

การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา

*Metarhizium anisopliae*

DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF CRUDE  
EXTRACTS FROM *Metarhizium anisopliae*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของ การศึกษาทางหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2556

KMITL-2013-SC-M-020-004

การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา

*Metarhizium anisopliae*

**DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF CRUDE  
EXTRACTS FROM *Metarhizium anisopliae***



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2556

KMITL-2013-SC-M-020-004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF CRUDE  
EXTRACTS FROM *Metarhizium anisopliae***



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

**2013**

**KMITL-2013-SC-M-020-004**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**COPYRIGHT 2013**

**FACULTY OF SCIENCE**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา  
*Metarhizium anisopliae*  
Determination of Biological Activities of Crude Extracts  
from *Metarhizium anisopliae*  
นักศึกษา นายกิตติพงษ์ มิตรขุนทด  
รหัสประจำตัว 51068303  
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อ่อนเรื้อน เพชรวัลย์		
รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง		
รศ.ดร.อรินทิพย์ ธรรมชัยเพนต์		
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม		

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556 เวลา 9.00 – 12.00 น.  
สถานที่สอบ ณ ห้อง 306 ชั้น 3 อาคารจุฬารามวลัยลักษณ์ 1

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว  
(รองศาสตราจารย์ ดร.เดชณิ ธนะบุรีพัฒน์)  
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่.....21.....เดือน.....พฤษภาคม.....ปี.....พ.ศ.....56.....

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่ได้  
จากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae*

ชื่อนักศึกษา

นายกิตติพงษ์ มีตรจนท

รหัสนักศึกษา

51068303

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

พ.ศ.

2556

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* จำนวน 5 ไอโซเลต (MA001, MA002, MA017, MA019 และ SNB03) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทของทั้ง 5 ไอโซเลตที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุด เมื่อนำไปทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration; MIC) โดยวิธี broth dilution พบว่าเฉพาะสารสกัดหยาบจากไอโซเลต MA019 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Micrococcus luteus* ที่ระดับความเข้มข้น 5, 5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดหยาบมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (human colon adenocarcinoma: HT-29), เซลล์มะเร็งเต้านม (human breast carcinoma: MCF-7), เซลล์ไตลิง (african green monkey kidney: Vero), เซลล์มะเร็งตับ (human hepatocellular carcinoma: HepG-2) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (murine leukemia cell: P388) ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต SNB03 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 มากที่สุด โดยค่าความเข้มข้นที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (50% cytotoxicity concentration: CC<sub>50</sub>) เท่ากับ 363.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดหยาบจากชั้นเฮกเซน และเมทานอล ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต SNB03 มาทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลอดทดลองที่ระดับความเข้มข้น 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index) ลดลง โดยความเข้มข้นที่ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อโครโมโซม จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบของเชื้อรา *M. anisopliae* จากชั้นเอทิลอะซิเตทอาจมีสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

คำสำคัญ : สารสกัดหยาบ, *Metarhizium anisopliae*, paper disc diffusion, MTT assay, อัตราการแบ่งเซลล์



<b>Thesis Title</b>	Determination of biological activities of crude extracts from <i>Metarhizium anisopliae</i>
<b>Student</b>	Mr. Kittipong Mitkhunthod
<b>Student ID</b>	51068303
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Programme</b>	Biotechnology
<b>Year</b>	2013
<b>Thesis Advisor</b>	Assist. Prof. Supattra Poeaim

### ABSTRACT

The research were to study antimicrobial activity of crude hexane, ethylacetate and methanol extracts prepared from five isolates of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (MA001, MA002, MA017, MA019 and SNB03). The antimicrobial activity was screened by paper disc diffusion and broth micro dilution method. The results showed that ethyl acetate crude extract from all isolate exhibited a significant antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. The crude extract of MA019 inhibited *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus* at a minimum inhibitory concentration (MIC) value of 5, 5 and 2.5 mg/mL, respectively. Crude extracts were screened for cytotoxic activity by MTT assay using five cell lines, human colon adenocarcinoma (HT-29), human breast cacinoma (MCF-7), african green monkey kidney (Vero), human hepatocellular carcinoma (HepG-2) and murine leukemia cell line (P388). The result of study found SNB03 crude ethyl acetate extract was expressed CC<sub>50</sub> value on P388 cell line more than another cell line, about 363.42 µg/mL. Hexane and methanol crude extract were not effective antimicrobial and weak cytotoxic effect on the different cell lines when incubated for 24 hours. The genotoxic activity of SNB03 crude ethyl acetate extract were tested on human lymphocyte culture at various concentration (250, 500, 1000 and 2000 µg/mL). The result showed without induced chromosome abberation when using 2000 µg/mL. Lymphocyte cell treated with ethyl acetate extract for 24 hours at 250, 500, 1,000 and 2,000 µg/mL, showed the mitotic index which average of 81.88, 57.76, 47.60 and 8.28 percent,

respectively. These results indicated that the ethyl acetate extract of *M. anisopliae* may be contained bioactive compounds.

**Keywords :** crude extract, *Metarhizium anisopliae*, paper disc diffusion, MTT assay, mitotic index



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยคำแนะนำด้านการทดลองและคำปรึกษาในด้านต่างๆ จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุ่นเรือน เพชรวัลย์ รองศาสตราจารย์ ดร. เกษม สร้อยทอง และรองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ที่ให้คำแนะนำ และสละเวลาในการตรวจทานรูปเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2553 ของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภายในสาขาวิชาชีววิทยาที่คอยให้คำชี้แนะ เจ้าหน้าที่ธุรการเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของสาขาชีววิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ต่างๆ รวมทั้งสารเคมี และอำนวยความสะดวกช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณอินทรา เพชรทับทิม คุณอัฐพร บุญเจริญ และคุณรัตนภรณ์ บุญเรือง ที่คอยให้ความช่วยเหลือแก้ไขปัญหาอุปสรรคโดยตลอด อีกทั้งยังเป็นกำลังใจคอยสอบถามความก้าวหน้าของงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่น้องปริญญาตรี ปริญญาโท และปริญญาเอก ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณผู้อนุเคราะห์โลหิตในการทดลองทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือให้การบริจาคเลือดจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณน้า และคุณยาย ที่คอยสนับสนุนให้กำลังใจ พร้อมทั้งค่าใช้จ่ายแก่ผู้วิจัย

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

กิตติพงษ์ มิตรขุนทด

พฤษภาคม 2556

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญรูป.....	X
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 เชื้อรา <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	4
2.1.1 การเข้าทำลายแมลงของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> .....	5
2.1.2 การใช้ประโยชน์จากเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> .....	7
2.1.3 สารเมทาบอลไลต์ของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> .....	9
2.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....	14
2.2.1 วิธีการเจือจาง.....	14
2.2.2 วิธีการแพร่.....	15
2.3. การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	17
2.3.1 MTT assay.....	17
2.3.2 SRB assay.....	18
2.3.3 Dry inclusion.....	18
2.3.4 Dry exclusion.....	19
2.4 ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม.....	22
2.4.1 การศึกษาความผิดปกติในรูปของการหักและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม (chromosome aberration).....	23

# สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.2 การศึกษาความผิดปกติของ โครโมโซมแบบที่มีการสลับชิ้นส่วนของ sister chromatid (sister chromatid exchange).....	25
2.4.3 การศึกษาความผิดปกติของ โครโมโซมในรูปของ micronuclei (MN).....	26
2.4.5 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อศึกษาโครโมโซม.....	26
<b>บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....</b>	<b>28</b>
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	28
3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	28
3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์เครื่องแก้ว.....	28
3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	29
3.3 เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง.....	30
3.4 เชื้อราและเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง.....	30
3.4.1 เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง.....	30
3.4.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง.....	31
3.5 วิธีการสกัดสารจากเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> .....	31
3.6 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....	33
3.6.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ.....	33
3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี paper disc diffusion.....	34
3.6.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี broth dilution.....	35
3.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	35
3.7.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดเกาะติดผิว.....	35
3.7.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดแขวนลอย.....	36
3.7.3 การศึกษากราฟการเจริญของเซลล์ไลน์.....	36
3.7.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบ โดยวิธี MTT assay.....	37
3.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม.....	39

# สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.8.1 การเตรียมเลือด.....	39
3.8.2 การเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว.....	39
3.8.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์เม็ดเลือดขาว.....	40
3.8.4 การเตรียมสไลด์และการย้อมสีเพื่อศึกษาโครโมโซม.....	40
3.8.5 การเลือกเซลล์ที่ทำการตรวจนับและรายงานการศึกษาโครโมโซม.....	40
3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	41
<b>บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....</b>	<b>43</b>
4.1 ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อรา.....	43
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี paper disc diffusion...	45
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี broth dilution.....	51
4.4 การศึกษาการเจริญของเซลล์.....	52
4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> .....	55
4.5.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ mitomycin C ต่อเซลล์ไลน์.....	55
4.5.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ HT-29.....	59
4.5.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ MCF-7.....	62
4.5.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ Vero.....	64
4.5.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ HepG-2.....	66
4.5.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ P388.....	68
4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดหยาบ.....	73
4.6.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ mitomycin C.....	73
4.6.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดหยาบ.....	74
<b>บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....</b>	<b>80</b>
<b>บรรณานุกรม.....</b>	<b>81</b>
ภาคผนวก ก.....	95
ภาคผนวก ข.....	97
ภาคผนวก ค.....	99
ภาคผนวก ง.....	131
ประวัติผู้เขียน.....	142

# สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การจัดจำแนกเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> โดยใช้ข้อมูลของลำดับ ITS, rDNA และ RAPD-PCR.....	5
4.1	ลักษณะของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> และเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบที่ได้ต่อน้ำหนักแห้งของเชื้อรา.....	44
4.2	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ในชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	47
4.3	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ในชั้นเอทิลอะซิเตท โดยวิธี broth dilution.....	52
4.4	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อทดสอบกับ mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์ 5 ชนิด เมื่อบ่มร่วมกับเซลล์นาน 24 ชั่วโมง.....	57
4.5	แสดงความเข้มข้นของ mitomycin C ที่ทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $CC_{50}$ ) ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ โดยวิธี MTT.....	59
4.6	แสดงความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ( $CC_{50}$ ) ต่อเซลล์ไลน์ P388 ด้วยวิธี MTT.....	70
4.7	แสดงผลของ mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว.....	74
4.8	แสดงผลของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ไอโซเลต SNB03 ในชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว และความผิดปกติของโครโมโซม.....	75

# สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงการเข้าทำลายแมลงของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> .....	6
2.2	ลักษณะของหนอนที่ถูกเชื้อรา <i>Metarhizium anisopliae</i> เข้าทำลาย.....	7
2.3	แสดงโครงสร้างของ destruxins ตามคุณสมบัติทางเคมีจำนวน 5 กลุ่ม.....	10
2.4	โครงสร้างทางเคมีของ Polyhydroxylated indolizine alkaloid (swainsonine).....	11
2.5	โครงสร้างทางเคมีของ cytochalasin C.....	11
2.6	แสดงลักษณะของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion .....	15
2.7	ปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้างของ MTT ไปเป็น MTT formazan.....	18
2.8	ความผิดปกติของโครโมโซมแบบต่างๆ (ก) Chromatid gap, (ข) Chromatid break, (ค) Isochromatid gap และ (ง) Isochromatid break.....	24
2.9	แสดงลักษณะ Ring chromosome.....	25
2.10	ลักษณะของการเกิด sisterchromatid exchange.....	25
2.11	ลักษณะของการเกิด micronucleus (MN).....	26
3.1	ขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> .....	33
4.1	แสดงลักษณะของเส้นใยเชื้อราที่ทำแห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส.....	43
4.2	แสดงการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท จากเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ไอโซเลต MA002 ต่อ (ก) <i>B. subtilis</i> , (ข) <i>S. aureus</i> , (ค) <i>M. luteus</i> , (ง) <i>E. coli</i> และ (จ) <i>P. aeruginosa</i> .....	49
4.3	ลักษณะของเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับที่กำลังขยาย 100 เท่า(ก) HT-29, (ข) MCF-7, (ค) Vero และ (ง) HepG-2 .....	53
4.4	ลักษณะของเซลล์ไลน์ P388 ที่ใช้ในการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับที่กำลังขยาย 100 เท่า.....	53
4.5	กราฟแสดงการเจริญของเซลล์ไลน์ในอาหาร RPMI-1640 ที่มีซีรัม FBS 8 เปอร์เซ็นต์เลี้ยงเป็นเวลา 192 ชั่วโมง.....	55
4.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388, MCF-7, HT-29 และ Vero กับความเข้มข้นของสารละลาย mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ไม่โครกรมต่อมิลลิกรัม) บ่มนาน 24 ชั่วโมง.....	58

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HT-29 ต่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ไอโซเลต (ก) MA001, (ข) MA002, (ค) MA017, (ง) MA019 และ (จ) SNB03 ในชั้นเฮกเซน, เอทิลอะซิเตท และเอทานอลแต่ละความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มนาน 24 ชั่วโมง..... 61
4.8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ MCF-7 ต่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ไอโซเลต (ก) MA001, (ข) MA002, (ค) MA017, (ง) MA019 และ (จ) SNB03 ในชั้นเฮกเซน, เอทิลอะซิเตท และเอทานอลแต่ละความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มนาน 24 ชั่วโมง..... 63
4.9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ Vero ต่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ไอโซเลต (ก) MA001, (ข) MA002, (ค) MA017, (ง) MA019 และ (จ) SNB03 ในชั้นเฮกเซน, เอทิลอะซิเตท และเอทานอลแต่ละความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มนาน 24 ชั่วโมง..... 65
4.10	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HepG-2 ต่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ไอโซเลต (ก) MA001, (ข) MA002, (ค) MA017, (ง) MA019 และ (จ) SNB03 ในชั้นเฮกเซน, เอทิลอะซิเตท และเอทานอลแต่ละความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มนาน 24 ชั่วโมง..... 67
4.11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ P388 ต่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ไอโซเลต (ก) MA001, (ข) MA002, (ค) MA017, (ง) MA019 และ (จ) SNB03 ในชั้นเฮกเซน, เอทิลอะซิเตท และเอทานอลแต่ละความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มนาน 24 ชั่วโมง..... 69
4.12	แสดงลักษณะ โครโมโซมในระยะเมทาเฟสจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัด บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อใช้กำลังขยาย 1,000 เท่า (ก) โครโมโซมจากตัวอย่างเพศชาย และ (ข) โครโมโซมจากตัวอย่างเพศหญิง..... 77

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.13	แสดง single chromatid break เมื่อป่มเซลล์ร่วมกับ mitomycin C ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	78
4.14	แสดง single chromatid gap เมื่อป่มเซลล์ร่วมกับ mitomycin C ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	79



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีการเพาะปลูก และเลี้ยงสัตว์อย่างแพร่หลาย ปัญหาสำคัญที่พบ คือแมลงศัตรูพืชที่อาจจะเป็นผลทำให้ผลผลิตเกิดการเสียหาย ซึ่งวิธีการจัดการหรือควบคุมแมลงเหล่านี้ส่วนใหญ่ คือการใช้สารเคมีหรือยาฆ่าแมลง ซึ่งปริมาณสารเคมีกำจัดแมลงที่เหลือทิ้งหรือตกค้างในธรรมชาติ อาจเป็นพิษต่อทั้งผู้ใช้และสิ่งมีชีวิตอื่น นอกจากนั้นการใช้สารเคมีหรือยาฆ่าแมลงอาจก่อให้เกิดปัญหาด้านต่างๆ เช่น ปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิต (residual effect) การกลับมาระบาดของใหม่อีกครั้งของแมลง (resurgence of new species) หรือการที่แมลงสร้างความต้านทานต่อสารเคมี (insecticide resistance) ทำให้เกิดการพัฒนาการควบคุมแมลงรบกวนหรือแมลงศัตรูพืชด้วยวิธีการทางชีวภาพเพื่อไม่ให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง (entomopathogenic fungi) บางชนิด เช่น เชื้อราในสกุล *Metarhizium*, *Hypocrella* และสกุล *Beauveria* จึงถูกนำมาใช้เพื่อจัดการกับแมลงศัตรูพืช เนื่องจากเชื้อราเหล่านี้สามารถเข้าทำลายแมลงได้ตลอดทุกระยะการเจริญเติบโต (สิริฉัตร, 2546; Ebert และ Weisser, 1997) และการควบคุมทางชีวภาพมีข้อดีต่างๆ เช่น ลดค่าใช้จ่าย ทำให้เกิดความสมดุลในระบบนิเวศวิทยา และมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมศัตรูพืชได้ในระยะยาวมากกว่า

เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* นอกจากจะมีความสามารถในการควบคุมแมลงแล้วยังมีรายงานว่าสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ได้หลายชนิด เช่น สารในกลุ่ม Destruxin ที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลง (insecticidal) (Pais และคณะ, 1981; Gupta และคณะ, 1989) ยับยั้งการเจริญของพืช (phytotoxic) (Buchwaldt และ Jensen, 1991) ต้านไวรัส (antiviral) (Kopecky และคณะ, 1992; Chen และคณะ, 1997) ชักนำให้สร้างอีริโทรโปรตีน (erythropoietin inducing) (Cai และคณะ, 1998) และสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulating activities) (Huxham และคณะ, 1989) สาร Swainsonin มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็ง (anti-cancer activity) และต่อต้านเนื้องอก (anti-tumour) (Mohla และคณะ, 1989) เป็นต้น จากข้อมูลข้างต้นเป็นส่วนหนึ่งของประโยชน์จากสารที่ได้จากเชื้อรา *M. anisopliae* ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเชื้อรา *M. anisopliae* มีการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีแนวโน้มไปใช้ในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ได้ แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพและความเป็นพิษของสารที่ได้จากเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้งการต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ หรือความพิษต่อสารพันธุกรรมยังมีอยู่น้อย ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ความเป็นพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรม ซึ่ง

ผลการทดลองที่ได้เบื้องต้น อาจเป็นแนวทางส่งเสริมให้มีการใช้สารสกัดจากเชื้อรา *M. anisopliae* เพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จะทำให้ทราบถึงระดับความปลอดภัยเมื่อนำไปใช้ต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
- 1.2.2 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยของ *M. anisopliae* กับเซลล์ไลน์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองโดยวิธี MTT
- 1.2.3 ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (human lymphocyte) ในหลอดทดลอง

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

สกัดสารจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 5 ไอโซเลต คือ MA001, MA002, MA017, MA019 และ SNB03 ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล นำสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยไปศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี paper disc diffusion ใช้ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Micrococcus luteus* ATCC9341 ตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก ใช้ *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ จากนั้นนำสารสกัดในส่วนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ มาหาค่า MIC โดยใช้วิธี broth dilution สำหรับการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยของ *M. anisopliae* กับเซลล์ไลน์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง คือ เซลล์ไตลิง (african green monkey kidney: Vero), เซลล์มะเร็งเต้านม (human breast carcinoma: MCF-7), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (human colon adenocarcinoma: HT-29), เซลล์มะเร็งเซลล์มะเร็งตับ (human hepatocellular carcinoma: HepG-2), และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (murine leukemia cell: P388) โดยวิธี MTT หาระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $CC_{50}$ ) จากนั้นคัดเลือกสารสกัดหยาบจากเชื้อราไอโซเลตที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดมาทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม โดยศึกษาความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในหลอดทดลอง

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงฤทธิ์เบื้องต้นและระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และค่าความเป็นพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรมของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในหลอดทดลอง ซึ่งข้อมูลที่ได้ อาจจะเป็นประโยชน์ในการนำสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไปใช้ต่อไปในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 เชื้อรา *Metarhizium anisopliae*

เชื้อราสกุล *Metarhizium* หรือเชื้อราเขียว สามารถพบได้ตามธรรมชาติ โดยพบกระจายในดิน และแมลงหรือหนอนต่างๆที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย เนื่องจากเชื้อราสกุลนี้เป็นกลุ่มของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลง (entomopathogenic fungi) (Bridge และคณะ, 1997) มีรายงานการค้นพบตั้งแต่ก่อนปี ค.ศ. 1976 (Tulloch, 1976; Rombach และคณะ, 1987) โดยมีลักษณะเป็นเชื้อราที่สร้างเส้นใยที่มีผนังกันไม่มีสี เมื่อเจริญเต็มที่จะสร้าง conidiophore ชูขึ้นจากเส้นใย มีลักษณะเป็นกิ่งๆ และอัดแน่นเป็นแท่ง ตรงปลายสร้าง phialide ซึ่งเป็นเซลล์ที่ผลิต โคนิเดียม (conidia) อยู่ต่อกันเป็นรอยคอดระหว่างโคนิเดียม สำหรับ โคนิเดียมที่เกิดใหม่ๆ จะมีสีขาวและจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวคล้ำและจะหลุดออกตรงรอยคอดเมื่อแก่จัด นอกจากนี้เมื่ออยู่ในสภาวะขาดแคลนอาหาร เชื้อราสกุล *Metarhizium* จะมีการสร้างซิงนีมาตา (synnemata) ซึ่งเป็นมัดเส้นใยที่เรียงตัวกันอย่างแน่นหนา ทำหน้าที่ในการสร้างสปอร์ที่ทนทาน เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ ซึ่งในระยะแรกของการระบุชนิดพบว่าแบ่งเชื้อราสกุล *Metarhizium* ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ *M. flavoviride* และ *M. anisopliae* (Tulloch, 1976) ต่อมาเมื่อมีการค้นพบเชื้อราสกุล *Metarhizium* ชนิดใหม่ๆ (new species) ซึ่งมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน จึงทำให้มีการแบ่งชนิดของเชื้อราในสกุลนี้ออกเป็นชนิดย่อยๆ อีกเป็น varieties โดยแบ่ง *M. anisopliae* ออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะสปอร์ คือ ชนิดสปอร์สั้น (shot-spore isolate) ซึ่งมีความยาวของสปอร์อยู่ในช่วงไม่เกิน 8 ไมโครเมตร เรียกชื่อ variety นี้ว่า var. *anisopliae* และชนิดสปอร์ยาว (long-spore isolate) ซึ่งมีความยาวของสปอร์อยู่ในช่วงตั้งแต่ 10 ถึง 14 ไมโครเมตร เรียกว่า var. *majus* (Rombach และคณะ, 1986) สำหรับ Driver และคณะ (2000) ได้แบ่งเชื้อราสกุล *Metarhizium* ออกเป็น 10 กลุ่ม (clade) ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยวิเคราะห์ลำดับของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS และ ITS2) ของ ribosomal DNA (rDNA) และเทคนิค random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) ซึ่งประกอบด้วย 3 สปีชีส์ คือ *M. album*, *M. flavoviride* และ *M. anisopliae* (Driver และคณะ, 2000) ดังตารางที่ 2.1

เดิมเชื้อรา *M. anisopliae* ได้จัดให้อยู่ในดิวิชัน Deuteromycota เนื่องจากพบว่าระยะส่วนใหญ่ที่พบของเชื้อรา *M. anisopliae* จะเป็นระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual stage, anamorph stages หรือ imperfect stages) เท่านั้น ซึ่งจะอาศัยโคนิเดียม เพื่อการขยายพันธุ์ สำหรับระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual stage, perfect stages หรือ teleomorph stages) นั้นไม่มีรายงานว่าพบได้บ่อย (Schaerffenberg, 1959 อ้างโดย Zimmermann, 1993) สำหรับปัจจุบันได้จัดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา *M. anisopliae* ให้อยู่ในดิวิชัน Ascomycota เนื่องจากมีรายงานว่าพระยะ teleomorph ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ดังเช่นในรายงานของ Liang และคณะ (1991) ที่ได้ทำการศึกษาเชื้อรา *Cordyceps taii* ที่พบในประเทศจีน และได้รายงานว่าเป็นระยะ teleomorph ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* และรายงานว่าเป็นชนิดใหม่ ซึ่งภายหลังให้ชื่อว่า *M. taii* หลังจากนั้นมีการรายงานว่า *C. brittlebankisoides* เป็นระยะ teleomorph ของเชื้อรา *M. anisopliae* var. *majus* (Liu และคณะ 2001) ดังนั้นจึงจัดให้ *M. anisopliae* อยู่ในกลุ่มของ Ascomycota (CABI bioscience, 2007)

ตารางที่ 2.1 การจัดจำแนกเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดยใช้ข้อมูลของลำดับ ITS, rDNA และ

RAPD-PCR

Clade	Species	Variety (abbreviation)	Previous names	Hosts groups	Location
1	<i>M. album</i>		<i>M. album</i>	Homoptera	Philippines
2	<i>M. flavoviride</i>	var. Type E	<i>M. f.</i> var. <i>flavoviride</i>	Homoptera	Brazil
3	<i>M. flavoviride</i>	var. <i>novazealandicum</i> (Mf-no)	<i>M. a.</i> var. <i>anisopliae</i>	Coleoptera	Australia
			<i>M. a.</i> var. <i>frigidum</i>	Lepidoptera	New Zealand
			<i>M. a.</i> var. <i>novazealandicum</i>	Coleoptera soil	Australia
4	<i>M. flavoviride</i>	var. <i>pemphigum</i> (Mf-pe)	<i>M. a.</i> var. <i>anisopliae</i>	Homoptera	United Kingdom
5	<i>M. flavoviride</i>	var. <i>minus</i> (Mf-mi)	<i>M. f.</i> var. <i>minus</i>	Homoptera	Philippines
6	<i>M. flavoviride</i>	var. <i>flavoviride</i> (Mf-fl)	<i>M. a.</i> var. <i>frigidum</i>	Coleoptera	France Germany
			<i>M. f.</i> var. <i>flavoviride</i>	Isoptera mound	Australia
7	<i>M. anisopliae</i>	var. <i>acridum</i> (Ma-ac)	<i>M. f.</i> var. <i>minus</i>	Orthoptera	Africa Australia
			<i>M. a.</i> var. <i>anisopliae</i>	Brazil Mexico	
8	<i>M. anisopliae</i>	var. <i>lepidiotum</i> (Ma-le)	<i>M. a.</i> var. <i>anisopliae</i>	Coleoptera	Australia
				Isoptera	
9	<i>M. anisopliae</i>	var. <i>anisopliae</i> (Ma-an)	<i>M. a.</i> var. <i>anisopliae</i>	Orthoptera, Isoptera, Coleoptera, Diptera, Hemiptera	Benin, Eritrea, Oman, Pakistan, Thailand, Australia, New Zealand, Mexico, Brazil, USA*
10	<i>M. anisopliae</i>	var. <i>majus</i> (Ma-ma)	<i>M. a.</i> var. <i>majus</i>	Coleoptera	Philippines Indonesia

ที่มา : Driver และคณะ (2000)

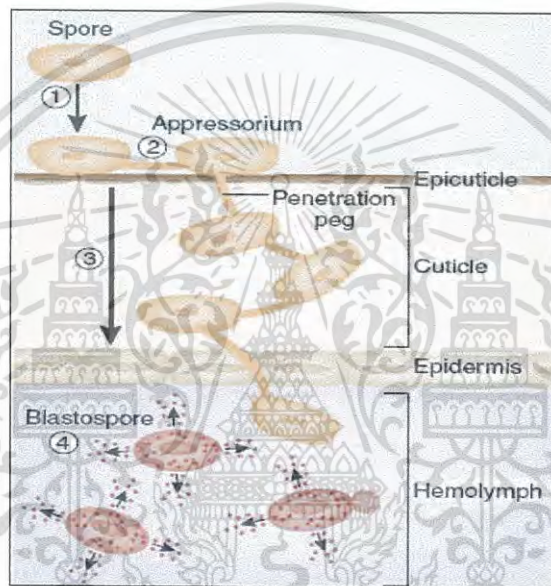
หมายเหตุ : *M.a.* คือ *M. anisopliae*                      *M.f.* คือ *M. flavoviride*

### 2.1.1 การเข้าทำลายแมลงของเชื้อรา *M. anisopliae*

เชื้อรา *M. anisopliae* มีคุณสมบัติเข้าทำลายแมลงได้หลายชนิด เช่น ตั๊กแตน ปลวก ยุง (Peng และคณะ, 2008; Milner และคณะ, 1998) โดยพบว่าสามารถอาศัยแมลงได้ตลอดทุกระยะการเติบโต โดยมีกลไกการเข้าทำลายแมลงคือเมื่อ โคนิเดียของเชื้อราตกลงบนผนังลำตัวของแมลงและมีอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม โคนิเดียของเชื้อราจะงอกออกมาเป็น โครงสร้างที่เรียกว่า appressorium หรือ penetration peg แทะทะลุผ่านผนังลำตัวหรือช่องว่างในตัวของแมลง (haemocoel) เข้าไปเจริญและสร้างเส้นใยในตัวแมลง (รูปที่ 2.1) โดยเชื้อราจะหลั่งเอนไซม์ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างๆ เช่น โปรติเอส (proteases) เอสเทอเรส (esterases) ไคตินเอส (chitinase) และไลเปส (lipase) เพื่อย่อยผนังลำตัวและเนื้อเยื่อของแมลง (St. Leger และคณะ, 1986; Butt, 1990) เมื่อเส้นใยแทงเข้าไปในตัวแมลงแล้วจะเจริญสร้างเส้นใยในลักษณะเป็นเส้นสั้นๆ เรียกว่า hyphal bodies หรือ blastospores เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของเชื้อราในการดูดซับแร่ธาตุอาหารจากตัวแมลง สารอาหารต่างๆ ที่มีอยู่ใน haemolymph จะถูกนำมาใช้เพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา นอกจากนี้เชื้อราอาจเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ และสร้างสารพิษเพื่อทำลายเนื้อเยื่อของแมลง หรือปล่อยสารที่มีฤทธิ์ไปรบกวนพัฒนาการ และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ (metamorphosis) ของแมลงด้วย (Butt และ Brownbridge, 1997)



รูปที่ 2.1 แสดงการเข้าทำลายแมลงของเชื้อราสกุล *Metarhizium*  
(ที่มา : <http://www.nature.com/naturebiotechnology>)

ซึ่งแมลงในตอนนี้จะเหลือเพียงเปลือกหุ้มชั้นนอกเท่านั้น เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม สเคอโรเตียม (sclerotium) จะพัฒนาไปเป็นสโตรมา (stroma) เจริญออกมาบนผิวหนังของแมลง ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใย ปกคลุมบนผนังลำตัวแมลงพร้อมกับสร้างโคนิเดีย และมีผลทำให้แมลงตายในที่สุด (Isaka และคณะ, 2005) หลังจากนั้น โคนิเดียจะฟุ้งกระจายเข้าสู่วงจรการทำลายต่อไป ซากของแมลงจะแห้งแข็ง โดยมีเส้นใยเชื้อราคลุมทั้งตัวคล้ายมัมมี่เรียกลักษณะนี้ว่า mummified (รูปที่ 2.2) โดยทั่วไปแล้วความรุนแรงในการเข้าทำลายและการทำให้เกิดโรคในแมลงของเชื้อรา *M. anisopliae* นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ ปริมาณเชื้อที่แมลงได้รับ (dose dependent) ชนิด อายุ และพฤติกรรมของแมลง โดยเชื้อราต้องการความชื้นสูงเพื่อให้โคนิเดียที่ตกบนผนังลำตัวแมลงงอกและแทงทะลุเข้าไปในตัวแมลง (Brownbridge, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ลักษณะของหนอนที่ถูกเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* เข้าทำลาย  
(ที่มา : <http://www.cenicana.org>)

### 2.1.2 การใช้ประโยชน์จากเชื้อรา *M. anisopliae*

ในปัจจุบันเชือรานี้มีความสำคัญเนื่องจากนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี (biological control) (Bidochka และคณะ, 2001) โดยนำมาทดแทนการใช้สารเคมีหรือยาฆ่าแมลง (insecticide) เนื่องจากสามารถหลั่งสารเพื่อทำลายแมลงได้ และมีความจำเพาะต่อแมลงเป้าหมาย โดยไม่ทำลายแมลงที่มีประโยชน์หรือสัตว์อื่นๆ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมศัตรูพืชได้ในระยะยาว และทำให้เกิดความสมดุลในระบบนิเวศวิทยาอีกด้วย เนื่องจากไม่มีสารพิษตกค้าง สำหรับการนำเชื้อรา *M. anisopliae* ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงมีตัวอย่างดังนี้

Mnyone และคณะ (2009) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต IP 46 ในการควบคุมยุง (*Anopheles gambiae* และ *A. arabiensis*) พบว่ามีประสิทธิภาพมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมยุงซึ่งเป็นพาหะของโรคมาลาเรียต่อไปในอนาคต

Makaka (2008) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 2 ไอโซเลต คือ IMI098396 และ MI098376 ในการควบคุมด้วงดำข้าวโพด (*Heteronychus licas*) ที่อุณหภูมิ 15 และ 28 องศาเซลเซียส และความชื้น 55-70 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สารแขวนลอยสปอร์รา (spore suspension) ในน้ำมันและในน้ำ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่  $1.4 \times 10^4$  -  $1.4 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าในทุกความเข้มข้นสามารถทำให้ด้วงตายได้ และสารแขวนลอยสปอร์ราที่ใช้ในน้ำมันให้ผลดีกว่าการใช้ในน้ำ โดยที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เชื้อราไอโซเลต IMI098376 มีค่าความเข้มข้นที่จะทำให้ตายจำนวนครึ่งหนึ่ง (50% lethal concentration;  $LC_{50}$ ) เท่ากับ  $4.47 \times 10^4$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีระยะเวลาที่ทำให้สัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่ง (50% Lethal Time;  $LT_{50}$ ) ที่ความเข้มข้นสูงสุดและต่ำสุดในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ไอโซเลต MI098376 มีค่า  $LC_{50} = 3.10 \times 10^4$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร กับค่า  $LT_{50}$  ที่ความเข้มข้นสูงสุดและต่ำสุดเกิดขึ้นในสัปดาห์ที่

4 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งได้แนะนำให้ใช้สูตรสารแขวนลอยสปอร์ราในน้ำมันซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า

Milner และคณะ (1998) ได้คัดแยกเชื้อรา *M. anisopliae* จากปลวกเพื่อใช้ในการควบคุมปลวก (*Nasutitermes exitus*, *Coptotermes frenchi* และ *C. acinaciformis*) ในประเทศออสเตรเลีย พบว่า *M. anisopliae* ไอโซเลต FI-610 มีประสิทธิภาพมากที่สุด และเมื่อนำไปทดลองในพื้นที่ พบว่าต้องใช้ ปริมาณ 10 กรัม ( $3 \times 10^{11}$  โคนิเดียต่อมิลลิลิตร) หรือมากกว่าเพื่อให้มีประสิทธิภาพมากพอในการควบคุม *C. acinaciformis* เช่นเดียวกับ Maketon และคณะ (2007) ซึ่งได้ทดลองใช้ *M. anisopliae* จำนวน 8 ไอโซเลต เพื่อหาประสิทธิภาพในการควบคุมปลวกใต้ดิน (*C. gestrio*) พบว่า *M. anisopliae* CKM-048 ที่ความเข้มข้น  $3 \times 10^8$  โคนิเดียต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยทำลายปลวกได้ 89 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 14 วัน นอกจากนั้นแล้วยังสามารถใช้ควบคุมด้กัแตนโดยเชื้อ *M. anisopliae* var. *acridum* (Peng และคณะ, 2008) และ *M. flavovirde* (Lomer และคณะ, 1997 ; Shah และคณะ, 1998)

สำหรับในประเทศไทยมีการใช้เชื้อรา *M. anisopliae* ในการควบคุมด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย ด้วงแรดมะพร้าว แมลงค้ำหนามมะพร้าวในพื้นที่การเกษตร จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ และกลุ่มงานวิจัยปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร (<http://www.thaibiocontrol.org/main.php?filename=Metarhizium>) โดยมีตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาการนำ *M. anisopliae* ไปใช้ในการควบคุมแมลงดังนี้

อัญชลี และคณะ (2553) ได้แยกเชื้อราสกุล *Metarhizium* จากพื้นที่ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จำนวน 16 ไอโซเลต และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมยุงรำคาญ และหนอนกระทู้หอม พบว่าสามารถทำให้ยุงรำคาญและหนอนกระทู้หอมมีการตายเฉลี่ยอยู่ในช่วง 6.00 - 80.67 เปอร์เซ็นต์ และในช่วง 3.33 - 40.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

มาลี และกรกฎ (2552) ศึกษาความประสิทธิภาพของเชื้อ *M. anisopliae* ในการควบคุมเห็บโค (*Boophilus microplus*) โดยวิธีการพ่นสารแขวนลอยสปอร์ราจำนวน 5 ไอโซเลต ลงบนเห็บโค พบว่าไอโซเลต Ma 6079 และ Ma 7965 สามารถทำให้เห็บโค มีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเชื้อราที่มีความสามารถในการทำให้เห็บโคเกิดโรคตายสูงสุด มาทดสอบหาความรุนแรงของเชื้อราในความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  และ  $1 \times 10^{10}$  โคนิเดียต่อมิลลิลิตร พบว่าไอโซเลต Ma 6079 มีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ  $2.4 \times 10^4$  โคนิเดียต่อมิลลิลิตร และมีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 11.9 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อรามีประสิทธิภาพในการควบคุมปริมาณเห็บโคได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าไม่สามารถทำให้เกิดโรคกับโคได้

นริศ และอนุชิต (2551) ศึกษาประสิทธิภาพของ *M. anisopliae* จำนวน 4 ไอโซเลต ในการควบคุมแมลงวันผลไม้ (Diptera: Tephritidae) อายุ 10 วัน โดยใช้สารแขวนลอยสปอร์ราความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  โคนิเดียต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถฆ่าแมลงวันผลไม้ได้โดยเชื้อรา *M. anisopliae* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ผ่านการคัดค้าน ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต M1 และ M3 มีการเข้าทำลายแมลงได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 4 วัน ส่วนเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต M2 และ M4 มีการเข้าทำลายแมลงได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 6 วัน ตามลำดับ

วิวัฒน์ (2551) ได้เก็บตัวอย่างเชื้อรา *M. anisopliae* ในพื้นที่ปลูกอ้อย 4 จังหวัด ได้แก่ อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี อำเภอพนมทวน จังหวัดกาญจนบุรี และอำเภอบ้านฝาง จังหวัดขอนแก่น และนำมาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 4 ไอโซเลต กับหนอนดั่งหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย (*Dorystenes buqueti*) ในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อราไอโซเลต ที่เก็บได้จากอำเภอบ้านฝาง จังหวัดขอนแก่น มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยทำให้หนอนตายได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้สารแขวนลอยสปอร์ราที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตรขึ้นไป

มณจันทร์ และศศิเทพ (2549) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา 5 สายพันธุ์ ในการกำจัด หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Hub.) ระยะไข่ หนอนวัย 1, 2 และ 3 โดยการหยดสารแขวนลอยสปอร์ราที่มีความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงบนไข่หนอนกระทู้หอม พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* CKM-048 และ *P. lilacinus* CKP-012 ให้ค่าการตายของหนอนกระทู้หอมวัย 1-2 สูงสุดเท่ากับ 36.67 และ 36.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเชื้อรา *M. anisopliae* CKM-048 มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้หอมวัย 3 มากกว่าเชื้อราชนิดอื่น โดยสามารถทำให้มีค่าการตายของหนอนกระทู้หอมวัย 3 เท่ากับ 36.67 เปอร์เซ็นต์

