

การประเมินฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ ที่แยกได้จากบัวเผื่อน

Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Extracts from Endophytic Fungi Isolated from *Nymphaea nouchali*

พฤทธิกร ศุภพล

Preuttiorn Supaphon

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

Department of Basic Science and Mathematic, Faculty of Science, Thaksin University

E-mail: preuttiorn@tsu.ac.th

Received: Aug 18, 2021

Revised: Sep 17, 2021

Accepted: Oct 15, 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ และต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ ที่คัดแยกจากบัวเผื่อน (*Nymphaea nouchali*) โดยสกัดสารจากราเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลตด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ และต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยวิธี colorimetric broth microdilution และ DPPH free radical scavenging ตามลำดับ จุลินทรีย์ก่อโรค จำนวน 6 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ประกอบด้วย *Staphylococcus aureus* ATCC25923, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* SK1, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Candida albicans* ATCC90028 และ *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 ผลการทดสอบพบว่าสารสกัด cell ethanol (CE) จากราเอนโดไฟต์ EFN 016 มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) เท่ากับ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) เท่ากับ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัด broth ethyl acetate (BE) จากราเอนโดไฟต์ EFN 022 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) เท่ากับ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผลการจัดจำแนกราเอนโดไฟต์ ไอโซเลต EFN 016 และ EFN 022 ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เป็นราในจีนัส *Nigrospora* และ *Pestalotiopsis* ตามลำดับ จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

คำสำคัญ: ราเอนโดไฟต์ บัวเผื่อน จุลินทรีย์ก่อโรค อนุมูลอิสระ

Abstract

This research aims to study the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Nymphaea nouchali*. Each fungal isolate was extracted with hexane, ethyl acetate and ethanol. All crude extracts were evaluated for their antimicrobial and antioxidant activities by using a colorimetric broth microdilution test and DPPH free radical scavenging assay, respectively. Six pathogenic microorganisms were used in the antimicrobial test including *Staphylococcus aureus* ATCC25923, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Candida albicans* ATCC90028 and *Cryptococcus neoformans* ATCC90112. The results revealed that cell ethanol extract (CE) from fungal isolate EFN 016 was the most active against *S. aureus* with the minimal inhibitory concentration (MIC) of 31.25 µg/ml and minimal bactericidal concentration (MBC) of 125 µg/ml. On the other hand, broth ethyl acetate extract (BE) from fungal isolate EFN 022 gave the strongest

antioxidant activity with the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.75 mg/mL. In addition, the active fungal isolates (EFN 016 and EFN 022) were identified by using their morphological characteristics as genus *Nigrospora* and *Pestalotiopsis*, respectively. These results suggest that crude extracts from endophytic fungi are sources of interesting active metabolites for future application.

Keywords: Endophytic fungi, *Nymphaea nouchali*, Pathogenic microorganisms, Free radical

1. บทนำ

ปัญหาสุขภาพเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยและทั่วโลก โดยปัญหาเหล่านี้นอกจากจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตทางด้านสุขภาพอนามัยของประชาชนโดยตรงแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ และสังคมของประเทศอีกด้วย ปัจจุบันโรคติดเชื้อและโรคไม่ติดต่อ เช่น โรคเบาหวาน และโรคความดันโลหิต ได้มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น สำหรับโรคติดเชื้อ พบว่าในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมา มีจำนวนของแบคทีเรียดื้อยาเพิ่มมากขึ้น ได้แก่ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE), Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) และแบคทีเรียอื่น ๆ ที่ดื้อยาปฏิชีวนะอีกหลายชนิด การดื้อยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี [1] มีการพัฒนายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมา เพื่อให้การรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียดื้อยาให้ได้ผลดียิ่งขึ้น เช่น การค้นพบยาแวนโคไมซิน (Vancomycin) ในปี ค.ศ. 1956 เพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียที่ดื้อยาเพนิซิลลิน (Penicillin) แต่อย่างไรก็ตามเห็นได้ว่าแบคทีเรียก็พัฒนาหรือเกิดการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น และสามารถดื้อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด ทำให้เป็นปัญหาในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ ต่อมาแนวโน้มการค้นพบหรือพัฒนายาใหม่ ๆ ที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อเริ่มลดลง [2] มีผู้เสียชีวิตจากโรคติดเชื้อประมาณ 23,000 ต่อปี โดยมีรายงานว่ายาปฏิชีวนะใหม่ เช่น ไลนิโซลิด (Linezolid) และ ดาปโตไมซิน (Daptomycin) ก็มีการดื้อยาแล้ว [3] นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยอาจมีภาวะความเครียดจากอาการเจ็บป่วยและจากผลข้างเคียงของการรักษา ซึ่งภาวะความเครียดส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกาย โดยทราบดีว่าอนุมูลอิสระส่งผลและก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ และหากไม่สามารถควบคุมหรือกำจัดอนุมูลอิสระได้จะส่งผลให้เกิดโรคอื่น ๆ ตามมา ทั้งโรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคเบาหวาน สำหรับโรคเบาหวาน พบว่ามีผู้ป่วยมะเร็งมากกว่า 12 ล้านคนทั่วโลก ในปี ค.ศ. 2008 และประมาณการณ์ว่าในปี ค.ศ. 2025 แนวโน้มของจำนวนผู้ป่วยมะเร็งจะเพิ่มขึ้นถึง 19.3 ล้านคน [4] ดังนั้นอุตสาหกรรมยาพยายามมองหาสารออกฤทธิ์ทาง

