View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Srinakharinwirot University: SWU e-Journals System

บทความวิจัย

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเจริญของแบคทีเรีย และต้านการทำงานของเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส ของสารสกัดจากเห็ดปะการังรามาเรีย

ณัชชา พรหมเพศ[1] เชิดชัย โพธิ์ศรี[2] รุ้งเพชร แข็งแรง[3] อรอนงค์ พริ้งศุลกะ[4] และ ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย[4*]

ได้รับบทความ: 14 พฤษภาคม 2561
ได้รับบทความแก้ไข: 16 กรกฎาคม 2561
ยอมรับตีพิมพ์: 16 กรกฎาคม 2561

บทคัดย่อ

เห็ดปะการังสกุล *Ramaria* จำนวน 10 ตัวอย่าง จัดจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้ 9 สปีชีส์ ดังนี้ *Ramaria* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74 และ PKWS15-109), *R. flava* var. *aurea* (PKWS15-173), *Ramaria* sp.1 (PKWS15-92), *Ramaria* sp.2 (PKWS15-95), *Ramaria* sp.3 (PKWS15-164), *Ramaria* sp.4 (PKWS15-181), *Ramaria* sp.5 (PKWS15-194), *Ramaria* sp.6 (PKWS15-221) และ *Ramaria* sp.7 (PKWS14-02) เมื่อนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลและทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพพบว่าสารสกัดจากเห็ดทุกตัวอย่างมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยเฉพาะ PKWS15-164 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ positive control นอกจากนี้ยังตรวจพบสารฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลในปริมาณที่สูง เช่น PKWS15-164 (3,909.52 ± 58.56 g QE/g extract) และ PKWS15-194 (3,765.88 ± 33.75 g QE/g extract) ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้เนื่องจากสารฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ส่วนประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียพบว่าสารสกัดส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้มากที่สุดรองลงมาคือ *Escherichia coli, Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเห็ด PKWS15-181 (IC50 = 0.216 ± 0.026 mg/mL) และ PKWS15-194 (IC_{50} = 12.908 ± 0.110 mg/mL) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ได้ดีไม่ต่างจากยา acarbose (IC_{50} = 33.782 ± 0.523 mg/mL) ที่ใช้รักษาโรคเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเห็ดปะการัง *Ramaria* สามารถใช้เป็นแหล่งผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านการเจริญของแบคทีเรีย และสารลดปริมาณน้ำตาลที่มีประสิทธิภาพแหล่งใหม่ได้ในอนาคต

คำสำคัญ: เห็ดปะการัง ฟลาโวนอยด์ สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านจุลินทรีย์ เบาหวาน

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[2]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม
[3]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
[4]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: nuttika@g.swu.ac.th

Antioxidant, Antibacterial and Anti-alpha Glucosidase Activities of Coral Mushroom *Ramaria* spp.

Nutcha Promphet[1], Cherdchai Prosri[2], Rungpetch Khaeng-raeng[3], Onanong Pringsulaka[4], and Nuttika Suwannasai[4*]

Received: 14 May 2018
Revised: 16 July 2018
Accepted: 16 July 2018

ABSTRACT

Ten collections of coral mushroom genus *Ramaria* were identified to 9 species based on the morphological characteristics i.e. *Ramaria* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74 และ PKWS15-109), *R. flava* var. *aurea* (PKWS15-173), *Ramaria* sp.1 (PKWS15-92), *Ramaria* sp.2 (PKWS15-95), *Ramaria* sp.3 (PKWS15-164), *Ramaria* sp.4 (PKWS15-181), *Ramaria* sp.5 (PKWS15-194), *Ramaria* sp.6 (PKWS15-221) and *Ramaria* sp.7 (PKWS14-02). The *Ramaria* samples were then extracted with ethanol and screened for the bioactivities. The results showed that all extracts contained high antioxidant activity especially PKWS15-164. They were detected high number of flavonoids and total phenolic contents such as PKWS15-164 (3,909.52 ± 58.56 g QE/g extract) and PKWS15-194 (3,765.88 ± 33.75 g QE/g extract), which supported their results of antioxidant activity. Flavonoids are phenolic substances that act as antioxidants. The results of antibacterial activity revealed that most *Ramaria* extracts could inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* followed by *Escherichia coli, Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa,* respectively. Moreover, the extracts of PKWS15-181 (IC_{50} = 0.216 ± 0.026 mg/mL) and PKWS15-194 (IC_{50} = 12.908 ± 0.110 mg/mL) exhibited high alpha-glucosidase inhibitory potential, which were not significantly different from diabetes mellitus drug as well as acarbose (IC_{50} = 33.782 ± 0.523 mg/mL). The results from this study indicated that the coral mushroom Ramaria species are new potential source of antioxidant, antibacterial and anti-alpha glucosidase activities in future.

Keywords: Coral mushroom, Flavonoids, Antioxidants, Antimicrobial activity, Diabetes mellitus

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University
[2]Department of Biology, Faculty of Science, Nakhon Phanom University
[3]Department of Microbiology, Faculty of Science and technology, Pibulsongkram Rajabhat University
[4]Department of Microbiology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University
[*]Corresponding author, email: nuttika@g.swu.ac.th