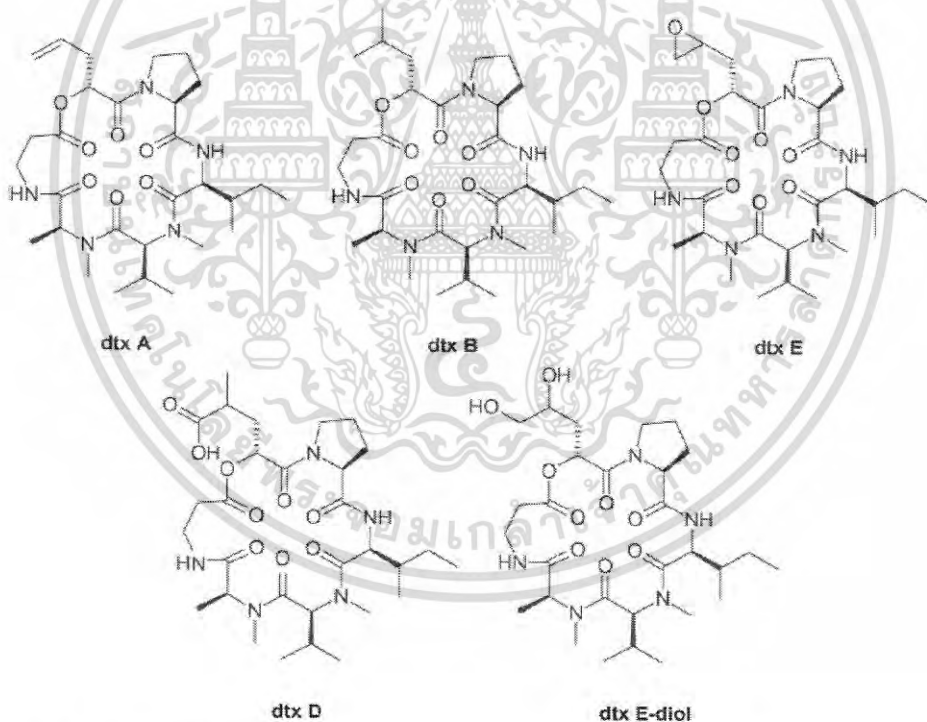
เพชรหทัย และอัจฉราพร (2550) ทดลองใช้สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *M. anisopliae* และ *Beauveria bassiana* ทดสอบกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยจักจั่นสีเขียว พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ความเข้มข้น  $10^6$ - $10^7$  โคนิเดียมต่อมิลลิลิตร สามารถเกิดโรคกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ดีที่สุด 48.33-51.67 เปอร์เซ็นต์ แต่ประสิทธิภาพไม่ต่างกับ *B. bassiana* เมื่อทดสอบกับตัวอ่อนของเพลี้ยจักจั่นสีเขียว เมื่อทดลองนำสารแขวนลอยสปอร์ราทดสอบร่วมกับสารสกัดจากสะเดาและหางไหลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในห้องปฏิบัติการและแปลงทดสอบ พบว่าสารสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อราในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยจักจั่นสีเขียว

### 2.1.3 สารเมตาบอไลต์ของเชื้อรา *M. anisopliae*

เชื้อรา *M. anisopliae* ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโดยชีววิธี เนื่องจากมีความสามารถสร้างสารเมตาบอไลต์ ในระยะแรกของการเข้าทำลายแมลงได้ ซึ่งส่วนมากจัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่นเดียวกับเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงอื่นๆ ซึ่งสารเหล่านี้สามารถยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของแมลงทำให้แมลงตายได้ โดยสามารถสร้างสารได้หลายชนิด ตัวอย่างสารที่เชื้อรา *M. anisopliae* สร้างขึ้น เช่น destruxins และ swainsonine ซึ่งเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบเอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า เหมอนุญาตเหนือไปเชิงวิจัยขั้นต้นการค้นคว้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Roberts, 1966) นอกจากนั้นยังมีรายงานเกี่ยวกับสารชนิดอื่นๆที่แยกได้จากเชื้อราในสกุล *Metarhizium* เช่น cytochalasin C และ D, 12-hydroxyvalicin, viridoxin, myroridins และ hydroxyfungerin (Krasnoff และคณะ, 2006)

destruxins เป็นสารในกลุ่ม cyclic hexadeseptides มีโครงสร้างเป็นวงที่มีฤทธิ์ในการฆ่าแมลง (insecticidal activity) มีฤทธิ์ยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันทำให้แมลงตาย (Kershaw และคณะ, 1999; Dumas และคณะ, 1996) เมื่อแยกอนุพันธ์ในธรรมชาติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* ตามคุณสมบัติทางเคมี ได้เป็น 5 กลุ่มพื้นฐานได้ คือ Destruxin A, B, D, E และ E-diol (รูปที่ 2.3) สำหรับ Destruxin A, B, D, และ E พบได้ในเชื้อราสกุล *Metarhizium* หลายสายพันธุ์เช่น *M. anisopliae* var. *anisopliae* สร้างสาร destruxins A, B และ E สำหรับ *M. anisopliae* var. *majus*, *M. flavoviride* และ *M. album* สร้างสาร destruxins A ได้มากกว่าสารชนิดอื่น นอกจากนั้นยังสามารถพบสาร destruxins ได้ในเชื้อราชนิดอื่นด้วย เช่น *Beauveria felina* สร้างสาร destruxin B (Kim และคณะ, 2002)



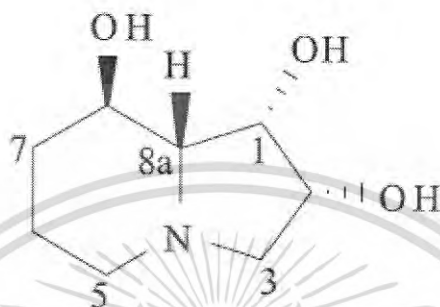
รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของ destruxins ตามคุณสมบัติทางเคมี จำนวน 5 กลุ่ม (ที่มา : [www.regional.org.au](http://www.regional.org.au))

swainsonine เป็นสารประเภท polyhydroxylated indolizine alkaloid ซึ่งประกอบด้วยวงแหวน piperidine และ pyrrolidine เชื่อมกัน (รูปที่ 2.4) Hino และคณะ (1985) ได้รายงานว่าพบใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

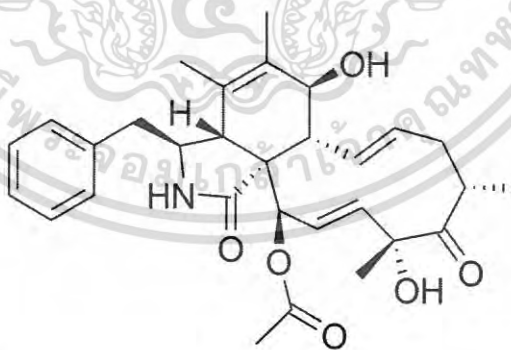
*M. anisopliae* ไอโซเลต F-3622 นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในพืชหลายสกุล *Swainsona*, *Sphaerophysa*, *Oxytropis*, *Astragalus*, *Ipomea* และ *Sida* ซึ่งสารประกอบมีคุณสมบัติในการยับยั้ง

เอนไซม์ lysosomal alpha-mannosidase และ mannosidase II มีสมบัติต้านการแบ่งเซลล์ของเนื้องอก (antitumor-proliferative) และต้านมะเร็ง (anticancer activity) นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Nemr, 2000)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของ polyhydroxylated indolizine alkaloid (swainsonine)  
(ที่มา: Oselys และคณะ, 2007)

เชื้อรา *M. anisopliae* สามารถสร้างสาร cytochalasin ได้ 2 ชนิด คือ cytochalasin C และ D ซึ่งมีความสำคัญในด้านยา และทางด้านชีววิทยาของเซลล์ (cell biology) (Vey และคณะ, 2001; Krasnoff และคณะ, 2007) โดยมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ cytochalasin C ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ cytochalasin C  
(ที่มา: <http://www.ask.com/wiki/Cytochalasin>)

นอกจากสารที่กล่าวถึงในข้างต้นแล้วยังมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *M. anisopliae* สามารถสร้างสารชนิดอื่นๆ ได้อีกหลายชนิด ซึ่งมีผลต่อแมลง หรือใช้ในทางการแพทย์ได้ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oselys และคณะ (2007) ศึกษาการคัดเลือกเชื้อราสกุล *Metarhizium* เพื่อผลิตสารเมทาบอลิไทด์ชนิด swainsonine โดยใช้เชื้อราสกุล *Metarhizium* ทั้งหมด 6 ไอโซเลตได้แก่ *M. anisopliae* ไอโซเลต 3935, 4516, 4819, PL57, PL43 และ *Metarhizium flavoviride* ไอโซเลต CG291 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ Oat meal extract สูตรตัดแปลง และอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek culture medium สูตรตัดแปลง ในฟลาสก์เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต 3539 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Oat meal extract ที่เสริมด้วย D-lysine 1.8 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตของ swainsonine มากที่สุด คือ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่อง electrospray ionization mass spectrometry : ESI-MS

Hsiao และ Ko (2001) ศึกษาการผลิตสาร destruxin จากเชื้อรา *M. anisopliae* สายพันธุ์ปกติเปรียบเทียบกับสายพันธุ์กลาย พบว่าผลผลิตของ *M. anisopliae* ไอโซเลต F061 มีผลผลิตมากที่สุด โดยมีปริมาณของ destruxin A, B และ desmethyldestruxinB (DMDB) เท่ากับ  $12.84 \pm 0.04$ ,  $66.89 \pm 2.57$  และ  $1.41 \pm 0.13$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับ *M. anisopliae* ไอโซเลต F007 ให้ผลผลิต destruxins E มากที่สุด คือ  $4.19 \pm 0.13$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า ethyl methane sulfonate (EMS) และรังสี UV สามารถชักนำให้มีการเพิ่มผลผลิต destruxin ที่สูงขึ้นได้ โดยในสายพันธุ์กลาย  $6E-9$  ให้ปริมาณ destruxin A, B และ DMDB เท่ากับ  $30.05 \pm 1.97$ ,  $110.37 \pm 10.02$  และ  $8.30 \pm 0.45$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสายพันธุ์กลาย  $7E-3$  ให้ผลผลิต destruxin E สูงที่สุดเท่ากับ  $20.59 \pm 2.65$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเชื้อราแต่ละไอโซเลตให้สาร destruxin ได้ในปริมาณไม่เท่ากัน โดยการสกัดสารจากเชื้อราจะได้สารแต่ละชนิดต่างกัน ดังเช่น Seger และคณะ (2006) ทำการแยกสารจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* โดยทำการแยกให้บริสุทธิ์ 3 ขั้นตอน คือ เทคนิค Liquid-liquid extraction ที่แยก destruxin D และ E-diol ออกจากสารสกัดหยาบ ขั้นตอนทำ enrichment ด้วยเทคนิค Apolar chromatography เพื่อแยกสารออกเป็นกลุ่มๆ ตามความมีขั้วและน้ำหนักโมเลกุลของสาร และใช้เทคนิค High-speed counter-current chromatography (HSCC) เพื่อแยก destruxin ที่เหลือออกจากกัน พบองค์ประกอบหลักที่พบในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่ผ่านการกรอง คือ destruxin A, B และ E เท่ากับ 78, 59 และ 63 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีความบริสุทธิ์มากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Wang และคณะ (2004) ที่ศึกษาปริมาณของ destruxin ที่ผลิตได้จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต V245 และ V275 ในอาหารเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ พบว่าปริมาณของ destruxin ที่ได้มีค่าแตกต่างกันโดยพบว่าเชื้อราไม่มีการสร้างสาร destruxin เมื่อเลี้ยงในระดับถึงหมักและเชื้อราสามารถสร้างสารได้เมื่อเลี้ยงบนข้าว โดยสามารถสร้างสารได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

Amiri-Besheli และคณะ (2000) ศึกษาชนิดและปริมาณของ destruxin พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* var. *anisopliae* มีปริมาณของ destruxin A, B และ E โดยไอโซเลต V220 ไม่สามารถ

ผลิต destruxin ได้ และ *M. anisopliae* var. *majus*, *M. flavoviride* และ *M. album* ที่มีความจำเพาะ  
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปเผยแพร่  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อแมลงในกลุ่ม Coleoptera, Orthoptera และ Hemiptera ตามลำดับนั้นให้ผลผลิตของ destruxin ชนิดต่างๆ ที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามแม้จะให้ปริมาณของ destruxin มาก แต่อาจมีความเป็นพิษต่ำในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าสารที่เชื้อราผลิตขึ้นนั้น นอกจากสายพันธุ์แล้วยังมีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง

Yeh และคณะ (1996) ได้นำน้ำเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* มาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เมื่อนำมาศึกษาโครงสร้างโดยเครื่อง NMR spectroscopy และ mass spectrometry พบว่าได้สาร destruxin ชนิดใหม่ คือ destruxin E2 chlorohydrin คล้ายกับการทดลองของ Azumi และคณะ (2008) ที่ได้แยกสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต HF260 โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR spectroscopy และ mass spectrometry พบว่าได้สารชนิดใหม่ คือ Aurovertin D, F และ H

Kuboki และคณะ (1999) รายงานว่า *Metarhizium* sp. ที่แยกได้จากดินในประเทศญี่ปุ่น สามารถสร้างสาร 12-hydroxy-ovalicin ซึ่งให้ชื่อว่า Mer-f3 มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ประมาณ 311

Kikuchi และคณะ (2009) ได้สกัดสารจากเส้นใยของเชื้อรา *M. flavoviride* ด้วยเมทานอล พบว่าได้สาร 2 ชนิด คือ metarhizins A และ B ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม diterpene pyrone คล้ายคลึงกับการทดลองของ Gupta และคณะ (1993) ที่ได้ทดลองเลี้ยง *M. flavoviride* ในฟลาสก์เขย่า 110 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน และนำเส้นใยมาสกัดด้วยเอทานอล พบว่าสามารถสกัดสารได้ 2 ชนิดคือ viridoxins A และ B

Jegrov และคณะ (1998) ได้ศึกษาสารที่แยกได้จากเชื้อรา *M. anisopliae* โดยใช้ข้อมูลจากเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR) และแมสสเปกโตรสโคปี (Mass spectrometry) พบว่าเป็นสารที่ได้เป็นสารใหม่และรายงานว่าเป็น destruxin Ed1

Krasnoff และคณะ (2006) ทดลองแยกสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อรา *M. anisopliae* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์กลาย *M. anisopliae* KOB1-3 และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR และ mass spectrometry ได้สาร 2 ชนิดคือ NG-391 และ NG-393 โดยพบว่าสายพันธุ์กลายสามารถให้ผลผลิตของสารทั้ง NG-391 และ NG-393 ได้มากกว่าสายพันธุ์ปกติ ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Krasnoff และคณะ (2012) ได้สกัดสารจากโคนิเดียมของ *M. acridum* และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR และ mass spectrometry ได้สาร 2 ชนิด คือ Metacridamide A และ B

Liu และคณะ (2000) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต destruxins A และ B จากเชื้อรา *M. anisopliae* บนอาหารแข็ง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ประกอบไปด้วย ข้าว รำข้าว และแกลบ โดยมีน้ำ 71 เปอร์เซ็นต์ และค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (water activity) เท่ากับ 0.921 เป็นเวลา 14 วัน จะได้ผลผลิตของ destruxin มากที่สุด โดยมี destruxins A เท่ากับ 2.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของสับเสตรท และ destruxins B 227 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของสับเสตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lee และคณะ (2008) ทดลองสกัดสารจาก *M. anisopliae* สายพันธุ์ HF293 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของแมลงบดเป็นเวลา 10 วัน พบว่าได้สารกลุ่มใหญ่ คือ กรด helvolic (helvolic acid) และมีอนุพันธ์ คือ กรด helvolic 1,2-acid dihydrohelvolic

## 2.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

วิธีที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์มีหลายวิธี ซึ่งโดยทั่วไปเป็นการวัดความสามารถในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่บ่มร่วมกับสารทดสอบ (มาลีย์ และมาลิน, 2536) เช่น

### 2.2.1. วิธีการเจือจาง (dilution method)

เป็นการสอบหาปริมาณ เพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้า ใช้ทดสอบยืนยันผลของวิธี diffusion ที่ให้ผลความไวปานกลางหรือคือยา และใช้ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ (anaerobe) มีหลักการสำคัญ คือ เจือจางสารสำหรับทดสอบให้มีความเข้มข้นต่างๆกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเพาะเชื้อทดสอบลงไป แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

#### 2.2.1.1 broth dilution method

ทำได้โดยการเจือจางสารทดสอบในอาหารเหลวให้มีความเข้มข้นของสารลดลงทีละครั้งตามลำดับจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่าที่ต้องการ แล้วเติมเชื้อทดสอบโดยมีเชื้อประมาณ  $10^5$ - $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงไปเท่าๆ กันทุกหลอด นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (Minimal Inhibitory Concentration หรือ MIC) โดยดูจากหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญเมื่อดูด้วยตาเปล่าและนำไปหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration หรือ MBC) โดยนำหลอดเชื้อที่ไม่เจริญทุกหลอดไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ปริมาณสารในหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อขึ้นคือค่า MBC การทดสอบด้วยวิธีนี้สิ้นเปลือง แต่สามารถอ่านค่าได้ละเอียด

#### 2.2.1.2 agar dilution method

ทำได้โดยการเจือจางสารทดสอบให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน แล้วผสมกับอาหารวุ้นที่อยู่ในสภาพหลอมเหลว อุณหภูมิ 48-50 องศาเซลเซียส ใช้อาหาร 20 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 10 เซนติเมตร เมื่อวุ้นแข็งจึงเพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปสังเกตการเจริญของเชื้อภายหลังจากนำไปบ่มชั่วระยะเวลาหนึ่ง ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนจานอาหารเดียวกันได้ และถ้ามีเชื้ออื่นๆ ปนเปื้อนหรือฝ่าเหล่าคือยากก็สามารถมองเห็นได้ แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถหาค่า MBC ได้

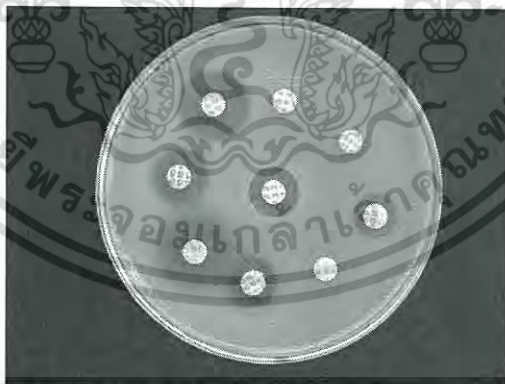
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2.2 วิธีการแพร่ (diffusion method)

อาศัยหลักการคือให้สารทดสอบแพร่ไปในอาหารแข็ง เมื่อระยะทางที่สารแพร่ออกไปเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารจะลดลงทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสารบริเวณที่มีความเข้มข้นของสารมากพอจะยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้จะเกิดเป็นบริเวณใสหรือบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) อัตราการแพร่ของสารที่ผ่านไปอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณ ซึ่งจะบอกถึงความสามารถของสารที่นำมาทดสอบว่าสารนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากน้อยเพียงใด ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถปฏิบัติได้สะดวกและรวดเร็ว ซึ่งวิธีที่นิยมใช้คือ

### 2.2.2.1 วิธี paper disc diffusion method

เป็นวิธีการหดยสารทดสอบลงบน แผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ที่งอไว้ให้แห้งเพื่อระเหยตัวทำละลายออก นำ paper disc ไปวางบนผิวหน้าอาหารแข็งที่มีเชื้อแบคทีเรีย นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งรอบๆ แผ่น paper disc (รูปที่ 2.6) วิธีการนี้โดยทั่วไปมักใช้เพื่อเป็นการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารปฏิชีวนะเบื้องต้น ซึ่งเป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ ซึ่งไม่อาจทราบค่า MIC หรือ MBC ได้ ไม่เหมาะในการทดสอบกับเชื้อที่เจริญช้าและจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ (มาลัย และมาลิน, 2536)



รูป 2.6 แสดงลักษณะของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

(ที่มา : <http://www.siamanswer.com/media/?search=disc+test>)

### 2.2.2.1 วิธี agar well diffusion method

เป็นการทดสอบสาร โดยการหดยสารทดสอบลงในหลุมของอาหารแข็งที่มีเชื้อและเจาะหลุมไว้แล้วด้วย cock borror จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรียที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการทดสอบ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการสังเกตการณ์เกิดบริเวณยับยั้ง รอบหลุมที่มีสารทดสอบ

การศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงมีการศึกษา เช่น การศึกษาของสิริฉัตร (2546) ที่ได้แยกตัวอย่างเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง *Hypocrella scutata* จำนวน 46 ตัวอย่าง บนใบหว่าหิน (*Syzygium tumida*) และหว่าน้ำ (*Syzygium oblatum*) จากป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส สามารถแยกเชื้อราได้ 31 ไอโซเลต จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) และน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *H. scutata* SSC18 และ P36 มาทดสอบหาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น โดยวิธี agar diffusion พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Microsporium gyseum*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Cuvularia* sp. แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์

รัชดา และคณะ (2547) ได้หาโครงสร้างสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี จากเชื้อรา *Isaria tenuipes* BCC7831 ซึ่งพบว่าสารประกอบที่ได้แสดงผลยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

อภิรดี (2551) รวบรวมเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงจากป่าในเขตภาคเหนือของประเทศไทย พบเชื้อราจำนวน 11 ไอโซเลต ในสกุล *Beauveria*, *Cordyceps*, *Isaria* และ *Paecilomyces* นำเชื้อรามานำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB และนำน้ำเลี้ยงเชื้อรามาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อราทุกไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ 7 ชนิด ได้แก่ *Salmonella welterredens*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *Listeria* sp. เมื่อนำมาหาค่า MIC พบว่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งได้คือ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Khan และคณะ (2003) ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ไอโซเลต 251 ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี agar well diffusion บ่มน้ำเลี้ยงเชื้อราร่วมกับเชื้อทดสอบ ได้แก่ *B. subtilis*, *M. luteus* และ *E. coli* ที่อุณหภูมิ 33 และ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อรามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้เพียงสายพันธุ์เดียว ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง สำหรับที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงจะไม่พบบริเวณยับยั้ง

Krasnoff และคณะ (2012) ได้นำสารสกัดจากโคนิเดียมของ *M. acridum* คือ Metacridamide (A และ B) ไปทดสอบกับเชื้อ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* และ *Colletotrichum acutatum* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงสุด 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์

Lee และคณะ (2005) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงจำนวน 47 ตัวอย่าง ในสกุล *Akanthomyces*, *Aschersonia*, *Cordyceps*, *Gibellula*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Paecilomyces*, *Verticilium* และ *Beauverria* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. subtilis* จำนวน 38 ตัวอย่าง (81 เปอร์เซ็นต์) มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* จำนวน 30 ตัวอย่าง (64 เปอร์เซ็นต์) และมีฤทธิ์ยับยั้ง *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 10 ตัวอย่าง (21 เปอร์เซ็นต์)

Lee และคณะ (2008) สกัดสารจาก *M. anisopliae* ไอโซเลต HF293 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว sanakiko medium ที่มีส่วนผสมของแมลงบดเป็นเวลา 10 วัน พบว่าได้สาร helvolic 1,2-acid dihydrohelvolic เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* 209P

Sahab และคณะ (2012) ได้ทดสอบสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลต ITCC 4688 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยทดสอบกับเชื้อ 6 ชนิด ได้แก่ *M. luteus*, *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* และ *Aeromonas* sp. ที่ระดับความเข้มข้น 400, 800, 1200 และ 1600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลต ITCC 4688 ในชั้นเอทิลอะซิเตททุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หมดทุกสายพันธุ์ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 8.5-28.5 มิลลิเมตร

Boonpong และคณะ (2001) ได้สกัดสารจากเส้นใยของเชื้อรา *Aschersonia tubulata* ไอโซเลต BCC1785 และศึกษาโครงสร้างของสารพบว่าสารที่แยกได้คือ dustanin และ 3 $\beta$ -acetoxy-15 $\alpha$ , 22-dihydroxyhopane ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* H37R9 โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

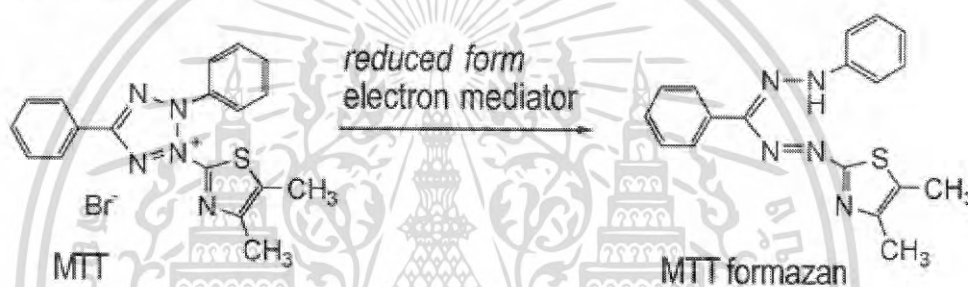
## 2.3 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์จะเป็นวิธีที่ใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง มาทดสอบหรือสัมผัสกับสารทดสอบ ระยะเวลาการสัมผัสกับสารทดสอบ และความเสถียรของสารทดสอบ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ใช้เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกลุ่มควบคุมบวก (positive control) และกลุ่มควบคุมลบ (negative control) ซึ่งตรวจสอบได้จากการนับจำนวนเซลล์โดยตรงโดยการย้อมสีหรือวัดจากค่ากิจกรรมของเมทาบอลไลท์ที่เกิดขึ้นในเซลล์ ซึ่งสีที่ใช้ย้อมเซลล์มีทั้งที่เป็น dye inclusion และ dye exclusion วิธีที่ใช้ตรวจสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์มีอยู่หลายวิธี ตัวอย่าง เช่น

### 2.3.1 MTT assay

เป็นวิธีการหนึ่งซึ่งเป็นที่นิยมนำมาศึกษาเนื่องจาก ป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และเชื่อถือได้ โดยใช้ความสามารถของกิจกรรมของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ในการรีดิวซ์สีสังเคราะห์ tetrazolium 3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ที่มีสีเหลืองไปเป็นผลึกฟออร์มาซานที่มีสีม่วงที่ไม่ละลายน้ำ

(รูปที่ 2.7) (Slater และคณะ, 1963) จึงต้องละลายฟลูออโรมาซานด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ซึ่งสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 500-600 นาโนเมตร ได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และปริมาณของฟลูออโรมาซานที่วัดได้จะสัมพันธ์กับจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตในตัวอย่างเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษได้ (Denizot และ Lang, 1986) นอกจากนี้ปริมาณของฟลูออโรมาซานที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสี MTT เริ่มต้นที่ใช้และชนิดของเซลล์ด้วย โดยมีรายงานว่าความเข้มข้นที่ใช้มีตั้งแต่ 0.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Mossman, 1983; Garn และคณะ, 1994) จนถึง 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Ho และคณะ, 1997) สำหรับสารที่ใช้ละลายฟลูออโรมาซาน มีรายงานว่าใช้ได้หลากหลาย เช่น propanol (Denizot และ Lang, 1986) 2-propanol และ 1 M HCl (Mueller และคณะ, 2004) DMSO หรือ 0.04 N HCl ใน isopropanol (Green และคณะ, 1984; Pieters และคณะ, 1990) หรือ SDS ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ใน DMSO 50 เปอร์เซ็นต์ (Garn และคณะ, 1994; Hansen และคณะ, 1989)



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้างของ MTT ไปเป็น MTT formazan

ที่มา: [http://www.itsbio.co.kr/main/goods\\_view.php?category2=58&no=122](http://www.itsbio.co.kr/main/goods_view.php?category2=58&no=122)

### 2.3.2 SRB assay (Sulforhodamine B assay)

เป็นการวัดปริมาณ โปรตีนภายในเซลล์ด้วยสีที่เป็น anionic protein stain โดยโมเลกุลของสีมี sulfonic group 2 หมู่ จะจับกับ โปรตีนในสภาวะที่เป็นกรดอ่อนๆ ซึ่งวิธีนี้สามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งเซลล์เกาะผิวและเซลล์แขวนลอย โดยหลังจากตรึงเซลล์ด้วย TCA และบ่มกับ SRB ในกรดอะซิติก หลังจากนั้นจะล้างสีส่วนเกินออกทิ้งไว้ให้แห้งแล้วสกัดสีที่จับอยู่กับ โปรตีนภายในเซลล์ด้วย Tris base buffer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของสีด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 510 นาโนเมตร ทั้งนี้ความเข้มของสีจะมีความสัมพันธ์กับความมีชีวิตของเซลล์ และวิธีนี้ยังสามารถให้ผลที่ใกล้เคียงกับวิธีการวัดสี (fluorometric methods) วิธีอื่นๆด้วย (Vichai และ Kirtikara, 2006)

### 2.3.3 Dry inclusion

วิธีนี้สีที่ใช้จะข้อมติดเซลล์ที่มีชีวิต เช่น neutral red assay โดยสี neutral red โดยสีจะเข้า

ไปรวมตัวในไลโซโซม (lysosomes) ของเซลล์มีชีวิต ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วหรือขาดเยื่อหุ้มเซลล์จะเข้าไป เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่เชิงพาณิชย์ การค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จับไม่ได้ จากนั้นจึงล้างสีส่วนเกินออกแล้วจึงละลายสีที่เข้าไปจับในเซลล์ออกมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Repetto และคณะ, 2008) ระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมจะแตกต่างกันไปเนื่องจากเซลล์แต่ละชนิดจะจับกับสีย้อมได้ในปริมาณที่ไม่เท่ากัน

### 2.3.4 Dry exclusion

เป็นวิธีการตรวจดูผลของสารทดสอบที่ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งใช้ในการบ่งความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเซลล์มีชีวิตสามารถป้องกันไม่ให้สีผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ได้ เซลล์ที่ตายแล้วหรือเซลล์ที่ได้รับสารพิษ เยื่อหุ้มเซลล์จะขาดคุณสมบัติของการยอมให้สารบางอย่างผ่านเข้าออกเซลล์ ดังนั้นสีทริปแฟนบลู (trypan blue) จึงสามารถเข้าไปในเซลล์ที่ตายและทำให้นิวเคลียสติดสีฟ้าของสีทริปแฟนบลู (Freshney, 1987) โดยวิธีนี้จะเป็นการตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่ง่ายและใช้เวลาสั้น สำหรับอุปกรณ์นับเซลล์จะใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)

Fotakis และคณะ (2006) ได้เปรียบเทียบเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่ LDH release, neutral red, MTT และ protein assay โดยใช้เซลล์มะเร็งตับของหนู (rat hepatoma; HTC) และเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ (liver hepatocellular-carcinoma; HepG-2) ทดสอบกับแคดเมียมคลอไรด์ ( $\text{CdCl}_2$ ) ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงสามารถตรวจสอบค่าความเป็นพิษของเทคนิค LDH release, neutral red, MTT และ protein assay ต่อเซลล์ไลน์ HTC โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 80, 20, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่วิธี LDH release ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อตรวจที่เวลา 3, 5 และ 8 ชั่วโมง เช่นเดียวกับเมื่อทดสอบกับเซลล์ไลน์ HepG-2 พบว่าวิธี neutral red และ MTT นั้นสามารถตรวจสอบค่าความเป็นพิษได้ตั้งแต่ 3 ชั่วโมง และวิธี LDH release สามารถตรวจพบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่านั้น ซึ่งอาจจะสรุปได้ว่า การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จะขึ้นอยู่กับปัจจัยของสารที่จะส่งผลกระทบต่อเซลล์ที่ทดสอบ และในส่วนของวิธีการทดสอบจะพบว่า neutral red และ MTT จะมีความไวในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ได้เร็วกว่าวิธีการทดสอบโดย LDH release และ protein assay ซึ่งเบญจมาศ (2543) รายงานว่าวิธี MTT เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากให้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำและมีความสม่ำเสมอ เมื่อเทียบกับสารอื่นที่เป็นอนุพันธ์ของ MTT เช่น MTS, XTT, AP (acid phosphatase), neutral red, CVDE (crystal violet dye elution) และ SRB (sulforhodamine B) เป็นต้น

สำหรับสารสกัดที่ได้จากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงมีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ความเป็นพิษต่อแมลง และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (Pedras และคณะ, 2002) แต่เน้นการศึกษาไปที่การสกัดสารจากเชื้อราเพื่อนำไปใช้เป็นสารควบคุมแมลงศัตรูพืช (mycoinsecticide) รวมทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ เช่น ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส ดังนี้

Cai และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาสารสกัดที่แยกได้จากเชื้อรา *M. anisopliae* OS-F68576 พบ destruxin จำนวน 5 ชนิด ซึ่งมีฤทธิ์ในการชักนำทำให้เกิดการแสดงออกของยีน erythropoietin เป็น 5 เท่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.2-2 ไมโครโมลาร์

Skrobek และคณะ (2006) ได้ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60) และเซลล์ไลน์แมลง (SF9) เปรียบเทียบกับ destruxin พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรามีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดมากกว่าสาร destruxin โดยมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดน้อยที่สุดที่ทำให้เซลล์ตายครึ่งหนึ่ง (50% lethal concentration;  $LC_{50}$ ) เท่ากับ 221 และ 193 ppm เมื่อเทียบกับเซลล์ไลน์ HL-60 เป็นเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับเซลล์ไลน์แมลง SF9 มีค่า  $LC_{50}$  มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ 500 ppm

Saowanit และ Angsumarn (2004) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของเชื้อ *Hirsutella thompsonii* 966 นำสารสกัดหยาบมาทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ไลน์แมลงชนิด Sf9 เซลล์ไลน์แมลงชนิด (larval tissue of *Aedes albopictus*; C6/36) และเซลล์ไตของหนูแฮมสเตอร์ (Hamster syrian kidney; BHK21) โดยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดหยาบมีผลทำให้เซลล์ Sf9, C6/36 และ BHK(21) มีการเพิ่มปริมาณเซลล์มากขึ้นถึง 110.00, 115.38 และ 140.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับอาหาร โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์

Yeh และคณะ (1996) ได้ศึกษาโครงสร้างของสารในน้ำเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* โดย NMR spectroscopy และ mass spectrometry ได้สาร destruxin ชนิดใหม่ คือ destruxin E2 chlorohydrin เมื่อทำการเปรียบเทียบกับ destruxin ชนิดอื่นๆ พบว่า destruxin ชนิดใหม่มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสตับอักเสบบี ที่ศึกษาในเซลล์ชนิด human hepatoma (Hep3B)

Kuboki และคณะ (1999) ได้ทดสอบสาร Mer-f3 ซึ่งแยกได้ในชั้นเอทิลอะซิเตทจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Metarhizium* f3 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่ามีความสัมพันธ์กับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนู (Mouse lymphocytic leukemia; L-1210) โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1 ไมโครโมลาร์ และมีความเป็นพิษน้อยในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2.2 และ 1.5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

Kikuchi และคณะ (2009) ได้สกัดจากเส้นใยของเชื้อรา *M. flavoviride* ด้วยเมทานอลพบว่าได้สารสองชนิดคือ metarhizins A และ B และพบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ (antiproliferative) เมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม (human breast adenocarcinoma; MCF-7), เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (human leukemia; K562), เซลล์มะเร็งปอด (human lung adenocarcinoma; A549), เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte (human monocyte; THP-1) และเซลล์มะเร็งลำไส้

ใหญ่ (human colon carcinoma; HCT116) คล้ายคลึงกับการทดลองของ Gupta และคณะ (1993) ที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ทดลองเลี้ยง *M. flavoviride* ในฟลาस्कเขย่า 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน และนำเส้นใยมา สกัดด้วยเอทานอล พบว่าสามารถสกัดสารได้สองชนิดคือ viridoxins A และ B ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น พิษต่อตัวอ่อนของด้วงมันฝรั่ง (Colorado potato beetle larvae) โดยความเข้มข้นของสารที่ทำให้ สัตว์ทดลองตายไปเป็นจำนวนครึ่งหนึ่งของจำนวนเริ่มต้น ( $LC_{50}$ ) เท่ากับ 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อ ลิตร ตามลำดับ

Krasnoff และคณะ 2012 ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร metacridamide A และ B ที่สกัด ได้จากโคนิเดียมของ *M. acridum* เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า metacridamide A มี ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยมีผลต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (epithelial colorectal adenocarcinoma; Caco-2) มะเร็งเต้านม (breast cancer; MCF-7) และมะเร็งตับ (hepatoma; HepG2/C3A) โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 6.2, 11.0, และ 10.8 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ metacridamide B มีฤทธิ์ในการยับยั้ง เซลล์ HepG2/C3A ที่ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 18.2 ไมโครโมลาร์ แต่พบว่าไม่มีฤทธิ์กับเซลล์ Caco-2 และ MCF-7 เมื่อใช้ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ metacridamide A ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เมื่อทดสอบกับแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าแมลง (insecticidal) เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม

Zhang และคณะ (2004) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิ เตทจากเชื้อรา *Cordyceps sinensis* ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว HL-60 โดยทดสอบที่ระดับความ เข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี MTT assay พบว่ามีความเป็นพิษต่อ เซลล์ HL-60 ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Kim และคณะ (2006) ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Cordyceps militaris* ที่สกัดด้วยน้ำร้อน โดยนำมาทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกับเซลล์ HL-60 ที่ระดับความ เข้มข้น 500, 1000, 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี MTT assay โดยบ่มสาร ร่วมกับเซลล์นาน 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 12 ชั่วโมง สารสกัดหยาบมีค่า  $IC_{50}$  ต่อเซลล์ HL-60 เท่ากับ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่เวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดหยาบมีค่า  $IC_{50}$  ต่อเซลล์ HL-60 เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Wu และคณะ (2007) สกัดสารจากเส้นใยของเชื้อรา *Cordyceps sinensis* ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำ และนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อ เซลล์ MCF-7 โดยวิธี MTT บ่มสารสกัดหยาบร่วมกับเซลล์นาน 48 ชั่วโมง จากผลการทดสอบ พบว่าค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่ทำ ให้ค่าความเป็นพิษกับเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxicity concentration;  $CC_{50}$ ) เท่ากับ 87.37, 44.77 และ 79.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดในชั้นน้ำพบว่ามีความเป็นพิษต่ำโดย มีค่า  $CC_{50}$  มากกว่า 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Isaka และคณะ (2001) ศึกษาสารสกัดจากเชื้อราก่อโรคในแมลง *Cordyceps nipponica* ไอโซเลต BCC1389 พบว่าสารที่แยกได้คือ cordypyridones A และ B เมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งและนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง *P. falciparum* (K1, multidrug-resistant strain) พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. falciparum* โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.066 และ 0.037 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ

