รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากรา endophyte

จากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

ANTIMALARIAL SUBSTANCES PRODUCED BY ENDOPHYTIC FUNGI

ON ANTIMALARIAL MEDICINAL PLANTS

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

โดย

ดร. พัตรา สุนทรฐิติเจริญ

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2556

ชื่อเรื่อง : สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากรา endophyte จากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

ผู้วิจัย : พัตรา สุนทรฐิติเจริญ สถาบัน : มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีที่พิมพ์ : 2556 สถานที่พิมพ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต จำนวนหน้างานวิจัย: 39 หน้า

คำสำคัญ : ราเอนโดไฟต์, มาลาเรีย, ส้มโอ, ราชพฤกษ์ ลิขสิทธิ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

รายงานวิจัยเรื่องสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากรา endophyte จากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย เป็นการวิจัยที่มุ่งศึกษาหาสารต้านมาลาเรียจากสารสกัดเชื้อราชนิดเอนโดไฟต์จากต้นไม้สมุนไพร ได้แก่ต้นส้มโอและต้นราชพฤกษ์ที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย รวมทั้งทดสอบสารสกัดต้านแบคทีเรียบางชนิด โดยเก็บใบและลำต้นของต้นส้มโอและต้นราชพฤกษ์ จากจังหวัดปทุมธานี จากนั้นนำมาแยกราเอนโดไฟต์โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทดสอบฤทธิ์ของสารจากราเอนโดไฟต์จากต้นส้มโอต้านแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี agar diffusion และทดสอบหาค่าการยับยั้ง (Minimal inhibitory concentration, MIC) และการฆ่าเชื้อ (Mimimal bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัด ethyl acetate จากต้นส้มโอและต้นราชพฤกษ์ ด้วยวิธี broth micirodilution และทดสอบฤทธิ์ต้าน *Plasmodium falciparum* โดยหาค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (IC_{50}) ด้วยวิธี microculture radioisotope techniques

ผลการวิจัยพบว่า ราเอนโดไฟต์จาก ลำต้นส้มโอมี 14 isolates ส่วนราเอนโดไฟต์จากลำต้นราชพฤกษ์มี 6 isolates สารสกัด ethyl acetate ของราเอนโดไฟต์จากพืชทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิดแกรมบวกคือ *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบ สำหรับสารต้านมาลาเรียพบว่า สารสกัด ethyl acetate ของราเอนโดไฟต์จากลำต้นส้มโอมี 1 ชนิด ชื่อ Cmax3 สามารถยับยั้ง *P. falciparum*, K1 ได้ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.66 µg/ml

Title : Antimalarial substances produced by endophytic fungi on antimalarial medicinal plants

Researcher : Pattra Suntornthiticharoen

Institution : Rangsit University

Year of Publication : 2013

Publisher : Rangsit University

Sources : Rangsit University

No. of page : 39 pages

Keyword : Endophytic fungi, *Plasmodium falciparum*, *Citrus maxima*, Merr., *Cassia fistula*, Linn.

Copyright : Rangsit University

Abstract

The research was antimalarial substances produced by endophytic fungi on antimalarial medicinal plants. The objective of this study is searching for antimalarial and antibacterial activities of endophytic fungi from *Citrus maxima*, Merr. and *Cassia fistula*, Linn. The stem and leaf of the plants were collected in Pathumthani, Thailand and examined for the presence of endophytic fungi. Antibacterial activity of endophytic fungi from *C. maxima*, Merr. was done by agar diffusion method against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Ethyl acetate extract of endophytic fungi from two plants were tested against the bacterial for MIC and MBC by broth micirodilution method. The extracts were examined to *P. falciparum*, K1 strain by microculture radioisotope techniques for 50% of growth inhibition (IC_{50}).

A total of 20 isolates, 14 isolates were obtained from stem of *C. maxima*, Merr. and 6 isolates from stem of *C. fistula*, Linn. Ethyl acetate extracts of endophytic fungi from the plants have antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, *S. aureus* and *B. subtilis*. The ethyl acetate extract of endophytic fungi from *C. maxima*, Merr., Cmax3, has an activity against *P. falciparum* at IC_{50} of 3.66 µg/ml.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ และขอขอบคุณ ดร .พรรณนภา เภาทอง นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ นักศึกษาสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้ความร่วมมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณ รตท.หญิง ผศ.ดร.อัจฉราวรรณ ทองมี และ ผศ .ดร.ปถมาพร สุกปลั่ง ที่ให้ความอนุเคราะห์แบคทีเรียในการศึกษานี้ คุณสุชิน ไวยศิลา และบุคลากรในหมวดวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่มีส่วนสนับสนุนให้งานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร .จีรพันธ์ วรพงศ์ , รศ.ดร.นงลักษณ์ ศรีอุบลมาศ และ ผศ .ดร.สุเทพ ไวยครุฑธา ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำด้วยดีตลอดมา

ดร.พัตรา สุนทรฐิติเจริญ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		จ
บทที่ 1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3	ระเบียบวิธีวิจัย	10
บทที่ 4	ผลการวิจัย	13
บทที่ 5	สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ	23
บรรณานุกรม		26
ภาคผนวก		31
	ประวัติผู้วิจัย	38

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. การทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* ต่อเชื้อรา isolated ต่างๆ ที่แยกได้จาก *C. maxima* ด้วยวิธี agar diffusion เฉลี่ยจาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน 14
2. การทดสอบความไวของเชื้อ *B. subtilis* ต่อเชื้อรา isolated ต่างๆ ที่แยกได้จาก *C. maxima* ด้วยวิธี agar diffusion เฉลี่ยจาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน 15
3. การทดสอบความไวของเชื้อ *E. coli* ต่อเชื้อรา isolated ต่างๆ ที่แยกได้จาก *C. maxima* ด้วยวิธี agar diffusion เฉลี่ยจาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน 16
4. การทดสอบความไวของเชื้อ *P. aeruginosa* ต่อเชื้อรา isolated ต่างๆ ที่แยกได้จาก *C. maxima* ด้วยวิธี agar diffusion เฉลี่ยจาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน 17
5. ค่า MIC และ MBC ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 กับสารสกัด ethyl acetate จากราเอนโดไฟต์ isolated ต่างๆ ที่ได้จากต้นส้มโอ 18
6. ค่า MIC และ MBC ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6633 กับสารสกัด ethyl acetate จากราเอนโดไฟต์ isolated ต่างๆ ที่ได้จากต้นส้มโอ 19
7. ค่า MIC และ MBC ของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ กับสารสกัด ethyl acetate จากราเอนโดไฟต์ isolated ต่างๆ ที่ได้จากต้นราชพฤกษ์ 21
8. สารสกัดจาก endophytes ต้านมาลาเรีย *P. falciparum* (K1, multidrug resistant strain) 22

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่มีปัญหาต่อสุขภาพของประชากรโลก เป็นโรคที่เกิดจากโปรโตซัว ใน genus *Plasmodium* มี 5 species ที่ทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *Plasmodium falciparum, P. vivax, P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *P. falciparum* เป็นชนิดที่ทำให้เกิดมาลาเรียที่รุนแรงที่สุด ทำให้ผู้ป่วยมีอาการซับซ้อนและรุนแรงมาก ผู้ป่วยมักมีภาวะเลือดจาง (anemia) เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อสามารถอุดตันได้ตามเส้นเลือดขนาดเล็ก ถ้าเกิดที่บริเวณสมอง จะทำให้เกิดมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเด็กในทวีปแอฟริกา อัตราการติดเชื้อสูงถึง 500 ล้านคนต่อปี และมีอัตราการตายมากกว่าหนึ่งล้านคน พบในเขตร้อนและแถบใกล้เขตร้อน การติดเชื้อพบในหลายประเทศ เช่น อินเดีย บราซิล อัฟกานิสถาน ศรีลังกา ไทย อินโดนีเซีย เวียดนาม กัมพูชา จีน และในประเทศแถบแอฟริกา ก่อให้เกิดการใช้จ่ายในการรักษาสูงถึง 12 พันล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐ มาลาเรียต้องการโฮสต์สองชนิด ได้แก่ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles*) และคน ในประเทศไทยยังคงมีผู้ป่วยมาลาเรียในหลายพื้นที่ ปัญหาในเรื่องการควบคุมโรคเกิดจากเชื้อดื้อต่อยาต้านมาลาเรียชนิดต่างๆ เช่น คลอโรควิน และยาต้านมาลาเรียอีกหลายชนิด การศึกษาด้านวัคซีนป้องกันโรคก็ยังไม่สำเร็จ นอกจากนี้ยังมีปัญหายุงพาหะดื้อต่อยาฆ่าแมลงอีกด้วย การดื้อยาต้านมาลาเรียเกิดจากหลายปัจจัย เช่น การใช้ยาต้านมาลา เรียสำหรับการป้องกันโรค (prophylaxis) ที่ไม่เหมาะสม การใช้ยาไม่ครบตามปริมาณที่กำหนด ปรสิตมีการปรับปรุงสายพันธุ์ในระดับยีนและ metabolism เช่น การดื้อยา pyrimethamine และ proguanil ซึ่งมีเป้าหมายที่ dihydrofolate reductase เป็นต้น จากปัญหาที่มาลาเรียทำให้ประชากรโลกถึงหนึ่งในสามป่วยและบางส่วนเสียชีวิต ถ้าหากสามารถป้องกันโรคนี้ได้ จะเป็นวิธีการที่ดีที่สุดในการควบคุมโรค เช่นการหาวัคซีนป้องกันโรคนี้แต่ยังไม่สามารถทำได้ ดังนั้นการใช้ยารักษาโรคจึงเป็นทางออกที่ดีในการแก้ปัญหา แต่มีปัญหาเนื่องจากการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียซึ่งเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขระดับโลก ปรสิตสามารถปรับตัวหลบหลีกจากการออกฤทธิ์ของยา เช่นอาจหลบเข้าไปอยู่ในที่ปลอดภัย ปรับเปลี่ยนการรับยาเข้าสู่เซลล์ หรืออาจเปลี่ยนเยื่อหุ้ม (membrane) หลังจากที่เชื้อได้ปรับเปลี่ยนสิ่งเหล่านี้ ยาก็ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ โรคติดเชื้อต่างๆ จากเชื้อแบคทีเรียก็ มีปัญหาเชื้อดื้อยาเช่นกัน การพัฒนายาต้านมาลาเรียมีหลายวิธี เช่น การปรับเปลี่ยนและพัฒนาจากยาเดิมที่ใช้กันอยู่ การพัฒนายาให้มีความซับซ้อนน้อยลงและสังเคราะห์ง่ายขึ้น เช่น trioxalane derivative ซึ่งขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการทดลองทางคลินิค (clinical trials) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่จะต้องหาเป้าหมายยาใหม่ๆ หนึ่งในนั้นคือการหายา ต้านจุลชีพใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ต้านมาลาเรีย แบคทีเรีย หรือจุลชีพต่างๆ ได้ แหล่งที่สามารถพบ antimicrobial agents ใหม่ๆ พบได้หลายแหล่ง เช่น พืช, รา, ราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi) เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของต้นไม้ โดยไม่ทำอันตรายแก่ต้นไม้ สามารถพบได้ในต้นไม้บกทุกชนิด และพบว่า endophytic fungi ที่พบบนพืชต่างๆ เป็นแหล่งที่พบสารต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น สารต้านแบคทีเรีย สารต้าน เชื้อรา สารต้านมาลาเรีย สารต้านมะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านไวรัส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการเก็บต้นไม้ในส่วนลำต้นและใบของต้นส้มโอ (*Citrus maxima* Merr.) และ ราชพฤกษ์ (*Cassia fistula* Linn.) เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงให้ได้ราเอนโดไฟต์ จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อให้สร้างสาร secondary metabolite จากนั้นสกัดสารด้วย ethyl acetate ออกมา เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียและแบคทีเรียต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อหาสารต้านมาลาเรียจากสารสกัดเชื้อราชนิด endophyte จากต้นไม้สมุนไพร ได้แก่ต้นส้มโอและต้นราชพฤกษ์ที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย รวมทั้งทดสอบสารสกัดต้านแบคทีเรียบางชนิด

