



ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเห็ด *Flavodon flavus* (Klotzsch) Ryvar den



โดย
นางสาวศศิณา สุทัศน์กนก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเห็ด *Flavodon flavus* (Klotzsch) Ryvarden



โดย
นางสาวศศิณา สุทัศน์กนก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

BIOACTIVITY OF EXTRACTS FORM *FLAVODON FLAVUS* (KLOTZSCH)

RYVARDEN



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (MICROBIOLOGY)

Department of MICROBIOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2022

Copyright of Silpakorn University

620720046 : จุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : ฤทธิ์ทางชีวภาพ, *Flavodon flavus*, ด้านการเจริญแบคทีเรีย, ด้านการเจริญเชื้อรา, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ด้านเบาหวาน, ความเป็นพิษต่อเซลล์, ความเป็นพิษต่อไรทะเล, ด้านอนุมูลอิสระ, การวิเคราะห์ GC-MS

นางสาว ศศิณา สุทัศนกก: ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเห็ด *Flavodon flavus* (Klotzsch) Ryvardeen อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 28s rDNA ของเห็ดสายพันธุ์ EB2101 ที่เก็บได้จากจังหวัดนครปฐม สามารถระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ดได้เป็น *Flavodon flavus* (Klotzsch) Ryvardeen เมื่อทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ นำเส้นใยมาเลี้ยงในอาหาร MCM และทำการเพาะเห็ด แล้วจึงนำเส้นใยและดอกเห็ดมาสกัดลำดับส่วนโดยใช้เอทิลอะซิเตท เมทานอล และน้ำเป็นตัวทำละลาย ได้สารสกัดร้อยละ 1.79-28.73 เมื่อวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดพบว่า มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดระหว่าง 0.59-12.37 mg glucose/mg of extract มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่าง 0.03-2.15 mg glucose/mg of extract และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.04-0.09 mg GAE/mg of extract เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดทั้ง 6 ตัวอย่าง ต่อการต้านการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา ด้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ด้านการอักเสบ และความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงและไรทะเล พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ด และสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* และ *Bacillus subtilis* โดยมีค่า MIC ระหว่าง 3.125-12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดทุกชนิดไม่มีฤทธิ์การต้านการเจริญต่อเชื้อราทดสอบ สารสกัดจากเห็ดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่า มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระระหว่าง 37.71-87.60, 5.13-33.47 และ 7.04-9.60 ตามลำดับ สารสกัดจากเห็ดไม่มีฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส สารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดมีฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 36.75 และ 84.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ด และสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคฟาจ Raw 264.7 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 103.60, 48.83, 746.51 และ 166.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ด และสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด มีความเป็นพิษต่อไรทะเล โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 178.95, 107.06, 1260.2 และ 307.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดด้วยวิธี GC-MS พบสารประกอบ 55 ชนิด และพบว่าสารบางชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย ด้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบและด้านการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยง

620720046 : Major (MICROBIOLOGY)

Keyword : Bioactivity, *Flavodon flavus*, Antibacterial activity, Antioxidant activity, Antifungal activity, Anti-inflammatory, Anti-diabetic activity, Cytotoxicity, Brine shrimp cytotoxicity bioassay, GC-MS

MISS SASINA SUTATKANOK : BIOACTIVITY OF EXTRACTS FORM *FLAVODON FLAVUS* (KLOTZSCH) RYVARDEN THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR EAKAPHUN BANGYEEKHUN, Ph.D.

A specimen of mushroom, named as EB2101, was collected from Nakhon-Pathom. Based on morphological characteristics and 28s rDNA nucleic acid sequence comparison, it was identified as *Flavodon flavus* (Klotzsch) Ryvarden. The mycelium was purely isolated and used for mycelial biomass production and mushroom cultivation. The mycelia and the mushrooms were then fractionally extracted using ethyl acetate, methanol and water as solvents. The extractions yielded 1.79-28.73% of crude extracts. The total carbohydrate content, the reducing sugar content and the total phenolic content were analyzed from crude extracts and revealed 0.59-12.37 mg glucose/mg of extract, 0.03-2.15 mg glucose/mg of extract and 0.04-0.09 mg GAE/mg of extract, respectively. The bioactivities of crude extracts were studied. The ethyl acetate and methanol extract of mycelium and fruiting body exhibited antibacterial activity against Gram-positive bacteria, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*, with MIC value of 3.125-12.5 mg/ml. There was no antifungal activity from all extracts. The antioxidant activities of the extracts by using DPPH, ABTS and FRAP methods were found to be 37.71-87.60, 5.13- 33.47 and 7.04-9.60 percent of free radical inhibition, respectively. The crude extracts showed no inhibition of an alpha-amylase activity. The methanol extracts of mycelium and fruiting body could inhibit nitric oxide production with IC₅₀ values of 36.75 and 84.01 µg/ml, respectively. The cytotoxicity of the ethyl acetate and methanol extracts of mycelium and fruiting body were indicated by IC₅₀ values of 103.60, 48.83, 746.51 and 166.02 µg/ml, respectively. The brine shrimp lethality was assayed and revealed that the ethyl acetate and methanol extracts of mycelium and fruiting body were toxic to the brine shrimp with IC₅₀ values of 178.95, 107.06, 1260.2 and 307.53 µg/ml, respectively. The chemical composition analysis of methanolic extracts of mycelium and fruiting body by GC-MS method revealed there were 55 compounds and a number of those were literacy reported for antibacterial activity, antioxidant activity, anti-inflammation and antiproliferative effect on tested cells.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีได้โดยขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.เอกพันธ์ บางยี่ขัน ที่ให้ความช่วยเหลือคอยชี้แนะและให้คำปรึกษาในการทำวิจัยอย่างละเอียดตลอดการทำงาน

ขอขอบคุณอาจารย์กรรมการ ผศ.ดร.อุรารักษ์ รมรินทร์ ที่คอยชี้แนะและให้คำปรึกษาในการทำวิจัย ขอขอบคุณอาจารย์กรรมการ รศ.ดร.ธงชัย เตโชวิชิต และ ผศ.ดร.กมลชัย ชะเอม ที่คอยชี้แนะการทำงานวิจัยและให้ความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับงานวิจัย

ขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ นางสาวกรพรรณ เสวตสุวรรณกุล ที่คอยช่วยเหลืออุปกรณ์และคำแนะนำในการทำวิจัย ขอขอบคุณบุคลากรในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณเพื่อนปริญญาโททุกคนที่คอยช่วยเหลือในการทำวิจัยจนจบ

และสุดท้ายขอขอบคุณครอบครัวที่คอยช่วยสนับสนุนในการศึกษาครั้งนี้และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

นางสาว ศศินา สุทัศน์กนก



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
Polypore.....	3
การสกัดสารสกัดหยาบ.....	7
การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid.....	8
การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS).....	9
การวัดปริมาณ phenolic ทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay.....	9
อนุมูลอิสระ (Free radical) และสารต้านอนุมูลอิสระ.....	9
การทดสอบฤทธิ์การต้านเจริญของเชื้อจุลินทรีย์.....	13
การต้านการอักเสบ.....	15
การต้านเบาหวาน.....	16
Cytotoxicity.....	17
Brine shrimp lethality assay.....	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	19

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....	19
2. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ด.....	20
3. การศึกษาลำดับกรดนิวคลีอิกของ ITS และ 28s rDNA และการเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วน 28s rDNA และ ITS กับฐานข้อมูล.....	20
4. การเพาะเลี้ยงเส้นใย.....	21
5. การเพาะเลี้ยงดอกเห็ด.....	21
6. การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้วย Soxhlet extractor.....	22
7. การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรต.....	22
8. การวัดปริมาณ Reducing sugar.....	23
9. การวัดปริมาณ phenolic.....	23
10. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดหยาบและการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อ (MBC).....	23
11. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC) ของสารสกัดหยาบ และ การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อ (MFC).....	25
12. การทดสอบการต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging.....	26
13. การทดสอบการต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay.....	26
14. การทดสอบการต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชัน FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power assay).....	27
15. การทดสอบการต้านเบาหวาน.....	27
16. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ.....	28
17. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	28
18. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อไรทะเล (brine shrimp cytotoxicity bioassay).....	29
19. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC-MS (Gas chromatography-mass spectroscopy).....	30
20. การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	30

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	31
1. การระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ด.....	31
2. สารสกัดหยาบจากเห็ด <i>Flavodon flavus</i>	34
3. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากเห็ด <i>Flavodon flavus</i>	35
4. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดหยาบจากเห็ด <i>Flavodon flavus</i>	35
5. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากเห็ด <i>Flavodon flavus</i>	36
6. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC).....	36
7. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (Minimal fungicidal concentration: MFC)	39
8.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเห็ด <i>Flavodon flavus</i>	40
9. ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดหยาบจากเห็ด <i>Flavodon flavus</i>	41
10. ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบจากเห็ด <i>Flavodon flavus</i>	41
11. ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากเห็ด <i>Flavodon flavus</i>	42
12. ความเป็นพิษต่อไรทะเลของสารสกัดหยาบจากเห็ด <i>Flavodon flavus</i>	43
13. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC-MS (Gas chromatography-mass spectroscopy)	45
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....	53
บทที่ 6 บทสรุป.....	55
รายการอ้างอิง.....	57
ภาคผนวก ก.....	66
ภาคผนวก ข.....	69
ภาคผนวก ค.....	74

ภาคผนวก ง	76
ภาคผนวก จ	77
ภาคผนวก ช	80
ภาคผนวก ซ	83
ภาคผนวก ด	86
ภาคผนวก ต	110
ภาคผนวก ถ	128
ภาคผนวก ท	130
ภาคผนวก น	132
ภาคผนวก บ	134
ภาคผนวก ป	141
ภาคผนวก ผ	143
ภาคผนวก ฝ	145
ประวัติผู้เขียน	149



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สารสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดกลุ่ม polypore.....	5
ตารางที่ 2 ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัด.....	35
ตารางที่ 3 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณฟีนอลิก	36
ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดเห็ด.....	37
ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดเห็ด.....	38
ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดเห็ด.....	39
ตารางที่ 7 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัด.....	41
ตารางที่ 8 องค์ประกอบเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดที่วิเคราะห์ด้วย GC-MS แบบไม่ split.....	47
ตารางที่ 9 องค์ประกอบเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดที่วิเคราะห์ด้วย GC-MS แบบ split 1:10.....	51
ตารางที่ 10 ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัด.....	76
ตารางที่ 11 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของกลูโคสใน DMSO ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid ...	77
ตารางที่ 12 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของกลูโคสในน้ำด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid	78
ตารางที่ 13 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของสารสกัดด้วยวิธี Phenol-sulfuric Acid.....	79
ตารางที่ 14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของกลูโคสใน DMSO ด้วยวิธี DNS.....	80
ตารางที่ 15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของกลูโคสในน้ำด้วยวิธี DNS.....	81
ตารางที่ 16 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS).....	82
ตารางที่ 17 ปริมาณฟีนอลิกของกรดแกลลิกใน DMSO ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method.....	83

ตารางที่ 18 ปริมาณฟีนอลิกของกรดแกลลิกในน้ำด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method.....	84
ตารางที่ 19 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay.....	85
ตารางที่ 20 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>B. cereus</i> (Minimal bactericidal concentration: MBC).....	88
ตารางที่ 21 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>B. subtilis</i> (Minimal bactericidal concentration: MBC).....	91
ตารางที่ 22 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>S. aureus</i> (Minimal bactericidal concentration: MBC).....	94
ตารางที่ 23 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (Minimal bactericidal concentration).....	97
ตารางที่ 24 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>E. coli</i> (Minimal bactericidal concentration: MBC).....	100
ตารางที่ 25 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> (Minimal bactericidal concentration).....	103
ตารางที่ 26 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>P. fluorescens</i> (Minimal bactericidal concentration).....	106
ตารางที่ 27 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>S. typhimurium</i> (Minimal bactericidal concentration).....	109
ตารางที่ 28 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>A. fumigatus</i> (Minimal fungicidal concentration: MFC).....	112
ตารางที่ 29 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>A. niger</i> (Minimal fungicidal concentration: MFC).....	115
ตารางที่ 30 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>C.albicans</i> (Minimal fungicidal concentration: MFC).....	118
ตารางที่ 31 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>F. solani</i> (Minimal fungicidal concentration: MFC).....	121

ตารางที่ 32 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>Penicilium</i> sp. (Minimal fungicidal concentration: MFC).....	124
ตารางที่ 33 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>T. harzainum</i> (Minimal fungicidal concentration: MFC).....	127
ตารางที่ 34 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ในตัวทำละลาย DMSO ด้วยวิธี DPPH.....	128
ตารางที่ 35 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ในตัวทำละลาย ethanol ด้วยวิธี DPPH.....	128
ตารางที่ 36 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระสารสกัดด้วยวิธี DPPH.....	129
ตารางที่ 37 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ในตัวทำละลาย DMSO ด้วยวิธี ABTS	130
ตารางที่ 38 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ในตัวทำละลาย ethanol ด้วยวิธี ABTS	130
ตารางที่ 39 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระสารสกัดด้วยวิธี ABTS	131
ตารางที่ 40 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ในตัวทำละลาย DMSO ด้วยวิธี FRAP	132
ตารางที่ 41 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ในตัวทำละลาย ethanol ด้วยวิธี FRAP	132
ตารางที่ 42 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระสารสกัดด้วยวิธี FRAP	133
ตารางที่ 43 ปริมาณไนตริกออกไซด์ของเซลล์เพาะเลี้ยง Raw 264.7.....	134
ตารางที่ 44 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์	135
ตารางที่ 45 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์	136
ตารางที่ 46 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดน้ำจากเส้นใยด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์	137
ตารางที่ 47 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ดด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์	138
ตารางที่ 48 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารเมทานอลจากดอกเห็ดด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์..	139
ตารางที่ 49 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดน้ำจากดอกเห็ดด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์.....	140
ตารางที่ 50 ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ Acarbose ในตัวทำละลาย DMSO.	141
ตารางที่ 51 ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ Acarbose ในน้ำ.....	141

ตารางที่ 52 ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัด	142
ตารางที่ 53 ความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคฟาจ Raw 264.7 ด้วยวิธี MTT assay	143
ตารางที่ 54 ความเป็นพิษของสารสกัดต่อไรทะเลของสารสกัด	145
ตารางที่ 55 ความเป็นพิษต่อไรทะเลของตัวทำละลาย DMSO	147

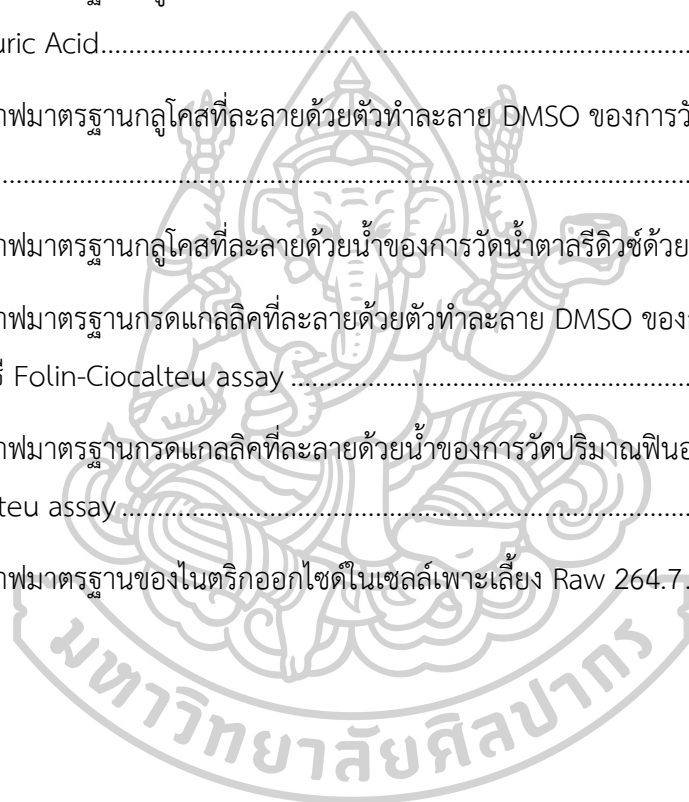


สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 เห็ด <i>Flavodon flavus</i> สายพันธุ์ EB2101 A.) ดอกเห็ดที่มีลักษณะ effused-reflexed B.) ดอกเห็ดที่มีลักษณะ resupinate C.) ไฮเมนเนียม D.) ดอกเห็ดเมื่อทำปฏิกิริยากับ 10% KOH E.) ภาพพิมพ์สปอร์ F.) สปอร์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า.....	31
ภาพที่ 2 phylogenic tree จากการเปรียบเทียบลำดับกรดนิวคลีอิกของ 28s rDNA ของเห็ด โดยใช้โปรแกรม MEGA 11	32
ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบเพื่อแสดงบริเวณอนุรักษ์ของกรดนิวคลีอิกบริเวณ ITS ของ F1.) เห็ด <i>Flavodon flavus</i> EB2101 F2.) เห็ด <i>Flavodon flavus</i> (Accession No. MN888947.1) และ I.) <i>Irpex lacteus</i> (Accession No. KC570335.1) สัญลักษณ์ “-” แสดง บริเวณที่ขาดหายไป (Gap) และ สัญลักษณ์ “*” แสดง บริเวณที่อนุรักษ์ของลำดับกรดนิวคลีอิกบริเวณ ITS ของเห็ดทั้ง 3 ชนิด34	
ภาพที่ 4 ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ผลิตโดยเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคฟาจ Raw 264.7 ในสภาวะที่ (1) ไม่มี LPS (2) มี LPS (3) มี LPS และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใย (ME) สารสกัดเมทานอลจากเส้นใย (MM) สารสกัดน้ำจากเส้นใย (MW) สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ด (FBE) สารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด (FBM) และสารสกัดน้ำจากดอกเห็ด (FBW) ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	42
ภาพที่ 5 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคฟาจ Raw 264.7 ในสภาวะที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใย (ME) สารสกัดเมทานอลจากเส้นใย (MM) สารสกัดน้ำจากเส้นใย (MW) สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ด (FBE) สารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด (FBM) และสารสกัดน้ำจากดอกเห็ด (FBW) ที่ความเข้มข้น 156.25-1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	43
ภาพที่ 6 ร้อยละการรอดชีวิตของไรทะเล ในสภาวะที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใย (ME) สารสกัดเมทานอลจากเส้นใย (MM) สารสกัดน้ำจากเส้นใย (MW) สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ด (FBE) สารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด (FBM) และสารสกัดน้ำจากดอกเห็ด (FBW) ที่ความเข้มข้น 0-1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	44
ภาพที่ 7 ร้อยละการรอดชีวิตของไรทะเล ในสภาวะที่มีตัวทำละลาย DMSO ที่ร้อยละความเข้มข้น 0.039-2.5	44

ภาพที่ 8 โครมาโตแกรมของสารสกัดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS แบบไม่ split A.) สารสกัดเมทานอลจากเส้นใย B.) สารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด	46
ภาพที่ 9 โครมาโตแกรมของสารสกัดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS แบบ split 1:10 A.) สารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด B.) สารสกัดเมทานอลจากเส้นใย	46
ภาพที่ 10 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO ของการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric Acid.....	77
ภาพที่ 11 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ละลายด้วยน้ำของการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric Acid.....	78
ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO ของการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS	80
ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ละลายด้วยน้ำของการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS.....	81
ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO ของการวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay	83
ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ละลายด้วยน้ำของการวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay	84
ภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานของไนตริกออกไซด์ในเซลล์เพาะเลี้ยง Raw 264.7.....	134



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Polypore เป็นเห็ดกลุ่มหนึ่งใน Division Basidiomycota มีลักษณะเป็นเห็ดเนื้อแข็งเหมือนไม้ โดยเชื้อราเหล่านี้มีการกระจายตัวอยู่ทั่วโลก ซึ่งชื่อ “Polypore” แปลว่ามีรูจำนวนมาก โดยรูเหล่านี้อยู่ด้านล่างของหมวกเห็ดเรียกว่าไฮเมนเนียม (hymenium) มีหน้าที่สร้างสปอร์ ไฮเมนเนียมของเห็ด polypore นอกจากจะมีรูปร่างเป็นรู (poroid) แล้ว ยังมีลักษณะคล้ายครีป (agaroid) หรือคล้ายฟัน (hydrioid) (Zhou and Dai, 2013) เห็ดเหล่านี้ไม่นิยมนำมารับประทาน เนื่องจากมีลักษณะเหนียวคล้ายไม้หรือหนังสัตว์ (Darlis et al., 2019) จากการศึกษาพบว่าเห็ดกลุ่ม Polypore หลายชนิดมีสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีฤทธิ์ทางยา

เห็ด *Ganoderma lucidum* หรือที่รู้จักกันในชื่อ “เห็ดหลินจือ” เป็นเห็ดสมุนไพรที่ได้รับความนิยมอย่างสูงทั่วโลก และใช้เป็นสมุนไพรหรืออาหารเสริมในการรักษาโรค เนื่องจากพบว่ามีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น triterpenoids และ polysaccharides มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เช่น มะเร็งปอด (LLC), มะเร็งกระเพาะ (T-47D), Sarcoma 180 และ Meth-A tumor cells (Gao et al., 2002) และ polysaccharide จากเห็ดหลินจือมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยเพิ่มจำนวนของ T และ B cell กระตุ้นการทำงานของ NK cell (Zhang et al., 2004) และสามารถรักษาโรคตับแข็งในหนูได้ (Park et al., 1997) นอกจากนี้พบว่า สารสกัดหยาบจากน้ำของเห็ดหลินจือสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูที่มีภาวะเบาหวาน (Seto et al., 2009)

เห็ด *Antrodia camphorate* เป็นเห็ด polypore ที่ใช้เป็นสมุนไพรมีสารออกฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน Shen et al. (2004) พบว่า สารสกัดหยาบของเห็ด มีสารประกอบกว่า 78 ชนิด เช่น terpenoids, benzenoids, lignans, benzoquinone derivatives, succinic, maleic derivatives และ polysaccharides สารสกัดหยาบจากน้ำของ *A. camphorate* มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ยับยั้งการผลิต reactive oxygen species (ROS) ต้านอนุมูลอิสระ (Hsiao et al., 2003) และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (Chen et al., 1995)

ประเทศไทยมีเห็ดในกลุ่ม polypore ที่หลากหลาย จึงมีความเป็นไปได้ว่าเห็ด polypore ในประเทศไทยน่าจะมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกับเห็ด polypore ที่กล่าวมาข้างต้น ในการทดลองนี้ได้แยกเห็ด polypore จากธรรมชาติที่พบได้ในจังหวัดนครปฐม จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเห็ดสามารถปล่อยสารสีเหลืองเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10 วัน จึงมีความสนใจที่จะศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ด polypore ที่แยกได้ ในด้านต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย ต้านการเจริญของเชื้อรา ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านเบาหวานและความเป็นพิษกับ cell line และไรทะเล



บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Polypore

Polypore เป็นเห็ดกลุ่มหนึ่งที่จัดอยู่ใน Division Basidiomycota ซึ่งชื่อ “Polypore” แปลว่ามีรูจำนวนมาก โดยรูเหล่านี้จะอยู่ด้านล่างของหมวกเห็ดและมีขนาดเล็กมาก เรียกว่าไฮเมเนียม (hymenium) ซึ่งสปอร์ของเห็ดจะสร้างอยู่บนไฮเมเนียม นอกจากนี้รูปร่างของไฮเมเนียมจะมีลักษณะเป็นรู (poroid) แล้ว ยังมีลักษณะคล้ายครีป (agaroid) และคล้ายฟัน (hydrioid; Zhou & Dai, 2013) เห็ด polypore มักพบบนท่อนไม้ โดยสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดมีหลายแบบได้แก่ แบบ effused-reflexed เป็นแบบดอกเห็ดโตออกจากเนื้อไม้และมีบางส่วนยึดติดกับท่อนไม้ แบบ sessile เป็นลักษณะดอกเห็ดงอกมาจากท่อนไม้โดยไม่มีก้านติดกับท่อนไม้ แบบ resupinate เป็นลักษณะแบนราบไปกับท่อนไม้ แบบ stipitate เป็นลักษณะดอกเห็ดที่มีก้านติดกับท่อนไม้ แบบ imbricate เป็นลักษณะดอกเห็ดเกิดขึ้นมาทับซ้อนกันเป็นชั้น ๆ แบบ perennial เป็นลักษณะรูปกึ่งหรือแบนติดกับท่อนไม้ซึ่งดอกเห็ดจะมีเนื้อเป็นไม้ โดยทั่วไปจะหนาประมาณ 2-5 นิ้ว และความหนาจะเพิ่มตามอายุ แบบ applanate เป็นลักษณะดอกเห็ดแบนราบคล้ายหิ้ง (Stokland and Sippola, 2006) ซึ่งเห็ดในกลุ่ม polypore นี้มีลักษณะเนื้อเหนียวคล้ายไม้หรือหนังสัตว์ จึงไม่นิยมนำมารับประทาน (Darlis et al., 2019) แต่เห็ดในกลุ่ม Polypore หลายชนิด มีสารออกฤทธิ์ชีวภาพและใช้เป็นสมุนไพรหรืออาหารเสริม

เห็ด *Ganoderma lucidum* หรือที่รู้จักกันในชื่อ “เห็ดหลินจือ” ซึ่งเป็นเห็ดสมุนไพรที่ได้รับความนิยมอย่างสูงทั่วโลกและมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งและต้านอนุมูลอิสระ โดยมีสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น triterpenoids, polysaccharides, polyphenols, protein และ amino acid (Sudheer et al., 2019) โดย Gao et al. (2002) ศึกษาฤทธิ์ของ triterpene aldehydes ที่แยกจากเห็ดหลินจือในการต้านการเจริญของมะเร็งต่าง ๆ พบว่า สามารถต้านการเจริญของเซลล์ LLC (มะเร็งปอด), T-47D (มะเร็งกระเพาะ), Sarcoma 180 และ Meth-A tumor cells มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 0.7, 4.7, 7.1 และ 3.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ Zhang et al. (2004) ศึกษา polysaccharide จาก เห็ดหลินจือพบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์เม็ดเลือดขาว และมีผลในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยเพิ่มจำนวนของ T และ B cell และกระตุ้นการทำงานของ NK cell จากการศึกษาฤทธิ์สารสกัด polysaccharides ของเห็ดหลินจือพบว่า สามารถต้านการเจริญเนื้องอกในร่างกาย แต่สาร

polysaccharide ไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็งโดยตรง แต่น่าจะอาศัยกลไกที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และการศึกษาสารสกัดหยาบจากน้ำของเห็ดหลินจือพบว่า สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูที่เป็นโรคอ้วนหรือเบาหวานได้ (Seto et al., 2009) และการให้สาร polysaccharide จากเห็ดหลินจือแก่หนูเป็นเวลา 28 วัน พบว่า สามารถช่วยรักษาโรคตับแข็งที่เกิดจากท่อน้ำดี และทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลในตับหนูลดลงและพบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตับที่ดีขึ้น (Park et al., 1997)

เห็ด *Antrodia camphorate* ที่ใช้เป็นสมุนไพรมีสารออกฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยสารสกัดหยาบของเห็ด มีสารประกอบกว่า 78 ชนิด เช่น terpenoids, benzenoids, lignans, benzoquinone derivatives, succinic, maleic derivatives และ polysaccharides จากการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบจากน้ำของเห็ด *A. camphorate* มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบโดยยับยั้งการผลิต reactive oxygen species (ROS) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Shen et al., 2004) และยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ที่เพิ่มขึ้น โดยสามารถลดของการแสดงออกของยีนไนตริกออกไซด์ (iNOS) และการการผลิต TNF- α และ IL-6 (Hseu et al., 2005) มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในสมองหนู โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ได้โดยตรง (Hsiao et al., 2003)

สารสกัดหยาบของ *Piptoporus betulinus* มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 98 $\mu\text{g/ml}$ และ *Bacillus subtilis* มีค่า MIC เท่ากับ 200 $\mu\text{g/ml}$ (Alresly et al., 2015) และพบว่า มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง myelocytic leukemia cell line HL-60 และ human acute monocytic leukemia cell line THP-1 ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.77 และ 8.21 μM ตามลำดับ (Tohtahon et al., 2017) และสารสกัดหยาบจากเอทานอลของเห็ด *Laetiporus sulphureus* มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Micrococcus flavus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* และ *Bacillus subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis* และ *Morganella morganii* และต้านการเจริญของเชื้อรา คือ *Candida* sp. (Turkoglu et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า polysaccharides, phenolic compound, indole compound, terpenes และ vitamins จากเห็ด *Laetiporus sulphureus*, *Piptoporus*

betulinus และ *Trametes versicolor* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านการเจริญของจุลชีพและเซลล์มะเร็ง (Zięba et al., 2018)

นอกจากนี้มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเห็ดจากเห็ด polypore อื่นหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดกลุ่ม polypore

ชื่อสายพันธุ์	สารสกัด	คุณสมบัติ	อ้างอิง
<i>Piptoporus betulinus</i>	เห็ดลอยซีเตท	ต้านการเจริญแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	(Alresly et al., 2015)
<i>Piptoporus betulinus</i>	เมทานอล	ต้านเซลล์มะเร็ง romyelocytic leukemia cell line HL-60 และ human acute monocytic leukemia cell line THP-1	(Tohtahon et al., 2017)
<i>Laetiporus sulphureus</i>	เอทานอล	ต้านการเจริญแบคทีเรียแกรม บวก แกรมลบ และเชื้อรา เช่น <i>Micrococcus flavus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Morganella morganii</i> และ <i>Candida albicans</i>	(Turkoglu et al., 2007)
<i>Fomitopsis pinicola</i>	เมทานอล	ต้านสารอนุมูลอิสระ	(Sulkowska-Ziaja

<i>Gloeophyllum sepiarium</i>			et al., 2012)
<i>Piptoporus betulinus</i>			
<i>Daedaleopsis confragosa</i>			
<i>Laetiporus sulphureus</i>			
<i>Trametes versicolor</i>		ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ต้าน	(Zieba et al.,
<i>Laetiporus sulphureus</i>		การอักเสบ ต้านจุลชีพและต้าน	2018)
<i>Piptoporus betulinus</i>		มะเร็ง	
<i>Fomes fomentarius</i>	เอทานอล	ฤทธิ์การต้านไวรัสปีกแมลงผึ้ง	(Stamets et al.,
<i>Ganoderma applanatum</i>		(DWV) และไวรัส Lake Sinai	2018)
		(LSV)	
<i>Phellinus igniarius</i>	เอทานอลน้ำ	ฤทธิ์ในการยับยั้งการแทรกซึม	(Li et al., 2014)
		ของเซลล์ภูมิคุ้มกันในไขสันหลัง	
<i>Trametes polyzona</i>	โพลีฟีนอล	ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ	(Adongbede et
		ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย <i>K.</i>	al., 2019)
		<i>pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S.</i>	
		<i>aureus</i> และ <i>S. Enterica</i>	
Trametes spp.	คลอโรฟอร์ม	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ,	(Gebreyohannes
		<i>K. pneumoniae</i> , MRSA, <i>E.</i>	et al., 2019)
		<i>coli</i>	
	เอทานอล	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ,	
		<i>K. pneumoniae</i> , MRSA, <i>E.</i>	
		<i>coli</i>	
	น้ำ	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ,	
		<i>K. pneumoniae</i> , <i>P.</i>	
		<i>aeruginosa</i> , MRSA, <i>E. coli</i>	

การสกัดสารสกัดหยาบ (Zhang et al., 2018)

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอาจทำได้หลายวิธี การเลือกวิธีสกัดขึ้นอยู่กับตัวอย่างในการนำมา คุณสมบัติของสาร เช่น การทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลาย วิธีการสกัดสารมีดังต่อไปนี้

1. Maceration หรือ การหมัก คือการนำตัวอย่างใส่ลงภาชนะปิดจากนั้นเติมด้วยตัวทำละลายที่ต้องการสกัดแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3-7 วัน คอยกวนหรือคนสารบ่อย ๆ เพื่อให้ได้สารสำคัญออกมาจากสารสกัด เมื่อครบกำหนดให้นำมากรองแยกสารสกัดออก ถ้าต้องการให้ได้สารสกัดออกมาได้มากที่สุดอาจสามารถสกัดซ้ำได้หลายครั้ง

2. Percolation คือการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยเครื่อง percolator โดยการนำตัวอย่างมาหมักกับตัวทำละลาย โดยใส่ตัวทำละลายลงในตัวอย่างให้พอขึ้นประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วค่อยใส่ตัวอย่างไปที่ละน้อย และเติมตัวทำละลายให้สูงกว่าระดับตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารที่สกัดออกมาแล้วจึงเติมตัวละลายลงไปซ้ำถ้าต้องการสกัดซ้ำ แต่ควรระวังตัวทำละลายแห้ง

3. Infusion คือการชง เป็นการสกัดโดยใช้เวลาระยะสั้น โดยสามารถใช้ได้ทั้งน้ำร้อนและน้ำเย็น

4. Digestion คือการสกัดโดยใช้ความร้อน ซึ่งใช้ความร้อนเป็นเวลานานกว่าการต้มโดยปริมาตรของตัวทำละลายอาจเหลือ 1 ใน 3 ส่วน

5. Decoction คือการต้มเพื่อสกัดตัวอย่างที่ละลายในน้ำได้ดีและทนความร้อนได้ดี ต้มหลังจากที่น้ำเดือดประมาณ 15 นาที

6. Soxhlet extraction การสกัดด้วยวิธี Soxhlet เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยใช้ทำตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในภาชนะระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (Trimble) ซึ่งบรรจุผงแห้งไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในภาชนะด้วยวิธีกลั่นน้ำภาชนะนี้ได้รับความร้อนจาก heating mantle หรือหม้ออั้งไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปทั้งสารสกัดไว้ในภาชนะ ตัวทำละลายเมื่อกระทบ condenser จะกลั่นกลับลงมาสกัดสารใหม่ วงเวียนจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งการสกัดวิธีนี้ใช้ความร้อนจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัวได้

7. Heat Reflux Extraction (HRE) คือเป็นการสกัดผงแห้งกับตัวทำละลายโดยใช้ความร้อน โดยสัมผัสความร้อนโดยตรงและถูกต้มให้ความร้อนจนเดือด จากนั้นตัวทำละลายจะระเหยขึ้นไปด้านบน

condenser และจะถูกควบแน่นกลับมาลงมาเพื่อสกัดต่อเนื่อง และวนเวียนไปเรื่อย ๆ จนได้สารสกัดสมบูรณ์ซึ่งสารสกัดจะเข้มข้นขึ้น

8. Ultrasound Extraction (UAE) คือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วง 20-2000 กิโลเฮิร์ตซ์ เพื่อทำให้เกิดการสั่นสะเทือนหรือเสียดสีกันเป็นความร้อนทำให้เกิดการสกัดและเกิดการปล่อยสารสำคัญจากเนื้อออกมา

9. Microwave Extraction (MAE) คือการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งคลื่นนี้เปลี่ยนไปเป็นความร้อนโดยการทำให้อนุภาคหรือโมเลกุลที่มีขั้วเสียดสีกันและเกิดความร้อนขึ้น เมื่อนำสารที่จะสกัดไปวางในสนามแม่เหล็กไฟฟ้าและด้วยคุณสมบัติความเป็นขั้วของโมเลกุลภายในสารที่จะสกัดจะเกิดแรงต้านการเคลื่อนที่หรือเสียดสีกันทำให้เกิดความร้อนขึ้นซึ่งมีผลต่อเซลล์พืชและเกิดการสกัดสารสำคัญออกมา

การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid

คาร์โบไฮเดรต เป็นสารประกอบของ polyhydroxy aldehyde หรือ polyhydroxy ketone ที่มีอยู่ในธรรมชาติจำนวนมาก แบ่งตามจำนวนหน่วยองค์ประกอบในโครงสร้างออกได้เป็น 4 ประเภทคือ monosaccharide, disaccharide, oligosaccharide และ polysaccharide ซึ่งการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid เป็นการตรวจวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง สามารถวัดได้ทั้งน้ำตาลรีดิวิซ และน้ำตาลในธรรมชาติที่อยู่รูป monosaccharide, disaccharide, oligosaccharide และ polysaccharide โดยวิธีนี้กรดซัลฟิวริกเข้มข้นจะสลาย polysaccharide, oligosaccharide และ disaccharide เป็น monosaccharide น้ำตาลเพนโทส (pentoses) ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอน 5 โมเลกุล จะถูกทำให้แห้งเป็นเฟอร์ฟูรัล (furfural) และน้ำตาลเฮกโซส (hexoses) ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอน 6 โมเลกุล ถูกทำให้เป็นไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethyl furfural) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับฟีนอลเกิดเป็นสีเหลืองทอง สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 480-490 นาโนเมตร ซึ่งสีสำหรับปฏิกิริยานี้สามารถคงตัวได้เป็นเวลาหลายชั่วโมงและมีความแม่นยำของวิธีการอยู่ภายใน $\pm 2\%$ ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม (Nielsen, 2010)

การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

น้ำตาลรีดิวซ์คือ น้ำตาลที่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ได้เนื่องจากมีหมู่อัลดีไฮด์ (-CHO) หรือคีโตน (-C=O) อิสระ ที่สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิไดส์ เช่น โซเดียมเปอร์ไอโอเดท (NaIO₃) หรือกรดไนตริก ได้กรดน้ำตาลชนิดต่าง ๆ กัน ซึ่งการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid เป็นการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยการต้มน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายต่างที่มีกรดไนโตรลิวซาลิไซค (3,5-Dinitrosalicylic acid) ในกระบวนการรีดักชันทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของ 3,5-Dinitrosalicylic acid (สีเหลือง) ไปเป็น 3-amino-5-nitrosalicylic acid (สีส้มแดง) สามารถวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตร (Deshavath et al., 2020)

การวัดปริมาณ phenolic ทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบที่เป็นวงแหวนอะโรมาติก และมีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ รวมไปถึงอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ เช่น ฟลาโวนอยด์ ลิกนิน กรดซินนามิก และโคเอ็นไซม์คิว ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ การต้านจุลชีพ การต้านมะเร็ง (Luna-Guevara et al., 2018)

การวัดปริมาณ phenolic โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric คือการที่สารประกอบฟีนอลิกจะทำปฏิกิริยาเชิงซ้อนกับ phosphor-tungstic acid และ phosphomolybdic acid เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (Blainski et al., 2013)

อนุมูลอิสระ (Free radical) และสารต้านอนุมูลอิสระ (Gulcin, 2020)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด (Outer orbital) เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (Unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุล ทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่

(Chain reaction) ต่อกันไปเรื่อย ๆ โดยที่อนุมูลอิสระก็มีสมบัติเหมือนสารทั่ว ๆ ไป ตรงที่ความสามารถ ในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิความเป็นกรดต่าง (pH) และความชื้น เป็นต้น อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้าและอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้าโดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบสัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระคืออิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมีเช่น อนุมูล R• แทน อะตอม หรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นประจุบวก (R⁺) เช่น อนุมูล pyridinyl (NAD⁺) และประจุลบ (R⁻) เช่น อนุมูล superoxide (O₂^{-•}) หรือเป็นกลาง เช่น อนุมูล peroxy (ROO•) หรืออนุมูล thiyl (RS•) เป็นต้น อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ Hydroxyl radical (•OH) และ Superoxide anion (O₂^{-•}) เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก หรือการเกิดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (Oxidative stress) คือ การที่อนุมูลอิสระเกิดขึ้นใน ปริมาณมากเกินไปกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหลอดเลือดอุดตัน อัลไซเมอร์ เบาหวาน จอประสาทตาเสื่อม มะเร็ง เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยา oxidation ด้วยเหตุที่ reactive oxygen species (ROS) เกิดขึ้นมาจากกระบวนการต่าง ๆ ในการดำรงชีวิต ดังนั้นร่างกายจึงต้องสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อกำจัดและลดความรุนแรงของ ROS ที่เกิดขึ้นด้วย เช่น co-enzyme Q10 alpha-lipoic acid เป็นต้น โดยปกติแล้วการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นเมื่อเพียงพอต่อการเกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกาย จะเห็นได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคและความเสื่อมของร่างกายเป็นอย่างมาก นอกจากการไปจับกับอนุมูลอิสระแล้วสารต้านอนุมูลอิสระควรจะต้องมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ร่วมด้วย

1. ป้องกันการเกิดขึ้นของ ROS ได้
2. สามารถจับกับ ROS ที่เกิดขึ้นก่อนที่ ROS นั้นจะไปทำอันตรายเนื้อเยื่อต่าง ๆ
3. ต้องไม่เพิ่มความรุนแรงของอนุมูลอิสระหรือไม่เปลี่ยน ROS ที่มีความแรงต่ำไปเป็น ROS ที่มีความแรงสูง เช่น ไม่เปลี่ยนจาก super oxide ไปเป็น hydroxyl radical เป็นต้น
4. ทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ antioxidant enzyme หรือสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ

5. เพิ่มการแสดงออกของยีนที่ใช้สร้าง antioxidant enzyme และช่วยในการฟื้นฟูความเสียหายของเซลล์หรือเนื้อเยื่อจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ

เราสามารถแบ่งสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายได้เป็น 4 ประเภทดังนี้

1. Intracellular antioxidants (antioxidant enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการต้านอนุมูลอิสระเช่น catalase glutathione peroxidase superoxide dismutase
2. Extracellular antioxidants ได้แก่ Vitamin C สารที่มีกลุ่ม sulfhydryl groups
3. Membrane antioxidants ได้แก่ Carotenoids Ubiquinone Vitamin E
4. สารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ Copper Manganese Selenium Zinc

กลไกการต้านอนุมูลอิสระ

1. Free radical scavenging สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระและทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระได้ให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนไปแล้วก็จะเกิดเป็นอนุมูลตัวใหม่ซึ่งมีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระเดิม อาจจะไปรวมตัวกันกับอนุมูลอิสระอีกโมเลกุลหนึ่งเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียร หรือมีสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ มาให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนเพื่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียรต่อไป สารที่มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้เช่น Butylated hydroxyl anisole (BHA), Vitamin E (alpha-tocopherol) เป็นต้น
2. Singlet oxygen quenching (1O_2) ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยการเปลี่ยน Singlet oxygen (1O_2) ให้ไปอยู่ในรูป triplet oxygen (3O_2) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้เช่น carotenoids โดย carotenoids 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen ได้ 1,000 โมเลกุล
3. Metal chelating โลหะหนักเช่น Fe^{2+}/Fe^{3+} และ Cu^{2+} มีผลเร่งให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ในร่างกายซึ่งโลหะหนักดังกล่าวจะไปเร่งการเกิดอนุมูลอิสระหลายประเภทเช่น peroxy radical, hydroxyl radical และ alkyl radical รวมถึง singlet oxygen ดังนั้นการที่มีสารไปจับกับโลหะหนักเหล่านี้จะช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ได้แก่ flavonoids, phosphoric acid, citric acid และ ascorbic acid เป็นต้น

- ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibitor) สารประกอบ phenolics บางชนิด เช่น flavonoids phenolic acid และ gallates สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็น cofactor ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้

วิธีการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant assay) มีดังนี้

- การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ Diphenyl-picryldrazyl radical (DPPH) free radical scavenging assay เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระคือ DPPH ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างจากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ โทร็อกซ์ (trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) แสดงค่าเป็น TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) มีหน่วยเป็น mM/mg หรือ $\mu\text{M}/\text{mg}$

- การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) เป็นวิธีการวัดความสามารถการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) เป็นสารสังเคราะห์สีเขียวปนน้ำเงินที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 734 นาโนเมตร เนื่องจาก ABTS•+ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงจึงต้องทำการเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ABTS•+ ทำปฏิกิริยาตัวอย่างกับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS•+ ซึ่งวิธีการคำนวณและเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox เช่นเดียวกับวิธี DPPH

- การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay) เป็นวิธีการที่อาศัยหลักการการถ่ายเทอิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe}(\text{III})(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น

[Fe(III)(TPTZ)₂]²⁺ ซึ่ง [Fe(III)(TPTZ)₂]²⁺ มีความสามารถวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ [Fe(III)(TPTZ)₂]²⁺ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO₄) ซึ่งขั้นตอนโดยละเอียดของวิธีการนี้ ได้แก่ การทำให้เกิดสารประเชิงซ้อน [Fe(III)(TPTZ)₂]³⁺ ประกอบด้วยการนำสารละลาย TPZP (2,4,6-tri (2-pyridyl)-s-triazine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต หรือสารตัวอย่างและตั้งทิ้งไว้ที่มีด

4. การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) เป็นวิธีการที่อาศัยหลักการถ่ายเทอิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระให้กับสารประเชิงซ้อน [Cu(II)(Nc)₂]²⁺ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น [Cu(I)(Nc)₂]⁺ ซึ่ง [Cu(I)(Nc)₂]⁺ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ปริมาณ [Cu(I)(Nc)₂]⁺ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งขั้นตอนคือการทำให้เกิดสารประเชิงซ้อน [Cu(II)(Nc)₂]²⁺ ประกอบด้วยการนำสารละลาย CuCl₂ มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย ammonium acetate และสารละลาย neocuproene จากนั้นทำการรีดิวซ์คอปเปอร์โดยการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยานี้จะเกิดได้สมบูรณ์ภายในเวลา 30 นาที

การทดสอบฤทธิ์การต้านเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Awerbuch et al., 1989)

การทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) เป็นการหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี dilution test จะเป็นการทดสอบในเชิงปริมาณ เพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำลายเชื้อได้ หลักการโดยทั่วไปของวิธีทดสอบแบบ broth และ agar dilution susceptibility test จะคล้ายคลึงกัน คือ จะเจือจางสารสกัดใน medium ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงในบน medium ที่มีสารสกัด ภายหลังจากบ่มเพาะให้ดูค่า MIC ทั้งนี้โดยสังเกตความขุ่นหรือใสของ broth และมีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้นบน agar โดยการทดสอบแบ่งเป็น broth และ agar dilution susceptibility test มีวิธีการดังนี้

1). Broth dilution test เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสารสกัดที่ละเอียดวิธีหนึ่ง การทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้ง MIC และ MBC ของสารสกัดนั้น ๆ กับ เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ

หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้คือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีสารสกัดในปริมาณต่าง ๆ ผสมอยู่และดูการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ แบ่งเป็น 2 วิธี คือ

1.1 broth macrodilution test จะทำในหลอดทดลอง โดยทำการเจือจางสารสกัด stock solution ด้วยตัวเจือจาง หรือด้วย broth ในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) ไปเรื่อย ๆ ปริมาตรสุดท้ายที่อยู่ในหลอดเท่ากับ 0.5 มล. และต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีสารสกัด เตรียมเชื้อที่ทดสอบให้ได้ขนาด โดยอาจใช้วิธีเทียบความขุ่นกับ McFarland เบอร์ 0.5 หรืออาจใช้การวัดความขุ่นด้วย spectrophotometer แล้วเจือจางลงเพื่อให้ได้ขนาดเชื้อที่ต้องการ

1.2 broth microdilution test ทำการทดลองใน microtiter plate 96-well โดยเจือจางสารสกัด stock solution ด้วย broth แบบ 2- fold serial dilution มีหลุมควบคุมเป็น broth ที่ไม่มีสารสกัด ในแต่ละหลุมจะมีปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับขนาดแล้ว (ใช้เชื้อประมาณ 10^5 CFU/มิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วปิดฝาก่อนนำไปบ่ม สามารถอ่านค่า MIC โดยดูความขุ่นด้วยตาเปล่าหรืออาจใช้สารบางอย่างที่สามารถบ่งชี้การเจริญของเชื้อได้เพื่อให้อ่านค่าได้ง่าย

2). Agar dilution test เป็นการทดสอบความไวของเชื้อแบบปริมาณวิเคราะห์โดยมีหลักการทดสอบคล้ายคลึงกับ Broth dilution method ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น กล่าวคือทำการทดสอบ โดยการเจือจางสารทดสอบในอาหารร่วนและถ่ายเชื้อลงบนผิวของอาหารร่วน ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานเดียวกันได้ วิธีนี้สามารถหา ค่า MIC ได้ สามารถแบ่งเป็น 3 วิธีการดังนี้

1) Agar dilution test ทดสอบโดยการนำสารสกัด stock solution มาเจือจางด้วยน้ำหรือตัวเจือจางที่เหมาะสมจนได้ ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ แล้วจึงใส่ใน agar medium ซึ่งหลอมไว้ (45-50°C) การเตรียมขนาดเชื้อด้วยวิธีการเดียวกับที่ทำใน broth dilution test แต่เจือจางขนาดเชื้อลงให้ได้ขนาดเชื้อซึ่งเมื่อแต่ละลงบน agar แล้วให้ได้เชื้อประมาณ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม เมื่อแต่ละเชื้อลงบน agar ทดสอบแล้ว ต้อง ทิ้งให้ซีมหมดก่อนคว่ำ plate และนำไปบ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 16-20 ชั่วโมง (เชื้อที่เจริญช้าอาจให้นานมากกว่า 48 ชั่วโมง) แล้วอ่านค่า MIC ที่ความเข้มข้นที่จะต้องไม่มีเชื้อขึ้นเลย

2) Disc diffusion method (Kirby-Bauer) เป็นวิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุด เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบ ไม่อาจทราบค่า MIC ได้ ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้าและ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ หลักการทั่วไปคือ การทำให้สารต้านจุลชีพที่มีในแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ที่เตรียมไว้ก่อนซึบไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อ (spread) ในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบแผ่น disc ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของ โซนใส

3) Disc diffusion test และ Hole-plate diffusion ทำการทดสอบโดยการเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบ เพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว วัดความขุ่นของเชื้อเพื่อให้ได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการทดสอบแล้ว spread เชื้อบน Mueller-Hinton agar ให้ทั่ว จุ่มกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ในสารละลายสารสกัดและวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรทำกลุ่มควบคุม คือ กระดาษกรองปลอดเชื้อที่จุ่มในตัวทำละลายสารสกัด หรืออาจใช้วิธีการเจาะหลุม (hole - plate diffusion) (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) แล้วหยดสารละลายสารสกัดลงไปประมาณ 40 ไมโครลิตรต่อหลุม ปุ่มเพาะเชื้อนาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม การแปรผลของวิธีนี้จะสามารถบอกได้เพียงว่า สารสกัดที่ความเข้มข้นนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากหรือน้อยตามขนาดของบริเวณใสเท่านั้น และอาจใช้การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เกิดจากยาปฏิชีวนะมาตรฐานก็ได้

การต้านการอักเสบ (Ricciotti and FitzGerald, 2011)

การอักเสบเป็นการตอบสนองทั่วไปของร่างกายในการป้องกันตัวเองจากการบาดเจ็บหรือการติดเชื้อ กระบวนการอักเสบเฉียบพลันเป็นปฏิกิริยาระยะสั้น ซึ่งเกิดขึ้นจากการตอบสนองต่อการบาดเจ็บหรือที่ติดเชื้อ ในระยะนี้ระบบภูมิคุ้มกันจะปล่อยเซลล์เม็ดเลือดขาวออกมาล้อมรอบและปกป้องบริเวณนั้น ทำให้เกิดรอยแดงและบวมที่มองเห็นได้ ด้วยเหตุนี้การอักเสบจึงมีความสำคัญ หากไม่มีการอักเสบ การติดเชื้อธรรมดาอาจเป็นอันตรายได้ แต่ในทางกลับกันการอักเสบเป็นระยะเวลานานหรือเป็นเรื้อรังก็เป็นต้นเหตุของความผิดปกติของการอักเสบหลายอย่าง รวมถึงมะเร็งด้วย

Prostaglandin E2 (PGE2) เป็น mediator สำคัญที่ตอบสนองในระหว่างการอักเสบ การสังเคราะห์ PGE2 เกิดผ่านเอนไซม์ cyclooxygenase หรือ prostaglandins H2 synthase (PGH2) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่เปลี่ยน arachidonic acid ให้เป็น PGH2 ซึ่งเปลี่ยนต่อเป็น PGE2 และ

prostaglandins (PGs) ชนิดอื่น ๆ เช่น PGI₂ PGE₂ PGF₂ α PGD₂ และ thromboxane A₂ เอนไซม์ cyclooxygenase มี 2 ประเภท คือ เอนไซม์ cyclooxygenase-1 (COX-1) เป็นเอนไซม์ประเภทที่ถูกสังเคราะห์และแสดงออกตลอดเวลา (constitutively expressed) ในสภาวะปกติในร่างกายเพื่อทำหน้าที่ทางสรีรวิทยาและเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) เป็นเอนไซม์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเมื่อถูกชักนำให้แสดงออกระหว่างเกิดการอักเสบ ซึ่ง prostaglandin E₂ ทำให้เกิดอาการต่าง ๆ ของการอักเสบ คือ ปวด บวม แดง ร้อน ตามมา โดย prostaglandin E₂ ทำให้หลอดเลือดขยายตัว เพิ่มการซึมผ่านของสารน้ำจากหลอดเลือดและเพิ่มการไหลเวียนของเลือดมายังบริเวณที่มีการอักเสบทำให้บวม นอกจากนี้อาการปวดยังเป็นผลมาจากการที่ PGE₂ ไปกระตุ้นระบบประสาทส่วนปลายและ preoptic area ในสมอง

การต้านเบาหวาน (Ahmed et al., 2020; Chamika et al., 2021)

โรคเบาหวานเป็นโรคเมตาบอลิซึมเรื้อรังที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ทำให้มีภาวะระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูง อันเป็นผลมาจากความบกพร่องของการหลั่งอินซูลินหรือการออกฤทธิ์ของอินซูลิน ส่งผลให้เกิดความผิดปกติกับอวัยวะหลายส่วน เช่น ตา ไต ระบบประสาท ระบบหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น ซึ่งผู้ป่วยเบาหวานส่วนใหญ่จึงต้องรับประทานยาอย่างต่อเนื่องเพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข ส่งผลต่อการพัฒนาสังคมและเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก จากรายงานแนวโน้มจำนวนผู้ป่วยเบาหวาน ในปี พ.ศ. 2560 พบทั่วโลกมีผู้ป่วยเบาหวานมากกว่า 425 ล้านคน และจำนวนยังเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยคาดในปี พ.ศ. 2590 จะมีมากถึง 629 ล้านคน และในร้อยละ 90-95 ของผู้ป่วยโรคเบาหวาน พบเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes) โดยมีปัญหาหลักคือผู้ป่วยมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง ดังนั้นหนึ่งในวิธีการลดระดับน้ำตาลในเลือด คือการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase และ α -glucosidase เพื่อหยุดการย่อยคาร์โบไฮเดรตและปล่อยกลูโคส

เอนไซม์ α -amylase (α -1,4-glucanohydrolases) เป็นเอนไซม์ย่อยแป้งให้กลายเป็นมอลโทสและเดกซ์ทริน พบได้ในสิ่งมีชีวิต เอนไซม์ α -amylase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี 2 ชนิด คือ salivary α -amylase จากต่อมน้ำลาย และ pancreatic α -amylase จากตับอ่อน การย่อยอาหารประเภทแป้งเริ่มจากเอนไซม์ α -amylase ในน้ำลาย จากนั้นถูกย่อยอย่างสมบูรณ์โดยเอนไซม์ในลำไส้เล็กที่ผลิตจากตับอ่อน ส่วนแบคทีเรียและราจะปล่อยเอนไซม์ออกมาเพื่อย่อยแป้งให้เป็น

มอลโทส เดกซ์ทรินแล้วนำเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นพลังงาน ในพืชจะผลิตเอนไซม์เพื่อสลายแป้งที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์เพื่อใช้เป็นพลังงาน

เอนไซม์ α -glucosidase เป็นเอนไซม์ที่อยู่บริเวณผนังลำไส้เล็ก เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยน้ำตาลพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลเดี่ยวของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมากกว่า 10 โมเลกุลขึ้นไป เชื่อมกันด้วยพันธะแอลฟาไกลโคซิดิกด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคส เข้าสู่กระแสเลือดไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย

ซึ่งการตรวจการต้านเบาหวานที่ใช้คือวิธีการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase โดยการเตรียมสารละลายเอนไซม์ α -amylase ผสมกับสารสกัดและเติมสารละลายแป้งลงไปเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยแป้งและหยุดปฏิกิริยาการย่อยแป้งด้วยการเติม dinitrosalicylic acid color reagent แล้วนำไปต้มให้เดือด รอจนเย็นแล้วนำไปวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

Cytotoxicity (Özlem, 2017)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งเป็นการทดสอบ cell viability โดยวัดความสามารถของ mitochondrial enzyme ที่เปลี่ยน tetrazolium salt (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, MTT) สีเหลือง ไปเป็น formazan product ที่มีสีน้ำเงิน สามารถวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500-600 นาโนเมตร ซึ่งจากระดับสีจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ ข้อดีของวิธีนี้คือใช้งานง่าย ปลอดภัย มีความสามารถในการทำซ้ำสูง และใช้อย่างแพร่หลายในการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์และความเป็นพิษต่อเซลล์ ข้อเสียคือ MTT formazan ไม่ละลายน้ำ และเกิดผลึกรูปเข็มสีม่วงในเซลล์

Brine shrimp lethality assay (Sarah et al., 2017; Wu, 2014)

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดมีหลายวิธี เช่น การทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ และทดสอบกับสัตว์ต่าง ๆ ซึ่งการใช้ brine shrimp เป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลต่อไรทะเล จัดเป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารเบื้องต้น (primary screening bioassays) เป็นวิธีการทดสอบที่ง่าย รวดเร็ว ต้นทุนต่ำ ไม่ซับซ้อน ไม่จำเป็นต้องใช้ความชำนาญพิเศษในการทดสอบ และใช้สารทดสอบน้อย ซึ่งวิธีทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเลมักทำควบคู่กับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

เพาะเลี้ยง และการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลต่อไรทะเล ทำโดยละลายสารสกัดในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น แล้วนำมาทดสอบกับไรทะเลที่ฟักออกจากไข่หลังการเพาะเป็น 36-48 ชั่วโมง โดยนำไรทะเลใส่ในไมโครเพลท 96 หลุมหลุมละ 10 ตัว ทำการทดลองเป็นจำนวน 3 ซ้ำ ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ดูจำนวนการตายหรือรอดของไรทะเล เพื่อหาค่า LC_{50}



บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เก็บตัวอย่างเห็ด polypore ไอโซเลต EB2101 จาก ต. มาบแค อ. เมือง จ. นครปฐม (13.893224, 100.071816) เมื่อวันที่ 8 กันยายน พ.ศ. 2564 ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยนำชิ้นเห็ด มามาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5×0.5 เซนติเมตร และนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) จานละ 3 ชิ้น และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อชิ้นเห็ดมีเส้นใยเจริญเติบโตทำการตัดชิ้นวุ้น ที่มีเส้นใยนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) ใหม่ ทำการเลี้ยงเส้นใยจนเส้นใยบริสุทธิ์ แล้วทำการเก็บเชื้อเป็น stock culture ในขวดเมล็ดข้าวฟ่าง และเก็บเป็น working culture ในอาหารสูตร PDA เพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ TISTR008, *Bacillus cereus* สายพันธุ์ TISTR2372, *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ TISTR885, *Staphylococcus epidermidis* สายพันธุ์ TISTR518, *Escherichia coli* สายพันธุ์ TISTR887, *Salmonella thyphimurium* สายพันธุ์ TISTR292, *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ TISTR1287 เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ TISTR358 เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ยีสต์ *Candida albicans* สายพันธุ์ TISTR239 เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง และเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์ TISTR3628, *Aspergillus niger* สายพันธุ์ TISTR3205, *Penicilium* sp. สายพันธุ์ EB1809, *Fusarium solani* สายพันธุ์ TISTR3436, *Trichoderma harzainum* เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง

2. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ด

- นำเห็ดตัวอย่างมาบันทึก ภาพถ่าย จดบันทึกวัน เดือน ปี ที่เก็บศึกษา
- บันทึกลักษณะของดอกเห็ด สี ขนาด รูปร่าง ลักษณะเนื้อและสีของเนื้อเห็ด และการทำปฏิกิริยากับ KOH
- บันทึกลักษณะไฮเมเนียมใต้หมวกเห็ด สังเกตสี ขนาดความกว้างของไฮเมเนียม ความถี่ของไฮเมเนียมรูปร่าง และลักษณะที่ติดกับก้าน
- บันทึกลักษณะก้านดอกเห็ด สังเกตสี ขนาด รูปร่าง เนื้อเห็ด การเกาะติดกับหมวกเห็ด
- บันทึกภาพพิมพ์สปอร์และลักษณะสปอร์

3. การศึกษาลำดับกรดนิวคลีอิกของ ITS และ 28s rDNA และการเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วน 28s rDNA และ ITS กับฐานข้อมูล

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวสูตร MCM เป็นเวลา 15 วัน และนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 Plant DNA extraction Kit (Vivantis, Malaysia). เมื่อสกัดดีเอ็นเอเสร็จแล้วนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis

3.2 การทำ polymerase chain reaction

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้แล้วมาทำ PCR ด้วย Primer ITS1 และ ITS4 และ Primer LROR และ LR7 ดัดแปลงจาก Kumar and Shukla (2005)

สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน PCR คือ 1X PCR Buffer, 2.0mM MgCl₂ , 100 μM dNTP, 0.1 μM Forward primer, 0.1 μM Reverse primer, 1 U Taq polymerase, 2 μl DNA template, PCR H₂O จนครบปริมาตร 25 μl

โดยใช้โปรแกรมโปรแกรมที่ 1 initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที

โปรแกรมที่ 2 denaturation	ที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที	}	30 รอบ
annealing	ที่ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที		
extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที		
โปรแกรมที่ 3 extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที	}	

หลังจากได้ PCR productให้นำมาตรวจสอบด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) และย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 การเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วน 28S rDNA และ ITS กับฐานข้อมูล

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างนำมาวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสในส่วน 28S rDNA และ ITS ของเห็ดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล National center for Biotechnology Information (NCBI) โดยผ่านโปรแกรม BlastN search

4. การเพาะเลี้ยงเส้นใย

นำหัวเชื้อเห็ดมาเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA บ่มในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร มาตัดชิ้นวงใส่ลงขวดอาหารเหลว MCM ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ขวดละ 4-5 ชิ้น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นกรองเส้นใยแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่

5. การเพาะเลี้ยงดอกเห็ด

ทำการเตรียมหัวเชื้อในขวดข้าวฟ่างโดยนำข้าวฟ่างมาแช่น้ำทิ้งไว้ข้ามคืนและนำมาต้มเป็นเวลา 5-10 นาที และกรองแยกน้ำออกและผึ่งเมล็ดข้างฟ่างให้หมาดแล้วนำไปใส่ขวดภาชนะและนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ถ้ายเชื้อเห็ดลงในขวดข้าวฟ่างปลอดเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เมื่อเส้นใยเจริญเติบโตจนเต็มขวดข้าวฟ่างแล้วนำหัว

เชื่อมมาใส่ถุงซีลื้อยที่ปลอดภัย หลังจากนั้นนำไปบ่มเส้นใยให้เจริญเติบโตเต็มถุงซีลื้อยเป็นเวลา 30 วัน จึงทำการเปิดออกเพื่อให้เกิดดอกเห็ดโดยเปิดดอกเห็ดที่อุณหภูมิ 21-30 องศาเซลเซียส และรดน้ำ 2 ครั้งต่อวัน เมื่อเกิดดอกเห็ดให้นำดอกเห็ดที่เก็บได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่

6. การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้วย Soxhlet extractor

ให้นำเส้นใยอบแห้งและดอกเห็ดอบแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยครก และนำมาทำการสกัดด้วย Soxhlet extractor โดยใช้สารตัวทำละลาย Ethyl acetate, Methanol โดยใช้ตัวอย่างอบแห้ง 20 กรัมต่อตัวทำละลาย 250 มิลลิลิตร สกัดจำนวน 15 รอบ และสกัดตามวิธีการทดลองของ Salvatore et al. (2020) ด้วยการนำกากที่เหลือใส่ลงในอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 5 มิลลิลิตรแล้วไปต้มด้วยน้ำเดือดอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สารสกัดหยาบจาก Ethyl acetate และ Methanol ไปทำการระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) สารสกัดหยาบจากน้ำนำไปปั่นเหวี่ยง 6000 rpm เวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำส่วนใสไประเหยด้วยการแช่เยือกแข็ง (lyophilize)

7. การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรต

วัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid method ตามวิธีการทดลองของ Albalasmeh et al. (2013) ด้วยการนำสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับ 5% (v/v) phenol 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เติม สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองและผสมกันอย่างทันที และวางทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นนำมาเขย่า 30 วินาที วางแช่ไว้ในอ่างน้ำอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ สารละลายมีการเปลี่ยนสี และนำสารละลายมาวัด spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบค่ากับสารละลายมาตรฐาน glucose โดยเตรียมสารละลายเหมือนวิธีข้างต้น ส่วน สารละลายอ้างอิง (blank) ให้ผสมกับ 5% สารละลาย phenol 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองและวัด ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

8. การวัดปริมาณ Reducing sugar

วัดปริมาณ Reducing sugar ด้วยวิธี DNS method (Dinitrosalicylic acid method) ตามวิธีการทดลองของ Sawangwan et al. (2018) โดยนำสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS reagent 1 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากสารละลายที่ผสมแล้วเย็นลงให้นำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานและใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายอ้างอิง

9. การวัดปริมาณ phenolic

วัดปริมาณ phenolic ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay ตามวิธีการทดลองของ Karimi et al. (2016) โดยนำสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ 10% (v/v) Folin-Ciocalteu reagent 0.5 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที เติมสารละลาย 7.5% (w/v) Na_2CO_3 0.4 มิลลิลิตร ผสมกันและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยการทำการฟมาตรฐานเตรียมจากสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 2.0-0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

10. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดหยาบและการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อ (MBC)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Broth microdilution ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Parvekar et al. (2020) โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* และ *Pseudomonas aeruginosa* บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ *Pseudomonas fluorescens* บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ $0.5-1.0 \times 10^6$ โดยเกลี่ยเชื้อลงในสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl เทียบความเข้มข้นของสารละลายเซลล์เท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml และนำไปเจือจางในอาหาร

Mueller Hinton Broth (MBH) ในอัตราส่วน 1:200 แล้วเตรียมสารสกัดหยาบความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมสารสกัดหยาบ 200 มิลลิกรัม จาก Ethyl acetate และ Methanol ใช้ตัวทำละลาย DMSO ส่วนสารสกัดหยาบจากน้ำใช้น้ำเป็นตัวละลาย ปริมาณ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท 96 หลุม จำนวน 8 หลุม และดูดสารสกัดหยาบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และทำ Two-fold serial dilution โดยดูดถ่ายสารจากหลุมที่ 1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไปสู่หลุมที่ 2 และทำเหมือนกันไปที่หลุมที่ 3-8 จนหลุมที่ 8 ให้ดูดสารปริมาตร 50 ไมโครลิตรทิ้ง โดยใช้น้ำ สารละลาย Chloramphenicol (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ DMSO เป็นชุดควบคุม และปิดฝาไมโครเพลทให้แน่นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยกเว้น *Pseudomonas fluorescens* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย Resazurin ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยกเว้น *Pseudomonas fluorescens* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งอ่านค่าและบันทึกผลจากการดูสีที่เปลี่ยนของสารละลาย Resazurin จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู สีน้ำเงินคือไม่มีเชื้อ และสีชมพูคือมีเชื้อเจริญเติบโต โดยค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่ไม่มีการเปลี่ยนสีของสารละลาย Resazurin

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อ (minimal bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดหยาบ ด้วยวิธี drop plate ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Parvekar et al. (2020) โดยเมื่อบันทึกค่า MIC ให้หยดอาหารที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโตจากการหาค่า MIC ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยกเว้น *Pseudomonas fluorescens* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง อ่านค่าและบันทึกผลจากการดูการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยค่า MBC คือค่าของความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ

11. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC) ของสารสกัด หยาบและ การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อ (MFC)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดหยาบ ด้วยวิธี Broth microdilution ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Richter et al. (2005) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Candida albicans* บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง และเชื้อ *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Fusarium solani* และ *Trichoderma harzianum* บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง ทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายสปอร์โดยเกลี่ยเชื้อสปอร์ในสารละลาย Tween 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เทียบความเข้มข้นของสารละลายสปอร์เท่ากับ McFarland standard No. 0.5 (ปริมาณเชื้อประมาณ 10^5 CFU/ml) และเตรียมสารสกัดหยาบความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมสารสกัดหยาบ 200 มิลลิกรัม จาก Ethyl acetate และ Methanol ใช้ตัวทำละลาย DMSO ส่วนสารสกัดหยาบจากน้ำใช้น้ำเป็นตัวละลาย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท 96 หลุม จำนวน 8 หลุม และดูดสารสกัดหยาบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และทำ Two-fold serial dilution โดยดูดถ่ายสารจากหลุมที่ 1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไปสู่หลุมที่ 2 และทำเหมือนกันไปที่หลุมที่ 3-8 จนหลุมที่ 8 ให้ดูดสารปริมาตร 50 ไมโครลิตรทิ้ง โดยใช้น้ำ สารละลาย Amphotericin B (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ DMSO เป็นชุดควบคุม และปิดฝาไมโครเพลทให้แน่นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย Resazurin ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งอ่านค่าและบันทึกผลจากการดูสีที่เปลี่ยนของสารละลาย Resazurin จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู สีน้ำเงินคือไม่มีเชื้อ และสีชมพูคือมีเชื้อเจริญเติบโต โดยค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่ไม่มีการเปลี่ยนสีของสารละลาย Resazurin

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อ (Minimum fungicidal concentration, MFC) ของสารสกัดหยาบ ด้วยวิธี drop plate ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Sukmawati et al. (2018) โดยเมื่อบันทึกค่า MIC แล้ว หยดอาหารที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโตจากการหาค่า MIC ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการ

ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง อ่านค่าและบันทึกผลจากการดูการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยค่า MFC คือค่าของความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ

12. การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ตามวิธีการทดลองของ Butkhup et al. (2018) โดยผสมสารละลาย DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine) ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ใน ethanol ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ให้เข้ากันดีและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที และนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และคำนวณค่าการยับยั้งสารอนุมูลอิสระโดยใช้สมการ % Inhibition = $[(Ac-(As-Ab))/ Ac] \times 100$ (เมื่อ Ac หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุม As หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง และ Ab หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่เป็น Blank)

13. การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay ตามวิธีการทดลอง Xiao et al. (2020) โดยเตรียมสารละลาย ABTS+ จากสารละลาย ABTS ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย Potassium persulfate ที่ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 บ่มไว้ที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้ และนำสารละลาย ABTS+ มาเจือจางใน acetic acid buffer pH 4.5 ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 743 นาโนเมตร ให้ได้ค่า 0.7 แล้วผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับสารละลาย ABTS+ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 7 นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 743 นาโนเมตร และคำนวณค่าการยับยั้งสารอนุมูลอิสระโดยใช้สมการ % Inhibition = $[(Ac-(As-Ab))/ Ac] \times 100$ (เมื่อ Ac หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุม As หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง และ Ab หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่เป็น Blank)

14. การทดสอบการต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชัน FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power assay)

การทดสอบการต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชัน FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power assay) ตามวิธีการทดลองของ Fernandes et al. (2016) โดยเตรียมสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 3.4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร และคำนวณค่าการยับยั้งสารอนุมูลอิสระโดยใช้สมการ %inhibition = $[(As-Ab) - Ac/(As-Ab)] \times 100$ (เมื่อ Ac หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุม As หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง และ Ab หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่เป็น Blank)

15. การทดสอบการต้านเบาหวาน

ทดสอบการต้านเบาหวานด้วยวิธีการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ตามวิธีการทดลองของ Chamika et al. (2021) โดยเตรียมสารละลายเอนไซม์อะไมเลสความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 0.02 M sodium phosphate buffer pH 6.9 และเติมสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมและบ่มในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และเติมสารละลายแบ่งความเข้มข้นร้อยละ 1 ใน 0.02 M sodium phosphate buffer pH 6.9 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม dinitrosalicylic acid color reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที และปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นเพื่อเจือจางปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งสารควบคุมที่ใช้คือสารละลาย 0.02 M sodium phosphate buffer pH 6.9 และการทำกราฟมาตรฐานใช้สารละลายมาตรฐานคือ สารละลาย Acarbose ความเข้มข้น 100-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสโดยสมการ %inhibition = $(A_{blank} - (A_{sample}/A_{blank})) \times 100$ (เมื่อ A_{blank} หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุม A_{sample} หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง)

16. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโคฟาจ Raw 264.7 ดัดแปลงตามวิธีของ Taechowisan et al. (2010) โดยเตรียมเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโคฟาจ Raw264.7 ในไมโคเพลท 96 หลุม โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 penicillin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ streptomycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Amphotericin B ที่ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) เข้มข้น 5% เวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อครบเวลาดูดอาหาร RPMI 1640 เก่าออก และเติมสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติมสาร liposaccharide (LPS) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) เข้มข้น 5% เวลา 48 ชั่วโมง และหลังจากนั้นใส่อาหารที่มี Griess reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 15 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยการทำกราฟมาตรฐานเตรียมจากสารละลายโซเดียมไนไตรตความเข้มข้น 0-250 ไมโครโมลาร์

17. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้วิธี MTT assay ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Taechowisan et al. (2020) โดยเตรียมเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโคฟาจ Raw 264.7 ในอาหาร RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 penicillin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร streptomycin sulfate ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Amphotericin B ที่ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ที่ความเข้มข้น 5% ทดสอบโดยนำเซลล์ที่เลี้ยงลงหลุม 96 well-plate โดยเซลล์มีความเข้มข้นจำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อหลุม และแต่ละหลุมมีอาหาร RPMI 1640 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มข้ามคืน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ที่ความเข้มข้น 5% เตรียมสารละลายสารสกัดในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) และบ่มเซลล์กับสารละลายสารสกัดแต่ละความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 156.25, 312.5, 625 และ 1250 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังครบ 24 ชั่วโมง นำอาหารที่มีสารสกัดออกก่อนและล้างเซลล์
 หนึ่งครั้งก่อนที่จะเติมอาหาร RPMI ปริมาตร 100 ไมโครลิตรที่มี 5- (4, 5-Dimethylthiazol 2-yl)-2,
 5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ
 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดอาหารทิ้งแล้วละลายฟอร์มาซันสีน้ำเงินซึ่งก่อรูปในเซลล์
 ด้วย DMSO ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วัดความหนาแน่นของแสงที่ 570 นาโนเมตร การวัดความ
 เข้มข้นที่จำเป็นสำหรับการยับยั้ง 50% (IC₅₀) โดยคำนวณได้จากสมการ percentage (%) of cell
 viability = (A570 of treated cells/A570 of control cells) x 100

18. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อไรทะเล (brine shrimp cytotoxicity bioassay)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีการใช้ไรทะเล (brine shrimp cytotoxicity
 bioassay) ดัดแปลงตามวิธีการทดลองของ Wickramaratne et al. (2016) โดยเตรียมการฟักตัว
 ของไรทะเล (brine shrimp) ตามวิธีการทดลองของ Wakawa (2017) นำ Artemia salina cysts
 ปริมาณ 1.5 กรัม ใส่ลงในภาชนะที่บรรจุน้ำทะเลที่ผ่านการกรอง ปริมาตร 1 ลิตร ติดตั้งปั๊มลมเข้ากับ
 น้ำเพื่อเติมอากาศให้ซีสต์ รวมถึงการติดตั้งหลอดฟลูออเรสเซนต์เพื่อให้แสงสว่าง โดยอุณหภูมิอยู่
 ระหว่าง 27-29 องศาเซลเซียส หลังจาก 48 ชั่วโมงของการฟักตัว ไรทะเลจะเริ่มว่ายน้ำอยู่บริเวณ
 ด้านล่างของภาชนะ แล้วนำไปทดสอบทางชีวภาพ

เตรียมสารสกัดละลายในสารละลาย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และละลายในน้ำ
 ทะเลเทียมโดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 78.125-1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดที่เตรียม
 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม เตรียมไรทะเลจำนวน 10 ตัว และนำไมโคร
 เพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย positive control ของการ
 ทดลองคือสารละลาย Potassium dichromate ในน้ำทะเลเทียมที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 125-1000
 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนับจำนวนไรทะเลที่รอดชีวิต โดยจำนวนไรทะเลที่รอดนำมาพลอตกราฟ
 เทียบกับความเข้มข้นของสารสกัดแล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่จำเป็นสำหรับการยับยั้ง 50%
 (IC₅₀) โดยคำนวณได้จากสมการ percentage (%) of cell viability = (จำนวนไรทะเลที่รอดชีวิต/
 จำนวนไรทะเลทั้งหมด) x 100

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อไรทะเลได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (เลขที่คำขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์ U1-08536-2562)

19. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC-MS (Gas chromatography-mass spectroscopy) ตัดแปลงตามวิธีของ Ramos et al. (2018)

การวิเคราะห์ GC-MS ด้วยเครื่อง TRACE 1310 Gas Chromatograph (Thermo Scientific) โดยใช้คอลัมน์ TG-5 SILMS (0.25 ไมโครเมตร x 30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร) โดยใช้ฮีเลียมเป็น carrier gas ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร (ทั้งแบบ split ที่อัตราส่วน 1:10 และแบบไม่ split) ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส สำหรับการฉีดสารเข้าเครื่องและใช้อุณหภูมิที่อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และเพิ่มทุก ๆ 5 องศาเซลเซียสต่อ นาที จนเป็น 120 องศาเซลเซียส ค้างไว้เป็นเวลา 2 นาที และเพิ่มทุก ๆ 5 องศาเซลเซียสต่อ นาที จนเป็น 250 องศาเซลเซียส และค้างไว้เป็นเวลา 2 นาที ใช้ ionizing energy สำหรับ mass spectrometer ที่ 70 eV ที่ acquisition mass range จาก 45-700 a.m.u. โดยใช้เวลาประมาณ 40 นาที สเปกตรัมของสารประกอบถูกเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของสเปกตรัมของสารประกอบที่รู้จักซึ่งจัดเก็บไว้ในไลบรารี GC-MS โดยใช้การค้นหาจากฐานข้อมูลของ National Institute of Standards and Technology (NIST)

20. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองถูกวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี one-way ANOVA และ Turkey's test ด้วยโปรแกรมสถิติ JASP เวอร์ชัน 0.16.3.0

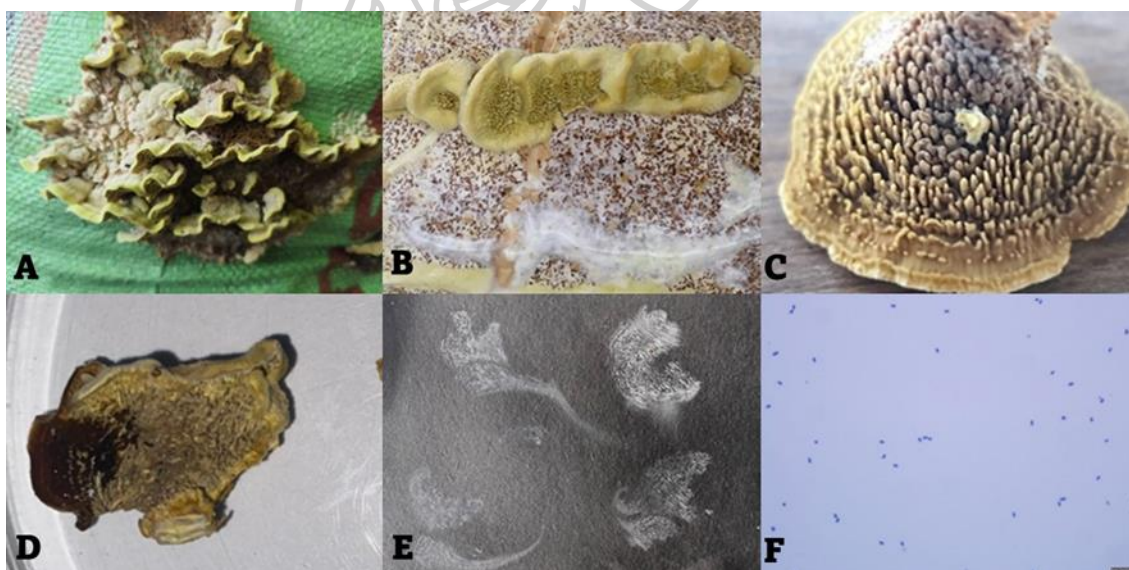
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ด

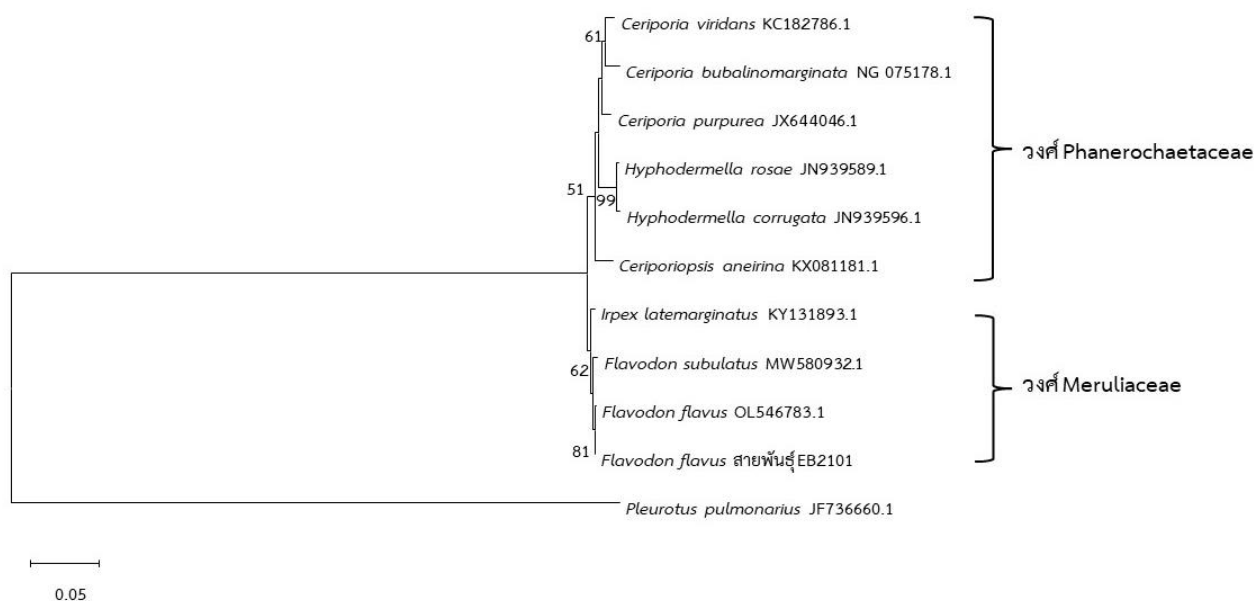
จากการเก็บตัวอย่างเห็ด polypore และทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่า เห็ดไอโซเลต EB2101 ที่เก็บตัวอย่างจาก ต. มาบแค อ. เมือง จ. นครปฐม (13.893224, 100.071816) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้

ดอกเห็ดมีลักษณะราบแนบติดไม้และมีบางส่วนยื่นออกมา (effused-reflexed) หรือราบแนบติดกับไม้ (resupinate) มีสีเหลือง-สีน้ำตาล เนื้อเห็ดมีลักษณะเหนียวคล้ายหนัง มีสีเหลือง-สีน้ำตาล หนาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ทำปฏิกิริยากับ 10% KOH ให้สีน้ำตาลเข้ม ไฮเมนเนียมมีลักษณะคล้ายซี่ฟัน (hydroid) มีสีเหลืองเข้ม-สีน้ำตาล ภาพพิมพ์สปอร์มีสีขาว สปอร์รูปร่างรี ขนาด $1.31-3.11 \times 3.90-5.89$ ไมโครเมตร ไม่มีสี ผิวเรียบ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 เห็ด *Flavodon flavus* สายพันธุ์ EB2101 A.) ดอกเห็ดที่มีลักษณะ effused-reflexed B.) ดอกเห็ดที่มีลักษณะ resupinate C.) ไฮเมนเนียม D.) ดอกเห็ดเมื่อทำปฏิกิริยากับ 10% KOH E.) ภาพพิมพ์สปอร์ F.) สปอร์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า

เมื่อทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์แล้วเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว MCM เป็นเวลา 7 วัน นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นเทมเพลตสำหรับปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกบริเวณ 28s rDNA และ ITS และหาลำดับเบส เมื่อเทียบลำดับเบสของกรดนิวคลีอิกบริเวณ 28s rDNA กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า เห็ดไอโซเลต EB2101 มีความใกล้เคียงกับเห็ด *Flavodon flavus* (Klotzsch) Ryvarden ด้วยค่า % identity ร้อยละ 99.85 และใกล้เคียงกับเห็ดในวงศ์ Meruliaceae (ภาพที่ 2) เมื่อเทียบลำดับเบสของกรดนิวคลีอิกบริเวณ ITS กับเห็ด *Flavodon flavus* (Accession No. MN888947.1) และ *Irpex lacteus* (Accession No. KC570335.1) พบว่า มีค่า % identity ร้อยละ 30.7 และ 30.4 ตามลำดับ (ภาพที่ 3) เมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์ EB2101 พบว่าตรงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด *Flavodon flavus* (Klotzsch) Ryvarden ที่รายงานโดย Saha et al. (2018) และ Gore and Mali (2021) อธิบายไว้



ภาพที่ 2 phylogenetic tree จากการเปรียบเทียบลำดับกรดนิวคลีอิกของ 28s rDNA ของเห็ด โดยใช้โปรแกรม MEGA 11