Isaka และคณะ (2005) ได้สกัดสารจากเส้นใยของเชื้อราที่ก่อโรคในแมลง *Aschersonia* ไอโซเลต BCC 8401 ด้วยเมทานอล ได้สาร ascherxanthone A และนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง *P. falciparum* (K1, multidrug-resistant strain) ด้วยวิธี microculture radioisotope พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. falciparum* โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ มะเร็งช่องปาก (oral carcinoma; KB), มะเร็งเต้านม (human breast cancer ;BC) และมะเร็งปอด (human lung cancer cells; NCI-H187) โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1.7, 1.7 และ 0.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สำหรับสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. anisopliae* ยังมีข้อมูลไม่เพียงพอต่อการยอมรับว่าสามารถนำมาใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยไม่มีผลข้างเคียงต่อร่างกายทั้งต่อเซลล์ปกติ หรือ สารพันธุกรรม อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. anisopliae* เป็นพิษเมื่อใช้เพื่อจุดประสงค์ในการเป็นควบคุมชีวภาพเป็นหลัก (Zimmermann, 1993) งานวิจัยของ Genthner และคณะ 1998 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเชื้อรา *M. anisopliae* ด้วยวิธี aquatic animal bioassay ต่อตัวอ่อนของกุ้ง (grass shrimp; *Palaemonetes pugio*), และตัวอ่อนของกบ (*Xenopus laevis*) พบว่าสารสกัดมีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนของกุ้งและตัวอ่อนของกบ โดยมีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ 52 และ 32 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดยังเป็นพิษต่อลูกปลาเกียก (*Gambusia affinis*) ที่ค่า  $LC_{50}$  141 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่เป็นพิษและทำให้ปลาตัวเต็มวัยตาย

Barbieri และคณะ (2005) ที่ได้ศึกษาการก่อภูมิแพ้ของสารสกัดจากเชื้อรา *M. anisopliae* ด้วย Tris-HCl ในหนู Balb/c mice ซึ่งพบว่าสารสกัดนี้มีส่วนประกอบที่ทำให้เกิดการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน และการอักเสบในหนู นอกจากนี้ยังสามารถก่อภูมิแพ้ได้มากขึ้นเมื่อทดสอบในหนูที่อ่อนแอ (Instanes และคณะ, 2006)

## 2.4 ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity)

การตรวจสอบการเกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต มีเทคนิคและวิธีการตรวจสอบที่หลากหลาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของการนำไปใช้ รวมไปถึงประสิทธิภาพของเทคนิคที่ใช้การตรวจสอบด้วย ตัวอย่างเช่น chromosome aberration, sisterchromatid exchange, micronucleus (MN) test และ FISH เป็นต้น ตัวอย่างของการตรวจสอบพิษต่อสารพันธุกรรม เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์หรือการเขียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4.1 การศึกษาความผิดปกติในรูปของการหักและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม (chromosome aberration)

เป็นวิธีที่นิยมตรวจจากระยะเมทาเฟส แต่การหักของโครโมโซมเกิดได้ทุกระยะของวัฏจักรเซลล์ ( $G_1$ , S,  $G_2$ ) เมื่อแบ่งเซลล์จนถึงระยะเมทาเฟสแล้วจึงจะนำมาศึกษารูปร่างของโครโมโซม ซึ่งโครโมโซมประกอบด้วยโครมาทิด 1 แท่ง เมื่อเซลล์อยู่ในระยะ  $G_1$  และ early S โครโมโซมจะประกอบด้วยโครมาทิด 2 แท่ง เมื่อเซลล์อยู่ในระยะ late S และ  $G_2$  เมื่อโครโมโซมหักในระยะใดระยะหนึ่งจะปรากฏว่ามีรูปร่างของโครโมโซมในระยะเมทาเฟสที่แตกต่างกัน สามารถแบ่งชนิดความผิดปกติของโครโมโซมได้ 2 แบบ คือ chromosome type aberration คือความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโครโมโซมในระยะ late S และ  $G_2$  และ chromatid type aberration คือความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโครโมโซมในระยะ  $G_1$  และ early S ซึ่งตัวอย่างของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม ยกตัวอย่าง เช่น

### 2.4.1.1 Single chromatid gap (SG)

ความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในส่วนของโครมาทิดแท่งใดแท่งหนึ่ง แต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกัน และแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยังมีเส้นใยโครมาทิน ยึดเห็นบางๆ (รูปที่ 2.8 ก) ให้นับเป็น 1 หักต่อ 1 SG

### 2.4.1.2 Isochromatid gap (ISCG)

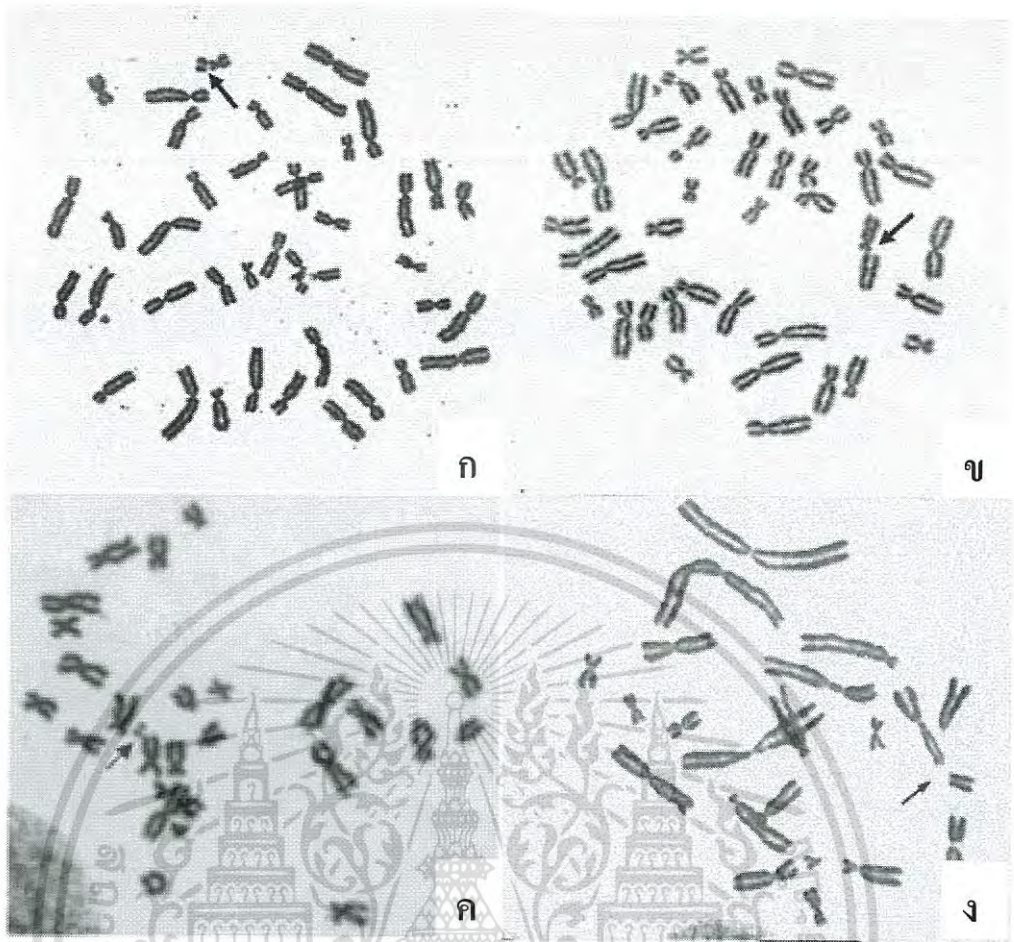
เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในส่วนของโครมาทิดทั้งสองแท่งของโครโมโซมเดียวกัน แต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกัน และแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยังมีเส้นใยโครมาทิน ยึดให้เห็นบางๆ (รูปที่ 2.8 ค) ให้นับเป็น 2 หักต่อ 1 ISCG

### 2.4.1.3 Single chromatid break (SB)

เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีโครมาทิดแท่งหนึ่งเกิดการหักหรือขาดออกจากกัน และแนวของปลายที่หักไม่อยู่ในแนวเดียวกัน (รูปที่ 2.8 ข) ในการนับจำนวน ให้นับเป็น 1 หักต่อ 1 SB

### 2.4.1.4 Isochromatid break (ISCB)

เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีโครมาทิดทั้งสองแท่งหักหรือขาดออกจากกัน โดยสิ้นเชิง และแนวของปลายที่หักไม่อยู่ในแนวเดียวกัน (รูปที่ 2.8 ง) ในการนับจำนวน ให้นับเป็น 2 หักต่อ 1 ISCB

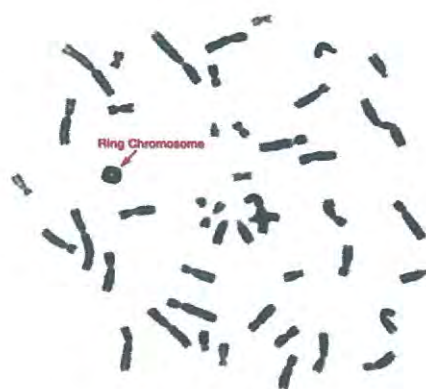


รูปที่ 2.8 ความผิดปกติของโครโมโซมแบบต่างๆ (ก) Chromatid gap, (ข) Chromatid break, (ค) Isochromatid gap และ (ง) Isochromatid break

ที่มา: <http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences>

#### 2.4.1.1 Ring chromosome

เป็นความผิดปกติที่เกิดเนื่องจากการขาดของแท่งโครโมโซม 2 ตำแหน่งคือในบริเวณเซนโทรเมียร์ และส่วนปลายของโครโมโซม ปลายเหนียวทั้งสองมาเชื่อมกันทำให้เกิดเป็นรูปวงแหวน ส่วนของแขนโครโมโซมอีกข้างหนึ่งมักปรากฏเป็นลักษณะแท่งสั้นๆ ของโครโมโซม (rod) รูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะ Ring chromosome

ที่มา <http://www.folk.uio.no/kjetilgb/rb.htm>

#### 2.4.2 การศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมแบบที่มีการสลับชิ้นส่วนของ sister chromatid (sister chromatid exchange)

เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการวิจัยสำหรับตรวจสอบ clastogenicity หรือ genotoxicity ซึ่งเทคนิคนี้จะตรวจวัดการสลับชิ้นส่วนของ sister chromatid โดยนำเซลล์เมทาเฟสมาเชื่อมต่อนิวคลีอัสและขณะการเพาะเลี้ยงเซลล์จะเติมสาร 5-bromodeoxyuridine ลงในอาหารเพาะเลี้ยงแล้วฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต การเชื่อมต่อนี้จะทำให้เกิดการติดสีต่างกันระหว่าง sister chromatid ทั้งสองของโครโมโซม โดยสายหนึ่งของ sister chromatid จะติดสีเข้มแต่อีกสายหนึ่งจะติดสีจาง (รูปที่ 2.10) ทั้งนี้หากมีการสลับชิ้นส่วนของ sister chromatid จะทำให้สังเกตเห็นได้ (อมรา, 2546 ; Bhattacharya และคณะ, 2005; Rowland, 2007)



รูปที่ 2.10 ลักษณะของการเกิด sister chromatid exchange

ที่มา : <http://www.vin.bg.ac.rs>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.4.3 การศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมในรูปของ micronuclei (MN)

เป็นวิธีประเมินความเสียหายเกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) หรือชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เกิดการแตกหักในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสถึงระยะแอนาเฟส (Udroiu, 2006) หลังจากโครโมโซมได้รับความเสียหายและไม่สามารถรวมตัวเป็น daughter nuclei ได้ จึงเป็นชิ้นส่วนโครโมโซมขนาดเล็กเกิดรอบๆ เยื่อหุ้มนิวเคลียส ชิ้นส่วนของ DNA ที่แตกหักจะไม่ถูกดึงเนื่องจากไม่มีเซนโทรเมียร์จึงเกิดเป็น micronucleus (MN) ที่มีขนาดเล็กกว่านิวเคลียสหลักอยู่ในเซลล์ (รูปที่ 2.11) (Fenech, 2006)

รูปที่ 2.11 ลักษณะของการเกิด micronucleus (MN)

ที่มา : Ahmed และคณะ 2011

ซึ่งโครโมโซมในระยะเมทาเฟสเป็นระยะที่เหมาะสมในการศึกษามากที่สุดจึงนิยมทำการศึกษาในวิธีที่หนึ่งและสอง และวิธีแรกเป็นที่นิยมมากที่สุดเนื่องจากมีเทคนิคที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มาหยุดอยู่ในระยะเมทาเฟสได้ จึงทำให้มีจำนวนเซลล์เมทาเฟสเพียงพอในการศึกษา อีกทั้งรูปร่างของโครโมโซมระยะนี้จะมีความชัดเจนมาก รอยหักและแตกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมแบบต่างๆ จึงสังเกตได้ง่าย

### 2.4.4 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อศึกษาโครโมโซม (อมรา, 2546)

การศึกษาเพื่อตรวจสอบจำนวนและรูปร่างของโครโมโซมมีหลายวิธีซึ่งแต่ละวิธีจะเลือกศึกษาเซลล์ในระยะเมทาเฟส (metaphase) เพราะเป็นระยะที่เซลล์มีโครโมโซมหดสั้นมากที่สุดและเห็นลักษณะได้ชัดเจน ในการเก็บเกี่ยวเซลล์ในระยะเมทาเฟสจะใช้สารยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิล (spindle inhibitor) เช่น โคลซิมิด (colcemid) ทำให้เซลล์ที่มีการแบ่งตัวไม่สามารถเข้าสู่ระยะแอนาเฟส (anaphase) ได้ และจะทำให้เห็นโครโมโซมกระจายอยู่ที่ตรงกลางเซลล์ สำหรับวิธีการเตรียมโครโมโซมแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีโดยตรง (direct chromosome preparation) และวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยอ้อม (indirect chromosome preparation) วิธีโดยตรงเป็นวิธีที่เลือกเอาเซลล์ในร่างกายที่กำลังมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสมาศึกษา เนื่องจากเป็นเซลล์ที่ยังอ่อนและยังมีการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลา เช่นเซลล์เม็ดเลือดจากไขกระดูก (bone marrow) ส่วนวิธีโดยอ้อมนั้นจะเลือกเซลล์ในร่างกายชนิดที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย (in vitro) ให้เซลล์มีการแบ่งตัว การเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจะนำเซลล์เม็ดเลือดขาวจากกระแสเลือด ซึ่งเป็นเซลล์ที่แก่หรือหยุดแบ่งตัวแล้วมากระตุ้นให้เซลล์กลับสู่วัฏจักรการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ต่อมาได้มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงโดยเติมสารกระตุ้นการแบ่งตัวชนิด phytohemagglutinin (PHA) เป็นสารประเภท mitogen stimulating agent (สารก่อเกิดการแบ่งไมโทซิส) จะช่วยกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte เพิ่มจำนวนมากขึ้นและเริ่มมีการแบ่งเซลล์ไมโทซิสจะได้เซลล์เมทาเฟสมากเพียงพอในการศึกษาซึ่งนับว่าเป็นข้อดี ได้ผลที่รวดเร็ว

Sontake และ Fulzele (2009) ได้เลี้ยงเลือดเพื่อทดสอบกับ Mitomycin C ในอาหาร RPMI-1640 ที่เสริมด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อทดสอบ MMC ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์ (mitotic inhibition) แต่พบว่าความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่บ่มร่วมกับ MMC นานขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง พบผิดปกติของโครโมโซมมากกว่าการใช้ความเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 1 ชั่วโมง และที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบความผิดปกติของโครโมโซมมากที่สุด ซึ่งได้สรุปว่าอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของ MMC เท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับเวลาที่บ่มร่วมด้วย โดย MMC ไม่ชักนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบสุ่ม ซึ่งจะมีผลต่อโครโมโซมคู่ที่ 1, 9 และ 16 ของมนุษย์

Celik และคณะ (2009) ได้ศึกษาสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Fusarium* ได้สาร moniliformin (MON) ซึ่งนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม โดยเลี้ยงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาว (blood lymphocytes) ที่ความเข้มข้น 2.5-25 ไมโครโมลาร์ ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ตรวจสอบความผิดปกติแบบ chromosomal aberration, sister-chromatid exchange และ micronucleus (MN) พบว่าสารสกัดทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบ chromosomal aberration ได้ เมื่อใช้ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 ไมโครโมลาร์

Genthner และคณะ (1998) ทดสอบสารสกัดจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธี Ames test ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* TA98 และ TA100 พบว่าสารสกัดไม่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (mutagenicity)

## บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

#### 3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.1.1.1 กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
- 3.1.1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope)
- 3.1.1.3 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (balance)
- 3.1.1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge)
- 3.1.1.5 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
- 3.1.1.6 เครื่องระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator)
- 3.1.1.7 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH-meter)
- 3.1.1.8 เครื่องอบลมร้อน (hot air oven)
- 3.1.1.9 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิและคาร์บอนไดออกไซด์ (Incubator)
- 3.1.1.10 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator)
- 3.1.1.11 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
- 3.1.1.12 ตู้ปลอดเชื้อ (astec micro flow)
- 3.1.1.13 ตู้ดูดควัน (protector laboratory hood)
- 3.1.1.14 ตู้เย็น (refrigerator)
- 3.1.1.15 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (high pressure steam sterilizer)
- 3.1.1.16 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 3.1.1.17 Microtiter plate reader

#### 3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์เครื่องแก้ว

- 3.1.2.1 กระดาษกรองขนาด 0.45 และ 0.2 ไมโครเมตร
- 3.1.2.2 กระบอกตวง (cylinder)
- 3.1.2.3 กระบอกฉีดขนาด 10 มิลลิลิตร (syringe)
- 3.1.2.4 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (erlenmeyer flask)
- 3.1.2.5 ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (T flask)
- 3.1.2.6 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (plate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.2.7 งานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate)
- 3.1.2.8 ชุดกรองอาหาร (filter)
- 3.1.2.9 เครื่องดูด (suction)
- 3.1.2.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (burner)
- 3.1.2.11 บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.1.2.12 ปิเปต (pipette) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.1.2.14 ปากคีบ (forceps)
- 3.1.2.15 หลอดทดลอง (test tube)
- 3.1.2.16 หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube)
- 3.1.2.17 ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
- 3.1.2.18 อุปกรณ์ถ่ายรูป (camera)
- 3.1.2.19 อุปกรณ์สำหรับเจาะเชอร์รา (cork borer)
- 3.1.2.20 เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
- 3.1.2.21 แผ่นดิสก์ (paper disc) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร
- 3.1.2.22 ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (sterile cotton swab)
- 3.1.2.23 ไมโครปิเปต (microliter pipette)
- 3.1.2.24 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Heamacytometer)

### 3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato Dextrose Agar (PDA)
- 3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato Dextrose Broth (PDB)
- 3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Mueller Hinton Agar (MHA)
- 3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Mueller Hinton Broth (MHB)
- 3.2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient Agar (NA)
- 3.2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640)
- 3.2.7 กรดอะซิติก (acetic acid) เกรดวิเคราะห์
- 3.2.8 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) เกรดวิเคราะห์
- 3.2.9 เฮปาริน (heparin)
- 3.2.10 โคลซีมิด (Colcemid)
- 3.2.11 เอทิลอะซิเตต (ethylacetate) เกรดการค้า
- 3.2.12 เฮกเซน (hexane) เกรดการค้า

### 3.2.13 เมทานอล (methanol) เกรดการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการขงนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.14 เมทานอล เกรดวิเคราะห์
- 3.2.15 โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride)
- 3.2.16 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)
- 3.2.17 โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate)
- 3.2.18 สีย้อมทริปแฟนบลู (trypan blue)
- 3.2.19 สีย้อมจิมซ่า (giemsa)
- 3.2.20 ทริปซิน (trypsin 1: 250)
- 3.2.21 เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซีติก แอซิด (ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA)
- 3.2.22 ซีรั่มบอวีน (Fetal Bovine Serum; FBS)
- 3.2.23 ไฟโตฮีแมกกลูตินิน (phytohemagglutinin-M; PHA)
- 3.2.24 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide: MTT)

### 3.3 เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

- 3.3.1 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (human colon adenocarcinoma: HT-29)
- 3.3.2 เซลล์มะเร็งเต้านม (human breast carcinoma: MCF-7)
- 3.3.3 เซลล์ไตลิง (african green monkey kidney: Vero)
- 3.3.4 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (murine leukemia cell: P388)

ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.พรทิพา พิชา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

- 3.3.5 เซลล์มะเร็งตับ (human hepatocellular carcinoma: HepG-2)

ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. อุ่นเรือน เพชรวิทย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### 3.4 เชื้อราและเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

#### 3.4.1 เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของนฤมล (2553) ได้แยกเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงจำนวน 33 ตัวอย่าง จากแมลงจำนวน 18 ไอโซเลต และจากดิน 15 ไอโซเลต นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA และเทคนิคทางโมเลกุลในบริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacers) โดยใช้เทคนิค PCR สามารถจัดเชื้อรา *M. anisopliae* ได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกเชื้อราจำนวน 5 ไอโซเลต ซึ่งเป็นตัวแทนจากแต่ละกลุ่มในการศึกษา โดยเชื้อราแต่ละไอโซเลตได้รับความอนุเคราะห์จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1.1 ไอโซเลต MA001 จากเชื้อรา *M. anisopliae* BCC2481 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

3.4.1.2 ไอโซเลต MA002 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

3.4.1.3 ไอโซเลต MA017 แยกตัวอย่างจากแมลงหางหนีบ แปลงข้าวโพด จังหวัดนครราชสีมา

3.4.1.3 ไอโซเลต MA019 แยกตัวอย่างจากตัวอ่อนด้วงอ้อย จังหวัดกาญจนบุรี

3.4.1.3 ไอโซเลต SNB03 แยกตัวอย่างจากดิน จังหวัดเชียงใหม่

สำหรับเชื้อราแต่ละ ไอโซเลต ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. สุภัตรา โพธิ์เยี่ยม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

#### 3.4.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

3.4.2.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

3.4.2.2 *Staphylococcus aureus* ATCC25923

3.4.2.3 *Micrococcus luteus* ATCC9341

3.4.2.4 *Escherichia coli* ATCC25922

3.4.2.5 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

ได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

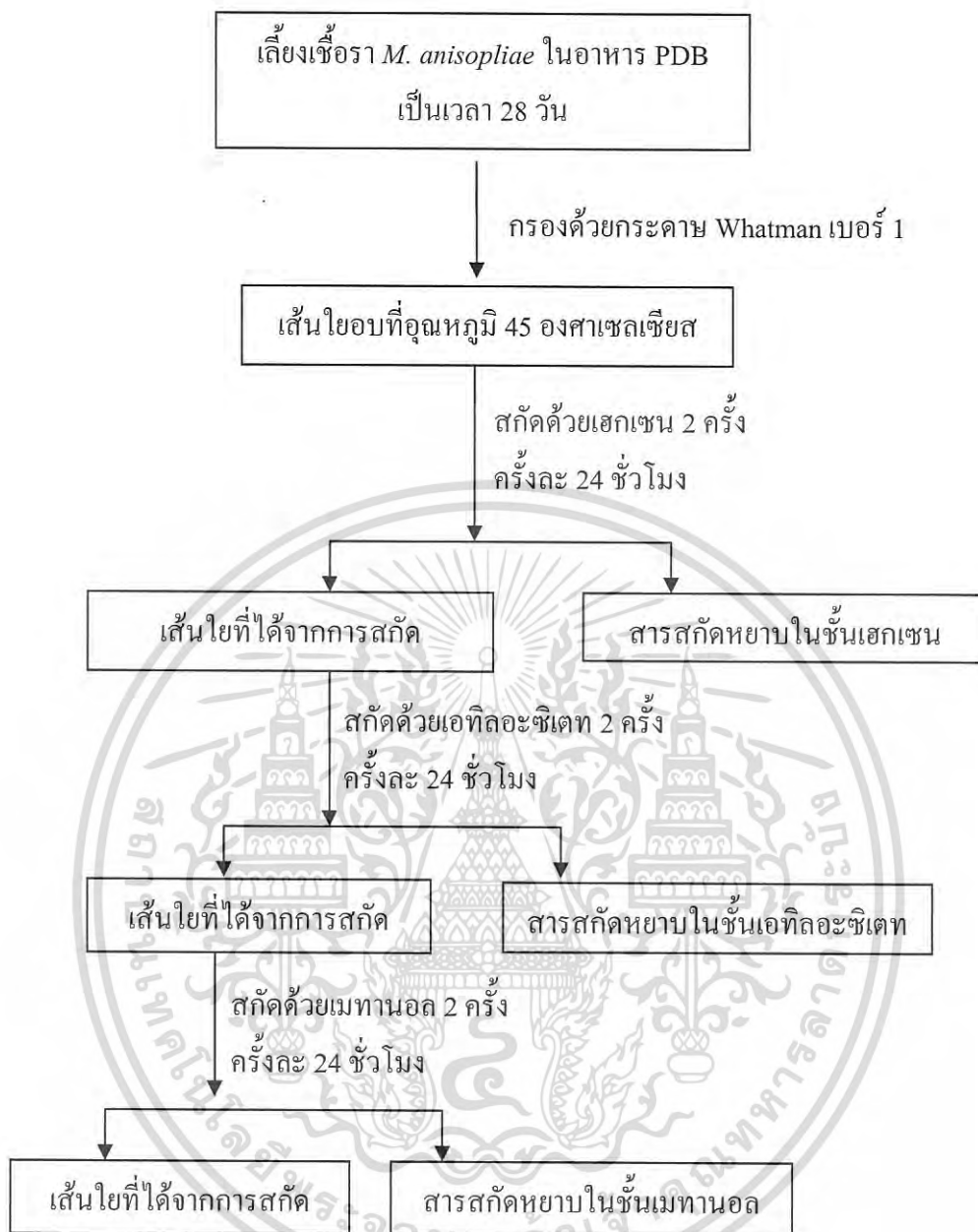
### 3.5 วิธีการสกัดสารจากเชื้อรา *M. anisopliae*

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 5 ไอโซเลต คือ MA001, MA002, MA017, MA019 และ SNB03 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นใช้ cock borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วเผาไฟทิ้งให้เย็น เจาะรูบนบริเวณส่วนที่มีเส้นใยเจริญ แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อเผาไฟ เขี่ยขึ้นรูกลงในอาหาร PDB ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หรือใช้ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 8 ออนซ์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 28 วัน จากนั้นแยกเส้นใยนำมาทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 วัน หรือจนกระทั่งเส้นใยมีน้ำหนักคงที่ นำส่วนของเส้นใยที่ได้มาบดให้ละเอียด สกัดด้วยตัวทำละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล

ตามลำดับ ในอัตราส่วนเส้นใย 1 กรัมต่อปริมาตรตัวทำละลาย 15 มิลลิลิตร ปิดฝาทิ้งไว้บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 กากที่เหลือทำการสกัดซ้ำด้วยเฮกเซนอีกครั้ง นำส่วนที่กรองได้ใส่ในขวด Pear shape ขนาด 1,000 มิลลิลิตร นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เรียกสารสกัดในส่วนนี้ว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเฮกเซน ซึ่งน้ำหนักรวบรวมสารสกัดที่ได้ นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบที่ได้ต่อน้ำหนักเส้นใยของเชื้อรา และเก็บให้แห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป ต่อมานำเส้นใยของเชื้อราที่สกัดด้วยเฮกเซนแล้วมาแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ลำดับต่อมาคือ ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และลำดับสุดท้ายคือตัวทำละลายเมทานอล ดังแสดงตามรูปที่ 3.1 โดยทำทุกขั้นตอนเหมือนวิธีสกัดสารในตัวทำละลายเฮกเซน จนได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae*

### 3.6 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

#### 3.6.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Micrococcus luteus* ATCC9341 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดคือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 นำแบคทีเรียมาขีด (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มที่เอกซารีนเป็นเอกซารีนที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อ *B. subtilis* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือโคโลนีเดียวของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร Nutrient broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อ *B. subtilis* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่น (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.5 ถ้าค่าความขุ่นที่ได้มีค่ามากสามารถทำการเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ จะได้เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียที่มีความหนาแน่นประมาณ  $1.0 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับทดสอบวิธี paper disc diffusion และเจือจางต่ออีก 100 เท่าจะได้เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียที่มีความหนาแน่นประมาณ  $1.0 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับทดสอบวิธี broth dilution

### 3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี paper disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion เทคนิคนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Ansari และคณะ (2005) โดยละลายสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ด้วยตัวทำละลายเมทานอลร้อยละ 99.7 ให้ได้สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางที่ละสองเท่า (2-fold dilution) ให้มีความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยอดสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นดิสก์เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เมทานอล เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) รอทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 30-50 นาที จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่หนึ่งฆ่าเชื้อจุ่มในแบคทีเรียที่ทราบความเข้มข้นแล้ว ตามวิธีการในข้อ 3.6.1 ซับให้แห้งกับข้างหลอดทดลอง แล้วป้าย (swab) ให้ทั่วบนผิวอาหารแข็ง mueller hinton agar (MHA) หมุนจานเพาะเชื้อและทำซ้ำอีกครั้ง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง จากนั้นนำปากคีบ คีบแผ่นดิสก์วางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยให้สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 0.625-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบอยู่ในจานเดียวกัน โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสำหรับเชื้อ *B. subtilis* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) บันทึกผลการทดลองโดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร ซึ่งแสดงถึงความสามารถของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี broth dilution

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อรา *M. anisopliae* ทุกไอโซเลต มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *M. luteus* ได้ แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* จึงได้นำสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทมาหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration; MIC) โดยวิธี broth dilution ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Doughari (2006) โดยนำสารสกัดในแต่ละชั้นของตัวทำละลายละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้นร้อยละ 20 จากนั้นเจือจางสารสกัดในลักษณะลดลงทีละ 2 เท่า (2-fold dilution) จากความเข้มข้นเริ่มต้น 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 และ 0.156 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมเชื้อแบคทีเรียให้มีเซลล์แขวนลอยความหนาแน่นประมาณ  $1.0 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีการในข้อ 3.6.1 จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด 96 หลุม มาเติมอาหารเหลว MHB หลุมละ 45 ไมโครลิตร และเติมสารสกัดในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อแบคทีเรียลงไปในหลุมหลุมละ 5 ไมโครลิตร ให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลุมเท่ากับ 100 ไมโครลิตร จะทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในหลุมเท่ากับ 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156 และ 0.078 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีตัวควบคุมเชิงลบ คือ DMSO ร้อยละ 10 แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiter plate reader บันทึกความขุ่นของตัวอย่างในแต่ละหลุม จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อ *B. subtilis* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่าความขุ่นของตัวอย่างอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบค่าความขุ่นระหว่างก่อนบ่มเชื้อและหลังบ่มเชื้อ สารสกัดที่ระดับความเข้มข้นซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้จะมีค่าความขุ่นของอาหารเหลวหลังบ่มไม่เพิ่มขึ้นจากค่าความขุ่นของของเหลวก่อนบ่ม โดยระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ จะนำมาบันทึกเป็นค่า MIC

## 3.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

### 3.7.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว

เซลล์ไลน์ชนิดเกาะติดพื้นผิวที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่ เซลล์ไลน์ 4 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์ไตลิง (Vero) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG-2) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 ที่มี fetal bovine serum (FBS) 8 เปอร์เซ็นต์ ในพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยในการเพาะเลี้ยงเซลล์จะต้องทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเพื่อการคงอยู่ของเซลล์ และต้องทำการถ่ายเซลล์ (subculture) เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งมีวิธีการคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มาดูดอาหารเก่าออกและใส่ phosphate buffer saline (PBS) ที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  และ  $Mg^{2+}$  ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง เพื่อล้างเศษเซลล์และซีรัมที่เหลือออก ดูด PBS ทิ้ง จากนั้นใส่เอนไซม์ทริปซิน เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะ ซึ่งสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ดูดทริปซินออก จากนั้นทำการเติมอาหาร RPMI-1640 ที่มี FBS 8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กลับอาหารให้ทั่วพลาสติก และเคาะพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์กับมือเพื่อให้เซลล์หลุดออกจากการยึดเกาะกับพลาสติก นำไปส่งใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ จากนั้นเปิด ขึ้น-ลงให้เข้ากัน ดูดอาหารทิ้งและเหลือเซลล์ไว้ในขวดเพาะเลี้ยงประมาณ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดอาหารใหม่ประมาณ 4.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์เดิม นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยสังเกตจากปริมาณของเซลล์เจริญเต็มพื้นผิวของภาชนะ จึงทำการถ่ายเซลล์ หรือเปลี่ยนอาหารใหม่ต่อไป

### 3.7.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ชนิดแขวนลอย

เซลล์ไลน์ชนิดแขวนลอยที่ใช้ในการทดลอง คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนู (P388) ทำการเพาะเลี้ยงโดยเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 ที่มี FBS 8 เปอร์เซ็นต์ ในพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยในการเพาะเลี้ยงเซลล์จะต้องทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเพื่อการคงอยู่ของเซลล์ และเพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์ มีวิธีการคือ

ใช้เปิดดูดพ่นเซลล์ไลน์ที่เลี้ยงอยู่ในพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เซลล์กระจายตัว จากนั้นดูดเซลล์ออกโดยให้เหลือเซลล์ไว้ในพลาสติกเพาะเลี้ยงประมาณ 0.3 - 0.5 มิลลิลิตร เปิดอาหารใหม่ประมาณ 4.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์เดิม จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์

### 3.7.3 การศึกษากราฟการเจริญ (Growth curve) ของเซลล์ไลน์

นำเซลล์ไลน์ P388 ที่ได้เพาะเลี้ยงไว้ในพลาสติกขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาทำการดูดพ่นเซลล์เพื่อให้เซลล์แขวนลอยที่เกาะกันอยู่แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นดูดเซลล์ออกมานับจำนวนและคำนวณเซลล์ที่มีชีวิต (ภาคผนวก ข) จากนั้นปลูกเซลล์ลงในจานเพาะเชื้อเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร จำนวน 14 จานเพาะเลี้ยง โดยให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตตั้งต้นเท่ากับ  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร สำหรับเซลล์ไลน์ HT-29, MCF-7, Vero และ HepG-2 นำพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มาดูดอาหารเก่าออกและใส่ PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อล้างเศษเซลล์ออก ดูด PBS ทิ้ง จากนั้นใส่เอนไซม์ทริปซิน เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้และประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้เซลล์เริ่มหลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะ จากนั้นทำการเติมอาหาร RPMI-1640 ที่มี FBS 8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กลับอาหารให้

ทั่วพลาสติก และเกาะพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์กับมือเพื่อให้เซลล์หลุดออกจากการยึดเกาะกับพลาสติก จากนั้นนำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และนำเซลล์ที่ได้มารวมกันในขวดและทำการเจือจางด้วยอาหาร RPMI-1640 ที่มี FBS 8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรประมาณ 2-3 มิลลิลิตร คูดเซลล์ออกมานับจำนวนและคำนวณเซลล์ที่มีชีวิต ปลูกเซลล์มีชีวิตเริ่มต้นเท่ากับ  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรทั้งหมด 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นับจำนวนเซลล์ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน โดยนับจำนวน 2 จานเพาะเลี้ยงต่อ 1 วันวิธีการนับจำนวนเซลล์เริ่มจากดูดพ่นให้เซลล์ที่เกาะหลุดออกจากกัน คูดเซลล์แขวนลอยออกมาปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นแยกสารขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมหริบแพนบลูปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันคูดเซลล์ที่ย้อมหริบแพนบลูแล้วลงในฮีมาไซโตมิเตอร์ตรวจสอบความมีชีวิตด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีสีใสไม่ติดสีฟ้าส่วนเซลล์ตายจะติดสีฟ้าของหริบแพนบลู ทำการนับเซลล์และคำนวณเซลล์ที่ได้บันทึกจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตนำข้อมูลที่ได้แสดงในรูปของกราฟการเจริญของเซลล์และคำนวณหาค่าของจำนวนเซลล์ที่เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Population doubling , PDT) (อุ๋นเรื่อน เพชรวัลย์ อ้างถึงใน Mitsuhashi, 2002)

$$PDT = (t - t_0) \log 2 / (\log N - \log N_0)$$

เมื่อ  $t_0$  = เวลาเริ่มต้นที่นับเซลล์หรือปลูกเซลล์ (ชั่วโมงหรือวัน)  
 $t$  = เวลาที่เก็บเกี่ยวเซลล์ ช่วงที่เซลล์มีการเจริญสูงสุด (ชั่วโมงหรือวัน)  
 $N_0$  = จำนวนเซลล์ที่ปลูก (มิลลิลิตรหรือตารางเซนติเมตร) ณ เวลา  $t_0$   
 $N$  = จำนวนเซลล์ที่เก็บเกี่ยว (มิลลิลิตรหรือตารางเซนติเมตร) ณ เวลา  $t$

### 3.7.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae*

#### โดยวิธี MTT assay

##### 3.7.4.1 การปลูกเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบด้วยวิธี MTT ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Mosmann (1983) ทำโดยเตรียมเซลล์เริ่มต้นตามวิธีการในข้อ 3.7.3 โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 ที่มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ นับจำนวนเซลล์ด้วยวิธีหริบแพนบลู จากนั้นปลูกเซลล์เริ่มต้นในแต่ละหลุมเป็น  $1.5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^5$ ,  $0.8 \times 10^5$  และ  $1.5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในเซลล์ชนิด HT-29, MCF-7, HepG2, P388 และ Vero ตามลำดับ โดยหยอดเซลล์ลงใน 96-well plate โดยให้แต่ละหลุมมีปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการเขียนขึ้นเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.7.4.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae*

ซึ่งสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ปริมาณ 300 มิลลิกรัม ละลายใน DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม PBS 9 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดหยาบปริมาณ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองสารผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร สารสกัดที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นของ DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อต้องการทดสอบให้เจือจางสารสกัดหยาบด้วยอาหาร RPMI-1640 ที่มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเข้มข้นเริ่มต้น 4000, 2000, 1000, 500 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน 96-well plate ที่บ่มไว้มาใส่สารสกัดหยาบที่ได้เจือจางไว้แล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในหลุมเป็น 2000, 1000, 500, 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการทดสอบจำนวน 5 หลุม ต่อ 1 เซลล์ สำหรับเซลล์ HepG-2 ทำการทดสอบจำนวน 4 หลุม (ต่อ 1 ซ้ำ) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยมีกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารใดๆ (0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และกลุ่มที่ไม่ใส่เซลล์ (blank) หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในการทดลองจะควบคุมให้เปอร์เซ็นต์ของ DMSO ไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงการทำลายเซลล์จากฤทธิ์ของ DMSO ที่เข้มข้นเกินไป (เปรมวดี, 2549)

