รายงานการวิจัย

การใช้ประโยชน์จากสารทุติยภูมิจากเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) ในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

The Utilization of Secondary Metabolites from Split Mushroom (*Schizophyllum commune*) as Anti-microbial Agents and Immunostimulantin Aquaculture

โดย

นางสาวมณี ศรีชะนันท์	ManeeSrichanun
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธีรวุฒิ เลิศสุทธิชวาล	TheerawootLerssutthichawal
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธรรมนูญ ง่านวิสุทธิพันธ์	ThammanoonNganwisuttiphan
นางสาวนิอร จิรพงศธรกุล	NionChirapongsatonkul
รองศาสตราจารย์พชรเพ็ชรประดับ	PatcharaPedpradab
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นเรศ ซ่วนยุก	Naraid Suanyuk

คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ.2559-2560

รายงานการวิจัย

การใช้ประโยชน์จากสารทุติยภูมิจากเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) ในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

The Utilization of Secondary Metabolites from Split Mushroom (*Schizophyllum commune*) as Anti-microbial Agents and Immunostimulant in Aquaculture

โดย

นางสาวมณี ศรีชะนันท์	Manee Srichanun
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธีรวุฒิ เลิศสุทธิชวาล	Theerawoot Lerssutthichawal
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธรรมนูญ ง่านวิสุทธิพันธ์	Thammanoon Nganwisuttiphan
นางสาวนิอร จิรพงศธรกุล	Nion Chirapongsatonkul
รองศาสตราจารย์พชรเพ็ชรประดับ	Patchara Pedpradab
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นเรศ ซ่วนยุก	Naraid Suanyuk

คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ.2559-2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2559-2560 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ภายใต้ชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การเพิ่มผลผลิตเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) การใช้ประโยชน์สารทุติยภูมิจากเห็ดแครงในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำ และการจัดการวัสดุก้อนเห็ดเก่า” โดยมีทีมผู้วิจัยจากคณะเกษตรศาสตร์ มทร.ศรีวิชัยจึงทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มทร.ศรีวิชัย ที่อนุเคราะห์เห็ดแครง รวมทั้งเศษเหลือเห็ดแครงเหลือทิ้งเพื่อนำมาใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งคุณจันทนา ขวัญใจ ผู้ช่วยวิจัยฯ รวมถึงเจ้าหน้าที่สาขาประมงคุณวันเพ็ญ สายน้ำ คุณชุติมณฑ์ ชำนาญกิจ และนักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโท ที่มีส่วนร่วมในการทำงานวิจัยฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อวงการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและประเทศต่อไป

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2561

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นสารต้านแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำและคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ และกลุ่มสารทุติยภูมิจากเห็ดแครงในตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน รวมทั้งการประยุกต์ใช้สารสกัดจากเห็ดแครงเหลือทิ้งต่อการต้านทานความเครียดแบบออกซิเดชั่นในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ดแครงที่ได้ด้วยตัวทำลายต่าง ๆ กัน ประกอบด้วยเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน,เอทิลอะซีเตท, 2-บิวทานอล, เอทิลแอลกอฮอล์, เมทานอลและน้ำและแยกสารทุติยภูมิด้วยวิธี TLC, HPLC, VLC และ GC-MS มีสารที่เหมือนกันที่พบอยู่ในชั้นตัวทำละลายที่ต่างกันหลายชนิด เช่น กรดไขมัน โปรตีน แทนนิน เป็นต้น สามารถบ่งบอกได้ว่า ตัวทำละลาย ที่มีขั้วใกล้เคียงกัน สามารถใช้สกัดสารจากเห็ดแครงได้ โดยที่ให้ผลการสกัดเหมือนกัน เช่น water กับ methanol หรือ ethanol กับ 2-butanol หรือ hexane กับ dichloromethaneเมื่อนำสารสกัดการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ2 ด้านคือการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ 2 ชนิดคือ *Aeromonas hydrophila*และ *Streptococcu agalactiae* พบว่าสารสกัดหยาบ รวมถึงสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ หรือสารสกัดบริสุทธิ์จากการทำละลายด้วยตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิดได้ แสดงให้เห็นว่าเห็ดแครงไม่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแต่สารสกัดหยาบเห็ดแครงมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเห็ดแครงที่สกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระสูงที่สุดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับคือเห็ดแครงที่สกัดด้วย 2-บิวทานอล รองลงมาคือเห็ดแครงที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน เฮกเซน และน้ำ ในขณะที่เห็ดแครงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และเอทิลแอลกอฮอล์มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระต่ำที่สุดเมื่อนำสารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายต่างชนิดประกอบด้วย สารสกัดเมทานอล 2-บิวทานอล ไดคลอโรมีเทน และน้ำ ผสมในอาหารเพื่อศึกษาผลต่อการต้านทานความเครียดแบบออกซิเดชันในอาหารปลาที่ระดับ 0.5% เปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม และอาหารทางการค้า รวมทั้งอาหารที่มีส่วนผสมของเห็ดแครงป่นที่ระดับ 1% ทำการทดลองในปลาดุก เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าปลาที่ได้รับสารสกัดเห็ดแครงด้วยเมทานอล มีผลลดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่น แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลาที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดแครงที่สกัดด้วยบิวทานอล และไดคลอโรมีเทน นอกจากนั้นยังมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์คะตะเลส โดยปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดเห็ดแครงด้วยไดคลอโรมีเทน และน้ำมีค่ากิจกรรมเอนไซม์คะตะเลสสูงสุด แต่ไม่มีผลต่อค่ากิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดจากเห็ดแครงที่สามารถใช้เป็นสารป้องกันความเครียดแบบออกซิเดชันในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ อันจะเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรกรได้

คำสำคัญ: เห็ดแครง, สารสกัดหยาบเห็ดแครง, สารต้านแบคทีเรีย, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, การป้องกันภาวะออกซิเดชัน, ปลาเศรษฐกิจ

Abstract

This research was to investigate the biological activity against bacterial pathogen that causes important disease in fish culture and antioxidant activity of crude extract and secondary metabolites from split mushroom (*Schizophyllum commune*) extracted with different organic solvent. In addition, the utilization of crude split mushroom by-product extract for oxidative defense in economic fish culture was also studied. The results found that most fraction of the extract of split mushroom with different organic solvent (different polarity): hexane, dichloromethane, ethyl acetate, 2-butanol, ethanol, methanol and water followed by the secondary metabolite extraction by TLC, HPLC, VLC and GC-MS contained fatty acid, protein and tannin. This result indicated that the solvent having the similar polarity gave the same group of substance for example water similar to methanol, ethanol similar to 2-butanol and hexane similar to dichloromethane. The extracts and secondary metabolite fraction were then examined the biological activity against bacterial pathogen that causes important disease in fish culture; *Aeromonas hydrophila*and*Streptococcus agalactiae* and antioxidant activity. We found that all extracts and secondary metabolite fraction could not inhibit the growth of both pathogenic bacteria while, we found the antioxidant properties of split mushroom extracted. The antioxidant activity of split mushroom extracted with different solvent were significant ($p<0.05$). Split mushroom extracted with methanol showed the highest activity to radical scavenging activity with not significantly different to 2-butanol extraction followed by dichloromethane hexane and water. While ethylacetate and alcohol showed the lowest activity. The *in vivo* testwas studied by feeding the catfish with the diet supplemented with split mushroom by-product extracted by methanol, 2-butanol, dichloromethane and water at 0.5% compared to control and commercial diet fed group including native split mushroom meal diet at 1% for 2 months. Growth performance, survival rate and oxidative defense ability (lipid peroxidation, catalase activity, lysozyme activity, alkaline phosphatase activity) was analyzed at the end of experiment.The result found that growth performance and survival rate was not significantly different among the treatment ($p>0.05$). Fish fed split mushroom extracted with methanol decreased level of lipid peroxidation in liver which no significantly different to those fish fed split mushroom extracted with 2-butanol and dichloromethane. Inaddition, fish fed diet supplemented with split mushroom extracted

with dichloromethane and water showed the high level of catalase activity. However, the activity of lysozyme and alkaline phosphatase activity was not influenced by the treatment. This research reveals the efficiency of split mushroom by product extracted by methanol, 2-butanol or dichloromethane could be used as feed additive to increase the ability to oxidative defense that can be beneficial applied in aquacultureand increases the value of agricultural waste.

Keywords : Split gill mushroom, Crude extract of split gill mushroom, Anti-bacterial, Antioxidant activity, Oxidative defense, Economic fish

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
สารบัญ	vi
สารบัญตาราง	vii
สารบัญภาพ	viii
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	2
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 หลักการ ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	5
บทที่ 4 ผลการวิจัย	16
บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	42
เอกสารอ้างอิง	45

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเห็ดแครง	16
2	ลักษณะเนื้อสารและปริมาณสารสกัดหยาบของเห็นแครง ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ	18
3	การตอบสนองของสารสกัดหยาบจากเห็ดแครงต่อสารเคมีทดสอบในการศึกษา TLC	19
4	ผลการวิเคราะห์ของสสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย Dichloromethane ด้วย HPLC	21
5	ผลการวิเคราะห์ของสสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย 2-Butanol ด้วย HPLC	21
6	ผลการวิเคราะห์ของสสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย Ethyl Alcohol ด้วย HPLC	22
7	ผลการวิเคราะห์ของสสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย Methanol ด้วย HPLC	22
8	ผลการวิเคราะห์ของสสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย Water ด้วย HPLC	22
9	ลักษณะเนื้อสารและปริมาณสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์หลังการแยกด้วยกระบวนการวิเคราะห์ VLC	24
10	ชนิดของสารที่พบในตัวทำละลาย dichloromethane	26
11	โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย 2-butanol	27
12	ชนิดของสารที่พบในตัวทำละลาย methanol	28
13	ผลทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากเห็ดแครง	34
14	องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง(กรัม/ 100 กรัม)	37
15	น้ำหนักปลาเริ่มต้น น้ำหนักปลาสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตรารอดตายของปลาที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	38

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการสกัด	17
2	รูปแบบกลุ่มสารต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบจากเห็ดแครง ที่ปรากฏบน TLC เมื่อพ่นด้วยสารทดสอบชนิดต่าง ๆ	20
3	สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย Hexane	25
4	สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลายDichloromethane	25
5	สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย Ethyl acetate	25
6	สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย 2-Butanol	25
7	สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย Ethyl Alcohol	25
8	สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย Methanol	25
9	สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย Water	25
10	โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย dichloromethane	26
11	โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย 2-butanol	27
12	โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย Methanol	28
13	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายต่าง ๆ ความเข้มข้น (20,000พีพีเอ็ม) ในการต้าน เชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ	29
14	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย water ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ	29
15	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย methanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ	30
16	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย ethanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ	30
17	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย 2-butanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ	31
18	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย ethyl acetate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ	31
19	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย Dichloromethane ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ	32
20	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย hexane ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ	32
21	ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (IC 50) โดยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด	35

ภาพที่ **หน้า**

22	ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (IC 50) โดยวิธี Scavenging activity of ABTSของสารสกัดหยาบเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด	36
23	ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (IC 50) โดยวิธี Metal chelating activity ของสารสกัดหยาบเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด	37
24	ผลของสารสกัดเห็ดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นในปลาดุก	38
25	ผลของสารสกัดเห็ดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อระดับกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในปลาดุก	40
26	ผลของสารสกัดเห็ดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อระดับกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในปลาดุก	40
27	ผลของสารสกัดเห็ดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อระดับกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ในปลาดุก	41

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

เห็ดเป็นอาหารพื้นบ้านที่มีคุณค่าทางโภชนาการมีคาร์โบไฮเดรต โปรตีน เส้นใย เกลือแร่สูง สามารถผลิตสารกลุ่ม polysaccharide ที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ schizophyllan (Reyes *et al*., 2007) นอกจากนี้ยังมีสารทุติยภูมิที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ สารยับยั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน รวมถึงการยับยั้งเซลล์มะเร็ง(นฤมล, 2557; Mirfat*et al.,* 2010; Teoh& Mat Don, 2013; Mirfat*et al*., 2014; Naz, 2014)

เห็ดแครงหรือเห็ดตีนตุ๊กแก เป็นเห็ดที่ขึ้นอยู่ทั่วโลกและพบได้ตลอดปีในช่วงที่มีความชื้นพอ พบขึ้นอยู่กับวัสดุหลายชนิดเช่น ท่อนไม้ กิ่งไม้ ใบไม้ ใบหญ้า ในภาคใต้ของไทยพบมากบนท่อนไม้ยางพารา เห็ดแครงเป็นเห็ดที่สามารถเพาะได้ง่ายและรวดเร็ว ใช้วัสดุเพาะที่มีความหลากหลาย สามารถเก็บรักษาเห็ดสดได้ทนนาน โดยคงรูป คงรส และกลิ่น ทำแห้งเก็บได้นานไม่เน่าเสีย อีกทั้งมีราคาสูงมากเมื่อเทียบกับเห็ดนางรม นางฟ้า เห็ดฟางที่มีขายในท้องตลาด ราคาจำหน่ายดอกสด กิโลกรัมละ 80-150 บาท เห็ดแห้ง กิโลกรัมละ 400-500 บาท

ในการเพาะเห็ดแครงโดยใช้สูตรขี้เลื่อยไม้ยางพารา 100 กิโลกรัม รำละเอียด 50 กิโลกรัม ภูไมซ์2 กิโลกรัม ดีเกลือ 0.2 กิโลกรัม น้ำ 80 ลิตร จะได้ก้อนเชื้อเห็ดแครง จำนวน 385 ถุง (ถุงละ 600 กรัม) ซึ่งเมื่อคิดค่าใช้จ่ายแล้ว มีต้นทุนในการผลิตอยู่ที่ประมาณ 3.50 – 8.00 บาท และจะให้ผลผลิตต่อถุงเฉลี่ยประมาณ 100 กรัม (กาญจณี, 2556; ชัยสิทธิ์: ติดต่อด้วยวาจา)

จากการที่ต้นทุนในการผลิตเห็ดแครงที่ค่อนข้างต่ำ และผลผลิตที่ได้ในปริมาณสูง รวมถึงมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการป้องกัน รักษาโรคสัตว์น้ำ รวมถึงเป็นสารเสริมสุขภาพสัตว์น้ำที่มีราคาถูก เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ในการยาหรือสารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตอาหารปลอดภัย และเป็นการใช้ผลผลิตทางการเกษตรอื่น ๆ ให้เกิดประโยชน์ร่วมกัน อย่างไรก็ดีแม้ว่าการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทุติยภูมิในเห็ดแครงจะได้รับการศึกษามากมาย แต่การศึกษาในโรคสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาในการคุ้มโรคต่อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ รวมถึงการมีคุณสมบัติในการต้านทานความเครียดแบบออกซิเดชั่นยังมีอยู่น้อย คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. ศึกษาองค์ประกอบของกลุ่มสารทุติยภูมิจากเห็ดแครง ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือการเป็นสารต้านแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติการเป็นสารต้านมะเร็ง
4. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดแครงเหลือทิ้งต่อการต้านทานความเครียดแบบออกซิเดชั่น

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในการศึกษา จะเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ ในการสกัดสารทุติยภูมิจากเห็ดแครงที่ได้จากวัสดุเพาะทั่วไป สารสกัดที่ได้จะนำไปแยกกลุ่มสาร และทำการวิเคราะห์ตามกรรมวิธีทางเคมี เช่น partition, TLC, HPLC เป็นต้น

สารสกัดหยาบ พร้อมทั้งสารกึ่งบริสุทธิ์ที่เป็น major components ที่ได้จากขั้นตอนแรก จะนำไปทดสอบคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่าง ๆ เช่น การเป็นสารต้านแบคทีเรีย สารต้านเชื้อรา ต้านมะเร็ง ความสามารถในความคุ้มโรค และการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในปลาเศรษฐกิจ ซึ่งจะนำไปสู่ข้อสรุปในการใช้ประโยชน์จากสารทุติยภูมิของเห็ดแครงในกระบวนการผลิตสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีคุณภาพต่อไป

1.4 หลักการ ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

เนื่องจากเห็ดแครงเป็นเห็ดชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์มาก เป็นที่ต้องการของตลาด ทั้งในสภาพเห็ดสดและแห้ง และมีรายงานในต่างประเทศมากมายที่ระบุว่าเห็ดชนิดนี้มีสารทุติยภูมิ ที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากมาย แม้จะมีราคาจำหน่ายที่ค่อนข้างสูง (400 – 500 บาท / กิโลกรัมนำหนักแห้ง) หากแต่ต้นทุนการผลิตที่ค่อนข้างต่ำ (3.50 – 8 บาท / ถุง (600 กรัม)) เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการป้องกันรักษา ซึ่งนำไปสู่การเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในสัตว์น้ำ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ในกิจการทางด้านการเพาะ เลี้ยงสัตว์น้ำ การใช้สารทุติยภูมิในรูปสารสกัดหยาบหรือสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากเห็ดแครง นอกจากจะเป็นอีกทาง เลือกในการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เพื่อทดแทนสารเคมีสังเคราะห์แล้ว ยังเป็นการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ท้องถิ่นราคาถูกในการทดแทนการนำเข้าสารเคมี และลดต้นทุนการผลิตสัตว์น้ำเป็นอย่างดี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีขั้นพื้นฐานของสารสกัดหยาบ และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่เห็ดแครงสร้างขึ้น ภายใต้เงื่อนไขของชนิดของตัวทำละลายที่ต่างกัน
2. ทราบถึงประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิที่เห็ดแครงสร้างขึ้นต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ
3. ทราบถึงประสิทธิภาพในความคุ้มโรคติดเชื้อในปลาเศรษฐกิจ เพื่อเป็นทางเลือกในการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีต่าง ๆ เพื่อลดการนำเข้า และลดการปนเปื้อนในอาหารมนุษย์