ชีวภาพจากแหล่งต่าง ๆ โดยเฉพาะจากทรัพยากรธรรมชาติ เพื่อพัฒนาการผลิตและค้นหายาใหม่ทดแทนยาเดิมเนื่องจากยาส่วนใหญ่มีผลข้างเคียงของการใช้ [5] วิธีการรักษาทั้งกลุ่มโรคติดเชื้อและโรคไม่ติดเชื้อมีในปัจจุบัน นิยมใช้ยาหรือสารสังเคราะห์ โดยมีการสังเคราะห์สารจำนวนมากถึงกว่า 10,000 สาร และเริ่มถึงจุดที่ปรับโครงสร้างหรือสังเคราะห์สารใหม่ ๆ ได้ยากขึ้น ดังนั้นอุตสาหกรรมยาจึงหันมาใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตสาร โดยพบว่าสารหรือยาปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์มีความเป็นพิษต่ำ และประสบความสำเร็จในการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์ นอกจากนี้หลาย ๆ หน่วยงานยังให้ความสนใจและตระหนักถึงปัญหาสุขภาพของประชากร จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการศึกษาและค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งสารยับยั้งจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะจากกลุ่มจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์มีความหลากหลาย สามารถเพิ่มจำนวนได้ง่าย และที่สำคัญจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าจุลินทรีย์มีศักยภาพในการผลิตสารเมแทบอไลต์ (Metabolites) ที่มีประสิทธิภาพทั้งฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็ง โดยเฉพาะราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi) [1], [6] มีการคาดการณ์ว่าจุลินทรีย์เป็นแหล่งของสารเมแทบอไลต์ที่มีศักยภาพ และสารจากจุลินทรีย์มีจำนวนประมาณ 22,500 ชนิด โดยสารที่ผลิตได้จากรามีประมาณ 9,000 ชนิด คิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสัดส่วนเกือบครึ่งหนึ่งของสารเมแทบอไลต์ทั้งหมดจากจุลินทรีย์ [7]

จากงานวิจัยที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่าสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) จากราเอนโดไฟต์หลายชนิดมีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากราเอนโดไฟต์สามารถผลิตสารได้หลากหลาย เช่น สเตียรอยด์ (Steroids), แซนโทน (Xanthone), ฟีนอล (Phenol), ไอโซโคมาริน (Isocoumarin), เพอร์ลิเนน (Perylene derivative), ควิโนน (Quinone), ฟูแรนไดโอน (Furandione), เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid), เดปส์เปปไทด์ (Depsipeptide), ไซโตซาลาซีน (Cytochalasin), โพลีคีไต์ (Polyketide), อัลคาลอยด์ (Alkaloid), เพปไทด์

(Peptide), โปรตีน (Protein), ลิพิด (Lipid), ชิคิเมท (Shikimate), ไกลโคไซด์ (Glycoside) และไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) เป็นต้น [8], [9] จากการรวบรวมข้อมูลการวิจัยที่ผ่านมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990-2019 พบว่ามีการตีพิมพ์ผลงานและรายงานศักยภาพของราเอนโดไฟต์จากพืชชายเลน โดยสัดส่วนของฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์สูงสุด 2 อันดับแรก คือ ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ คิดเป็น 48.9 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง 33.3 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 12.2 เปอร์เซ็นต์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ 4.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ El-Bondkly และคณะ [10] รายงานว่าจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคติดเชื้อและโรคมะเร็งกำลังเพิ่มสูงขึ้น และเป็นเรื่องที่วิกฤตทั่วโลก โดยราเอนโดไฟต์ในตัวอย่างจากทะเลที่แยกได้จากสาหร่าย หญ้าทะเล และพืชชายเลน พบสารใหม่ในกลุ่มต่าง ๆ จำนวนมาก เมื่อเทียบกับสารทั้งหมดที่พบในแต่ละกลุ่ม พบสารใหม่ในกลุ่ม phenylpropanoids (50 เปอร์เซ็นต์) สารในกลุ่ม macrocyclic lactones, azaphilones และ terpenoids (กลุ่มละ 40 เปอร์เซ็นต์) ในกลุ่ม anthraquinones, steroids, peptides และ alkaloids (กลุ่มละ 20 เปอร์เซ็นต์) และ phenyl ether derivatives (10 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อไม่นานนี้ Supaphon และคณะ [11] พบว่าราเอนโดไฟต์ (*Fusarium* sp., *Apodus oryzae* และ *Eupenicillium levitum*) ที่แยกได้จากบัวหลวง (*Nymphaea lotus*) มีศักยภาพในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดีโดยสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ MRSA) ยีสต์ (*C. albicans* และ *Cr. neoformans*) และ รา (*M. gypseum* และ *T. marneffe*) ให้ค่า MIC ในช่วง 0.5-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นได้ว่าราเอนโดไฟต์จากพืชบริเวณชายฝั่งหรือพืชน้ำ โดยเฉพาะบัว มีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และสามารถผลิตสารใหม่ ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากบัวเผื่อนซึ่งเป็นพืชน้ำที่พบได้ทั่วไป ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจเป็นแหล่งทางเลือกของการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การแยกราเอนโดไฟต์