ทั้งนี้สารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถละลายได้ใน DMSO และกรองผ่านตัวกรองได้หมด ยกเว้นสารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตทที่สามารถละลายใน DMSO ได้หมด แต่เมื่อเติม PBS ลงไปจะเกิดลักษณะขุ่นเป็น คอลลอยด์ (colloid) สีนวล เมื่อนำไปกรองผ่านตัวกรองสามารถกรองได้ง่าย แต่จะเหลือบางส่วนที่ติดอยู่บนกระดาษกรองจึงได้นำไปชั่งน้ำหนักของสารที่ติดอยู่บนกระดาษกรองแล้วจึงมาคำนวณความเข้มข้นของสารที่เหลือในขวดอีกครั้ง

### 3.7.4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* โดยวิธี MTT assay

นำเซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบใน 96-well plate มาเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มต่อเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ละลายผลึกฟอรัมาซานด้วยสารละลาย DMSO ต่อเอทานอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) และค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เซลล์เป็นพิษ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration:  $CC_{50}$ ) ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 5 ในการทดลองใช้อาหารเพื่อเป็นชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารใดๆ (0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใช้ DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และใช้ mitomycin C ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 3.7.4.4 การเตรียม mitomycin C เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก

การทดลองในครั้งนี้ใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C เป็นชุดควบคุมเชิงบวกจึงต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดย mitomycin C จากขวด stock จะมีความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยอาหาร RPMI-1640 ที่มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า โดยใช้ความเข้มข้นสูงสุดเริ่มต้น เท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางต่อมีความเข้มข้น 20, 10, 5 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน 96-well plate ที่บ่มไว้มาใส่ mitomycin C ที่ได้เจือจางไว้แล้วหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ mitomycin C ในหลุมเป็น 20, 10, 5, 2.5 และ 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้วิธีการเดียวกับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* นำค่าที่ได้มาหาค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ และค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เซลล์เป็นพิษ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration:  $CC_{50}$ ) ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 5

### 3.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity test)

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดเมื่อทดสอบกับเซลล์ P388 จึงเลือกมาเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม โดยมีวิธีการดังนี้

#### 3.8.1 การเตรียมเลือด

เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำของบุคคลตัวอย่างจำนวน 4 คน แบ่งเป็นเพศชาย 2 คนและเพศหญิง 2 คน โดยเจาะเลือดแต่ละคนประมาณ 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีสารเฮปารินเขย่าเบาๆ ให้เลือดกับเฮปารินเข้ากันโดยใช้เฮปาริน 50 I. U ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัว

#### 3.8.2 การเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

เตรียมขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อแล้ว ใส่อาหาร RPMI 1640 ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 5 มิลลิลิตร แล้วเติม phytohemagglutinin (PHA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เลือดชนิด whole blood ปริมาณ 10 หยด ลงไป แล้วปิดจุกขวดให้สนิท เก็บในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบชั่วโมงที่ 48 หยดสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท จากไอโซเลต SNB03 ความเข้มข้น 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มควบคุมใส่อาหาร RPMI 1640 ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับ mitomycin C ความเข้มข้น 2 และ 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ก่อนครบชั่วโมงที่ 72 ประมาณ 30 นาที หยดโคซิมิตความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงไปในทุกขวดขวดละ 50

ไมโครลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 72 ชั่วโมงจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยในทุกขั้นตอนทำในตู้ปลอดเชื้อ

### 3.8.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์เม็ดเลือดขาว

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบ 72 ชั่วโมงแล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยเทอาหารและเซลล์ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นดูดส่วนที่เป็นน้ำใสตอนบนทิ้ง ใส่สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ ลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ออกแล้วดูดส่วนใสที่เป็นน้ำใสตอนบนทิ้ง อาจจะทำซ้ำเป็นจำนวน 2 ครั้ง หากพิจารณาแล้วว่าเซลล์ยังไม่แตก ทำให้เซลล์คงสภาพโดยใช้น้ำยาคงสภาพ (fixative solution) ที่เย็นจัด ซึ่งประกอบด้วยเมทานอล 3 ส่วน และกรดอะซิติก 1 ส่วน ลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตร โดยการหยดน้ำยาคงสภาพที่ละลายพร้อมทั้งเขย่าเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง หรือจนกระทั่งพบว่าตะกอนสีขาวขุ่นที่ก้นหลอดทดลองสะอาดดี เติมน้ำยาคงสภาพที่เตรียมใหม่ๆ ลงผสมกับเซลล์ที่อยู่ก้นหลอดเขย่าเบาๆ ปรับให้มีความขุ่นพอเหมาะ

### 3.8.4 การเตรียมสไลด์และการย้อมสีเพื่อศึกษาโครโมโซม

นำสไลด์มาหยดน้ำยาคงสภาพแล้วเช็ดด้วยผ้าสะอาด จากนั้นนำเซลล์ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวหยดลงบนสไลด์ประมาณ 2 หยด โดยพยายามไม่ให้แต่ละหยดซ้ำที่เดิม อาจหยดตามด้วยน้ำยาคงสภาพแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำโครโมโซมไปย้อมด้วยสียิมซา 10 เปอร์เซ็นต์ในไนโน ไวส์บัฟเฟอร์ pH 7.2 นานประมาณ 10 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นทิ้งไว้ให้แห้ง

### 3.8.5 การเลือกเซลล์ที่ทำการตรวจนับและรายงานการศึกษาโครโมโซม

ในการตรวจนับโครโมโซมจะนับเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส (metaphase) โดยนำสไลด์ตัวอย่างที่ย้อมสีแล้วมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งตรวจสอบและบันทึกผลความผิดปกติ ดังนี้

3.8.5.1 กรณีศึกษาพิษของสารที่มีต่อเซลล์ (cytotoxicity) โดยการวัดค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index หรือ MI) ซึ่งได้จากการตรวจดูเซลล์ของเม็ดเลือดขาวโดยวิธีสุม โดยคิดเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์แบ่งใน 2,000 เซลล์ ในกลุ่มทดลองต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแบ่งในจำนวน 2000 เซลล์ของกลุ่มควบคุมดังนี้

$$\text{Mitotic index} = (A/B) \times 100$$

เมื่อ A = จำนวนเซลล์ในระยะเมตาเฟสจากเซลล์เม็ดเลือดขาว 2000 เซลล์ในหน่วยทดลอง  
 B = จำนวนเซลล์ในระยะเมตาเฟสจากเซลล์เม็ดเลือดขาว 2000 เซลล์ในชุดควบคุม

3.8.5.2 กรณีศึกษาพิษของสารที่มีต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity) ศึกษาจากเซลล์ระยะเมตาเฟสที่มีโครโมโซมกระจายดี แต่ละเซลล์จะมีจำนวนโครโมโซม 46 แท่ง ถ้ามีจำนวนขาดหรือเกินจะอยู่ในจำนวน  $46 \pm 1$  แท่ง เท่านั้น ตรวจสอบผลการเหนี่ยวนำสารต่อโครโมโซมโดยวิธีการนับจำนวนหักของโครโมโซม นับจากเซลล์ระยะเมตาเฟสจำนวน 50 เซลล์ จดบันทึกชนิดของการหักและนับจำนวนหักตามชนิดการหักดังนี้

3.8.5.2.1 single chromatic gap (SG) ความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในส่วนของโครมาทิดแท่งใดแท่งหนึ่ง แต่ไม่ถึงขาดออกจากกันและแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยังมีเส้นใยโครมาทิน (chromatin) ยึดให้เห็นบางๆ ให้นับเป็น 1 หักต่อ 1 SG

3.8.5.2.2 isochromatid gap (ISCG) เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในส่วนโครมาทิดทั้งสองแท่งของโครโมโซมเดียวกัน แต่ไม่ถึงขาดออกจากกันและแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกันจะนับเป็น 2 หักต่อ 1 ISCG

3.8.5.2.3 single chromatid break (SB) เป็นความผิดปกติที่จะมีโครมาทิดแท่งหนึ่งเกิดหักหรือขาดออกจากกันโดยสิ้นเชิง และแนวทางของปลายที่หักไม่อยู่ในแนวเดียวกันในการนับจำนวนที่หักจะนับจำนวนที่หักเป็น 1 หักต่อ 1 SB

3.8.5.2.4 isochromatid break (ISCB) เป็นความผิดปกติที่จะมีโครมาทิดทั้งสองแท่งหักออกจากกันโดยสิ้นเชิงปลายของโครมาทิดที่อยู่ในแนวเดียวกันและนับจำนวนที่หักเป็น 2 หักต่อ 1 ISCB

ในการคำนวณค่าเฉลี่ยจำนวนหักของโครโมโซมจะนับจำนวนหักทั้งหมด คำนวณหาค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มที่ศึกษา และนำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษาใน 4 ชั่วโมงในสารละลายที่มาจากสารสกัดหยาบแล้วนำเสนอการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองแต่ละระดับความเข้มข้นกับกลุ่มควบคุม

### 3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการทดลองหาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในการยับยั้งจุลินทรีย์และความเป็นพิษต่อเซลล์ได้วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวางแผนการทดลองแบบ factorial experiment in CRD โดยทำการทดลอง 3 ชั่วโมง นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Analysis of Variance, ANOVA) และวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันของสิ่งทดลอง ด้วยวิธีของดันแคน (Duncan's New Multiple Range Test; DMRT) โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย โปรแกรม SPSS 14.0 for window ที่ระดับนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )

สำหรับการทดลองหาความเป็นพิษต่อสารพิษธรรมชาติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติแบบ one way ANOVA โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีด้วยวิธีของดันแคน โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 14.0 for window ที่ระดับนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อรา

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ MA001, MA002, MA017, MA019 และ SNB03 ในอาหาร PDB เป็นเวลา 28 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา นำเชื้อราที่ได้มากรองแยกส่วนเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำส่วนของเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน หรือจนกระทั่งเส้นใยมีน้ำหนักคงที่ โดยลักษณะของเส้นใยจากเชื้อรา *M. anisopliae* ที่อบแล้วของตัวอย่าง ไอโซเลต MA001 และ MA002 เป็นดังรูปที่ 4.1 ก และ ข ตามลำดับ จากนั้นนำเส้นใยที่อบแล้วไปบด และนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ ทำให้สามารถแยกสารออกมาได้ตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาหาเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบที่ได้คือน้ำหนักของเส้นใย พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลของเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวอย่าง โดยพบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลจะได้เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบต่อเส้นใยมากที่สุด และจากตัวทำละลายเฮกเซน ได้เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบต่อเส้นใยน้อยที่สุด ดังรายละเอียดในแต่ละ ไอโซเลตและตัวทำละลาย ในตารางที่ 4.1 สารสกัดหยาบได้จากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละ ไอโซเลตมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน โดยสารสกัดหยาบในชั้นของเฮกเซนมีลักษณะเป็นไขมันสีเหลือง ส่วนสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเอทิลอะซิเตทมีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลเข้ม และสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเมทานอล มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม แสดงดังตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะของเส้นใยเชื้อราที่ทำแห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

(ก) MA001 และ (ข) MA002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* และเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบที่ได้ต่อน้ำหนักแห้งของเชื้อรา

ไอโซเลต	ชนิดตัวทำละลาย	ลักษณะของสารสกัดหยาบ	น้ำหนักของสารสกัดหยาบ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบ
MA001	เฮกเซน	ไขมันสีเหลือง	0.65	1.09
	เอทิลอะซิเตท	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม	1.37	2.28
	เมทานอล	เป็นสารหนืดสีน้ำตาล	2.83	4.72
MA002	เฮกเซน	ไขมันสีเหลือง	0.53	0.93
	เอทิลอะซิเตท	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม	1.41	2.72
	เมทานอล	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม	3.46	5.48
MA017	เฮกเซน	ไขมันสีเหลือง	0.69	0.93
	เอทิลอะซิเตท	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม	2.54	3.39
	เมทานอล	สารหนืดสีน้ำตาลดำ	3.02	4.03
MA019	เฮกเซน	ไขมันสีเหลือง	0.41	0.60
	เอทิลอะซิเตท	ของแข็งสีน้ำตาล	1.42	2.09
	เมทานอล	สารหนืดสีน้ำตาลดำ	2.34	3.44
SNB03	เฮกเซน	ไขมันสีเหลือง	0.55	1.00
	เอทิลอะซิเตท	ของแข็งสีน้ำตาล	1.97	3.94
	เมทานอล	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม	2.78	5.57

จากผลการสกัดพบว่าเมทานอล เป็นตัวทำละลายในการสกัดที่ให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ตัวทำละลายเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ซึ่งการสกัดสารด้วยตัวทำละลายเป็นการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกันกับตัวอย่าง โดยตัวทำละลายแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพในการสกัดสารแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสมบัติความมีขั้วของตัวทำละลายและองค์ประกอบของตัวอย่างที่ต้องการสกัด โดยจะเป็นไปตามกฎ like dissolves like คือตัวถูกละลายที่มีขั้ว จะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วและตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้ว จะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (Self, 2005) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ตัวทำละลาย แต่ละชนิดมีความเป็นขั้วที่แตกต่างกัน โดยเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วที่สูงที่สุด จึงมีอำนาจในการละลายกว้าง ซึ่งอาจสามารถละลายสารออกจากเชื้อราได้มากกว่าเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ซึ่งมีขั้วต่ำกว่า ทำให้ปริมาณสารที่สกัดได้จากเมทานอลมีปริมาณมากที่สุด ส่วนเฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสารที่มีขั้วต่ำหรือไม่มีขั้ว เช่น ไขมัน การที่เฮกเซนสามารถสกัดสารได้ปริมาณน้อยที่สุดอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่มีความเอกลักษณะนี้เป็นเอกลักษณะที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นข้าวต้มมีปริมาณน้อยในเชื้อรา ดังนั้นการเลือกใช้ตัวทำลายจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงในการสกัด เพื่อให้สกัดสารที่ต้องการออกมาได้ดีที่สุดทั้งปริมาณและประสิทธิภาพ ซึ่งชนิดตัวทำลายที่เหมาะสม อาจช่วยให้สกัดสารออกมาจากตัวอย่างได้ดีมากขึ้นด้วย นอกจากนี้การสกัดที่ใช้ตัวทำลายต่างชนิดกันจะทำให้ได้สารสกัดที่แตกต่างกันได้ และเหมาะสำหรับที่จะนำไปศึกษาหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต่อไป สำหรับการทดลองในครั้งนี้ได้เพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* เป็นเวลา 28 วัน ซึ่งคล้ายกับเวลาในการเลี้ยงเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงชนิดอื่นๆ ที่เลี้ยงเป็นเวลา 21-29 วัน ดังเช่นการทดลองของ Boonphong และคณะ (2001) ที่ได้เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aschersonia tubulata* ไอโซเลต BCC1785 เพื่อผลิตสาร destruxin โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน คล้ายกันกับการทดลองของ Krasnoff และคณะ (1996) ที่เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aschersonia* sp. ในอาหารเหลว Czapek Dox (CD) เป็นเวลา 21 วัน และ Isaka และคณะ (2001) ที่เพาะเลี้ยง *Cordyceps nipponica* ไอโซเลต BCC1389 ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 29 วัน จากการศึกษาของ Wang และคณะ (2004) ได้ศึกษาการผลิตสาร destruxin จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต V245 และ V275 ในอาหารแข็ง Czapek Dox (CD) agar และอาหารเหลว เป็นเวลา 10, 20 และ 30 วัน พบว่าเชื้อราทั้งสองไอโซเลตไม่มีการสร้างสาร destruxin เมื่อเลี้ยงในระดับถึงหมัก เมื่อทดลองเลี้ยงในข้าว พบว่าเชื้อราทั้งสองไอโซเลตมีการผลิตสาร destruxin โดยที่เวลา 30 วัน เชื้อราสร้างสาร destruxin B ได้มากที่สุด โดยเชื้อราไอโซเลต V275 สามารถผลิตสาร destruxin B ได้  $34.0 \pm 4.2$  มิลลิกรัม และไอโซเลต V245 สามารถผลิตสาร destruxin B ได้  $14.2 \pm 2.4$  มิลลิกรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อรา มีผลต่อปริมาณของสารที่สกัดได้ และนอกจากนี้เชื้อราในไอโซเลตที่ต่างกันยังสามารถให้ผลผลิตของสารแตกต่างกันอีกด้วย ซึ่งการทดลองได้ใช้เชื้อราหลายไอโซเลตเปรียบเทียบกันทำให้สามารถพิจารณาคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการสกัดสารและประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้สำหรับนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

#### 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี paper disc

##### diffusion

นำสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ MA001, MA002, MA017, MA019 และ SNB03 ที่สกัดด้วยตัวทำลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มาเจือจางด้วยเมทานอล 97.5 เปอร์เซ็นต์ ให้มีระดับความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยดสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำลายลงบน paper disc ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยมียาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gentamicin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) และมีเมทานอล 97.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุมลบ (negative control) จากนั้นทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *M. luteus* แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลต ในชั้นเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด โดยสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต MA001, MA002, MA017, MA019 และ SNB03 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ  $10.18 \pm 0.29$ ,  $15.22 \pm 0.15$ ,  $14.61 \pm 2.87$ ,  $14.37 \pm 0.57$  และ  $15.54 \pm 0.69$  มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งต่อเชื้อ *B. subtilis* เท่ากับ  $8.49 \pm 0.24$ ,  $11.96 \pm 0.29$ ,  $12.43 \pm 1.67$ ,  $10.96 \pm 0.72$  และ  $16.02 \pm 0.31$  มิลลิเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งต่อเชื้อ *M. luteus* เท่ากับ  $7.86 \pm 0.24$ ,  $12.60 \pm 0.35$ ,  $11.51 \pm 0.33$ ,  $0.00 \pm 0.00$  และ  $12.36 \pm 0.16$  ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลต ในชั้นเฮกเซนและเมทานอลไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบทั้ง 5 ชนิด เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงสุดคือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่มีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA001, MA002, MA017, MA019 และ SNB03 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือความเข้มข้น 5, 2.5 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้น 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเฉพาะไอโซเลต MA017 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $7.30 \pm 0.12$  มิลลิเมตร สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA019 ทุกความเข้มข้น ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *M. luteus* โดยสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของไอโซเลตอื่นๆ โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *M. luteus* เท่ากับ  $16.02 \pm 0.31$ ,  $15.54 \pm 0.69$  และ  $12.36 \pm 0.16$  ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) สำหรับเมทานอลที่ใช้เป็นตัวควบคุมทางลบ (negative control) ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด เนื่องจากไม่พบบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามในแต่ละการทดลองมีเพียงยาปฏิชีวนะเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ ดังแสดงตัวอย่างผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต MA002 ต่อเชื้อ *B. subtilis* (รูปที่ 4.2 ก), *S. aureus* (รูปที่ 4.2 ข) และ *M. luteus* (รูปที่ 4.2 ค) และสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* (รูปที่ 4.2 ง) และ *P. aeruginosa* (รูปที่ 4.2 จ)

ตารางที่ 4.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ความเข้มข้นต่างๆ

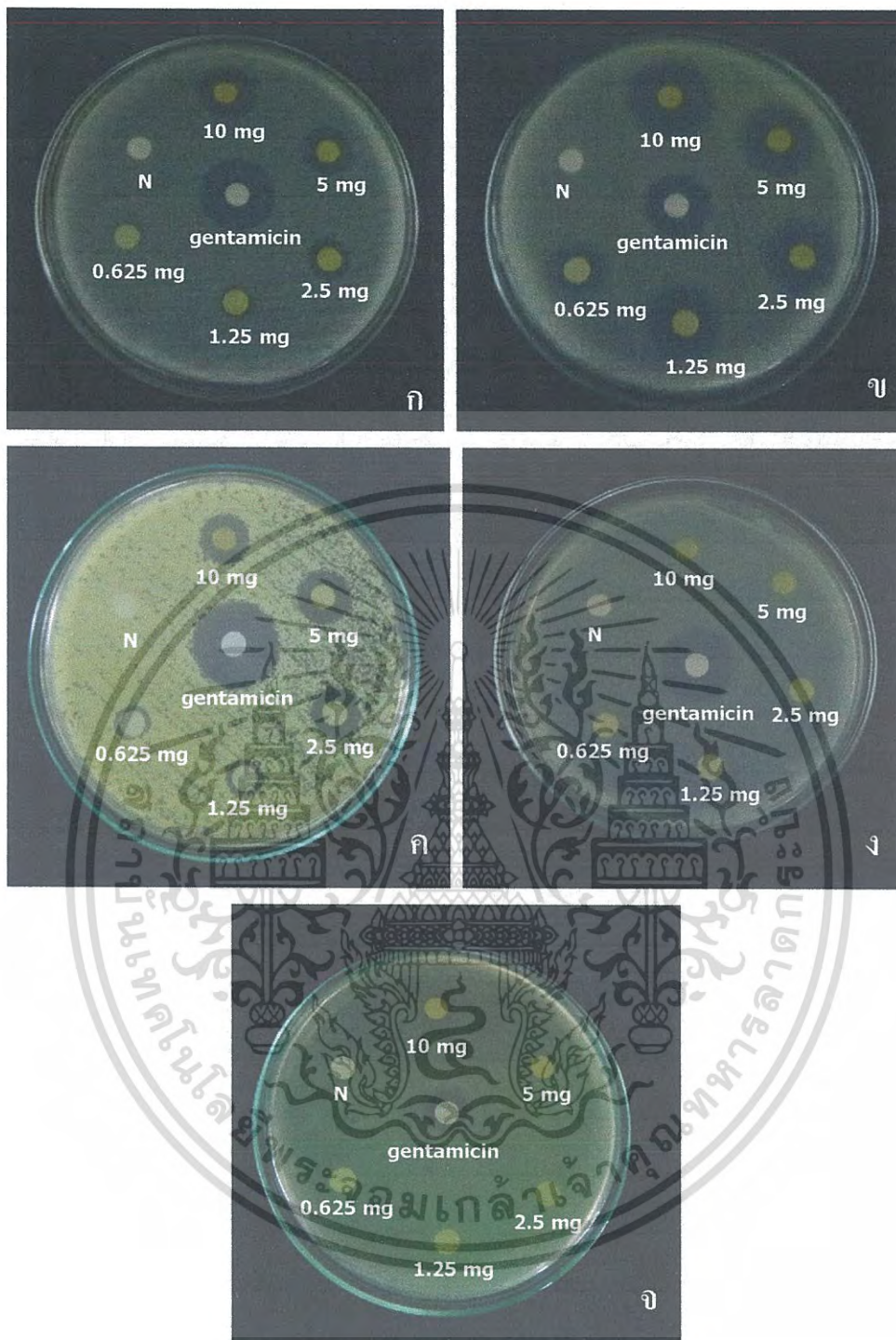
ไอโซเลต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>
MA001	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	0.625	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	1.25	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	2.5	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	5	7.63 <sup>h</sup> ±0.25	9.53 <sup>h</sup> ±0.35	0.00±0.00
	10	8.49 <sup>ig</sup> ±0.24	10.18 <sup>h</sup> ±0.29	7.86 <sup>i</sup> ±0.24
MA002	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	0.625	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	1.25	7.83 <sup>gh</sup> ±0.19	0.00±0.00	0.00±0.00
	2.5	9.11 <sup>f</sup> ±0.37	10.32 <sup>h</sup> ±0.90	9.15 <sup>gh</sup> ±0.19
	5	10.42 <sup>e</sup> ±0.49	12.70 <sup>f</sup> ±0.19	10.79 <sup>f</sup> ±0.26
	10	11.96 <sup>d</sup> ±0.29	15.22 <sup>b</sup> ±0.15	12.60 <sup>d</sup> ±0.35
MA017	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	0.625	7.30 <sup>h</sup> ±0.12	0.00±0.00	0.00±0.00
	1.25	7.33 <sup>h</sup> ±0.24	9.5 <sup>h</sup> ±0.90	7.34 <sup>h</sup> ±0.29
	2.5	8.56 <sup>f</sup> ±0.42	9.8 <sup>h</sup> ±1.10	8.59 <sup>h</sup> ±0.37
	5	11.05 <sup>d</sup> ±2.35	13.55 <sup>e</sup> ±1.50	9.16 <sup>g</sup> ±0.38
	10	12.43 <sup>c</sup> ±1.67	14.61 <sup>cd</sup> ±2.87	11.51 <sup>c</sup> ±0.33
MA019	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	0.625	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	1.25	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	2.5	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	5	8.46 <sup>f</sup> ±0.51	12.04 <sup>g</sup> ±1.08	0.00±0.00
	10	10.96 <sup>e</sup> ±0.72	14.37 <sup>d</sup> ±0.57	0.00±0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเชื้อรา  
*M. anisopliae* ในชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ไอโซเลต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>
SNB03	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	0.625	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	1.25	7.63 <sup>h</sup> ±0.04	7.62 <sup>d</sup> ±0.43	8.34 <sup>f</sup> ±0.25
	2.5	9.38 <sup>f</sup> ±0.90	9.38 <sup>cd</sup> ±0.9	10.61 <sup>f</sup> ±0.57
	5	11.72 <sup>d</sup> ±1.16	11.72 <sup>e</sup> ±1.17	11.61 <sup>d</sup> ±0.45
	10	16.02 <sup>b</sup> ±0.31	15.54 <sup>b</sup> ±0.69	12.36 <sup>b</sup> ±0.16
Gentamicin	0.1	18.90 <sup>a</sup> ±0.34	16.52 <sup>a</sup> ±0.61	17.09 <sup>a</sup> ±0.36

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบ factorial ANOVA ด้วย DMRT ที่  $P < 0.05$



รูปที่ 4.2 แสดงการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA002 ต่อ (ก) *B. subtilis*, (ข) *S. aureus*, (ค) *M. luteus*, (ง) *E. coli* และ (จ) *P. aeruginosa*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดจากชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (2008) ที่สกัดสารจาก *M. anisopliae* สายพันธุ์ HF293 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของแมลงบดเป็นเวลา 10 วัน เมื่อนำไปทดสอบกับการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคเมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ 209P และการทดลองของ Lee และคณะ (2005) ที่ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงจำนวน 47 ตัวอย่าง ในสกุล *Akanthomyces*, *Aschersonia*, *Cordyceps*, *Gibellula*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Verticilium* และ *Beauveria* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. subtilis* จำนวน 38 ตัวอย่าง (81 เปอร์เซ็นต์) มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* จำนวน 30 ตัวอย่าง (64 เปอร์เซ็นต์) และมีฤทธิ์ยับยั้ง *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 10 ตัวอย่าง (21 เปอร์เซ็นต์) สำหรับการทดลองของ Krasnoff และคณะ (2012) ได้นำสารสกัดจากโคนิดีเยของ *M. acridum* คือ Metacridamide (A และ B) ไปทดสอบกับเชื้อ *E. coli*, *B. cereus* และ *Colletotrichum acutatum* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงสุด 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ซึ่งการที่สารสกัดหยาบมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis*, *S. aureus* และ *M. luteus*) มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*) อาจเนื่องมาจากความแตกต่างขององค์ประกอบของผนังเซลล์และการจัดเรียงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ (Negi และคณะ, 2008) ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบส่วนที่ปกคลุมชั้นของผนังเซลล์อยู่ด้านบน (outer phospholipidic membrane) และ โปรตีน porin ที่มีบทบาทในการควบคุมการผ่านเข้าและออกของสารต่างๆ ซึ่งช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์ของแบคทีเรีย (Nikaido และ Vaara, 1985) สำหรับงานวิจัยของ Xiao และคณะ (2010) ที่ได้สกัดสารจากเส้นใยของเชื้อรา *M. taii* ในชั้นกลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และ สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อในชั้นเอทิลอะซิเตท นำไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar diffusion พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราโรคพืช ได้แก่ *Rhizoctonia solani* และ *Fusarium oxysporum* อีกด้วย

Yang และคณะ (2009) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. taii* var. *chongqingensis* ซึ่งรายงานว่าเป็นระยะ anamorph ของเชื้อรา *Cordyceps chongqingensis* จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *E. coli* แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อรา *Mucor* sp.

ผลที่ได้จากการทดลองอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ ซึ่งการทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion นี้เป็นเพียงวิธีการเบื้องต้นที่ทำให้ทราบว่าสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการเจริญของเอกซาร์นเป็นเอกซาร์นที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตหนาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่อย่างไรก็ตามต้องนำไปทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ต่อไป นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ยังมีปริมาณที่ค่อนข้างสูง และสารที่นำมาทดสอบเป็นเพียงสารสกัดหยาบ ซึ่งอาจจะมีองค์ประกอบของสารอื่นๆ ผสมอยู่ด้วย ผลการทดลองที่ได้ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปทั้งสถานะในการเพาะเลี้ยง วิธีการสกัด หรือองค์ประกอบของสารสกัดที่ได้ เพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในอนาคต

#### 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี broth dilution

ผลของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเอทิลอะซิเตทเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และมีฤทธิ์ต่อเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ในการทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ด้วยวิธี broth dilution จึงได้ทดลองเฉพาะสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น ได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *M. luteus* โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 0, 0.65, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา MA019 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดีที่สุด เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของสารสกัดน้อยที่สุด โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *M. luteus* เท่ากับ 5, 5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ไอโซเลต MA001 มีค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้งสามชนิดเท่ากัน คือ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไอโซเลต MA002 มีค่า MIC ต่อเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *M. luteus* เท่ากับ 20, 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) การทดลองนี้คล้ายกับการทดลองของอภิชาติ (2551) ที่ได้รวบรวมเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงจากป่าในเขตภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 11 ไอโซเลต ในสกุล *Beauveria*, *Cordyceps*, *Isaria* และ *Paecilomyces* นำเชื้อรามานำเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB และนำน้ำเลี้ยงเชื้อรามาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียพบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการที่ใช้ในการทดลองนี้คือวิธี broth dilution เป็นวิธีที่นิยมใช้เพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถทำลายเชื้อได้ ซึ่งสามารถใช้ทดสอบเพื่อยืนยันผลของวิธี paper disc diffusion และจากผลการทดลองทำให้ทราบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อรา *M. anisopliae* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ยังเป็นความเข้มข้นที่สูง อาจเนื่องมาจากสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบยังเป็นสารสกัดหยาบ ทำให้มีองค์ประกอบของสารที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบมีหลากหลายชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

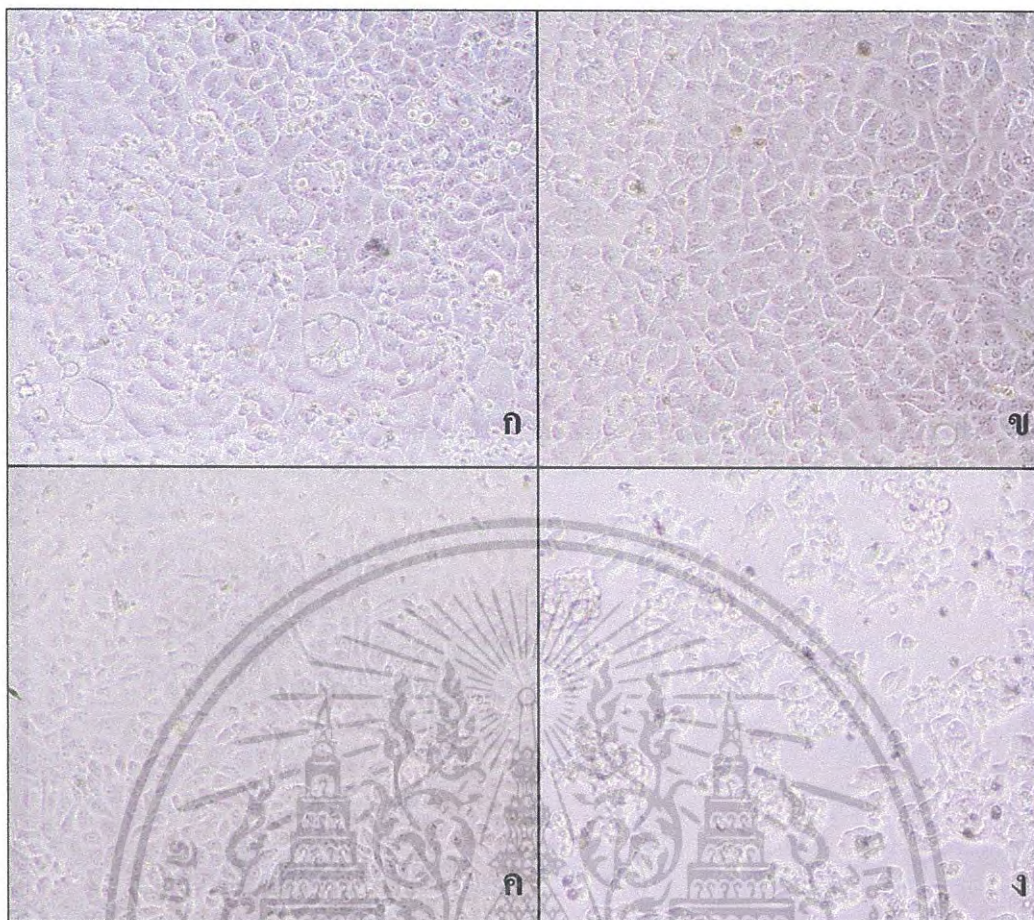
ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเอทิลอะซิเตท โดยวิธี broth dilution

ไอโซเลต	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>
MA001	20	20	20
MA002	20	20	10
MA017	20	5	10
MA019	5	5	2.5
SNB03	10	5	20

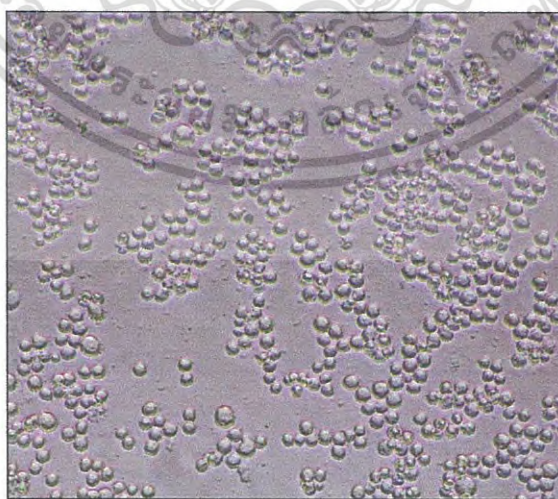
ซึ่งสารเหล่านี้อาจจะเกิดปฏิกิริยาการเสริมฤทธิ์ทำให้มีทั้งฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ และอาจจะมีสารบางชนิดมีฤทธิ์ในการขัดขวางหรือยับยั้งการออกฤทธิ์ของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (ถาวนา และคณะ, 2554) ทำให้ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบยังมีอยู่น้อย จึงมีความน่าสนใจในการนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ และศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด เพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในอนาคต

#### 4.4 การศึกษาการเจริญของเซลล์

ผลการศึกษาลักษณะของเซลล์ชนิดต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหาร RPMI-1640 ที่มี FBS 8 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับพบว่าเซลล์ไลน์แต่ละชนิดมีลักษณะเฉพาะแตกต่างกัน โดยแบ่งเป็นเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว (adherent cell) คือเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เป็นเซลล์ที่มีการเจริญแบบเรียงตัวเจริญชั้นเดียว (monolayer) ที่มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อเยื่อผิว (epithelial like) มีลักษณะของแควิวโอขนาดใหญ่ และเซลล์จะมีการเกาะเรียงตัวชิดกันมาก (รูปที่ 4.3 ก) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เป็นเซลล์ที่เจริญชั้นเดียวมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อเยื่อผิว มีรูปร่างเป็นเหลี่ยม (รูปที่ 4.3 ข) เซลล์ไตลิง (Vero) เป็นเซลล์ที่มีการเจริญแบบเรียงตัวชั้นเดียวที่มีลักษณะแบบไฟโบรบลาสต์ (fibroblast like) มีลักษณะริ้วคล้ายกระดาษแหลมหัวและท้าย เซลล์จะมีการเกาะเรียงตัวชิดกันมาก (รูปที่ 4.3 ค) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG-2) เป็นเซลล์ที่เจริญชั้นเดียวที่มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อเยื่อผิว และเซลล์มีการเจริญได้ค่อนข้างช้าเมื่อเทียบกับเซลล์ไลน์ชนิดอื่นที่ใช้ในการศึกษา (รูปที่ 4.3 ง) นอกจากนี้ยังมีเซลล์แขวนลอย (suspension) คือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู เป็นเซลล์ที่มีลักษณะกลม เจริญเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ไม่เกาะติดพื้นผิว (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.3 ลักษณะของเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับที่กำลังขยาย 100 เท่า (ก) HT-29, (ข) MCF-7, (ค) Vero และ (ง) HepG-2

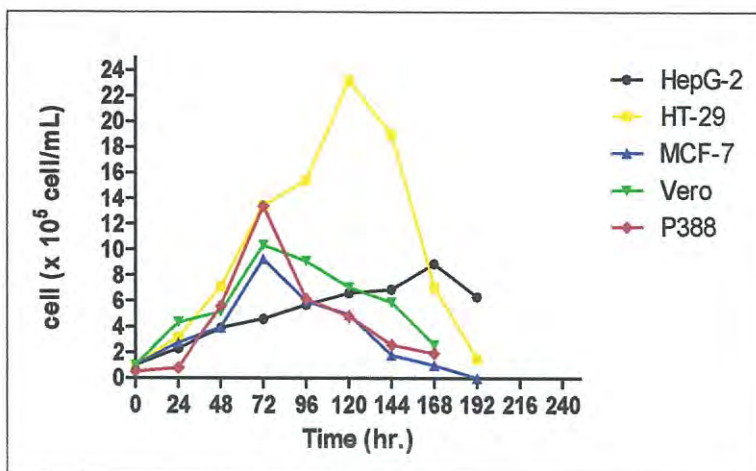


รูปที่ 4.4 ลักษณะของเซลล์ไลน์ P388 ที่ใช้ในการศึกษา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษากราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ โดยปลูกเซลล์มีชีวิตเริ่มต้นเท่ากับ  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับเซลล์ HT-29, MCF-7, Vero, HepG2 และ  $0.8 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับเซลล์ P388 ปริมาตรทั้งหมด 2 มิลลิลิตรต่อ 1 งานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นับจำนวนเซลล์ทุกวันเป็นเวลา 7 วันโดยนับจำนวน 2 งานเพาะเลี้ยงต่อ 1 วัน นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตกับเวลา (รูปที่ 4.5) พบว่าเซลล์มีการเจริญสูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง หลังจากถ่ายเซลล์ (subculture) อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยทั่วไปจะลดลงหลังจากถ่ายเซลล์แล้วประมาณ 96 ชั่วโมง สำหรับเซลล์ HT-29 มีการเจริญสูงสุดที่เวลา 120 ชั่วโมง สำหรับเซลล์ HepG-2 เมื่อเวลาผ่านไปถึง 168 ชั่วโมง เซลล์ยังคงมีการเจริญต่อเนื่อง อาจเนื่องมาจากปริมาณของเซลล์เริ่มต้นที่ปลูกมีปริมาณน้อย และเซลล์มีการเจริญได้ช้า ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตสำหรับเซลล์จนพร้อมที่จะนำมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง จึงได้ทำการเปลี่ยนอาหาร และถ่ายเซลล์ ทุกวันที่ 3 หรือประมาณ 1-2 ครั้งต่อสัปดาห์