ขอบเขตของการวิจัย

1. เก็บต้นไม้และนำมาแยกราเอนโดไฟต์จากต้นส้มโอและต้นราชพฤกษ์
2. สกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์
3. ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัด
4. ทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียในหลอดทดลองของสารสกัด

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถค้นพบสารสกัดราเอนโดไฟต์จากต้นไม้สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียและแบคทีเรียซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนายาต้านมาลาเรียและแบคทีเรียต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขระดับโลก ผู้ป่วยติดเชื้อจากการถูกยุงก้นปล่องกัดและปล่อยปรสิตเข้าสู่ร่างกาย สาเหตุเกิดจากเชื้อโปรโตซัวซึ่งเป็นสัตว์เซลล์เดียว ใน genus *Plasmodium* มี 5 species ที่ก่อโรคมาลาเรียในคน ได้แก่ *Plasmodium falciparum, P. vivax, P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* ในโลกนี้ทุกปีจะมีผู้ป่วยมากกว่า 1 ล้านคนเสียชีวิตจากการติดเชื้อมาลาเรีย (Miller, et al., 2002) ในประเทศไทยยังคงมีผู้ป่วยมาลาเรียในหลายพื้นที่ เช่นจังหวัดตาก กาญจนบุรี ปัญหาในเรื่องการควบคุมโรคเกิดจากเชื้อดื้อต่อยาต้านมาลาเรียชนิดต่างๆ เช่น คลอโรควิน นอกจากนี้ยังมีปัญหายุงพาหะดื้อต่อยาฆ่าแมลงอีกด้วย ดังนั้นการค้นหายาต้านมาลาเรียจึงมีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นโรคที่ตกขอบการวิจัย เป็นโรคของคนที่มีรายได้น้อย เช่นประเทศในแถบแอฟริกา บริษัทยาต่างชาติจึงเมินที่จะพัฒนายาต้านมาลาเรียใหม่ๆ ดังนั้นนักวิจัยในประเทศไทยควรหันมาให้ความสนใจกับการค้นคว้าและพัฒนายาต้านมาลาเรียเอง นอกจากนั้นโรคติดเชื้อต่างๆ จากเชื้อแบคทีเรียก็ยังมีปัญหาเชื้อดื้อยาเช่นกัน ดังนั้นการหา antimicrobial agents ใหม่ๆ ก็ยังคงมีความสำคัญมากอีกด้วย (Pillay and Zambon 1998; Espinal, et al., 2001)

ราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi) เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของต้นไม้ โดยไม่ทำอันตรายแก่ต้นไม้ สามารถพบได้ในต้นไม้บกทุกชนิด (Petrini, et al., 1992; Saikkonen, et al., 1998) และพบว่า endophytic fungi ที่พบบนพืชต่างๆ เป็นแหล่งที่พบสารต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น สารต้านแบคทีเรีย สารต้านเชื้อรา สารต้านมาลาเรีย สารต้านมะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านไวรัส (Tan and Zou 2001; Wiyakrutta, et al., 2004)

กว่า 80% ของประชากรโลกอาศัยพืชสมุนไพรในการรักษาโรค (Zirihi, et al., 2005) รวมถึงประเทศไทยด้วย ต้นไม้ที่ใช้เป็นยารักษามาลาเรียในตำรับยาสมุนไพรมีมากมายหลายขนาน เช่น หญ้าลูกใต้ใบ *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540) กันเกรา *Fagraea fragrans* Roxb., ขมิ้นเครือ *Arcangelisia flava* Merr., เจตมูลเพลิงขาว *Plumbago zeylanica* Linn., ชิงเฮา *Artemisia annua* Linn, โด่ไม่รู้ล้ม *Elephantopus scaber* Linn, มะตูม *Aegle marmelos* (L.) Corr., ส้มป่อย *Acacia rugata* Merr., สะเดา *Azadirachta indica* Juss var. *siamensis* Valenton, สะเดาอินเดีย *Azadirachta indica* Juss., (พรรณนิภา ชุมศรี, 2542), ฉัตรพระอินทร์ *Leonotis nepetifolia* R. Br., ประทัดจีน *Russelia equisetiformis* Schltr.&Cham., ปลาไหลเผือก *Eurycoma longifolia* Jack (หมอสมุนไพรพื้นบ้าน 2545), สะเดาเทียม *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs (สุทัศน์ จูงพงศ์, 2546), เลี่ยนดอกม่วง *Melia azedarach* Linn., ราชดัด

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Brucea javanica Merr. (พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ, 2537), มะตูม *Aegle marmelos* (L.) Correa (พร้อมจิต ศรลัมพ์, 2543), น้ำนมราชสีห์ใหญ่ *Euphorbia hirta* L. var, typica L.C. Wheeler., หญ้าพันงู *Achyrathes aspera* Linn., น้ำนมราชสีห์เล็ก *Euphorbia humifusa* Willd., มะไฟจีน *Clausena lansium* (Lour) Skeels. (บุญชัย ฉัตตะวานิช, 2540)

แห้วหมู *Cyperus rotundus* L. การทดลองในสัตว์พบฤทธิ์ขับปัสสาวะ ลดไข้ ลดความดันโลหิตและลดการอักเสบ ซึ่งเชื่อว่าเกิดจาก α-cyperone นอกจากนี้พบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในหลอดทดลองด้วย, สารสกัดแอลกอฮอล์ของแก่นกันเกรา *Fagraea fragrans* Roxb. สารสกัดของใบและกิ่งคนทา *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. สารสกัดรากย่านาง *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในหลอดทดลองเช่นกัน (พร้อมจิต ศรลัมพ์, 2543)

การค้นหาสารสกัดจากเชื้อราชนิด endophyte บนต้นไม้ที่เป็นสมุนไพรต้านมาลาเรีย อาจทำให้พบสารต้านมาลาเรีย เมื่อเทียบกับสารต้านมาลาเรียที่มาจากตัวพืชสมุนไพรอาจจะมีความเหมือนหรือแตกต่างกันซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนายาต้านมาลาเรียต่อไปในอนาคต

ส้มโอ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Citrus maxima* Merr. (syn. *C. grandis* Osbeck)

วงศ์ : Rutaceae

ชื่อสามัญ : Pumello, Shaddock, ส้มโอ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ส้มโอเป็นไม้พุ่มยืนต้นกลุ่มไม้ผลเมืองร้อน ลำต้นเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง มีความสูงประมาณ 6-8 เมตร แต่ถ้าปลูกในพื้นที่เหมาะสมและมีอายุมากๆ อาจสูงถึง 15 เมตร ทรงต้นโปร่ง ลำต้นและกิ่งใหญ่ ดอกส้มโอออกตามปลายกิ่ง ดอกช่อแบบ axillary raceme มีจำนวน 10-20 ดอก หรือบางทีออกเป็นดอกเดี่ยวๆ ก็มี เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ดอกค่อนข้างใหญ่ ก้านดอกยาว กลีบดอกสีขาว มี 4-5 กลีบ กว้างประมาณ ¼ นิ้ว ยาว ¾ - 1¼ นิ้ว กลีบรองดอกมีสีเขียวอ่อน มีอับเกสรตัวผู้ 16-24 อัน อยู่ล้อมรอบรังไข่ ซึ่งมีลักษณะรูปทรงกลม สีเขียวอ่อน ก้านเกสรตัวเมียยาวใหญ่ ส่วนปลายกลม เมื่อดอกบานมีกลิ่นหอมคล้ายดอกแก้ว ออกดอกมากที่สุดช่วงกลางเดือนธันวาคมถึงกลางเดือนมกราคม และออกดอกอีกครั้งหนึ่งระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน ระหว่างเวลาจากผลิดอกถึงดอกบานใช้เวลา 25-30 วัน และระยะเวลาจากดอกบานถึงผลแก่ 180-210 วัน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ผลมีขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 15-18 เซนติเมตร สูง 14-16 เซนติเมตร จัดอยู่ในประเภทเบอรี่ (berry ซึ่งเป็น freshy fruit ในกลุ่มของผลเดี่ยว หรือ simple fruit ซึ่งผลที่เกิดมาจากรังไข่ในดอกเดียวกัน) จำพวกเฮสพาริเดี่ยม (hesparidium) เป็นผลชนิดเบอรี่ที่มีเปลือกค่อนข้างเหนียวคล้ายหนัง มีต่อมน้ำมันมาก เปลือกนี้สามารถลอกหรือปอกออกมาได้) ทรงผลมี 2 ลักษณะ คือกลมแป้นหรือกลมสูง ผิวของผลมีสีเขียวอ่อนถึงเหลือง มีต่อมน้ำมันตามผิว มีเปลือกหนา (โดยธรรมชาติ) โดยเปลือกส้มโอที่มาจากต้นที่อายุมากจะไม่หนามาก ส้มโอที่มีอายุประมาณ 15 ปี จะมีความหนาของเปลือกโดยเฉลี่ยประมาณ 1.5-1.7 เซนติเมตร โดยขณะที่ส้มโออายุได้ 3 หรือ 4 ปี เปลือกจะหนาประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร เปลือกด้านในมีลักษณะนุ่ม จัดเป็น pericarp ของผล เนื้อเกิดจากส่วนเจริญของเปลือกด้านใน (endocarp) มีรสหวานอมเปรี้ยว ภายในผลแบ่งออกเป็นกลีบ 12-14 กลีบ ตรงกลางมีแกน (core) แข็ง แต่บางผลก็ไม่มี มีลักษณะเป็นโพรงกลวงกลางผล ปริมาณผลในต้นหนึ่งมีตั้งแต่ 40-180 ผล ขึ้นอยู่กับอายุของต้นส้มโอที่ปลูก ส้มโอมีเมล็ดค่อนข้างใหญ่ ลักษณะแบน เปลือกย่นหรือขรุขระอยู่รวมกัน ตรงกลางผลรอบๆ แกนบางผลไม่มีเมล็ดหรือเมล็ดลีบ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2546)