บทนำ

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีจำนวนมาก โดยเฉพาะจากพืชสมุนไพร และจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียบางชนิด เช่น แอคติโนมัยซีส (actinomycetes) แต่การศึกษาสารสกัดจากเห็ดรานั้นพบว่ามีจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับจำนวนสายพันธุ์ที่มีจำนวนมาก โดยเฉพาะเห็ดป่าเอคโตไมคอร์ไรซาที่สามารถรับประทานได้และมีความหลากหลายสูง สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจกลุ่มหนึ่ง ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งสามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระนี้สามารถทำลายชีวโมเลกุลได้ทั้งชนิดที่พบในเซลล์ และชนิดที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ [1] นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย เกิดการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม รวมทั้งสาเหตุของโรคชรา และโรคมะเร็ง อีกด้วย นอกจากนี้แนวโน้มของผู้บริโภคปัจจุบันได้หันมาสนใจสุขภาพกันมากขึ้น การศึกษาคุณประโยชน์ของสารสกัดจากเห็ดที่สามารถรับประทานได้ในแง่การลดระดับปริมาณน้ำตาลในเลือด (antihyperglycemic activity) จึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน (diabetes mellitus) หรือโรคที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงผิดปกติ ประเภทที่ 2 (type 2) ซึ่งมีจำนวนเพิ่มสูงขึ้นในปัจจุบัน เกิดจากการที่ตับอ่อนผลิตอินซูลินได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย หรือเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ทำให้ผู้ป่วยต้องคุมอาหารเพื่อรักษาระดับน้ำตาลในเลือดไม่ให้มีปริมาณที่สูงจนเกินไป เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานว่าการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารคาร์โบไฮเดรต เช่น เอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase ในระบบย่อยอาหารสามารถลดปริมาณน้ำตาลในเลือดได้ [2] การมีระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงยังนำไปสู่การเกิดสารอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species (ROS) ซึ่งก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องในการทำลายเซลล์ต่างๆ อีกด้วย ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมียาสังเคราะห์ที่ใช้ลดปริมาณน้ำตาลในเลือดได้แต่พบว่ามักมีผลข้างเคียงเมื่อผู้ป่วยต้องใช้ยาในระยะเวลานาน และเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีงานวิจัยที่รายงานว่าสารสกัดจากเห็ด *Clitocybe maxima* มีคุณสมบัติในการลดปริมาณน้ำตาลได้และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ [3] นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเห็ด *Catathelasma ventricosum, Stropharia rugoso-annulata, Craterellus cornucopioides* และ *Laccaria amethystea* สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase หรือมีคุณสมบัติในการลดปริมาณน้ำตาลจากการย่อยสารคาร์โบไฮเดรตได้ รวมทั้งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี [4] ส่วนการศึกษาสารสกัดจากเห็ด *Phaeolus schweinitzii, Inonotus hispidus, Tricholoma columbetta, Tricholoma caligatum, Xerocomus chrysenteron, Hydnellum ferruginemum, Agaricus bisporus* และ *Pleurotus ostreatus* พบว่ามีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีเช่นกัน [5] จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเห็ดรามีแนวโน้มที่น่าสนใจในการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและสารลดปริมาณน้ำตาลในรูปของการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase ได้

โดยงานวิจัยนี้สนใจศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* ซึ่งมีลักษณะรูปร่างของดอกเห็ดแตกกิ่งก้านคล้ายปะการัง บางชนิดมีความสัมพันธ์กับรากพืชแบบเอคโตไมคอร์ไรซ่า สามารถรับประทานได้ บางชนิด เช่น *Ramaria botrytis* สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด และสารสกัดจากดอกเห็ด มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง [6-7] ส่วน *Ramaria flava* เป็นเห็ดที่รับประทานได้ มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และต้านอนุมูลอิสระที่ดี [8] นอกจากนี้สารสกัดจาก *Ramaria subaurantiaca* สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) ได้ เป็นต้น [9] ในประเทศไทยมีรายงานชนิดของ

เห็ด *Ramaria* ประมาณ 20 สปีชีส์ ซึ่งในจำนวนนี้เป็นรายงานการค้นพบครั้งแรกในประเทศไทยถึง 8 สปีชีส์ [10] ทั้งนี้อาจเนื่องจากข้อมูลการศึกษาเห็ดปะการังในประเทศไทยนั้นมีไม่มาก จึงทำให้ข้อมูลทางวิชาการของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของเห็ดกลุ่มนี้มีจำกัด [11] ที่สำคัญไม่มีฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดปะการัง *Ramaria* ที่พบจากประเทศไทยในฐานข้อมูลนานาชาติ GenBank และ UNITE (สืบค้นเมื่อวันที่ 30 เมษายน 2561) ที่สามารถใช้เทียบเคียงได้ นอกจากนี้ยังไม่มีข้อมูลสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดชนิดนี้ในประเทศไทยมาก่อน ขณะที่ในต่างประเทศมีรายงานอย่างต่อเนื่องถึงคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถนำมาพัฒนาต่อยอดได้ ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นพบสารชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าเดิม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเน้นการนำเห็ดปะการัง *Ramaria* ชนิดที่รับประทานได้มาสกัดเพื่อทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และสารออกฤทธิ์ชีวภาพรวมทั้งคุณสมบัติในการลดปริมาณน้ำตาล (antihyperglycemic activity) โดยวัดจากประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase เพื่อการนำทรัพยากรธรรมชาติมาใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่าต่อไป

วิธีการทดลอง

1. การรวบรวมและการจัดจำแนกชนิดของเห็ด *Ramaria* spp.

ตัวอย่างเห็ด *Ramaria* รวบรวมได้จากพื้นที่ อำเภอคอนสาร จังหวัดชัยภูมิ นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามหลักอนุกรมวิธาน เช่น ลักษณะของรูปร่างดอกเห็ด การแตกกิ่งก้าน สี และขนาดของดอกเห็ด เบสิเดียม และเบสิดิโอสปอร์ เป็นต้น เพื่อการระบุชนิด โดยเทียบเคียงกับชนิดที่มีรายงานการค้นพบในประเทศไทยมาก่อนหน้านี้ [10-12]

2. การสกัดสารจากดอกเห็ด *Ramaria* spp.