F1.	CCATCGCCAAGCCTTCTTTTAGGTTTTCCACAGAGCGTTCTAGATAAGGAACCAAAAACA	816
F2	-----	269
I.	-----	234
F1.	GCTTCTAATACAGATCCCTACAATTTACACCAAGGGATTTCTTGGCTTCAGCATCAGTA	876
F2	-----ATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA	312
I.	-----ATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	277
F1.	AGAAATCACAGTAATTTTCATCGTTAAATTTGTTTTGAGAATCCCGGTAATCATGCAATAT	936
F2	AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT	372
I.	AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT **** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	337
F1.	TGGAATGCTCCATAGATTTAGCTTTATTCCGAGTTATCTTCCCATTTCTTTCTTTTGTAG	996
F2	TTGAACGCACCTTGCACTCCTTGGTATTCCGAGGAGTATGCCTGTTGAGTCTCATGGTA	432
I.	TTGAACGCACCTTGCACTCCTTGGTATTCCGAGGAGTATGCCTGTTGAGTCTCATGGTA *	397
F1.	TCACCAAC-TCGAACTTTGAGAGGGCATCACAGA--GGCACCA-----GGTTGTCC-	1045
F2	TTCTCAACCCCTAAATTTTCTAGTGAAGATTTGGTGGGCTTGGACTTGGAGGTTGTGTT	492
I.	TTCTCAACCCCTAAATTTTCTAGTGAAGATTTGGTGGGCTTGGACTTGGAGGTTGTGTT *	457
F1.	-----GTGCCAAGACGGGATTGTCAACCTTTAGGTTGTTCCATTC	1086
F2	GGCTCTCGCTAGTTCGACTCCTCTGAAATACATTAGTGTGAACCTTACGGATCG-CCTTCA	551
I.	GGCTCTCGCTAGTTCGACTCCTCTGAAATACATTAGTGTGAACCTTACGGATCG-CCTTCA *	516
F1.	CCGCAGGGATTGTGCACGGTCTGCCGGGGAAAACACTTCTTTAAATT-CTACTCCAACG	1145
F2	GTGTGATAATTATCTGCGCTGTGGTG--GTGAAGTATTTATGTATTCACGCTTCTAACC	609
I.	GTGTGATAATTATCTGCGCTGTGGTG--GTGAAGTATTTATGTATTCACGCTTCTAACC *	574
F1.	CCCAA-----TTATTTCCAGTTTTTAA-----TTTTTTGCTTTTCCCGC	1185
F2	GTCTCTCCTTCGAGACAAATACTTTGACAATCTGAGCTCAAATCAGGTAGRWYACCCGC	669
I.	GTCTCTCCTTCGAGACAAATACTTTGACAATCTGAGCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGC *	634
F1.	TTCACTCGCAGTTCTATAAAGGGAATTTCTGGGAAGTTGTTTTAGTTC	1234
F2	TGAACCTAACATTCAAAAACCCCGAGGG--AAAAAGGAAGAAA---	712
I.	TGAACCTAACG----- * * * *	645

ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบเพื่อแสดงบริเวณอนุรักษ์ของกรดนิวคลีอิกบริเวณ ITS ของ F1.) เห็ด *Flavodon flavus* EB2101 F2.) เห็ด *Flavodon flavus* (Accession No. MN888947.1) และ I.) *Irpex lacteus* (Accession No. KC570335.1) สัญลักษณ์ “-” แสดง บริเวณที่ขาดหายไป (Gap) และ สัญลักษณ์ “*” แสดง บริเวณที่อนุรักษ์ของลำดับกรดนิวคลีอิกบริเวณ ITS ของเห็ดทั้ง 3 ชนิด

2. สารสกัดหยาบจากเห็ด *Flavodon flavus*

เมื่อนำเส้นใยและดอกเห็ดมาอบให้แห้ง บดให้เป็นผงและนำมาสกัดลำดับส่วนด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังขั้วสูง คือ เอทิลอะซิเตท เมทานอล และน้ำ โดยใช้อัตราส่วนของน้ำหนักผงแห้งกับปริมาณตัวทำละลายคือ 1:12.5 พบว่า สารสกัดเห็ดมีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกัน ซึ่งสารสกัดจากเอทิลอะซิเตทมีลักษณะคล้ายครีม สีน้ำตาลอ่อน สารสกัดจากเมทานอลมีลักษณะหนืดข้น สีน้ำตาล

เข้มข้น และสารสกัดจากน้ำมีลักษณะเป็นผงแห้ง สีน้ำตาลเข้ม โดยปริมาณของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยมีค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดสูงสุด มีค่าเท่ากับร้อยละ 28.73±8.47 และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยมีค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดน้อยที่สุด มีค่าเท่ากับร้อยละ 1.79±0.27 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัด

สารสกัด	ลักษณะของสารสกัด	ปริมาณสารสกัด (ร้อยละ)
เอทิลอะซิเตทจากเส้นใย (ME)	เนื้อครีม น้ำตาลอ่อน	1.79±0.27 abc
เมทานอลจากเส้นใย (MM)	เนื้อหนืด สีน้ำตาลเข้ม	28.73±8.47 d
น้ำจากเส้นใย (MW)	ผงแห้ง สีน้ำตาลเข้ม	12.25±5.04 bc
เอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ด (FBE)	เนื้อครีม น้ำตาลอ่อน	2.72±0.38 a
เมทานอลจากดอกเห็ด (FBM)	เนื้อหนืด สีน้ำตาลเข้ม	6.29±1.84 ab
น้ำจากดอกเห็ด (FBW)	ผงแห้ง สีน้ำตาลเข้ม	5.54±0.57 abc

สัญลักษณ์ a b c และ d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากเห็ด *Flavodon flavus*

จากการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid method โดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานพบว่า สารสกัดทั้ง 6 ตัวอย่าง มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดระหว่าง 0.59-12.37 mg glucose/mg of extract ซึ่งสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุดเท่ากับ 12.37±1.80 mg glucose/mg of extract และสารสกัดน้ำจากดอกเห็ดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตน้อยสุดเท่ากับ 0.59±0.19 mg glucose/mg of extract (ตารางที่ 3)

4. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดหยาบจากเห็ด *Flavodon flavus*

จากการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS) โดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานพบว่า สารสกัดทั้ง 6 ตัวอย่าง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่าง 0.03-2.15 mg glucose/mg of extract ซึ่งสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 2.15±1.37 mg glucose/mg of extract และสารสกัดน้ำจากเส้นใยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยสุดเท่ากับ 0.03±0.01 mg glucose/mg of extract (ตารางที่ 3)

5. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากเห็ด *Flavodon flavus*

จากการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานพบว่า สารสกัดทั้ง 6 ตัวอย่าง มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.04-0.09 mg GAE/mg of extract ซึ่งสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ 0.09 ± 0.01 mg GAE/mg of extract และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดน้อยสุดเท่ากับ 0.04 ± 0.01 mg GAE/mg of extract (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณฟีนอลิก

สารสกัด	ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (mg glucose/mg of Extract)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg glucose/mg of Extract)	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/mg of Extract)
เอทิลอะซิเตทจากเส้นใย (ME)	7.25 ± 1.39 bc	2.15 ± 1.37 e	0.04 ± 0.01 fgi
เมทานอลจากเส้นใย (MM)	12.37 ± 1.8 d	2.06 ± 0.58 e	0.09 ± 0.01 gh
น้ำจากเส้นใย (MW)	0.82 ± 0.14 a	0.03 ± 0.01 e	0.05 ± 0.01 fgi
เอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ด (FBE)	5.68 ± 0.85 b	1.47 ± 0.13 e	0.07 ± 0.02 g
เมทานอลจากดอกเห็ด (FBM)	7.11 ± 3.30 bc	1.67 ± 1.91 e	0.09 ± 0.01 gh
น้ำจากดอกเห็ด (FBW)	0.59 ± 0.19 a	0.04 ± 0.00 e	0.04 ± 0.02 gi

สัญลักษณ์ a-j แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Broth microdilution โดยใช้แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบทั้งหมด 8 ชนิด ในการทดสอบและใช้ความเข้มข้นของสารสกัดสูงสุดเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ด และสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* และ *B. cereus* โดยสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ด และสาร

สกัดเมทานอลจากดอกเห็ดและสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของแบคทีเรีย *B. subtilis* เท่ากับ 0.39, 0.39, 0.39 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ด และสารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด และเส้นใยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของแบคทีเรีย *B. cereus* เท่ากับ 3.25, 6.25, 6.25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดเห็ด

เชื้อแบคทีเรีย	ค่า MIC (mg/ml)					
	เอทิลอะซิเตทจากเส้นใย (ME)	เมทานอลจากเส้นใย (MM)	น้ำจากเส้นใย (MW)	เอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ด (FBE)	เมทานอลจากดอกเห็ด (FBM)	น้ำจากดอกเห็ด (FBW)
แบคทีเรียแกรมบวก						
<i>Bacillus cereus</i> (TISTR2327)	3.125	12.5	ND	6.25	6.25	ND
<i>Bacillus subtilis</i> (TISTR008)	0.39	12.5	ND	0.39	0.39	ND
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (TISTR518)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> (TISTR885)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
แบคทีเรียแกรมลบ						
<i>Salmonella thyphimurium</i> (TISTR292)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> (TISTR887)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (TISTR1287)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (TISTR358)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND (Not detected) หมายถึง ไม่พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

และจากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียพบว่า มีสารสกัด 3 ตัวอย่าง คือ สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ด และสารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (MBC) เท่ากับ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีสารสกัด 2 ตัวอย่าง คือ สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและสารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (MBC) เท่ากับ 6.25 และ 10.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดหยาบ

เชื้อแบคทีเรีย	ค่า MBC (mg/ml)					
	เอทิลอะซิเตทจากเส้นใย (ME)	เมทานอลจากเส้นใย (MM)	น้ำจากเส้นใย (MW)	เอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ด (FBE)	เมทานอลจากดอกเห็ด (FBM)	น้ำจากดอกเห็ด (FBW)
แบคทีเรียแกรมบวก						
<i>Bacillus cereus</i> (TISTR2327)	6.25	ND	ND	6.25	6.25	ND
<i>Bacillus subtilis</i> (TISTR008)	6.25	ND	ND	ND	10.41	ND
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (TISTR518)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> (TISTR885)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
แบคทีเรียแกรมลบ						
<i>Salmonella thyphimurium</i> (TISTR292)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> (TISTR887)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (TISTR1287)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (TISTR358)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND (Not detected) หมายถึง ไม่พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

7. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (Minimal fungicidal concentration: MFC)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี Broth microdilution และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ โดยใช้เชื้อราทดสอบทั้งหมด 6 ชนิด (*Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์ TISTR3628, *Aspergillus niger* สายพันธุ์ TISTR3205, *Candida albicans* สายพันธุ์ TISTR5239, *Fusarium solani* สายพันธุ์ TISTR3436, *Trichoderma harzainum* และ *Penicilium sp.* สายพันธุ์ EB1809) ในการทดสอบพบว่า สารสกัดทั้ง 6 ตัวอย่าง ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและฆ่าเชื้อราเมื่อใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดหยาบ

เชื้อรา	ค่า MIC (mg/ml)					
	เอทิลอะซิเตท	เมทานอล	น้ำจากเส้น	เอทิลอะซิเตท	เมทานอล	น้ำจากดอก
	จากเส้นใย	จากเส้นใย	ใย (MW)	จากดอกเห็ด	จากดอกเห็ด	เห็ด (FBW)
	(ME)	(MM)		(FBE)	(FBM)	
<i>Aspergillus fumigatus</i> (TISTR3628)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Aspergillus niger</i> (TISTR3205)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Candida albicans</i> (TISTR5554)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Fusarium solani</i> (TISTR3436)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Trichoderma harzainum</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Penicilium sp.</i> (EB1809)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND (Not detected) หมายถึง ไม่พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

8. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเห็ด *Flavodon flavus*

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารสกัดทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดน้ำจากเส้นใยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 87.60 ± 3.26 และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ด มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 37.71 ± 5.92 (ตารางที่ 6)

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay ของสารสกัดทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดเมทานอลจากเส้นใยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 33.47 ± 3.58 และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ดมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 5.13 ± 2.04 (ตารางที่ 6)

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชัน FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power assay) ของสารสกัดทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดน้ำจากเส้นใยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 9.60 ± 0.03 และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ดมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 7.04 ± 0.72 (ตารางที่ 7)



ตารางที่ 7ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัด

สารสกัด	วิธี DPPH (%inhibition)	วิธี ABTS (%inhibition)	วิธี FRAP (%inhibition)
เอทิลอะซิเตทจากเส้นใย (ME)	64.57±12.56 bcd	30.44±1.40 k	9.51±0.09 nop
เมทานอลจากเส้นใย (MM)	65.03±8.62 bcde	33.47±3.58 k	9.56±0.04 nopq
น้ำจากเส้นใย (MW)	87.60±3.26 cef	24.32±12.58 ijk	9.60±0.03 nopq
เอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ด (FBE)	37.71±5.92 a	5.13±2.04 h	7.04±0.72 m
เมทานอลจากดอกเห็ด (FBM)	49.95±10.05 ab	20.88±4.94 i	9.10±0.15 n
น้ำจากดอกเห็ด (FBW)	74.57±11.85 bc	22.99±2.19 ij	9.51±0.08 no
Trolox in DMSO (0.05 mg/ml)	95.86 cfg		
Trolox in ethanol (0.25 mg/ml)	96.35 cfg		
Trolox in DMSO (1 mg/ml)		99.56 l	97.36 r
Trolox in ethanol (0.5 mg/ml)		100 l	98.56 r

สัญลักษณ์ a-r แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

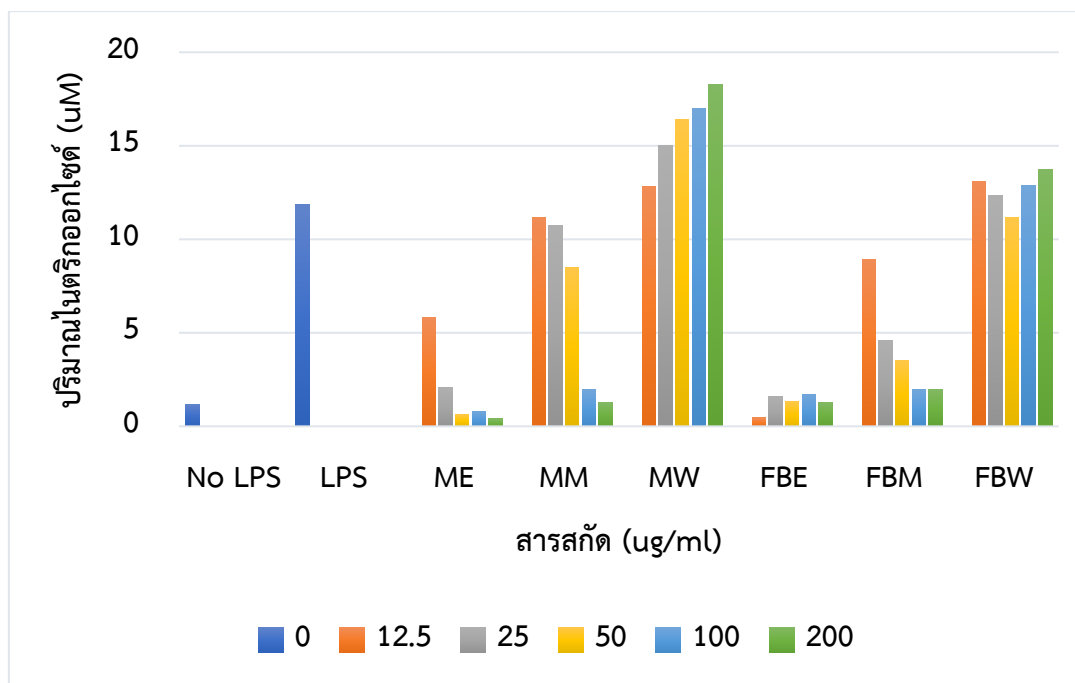
9. ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดหยาบจากเห็ด *Flavodon flavus*

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดหยาบจากเห็ด *F. flavus* โดยเทียบร้อยละการยับยั้งกิจกรรมแอลฟาอะไมเลสกับสารละลายอะคาร์โบสที่ใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน พบว่าสารสกัดทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ไม่มีฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากการทดสอบที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยอะคาร์โบสที่ละลายใน DMSO มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และอะคาร์โบสที่ละลายในน้ำกลั่น ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

10. ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบจากเห็ด *Flavodon flavus*

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคฟาจ Raw 264.7 โดยสารสกัดหยาบทั้ง 6 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ด และสารสกัดเมทานอล

จากเส้นใยและดอกเห็ด มีฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 107.25, 183.29, 36.75 และ 84.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดน้ำจากเส้นใยและดอกเห็ดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (ภาพที่ 4)

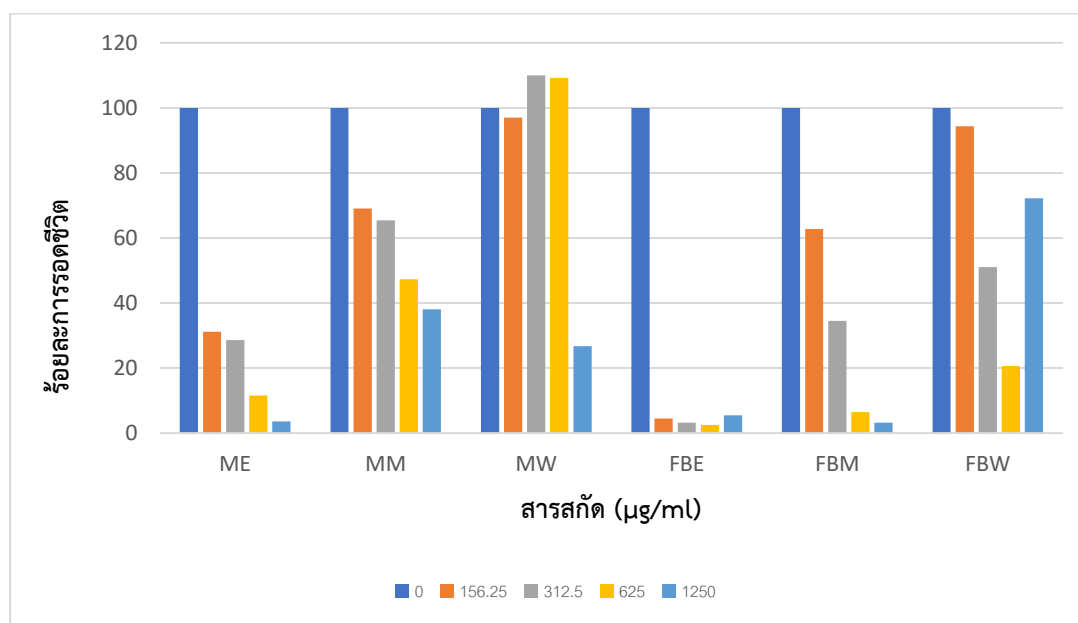


ภาพที่ 4 ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ผลิตโดยเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคฟาจ Raw 264.7 ในสภาวะที่ (1) ไม่มี LPS (2) มี LPS (3) มี LPS และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใย (ME) สารสกัดเมทานอลจากเส้นใย (MM) สารสกัดน้ำจากเส้นใย (MW) สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ด (FBE) สารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด (FBM) และสารสกัดน้ำจากดอกเห็ด (FBW) ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

11. ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากเห็ด *Flavodon flavus*

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดทั้ง 6 ตัวอย่าง ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคฟาจ Raw 264.7 ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งวัดความสามารถของ mitochondrial enzyme ที่เปลี่ยน tetrazolium salt (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, MTT) สีเหลือง ไปเป็น formazan product ที่มีสีน้ำเงิน และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ด และสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและ

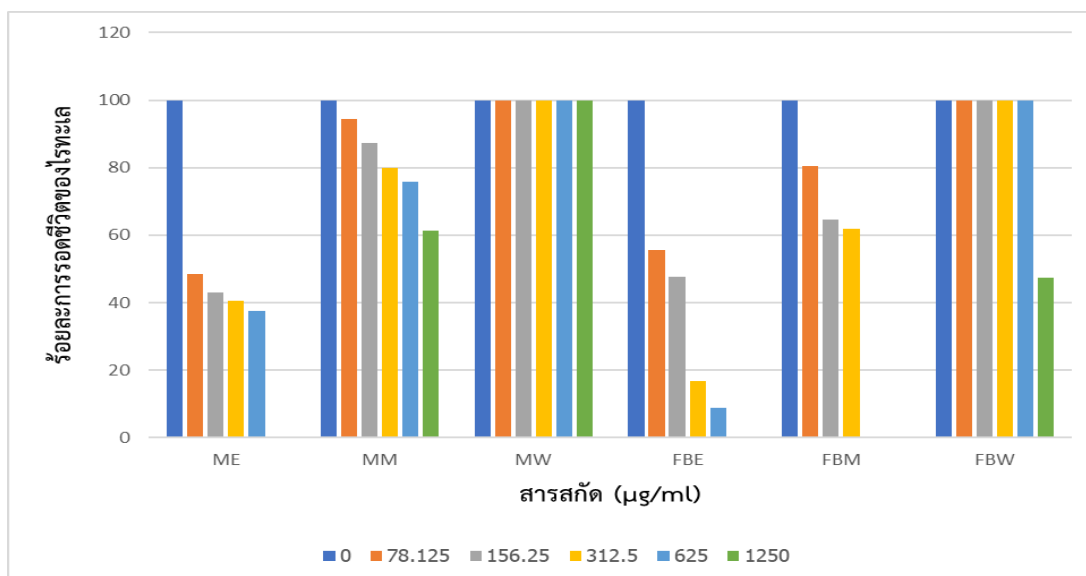
ดอกเห็ดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 103.60, 48.83, 746.51 และ 166.02 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดน้ำจากเส้นใยมีค่าเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 1250 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร และสารสกัดน้ำจากดอกเห็ดมีค่าเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 5)



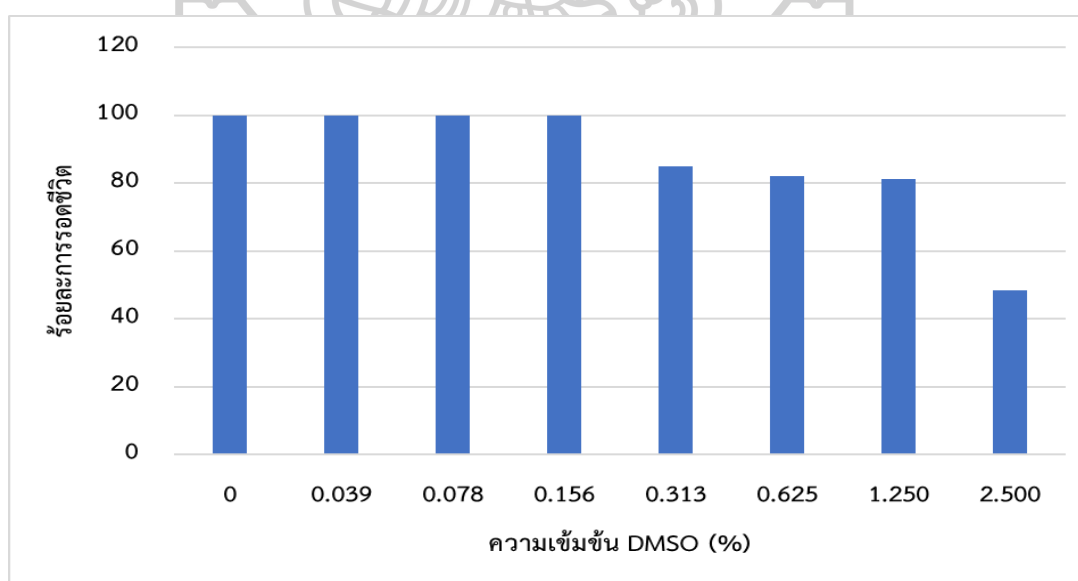
ภาพที่ 5 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคฟาจ Raw 264.7 ในสถานะที่มีสารสกัด เอทิลอะซิเตทจากเส้นใย (ME) สารสกัดเมทานอลจากเส้นใย (MM) สารสกัดน้ำจากเส้นใย (MW) สาร สกัดเอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ด (FBE) สารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด (FBM) และสารสกัดน้ำจาก ดอกเห็ด (FBW) ที่ความเข้มข้น 156.25-1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

12. ความเป็นพิษต่อไรทะเลของสารสกัดหยาบจากเห็ด *Flavodon flavus*

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดทั้ง 6 ตัวอย่างต่อไรทะเล พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ด และสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด มีความเป็นพิษต่อเซลล์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 178.95, 107.06, 1260.2 และ 307.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่า สารสกัดน้ำจากเส้นใยและดอกเห็ดไม่มีความเป็นพิษต่อไรทะเล (ภาพที่ 6) และในตัวทำละลาย DMSO มีความเป็นพิษต่อเซลล์ มีค่า IC_{50} เท่ากับความเข้มข้นร้อยละ 2.48 (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 6 ร้อยละการรอดชีวิตของไรทะเล ในสภาวะที่มีสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใย (ME) สารสกัดเมทานอลจากเส้นใย (MM) สารสกัดน้ำจากเส้นใย (MW) สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ด (FBE) สารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด (FBM) และสารสกัดน้ำจากดอกเห็ด (FBW) ที่ความเข้มข้น 0-1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร



ภาพที่ 7 ร้อยละการรอดชีวิตของไรทะเล ในสภาวะที่มีตัวทำละลาย DMSO ที่ร้อยละความเข้มข้น 0.039-2.5

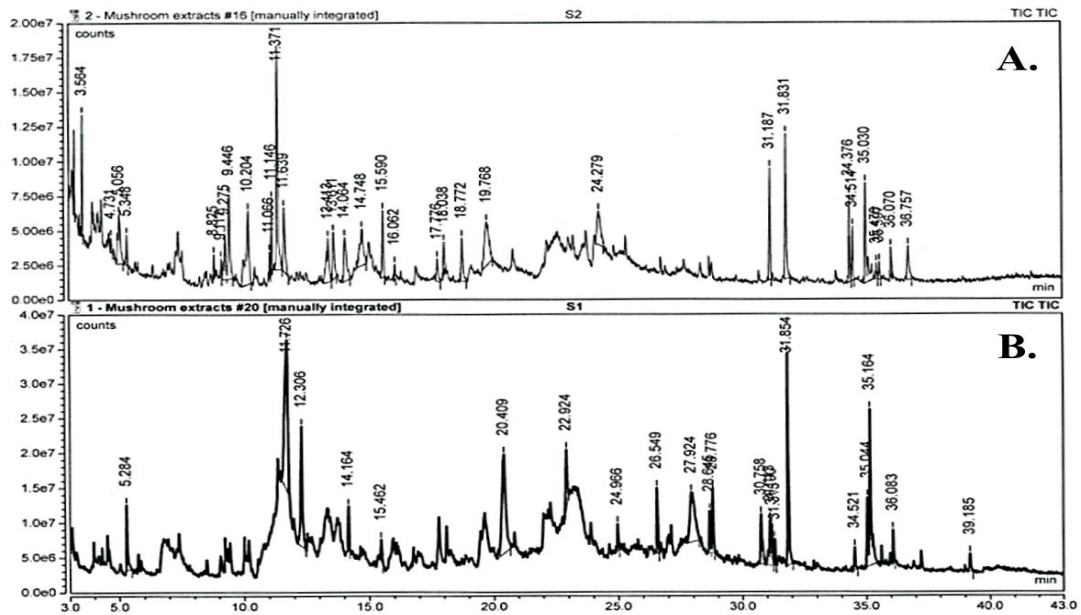
13. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC-MS (Gas chromatography-mass spectroscopy)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดด้วยวิธี GC-MS โดยการฉีดสารแบบไม่ split และ แบบ split 1:10

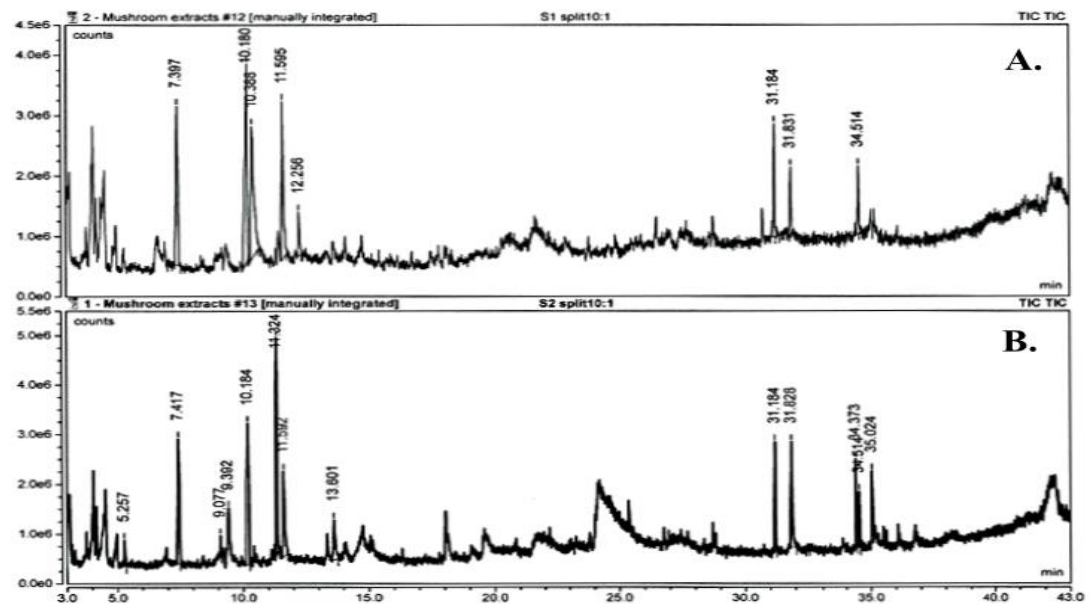
การวิเคราะห์แบบไม่ split พบว่า สารสกัดเมทานอลจากเส้นใยมีพีค (Peak) ขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 33 ชนิด และสารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ดมีพีค (Peak) ขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 22 ชนิด (ภาพที่ 8) โดยพบพีค (Peak) ขององค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกันของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด 4 ชนิด คือ (ก) 2(5H)-Furanone (ข) 2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy- (ค) Hexadecanoic acid, methyl ester และ (ง) 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- (ตารางที่ 8)

การวิเคราะห์แบบ split 1:10 พบว่า สารสกัดเมทานอลจากเส้นใยมีพีค (Peak) ขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 13 ชนิด และสารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ดมีพีค (Peak) ขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 8 ชนิด (ภาพที่ 9) โดยพบพีค (Peak) ขององค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกันของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด 4 ชนิด คือ (ก) Decane (ข) Undecane (ค) 2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy- และ (ง) Hexadecanoic acid, methyl ester (ตารางที่ 9)

โดยองค์ประกอบทางเคมีที่วิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS ของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด พบว่า สาร (ก) Oleic acid และ (ข) 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- มีฤทธิ์ต้านการเจริญแบคทีเรีย สาร (ก) 4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-Methyl (ข) 5-Hydroxymethylfurfural (ค) Vanilic acid (ง) Benzoic acid 4-hydroxy-3,5-dimethoxy- และ (จ) Oleic acid มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สาร (ก) Undecane (ข) Vanilic acid (ค) Benzoic acid 4-hydroxy-3,5-dimethoxy- และ (ง) trans-13-Octadecenoic acid มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ สาร (ก) Undecane (ข) Piperidine, 1-methyl- (ค) 5-Hydroxymethylfurfural และ (ง) Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)- มีฤทธิ์ต้านการเจริญต่อเซลล์ทดสอบ



ภาพที่ 8 โครมาโตแกรมของสารสกัดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS แบบไม่ split A.) สารสกัดเมทานอลจากเส้นใย B.) สารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด



ภาพที่ 9 โครมาโตแกรมของสารสกัดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS แบบ split 1:10 A.) สารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด B.) สารสกัดเมทานอลจากเส้นใย

ตารางที่ 8 องค์ประกอบเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดที่วิเคราะห์ด้วย GC-MS แบบไม่ split

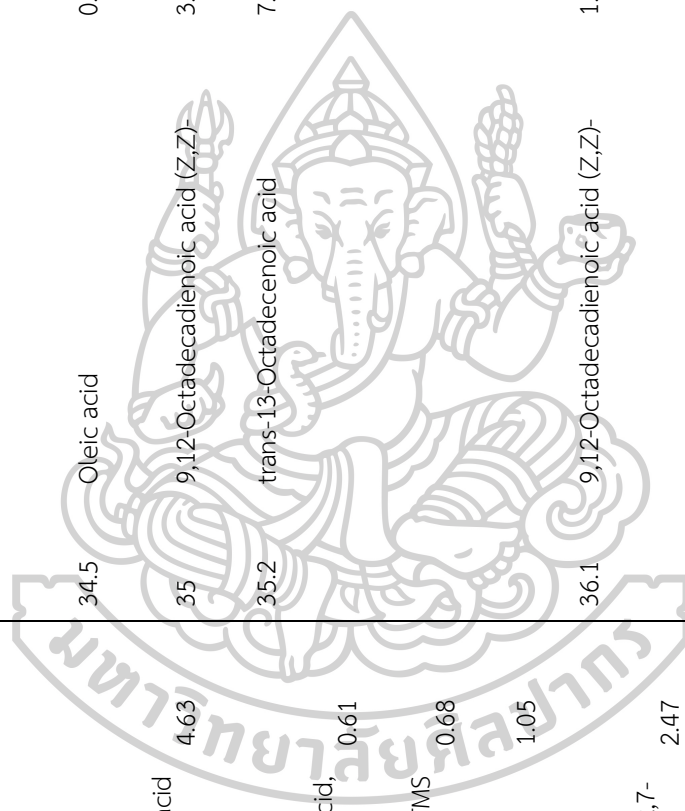
สารสกัดเมทานอลจากเส้นใย		สารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด		สูตรเคมี	คุณสมบัติ
เวลา (Rt)	ชนิดของสารประกอบ	%Area	เวลา (Rt) ชนิดของสารประกอบ		
3.564	Methane, trimethoxy-	2.21			
4.731	1-Methyl-1-(2-hydroxyethyl)-1-silacyclobutane	0.59			
5.056	Oxime-, methoxy-phenyl-	3.8			
5.348	2(5H)-Furanone	1.01	5.284 2(5H)-Furanone		สารระงับความทิว สารกดภูมิคุ้มกัน
8.825	D-Glucose, cyclic 1,2-ethanediyl mercaptal,pentaacetate	0.66			
9.117	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	0.51			
9.275	Cyclotrisiloxane,hexamethyl-	2			
9.446	Isovaleric acid, nonyl ester	5.5			
10.2	Undecane	5.03			ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ เป็นพิษต่อเซลล์
11.07	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-Methyl	0.67			ต้านอนุมูลอิสระ
11.15	1.5-Naphthalenediol	2.07			
11.37	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-Methyl	10.77			ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเจริญต่อเซลล์มะเร็ง

11.64	2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy-	4.15	11.726	2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy-	17.63	$C_4H_6O_3$
13.41	Cyclotetrasiloxane, octamethyl	2.48	12.306	5-Methoxypyrrrolidin-2-one	8.77	$C_5H_9NO_2$
13.61	5-Hydroxymethylfurfural	2.92				$C_8H_{24}O_4Si_4$
14.06	Ethyl(dimethyl)ethoxysilane	4.54	14.164	Propanedioic acid; phenyl-	1.8	$C_6H_6O_3$
14.75	L-Methionine, N-isopropylloxycarbonyl-, isopropyl ester	5.04	15.462	1-Methyl-1-n-octyloxy-1-silacyclobutane	1.11	$C_6H_{16}OSi$
15.59	5-(hydroxymethyl)-2-(dimethoxymethyl)furan	2.89				$C_9H_{18}O_4$
16.06	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	0.62				$C_{12}H_{26}OSi$
17.78	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	1.28				$C_8H_{12}O_4$
18.04	1-(Cyclohexylmethyl)-4-piperidylamine	1.49				$C_{12}H_{36}O_6Si_6$
18.77	4-Methyl(trimethylene)silyloxyoctane	2.69				$C_{10}H_{30}O_5Si_5$
19.77	Melezitose	7.74	20.409	Piperidine, 1-methyl-	15.2	$C_{12}H_{24}N_2$
			22.924	Vanillic acid	3.45	$C_{12}H_{26}OSi$
						$C_{18}H_{32}O_{16}$
						$C_6H_{13}N$
						$C_8H_8O_4$

มีความเป็นพิษ

ด้านอนุโมลิตีสระ ด้านการ

34.38	8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	3.2		$C_{19}H_{34}O_2$	
34.51	9-Octadecenoic (Z)-, methyl ester	1.97		$C_{19}H_{36}O_2$	
35.03	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	4.63	34.5		$C_{18}H_{34}O_2$
			Oleic acid		0.98
			35		
			9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-		3.15
			35.2		
			trans-13-Octadecenoic acid		7.19
35.48	8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	0.61		$C_{19}H_{34}O_2$	
35.6	1,25-Dihydroxyvitamin D3, TMS derivative	0.68		$C_{30}H_{52}O_3Si$	
36.07	13-Heptadecyn-1-ol	1.05		$C_{17}H_{32}O$	
36.76	1,8-Diazacyclotetradecane-2,7-dione	2.47	36.1		$C_{18}H_{32}O_2$
			9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-		1.4
			39.2		$C_{12}H_{22}N_2O_2$
			Ergotamine		0.89
					$C_{33}H_{35}N_5O_5$



35.024 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-

6.07

C₁₈H₃₂O₂ ต้านการเจริญแบคทีเรีย

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานของเห็ดไอโซเลท EB2101 พบว่า ดอกเห็ดมีลักษณะราบแนบติดไม้และมีบางส่วนยื่นออกมา (effused-reflexed) หรือราบแนบติดกับไม้ (resupinate) มีสีเหลือง-สีน้ำตาล เนื้อเห็ดมีลักษณะเหนียวคล้ายหนัง มีสีเหลือง-สีน้ำตาล หนาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ทำปฏิกิริยากับ 10% KOH ให้สีน้ำตาลเข้ม ไฮเมนเนียมมีลักษณะคล้ายซีฟีน (hydroid) มีสีเหลืองเข้ม-สีน้ำตาล ภาพพิมพ์สปอร์มีสีขาว สปอร์รูปร่างรี ขนาด $1.31-3.11 \times 3.90-5.89$ ไมโครเมตร ไม่มีสี ผิวเรียบ ซึ่งลักษณะสัณฐานวิทยาที่พบตรงกับลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ด *Flavodon flavus* (Klotzsch) Ryvar den ที่ Saha et al. (2018) พบในประเทศอินเดีย คือ ดอกเห็ดมีลักษณะราบแนบติดไม้และบางส่วนยื่นออกมา (effused-reflexed) สีเหลืองอมเทา ดอกเห็ดหนาประมาณ 1-3 มิลลิเมตร ไฮเมนเนียมลักษณะเป็นซีฟีน สีเหลืองอมเทา เมื่อทำปฏิกิริยากับ 10% KOH ให้สีน้ำตาลแดง สปอร์รูปร่างรี ผ้นบาง มีขนาด $3.66-6.33 \times 1.67-3.33$ ไมโครเมตร และรายงานของ Gore & Mali (2021) ที่พบในประเทศอินเดีย พบว่า ดอกเห็ดมีลักษณะราบแนบติดไม้และมีบางส่วนยื่นออกมา (effused-reflexed) หรือราบแนบติดกับไม้ (resupinate) ดอกเห็ดลักษณะเหนียว หนาประมาณ 0.8 เซนติเมตร สีเหลืองอมเทา ไฮเมนเนียมมีลักษณะเป็นซีฟีน สีเหลือง เขียว เทา สปอร์รูปร่างรี ผิวเรียบ ผ้นบาง ขนาด $4-7 \times 2.5-4$ ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังมีการพบเห็ด *F. flavus* ในประเทศศรีลังกา ซึ่งแยกได้จากในป่า (Fernando et al., 2016) พบในประเทศบราซิล ซึ่งแยกได้จากใบงุ่น (Brum et al., 2012) พบในประเทศเวียดนาม ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเล (Vu et al., 2018) และพบในป่าชายเลนจากประเทศไทย (Klaiklay et al., 2013) และเมื่อเทียบลำดับเบสของกรดนิวคลีอิกบริเวณ 28s rDNA และ ITS พบว่า ลำดับเบสของกรดนิวคลีอิกบริเวณ 28s rDNA ของเห็ดไอโซเลท EB2101 มีความใกล้เคียงกับเห็ด *Flavodon flavus* (Klotzsch) Ryvar den ด้วยค่า %identity ร้อยละ 99.85 เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และในการเทียบลำดับเบสของกรดนิวคลีอิกบริเวณ ITS ของเห็ดไอโซเลท EB2101 กับเห็ด *Flavodon flavus* (Accession No. MN888947.1) ด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่า มีค่า %identity ร้อยละ 30.7 โดยลำดับเบสของกรดนิวคลีอิกบริเวณ ITS เป็นบริเวณที่มักนำมาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อราอย่างแพร่หลาย (Schoch et al., 2012) เพราะเป็นส่วนที่มีลำดับเบสของกรดนิวคลีอิกที่ความแปรปรวนสูงทั้งในสปีชีส์เดียวกันและต่างกัน (James et al., 2001) และลำดับเบสของกรดนิวคลีอิกบริเวณ 28s rDNA เป็นบริเวณที่มักนำมาใช้ในการจำแนกเห็ด เช่น การจำแนกของเห็ด *Cladobotryum* sp. (Back et al., 2012) และการจำแนกเห็ด *Agaricus* sp. (Mitchell and Bresinsky, 1999)

จากการศึกษาของ Kumar and Goel (2019) พบว่า สารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านเบาหวาน ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจาก *F. flavus* พบฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลิกในเห็ด

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญแบคทีเรียของสารสกัดจาก *F. flavus* พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทและสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด สามารถต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* และ *B. subtilis* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kothiyal and Singh (2022) พบว่า สารสกัดเอทานอลและสารสกัดเมทานอลจากเห็ด *Gloeophyllum sepiarium* มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย *B. subtilis* เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยมีค่าโซนใส (Zone of inhibition) เท่ากับ 28.8 ± 0.86 และ 29.5 ± 0.85 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษากลไกการต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกที่แตกต่างกันของสารสกัดในอนาคต และจากการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC-MS ของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด มีสาร Oleic acid และสาร 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดจากเห็ด *F. flavus* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อศึกษาด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP เนื่องจากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแต่ละวิธีมีอนุมูลอิสระที่เป็นเป้าหมายแตกต่างกัน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการกำจัดอนุมูลอิสระประเภทไฮดรอกซิล โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะให้อะตอมไฮโดรเจนแก่ DPPH (สีม่วง) เกิดเป็น DPPH-H (สีเหลือง) (Munteanu and Apetrei, 2021) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เป็นการกำจัดอนุมูลอิสระประเภทเปอร์ออกซิล โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะให้อะตอมไฮโดรเจนแก่ ABTS+ (สีเขียว) เกิดเป็น ABTS (สีใส) (Henriquez et al., 2002) และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เป็นการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Fe^{3+} โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยให้อิเล็กตรอนแก่ Fe^{3+} -TPTZ (สีใส) เกิดเป็น Fe^{2+} -TPTZ (สีม่วง) (Munteanu and Apetrei, 2021) จากการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดด้วยวิธี GC-MS พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดอาจเป็นผลมาจากสาร (ก) 4H-Pyran-4-one,2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-Methyl (ข) -Hydroxymethylfurfural (ค) Vanilic acid (ง) Benzoic acid 4-hydroxy-3,5-dimethoxy- (จ) Oleic acid และ (ฉ) 5-Hydroxymethylfurfural

และในการศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานโดยการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดทั้ง 6 ตัวอย่าง จากเห็ด *Flavodon flavus* พบว่า สารสกัดทั้ง 6 ตัวอย่าง ไม่มีฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ซึ่งจากการศึกษาของ Shobana et al. (2009) พบว่า สารสกัดพินอลิกจากข้าวฟ่าง สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Pradeep and Sreerama (2018) พบว่า สารสกัดพินอลิกจากข้าวฟ่างหางหมาและข้าวฟ่างเม็ดเล็กมีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส และพบว่าสารสกัดจากข้าวฟ่างหางหมากับข้าวฟ่างเม็ดเล็กมีสารประกอบประเภทพินอลิกและฟลาโวนอยด์ เช่น Ferulic acids, caffeic acids, sinapic acids, luteolin และ kaempferol อยู่ จากการวิเคราะห์ทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดของ *F. flavus* ไม่พบสารประกอบเหล่านี้

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์พบว่า สารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทและสารสกัดน้ำจากเส้นใยและดอกเห็ด ตามลำดับ แต่พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบมากกว่าสารสกัดเมทานอลและสารสกัดน้ำจากเส้นใยและดอกเห็ดตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจากค่า IC_{50} ของฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ พบว่า ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทเป็นผลมาจากการตายของเซลล์ทดสอบ ในขณะที่ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเมทานอลน่าจะเป็นผลมาจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ด จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดด้วยวิธี GC-MS พบว่าฤทธิ์การต้านอักเสบของสารสกัดอาจเป็นผลมาจากสาร (ก) Undecane (ข) Vanilic acid (ค) Benzoic acid 4-hydroxy-3,5-dimethoxy- และ (ง) trans-13-Octadecenoic acid และสารสกัดน้ำจากเส้นใยและดอกเห็ดไม่มีฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ

และเมื่อพิจารณาผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อไรทะเลพบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทและสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด มีความเป็นพิษต่อไรทะเลเช่นเดียวกับผลความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ และสารสกัดน้ำจากเส้นใยและดอกเห็ด ไม่เป็นพิษต่อไรทะเลเหมือนกับเซลล์ทดสอบเช่นกัน

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดด้วยวิธี GC-MS พบว่า มีสารประกอบที่รายงานฤทธิ์ทางชีวภาพที่ตรงกันกับผลการทดลอง เช่น Dilika et al.

