (อาหารเลี้ยงเชื้อ)

1. Potato Dextrose Agar (สำหรับการเตรียม 1000 มิลลิลิตร)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

2. Potato Dextrose Broth (สำหรับการเตรียม 1000 มิลลิลิตร)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

3. Nutrient Agar (สำหรับการเตรียม 1000 มิลลิลิตร)

Nutrient broth powder	13	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

4. Nutrient Broth (สำหรับการเตรียม 1000 มิลลิลิตร)

Nutrient Broth powder	13	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

5. Muller Hinton Agar (สำหรับการเตรียม 1000 มิลลิลิตร)

Muller Hinton Broth powder	38	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (การเตรียมสารเคมี)

1. การเตรียม Kanamycin ความเข้มข้น 50 mg/ml

ชั่ง Kanamycin ปริมาณ 0.5 กรัม ด้วยวิธีปลอดเชื้อ ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (แบ่งใส่หลอด Eppendorf หลอดละ 1 มิลลิตร เก็บรักษาที่ -20 ℃)

2. การเตรียม Sodium Chloride (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85

นำ NaCl ปริมาณ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave

3. การเตรียม Sodium Hypochlorite (NaClO) ความเข้มข้นร้อยละ 5 (สำหรับการเตรียม 100 มิลลิลิตร)

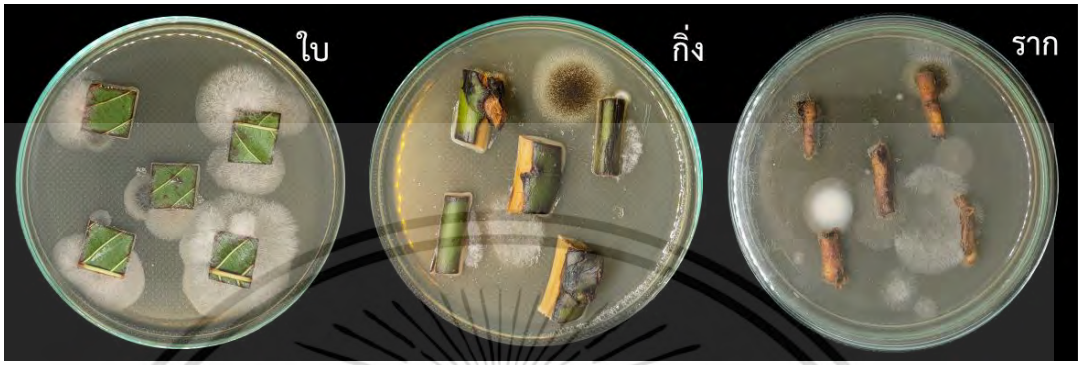
นำสารละลาย Sodium Hypochlorite (NaClO) ความเข้มข้นร้อยละ 6 ปริมาตร 83.3 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 16.7 มิลลิลิตร ทำให้ได้สารละลายความเข้มข้นร้อยละ 5

4. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5

ละลาย 0.048 M. Barium Chloride ($BaCl_2$) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.36 M Sulfuric acid (H_2SO_4) 99.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดแก้วและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่ที่พ้นแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค (ผลการทดลองเพิ่มเติม)



รูปที่ 1ค. ลักษณะของราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากส่วนต่าง ๆ ของพืชบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน

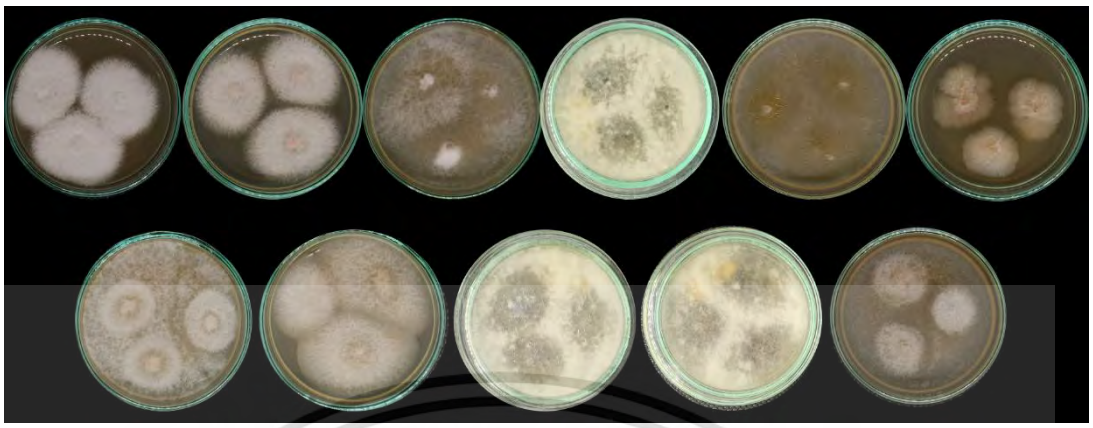
รูปที่ 2ค. ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชกระท่อมจากแหล่งที่ 1 บนอาหาร PDA เพาะเลี้ยงที่ 25 ºC นาน 3-5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3ค. ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชกระท่อมจากแหล่งที่ 2 บนอาหาร PDA เพาะเลี้ยงที่ 25 ºC นาน 3-5 วัน