สรรพคุณ

ใบ รสปร่าหอม แก้ท้องอืดแน่นเฟ้อ ตำพอกแก้ปวดศีรษะ

ดอก รสหอมร้อน ขับเสมหะ ขับลม

เปลือกลูก รสปร่าหอม ขับเสมหะ แก้แน่น จุกเสียด แก้ไส้เลื่อน ต้มอาบแก้คัน

ผิวเปลือก รสปร่าหอม ปรุงยาหอม แก้ลมวิงเวียน หน้ามืดตาลาย แก้จุกเสียดแน่นเฟ้อ

เมล็ด รสขม แก้ปวดท้อง

ราก รสขมปร่า แก้หวัด แก้ไอ แก้ปวดท้อง ปวดกระเพาะอาหาร

เนื้อลูก รสเปรี้ยวสุขุม แก้เสมหะ บำรุงโลหิต ทำให้ชุ่มคอ

Citrus spp. เป็นแหล่งที่มี polymethoxylated flavonoids (PMF) ซึ่งเป็น secondary plant metabolites (Afek, et al., 1986) จากการศึกษาสารสกัดโดย wax และ hexane จากเปลือก ของ *Citrus* พบว่ามีฤทธิ์ต้านราหลายชนิดและแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* (Johann et al., 2007)

Dabbah, R. และคณะ ได้ทำการศึกษาน้ำมันจากเปลือกของ *Citrus* หลายชนิดต้านแบคทีเรีย พบว่า terpineol และ terpene-less fractions ของ น้ำมัน จากเปลือกของ *Citrus* มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิด Gram-positive ได้ดี (Dabbah et al., 1970)

จากการศึกษาสารสกัดจากส้มหลายชนิดมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและก่อโรค พบว่าสารสกัดจากส้มโอมีฤทธิ์ต้าน แบคทีเรียหลายชนิดได้แก่ *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

25922, *Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes* และ *Saccharomyces cerevisiae* (ปรียานุช กฤษณะประสิทธิ์ และ พรทิพย์ จึงถาวรรณ, 2552)

Kirbaslar และคณะ ได้ทำการศึกษาน้ำมันที่สกัดจากเปลือกส้มหลายชนิด ของประเทศตุรกีตอนใต้ โดยวิธี disk diffusion พบว่า มีฤทธิ์ต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น *E. coli, S. aureus, Klebsiella pneumoniae, Bacillus cereus, Micrococcus luteus, Proteus vulgaris, Mycobacterium smegmatis, L. monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Kluyveromyces fragilis, Rhodotorula rubra, Candida albicans, Hanseniaspora guilliermondii, Debaryomyces hansenii* (Kirbaslar, et al., 2009)

มีการศึกษาฤทธิ์ต้าน แบคทีเรีย 7 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis, S. aureus, Enterococcus faecalis, E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa* และ *P. vulgaris* รา 2 ชนิด *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* และ ยีสต์ *C. albicans* โดยใช้น้ำผลไม้ และ สารสกัดด้วย ethanol จากส่วนของราก ใบ เปลือกลำต้น เปลือกของผล และ เนื้อส้ม จากต้น *Citrus medica* Linn., Rutaceae พบว่า ส่วนต่างๆ มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ดังนี้ น้ำผลไม้โดยมีค่า MIC <1% - 3.5% และ MBC 1% - 7% v/v เนื้อส้มมีค่า MIC 25 mg/ml และ MBC 30 - 75 mg/ml สารสกัดจากรากมีค่า MIC เท่ากับ 0.5 mg/ml และ MBC 1 mg/ml ต่อ *S. aureus* (Sah, et al., 2011)

จากการวิจัย พบว่า สารสกัดจาก *Citrus sinensis* ซึ่งอยู่ใน genus เดียวกับส้มโอมีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย *P. falciparum* strain FCK2 ในหลอดทดลอง (Bhat and Surolia, 2001)

ราชพฤกษ์

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Cassia fistula* Linn.

วงศ์ : Caesalpiniaceae

ชื่อสามัญ : golden shower, Indian laburnum, Pudding pine tree, ราชพฤกษ์, ลมแล้ง, กุเพยะ, คูน, ปือยู, ปูโย, เปอโช, แมะหล่าอยู่, ลักเกลือ, ลักเคย, อ้อดิบ

ลักษณะทั่วไป

ต้นเป็นไม้ยืนต้น ที่ไม่ค่อยจะสูงหรือใหญ่มากนัก จะแตกกิ่งก้านสาขาย่อยออกไป เพื่อที่จะชูดอกนั่นเอง ใบมีสีเขียวอ่อนๆ ขอบใบจะเรียบ ไม่มีจัก โคนใบมน ปลายใบแหลมเล็กน้อย ใบกว้างประมาณ 4-3 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อ อยู่ตามก้านของลำต้น มีสีเหลืองงามระยับ ในขณะที่ออกดอกนั้น ใบจะร่วง และจะออกดอกได้เพียงปีละครั้งเดียว การขยายพันธุ์เป็นไม้กลางแจ้งเวลาปลูกควรจะปลูกไว้ในที่โล่ง เพราะอากาศจะได้ถ่ายเทสะดวก ต้องการน้ำและความชื้นน้อย จะผลิดอกในฤดูร้อน ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ด (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม, 2542) ผลสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีดำ ลักษณะเป็นฝักทรงกระบอก ยาว

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประมาณ 20-60 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร เปลือกนอกบาง เรียบ แข็ง ไม่มีขน ภายในฝักจะมีชั้นกั้นเป็นช่องๆ จำนวนมาก แต่ละช่องจะมีเมล็ดรูปรี แบน สีน้ำตาล 1 เมล็ด และมีเนื้อนุ่มสีดำหุ้มเมล็ดอยู่ด้วย

ราชพฤกษ์เป็นต้นไม้ที่มีนามเป็นมงคล นิยมใช้ในพิธีสำคัญต่างๆ เช่น พิธีลงหลักเมือง ยอดธงชัย เฉลิมพล และคทาจอมพล ก็ทำด้วยแก่นชัยพฤกษ์ การปลูกต้นราชพฤกษ์ไว้ในบริเวณบ้าน เชื่อกันว่าจะช่วยส่งเสริมให้มีเกียรติยศ มีศักดิ์ศรี มีตำแหน่งหน้าที่ใหญ่โต มีอำนาจและเนื่องจากราชพฤกษ์เป็นไม้มีคุณทางเป็นสมุนไพรรักษาหลายโรค คนโบราณถือว่าการปลูกไม้มีคุณจะต้องปลูกในวันเสาร์และสำหรับราชพฤกษ์ท่านให้ปลูกทางทิศหรดี (ทิศตะวันตกเฉียงใต้) จะเกิดสิริมงคลยิ่งขึ้น

นิยมปลูกในแปลง โดยเพาะเมล็ดให้ได้ต้นกล้าสูง 30-50 เซนติเมตร ขุดหลุมกว้าง 50 เซนติเมตร ลึก 70 เซนติเมตร ตากดินที่ขุดขึ้นมาไว้ 10-15 วัน ใช้ปุ๋ยคอกรองก้นหลุม นำต้นกล้าลงปลูก กลบดินให้แน่น รดน้ำให้ชุ่ม ไม่ช้าก็จะตั้งตัวได้ ควรปลูกให้มีระยะห่างจากตัวอาคารที่พอเหมาะ เพราะราชพฤกษ์เป็นไม้ที่มีทรงพุ่มใหญ่พอสมควร นิยมขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ดเป็นต้นกล้ามากกว่าการตอนกิ่ง

ประโยชน์ทางสมุนไพร

ฝัก รสหวานอมเปรี้ยว มีกลิ่นเหม็นเอียนๆ สรรพคุณขับเสมหะ ฝักแห้งต้มกับน้ำดื่มเป็นยาขับพยาธิแก้เด็กเป็นตานขโมย

เนื้อในฝักแก่ รสหวานเอียน แกะเอาเปลือกและเมล็ดออก ต้มกับน้ำให้เดือด 5-10 นาที ใส่เกลือเล็กน้อย ดื่มเป็นยาระบายสำหรับคนที่ท้องผูกเป็นประจำ แก้บิด แก้ไข้มาลาเรีย เนื้อตำละเอียดใช้พอกบริเวณข้อที่ปวดแก้ปวดข้อ

เมล็ด บดเป็นผงรับประทานกระตุ้นให้อาเจียน

ใบอ่อน รสเมา ต้มเอาน้ำดื่มแก้ไข้รูมาติก

ใบแก่ ใช้ใบสดตำละเอียด ใช้พอกหรือทาถูผิวหนังแก้กลาก และโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อรา ใบแห้งบดละเอียดชงน้ำดื่มเป็นยาถ่าย แก้อัมพาต และโรคเกี่ยวกับสมอง

แก่น รสเมา ใช้ขับพยาธิไส้เดือน

เปลือกราก เป็นยาระบาย แก้ไข้มาลาเรีย

ราก รสเมา เป็นยาบำรุงและยาถ่ายอย่างแรง แก้โรคเกี่ยวกับหัวใจและถุงน้ำดี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ข้อมูลทางเภสัชวิทยา

สารสกัดจากเปลือกต้นคูนหรือราชพฤกษ์ มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งได้ในขนาด 20 μg/ml เนื้อในฝักมีสารประเภท anthraquinones หลายตัวเช่น aloin, rhein, sennoside A, B มีฤทธิ์เป็นยาระบาย เนื่องจากไปกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ เหมาะสำหรับคนที่ท้องผูกเป็นประจำ (พิชาน, 2547)