(2000) รายงานว่า สาร Oleic acid และสาร 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis* และ *Micrococcus kristinae* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Emre and Kursat (2021) รายงานว่า Oleic acid ที่แยกได้จากพืชในสกุล *Salvia* สามชนิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS

Hidajati et al. (2018) รายงานว่า สาร Palmitic acid หรือ สาร n-Hexadecanoic มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดเมทานอลจาก *Syzygium litoralle* โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 189.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Chen et al. (2021) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ สาร 4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-Methyl ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ Scavenging galvinoxyl radical พบว่า สารมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในทุกวิธี แต่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดคือ อนุมูลอิสระประเภทไฮดรอกซิล

Zhao et al. (2013) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS และศึกษาการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งในมนุษย์ของสาร 5-Hydroxymethylfurfural พบว่า สารมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดีกว่าวิธี DPPH และพบว่า สารสามารถต้านการเจริญเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.58±0.012 มิลลิโมลาร์ เทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 2.13 0.021 มิลลิโมลาร์

จากรายงานของ Kumar et al. (2011) พบว่า สาร Vanilic acid มีฤทธิ์ในการลดความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์ในพลาสมาของหนูทดสอบ และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยช่วยลดอนุมูลอิสระประเภทซูเปอร์ออกไซด์

จากรายงานของ Cikman et al. (2015) พบว่า สาร Benzoic acid 4-hydroxy-3,5-dimethoxy- เป็นสารต้านอนุมูลอิสระประเภทซัลไฮดริล และจากการศึกษาของ Chanda and Juvekar (2018) พบว่า สาร Benzoic acid 4-hydroxy-3,5-dimethoxy- มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยลดการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสและการเสื่อมสภาพของโปรตีน

จากการศึกษาของ Awonyemi et al. (2020) ที่ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันของเมล็ด *Raphia taedigera* พบว่า สาร trans-13-Octadecenoic acid มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

Choi et al. (2020) รายงานว่า สาร Undecane มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Basophilic ของหนู (RBL-2H3) โดยมีกลไกการยับยั้งการเชื่อมสภาพของเซลล์ การหลั่งของฮีสตามีนและยับยั้งการผลิต tumor necrosis factor α (TNF- α)

Sanjenbam and Krishnan (2016) พบว่า สาร Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)- มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์แมคโคฟาจ Raw 264.7 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



บทที่ 6

บทสรุป

1. จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและเปรียบเทียบดีเอ็นเอในบริเวณ 28s rDNA พบว่าเห็ดไอโซเลท EB2101 คือ *Flavodon flavus* (Klotzsch) Ryvarden
2. จากการสกัดสารสกัดเอทิลอะซิเตท เมทานอล และน้ำจากเส้นใยและดอกเห็ด พบว่า มีผลผลิตร้อยละ 1.79-28.73
3. จากการศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทิลอะซิเตท เมทานอล และน้ำจากเส้นใยและดอกเห็ด พบว่า มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดระหว่าง 0.59-12.37 mg glucose/mg of extract มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่าง 0.03-2.15 mg glucose/mg of extract และ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดระหว่าง 0.04-0.09 mg GAE/mg of extract
4. สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ด สารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* และ *Bacillus subtilis* โดยมีค่า MIC ระหว่าง 3.125-12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
5. สารสกัดเอทิลอะซิเตท เมทานอล และน้ำจากเส้นใยและดอกเห็ดไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราทดสอบ
6. จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่า สารสกัดน้ำจากเส้นใยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP และสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS
7. สารสกัดเอทิลอะซิเตท เมทานอล และน้ำจากเส้นใยและดอกเห็ดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส
8. จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคฟาจ Raw 264.7 พบว่า สารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดมีฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 36.75 และ 84.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดน้ำจากเส้นใยและดอกเห็ดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์
9. จากการทดสอบความพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคฟาจ Raw 264.7 พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ด สารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด มีความ

เป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 103.60, 48.83, 746.51 และ 166.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

10. จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อโรทะเลพบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยและดอกเห็ด สารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด มีความเป็นพิษต่อโรทะเล โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 178.95, 107.06, 1260.2 และ 307.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
11. จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดด้วยวิธี GC-MS แบบไม่ split พบว่า สารสกัดเมทานอลจากเส้นใยพบพีคขององค์ประกอบทางเคมี 33 ชนิด และสารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ดพบพีคขององค์ประกอบทางเคมี 22 ชนิด โดยพบพีคขององค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกัน 4 ชนิด คือ (ก) 2(5H)-Furanone (ข) 2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy- (ค) Hexadecanoic acid, methyl ester และ (ง) 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-
12. จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ดด้วยวิธี GC-MS แบบ split 1:10 พบว่า สารสกัดเมทานอลจากเส้นใยมีพีคขององค์ประกอบทางเคมี 13 ชนิด และสารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ดมีพีคขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 8 ชนิด โดยพบพีคขององค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกัน 4 ชนิด คือ (ก) Decane (ข) Undecane (ค) 2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy- และ (ง) Hexadecanoic acid, methyl ester
13. สาร (ก) Oleic acid และ (ข) 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- จากเห็ด *F. flavus* มีรายงานว่ามียุทธิต้านการเจริญแบคทีเรีย
14. สาร (ก) 4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-Methyl (ค) Vanilic acid (ง) Benzoic acid 4-hydroxy-3,5-dimethoxy- และ (จ) Oleic acid จากเห็ด *F. flavus* มีรายงานว่ามียุทธิต้านอนุมูลอิสระ
15. สาร (ก) Undecane (ข) Vanilic acid (ค) Benzoic acid 4-hydroxy-3,5-dimethoxy- และ (ง) trans-13-Octadecenoic acid จากเห็ด *F. flavus* มีรายงานว่ามียุทธิต้านการอักเสบ
16. สาร (ก) Undecane (ข) Piperidine, 1-methyl- (ค) 5-Hydroxymethylfurfural และ (ง) Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)- จากเห็ด *F. flavus* มีรายงานว่ามียุทธิต้านการเจริญต่อเซลล์ทดสอบ

รายการอ้างอิง

- Adongbede, E.M., Jaiswal, Y.S., Davis, S.S., Randolph, P.D., Huo, L.-N., Williams, L.L., 2019. Antioxidant and antibacterial activity of *Trametes polyzona* (Pers.) Justo. *Food Science and Biotechnology* 29, 27-33.
- Ahmed, M.U., Ibrahim, A., Dahiru, N.J., Mohammed, H.u.S., 2020. Alpha amylase inhibitory potential and mode of inhibition of oils from *Allium sativum* (Garlic) and *Allium cepa* (Onion). *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes* 13, e1179551420963106.
- Albalasmeh, A.A., Berhe, A.A., Ghezzehei, T.A., 2013. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using uv spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers* 97, 253-261.
- Alresly, Z., Lindequist, U., Lalk, M., Porzel, A., Arnold, N., Wessjohann, L.A., 2015. Bioactive triterpenes from the fungus *Piptoporus betulinus*. *Records of Natural Products* 10, 103-108.
- Awerbuch, T.E., Lustman, L., Piret, J.M., 1989. A numerical method to determine minimal inhibitory concentrations (MICs) of antibiotics directly from disc-diffusion susceptibility tests. *Journal of Microbiological Methods* 9, 1-7.
- Awonyemi, O., Abegunde, S., Temitope, O., 2020. Analysis of bioactive compounds from *Raphia taedigera* using gas chromatography -mass spectrometry. *Eurasian Chemical Communications* 2, 938-944.
- Back, C.G., Lee, C.Y., Seo, G.S., Jung, H.Y., 2012. Characterization of species of *Cladobotryum* which cause cobweb disease in edible mushrooms grown in Korea. *Mycobiology* 40, 189-194.
- Blainski, A., Lopes, G.C., de Mello, J.C.P., 2013. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* 18, 6852-6865.
- Brum, M.C.P., Araugo, W.L., Maki, C.S., and Azevedo, J.L., 2012. Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. *Genetics and Molecular Research* 11, 4187-4197.

- Butkhup, L., Samappito, W., Jorjong, S., 2018. Evaluation of bioactivities and phenolic contents of wild edible mushrooms from northeastern Thailand. *Food Science and Biotechnology* 27, 193-202.
- Chamika, W.A.S., Ho, T.C., Roy, V.C., Kiddane, A.T., Park, J.-S., Kim, G.-D., Chun, B.-S., 2021. In vitro characterization of bioactive compounds extracted from sea urchin (*Stomopneustes variolaris*) using green and conventional techniques. *Food Chemistry* 361, e129866.
- Chanda, S., Juvekar, A., 2018. *In vitro* anti-inflammatory activity of syringic acid. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 11, 71-73.
- Chen, C.H., Yang, S.W., Shen, Y.C., 1995. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, a fungal parasite of *Cinnamomum micranthum*. *Journal of Natural Products* 58, 1655-1661.
- Chen, Z., Liu, Q., Zhao, Z., Bai, B., Sun, Z., Cai, L., Fu, Y., Ma, Y., Wang, Q., Xi, G., 2021. Effect of hydroxyl on antioxidant properties of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one to scavenge free radicals. *The Royal Society of Chemistry* 11, 34456-34461.
- Choi, D., Kang, W., Park, T., 2020. Anti-allergic and anti-inflammatory effects of undecane on mast cells and Keratinocytes. *Molecules* 25, e1554.
- Cikman, O., Soylemez, O., Ozkan, O.F., Kiraz, H.A., Sayar, I., Ademoglu, S., Taysi, S., Karaayvaz, M., 2015. Antioxidant activity of syringic acid prevents stress in L-arginine-Induced acute pancreatitis: An experimental study on rats. *International Surgery* 100, 891-896.
- Darlis, D., Mohd Rashid, M.R., Jalloh, M.B., 2019. Characterization and identification of polypore fungi collected from forests in Sandakan, Sabah based on the macro- and micro- morphology. *Transactions on Science and Technology* 6, 283-291.
- Deshavath, N.N., Mukherjee, G., Goud, V.V., Veeranki, V.D., Sastri, C.V., 2020. Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules* 156, 180-185.
- Dilika, F., Bremner, P.D., Meyer, J.J., 2000. Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: A plant used during circumcision

- rites. *Fitoterapia* 71, 450-452.
- Emre, I., Kursat, M., 2021. Biochemical parameters and antioxidant property of three *Salvia L.* taxa endemic in Turkey. *Brazilian Journal of Biology* 82, e239539.
- Fernandes, R.P., Trindade, M.A., Tonin, F.G., Lima, C.G., Pugine, S.M., Muneke, P.E., Lorenzo, J.M., de Melo, M.P., 2016. Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of Food Science and Technology* 53, 451-460.
- Fernando, M.D.M., Wijesundera, R.L.C., Soysa, S., de Silva, E.D., Nanayakkara, C., 2016. Antioxidant potential and content of the polyphenolic secondary metabolites of white rot macrofungi; *Flavodon flavus* (Klotzsch.) and *Xylaria feejeensis* (Berk.). *SDRP Journal of Plant Sciences* 1, 1-6.
- Gao, J.J., Min, B.S., Ahn, E.M., Nakamura, N., Lee, H.K., Hattori, M., 2002. New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50, 837-840.
- Gebreyohannes, G., Nyerere, A., Bii, C., Berhe Sbhatu, D., 2019. Determination of antimicrobial activity of extracts of indigenous wild mushrooms against pathogenic organisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019, e6212673.
- Gore, V.U., Mali, V.P., 2021. Diversity in host susceptible of *Flavodon flavus* from Aurangabad district, Maharashtra [India]. *International Journal of Researches in Biosciences, Agriculture and Technology* 14-23.
- Gulcin, İ., 2020. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology* 94, 651-715.
- Henriquez, C., Aliaga, C., Lissi, E., 2002. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. *International Journal of Chemical Kinetics* 34, 659-665.
- Hidajati, N., Tukiran, T., Setiabudi, D., Wardana, A., 2018. Antioxidant activity of palmitic acid and pinostrobin from methanol extract of *Syzygium litorale* (Myrtaceae).

- Atlantis Highlights in Engineering 1, 183-187.
- Hseu, Y.C., Wu, F.Y., Wu, J.J., Chen, J.Y., Chang, W.H., Lu, F.J., Lai, Y.C., Yang, H.L., 2005. Anti-inflammatory potential of *Antrodia Camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF- κ B pathway. International Immunopharmacology 5, 1914-1925.
- Hsiao, G., Shen, M.Y., Lin, K.H., Lan, M.H., Wu, L.Y., Chou, D.S., Lin, C.H., Su, C.H., Sheu, J.R., 2003. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 3302-3308.
- James, T.Y., Moncalvo, J.-M., Li, S., Vilgalys, R., 2001. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. Genetics 157 1, 149-161.
- Karimi, A., Mohammadi-Kamalabadi, M., Rafeiean-Kopaei, M., Amjad, L., Salimzadeh, L., 2016. Determination of antioxidant activity, phenolic contents and antiviral potential of methanol extract of *Euphorbia spinidens* Bornm (Euphorbiaceae). Tropical Journal of Pharmaceutical Research 15, 759-764.
- Klaiklay, S., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Buatong, J., Preedanon, S., Sakayaroj, J., 2013. Flavodonfuran: A new difuranylmethane derivative from the mangrove endophytic fungus *Flavodon flavus* PSU-MA201. Natural Product Research 27, 1722-1726.
- Kothiyal, G., Singh, K., 2022. Antimicrobial and phytochemical screening of selected wild mushrooms naturally found in Garhwal Himalayan region, Uttarakhand, India. Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics 5(2), 417-432.
- Kumar, M., Shukla, P.K., 2005. Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. Journal of Clinical Microbiology 43, 662-668.
- Kumar, N., Goel, N., 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. Biotechnology Reports 24, e00370.
- Kumar, S., Prahalathan, P., Raja, B., 2011. Antihypertensive and antioxidant potential of

- vanillic acid, a phenolic compound in l-NAME-induced hypertensive rats: A dose-dependence study. *Redox Report* 16, 208-215.
- Li, L., Wu, G., Choi, B.Y., Jang, B.G., Kim, J.H., Sung, G.H., Cho, J.Y., Suh, S.W., Park, H.J., 2014. A mushroom extract Piwep from *Phellinus igniarius* ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting immune cell infiltration in the spinal cord. *BioMed Research International* 2014, 218274.
- Luna-Guevara, M.L., Luna-Guevara, J.J., Hernández-Carranza, P., Ruíz-Espinosa, H., Ochoa-Velasco, C.E., 2018. Chapter 3 - Phenolic compounds: A good choice against chronic degenerative diseases, in: Atta ur, R. (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, Netherlands, pp. 79-108.
- Mitchell, A.D., Bresinsky, A., 1999. Phylogenetic relationships of *Agaricus* species based on ITS-2 and 28S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 91, 811-819.
- Munteanu, I.G., Apetrei, C., 2021. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Journal of Molecular Sciences* 22, e3380.
- Nielsen, S.S., 2010. Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates, in: Nielsen, S.S. (Ed.), *Food Analysis Laboratory Manual*. Springer Boston, MA, pp. 47-53.
- Özlem, S.A., 2017. *In vitro* cytotoxicity and cellviability assays: Principles, advantages, and disadvantages, in: Marcelo, L.L., Sonia, S. (Eds.), *Genotoxicity*. IntechOpen, London, England., pp. 1-17.
- Park, E.J., Ko, G., Kim, J., Sohn, D.H., 1997. Antifibrotic effects of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*, glycyrrhizin, and pentoxifylline in rats with cirrhosis induced by biliary obstruction. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 20, 417-420.
- Parvekar, P., Palaskar, J., Metgud, S., Maria, R., Dutta, S., 2020. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Biomaterial Investigations in Dentistry* 7, 105-109.
- Pradeep, P.M., Sreerama, Y.N., 2018. Phenolic antioxidants of foxtail and little millet cultivars and their inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase activities. *Food Chemistry* 247, 46-55.

- Ramos, G., Umejiego, J., Rapales, J., Awemu, G., Tejano, G., Faller, E., 2018. GC-MS analysis of Bioactive ohytochemicals present in methanol extract of *Pleurotus ostreatus*. (Jack Ex. Fr.) p. Kumm: Evidence for its medicinal diversity. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 7, 143-150.
- Ricciotti, E., FitzGerald, G.A., 2011. Prostaglandins and inflammation. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 31, 986-1000.
- Richter, S.S., Galask, R.P., Messer, S.A., Hollis, R.J., Diekema, D.J., Pfaller, M.A., 2005. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. Journal of Clinical Microbiology 43, 2155-2162.
- Saha, R., Das, D., Tarafder, E., Roy, A., Acharya, K., 2018. Contribution to the Macromycetes of West Bengal, India: 34–39. Research Journal of Pharmacy and Technology 11, e5123.
- Salvatore, M.M., De Gregorio, V., Gallo, M., Corsaro, M.M., Casillo, A., Vecchione, R., Andolfi, A., Naviglio, D., Netti, P.A., 2020. Evaluation of two extraction methods for the analysis of hydrophilic low molecular weight compounds from *Ganoderma lucidum* spores and antiproliferative activity on human cell lines. Applied Sciences 10, e4033.
- Sanjenbam, P., Krishnan, K., 2016. Bioactivity of Pyrrolo[1,2-A]pyrazine-1,4-dione,hexahydro-3-(phenylmethyl)- extracted from *Streptomyces* sp. VITPK9 Isolated from the Salt Spring Habitat of Manipur, India. Asian Journal of Pharmaceutics 10, e265.
- Sarah, Q.S., Anny, F.C., Misbahuddin, M., 2017. Brine shrimp lethality assay. Bangladesh Journal of Pharmacology 12, 186-189.
- Sawangwan, T., Wansanit, W., Pattani, L., Noysang, C., 2018. Study of prebiotic properties from edible mushroom extraction. Agriculture and Natural Resources 52, 519-524.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Consortium, F.B., List, F.B.C.A., Bolchacova, E., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 6241-6246.
- Seto, S.W., Lam, T.Y., Tam, H.L., Au, A.L., Chan, S.W., Wu, J.H., Yu, P.H., Leung, G.P., Ngai,

- S.M., Yeung, J.H., Leung, P.S., Lee, S.M., Kwan, Y.W., 2009. Novel hypoglycemic effects of *Ganoderma lucidum* water-extract in obese/diabetic (+db/+db) mice. *Phytomedicine* 16, 426-436.
- Shen, Y.C., Chou, C.J., Wang, Y.H., Chen, C.F., Chou, Y.C., Lu, M.K., 2004. Anti-inflammatory activity of the extracts from mycelia of *Antrodia camphorata* cultured with water-soluble fractions from five different *Cinnamomum* species. *FEMS Microbiology Letters* 231, 137-143.
- Shobana, S., Sreerama, Y.N., Malleshi, N.G., 2009. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry* 115, 1268-1273.
- Stamets, P.E., Naeger, N.L., Evans, J.D., Han, J.O., Hopkins, B.K., Lopez, D., Moershel, H.M., Nally, R., Sumerlin, D., Taylor, A.W., Carris, L.M., Sheppard, W.S., 2018. Extracts of polypore mushroom mycelia reduce viruses in honey bees. *Scientific Reports* 8, e13936.
- Stokland, J., Sippola, A.L., 2006. Laboratory protocols for processing fungi (Polypores), in: Stambaugh, C. (Ed.), *Alberta biodiversity monitoring program*. 2006, Alberta, Canada., pp. 1-17.
- Sudheer, S., Alzorqi, I., Manickam, S., Ali, A., 2019. Bioactive compounds of the wonder medicinal mushroom "*Ganoderma lucidum*", in: Mérillon, J.-M., Ramawat, K.G. (Eds.), *Bioactive Molecules in Food*. Springer international publishing, Cham, Denmark, pp. 1863-1893.
- Sukmawati, I., Yuniarto, A., Rakhmawati, D., 2018. Antifungal activity of extract and fraction of *Auricularia auricular* on *Candida albicans*, *Microsporium gypseum*, and *Aspergillus flavus*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 11, 141-145.
- Sulkowska-Ziaja, K., Muszynska, B., Motyl, P., Pasko, P., Ekiert, H., 2012. Phenolic compounds and antioxidant activity in some species of polyporoid mushrooms from Poland. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 14, 385-393.
- Taechowisan, T., Samsawat, T., Puckdee, W., Phutdhawong, W.S., 2020. Cytotoxicity

- activity of geldanamycin derivatives against various cancer cell lines. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 10(6), 12-21.
- Taechowisan, T., Wanbanjob, A., Tuntiwachwuttikul, P., Liu, J., 2010. Anti-inflammatory effects of lansai C and D cause inhibition of STAT-1 and NF- κ B activations in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Food and Agricultural Immunology* 21, 57-64.
- Tohtahon, Z., Xue, J., Han, J., Liu, Y., Hua, H., Yuan, T., 2017. Cytotoxic lanostane triterpenoids from the fruiting bodies of *Piptoporus betulinus*. *Phytochemistry* 143, 98-103.
- Turkoglu, A., Duru, M., Mercan Dogan, N., Kivrak, İ., Gezer, K., 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murril. *Food Chemistry* 101, 267-273.
- Vu, N., Ngoc, P., Hoa, P., 2018. Antibacterial activity of three wild wood-decaying fungi in southern Vietnam toward *Vibrio parahaemolyticus* bacterium in aquaculture wastewater. *Vietnam Journal of Biotechnology* 14, 705-712.
- Wickramaratne, M.N., Punchihewa, J.C., Wickramaratne, D.B.M., 2016. *In-vitro* alpha amylase inhibitory activity of the leaf extracts of *Adenanthera pavonina*. *BMC complementary and Alternative Medicine* 16, 466-466.
- Wu, C., 2014. An important player in brine shrimp lethality bioassay: The solvent. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 5, 57-58.
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., Liu, R., 2020. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers* 1, 60-69.
- Zhang, J., Jia, W., Xing, Z., Tang, Q., Liu, Y., Yang, Y., Zhou, C., Liu, F., 2004. Comparison of bioactivity of fruiting body and mycelia of *Ganoderma lucidum* and their purified fractions. *Mycosystema* 23, 85-92.
- Zhang, Q.W., Lin, L.G., Ye, W.C., 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine* 13, e20.
- Zhao, L., Chen, J., Su, J., Lin, L., Hu, S.-Q., Li, B., Zhang, X., xu, Z., Chen, T., 2013. *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of 5-Hydroxymethylfurfural. *Journal of agricultural and food chemistry* 61, 10604-10611
- Zhou, L.W., Dai, Y.C., 2013. Taxonomy and phylogeny of wood-inhabiting hydroid

species in Russulales: two new genera, three new species and two new combinations. *Mycologia* 105, 636-649.

Zięba, P., Katarzyna, K., Zofia, S., Jan, L., Katarzyna, S.-Z., Agnieszka, S., Bożena, M., 2018. Biological activity of polypore Mushrooms: *Laetiporus sulphureus*, *Piptoporus betulinus*, and *Trametes versicolor*. *Medicina Internacia Revuo* 28, 62-67.



ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium)

1.อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

อาหาร PDA สำเร็จรูป (Himedia, India) 39 กรัม

ละลายผงอาหารในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดันน้ำ
อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.อาหารเลี้ยงเชื้อ Mushroom complete medium (MCM)

thiamine-HCl (labchem, Australia) 1 มิลลิกรัม

KH₂PO₄ (Univar, Australia) 1 กรัม

CaCl₂·H₂O (Daejung, Korea) 0.5 กรัม

MgSO₄·7H₂O (Univar, Australia) 0.5 กรัม

FeSO₄·7H₂O (QRec, Newzealand) 10 มิลลิกรัม

MnSO₄·H₂O (Rankem, India) 1.6 มิลลิกรัม

CuSO₄ (QRec, Newzealand) 1 มิลลิกรัม

NaNO₃ (Univar, Australia) 2 กรัม

Starch soluble (Kemaus, Australia) 40 กรัม

Fructose (Daejung, Korea) 15 กรัม

yeast extract (Himedia, India) 5 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดันน้ำอุณหภูมิ
121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

อาหาร Nutrient broth (Himedia, India)	13	กรัม
ผง agar	15	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดันน้ำอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

4.เลี้ยงสำหรับเพาะเห็ด (Arunyik Mushroom Center, 2016)

ซีลี้อย	100	กิโลกรัม
รำข้าว	5	กิโลกรัม
ยิบซั่ม	2	กิโลกรัม
ดีเกลือ	0.2	กิโลกรัม
ปูนขาว	1	กิโลกรัม

โดยมีความชื้นร้อยละ 65 จากนั้นแบ่งใส่ถุงถุงละ 900 กรัม และนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดันน้ำอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 25 นาที

5.อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640 (Gibco, USA)	2	กรัม
10% Fetal bovine serum (Gibco, USA)	1000	ไมโครลิตร
Penicillin (Applichem, Germany)	1000	ไมโครลิตร
Streptomycin (Biobasic, USA)	1000	ไมโครลิตร
Amphotericin B (Gibco, USA)	100	ไมโครลิตร

ละลายผง RPMI 1640 ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร และเติม 10% Fetal bovine serum, Penicillin กับ Streptomycin และปรับ pH ประมาณ 7.2-7.5 แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

6.อาหาร Mueller Hinton Broth (MHB)

อาหาร Mueller Hinton (Himedia, India) 21 กรัม

ละลายผงอาหารในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดันน้ำ
อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

7.อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose Broth (PDB)

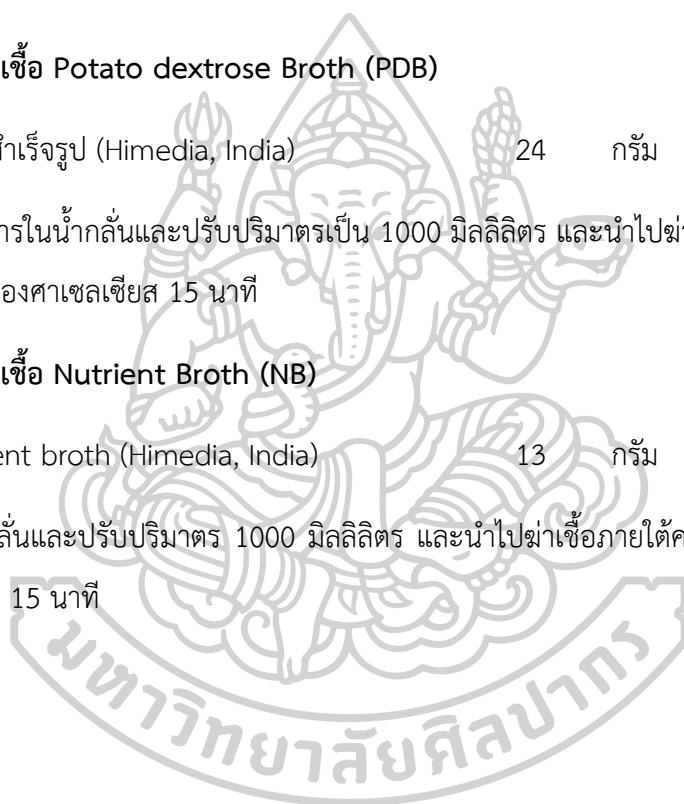
อาหาร PDB สำเร็จรูป (Himedia, India) 24 กรัม

ละลายผงอาหารในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดันน้ำ
อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

4.อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB)

อาหาร Nutrient broth (Himedia, India) 13 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดันน้ำอุณหภูมิ 121
องศาเซลเซียส 15 นาที



ภาคผนวก ข

การเตรียม reagent

1. KOH ความเข้มข้น 10% (w/v)

KOH (QRec, Newzealand)	10	กรัม
------------------------	----	------

ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2. phenol ความเข้มข้น 5% (w/v)

Phenol (Fisher chemical, UK)	5	กรัม
------------------------------	---	------

ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. glucose ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Glucose (Deajung, Korea)	10	มิลลิกรัม
--------------------------	----	-----------

ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

4. Dinitrosalicylic acid reagent (DNSA)

Dinitrosalicylic acid (Sigma-aldrich, India)	5	กรัม
--	---	------

2M NaOH (Fisher chemical, UK)	100	มิลลิลิตร
-------------------------------	-----	-----------

KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O (QRec, Newzealand)	150	กรัม
---	-----	------

ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

5. Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 10% (v/v)

Folin-Ciocalteu (Loba chemie, India)	10	มิลลิลิตร
--------------------------------------	----	-----------

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized water) ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

6. Na₂CO₃ ความเข้มข้น 700 มิลลิโมลาร์

Na ₂ CO ₃ (Himedia, India)	7.42	กรัม
--	------	------

ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

7. Gallic acid ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Gallic acid (Sigma-aldrich, Germany) 10 มิลลิกรัม

ละลายด้วย 80% (v/v) เมทานอล ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

8. Resazurin ความเข้มข้น 0.02 % (w/v)

Resazurin (Himedia, India) 20 มิลลิกรัม

ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

9. Chloramphenicol ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Chloramphenicol (Himedia, India) 8 มิลลิกรัม

ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร

10. DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine) ความเข้มข้น 0.2 mM

สาร DPPH (Sigma-aldrich, Germany) 0.0788 มิลลิกรัม

ละลายด้วยเอทานอลและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

11. ABTS ความเข้มข้น 0.7 มิลลิโมลาร์

ABTS (Sigma-aldrich, china) 3.84 กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

12. FRAP reagent

10 mM TPTZ 5 มิลลิลิตร

10 mM FeCl₃•6H₂O 5 มิลลิลิตร

300 mM Acetate buffer pH 3.6 50 มิลลิลิตร

ผสมกันในอัตราส่วน 1:1:10 ก่อนนำมาใช้งาน

13. สารละลายเอนไซม์อะไมเลสความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผงเอนไซม์ amylase (Sigma-aldrich, Switzerland) 0.5 มิลลิกรัม

ละลายด้วย 0.02 M sodium phosphate buffer pH 6.9 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

14. สารละลายแป้ง ความเข้มข้น 1% (w/v)

Starch (Kemaus, Australia) 1 กรัม

ละลายด้วย 0.02 M sodium phosphate buffer pH 6.9 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

15. 5-(4, 5-Dimethylthiazol 2-yl)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

MTT (Sigma-aldrich, china) 5 มิลลิกรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน (Deionized water) เป็น 1 มิลลิลิตร

16. น้ำทะเลเทียม

NaCl (QRec, Newzealand) 26.29 กรัม (450 mM)

KCl (Chemex, USA) 0.74 กรัม (10 mM)

CaCl₂ (Deajung, Korea) 0.99 กรัม (9 mM)

MgCl₂•6H₂O (Fluka, Switzweland) 6.09 กรัม (30 mM)

MgSO₄•7H₂O (Univar, Australia) 3.94 กรัม (16 mM)

นำมาละลายในน้ำ deionized water ปริมาตร 1 ลิตร และกรองโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 42 โดยให้สารละลายมี pH 7.8 และนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้มากที่สุดเวลา 1 สัปดาห์

17. NaCl ความเข้มข้น 0.85% (w/v)

NaCl (QRec, Newzealand) 0.85 กรัม

ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

18. PBS

KCl (Chemex, USA)	0.2	กรัม
KH ₂ PO ₄ (Univar, Australia)	0.2	กรัม
NaCl (QRec, Newzealand)	8	กรัม
Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O (Deajung, Korea)	1.15	กรัม

ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized water 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

18. FeCl₃ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

FeCl ₃ •6H ₂ O (Deajung, Korea)	2.702	กรัม
---	-------	------

ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

19. TPTZ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

TPTZ (Sigma-aldrich, Switzerland)	0.31	กรัม
-----------------------------------	------	------

ละลายและปรับปริมาตรด้วย 40mM HCl 100 มิลลิลิตร

20. Acetate buffer pH 3.6 ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์

Sodium acetate (QRec, Newzealand)	24.61	กรัม
-----------------------------------	-------	------

Acetic acid 0.0452 กรัม

ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 3.6 ด้วย HCl และนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

21. Sodium phosphate buffer pH 6.9 ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.006 โมลาร์

0.02 M NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	70	มิลลิลิตร
--	----	-----------

0.02 $\text{MNa}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 มิลลิลิตร

NaCl (QRec, Newzealand) 0.038 กรัม

ผสมสารละลายทั้ง 2 อย่าง และเติม NaCl และนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

22. Trolox ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Trolox (Sigma-aldrich, Switzerland) 5 มิลลิกรัม

ละลายด้วยเอทานอลและปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตรด้วย ขวดปรับปริมาตร

23. Acarbose ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Acarbose (Sigma-aldrich, Germany) 10 มิลลิกรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตรด้วย ขวดปรับปริมาตร

24. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 0.02 มิลลิโมลาร์

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Univar, England) 2.399 กรัม

ละลายด้วยและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

25. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 0.02 มิลลิโมลาร์

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Deajung, Korea) 5.361 กรัม

ละลายด้วยและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS

1. *Flavodon Flavus* สายพันธุ์ EB2101

ACGGGCTGAATCTGATCTCTTTTCGGGGTATGTGCCTCCCAGGATCAACCGCTCTAACCTCTGTGCACTTCT
 ACTTCAACAACGGTGACACAGATTTATCACACTGATCGCTGTCCAGCCTGCTCTTGCTAATGAACTTCAAAGG
 ATTCGATAAACAATGTTTACCGCGTACTCCACGTCTATACCCACCTTATCTTCACTGATCTCTTGACGGGTTGA
 GAATACAATAACGCTCCGAAACGGCAAACCTCCTCGGAATATTGCAAGAATGCAATGAGCCTTCAAAGATTCGA
 TGACTCATTGAATTCCGTGCAATCACATTAATGCATTTTCGCTGCGTTCTCAATTCGATGCAGACACCCA
 AGAGATCCATTGCTGAAAGTTGGGGATATAATGTGTATAAACATGTGAAACATTCTATAACTGAACTGTTTGTG
 GTAAAACGCAAGAGAACGCTTGTCACTGACTTCTTTACAAAATCTAGCTTACACCGTTCTTTACATGAAGTGC
 ACAGAGGTTGAGAGTGAGTGCAGCTCACGCGTGCACATACCCGAATAAAGAGTCAGCTACAACCCGTTCAAAAA
 TCAATAATGATCCTCTCCGCATGTCGGGGCCCCGGGGTGAGCCCCGGTATCAACTTTCACGCGGGGGGACGGGC
 TCTCATATGGGGTTTTTTGCACGCGAGTTCTCCAACACGCAACCACAGTACATTTACAGACACGAAAAGGGGT
 GTAGATATTTCTAAGAAGTCCATCGCCAAGCCTTTCTTTAGGTTTTTCCACAGAGCGTTCTAGATAAGGAAC
 CAAAACAGCTTCTAATACAGATCCCTACAATTTACACCAAGGGATTTCTTGGCTTCAGCATCACGTAAGAAATC
 ACAGTAATTTATCGTTAAATGTTTTGAGAATCCCGGTAATCATGCAATATTGGAATGCTCCATAGATTTAG
 CTTTATCCGAGTTATCTTCCATTTCTTTCTTTTTAGTCACCAACTCGAACTTTGAGAGGGGCATCACAGAG
 GCACCAGGTTGTCCGTGCCAAAGACGGGATTGTCACCCTTTAGGTTGTTCCATTCCCGCAGGGATTGTGCACG
 GTCTGCCGGGGAAAACACTTCTTTAAATTAATACTCAACGCCCAATTATTTCCAGTTTTTAATTTTTTGCTT
 TTCCCGCTTCACTCGCAGTTCTATAAAGGGAATTTCTGGGAAGTTGTTTTCAAGTTC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 28S rDNA

1. *Flavodon Flavus* สายพันธุ์ EB2101

TGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGCGGCTTTGGTCGTCCGAGT
 TGTATTCTAGAGAAGTGTTTTCCGCGTTGGACCGTGTATAAGTCTCTTGAACAGAGCGTCATAGAGGGTGAG
 AATCCCGTCTTTGACACGGACTACCAATGCTTTGTGATACACTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAG
 CTCAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGG
 GAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTCA
 GTCGCGTTATCTAGAACTCAACCAGGCTTGCTTGGCGTATTTCTAGTTAACGGGCCAGCATCAGTTTTGACC
 GCAGGAAAAGGCCAGGGAAATGTGGCACCCTCGGGTGTGTTATAGTCTCTGGTCATATACTGTGATTGGGGC
 TGAGGACCCGACGACGCGCAAGCTGTGCTTAGGATGCTGGCGTAATGGCTTTAAACGACCCGCTTGAACA
 CGGACCAAGGAGTCTAACAACTGCGAGTATTTGGGTGGTAAACCCGAGTGCGTAATGAAAGTAAAGTTGG
 GATCTCTGTCGTGGAGAGCACCGACGCCCGACAGACCTTCTGTGACGGATCTGCGGTAGAGCATGTTTGTT
 GGGACCCGAAAGATGGTGAACCTATGCCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGCG
 ATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGT
 TCCTGCCGAAGTTTCCCTCAGGATAGCAGAACTCATATCAGATTTATGTGGTAAAGCGAATGATTAGAGGCC
 TTGGGGTTGAAACAACCTTAACCTATTCTCAAACCTTTAAATATGTAAGAACGAGCCGTCACTTAATTGGACCGC
 TCGGCGATTGAGAGTTTCTAGTGGGCCATTTTGGTAAGCAGAAGTGGCGATGCGGGATGAACCGAACGTGAG
 GTTAAGGTGCCGAATACACGCTCATCAGACACCACAAAAGGTGTTAGTTCATCTAGACAGCAGGACGGTGGC
 CATGGAAGTCGGAATCCGCTAAGGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAATGAACTAGCCCTGAAAATGGATGG
 CGCTCAAGCGTGTACCCATACCTACCGTCAGTGTTTAAGTGATGCACTGACGAGTAGGCAGGCGTGGAGGT
 TTGTGAAGAAGCCTAGGCAGTGATG

ภาคผนวก ง

ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัด

ตารางที่ 10 ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัด

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	Replication	จำนวนที่ใช้สกัด (g)	ปริมาณสารที่ได้(g)	%yield
เส้นใย	ethyl acetate	ME1	20	0.3558	1.779
เส้นใย	methanol	MM1	20	5.275	26.375
เส้นใย	water	MW1	20	1.745	8.725
เส้นใย	ethyl acetate	ME2	20	0.2848	1.424
เส้นใย	methanol	MM2	20	5.9192	29.596
เส้นใย	water	MW2	20	2.073	10.365
เส้นใย	ethyl acetate	ME3	20	0.3773	1.8865
เส้นใย	methanol	MM3	20	3.8552	19.276
เส้นใย	water	MW3	20	2.03	10.15
เส้นใย	ethyl acetate	ME4	20	0.415	2.075
เส้นใย	methanol	MM4	20	7.931	39.655
เส้นใย	water	MW4	20	3.952	19.76
ดอกเห็ด	ethyl acetate	FBE1	20	0.469	2.345
ดอกเห็ด	methanol	FBM1	20	1.222	6.11
ดอกเห็ด	water	FBW1	20	1.133	5.665
ดอกเห็ด	ethyl acetate	FBE2	20	0.54	2.7
ดอกเห็ด	methanol	FBM2	20	0.909	4.545
ดอกเห็ด	water	FBW2	20	0.984	4.92
ดอกเห็ด	ethyl acetate	FBE3	20	0.62	3.1
ดอกเห็ด	methanol	FBM3	20	1.641	8.205
ดอกเห็ด	water	FBW3	20	1.206	6.03

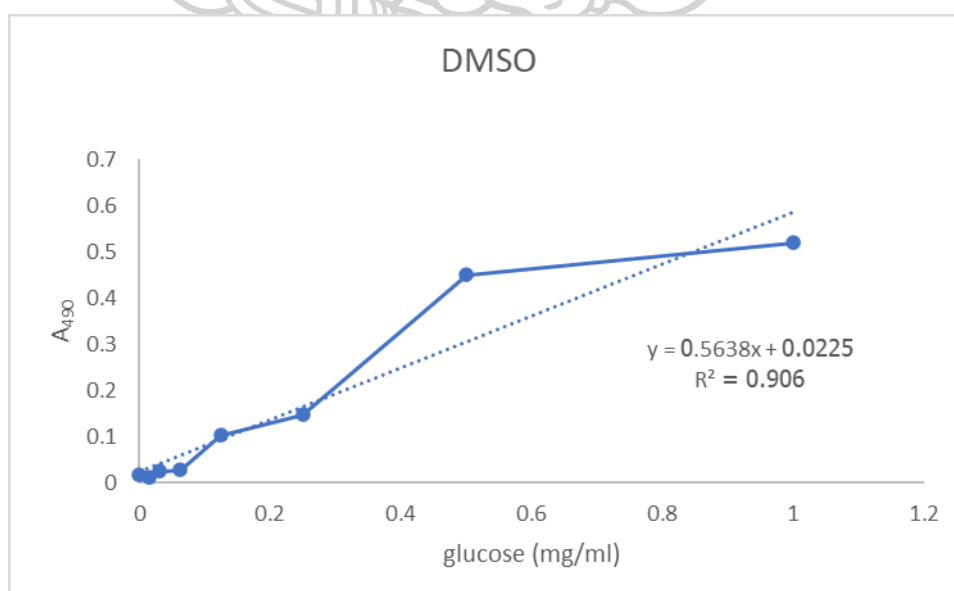
ภาคผนวก จ

การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid

1. วัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของสารมาตรฐานกลูโคสด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid

ตารางที่ 11 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของกลูโคสใน DMSO ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid

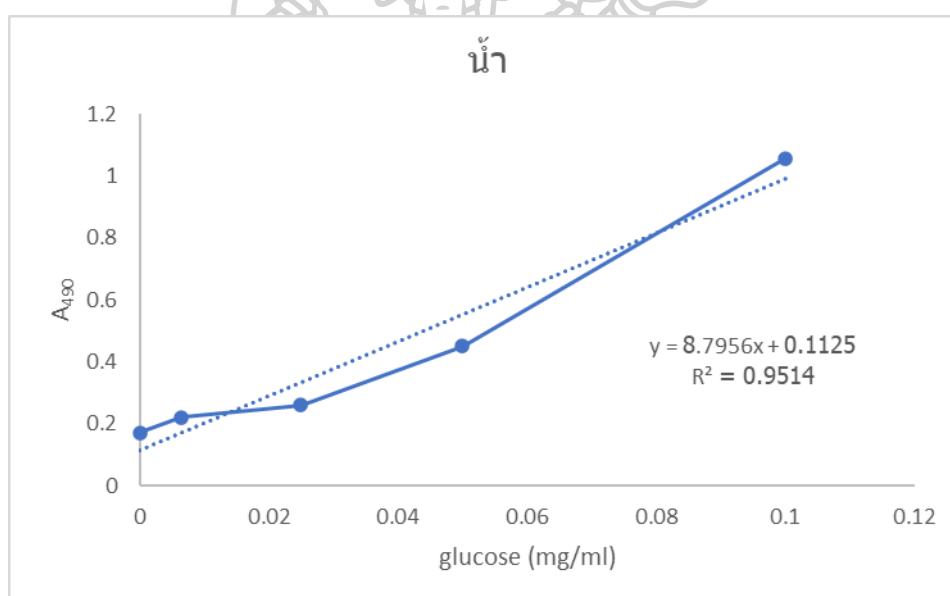
ความเข้มข้นของกลูโคสใน DMSO (mg/ml)	A ₄₉₀
0	0.0172
0.015625	0.0116
0.03125	0.025
0.0625	0.0273
0.125	0.1019
0.25	0.1463
0.5	0.4503
1	0.5192



ภาพที่ 10 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO ของการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric Acid

ตารางที่ 12 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของกลูโคสในน้ำด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid

ความเข้มข้นของกลูโคสในน้ำ (mg/ml)	A ₄₉₀
0	0.17
0.0065	0.221
0.025	0.26
0.05	0.45
0.1	1.058



ภาพที่ 11 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ละลายด้วยน้ำของการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric Acid

2. วัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของสารสกัด *Flavodon flavus* ทั้ง 6 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Phenol-suifuric Acid

ตารางที่ 13 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของสารสกัดด้วยวิธี Phenol-suifuric Acid

สารสกัด	A490	ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (mg glucose/mg of Extract)	ค่าเฉลี่ย	SD
ME1	0.209	6.62	7.25	1.39
ME2	0.2	6.30		
ME3	0.272	8.85		
MM1	0.323	10.66	12.37	1.80
MM2	0.424	14.24		
MM3	0.367	12.22		
MW1	0.428	0.72	0.82	0.14
MW2	0.54	0.97		
MW3	0.449	0.77		
FBE1	0.166	5.09	5.68	0.85
FBE2	0.172	5.30		
FBE3	0.21	6.65		
FBM1	0.177	5.48	7.11	3.30
FBM2	0.162	4.95		
FBM3	0.33	10.91		
FBW1	0.297	0.42	0.59	0.19
FBW2	0.46	0.79		
FBW3	0.356	0.55		

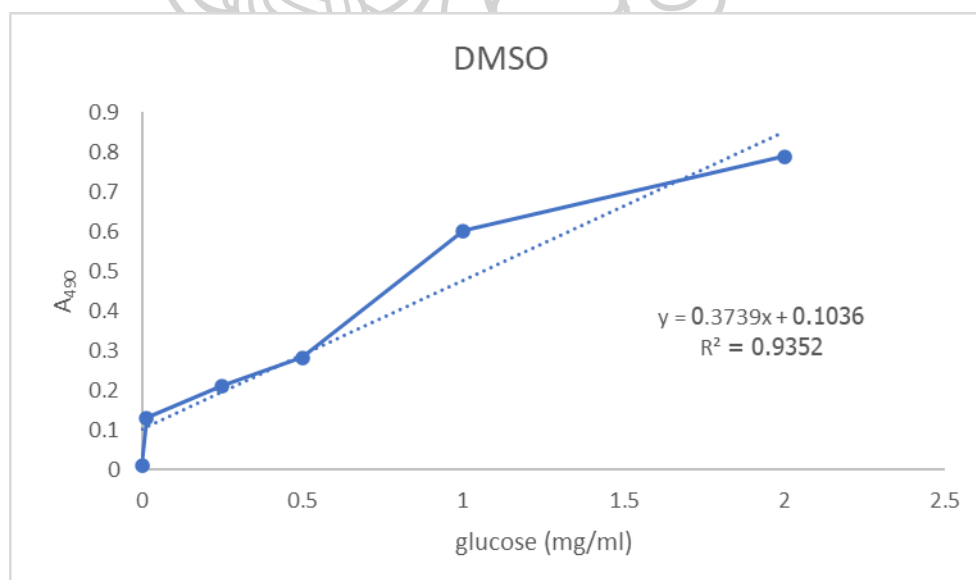
ภาคผนวก ข

การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS)

1. วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารมาตรฐานกลูโคสที่ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS)

ตารางที่ 14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของกลูโคสใน DMSO ด้วยวิธี DNS

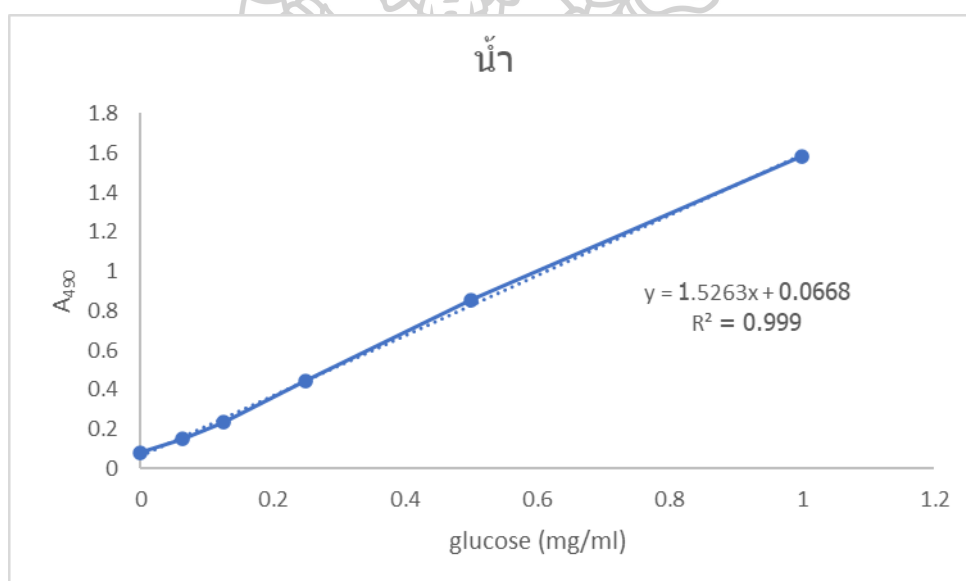
ความเข้มข้นของกลูโคสใน DMSO (mg/ml)	A ₅₄₀
0	0.01144
0.015625	0.1318
0.25	0.2123
0.5	0.2834
1	0.6016
2	0.7891



ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO ของการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

ตารางที่ 15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของกลูโคสในน้ำด้วยวิธี DNS

ความเข้มข้นของกลูโคสในน้ำ (mg/ml)	A ₅₄₀
0	0.0838
0.0625	0.1522
0.125	0.2364
0.25	0.4453
0.5	0.8567
1	1.5838



ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ละลายด้วยน้ำของการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

2. วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัด *Flavodon flavus* ทั้ง 6 ตัวอย่าง ด้วยวิธี
Dinitrosalicylic acid method (DNS)

ตารางที่ 16 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS)

สารสกัด	A ₅₄₀	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์		SD
		(mg glucose/mg of Extract)	ค่าเฉลี่ย	
ME1	0.3722	3.72	2.15	1.37
ME2	0.7993	1.28		
ME3	0.3436	1.46		
MM1	0.3770	2.09	2.06	0.58
MM2	0.4952	2.61		
MM3	0.5923	0.04		
MW1	0.0972	0.02	0.03	0.01
MW2	0.0834	0.02		
MW3	0.0828	1.33		
FBE1	0.3516	1.52	1.47	0.13
FBE2	0.3873	1.57		
FBE3	0.3966	1.23		
FBM1	0.3332	0.02	1.67	1.91
FBM2	0.1066	3.76		
FBM3	0.8069	0.04		
FBW1	0.0399	0.04	0.04	0.00
FBW2	0.0505	0.04		
FBW3	0.0623	0.55		

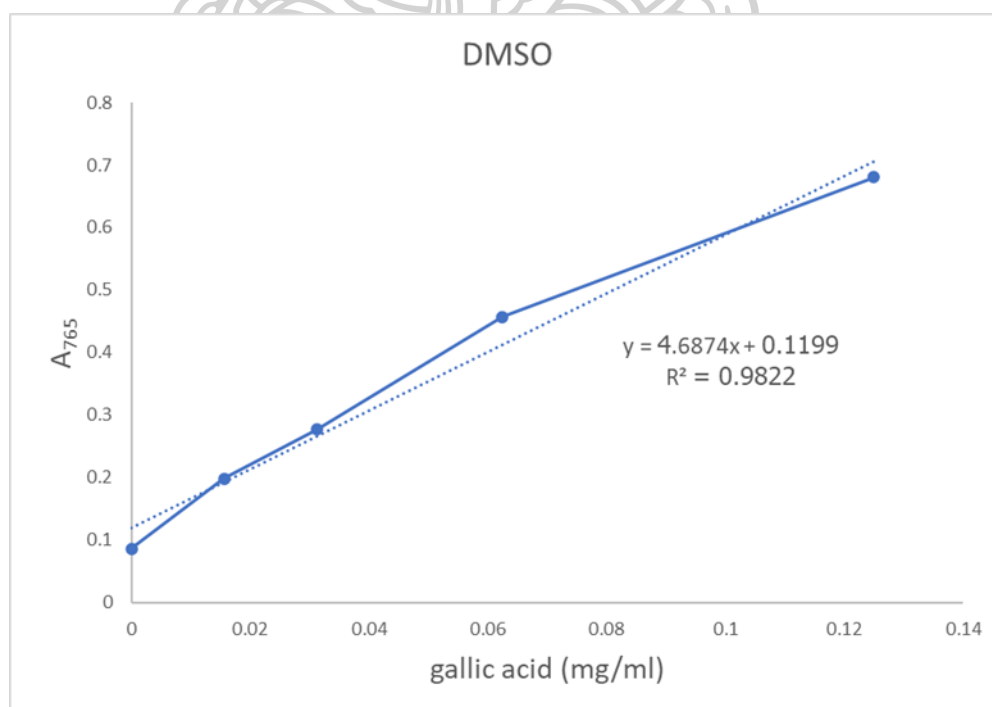
ภาคผนวก ซ

การวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method

1. วัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารมาตรฐานกรดแกลลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method

ตารางที่ 17 ปริมาณฟีนอลิกของกรดแกลลิกใน DMSO ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method

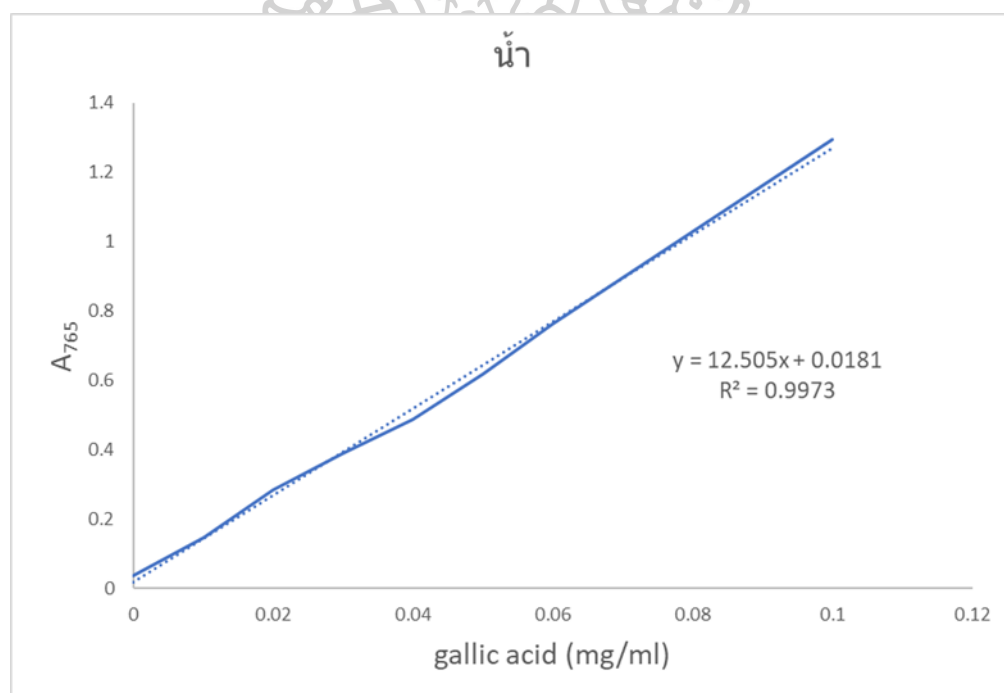
ความเข้มข้นของกรดแกลลิกใน DMSO (mg/ml)	A ₇₆₅
0	0.0858
0.01563	0.1981
0.03125	0.2768
0.0625	0.457
0.125	0.6806



ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO ของการวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay

ตารางที่ 18 ปริมาณฟีนอลิกของกรดแกลลิกในน้ำด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method

ความเข้มข้นของกรดแกลลิกในน้ำ (mg/ml)	A ₇₆₅
0	0.038
0.01	0.146
0.02	0.285
0.03	0.389
0.04	0.487
0.05	0.619
0.06	0.763
0.1	1.294



ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ละลายด้วยน้ำของการวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay

2. วัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด *Flavodon flavus* ทั้ง 6 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay

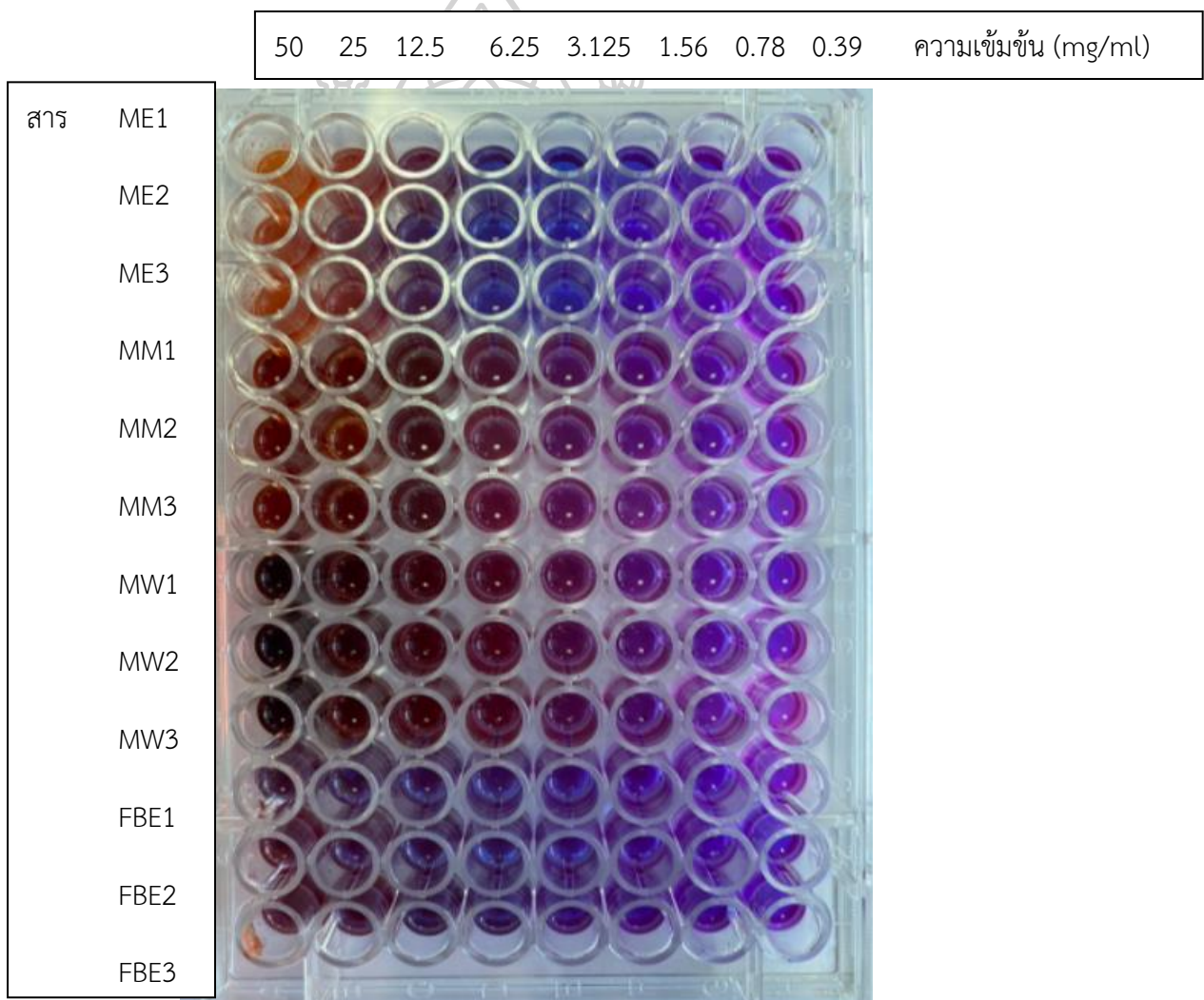
ตารางที่ 19 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay

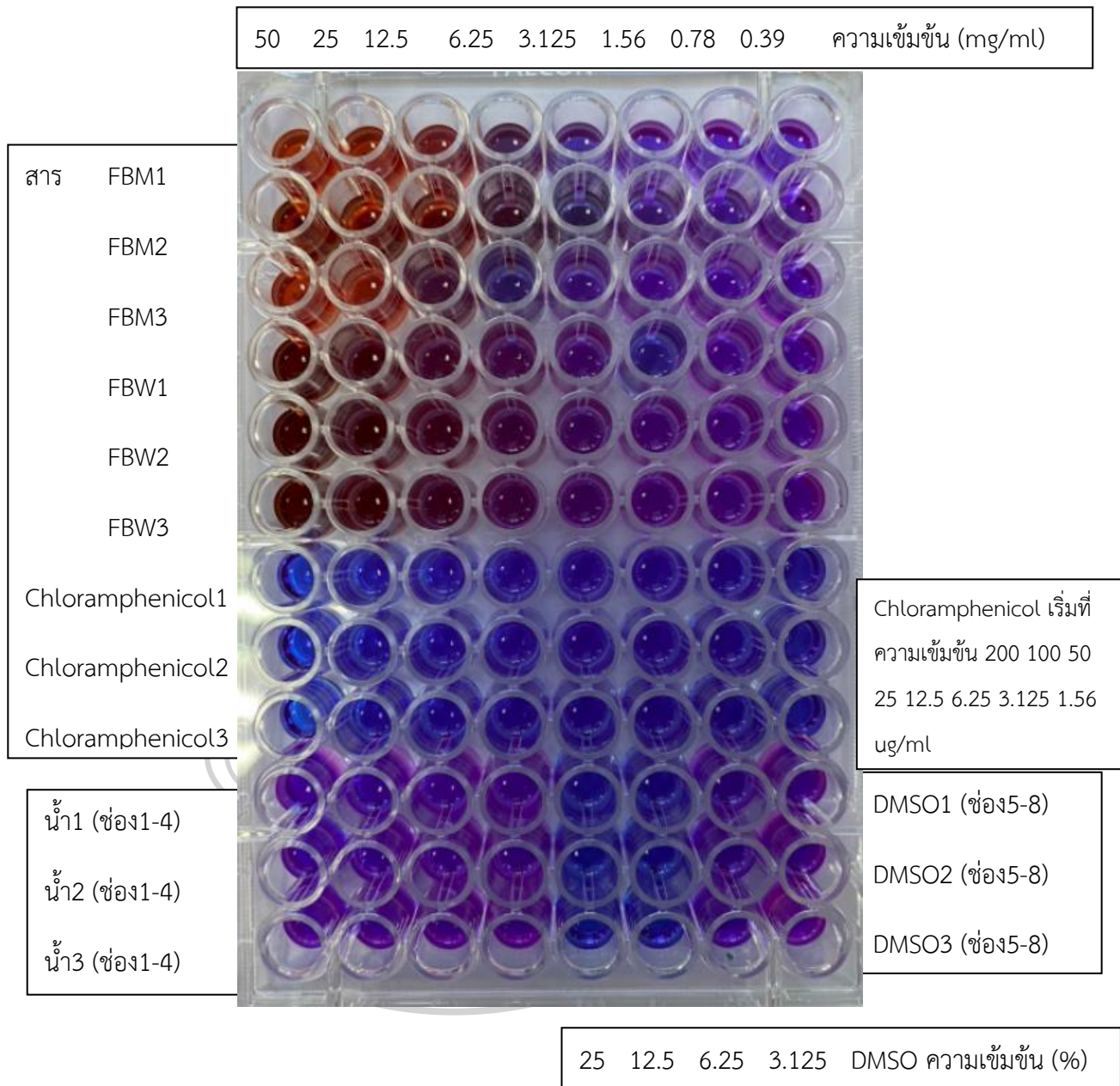
สารสกัด	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด			SD
	A765	(mg GAE/mg of Extract)	ค่าเฉลี่ย	
ME1	0.315	0.042	0.04	0.01
ME2	0.265	0.031		
ME3	0.297	0.038		
MM1	0.483	0.077	0.09	0.01
MM2	0.578	0.098		
MM3	0.591	0.101		
MW1	0.549	0.042	0.05	0.01
MW2	0.545	0.042		
MW3	0.691	0.054		
FBE1	0.355	0.050	0.07	0.02
FBE2	0.47	0.075		
FBE3	0.524	0.086		
FBM1	0.619	0.106	0.09	0.01
FBM2	0.526	0.087		
FBM3	0.519	0.085		
FBW1	0.477	0.037	0.04	0.02
FBW2	0.786	0.061		
FBW3	0.413	0.032		

ภาคผนวก ด

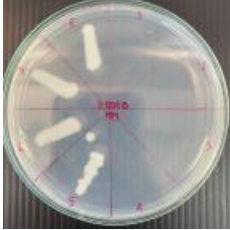
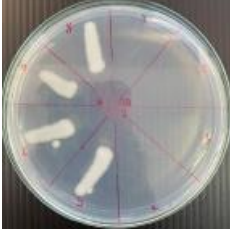
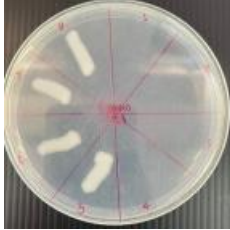

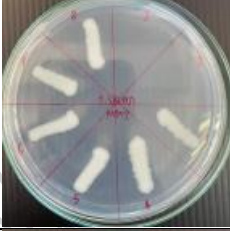
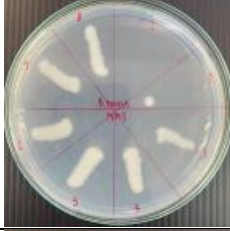




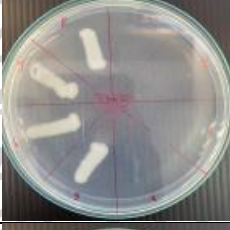




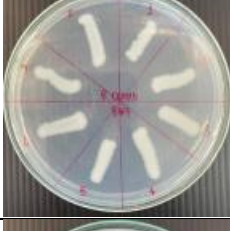

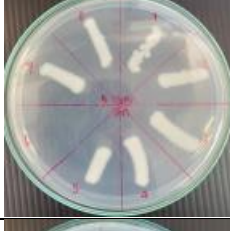
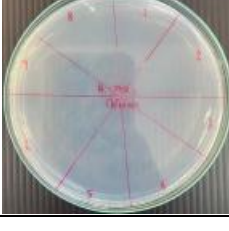
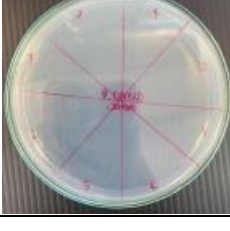
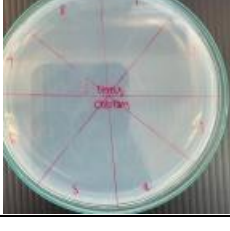
การค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

1. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

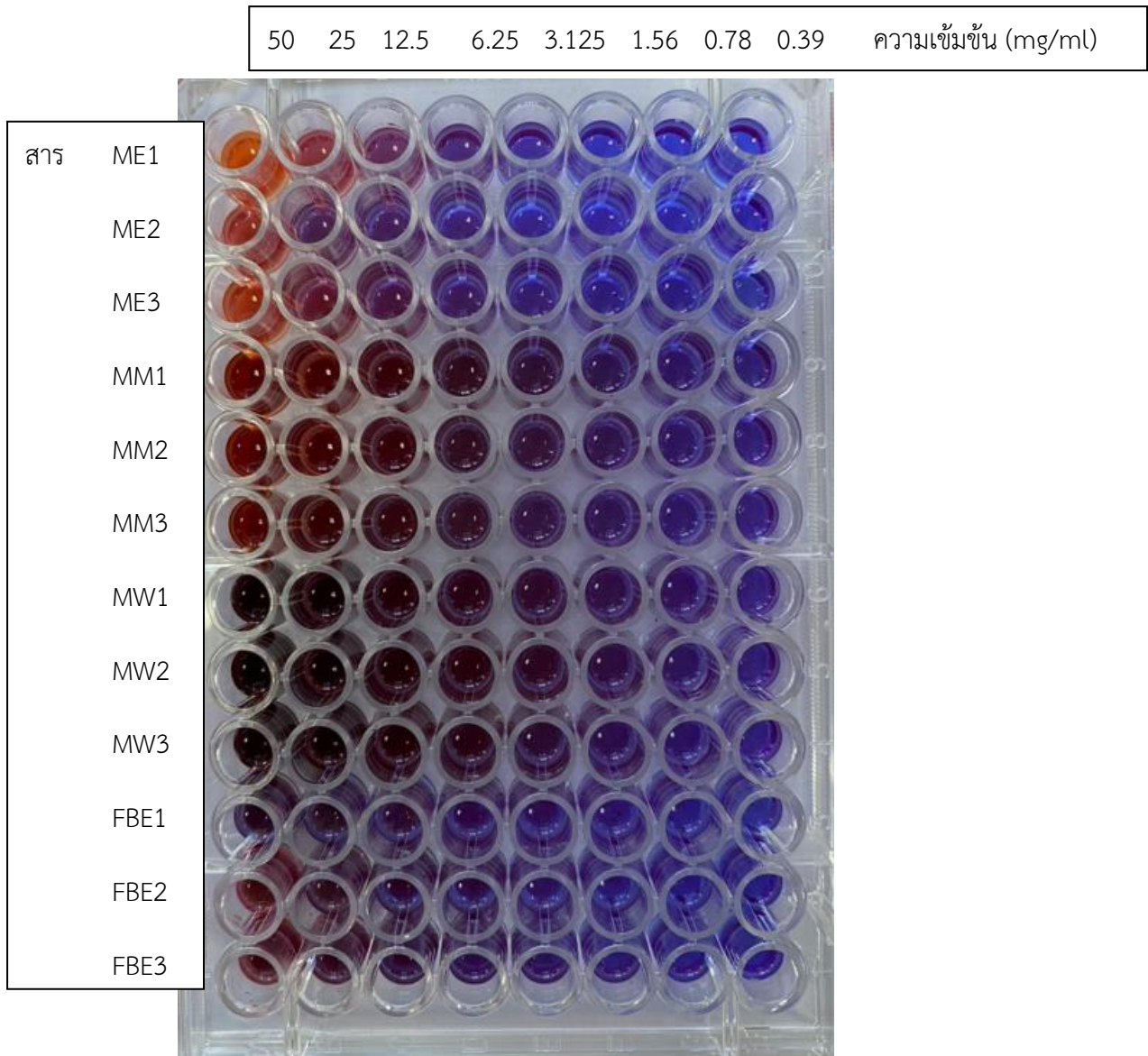


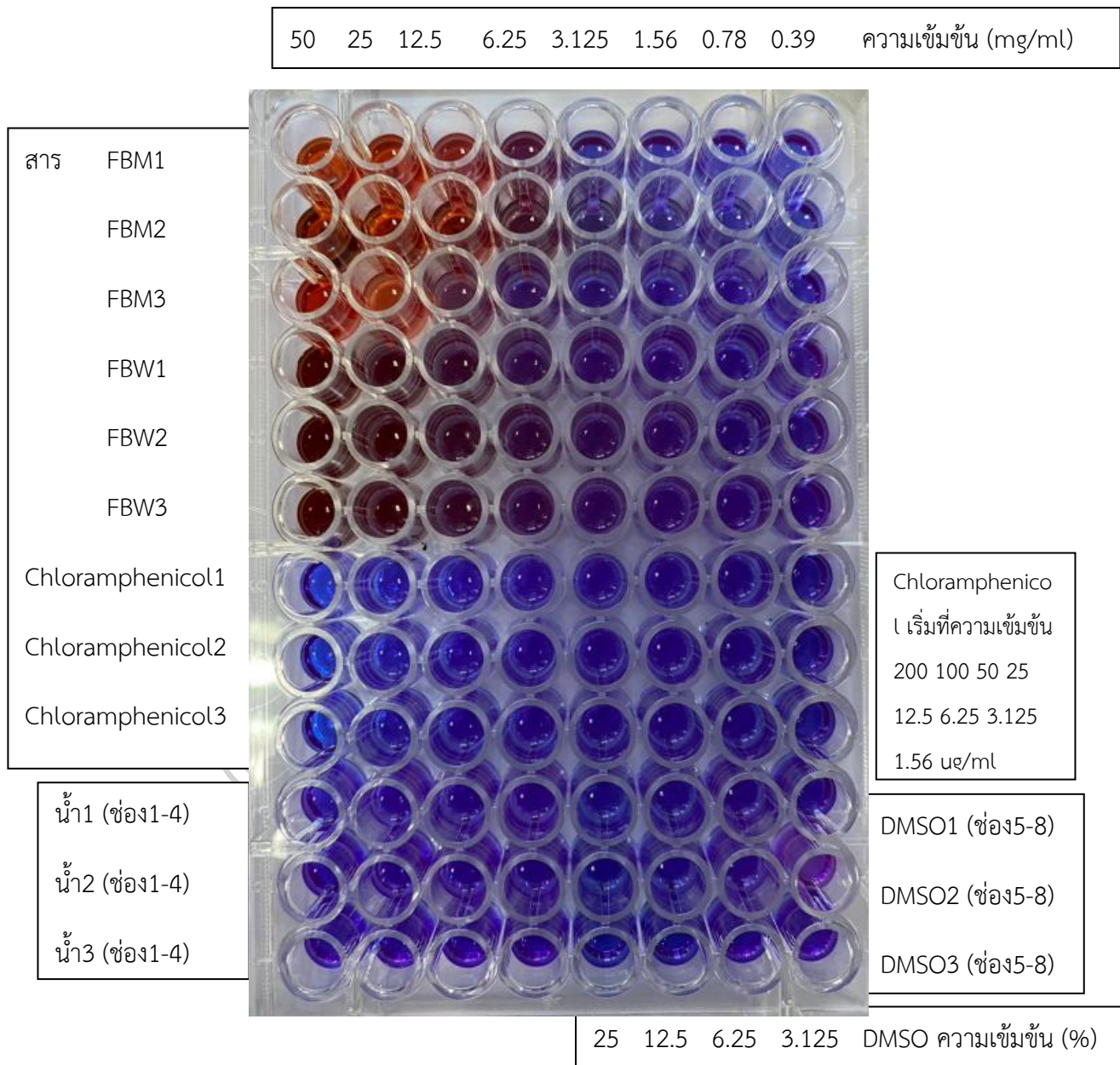


ตารางที่ 20 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus* (Minimal bactericidal concentration: MBC)


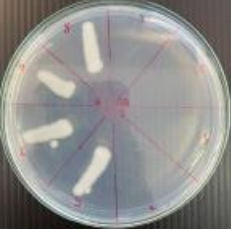
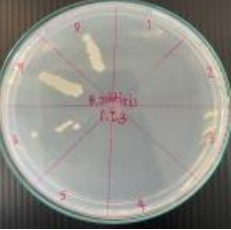











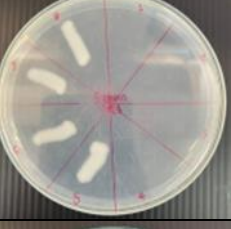
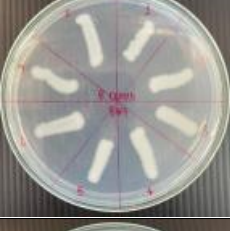

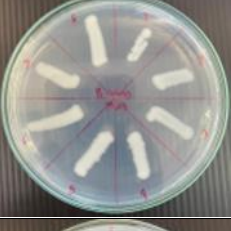
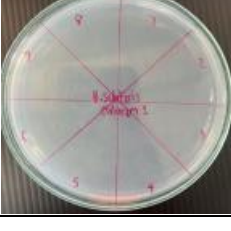


สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Chloramphenicol			

2. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

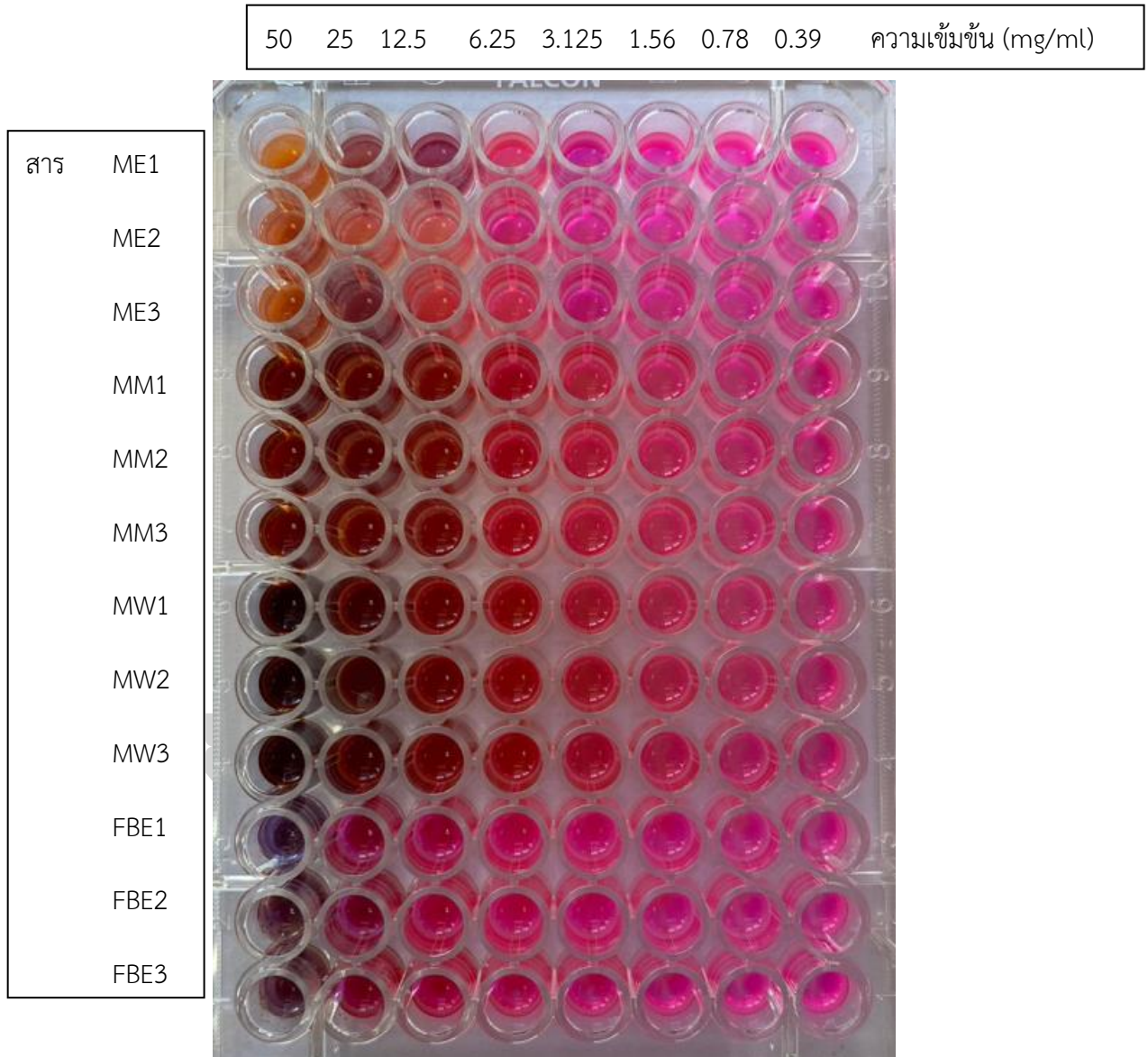


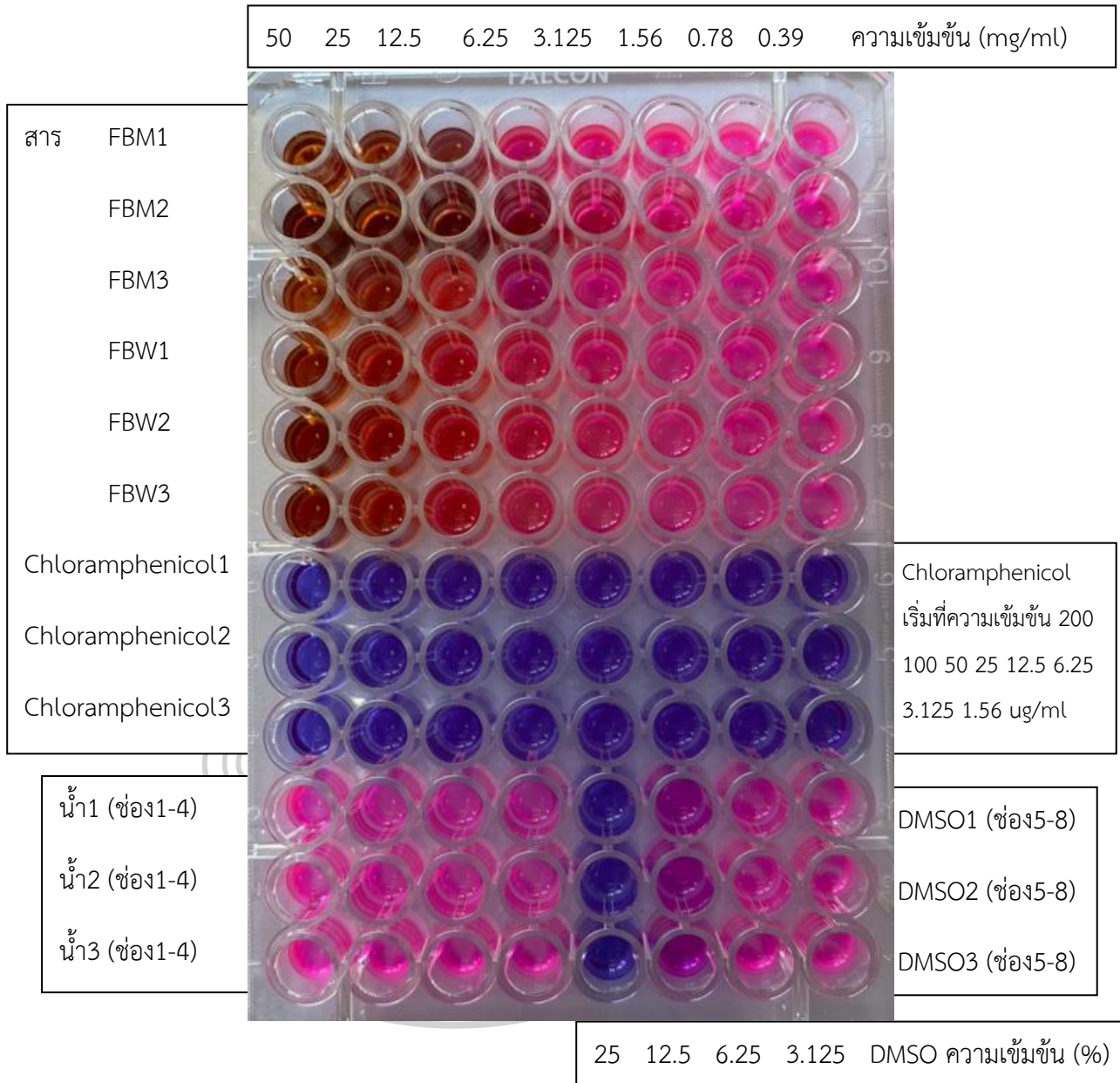


ตารางที่ 21 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *B. subtilis* (Minimal bactericidal concentration: MBC)


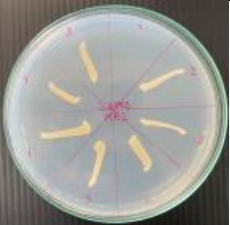
















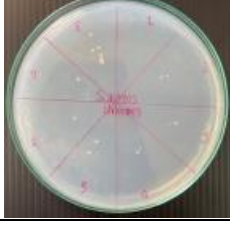
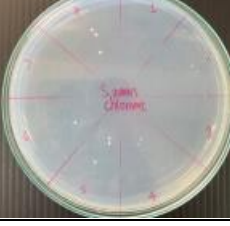
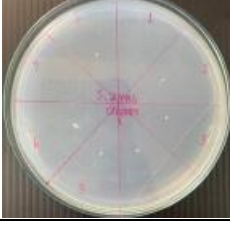
สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Chloramphenicol			

3. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

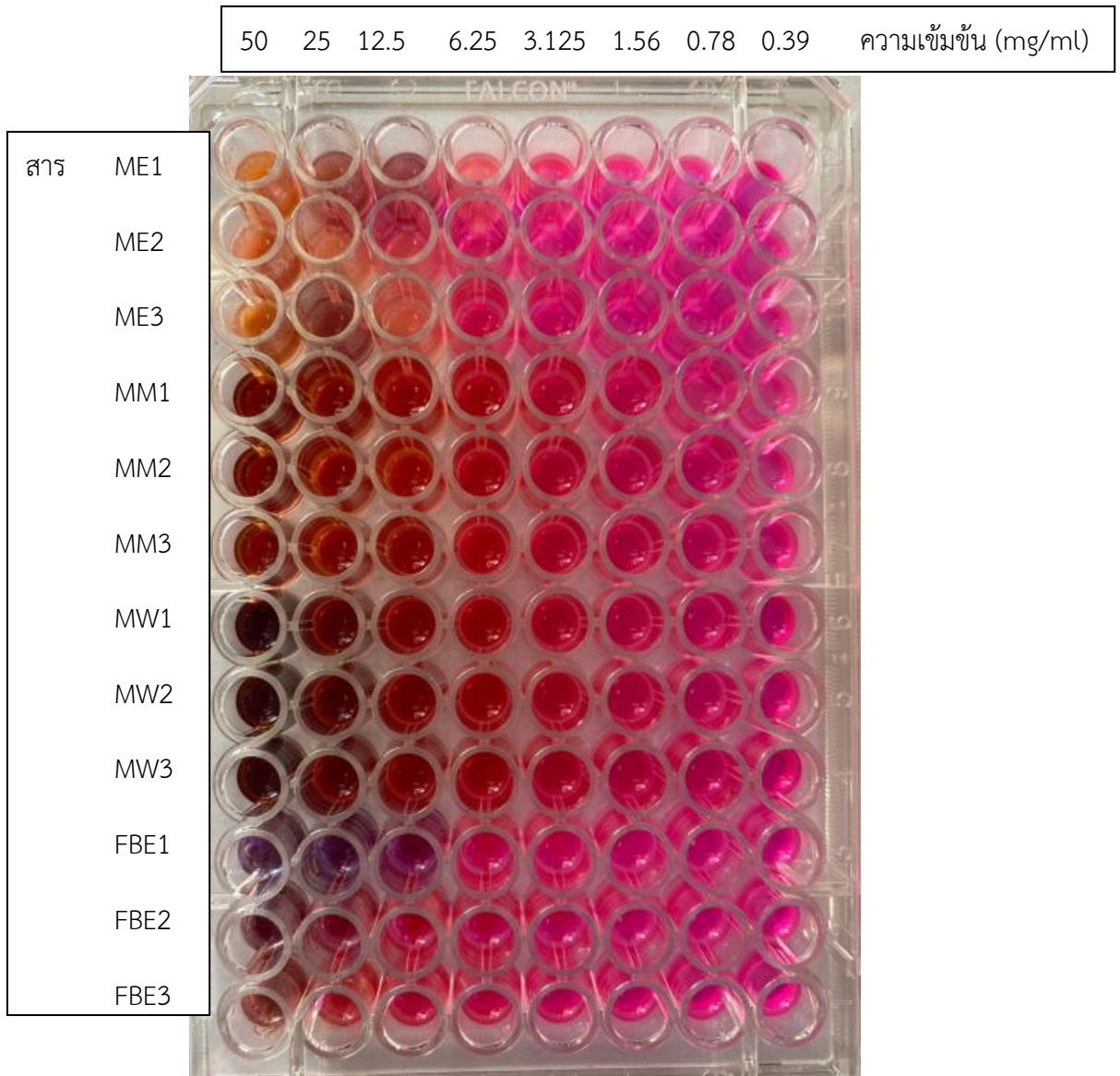


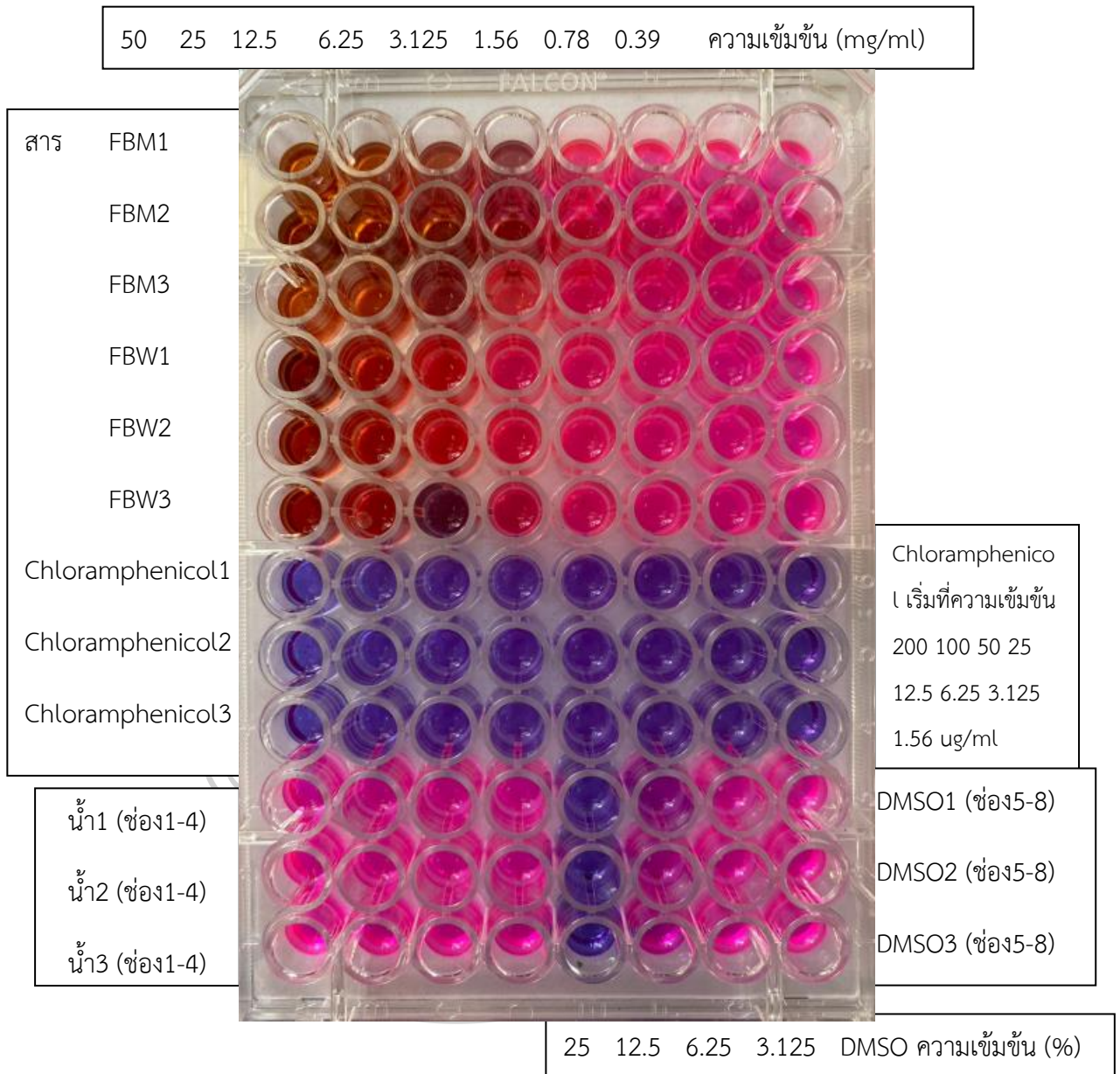


ตารางที่ 22 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* (Minimal bactericidal concentration: MBC)

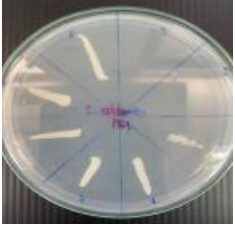




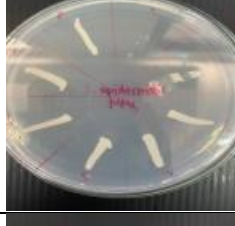


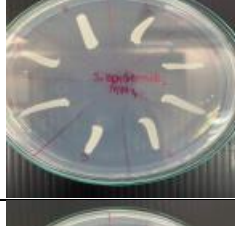


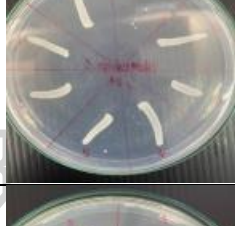
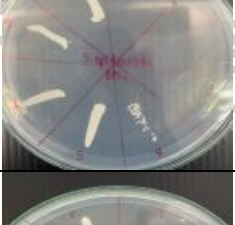
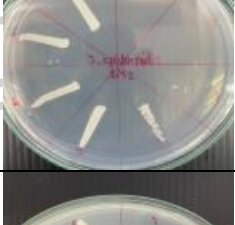
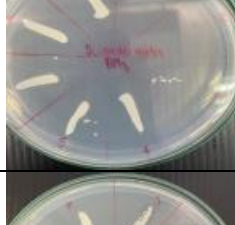
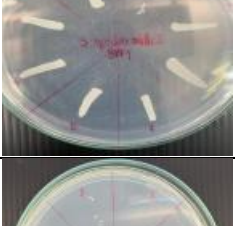
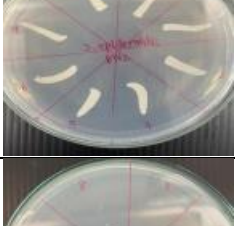
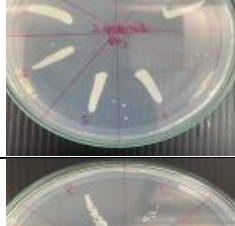

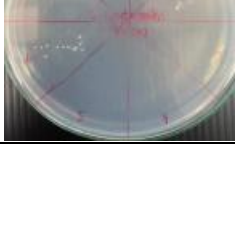
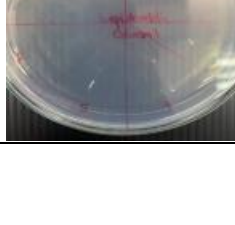
สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Chloramphenicol			

4. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

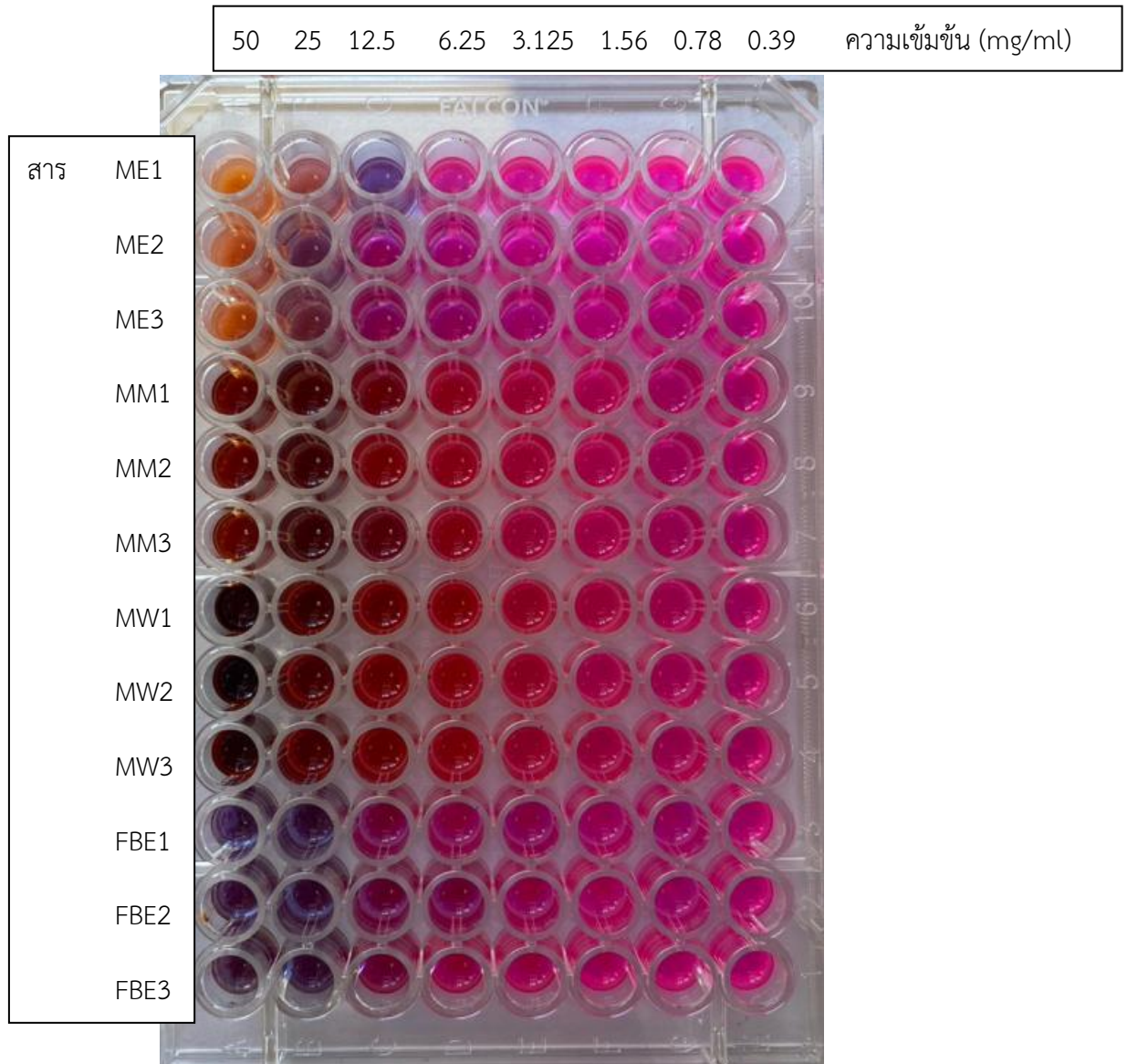


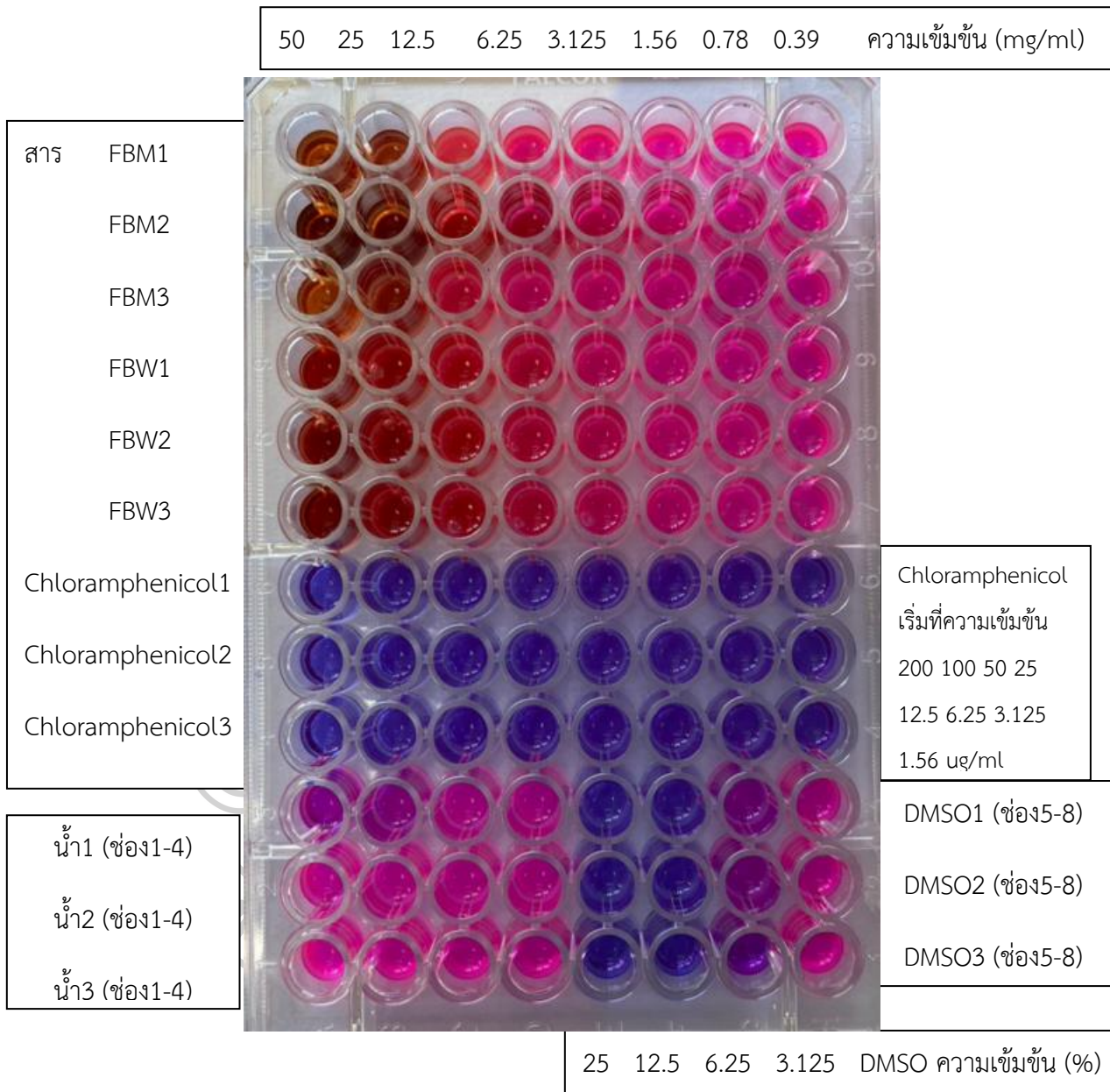


ตารางที่ 23 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* (Minimal bactericidal concentration)






















สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Chloramphenicol			

5. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

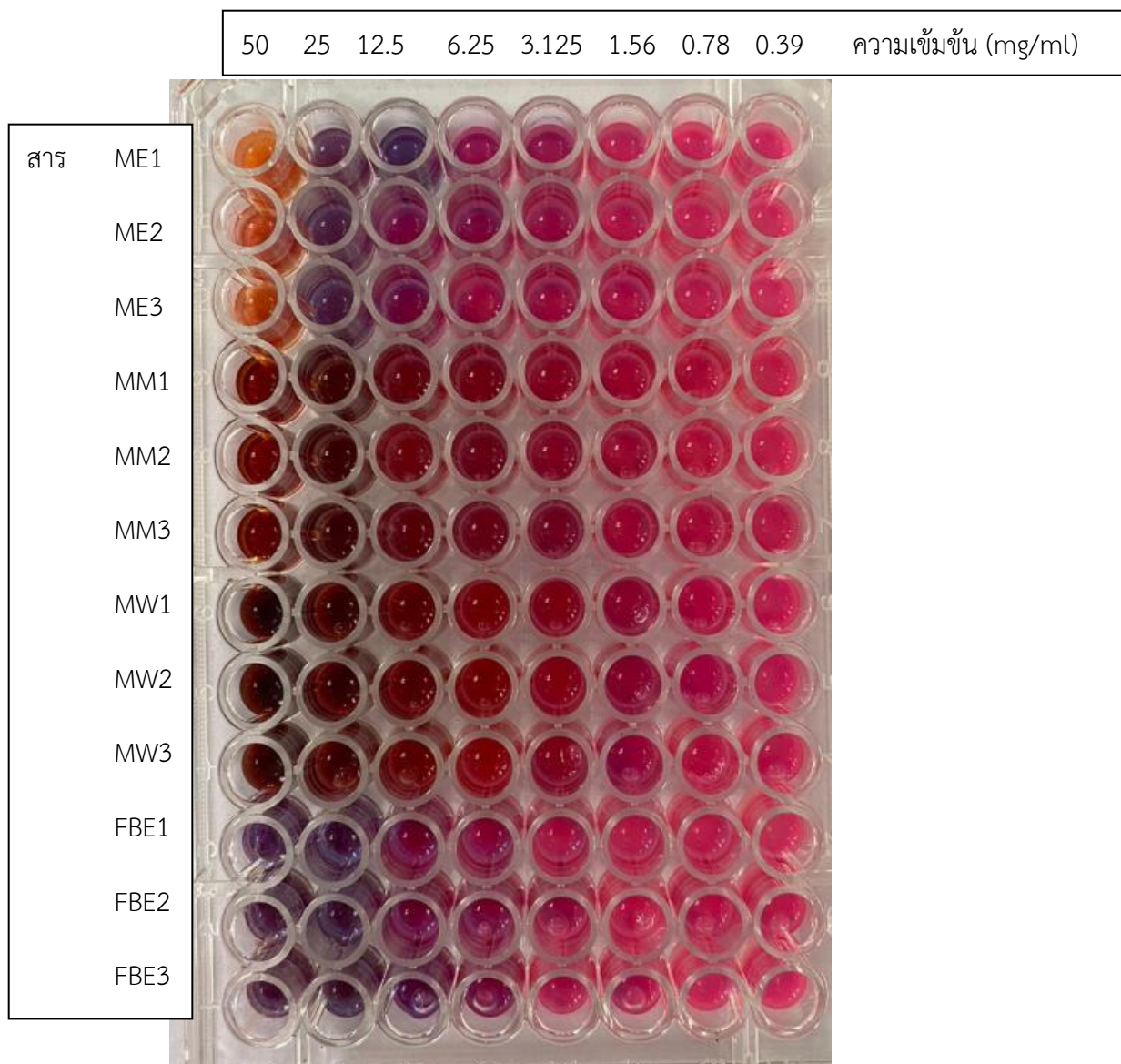


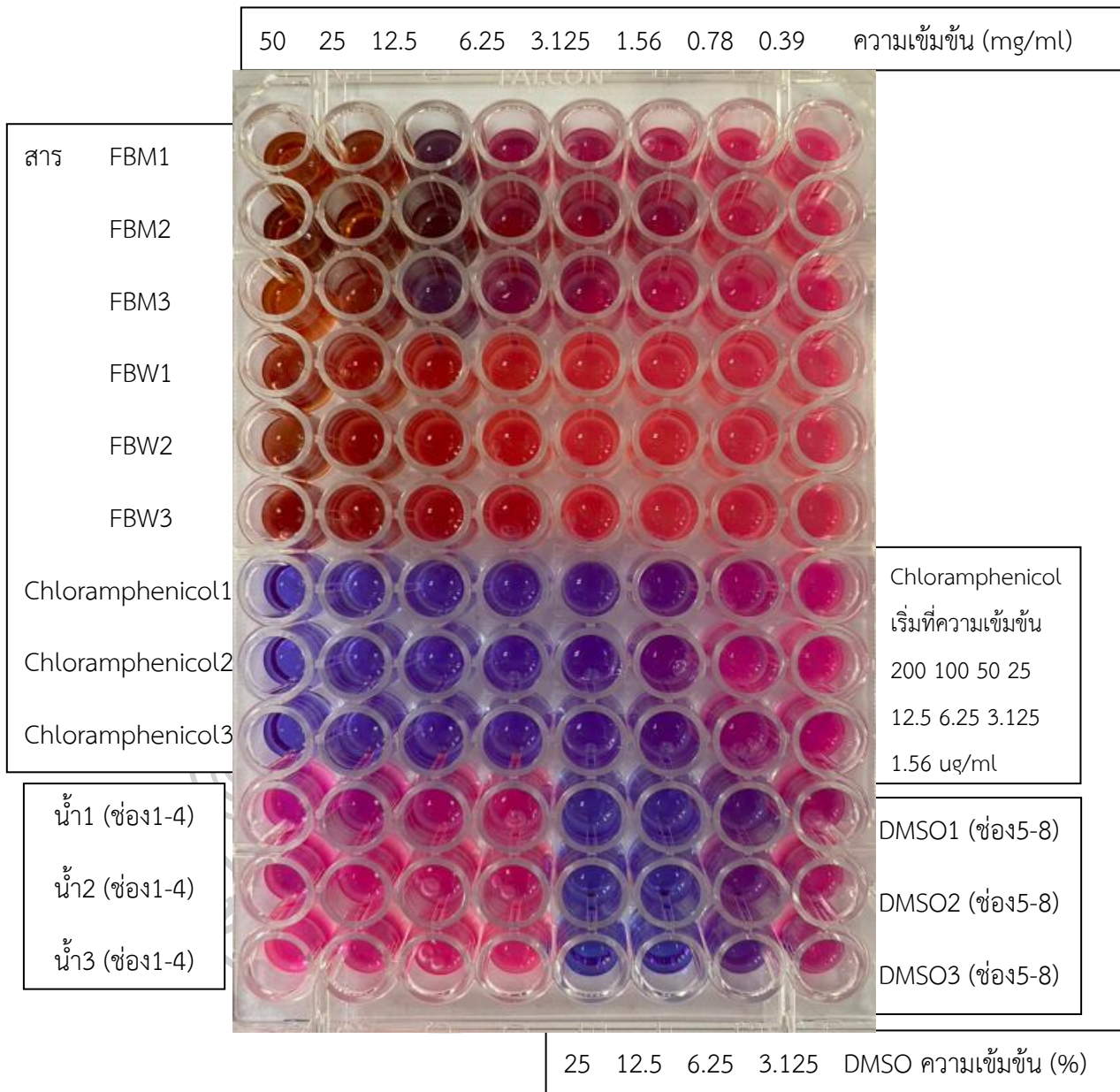


ตารางที่ 24 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* (Minimal bactericidal concentration: MBC)

















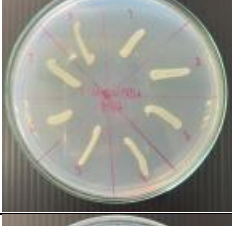




สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Chloramphenicol			

6. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

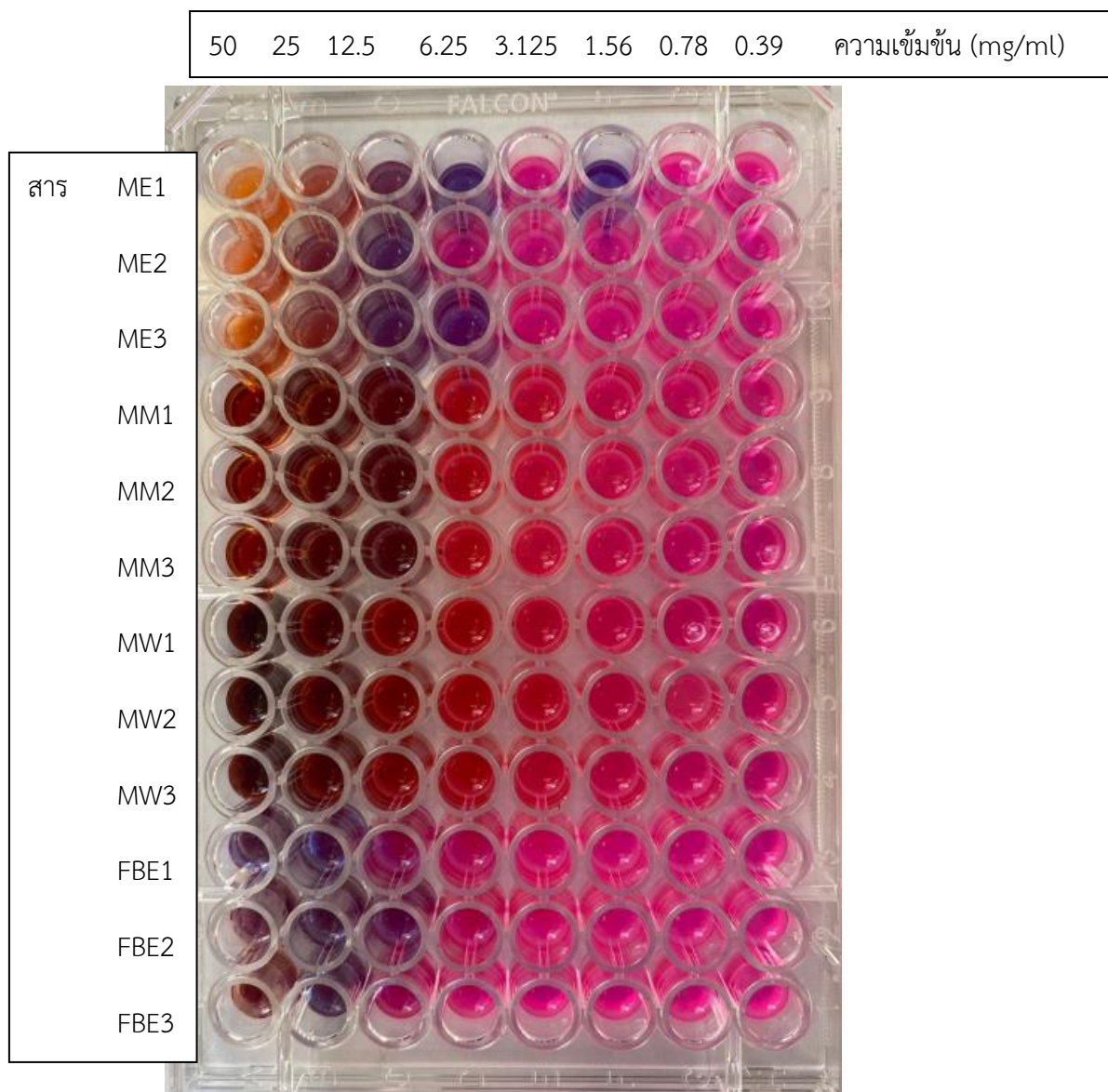


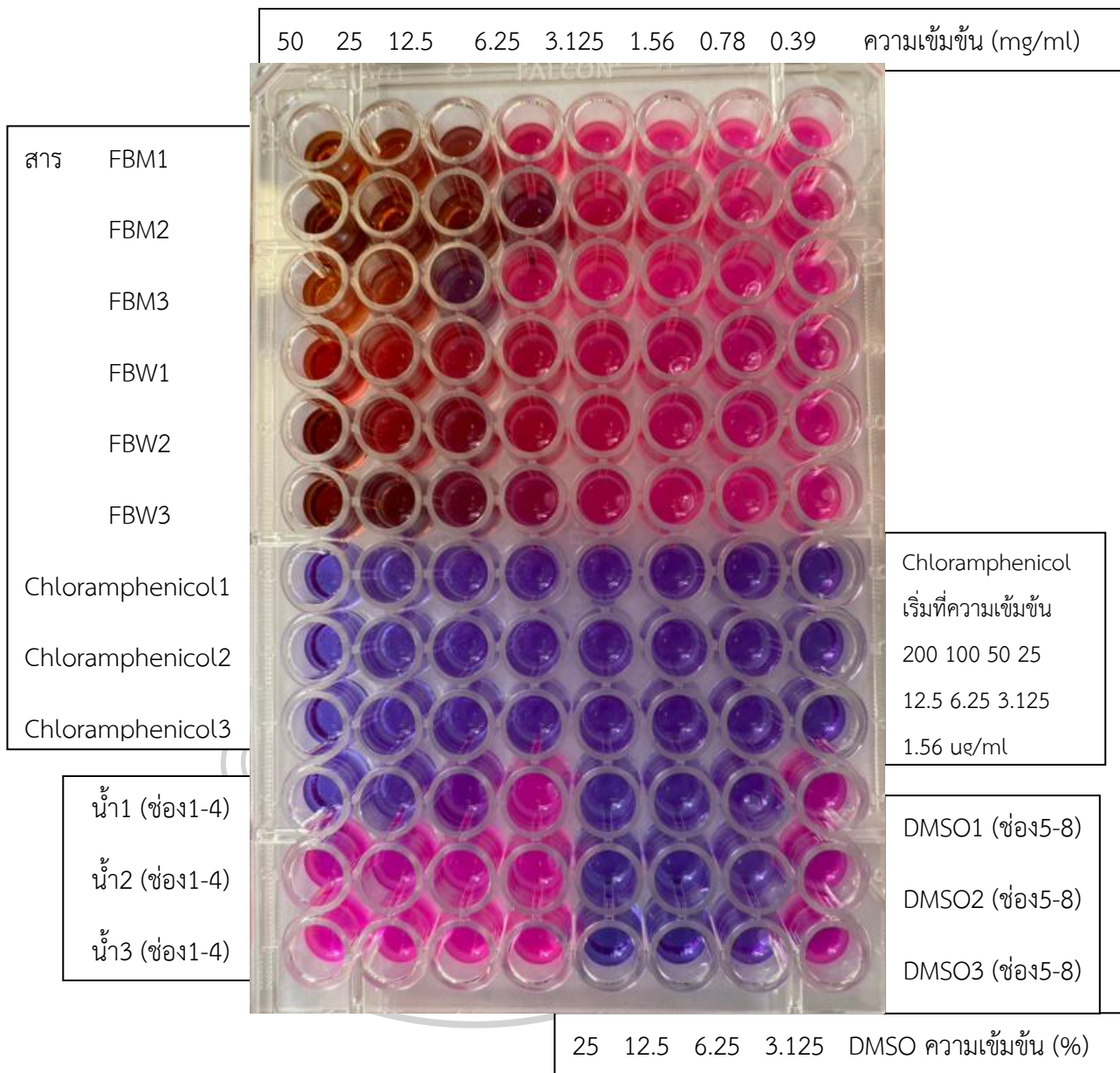


ตารางที่ 25 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *P. aeruginosa* (Minimal bactericidal concentration)


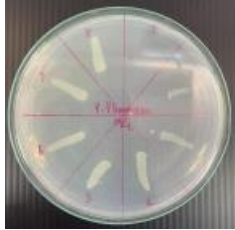













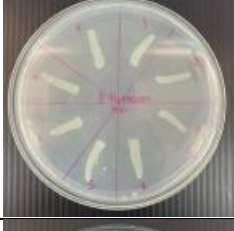


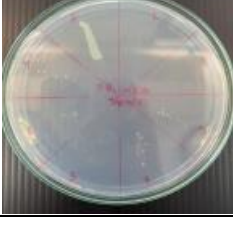
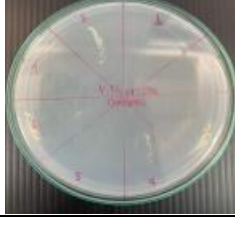
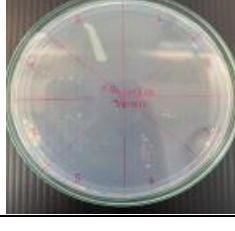
สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Chloramphenicol			

7. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. fluorescens* (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

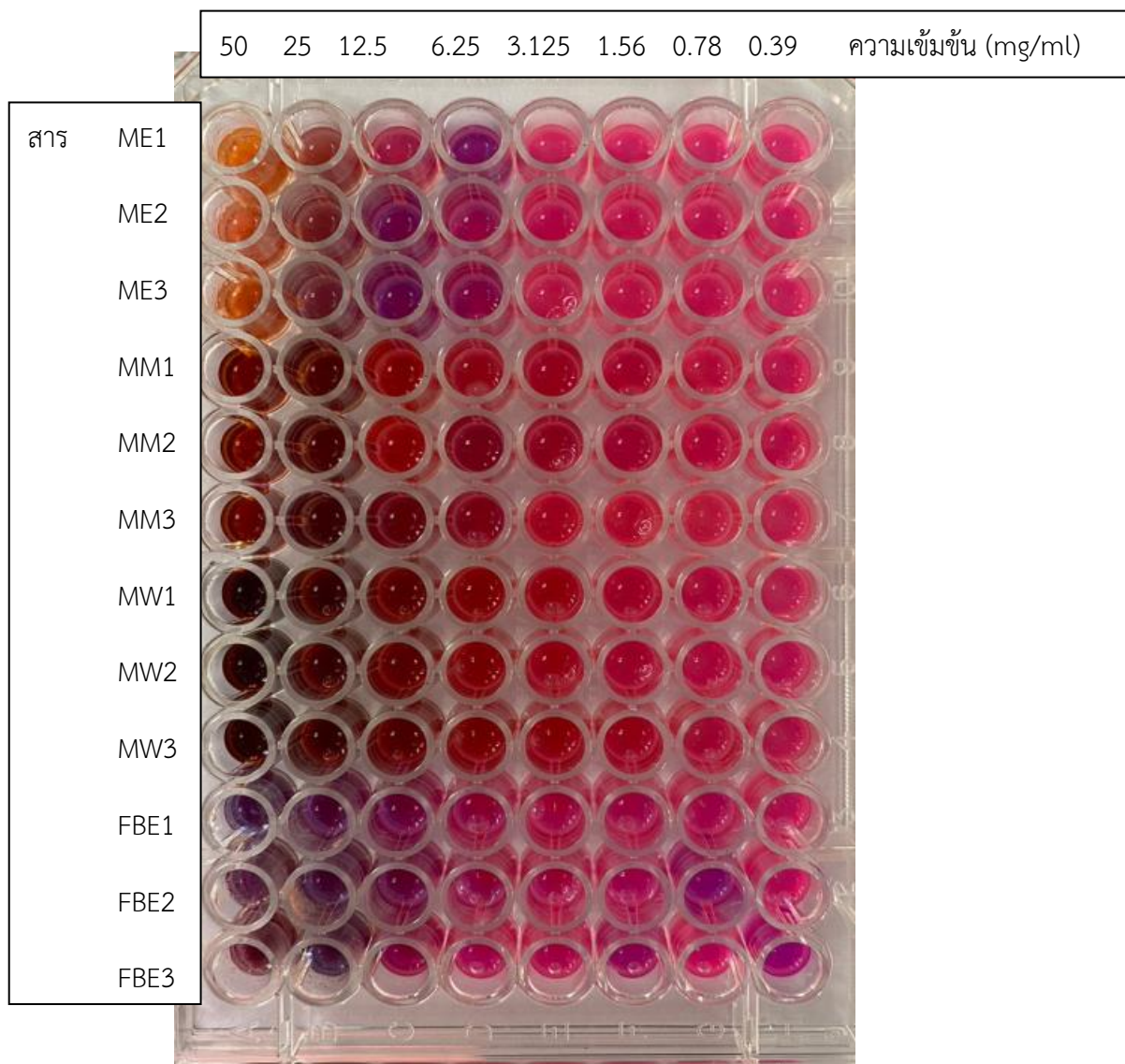


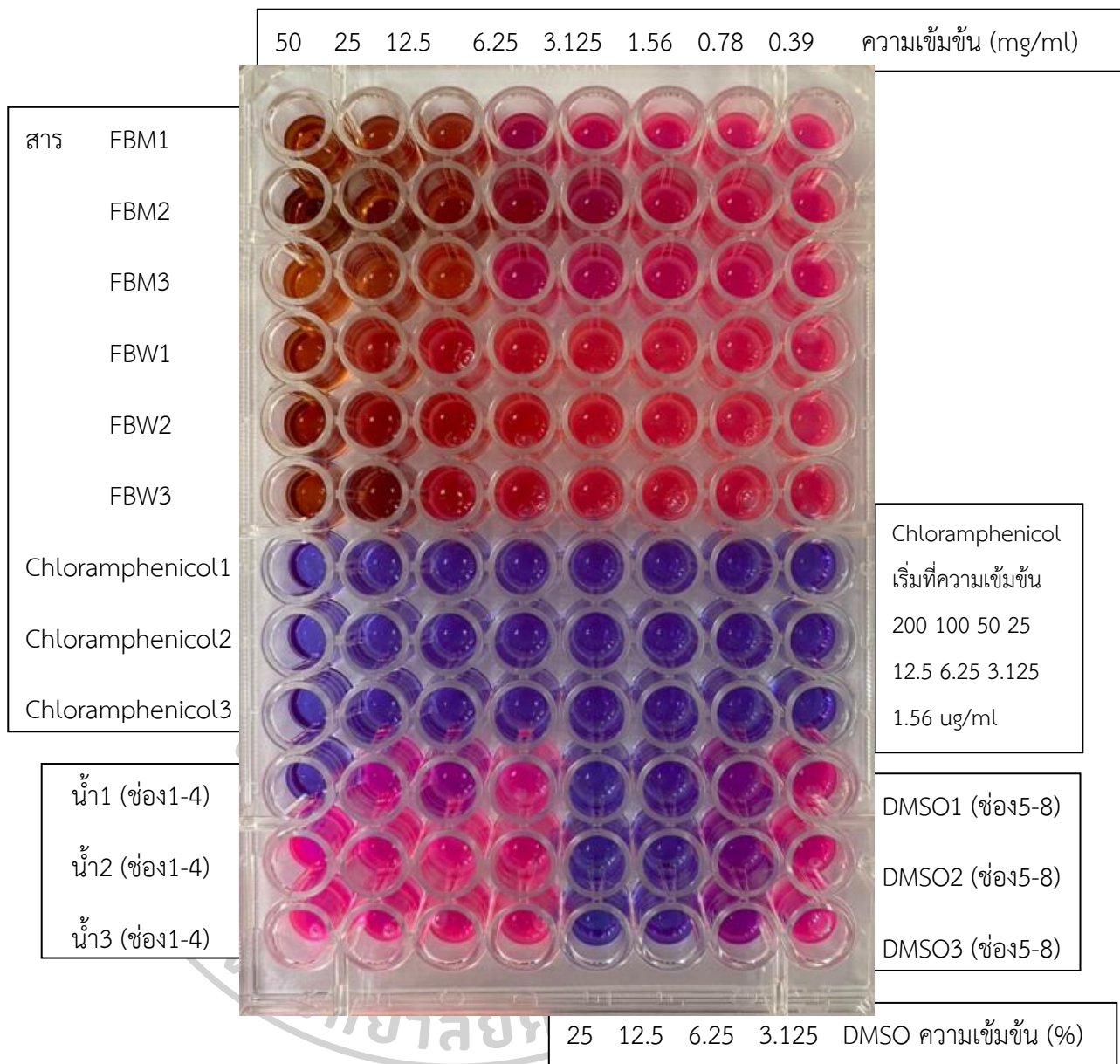


ตารางที่ 26 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *P. fluorescens* (Minimal bactericidal concentration)



















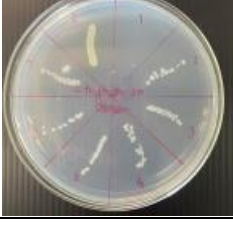


สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Chloramphenicol			

8. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. typhimurium* (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)





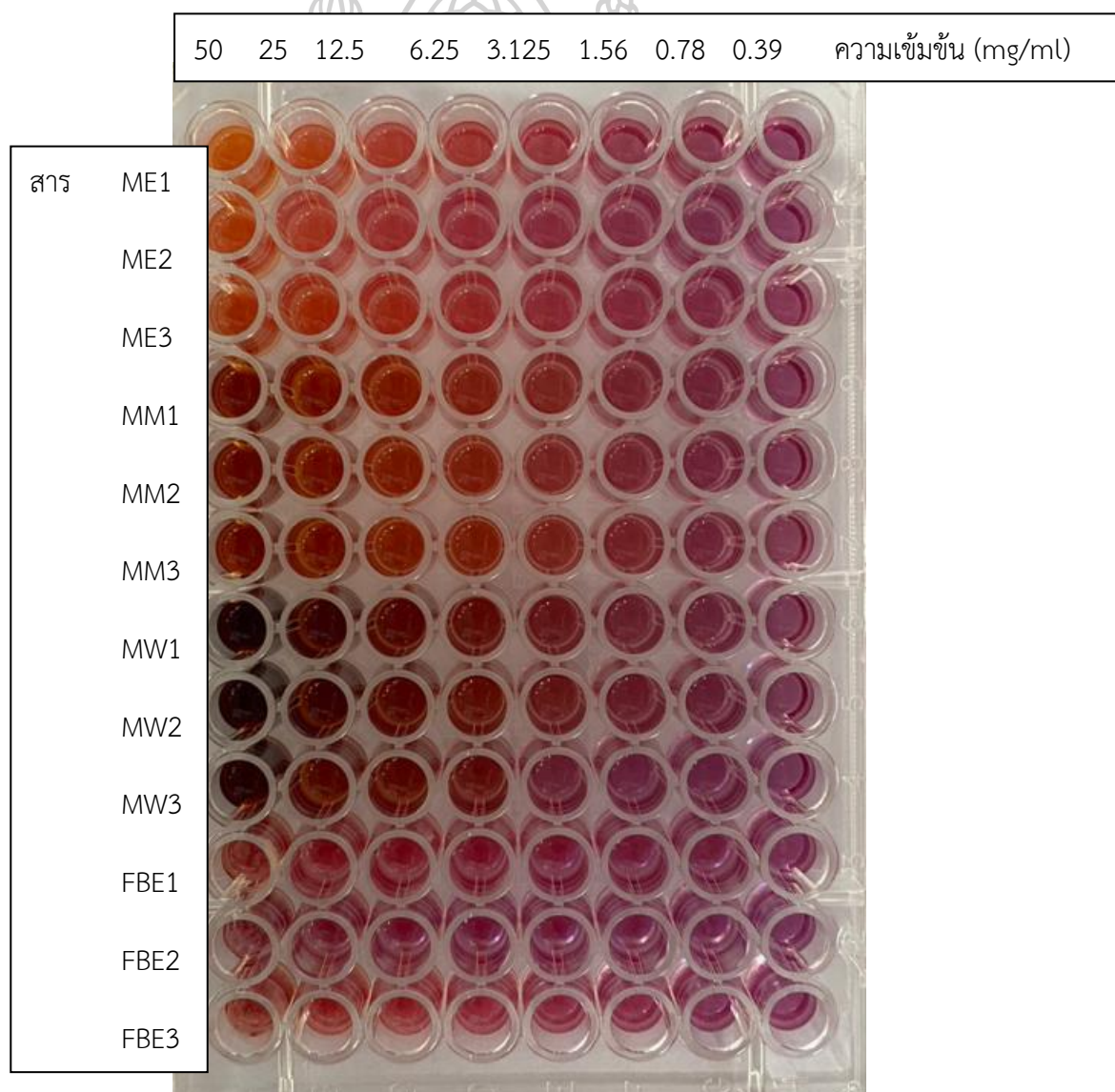
ตารางที่ 27 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. typhimurium* (Minimal bactericidal concentration)