รูปที่ 4ค. ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชกระท่อมจากแหล่งที่ 3 บนอาหาร PDA เพาะเลี้ยงที่ 25 ºC นาน 3-5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5ค. ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชกระท่อมจากแหล่งที่ 4 บนอาหาร PDA เพาะเลี้ยงที่ 25 ºC นาน 3-5 วัน

รูปที่ 6ค. ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชกระท่อมจากแหล่งที่ 5 บนอาหาร PDA เพาะเลี้ยงที่ 25 ºC นาน 3-5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 7ค. ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชกระท่อมจากแหล่งที่ 6 บนอาหาร PDA เพาะเลี้ยงที่ 25 ºC นาน 3-5 วัน

รูปที่ 8ค. ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟท์ที่ได้จากพืชกระท่อมจากแหล่งที่ 7 บนอาหาร PDA เพาะเลี้ยงที่ 25 ºC นาน 3-5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1ค. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิดของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 4 สัปดาห์ด้วยวิธี Agar well diffusion

รหัสไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (mm)											
	B. subtilis			*S. aureus*			*E. coli*			*P. aeruginosa*		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
L1-01	-	-	-	-	-	-	7.53	-	-	-	-	-
L1-04	-	-	-	-	-	-	8.63	8.63	-	-	-	-
L1-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L1-08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1-01	-	-	-	-	-	-	7.56	-	-	6.86	6.73	6.63
S1-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R1-04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L2-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L2-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L2-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L2-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 1ค. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิดของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 4 สัปดาห์ด้วยวิธี Agar well diffusion (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (mm)											
	B. subtilis			*S. aureus*			*E. coli*			*P. aeruginosa*		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
S2-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2-08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R2-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R2-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L3-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L3-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L3-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L3-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L3-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L3-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L3-26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L3-27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 1ค. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิดของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 4 สัปดาห์ด้วยวิธี Agar well diffusion (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (mm)											
	B. subtilis			*S. aureus*			*E. coli*			*P. aeruginosa*		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
R3-14	-	9.76	7.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L4-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L4-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L4-04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L4-08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L4-09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L4-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L4-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L4-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L4-23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L4-24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4-12	12.53*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R4-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 1ค. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิดของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 4 สัปดาห์ด้วยวิธี Agar well diffusion (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (mm)											
	B. subtilis			*S. aureus*			*E. coli*			*P. aeruginosa*		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
R4-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R4-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L5-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L5-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L5-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L5-10	13.93	15.5	15.56	10.63	11.13	11.63	-	-	-	-	-	-
L5-13	10*	11.2*	12*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L5-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L5-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L5-18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L5-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L5-21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L5-23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L5-25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 1ค. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิดของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 4 สัปดาห์ด้วยวิธี Agar well diffusion (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (mm)											
	B. subtilis			*S. aureus*			*E. coli*			*P. aeruginosa*		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
L5-27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L5-31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S5-09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S5-10	16.7	17	16.9	17	17.4	17	-	-	-	-	-	-
R5-09	18.97	18.43	17.87	16	15.3	15.6	-	-	-	-	-	-
L6-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L6-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L6-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L6-20	17.53*	15.53*	16.73*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L6-23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S6-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R6-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R6-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R6-04	17.1	16.9	17.2	14.67	14.5	16.2	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 1ค. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิดของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 4 สัปดาห์ด้วยวิธี Agar well diffusion (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (mm)											
	B. subtilis			*S. aureus*			*E. coli*			*P. aeruginosa*		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
R6-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R6-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R6-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R6-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L7-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L7-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L7-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L7-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L7-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L7-25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S7-04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S7-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S7-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S7-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 1ค. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิดของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 4 สัปดาห์ด้วยวิธี Agar well diffusion (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (mm)											
	Bacillus subtilis			*Staphylococcus aureus*			*Escherichia coli*			*Pseudomonas aeruginosa*		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
S7-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S7-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S7-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R7-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R7-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R7-04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R7-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R7-08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: * = ราเอนโดไฟท์มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียบางส่วน