นำตัวอย่างดอกเห็ด *Ramaria* ที่รวบรวมได้มาอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด จากนั้นนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 95% โดยใช้ปริมาณตัวอย่างเห็ดบดต่อตัวทำละลายเท่ากับ 5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของตัวทำละลาย ใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปสกัดบนแท่นเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman™ No.1) เพื่อแยกส่วนของเห็ดออกมาแล้วนำไปสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิมอีก 3 ครั้ง ส่วนน้ำของสารสกัดที่ได้ ปริมาตรรวม 400 มิลลิลิตร นำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) เมื่อแห้งนำไปชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้แล้วละลายกลับด้วยตัวทำละลายเดิม ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

3. การวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

สารสกัดจากเห็ดที่ได้นำมาวัดคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

- วิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (diphenylpicry-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity)

นำสารสกัดจากเห็ดมาเจือจางเป็นลำดับทีละ 2 เท่า (two-fold dilution) ด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 95% (1:2 ถึง 1:256 v/v) ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ (Sigma) เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยชุดควบคุมใช้สารละลาย เอทานอลเข้มข้น 95% แทนสารสกัด ซึ่งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดได้คำนวณจากสีที่จางลงของ DPPH ดังสมการ

DPPH$^{\bullet}$ (สีน้ำเงิน) + AH (สารต้านอนุมูลอิสระ) ---> DPPH-H (สีเหลือง) + A$^{\bullet}$

จากนั้นคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) จากสูตร

% inhibition = [(Ac-As)/Ac] × 100

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (เอทานอลเข้มข้น 95%) และ As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด ค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดที่ระดับการเจือจางต่างๆ นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 50% ซึ่งสารมาตรฐานที่ใช้เทียบเคียงได้แก่ Butylated hydroxy toluene (BHT) (Sigma) [13]

- วิธีการทำลายอนุมูลอิสระ ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS^{+}) radical scavenging activities)

นำสารสกัดจากเห็ดมาเจือจางเป็นลำดับทีละ 2 เท่า ด้วยน้ำกลั่น (1:2 ถึง 1:256 v/v) ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 125 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet+}$ (Sigma) เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 880 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 6 นาที เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดซึ่งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคำนวณจากสีที่จางลงของ ABTS ดังสมการ

ABTS$^{\bullet+}$ (สีเขียวอมน้ำเงิน) + AH (สารต้านอนุมูลอิสระ) $\rightarrow$ ABTS (สีจางลง) + A$^{\bullet}$

จากนั้นคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) จากสูตร

% inhibition = [(Ac-As)/Ac] × 100

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (น้ำกลั่น) และ As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

ค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดที่ระดับการเจือจางต่างๆ ที่ได้ นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} สารมาตรฐานที่ใช้เทียบเคียงได้แก่ Trolox® (Sigma) [14]

4. การวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid contents)

นำสารสกัดจากเห็ดมาหาปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยใช้สารสกัดปริมาตร 125 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) เข้มข้น 1:20 w/v ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) เข้มข้น 1:10 w/v ปริมาตร 150 ไมโครลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 950 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาตรวจค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

415 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ค่าที่ได้นำไปเทียบเคียงกับกราฟมาตรฐานของ Quercetin (Sigma) รายงานผลเป็น g QE/g extract [14]

5. การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอล (Total phenolic compounds)

นำสารสกัดจากเห็ดมาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's method [15] โดยนำสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ที่เจือจาง 10 เท่า (v/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 7.5% (w/v) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาตรวจค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 735 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ค่าที่ได้นำไปเทียบเคียงกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid รายงานผลเป็น mg GAE/g extract

6. การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

- การทดสอบด้วยเทคนิค agar well diffusion

นำสารสกัดจากเห็ดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจากวิธีการทดลองในข้อ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาระเหยตัวทำละลายออกจนแห้งเพื่อกำจัดเอทานอล ชั่งน้ำหนักของสารสกัด แล้วละลายด้วย DMSO เข้มข้น 10% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27813 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25926 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Müller-hinton agar (MHA) นำมา spread เชื้อทดสอบที่ปรับความเข้มข้นให้มีค่าเท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้นเจาะอาหารให้เป็นหลุมด้วย cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 5 มิลลิเมตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วใส่สารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้จะเกิดวงใสที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส ทั้งนี้ใช้สารละลาย DMSO เข้มข้น 10% เป็นชุดควบคุม (negative control) [16]

- การหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC)

นำสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้จากวิธี agar well diffusion มาหาค่า MIC ด้วยวิธี MTT assay [17] โดยการเจือจางสารสกัดเป็นลำดับทีละ 2 เท่า ด้วยสารละลาย DMSO เข้มข้น 10% การทดลองนี้ศึกษาใน 96 well plate โดยใช้สารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ M?ller-hinton broth (MHB) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/mL ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ในการตรวจผลจะเติมสารละลาย MTT (3-(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เข้มข้น 0.12 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมนาน 4 ชั่วโมง ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ส่วนผสมจะใสเนื่องจากไม่มีการเจริญของเชื้อ แต่ถ้าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งได้เชื้อจะเจริญและผลิตเอนไซม์ dehydrogenase รีดิวซ์สาร MTT เกิดตะกอนเซลล์สีม่วงของ formazan ใน

การทดลองนี้ใช้ยา ampicillin เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น positive control และใช้ DMSO เข้มข้น 10% เป็น negative control ทั้งนี้ MIC คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

ส่วนการทดสอบ MBC นั้นเป็นการทดสอบต่อเนื่องจาก MIC โดยให้เลือกหลุมทดสอบที่ให้ผล MIC คือไม่พบการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี MTT assay และหลุมทดสอบที่มีความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้นติดกัน จำนวน 3 หลุม โดยดูดสารในหลุมดังกล่าวซึ่งมีส่วนผสมของสารสกัดและเชื้อแบคทีเรียทดสอบปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาหยดลงบนอาหารแข็ง MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อ โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียคือค่า MBC (mg/mL)

7. การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase

- การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase

ในการวัดคุณสมบัติของสารสกัดในการลดปริมาณน้ำตาลในรูปของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase (Sigma) [17] โดยนำสารสกัดมาปรับให้มีความเข้มข้นต่างๆ (0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสารละลาย DMSO ปริมาตร 125 ไมโครลิตร แล้วเติมเอนไซม์ alpha-glucosidase เข้มข้น 0.025 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วเติมสารตั้งต้น *p*-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside (PNPG) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มต่อนาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยเทียบกับปฏิกิริยาที่เติมสารละลาย DMSO แทนสารสกัด (negative control) จากนั้นคำนวณค่าร้อยละในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (% inhibition) ตามสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (DMSO) และ As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด ซึ่งค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดที่ระดับการเจือจางต่างๆ นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ได้ 50% โดยสารมาตรฐานที่ใช้เทียบเคียงคือยารักษาโรคเบาหวาน acarbose (Sigma)

- การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-amylase

นำสารสกัดมาปรับให้มีความเข้มข้นต่างๆ (0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสารละลาย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติมเอนไซม์ alpha-amylase (Sigma) เข้มข้น 2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย soluble starch เข้มข้น 1% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นวัดปริมาณ reducing sugar โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยใช้ positive control เป็น acarbose ค่าที่ได้รายงานเป็น IC_{50} เช่นเดียวกับการวัดเอนไซม์ alpha-glucosidase [18]

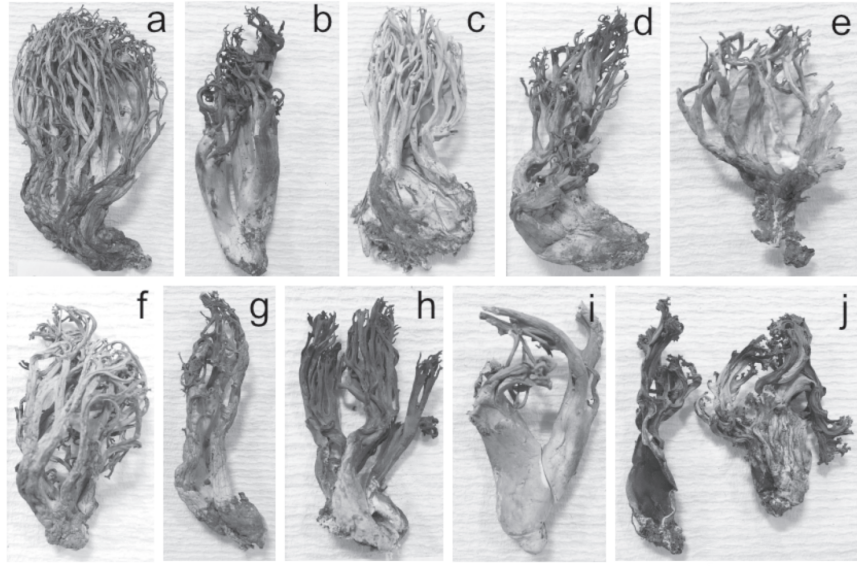
8. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turkey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics 20

ผลการทดลอง

1. การรวบรวมและการสกัดสารจากดอกเห็ด *Ramaria* spp.

ตัวอย่างเห็ด *Ramaria* จำนวน 10 ตัวอย่าง ที่รวบรวมได้จากจังหวัดชัยภูมิ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1 พบว่ามี 3 ตัวอย่าง ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับสปีชีส์ที่เคยมีรายงานมาก่อน แต่มีลักษณะบางประการที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย เช่น ขนาดของเบสิดิโอสปอร์ และสีของดอกเห็ด ซึ่งอาจเนื่องมาจากสภาพภูมิศาสตร์ แหล่งที่พบ และระยะการเจริญของดอกเห็ดที่ต่างกัน จึงใช้อักษร "aff." (= affinis) ในการระบุสปีชีส์ ได้แก่ *R.* aff. *flava* var. *aurea* (PKWS15-173) และ *Ramaria* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74 และ PKWS15-109) ส่วนอีก 7 ตัวอย่าง พบว่ายังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดตัวอย่างแตกต่างจากชนิดที่เคยมีรายงานในประเทศไทยมาก่อน [10-13] จึงต้องพิสูจน์เอกลักษณ์อย่างละเอียดโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และเทียบเคียงกับฐานข้อมูลของเห็ด Ramaria ในหอพรรณไม้ (Herbarium) นานาชาติต่อไป เมื่อนำดอกเห็ดแห้งไปบดและสกัดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 95% แล้วทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบสุญญากาศ ได้สารสกัดที่มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 0.103–0.501 กรัมต่อกรัมเห็ดตัวอย่างแห้ง สารที่ได้มีสีเหลืองถึงสีน้ำตาล จากนั้นนำสารสกัดไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพต่อไป



รูปที่ 1 ตัวอย่างดอกเห็ด *Ramaria* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ a) *Ramaria* aff. *vinosimaculans* PKWS15-109, b) *Ramaria* sp.2 PKWS15-95, c) *Ramaria* sp.3 PKWS15-164, d) *Ramaria* sp.1 PKWS15-92, e) *R.* aff. *vinosimaculans* PKWS15-74, f) *Ramaria* sp.6 PKWS15-221, g) *R.* aff. *flava* var. *aurea* PKWS15-173, h) *Ramaria* sp.5 PKWS15-194, i) *Ramaria* sp.7 PKWS14-02 และ j) *Ramaria* sp.4 PKWS15-181