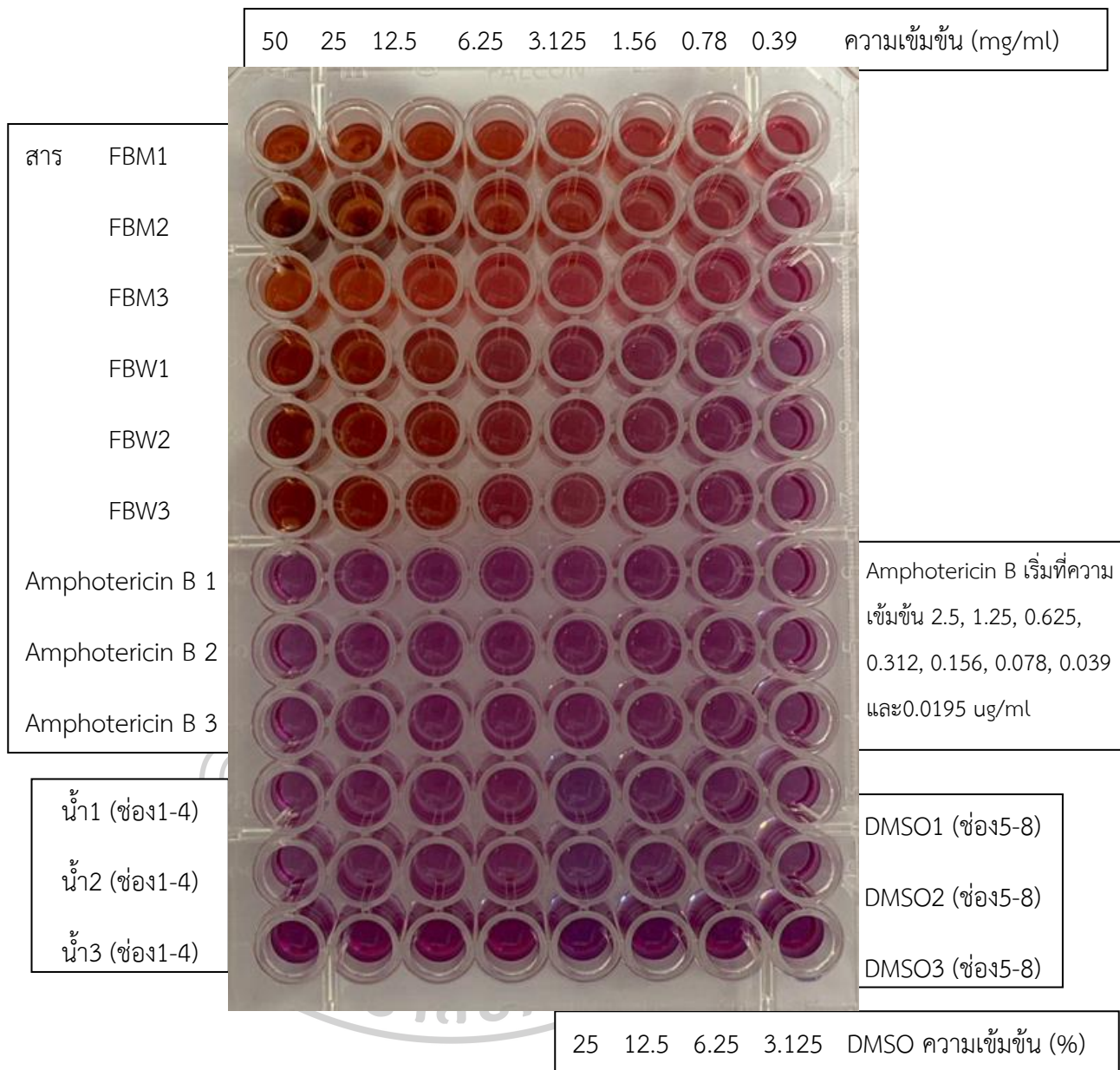
สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Chloramphenicol			

ภาคผนวก ต

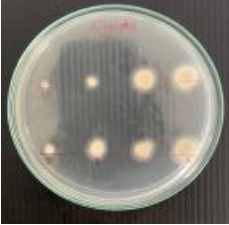
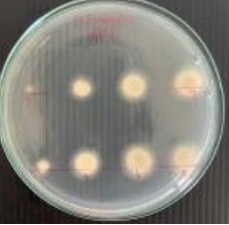
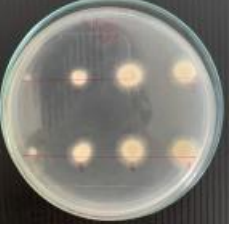


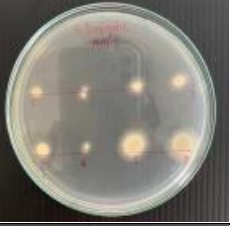








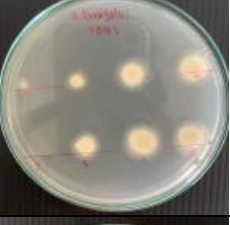

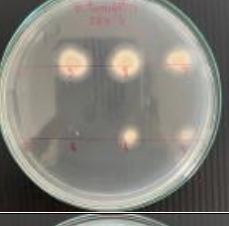

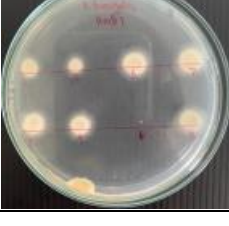
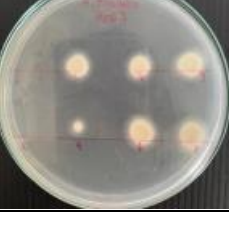
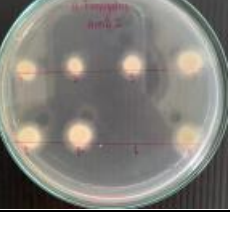
การค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (Minimal fungicidal concentration: MFC)

1. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (Minimal fungicidal concentration: MFC)

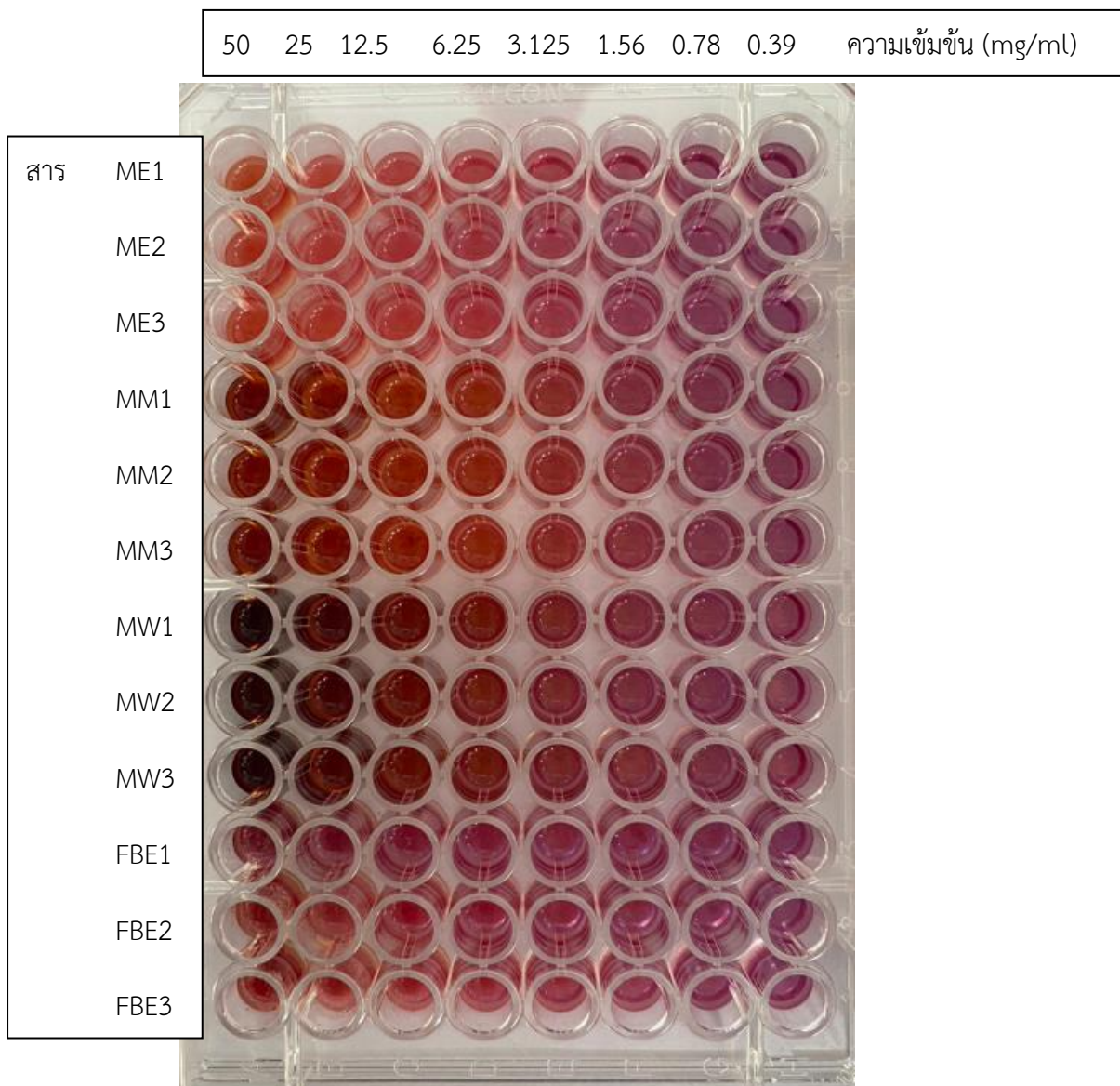


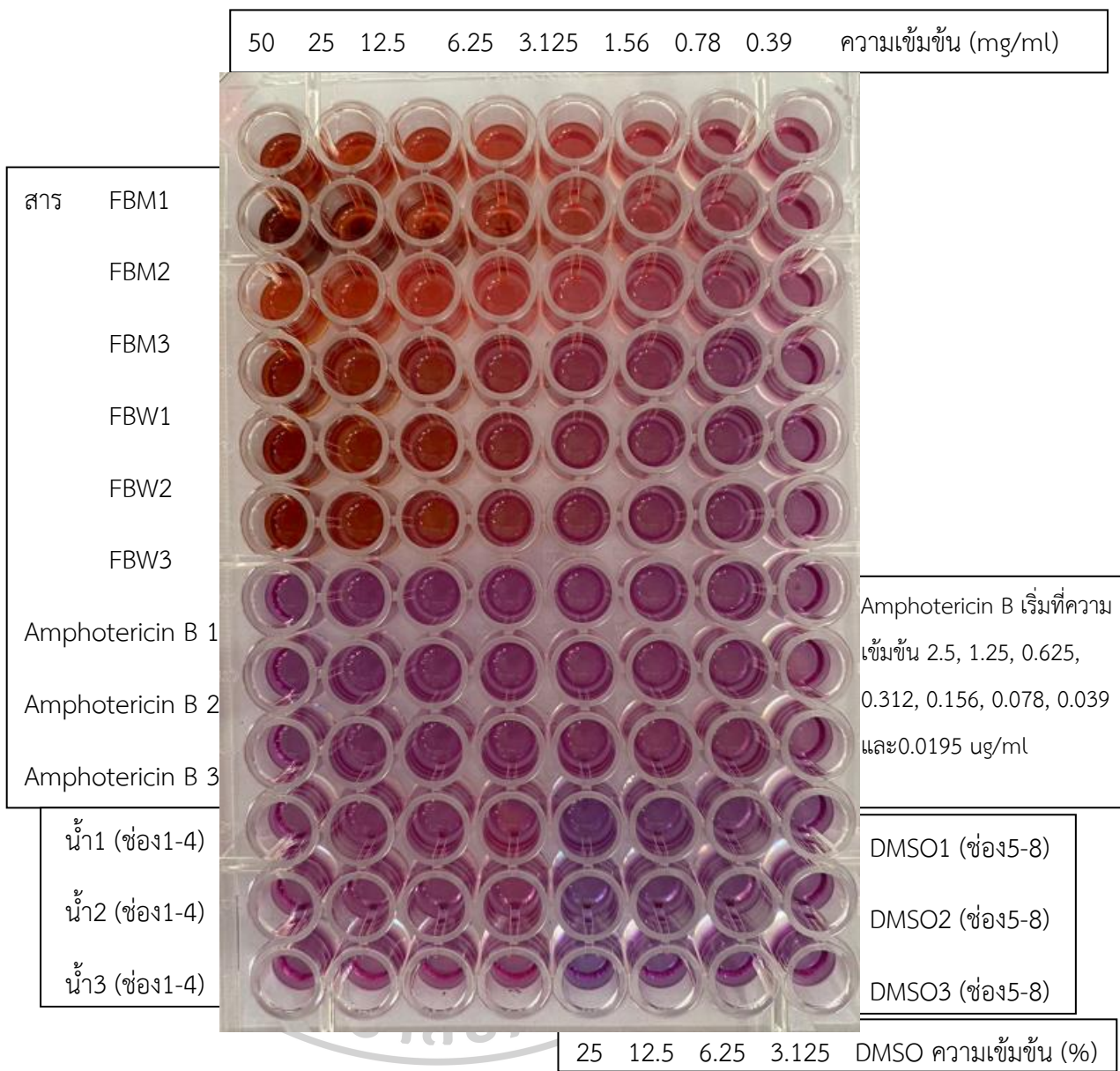


ตารางที่ 28 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *A. fumigatus* (Minimal fungicidal concentration: MFC)

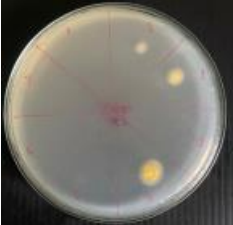
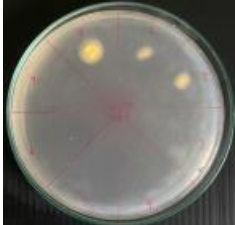
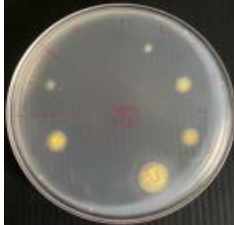

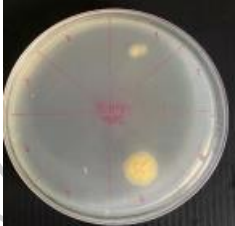



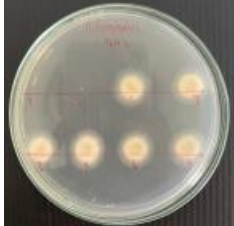












สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Amphotericin B			

2. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (Minimal fungicidal concentration: MFC)

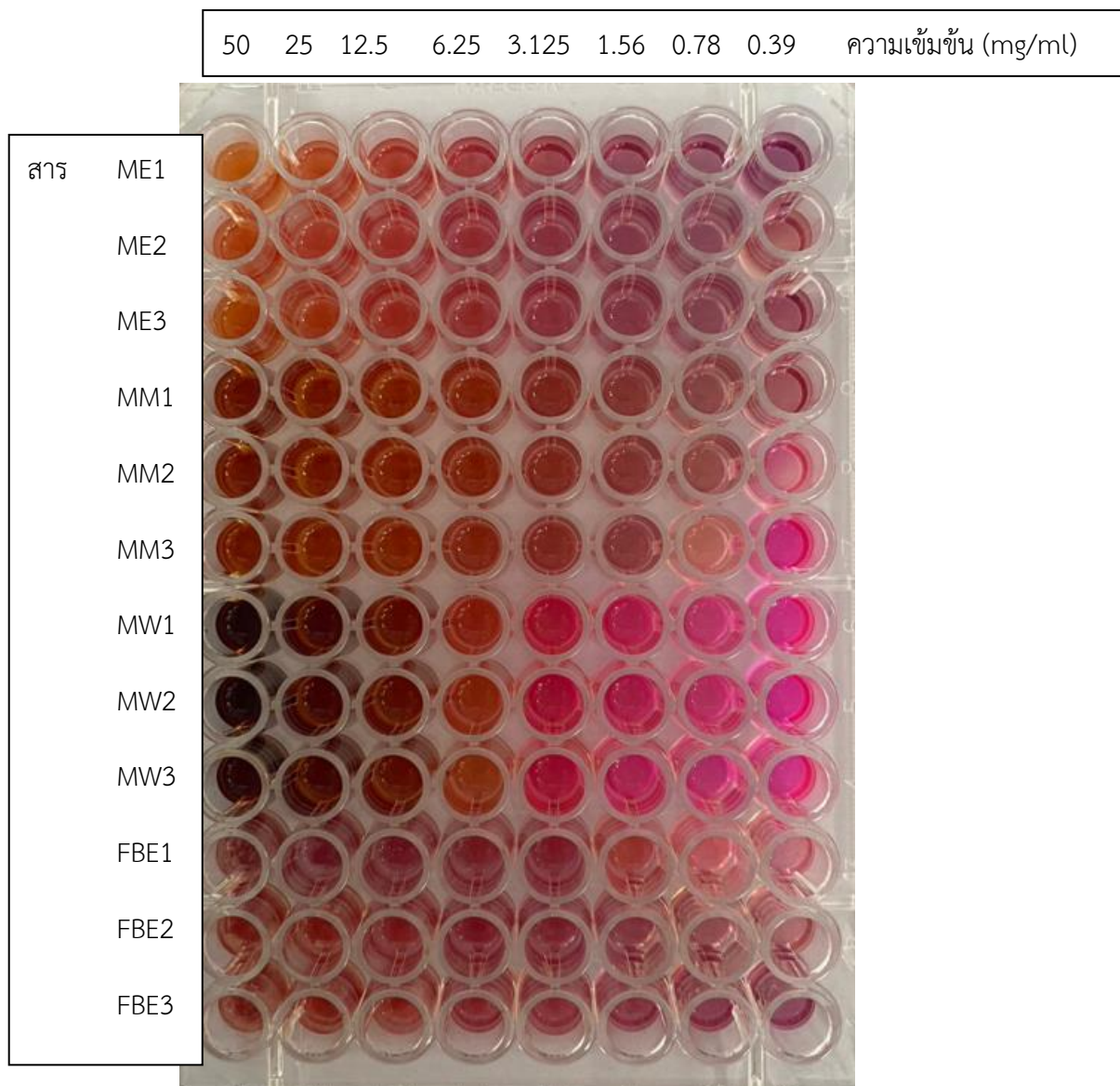


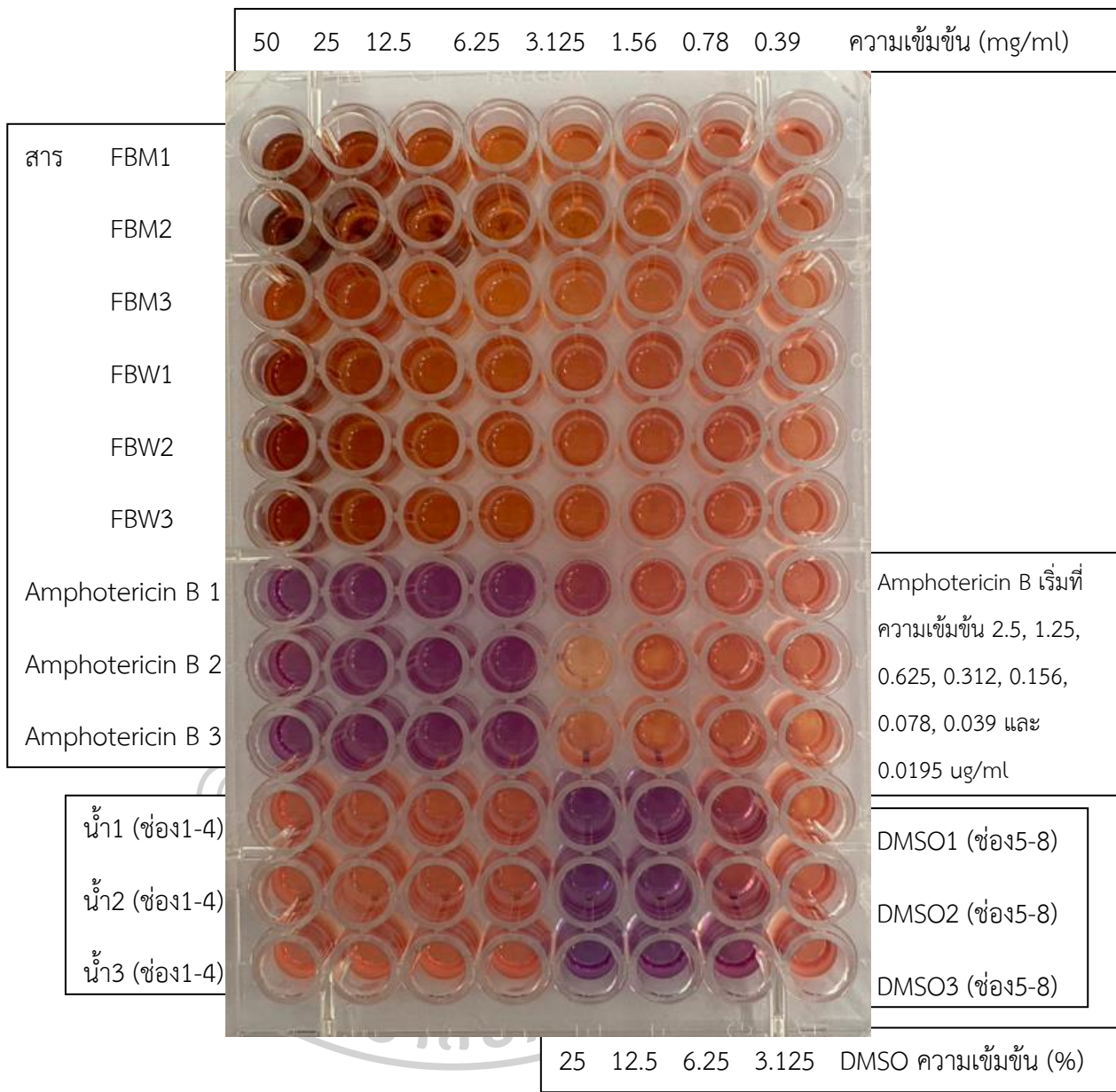


ตารางที่ 29 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *A. niger* (Minimal fungicidal concentration: MFC)



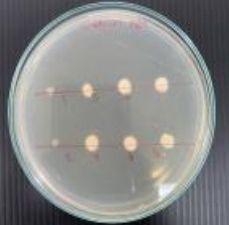



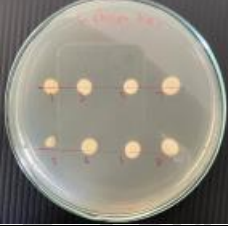
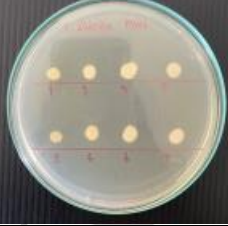
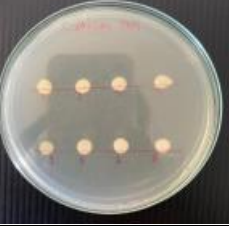
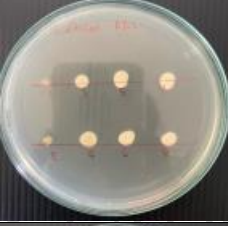




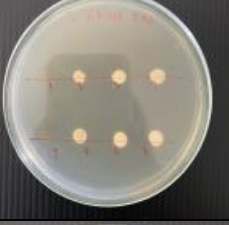






สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Amphotericin B			

3. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (Minimal fungicidal concentration: MFC)

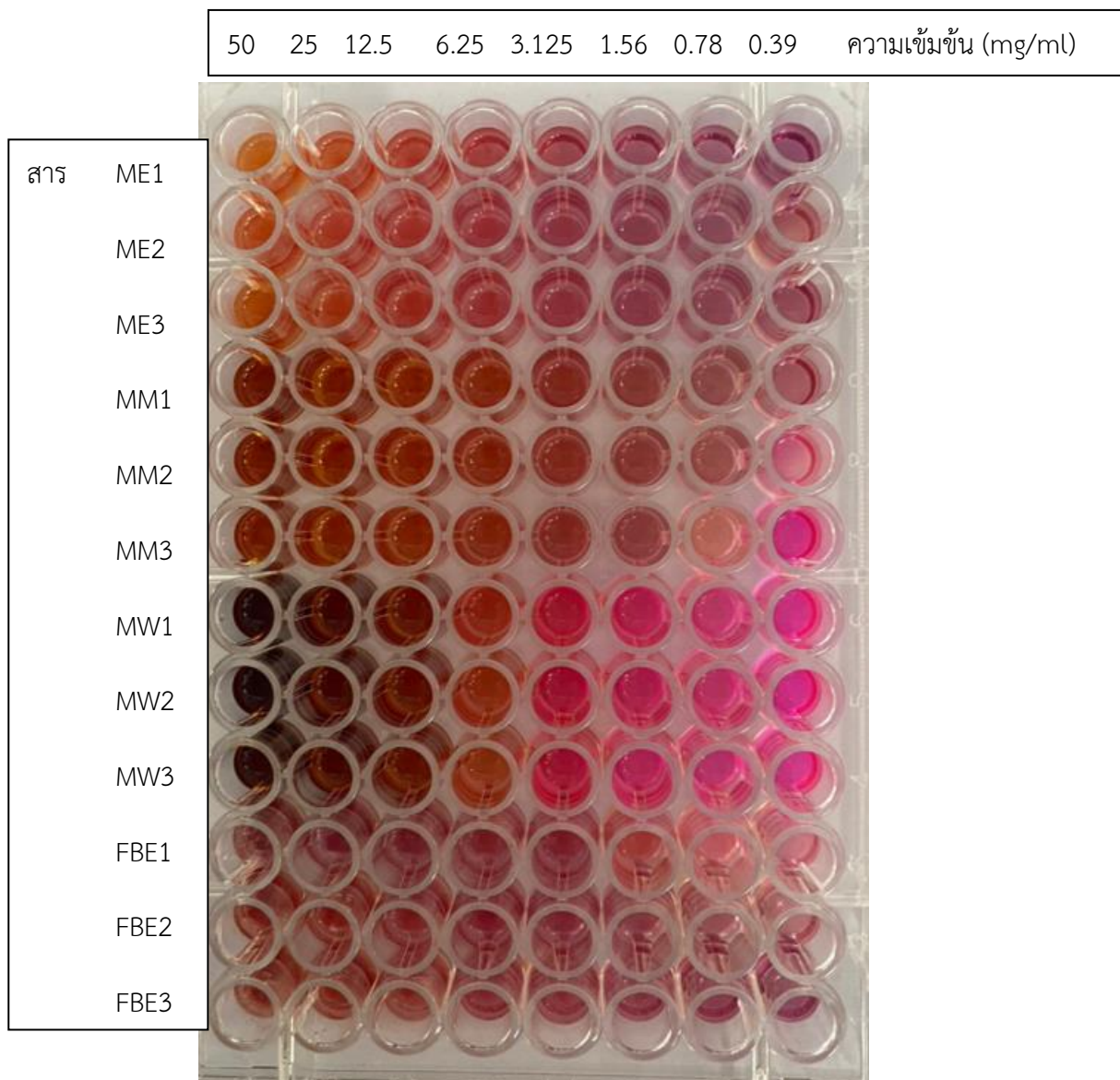


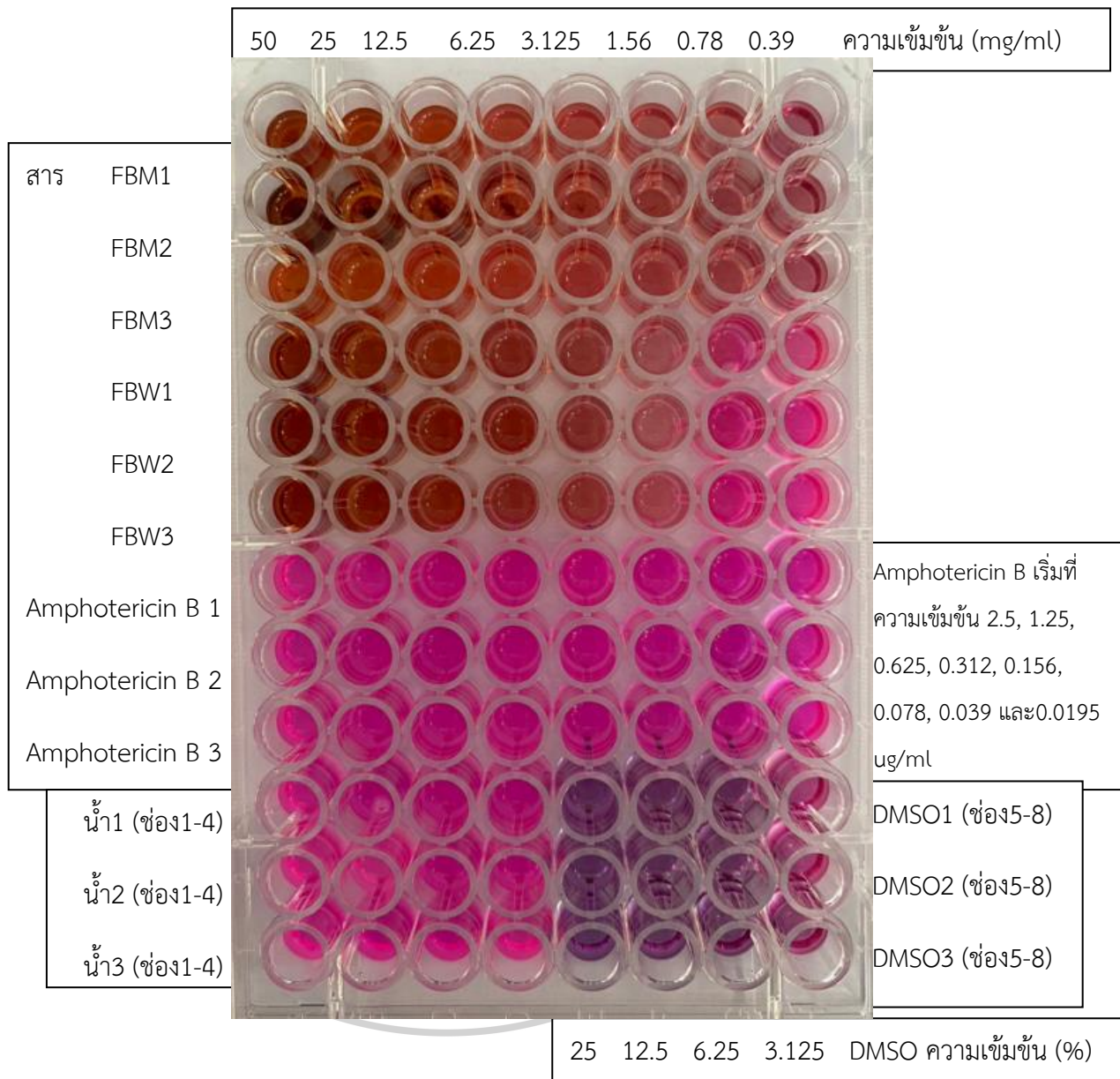


ตารางที่ 30 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *C.albicans* (Minimal fungicidal concentration: MFC)

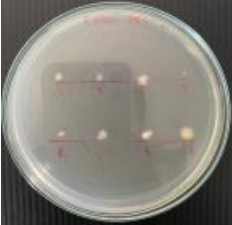
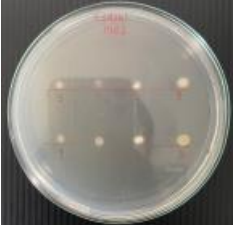

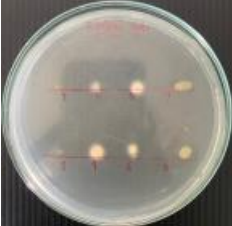
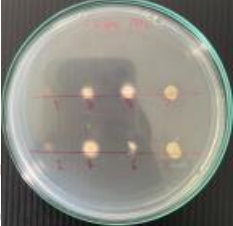
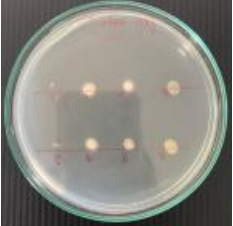
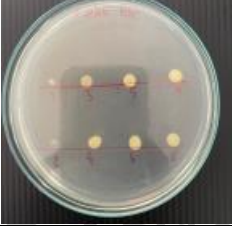
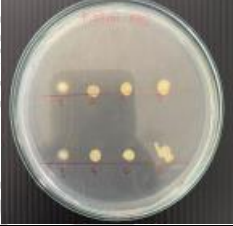
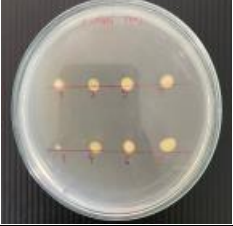
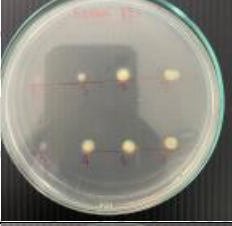

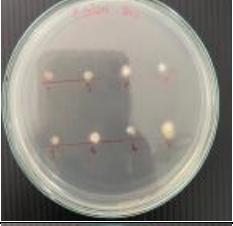
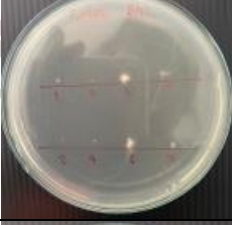
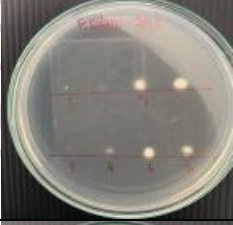

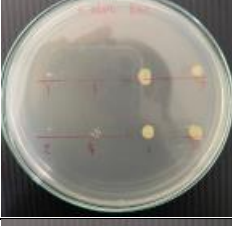

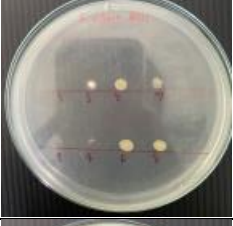
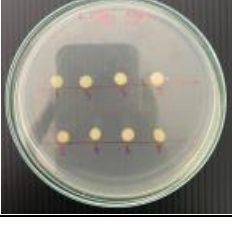

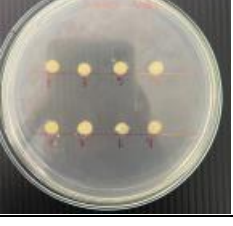
สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Amphotericin B			

4. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. solani* (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (Minimal fungicidal concentration: MFC)

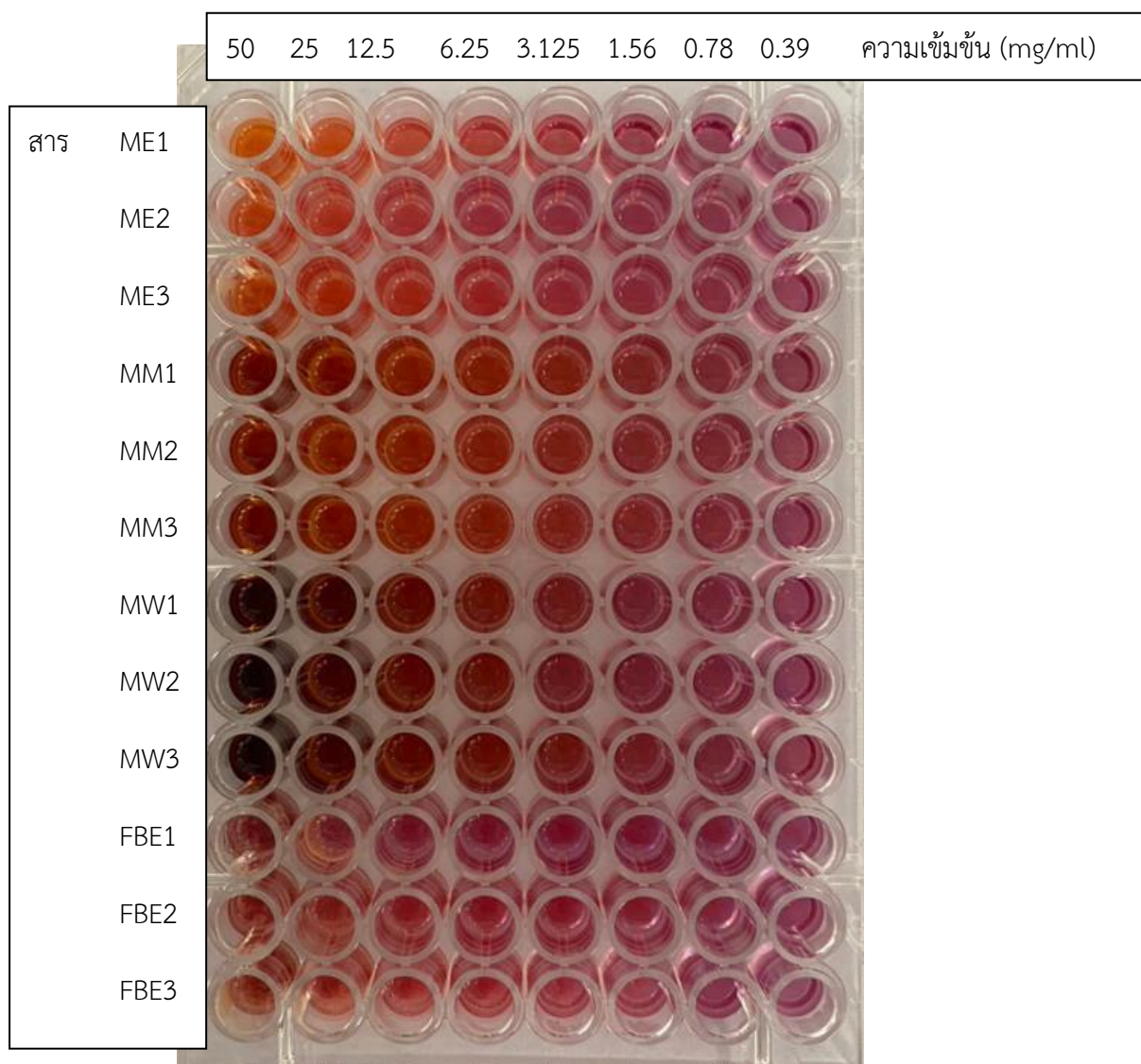


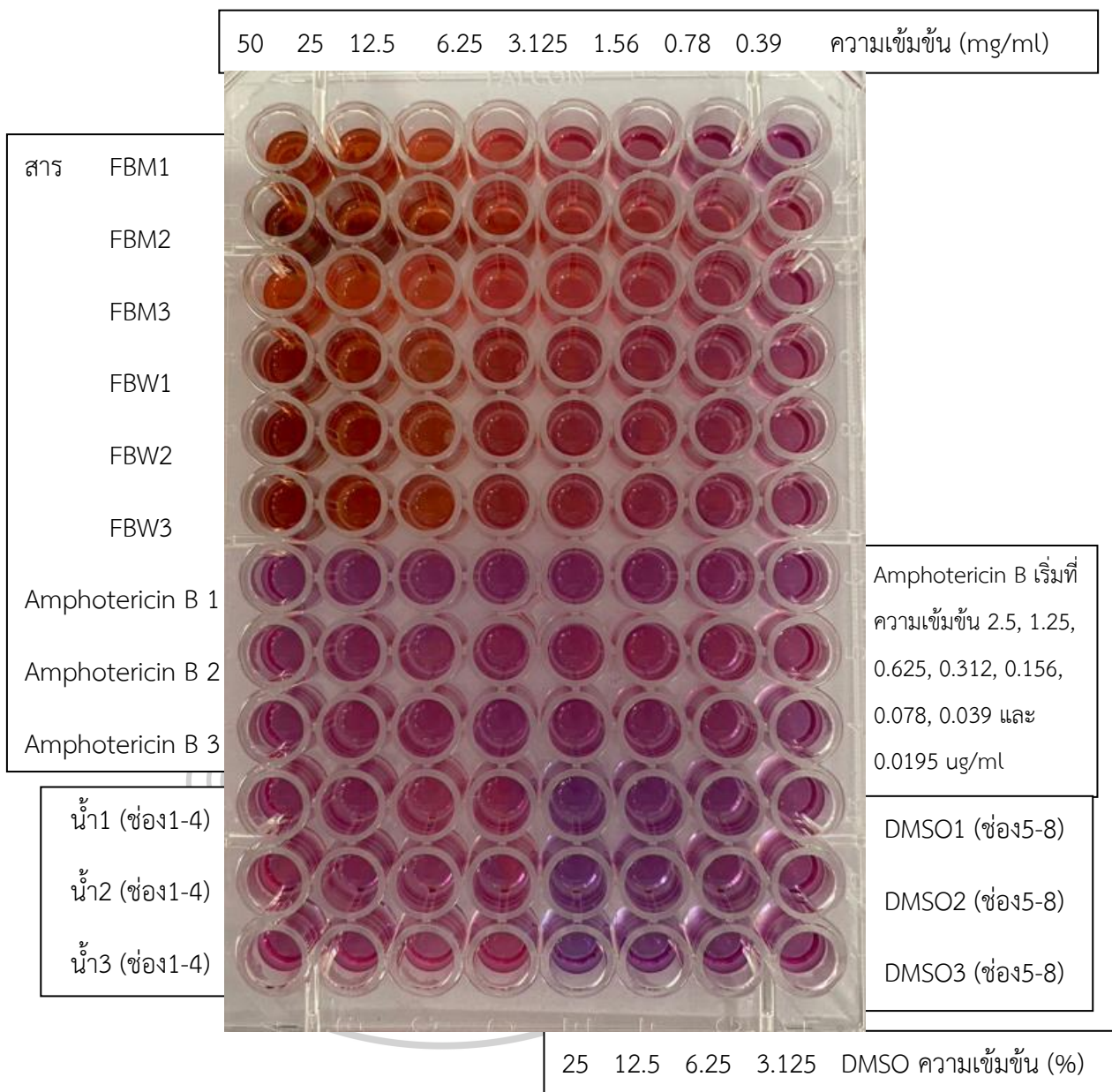


ตารางที่ 31 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *F. solani* (Minimal fungicidal concentration: MFC)