เมื่อนำมาคำนวณช่วงเวลาที่ทำให้เซลล์เพิ่มเป็น 2 เท่า (doubling time) พบว่าเซลล์ HT-29, MCF-7, Vero, HepG2 และ P388 จะมีค่าอยู่ที่ 32.61, 24.19, 21.36, 53.30 และ 19.24 ชั่วโมงตามลำดับ จึงใช้ข้อมูลนี้เพื่อใช้ในการพิจารณาในการปลูกเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป โดยในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นสำหรับการทดสอบความเป็นพิษในเซลล์เซลล์ HT-29, MCF-7, Vero, HepG2 และ P388 เท่ากับเป็น  $1.5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^5$  และ  $0.8 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งคล้ายกับการทดลองของปก้อง (2551) ได้ศึกษาปริมาณของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยวิธี MTT พบว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับเซลล์ HepG-2 และ Vero คือ  $3 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสำหรับเซลล์ acute T cell leukemia; Jurkat และ acute lymphoblastic leukemia; MOLT-4 คือ  $3 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเจริญของเซลล์ไลน์ในอาหาร RPMI-1640 ที่มีซีรัม FBS 8 เปอร์เซ็นต์เลี้ยงเป็นเวลา 192 ชั่วโมง

#### 4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae*

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 5 ไอโซเลต คือ MA001, MA002, MA017, MA019 และ SNB03 ที่มีต่อเซลล์ไลน์ HT-29, MCF-7, Vero, HepG-2 และ P388 โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจาก *M. anisopliae* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 0, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นประเมินความมีชีวิตรอดของเซลล์หลังจากทดสอบกับสารสกัดด้วยวิธี MTT ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ของเซลล์ที่มีชีวิตเพื่อเปลี่ยนสาร MTT ให้เป็นผลึกฟอร์มazan และวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่มีชีวิตที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (% cell viability) เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม ซึ่งนิยมรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC<sub>50</sub>) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C (MMC) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก พบว่าผลของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ HT-29, MCF-7, Vero, HepG-2 และ P388 ดังนี้

##### 4.5.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ mitomycin C ต่อเซลล์ไลน์

Mitomycin C เป็นยาปฏิชีวนะที่ได้มาจากเชื้อ *Streptomyces caespitosus* มีส่วนที่เป็น active alkylating moiety หรือ alkyl group ที่มีคุณสมบัติในการเข้าไปจับกับส่วน sulfur, nitrogen, oxygen หรือ phosphorus ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสายดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) และการสังเคราะห์โปรตีน โดยไม่จำเพาะต่อระยะใดในเอกซาร์นเป็นเอกซาร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัฏจักรของเซลล์ (cell-cycle non-specific) ทำให้ไม่สามารถแบ่งเซลล์และตายไปในที่สุด (Sadeghi และคณะ, 1998) mitomycin C จึงถูกนำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะสำหรับรักษาเนื้องอก และ โรคมะเร็ง (Sigma-Aldrich, 2004) นอกจากนี้ mitomycin C ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านรูปร่างและลักษณะของเซลล์ เช่นในงานวิจัยของ Murayama และคณะ (1996) ได้ทดสอบเพื่อประเมินความเป็นพิษของ mitomycin C ที่มีผลต่อวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) และลักษณะสัณฐานวิทยาของผิวเซลล์โดยใช้เซลล์ชนิด Chang's cells (human conjunctival cell line) บ่มร่วมกับ mitomycin C เป็นเวลา 2 และ 4 นาที ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.002-0.04 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นของ mitomycin C ตั้งแต่ 0.004 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ซึ่งพบว่า mitomycin C จะไปยับยั้งกระบวนการในสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA synthesis) ในวัฏจักรของเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ mitomycin C ที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ ไม่ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากปกติ

เนื่องจาก mitomycin C เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง จึงนำสาร mitomycin C มาใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก โดยในการทดลองครั้งนี้ นำ mitomycin C มาทดสอบกับเซลล์ไลน์ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ HT-29, MCF-7, HepG-2 และ P388 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็ง และ Vero เป็นเซลล์ปกติ เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่ทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป โดยทดสอบ mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น คือ 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มร่วมกับเซลล์นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT ซึ่งรายงานเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ พบว่าเมื่อทดสอบความเป็นพิษของ mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร mitomycin C ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์เป็นดังแสดงในตารางที่ 4.4

เมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ในแต่ละความเข้มข้น มาทำการวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของสารที่ทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม Graph Prism 5 ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์กับระดับความเข้มข้น (รูปที่ 4.6) พบว่า mitomycin C มีความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 มากที่สุด โดยระดับความเข้มข้นของสารที่ทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 7.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเซลล์ P388 โดยระดับความเข้มข้นของสารที่ทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 9.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตารางที่ 4.5

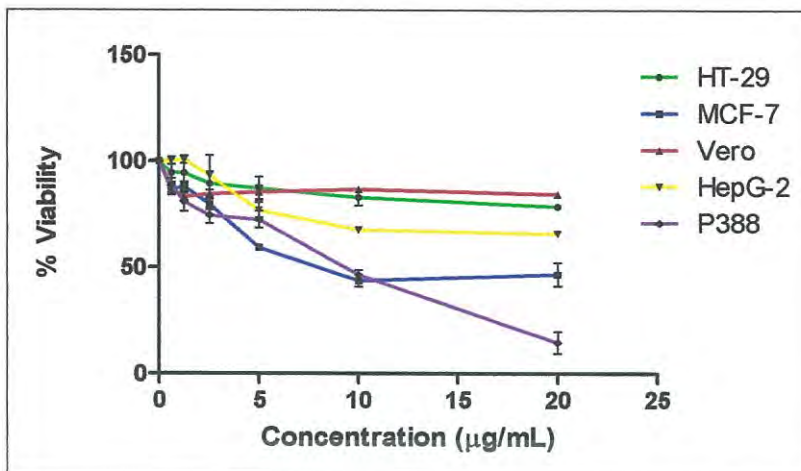
ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อทดสอบกับ mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์ไลน์ 5 ชนิด เมื่อบ่มร่วมกับเซลล์นาน 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด				
	HT-29	MCF-7	Vero	HepG-2	P388
0	100 <sup>b</sup> ±0.00	100 <sup>d</sup> ±0.00	100 <sup>b</sup> ±0.00	100 <sup>c</sup> ±0.00	100 <sup>b</sup> ±0.00
0.625	94.39 <sup>ab</sup> ±4.13	86.58 <sup>c</sup> ±1.91	86.90 <sup>a</sup> ±2.53	100.40 <sup>de</sup> ±1.74	88.58 <sup>b</sup> ±3.44
1.25	94.46 <sup>ab</sup> ±5.93	88.24 <sup>c</sup> ±2.02	83.26 <sup>a</sup> ±1.74	100.86 <sup>cd</sup> ±1.82	80.96 <sup>b</sup> ±4.49
2.5	89.41 <sup>b</sup> ±5.56	79.69 <sup>c</sup> ±2.44	84.49 <sup>a</sup> ±2.08	93.16 <sup>c</sup> ±9.78	74.50 <sup>b</sup> ±3.87
5	87.28 <sup>ab</sup> ±5.49	59.39 <sup>b</sup> ±1.30	85.45 <sup>a</sup> ±3.12	77.10 <sup>c</sup> ±3.70	72.61 <sup>a</sup> ±4.03
10	83.06 <sup>a</sup> ±3.85	43.83 <sup>a</sup> ±2.72	86.81 <sup>a</sup> ±0.96	67.72 <sup>b</sup> ±1.09	46.57 <sup>a</sup> ±2.30
20	78.63 <sup>a</sup> ±0.47	46.70 <sup>a</sup> ±5.55	84.59 <sup>a</sup> ±1.40	65.85 <sup>a</sup> ±1.29	14.71 <sup>a</sup> ±5.11

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบ oneway ANOVA ด้วย DMRT ที่  $P < 0.05$

สำหรับเซลล์ HT-29, Vero และ HepG2 พบว่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากกว่าความเข้มข้นสูงสุดของ mitomycin C ที่ใช้คือ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นของ mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HT-29, Vero และ HepG-2 เท่ากับ 78.63, 84.59 และ 65.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Sadeghi และคณะ (1998) ได้ทดสอบความเป็นพิษของ mitomycin C ที่มีต่อเซลล์ Keratocyte ของมนุษย์ โดยใช้ความเข้มข้นของ mitomycin C เท่ากับ 0.05, 0.5, 5 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรบ่มร่วมกับเซลล์เป็นเวลา 5 นาทีและ 1 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดโดยใช้เครื่อง Coulter counter พบว่า mitomycin C สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ได้ เมื่อใช้ความเข้มข้นของ mitomycin C 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 5 นาที โดยสามารถหาค่าปริมาณของสารที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (inhibitory dose; ID<sub>50</sub>) เท่ากับ 38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเมื่อใช้ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะมีค่า ID<sub>50</sub> เท่ากับ 4.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ mitomycin C ไม่ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้เท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ใน



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388, MCF-7, HT-29 และ Vero กับความเข้มข้นของสารละลาย mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มนาน 24 ชั่วโมง

การบ่มด้วย ซึ่งเมื่อใช้ระยะเวลาในการบ่มเซลล์ร่วมกับ mitomycin C นานขึ้นจะทำให้มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าลดลง คล้ายกับการทดลองของ Park และคณะ (2002) ที่ได้รายงานว่ mitomycin C สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ alpha-TN4 mouse lens epithelial cells (LECs) ซึ่งฤทธิ์ของยาที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณและเวลาที่ได้รับ อย่างไรก็ตาม mitomycin C มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero ซึ่งเป็นเซลล์ปกติอีกด้วย ในการทดลองครั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของ mitomycin C ที่ทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ HT-29, Vero และ HepG-2 ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* จึงได้ใช้ความเข้มข้นของ mitomycin C เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงบวกในการทดสอบ

ตารางที่ 4.5 แสดงความเข้มข้นของ mitomycin C ที่ทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (CC<sub>50</sub>) ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ โดยวิธี MTT

ชนิดของเซลล์	ค่า CC <sub>50</sub> (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
HT-29	>20
MCF-7	7.11
Vero	>20
HepG-2	>20
P388	9.45

หมายเหตุ : >20 หมายถึง ความเข้มข้นของสาร mitomycin C ที่ทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

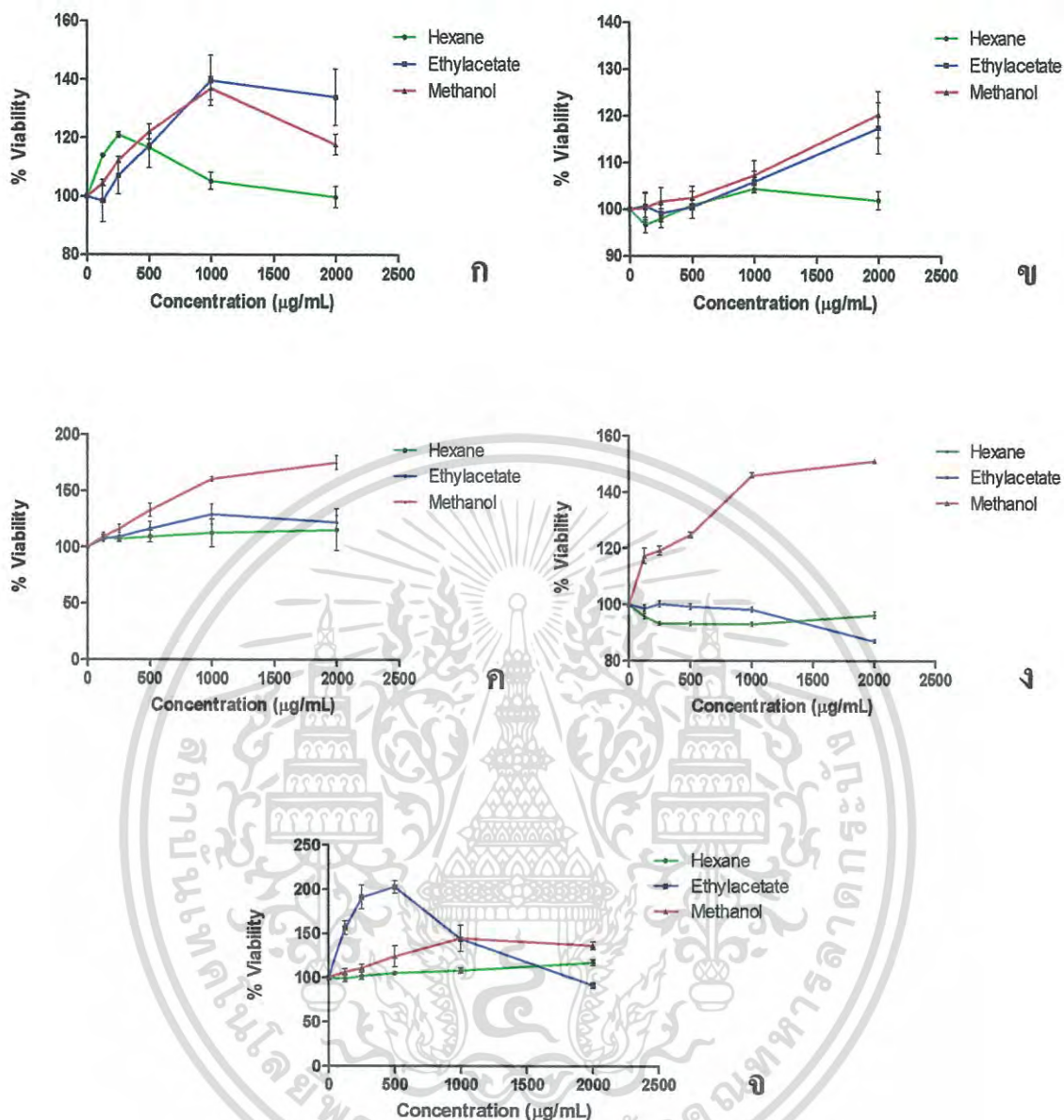
#### 4.5.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ HT-29

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA001, MA002, MA017, MA019 และ SNB03 ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มีผลต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มสารสกัดหยาบร่วมกับเซลล์นาน 24 ชั่วโมง โดยมี DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ และ mitomycin C ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงลบและตัวควบคุมเชิงบวกตามลำดับ เมื่อนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ HT-29 เมื่อทดสอบกับสารละลาย DMSO ที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบ ให้ผลแตกต่างกับค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารใดๆ (ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในการทดสอบ แต่อย่างไรก็ตามสารละลาย DMSO แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ คือ ทำให้มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ HT-29 อยู่ระหว่าง 91.51±0.31– 98.70±0.42 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเชื้อ *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลต ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29 ซึ่งแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ แต่ละความเข้มข้น พบว่าสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ของทุกไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนของไอโซเลต MA001, MA002, MA017, MA019 และ SNB03 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ HT-29 เท่ากับ 101.14±3.60, 101.93±1.96, 115.55±18.61, 96.38±1.14 และ 117.54±3.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทมีค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ HT-29 เท่ากับ 133.96±9.69, 117.42±5.47,

122.12±6.10, 87.03±0.65 และ 128.72±5.14 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอลมีค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ HT-29 เท่ากับ 117.69±3.54, 120.32±4.96, 175.36±6.18, 151.20±0.10 และ 136.52±0.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากทุกไอโซเลตทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์เพิ่มสูงขึ้นจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารใดๆ (0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เฉพาะสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน และเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต MA019 เท่านั้นที่ทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าลดลงจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารใดๆ (รูปที่ 4.7 ก-จ) แสดงว่าสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลจากเชื้อราไอโซเลต MA001, MA002, MA017 และ SNB03 นอกจากไม่เป็นพิษต่อเซลล์แล้ว ยังอาจมีการส่งเสริมการเจริญของเซลล์ HT-29 อีกด้วย

เมื่อนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ ในแต่ละความเข้มข้น มาทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ( $CC_{50}$ ) โดยการใช้โปรแกรม Graph Prism 5 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์กับระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (รูปที่ 4.7) พบว่าสารสกัดหยาบในชั้น เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตจะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ เนื่องจากมีค่า  $CC_{50}$  มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

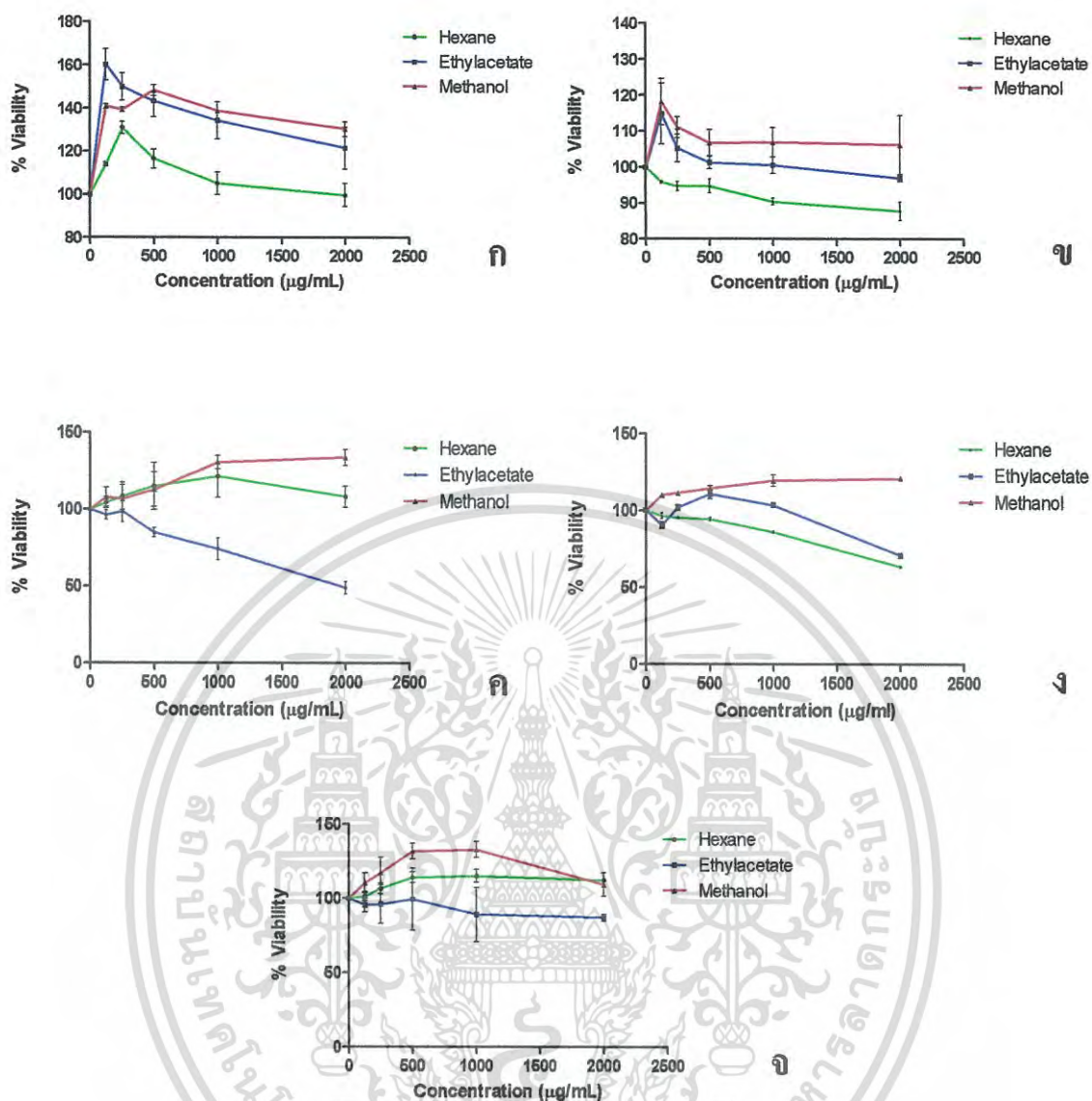


รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไคน์ HT-29 ต่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต (ก) MA001, (ข) MA002, (ค) MA017, (ง) MA019 และ (จ) SNB03 ในตัวทำละลายเฮกเซน, เอทิลอะซิเตต และเมทานอลแต่ละความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) บ่มนาน 24 ชั่วโมง

#### 4.5.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ MCF-7

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเชื้อ *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลต ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ในแต่ละความเข้มข้น มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 พบว่าสารสกัดหยาบ ในชั้นเอทิลอะซิเตท ของเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบคือ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าลดลงจากกลุ่มควบคุม โดยสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต MA002, MA017, MA019 และ SNB03 ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ เท่ากับ  $97.04 \pm 0.98$ ,  $48.96 \pm 4.14$ ,  $87.03 \pm 0.65$  และ  $87.02 \pm 5.14$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบจากไอโซเลต MA017 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 มากที่สุด เนื่องจากทำให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเหลือ 48 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.8 ค) สำหรับสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต MA001 ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารใดๆ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ เท่ากับ  $121.64 \pm 9.69$  เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอลจากทุกไอโซเลตส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ MCF-7 มากขึ้นจากกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.8 ก-จ)

เมื่อนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ ในแต่ละความเข้มข้น มาทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ( $CC_{50}$ ) โดยการใช้โปรแกรม Graph Prism 5 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์กับระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (รูปที่ 4.8) พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA017 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 มากที่สุด โดยทำให้มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ  $48.96 \pm 4.14$  เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต MA017 มีค่า  $CC_{50}$  มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ เนื่องจากมีค่า  $CC_{50}$  มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ MCF-7 ต่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต (ก) MA001, (ข) MA002, (ค) MA017, (ง) MA019 และ (จ) SNB03 ในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลแต่ละความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มนาน 24 ชั่วโมง

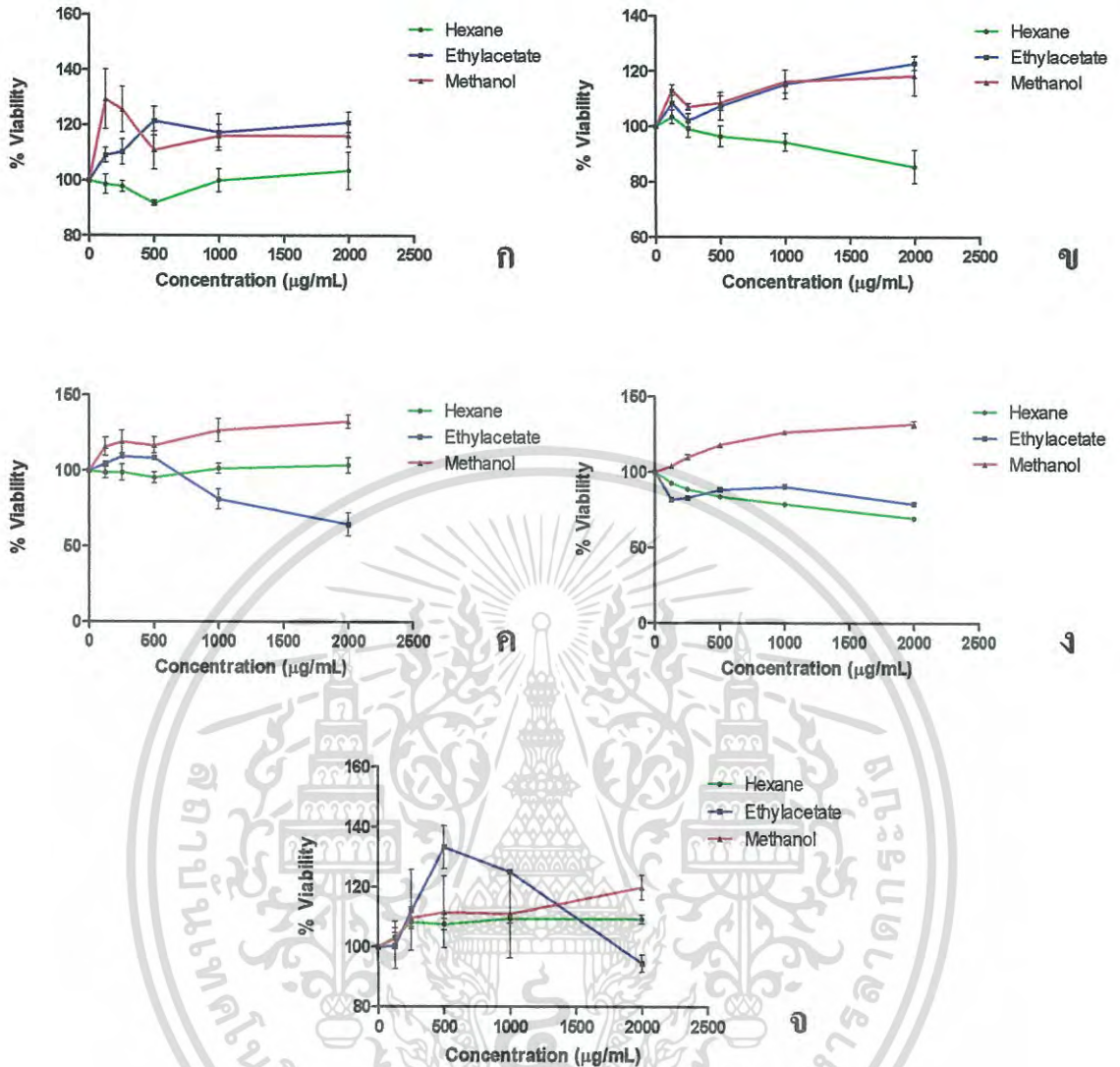
#### 4.5.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ Vero

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเชื้อ *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลต ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ในแต่ละความเข้มข้น มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนจากไอโซเลต MA002 และ MA019 ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง จากกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารใดๆ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ เท่ากับ  $85.52 \pm 6.05$  และ  $69.30 \pm 0.29$  เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงผลของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนที่มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ Vero ของไอโซเลต MA002 ดังรูปที่ 4.9 ข และไอโซเลต MA019 ดังรูปที่ 4.9 ง

สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต MA017, MA019 และ SNB03 ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารใดๆ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ เท่ากับ  $64.41 \pm 7.65$ ,  $78.98 \pm 0.18$  และ  $94.59 \pm 2.25$  เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงผลของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทที่มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ Vero ของไอโซเลต MA017 ดังรูปที่ 4.9 ค ไอโซเลต MA019 (รูปที่ 4.9 ง) และ SNB03 (รูป 4.9 จ)

สำหรับสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอลจากทุกไอโซเลตทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารใดๆ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ เท่ากับ  $121.47 \pm 13.60$  และ  $108.30 \pm 2.91$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ  $116.25 \pm 4.13$ ,  $118.34 \pm 7.10$ ,  $132.66 \pm 4.33$ ,  $131.77 \pm 2.10$  และ  $119.94 \pm 8.03$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.9 ก-จ)

เมื่อนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ ในแต่ละความเข้มข้น มาทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ( $CC_{50}$ ) โดยการใช้โปรแกรม Graph Prism 5 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์กับระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (รูปที่ 4.9 ก-จ) พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA017 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero มากที่สุดโดยทำให้มีค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ  $64.41 \pm 7.65$  เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต MA017 มีค่า  $CC_{50}$  มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นอกจากนี้สารสกัดหยาบในชั้น เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ เนื่องจากมีค่า  $CC_{50}$  มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

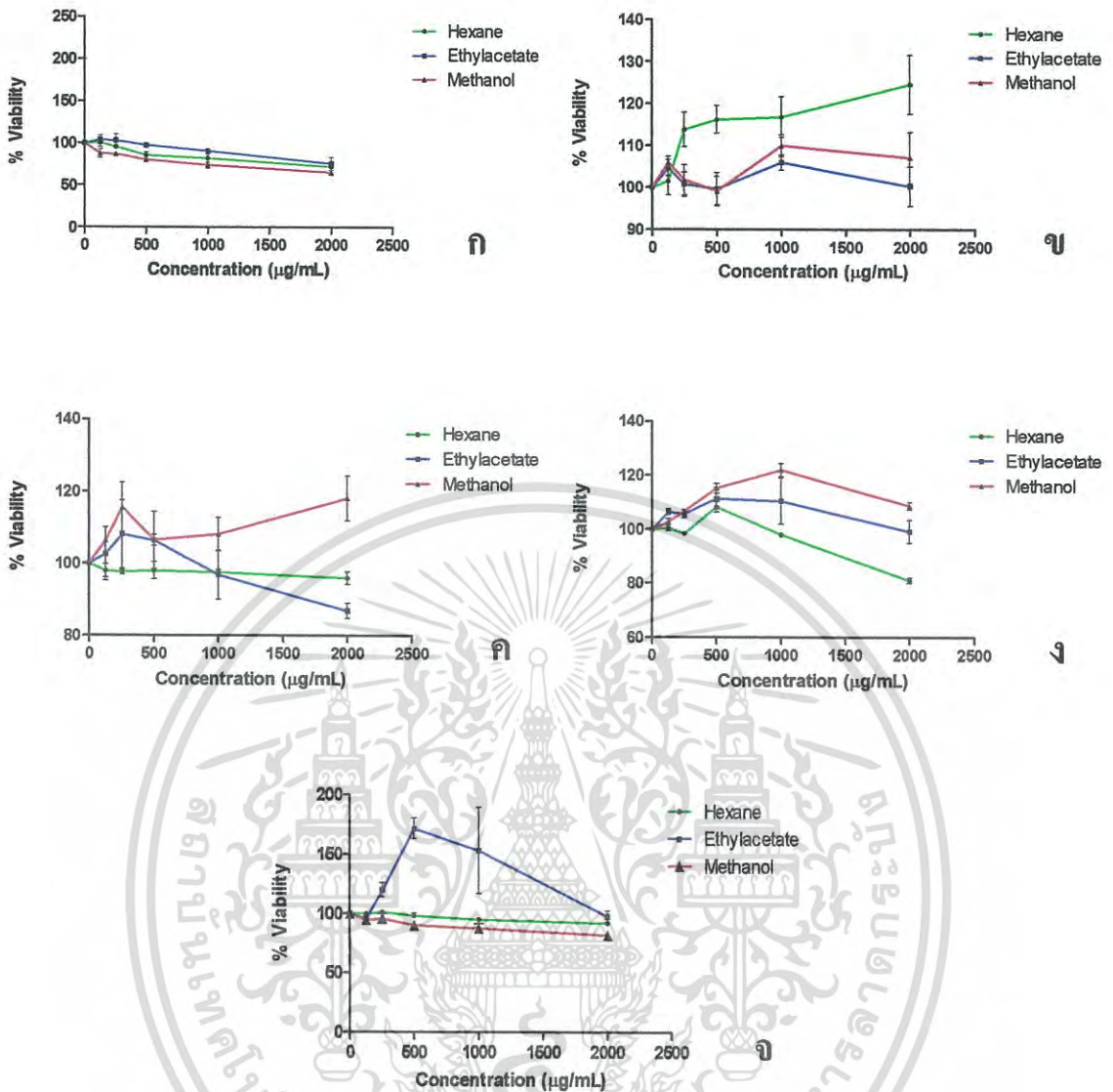


รูปที่ 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ Vero ต่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต (ก) MA001, (ข) MA002, (ค) MA017, (ง) MA019 และ (จ) SNB03 ในตัวทำละลายเฮกเซน, เอทิลอะซิเตท และเมทานอลแต่ละความเข้มข้น (ไม่โครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มนาน 24 ชั่วโมง

#### 4.5.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ HepG-2

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเชื้อ *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลต ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG-2 ซึ่งแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ แต่ละความเข้มข้น พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ของเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลต ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากไม่ทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าลดลงจากกลุ่มควบคุม สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนของไอโซเลต MA002 ทุกความเข้มข้นทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ HepG-2 สูงขึ้นจากกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.10 ข) และสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต SNB03 ที่ความเข้มข้นต่ำ (125, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ HepG-2 สูงขึ้นจากกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.10 จ)

เมื่อนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ ในแต่ละความเข้มข้น มาทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ( $CC_{50}$ ) โดยการใช้โปรแกรม Graph Prism 5 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์กับระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (รูปที่ 4.10 ก-จ) พบว่าสารสกัดหยาบในชั้น เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ เนื่องจากมีค่า  $CC_{50}$  มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HepG-2 ต่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต (ก) MA001, (ข) MA002, (ค) MA017, (ง) MA019 และ (จ) SNB03 ในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลแต่ละความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มนาน 24 ชั่วโมง

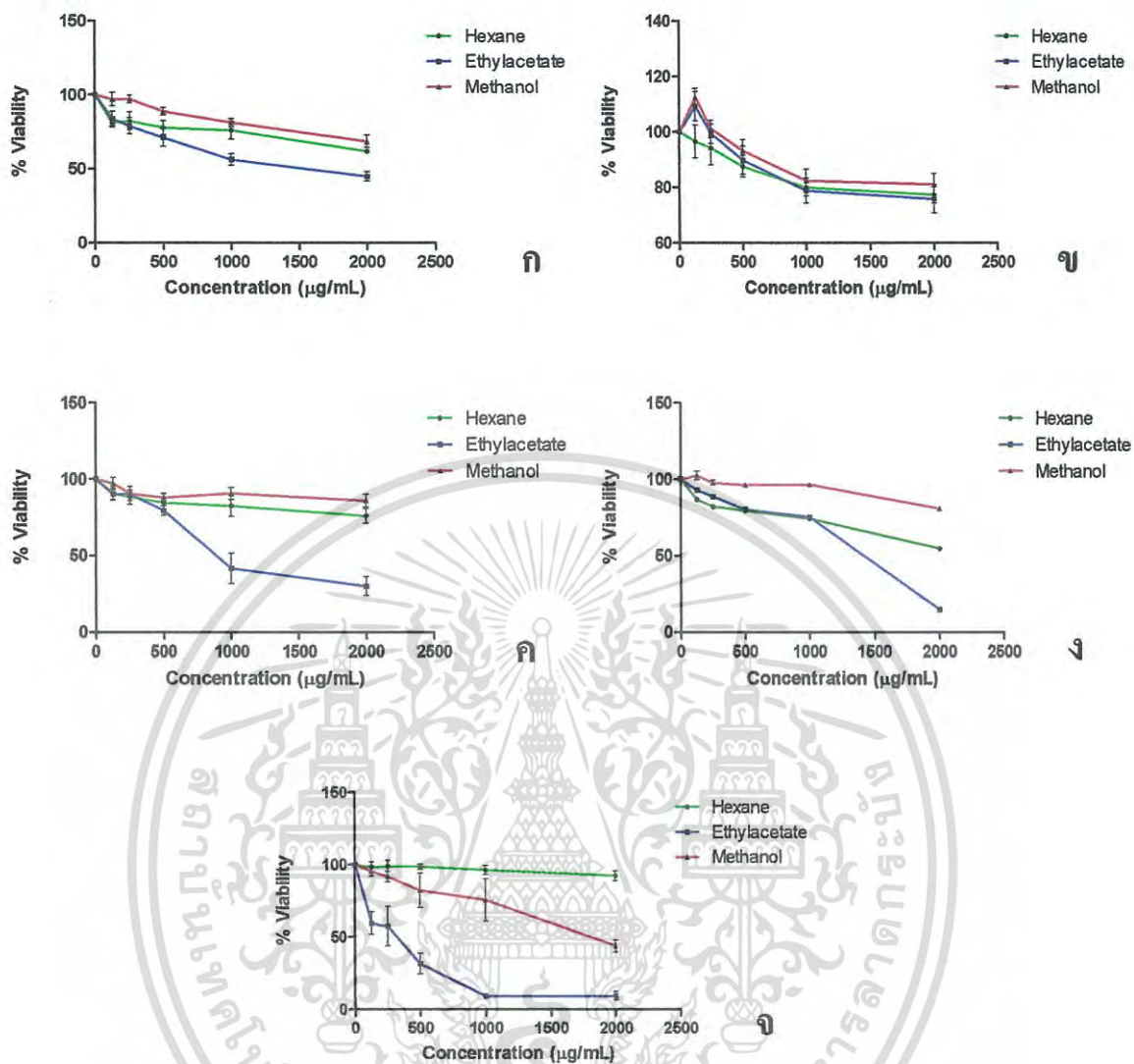
#### 4.5.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาดต่อเซลล์ P388

เมื่อนำสารสกัดหยาดจากเชื้อ *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลต ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 ซึ่งแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ แต่ละความเข้มข้น พบว่าสารสกัดหยาดในชั้นเฮกเซนของไอโซเลต MA001, MA002, MA017, MA019 และ SNB03 ที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ P388 เท่ากับ  $61.88 \pm 1.14$ ,  $77.34 \pm 2.95$ ,  $75.94 \pm 4.86$ ,  $54.52 \pm 1.14$  และ  $92.44 \pm 3.44$  เปอร์เซ็นต์ สารสกัดหยาดในชั้นเอทิลอะซิเตททำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ P388 เท่ากับ  $44.99 \pm 3.15$ ,  $75.80 \pm 5.07$ ,  $30.07 \pm 6.21$ ,  $14.72 \pm 0.65$  และ  $9.49 \pm 2.93$  เปอร์เซ็นต์ สารสกัดหยาดในชั้นเมทานอลทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ P388 เท่ากับ  $68.61 \pm 4.31$ ,  $81.08 \pm 3.76$ ,  $86.06 \pm 4.17$ ,  $80.86 \pm 0.10$  และ  $43.90 \pm 4.11$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ในแต่ละไอโซเลต พบว่าที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบคือ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล พบว่าสารสกัดหยาดจากทุกไอโซเลต ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารใดๆ โดยสารสกัดหยาดจากชั้นเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต MA001, MA017, MA019 และ SNB03 ทำให้ร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ ในแต่ละความเข้มข้น มาทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ( $CC_{50}$ ) โดยการใช้โปรแกรม Graph Prism 5 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์กับระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาด (รูปที่ 4.11 ก-จ) พบว่าสารสกัดหยาดจากชั้นเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต MA001, MA017, MA019 และ SNB03 ทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าลดลงมากกว่าร้อยละ 50 โดยมีค่า  $CC_{50}$  ต่อเซลล์ P388 เท่ากับ 1380.76, 876.06, 1543.43 และ 363.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาดในชั้นเมทานอลจากไอโซเลต SNB03 มีค่า  $CC_{50}$  ต่อเซลล์ P388 เท่ากับ 1854.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.6 สารสกัดหยาดในชั้นเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต SNB03 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 มากที่สุด เนื่องจากมีค่า  $CC_{50}$  ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น สำหรับสารสกัดหยาดในชั้นเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต MA002 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ทำให้ร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าลดลงไม่ถึงร้อยละ 50 โดยทำให้มีค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ  $75.80 \pm 5.07$  เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สารสกัดหยาดในชั้น เฮกเซน และเมทานอลของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ เนื่องจากมีค่า  $CC_{50}$  มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ P388 ต่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต (ก) MA001, (ข) MA002, (ค) MA017, (ง) MA019 และ (จ) SNB03 ในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล แต่ละความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มนาน 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ( $CC_{50}$ ) ต่อเซลล์ไลน์ P388 ด้วยวิธี MTT