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* ในการศึกษาครั้งนี้

ชนิดของเห็ดปะการัง	ขนาดของดอกเห็ด (กว้าง x สูง) เซนติเมตร	จำนวนชั้นของการแตกกิ่ง	สีของดอกเห็ด (โคนก้าน กิ่ง และปลายกิ่ง)	ลักษณะปลายกิ่ง	ขนาดของเบสิดิโอสปอร์ (กว้าง x ยาว) ไมโครเมตร	รูปร่าง สี และผิวของสปอร์
Ramaria aff. *flava* var. *aurea* (PKWS15-173)	2-3 × 3-8	4-6	ก้านมีสีขาวถึงครีม, กิ่งมีสีเหลืองอ่อน, ปลายกิ่งมีสีเหลือง	unequal development of branches	4-6 × 9-13	รูปรี สีเหลืองอมเขียว ผิวขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)
R. aff. vinosimaculans (PKWS15-74)	1.5-6 × 6-10	6-8	ก้านมีสีครีม พบรอยช้ำสีไวน์แดง, กิ่งมีสีครีมถึงสีเหลือง	symmetrical dichotomy	4-6 × (8-)9-12	รูปรี สีเหลืองอมเขียว ผิวขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน (strong verrucose)
R. aff. vinosimaculans (PKWS15-109)	2-6 × 6-10	6-8	ก้านมีสีครีม พบรอยช้ำสีไวน์แดง, กิ่งมีสีครีมถึงสีเหลืองอ่อน, ปลายกิ่งมีสีเหลือง	symmetrical dichotomy	4-6 × 9-12	รูปรี สีเหลืองอมเขียว ผิวขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน (strong verrucose)
Ramaria sp.1 (PKWS15-92)	2-4 × 4-10	6-10	ก้านมีสีขาวครีมถึงน้ำตาลอ่อน, กิ่งสีน้ำตาล, ปลายกิ่งมีสีเหลือง	unequal development of branches	4-6(-7.5) × 9-12	รูปรี สีเหลืองอมเขียว ผิวขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)
Ramaria sp.2 (PKWS15-95)	3-6 × 4-11	6-8	ก้านมีสีขาวครีมถึงน้ำตาลอ่อน, กิ่งมีสีน้ำตาลแดง, ปลายกิ่งมีสีน้ำตาลแดง	symmetrocal dichotomy	4-6 × (8-) 9-13	รูปรี สีเหลืองอมเขียว ผิวขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน (strong verrucose)
Ramaria sp.3 (PKWS15-164)	1.5-6 × 3-6	3-6	ก้านมีสีขาวครีม, กิ่งมีสีน้ำตาลอ่อน, ปลายกิ่งมีสีน้ำตาลอ่อน	unequal development of branches	2-4 × 8-12(-13)	รูปยาว รี สีใส ผิวเรียบ (smooth)
Ramaria sp.4 (PKWS15-181)	4-11 × 6-10	6-8	ก้านมีสีขาวอมชมพูอ่อน, กิ่งมีสีน้ำตาลอ่อนอมชมพู, ปลายกิ่งมีสีน้ำตาลอ่อนอมชมพู	poly dichotomy	4-5 × 5-8(-9.5)	รูปรีเกือบกลม สีเหลืองอมเขียว ผิวขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)
Ramaria sp.5 (PKWS15-194)	4-6 × 8-10	4-8	ก้านมีสีขาว, กิ่งมีสีน้ำตาลอมส้มถึงน้ำตาลแดง, ปลายกิ่งมีสีส้ม	dichotomy	4-7 × (9-)10-12 (-13.6)	มีรูปรี สีน้ำตาล ผิวขรุขระเป็นหนาม (spiny)
Ramaria sp.6 (PKWS15-221)	3-5 × 4-6	4-6	ก้านและกิ่งมีสีครีมถึงน้ำตาลถึงน้ำตาลเสมอกันทั้งดอก, ปลายกิ่งมีสีน้ำตาลเข้มกว่ากิ่ง	decussation	4-7 × 9-13	รูปรี สีเหลืองอมเขียว ผิวขรุขระเป็นตุ่มนูนใหญ่ชัดเจน (strong verrucose)
Ramaria sp.7 (PKWS14-02)	3.5-5 × 5-9.5	4-8	ก้านมีสีน้ำตาล, กิ่งมีสีน้ำตาลแดงถึงน้ำตาลเข้ม, ปลายกิ่งมีสีน้ำตาลเข้ม	dichotomy	4-6(-7) × 10-13 (-14)	รูปรี สีเหลืองอมเขียว ผิวขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)

หมายเหตุ: decussation = แตกกิ่งแบบไขว้ทแยงที่ละคู่, symmetrical dichotomy = แตกกิ่งทีละคู่ที่สมมาตรกัน, unequal development of branches = แตกแบบหลายกิ่งที่ไม่เท่ากัน, unequal dichotomy = แตกกิ่งที่ละคู่ที่ไม่สมมาตรกัน, poly dichotomy = แตกกิ่งแบบหลายกิ่งเท่าๆ กัน

2. การวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

สารสกัดจากเห็ดปะการัง *Ramaria* ทั้ง 10 ตัวอย่าง นำมาศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ผลแสดงเป็นค่า IC_{50} (mg/mL) ในตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดจากเห็ด *Ramaria* ทั้ง 10 ตัวอย่าง มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี และผลการวิเคราะห์สอดคล้องกันทั้งสองวิธีทดสอบ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.009 ± 0.001 ถึง 1.043 ± 0.005 mg/mL เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH ส่วนการทดสอบด้วยวิธี ABTS มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.069 ± 0.003 ถึง 6.001 ± 0.060 mg/mL ซึ่งชนิดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดสามอันดับแรก ได้แก่ PKWS15-164, PKWS15-194 และ PKWS14-02 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ positive control ของ BHT และ Trolox ส่วนปริมาณของสารฟลาโวนอยด์หาได้จากการเทียบเคียงกับกราฟมาตรฐานของสาร Quercetin พบว่าสารสกัดเห็ด *Ramaria* ทุกชนิดมีสารฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูงอยู่ในช่วง 53.049 ± 1.694 ถึง $3,909.517 \pm 58.556$ g QE/g extract ในขณะที่สารประกอบฟีนอลทั้งหมดหาได้จากการเทียบเคียงกับกราฟมาตรฐานของสาร Gallic acid พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 5.756 ± 0.247 ถึง 461.955 ± 8.783 g GAE/g extract ทั้งนี้สารฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลพบมากในสารสกัดเห็ด PKWS15-164 และ PKWS15-194 (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีรายงานว่าสารฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี [1, 14]

ตารางที่ 2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากเห็ด *Ramaria*

ชนิดของเห็ด	การต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) mg/mL		สารฟลาโวนอยด์ (g QE/g extract)	สารประกอบฟีนอลทั้งหมด (g GAE/g extract)
	DPPH	ABTS		
Ramaria aff. *flava* var. *aurea* (PKWS15-173)	0.500 ± 0.009^{a}	1.426 ± 0.055^{a}	75.031 ± 0.887^{a}	9.873 ± 0.272^{ab}
R. aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74)	0.285 ± 0.007^{b}	2.444 ± 0.135^{b}	94.030 ± 1.033^{ab}	14.733 ± 0.388^{b}
R. aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109)	0.501 ± 0.013^{a}	2.029 ± 0.010^{c}	60.809 ± 1.880^{a}	5.756 ± 0.247^{a}
Ramaria sp. 1 (PKWS15-92)	0.564 ± 0.013^{d}	1.892 ± 0.013^{c}	$5.862 \pm 0.560b^{c}$	53.049 ± 1.694^{a}
Ramaria sp. 2 (PKWS15-95)	1.043 ± 0.005^{e}	6.001 ± 0.060^{e}	58.503 ± 0.654^{a}	12.355 ± 1.378^{ab}
Ramaria sp. 3 (PKWS15-164)	0.009 ± 0.001^{i}	0.069 ± 0.003^{i}	3909.517 ± 58.556^{d}	461.955 ± 8.783^{e}
Ramaria sp. 4 (PKWS15-181)	0.209 ± 0.004^{c}	0.984 ± 0.075^{d}	74.185 ± 0.980^{a}	39.687 ± 0.919^{c}
Ramaria sp. 5 (PKWS15-194)	0.032 ± 0.001^{gh}	0.800 ± 0.049^{h}	$3,765.877 \pm 33.753^{c}$	148.471 ± 1.445^{d}
Ramaria sp. 6 (PKWS15-221)	0.106 ± 0.004^{f}	2.883 ± 0.060^{f}	56.785 ± 0.534^{a}	15.352 ± 1.417^{b}
Ramaria sp. 7 (PKWS14-02)	0.046 ± 0.001^{g}	1.649 ± 0.032^{g}	138.784 ± 2.531^{b}	41.304 ± 0.702^{c}
BHT	0.015 ± 0.001^{hi}	-	-	-
Trolox	-	0.002 ± 0.010^{i}	-	-