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร

ประโยชน์จากเห็ดแครง

เนื่องจากเห็ดแครงเป็นเห็ดที่มีแร่ธาตุอาหารต่าง ๆ เป็นอาหารบำรุงร่างกายทำให้สุขภาพดี อีกทั้งมีสาร schizophyllan ที่มีสรรพคุณในด้านการรักษาโรคต่าง ๆ มากมาย เห็ดแครงสามารถปรุงอาหารได้หลายชนิด ในประเทศจีนมีการแนะนำให้คนไข้ที่เป็นโรคระดูขาว รับประทานเห็ดแครงที่ปรุงกับไข่เพื่อรักษาโรค และรับประทานร่วมกับใบชาโดยต้มเห็ดแครง 9 – 16 กรัม กับน้ำกินวันละประมาณ 3 ครั้ง ใช้เป็นอาหารบำรุงร่างกาย ในประเทศญี่ปุ่นใช้เป็นยาเนื่องจาก พบสารประกอบที่สำคัญคือว่า schizophyllan (1,3 B-glucan: polysaccharidae) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อไวรัส และยับยั้งเซลมะเร็งชนิด Sarcoma 180 และ Sarcoma 37 โดยทดลองใน หนูขาวยับยั้งได้ร้อยละ 70 – 100เห็ดแครงทีคุณค่าทางโภชนาการสูง จากการศึกษาพบว่าเห็ดแครง 100 กรัม ให้ โปรตีน 17.0 กรัม ไขมัน 0.5 กรัม แคลเซียม 90 มิลลิกรัม ธาตุเหล็ก 280 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 640 มิลลิกรัม (สถาบันการแพทย์แผนไทย,2542)เห็ดแครงมีอนุกรมวิธานดังนี้

ชื่อไทย : เห็ดแครง, เห็ดตีนตุ๊กแก เห็ดจิก เห็ดยาง

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Schizophyllum commune* Fr.

ชื่อสามัญอังกฤษ : Split Gill Fungus

Division : Basidiomycota

Class : Basidiomycetes

Order : Agaricales

Family : Schizophyllaceae

Genus : *Schizophyllum*

Species : *commune*

สารทุติยภูมิในเห็ดแครงและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทุติยภูมิจากเห็ดแครงมีอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยจากการศึกษาของ Joel and Bhimba (2013) พบว่าสารทุติยภูมิซึ่งเห็ดแครงที่แทรกอยู่ที่ใบของต้นแสมดำ (*Avicenia officialnalis*) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio cholerae*, *Micrococcusluteus* และ*Staphylococcus aureus*ทั้งนี้ตัวทำละลายที่เลือกใช้คือ ethyl acetate ขณะที่ Mirfat *et al.* (2014) พบว่า สารทุติยภูมิที่ได้จากเห็ดแครงจะให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบรวม 14 ชนิด โดยเมื่อเปรียบเทียบสารที่ได้จากตัวทำละลายอินทรีย์ที่ต่าง กัน พบว่าสารสกัดที่ได้จาก dichloromethane ได้ผลดีกว่า methanol, ethyl acetate และน้ำ

ในด้านการออกฤทธิ์การต้านเชื้อรา Teoh and Mat Don (2013) ได้ศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเห็ดแครง ในตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ, ethanol และ ethanol ต่อเชื้อราที่ย่อยเนื้อไม้ จำนวน 6 สกุล 10 ชนิด โดยหาค่า MIC พบว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ให้ผลในการยับยั้งเชื้อราได้เพียง 2 ชนิด ได้แก่ *Microporus affinis*และ *M. xanthopus*

นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สารกสกัด β-glucan จากยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) และเห็ดแครง*Schizophyllum commune* (ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป) เพื่อใช้ประโยชน์ในการเป็นส่วนผสมในอาหารเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโต และกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ เช่น ปลาและกุ้งทะเล ซึ่งพบว่าให้ผลดี (ชยพร และคณะ, Burgents *et al.,* 2004)

ทั้งนี้ งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากสารทุติยภูมิจากเห็ดแครงในสัตว์น้ำมีเพียงรายงานเฉพาะในส่วนของการเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเท่านั้น และยังเป็นไปในรูปแบบผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ภายใต้เครื่องหมายการค้า และยังขาดในส่วนของการศึกษาด้านความคุ้มโรคเมื่อได้รับเชื้อโรคต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกาย การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการเติมเต็มในส่วนของการศึกษาในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งถือเป็นอาชีพที่สร้างรายได้หลักของประเทศชาติเช่นกัน

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่างเห็ดแครง

นำเศษเหลือเห็ดแครงที่เหลือจากการตัดแต่งก่อนจำหน่าย ที่ได้จากสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ซึ่งทำการเพาะโดยใช้ก้อนเห็ดที่เตรียมทำจากการใช้สูตรขี้เลื่อยไม้ยางพารา 100 กิโลกรัม รำละเอียด 50 กิโลกรัม ภูไมซ์ 2 กิโลกรัม ดีเกลือ 0.2 กิโลกรัม น้ำ 80 ลิตร

นำเห็ดแครงที่รวบรวมได้ ล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส จนกว่าจะแห้ง นำมาหั่นให้ละเอียด เพื่อเตรียมการสกัดตามหัวข้อต่อไป

3.2 กระบวนการสกัดสารสกัดจากเห็ดแครง

3.2.1 การสกัดหยาบ

นำเห็ดแครงอบแห้งที่เตรียมไว้ มาแช่สกัดในตัวทำละลายจำนวน 6 ชนิด คือ น้ำ, 100% methanol, 95% ethyl alcohol, ethyl acetate, dichloromethane และ hexane ในอัตราส่วนน้ำหนักตัวอย่าง (กิโลกรัม) ต่อปริมาตรตัวทำละลาย (ลิตร) 1: 2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง นำกากมาแช่ซ้ำด้วยตัวทำลายชนิดเดิมอีกจนกว่าจะได้สารละลายสกัดใส เพื่อให้การสกัดเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารสกัด (ของเหลว) ที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotaryevaporator) เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบที่แห้งที่สุด แล้วคำนวณผลผลิตที่ได้จากการสกัดเห็ดแครงที่ได้จากสารสกัดแต่ละชนิด เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ใส่ภาชนะปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป (Natarajan *et al*., 2005)

3.3. การศึกษาองค์ประกอบขั้นพื้นฐานทางเคมีของสารสกัดหยาบ

3.3.1นำสารสกัดหยาบในแต่ละชั้น วิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทรกราฟีแบบเยื่อบาง Thin Layer Chromatography(TLC) ละลายสิ่งสกัดในแต่ละตัวทำละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมประมาณ 0.5 มิลลิกรัม: ตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตร ในขวดแก้วเล็ก (vial) ใช้หลอดคาปิลลารี (capillary) ดูดสารละลายสิ่งสกัดหยาบแต้มลงบนแผ่น TLC รอจนแห้ง นำไปแยกแถบสารในตัวทำละลายอินทรีย์ที่กำหนด (mobile phase) เมื่อเคลื่อนที่ตามที่กำหนดแล้วเอาออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ (mobile phase) ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้เครื่อง Ultraviolet (UV) (Lambomed, รุ่น UV-VIS Auto, UV-2602) ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร พ่นด้วย Anisaldehyde ลงบนแผ่น TLC แล้วนำไปให้ความร้อน สังเกตสีที่เกิดขึ้น เพื่อให้ทราบกลุ่มของสารที่มีอยู่ในสิ่งสกัดหยาบ

3.3.2การวิเคราะห์ด้วย High-performance liquid chromatography (HPLC) หลังจากสกัดสารด้วยวิธีการสกัดหยาบแล้วจากนั้นนำมาวิเคราะห์การแยกสารเคมีภายใต้ความดันของเหลวเป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และปริมาณ (quantitative analysis) โดยสามารถวิเคราะห์เพื่อบอกชนิดของสารและปริมาณของสารเบื้องต้นได้และใช้กับงานด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง เพื่อแสดงผลออกมาเป็น chromatogram

3.3.3 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ดแครง

วิธีที่นำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิธี DPPH radical Scavenging activity, วิธี Scavenging activity of ABTS radical และวิธี Metal chelating activity โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. วิธี DPPH radical Scavenging activity

การตรวจวิเคราะห์การยับยั้งอนุมูล DPPH$^{\bullet}$โดยดัดแปลงจากวิธีของ (Shimada *et al*., 1992) เป็นการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ก็คืออนุมูลอิสระ ดีพีพีเอช (DPPH$^{\bullet}$, diphenyl-picryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวมีสีม่วง ซึ่งสามารถทดสอบได้โดยการเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.0000, 0.0125, 0.0250, 0.0500 และ 0.1000 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที เมื่อ DPPH$^{\bullet}$ได้รับ Hydrogen atom จากสารสกัดเห็ดแครงที่ใช้ในการทดสอบ สารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้BHT เป็น standard control นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณ % การยับยั้ง (% inhibition)ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \left(\frac{(A_{517control} - A_{517sample}) \times 100}{A_{517control}} \right)$$

เมื่อ $A_{517control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายควบคุม (ตัวทำละลาย + DPPH)

$A_{517sample}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง (สารสกัด + DPPH)

2. วิธี Scavenging activity of ABTS radical

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS$^{\bullet+}$,2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ ดัดแปลงตามวิธีการของ Re *et al*.,(1999) โดยการผสมสารละลาย ABTS$^{\bullet+}$ความเข้มข้น 7มิลลิโมลาร์ปริมาตร 2 มิลลิลิตรกับสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร35.5 ไมโครลิตรในขวดสีชาตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จะได้ Stock ABTS radical cation ที่มีสีน้ำเงินอมเขียว ก่อนนำมาทำการทดลองจะต้องเจือจาง Stock ABTS radical cation ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.70±0.05 (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้งาน) เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.0000, 0.0125, 0.0250, 0.0500 และ 0.1000 ppm ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง ผสมกับสารละลายABTS$^{\bullet+}$ 0.9 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที เมื่ออนุมูลอิสระได้รับ Hydrogen atom จากสารสกัดเห็ดแครงที่ใช้ในการทดสอบ จะทำให้สี ABTS$^{+\bullet}$จางลง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม และใช้trolox เป็น standard control นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % การยับยั้ง ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \left(\frac{(A_{734control} - A_{734sample}) \times 100}{A_{734control}} \right)$$

เมื่อ $A_{734control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม (ABTS$^{+\bullet}$ที่เจือจางแล้ว)

$A_{734sample}$= ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง (สารสกัด + ABTS$^{+\bullet}$)

3.วิธี Metal chelating activity

เป็นการวิเคราะห์กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยการทดสอบความสามารถในการแย่งจับโลหะไอออน ตามวิธีของ Dinis *et al*., (1994) โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดที่เข้มข้นต่างๆปริมาตร 0.80 มิลลิลิตรในหลอดทดลองและใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นชุดควบคุม เติมสารละลาย เฟอร์รัสคลอไรด์ ($FeCl_2$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร และเติมเฟอร์โรซีน(Ferrozine) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตรเขย่าอย่างรวดเร็ว บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อเติมสาร Ferrozine

ลงไป จะไปจับกับ Fe^{2+}แล้วจะให้สีม่วง และถ้าสารสกัดสาหร่ายมีความสามารถในการแย่งจับโลหะ Fe^{2+}จะทำให้สีม่วงจางลง สามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร โดยใช้EDTA เป็น standard controlนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \left(\frac{(A_{562control} - A_{562sample})}{A_{562control}} \right) \times 100$$

เมื่อ $A_{562control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากไอออน + $FeCl_2$+ Ferrozine)

$A_{562sample}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง (สารสกัด + $FeCl_2$+ Ferrozine)

3.4การวิเคราะห์การออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

โดยส่งตัวอย่างสารสกัดไปวิเคราะห์ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติเพื่อทดการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ประกอบด้วยเซลล์มะเร็ง 5 ชนิดคือ

1.HepG2 : Cytotoxicity against human hepatocarcinoma ATCC HB-8065(มะเร็งตับ)

2. Caco2 : Cytotoxicity against human caucasian colon adenocarcinoma ATCC HTB-37(มะเร็งลำไส้ใหญ่)

3. KB-Oral cavity cancer : Anti-Cancer(มะเร็งช่องปาก)

4.MCF7-breast cancer : Anti-Cancer (มะเร็งเต้านม)

5. NCI-H187-Small cell lung cancer:Anti-Cancer (มะเร็งปอด)

และเซลล์ไข้หวัดนก 1 ชนิด คือเซลล์ NA: Neuraminidase inhibition assayโดยเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติคือ African green monkey kidney : Cytotoxicity against Vero cells (ไตลิง)

3.5. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเห็ดแครงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เพื่อหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) โดยใช้วิธี broth dilution method และ disc diffusion method

3.5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

เชื้อ *Aeromonas hydrophilaและ streptococcus agalactiae* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับการเอื้อเฟื้อจากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำกิจการ ศุภมาตย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ มาบ่มไว้ในอุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy agar (TSA) บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วมาทำสารละลายด้วยน้ำเกลือ 0.85% ในส่วนของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* ให้มีมีปริมาณเซลล์แบคทีเรีย 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรโดยการวัดค่า Optical density (OD) เท่ากับ 0.15 ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ก่อนนำไปทดสอบด้วยสารสกัดหยาบ

3.5.2การเตรียมสารละลายสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 2.1 มาชั่งในปริมาณ 0.1 กรัม ละลายในตัวทำละลาย (ชนิดนั้นๆ) 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงจนเนื้อสารละลาย เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธีวิธี broth dilution methodและ วิธี disc diffusion method เพื่อคัดเลือกว่าสารสกัดชนิดไหนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาเศรษฐกิจ โดยเปรียบเทียบกับการใช้สารปฏิชีวนะ ชนิด Oxytetracyclin และ Norfloxacin

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเห็ดแครงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เพื่อหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) โดยใช้วิธี broth dilution method และ disc diffusion method

I. Broth dilution method สำหรับการศึกษาแบคทีเรียก่อโรค

1. การเตรียม stock

เตรียมสารสกัดหยาบ ให้ได้ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ ภายใต้ตัวละลายที่เหมาะสมที่ให้ค่าสารทุติยภูมิสูงสุด (ตามผลการวิเคราะห์ทางเคมี: HPLC)

2. การทดสอบ

นำสารละลายเชื้อแต่ละชนิดที่เตรียมไว้มาใส่ในอาหารเหลว Trypticase soy broth (TSB) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นใส่สารสกัดหยาบตามปริมาณที่กำหนดจากความเข้มข้นต่ำไปสูง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเชื้อ 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ประเมินค่าความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ต่ำที่สุดที่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ (ESCMID, 2003)

II. Disc diffusion method สำหรับการศึกษาแบคทีเรีย

1. การเตรียม stock

นำสารกัดหยาบที่เตรียมไว้เตรียมให้ได้ความเข้มข้นจากน้อยไปมาก ประมาณ 6-7 ความเข้มข้นโดยวิธี two-fold dilution method

2. การเตรียม sensitivity disc

นำสารสกัดที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 25 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษทดสอบ ที่ปลอดเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วอบที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จะได้ sensitivity disc ที่พร้อมจะใช้งาน

3. การดำเนินการทดลอง

นำสารละลายเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อรา ที่เตรียมไว้จากขั้นตอนที่ 3.1 -3.2 มาเกลี่ย (swap) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้จนหน้าอาหารแห้ง วาง sensitivity disc ลงบนอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (Islam *et al*., 2008)

1. เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ที่ได้จากแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อประเมินค่า MIC

3.6การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการออกฤทธิ์ต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในปลา

3.6.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

3.6.1.1 คัดเลือกชนิดของสารสกัดหยาบจากเห็ดแครงที่ได้ผลผลิต (% yield) ของสารสกัดในประมาณสูง ประกอบกับชนิดของสารสกัดจากเห็ดแครงที่ให้มีคุณสมบัติการต่อต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 ชนิด ในระดับสูง 4 อันดับแรก เพื่อนำมาใช้ในการผสมในอาหารเพื่อทดสอบในตัวปลาต่อไป โดยคัดเลือกสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยสารสกัด 4 ชนิดคือ น้ำ เมทานอล 2-บิวทานอล และไดคลอโรมีเทน