ไอโซเลต	ค่า $CC_{50}$ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	เฮกเซน	เอทิลอะซิเตท	เมทานอล
MA001	>2,000	1,380.76	>2,000
MA002	>2,000	>2,000	>2,000
MA017	>2,000	876.06	>2,000
MA019	>2,000	1,543.43	>2,000
SNB03	>2,000	363.42	1,854.07

หมายเหตุ : >2,000 หมายถึง ความเข้มข้นของสาร mitomycin C ที่ทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $CC_{50}$ ) มีค่าสูงกว่า 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* กับเซลล์ไลน์ทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี MTT และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวกที่ใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าชุดควบคุมเชิงบวกทำให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่มีค่าการมีชีวิตรอด 100 เปอร์เซ็นต์ และมีผลทำให้เซลล์ไลน์ MCF-7 และ P388 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ 7.11 และ 9.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ไลน์ 5 ชนิด คือ HT-29, MCF-7, Vero, HepG-2 และ P388 พบว่าสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตท ของเชื้อรา *M. anisopliae* ทุกไอโซเลตมีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 มากที่สุด เนื่องจากสารสกัดหยาบมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ P388 มีค่าลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิดอื่นในระดับต่ำ โดยมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์แต่ละชนิด ลดลงไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากทุกไอโซเลตที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต SNB03 มีพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด เนื่องจากมีค่า  $CC_{50}$  ต่ำที่สุด โดยมีค่า  $CC_{50}$  ต่อเซลล์ P388 เท่ากับ 363.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตท ของไอโซเลต MA001, MA017 และ MA019 มีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ 1380.76, 876.06 และ 1,543.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.6) เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับสารสกัดหยาบจากไอโซเลต MA002 ในชั้นเอทิลอะซิเตท พบว่ามีความเป็นพิษ

ต่อเซลล์ไลน์ P388 เนื่องจากทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดลดลง แต่ไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ  $75.80 \pm 5.07$  เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับ Skrobek และ Butt (2005) ที่ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบที่แยกได้ในแต่ละส่วนด้วยเครื่อง HPLC จาก *M. anisopliae* ไอโซเลต V275 เปรียบเทียบกับ Destruxin พบว่าสารสกัดหยาบมีผลต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (human promyelocytic leukemia cell line: HL-60) แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ไลน์แมลง (*Spodoptera frugiperda*; Sf9) เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คล้ายคลึงกับการทดลอง Skrobek และคณะ (2006) ซึ่งรายงานว่าสารสกัดหยาบของเชื้อรา *M. anisopliae* สายพันธุ์ V245 และ V275 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว HL-60 ที่ความเข้มข้น 50 ppm และมีความเป็นพิษน้อยต่อเซลล์แมลง Sf9 เมื่อใช้ความเข้มข้นที่ 300 และ 500 ppm ตามลำดับ Kuboki และคณะ (1999) รายงานว่า *Metarhizium* sp. ที่แยกได้จากดินในประเทศญี่ปุ่น มีคุณสมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว L-1210 (Murine leukemia lymphocyte) พบเป็นพิษน้อยต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และรายงานว่าไม่พบเป็นพิษต่อแมลง

สารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ HT-29, MCF-7, Vero และ HepG-2 ในระดับต่ำ เนื่องจากไม่ทำให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง หรือทำให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ คล้ายกับงานวิจัยของ Krasnoff และคณะ (2012) ที่ได้สกัดสารจากโคนิเดียมของ *M. acridum* ได้สาร 2 ชนิดคือ metacridamide A และ B เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า metacridamide A มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (epithelial colorectal adenocarcinoma; Caco-2) มะเร็งเต้านม (breast cancer; MCF-7) และมะเร็งตับ (hepatoma; HepG2/C3A) โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 6.2, 11.0, และ 10.8 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ สาร metacridamide B มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์ HepG2/C3A ที่ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 18.2 ไมโครโมลาร์ แต่พบว่าไม่มีฤทธิ์กับเซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2 และเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 เมื่อใช้ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนของเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลต ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอลสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ เนื่องจากมีแวนิลีนทำให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม แสดงว่าสารสกัดหยาบนอกจากไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แล้ว ยังอาจมีการส่งเสริมการเจริญของเซลล์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Saowanit และ Angsumarn (2004) ที่ศึกษาสารสกัดจากเชื้อรา *H. thompsonii* ด้วยเอทิลอะซิเตทและน้ำ เมื่อทดสอบกับเซลล์ไตของหนูแฮมสเตอร์ (Hamster Syrian Kidney: BHK) และเซลล์ไลน์แมลง (Sf9) พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นน้ำที่ความเข้มข้นต่ำ (0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีผลทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของเซลล์มากขึ้นถึง 106.90 และ 106.25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่ง ศศิธรและคณะ (2554) ได้รายงานสาเหตุของการเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มากขึ้นอาจเกิด

จากปัจจัยที่ว่าเซลล์เกิดสภาวะเครียดโดยสาเหตุที่ทำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียดได้แก่ การได้รับรังสีหรือสารเคมี เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียดหรือสภาวะไม่สมดุลจะทำให้เกิดความผิดปกติต่อยีน โดยอาจส่งผลให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวที่ผิดปกติซึ่งจะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณเซลล์มากขึ้น อย่างไรก็ตามผลของสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอลจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kikuchi และคณะ (2009) ที่ได้สกัดสารจากเชื้อรา *M. flavoviride* ด้วยเมทานอล พบว่าได้สารสองชนิดคือ metarhizins A และ B และเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์พบว่ามียุทธการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ (antiproliferative) เมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7, มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Human erythromyeloblastoid leukemia; K562), มะเร็งปอด (Human lung adenocarcinoma epithelial; A549), มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Human acute monocytic leukemia; THP-1) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colon Carcinoma; HCT116)

จากผลที่ได้จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอทิลอะซิเตท เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับนำมาสกัดสารจากเชื้อรา *M. anisopliae* เนื่องจากให้สารที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มากที่สุด ดังรายงานของ Zhang และคณะ (2004) รายงานว่าสารสกัดจากชั้นเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยของเชื้อ *Cordyceps sinensis* ประกอบด้วยสารในกลุ่ม ergosterols glycosides และ polysaccharides แต่ไม่พบว่ามีสารประเภท alkaloids กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน หรือ peptides ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเอทิลอะซิเตทอาจมีสารประกอบที่คล้ายคลึงกับสารที่ได้จากเชื้อรา *C. sinensis* ซึ่งเป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแมลงเช่นเดียวกัน จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าสารสกัดหยาบจากไอโซเลต SNB03 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าไอโซเลตอื่น แม้ว่าเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตจะเพาะเลี้ยงที่สภาวะเดียวกันก็ตาม Zimmerman (2007) รายงานว่าคุณสมบัติของสารเมทาบอลไลท์ที่ได้จากเชื้อราจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น สายพันธุ์ของเชื้อรา อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และสภาวะแวดล้อม อย่างไรก็ตามวิธีการในการสกัดสารก็อาจมีผลต่อคุณสมบัติของสารที่ได้เช่นกัน (Ryan และคณะ, 2003)

ผลการทดลองที่ได้อาจจะกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *M. anisopliae* อาจจะมีฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวซึ่งอาจจะนำไปศึกษารูปแบบของกลไกของสารที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพื่อประโยชน์ในการแพทย์ต่อไป อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาระดับความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ปกติหรือในสิ่งมีชีวิตต่อไปด้วย เนื่องจากสารสกัดหยาบที่ได้ อาจมีผลต่อสุขภาพทั้งต่อมนุษย์และสัตว์ สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้เซลล์ชนิด Vero เป็นเซลล์ปกติ เนื่องจากเป็นเซลล์ที่ได้รับการยอมรับจากงานวิจัยหลายงาน เช่นห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติก็ใช้ Vero เป็นเซลล์ปกติในการทดสอบความเป็นพิษของสารเช่นเดียวกัน

## 4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดหยาบ

### 4.6.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ mitomycin C

ในการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเบื้องต้นของ mitomycin C เพื่อใช้เป็นแนวทางในการหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ mitomycin C ในการทดลองต่อไป โดยการนำมาทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ที่ระดับความเข้มข้น คือ 0, 1.5, 2, 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ตัวอย่างเลือดของผู้ชาย 1 คน และผู้หญิง 1 คน เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบ่มร่วมกับ mitomycin C นาน 24 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์และนับจำนวนเมทาเฟสต่อเซลล์ทั้งหมดจำนวน 2,000 เซลล์ นำไปหาค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (Mitotic index) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบกับสาร พบว่าที่ความเข้มข้น 0, 1.5, 2, 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการแบ่งเซลล์ดังตารางที่ 4.7 โดยมีค่าเท่ากับ  $100 \pm 0.00$ ,  $35.21 \pm 1.90$ ,  $14.15 \pm 2.33$ ,  $13.41 \pm 1.72$  และ  $4.805 \pm 4.08$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการแบ่งเซลล์ที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการแบ่งเซลล์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งที่ความเข้มข้นดังกล่าวอาจจะทำให้มีโอกาสการพบเซลล์ในระยะเมทาเฟสได้น้อย สำหรับที่ความเข้มข้น 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีอัตราการแบ่งเซลล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

การทดลองของ Sontake และ Fulzele (2009) ได้เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อทดสอบกับ mitomycin C ในอาหาร RPMI-1640 ที่เสริมด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 1, 24 และ 72 ชั่วโมง พบว่าเมื่อทดสอบ mitomycin C ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์ (mitotic inhibition) แต่พบว่าความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่บ่มร่วมกับ mitomycin C นานขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง พบผิดปกติของโครโมโซมมากกว่าการใช้ความเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 1 ชั่วโมง และที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถพบความผิดปกติของโครโมโซมได้มากที่สุด โดย mitomycin C ไม่ชักนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบสุ่ม ซึ่งจะมีผลต่อโครโมโซมคู่ที่ 1, 9 และ 16 ของมนุษย์ ในการทดลองครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ mitomycin C โดยได้ตรวจดูความผิดปกติในด้านโครงสร้างของโครโมโซมซึ่งใช้วิธีการย้อมโครโมโซมด้วยสีจิมซ่า จึงไม่สามารถจำแนกได้ว่ามีความผิดปกติที่โครโมโซมคู่ใดอย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคการย้อมสีชนิดพิเศษ เช่น G-band หรือ Q-band จะทำให้สามารถจำแนกถึงคู่ของโครโมโซมได้ (อมรา, 2546) จากข้อมูลในการทดลองนี้จึงได้เลือกใช้ความเข้มข้นของ mitomycin C เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงบวกในการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงผลของ mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	ค่า Mitotic index (%)		
	ผู้ชาย	ผู้หญิง	เฉลี่ย
0	100	100	100 <sup>d</sup> ±0.00
1.5	33.86	36.56	35.21 <sup>c</sup> ±1.90
2	14.15	17.45	14.15 <sup>b</sup> ±2.33
4	12.19	14.63	13.41 <sup>b</sup> ±1.72
8	1.92	7.69	4.805 <sup>a</sup> ±4.08

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบ oneway ANOVA ด้วย DMRT ที่  $P < 0.05$

#### 4.6.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดหยาบ

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดเมื่อทดสอบกับเซลล์ P388 จึงได้เลือกสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 มาเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม โดยศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อราที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการแบ่งเซลล์ และความผิดปกติของโครโมโซมโดยใช้ตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครผู้หญิง 2 คน และผู้ชาย 2 คน หลังจากเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเติมสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 ที่ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นกลุ่มควบคุมบวก บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ และนับจำนวนเมทาเฟสต่อเซลล์ทั้งหมดจำนวน 2,000 เซลล์ นำไปหาอัตราการแบ่งเซลล์ (Mitotic index) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบกับสาร และกลุ่มควบคุมบวก ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.8 ดังนี้

ตารางที่ 4.8 แสดงผลของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 ในชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว และความผิดปกติของโครโมโซม

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	% Mitotic index*	Chromosome aberrations**			
		SCG	ISCG	SCB	ISCB
0	100.00 <sup>c</sup> ± 0.00	ND	ND	ND	ND
250	81.83 <sup>c</sup> ± 9.07	ND	ND	ND	ND
500	57.76 <sup>d</sup> ± 19.08	ND	ND	ND	ND
1,000	46.85 <sup>cd</sup> ± 18.42	ND	ND	ND	ND
2,000	8.27 <sup>a</sup> ± 4.93	ND	ND	ND	ND
mitomycin C					
2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	15.80 <sup>ab</sup> ± 5.16	0.2	0.05	0.4	ND

หมายเหตุ : ND = ไม่พบความผิดปกติของโครโมโซม

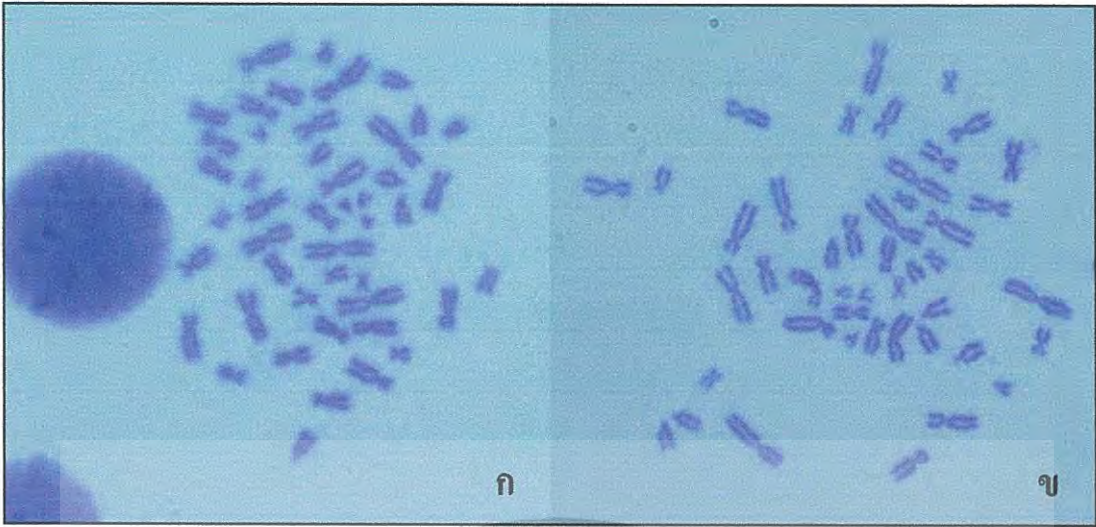
\* ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบ oneway ANOVA ด้วย DMRT ที่  $P < 0.05$

\*\* สังกัดจากจำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสจำนวน 20 เมทาเฟส และนับจำนวนความผิดปกติทั้งหมด คิดเป็นความถี่ของการเกิด ต่อ 1 เซลล์

จากตารางที่ 4.8 พบว่า ในกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทดสอบกับสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าอัตราการแบ่งเซลล์เป็น 81.83±9.07, 57.76±19.08, 46.85±18.42 และ 8.27±4.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสูงขึ้นอัตราการแบ่งเซลล์จะน้อยลงไปด้วย สำหรับความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่  $P < 0.05$  และที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าอัตราการแบ่งเซลล์น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่น รวมถึงมีค่าอัตราการแบ่งเซลล์ต่ำกว่าเมื่อทดสอบกับ mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญที่  $P < 0.05$  โดยกลุ่มควบคุมมีอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลักษณะของโครโมโซมในระยะเมทาเฟสจากเซลล์ปกติ ของตัวอย่างเลือดจากผู้ชาย และผู้หญิงจะเห็นการกระจายตัวของโครโมโซมอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.12ก และ ข) และจากตารางที่ 4.8 ในกลุ่มที่ทดสอบกับ mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นมีค่าอัตราการแบ่งเซลล์ เท่ากับ 15.80±5.16 เปอร์เซ็นต์

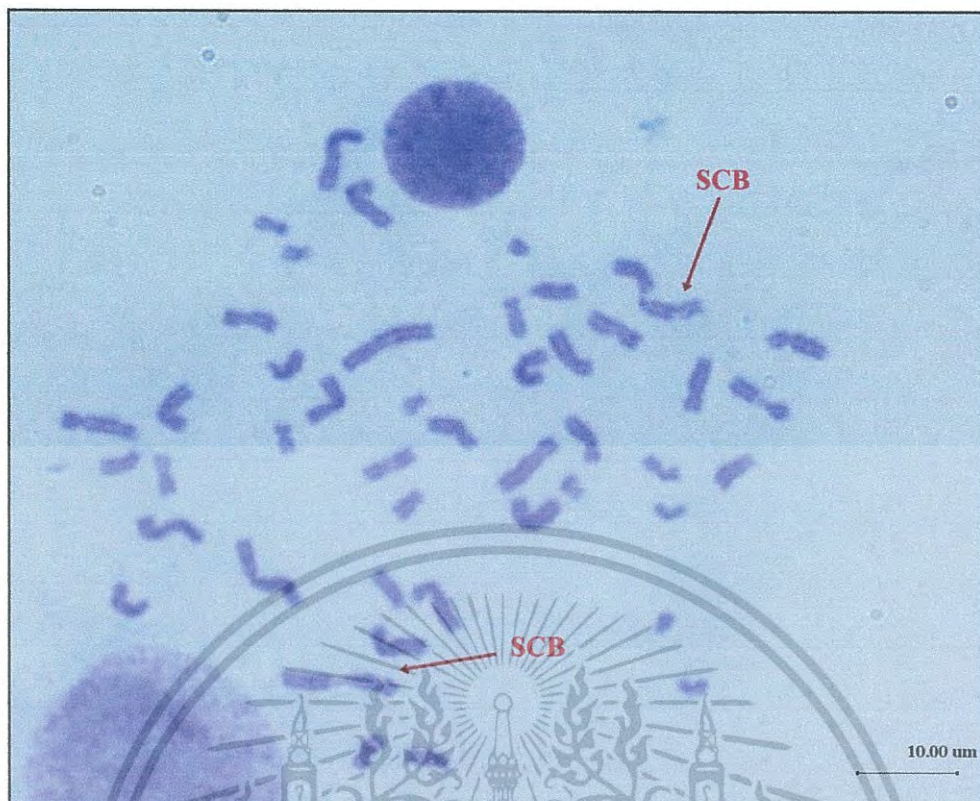
เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทที่มีผลต่อความผิดปกติของโครโมโซม พบว่าในกลุ่มควบคุมไม่พบความผิดปกติในด้านรูปร่างของโครโมโซม และไม่พบความผิดปกติในด้านจำนวนของโครโมโซมที่เป็นแบบ aneuploidy คือ เป็นความผิดปกติแบบที่มีจำนวนโครโมโซมขาด หรือเกินไปจากปกติ (46 โครโมโซม) (รูปที่ 4.12 ก และ ข) สำหรับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 ในชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ไม่พบความผิดปกติของโครโมโซม เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบความผิดปกติของโครโมโซมทั้งชนิด single chromatid gap และ single chromatid break (รูปที่ 4.13 และ 4.14) โดยรูปแบบความผิดปกติของโครโมโซมที่พบมากที่สุด คือ การเกิด single chromatid break และพบการเกิด single chromatid gap รองลงมา และจากการทดลองไม่พบความผิดปกติของโครโมโซมแบบ isochromatid break เมื่อพิจารณาจากโครโมโซมในระยะเมทาเฟสจำนวน 20 เซลล์ (ตารางที่ 4.8) ซึ่งยาปฏิชีวนะ mitomycin C มีกลไกการออกฤทธิ์แบบไม่จำเพาะต่อระยะใดๆ ของวัฏจักรเซลล์จึงมีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ โดยจะพบการหดตัวของโครมาติน (chromatin condensation) แต่จะไม่มี การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไปเป็น apoptotic body (Clarke และคณะ, 2004) นอกจากนี้ mitomycin C ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เกิด DNA-cross-link และการแตกหักของดีเอ็นเอ (Lown และคณะ, 1979)

Kuboki และคณะ (1999) ทดสอบสารสกัด Mer-f3 จาก *Metarhizium* sp. ที่แยกได้จากดินในประเทศญี่ปุ่น พบว่าสารสกัดที่ได้มีความเป็นพิษน้อยต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อทดสอบกับหนูไมส์ ชนิด C3H/He (C3H/He mice) และ Balb/c (Balb/c mice) โดยวิธี mixed lymphocyte reaction (MLR) ซึ่งเป็นวิธีการวัดการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ mitogen โดยวัดการแบ่งตัวของเซลล์ด้วยสาร [<sup>3</sup>H]TdR และการทดลองของ Gentner และคณะ (1998) ที่ได้สกัดสารจาก *M. anisopliae* และเมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษกับปลากินยุง (*Gambusia affinis*) พบว่ามีความเข้มข้นของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองตายไปเป็นจำนวนครึ่งหนึ่งของจำนวนเริ่มต้น (50% Lethal Concentration; LC<sub>50</sub>) ที่ค่า LC<sub>50</sub> เท่ากับ 141 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่เป็นพิษและทำให้ปลาตัวเต็มวัยตาย



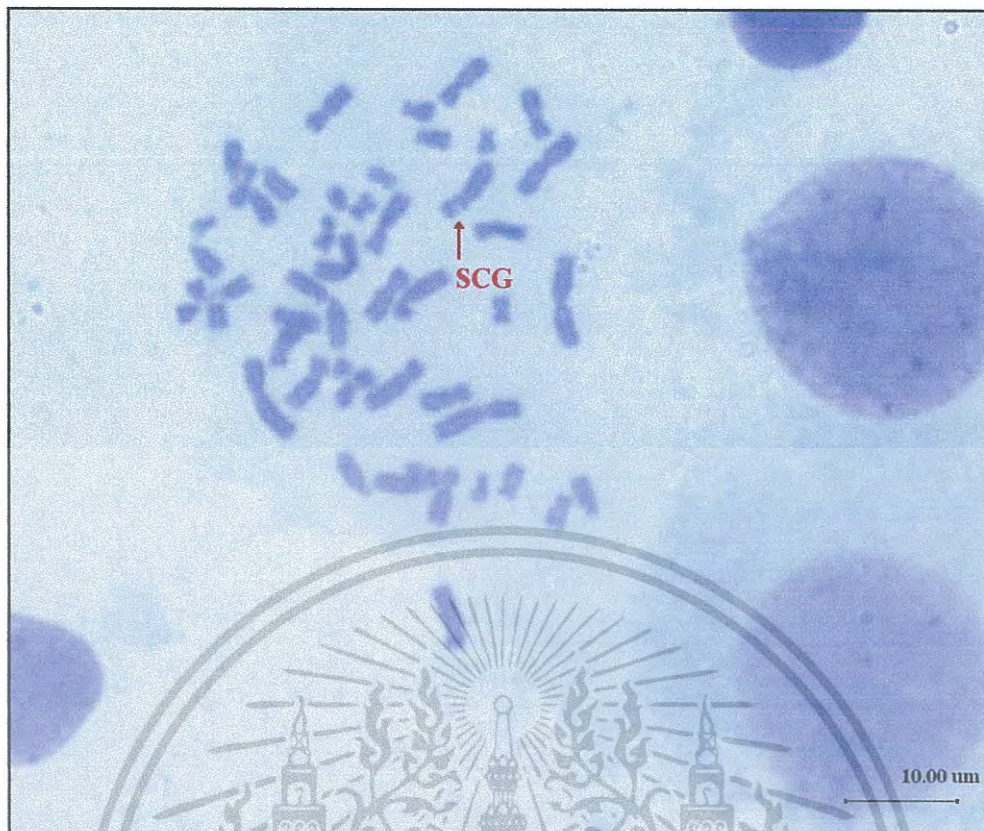
**รูปที่ 4.12** แสดงลักษณะ โครโมโซมในระยะเมทาเฟสจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัด บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อใช้กำลังขยาย 1,000 เท่า (ก) โครโมโซมจากตัวอย่างเพศชาย และ (ข) โครโมโซมจากตัวอย่างเพศหญิง

ผลที่ได้จากการทดลอง พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 ไม่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อกลายพันธุ์เนื่องจากไม่ทำให้เกิดความผิดปกติหรือการแตกหักของโครโมโซม โดยสารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติทางไซโตจีนิติก สามารถแบ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการหักของโครโมโซม (clastogen) และสารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติในการแบ่งเซลล์ (mitotic poison) โดยสารบางชนิดอาจมีคุณสมบัติเป็นทั้ง clastogen และ mitotic poison (Hsu และคณะ, 1986 อ้างถึงใน นฤพร, 2546) ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อรา *M. anisopliae* หากมีการนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จะมีภาวะเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ในระดับต่ำ เนื่องจากไม่พบความผิดปกติของโครโมโซมที่ได้ทดสอบกับสารสกัดหยาบ แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีต่อสารพันธุกรรมในครั้งนี้เป็นเพียงงานวิจัยเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งงานวิจัยที่เกี่ยวกับการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเชื้อรา *M. anisopliae* ต่อสารพันธุกรรมในลักษณะของการทดสอบกับโครโมโซมเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ยังมีอยู่น้อย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาหรือปรับปรุงวิธีการในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีต่อสารพันธุกรรม เพื่อให้ผลการทดสอบเป็นที่ยอมรับได้ นอกจากนี้ควรจะต้องมีการทดสอบด้วยวิธีต่างๆกัน เพื่อเป็นการยืนยันและเปรียบเทียบผลการทดสอบอีกด้วย



รูปที่ 4.13 แสดง single chromatid break เมื่อบ่มเซลล์ร่วมกับ mitomycin C ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 แสดง single chromatid gap เมื่อบ่มเซลล์ร่วมกับ mitomycin C ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากการสกัดสารจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ MA001, MA002, MA017, MA019 และ SNB03 ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล พบว่าเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ให้ปริมาณสารสกัดหายามากที่สุด อาจเนื่องมาจากเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วที่สูงจึงมีความสามารถในการละลายสารออกจากเส้นใยได้มาก เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดหายาจากเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลตในชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ชนิด *B. subtilis*, *S. aureus* และ *M. luteus* แต่ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาทดสอบ คือ *E. coli* และ *P. aeruginosa* แต่สารสกัดหายาในชั้นเฮกเซนและเมทานอลไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่นำมาใช้ทดสอบ

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HT29, MCF7, Vero HepG-2 และ P388 ที่ความเข้มข้น 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดหายาในชั้นเอทิลอะซิเตทมีแนวโน้มมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าการใช้เฮกเซน และเมทานอล สารสกัดหายาจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 เนื่องจากค่า  $CC_{50}$  ของเซลล์ P388 นั้นสามารถทำให้เซลล์เป็นพิษ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่สารสกัดหายาด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และเมทานอล นั้น แสดงความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, Vero และ HepG-2 เนื่องจากไม่ทำให้ร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่า  $CC_{50}$  ของสารสกัดหายาต่อเซลล์ทั้ง 4 ชนิดนั้นสูงกว่า 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสกัดหายาจากเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่าสารสกัดหายาในชั้นเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต SNB03 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 มากกว่าไอโซเลตอื่น โดยมีค่า  $CC_{50}$  ที่ความเข้มข้น 363.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดหายาในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 ที่ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลของการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โครโมโซมมีอัตราการแบ่งเซลล์ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม และเมื่อใช้ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวในหลอดทดลอง โดยไม่พบโครโมโซมที่มีความผิดปกติในด้านจำนวน คือ การที่มีจำนวนโครโมโซมขาด หรือเกินไปจากปกติ (46 โครโมโซม) และไม่พบความผิดปกติในด้านรูปร่างของโครโมโซม (chromosome aberration)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- นริศ ท้าวจันทร์ และอนุชิต ชนาจริยวงศ์. 2551. ประสิทธิภาพการควบคุมของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในแมลงวันผลไม้ (Diptera: Tephritidae), ว. วิทยาศาสตร์การเกษตร, 39: 21-22.
- นฤมล ตั้งธีระสุนันท์. 2553. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Metarhizium* sp. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เบ็ญจมาศ จิตรสมบุญ. 2543. การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน. รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ปกป้อง ประยงค์. 2551. การตรวจกรองฤทธิ์ฆ่าเซลล์ไลน์มะเร็ง และการชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสของพืชไทย 14 ชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเภสัชภัณฑ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- เปรมวดี สกุลสม. 2549. พืชต้านมะเร็งและกลไกการออกฤทธิ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยศิลปากร
- เพชรหทัย ปฎิรูปานุสร และอัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อราทำลายแมลงต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยจักจั่นสีเขียว, ในการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว. 144-154.
- ภาวนา พนมเขต, สุรศักดิ์ แว่นรัมย์ และธัญยาจารย์ ศรีวรมาศ. 2554. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของส่วนสกัดของพืชไทยต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*. ว. เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด, 23: 151-158.
- มณจันทร์ เมฆธน และศศิเทพ ปิติพรเทพิน. 2554. การใช้เชื้อราศัตรูแมลงในการควบคุมหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Hub.), ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44: สาขาพืช. 753-761.
- มาลี ตั้งระเบียบ และกรกฎ งานวงศ์พาณิชย์. 2552. ผลของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ต่อเห็บโค (*Boophilus microplus*), เชียงใหม่สัตวแพทยสาร. 7: 7-17.
- มาลัย วรจิตร และมาลิน จุลศิริ. 2536. สารต้านแบคทีเรียและการดื้อยา. โรงพิมพ์ศิริยอด, กรุงเทพฯ.
- รัชดา หริตกุล, มาฮาธิโกะ อีชาเกะ และยอดหทัย เทพธรานนท์. 2547. สารประกอบอัลคาลอยด์ชนิดใหม่จากเชื้อราแมลงสายพันธุ์ *Isaria tenuipes* BCC7831. Biotec. Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิวัฒน์ เสือสะอาด, พิมพ์พรณ สมมาตย์, ปวีณา นูชาเทียน, อาภรณ์ ปั้นทองคำ และ รัตติรส เชียง  
สิน. 2551. การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราขาว *Beuveria bassiana* ในการเข้าทำลาย  
แมลงศัตรูพืชเศรษฐกิจ. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่  
46. กรุงเทพฯ : สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิธร คาคสนิท, ชฎามาศ พินิจสุนทร, วัชรินทร์ ลอยลม และ พวงรัตน์ ยงวนิชย์. 2554. ผลเสียต่อ  
เซลล์เมื่อมีการปรับตัวที่ไม่สมดุลต่อภาวะเครียดที่เกิดกับยีน ภายหลังจากติดเชื้อและการ  
อักเสบ. ศรีนครินทร์เวชสาร. 26: 127-135.

ศิริฉัตร ศิสรพงศ์. 2546. การคัดเลือกราแมลง *Hypocrella scutata* ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์.  
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร), มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อภิรดี คำธิดีศวกุล. 2551. การคัดกรองเชื้อราในแมลงบางชนิดที่สามารถผลิตสารเมทาบอลิไต์  
จากป่าในภาคเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา,  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อมรา คัมภีรานนท์. 2546. พันธุศาสตร์ของเซลล์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ, สำนักพิมพ์แห่ง  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัญชติ นาทองคำ, ศิวีย์ สิริมังกรรัตน์, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, หทัยรัตน์ อุไรรงค์, เบญจมาศ  
แก้วรัตน์. 2553. ประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. ไอโซเลตภาค  
ตะวันออกเฉียงเหนือ ในการควบคุมแมลงศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจ, วารสารวิจัย มช. 15:  
930-939.

อุ้นเรือน เพชรวัลย์. เอกสารประกอบการสอนวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: ปฏิบัติการ  
เพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า  
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง. อ้างถึง: Mitsuhashi, J. 2002. Invertebrate Tissue Culture  
Methods. Springer-Verlag, Tokyo.

Ahmed, M.K., Habibullah, A.M.M., Hossain, M.A., Arif, M., Parvin, E., Akter, M.S., Khan, M.S.  
and Islam, M.M. 2011. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia  
(*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test.  
Chemosphere. 84: 143-149.

Amiri-Besheli, B., Khambay, B., Cameron, S., Deadman, M.L. and Butt, T.M. 2000. Inter and  
intra specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp.,  
and its significance to pathogenesis. Mycol. Res. 104: 447-452.

Ansari, M.A., Tirry, L. and Moens, M. 2005. Antagonism between entomopathogenic fungi and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้เฉพาะในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้รู้เห็นว่ามีประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Azumi, M., Ishidoh, K., Hiroshi, K., Takuya N., Fumio I., Tsuyoshi F. and Yasuhiro I. 2008. Aurovertins F–H from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Nat. Prod. 71: 278-280.
- Barbieri, R.T., Croce, J., Gandra, R.F., Gagate, E., Paula, C.R. and Gambale, W. 2005. Allergenic extracts from *Metarhizium anisopliae*: obtainment and characterization. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 15: 131-139.
- Bhattacharya, K., Dopp, E., Kakkar, P., Jaffery, F.N. and Schiffmann, D. 2005. Biomarkers in risk assessment of asbestos exposure. Mutat. Res. 579: 6-21.
- Bidochka, M.J., Kamp A.M., Lavender, T.M., Dekoning, J. and De Croos J.N.A. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* : uncovering cryptic species. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1335-1342.
- Bridge P.D., Prior C., Sagbohan J., Lomer C.J., Carey M. and Buddie A. 1997. Molecular characterization of isolates of isolate of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. Biodivers. Conserv. 6: 177-189.
- Boonphong, S., Kittakoop, P., Isaka, M., Palittapongarnpim, P., Jaturapat, A., Danwisetkanjana, K., Tanticharoen, M. and Thebtaranonth, Y. 2001. A new antimycobacterial, 3 beta-acetoxy-15 alpha,22-dihydroxyhopane, from the insect pathogenic fungus *Aschersonia tubulata*. Planta. Med. 67: 279-281.
- Brownbridge, M. 1995. Prospects for mycopathogens in thrips management. In : Thrips Biology and Management. (B. L Parker, M. Skinner and T. Lewis, eds). Plenum Press, New York. 281-295.
- Buchwaldt, L., Jensen, J.S. 1991. HPLC purification of destruxins produced by *Alternaria brassicae* in culture and leaves of *Brassica napus*. Phytochemistry. 30: 2311-2316.
- Butt, T.M. 1990. Fungal infection processes - a mini-review. In : Proceedings, 5<sup>th</sup> International colloquium on invertebrate pathology and Microbial Control. Society for Invertebrate Pathology. Adelaide, Australia. 121-124.
- \_\_\_\_\_, T.M. and Brownbridge, M. 1997. Fungal Pathogens of Thrips. In : Thrips as Crop Pests (T. Lewis, ed.). CAB International. USA. 399-433.

- Cai, P., Smith, D., Katz, B., Pearce, C., Venables, D. and Houck, D. 1998. Destruxin-A4 chlorohydrin, a novel destruxin from fungus OS-F68576: isolation, structure determination, and biological activity as an inducer of erythropoietin. *J. Nat. Prod.* 61: 290-293.
- Celik, M., Yilmaz, S., Aksoy, H., Unal, F., Yuzbasioglu, D. and Donbak, L. 2009. Evaluation of the genotoxicity of *Fusarium* mycotoxin moniliformin in human peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 50: 431-434.
- Chen, H.C., Chou, C.K., Sun, C.M. and Yeh, S.F. 1997. Suppressive effects of destruxin B on hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral. Res.* 34: 137-144.
- Clarke, A.A., Gibson, F.M., Scott, J., Myatt, N. and Rutherford, T.R. 2004. Fanconi's anemia cell lines show distinct mechanisms of cell death in response to mitomycin C or agonistic anti-Fas antibodies. *Haematologica.* 89: 11-20.
- Denizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Meth.* 89: 271-277.
- Doughari, J.H. 2006. Antimicrobial Activity of *Tamarindus indica* Linn. *Trop. J. Pharm. Res.* 5: 597-603.
- Driver, F., Milner, R.J. and Trueman, J.W.H. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.* 104: 134-150.
- Dumas, C., Matha, V., Quiot, J.M. and Vey, A. 1996. Effects of destruxins, cyclic depsipeptide mycotoxins, on calcium balance and phosphorylation of intracellular proteins in lepidopteran cell lines. *Comp. Biochem. Physiol.* 114: 213-219.
- Ebert, D., and Weisser, W.W. 1997. Optimal killing for obligate killers: the evolution of life histories and virulence of semelparous parasites. *Proc. R. Soc. Lond.* 264: 985-991.
- Fenech, M. 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a cytome assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.* 600: 58-66.
- Fotakis, G. and Timbrell, J.A. 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 160: 171-177.

- Freshney, R. 1987. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 117, Alan R. Liss, Inc., New York.
- Garn, H., Krause, H., Enzmann, V., Drossler, K. 1994. An improved MTT assay using the electron-coupling agent menadione. *J. Immunol. Methods.* 168: 253-256.
- Genthner, F.J., Chancy, C.A., Couch, J.A., Foss, S.S., Middaugh, D.P., George, S.E., Warren, M.A. and Bantle J.A. 1998. Toxicity and pathogenicity testing of the insect pest control fungus *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 317-324.
- Gillespie A. T. and Claydon N. 1989. The use of entomopathogenic fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pestic. Sci.* 27: 203-215.
- Green, L.M., Reade, J.L. and Ware, C.F. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantification of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Method.* 70: 257-268.
- Gupta, S., Roberts, D.W., Renwick, J.A.A. 1989. Insecticidal cyclodepsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1:* 2347-2357.
- \_\_\_\_\_, S., Krasnoff, S.B., Renwick, J.A.A., Roberts, D.W., Steiner, J.R., and Clardy, J. 1993. Viridoxins A and B: Novel toxins from the fungus, *Metarhizium flavoviridae*. *J. Organic. Chemistry.* 58: 1062-1067.
- Hansen, M.B., Nielsen, S., K.B., 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. immunol. method.* 119: 203-210.
- Hsiao, Y.M. and Ko J.L. 2001. Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. *Toxicon.* 39: 837-841.
- Hsu, T.C., Jan, C.L. and halli, L.K. 1986. Cytogenetic assays for mitotic poisons using aromatic animal cells. *Chem. Mut.* 10: 155-181. :อ้างอิงใน นฤพร เพ็ชรกลาง. 2546. ผลทางไซโตจีนิติกของยาสลบชนิดสูดดม Diethyl Ether Halothane และ Isoflurane ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในอาหารเพาะเลี้ยง. ภาควิชาพันธุศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Hino, M., Nakayama, O., Tsurumi, Y., Adachi, K., Shibata, T., Terano, H., Kohsaka, M., Aoki, H., and Imanaka, H. 1985. Studies of an immunomodulator, swainsonine: I. Enhancement of immune response by swainsonine in vitro. *J. Antibiotics.* 38: 926-935.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ho, M., Delgado, C., Owens, G. and Steller, M. 1997. Insulin-like growth factor-II participates in the biphasic effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on ovarian cancer cell growth. *Fertil. Steril.* 67: 870-876.
- Huxham, I.M., Lackie, A.M. and McCorkindale, N.J. 1989. Inhibitory effects of cyclodepsipeptides, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae* on cellular immunity in insects. *J. Insect. Physiol.* 35: 97-105.
- Iijima, M., Masuda, T., Nakamura, H., Naganawa, H., Kurasawa, S., Okami, Y., Ishizuka, M., Takeuchi, T., and Iitaka, Y. 1992. Metacytofilin, a novel immunomodulator produced by *Metarhizium* sp. TA2759. *J. Antibiot.* 45: 1553-1556.
- Isaka, M., Tanticharoen, M., Kogsaree, P. and Thebtaranonth, Y. 2001. Structures of cordypyridones A-D, antimalarial N-hydroxy and N-methoxy-2-pyridones from the insect pathogenic fungus *cordyceps nipponica*. *J. Org. Chem.* 66: 4803-4808.
- \_\_\_\_\_, M., Kittakoop, P., Kirtikara, K., Hywel-Jones N.L. and Thebtaranonth, Y. 2005. Bioactive substances from insect pathogenic fungi. *Acc. Chem. Res.* 38: 813-823.
- Instanes, C., Ward, M.D. and Hetland, G. 2006. The fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae* has an adjuvant effect on the allergic response to ovalbumin in mice. *Toxicol. Lett.* 161: 219-225.
- Jegrov alexandra., Sedmera P., HavliaCiek V. and Matha V. 1998. Destruxin Ed1 a cyclopeptide from the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry.* 49: 1815-1817.
- Kershaw, M.J., Moorhouse, E.R., Bateman, R., Reynolds, S.E. and Charnley, A.K. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of Insect. *J. Invertebr. Pathol.* 74: 213-223.
- Khan, A., Williams, K and Nevalainen, H. 2003. Testing the nematophagous biological control strain *Paecilomyces lilacinus* 251 for paecilotoxin production. *FEMS-Microbiol. lett.* 227: 107-111.
- Kikuchi, H., Miyagawa, Y., Sahashi, Y., Inatomi, S., Haganuma, A., Nakahata, N and Oshima, Y. 2004. Novel trichothecanes paecilomycine A, B and C isolated from entomopathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes*. *Tetrahedron letters.* 45: 6225-6228.