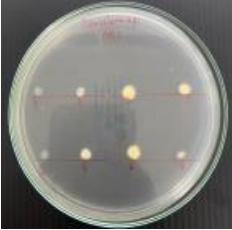
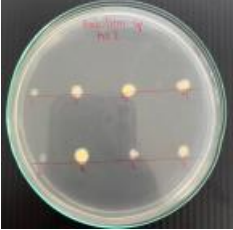
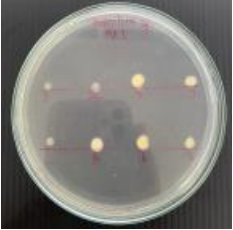
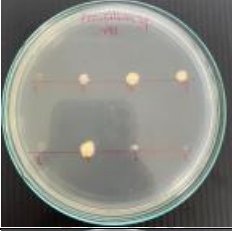

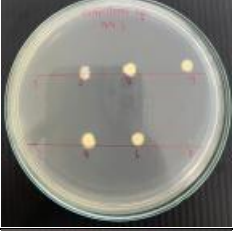

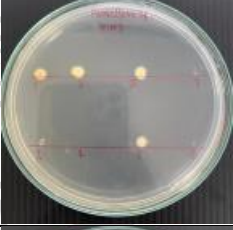
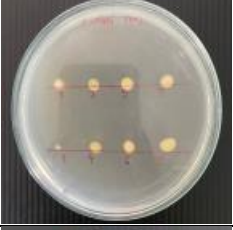
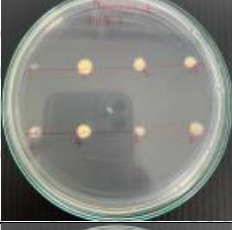
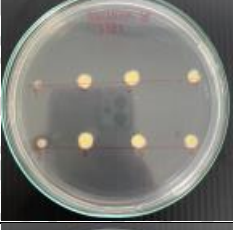


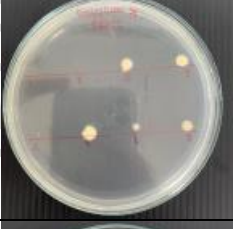

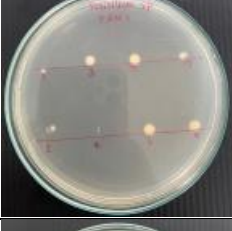
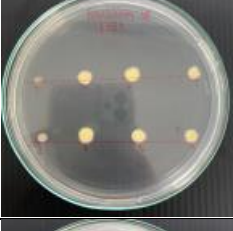
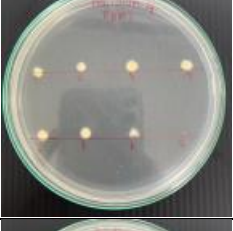
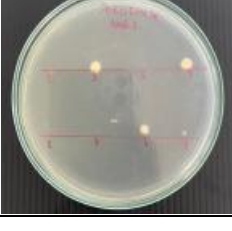
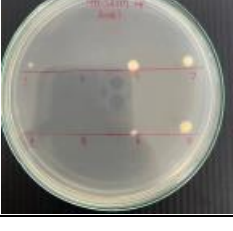
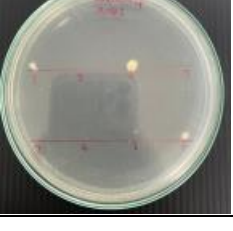
สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Amphotericin B			

5. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Penicillium* sp. (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (Minimal fungicidal concentration: MFC)

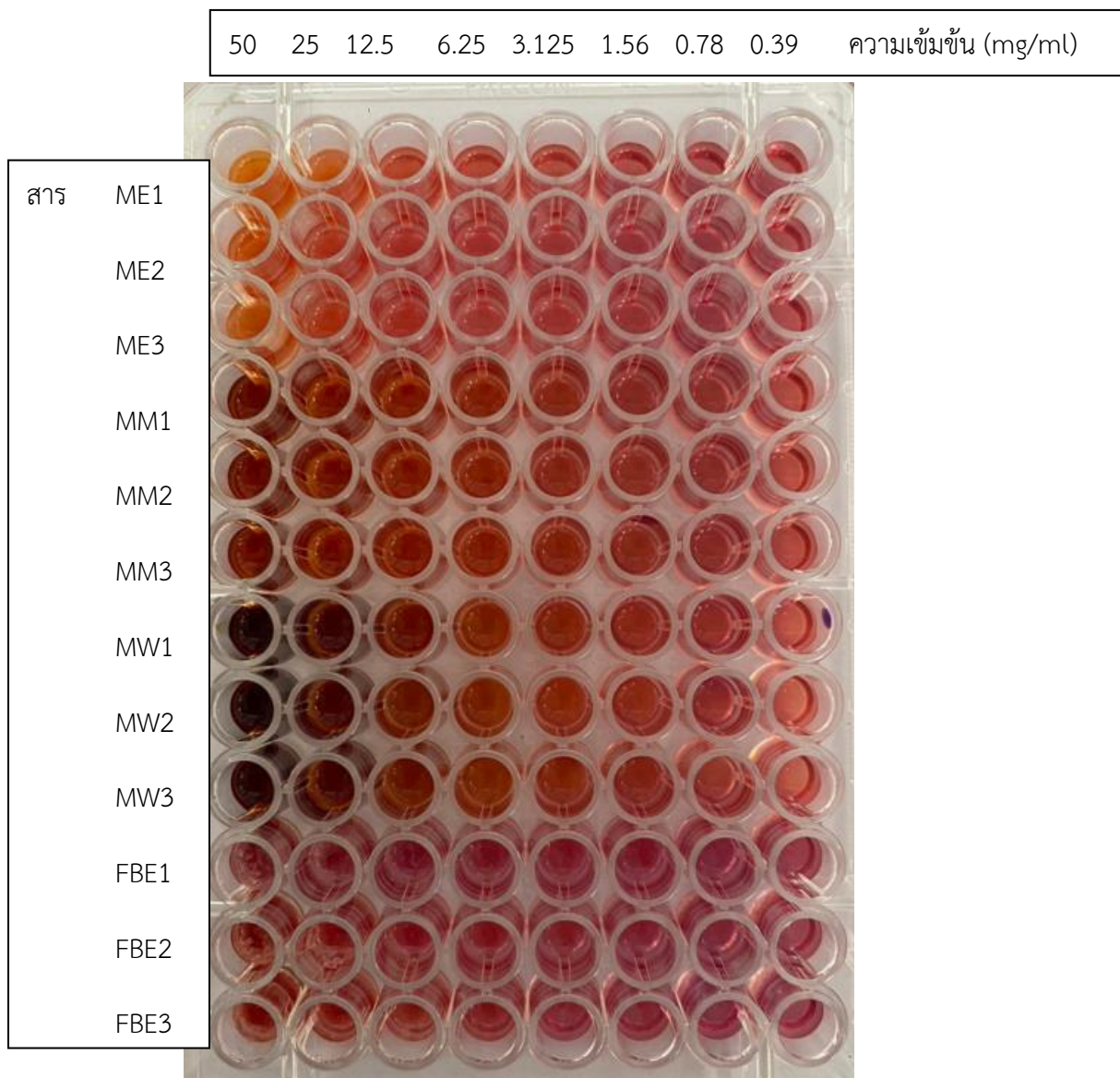


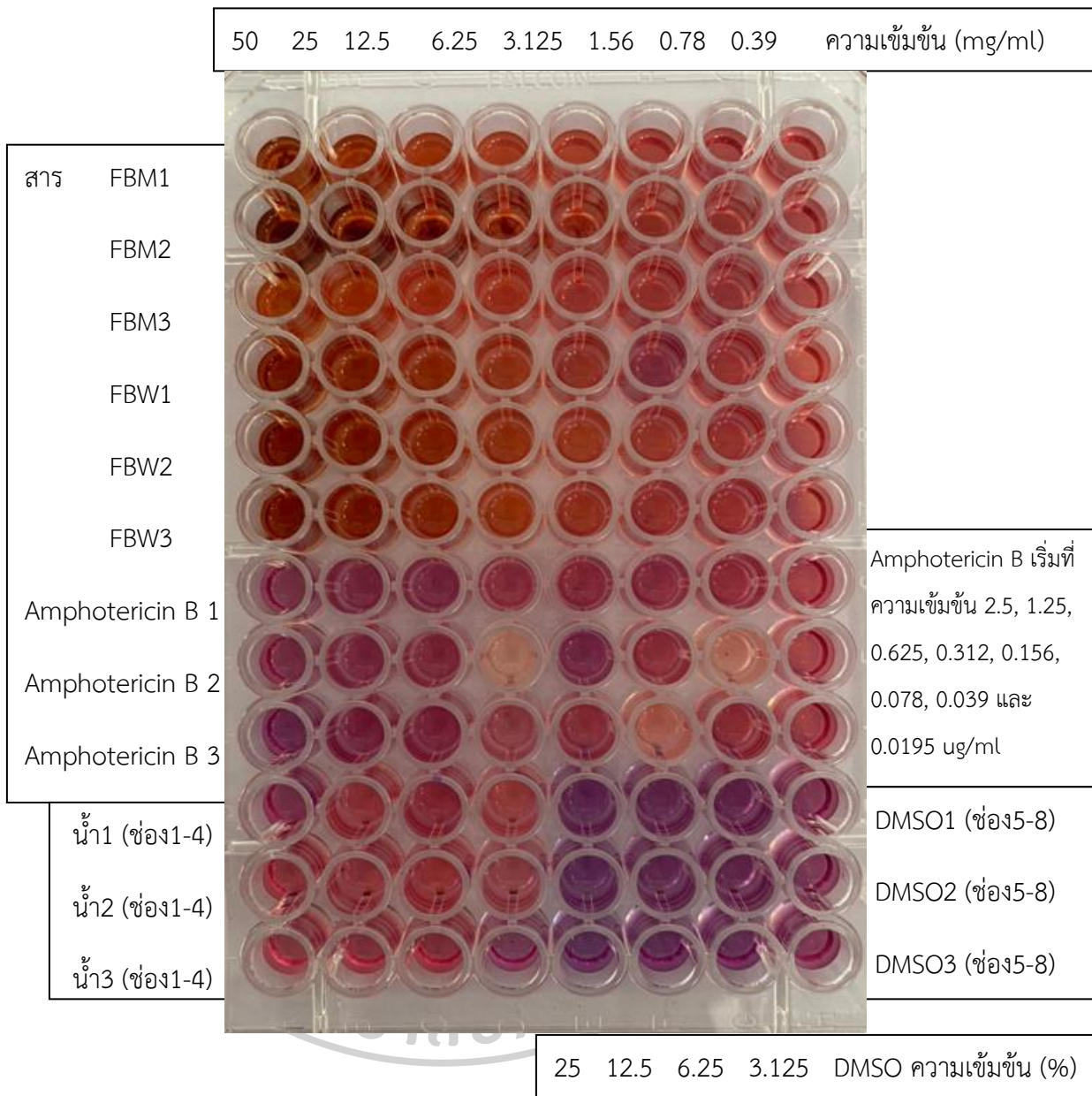


ตารางที่ 32 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Penicillium* sp. (Minimal fungicidal concentration: MFC)


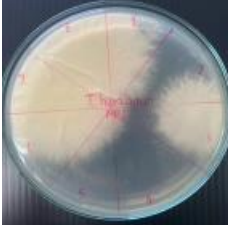


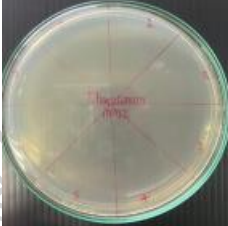

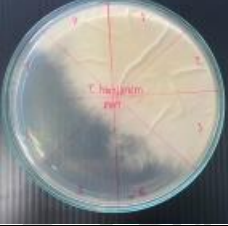
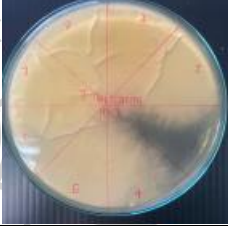


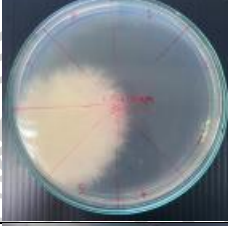
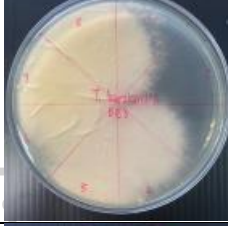

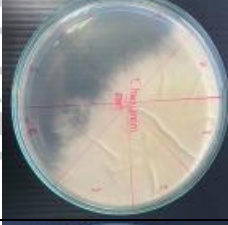


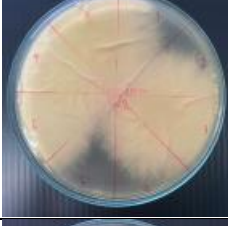




สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Amphotericin B			

1. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzainum* (Minimal inhibitory concentration: MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (Minimal fungicidal concentration: MFC)





ตารางที่ 33 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *T. harzainum* (Minimal fungicidal concentration: MFC)

สารสกัด	Rep1	Rep2	Rep3
ME			
MM			
MW			
FBE			
FBM			
FBW			
Amphotericin B			

ภาคผนวก ก

การศึกษาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging

1. ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ด้วยวิธี DPPH free radical scavenging

ตารางที่ 34 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ในตัวทำละลาย DMSO ด้วยวิธี DPPH

Trolox (mg/ml)	A520	% Inhibition
0.000	0.7123	0.00
0.002	0.6932	2.68
0.003	0.6288	11.72
0.006	0.5908	17.06
0.013	0.3596	49.52
0.025	0.1095	84.63
0.050	0.0295	95.86

ตารางที่ 35 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ในตัวทำละลาย ethanol ด้วยวิธี DPPH

Trolox (mg/ml)	A520	% Inhibition
0.000	0.8164	0
0.016	0.7331	10.20
0.031	0.6092	25.38
0.063	0.3588	56.05
0.125	0.185	77.34
0.250	0.0298	96.35

2. ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH free radical scavenging

ตารางที่ 36 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระสารสกัดด้วยวิธี DPPH

สารตัวอย่าง	A520 (Ac)	A520 (As)	A520 (Ab)	% Inhibition	ค่าเฉลี่ย	SD
ME1	0.5334	0.1718	0.005	68.73	64.57	12.56
ME2	0.5334	0.2683	0.004	50.45		
ME3	0.5334	0.1413	0.0054	74.52		
MM1	0.5334	0.2604	0.0243	55.74	65.03	8.62
MM2	0.5334	0.2076	0.0294	66.59		
MM3	0.5334	0.1758	0.0305	72.76		
MW1	0.5168	0.1365	0.0861	90.25	87.60	3.26
MW2	0.5168	0.149	0.0661	83.96		
MW3	0.5168	0.1401	0.0812	88.60		
FBE1	0.5334	0.3135	0.0122	43.51	37.71	5.92
FBE2	0.5334	0.3758	0.0114	31.68		
FBE3	0.5334	0.3443	0.0132	37.93		
FBM1	0.5334	0.2698	0.0146	52.16	49.95	10.05
FBM2	0.5334	0.2489	0.0287	58.72		
FBM3	0.5334	0.3364	0.0109	38.98		
FBW1	0.5168	0.1894	0.0378	70.67	74.57	11.85
FBW2	0.5168	0.1023	0.0397	87.89		
FBW3	0.5168	0.2359	0.0559	65.17		

ภาคผนวก ท

การศึกษาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระวิธี ABTS radical scavenging assay

1. ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

ตารางที่ 37 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ในตัวทำละลาย DMSO ด้วยวิธี ABTS

Trolox (mg/ml)	A743	% Inhibition
0	0.6845	0.00
0.015625	0.6007	12.24
0.03125	0.5673	17.12
0.0625	0.5012	26.78
0.125	0.4382	35.98
0.5	0.0575	91.60
1	0.003	99.56

ตารางที่ 38 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ในตัวทำละลาย ethanol ด้วยวิธี ABTS

Trolox (mg/ml)	A743	% Inhibition
0	0.6536	0.00
0.015625	0.6042	7.56
0.03125	0.5619	14.03
0.0625	0.5059	22.60
0.125	0.4353	33.40
0.25	0.3152	51.77
0.5	0.002	99.69

2. ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

ตารางที่ 39 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระสารสกัดด้วยวิธี ABTS

สารตัวอย่าง	A743 (Ac)	A743 (As)	A743 (Ab)	% Inhibition (1mg/ml)	ค่าเฉลี่ย	SD
ME1	0.5764	0.2201	0.0053	31.12	30.44	1.40
ME2	0.5764	0.2466	0.0057	28.82		
ME3	0.5764	0.2161	0.0042	31.37		
MM1	0.5764	0.2402	0.0085	29.63	33.47	3.58
MM2	0.5764	0.1552	0.0041	36.72		
MM3	0.5764	0.1886	0.0072	34.05		
MW1	0.5578	0.3113	0.0016	22.89	24.32	1.24
MW2	0.5578	0.2858	0.0017	25.13		
MW3	0.5578	0.2883	0.0021	24.94		
FBE1	0.5764	0.5687	0.2122	7.46	5.13	2.04
FBE2	0.5764	0.6451	0.182	3.72		
FBE3	0.5764	0.5641	0.1149	4.21		
FBM1	0.5764	0.4019	0.0069	15.28	20.88	4.94
FBM2	0.5764	0.3041	0.0004	22.78		
FBM3	0.5764	0.2891	0	24.59		
FBW1	0.5578	0.2814	0.0018	25.52	22.99	2.19
FBW2	0.5578	0.3234	0.0003	21.71		
FBW3	0.5578	0.3277	0.005	21.75		

ภาคผนวก น

การศึกษาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชัน FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power assay)

1. ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ด้วยวิธี FRAP

ตารางที่ 40 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ในตัวทำละลาย DMSO ด้วยวิธี FRAP

Trolox (mg/ml)	A593	% Inhibition
0	0.094	0.00
0.015625	0.1584	40.66
0.03125	0.2308	59.27
0.0625	0.345	72.75
0.125	0.5827	83.87
0.25	1.055	91.09
0.5	1.973	95.24
1	3.566	97.36

ตารางที่ 41 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ในตัวทำละลาย ethanol ด้วยวิธี FRAP

Trolox (mg/ml)	A593	% Inhibition
0	0.0497	0.00
0.015625	0.05811	14.47
0.03125	0.2771	82.06
0.0625	0.6529	92.39
0.125	1.097	95.47
0.25	1.404	96.46
0.5	3.451	98.56

2. ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี FRAP

ตารางที่ 42 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระสารสกัดด้วยวิธี FRAP

สาร ตัวอย่าง	A593 (Ac)	A593 (As 10 mg/ml)	A593 (Ab 10mg/ml)	% Inhibition (10 mg/ml)	% Inhibition (1 mg/ml)	ค่าเฉลี่ย	SD
ME1	0.0596	1.397	0.0986	95.41	9.54	9.51	0.09
ME2	0.0596	1.084	0.0804	94.06	9.41		
ME3	0.0596	1.5	0.0655	95.85	9.58		
MM1	0.0596	1.276	0.0327	95.21	9.52	9.56	0.04
MM2	0.0596	1.501	0.0392	95.92	9.59		
MM3	0.0596	1.439	0.0188	95.80	9.58		
MW1	0.0724	1.493	0.0444	95.00	9.59	9.60	0.03
MW2	0.0724	1.686	0.0333	95.62	9.64		
MW3	0.0724	1.474	0.0381	94.96	9.58		
FBE1	0.0596	0.5241	0.2569	77.69	7.77	7.04	0.72
FBE2	0.0596	0.4267	0.2645	63.26	6.33		
FBE3	0.0596	0.466	0.2659	70.21	7.02		
FBM1	0.0596	0.7065	0.0606	90.77	9.08	9.10	0.15
FBM2	0.0596	0.8882	0.0804	92.62	9.26		
FBM3	0.0596	0.6046	0.0305	89.62	8.96		
FBW1	0.0724	1.08	0.0271	93.12	9.43	9.51	0.08
FBW2	0.0724	1.483	0.0169	95.06	9.59		
FBW3	0.0724	1.255	0.0426	94.03	9.51		

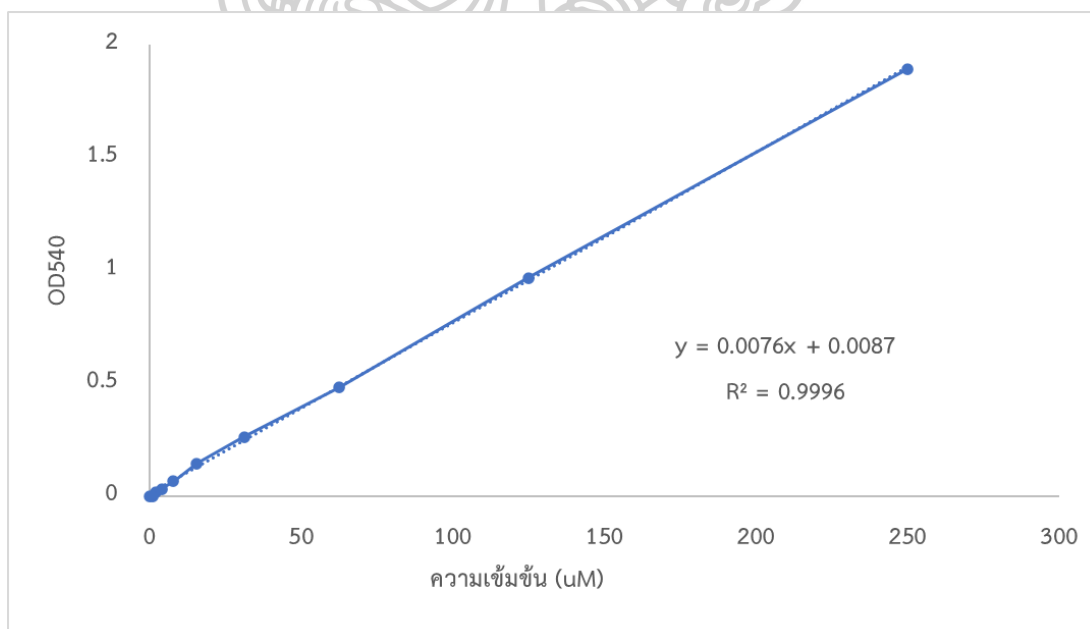
ภาคผนวก บ

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์

1. การวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ของเซลล์เพาะเลี้ยง Raw 264.7

ตารางที่ 43 ปริมาณไนตริกออกไซด์ของเซลล์เพาะเลี้ยง Raw 264.7

Nitrite (uM)	OD540
250	1.892
125	0.967
62.5	0.481
31.25	0.263
15.63	0.145
7.81	0.067
3.91	0.032
1.95	0.016
0.98	0.001
0	0



ภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานของไนตริกออกไซด์ในเซลล์เพาะเลี้ยง Raw 264.7

ตารางที่ 44 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยด้วยวิธีการย้อมในตริกอกออกไซด์

สารสกัด	Raw 264.7 Cell line	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Extract (ug/ml)	No	No	0	12.5	25	50	100	200			
LPS (1 ug/ml)	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes			
ME1	OD540	0.05	0.05	0.16	0.12	0.09	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05
	OD-Blank	0.05	0.00	0.10	0.07	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Nitrite conc. (uM)	-	1.12	12.32	8.02	3.41	1.03	1.49	1.03	1.03	0.00
	% of NO	-	-	100.00	65.09	27.68	8.36	12.09	8.36	12.09	0.00
	% of NO inhibition	-	-	0.00	34.91	72.32	91.64	87.91	91.64	87.91	100.00
ME2	OD540	0.05	0.05	0.16	0.09	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
	OD-Blank	0.05	0.00	0.11	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Nitrite conc.	-	1.40	13.52	3.98	1.58	0.95	0.95	0.95	0.95	1.23
	% of NO	-	10.36	100.00	29.44	11.69	7.03	7.03	7.03	7.03	9.10
	% of NO inhibition	-	-	0.00	70.56	88.31	92.97	92.97	92.97	92.97	90.90
ME3	OD540	0.06	0.06	0.16	0.11	0.07	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
	OD-Blank	0.06	0.00	0.10	0.05	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.01
	Nitrite conc.	-	0.90	12.58	5.51	1.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	% of NO	-	7.15	100.00	43.80	9.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	% of NO inhibition	-	-	0.00	56.20	90.54	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

ตารางที่ 45 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเมทานอลจากเส้นใยตัวบิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์

สารสกัด	Raw 264.7 Cell line	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
สารสกัด	Extract (ug/ml)	No	No	0	12.5	25	50	100	200		
	LPS (1 ug/ml)	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes		
MM1	OD540	0.05	0.06	0.15	0.14	0.13	0.11	0.06	0.06		
	OD-Blank	0.05	0.01	0.10	0.09	0.08	0.06	0.01	0.01		
	Nitrite conc.	-	1.91	11.66	10.39	9.75	7.11	1.68	1.43		
	% of NO	-	610.47	100.00	89.11	83.62	60.98	14.41	12.26		
	% of NO inhibition	-	-	0.00	10.89	16.38	39.02	85.59	87.74		
MM2	OD540	0.05	0.05	0.16	0.15	0.14	0.13	0.07	0.06		
	OD-Blank	0.05	0.00	0.11	0.10	0.09	0.08	0.02	0.01		
	Nitrite conc.	-	1.41	12.81	11.54	11.03	9.40	1.47	1.27		
	% of NO	-	11.01	100.00	90.09	86.10	73.38	11.48	9.91		
	% of NO inhibition	-	-	0.00	9.91	13.90	26.62	88.52	90.09		
MM3	OD540	0.05	0.05	0.15	0.15	0.15	0.13	0.08	0.07		
	OD-Blank	0.05	0.00	0.10	0.10	0.10	0.08	0.03	0.02		
	Nitrite conc.	-	0.99	11.83	11.57	11.50	9.35	2.75	1.13		
	% of NO	-	8.37	100.00	97.80	97.21	79.04	23.25	9.55		
	% of NO inhibition	-	-	0.00	2.20	2.79	20.96	76.75	90.45		

ตารางที่ 46 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดน้ำจากเส้นใยด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์

สารสกัด	Raw 264.7 Cell line	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Extract (ug/ml)		No	No	0	12.5	25	50	100	200	
LPS (1 ug/ml)		No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	
MW1	OD540	0.05	0.06	0.16	0.16	0.18	0.18	0.19	0.20	
	OD-Blank	0.05	0.00	0.10	0.11	0.12	0.13	0.13	0.15	
	Nitrite conc.	-	0.96	12.14	12.81	15.23	15.71	16.43	17.96	
	% of NO	-	7.91	100.00	105.52	125.45	129.41	135.34	147.94	
	% of NO inhibition	-	-	0.00	-5.52	-25.45	-29.41	-35.34	-47.94	
MW2	OD540	0.05	0.05	0.16	0.16	0.18	0.20	0.19	0.20	
	OD-Blank	0.05	0.00	0.11	0.11	0.13	0.15	0.14	0.15	
	Nitrite conc.	-	1.41	13.01	13.81	15.32	17.93	17.61	19.10	
	% of NO	-	10.84	100.00	106.15	117.76	137.82	135.36	146.81	
	% of NO inhibition	-	-	0.00	-6.15	-17.76	-37.82	-35.36	-46.81	
MW3	OD540	0.05	0.05	0.15	0.15	0.17	0.18	0.19	0.20	
	OD-Blank	0.05	0.00	0.10	0.10	0.12	0.13	0.14	0.14	
	Nitrite conc.	-	0.00	11.80	11.94	14.42	15.63	16.88	17.80	
	% of NO	-	0.00	100.00	101.19	122.20	132.46	143.05	150.85	
	% of NO inhibition	-	-	0.00	-1.19	-22.20	-32.46	-43.05	-50.85	

ตารางที่ 47 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากดอกเห็ดด้วยวิธีการบ่มยั้งในตริกอกไกเซด

สารสกัด	Raw 264.7 Cell line	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Extract (ug/ml)	No	No	0	12.5	25	50	100	200		
LPS (1 ug/ml)	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes		
BE1	OD540	0.05	0.04	0.11	0.04	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06
	OD-Blank	0.05	-0.01	0.06	-0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01
	Nitrite conc.	-	0.00	6.14	0.00	1.62	1.25	1.92	2.23	2.23
	% of NO	-	0.00	100.00	0.00	26.38	20.36	31.27	36.32	36.32
	% of NO inhibition	-	-	0.00	100.00	73.62	79.64	68.73	63.68	63.68
BE2	OD540	0.05	0.05	0.13	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
	OD-Blank	0.05	0.00	0.08	-0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
	Nitrite conc.	-	0.98	9.51	0.00	0.00	1.39	1.45	1.63	1.63
	% of NO	-	10.30	100.00	0.00	0.00	14.62	15.25	17.14	17.14
	% of NO inhibition	-	-	0.00	100.00	100.00	85.38	84.75	82.86	82.86
BE3	OD540	0.05	0.05	0.13	0.07	0.08	0.05	0.06	0.05	0.05
	OD-Blank	0.05	0.00	0.08	0.02	0.03	0.00	0.01	0.00	0.00
	Nitrite conc.	-	1.33	9.57	1.38	3.11	1.31	1.73	0.00	0.00
	% of NO	-	13.90	100.00	14.42	32.50	13.69	18.08	0.00	0.00
	% of NO inhibition	-	-	0.00	85.58	67.50	86.31	81.92	100.00	100.00

ตารางที่ 48 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารเมทานอลจากดอกเห็ดด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์

สารสกัด	Raw 264.7 Cell line	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Extract (ug/ml)		No	No	0	12.5	25	50	100	200
LPS (1 ug/ml)		No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
BM1	OD540	0.0483	0.0563	0.1522	0.1248	0.0617	0.0569	0.0535	0.0622
	OD-Blank	0.0483	0.0080	0.1039	0.0765	0.0134	0.0086	0.0052	0.0139
	Nitrite conc.	-	1.9100	12.5200	8.9200	2.2000	1.9200	1.5400	2.3200
	% of NO	-	15.2556	100.0000	71.2460	17.5719	15.3355	12.3003	18.5304
	% of NO inhibition	-	-	0.0000	28.7540	82.4281	84.6645	87.6997	81.4696
BM2	OD540	0.0488	0.0594	0.1608	0.1073	0.0644	0.0555	0.0585	0.0669
	OD-Blank	0.0488	0.0106	0.1120	0.0585	0.0156	0.0067	0.0097	0.0181
	Nitrite conc.	-	1.75	13.59	6.55	2.10	1.74	1.87	2.76
	% of NO	-	12.88	100.00	48.20	15.45	12.80	13.76	20.31
	% of NO inhibition	-	-	0.00	51.80	84.55	87.20	86.24	79.69
BM3	OD540	0.0520	0.0570	0.1680	0.1468	0.1326	0.1134	0.0644	0.0619
	OD-Blank	0.0520	0.0050	0.1160	0.0948	0.0806	0.0614	0.0124	0.0099
	Nitrite conc.	-	1.52	14.11	11.32	9.46	6.93	2.52	0.85
	% of NO	-	10.77	100.00	80.23	67.04	49.11	17.86	6.02
	% of NO inhibition	-	-	0.00	19.77	32.96	50.89	82.14	93.98

ตารางที่ 49 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดน้ำจากดอกเห็ดด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์

สารสกัด	Raw 264.7 Cell line		Yes		Yes		Yes		Yes		Yes	
	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes
Extract (ug/ml)	No	No	12.5	25	50	100	200					
LPS (1 ug/ml)	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes					
BW1	0.0525	0.0578	0.1571	0.1610	0.1533	0.1562	0.1526					
OD-Blank	0.0525	0.0053	0.1046	0.1085	0.1008	0.1037	0.1001					
Nitrite conc.	-	1.52	12.62	13.13	12.11	12.50	12.02					
% of NO	-	12.04	100.00	104.04	95.96	99.05	95.25					
% of NO inhibition	-	-	0.00	-4.04	4.04	0.95	4.75					
BW2	0.0516	0.0572	0.1541	0.1653	0.1588	0.1626	0.1613					
OD-Blank	0.0516	0.0056	0.1025	0.1137	0.1072	0.1110	0.1097					
Nitrite conc.	-	1.52	12.34	13.81	12.96	13.46	13.28					
% of NO	-	12.32	100.00	111.91	105.02	109.08	107.62					
% of NO inhibition	-	-	0.00	-11.91	-5.02	-9.08	-7.62					
BW3	0.0559	0.0560	0.1538	0.1588	0.1550	0.1608	0.1858					
OD-Blank	0.0559	0.0001	0.0979	0.1029	0.0991	0.1049	0.1299					
Nitrite conc.	-	0.87	11.74	12.39	11.89	12.61	15.94					
% of NO	-	7.41	100.00	105.54	101.28	107.41	135.78					
% of NO inhibition	-	-	0.00	-5.54	-1.28	-7.41	-35.78					

ภาคผนวก ป

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

1. ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ Acarbose

ตารางที่ 50 ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ Acarbose ในตัวทำละลาย DMSO

Acarbose (mg/ml)	A540 (Blank)	A540 (Sample)	% Inhibition
2.000	0.569	0.208	63.432
1.000	0.569	0.283	50.246
0.500	0.569	0.377	33.755
0.250	0.569	0.447	21.396
0.125	0.569	0.513	9.880
0.063	0.569	0.568	0.229
0.000	0.569	0.569	0.000

ตารางที่ 51 ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ Acarbose ในน้ำ

Acarbose (mg/ml)	A540 (Blank)	A540 (Sample)	% Inhibition
0.250	0.731	0.176	75.961
0.125	0.731	0.306	58.198
0.063	0.731	0.488	33.283
0.031	0.731	0.578	20.922
0.016	0.731	0.664	9.230
0.000	0.731	0.731	0.000

ตารางที่ 52 ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัด

สารตัวอย่าง	A540 (Blank)	A540 (Sample)	% Inhibition
ME1	0.5688	0.7748	-36.21659634
ME2	0.5688	0.6239	-9.687060478
ME3	0.5688	0.8314	-46.1673699
MM1	0.5688	0.818	-43.81153305
MM2	0.5688	0.9042	-58.96624473
MM3	0.5688	0.8983	-57.92897328
MW1	0.7313	0.943	-28.94844797
MW2	0.7313	1.119	-53.01517845
MW3	0.7313	0.9433	-28.98947081
FBE1	0.5688	0.6581	-15.69971871
FBE2	0.5688	0.6131	-7.788326301
FBE3	0.5688	0.8683	-52.65471167
FBM1	0.5688	0.7287	-28.11181435
FBM2	0.5688	0.6141	-7.964135021
FBM3	0.5688	0.7194	-26.47679325
FBW1	0.7313	0.7909	-8.149870094
FBW2	0.7313	0.9541	-30.4662929
FBW3	0.7313	0.7682	-5.045808834

ภาคผนวก ผ

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคไฟจ Raw 264.7 ด้วยวิธี MTT assay

ตารางที่ 53 ความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคไฟจ Raw 264.7 ด้วยวิธี MTT assay

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ug/ml)					
	0	156.25	312.5	625	1250	
ME1	OD540 0.2694	0.0819	0.0736	0.0609	0.0098	
	% รอดชีวิตของเซลล์ 100	30.39	27.31	22.60	3.64	
ME2	OD540 0.2694	0.0611	0.0865	0.0155	0.0092	
	% รอดชีวิตของเซลล์ 100	22.67	32.10	5.75	3.41	
ME3	OD540 0.2694	0.1087	0.0708	0.0169	0.0101	
	% รอดชีวิตของเซลล์ 100	40.34	26.27	6.27	3.75	
MM1	OD540 0.2694	0.1734	0.147	0.1188	0.1058	
	% รอดชีวิตของเซลล์ 100	64.35	54.55	44.09	39.26	
MM2	OD540 0.2694	0.1908	0.1874	0.1132	0.0992	
	% รอดชีวิตของเซลล์ 100	70.81	69.55	42.01	36.81	
MM3	OD540 0.2694	0.1938	0.1947	0.1505	0.1027	
	% รอดชีวิตของเซลล์ 100	71.92	72.25	55.85	38.11	
MW1	OD540 0.2694	0.253	0.2564	0.2552	0.1202	
	% รอดชีวิตของเซลล์ 100	93.89	95.15	94.71	44.61	
MW2	OD540 0.2694	0.2564	0.2812	0.2627	0.0882	
	% รอดชีวิตของเซลล์ 100	95.15	104.36	97.49	32.73	
MW3	OD540 0.2694	0.275	0.3518	0.365	0.008	
	% รอดชีวิตของเซลล์ 100	102.06	130.56	135.45	2.97	

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ug/ml)					
	0	156.25	312.5	625	1250	
FBE1	OD540	0.2694	0.003	0.0042	0.005	0.0137
	% รอดชีวิตของเซลล์	100	1.20	1.68	2.00	5.49
FBE2	OD540	0.2694	0.0151	0.0053	0.0068	0.0111
	% รอดชีวิตของเซลล์	100	6.05	2.12	2.72	4.45
FBE3	OD540	0.2694	0.0158	0.0143	0.0067	0.0162
	% รอดชีวิตของเซลล์	100	6.33	5.73	2.68	6.49
FBM1	OD540	0.2694	0.1297	0.0818	0.0035	0.0089
	% รอดชีวิตของเซลล์	100	51.97	32.78	1.40	3.57
FBM2	OD540	0.2694	0.1494	0.0682	0.0052	0.008
	% รอดชีวิตของเซลล์	100	59.87	27.33	2.08	3.21
FBM3	OD540	0.2694	0.1907	0.108	0.0396	0.0069
	% รอดชีวิตของเซลล์	100	76.42	43.28	15.87	2.77
FBW1	OD540	0.2694	0.2424	0.1386	0.0503	0.1892
	% รอดชีวิตของเซลล์	100	97.14	55.54	20.16	75.82
FBW2	OD540	0.2694	0.2396	0.1293	0.0586	0.2012
	% รอดชีวิตของเซลล์	100	96.01	51.81	23.48	80.63
FBW3	OD540	0.2694	0.2241	0.1146	0.0459	0.1505
	% รอดชีวิตของเซลล์	100	89.80	45.92	18.39	60.31

ภาคผนวก ๗

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อไรทะเล

ตารางที่ 54 ความเป็นพิษของสารสกัดต่อไรทะเลของสารสกัด

ตัวอย่าง	0	ความเข้มข้น (ug/ml)					
		78.125	156.25	312.5	625	1250	
ME1	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	11/11	3/6	4/8	4/11	2/7	0/8
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	50.00	50.00	36.36	28.57	0.00
ME2	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	7/7	5/11	4/11	2/5	4/9	0/5
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	45.45	36.36	40.00	44.44	0.00
ME3	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	8/8	3/6	3/7	5/11	4/10	0/7
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	50.00	42.86	45.45	40.00	0.00
MM1	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	6/6	5/6	4/5	9/11	8/11	4/7
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	83.33	80.00	81.82	72.73	57.14
MM2	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	10/10	7/7	9/11	7/9	8/10	3/5
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	100.00	81.82	77.78	80.00	60.00
MM3	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	11/11	12/12	6/6	4/5	9/11	4/6
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	100	100	80.00	75.00	66.67
MW1	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	13/13	10/10	9/9	10/10	11/11	6/6
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	100	100	100	100	100
MW2	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	11/11	10/10	11/11	12/12	8/8	7/7
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	100	100	100	100	100

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (µg/ml)									
	0	78.125	156.25	312.5	625	1250				
MW3	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	11/11	9/9	10/10	8/8	8/8				
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	100	100	100	100				
FBE1	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	8/8	3/6	3/7	2/88	1/8	0/6			
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	50.00	42.86	25.00	12.50	0.00			
FBE2	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	9/9	3/6	4/8	0/7	0/8	0/8			
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	50.00	50.00	0.00	0.00	0.00			
FBE3	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	10/10	4/6	4/8	2/8	1/7	0/8			
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	66.67	50.00	25.00	14.29	0.00			
FBM1	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	9/9	6/8	4/7	6/10	0/6	0/7			
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	75.00	57.14	60.00	0.00	0.00			
FBM2	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	7/7	6/9	8/11	5/9	0/8	0/9			
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	66.67	72.73	55.56	0.00	0.00			
FBM3	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	9/9	6/8	7/11	7/10	0/9	0/9			
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	75.00	63.64	70.00	0.00	0.00			
FBW1	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	9/9	11/11	10/10	9/9	8/8	2/6			
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	100	100	100	100	33.33			
FBW2	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	11/11	10/10	10/10	7/7	8/8	5/7			
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	100	100	100	100	71.43			
FBW3	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	8/8	9/9	9/9	8/8	7/7	3/8			
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	100	100	100	100	37.50			

ตารางที่ 55 ความเป็นพิษต่อไรทะเลของตัวทำละลาย DMSO

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (%)									
	0	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.250	2.500		
DMSO1	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	10/10	9/9	9/9	8/8	8/10	4/5	5/6	2/5	
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	100	100	100	80	80	83.33	40	
DMSO2	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	6/6	6/6	8/8	7/7	7/7	5/6	4/5	1/4	
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	100	100	100	100	83.33	80	25	
DMSO3	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	7/7	7/7	5/5	8/8	6/8	5/6	4/5	4/5	
	%รอดชีวิตของเซลล์	100	100	100	100	75	83.33	80	80	



ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

เลขที่ อว 8603.16/2164

ลงวันที่ 28 เมษายน 2565

รหัสโครงการ (ID Project/Proposal) 10/2565

ชื่อโครงการที่ขอใช้สัตว์ (Animal Protocol)

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเห็ด *Flavodon fluvus* (Klotzsch) Ryvarden (วิทยานิพนธ์)
Bioactivity of extracts form *Flavodon fluvus* (Klotzsch) Ryvarden

หัวหน้าโครงการที่ขอใช้สัตว์ (Principal Investigator)

ชื่อ - สกุล รองศาสตราจารย์ ดร.เอกพันธ์ บางยี่ขัน

เลขที่คำขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์ฯ U1-08536-2562

หน่วยงานที่สังกัด คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

ระยะเวลาของโครงการใช้สัตว์ 1 กรกฎาคม 2565 - 30 มิถุนายน 2566

สถานที่ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ อาคารวิทยาศาสตร์ 1 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

โครงการที่ขอใช้สัตว์ (Animal Protocol) นี้ ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรแล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ตามโครงการที่ขอใช้สัตว์นี้ได้

ลงนาม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล)

ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์
เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
วันที่ 28 เมษายน 2565

ลงนาม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชัยชาญ ถาวรเวช)

อธิการบดีมหาวิทยาลัยศิลปากร
วันที่ 29 เมษายน 2565

- หมายเหตุ : 1. รหัสโครงการ (ID Project/Proposal) ออกโดยคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์
เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
2. การขอต่ออายุหนังสือรับรองโครงการขอใช้สัตว์ที่ได้รับการรับรองแล้ว ควรยื่นเรื่องอย่างน้อย 2 เดือนก่อนหนังสือ
รับรองหมดอายุ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวศศิณา สุทัศน์กนก
วัน เดือน ปี เกิด	15 ตุลาคม 2539
สถานที่เกิด	เพชรบุรี
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ที่อยู่ปัจจุบัน	4 หมู่ 2 ต.ท่าคอย อ.ท่ายาง จ.เพชรบุรี 76130