3.6.1.2 การเตรียมสารสกัดหยาบ

ทำการสกัดสารสกัดหยาบตามวิธีในข้อ 2.1 และทำแห้งโดยใช้ Rotary evaporation ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเก็บสารสกัดหยาบไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปใช้ผสมในอาหารต่อไป

3.6.2 การเตรียมอาหารทดลอง

3.6.2.1การวิเคราะห์องประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตอาหารทดลอง และเศษเหลือเห็ดแครงประกอบด้วยคือ โปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (1990)เพื่อใช้ในการคำนวณสูตรอาหาร

3.6.2.2การเตรียมอาหารทดลอง

สูตรอาหารทดลอง

อาหารทดลองมี 7 สูตร กำหนดให้อาหารมีปริมาณโปรตีนและไขมันเท่ากันที่ระดับ 35% และ 6% ตามลำดับ ประกอบด้วย

อาหารสูตรที่ 1 อาหารสูตรควบคุม (อาหารที่ไม่มีการใช้สารสกัดจากเห็ดแครง) (Control)

อาหารสูตรที่ 2 อาหารผสมเศษเหลือจากเห็ดแครงป่น ระดับ 1% (1% NS)

อาหารสูตรที่ 3อาหารสารสกัดจากเห็ดแครงด้วยน้ำ ระดับ 0.5%(0.5% WS)

อาหารสูตรที่ 4 อาหารสารสกัดจากเห็ดแครงด้วยเมทานอล ระดับ 0.5%(0.5% MS)

อาหารสูตรที่ 5 อาหารสารสกัดจากเห็ดแครงด้วย2-บิวทานอล ระดับ 0.5% (0.5% BS)

อาหารสูตรที่ 6 อาหารสารสกัดจากเห็ดแครงด้วยไดคลอโรมีเทน ระดับ 0.5% (0.5% DS)

อาหารสูตรที่ 7 อาหารทางการค้าที่มีระดับโปรตีนใกล้เคียงกับอาหารสูตรควบคุม(Ref)

โดยมีองค์ประกอบของอาหารทดลองแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของอาหารทดลองสำหรับปลาดุก (กรัม/ 100 กรัม อาหาร)

วัตถุดิบ	สูตรควบคุม	1% NS	0.5% WS	0.5% MS	0.5% BS	0.5% DS
ปลาป่น	15	15	15	15	15	15
กากถั่วเหลือง	50	50	50	50	50	50
เศษเหลือเห็ดเห็ดแครง	0	1	0	0	0	0
สารสกัดจากเห็ดแครงแต่ละชนิด	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5
รำ	10	10	10	10	10	10

แป้งข้าวจ้าว	12	12	12	12	12	12
แกลบ	7.45	6.45	6.95	6.95	6.95	6.95
น้ำมันพืช	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
วิตามิน/แร่ธาตุผสม[1]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
โคลีนคลอไรด์	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
เกลือ	1	1	1	1	1	1
โมโนแคลเซียมฟอสเฟต[2]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
รวม	100	100	100	100	100	100

หมายเหตุ [1] ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไทยยูเนียนฟีดมิลล์ จำกัด (มหาชน)

[2] ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไทยลักซ์เอนเตอร์ไพรส์ จำกัด (มหาชน)

3.6.3การผลิตอาหารทดลอง

1.เตรียมวัตถุดิบที่มีลักษณะหยาบคือ กากถั่วเหลือง แกลบ และรำ มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องโม่และร่อนผ่านตะแกรงตาถี่

2. ชั่งวัตถุดิบอาหารแต่ละชนิดตามสูตรอาหารแต่ละสูตร ใส่ในถุงพลาสติก โดยผลิตอาหารสูตรละ 3 กิโลกรัม

3. ผสมส่วนประกอบวัตถุดิบที่มีลักษณะแห้งในกะละมัง โดยผสมด้วยเครื่องผสมแบบแนวนอนให้เข้ากัน นาน 15 นาที ผสมสารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในแป้งข้าวจ้าว เพื่อให้สารสกัดกระจายให้ทั่วอาหาร แล้วผสมในลงในถังผสม จากนั้นเติมน้ำมันพืชแล้วผสมต่อให้ส่วนผสมเข้ากันดีประมาณ 10 นาที แล้วจึงเติมน้ำสะอาดประมาณ 30-35 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการผสมต่อจนเป็นเนื้อเดียวกัน ประมาณ 10นาที จึงนำไปอัดเม็ดด้วยเครื่องอัดเม็ดอาหารแบบจม

4. นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมกันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแว่นที่ผ่านขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน

5. อบอาหารที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมงความชื้นเม็ดอาหารไม่เกิน 10%

6. เก็บอาหารทดลองที่ผ่านกระบวนการอบแล้วร่อนเพื่อกำจัดเศษอาหารผงออกไป บรรจุถุงพลาสติก เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. นำอาหารที่เตรียมไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (1990)

3.6.4การเตรียมปลาทดลอง และระบบการเลี้ยง

นำลูกพันธุ์ปลาดุกจากฟาร์มปลาเอกชน ขนาด 3 นิ้วมาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ตัน จำนวน 1 ถัง ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือ ช่วงเช้า เวลา 08.00 น. และช่วงบ่าย เวลา 16.00 น.อนุบาลจนได้น้ำหนักประมาณ 15 กรัม/ตัว จากนั้น จึงคัดปลาขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 15ตัว/ตู้ ขึ้นตู้ทดลองขนาดความจุน้ำ 100ลิตรเติมน้ำปริมาตร 80 ลิตร ให้ออกซิเจนตลอดเวลา เพื่อให้ปลาสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม เป็นระยะเวลา 5 วัน หลังจากนั้นทำการคัดขนาดปลาและชั่งปลาเริ่มต้นโดยคัดปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกัน 12ตัว/ตู้ ชั่งน้ำหนักปลารายตัว โดยการสลบด้วยน้ำกานพลูทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ บันทึกข้อมูลน้ำหนักเริ่มต้น และหาน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นของปลานิลดำที่ทดลอง ในระหว่างการทดลองให้อาหารโดยให้กินจนอิ่ม และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันในสัดส่วน 70% ของน้ำในตู้ ในช่วงบ่ายก่อนการให้อาหารทำการทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

3.6.5การเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต

1. ตรวจสอบพฤติกรรมลักษณะอาการของปลา ในช่วงระหว่างการทดลองสังเกตพฤติกรรมการกินอาหารของปลา และลักษณะผิดปกติภายนอกที่อาจเกิดขึ้น เช่น การเป็นแผลจากการกัดกันเอง การติดเชื้อ เป็นต้น

2. การเจริญเติบโตของปลานิล หลังจากที่ปลานิลได้รับอาหารจากการทดลองของแต่ละสูตรที่แตกต่างกัน ทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์โดยคำนวณน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น บันทึกจำนวนปลาที่เหลือ เพื่อคำนวณน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตาย บันทึกปริมาณการกินอาหารของปลาเพื่อคำนวณหาอัตราการแลกเนื้อ และประสิทธิภาพการกินใช้โปรตีน ได้โดยคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือ} \times 100}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้น}}$$

$$\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่ม} = \text{น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น}$$

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)} = \frac{(\ln \text{น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย} - \ln \text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น}) \times 100}{\text{จำนวนวันทดลอง}}$$

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ= น้ำหนักอาหารที่กินทั้งหมด (กรัม/ตัว)
(FCR) น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)

3.7 การเก็บตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อการป้องกันภาวะออกซิเดชัน

3.7.1 การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ตู้ละ 2 ตัว (ทรีทเมนต์ละ 6 ตัว) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อการป้องการภาวะออกซิเดชั่นในตัวปลา โดยเจาะเลือดปลา และตั้งตัวอย่างเลือดให้เม็ดเลือดตกตะกอน แล้วนำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยง แล้วจึงนำซีรัม มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเตส (alkaline / acid phosphatase) และกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ และผ่าตัดตับปลาใส่ใน microtube และแช่ในไนโตรเจนเหลว เพื่อวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ และกิจกรรมเอนไซม์คะตาเลส

3.7.2 วิธีการวิเคราะห์

1. การวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์เพื่อหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่น (Buege and Aust, 1978) โดยสลบตัวอย่างปลาด้วยน้ำมันกานพลู และผ่าตัดนำเนื้อเยื่อตับของปลาประมาณ 40 มก. ใส่ในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 และบดด้วยแท่งบด (ทำการบดในสภาวะที่เย็นตลอดเวลา)ทำปฏิกิริยากับสารละลาย TBA (0.375 % TBA ที่ละลายใน 15% trichloroacetic acid and 0.25 N HCl) นำตัวอย่างไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีทำตัวอย่างให้เย็นโดยผ่านน้ำไหล และนำตัวอย่างหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,600 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ TBARS (thiobarbituric reactive substances) ในรูปของ malonaldehyde

2. การวัดกิจกรรมเอนไซม์ Alkaline phosphatase

นำซีรัมของปลาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Alkaline phosphatase ตามวิธีการของ Besseyet *al*. (1946) โดยใช้ 7 mM p-nitro-phenyl-phosphate เป็นซับสเตรท โดยนำตัวอย่างซีรัมผสมกับบัฟเฟอร์ (ที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม) ปริมาตร 250 uL แล้วทำปฏิกิริยากับซับเสตรทปริมาตร 50 uL ใน 96 well plate วัดปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้วิธีวัดแบบ Kinetic ที่ความยาวคลื่น 407 นาโนเมตร ทุก 20 วินาที นาน 5 นาที นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ p-nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างซีรัมโดยวิธี Lowry's method (Lowry *et al*., 1951)และรายงานกิจกรรมเอนไซม์ในหน่วยกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (Unit/mg protein) โดย 1 Unit ของเอนไซม์คือปริมาณผลผลิต (p-nitrophenol) ที่ได้ต่อนาที

3. การวัดกิจกรรมเอนไซม์คะตะเลส (Catalase activity)(Trasviña-Arenas et al. 2013) สกัดตัวอย่างตับปลาด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์pH 7.5บดด้วยแท่งบดให้ละเอียดภายใต้สภาวะเย็นและหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C วัดกิจกรรมเอนไซม์โดยใช้96 well-plateโดยเติม potassium phosphate buffer (0.1M, pH 7.0) 100 µLและเติม Abs. methanol 30 µL แล้วเติมสาร Formaldehydeมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากนั้นเติมตัวอย่างสารสกัดหลุมละ 20 µL และเติม 40mM hydrogen peroxide 20 µL (เตรียมแล้วใช้ทันที) หลังจากนั้นซีลเพลสด้วย plastic film นำไป shake บน orbital shaker 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาเติม 10M KOH 30 µL จากนั้นเติม 25mM Purpald®30 µL seal well plate ด้วย plastic film นำไป shake บน orbital shaker 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องเมื่อครบเวลาเติม 62.5mM KIO_3 10 µL และ seal well plate ด้วย plastic film นำไป shake บน orbital shaker 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่า OD ที่ 540 nm)วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างสารสกัดจากตับโดยวิธี Lowry's method (Lowry *et al*., 1951)และรายงานกิจกรรมเอนไซม์ในหน่วยกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (Unit/mg protein) โดย 1 Unit ของเอนไซม์คือปริมาณผลผลิต formaldehyde 1 nmol ที่ได้ต่อนาที

4. การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme activity)

วัดกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์จากพลาสมาตามวิธีการของ (Demers and Bayne, 1997 อ้างโดย Suwannasang *et al.,* 2014) โดยนำพลาสมา 25 uL เติมเชื้อ Micrococcus lysodeikticus ปริมาตร 175 mL นำสารละลายวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับ Hen egg white lysozyme เป็นสารละลายมาตรฐาน วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างโดยวิธี Lowry's method (Lowry *et al*., 1951) และรายงานกิจกรรมเอนไซม์ในหน่วยกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (Unit/mg protein)

3.8การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์การกระจายของข้อมูลโดยใช้ Shapiro-Wilk test และความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Levene`s test แล้ววิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Vanance: ANOVA)และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4 ผลการศึกษา

1. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และสารทุติยภูมิในเห็ดแครง

1.1 การสกัดเห็ดแครง

1.1.1 การเลือกตัวทำละลาย

เลือกตัวทำละลายจำนวน 7 ชนิด โดยคำนึงถึง Relative polarity ของตัวทำละลาย โดยเริ่มจาก 1.0 ถึง 0.009 ดังตารางที่ 1

ตารางที่1 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเห็ดแครง

Solvent	formula	Relativepolarity
Hexane	C_6H_{14}	0.009
Ethyl acetate	$C_4H_8O_2$	0.028
Dichloromethane (Methylene chloride)	CH_2Cl_2	0.309
2-butanol	$C_4H_{10}O$	0.506
Ethanol	C_2H_6O	0.654
Methanol	CH_4O	0.762
Water	H_2O	1.000

1.1.2 กระบวนการสกัด

เตรียมวัตถุดิบ คือเห็ดแครงอบแห้งปริมาณ 250 กรัม ชะด้วยตัวทำละลาย แต่ละชนิด เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบในสภาพของเหลว จากนั้นนำไประเหยแห้งเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบที่แห้งที่สุด (ภาพที่ 1)

ผลการสกัดเห็นแครง น้ำหนัก 250 กรัม เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ โดยใช้ตัวทำละลาย 7 ชนิด ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethyl acetate, 2-butanol, ethanol, methanol ปริมาตร 2,000 มล. และน้ำ (ปริมาตร 3,000 มล.) หลังจากนำไประเหยแห้ง ระเหยสุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบ รูปแบบต่าง ๆ และน้ำหนัก ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 1

ก้อนเห็ดแครง

เห็ดแครงสด

เห็ดแครงที่ล้างทำความสะอาดแล้ว

เกลี่ยให้ทั่วถาด

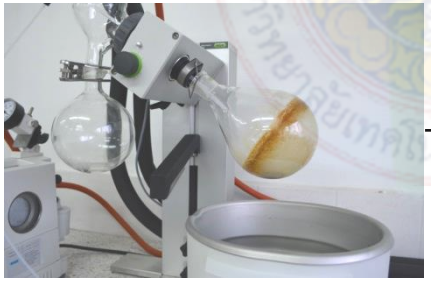
อบในตู้อบลมร้อน

แช่สกัดในตัวทำละลาย

กรองโดยใช้ผ้าขาวบาง

สารสกัด (เหลว) ที่ได้

เตรียมการทำระเหยแห้ง



สารสกัด (เหลว) ระเหยแห้ง

ผลผลิตที่ได้

ภาพที่ 1 กระบวนการสกัด

ตารางที่2 ลักษณะเนื้อสารและปริมาณสารสกัดหยาบของเห็นแครง ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

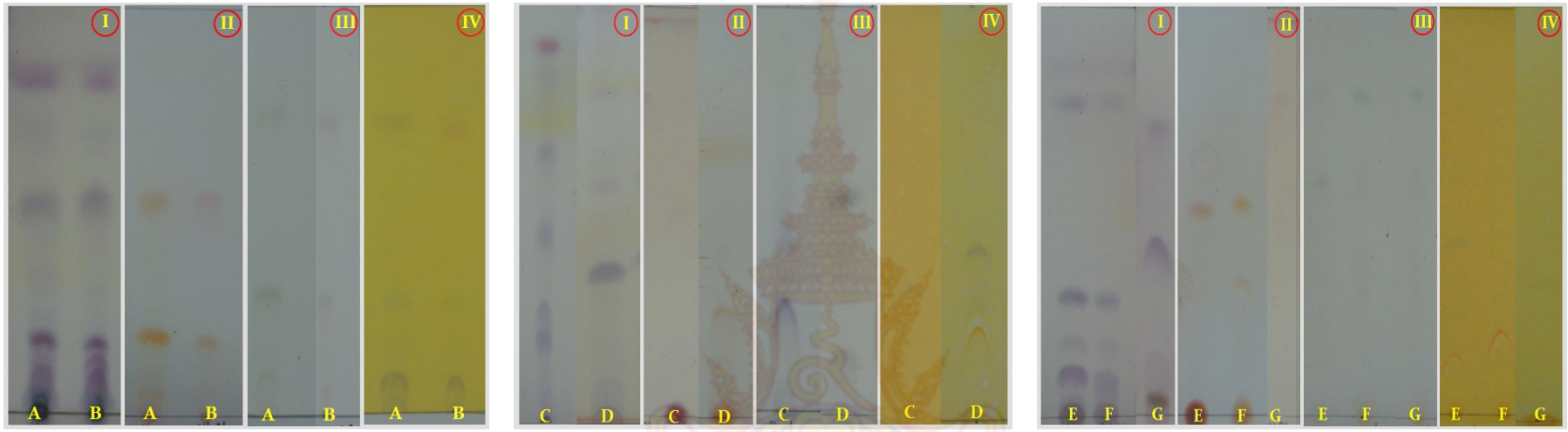
ตัวทำละลาย	ปริมาตร (มล.)	สารสกัด (เหลว) (มล.)	สารสกัดจากการระเหยแห้ง (ก.)	ลักษณะ
Hexane	2,000	1,670	1.102	หนืด สีน้ำตาลเข้ม
Dichloromethane	2,000	1,694	2.500	ครีม ก้อนเหนียว
Ethyl acetate	2,000	1,580	1.103	แดง ผง
2-butanol	2,000	1,721	3.410	น้ำตาล ก้อนเหนียว
Ethyl Alcohol	2,000	1,710	2.640	น้ำตาลอมดำ ก้อนเหนียว
Methanol	2,000	1,610	7.966	น้ำตาลอมดำ ก้อนเหนียว
Water	3,000	2,360	44.963	ดำ ก้อนเหนียว