มีการใช้ *C. fistula* L. เป็นยาสมุนไพรในหลายพื้นที่เช่น เอเชีย แอฟริกาใต้ เม็กซิโก จีน อินเดีย ตะวันตก แอฟริกาตะวันออก และ บราซิล และได้มีการใช้เป็นยาต้าน ringworm และ โรคผิวหนังจากเชื้อรา (Rajan et al., 2001) ใช้รักษาการติดเชื้อทางเดินหายใจในอินเดียโดยชนเผ่า Malaialis (Perumal Samy et al., 1998) ส่วนเนื้อของผลสุกมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Kasuko and Nagayo 1951) คนอินเดียใช้ใบรักษาอาการอักเสบ ดอกใช้เป็นยาระบาย ผลใช้ต้านการอักเสบ หนาวสั่น หวัด โรคหัวใจและตับ ผิดปกติ และ rheumatism (Kirtikar and Basu 1975; Patel et al., 1965; Satyavati and Sharma 1989) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าสามารถใช้เป็น broad-spectrum antimicrobial agents (Prashanth Kumar et al., 2006) พืชทั้งต้นใช้รักษาอาการท้องร่วง เมล็ดใช้รักษาโรคผิวหนัง ดอกและผลใช้รักษาโรคผิ วหนัง ไข้ ปวดท้อง โรคเรื้อนโดย ชาวพื้นเมือง (Perry 1980)

ส่วนต่างๆ ของ *C. fistula* มีสาร secondary metabolite มากมายโดยเฉพาะอย่างยิ่ง phenolic compounds เช่น fistucacidin (3,4,7,8,4′-pentahydroxyflavan) จากแก่นไม้ (Padmanabha Rao and Venkateswarlu 1965) สารสกัด kaempferol และ proanthocyanidin จากดอกโดยใช้ acetone (Narayanan and Seshadri 1972) bianthraquinone glycoside, fistulin, kaempferol, rhein สกัดด้วย ethanol จากดอก (Kumar et al., 1966) และยังพบสาร alkaloids หลายชนิดจากดอก (Asseleih et al., 1990)

ได้มีการศึกษาสารต้านแบคทีเรียและราจากด อกของต้น *C. fistula* L. พบว่า มีสารต้านแบคทีเรียชนิด Gram –positive เช่น *S. aureus, Staphylococcus epidermidis, B. subtilis, Enterococcus faecalis* มีค่า MIC ระหว่าง 0.078-2.5 mg/ml และมีสามารถต้านแบคทีเรียชนิด Gram-negative ได้เพียงชนิดเดียว คือ *P. aeruginosa* มีค่า MIC ระหว่าง 0.625-5 mg/ml สำหรับสารต้านเชื้อราพบว่ายับยั้งเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes* (MIC 0.5 mg/ml) และ *Epidermophyton floccosum* (MIC 0.5 mg/ml) (Duraipandiyan and Ignacimuthu 2007)

ในผลของ *C. fistula* Linn. มีสาร anthraquinone derivative rhein ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ดังนั้นจึงมีการศึกษาสารต้านเชื้อรา *Candida* หลาย species จากสารสกัดเนื้อผลและเมล็ดต้าน *C. albicans* ATCC 10261, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. tropicalis* ATCC 750 พบว่าสารสกัดจากเมล็ดมีค่า MIC ระหว่าง 300-350 μg/ml ในขณะที่สารสกัดจากเนื้อผลมีค่า MIC ระหว่าง 100-250 μg/ml (Irshad et al., 2011)

มีการศึกษา synergistic combination ของ amoxicillin และสารสกัดด้วยน้ำจาก *C. fistula* ต่อ Multi Drug Resistant (MDR) *Salmonella enterica* Serovar Typhi (SEST) มีค่า MIC เท่ากับ 23.4-187.5 µg/ml (Ali et al., 2007)

ในเปรูเหนือมีการศึกษาพื ชสมุนไพรหลายชนิดต้านแบคทีเรีย พบว่า ในการสกัด ethanol จากพืชหลายชนิดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย รวมถึง *C. fistula* (Bussmann et al., 2010)

ได้มีการศึกษาสารต้านการอักเสบ โดยใช้สารสกัด ด้วยน้ำจากผลของ *C. fistula* Linn. ร่วมกับ *Solanum xanthocarpum* Schrad and Wendl พบว่ามี anti-inflammatory activity (Anwikar and Bhitre 2010)

Govindarajan ศึกษาสารสกัดจากใบของ *C. fistula* Linn. ฆ่าลูกน้ำยุง (larvicidal) ยับยั้งการฟักไข่ยุง (ovicidal)ในยุง *Culex quinquefasciatus* พาหะนำ filariasis, *Anopheles stephensi* พาหะนำโรคมาลาเรีย (Govindarajan et al., 2008), *Aedes aegypti* และ สารไล่แมลง (repellent) ใน *Aedes aegypti* ซึ่งเป็นพาหะของโรค chikungunya โดยใช้สารสกัดชนิดต่างๆ ได้แก่ methanol, benzene, acetone พบว่าสารสกัดเหล่านี้มีฤทธิ์ larvicidal, ovicidal และ repellent (Govindarajan 2009)

จากการศึกษาสารสกัด hexane จากผลของ *C. fistula* สามารถต้าน *Leishmania* L. *chagasi* ระยะ promastigote ซึ่งเป็นโปรโตซัว โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.03 µg/ml และต้านระยะ amastigote IC_{50} เท่ากับ 18.10 µg/ml (Sartorelli et al., 2007) จากนั้นได้ศึกษาสาร สกัด dichloromethane จากผลของ *C. fistula* พบสารชื่อ isoflavone biochanin A ทดสอบต้าน *Leishmania* (L.) *chagasi* ระยะ promastigotes ค่า 50% effective concentration (EC_{50}) เท่ากับ 18.96 µg/ml และยังพบว่า biochanin A สามารถต้าน *Trypanosoma cruzi* มีค่า EC_{50} เท่ากับ 18.32 µg/ml ซึ่งดีกว่า benznidazole ถึง 2.4 เท่า ซึ่งน่าจะเป็นเป้าหมายใหม่สำหรับเป็น antiprotozoal compounds (Sartorelli et al., 2009)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

การแยก endophytic fungi จากพืช

1. เก็บส่วนใบและลำต้นของส้มโอและราชพฤกษ์ จากจังหวัดปทุมธานี โดยเก็บส่วนที่แข็งแรงไม่มีราหรือแมลงรบกวน

2. นำส่วนของต้นไม้ที่ได้มาเพาะเลี้ยง endophytic fungi โดยนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด ส่วนของลำต้นให้ตัดเป็นชิ้น ประมาณ 5 เซนติเมตร ส่วนใบให้แช่ทั้งใบ ล้างด้วย 70 % ethanol 1 นาที 5% sodium hypochlorite solution 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 4 ครั้งๆ ละ 1 นาที เพื่อทำความสะอาด

3. นำมาเพาะบน sterile water agar plate ตั้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง ส่วนของราจะงอกออกมา จากนั้นตัดด้วย pasteur pipette ภายใต้กล้อง stereozoom

4. ย้ายส่วนของราที่งอกมา ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา potato dextrose agar (PDA) half strength ตั้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง นาน7-14 วัน ดูลักษณะของโคโลนีเพื่อแยกชนิดของราเอนโดไฟต์

การศึกษาฤทธิ์ของสารที่ผลิตจากเชื้อราโดยวิธี Agar diffusion

1. นำมาศึกษาฤทธิ์ของสารที่ผลิตจากเชื้อราที่แยกจาก ต้นส้มโอ โดยวิธี Agar diffusion โดยตัดวุ้นที่เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีอายุ 7, 14, 21 และ 28 วันในจานเลี้ยงเชื้อ Glucose yeast agar (GYA) วางทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853, และ *E. coli* ATCC 25922 โดยเทียบกับยามาตรฐานคือ gentamicin, ampicillin, chloramphenicol, novobiocin, ofloxaxin, amikacin

2. นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมาปรับความขุ่นใน normal saline solution นำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีค่าดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร ในช่วง 0.08-0.1 ควรทำการปรับความขุ่นก่อนทำการทดลองไม่เกิน 15 นาที

3. ใช้ sterile cotton swab จุ่มเชื้อและทำ 3-way swab technique ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Agar ที่มีความหนา 4 มิลลิเมตร

4. ตัดวุ้นที่เลี้ยงเชื้อรา endophyte อายุ 7, 14, 21 และ 28 วันในจานเลี้ยงเชื้อ Glucose yeast agar (GYA) ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร และย้ายชิ้นวุ้นที่มีรา isolate ต่างๆ ด้วย sterile needle วางลงบน Mueller-Hinton Agar 4 จุด แต่ละ isolate ทำ 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

5. อ่านผลโดยการวัดค่าการยับยั้งโดยดูจากโซนใสรอบๆ ชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา (inhibition zone) วัดค่าเส้นผ่าศูนย์กลางโดยใช้ไม้บรรทัด บันทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร

การสกัดสารจากอาหารเลี้ยงเชื้อรา endophyte

1. นำราเอนโดไฟต์ isolate ต่างๆ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA อุณหภูมิห้อง นาน 3-4 วัน

2. ตัดส่วนของราจาก plate ให้ได้ขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร จำนวน 6 ชิ้น มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose yeast broth (GYB) 200 ml ใน flask 1,000 ml ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน

3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มากรองด้วยผ้ากอซ 4 ชั้น เพื่อแยกเอาราออก

4. นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth) มาแยกสกัดด้วย ethyl acetate ในสัดส่วน broth: solvent 1:1 ทั้งหมด 2 ครั้ง โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อและ ethyl acetate ใน separating funnel และเขย่าแรงๆ ประมาณ 5 นาที

5. แยกเอาส่วนที่เป็น ethyl acetate ใส่ในขวดก้นกลม นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Rotavapor ที่อุณหภูมิ 40-45 ^{O}C

6. นำสารสกัดที่ได้มา ชั่งน้ำหนักและ ละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 10 mg/ml

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์เพื่อหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และค่า minimal bactericidal concentration (MBC) (NCCLS, 2004)

1. การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดของเชื้อรา Isolate ต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรีย (Castillo et al., 2002) ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853, และ *E. coli* ATCC 25922 โดยวิธี Broth microdilution method โดยเทียบกับยามาตรฐานคือ gentamicin, ampicillin

2. เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบน blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เป็นเวลา 18-24 ชั่งโมง

3. นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมาปรับความขุ่นใน normal saline solution เทียบเท่ากับค่า McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรีย $1.5x10^{8}$ CFU/ml

4. นำแบคทีเรียมาเจือจางในอัตราส่วน 1:100 ใน tryptic soy broth (TSB)

5. นำสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นส้มโอ ตั้งชื่อว่า Cmax และราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นราชพฤกษ์ ตั้งชื่อว่า Cfis ความเข้มข้น 10 mg/ml มาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น สุดท้าย 1.95-1,000 µg/ml โดยวิธี two-fold dilution ใน sterile microtiter plate 96 wells โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ทำการเจือจางสารสกัดด้วย TSB โดยมีปริมาตรทั้งหมด 50 µl จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 50 µl