เก็บตัวอย่างดอกและใบของบัวเผื่อนจากพื้นที่ในบริเวณอำเภอบ้านดง จังหวัดพิจิตร พิกัดทางภูมิศาสตร์ ละติจูด 7° 50' 24" ลองจิจูด 99° 55' 6" จากนั้นนำตัวอย่างมาทำความสะอาดด้วยน้ำประปา และล้างตัวอย่างให้แห้ง ตัดตัวอย่างให้มีขนาด 5 ตารางเซนติเมตร นำชิ้นตัวอย่างมาจุ่มในชุดสารละลายเพื่อกำจัดจุลินทรีย์บริเวณผิวของตัวอย่างออก [11] ดังนี้ จุ่มตัวอย่างในสารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที และจุ่มในสารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปจุ่มในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 นาที เพื่อล้างสารละลายออกจากตัวอย่าง ซับตัวอย่างด้วยกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อ และตัดตัวอย่างให้มีขนาด 0.5 ตารางเซนติเมตร นำชิ้นตัวอย่างไปวางบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่เติมยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 5 ชิ้น จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-14 วัน หรือจนกว่าจะไม่สามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้ แยกราเอนโดไฟต์ภายใต้กล้องสเตอริโอไมครอป โดยใช้เทคนิค hyphal tip isolation ลงในจานอาหาร PDA จานใหม่ หรือจนกว่าจะได้ราบริสุทธีเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป และคำนวณค่า isolation rate หรืออัตราการแยกราเอนโดไฟต์จากบัวเผื่อนจากจำนวนราเอนโดไฟต์ทั้งหมดที่ได้ต่อจำนวนชิ้นตัวอย่างทั้งหมด

2.2. การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ และการการเตรียมสารสกัดหยาบ

นำราบริสุทธีที่เพาะเลี้ยงได้บนจานอาหาร PDA มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Potato dextrose agar (PDB) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นกรองแยกส่วนของเส้นใยและของเหลวออกจากกัน ส่วนของเส้นใย สกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซน และส่วนของเหลวสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ทำให้แห้งด้วย anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4) และ rotary vacuum evaporator ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบในส่วน cell ethanol (CE) และ cell hexane (CH) และ broth ethyl acetate (BE) [13] นำสารสกัดหยาบที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ มาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

2.3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ด้วยวิธี colorimetric broth microdilution tests

2.3.1. จุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) SK1 แบคทีเรียแกรมลบ 2 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 และยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ *Candida albicans* ATCC90028 และ *Cryptococcus neoformans* ATCC90112

2.3.1.1. การเตรียมแบคทีเรีย

ซิดเชื้อแบคทีเรียทดสอบลงบนอาหาร nutrient agar (NA) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นโคโลนีของแบคทีเรียขึ้นบนจานอาหาร จากนั้นทำการเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเชื้อแบคทีเรีย 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร nutrient broth (NB) ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 0.5 McFarland standard (เชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml) และเจือจางต่อที่อัตราส่วน 1:200 ด้วยอาหาร Mueller-Hinton Broth (MHB)

2.3.1.2. การเตรียมยีสต์

ซิดเชื้อยีสต์ทดสอบลงบนอาหาร sabouraud's dextrose agar (SDA) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สำหรับ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับ *Cr. neoformans* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นโคโลนีของยีสต์ขึ้นบนจานอาหาร จากนั้นทำการเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเชื้อยีสต์ 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB) ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 2 McFarland standard และเจือจางต่อที่อัตราส่วน 1:20 ด้วยอาหาร SDB

2.3.2. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางต่อด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ใน sterile 96-well microtiter plates หลุมละ 12 ไมโครลิตร จากนั้นเติมอาหาร MHB สำหรับแบคทีเรีย และเติมอาหาร SDB สำหรับยีสต์ ลงไปหลุมละ 88 ไมโครลิตร และเติมเชื้อทดสอบที่

เตรียมไว้ซึ่งปรับความขุ่นแล้วใส่ใน sterile 96-well microtiter plates ที่มีสารสกัดและอาหารอยู่ หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และยีสต์ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง สำหรับ *Cr. neoformans* หยด resazurin indicator (0.18%) ลงในหลุมทดสอบหลุมละ 30 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดอ่านผลการทดสอบโดยสังเกตสีของ resazurin หากยังคงเห็นเป็นสีน้ำเงินให้ผลเป็นบวกแสดงว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ และหากเปลี่ยนเป็นสีชมพูให้ผลเป็นลบแสดงว่าสารสกัด ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ [11]