1.2 การวิเคราะห์สารสกัดหยาบโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin-layer Chromatography : TLC)

ผลจากการศึกษาพ่นด้วยสารเคมีทดสอบ 4 ชนิด คือanisaldehyde,vanilin, ninhydrin และ Dragendorff'sพบว่าสารสกัดหยาบมีการตอบสนองเฉพาะสารเคมีทดสอบดังกล่าวได้ดี โดยสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย Hexane มีการตอบสนองanisaldehyde เกิดเป็นสีม่วงอมชมพูเช่นเดียวกับ dichloromethane, Ethyl acetate, 2-butanol, Ethyl Alcohol, methanol และ water แสดงว่าสารดังกล่าวเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ และตอบสนองต่อสารทดสอบ vanillin เกิดเป็นสีแดงอมชมพู เช่นเดียวกับตัวทำละลาย dichloromethane, 2-butanol, Ethyl Alcohol และ methanol แสดงว่าสารดังกล่าวเป็นสารกลุ่มของแทนนิน ตอบสนองต่อสารทดสอบninhydrin เกิดเป็นสีน้ำเงิน เช่นเดียวกับตัวทำละลายอีก 6 ชนิด แสดงว่าสารดังกล่าวเป็นสารกลุ่มกรดอะมิโนและโปรตีน นอกจากนี้ยังตอบสนองต่อสารทดสอบDragendorff's เช่นเดียวกับตัวทำละลาย Dichloromethane, 2-butanol, Ethyl Alcohol และ methanol ที่เกิดเป็นสีส้ม แสดงว่าสารดังกล่าวเป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์(ตารางที่ 3, ภาพที่ 2)

ตารางที่ 3 การตอบสนองของสารสกัดหยาบจากเห็ดแครงต่อสารเคมีทดสอบในการศึกษา TLC

สารทดสอบ	**สารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย**						
	Hexane	**Dichloromethane**	**Ethyl acetate**	**2-butanol**	**Ethyl Alcohol**	**Methanol**	**Water**
Anisaldehyde	(สีม่วงอมชมพู) กลุ่มสเตียรอยด์	(สีม่วงอมชมพู) กลุ่มสเตียรอยด์	(สีม่วงอมชมพู) กลุ่มสเตียรอยด์	(สีม่วงอมชมพู) กลุ่มสเตียรอยด์	(สีม่วงอมชมพู) กลุ่มสเตียรอยด์	(สีม่วงอมชมพู) กลุ่มสเตียรอยด์	(สีม่วงอมชมพู) กลุ่มสเตียรอยด์
Vanilin	(สีแดงอมชมพู) กลุ่มของแทนนิน	(สีแดงอมชมพู) กลุ่มของแทนนิน	-	(สีแดงอมชมพู) กลุ่มของแทนนิน	(สีแดงอมชมพู) กลุ่มของแทนนิน	(สีแดงอมชมพู) กลุ่มของแทนนิน	-
Ninhydrin	(สีน้ำเงิน) กรดอะมิโนและโปรตีน	(สีน้ำเงิน) กรดอะมิโนและโปรตีน	(สีน้ำเงิน) กรดอะมิโนและโปรตีน	(สีน้ำเงิน) กรดอะมิโนและโปรตีน	(สีน้ำเงิน) กรดอะมิโนและโปรตีน	(สีน้ำเงิน) กรดอะมิโนและโปรตีน	(สีน้ำเงิน) กรดอะมิโนและโปรตีน
Dragendorff's	(สีส้ม) แอลคาลอยด์	(สีส้ม) แอลคาลอยด์	-	(สีส้ม) แอลคาลอยด์	(สีส้ม) แอลคาลอยด์	(สีส้ม) แอลคาลอยด์	-



ภาพที่ 2 รูปแบบกลุ่มสารต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบจากเห็ดแครง ที่ปรากฏบน TLC เมื่อพ่นด้วยสารทดสอบชนิดต่างๆ

: A = Hexane, B = Dichloromethane**,** C = Ethyl acetate, D = 2-butanol, E = Ethyl Alcohol, F = Methanol, G = Water เมื่อI = anisaldehyde,

II = Vanilin, III = Ninhydrin, IV = Dragendorff's

1.3 ผลการการวิเคราะห์ สารสกัดหยาบจากเห็ดแครงด้วยวิธีโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography: HPLC)

ในการวิเคราะห์สารสกัดหยาบในตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด สามารถวิเคราะห์ได้ 5 ชนิดได้แก่ Dichloromethane, 2-butanol, Ethyl Alcohol, Methanol และ Water ในส่วนของ Hexane และ Ethyl acetate ไม่ละลาย MethanolHPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

จากผลการวิเคราะห์ พบว่า Dichloromethane ประกอบด้วยองค์ประกอบสารเด่น 5 ชนิด ที่ค่า Retention time 2.350, 6.070, 6.700, 9.903 และ9.287 นาที ที่ความยาวคลื่น 285 และ 234 nm (ตารางที่ 4)ในตัวทำละลาย 2-butanol พบองค์ประกอบสารเด่น 2 ชนิด ที่ค่า Retention time 2.583 และ 2.680 นาที ที่ความยาวคลื่น 285 nm (ตารางที่ 5) Ethyl Alcohol พบองค์ประกอบสารเด่น 5 ชนิด ที่ค่า Retention time 2.217, 2.503, 5.917, 6.300 และ9.140 นาที ที่ความยาวคลื่น 234 nm (ตารางที่ 6)Methanol พบองค์ประกอบสารเด่น 7 ชนิด ที่ค่า Retention time 2.147, 2.267, 2.403, 2.657, 6.370, 11.803 และ29.933 นาที ที่ความยาวคลื่น 285 nm (ตารางที่ 7)ละลาย Water พบองค์ประกอบสารเด่น 2 ชนิด ที่ค่า Retention time 2.147 และ 2.267 นาที ที่ความยาวคลื่น 285 nm (ตารางที่ 8)

ตารางที่4 ผลการวิเคราะห์ของสสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย Dichloromethane ด้วย HPLC

สารที่พบ	Retention time (นาที)	Detection (WL)
1	2.350	285
2	6.070	285
3	6.700	258
4	9.903	285
5	9.287	234

ตารางที่ 5ผลการวิเคราะห์ของสสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย 2-Butanol ด้วย HPLC

สารที่พบ	Retention time (นาที)	Detection (WL)
1	2.583	285
2	2.680	285

ตารางที่ 6ผลการวิเคราะห์ของสสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย Ethyl Alcohol ด้วย HPLC

สารที่พบ	Retention time (นาที)	Detection (WL)
1	2.217	234
2	2.503	234
3	5.917	234
4	6.300	234
5	9.140	234

ตารางที่7 ผลการวิเคราะห์ของสสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย Methanol ด้วย HPLC

สารที่พบ	Retention time (นาที)	Detection (WL)
1	2.147	285
2	2.267	285
3	2.403	285
4	2.657	285
5	6.370	285
6	11.803	285
7	29.933	285

ตารางที่8 ผลการวิเคราะห์ของสสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย Water ด้วย HPLC

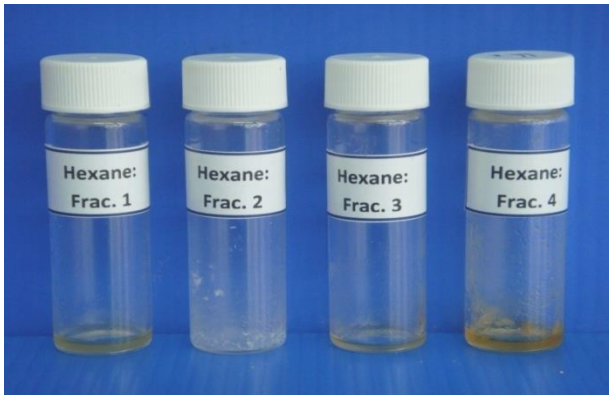
สารที่พบ	Retention time (นาที)	Detection (WL)
1	2.147	285
2	2.267	285

1.4 ผลการแยกสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยกระบวนการวิเคราะห์ Vacuum liquid column chromatography (VLC) เฟสเคลื่อนที่สำหรับการแยกด้วย VLC

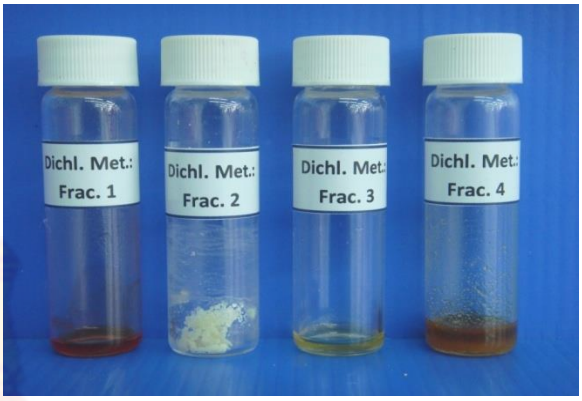
ในการนำสารสกัดหยาบในตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด คือ Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, 2-butanol, Ethyl Alcohol, Methanol และ Water ในส่วนของ Hexane สามารถแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ได้ 4 Fraction โดยที่ Fraction4 มีปริมาณสารมากสุด 1.115gมีลักษณะก้อนเหนียวสีส้มรองลงคือ Fractionที่ 1มีปริมาณสาร 0.959g มีลักษณะไข สีเหลืองและ Fractionที่ 3 มีปริมาณสารรองลงมาคือ 0.154 g มีลักษณะก้อนเหนียวสีเหลือง (ตารางที่ 9, ภาพที่ 3) ในส่วนของ Dichloromethane สามารถแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ได้ 4 Fraction โดยที่ Fraction4 มีปริมาณสารมากสุด คือ 1.100gมีลักษณะก้อนเหนียวสีส้มรองลงคือ Fractionที่ 2 มีปริมาณสาร 0.665g มีลักษณะผงสีขาว และ Fractionที่ 1 มีปริมาณสารรองลงมาคือ 0.015 g มีลักษณะไขสีแดง (ตารางที่ 9, ภาพที่ 4) Ethyl acetate สามารถแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ได้ 6 Fraction โดยที่ Fraction3 มีปริมาณสารมากสุด คือ 0.465gมีลักษณะก้อนเหนียวสีแดงรองลงคือ Fractionที่ 2 มีปริมาณสาร 0.325g มีลักษณะผงสีขาว และตามด้าย Fractionที่ 5 มีปริมาณสาร 0.313 g มีลักษณะก้อนเหนียวสีส้ม (ตารางที่ 9, ภาพที่ 5) 2-butanolสามารถแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ได้ 6 Fraction โดยที่ Fraction5 มีปริมาณสารมากสุด คือ 0.685gมีลักษณะไขเหลวสีแดงรองลงคือ Fractionที่ 2 มีปริมาณสาร 0.395g มีลักษณะผงสีขาว และตามด้าย Fractionที่ 3 มีปริมาณสาร 0.375 g มีลักษณะก้อนเหนียวสีครีม(ตารางที่ 9, ภาพที่ 6)Ethyl Alcohol สามารถแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ได้ 6 Fraction โดยที่ Fraction5 มีปริมาณสารมากสุด คือ 1.253gมีลักษณะก้อนเหนียวสีน้ำตาลรองลงคือ Fractionที่ 2 มีปริมาณสาร 1.171g มีลักษณะผงสีขาว และตามด้าย Fractionที่ 6 มีปริมาณสาร 0.999 g มีลักษณะก้อนเหนียวสีดำ (ตารางที่ 9, ภาพที่ 7)Methanol สามารถแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ได้ 4 Fraction โดยที่ Fraction2 มีปริมาณสารมากสุด คือ 1.048 gมีลักษณะก้อนเหนียวสีน้ำตาลรองลงคือ Fractionที่ 4 มีปริมาณสาร 0.878g มีลักษณะก้อนเหนียวสีดำ และตามด้าย Fractionที่ 3 มีปริมาณสาร 0.391 g มีลักษณะไขสีน้ำตาลและในส่วนของ (ตารางที่ 9, ภาพที่ 8) Water สามารถแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ได้ 4 Fraction เช่นเดียวกัน โดยที่ Fraction2 มีปริมาณสารมากสุด คือ 0.899 gมีลักษณะก้อนเหนียวสีน้ำตาลรองลงคือ Fractionที่ 3 มีปริมาณสาร 0.391g มีลักษณะก้อนเหนียวสีดำ และตามด้าย Fractionที่ 4 มีปริมาณสาร 0.306 g มีลักษณะก้อนเหนียวสีส้ม (ตารางที่ 9, ภาพที่ 9)

ตารางที่ 9ลักษณะเนื้อสารและปริมาณสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์หลังการแยกด้วยกระบวนการวิเคราะห์ VLC

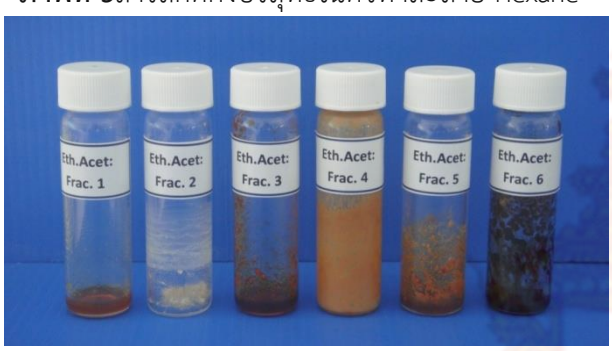
ตัวทำละลาย	ลักษณะเนื้อสารและน้ำหนัก (g)					
	Fraction ที่					
	1	2	3	4	5	6
Hexane	ไข สีเหลือง (0.959)	ผง สีขาว (0.024)	ก้อนเหนียวสีเหลือง(0.154)	ก้อนเหนียวสีส้ม (1.115)	-	-
Dichloromethane	ไขสีแดง (0.015)	ผงสีขาว (0.665)	ไขสีเหลือง (0.009)	ก้อนเหนียวสีส้ม (1.100)	-	-
Ethyl acetate	ไขเหลวสีส้ม (0.085)	ผงสีขาว (0.325)	ก้อนเหนียวสีแดง (0.465)	ก้อนเหนียวสีครีม (0.205)	ก้อนเหนียวสีส้ม (0.313)	ก้อนเหนียวสีดำ (0.215)
2-butanol	ไขเหลวสีส้ม (0.135)	ผงสีขาว (0.395)	ก้อนเหนียวสีครีม (0.375)	ก้อนเหนียวสีส้ม (0.345)	ไข เหลวสีแดง (0.685)	ก้อนเหนียวสีดำ (0.295)
Ethyl Alcohol	ไข สีแดง (0.135)	ผงสีขาว (1.171)	ไข สีเหลือง (0.160)	ไข สีส้ม (0.383)	ก้อนเหนียวสีน้ำตาล (1.253)	ก้อนเหนียวสีดำ (0.999)
Methanol	ไข สีเหลือง (0.186)	ก้อนเหนียวสีน้ำตาล (1.048)	ไขสีน้ำตาล (0.391)	ก้อนเหนียวสีดำ (0.878)	-	-
Water	ก้อนเหนียวสีขาวอมเหลือง(0.293)	ก้อนเหนียวสีน้ำตาล (0.899)	ก้อนเหนียวสีดำ (0.391)	ก้อนเหนียวสีส้ม (0.306)	-	-



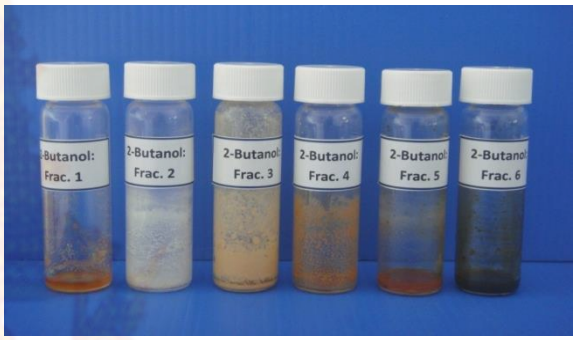
ภาพที่ 3สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย Hexane



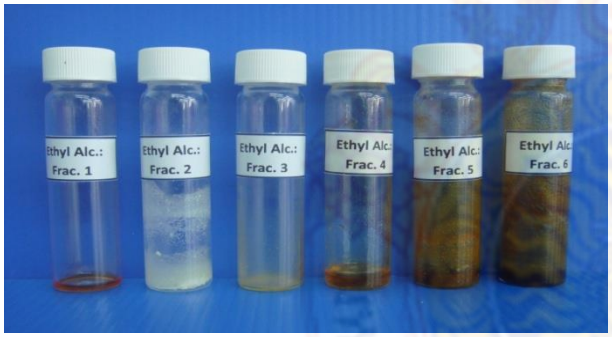
ภาพที่ **4**สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย



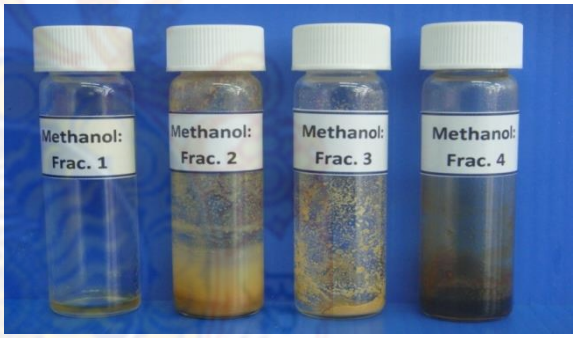
ภาพที่ 5สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย Ethyl



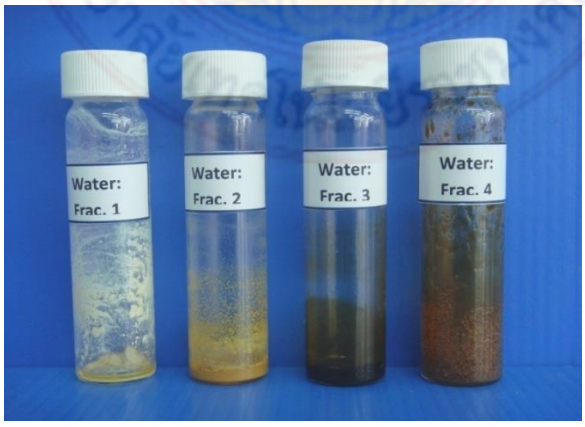
ภาพที่ 6สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย 2-Butanol



ภาพที่ 7สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย Ethyl Alcohol



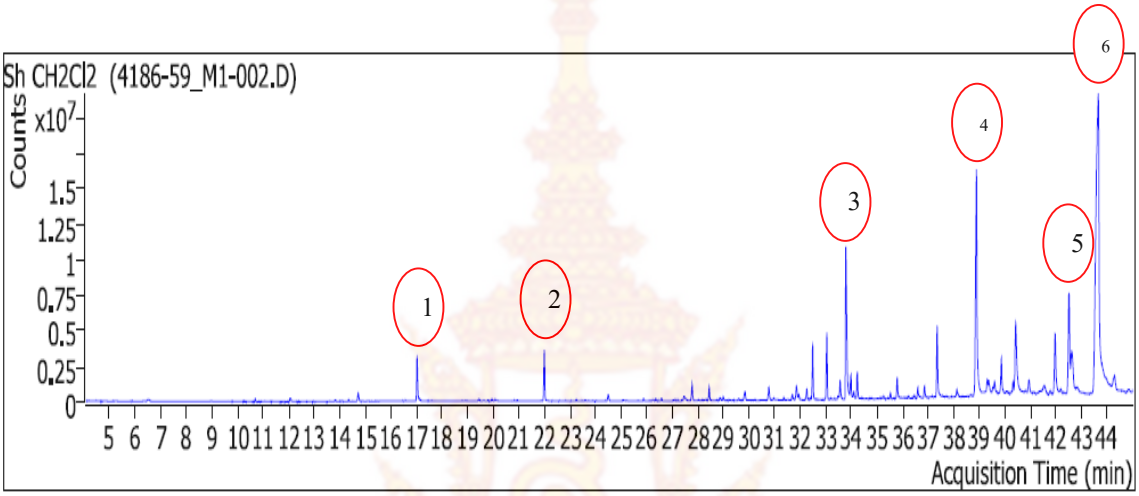
ภาพที่ 8สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย Methanol



ภาพที่ 9สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลายWater

1.5การวิเคราะห์สารสกัดหยาบจากเห็ดแครงด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรมิทรี (Gas chromatography–mass spectrometry:GC-MS)

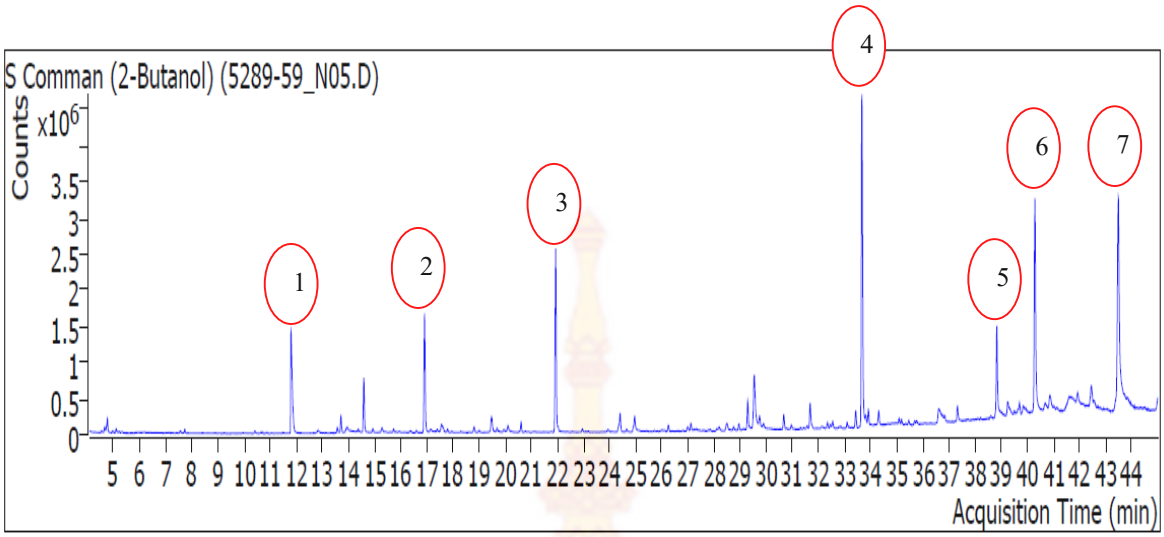
จากการเลือกสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ Dichloromethane, 2-Butanol และ methanol (เรียงจากปริมาณสารสกัดที่ได้) ไปทดสอบหาจำนวนและชนิดของสารด้วยวิธี GC-MS พบว่า Dichloromethane มีสารเด่นจำนวน 6 ชนิด (ภาพที่ 10, ตารางที่ 10) 2-Butanol มีสารเด่นจำนวน 7 ชนิด (ภาพที่ 11, ตารางที่ 11) และ Methanol มีสารเด่นจำนวน 8 ชนิด (ภาพที่ 12, ตารางที่ 12)



ภาพที่ 10โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย dichloromethane

ตารางที่ 10ชนิดของสารที่พบในตัวทำละลาย dichloromethane

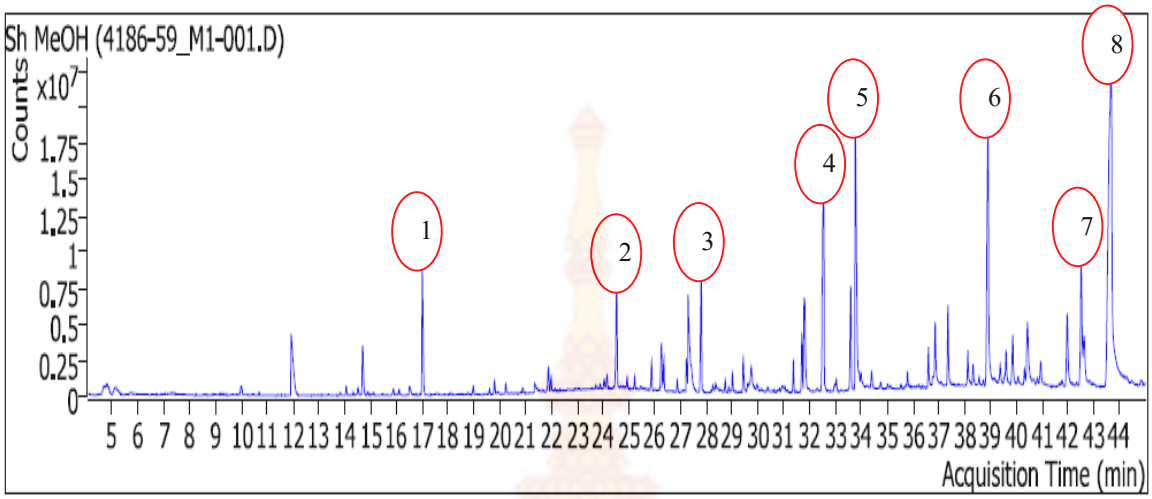
Peak	retention time	Molecular weight	Formula	Chemical name
1	17.0181	86.00	$C_5H_{10}O_2$	Pentanonic acid
2	21.9924	121.00	$C_8H_{10}O$	Benzeneethanol
3	33.9762	162.00	$C_{10}H_{13}NO$	Acetamide, N-(2-phenylethyl)
4	38.8909	255.00	$C_{16}H_{32}NO_7$	n-Hexadecanoic acid
5	42.6148	148.00	$C_{28}H_{25}O_2$	3,8,8'-Trimethoxy-3-piperidyl-2,2'-binaphthalene-1,'4,4'-tetrone
6	43.6487	279.00	$C_{18}H_{32}O_2$	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-



ภาพที่ 11โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย 2-butanol

Peak	retention time	Molecular weight	Formula	Chemical name
1	11.7990	59.00	$CH_2H_4O_2$	Acetic acid
2	16.9078	86.00	$C_5H_{10}O_2$	3-methyl Butanoic acid,
3	21.9267	127.00	$C_7H_{12}O_2$	5-ethyl furanone, dihydro-5-methyl-
4	33.9062	162.00	$C_{10}H_{13}NO$	Acetamide, N-(2-phenylethyl)
5	38.8247	255.00	$C_{16}H_{32}NO_7$	n-Hexadecanoic acid
6	40.2820	137.00	$C_8H_{10}O_2$	4-hydroxy-benzeneethanol,
7	43.4768	191.00	$C_{13}H_{19}NO_4$	3-Carbomoyl-2-methylbutane-1,3,4-triol1-o-benzyl ether

ตารางที่ 11ชนิดของสารที่พบในตัวทำละลาย 2-butanol



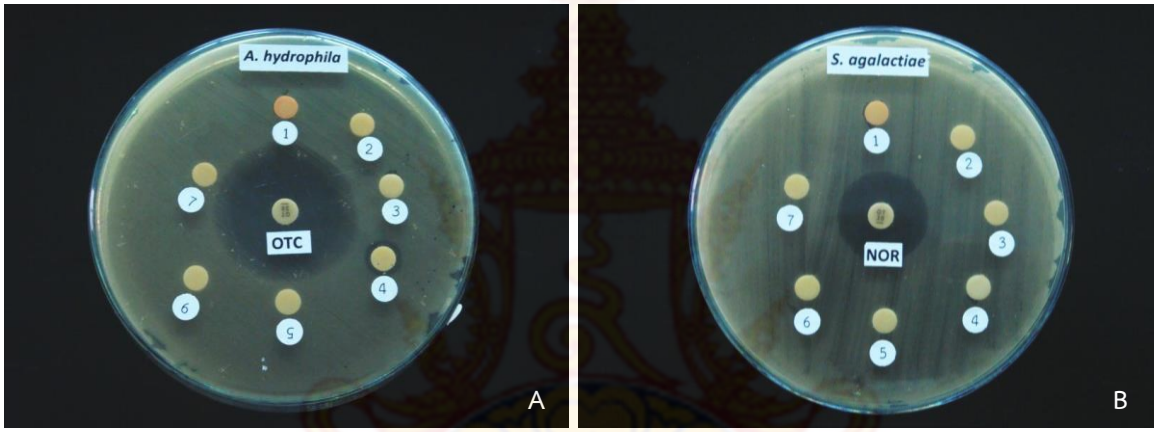
ภาพที่ 12โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย Methanol

ตารางที่ 12ชนิดของสารที่พบในตัวทำละลาย methanol

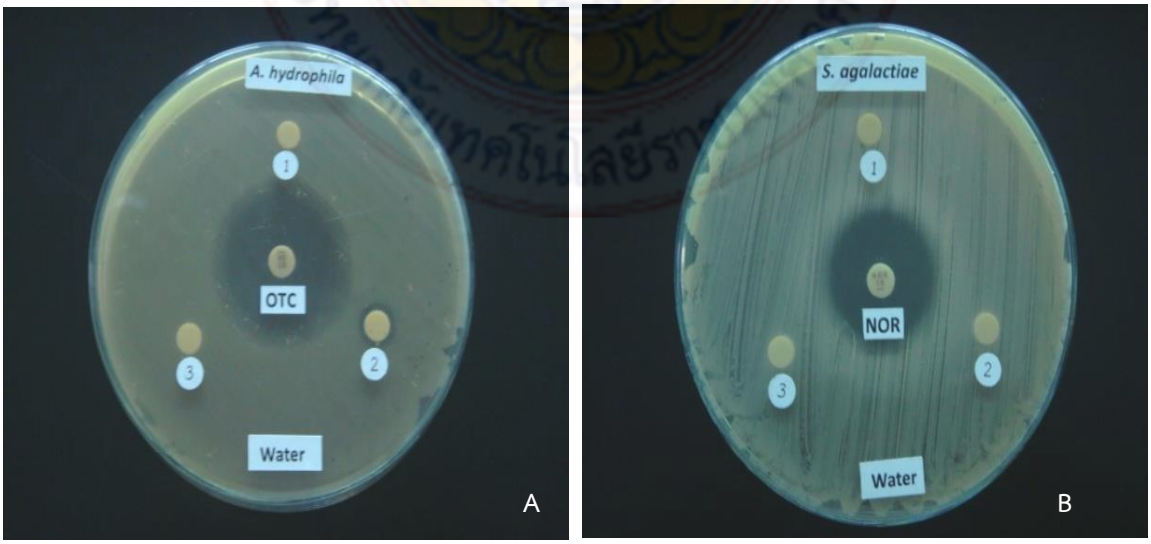
Peak	retention time	Molecular weight	Formula	Chemical name
1	17.0111	86.00	$C_5H_{10}O_2$	Pentanonic acid
2	24.5255	84.00	$C_{10}H_{18}O_3$	2H-Pyran,tetrahydro-2-(tetrahydro-2-furanyl) methoxy)-
3	27.8002	226	$C_{17}H_{34}O_2$	Hexadecanoic acid, methyl ester
4	32.5418	293.00	$C_{19}H_{34}O_2$	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,methyl ester
5	33.9815	162.00	$C_{10}H_{13}NO$	Acetamide, N-(2-phenylethyl)
6	38.9071	255.00	$C_{16}H_{32}O_2$	n-Hexadecanoic acid
7	42.5120	263.00	$C_{18}H_{34}O_2$	Octadec-9-enoic acid
8	43.6703	279.00	$C_{18}H_{32}O_2$	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ ในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ

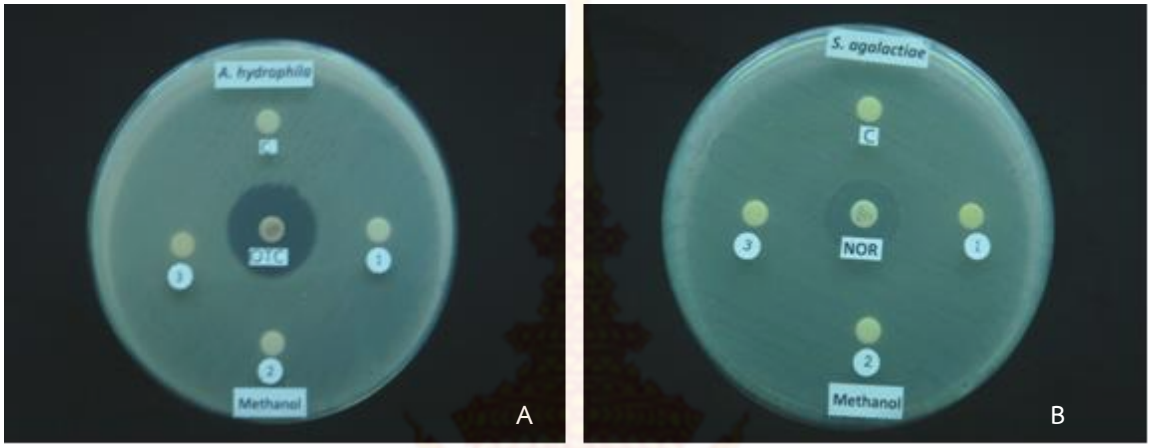
จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบและสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากเห็ดแครงในตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด ในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ 2 ชนิด ได้แก่ *A. hydrophila*และ *S. agalactiae*พบว่าทั้งสารสกัดหยาบ และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ จากตัวทำลายละลายที่ศึกษาทุกชนิด ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด (ภาพที่ 13 - 20)