- \_\_\_\_\_, H., Tomoko, H., Minoru, K., Mizuki, S., Yasuhiro, K., Kazunori, U., Yuzuru, K., Hiroki, S., Mitsuaki, S., Shoichiro, K. and Yoshiteru, O. 2009. New diterpene pyrone-type compounds, metarhizins A and B, isolated from entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* and their inhibitory effects on cellular proliferation. *Tetrahedron*. 65: 469-477.
- Kim, H.S., Jung, M.H., Ahn, S., Lee, C.W., Kim, S.N. and Ok, J.H. 2002. Structure elucidation of a new cyclic hexadepsipeptide from *Beauveria felina*. *J. Antibiot.* 55: 598-601.
- Kim, G.Y., Ko, W.S., Lee, J.Y., Lee, J.O., Ryu, C.H., Choi, B.T., Park, Y.M., Jeong, Y.K., Lee, K.J., Choi, K.S., Heo, M.S. and Choi, Y.H. 2006. Water extract of *Cordyceps militaris* enhances maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells in vitro. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 354-360.
- Kondo, S., Norio, M., Moji, H., Toshinao, A., Miura, K., Fujii, T., Hayashi, I., Makino, K., Yamamoto, M. and Nakajima, N. 1980. K-582, new peptide antibiotic I. *J. Antibiotic*. 33: 533-542.
- Kopecky, J., Matha, V. and Jegorov, A. 1992. The inhibitory effect of destruxin A on the replication of arboviruses in *Aedes albopictus* C6/36 cell line. *Comp. Biochem. Physiol.* 103: 23-25.
- Krasnoff, S.B., Gibson, D.M., Belofsky, G.N., Gloer, K.B. and Gloer, J.B. 1996. New destruxins from the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. *J. Nat. Prod.* 59: 485-489.
- \_\_\_\_\_, S.B., Sommers, C.H., Moon, Y. S., Donzelli, B.G.G., Vandenberg, J.D., Churchill, A. C.L. and Gibson D.M. 2006. Production of mutagenic metabolites by *Metarhizium anisopliae*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7083-7088.
- \_\_\_\_\_, S.B., Keresztes, I., Gillilan, R.E., Szebenyi, D.M.E., Donzelli, B.G.G., Churchill, A.C.L. and Gibson, D.M. 2007. Serinocyclins A and B, cyclic heptapeptides from *Metarhizium anisopliae*. *J. Nat. Prod.* 70: 1919-1924.
- \_\_\_\_\_, S.B., Ulrich E., Miller, P.G., Shuler, M.L., Glahn, R.P., Donzelli, B.G.G. and Gibson, D.M. 2012. Metacridamides A and B, macrocycles from conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. *J. Nat. Prod.* 75: 175-180
- Kuboki, H., Tsuchida, T., Wakazono, K., Isshiki, K., Kumagai, H., and Yoshioka, T. 1999. Merf3, 12-Hydroxy-ovalicin, produced by *Metarrhizium* sp. f3. *J. Antibiot.* 52: 590-593.

- Kuo, C.F., Tzyy, M.R., Bing, L.L., Yew, M.T. and Yaw, N.C. 2004. Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme. Microb. Tech.* 34: 22-25.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N. Coote, P.J. and Nychas, G.J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91: 4553-4620.
- Lee, S.Y., Nakajima, I., Ihara, F., Kinoshita, H and Nihira, T. 2005. Cultivation of entomopathogenic fungi for the search of antibacterial compounds. *Mycopathologia.* 160: 321-325.
- \_\_\_\_\_, S.Y, Kinoshita H., Ihara F., Igarashi Y., and Nihira T. 2008. Identification of novel derivative of helvolic acid from *Metarhizium anisopliae* grown in medium with insect Component. *J. Biosci. Bioeng.* 105: 476-480.
- Liang, Z.Q., Liu, A.Y. and Liu, J.L. 1991. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. *Acta. Mycologica. Sinica.* 10: 257-262. (in Chinese).
- Liu, Z.Y., Liang, Z.Q., Whalley, A.J.S., Yao, Y.J., and Liu, A.Y. 2001. *Cordyceps* brittle banksioides, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *J. Inverte. Path.* 78: 178-182.
- \_\_\_\_\_, Z.Y., Liang, Z.Q., Liu, A.Y., Yao, Y.J., Hyde, K. D., and Yu, Z.N. 2002. Molecular evidence for teleomorph-anamorph connections in *Cordyceps* based on ITS-5.8 S rDNA sequences. *Mycol. Res.* 106: 1100-1108.
- Liu, B.L., Chen, J.W. and Tzeng, Y.M., 2000. Production of cyclodepsipeptides destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol. Prog.* 16: 993-999.
- Lomer, C.J., Prior, C. and Kooyman, C. 1997. Development of *Metarhizium* spp. For the control of grasshoppers and locusts. *Mem. Ent. Soc. Can.* 171: 265-286.
- Lown, J.W. 1979. The molecular mechanism of antitumor action of the mitomycins. In Carter, S.K., Crooke, S.J. and Adler, N.A. "Mitomycin C: Current Status and new developments. New York: Academic press. 5-26.
- Makaka, C. 2008. The efficacy of two isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschin) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the adults of the black maize beetle *Heteronychus licas* (Klug) (Coleoptera: Scarabidae) under laboratory conditions. *Afr. J. Agric. Res.* 3: 259-265.

- Maketon, M., Sawangwan, P. and Sawatwarakul, W. 2007. Laboratory study on the efficacy of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) in controlling *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Entomol. Gen.* 30: 203-218.
- Milner, R.J., Staples, J.A. and Lutton, G.G. 1998. The selection of an isolate of the Hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae*, for control of termites in Australia. *Biol. control.* 11: 240-247.
- Mnyone, L.L., Tanya, L.R., Issa, N.L., Dickson, W.L., Matthew, J.K. and Christian, L. 2009. First report of *Metarhizium anisopliae* IP46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* s.s. and *An. arabiensis* (Diptera; Culicidae). *Parasitic.* 2: 59.
- Mohla, S., Humphries, M.j., White, S.L., Matsumoto, K., Newton, S.A, Sampson, C.C., Bowen, D. and Olden, K. 1989. Swainsonine: a new antineoplastic immunomodulator. *J. Nat. Med.* 81: 1049-1056.
- Mossman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63.
- Mueller, H., Kassack, M.U., Wiese, M. 2004. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J. Biomol. Screening.* 9: 506-515.
- Murayama, T., Takahashi, N. and Ikoma, N. 1996. Cytotoxicity and characteristics of mitomycin C. *Ophthalmic. Res.* 28:153-159.
- Nemr, A. E. 2000. Synthetic methods for the stereoisomers of swainsonine and its analogues. *Tetrahedron.* 56: 8579-8629.
- Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K. and Jena, B.S. 2008. Antibacterial activity of the extracts from the fruit rinds of *Garcinia cowa* and *Garcinia pedunculata* against food borne pathogens and spoilage bacteria. *LWT-Food Sci. Technol.* 41: 1857-1861.
- Nikaido, H. and Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability, *Microbiol. Rev.* 49: 1-32.
- Oselys, R.J., Chrissana, S.C., Victor, H.P. and Ranulfo, M.A. 2007. Screening of *Metarhizium* spp. strains for anticancer indolizidine alkaloid production and its rapid detection by MS analysis. *Bra. J. Microbiol.* 38: 780-784.
- Pais, M., Das, B.C. and Ferron, P. 1981. Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry.* 20: 715-723.

- Park, H.K., Lee, K.W. Choi, J.S. and Joo, C.K. 2002. Mitomycin C induced cell death in mouse lens epithelial cells. *Ophthalmic. Res.* 34: 213-219.
- Pedras, M.S.C., Zaharia, L. I., and Ward, D. E. 2002. The destruxins: Synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry.* 59: 579-596.
- Peng, G., Wang, Z., Yin, Y., Zeng, D. and Xia, Y. 2008. Fieldtrials of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Ascomycota: Hypocrales) against oriental migratory locusts, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) in Northern China. *Crop. Protection.* 27: 1244-1250.
- Pieters, R., Loonen, A.H., Huismans, D.R., Broekema, G.J., Dirven, M.W., Heyenbrok, K., Hahlen, K. and Veerman, A.J. 1990. In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood.* 76: 2327-2336.
- Repetto, G., delPeso, A. and Zurita, J.L. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3: 1125-1131.
- Roberts, D.W. 1966. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. II. Symptoms and detection in moribund hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 8: 222-227.
- \_\_\_\_\_, D.W., Dunn, H., Ramsay, G., Sweeney, A., and Dunn, N. 1987. A procedure for preservation of mycelium of the mosquito pathogen *Culicinomyces clavissporus*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 26: 186-188.
- Rombach, M.C., Humber, R.A. and Roberts, D.W. 1986. *Metarhizium flavoviride* var. *minus* var. nov. a pathogen of plant and leaf hoppers on rice in the Philippines and Solomon Islands. *Mycotaxon.* 27: 87-92.
- \_\_\_\_\_, M.C., Humber, R.A. and Evans, H.C. 1987. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leafhoppers and plant hoppers of rice. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 88: 451-459.
- Rowland, R.E., Edwards, L.A. and Podd, J.V. 2007. Elevated sister chromatid exchange frequencies in New Zealand Vietnam War veterans. *Cytogenet. Genome. Res.* 116:248-251.
- Ryan, M.J., D. Smith, P.D. Bridge and P. Jeffries. 2003. The relationship between fungal preservation method and secondary metabolite production in *Metarhizium anisopliae* and *Fusarium oxysporum*. *Wold J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 839-844.
- Sadeghi, H.M., Seitz, B., Hayashi, S., LaBree, L. and McDonnell, P.J. 1998. In vitro effects of mitomycin-C on human keratocytes. *J. Refract. Surg.* 14: 534-540.
- Sahab, A.F. 2012. Antimicrobial efficacy of secondary metabolites of *Beauveria bassiana* against selected bacteria and phytopathogenic fungi. *J. Appl. Sci. Res.* 8: 1441-1444.

- Saowanit, M. and Angsumarn, C. 2004. Chemical components of *Hirsutella thompsonii* crude filtrate and their biological activities. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 38: 331-339.
- Schaerffenberg, B.V. 1959. Zur Biologie und Okologie des insektentotenden Pilzes *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beaveria bassiana* (Bals.) Vuill; in : Zimmermann G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *J. Pest. Sci.* 37: 375-379.
- Seger, C., Eberhart, K., Sturm, S., Strasser, H. 2006. Apolar chromatography on sephadex LH-20 combined with high-speed counter-current chromatography high yield strategy for structurally closely related analytes-Destruxin derivatives from *Metarrhizium anisopliae* as a case study. *J. Chroma.* 1117: 67-73.
- Self, R. 2005. Extraction of organic analytes from foods: A manual of methods. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Shah, P.A. Godonou, I., Gbongboui, C., Hossou, A. and Lomer, C.T. 1989. Survival and mortality of grasshopper egg pods in semi arid cereal cropping areas of northern Benin. *B. Entomol. Res.* 88: 451-459.
- Sigma-Aldrich. 2004. Mitomycin-C. (ออนไลน์). สืบค้นจาก: [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/2/m4287pis.Par.0001.File.tmp/m4287pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/m4287pis.Par.0001.File.tmp/m4287pis.pdf).
- Skropek A. and Butt T.M., 2005. Toxicity testing of destruxins and crude extracts from the insect-pathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae*. *FEMS-Microbiol. Lett.* 2551: 23-28.
- Skropek, A., Boss, D., Defago, G., Butt, T.M. and Maurhofer, M. 2006. Evaluation of different biological test systems to assess the toxicity of metabolites from fungal biocontrol agents. *Toxicol. Lett.* 261: 43-52.
- Slater, T.F., Swyer, B. and Strauli U. 1963. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta.* 77: 383-393.
- Sontakke, Y.A. and Fulzele, R.R. 2009. Cytogenetic study on genotoxicity of antitumor-antibiotic mitomycin C. *Biomed. Res-India.* 20: 40-44.
- St. Leger, Charnley, A.K. and Cooper, R.M. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 48: 85-95.

- Strasser, H., Vey, A. and Butt, T.M. 2000. Are there any risk in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Toyplocadium* and *Beauveria* species. *Biocontrol Sci. Techn.* 10: 717-735.
- Tulloch, M. 1976. The genus *Metarhizium*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 66: 407-411.
- Twentyman, P.R., Luscombe, M. 1987. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Brit. J. Cancer.* 56: 279-285.
- Uchida, R., Imasato, R., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Shiomi, J., Tomoda H. and Omura, S. 2005. New insecticidal antibiotics, hydroxyfungierins A and B, produced by *Metarhizium* sp. FKI-1079. *Jpn. J. Antibiot.* 58: 804-809.
- Udroiu I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat. Toxicol.* 79: 201-204.
- Vey, A., Hoagland, R. and Butt, T.M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt T.M., Jackson C.W. and Magan N., editors. *Fungi as biocontrol agents: problems and potential*. Wallingford, UK: CABI International. 311-346.
- Vichai, V. and Kirtikara, K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* 1: 1112-1116.
- Wang, C., Skrobek, A., and Butt, T.M. 2004. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 85: 168-174.
- Watson, A.A., Fleet, W.J., Asano, N., Molyneux, R.J. and Nash, R.J. 2001. Polyhydroxylated alkaloids natural occurrence and therapeutic applications. *Phytochemistry.* 56: 265-295.
- Wu, J.Y., Zhang, Q.X. and Leung, P.H. 2007. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* mycelium on various cancer cells in culture and B16 melanoma in C57BL/6 mice. *Phytomedicine.* 14: 43-49.
- Xiao, D.M., Xiao, J.H., Zhang, Z.M. and Sun, Z.H. 2010. Antimicrobial potential of *Metarhizium taii* in vitro. *Zhong Yao Cai.* 33: 952-957.
- Yang, Y., Cai, S., Zheng, Y., Lu, X., Xu, X. and Han Y. 2009. *Metarhizium taii* var. *chongqingensis* nov., anamorph of *Cordyceps chongqingensis* sp. nov. isolated from a low altitude area in Chongqing, China. *Curr. Microbiol.* 58: 635-641.
- Yeh, S.F., Pan W., Ong G.T., Chiou, A.J., Chuang, C.C., Chiou, S.H. and Wu S.H. 1996. Study of structure-activity correlation in destruxins, a class of cyclodepsipeptides possessing suppressive effect on the generation of hepatitis B virus surface antigen in human hepatoma cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 229: 65-72.

- Zhang, Q., Wu, J., Hu, Z. and Bum, D.L. 2004. Induction of HL-60 apoptosis by ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* fungal mycelium. *Life Sci.* 75: 2911-2919.
- Zimmermann G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *J. Pest. Sci.* 37: 375-379.
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Ann. Bioeth.* 17: 879-920.

[Online].Available : <http://www.cenicana.org>

[Online].Available : <http://www.ncbi.nlm.gov>

[Online].Available : <http://www.nature.com/naturebiotechnology>

[Online].Available : <http://www.regional.org.au>

[Online].Available : [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Trypan\\_blue.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Trypan_blue.png)

[Online].Available : [http://www.itsbio.co.kr/main/goods\\_view.php?category2=58&no=122](http://www.itsbio.co.kr/main/goods_view.php?category2=58&no=122)

[Online].Available : <http://www.commonswikimedia.org/wiki/File:Hemocytometer.jpg>

[Online].Available : <http://www.thaibiocontrol.org/main.php?filename=Metarhizium>

[Online].Available : <http://www.ask.com/wiki/Cytochalasin>

[Online].Available : <http://www.siamanswer.com/media/?search=disc+test>

[Online].Available : <http://www.folk.uio.no/kjetilgb/rb.htm>

[Online].Available : <http://www.vin.bg.ac.rs>

[Online].Available : <http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ภาคผนวก ก**  
**สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์**

**อาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) สำเร็จรูป; Scharlar**

Potato	4.0	กรัมต่อลิตร
D (+) glucose	20.0	กรัมต่อลิตร
Agar	15.0	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ใช้อาหารสูตรสำเร็จ PDA ละลายอาหารด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**อาหารสูตร Nutrient Agar (NA)**

Beef Extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Agar	15.0	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ใช้อาหารสูตรสำเร็จ NA ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**อาหารสูตร Mueller - Hinton Agar**

Casein hydrolysate	17.5	กรัมต่อลิตร
Beef infusion	2	กรัมต่อลิตร
Starch	1.5	กรัมต่อลิตร
Agar	170	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ใช้อาหารสูตรสำเร็จ MHB แล้วเติมวุ้นร้อยละ 1.5 ละลายอาหารด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### อาหารสูตร RPMI-1640

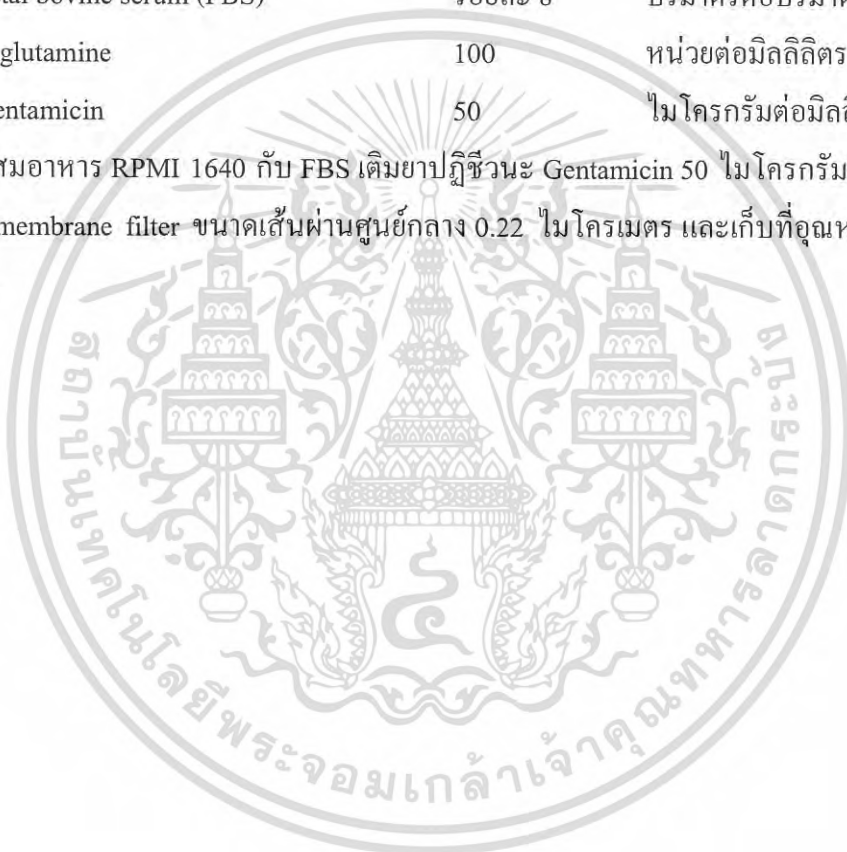
อาหาร RPMI 1640 medium powder	20.90	กรัม
L-glutamine	100	หน่วยต่อมิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เติมอาหารผง RPMI 1640 ลงไปในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติม  $\text{NaHCO}_3$  2 กรัม กวนอาหารให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน กรองด้วย membrane filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### การเตรียม complete media

Fetal bovine serum (FBS)	ร้อยละ 8	ปริมาตรต่อปริมาตร
L-glutamine	100	หน่วยต่อมิลลิลิตร
Gentamicin	50	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผสมอาหาร RPMI 1640 กับ FBS เติมนยาปฏิชีวนะ Gentamicin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วย membrane filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร และเก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส



## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสารเคมี

#### การเตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาตรที่เตรียม 20 มิลลิลิตร ชั่งผง MTT 40 มิลลิกรัม จากนั้นทำการละลายผง MTT ด้วย PBS (1X) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

#### การเตรียมสารละลาย mitomycin C ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมโดยใช้ mitomycin C ชนิดผงที่มีขนาดบรรจุ 2 มิลลิกรัม ต่อ 1 ขวด เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย mitomycin C ที่มีความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### การเตรียมน้ำยาคงสภาพ (fixative)

น้ำยาคงสภาพประกอบด้วย MeOH (absolute methanol) 3 ส่วนกับ glacial acetic acid 1 ส่วน โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้และแช่เย็นตลอดเวลา

#### การเตรียมสารละลายไวส์บัฟเฟอร์ (wiese buffer)

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 6.94 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 7.12 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อจะใช้น้ำสารละลายทั้งสองส่วนมารวมกันโดยใช้อัตราส่วนระหว่าง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  และ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  เป็น 1 : 1

#### การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.075 โมลาร์ (0.075 M KCl)

ในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

KCl	5.59	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำโพแทสเซียมคลอไรด์ มาละลายด้วยน้ำกลั่น ใช้แท่งแก้วคนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

### การเตรียมอนุไซม์ทริปซิน 0.25 เปอร์เซ็นต์

ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Trysin	0.25	กรัม
EDTA	3.74	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

นำ Trysin และ EDTA ใส่ในบีกเกอร์และเติม Phosphate buffered saline (PBS) 100 มิลลิลิตร ทำการคนสารเคมีทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกันและทำการฆ่าเชื้อโดยใช้การกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

### การเตรียม PBS ที่ปราศจาก $Ca^{2+}$ และ $Mg^{2+}$

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$KH_2HPO_4$	0.2	กรัม
$Na_2HPO_4$	2.9	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำสารเคมีใส่ในบีกเกอร์และเติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

### การนับจำนวนเซลล์โดยวิธี Trypan blue exclusion

การนำเซลล์ไปใช้ในการทดลองนั้นจะใช้เฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น โดยนำเซลล์มาเจือจางในสียทริปแฟนบลู 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงจุดเซลล์มาหยดลงบน haemocytometer นับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับเซลล์ที่ไม่ติดสีของทริปแฟนบลู ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งปริมาณเซลล์ทั้งหมด ได้มาจากการคำนวณโดยสูตร

$$\text{ปริมาณเซลล์ทั้งหมด} = (\text{ปริมาณเซลล์เฉลี่ยที่นับได้} \times \text{dilution factor} \times 10^4) \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร}$$

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ ค-1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อ

*M. anisopliae* ไอโซเลต MA001

เชื้อ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone (มิลลิเมตร)			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
<i>B. subtilis</i>	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	16.84	17.07	16.74	50.65	16.88±0.97
	0.625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	1.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	2.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	5	7.98	7.75	7.13	22.86	7.63±0.25
	10	8.88	8.54	8.05	25.47	8.49±0.24
<i>S. aureus</i>	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	13.4	18.66	14.34	46.40	15.46±1.67
	0.625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	1.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	2.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	5	9.35	10.22	9.02	28.59	9.53±0.35
	10	10.69	10.17	9.67	30.53	10.18±0.29
<i>M. luteus</i>	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	17.3	21.47	18.89	57.66	19.22±1.21
	0.625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	1.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	2.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	10	8.35	7.58	7.66	23.59	7.86±0.24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางที่ ค-2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อ

*M. anisopliae* ไอโซเลต MA002

เชื้อ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone (มิลลิเมตร)			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
<i>B. subtilis</i>	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	19.11	19.35	18.24	56.70	18.90±0.34
	0.625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	1.25	7.50	7.84	8.16	23.50	7.83±0.19
	2.5	8.88	8.63	9.84	27.35	9.11±0.37
	5	10.3	9.63	11.34	31.27	10.42±0.49
	10	12.04	11.41	12.43	35.88	11.96±0.29
<i>S. aureus</i>	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	16.51	16.81	16.25	49.57	16.52±0.61
	0.625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	1.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	2.5	10.00	9.62	11.35	30.97	10.32±0.90
	5	13.07	12.63	12.42	38.12	12.70±0.19
	10	14.96	15.20	15.50	45.66	15.22±0.15
<i>M. luteus</i>	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	16.51	16.81	16.25	49.57	17.09±0.36
	0.625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	1.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	2.5	10.00	9.62	11.35	30.97	9.15±0.19
	5	13.07	12.63	12.42	38.12	10.79±0.26
	10	14.96	15.2	15.5	45.66	12.60±0.35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-3 การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อ

*M. anisopliae* ไอโซเลต MA017

เชื้อ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone (มิลลิเมตร)			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
<i>B. subtilis</i>	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	19.29	16.97	16.85	53.11	17.70±1.37
	0.625	7.53	7.11	7.28	21.92	7.30±0.12
	1.25	7.14	7.04	7.81	21.99	7.33±0.24
	2.5	9.29	7.83	8.55	25.67	8.56±0.42
	5	15.68	8.03	9.45	33.16	11.05±2.35
	10	15.57	9.87	11.85	37.29	12.43±1.67
<i>S. aureus</i>	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	16.13	15.06	13.67	44.86	14.95±0.71
	0.625	0.00	0.00	0.00	16.11	0.00±0.00
	1.25	10.92	9.77	7.81	28.50	9.50±0.90
	2.5	11.85	9.49	8.06	29.40	9.80±1.10
	5	16.17	13.55	10.94	40.66	13.55±1.50
	10	15.57	15.64	12.62	43.83	14.61±2.87
<i>M. luteus</i>	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	16.62	15.96	14.96	47.54	15.85±0.48
	0.625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	1.25	6.80	7.77	7.25	21.82	7.34±0.29
	2.5	7.97	8.55	9.26	25.78	8.59±0.37
	5	9.54	9.55	8.40	27.49	9.16±0.38
	10	10.36	12.14	11.03	33.53	11.51±0.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-4 การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อ

*M. anisopliae* ไอโซเลต MA019

เชื้อ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone (มิลลิเมตร)			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
<i>B. subtilis</i>	0	0.00	0.00	0.00	0	0.00±0.00
	gentamicin	18.22	18.39	18.4	55.01	18.90±0.34
	0.625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	1.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	2.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	5	9.42	8.29	7.67	25.38	10.42±0.49
	10	10.9	12.24	9.74	32.88	11.96±0.29
<i>S. aureus</i>	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	13.76	14.1	16.64	44.50	16.52±0.61
	0.625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	1.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	2.5	10.00	9.62	11.35	30.97	10.32±0.90
	5	13.5	12.71	9.93	36.14	12.70±0.19
	10	13.97	15.51	13.64	43.12	15.22±0.15
<i>M. luteus</i>	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	17.8	16.91	16.56	51.27	17.09±0.36
	0.625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	1.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	2.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางที่ ค-5 การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อ

*M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03

เชื้อ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone (มิลลิเมตร)			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
<i>B. subtilis</i>	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	18.57	19.41	19.29	57.27	13.38±0.13
	0.625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	1.25	7.45	7.24	7.35	22.04	7.63±0.04
	2.5	9.11	9.35	10.02	28.48	9.38±0.90
	5	11.31	11.6	12.23	35.14	11.72±1.16
	10	16.39	15.43	16.36	48.18	16.02±0.31
<i>S. aureus</i>	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	17.73	14.72	15.01	47.46	13.38±0.13
	0.625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	1.25	7.51	7.61	7.67	40.10	7.62±0.43
	2.5	12.00	9.12	8.38	49.11	9.38±0.9
	5	8.27	12.50	12.68	52.33	11.72±1.17
	10	16.13	15.57	15.52	62.63	15.54±0.69
<i>M. luteus</i>	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	gentamicin	16.95	20.26	18.61	55.82	18.35±0.72
	0.625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00
	1.25	8.52	8.65	7.66	24.83	8.34±0.25
	2.5	9.61	12.11	10.86	32.58	10.61±0.57
	5	10.56	12.75	11.66	34.97	11.61±0.45
	10	12.52	12.69	12.34	37.55	12.36±0.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-6 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HT-29 ของสารสกัดหยาบ จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA001 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	92.12	91.08	91.32	274.52	91.51±0.31
	MMC 50	70.95	69.23	78.94	219.12	73.04±2.99
	125	94.19	93.29	91.67	279.15	93.05±0.74
	250	100.21	103.16	103.01	306.37	102.12±0.96
	500	98.96	97.24	97.22	293.42	97.81±0.58
	1000	108.92	99.41	100.93	309.26	103.09±2.95
	2000	102.91	106.31	94.21	303.43	101.14±3.60
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	91.10	99.75	96.86	287.71	95.90±2.54
	MMC 50	66.25	81.53	79.23	227.01	75.67±4.76
	125	97.31	111.58	86.47	295.36	98.45±7.27
	250	99.17	119.70	102.42	321.29	107.10±6.37
	500	107.25	131.77	112.80	351.82	117.27±7.42
	1000	126.92	155.91	136.23	419.06	139.69±8.55
	2000	122.36	153.20	126.33	401.89	133.96±9.69
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	98.82	90.87	94.64	284.33	94.78±2.30
	MMC 50	67.55	66.01	68.87	202.42	67.47±0.83
	125	104.24	105.04	104.12	313.39	104.46±1.08
	250	113.88	110.30	112.99	337.18	112.39±1.08
	500	121.88	126.70	117.94	366.52	122.17±2.53
	1000	129.18	139.46	142.27	410.91	136.97±3.98
	2000	112.24	116.51	124.33	353.08	117.69±3.54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-7 ผลการทดลองหาค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ MCF-7 ของสารสกัด  
 หยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA001 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้น  
 ต่างๆ

ชนิดตัวทำ ละลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	97.51	98.02	97.55	293.08	97.69±0.16
	MMC 50	40.32	48.81	50.20	139.34	46.45±3.09
	125	115.73	113.89	112.25	341.86	113.95±1.01
	250	128.23	128.18	136.74	393.14	131.05±2.85
	500	123.39	118.25	108.16	349.80	116.60±4.47
	1000	115.32	102.38	97.96	315.66	105.22±5.21
	2000	110.48	94.05	94.69	299.23	99.74±5.37
เอทิลอะซิ เตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	98.61	97.88	94.95	291.45	97.15±2.54
	MMC 50	30.56	41.95	38.07	110.58	36.86±4.76
	125	166.20	151.70	162.84	480.74	160.25±7.27
	250	155.56	139.20	155.05	449.80	149.93±6.37
	500	143.98	131.57	154.59	430.14	143.38±7.42
	1000	134.26	120.13	148.62	403.01	134.34±8.55
	2000	119.91	116.10	128.90	364.91	121.64±9.69
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	90.48	89.05	92.31	271.84	90.61±2.30
	MMC 50	42.86	35.04	48.58	126.48	42.16±0.83
	125	145.24	137.41	139.88	422.53	140.84±1.08
	250	142.46	133.76	141.90	418.12	139.37±1.08
	500	150.00	142.15	152.63	444.79	148.26±2.53
	1000	140.08	124.09	152.23	416.39	138.80±3.98
	2000	135.71	117.34	138.06	391.11	130.37±3.54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-8 ผลการทดลองหาค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ Vero ของสารสกัดหยาบ จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA001 ในแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	96.94	96.93	97.91	291.77	97.26±0.33
	MMC 50	53.07	60.04	49.75	162.86	54.29±3.03
	125	97.89	100.21	88.63	286.73	95.58±3.54
	250	96.94	95.08	101.65	293.66	97.89±1.96
	500	89.85	93.24	92.42	275.51	91.84±1.02
	1000	104.22	104.10	91.76	300.08	100.03±4.13
	2000	105.94	113.73	90.94	310.61	103.54±6.69
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	98.90	94.36	97.10	290.36	96.79±1.32
	MMC 50	64.87	59.71	54.81	179.39	59.80±2.90
	125	109.14	104.49	113.61	327.24	109.08±2.63
	250	110.02	102.30	118.51	330.83	110.28±4.68
	500	130.73	112.74	121.05	364.52	121.51±5.20
	1000	128.08	119.00	105.08	352.16	117.39±6.69
	2000	126.43	122.86	113.79	363.09	121.03±3.76
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	94.88	96.10	98.07	289.04	96.35±0.93
	MMC 50	58.47	43.46	53.73	155.65	51.88±4.43
	125	113.19	149.68	124.96	387.82	129.27±10.75
	250	112.01	140.56	124.08	376.65	125.55±8.27
	500	102.36	124.51	105.80	332.67	110.89±6.88
	1000	111.81	124.30	112.13	348.23	116.08±4.11
	2000	122.05	118.44	108.26	348.75	116.25±4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-9 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HepG-2 ของสารสกัด  
 หยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA001 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้น  
 ต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	94.52	92.76	93.68	280.96	93.65±1.27
	MMC 50	22.32	11.77	7.19	41.28	13.76±4.48
	125	108.57	99.77	92.59	300.94	100.31±4.62
	250	93.75	95.93	97.17	286.85	95.62±1.00
	500	91.07	87.33	77.34	255.74	85.25±4.10
	1000	88.93	84.16	72.77	245.86	81.95±4.79
	2000	78.57	73.30	64.05	215.93	71.98±4.24
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	99.20	97.06	93.96	290.22	96.74±1.52
	MMC 50	26.00	8.68	4.72	39.40	13.13±6.53
	125	112.20	93.97	105.51	311.68	103.89±5.32
	250	106.60	83.82	100.66	291.08	97.03±6.82
	500	108.80	99.12	101.71	309.62	103.21±2.89
	1000	89.00	93.82	88.45	271.28	90.43±1.71
	2000	87.80	77.79	61.16	226.75	75.58±7.77
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	93.41	90.43	90.94	274.78	91.59±0.92
	MMC 50	5.50	15.56	20.52	41.57	13.86±4.42
	125	90.99	74.42	79.44	244.85	81.62±4.91
	250	89.01	83.99	87.81	260.81	86.94±1.51
	500	83.08	76.40	80.40	239.88	79.96±1.94
	1000	80.44	72.28	68.21	220.92	73.64±3.60
	2000	63.30	64.85	66.73	194.87	64.96±0.99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-10 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ P388 ของสารสกัดหยาบ จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA001 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.0	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	93.68	91.95	96.9	282.50	94.17±1.45
	MMC 50	6.73	10.07	7.8	24.61	8.20±0.98
	125	76.85	79.36	86.6	242.84	80.95±2.92
	250	94.19	75.67	77.3	247.12	82.37±5.92
	500	68.27	83.56	81.4	233.25	77.75±4.78
	1000	65.87	75.84	86.6	228.34	76.11±5.99
	2000	60.33	61.24	64.1	185.64	61.88±1.14
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.0	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	92.57	97.41	93.2	283.18	94.39±1.52
	MMC 50	6.10	6.07	3.5	15.67	5.22±0.86
	125	74.01	89.44	88.2	251.68	83.89±4.95
	250	89.83	72.55	74.8	237.20	79.07±5.42
	500	83.47	64.83	65.3	213.65	71.22±6.14
	1000	64.19	51.49	53.7	169.35	56.45±3.92
	2000	48.01	38.71	48.3	134.98	44.99±3.15
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.0	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	94.01	92.01	94.7	280.74	93.58±0.81
	MMC 50	8.38	39.43	10.9	58.67	19.56±9.96
	125	87.87	100.95	102.1	290.95	96.98±4.56
	250	92.37	97.57	101.6	291.49	97.16±2.67
	500	84.13	92.92	89.3	266.37	88.79±2.55
	1000	76.80	85.80	81.2	243.76	81.25±2.60
	2000	60.03	73.67	72.1	205.82	68.61±4.31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-11 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HT-29 ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA002 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	98.02	96.95	98.45	293.43	97.81±0.45
	MMC 50	77.19	53.55	59.70	190.44	63.48±7.08
	125	99.36	93.66	96.86	289.88	96.63±1.65
	250	102.11	96.19	95.74	294.03	98.01±2.05
	500	106.71	98.73	97.37	302.80	100.93±2.91
	1000	103.01	105.84	104.18	313.03	104.34±0.82
	2000	98.04	104.32	103.43	305.79	101.93±1.96
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	99.44	93.99	94.92	288.35	96.12±1.68
	MMC 50	60.03	57.31	62.57	179.91	59.97±1.52
	125	99.37	96.37	106.42	302.15	100.72±2.98
	250	98.23	96.49	102.67	297.39	99.13±1.84
	500	101.37	100.92	99.20	301.49	100.50±0.66
	1000	107.56	108.77	101.34	317.67	105.89±2.30
	2000	112.71	128.32	111.23	352.26	117.42±5.47
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	98.86	93.99	94.92	287.76	95.92±1.49
	MMC 50	54.06	57.31	62.57	173.94	57.98±2.48
	125	98.33	96.37	106.42	301.11	100.37±3.08
	250	106.19	96.49	102.67	305.36	101.79±2.84
	500	107.24	100.92	99.20	307.36	102.45±2.44
	1000	111.84	108.77	101.34	321.95	107.32±3.12
	2000	121.40	128.32	111.23	360.95	120.32±4.96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-12 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ MCF-7 ของสารสกัด  
 หยาดจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA002 ในแต่ละตัวทำลายที่ความ  
 เข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำ ละลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	98.52	99.56	97.07	295.15	98.38±0.45
	MMC 50	46.38	43.68	36.67	126.72	42.24±2.89
	125	95.32	95.59	96.49	287.40	95.80±0.35
	250	96.21	92.13	95.60	283.94	94.65±1.27
	500	91.78	94.12	98.32	284.21	94.74±1.91
	1000	91.73	90.88	88.75	271.36	90.45±0.89
	2000	92.61	83.97	86.70	263.29	87.76±2.55
เอทิลอะซิ เตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	96.39	93.45	95.21	285.05	95.02±0.85
	MMC 50	38.42	44.89	48.17	131.48	43.83±2.86
	125	102.42	111.10	131.03	344.55	114.85±8.47
	250	98.45	105.57	111.71	315.72	105.24±3.83
	500	97.99	101.81	104.23	304.03	101.34±1.82
	1000	96.07	102.23	103.46	301.75	100.58±2.29
	2000	95.13	98.33	97.67	291.13	97.04±0.98
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	93.99	93.45	95.21	282.65	94.22±0.52
	MMC 50	34.89	44.89	48.17	127.95	42.65±3.99
	125	112.31	111.10	131.03	354.43	118.14±6.45
	250	115.91	105.57	111.71	333.18	111.06±3.00
	500	114.10	101.81	104.23	320.14	106.71±3.76
	1000	115.11	102.23	103.46	320.79	106.93±4.10
	2000	122.68	98.33	97.67	318.69	106.23±8.23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-13 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ Vero ของสารสกัดหยาบ จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA002 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	94.94	94.17	96.78	285.89	95.30±0.77
	MMC 50	17.98	18.44	47.99	84.41	28.14±9.93
	125	99.33	103.10	107.98	310.41	103.47±2.50
	250	93.81	99.00	104.43	297.23	99.08±3.07
	500	89.08	99.23	101.01	289.31	96.44±3.72
	1000	88.55	94.95	99.45	282.94	94.31±3.16
	2000	78.70	80.28	97.59	256.56	85.52±6.05
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	96.70	94.16	93.93	284.78	94.93±0.89
	MMC 50	51.03	61.47	58.91	171.41	57.14±3.14
	125	98.47	115.15	111.34	324.96	108.32±5.05
	250	97.61	105.84	103.10	306.56	102.19±2.42
	500	98.10	115.15	108.77	322.03	107.34±4.97
	1000	105.65	123.38	116.87	345.90	115.30±5.18
	2000	118.06	126.41	124.43	368.90	122.97±2.52
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	95.33	94.16	93.93	283.42	94.47±0.43
	MMC 50	46.19	61.47	58.91	166.57	55.52±4.72
	125	112.82	115.15	111.34	339.30	113.10±1.87
	250	111.98	105.84	103.10	320.92	106.97±1.11
	500	101.50	115.15	108.77	325.43	108.48±2.63
	1000	108.83	123.38	116.87	349.07	116.36±4.21
	2000	104.20	126.41	124.43	355.03	118.34±7.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-14 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HepG-2 ของสารสกัด  
 หยาดจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA002 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้น  
 ต่างๆ