2.3.3. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (The minimum inhibitory concentrations; MICs) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ (The minimum bactericidal concentration; MBCs หรือ minimum fungicidal concentration; MFC)

นำสารสกัดที่ให้การยับยั้งเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบหาค่า MIC ในช่วงความเข้มข้น 500-0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการดูดอาหารเหลว MHB สำหรับแบคทีเรีย และอาหารเหลว SDB สำหรับยีสต์ ใส่ลงใน sterile 96-well microtiter plates หลุมละ 89 ไมโครลิตร แล้วเติมสารสกัดหยาบใส่ sterile 96-well microtiter plates หลุมเดียวกันกับอาหารเหลวอยู่ หลุมละ 11 ไมโครลิตร แล้วทำการเจือจางแบบ 2-fold dilution เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบอยู่ในช่วง 512-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเติมอาหารและสารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 50 ไมโครลิตร โดยทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นเติมเชื้อทดสอบที่มีอัตราส่วน 1:200 สำหรับแบคทีเรีย และเชื้อที่มีอัตราส่วน 1:20 สำหรับยีสต์ ที่เตรียมไว้ใส่ใน sterile 96-well microtiter plates หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และยีสต์ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง สำหรับ *Cr. neoformans* จากนั้นหยด resazurin indicator (0.18 เปอร์เซ็นต์) ลงในหลุมทดสอบหลุมละ 30 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่อที่ 35 องศาเซลเซียส สำหรับแบคทีเรีย และยีสต์ *C. albicans* และ 25 องศาเซลเซียส สำหรับ *Cr. neoformans* เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่

กำหนดอ่านผลการทดสอบ บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เป็นค่า MIC จากนั้นนำผลที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ในการทดสอบ MIC มาชั่งดินอาหาร NA สำหรับแบคทีเรีย และชั่งดินอาหาร SDA สำหรับยีสต์ จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่สภาวะเดียวกับการทดสอบข้างต้น อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้เป็นค่า MBC และอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อยีสต์ได้เป็นค่า MFC ในการศึกษาที่ใช้ vancomycin และ amphotericin B เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) สำหรับการศึกษาการยับยั้งแบคทีเรีย และยีสต์ ตามลำดับ และใช้ DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control)

2.4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity

นำสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน DMSO ตูบใส่ใน sterile 96-well microtiter plates ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้กรดแอสคอร์บิก หรือวิตามินซี (ascorbic acid) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) และใช้ DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) จากนั้นคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และคำนวณประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยนำสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ มาเตรียมใหม่ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไปเจือจางต่อแบบ 2 fold dilution ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดในช่วง 10-0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) [12]

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1. ผลการแยกราเอนโดไฟต์จากบัวเผื่อน

แยกราเอนโดไฟต์จากส่วนดอกและใบของบัวเผื่อนสามารถแยกราได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลต จากชิ้นตัวอย่างทั้งหมด 125 ชิ้น คิดเป็น isolation rate เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการแยกราเอนโดไฟต์ พบอัตราการราเอนโดไฟต์ (isolation rate) จากกลีบดอก (0.16) และใบ (0.24) ราเอนโดไฟต์ 20 ไอโซเลต ราเอนโดไฟต์ จำนวน 12 ไอโซเลต จากเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 50 ไอโซเลต สามารถจัดจำแนกได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา คิดเป็น

24 เพอร์เซ็นต์ จัดจำแนกได้ทั้งหมด 3 จีนัส ได้แก่ *Nigrospora* spp. 5 ไอโซเลต *Curvularia* spp. 4 ไอโซเลต และ *Pestalotiopsis* spp. 3 ไอโซเลต และที่เหลืออีก 38 ไอโซเลต ไม่พบโครงสร้างในการสืบพันธุ์ จึงจัดเป็นกลุ่ม unidentified endophytic fungi โดยราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 50 ไอโซเลต นำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการศึกษาต่อไป

3.2. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบโดยวิธี colorimetric broth microdilution
ผลจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจำนวน 150 สาร จากราเอนโดไฟต์จำนวน 50 ไอโซเลต ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ประกอบด้วย เอทานอล เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ และยีสต์ 2 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดทั้ง 3 สาร สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งหมด ยกเว้น แบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และ *P. aeruginosa* และเมื่อนำสารสกัดที่มีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบไปหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MBC หรือ MFC) พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ ไอโซเลต EFN 016 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 2 สายพันธุ์ (*S. aureus* และ MRSA) และมีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ (*C. albicans* ATCC90028 และ *Cr. neoformans* ATCC90112) โดยสารสกัดจากเส้นใยของราเอนโดไฟต์ที่สกัดด้วยเอทานอล (CE) สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด ให้ค่า MIC เท่ากับ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC เท่ากับ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดดังกล่าวให้ผลการยับยั้งยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ (*C. albicans* ATCC90028 และ *Cr. neoformans* ATCC90112) ได้ต่ำ โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MFC มากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 1)

3.3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์จำนวน 150 สาร ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ เอทานอล เอทิลอะซิเตท และ เฮกเซน โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน ในการทดสอบเบื้องต้นที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (BE) ของราเอนโดไฟต์ ไอโซเลต EFN 022 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดเอทานอล (CE) และเฮกเซน (CH)

ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ขณะที่กรดแอสคอร์บิกให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดทั้ง 3 กลุ่ม คิดเป็น 93.01 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นหาค่าความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) พบว่าสารสกัดเอทานอล และกรดแอสคอร์บิกมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.75 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 2)

Table 1 MIC, MBC and MFC of extracts from endophytic fungi (isolate EFN016) against pathogenic microorganisms

Extracts	MIC/MBC or MFC values (µg/ml)			
	SA	MRSA	CA28	CA12
BE	500/	500/	500/	500/
	250	>500	>500	>500
CE	31.25/	250/	500/	500/
	125	500	>500	>500
CH	500/	500/	500/	500/
	>500	>500	>500	>500
Positive control				
Vancomycin	1/2	1/2		
Amphotericin B			0.5/1	0.5/1

BE = Broth ethyl acetate, CE = Cell ethanol, CH = Cell hexane, SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, CA28 = *Candida albicans* ATCC90028, CA12 = *Cryptococcus neoformans* ATCC90112

Table 2 Antioxidant activity of extracts from endophytic fungi (isolate EFN 022)

Extracts	Antioxidant activity	
	% Inhibition	IC ₅₀ (mg/ml)
BE	80	0.75
CE	-	-
CH	-	-
Positive control		
Ascorbic acid	93.1	0.005

จากการแยกราเอนโดไฟต์จากบัวเผื่อนที่เก็บในพื้นที่ของจังหวัดพิจิตร พบว่าราเอนโดไฟต์กระจายอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของบัวเผื่อนทั้งกลีบดอกและใบ สามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้มากที่สุดจากส่วนใบ (isolation rate เท่ากับ

0.24) และกลีบดอก (isolation rate เท่ากับ 0.16) ตามลำดับ การกระจายของราเอนโดไฟต์ในส่วนต่าง ๆ ของพืช อาจมาจากหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องด้วยกัน เช่น สถานที่เก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ อายุของพืช ฤดูกาล และสารอาหารที่มีอยู่ในแต่ละส่วนของพืช [14] ความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟต์กับพืชเจ้าบ้านค่อนข้างมีความซับซ้อน ในช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตของราที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืช ราอาจอาศัยกับพืชโดยมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน แต่ในบางช่วงของวงจรชีวิต ราอาจเป็นราก่อโรคพืชได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยของสภาพแวดล้อมภายนอก พืช และราเอนโดไฟต์ แต่อย่างไรก็ตามจากความหมายของราเอนโดไฟต์ ทำให้เข้าใจได้ว่ารูปแบบความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟต์และพืชต่างอยู่ร่วมกันในรูปแบบความสัมพันธ์ที่ต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ โดยพืชที่มีราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช พบว่าสามารถส่งเสริมให้พืชสามารถทนต่อแมลงและจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้ดี เนื่องจากราเอนโดไฟต์สามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ภายในพืชได้หลายชนิดซึ่งสามารถยับยั้งหรือช่วยป้องกันพืชจากแมลงและจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้ นอกจากนี้ยังพบว่าพืชที่มีราเอนโดไฟต์อยู่ สามารถทำให้พืชทนต่อความร้อนและความแห้งแล้งได้อีกด้วย [15] อัตราการแยกเชื้อ (isolation rate) ของราเอนโดไฟต์จากบัวเผื่อน พบว่ามีค่า isolation rate เท่ากับ 0.4 ใกล้เคียงกับ isolation rate จากพืชบก แต่หากเปรียบเทียบ isolation rate กับกลุ่มพืชน้ำ เช่น หญ้าทะเล พบว่า isolation rate ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากหญ้าทะเลมีค่าเท่ากับ 0.03 ซึ่งต่ำกว่า isolation rate จากบัวเผื่อน อาจเป็นไปได้ว่าเนื่องจากหลายปัจจัยด้วยกัน ทั้งลักษณะทางกายภาพ และชีวภาพของสถานที่เก็บตัวอย่าง และสารอาหารของพืชที่ต่างกัน [11], [12] ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในการศึกษานี้ สามารถจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 3 จินัส คือ *Nigrospora*, *Curvularia* และ *Pestalotiopsis* ซึ่งจัดเป็น common genus ที่พบเป็นราเอนโดไฟต์ในพืช [16], [17] แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ โดยพบว่าราส่วนใหญ่ไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ โดยรากลุ่มนี้ควรจัดจำแนกโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุลต่อไป นอกจากนี้สารละลายที่ใช้ทำความสะอาดผิวตัวอย่างก็มีผลต่ออัตราการแยกเชื้อได้เช่นกัน เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีลักษณะทางสรีรวิทยาแตกต่างกัน ในการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นของชุดสารละลายและเวลาดังนี้ 10 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล เวลา 3 นาที, 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ เวลา 1 นาที และ 10 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล เวลา 3 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออ้างอิงตามงานวิจัยของ Supaphon และคณะ [17] ศึกษา