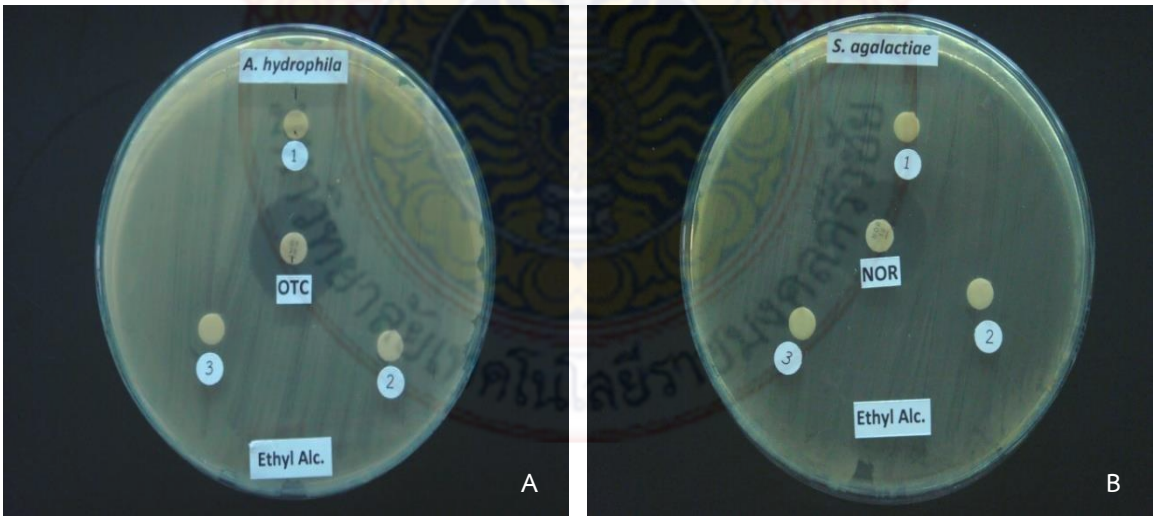
ภาพที่ 13ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายต่าง ๆ (ความเข้มข้น 20,000 พีพีเอ็ม) ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ, A: *A. hydrophila*, B: *S. agalactiae*; 1: water, 2 methanol, 3: ethanol, 4: 2-butanol, 5: dichloromethane, 6: ethyl acetate, 7: hexane, OTC: oxytetracycline, NOR: norfloxzacin



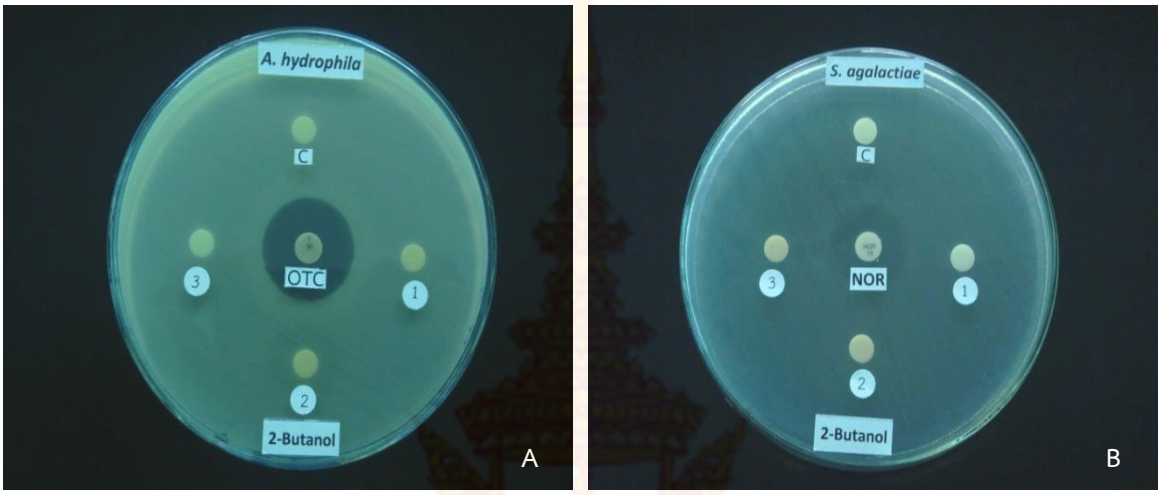
ภาพที่ 14 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย water ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการต้านเชื้อ แบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ, A: *A. hydrophila*, B: *S. agalactiae*; 1: 20,000, 2: 10,000, 3: 5,000



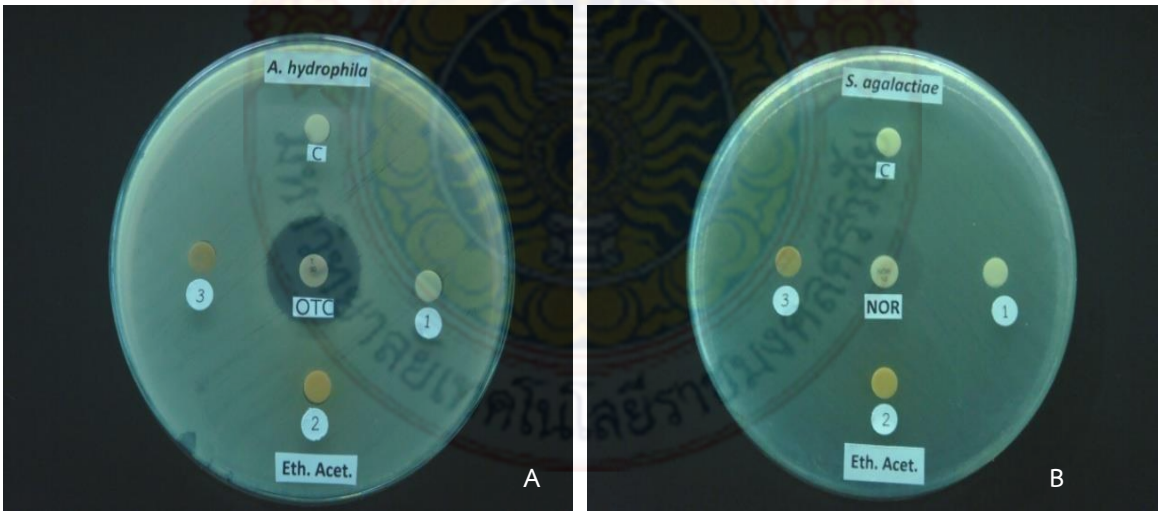
ภาพที่ 15 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย methanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ, A:*A. hydrophila*, B: *S. agalactiae*; 1: 20,000, 2: 10,000, 3: 5,000 พีพีเอ็ม, OTC: oxytetracycline, NOR: norfloxzacin



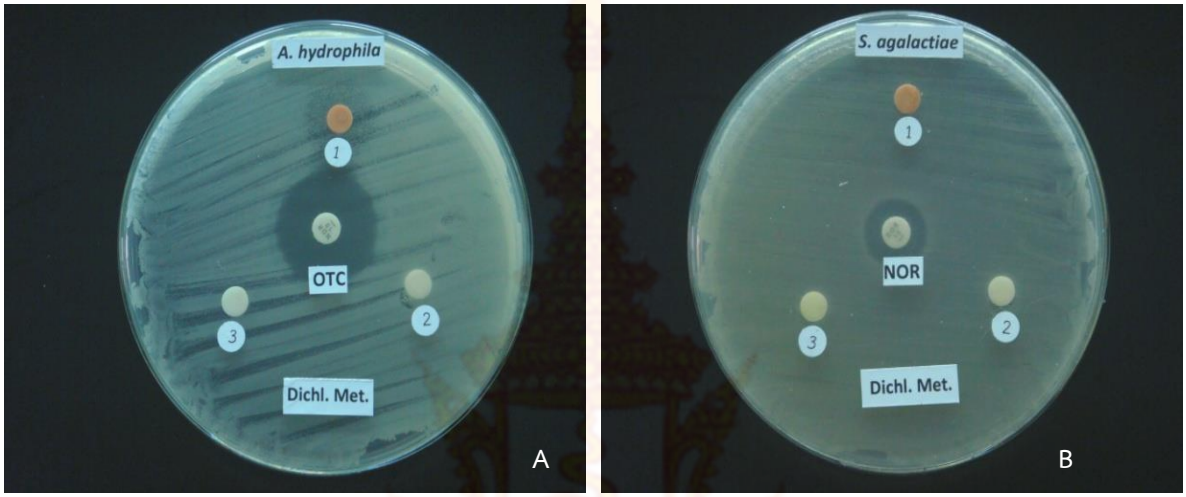
ภาพที่ 16 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ, A:*A. hydrophila*, B: *S. agalactiae*; 1: 20,000, 2: 10,000, 3: 5,000 พีพีเอ็ม, OTC: oxytetracycline, NOR: norfloxzacin



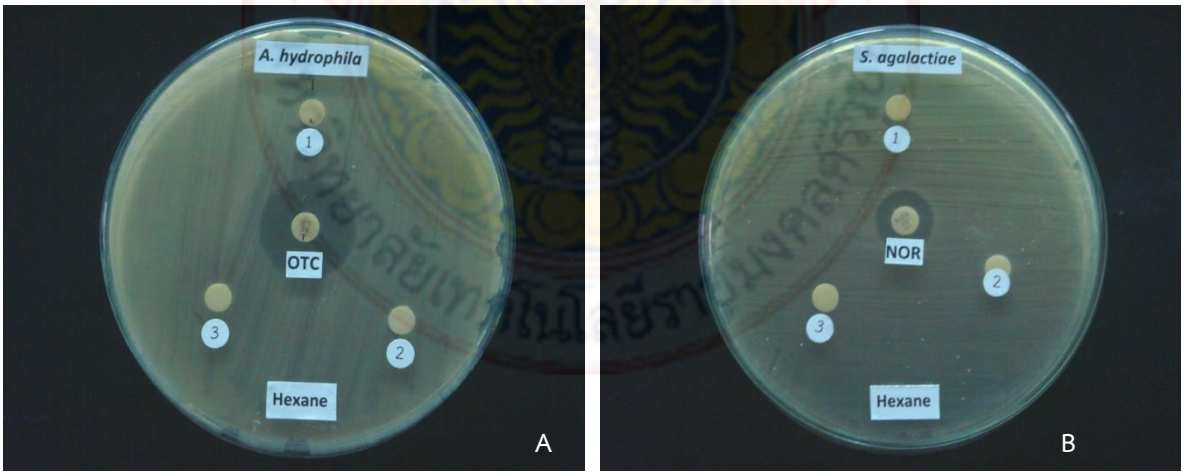
ภาพที่ 17 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย 2-butanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ, A:*A. hydrophila*, B: *S. agalactiae*; 1: 20,000, 2: 10,000, 3: 5,000 พีพีเอ็ม. OTC: oxytetracycline. NOR: norfloxacin



ภาพที่ 18 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย ethyl acetate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆในการต้าน เชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ, A:*A. hydrophila*, B: *S. agalactiae*; 1: 20,000, 2: 10,000, 3: 5.000 พีพีเอ็ม. OTC: oxytetracycline. NOR: norfloxacin



ภาพที่ 19ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย dichloromethane ที่ความเข้มข้นต่าง ๆในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ, A:*A. hydrophila*, B: *S. agalactiae*; 1: 20,000, 2: 10,000, 3: 5,000พีพีเอ็ม, OTC: oxytetracycline, NOR: norfloxzacin



ภาพที่ 20 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย hexane ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ, A:*A. hydrophila*, B: *S. agalactiae*; 1: 20,000, 2: 10,000, 3: 5,000 พีพีเอ็ม, OTC: oxytetracycline, NOR: norfloxzacin

3. ผลการทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

จากการนำสารสกัดหยาบของตัวอย่างเห็ดแครงในตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ Dichloromethane, 2- ButanolMethanolและWaterเพื่อทดการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ประกอบด้วยเซลล์มะเร็ง 5 ชนิดคือ

1.HepG2 : Cytotoxicity against human hepatocarcinoma ATCC HB-8065(มะเร็งตับ)

2. Caco2 : Cytotoxicity against human caucasian colon adenocarcinoma ATCC HTB-37(มะเร็งลำไส้ใหญ่)

3. KB-Oral cavity cancer : Anti-Cancer(มะเร็งช่องปาก)

4.MCF7-breast cancer : Anti-Cancer (มะเร็งเต้านม)

5. NCI-H187-Small cell lung cancer:Anti-Cancer (มะเร็งปอด)

และเซลล์ไข้หวัดนก 1 ชนิด คือเซลล์ NA: Neuraminidase inhibition assay

โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติคือ African green monkey kidney : Cytotoxicity against Vero cells (ไตลิง)พบว่าสารสกัดหยาบจากเห็ดแครงทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ไข้หวัดนกได้ แต่ในขณะเดียวกันตัวอย่างในตัวทำละลาย Methanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของ African green monkey kidneyที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.94μg/ml (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 13 ผลทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากเห็ดแครง

ชนิดของตัวทำละลาย	ชนิดของเซลล์ที่ทดสอบ							IC_{50} (μg/ml)
	[1]HepG2	[2]Caco2	[3]NA	[4]African green monkey kidney	[5]KB-Oral cavity cancer	[6]MCF7-breast cancer	[7]NCI-H187-Small cell lung cancer	
Dichloromethane	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	-
2-butanol	-	-	-	✘	✘	✘	✘	-
Methanol	✘	✘	✘	✓	✘	✘	✘	1.94
Water	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	

หมายเหตุ ✘คือ ไม่ยับยั้งความเป็นพิษของเซลล์✓คือ ยับยั้งความเป็นพิษของเซลล์

[1]HepG2: Cytotoxicity against human hepatocarcinoma ATCC HB-8065(มะเร็งตับ)

[2]Caco2: Cytotoxicity against human caucasian colon adenocarcinoma ATCC HTB-37(มะเร็งลำไส้ใหญ่)

[3]NA: Neuraminidase inhibition assay (ไข้หวัดนก)

[4]African green monkey kidney: Cytotoxicity against Vero cells(ไตลิง)

[5]KB-Oral cavity cancer: Anti-Cancer(มะเร็งช่องปาก)

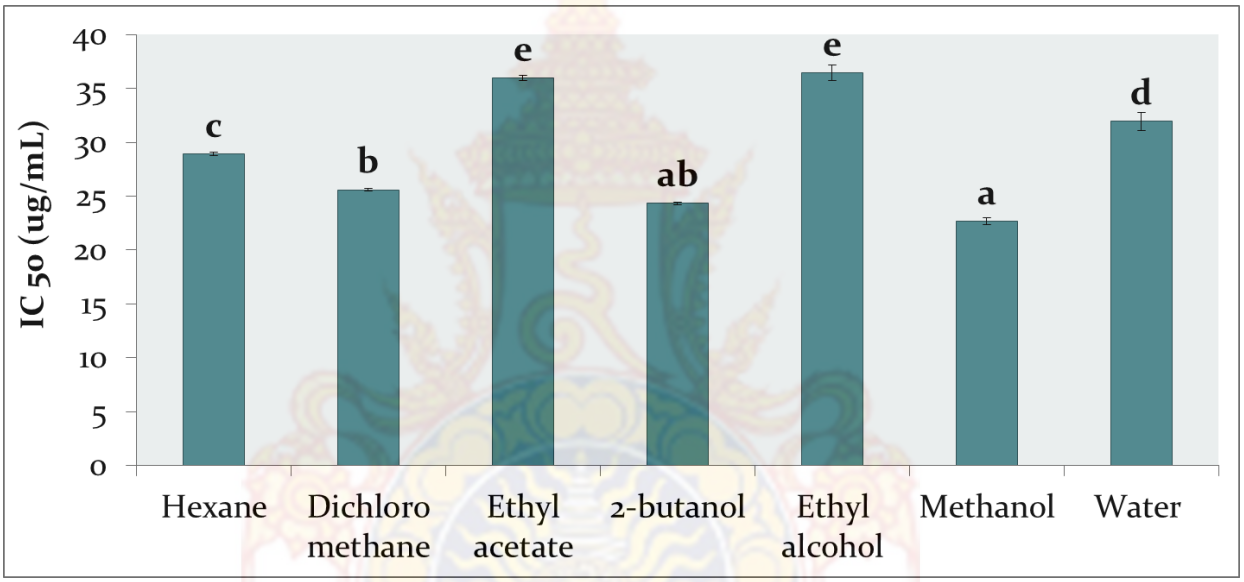
[6]MCF7-breast cancer: Anti-Cancer(มะเร็งเต้านม)

[7]NCI-H187-Small cell lung cancer:Anti-Cancer(มะเร็งปอด)

4. ผลของคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

4.1 ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH method

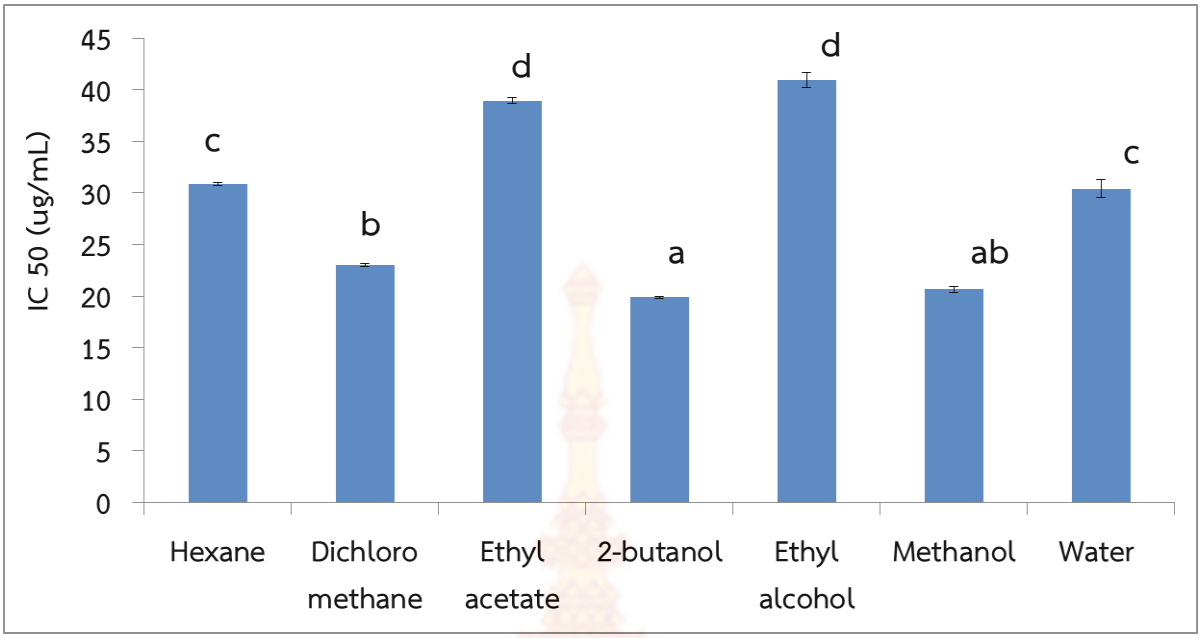
จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH method พบว่าเห็ดแครงที่สกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดให้ค่าที่แตกต่างกันคือ เห็ดแครงที่สกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระสูงที่สุดโดยมีค่า IC 50 ที่ 22.65 ± 0.31 ug/mL แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับคือ เห็ดแครงที่สกัดด้วย 2-บิวทานอล ที่มีค่า IC 50 ที่ 24.34 ± 0.10 ug/mL รองลงมาคือเห็ดแครงที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน เฮกเซน และน้ำ ในขณะที่เห็ดแครงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และเอทิลแอลกอฮอล์มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH method ต่ำที่สุด โดยมีค่า IC 50 ที่ 35.975 ± 0.26 ug/mL และ 36.45 ± 0.69 ug/mL ตามลำดับ (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (IC 50) โดยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด

4.2 ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ โดย วิธี Scavenging activity of ABTS radical

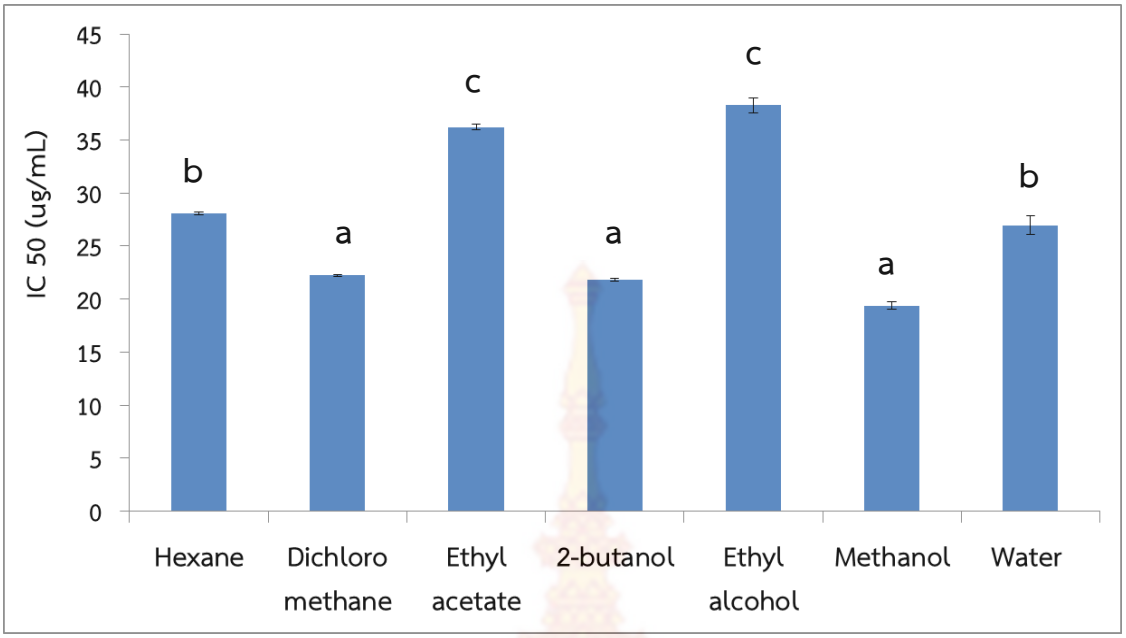
จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ โดยวิธี Scavenging activity of ABTS radical พบว่าเห็ดแครงที่สกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดให้ค่าที่แตกต่างกันคือ เห็ดแครงที่สกัดด้วยบิวทานอลมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระสูงที่สุดโดยแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับคือ เห็ดแครงที่สกัดด้วยเมทานอล มีค่า IC 50 อยู่ในช่วง 19.60-20.65 ug/mL รองลงมาคือเห็ดแครงที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน เฮกเซน และน้ำ โดยสารสกัดด้วยเฮกเซนและน้ำให้ผลที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ในขณะที่เห็ดแครงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และเอทิลแอลกอฮอล์มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระต่ำที่สุด (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (IC 50) โดยวิธี Scavenging activity of ABTSของสารสกัดหยาบเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด

4.3ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ โดยวิธี Metal chelating activity

จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ โดยวิธี Metal chelating activity พบว่าเห็ดแครงที่สกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดให้ค่าที่แตกต่างกันคือ เห็ดแครงที่สกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระสูงที่สุดโดยแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับคือ เห็ดแครงที่สกัดด้วยบิวทานอล และไดคลอโรมีเทน รองลงมาคือเห็ดแครงที่สกัดด้วย เฮกเซน และน้ำ โดยสารสกัดด้วยเฮกเซนและน้ำให้ผลที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ในขณะที่เห็ดแครงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และเอทิลแอลกอฮอล์มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ ต่ำที่สุด (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (IC 50) โดยวิธี Metal chelating activity ของสารสกัดหยาบเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด

5. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการออกฤทธิ์ต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในปลา

5.1 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง

อาหารทดลองที่ผลิตได้มีองค์ประกอบทางเคมีดังตารางที่ 3โดยอาหารทดลองมีโปรตีนอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกันกับที่คำนวณสูตรอาหารไว้อยู่ในช่วง 34.79-35.13 % ไขมันอยู่ในช่วง 5.71-6.02% โดยอาหารทางการค้ามีไขมันต่ำที่สุดคือ 4.95 % ความชื้นอยู่ในระดับไม่เกิน 10% และเถ้า อยู่ในช่วง 7.28-9.69%

ตารางที่ 14 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง(กรัม/ 100 กรัม) [1]

สูตรอาหาร	โปรตีน	ไขมัน	ความชื้น	เถ้า
1	34.79±0.16	5.71±0.116	8.24±0.40	9.69±0.04
2	35.01±0.17	5.98±0.21	8.12±0.13	8.38±0.26
3	34.86±0.29	6.02±0.22	9.03±0.36	8.45±0.09
4	34.97±0.23	5.78±0.19	8.73±0.61	8.72±0.31
5	35.13±0.05	5.96±0.21	9.18±0.03	8.58±0.27
6	34.97±0.02	5.87±0.20	8.38±0.36	8.13±0.14

7	34.56±0.23	4.95±0.19	8.29±0.13	7.28±0.27

1 ค่าที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

5.2การเจริญเติบโตและอัตรารอดของปลา

เมื่อทำการทดลองเลี้ยงปลาดุกด้วยอาหารทดลองที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน เปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมเห็ดแครงป่น และอาหารทางการค้า พบว่า น้ำหนักปลาสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดตาย ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยปลาที่ได้รับอาหารทางการค้ามีแนวโน้มน้ำหนักปลาสุดท้าย และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด และมีผลอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำที่สุด ($p>0.05$)

ตารางที่15น้ำหนักปลาเริ่มต้น น้ำหนักปลาสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตรารอดตายของปลาที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 8สัปดาห์[1]

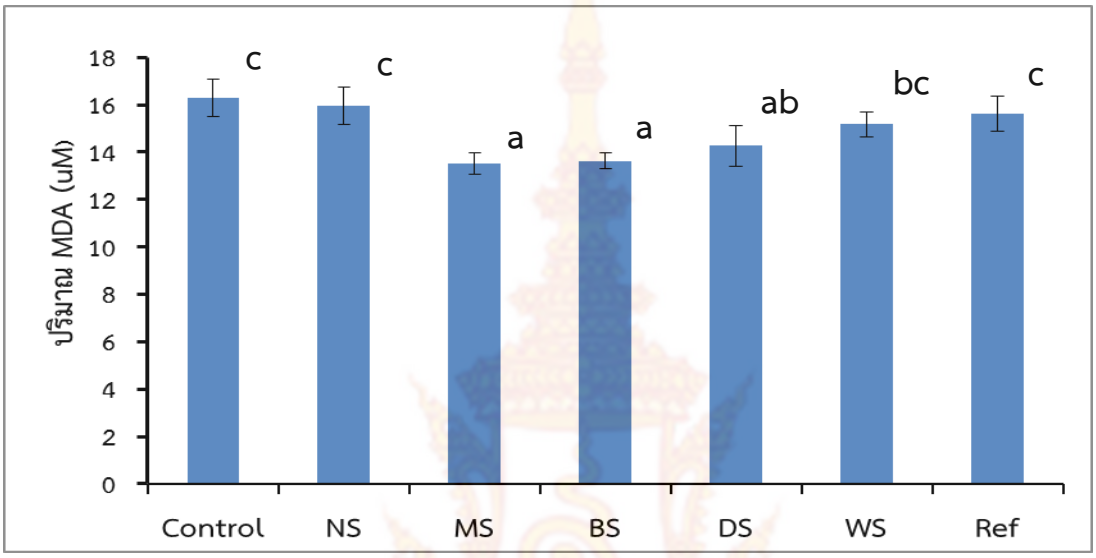
ทรีทเมนต์	น้ำหนักปลาเริ่มต้น (กรัม/ตัว)	น้ำหนักปลาสุดท้าย (กรัม/ตัว)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(%/วัน)	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ(FCR)	อัตราการรอดตาย(%)
1 (ควบคุม)	15.30±0.48	45.37±0.55 ^{ns}	1.98± 0.05^{ns}	1.52±0.03 ^{ns}	100±0.00 ^{ns}
2 (NS)	15.21±0.71	42.91±2.86	1.88±0.16	1.60±0.18	100±0.00
3 (MS)	15.20±0.65	43.07±1.51	1.89±0.11	1.60±0.11	100±0.00
4 (BS)	15.31±0.88	42.33±2.52	1.85±0.09	1.61±0.20	100±0.00
5 (DS)	15.23±0.64	45.37±1.52	1.98±0.08	1.53±0.30	100±0.00
6 (WS)	15.40±0.43	43.67±2.08	1.89±0.09	1.55±0.14	100±0.00
7 (Ref)	15.41±0.58	48.04±2.58	2.07±0.08	1.28±0.06	100±0.00

หมายเหตุ[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยตัวอักษรที่กำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

5.3 ผลของสารสกัดจากเห็ดแครงต่อการเป็นสารต้านทานความเครียดแบบออกซิเดชั่น

5.3.1 ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์เพื่อหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่น

ปลาดุกที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆมีผลลดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ลง เมื่อเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับการผสมสารสกัดจากเห็ดแครง (ควบคุม และอาหารทางการค้า) รวมทั้งอาหารที่ผสมเห็ดแครงป่น โดยปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดเห็ดแครงด้วยเมทานอล และบิวทานอลมีปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ต่ำสุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมสารสกัดเห็ดแครงด้วยไดคลอโรมีเทน ในขณะที่ปลาที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดแครงด้วยน้ำ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24ผลของสารสกัดเห็ดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นในปลาดุก

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแท่งหมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

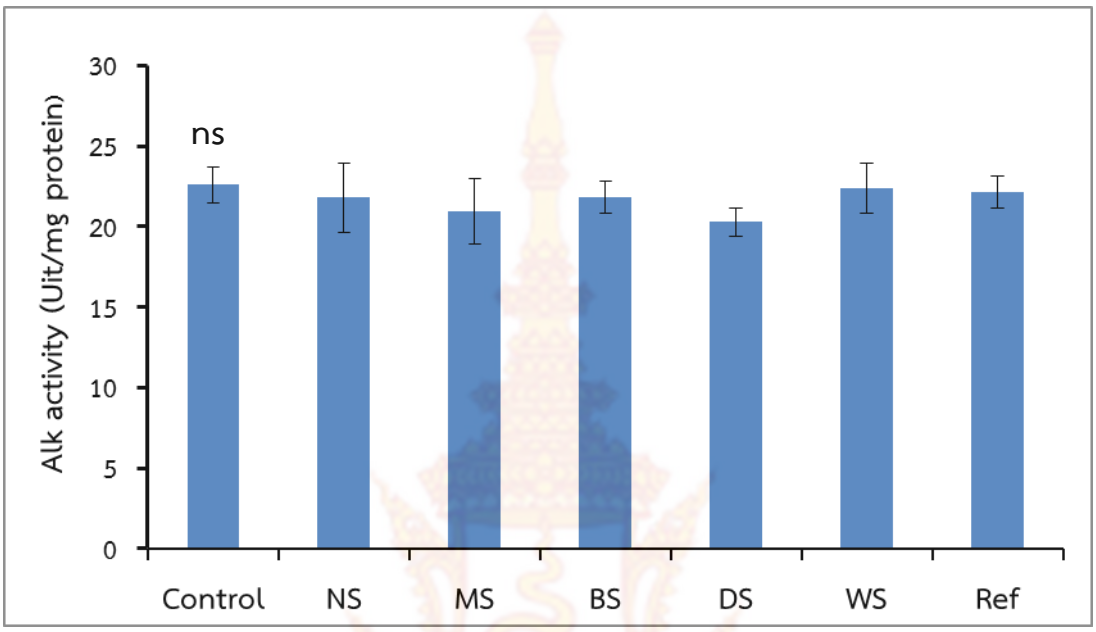
5.3.2 กิจกรรมเอนไซม์ Alkaline phosphatase

กิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของปลาดุกที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เมื่อเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับการผสมสารสกัดจากเห็ดแครง (ควบคุม และอาหารทางการค้า) รวมทั้งอาหารที่ผสมเห็ดแครงป่น พบว่าอาหารที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อระดับกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์อยู่ในช่วง 20-22 Unit/mg protein (ภาพที่ 25)

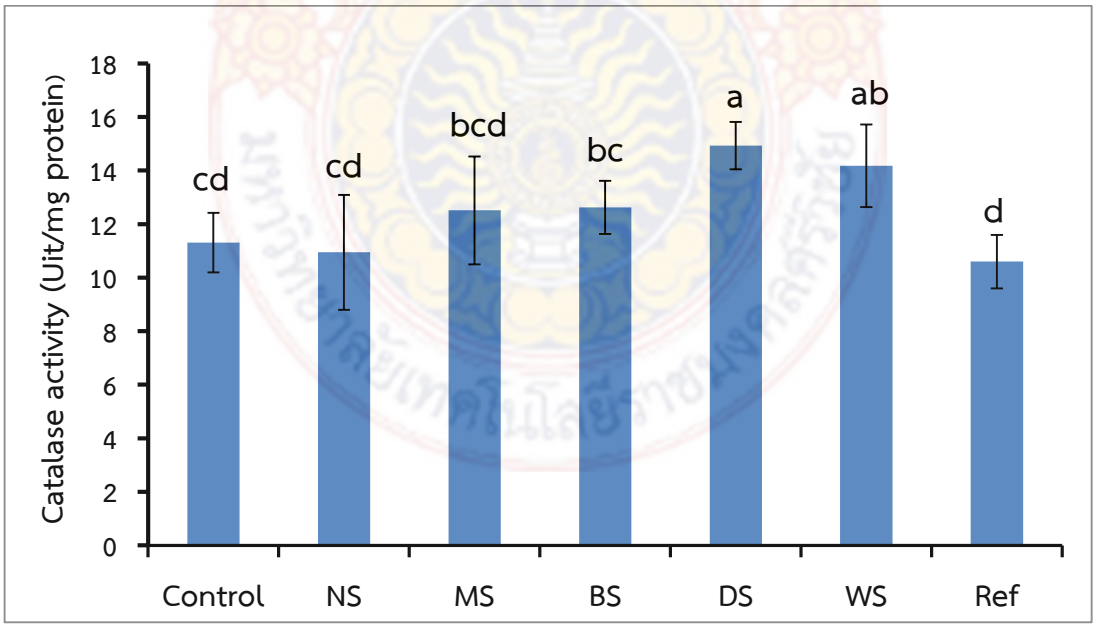
5.3.3 กิจกรรมเอนไซม์คะตะเลส

ปลาดุกที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์คะตะเลส เมื่อเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับการผสมสารสกัดจากเห็ดแครง (ควบคุม และอาหารทางการค้า) รวมทั้งอาหารที่ผสมเห็ดแครงป่น โดยปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดเห็ดแครงด้วยไดคลอโรมีเทน และน้ำมี