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ทำ Growth control โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ปราศจากสารสกัด และ ทำ reagent control โดยใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่สูงที่สุดที่ใช้ในการละลายสารสกัด

นำ plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เป็นเวลา 18-24 ชั่งโมงและอ่านผลการทดลอง

ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้

ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อมีการเจริญเติบโต

ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อใสแสดงว่าเชื้อไม่มีการเจริญเติบโต

6. นำหลุมที่ใสมาหาค่า MBC ต่อไป โดยแตะเชื้อในหลุมที่ใสมา streak ลงบน Mueller-Hinton agar โดยแบ่ง plate เป็นส่วนๆ ตามต้องการ

7. นำ plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เป็นเวลา 18-24 ชั่งโมง

8. ดูผลการเจริญของเชื้อ โดยค่า MBC คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัด ที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้

การทดสอบหาค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเชื้อรา endophyte ต่อเชื้อ *Plasmodium falciparum* strain K1

ทำการเพาะเลี้ยง *Plasmodium falciparum* (K1, multidrug resistant strain) ในหลอดทดลองตามวิธีของ Trager & Jensen (Trager and Jensen 1976) โดยเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 medium ที่มี 20 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), 32 mM $NaHCO_3$, 10 % heat activated human serum และ มี 3 % erythrocytes บ่มที่ 37 ^{o}C, 3 % CO_2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใช้ microculture radioisotope techniques โดยวิธีของ Desjardins (Desjardins et al., 1979) โดยใช้ส่วนผสม 200 µl ของ 1.5% erythrocytes และมี 1 % parasitemia ระยะวงแหวน (ring stage) เติมสารสกัด 25 µl (0.1 % DMSO final concentration) บ่มไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม [^{3}H] hypoxanthine (Amersham, USA) 25 µl ใน culture medium (0.5 µCi) บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง การวัดค่าของ incorporated radioactively labeled hypoxanthine บ่งชี้ถึงการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยใช้เครื่อง Top Count microplate scintillation counter (Packard, USA)

IC_{50} = ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ 50%

โดยเทียบกับยามาตรฐานคือ Dihydroartemisinine (DHA)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ราเอนโดไฟต์จากต้นส้มโอ

จากการทดลองได้ทำการเพาะเลี้ยง endophyte จากต้นและใบส้มโอ นำมาเพาะเลี้ยงใน sterile water agar plate 2-7 วัน หลังจากย้ายเชื้อส่วน hyphal tip ไปลง PDA สังเกตดูจากลักษณะของ colony ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามี endophyte 14 ชนิดแยกได้จาก ส่วนของ ลำต้น ส่วน ใบไม่พบ endophyte ให้ชื่อ Cmax1-Cmax11 เป็นราที่เจริญเติบโตเร็ว และ Cmax14-16 เป็นราที่เจริญเติบโตช้า จะเห็นลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันโดยดู plate ทั้งด้านบนและด้านหลังโคโลนีที่เจริญในอาหารแข็ง (ภาคผนวก) จากนั้นนำเชื้อราเอนโดไฟต์เพาะเลี้ยงใน Glucose yeast agar (GYA) ราที่เจริญเติบโตเร็ว Cmax1-Cmax11 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 และ 14 วัน ราที่เจริญเติบโตช้า Cmax14-Cmax16 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน เพื่อให้ราสร้างสารต่างๆ ในวุ้นอาหาร และนำมา ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการ เจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Agar diffusion ต่อเชื้อ *S. aureus, B. subtilis, E. coli* และ *P. aeruginosa* พบว่า มีราเอนโดไฟต์ 6 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้แก่ Cmax1, Cmax2, Cmax5, Cmax8, Cmax14 และ Cmax15 โดยที่มีค่า inhibition zone ดังนี้ Cmax1 จากการเลี้ยงเชื้อ 7 และ 14 วัน เท่ากับ 27 และ 21.66 มิลลิเมตรตามลำดับ , Cmax2 จากการเลี้ยงเชื้อ 7 และ 14 วัน เท่ากับ 22.33 และ 13.3 มิลลิเมตรตามลำดับ, Cmax5 จากการเลี้ยงเชื้อ 14 วัน เท่ากับ 16.66 มิลลิเมตร, Cmax8 จากการเลี้ยงเชื้อ 14 วัน เท่ากับ 21.33 มิลลิเมตร, Cmax14 จากการเลี้ยงเชื้อ 21 วัน เท่ากับ 11 มิลลิเมตรและ Cmax15 จากการเลี้ยงเชื้อ 14, 21 และ 28 วัน เท่ากับ 13, 32.5 และ 32 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 1) เทียบกับยามาตรฐาน gentamicin 27.67 มิลลิเมตร ampicillin 16.33 มิลลิเมตร และ novobiocin 28 มิลลิเมตร

มีราเอนโดไฟต์ 1 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้แก่ Cmax1 จากการเลี้ยงเชื้อ 7 และ 14 วัน มีค่า inhibition zone 15.67 และ 13.66 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 2) เทียบกับยามาตรฐาน gentamicin 27 มิลลิเมตร ampicillin 21.33 มิลลิเมตร และ chloramphenical 21.33 มิลลิเมตร

ไม่มีราเอนโดไฟต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* และ *P. aeruginosa* (ตารางที่ 3 และ 4) ยามาตรฐานยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ค่า inhibition zone ดังนี้ gentamicin 25.3 มิลลิเมตร ampicillin ไม่ยับยั้ง และ ofloxaxin 32 มิลลิเมตร การทดสอบต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ยามาตรฐาน gentamicin, amikacin, ofloxaxin มีค่า 21.8, 20 และ 24 มิลลิเมตรตามลำดับ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 1 การทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* ต่อเชื้อรา isolated ต่างๆ ที่แยกได้จาก *C. maxima* ด้วยวิธี agar diffusion เฉลี่ยจาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน

isolated	Inhibition zone (mm)			
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Fast growth				
Cmax1	27	21.66	ND	ND
Cmax2	22.33	13.3	ND	ND
Cmax3	0	0	ND	ND
Cmax4	0	0	ND	ND
Cmax5	0	16.66	ND	ND
Cmax6	0	0	ND	ND
Cmax7	0	0	ND	ND
Cmax8	0	21.33	ND	ND
Cmax9	0	0	ND	ND
Cmax10	0	0	ND	ND
Cmax11	0	0	ND	ND
Slow growth				
Cmax14	0	0	11	0
Cmax15	0	13	32.5	32
Cmax16	0	0	0	0

ND = not determine

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 2 การทดสอบความไวของเชื้อ *B. subtilis* ต่อเชื้อรา isolated ต่างๆ ที่แยกได้จาก *C. maxima* ด้วยวิธี agar diffusion เฉลี่ยจาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน

isolated	Inhibition zone (mm)			
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Fast growth				
Cmax1	15.67	13.66	ND	ND
Cmax2	0	0	ND	ND
Cmax3	0	0	ND	ND
Cmax4	0	0	ND	ND
Cmax5	0	0	ND	ND
Cmax6	0	0	ND	ND
Cmax7	0	0	ND	ND
Cmax8	0	0	ND	ND
Cmax9	0	0	ND	ND
Cmax10	0	0	ND	ND
Cmax11	0	0	ND	ND
Slow growth				
Cmax14	0	0	0	0
Cmax15	0	0	0	0
Cmax16	0	0	0	0

ND = not determine

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 3 การทดสอบความไวของเชื้อ *E. coli* ต่อเชื้อรา isolated ต่างๆ ที่แยกได้จาก *C. maxima* ด้วยวิธี agar diffusion เฉลี่ยจาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน

isolated	Inhibition zone (mm)			
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Fast growth				
Cmax1	0	0	ND	ND
Cmax2	0	0	ND	ND
Cmax3	0	0	ND	ND
Cmax4	0	0	ND	ND
Cmax5	0	0	ND	ND
Cmax6	0	0	ND	ND
Cmax7	0	0	ND	ND
Cmax8	0	0	ND	ND
Cmax9	0	0	ND	ND
Cmax10	0	0	ND	ND
Cmax11	0	0	ND	ND
Slow growth				
Cmax14	0	0	-	-
Cmax15	0	0	-	-
Cmax16	0	0	-	-

ND = not determine

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4 การทดสอบความไวของเชื้อ *P. aeruginosa* ต่อเชื้อรา isolated ต่างๆ ที่แยกได้จาก *C. maxima* ด้วยวิธี agar diffusion เฉลี่ยจาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน

isolated	Inhibition zone (mm)			
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Fast growth				
Cmax1	0	0	ND	ND
Cmax2	0	0	ND	ND
Cmax3	0	0	ND	ND
Cmax4	0	0	ND	ND
Cmax5	0	0	ND	ND
Cmax6	0	0	ND	ND
Cmax7	0	0	ND	ND
Cmax8	0	0	ND	ND
Cmax9	0	0	ND	ND
Cmax10	0	0	ND	ND
Cmax11	0	0	ND	ND
Slow growth				
Cmax14	0	0	0	0
Cmax15	0	0	0	0
Cmax16	0	0	0	0

ND = not determine

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

จากนั้นทำการเลี้ยงราเอนโดไฟต์ จากต้นส้มโอที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในอาหารเหลว Glucose yeast broth และทำการสกัดสารโดยใช้ ethyl acetate หลังจากทำให้แห้งนำมาทดสอบหาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 พบว่า Cmax1, Cmax2, Cmax5, Cmax8, Cmax14 และ Cmax15 มีค่า MIC และ MBC ระหว่าง 250-1,000 µg/ml สารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดคือ Cmax2 และ Cmax8 มีค่า MIC เท่ากับ MBC คือ 250 µg/ml ในขณะที่ยามาตรฐาน ampicillin และ gentamicin สามารถยับยั้งเชื้อที่ MIC เท่ากับ MBC คือ $\leq$ 1.95 µg/ml (ตารางที่ 5)

ส่วนฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 พบว่า Cmax1, Cmax2, Cmax5, Cmax8, Cmax14 และ Cmax15 มีค่า MIC และ MBC ระหว่าง 31.25-250 µg/ml สารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดคือ Cmax2 มีค่า MIC เท่ากับ MBC คือ 31.25 µg/ml ในขณะที่ยามาตรฐาน ampicillin และ gentamicin สามารถยับยั้งเชื้อที่ MIC เท่ากับ MBC คือ $\leq$ 1.95 µg/ml (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ค่า MIC และ MBC ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 กับสารสกัด ethyl acetate จากราเอนโดไฟต์ isolated ต่างๆ ที่ได้จากต้นส้มโอ