ราเอนโดไฟต์จากหญ้าทะเลที่เป็นพืชน้ำ เนื่องจากพบว่าพืชน้ำเหล่านี้มีลักษณะทางสรีระของใบและลำต้นที่อวบน้ำและบางกว่าพืชบก โดยการแยกราเอนโดไฟต์จากพืชบก ใช้ชุดความเข้มข้นที่สูงและเวลาในการฆ่าเชื้อผิวใบนานกว่าชุดของสารละลายในพืชน้ำ ดังนี้ 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล เวลา 30 วินาที, 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ เวลา 5 นาที, 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล เวลา 30 วินาที และล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบและอัตราการแยกราเอนโดไฟต์จากชุดสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และเวลาในการฆ่าเชื้อที่ต่างกัน พบว่าหากเลือกใช้สารละลายในการฆ่าเชื้อผิวใบไม่เหมาะสมกับลักษณะของพืชอาจมีผลต่อจำนวนไอโซเลตของราเอนโดไฟต์และอัตราการแยกราเอนโดไฟต์จากพืชน้ำ ๆ ได้

เนื่องจากปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ก่อโรคมียิ่งเพิ่มมากขึ้น และยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษายังมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย เช่น เป็นอันตรายต่อไต เป็นผื่น และกระเพาะอาหารเป็นแผล เป็นต้น [5], [15] รวมทั้งปัญหาความเครียดและส่งผลต่อปริมาณของอนุมูลอิสระในร่างกายซึ่งอาจส่งผลให้เกิดโรคอื่น ๆ ตามมา มีรายงานการศึกษาราเอนโดไฟต์จากกลุ่มพืชน้ำและพบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชน้ำมีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและต้านอนุมูลอิสระได้ดี นอกจากนี้รายงานการศึกษาราเอนโดไฟต์จากพืชน้ำยังไม่แพร่หลายมากนักเมื่อเทียบกับพืชบก [14], [17], [18], [19] การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาราเอนโดไฟต์จากพืชน้ำ คือ บัวเผื่อน เนื่องจากเป็นทรัพยากรในท้องถิ่นและยังไม่มีรายงานการศึกษาศักยภาพของราเอนโดไฟต์จากบัวเผื่อนในภาคใต้มาก่อน บัวเผื่อนเป็นพืชน้ำที่มีสรรพคุณทางยาทั้งด้านการอักเสบ รักษาเบาหวาน และกระเพาะปัสสาวะอักเสบ เป็นต้น โดยพบสารฟลักซ์เคมีเป็นองค์ประกอบหลากหลายกลุ่มทั้งในส่วนใบ ลำต้น ดอก และราก ได้แก่ อัลคาลอยด์ และฟลาโวนอยด์ โดยสารสกัดจากดอกมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ *Bacillus cereus*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* และต้านมะเร็ง [20], [21], [22] จากรายงานการวิจัยข้างต้นเห็นได้ว่าบัวเผื่อนมีสรรพคุณทางยาที่น่าสนใจ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาโดยการสกัดสารจากพืชอาจต้องใช้พืชจำนวนมาก จึงเป็นการทำลายทรัพยากรธรรมชาติทางอ้อม ดังนั้นจากการค้นพบราที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืช หรือที่เรียกว่าราเอนโดไฟต์ โดยพบว่าราเอนโดไฟต์ในพืชสามารถผลิตสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้เหมือนพืชเจ้าบ้าน โดยการค้นพบที่สำคัญ คือ การค้นพบสารเมแทบอลิต์จากราเอนโดไฟต์ที่อาศัยในพืช *pacific yew (Taxus brevifolia)* พบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชน้ำนี้สามารถผลิตสาร *taxol* ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้าน

มะเร็ง [3], [6] ต่อมาพบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชอื่นสามารถผลิตสารต้านมะเร็งชนิดนี้ได้เช่นเดียวกัน จากการค้นพบดังกล่าว ราเอนโดไฟต์จึงเป็นแหล่งทางเลือกที่นิยมนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ทั้งฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็ง เป็นต้น

จากผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่าราเอนโดไฟต์ 2 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต EFN 016 และ EFN 022 มีศักยภาพสูงสุด ในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระตามลำดับ โดยสารสกัดจากราไอโซเลต EFN 016 ซึ่งจัดจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้เป็นเป็นราในจีนัส *Nigrospora* สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ได้ดีที่สุด (MIC 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และ MBC 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) แต่สารสกัดทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ อาจเนื่องจากโครงสร้างเซลล์ของแบคทีเรียมีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกซึ่งช่วยป้องกันการซึมผ่านและการถูกทำลายของสารสกัด [23] นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลต EFN 022 จัดจำแนกได้เป็นราในจีนัส *Pestalotiopsis* มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC₅₀ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม) ได้ดีที่สุด Rajagopal และคณะ [24] ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากบัวเผื่อน (*N. nouchli*) พบราในจีนัส *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Sporormiella*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* และ *Nigrospora* และรายงานว่ารราในจีนัส *Chaetomium*, *Curvularia*, *Nigrospora* และ *Pestalotiopsis* มีความหลากหลายของสารฟลักซ์เคมีสูงสุด พบสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ โดเทอร์พีนอยด์ และฟีนอล ซึ่งสารสำคัญที่รายงานเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระได้ดี นอกจากนี้ราเอนโดไฟต์ในจีนัส *Nigrospora* และ *Pestalotiopsis* เป็นราเอนโดไฟต์ที่พบได้บ่อยในพืชหลากหลายสปีชีส์ทั้งในพืชบกและพืชน้ำ [25] สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ukwatta และคณะ [26] พบว่าราเอนโดไฟต์ในจีนัส *Nigrospora* ซึ่งแยกได้จากพืชป่าชายเลน (*Bruguiera gymnorrhiza*) โดยราเอนโดไฟต์ที่พบ คือ *Nigrospora sphaerica* นอกจากนี้พบว่าราสปีชีส์นี้สามารถผลิตสาร *Nigronephthalphenyl* ซึ่งสามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC43300 โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และจากรายงานการวิจัยของ Dissanayake และคณะ [27] ที่ศึกษาศักยภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจาก *N. nouchli* ในประเทศศรีลังกา พบว่าราเอนโดไฟต์ *Chaetomium globosum* มีศักยภาพ

สูงสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยราผลิตสาร chaetoglobosin A และ C ซึ่ง chaetoglobosin A ยับยั้ง *S. aureus* ATCC43300 ให้ค่า MIC เท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากรายงานก่อนหน้านี้และจากผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ เห็นได้ชัดว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากบัวเผื่อนมีศักยภาพในการยับยั้ง *S. aureus* แต่อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้ราเอนโดไฟต์ที่มีศักยภาพ คือ ราในจีนัส *Nigrospora* ซึ่งสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ใกล้เคียงกับราเอนโดไฟต์ *C. globosum* ที่แยกจากบัวเผื่อนในประเทศศรีลังกา แต่ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้เป็นราต่างจีนัสกัน รวมทั้งสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่ใช้ในการทดสอบแตกต่างกันจึงไม่สามารถเปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยที่ผ่านมาได้ และสำหรับศักยภาพของราเอนโดไฟต์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟต์ จีนัส *Pestalotiopsis* มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (IC_{50} 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ของ Tejesvi และคณะ [28] พบว่าราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis* ที่แยกจากพืชสมุนไพรรสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยให้ค่า IC_{50} ในช่วง 14-27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้มีรายงานพบว่าราเอนโดไฟต์หลายจีนัสที่แยกจากบัวหลวง (*Nelumbo nucifera*) มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี ได้แก่ ราในจีนัส *Curvularia*, *Fusarium* และ *Penicillium* ซึ่งสารสกัดที่มีศักยภาพสูงสุดในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH คือ สารสกัดจากเส้นใยของราเอนโดไฟต์ที่สกัดด้วยเมทานอลให้ค่า IC_{50} ในช่วง 0.02-0.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [28] จากการตรวจหาสารพิษจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ พบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ คือ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโธไซยานิน และแคโรทีนอยด์ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ [29] จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยก่อนหน้านี้ อาจไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวได้เนื่องจากมีปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์และสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ เช่น แหล่งของพืช ฤดูกาล องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ รวมทั้งตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดหรือวิธีในการสกัด เป็นต้น โดยปัจจัยเหล่านี้เกี่ยวข้องกับศักยภาพของสารออกฤทธิ์ดังกล่าว [30], [31]

4. บทสรุป

จากการศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ (*Nigrospora* sp.) ที่แยกได้จากบัวเผื่อนในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดมีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*) ให้ค่า MIC เท่ากับ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร MBC เท่ากับ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (vancomycin) ให้ค่า MIC เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร MBC เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารสกัดจากราเอนโดไฟต์ (*Pestalotiopsis* sp.) ยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี ให้ค่า IC_{50} 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่กรดแอสคอร์บิก ให้ค่า IC_{50} 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด อาจยังไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบผลการทดสอบกับสารบริสุทธิ์ที่เป็นชุดควบคุมเชิงบวกได้ เนื่องจากสารสกัดที่ทดสอบเป็นสารสกัดหยาบแต่อย่างไรก็ตามเห็นได้ว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟต์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ทั้งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่ระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ จึงอาจใช้เป็นแหล่งทางเลือกเพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. วชิรนทร์ รุกขไชยศิริกุล และ ศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้คำปรึกษาและคอยช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย

6. References

- [1] Boonyasiri, A. and et al. 2014. Prevalence of antibiotic resistant bacteria in healthy adults, foods, food animals and the environment in selected areas in Thailand. *Pathogens and Global Health*. 108(5): 235-245.
- [2] Saga, T. and Yamaguchi, K. 2009. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Japan Medical Association Journal*. 52: 103-108.
- [3] Manganyi, M.C. and Ateba, C.N. 2020. Untapped potentials of endophytic fungi: A review of novel bioactive compounds with biological applications. *Microorganisms*. 8(2): 1934.