รูปที่ 9ค. การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์จากพืชกระท่อมในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 สัปดาห์เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion

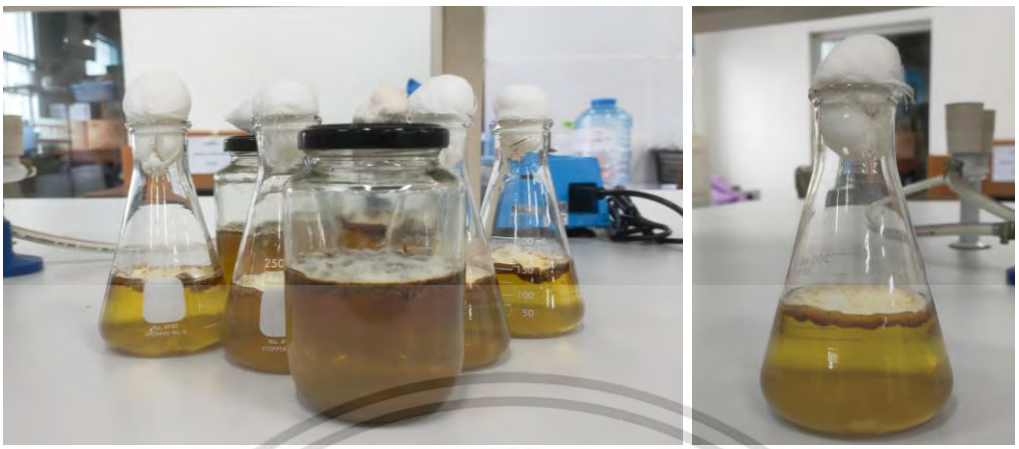
รูปที่ 10ค. การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ ราเอนโดไฟท์รหัส L1-01 ในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร/ขวด (รวม 2 ลิตร) โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อนำไปสกัดสารและทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disk diffusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 11ค. การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ ราเอนโดไฟท์รหัส L5-10 ในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร/ขวด (รวม 2 ลิตร) โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อนำไปสกัดสารและทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disk diffusion

รูปที่ 12ค. การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ ราเอนโดไฟท์รหัส R3-14 ในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร/ขวด (รวม 2 ลิตร) โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อนำไปสกัดสารและทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disk diffusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13ค. การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ ราเอนโดไฟท์รหัส R5-09 ในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร/ขวด (รวม 2 ลิตร) โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อนำไปสกัดสารและทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disk diffusion

รูปที่ 14ค. การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ ราเอนโดไฟท์รหัส R6-04 ในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร/ขวด (รวม 2 ลิตร) โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อนำไปสกัดสารและทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disk diffusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2ค. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงในอาหาร PDB เป็นเวลา 4 สัปดาห์ที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตต (EtAOc) และทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion ที่ความเข้มข้น 1 มก/แผ่นดิสก์

Isolate/ Bacteria	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone (มม.)									
	B. subtilis			*S. aureus*			*E. coli*			*P. aeruginosa*
	REP1	REP2	REP3	REP1	REP2	REP3	REP1	REP2	REP3	
L1-01		ND			ND		8.13	8.43	-	ND
R3-14	12.73	13.77	14		ND			ND		ND
L5-10	13.67	14.2	13.67	17.43	16.63	18.46		ND		ND
R5-09	20.83	20.5	22.57	14	14.07	14.23		ND		ND
R6-04	7.2	8.23	9	7.1	9.33	8.27		ND		ND

หมายเหตุ: ND (Not Determined) คือ ไม่ได้ทำการตรวจสอบ

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่..26...เดือน....มิถุนายน...พ.ศ...2566

ข้าพเจ้า นาย กฤษณะ บุญมี รหัสประจำตัว...62050566

นางสาว นางสาวเกวลิน ปูเงิน รหัสประจำตัว....62050571.

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม....

ภาควิชา...ชีววิทยา... ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย.....ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชกระท่อม

(*Mitragyna speciosa*)

ชื่อภาษาอังกฤษ...Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from Kratom

(*Mitragyna speciosa*)

ปีการศึกษา.....2565

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์.....1.25.....%

ลงชื่อ..... ลงชื่อ.....

(กฤษณะ บุญมี) (เกวลิน ปูเงิน)

นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร. ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย.. อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้