สารทดสอบ	**MIC (µg/ml)**	**MBC (µg/ml)**
Ampicillin	$\leq$ 1.95	$\leq$ 1.95
Gentamicin	$\leq$ 1.95	$\leq$ 1.95
Cmax1	500	500
Cmax2	250	250
Cmax5	1,000	1,000
Cmax8	250	250
Cmax14	1,000	1,000
Cmax15	500	500

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 6 ค่า MIC และ MBC ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6633 กับสารสกัด ethyl acetate จากราเอนโดไฟต์ isolated ต่างๆ ที่ได้จากต้นส้มโอ

สารทดสอบ	**MIC (µg/ml)**	**MBC (µg/ml)**
Ampicillin	$\leq$ 1.95	$\leq$ 1.95
Gentamicin	$\leq$ 1.95	$\leq$ 1.95
Cmax1	62.50	62.50
Cmax2	31.25	31.25
Cmax5	250	250
Cmax8	125	125
Cmax14	250	250
Cmax15	250	250

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ราเอนโดไฟต์จากต้นราชพฤกษ์

ทำการเพาะเลี้ยง endophyte จากต้นและใบราชพฤกษ์ นำมาเพาะเลี้ยงใน sterile water agar plate 2-7 วัน หลังจากย้ายเชื้อส่วน hyphal tip ไปลง PDA สังเกตดูจากลักษณะของ colony ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามี endophyte 6 ชนิดแยกได้จากส่วนของลำต้น ส่วนใบไม่พบ endophyte ให้ชื่อ Cfis1, Cfis2, Cfis4, Cfis5, Cfis7 และ Cfis9 จะเห็นลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันโดยดู plate ทั้งด้านบนและด้านหลังโคโลนีที่เจริญในอาหารแข็ง (ภาคผนวก)

จากนั้นทำการเลี้ยงราเอนโดไฟต์จากต้น ราชพฤกษ์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในอาหารเหลว Glucose yeast broth และทำการสกัดสารโดยใช้ ethyl acetate หลังจากทำให้แห้งนำมาทดสอบหาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *S. aureus, B. subtilis, E. coli* และ *P. aeruginosa* พบว่า Cfis1 และ Cfis5 มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 500 µg/ml, ค่า MBC เท่ากับ 1,000 µg/ml, Cfis7 และ Cfis 9 มีค่า MIC และ MBC เท่ากัน คือ 1,000 µg/ml ampicillin มีค่า MIC เท่ากับ MBC คือ 1.95 µg/ml (ตารางที่ 7)

สารสกัด ethyl acetate ของราเอนโดไฟต์จากต้นราชพฤกษ์มี ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *B. subtilis* พบว่า Cfis5 และ Cfis7 มีค่า MIC เท่ากับ MBC คือ 250 µg/ml, Cfis1 และ Cfis 9 มีค่า MIC และ MBC เท่ากัน คือ 500 µg/ml Cfis2 มีค่า MIC เท่ากับ MBC เท่ากับ 1,000 µg/ml, ampicillin และ gentamicin มีค่า MIC เท่ากับ MBC คือ 125 และ 1.95 µg/ml ตามลำดับ การทดลองฤทธิ์ต้าน *E. coli* และ *P. aeruginsosa* โดยสารสกัด ethyl acetate ของราเอนโดไฟต์จากต้นราชพฤกษ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองชนิดคือ *E. coli* และ *P. aeruginosa* แต่ gentamicin มีฤทธิ์ต่อ *E. coli* และ *P. aeruginsosa* ที่ค่า MIC 1.95 µg/ml และค่า MBC 7.81 µg/ml (ตารางที่ 7)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 7 ค่า MIC และ MBC ของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ กับสารสกัด ethyl acetate จากราเอนโดไฟต์ isolated ต่างๆ ที่ได้จากต้นราชพฤกษ์

สารทดสอบ	***S. aureus***		***B. subtilis***		***E. coli***		***P. aeruginosa***	
	MIC (µg/ml)	**MBC (µg/ml)**	**MIC (µg/ml)**	**MBC (µg/ml)**	**MIC (µg/ml)**	**MBC (µg/ml)**	**MIC (µg/ml)**	**MBC (µg/ml)**
Ampicillin	1.95	1.95	125	125	NI	-	NI	-
Gentamicin	NI	-	1.95	1.95	1.95	7.81	1.95	7.81
Cfis1	500	1,000	500	500	NI	-	NI	-
Cfis2	NI	-	1,000	1,000	NI	-	NI	-
Cfis4	NI	-	NI	-	NI	-	NI	-
Cfis5	500	1,000	250	250	NI	-	NI	-
Cfis7	1,000	1,000	250	250	NI	-	NI	-
Cfis9	1,000	1,000	500	500	NI	-	NI	-

หมายเหตุ NI = no inhibition

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ฤทธิ์สารสกัดต้านมาลาเรีย

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด ethyl acetate ของราเอนโดไฟต์จากต้นส้มโอและต้นราชพฤกษ์ต่อเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* (K1, multidrug resistant strain) ในหลอดทดลอง พบว่า Cmax 3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.66 µg/ml (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 สารสกัดจาก endophytes ต้านมาลาเรีย *P. falciparum* (K1, multidrug resistant strain)

สารสกัดจากราเอนโดไฟต์	**Activity**	**IC_{50} (µg/ml)**
Cmax1	Inactive	-
Cmax2	Inactive	-
Cmax3	Active	3.66
Cmax4	Inactive	-
Cmax5	Inactive	-
Cmax6	Inactive	-
Cmax7	Inactive	-
Cmax8	Inactive	-
Cmax11	Inactive	-
Cmax14	Inactive	-
Cmax15	Inactive	-
Cmax16	Inactive	-
Cfis1	Inactive	-
Cfis2	Inactive	-
Cfis4	Inactive	-
Cfis5	Inactive	-
Cfis7	Inactive	-
Cfis9	Inactive	-

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 5
สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ

รา endophyte จากต้นส้มโอแยกได้ 14 isolates ชื่อ Cmax1-11 และ Cmax14-16 โดยสามารถแยกได้จากการดูลักษณะของโคโลนีโดยการสังเกตด้วยตาเปล่าได้อย่างชัดเจน เหมือนกับการศึกษา endophytic fungi จากสมุนไพรไทย 81 ชนิด (Wiyakrutta et al., 2004) เมื่อนำราเอนโดไฟต์จากต้นส้มโอ มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อแบคทีเรีย ด้วยวิธี agar diffusion เพื่อทำการคัดกรอง isolate ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ 6 isolates ได้แก่ Cmax1, Cmax2, Cmax5, Cmax8, Cmax14 และ Cmax15 มีค่า inhibition zone ระหว่าง 13-32.5 มิลลิเมตร โดยอายุราเอนโดไฟต์ 7 หรือ 14 วันในรา endophyte ที่โตเร็ว (Cmax1, Cmax2, Cmax5 และ Cmax8) ส่วนรา endophyte ที่โตช้าคือ Cmax14 จากราอายุ 21 วัน ส่วน Cmax15 สามารถ ยับยั้งเชื้อได้ใน ราอายุ 14, 21 และ 28 วัน และราเอนโดไฟต์สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ได้ 1 isolate คือ Cmax1 ที่มีอายุ 7 และ 14 วัน มีค่า inhibition zone 15.67 และ 13.66 มิลลิเมตรตามลำดับ อาจเป็นเพราะสารที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากเอนโดไฟต์แต่ละ isolate ผลิตออกมาในช่วงเวลาต่างๆ กัน และวิธีการศึกษาใช้วิ ธี agar diffusion โดยการเลี้ยง endophate ให้เจริญแล้วจึงตัดมาวางในแบคทีเรียทดสอบ สารที่มีความสามารถในการซึมผ่านวุ้นได้ดีจะสามารถแสดงผลการยับยั้งได้ แต่ยังมีสารบางชนิดที่ไม่ซึมผ่านวุ้นไม่ดีนัก อาจทำให้เห็นผลการยั้งยั้งเชื้อไม่ชัดเจน จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นส้มโอใ ห้ผลค่อนข้างดีเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Hazalin และคณะ โดยทำการทดลอง endophyte 24 isolates จากต้นไม้ 43 ชนิด พบว่ามีฤทธิ์ต่อ *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa* และ *B. subtilis* โดยมี inhibition zone 7-8 มิลลิเมตร (Hazalin et al., 2009) ดังนั้นผลของสารที่พบในวุ้นอาหารจาก endophyte จากต้นส้มโอมีผลที่ดีกว่า เนื่องจาก มี inhibition zone ที่กว้างกว่า ในขณะที่สาร phomopsichalasin จาก endophytic *Phomopis* sp. มีฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* โดยวิธี disk diffusion assay (4 μg/disk) inhibition zone เท่ากับ 11 มิลลิเมตร (Horn et al., 1995) ส่วนรา endophyte จาก *Garcinia* sp. พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มี inhibition zone ระหว่าง 7-19 มิลลิเมตรและไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ (Phongpaichit et al., 2006) เช่นเดียวกับ endophyte จากส้มโอ

ดังนั้นจึงนำรา เอนโดไฟต์ จากต้นส้มโอ ทั้ง 6 ชนิดมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อนำมาสกัดสารต้านแบคทีเรียโดยใช้ ethyl acetate พบว่า สารสกัด Cmax2 และ Cmax5 เมื่อทดสอบกับ เชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 62.5 μg/ml และ สารสกัด Cmax2 เมื่อทดสอบกับ เชื้อ *B. subtilis* มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 7.81 μg/ml สารสกัด ethyl acetate ราเอนโดไฟต์จากต้นส้มโอ 2 ชนิด คือ Cmax2 สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *B. subtilis*, Cmax 5 สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้เพียงชนิดเดียว โดยเทียบกับสารสกัดจาก

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

endophyte *Ampelomyces* sp. จากต้น *Urospermum picroides* มีค่า MIC ต่อ *S. aureus* 12.5 μg/ml (Aly et al., 2008) endophytic *Xylaria* sp. จาก *Ginkgo biloba* L. มีค่า MIC ต่อ *S. aureus* 16 μg/ml (Liu et al., 2008) สาร colletotric acid จาก endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* จากลำต้น *Artemisia mongolica* สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* และ *S. aureus* ค่า MIC เท่ากับ 25 และ 50 μg/ml ตามลำดับ (Zou et al., 2000) phomodione เป็น usnic acid derivative ได้จาก culture broth ของ *Phoma* sp. จากต้น *Saurauia scaberrinae* ต้าน *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 1.6 μg/ml (Hoffman et al., 2008) สาร beauvericin จาก endophyte *Fusarium redolens* Dzf2 จาก rhizomes ของต้นไม้สมุนไพรจีน *Dioscorea zingiberensis* ต้านแบคทีเรียหลายชนิด มีค่า IC_{50} ต่อ *B. subtilis, Staphylococcus haemolyticus, Pseudomonas lachrymans, Agrobacterium tumefaciens, E. coli* และ *Xanthomonas vesicatoria* ระหว่าง 18.4-70.7 μg/ml (Xu et al., 2010)