- [4] Cruz, T.E.E. and et al. 2020. Biomining fungal endophytes from tropical plants and seaweeds for drug discovery. In: Ozsturk, M., Egamberdieva, D. and Pesic, M. (eds.) **Biodiversity and Biomedicine**. Cambridge, MA: Academic Press.
- [5] Won, K.J. and et al. 2012. Antifungal miconazole induces cardiotoxicity via inhibition of APE/REF-1-related pathway in rat neonatal cardiomyocytes. **Toxicological Sciences**. 126: 289-305.
- [6] Strobel, G. and et al. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Product**. 67: 257-268.
- [7] Brakhage, A.A. and Schroekh, V. 2011. Fungal secondary metabolites. Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetic and Biology**. 48:15-22.
- [8] Joshee, S. and et al. 2009. Diversity and distribution of fungal foliar endophytes in New Zealand Podocarpaceae. **Mycological Research**. 113: 1003-1015.
- [9] Passarini, M.R.Z. and et al. 2013. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Drarmacidon reticulatum*. **Archives of Microbiology**. 195: 99-111.
- [10] El-Bondkly, E.A.M., El-Bondkly, A.A.M. and El-Bondkly, A.A.M. 2021. Marine endophytic fungal metabolites: A whole new world of pharmaceutical therapy exploration. **Heliyon**. 7(3): e06362.
- [11] Supaphon, P. and et al. 2018. Isolation and antimicrobial activities of fungi derived from *Nymphaea lotus* and *Nymphaea stellata*. **Mycoscience**. 59: 415-423.
- [12] Supaphon, P. and et al. 2018. Antimicrobial and antioxidant activities of extracts from fungal endophytes and their host plant (*Nelumbo nucifera*). **Thai Science and Technology Journal**. 26(1): 136-154. (in Thai)
- [13] Phongpaichit, S. and et al. 2006. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 48: 367-372.
- [14] Wilson, W.L. 1998. **Isolation of Endophytes from Seagrasses from Bermuda**. M.Sc. Thesis, University of New Brunswick, Canada.
- [15] Owen, N.L. and Hundley, N. 2004. Endophytes - the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**. 87: 79-99.
- [16] Buatong, J. and et al. 2011. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 27: 3005-3008.
- [17] Supaphon, P. and et al. 2013. Antimicrobial potential of endophytic fungi derived from three seagrasses (*Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Thalassia hemprichii*) from Thailand. **PLoS One**. 8(8): e72520.
- [18] Alva, P. and et al. 2002. Do sea grasses harbour endophytes? **Fungal Diversity Research Series**. 7: 167-178.
- [19] Sakayaroj, J. and et al. 2010. Phylogenetic diversity of endophyte assemblages associated with the tropical seagrass *Enhalus acoroides* in Thailand. **Fungal Diversity**. 42: 27-45.
- [20] Raja, M.K.M.M. and et al. A comprehensive review on *Nymphaea stella*: A traditionally used bitter. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**. 1(3): 311-319.
- [21] Pareek, A. and Kumar, A. 2016. Pharmacognostic studies on *Nymphaea* spp. **World Journal of Pharmaceutical Research**. 5(6):1-18.
- [22] Singh, M. and Jain, A.P. 2017. A review on genus *Nymphaea*: Multipotential medicinal plant. **Asian Journal of Pharmaceutical Education and Research**. 6(4): 1-9.

- [23] Shan, B. and et al. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**. 117: 112-219.
- [24] Rajagopal, K. and et al. 2018. Mycodiversity and biotechnological potential of endophytic fungi isolated from hydrophytes. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**. 8(2): 172-182.
- [25] Rashmi, M., Kushveer, J.S. and Sarma, V.V. 2019. A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity. **Mycosphere**. 10(1): 798-1079.
- [26] Ukwatta, K.M., Lawrence, J.L. and Wijayathna, C.D. 2019. The study of antimicrobial, anti-cancer, anti-inflammatory and alpha-glucosidase inhibitory activities of *Nigronaphthaphenyl*, isolated from an extract of *Nigrospora sphaerica*. **Mycology**. 10(4): 222-228.
- [27] Dissanayake, R.K. and et al. 2016. Antimicrobial activities of endophytic fungi of the Sri Lankan aquatic plant *Nymphaea nouchali* and chaetoglobosin A and C, produced by the endophytic fungus, *Chaetomium globosum*. **Mycology**. 7(1): 1-8.
- [28] Tejesvi, M.V. and et al. 2008. Antioxidant, antihypertensive, and antibacterial properties of endophytic *Pestalotiopsis* species from medicinal plants. **Canadian Journal of Microbiology**. 54(9): 769-780.
- [29] Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escoria, A. and Saura-Calixto, J. 2000. Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. **Nutrition Research**. 20: 941-953.
- [30] Nayak, B.K. 2014. Endophytic fungal enumeration from various leaf samples of a medicinal plant: *Ziziphus mauritiana*. **International Journal of PharmTech Research**. 7: 344-348.
- [31] Chen, J.M., Ling, C. and Lu-Ping, Q. 2016. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review. **Frontiers in Microbiology**. 7: 906.