ชนิดตัวทำ ละลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	95.58	90.84	96.82	283.23	94.41±1.82
	MMC 50	30.62	27.17	17.08	74.87	24.96±4.06
	125	106.28	95.19	102.91	304.38	101.46±3.28
	250	118.76	105.67	116.93	341.35	113.78±4.09
	500	122.74	111.88	114.01	348.64	116.21±3.32
	1000	126.46	112.35	111.57	350.37	116.79±4.84
	2000	138.23	120.50	114.98	373.71	124.57±7.01
เอทิลอะซิ เตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	98.29	81.31	91.16	270.76	90.25±4.92
	MMC 50	13.95	23.65	26.52	64.11	21.37±3.80
	125	102.08	103.68	108.33	314.09	104.70±1.87
	250	104.15	94.97	103.20	302.32	100.77±2.91
	500	105.08	92.12	101.68	298.88	99.63±3.88
	1000	102.89	106.01	109.01	317.91	105.97±1.77
	2000	95.88	95.35	109.60	300.82	100.27±4.66
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	97.58	81.31	91.16	270.05	90.02±4.73
	MMC 50	14.47	23.65	26.52	64.64	21.55±3.63
	125	105.86	103.68	108.33	317.87	105.96±1.34
	250	107.24	94.97	103.20	305.40	101.80±3.61
	500	103.49	92.12	101.68	297.29	99.10±3.53
	1000	114.95	106.01	109.01	329.96	109.99±2.63
	2000	116.25	95.35	109.60	321.20	107.07±6.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-15 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ P388 ของสารสกัดหยาบ จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA002 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	96.43	95.98	96.84	289.25	96.42±0.25
	MMC 50	7.88	27.54	26.46	61.87	20.62±6.38
	125	108.02	93.68	88.06	289.76	96.59±5.94
	250	105.65	91.96	84.94	282.55	94.18±6.08
	500	87.25	94.60	81.01	262.86	87.62±3.93
	1000	81.40	84.65	74.14	240.18	80.06±3.11
	2000	80.09	80.50	71.44	232.03	77.34±2.95
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	97.16	98.56	94.59	290.31	96.77±1.16
	MMC 50	7.66	23.23	20.71	51.61	17.20±4.83
	125	100.54	118.85	108.36	327.75	109.25±5.30
	250	96.40	106.22	95.49	298.10	99.37±3.44
	500	83.60	99.80	85.84	269.25	89.75±5.07
	1000	74.47	88.02	74.41	236.90	78.97±4.53
	2000	68.34	85.47	73.59	227.40	75.80±5.07
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	96.91	98.56	94.59	290.07	96.69±1.15
	MMC 50	9.33	23.23	20.71	53.27	17.70±4.29
	125	110.43	118.85	108.36	337.64	112.55±3.21
	250	101.51	106.217	95.49	303.217	101.07±3.10
	500	93.94	99.80	85.84	279.58	93.19±4.05
	1000	85.05	88.02	74.41	247.48	82.49±4.13
	2000	84.17	85.47	73.59	243.23	81.08±3.76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-16 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HT-29 ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA017 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	98.31	99.03	98.75	296.10	98.70±0.21
	MMC 50	71.08	74.16	68.66	213.90	71.30±1.59
	125	112.77	105.07	108.12	325.96	108.65±2.24
	250	104.58	104.83	112.36	321.77	107.26±2.55
	500	103.13	105.07	119.73	327.93	109.31±5.24
	1000	99.28	101.45	137.33	338.05	112.68±12.34
	2000	94.70	99.28	152.68	346.66	115.55±18.61
เอพิลอะซีเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	95.53	92.62	95.96	284.11	94.70±1.05
	MMC 50	65.31	70.00	72.48	207.78	69.26±2.10
	125	102.53	109.29	110.35	322.17	107.39±2.45
	250	108.55	108.33	111.36	328.25	109.42±0.98
	500	105.05	119.29	125.25	349.59	116.53±5.99
	1000	111.27	137.86	138.64	387.77	129.26±9.00
	2000	110.40	130.95	125.00	366.35	122.12±6.10
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	99.72	91.71	98.06	289.49	96.50±2.44
	MMC 50	66.85	63.83	74.03	204.71	68.24±3.03
	125	112.48	103.00	112.86	328.34	109.45±3.23
	250	120.11	109.22	119.42	348.75	116.25±3.52
	500	128.71	144.24	125.73	398.68	132.89±5.74
	1000	160.75	157.14	164.08	481.97	160.66±2.00
	2000	175.17	164.75	186.17	526.09	175.36±6.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-17 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ MCF-7 ของสารสกัด  
 หยาดจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA017 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้น  
 ต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	89.26	98.15	96.84	284.24	94.75±2.77
	MMC 50	41.30	49.63	43.46	134.38	44.79±2.50
	125	99.26	102.78	111.46	313.50	104.50±3.63
	250	100.74	98.33	126.52	325.59	108.53±9.02
	500	97.41	102.41	145.42	345.24	115.08±15.24
	1000	107.96	107.78	148.67	364.42	121.47±13.60
	2000	94.44	112.96	117.45	324.86	108.29±7.04
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	88.18	94.00	91.62	273.81	91.27±1.69
	MMC 50	39.33	36.84	37.64	113.81	37.94±0.73
	125	102.48	94.19	92.18	288.84	96.28±3.15
	250	93.96	89.35	112.69	296.01	98.67±7.14
	500	87.74	78.76	88.08	254.58	84.86±3.05
	1000	67.98	66.46	88.33	222.78	74.26±7.05
	2000	43.01	46.94	56.92	146.87	48.96±4.14
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	90.33	88.90	94.04	273.27	91.09±1.53
	MMC 50	35.35	28.14	42.22	105.71	35.24±4.06
	125	103.90	99.48	120.22	323.60	107.87±6.31
	250	101.15	94.49	124.23	319.88	106.63±9.01
	500	116.60	91.82	130.38	338.80	112.93±11.28
	1000	131.31	122.55	138.02	391.88	130.63±4.48
	2000	124.10	135.46	141.75	401.31	133.77±5.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-18 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ Vero ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA017 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	88.42	98.15	96.83	283.40	94.47±3.05
	MMC 50	37.24	49.63	48.98	135.85	45.28±4.03
	125	90.90	102.78	102.05	295.73	98.58±3.84
	250	89.91	98.33	108.38	296.62	98.87±5.34
	500	90.90	102.41	92.92	286.23	95.41±3.55
	1000	100.78	107.78	96.28	304.84	101.61±3.35
	2000	96.16	112.96	101.86	310.99	103.66±4.93
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	86.06	87.00	89.50	262.56	87.52±1.03
	MMC 50	32.67	33.45	38.28	104.41	34.80±1.75
	125	103.63	102.73	107.55	313.91	104.64±1.48
	250	108.57	112.01	107.68	328.26	109.42±1.32
	500	106.87	110.12	108.32	325.32	108.44±0.94
	1000	77.06	72.56	94.11	243.72	81.24±6.56
	2000	55.47	58.11	79.64	193.23	64.41±7.65
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	96.63	98.20	97.45	292.28	97.43±0.45
	MMC 50	44.07	54.27	44.51	142.86	47.62±3.33
	125	119.85	124.14	103.60	347.59	115.86±6.26
	250	124.72	128.64	103.78	357.13	119.04±7.72
	500	115.86	126.69	107.99	350.53	116.84±5.42
	1000	123.47	141.38	115.63	380.48	126.83±7.62
	2000	134.83	138.83	124.32	397.98	132.66±4.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-19 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HepG-2 ของสารสกัด  
 หยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA017 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้น  
 ต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	96.49	91.95	104.46	292.89	97.63±3.66
	MMC 50	18.56	16.40	20.89	55.85	18.62±1.30
	125	101.67	95.75	96.47	293.89	97.96±1.86
	250	98.50	96.34	98.16	292.99	97.66±0.67
	500	102.68	95.90	95.55	294.12	98.04±2.32
	1000	98.66	97.80	96.31	292.78	97.59±0.69
	2000	97.32	98.10	92.47	287.89	95.96±1.76
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	98.48	91.26	87.17	276.91	92.30±3.31
	MMC 50	18.00	18.25	16.90	53.15	17.72±0.41
	125	89.67	115.18	102.97	307.83	102.61±7.37
	250	93.27	125.77	105.16	324.20	108.07±9.49
	500	93.58	120.86	104.54	318.98	106.33±7.93
	1000	85.60	109.20	95.62	290.42	96.81±6.84
	2000	90.45	87.12	83.10	260.67	86.89±2.12
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	94.14	90.73	94.03	278.91	92.97±1.12
	MMC 50	9.52	10.65	23.15	43.31	14.44±4.37
	125	106.88	105.95	106.33	319.16	106.39±0.27
	250	108.49	129.32	108.86	346.68	115.56±6.88
	500	109.52	104.29	105.61	319.41	106.47±1.57
	1000	103.08	104.01	117.36	324.45	108.15±4.61
	2000	103.22	113.28	137.79	354.29	118.10±10.27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-20 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ P388 ของสารสกัดหยาบ จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA017 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	92.25	98.53	91.49	282.27	94.09±2.23
	MMC 50	12.37	3.82	3.80	19.99	6.66±2.85
	125	99.33	87.87	84.99	272.18	90.73±4.38
	250	96.80	81.41	86.39	264.59	88.20±4.53
	500	96.42	77.59	80.18	254.20	84.73±5.89
	1000	96.65	74.07	77.08	247.79	82.60±7.08
	2000	85.54	72.41	69.87	227.82	75.94±4.86
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	85.39	88.67	92.19	266.25	88.75±1.96
	MMC 50	18.26	10.29	12.51	41.07	13.69±2.37
	125	83.68	95.85	91.04	270.57	90.19±3.54
	250	88.19	91.18	91.64	271.01	90.34±1.08
	500	85.47	77.16	75.57	238.21	79.40±3.07
	1000	33.64	61.33	30.11	125.09	41.70±9.87
	2000	24.63	42.47	23.12	90.22	30.07±6.21
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	94.58	93.08	86.36	274.02	91.34±2.53
	MMC 50	2.45	2.57	11.65	16.68	5.56±3.05
	125	99.39	102.57	89.42	291.38	97.13±3.96
	250	92.30	97.43	81.65	271.38	90.46±4.65
	500	87.40	92.46	84.38	264.24	88.08±2.36
	1000	94.31	94.85	82.40	271.56	90.52±4.06
	2000	79.35	93.70	85.12	258.18	86.06±4.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-21 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HT-29 ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA019 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	96.69	98.00	95.09	289.78	96.59±0.84
	MMC 50	59.54	59.25	59.69	178.48	59.49±0.13
	125	95.93	97.38	94.19	287.49	95.83±0.92
	250	94.40	92.25	93.15	279.80	93.27±0.62
	500	92.11	92.75	94.83	279.69	93.23±0.82
	1000	93.13	94.25	91.73	279.11	93.04±0.73
	2000	96.44	94.37	98.32	289.13	96.38±1.14
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	98.00	97.75	98.00	293.75	97.92±0.08
	MMC 50	66.50	69.00	67.67	203.17	67.72±0.72
	125	100.63	96.75	98.75	296.12	98.71±1.12
	250	102.13	98.25	100.25	300.63	100.21±1.12
	500	101.00	97.63	99.25	297.87	99.29±0.97
	1000	99.75	96.63	98.25	294.62	98.21±0.90
	2000	88.18	85.93	86.97	261.08	87.03±0.65
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	91.84	88.48	99.23	279.55	93.18±3.18
	MMC 50	71.32	71.14	71.06	213.51	71.17±0.08
	125	112.50	122.15	117.31	351.97	117.32±2.79
	250	122.11	116.46	119.12	357.68	119.23±1.63
	500	126.71	123.04	124.81	374.56	124.85±1.06
	1000	147.50	144.43	146.00	437.93	145.98±0.89
	2000	151.05	151.39	151.16	453.61	151.20±0.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-22 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ MCF-7 ของสารสกัด  
 หยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA019 ในแต่ละตัวทำลายที่ความ  
 เข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำ ละลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	96.34	94.33	95.72	286.39	95.46±0.59
	MMC 50	43.68	44.33	43.93	131.93	43.98±0.19
	125	96.05	99.80	93.59	289.43	96.48±1.81
	250	95.46	95.34	95.53	286.32	95.44±0.06
	500	94.17	96.25	92.84	283.26	94.42±0.99
	1000	85.77	87.29	84.74	257.80	85.93±0.74
	2000	63.24	64.03	62.68	189.96	63.32±0.39
เอทิลอะซิ เตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	97.47	99.86	94.26	291.59	97.20±1.62
	MMC 50	39.91	43.34	36.23	119.48	39.83±2.05
	125	89.87	94.85	86.74	271.46	90.49±2.36
	250	101.49	105.38	99.07	305.93	101.98±1.84
	500	109.87	116.22	105.86	331.95	110.65±3.02
	1000	103.14	106.43	101.04	310.62	103.54±1.57
	2000	70.39	73.62	68.36	212.37	70.79±1.53
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	94.17	99.35	99.15	292.66	97.55±1.69
	MMC 50	44.72	41.02	42.78	128.52	42.84±1.07
	125	109.26	108.33	112.47	330.05	110.02±1.25
	250	112.35	110.24	111.33	333.92	111.31±0.61
	500	111.36	116.98	115.39	343.73	114.58±1.67
	1000	124.51	112.25	121.53	358.29	119.43±3.69
	2000	121.45	118.90	122.29	362.63	120.88±1.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-23 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ Vero ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA019 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	99.58	98.22	99.14	296.94	98.98±0.40
	MMC 50	47.25	47.18	46.67	141.09	47.03±0.18
	125	92.59	90.90	94.27	277.75	92.58±0.97
	250	88.56	88.08	89.39	266.03	88.68±0.38
	500	83.48	83.89	83.73	251.09	83.70±0.12
	1000	78.39	79.50	78.07	235.95	78.65±0.43
	2000	69.07	69.87	68.96	207.90	69.30±0.29
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	96.98	98.55	97.83	293.36	97.79±0.45
	MMC 50	49.70	51.35	48.52	149.57	49.86±0.82
	125	81.69	81.74	81.72	245.16	81.72±0.01
	250	82.70	82.88	82.71	248.29	82.76±0.06
	500	88.33	87.76	88.82	264.91	88.30±0.31
	1000	90.54	89.94	90.80	271.28	90.43±0.25
	2000	79.07	78.63	79.22	236.93	78.98±0.18
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	99.60	95.25	97.85	292.70	97.57±1.26
	MMC 50	56.89	50.00	54.00	160.89	53.63±2.00
	125	102.99	103.23	105.40	311.63	103.88±0.77
	250	111.11	106.27	111.60	328.99	109.66±1.70
	500	116.97	117.21	119.60	353.77	117.92±0.84
	1000	127.21	123.57	128.40	379.19	126.40±1.45
	2000	133.73	127.57	134.00	395.30	131.77±2.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-24 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ HepG-2 ของสารสกัดหยาบ จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA019 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	99.56	99.43	98.51	297.50	99.17±0.33
	MMC 50	21.83	20.85	22.72	65.41	21.80±0.54
	125	100.44	102.20	98.58	301.22	100.41±1.05
	250	98.54	97.45	99.55	295.54	98.51±0.61
	500	109.03	104.68	111.21	324.92	108.31±1.92
	1000	97.96	97.59	98.28	293.83	97.94±0.20
	2000	82.97	80.92	79.37	243.26	81.09±1.04
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	98.38	99.72	99.74	297.84	99.28±0.45
	MMC 50	16.04	14.92	17.11	48.06	16.02±0.63
	125	106.47	104.63	108.09	319.19	106.40±1.00
	250	105.66	108.15	103.29	317.10	105.70±1.40
	500	111.32	118.30	104.61	334.23	111.41±3.95
	1000	110.51	125.41	95.59	331.52	110.51±8.61
	2000	99.60	106.22	91.71	297.52	99.17±4.19
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	97.90	94.20	98.47	290.56	96.85±1.34
	MMC 50	15.15	17.96	16.57	49.68	16.56±0.81
	125	100.84	104.63	102.79	308.26	102.75±1.09
	250	105.33	108.15	106.83	320.30	106.77±0.50
	500	111.99	118.30	115.32	345.61	115.20±1.82
	1000	117.81	126.04	122.01	365.85	121.95±2.38
	2000	106.17	111.05	108.77	326.00	108.67±1.41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-25 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ P388 ของสารสกัดหยาบ จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA019 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	95.12	98.90	91.14	285.17	95.06±0.84
	MMC 50	8.48	10.90	9.68	29.06	9.69±0.13
	125	90.52	82.37	87.31	260.20	86.73±0.92
	250	87.48	75.96	82.92	246.37	82.12±0.62
	500	85.93	72.25	80.46	238.64	79.55±0.82
	1000	83.23	64.10	75.62	222.95	74.32±0.73
	2000	62.63	45.24	55.71	163.57	54.52±1.14
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	94.11	90.45	96.67	281.23	93.74±0.08
	MMC 50	14.83	15.78	13.51	44.13	14.71±0.72
	125	93.03	91.78	93.88	278.69	92.90±1.12
	250	88.70	87.67	89.38	265.75	88.58±1.12
	500	80.16	80.77	79.74	240.66	80.22±0.97
	1000	75.84	70.84	79.27	225.94	75.31±0.90
	2000	15.23	9.88	19.05	44.16	14.72±0.65
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	94.17	93.88	96.34	284.39	94.80±3.18
	MMC 50	10.65	10.87	10.01	31.53	10.51±0.08
	125	102.81	97.03	107.28	307.13	102.38±2.79
	250	98.19	91.83	103.05	293.07	97.69±1.63
	500	96.68	92.06	100.18	288.92	96.31±1.06
	1000	97.09	88.90	103.52	289.51	96.50±0.89
	2000	81.51	72.69	88.38	242.58	80.86±0.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-26 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HT-29 ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	94.93	96.87	97.72	289.51	96.50±0.83
	MMC 50	67.55	66.01	68.53	202.08	67.36±0.73
	125	96.96	100.17	100.25	297.38	99.13±1.08
	250	101.42	104.29	100.51	306.22	102.07±1.14
	500	108.52	104.29	104.06	316.87	105.62±1.45
	1000	113.59	107.76	103.55	324.90	108.30±2.91
	2000	123.73	118.48	110.41	352.62	117.54±3.87
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	98.33	90.53	86.77	275.62	91.87±3.35
	MMC 50	68.96	64.00	67.65	200.61	66.87±1.48
	125	135.87	151.37	177.94	465.18	155.06±13.60
	250	175.47	208.00	178.15	561.62	191.10±9.39
	500	194.42	210.31	194.33	599.06	202.64±4.61
	1000	168.40	109.26	91.60	369.26	144.12±26.29
	2000	29.18	22.11	34.87	86.16	91.59±5.14
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	91.06	94.84	90.72	276.61	92.20±1.32
	MMC 50	88.62	62.52	71.21	222.35	74.12±7.67
	125	116.06	106.50	97.16	319.72	106.57±5.46
	250	120.73	109.18	104.36	334.27	111.42±4.86
	500	140.45	117.59	114.58	372.62	124.21±8.17
	1000	159.96	138.82	135.61	434.38	144.79±7.64
	2000	134.96	137.48	137.12	409.56	136.52±0.79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-27 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ MCF-7 ของสารสกัด

หยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้น  
ต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	95.30	92.02	98.23	285.56	95.19±1.79
	MMC 50	35.25	35.60	42.70	113.54	37.85±2.43
	125	94.00	102.02	107.71	303.72	101.24±3.98
	250	97.39	107.86	114.13	319.37	106.46±4.88
	500	102.61	117.50	121.83	341.94	113.98±5.82
	1000	102.09	117.74	125.52	345.35	115.12±6.89
	2000	106.53	110.95	119.26	336.74	112.25±3.73
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	93.63	84.81	96.37	274.81	91.60±0.89
	MMC 50	36.6	37.54	43.75	117.89	40.75±1.87
	125	104.49	108.31	117.76	330.56	95.25±1.71
	250	114.93	110.62	125.49	351.04	95.97±0.72
	500	125.84	120.46	148.85	395.15	99.28±1.52
	1000	127.77	124	146.71	398.48	89.00±1.65
	2000	106.58	107.39	113.98	327.95	87.02±3.47
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	96.15	95.39	97.37	288.90	96.30±0.58
	MMC 50	36.60	37.54	43.75	117.89	39.30±2.24
	125	104.49	108.31	117.76	330.57	110.19±3.94
	250	114.93	110.62	125.49	351.04	117.01±4.42
	500	125.84	120.46	148.85	395.15	131.72±8.71
	1000	127.77	124.00	146.71	398.48	132.83±7.03
	2000	106.58	107.39	113.98	327.95	109.32±2.34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-28 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ Vero ของสารสกัดหยาบ จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 ในแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	96.39	98.73	93.14	288.26	96.09±1.62
	MMC 50	40.98	43.13	43.53	127.63	42.54±0.79
	125	97.45	107.76	105.15	310.36	103.45±3.09
	250	101.06	112.98	110.61	324.65	108.22±3.64
	500	100.43	112.72	109.67	322.82	107.61±3.69
	1000	100.85	114.76	112.79	328.40	109.47±4.35
	2000	110.62	106.74	110.45	327.81	109.27±1.27
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	90.24	93.49	94.50	278.22	92.74±1.49
	MMC 50	36.01	42.57	48.2	126.78	42.26±3.52
	125	92.34	101.17	108.08	301.59	100.53±4.56
	250	94.81	103.81	138.17	336.79	112.26±13.21
	500	95.41	136.63	167.99	400.03	133.34±21.02
	1000	94.47	123.04	158.01	375.52	125.17±18.37
	2000	90.85	98.63	94.29	283.77	94.59±2.25
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	93.55	92.50	94.15	280.21	93.40±0.48
	MMC 50	44.25	48.59	28.96	121.80	40.60±5.95
	125	114.63	102.81	91.16	308.60	102.87±6.78
	250	130.66	99.06	99.43	329.15	109.72±10.47
	500	119.86	102.19	112.98	335.03	111.68±5.14
	1000	121.95	105.78	105.28	333.01	111.00±5.48
	2000	135.71	114.69	109.42	359.82	119.94±8.03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-29 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HepG-2 ของสารสกัด  
 หยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้น  
 ต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	91.70	99.79	96.66	288.15	96.05±2.36
	MMC 50	21.05	30.37	33.68	85.10	28.37±3.78
	125	98.79	102.69	98.46	299.93	99.98±1.36
	250	98.58	101.24	103.60	303.42	101.14±1.45
	500	94.74	98.76	101.29	294.78	98.26±1.91
	1000	94.74	92.77	97.69	285.19	95.06±1.43
	2000	93.93	89.26	92.80	275.99	92.00±1.41
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	34.04	20.36	34.04	88.44	93.78±2.47
	MMC 50	93.51	94.02	100.75	288.28	29.48±4.56
	125	130.4	109.98	119.26	359.64	96.09±2.33
	250	154.99	176.04	183.75	514.78	119.88±5.90
	500	81.05	183.5	195.28	459.83	171.59±8.59
	1000	97.18	89.63	106.38	293.19	153.27±36.27
	2000	34.04	20.36	34.04	88.44	97.73±4.84
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	90.21	98.49	96.76	285.46	95.15±2.52
	MMC 50	15.56	20.52	20.86	56.94	18.98±1.71
	125	91.61	98.92	93.05	283.57	94.52±2.24
	250	98.43	100.86	87.77	287.06	95.69±4.02
	500	87.94	95.03	87.17	270.14	90.05±2.50
	1000	86.89	95.03	81.54	263.46	87.82±3.92
	2000	83.74	79.48	82.37	245.60	81.87±1.26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-30 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ P388 ของสารสกัดหยาบ จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดตัวทำลาย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์			รวม	เฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
เฮกเซน	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	96.93	98.29	99.12	294.34	98.11±0.64
	MMC 50	11.11	2.45	6.44	20.00	6.67±2.50
	125	105.50	96.33	93.56	295.39	98.46±3.61
	250	107.04	95.35	95.17	297.56	99.19±3.93
	500	101.43	95.35	99.12	295.90	98.63±1.77
	1000	101.87	95.47	91.80	289.14	96.38±2.94
	2000	94.72	85.68	96.93	277.32	92.44±3.44
เอทิลอะซิเตท	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	95.28	88.35	93.18	276.80	92.27±2.05
	MMC 50	2.86	6.66	7.87	17.40	5.80±1.51
	125	74.54	57.00	47.64	179.18	59.73±7.88
	250	83.55	51.22	38.06	172.83	57.61±13.51
	500	40.34	37.41	17.72	95.47	31.82±7.10
	1000	8.73	9.60	9.71	28.04	9.35±0.31
	2000	13.59	11.07	3.81	28.47	9.49±2.93
เมทานอล	0	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00±0.00
	DMSO 1%	97.75	99.68	93.93	291.36	97.12±1.69
	MMC 50	8.88	1.92	5.64	16.44	5.48±2.01
	125	91.80	102.56	92.30	286.66	95.55±3.51
	250	88.09	99.20	88.40	275.69	91.90±3.65
	500	58.54	95.84	92.95	247.33	82.44±11.98
	1000	46.74	93.12	87.53	227.39	75.80±14.62
	2000	41.80	51.84	38.07	131.71	43.90±4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-31 แสดงผลของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 ใน  
ชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการแบ่งเซลล์เม็ดเลือดขาว

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า Mitotic index (%)				เฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	
กลุ่มควบคุม*	100	100	100	100	100±0.00
250	88.89	68.51	84.90	85.05	81.83±9.07
500	77.78	70.37	42.00	40.90	57.76±19.08
1000	68.25	55.56	35.8	27.8	46.85±18.42
2000	ND	ND	9.8	6.75	8.27±4.93
Mitomycin C** 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	19.05	9.26	20.70	14.20	15.80±5.16

หมายเหตุ : ND หมายถึง ไม่มีผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

### การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ตารางที่ ง-1 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งต่อเชื้อ *B. subtilis* ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทเมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

#### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2297.762	25	91.910	463.996	.000
Within Groups	10.300	52	.198		
Total	2308.063	77			

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีผลต่อค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งต่อเชื้อ *B. subtilis*

$H_0$  : ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งต่อเชื้อ *B. subtilis* ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทเมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

$H_1$  : มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งต่อเชื้อ *B. subtilis* ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทเมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ  $F = 463.996$  และมีค่า  $Sig. = 0.00$  ซึ่งน้อยกว่า  $\alpha = 0.05$  (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) จึงปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าเมื่อทดสอบเชื้อ *B. subtilis* กับสารสกัดหยาบจาก *M. anisopliae* ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันจะทำให้ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งต่อเชื้อ *B. subtilis* อย่างน้อย 1 คู่ ต่างกัน

ตารางที่ ง-2 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทเมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

## ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3024.223	25	120.969	1295.722	.000
Within Groups	4.855	52	.093		
Total	3029.078	77			

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีผลต่อค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ *S. aureus*

$H_0$  : ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทเมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

$H_1$  : มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทเมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ  $F = 1295.722$  และมีค่า  $Sig. = 0.00$  ซึ่งน้อยกว่า  $\alpha = 0.05$  (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) จึงปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าเมื่อทดสอบเชื้อ *S. aureus* กับสารสกัดหยาบจาก *M. anisopliae* ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันจะทำให้ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ *S. aureus* อย่างน้อย 1 ค่า ต่างกัน

ตารางที่ 3-3 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ *M. luteus* ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทเมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

## ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2622.558	25	104.902	2886.100	.000
Within Groups	1.890	52	.036		
Total	2624.448	77			

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีผลต่อค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ *M. luteus*

$H_0$  : ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ *M. luteus* ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทเมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

$H_1$  : มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ *M. luteus* ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทเมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ  $F = 2886.100$  และมีค่า  $\text{Sig.} = 0.00$  ซึ่งน้อยกว่า  $\alpha = 0.05$  (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) จึงปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าเมื่อทดสอบเชื้อ *M. luteus* กับสารสกัดหยาบจาก *M. anisopliae* ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันจะทำให้ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ *M. luteus* อย่างน้อย 1 ค่า ต่างกัน

ตารางที่ ง-4 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ HT-29 เมื่อป้อนในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นต่างกัน

Dependent Variable: viability

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	204920.829 <sup>a</sup>	119	1722.024	24.996	.000
Intercept	3959830.402	1	3959830.402	57478.287	.000
A	13584.176	4	3396.044	49.295	.000
B	12344.595	2	6172.297	89.593	.000
C	98834.977	7	14119.282	204.946	.000
A*B	14807.247	8	1850.906	26.867	.000
A*C	16654.081	28	594.789	8.634	.000
B*C	17347.057	14	1239.076	17.986	.000
A*B*C	31348.697	56	559.798	8.126	.000
Error	16534.231	240	68.893		
Total	4181285.463	360			
Corrected Total	221455.061	359			

a R Squared = .925 (Adjusted R Squared = .888)

หาค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปร (CV)

$$CV = \frac{\sqrt{\text{Error M.S}}}{G.M} \times 100$$

$$CV = 7.94\%$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัยคือ A, B และ C มีผลต่อค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HT-29

$H_0$  : ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ HT-29 เมื่อบ่มในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างกัน

$H_1$  : มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ HT-29 อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อบ่มในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ  $F = 8.126$  และมีค่า  $\text{Sig.} = 0.00$  ซึ่งน้อยกว่า  $\alpha = 0.05$  (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) แสดงว่ามีอิทธิพลร่วมของปัจจัย ABC ให้ผลการทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงปฏิเสธสมมติฐาน  $H_0$  แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์ HT-29 ในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างกันจะทำให้ค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HT-29 อย่างน้อย 1 คู่ ต่างกัน และมีค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปรเท่ากับ 7.94 เปอร์เซ็นต์



ตารางที่ ๕-5 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 เมื่อป้อนในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างกัน

Dependent Variable: viability

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	204920.829 <sup>a</sup>	119	1722.024	24.996	.000
Intercept	3959830.402	1	3959830.402	57478.287	.000
A	13584.176	4	3396.044	49.295	.000
B	12344.595	2	6172.297	89.593	.000
C	98834.977	7	14119.282	204.946	.000
A*B	14807.247	8	1850.906	26.867	.000
A*C	16654.081	28	594.789	8.634	.000
B*C	17347.057	14	1239.076	17.986	.000
A*B*C	31348.697	56	559.798	8.126	.000
Error	16534.231	240	68.893		
Total	4181285.463	360			
Corrected Total	221455.061	359			

a R Squared = .925 (Adjusted R Squared = .888)

หาค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปร (CV)

$$CV = \frac{\sqrt{\text{Error M.S}}}{G.M} \times 100$$

$$CV = \frac{\sqrt{68.893}}{96.422} \times 100$$

$$CV = 8.61\%$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัยคือ A, B และ C มีผลต่อค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ MCF=7

$H_0$  : ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 เมื่อบ่มในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างกัน

$H_1$  : มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อบ่มในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ  $F = 8.126$  และมีค่า  $\text{Sig.} = 0.00$  ซึ่งน้อยกว่า  $\alpha = 0.05$  (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) แสดงว่ามีอิทธิพลร่วมของปัจจัย ABC ให้ผลการทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงปฏิเสธสมมติฐาน  $H_0$  แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์ MCF=7 ในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างกันจะทำให้ค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ MCF=7 อย่างน้อย 1 คู่ ต่างกัน และมีค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปรเท่ากับ 8.61 เปอร์เซ็นต์



ตารางที่ ง-6 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ Vero เมื่อป้อนในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างกัน

Dependent Variable: viability

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	179947.122 <sup>a</sup>	119	1512.161	22.255	.000
Intercept	3347002.392	1	3347002.392	49258.338	.000
A	4594.791	4	1148.698	16.906	.000
B	10783.554	2	5391.777	79.352	.000
C	128500.282	7	18357.183	270.165	.000
A*B	8134.994	8	1016.874	14.965	.000
A*C	6369.542	28	227.484	3.348	.000
B*C	8349.475	14	596.391	8.777	.000
A*B*C	13214.484	56	235.973	3.473	.000
Error	16307.504	240	67.948		
Total	3543257.019	360			
Corrected Total	196254.626	359			

a R Squared = .917 (Adjusted R Squared = .876)

หาค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปร

$$CV = \frac{\sqrt{\text{Error M.S}}}{G.M} \times 100$$

$$CV = \frac{\sqrt{67.948}}{96.422} \times 100$$

$$CV = 8.54\%$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัยคือ A, B และ C มีผลต่อค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ Vero

$H_0$  : ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ Vero เมื่อบ่มในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างกัน

$H_1$  : มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ Vero อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อบ่มในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ  $F = 8.126$  และมีค่า  $\text{Sig.} = 0.00$  ซึ่งน้อยกว่า  $\alpha = 0.05$  (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) แสดงว่ามีอิทธิพลร่วมของปัจจัย ABC ให้ผลการทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงปฏิเสธสมมติฐาน  $H_0$  แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์ Vero ในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างกันจะทำให้ค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ Vero อย่างน้อย 1 คู่ ต่างกัน และมีค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปรเท่ากับ 8.54 เปอร์เซ็นต์



ตารางที่ ง-7 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ HepG-2 เมื่อบ่มในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างกัน

Dependent Variable: viability

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	314105.683 <sup>a</sup>	119	2639.544	36.668	.000
Intercept	2917676.041	1	2917676.041	40532.261	.000
A	9749.063	4	2437.266	33.858	.000
B	1747.616	2	873.808	12.139	.000
C	262174.487	7	37453.498	520.303	.000
A*B	10213.548	8	1276.694	17.736	.000
A*C	11144.532	28	398.019	5.529	.000
B*C	4161.658	14	297.261	4.130	.000
A*B*C	14914.780	56	266.335	3.700	.000
Error	17276.171	240	71.984		
Total	3249057.894	360			
Corrected Total	331381.853	359			

a R Squared = .948 (Adjusted R Squared = .922)

หาค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปร

$$CV = \frac{\sqrt{\text{Error M.S}}}{G.M} \times 100$$

$$CV = \frac{\sqrt{71.984}}{90.026} \times 100$$

$$CV = 9.42\%$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัยคือ A, B และ C มีผลต่อค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HepG-2

$H_0$  : ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ HepG-2 เมื่อบ่มในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างกัน

$H_1$  : มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ HepG-2 อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อบ่มในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ  $F = 3.70$  และมีค่า Sig. = 0.00 ซึ่งน้อยกว่า  $\alpha = 0.05$  (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) แสดงว่ามีอิทธิพลร่วมของปัจจัย ABC ให้ผลการทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงปฏิเสธสมมติฐาน  $H_0$  แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์ HepG-2 ในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างกันจะทำให้ค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HepG-2 อย่างน้อย 1 คู่ ต่างกัน และมีค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปรเท่ากับ 9.42 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ ง-8 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ P388 เมื่อป้อนในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างกัน

Dependent Variable: viability

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	336260.647 <sup>a</sup>	119	2825.720	47.548	.000
Intercept	2037628.177	1	2037628.177	34287.148	.000
A	8291.216	4	2072.804	34.879	.000
B	15724.102	2	7862.051	132.295	.000
C	263841.741	7	37691.677	634.237	.000
A*B	12931.770	8	1616.471	27.200	.000
A*C	4161.884	28	148.639	2.501	.000
B*C	17820.238	14	1272.874	21.419	.000
A*B*C	13489.696	56	240.887	4.053	.000
Error	14262.801	240	59.428		
Total	2388151.624	360			
Corrected Total	350523.448	359			

a R Squared = .959 (Adjusted R Squared = .939)

หาค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปร

$$CV = \frac{\sqrt{\text{Error M.S}}}{G.M} \times 100$$

$$CV = \frac{\sqrt{59.428}}{75.233} \times 100$$

$$CV = 10.25 \%$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัยคือ A, B และ C มีผลต่อค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ P388

$H_0$  : ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ P388 เมื่อบ่มในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างกัน

$H_1$  : มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดต่อเซลล์ไลน์ P388 อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อบ่มในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างกัน เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ  $F = 4.053$  และมีค่า  $\text{Sig.} = 0.00$  ซึ่งน้อยกว่า  $\alpha = 0.05$  (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) แสดงว่ามีอิทธิพลร่วมของปัจจัย ABC ให้ผลการทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงปฏิเสธสมมติฐาน  $H_0$  แสดงว่าเมื่อบ่มเซลล์ไลน์ P388 ในสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในแต่ละตัวทำลายที่ความเข้มข้นต่างกันจะทำให้ค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ P388 อย่างน้อย 1 คู่ ต่างกัน และมีค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปรเท่ากับ 10.25 เปอร์เซ็นต์



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นามสกุล	นายกิตติพงษ์ มิตรขุนทด
วันเดือนปีเกิด	24 ธันวาคม พ.ศ. 2528 จังหวัดชัยภูมิ
ที่อยู่	381 หมู่ 3 บ้านหนองแวง ต. บ้านเพชร อ. บำเหน็จณรงค์ จ. ชัยภูมิ
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2551 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้