รา endophyte จากต้นราชพฤกษ์แยกได้ 6 isolates ชื่อ Cfis1, Cfis2, Cfis4, Cfis5, Cfis7 และ Cfis9 เนื่องจาก endophyte จากต้นราชพฤกษ์มีจำนวนน้อยจึงไม่จำเป็นต้องคัดกรอง isolate ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวและนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปสกัดด้วย ethyl acetate พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้ง bacteria ที่นำมาทดสอบ คือ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ สารสกัด Cfis5 และ Cfis7 เมื่อทดสอบกับ เชื้อ *B. subtilis* มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 250 μg/ml และ สารสกัด Cfis1 และ Cfis5 เมื่อทดสอบกับ เชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 500 μg/ml และ MBC เท่ากับ 1,000 μg/ml

จากจำนวนของรา endophyte ที่พบในต้นส้มโอ มีมากชนิดกว่าต้นราชพฤกษ์ เมื่อเทียบกับต้นไม้อื่นๆ เช่น ต้นไม้ในอุทยานแห่งชาติปะหัง ประเทศมาเลเซีย ศึกษา ต้นไม้ 43 ชนิด พบ endophyte รวม 300 isolates โดยพบรา endophyte ต้นละ 1-14 isolates (Hazalin et al., 2009) โดยพบที่ใบ 146 isolates ลำต้น 77 isolates ราก 49 isolates ดอก 11 isolates สำหรับส้มโอและราชพฤกษ์พบ ราเอนโดไฟต์จาก ส่วนลำต้น ไม่พบจากใบ สำหรับในประเทศไทย ได้มีการศึกษาพืช 81 ชนิด โดยเก็บส่วนใบและลำต้น พบรา endophyte 582 isolates พบ endophyte 1-12 isolates ต่อพืช 1 ชนิด (Wiyakrutta et al., 2004)

สารสกัด ethyl acetate จากรา endophyte จากต้นส้มโอและราชพฤกษ์ทั้งหมด 18 ชนิด พบว่ามีเพียงชนิดเดียวที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. falciparum* ได้คือ Cmax3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.66 μg/ml เมื่อเทียบกับสารสกัดรา endophyte จากต้นไม้ต่างๆ เช่น สารสกัดรา endophyte จากต้นมังคุด 41 isolates พบว่ามีเพียงชนิดเดียวที่มี ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. falciparum* ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.53 μg/ml (Nanthawarasilp et al., 2007) ได้มีการศึกษา endophytic fungi จาก *Garcinia* sp. หลายชนิด เช่น *G. atroviridis, G. dulcis, G. mangostana, G. nigrolineata, G. scortechinii* พบว่าสารสกัดจาก *Garcinia*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. falciparum* strain K1 ได้โดยมีค่า IC_{50} ระหว่าง 1.94-7.87 µg/ml (Phongpaichit et al., 2007) ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับ Cmax3 จาก *C. maxima*

endophyte *Streptomyces* NRRL 30562 จาก *Kennedia nigriscans* ชื่อสามัญ snakevine จากตอนเหนือของออสเตรเลีย ใช้รักษาแผลสดป้องกันการอักเสบโดยชนเผ่า Aborigin มานาน จากสาร สกัดของน้ำเลี้ยง endophyte พบว่ามีสาร actinomycins X2, D, และ Xoβ ซึ่งเป็น wide-spectrum antibiotic activity และสาร munumbicins E-4 and E-5 มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย *P. falciparum* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.50±0.08 และ 0.87±0.026 µg/ml ตามลำดับ (Castillo et al., 2006) ในขณะที่ munumbicin D มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.5±0.07 ng/ml (Castillo et al., 2002) endophytic streptomycete (NRRL 30566) จากใบ *Grevillea pteridifolia* ทางตอนเหนือของออสเตรเลีย พบ kakadumycins หลายชนิด เช่น kakadumycin A และ echinomycin ต้าน *P. falciparum* ที่ค่า LD_{50}s 7-10 ng/ml (Castillo et al., 2003; Strobel and Daisy 2003) โดยสารเหล่านี้เป็นสารที่มีความบริสุทธิ์ดังนั้น ฤทธิ์การ ต้านมาลาเรียจึง มี IC_{50} ในระดับ ng/ml แต่ Cmax3 เป็นสารสกัด crude extract จึงมีค่า IC_{50} ในระดับ µg/ml ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่สารสกัด ethyl acetate จากต้นส้มโอจะมีโอกาสพัฒนาเป็นสารต้านมาลาเรีย และสารต้านจุลชีพอื่นๆ จึงควรที่จะเพาะเลี้ยง Cmax3 เพื่อให้ได้สาร ในปริมาณมากเพื่อทำให้สารบริสุทธิ์ขึ้น และศึกษาถึงโครงสร้างของสารต้านมาลาเรียต่อไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, ส. ก. 2546. **พืชสวนพันธ์ดีในรอบ 30 ปี.** สถาบันวิจัยพืชสวน: กรมวิชาการเกษตร

บุญชัย ฉัตตะวานิช. 2540. **ยาสมุนไพรจีน 100 ชนิด คุณสมบัติและการรักษา.** กทม: อักษรวัฒนา.

ปรียานุช กฤษณะประสิทธิ์ และ พรทิพย์ จึงถาวรรณ. 2552. **ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดจากส้มต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่ทำให้เกิดโรค.** กทม: มหาวิทยาลัยมหิดล.

พิชาน. 2547. **สมุนไพรไม้มงคล 8 ทิศ พรรณไม้ในพุทธประวัติ.** กรุงเทพมหานคร: เครือเถา. เมดิคัล มีเดีย จก.

พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ. 2537. **สมุนไพรก้าวใหม่ แก้ไขปรับปรุงใหม่จากตำราวิทยาศาตร์สมุนไพร.** กทม:

พรรณนิภา ชุมศรี . 2542**.** **สวนนานาพฤกษสมุนไพร** กรุงเทพมหานคร: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พร้อมจิต ศรลัมพ์. 2543. **สารานุกรมสมุนไพร เล่ม 1 สมุนไพรสวนสิริรุกขชาติ.** กทม: บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน).

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. **ร่วมรักษ์มรดกไทย สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย.** กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2542. **พจนานุกรมไม้ดอกไม้ประดับในเมืองไทย.** กทม: บริษัท รวมสาส์น (1977) จำกัด.

สุทัศน์ จูงพงศ์. 2546. **สมุนไพรพันธุ์ไม้มงคล พระราชทานประจำจังหวัด.** กทม: บ. พิฆเนศ พริ้นท์ติ้ง จำกัด.

หมอสมุนไพรพื้นบ้าน. 2545. **300 สมุนไพรที่คนไทยควรรู้จัก เล่ม 5.** กทม: โปร-เอสเอ็มอี.

Afek, U., et al. 6,7-dimethoxycouramin, a *Citrus* phytoalexin conferring resistance against *Phytophthora gummosis*. **Phytochemistry** 1986, **25:** 1855-1856.

Ali, N. H., et al. Activity of synergistic combination Amoxy-cassia against *Salmonella*. **Pak J Pharm Sci** 2007, 20 (2): 140-5.

Aly, A. H., et al. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry** 2008, 69 (8): 1716-25.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Anwikar, S. and Bhitre, M. Study of the synergistic anti-inflammatory activity of *Solanum xanthocarpum* Schrad and Wendl and *Cassia fistula* Linn. **Int J Ayurveda Res 1**(3), 2010: 167-71.

Asseleih, L. M. C., et al. Seasonal variation in the content of Sennosides in leaves and pods of two *Cassia fistula* populations. **Phytochemistry** 1990, 29: 3095-3099.

Bhat, G. P. and Surolia, N. In vitro antimalarial activity of extracts of three plants used in the traditional medicine of India. **Am J Trop Med Hyg** 2001, 65(4): 304-8.

Bussmann, R. W., et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **J Ethnopharmacol** 2010, 132 (1): 101-8.

Castillo, U., et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiol Lett** 2003, 24 (2): 183-90.

Castillo, U. F., et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology** 2002, 148 (Pt 9): 2675-85.

Castillo, U. F., et al. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL 3052. **FEMS Microbiol Lett** 2006, 255 (2): 296-300.

Dabbah, R., et al. Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. **Appl Microbiol** 1970, 19 (1): 27-31.

Desjardins, R. E., et al. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrob Agents Chemother** 1979, 16 (6): 710-8.

Duraipandiyan, V. and Ignacimuthu, S. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: an ethnomedicinal plant. **J Ethnopharmacol** 2007, 112 (3): 590-4.

Espinal, M. A., et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. **N Engl J Med** 2001, 344 (17): 1294-303.

Govindarajan, M. "Bioefficacy of *Cassia fistula* Linn. (Leguminosae) leaf extract against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 2009, 13 (2): 99-103.

Govindarajan, M., et al. Larvicidal and ovicidal activity of *Cassia fistula* Linn. leaf extract against filarial and malarial vector mosquitoes. **Parasitol Res** 2008, 102 (2): 289-92.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Hazalin, N. A., et al. "Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. **BMC Complement Altern Med** 2009, 9: 46.

Hoffman, A. M., et al. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. **Phytochemistry** 2008, 69 (4): 1049-56.

Horn, W. S., et al. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. **Tetrahedron** 1995, 14: 3969-3978.

Irshad, M., et al. Anticandidal activity of *Cassia fistula* and its effect on ergosterol biosynthesis. **Pharm Biol** 2011, 49 (7): 727-33.

Johann, S., et al. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2007, 102 (6): 681-5.

Kasuko, I. and Nagayo, O. Effects of vegetable drugs on pathogenic fungi I. Effect of anthraquinone-glycoside containing crude drugs upon the growth of pathogenic fungi. **Bulletin of Pharmaceutical Research Institute, Japan** 1951, 2: 23-29.

Kirbaslar, F. G., et al. Antimicrobial avtivity of Turkish *Citrus* peel oils. **Pak. J. Bot.** 2009, 41: 3207-3212.

Kirtikar, K. R. and Basu, B. D. 1975. **Indian Medicinal Plants**. New Delhi: Jayyed Press.

Kumar, A., et al. Chemical examination of *Cassia fistula* flowers. **Indian Journal of Chemistry** 1966, 4: 460.

Liu, X., et al. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp.YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin." **Appl Microbiol Biotechnol** 2008, 78 (2): 241-7.

Miller, L. H., et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature** 2002, 415 (6872): 673-9.