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a-i ในตารางแสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองตามคอลัมน์ที่ $p < 0.05$

3. การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

เมื่อนำสารสกัดจากเห็ด Ramaria ทั้ง 10 ตัวอย่าง มาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* ATCC25926, *B. subtilis* ATCC6633, *E. coli* ATCC25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27813 ด้วยวิธี agar well diffusion และคำนวณหาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้มากที่สุด (9 ตัวอย่าง) รองลงมาคือ *E. coli* (6 ตัวอย่าง), *B. subtilis* (4 ตัวอย่าง) และ *P. aeruginosa* (4 ตัวอย่าง) (ตารางที่ 3) ทั้งนี้มีสารสกัดของเห็ด 4 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ PKWS15-109, PKWS15-164, PKWS15-221 และ PKWS15-181 ซึ่งสารสกัดจากเห็ดที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดีที่สุดคือ PKWS15-181 (MBC = 15 mg/mL) ส่วนสารสกัดจากเห็ดที่สามารถฆ่าเชื้อ *B. subtilis* และ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุดคือ PKWS15-109 (MBC = 37.2 mg/mL) และ PKWS15-164 (MBC = 33.6 mg/mL) ตามลำดับ จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ด *Ramaria* ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ยกเว้นสารสกัดจาก PKWS15-173 ที่ไม่เกิดวงใสในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียตั้งแต่การทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion อาจเนื่องจากสารสกัดที่เตรียมได้จากการทดลองนี้มีความเข้มข้นต่ำที่สุดจึงไม่เพียงพอในการยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

4. การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase

การทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดเห็ด *Ramaria* ในการลดปริมาณน้ำตาลวัดจากประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase โดยเทียบกับยาที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน acarbose พบว่ามีสารสกัดจากเห็ดเพียง 3 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ได้ ซึ่งชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด ได้แก่ PKWS15-181 (IC_{50} = 0.216 ± 0.026 mg/mL) รองลงมาคือ PKWS15-194 (IC_{50} = 12.908 ± 0.011 mg/mL) และ PKWS15-74 (IC_{50} = 48.231 ± 1.115 mg/mL) ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่ต่างจากยา acarbose ซึ่งมีค่า IC_{50} = 33.782 ± 0.523 mg/mL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ไม่มีสารสกัดจากเห็ดชนิดใดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-amylase ได้ ในขณะที่ยา acarbose สามารถยับยั้งได้ดีมีค่า IC_{50} = 3.514 ± 0.018 mg/mL (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 คุณสมบัติในการยับยั้งและการทำลายแบคทีเรียของสารสกัดจากเห็ดปะการัง *Ramaria*

ชนิดของเห็ด	การยับยั้งและการทำลายจุลินทรีย์ (mg/mL)							
	S. aureus ATCC25926		**B. subtilis ATCC6633**		**E. coli ATCC25922**		**P. aeruginosa ATCC27813**	
	MIC	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**
Ramaria aff. *flava* var. *aurea* (PKWS15-173)	-	-	-	-	-	-	-	-
R. aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74)	27.4	54.8	-	-	27.4	54.8	-	-
R. aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109)	9.3	37.2	18.6	37.2	9.3	37.2	9.3	37.2
Ramaria sp.1 (PKWS15-92)	14.2	> 14.2	-	-	14.2	> 14.2	-	-
Ramaria sp.2 (PKWS15-95)	16.35	32.7	-	-	-	-	-	-
Ramaria sp.3 (PKWS15-164)	16.8	33.6	16.8	> 33.6	16.8	33.6	8.4	33.6
Ramaria sp.4 (PKWS15-181)	7.5	15.0	7.5	> 15.0	7.5	15.0	7.5	> 15.0
Ramaria sp.5 (PKWS15-194)	7.45	> 7.45	-	-	-	-	-	-
Ramaria sp.6 (PKWS15-221)	17.8	17.8	17.8	> 35.6	17.8	35.6	17.8	35.6
Ramaria sp.7 (PKWS14-02)	8.25	16.6	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเห็ดปะการัง Ramaria ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase

ชนิดของเห็ด	การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (IC_{50}) mg/mL	
	Alpha-glucosidase	**Alpha-amylase**
Ramaria aff. *flava* var. *aurea* (PKWS15-173)	-	-
R. aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74)	48.231 ± 1.115^{b}	-
R. aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109)	-	-
Ramaria sp.1 (PKWS15-92)	-	-
Ramaria sp.2 (PKWS15-95)	-	-
Ramaria sp.3 (PKWS15-164)	-	-
Ramaria sp.4 (PKWS15-181)	0.216 ± 0.026^{a}	-
Ramaria sp.5 (PKWS15-194)	12.908 ± 0.011^{a}	-
Ramaria sp.6 (PKWS15-221)	-	-
Ramaria sp.7 (PKWS14-02)	-	-
Acarbose	33.782 ± 0.523^{ab}	3.514 ± 0.018

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษในตารางแสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองตามคอลัมน์ที่ $p < 0.05$