Nanthawarasilp, S. P., et al. 2007. Effect of culture broth of endophytic fungi from Thai medicinal plant on growth of *Plasmodium falciparum*, Burapha University.

Narayanan, V. and Seshadri, T. R. Proanthocyanidins of *Cassia fistula*. **Indian Journal of Chemistry** 1972, 10: 379-381.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2004). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement NCCLS documents M100-S14. NCCLS, Wayne, PA.

Padmanabha Rao, T. V. and Venkateswarlu, V. Fistucacidin from the bark and heartwood of *Cassia fistula* Linn. **Bulletin of National Institute of Sciences of India** 1965, 31: 28-33.

Patel, D. G., et al. Antipyretic and analgesic activities of *Aconitum spicatum* and *Cassia fistula*. **Arch Int Pharmacodyn Ther** 1965, 157 (1): 22-7.

Perry, L. M. 1980. **Medicinal plants of East and South East Asia.** Cambridge: MIT Press.

Perumal Samy, R., et al. Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. **J Ethnopharmacol** 1998**,** 62 (2): 173-82.

Petrini, O., et al. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Nat Toxins** 1992, 1 (3): 185-96.

Phongpaichit, S., et al. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2006, 48 (3): 367-72.

Phongpaichit, S., et al. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2007, 51 (3): 517-25.

Pillay, D. and Zambon, M. Antiviral drug resistance**. Bmj** 1998, 317 (7159): 660-2.

Prashanth Kumar, V., et al. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** 2006**,** 107: 182-188.

Rajan, S., et al. Stem and stem bark used medicinally by the Tribals Irulas and Paniyas of Nilgiri District, Tamilnadu. **Ethnobotany** 2001, 6: 19-24.

Sah, A. N., et al. Antimicrobial activity of six different parts of the plant *Citrus medica* Linn. **Pharmacognosy Journal** 2011**,** 3: 80-83.

Saikkonen, K., et al. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecological System** 1998, 29: 319-343.

Sartorelli, P., et al. Isolation of antileishmanial sterol from the fruits of *Cassia fistula* using bioguided fractionation. **Phytother Res** 2007, 21 (7): 644-7.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Sartorelli, P., et al. Antiparasitic activity of biochanin A, an isolated isoflavone from fruits of Cassia fistula (Leguminosae). **Parasitol Res** 2009**,** 104 (2): 311-4.

Satyavati, G. V. and Sharma, M. 1989. **Medicinal Plant in India**. New Delhi: ICMR.

Strobel, G. and Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol Mol Biol Rev** 2003, 67 (4): 491-502.

Tan, R. X. and Zou, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Nat Prod Rep** 2001, 18 (4): 448-59.

Trager, W. and Jensen, J. Human malaria parasites in continuous culture. **Science** 1976**,** 193 (4254): 673-5.

Wiyakrutta, S., et al. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 2004, 20: 265-272.

Xu, L., et al. Beauvericin from the endophytic fungus, *Fusarium redolens*, isolated from *Dioscorea zingiberensis* and its antibacterial activity. **Nat Prod Commun** 2010, 5 (5): 811-4.

Zirihi, G. N., et al. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria. **J Ethnopharmacol** 2005**,** 98 (3): 281-5.

Zou, W. X., et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **J Nat Prod** 2000, 63 (11): 1529-30.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Blood agar

TSA	32 g
DW	800 ml
Agar	4 g

ผสมอาหารเข้าด้วยกัน นำเข้า autoclave 121 ^{O}C 15 นาที ทิ้งไว้จนอุณหภูมิประมาณ 40 ^{O}C เติมเลือด 3-4% ผสมให้เข้ากันแล้วเท plate

Mueller Hinton agar

Muller Hinton	37 g
DW	1,000 ml

ผสมอาหารเข้าด้วยกัน ปรับ pH 7.4 นำเข้า autoclave 121 ^{O}C 15 นาที เท plate 25 ml/plate

Tryptic soy broth

Tryptic soy powder	39 g
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ผสมอาหารเข้าด้วยกัน นำเข้า autoclave 121 ^{O}C 15 นาที

Sterile water agar

Agar	1.5%

เติมน้ำกลั่นและ นำเข้า autoclave 121 ^{O}C 15 นาที

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Half strength PDA

PDA	15 g
Agar	0.75%
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ผสมอาหารเข้าด้วยกัน นำเข้า autoclave 121 ^{O}C 15 นาที

Potato dextrose agar (PDA)

PDA	30 g
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ผสมอาหารเข้าด้วยกัน นำเข้า autoclave 121 ^{O}C 15 นาที

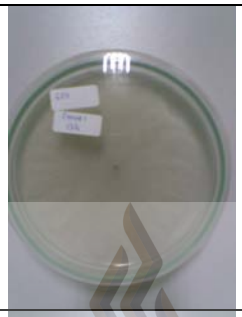
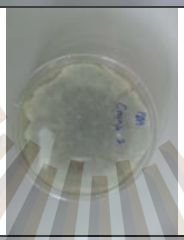
Glucose yeast media

Glucose	2.0%
Yeast extract	0.2%
$MgSO_4.7H_2O$	0.05%
Polypepton	0.5%
KH_2PO_4	0.1%
Agar	1.5-2%

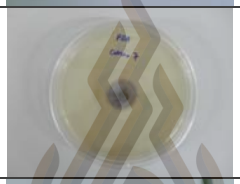
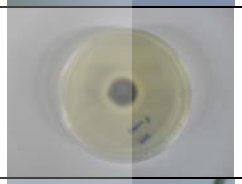
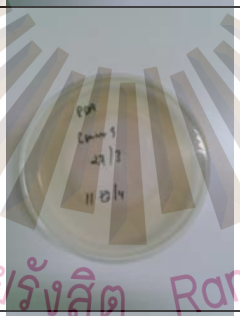
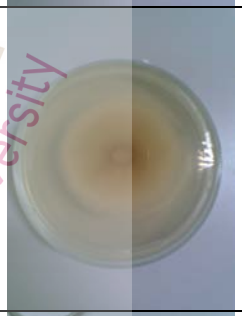
ผสมอาหารเข้าด้วยกัน ปรับ pH 6.0 นำเข้า autoclave 121 ^{O}C 15 นาที เท plate 25 ml/plate ถ้าเป็นอาหารเหลว (glucose yeast broth) ไม่ต้องเติม agar

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

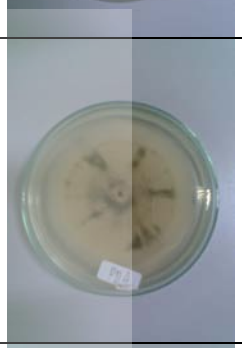
ตารางแสดงลักษณะโคโลนีของรา endophyte ที่แยกได้จากต้นส้มโอ isolate ต่างๆ

Endophyte	ภาพจาก plate ด้านหน้า	ภาพจาก plate ด้านหลัง
Cmax1		
Cmax2		
Cmax3		
Cmax4		
Cmax5		

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

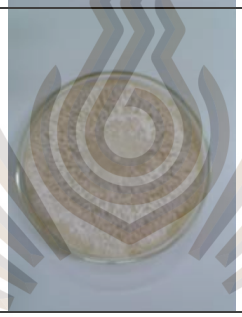
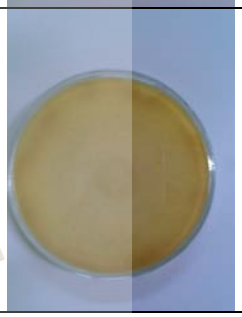
Endophyte	ภาพจาก plate ด้านหน้า	ภาพจาก plate ด้านหลัง
Cmax6		
Cmax7		
Cmax8		
Cmax9		
Cmax10		

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

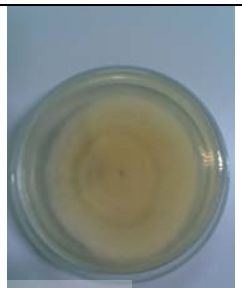
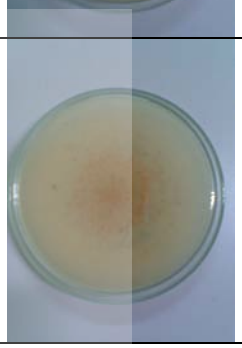
Endophyte	ภาพจาก plate ด้านหน้า	ภาพจาก plate ด้านหลัง
Cmax11		
Cmax14		
Cmax15		
Cmax16		

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางแสดงลักษณะโคโลนีของรา endophyte ที่แยกได้จากต้นราชพฤกษ์ isolate ต่างๆ

Endophyte	ภาพจาก plate ด้านหน้า	ภาพจาก plate ด้านหลัง
Cfis 1		
Cfis 2		
Cfis 4	No picture	No picture
Cfis 5		

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Endophyte	ภาพจาก plate ด้านหน้า	ภาพจาก plate ด้านหลัง
Cfis 7		
Cfis 9		

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประวัติผู้วิจัย

คำนำหน้า	☐ นาย ☐ นาง ☐ นางสาว
ตำแหน่งทางวิชาการ	☐ ศ. ☐ รศ. ☐ ผศ. ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ) _____
ชื่อผู้วิจัย	พัตรา
นามสกุลผู้วิจัย	สุนทรฐิติเจริญ
ชื่อภาษาอังกฤษ	Pattra
นามสกุลภาษาอังกฤษ	Suntornthiticharoen
วัน/เดือน/ปี เกิด	20 มกราคม 2512
ที่อยู่ (บ้าน)	9 ซ. สุขสวัสดิ์1 แยก 10 แขวงบางปะกอก เขตราษฎร์บูรณะ
จังหวัด (บ้าน)	กรุงเทพมหานคร
รหัสไปรษณีย์ (บ้าน)	10140
โทรศัพท์ (บ้าน)	0817503326
ที่อยู่ (ที่ทำงาน)	หมวดวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน หลักหก อ. เมือง
จังหวัด (ที่ทำงาน)	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์ (ที่ทำงาน)	12000
โทรศัพท์ (ที่ทำงาน)	029972222 ต่อ 1472
E-Mail Address :	lexpatra@hotmail.com

ปริญญาตรี

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ (ชีววิทยา)
ปีที่จบ	2533
สถาบัน	มหาวิทยาลัยมหิดล
ประเทศ	ไทย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ปริญญาโท

สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีที่จบ	2537
สถาบัน	มหาวิทยาลัยมหิดล
ประเทศ	ไทย

ปริญญาเอก

สาขาวิชา	อายุรศาสตร์เขตร้อน
ปีที่จบ	2548
สถาบัน	มหาวิทยาลัยมหิดล
ประเทศ	ไทย

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

1. เอนไซม์จากเชื้อมาลาเรีย
2. การทดสอบสารต้านมาลาเรียในหลอดทดลอง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University