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เห็ดปะการัง *Ramaria* จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถจัดจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 9 สปีชีส์ และพบว่ามี 3 ตัวอย่าง ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับสปีชีส์ที่มีรายงานมาก่อน ได้แก่ *R.* aff. *flava* var. *aurea* (PKWS15-173) ใกล้เคียงกับ *R. flava* var. *aurea* (Coker) R.H. Petersen แต่ต่างกันที่ขนาดของสปอร์ ซึ่งสปอร์ของ *R. flava* var. *aurea* มีขนาดเล็กกว่าตัวอย่างที่ศึกษาเล็กน้อย คือมีขนาด (กว้าง × ยาว) เท่ากับ 3.3-4.1 × 8.3-11.5(-12.6) ไมโครเมตร [19] ทั้งนี้ในประเทศไทยมีรายงานชนิดที่ใกล้เคียงคือ *R. flava* (Schaeff.) Quél. โดย Chandrasrikul และคณะ (2011) [11] ส่วนอีก 2 ตัวอย่าง ได้แก่ *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74 และ PKWS15-109) ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับ *R. rubribrunnescens* Marr & D.E.Stuntz. [20] คือสีของดอกเห็ดที่มีโคนสีขาวครีมและกิ่งมีสีเหลืออมส้ม ก้านมีรอยช้ำสีไวน์แดง สปอร์มีขนาด (กว้าง × ยาว) เท่ากับ 3.5-5 × 10-14 ไมโครเมตร ผิวสปอร์มีลวดลายขรุขระเล็กน้อยถึงเรียบ ในขณะที่ตัวอย่าง PKWS15-74 และ PKWS15-109 มีลักษณะที่แตกต่างเล็กน้อย เช่น สีของดอกเห็ด ขนาดของสปอร์ และลวดลายบนผิวสปอร์ (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการค้นพบ *R. rubribrunnescens* มาก่อน นอกจากนี้ยังพบอีก 7 ตัวอย่าง ที่ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้อย่างถูกต้องเมื่อเทียบเคียงข้อมูลทางสัณฐานวิทยากับตัวอย่างที่เคยมีรายงานในประเทศไทย จึงต้องพิสูจน์เอกลักษณ์อย่างละเอียดโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และเทียบเคียงกับ

ฐานข้อมูลในหอพรรณไม้นานาชาติต่อไป อย่างไรก็ตาม ข้อมูลของเห็ดปะการัง *Ramaria* ที่ได้จากงานวิจัยนี้ถือเป็นการเพิ่มข้อมูลทางวิชาการของอนุกรมวิธานเห็ดราที่พบในประเทศไทยให้มากขึ้น ซึ่งเป็นทรัพย์สินทางชีวภาพที่สำคัญของประเทศ

ส่วนผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดพบว่า *Ramaria* ทุกชนิด มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกันคือชนิดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดได้แก่ PKWS15-164, PKWS15-194 และ PKWS14-02 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ positive control ของ BHT และ Trolox สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ระบุว่าเห็ดกินได้หลายชนิดสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่ต่อเนื่องได้ โดยสารที่พบส่วนใหญ่เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ โพลีฟีนอล วิตามิน และแคโรทีนอยด์ เป็นต้น [1, 4, 19] ที่น่าสนใจคือสารสกัดเห็ดทุกตัวอย่างมี ฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูงโดยเฉพาะ PKWS15-164 (3,909.517 ± 58.556 g QE/g extract) รองลงมาคือ PKWS15-194 (3,765.877 ± 33.753 g QE/g extract) ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีรายงานว่าสารฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลชนิดหนึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี [1] นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์บางชนิดยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย ในงานวิจัยของ Gursoy และคณะ [21] ศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของ *R. flava* พบว่ามีค่าสูงถึง 500 ± 0.01 mg QE/mg extract ซึ่งสูงกว่าที่วัดได้จากงานวิจัยนี้ ในขณะที่ *R. aurea* พบสารฟลาโวนอยด์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น [22]

ส่วนประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนั้นพบว่าสารสกัดส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ โดยมีสารสกัดของเห็ด 4 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งได้มากที่สุดคือ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่กล่าวว่าแบคทีเรียแกรมบวกมีโอกาสถูกยับยั้งได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบเนื่องจากองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีชั้นของลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิด เช่น *P. aeruginosa* ยังพบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (exopolysaccharide, EPS) อีกด้วย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สารสกัดเข้าถึงเซลล์แบคทีเรียได้ยาก[23]ตัวอย่างของสารสกัดจากเห็ด *Ramaria* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ เช่น *R. aurea, R. botrytis, R. flava, R. flavescens, R. formosa R. largentii, R. rubripermanens* และ *R. stricta* [19, 24-25] ในงานวิจัยนี้พบสารสกัด 1 ชนิด ของ *R. flava* var. *aurea* (PKWS15-173) ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียชนิดใดได้เลย อาจเนื่องมาจากปริมาณสารสกัดที่ได้มีปริมาณน้อยเกินไปหรือสารสกัดที่ได้ไม่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ แม้ว่าจะมีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าสารสกัดจาก *R. flava* มีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ [16] ทั้งนี้ อาจเนื่องจากชนิดของตัวทำละลาย และลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่พบการเจริญของตัวอย่างมีผลในการผลิตสารเมแทบอไลท์ของเห็ดในปริมาณที่แตกต่างกันก็เป็นได้

นอกจากนี้ ยังพบว่าสารสกัดจากเห็ด PKWS15-181, PKWS15-194 และ PKWS15-74 ในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ได้ดีไม่ต่างจากยา acarbose ที่ใช้รักษาโรคเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดจากเห็ดดังกล่าวไปพัฒนาต่อยอดโดยการแยกสารบริสุทธิ์เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีในเชิงลึกต่อไป ซึ่งเป็นการเพิ่มทางเลือกให้กับผู้ป่วยและผู้รักสุขภาพที่ต้องการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด แม้ว่างานวิจัยนี้ไม่พบว่ามีสารสกัดชนิด

ใดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-amylase ได้ก็ตาม เช่นเดียวกับสารสกัดจาก *R. largentii* ด้วยตัวทำละลายเอทานอลสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ได้ดีกว่ายา acarbose โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.810 mg/mL ต่อมามีรายงานว่าสารสกัดจากเห็ด *R. aurea* ด้วยตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ทั้ง alpha-glucosidase และ alpha-amylase รวมทั้งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี [25] อย่างไรก็ตาม ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเห็ด *Ramaria* นี้ยังเป็นข้อมูลใหม่ และมีการศึกษาไม่มากนักโดยเฉพาะในประเทศไทย ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ที่ดีทางชีวภาพ จึงน่าสนใจที่จะใช้เป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแหล่งใหม่ที่มีประสิทธิภาพได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการทำวิจัยบางส่วนจากมูลนิธิโทเร เพื่อการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ประจำปี 2559 และขอขอบคุณอธิบดีกรมอุทยาน สัตว์ป่า และพันธุ์พืช หัวหน้าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จ.ชัยภูมิ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ ที่อำนวยความสะดวกในการศึกษาเทียบเคียงตัวอย่างเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา

เอกสารอ้างอิง

1. Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Petrovic, P., Niksic, M., Vrvic, M. M., & Griensven, L. (2015). Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules, 20,* 19489-19525.
2. Palanisamy, U. D., Ling, L. T., Manaharan, T., & Appleton, D. (2011). Rapid isolation of Geraiin from Nephelium lappaceum rind waste and its anti-hyperglycemic activity. *Food Chemistry.* 127, 21-27.
3. Tsai, S. Y., Huang, S. J., Lo, S. H., Wu, T. P., Lian, P. Y., & Mau, J. L. (2009). Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chemistry,* 113, 578-584.
4. Liu, Y. T., Sun, J., Luo, Z. Y., Rao, S. Q., Su, Y. J., Xu, R. R., & Yang, Y. J. (2012). Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from southwest china and their antihyperglycemic and antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology, 50,* 1238-1244.
5. Smolskaite, L., Venskutonis, P. R., & Talou, T. (2015). Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LWT-Food Science and Technology, 60*(1), 462-471.
6. Kim, J. M., & Jung, Y. M. (1995). Immune regulatory and antitumor effect of *Ramaria botrytis* extract. *Korean Journal of Veterinary Public Health, 9,* 181-190.

7. Lee, J. Y., & Han, Y. H. (2001). Enzyme activities of the fruit body of *Ramaria botrytis* DGUM 29001. *Mycobiology, 29,* 173-175.
8. Liu, K., Wang, J., Zhao, L., & Wang, Q. (2013). Anticancer, antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava. Food and Chemical Toxicology, 58,* 375-380.
9. Choomuenwai, V., Schwartz, B. D., Beattie, K. D., Andrews, K. T., Khokhar, S., & Davis, R. A. (2013). The discovery, synthesis and antimalarial evaluation of natural product-based polyamine alkaloids. *Tetrahedron Letters, 54,* 5188-5191.
10. Maneevun, A., Dodgson, J., & Sanoamuang, N. (2012). *Phaeoclavulina* and *Ramaria* (Gomphaceae, Gomphales) from Nam Nao national park, Thailand. *Tropical Natural History, 12*(2), 147-164.
11. Chandrasrikul, A., Suwanarit, P., Sandwanit, U., Lumyong, S., Payapanon, N., Sanoamuang, N., Pukahuta, C., ... & Thongklam, S. (2011). Checklist of mushrooms (Basdiomycetes) in Thailand. 2nd ed. Bangkok: Integrated promoting technology Co., Ltd.
12. Corner, E. J. H. (2005). Monograph of *Clavaria* and Allied Genera. London: Oxford university press.
13. Sudha, G., Vadivukkarasi, S., Shree, R. B. I., & Lakshmanan, P. (2012). Antioxidant activity of various extracts from an edible mushroom *Pleurotus eous. Food Science Biotechnology, 21*(3), 661–668.
14. Sharififar, F., Nudeh-Dehghn, G., & Mirtajaldini, M. (2008). Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry, 112,* 885-888.
15. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology, 299,* 152-178.
16. Lui, K., Junli, W., Le, Z., & Qian, W. (2013). Anticancer, antioxidant and antibiotic of mushroom *Ramaria flava. Food and Chemical Toxicology, 58,* 375-380.
17. Raju, B. C., Tiwari, A. K., Kumar, J. A., Ali, A. Z., Agawane, S. B., Saidachary, G., & Madhusudana, K. (2009). Alpha-glucosidase inhibitory antihyperglycemic activity of substituted chromenone derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry, 18*(1), 358-365.
18. Tamil, I. G., Dineshkumar, B., Nandhakumar, M., Senthilkumar, M., & Mitra, A. (2010). In vitro study on alpha-amylase inhibitory activity of an indian medicinal plant, *Phyllanthus amarus. Indian Journal of Pharmacology, 42*(5), 280-282.
19. Exeter, R.L., Norvell, L., Cázares, E. (2006). Ramaria of pacific northwestern United States. 1st Ed. United States. Salem District. p. 166.

20. Sharma, S. K., & Gautam, N. (2017). Chemical and bioactive profiling and biological activities of coral fungi from northwestern Himalayas. *Scientific Reports, 7,* 46570.
21. Gursoy, N., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., & Solak, M. H. (2009). Antioxidant Activities, Metal Contents, Total Phenolics and Flavonoids of Seven *Morchella* Species. *Food and Chemical Toxicology.* 47(9), 2381-2388.
22. Khatua, S., Paul, S., & Acharya, K. (2013). Mushroom as the potential source of new generation of antioxidant: a review. *Research Journal of Pharmacy and Technology, 6*(5), 496-505.
23. Yang, Q., Xu, Y-C., Koratisin, P., & Dowzicky, M. J. (2017). Antimicrobial activity among gram-positive and gram-negative organisms collected from the asia-pacific region as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial: comparison of 2015 results with previous years. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 89*(4), 314-323.
24. Ramesh, C., & Pattar, M. G. (2010). Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western Ghats of Karnataka, India. *Pharmaceutical Research, 2,* 107-112.
25. Zengin, G., Kocak, M.S., Gungor, H., Locatelli, M., Aktumsek, A., & Sarikurkcu, C. (2017). Antioxidant and enzyme inhibitory activities of extracts from wild mushroom species from turkey. *International Journal of Medicinal Mushrooms, 19,* 327-336.