ค่ากิจกรรมเอนไซม์คะตะเลสสูงสุด รองลงมาคือ ปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดเห็ดแครงด้วยบิวทานอล และเมทานอล ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม และอาหารทางการค้ารวมทั้งอาหารที่มีส่วนผสมของเห็ดแครงป่นมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำ (ภาพที่ 26)



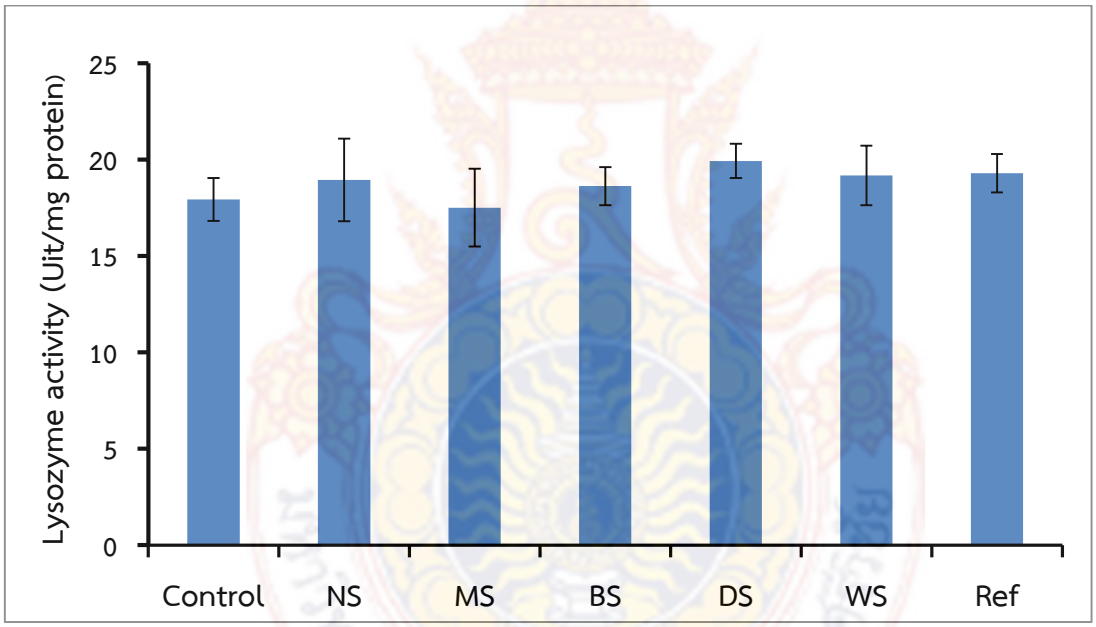
ภาพที่ 25ผลของสารสกัดเห็ดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อระดับกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในปลาดุก



ภาพที่ 26ผลของสารสกัดเห็ดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อระดับกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในปลาดุก

5.3.4 กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์

กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ของปลาดุกที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เมื่อเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับการผสมสารสกัดจากเห็ดแครง (ควบคุม และอาหารทางการค้า) รวมทั้งอาหารที่ผสมเห็ดแครงป่น พบว่าอาหารที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อระดับกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์(ภาพที่ 27)



ภาพที่ 27ผลของสารสกัดเห็ดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อระดับกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ในปลาดุก

บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเห็ดแครงในตัวทำละลาย7 ชนิดได้แก่ Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, 2-butanol, Ethyl alcohol, Methanol และ Water พบว่า น้ำสามารถสกัดได้ผลผลิตมากที่สุดรองลงมาคือ Methanol และ 2–butanolแต่เมื่อนำไปวิเคราะห์กลุ่มสารด้วย TLC พบว่า Hexane และ Dichloromethane มีกลุ่มสารที่คล้ายกัน เช่นเดียวกับ Ethyl Alcohol และ Methanol แต่มีกลุ่มสารต่างกันกับ Ethyl acetate, 2-butanolและ Water และนอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มสเตียรอยด์,กรดอะมิโนและโปรตีน พบมากที่สุดในเห็ดแครง รองลงมาคือกลุ่มของแทนนิน และแอลคาลอยด์ เมื่อนำไปตรวจสอบหาจำนวนและความหลากหลายของสารที่ถูกสกัดออกมาด้วย HPLC พบว่า Dichloromethane สามารถสกัดสารได้หลากหลายที่สุด รองลงมาคือ Methanol, 2-butanol, Ethyl alcohol และ Water ตามลำดับ เมื่อนำไปแยกสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ พบว่า Hexane, Dichloromethane, Methanol และ Water แยกได้ 4 Fraction ในส่วนของ Ethyl acetate, 2-butanol และ Ethyl alcohol สามารถแยกได้ 6 Fraction ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อเลือกสารสกัดในตัวทำละลาย Dichloromethane, 2-butanol, Methanol ไปทำการวิเคราะห์หาจำนวนและชนิดของสารที่พบในตัวทำละลายดังกล่าว พบว่า Dichloromethaneมีสารเด่นจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ Pentanonic acid, Benzeneethanol, Acetamide, N-(2-phenylethyl), n-Hexadecanoic acid, 3,8,8’-Trimethoxy-3-piperidyl-2,2’-binaphthalene-1,’4,4’-tetrone, และ 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- โดยที่ 2-butanol มีสารเด่นจำนวน 7 ชนิด Acetic acid, Butanoic acid 3-methyl-, Furanone,5-ethyldihydro-5-methyl-, Acetamide N-(2-phenylethyl), n-Hexadecanoic acid, Benzeneethanol,4-hydroxy และ Carbomoyl-2-methylbutane-1,3,4-triol1-o-benzyl etherและ Methanol มีสารเด่นจำนวน 8 ชนิดได้แก่ 2H-Pyran,tetrahydro-2-(tetrahydro-2-furanyl) methoxy)-, Hexadecanoic acid, methyl ester,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,methyl ester, 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,methyl ester, Acetamide, N-(2-phenylethyl), n-Hexadecanoic acid, Octadec-9-enoic acid และ 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- ตามลำดับ

เมื่อนำสารสกัดหยาบ รวมถึงสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ หรือสารสกัดบริสุทธิ์จากการทำละลายด้วยตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิดมาทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ 2 ชนิด คือ *A. hydrophila*และ *S. agalactiae*พบว่า ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแต่อย่างใด แสดงให้สารสกัดจากเห็ดแครงไม่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะทางการค้า

จากผลการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและสัตว์น้ำ 2 ชนิด คือ *A. hydrophila*และ *S. agalactiae*พบว่าสารสกัดหยาบรวมถึงสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ หรือสารสกัดบริสุทธิ์จากการทำละลายด้วยตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้และเมื่อทำการศึกษาผลของสารสกัดเห็ดแครงต่อการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ก็พบว่าไม่สามารถต้านทานเซลล์มะเร็งได้ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ด้วยวิธีต่าง ๆ กันประกอบด้วย DPPH, ATBS และ Metal chelating activity พบว่าสารสกัดจากเห็ด

แครงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยตัวทำละลายที่ต่างกันให้การออกฤทธิ์ต้านที่แตกต่างกัน โดยในการทดสอบทั้ง 3 วิธีให้ผลการต้านอนุมูลอิสระไปในทิศทางเดียวกันคือเห็ดแครงที่สกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระสูงที่สุดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับคือเห็ดแครงที่สกัดด้วย 2-บิวทานอล รองลงมาคือเห็ดแครงที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน เฮกเซน และน้ำ ในขณะที่เห็ดแครงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และเอทิลแอลกอฮอล์มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย ประวีณา และคณะ (2557) ที่พบว่าเส้นใยจากเห็ดแครงมีศักยภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ จึงคัดเลือกสารสกัดจากเห็ดแครงที่สกัดด้วยตัวทำลาย 4 ชนิดประกอบกับปริมาณผลผลิตที่ได้ในระดับสูง จึงคัดเลือกสารสกัดประกอบด้วย เมทานอล บิวทานอล ไดคลอโรมีเทน และน้ำ นำมาผสมในอาหารเลี้ยงปลาดุกที่ระดับ 0.5% ซึ่งเป็นระดับที่ได้ผลต่อค่าการต้านทานความเครียดแบบออกซิเดชั่น (Oxidative stress) ดีกว่าการใช้ที่ระดับ 1% ในปลานิล (Ahmed *et al*.,2014) เพื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม อาหารทางการค้า และอาหารที่ผสมเศษเหลือเห็ดแครงป่นที่ระดับ 1% ต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด และการเป็นสารต้านทานความเครียดแบบออกซิเดชั่นในปลาดุก โดยทำการทดลองเป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเห็ดแครงต่าง ๆ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดของปลาดุก แต่สารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ กันมีผลต่อค่าภาวะเครียดแบบออกซิเดชั่นในตัวปลา ซึ่งเป็นภาวะที่เกิดจากความไม่สมดุลของปริมาณอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีสาเหตุมาจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การปนเปื้อนจากสารพิษหรือโลหะหนัก การได้รับสารอาหารที่ไม่เหมาะสม และโรครวมทั้งปรสิต (มนต์สรวง, 2557) ทำให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระที่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic effect) ทำให้ปลาสุขภาพไม่ดี กินอาหารน้อย โตช้า และภูมิคุ้มกันต่ำลง (ดวงพร และคณะ, 2558) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการใช้สารสกัดจากเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายต่างกันมีผลต่อการลดระดับการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่นในตับลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$) โดยปลาที่ได้รับสารสกัดเห็ดแครงด้วยเมทานอล มีผลลดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่นต่ำสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลาที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดแครงที่สกัดด้วยบิวทานอล และไดคลอโรมีเทน นอกจากนั้นยังมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์คะตะเลสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกับกระบวนการต้านทานอนุมูลอิสระของร่างกาย โดยปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดเห็ดแครงด้วยไดคลอโรมีเทน และน้ำมีค่ากิจกรรมเอนไซม์คะตะเลสสูงสุด ซึ่งจะส่งผลให้ปลามีความสามารถในการต้านทานสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ และทำให้ปลามีภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอมหรือต่อความเครียดที่อาจจะเกิดขึ้นได้สูงขึ้น แต่ไม่มีผลต่อค่ากิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการใช้สารสกัดจากเห็ดแครงเหลือทิ้งด้วยตัวทำละลายชนิด เมทานอล บิวทานอล และไดคลอโรมีเทนที่ระดับ 0.5% สามารถนำมาใช้ในอาหารสำหรับเลี้ยงปลาดุกได้อันจะส่งผลให้เพิ่มความสามารถในการป้องการความเครียดแบบออกซิเดชันในตัวปลาได้ซึ่งจะส่งผลให้ปลามีภาวะสุขภาพที่แข็งแรงมากขึ้น และมีภูมิต้านทานในการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารทางการค้า และปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม แต่การที่ผสมเห็ดแครงป่นที่ระดับ 1 % อาจจะเป็นระดับที่น้อยเกินไปทำให้ไม่ส่งผลต่อค่าต่าง ๆ ที่ทำการศึกษา ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้สามารถเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรกรได้ ซึ่งเป็น

ทางเลือกในการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เพื่อทดแทนสารเคมีสังเคราะห์แล้ว ยังเป็นการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ท้องถิ่นราคาถูกในการทดแทนการนำเข้าสารเคมี และลดต้นทุนการผลิตสัตว์น้ำเป็นอย่างดี

สรุปผลการวิจัย

1. สามารถตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี โดยได้สารกึ่งบริสุทธิ์ และสารบริสุทธิ์ จากการสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำละลาย 7 ชนิด ด้วยวิธี TLC, HPLC, VLC และ GC-MS มีสารที่เหมือนกันที่พบอยู่ในชั้นตัวทำละลายที่ต่างกันหลายชนิด เช่น กรดไขมัน โปรตีน แทนนิน เป็นต้น สามารถบ่งบอกได้ว่า ตัวทำละลาย ที่มีขั้วใกล้เคียงกัน สามารถใช้สกัดสารจากเห็ดแครงได้ โดยที่ให้ผลการสกัดเหมือนกัน เช่น water กับ methanol หรือ ethanol กับ 2-butanol หรือ hexane กับ dichloromethane

2. จากผลการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและสัตว์น้ำ 2 ชนิดคือ *A. hydrophila*และ *S. agalactiae*พบว่าสารสกัดหยาบ รวมถึงสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ หรือสารสกัดบริสุทธิ์จากการทำละลายด้วยตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิดได้ แสดงให้เห็นว่าเห็ดแครงไม่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

3. สารสกัดหยาบเห็ดแครงมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเห็ดแครงที่สกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระสูงที่สุดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับคือเห็ดแครงที่สกัดด้วย 2-บิวทานอล รองลงมาคือเห็ดแครงที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน เฮกเซน และน้ำ ในขณะที่เห็ดแครงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และเอทิลแอลกอฮอล์มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระต่ำที่สุด

4. สารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายต่างชนิด มีผลต่อการต้านทานความเครียดแบบออกซิเดชันโดยปลาที่ได้รับสารสกัดเห็ดแครงด้วยเมทานอล มีผลลดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่น แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลาที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดแครงที่สกัดด้วยบิวทานอล และไดคลอโรมีเทน นอกจากนั้นยังมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์คะตะเลสโดยปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดเห็ดแครงด้วยไดคลอโรมีเทน และน้ำมีค่ากิจกรรมเอนไซม์คะตะเลสสูงสุด ซึ่งจะส่งผลให้ปลามีความสามารถในการต้านทานสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ และทำให้ปลามีภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอมหรือต่อความเครียดที่อาจจะเกิดขึ้นได้สูงขึ้น แต่ไม่มีผลต่อค่ากิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์

เอกสารอ้างอิง

กาญจณี เตชะวรรักษ์. 2556. เทคนิคการเพาะเห็ดแครง. วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีกระบี่ (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http: www.dailynews.co.th. 1 มิถุนายน 2561.

ชยพร ทิพย์ศรีมงมล, วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล, นิติ ชูเชิด และชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2552. ผลของเบต้ากลูแคนต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม, นน. 73-80. *ใน*เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 สาขาประมง.

ดวงพร อมรเลิศพิศาล, เมธัส เงินจันทร์, เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, รัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์ และชุติมา ศรีมะเริง. 2558. สาระสำคัญและการป้องกันภาวะออกซิเดชันของสาหร่ายไกในปลาหนังลูกผสม. วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. 38(4): 393-405.

นฤมล มงคลธนวัฒน์. 2557. เห็ดแครง: เห็ดพื้นบ้านที่มากด้วยคุณค่า. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง 23(1): 138-147.

ประวีณา รังคะวงศ์, ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์ และรำไพ เกณฑ์สาคู. 2557. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงในอาหารเหลวและคุณสมบัติของเส้นใยที่ผลิตได้. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม 33: 420-427.

มนต์สรวง ยางทอง. 2557. การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในปลา. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 32 (2): 65-75.

สถาบันการแพทย์แผนไทย. 2542. ผักพื้นบ้านภาคใต้. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ. 279น.

Abedi, Z., Khalesi, K. M. and Eskandari, S. K. 2013.Biochemical and haemotological profiles of common carp *Cyprinuscarpio* under sublethal effects of trivalent chromium.Iranian J. Toxicol. 7(20): 782-792.

Ahmed, M., Abdullah, N., Shuib, A.S. and Razak, S.A. 2014. Improvement of Antioxidant Statusin Nile Tilapia *Oreochromisniloticus* Using Hot Water Extract of Waste Mushroom Stalk. 2nd International Conference on Food and Agricultural Sciences(IPCBEE)77:26-30.

Akinrotmi, O. A., Uedeme-Naa, B. and Agokel, E. O. 2010. Effect of accumulation on haematological parameters of *Tilapia guineensis* (Bleeker, 1862). Sci. World J. 5(4): 1-4.

Blaxhall, P. C. and Daisley, K. W. 1973. Routine haemotological method for use with fish blood. J. Fish Biol. 5: 771-781.

Bull, B. S., Koepke, J. A., Simson, E. and Assendelft, O. W. 2000. Procedure for determing packed cell volume by micro-haematocrit method. 3rd edition.NCCLS Wanyne, PA.

Burgents, J. E., Burnrtt, K. G, Burnett, L. E. 2004. Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeusvannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. Aquaculture 231: 1-8.

Dacie, J. V. and Lewis, S. N. 2001. Practical heamatology. 9th ed. Churchill Livingstone, London.633 p.

Ellis, A.E. 1990. Lysozyme Assay, pp. 101-103. *In* Stolen, J. S. *et al*. (eds). Techniques in Fish Immunology.SOS Publications, New Jersey.

ESCMID. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases. 2003. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. Eucast discussion document, Clin.Microbiol. Infect. 9: 1-7.

Harikrishnan, R. Nisha, R. M. and Balasundaram, C. 2003. Heamatological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinuscarpio*, following herbal treatment for *Aeromonashydrophila* infection. Aquaculture 221 (14): 41-50.

Islam, M. A., Alam, M. M., Choudhury, M. E., Kobayashi, N. and Ahmed, M. U. 2008. Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) of cloxacillin for elected isolates of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with their antibiogram. Bang. J. Vet. Med.1: 121-126.

Joel, E.L., and Bhimba, B.V., 2013. A secondary metabobo;ite with antibacterial activity produced by mangrove foliar fungus *Schizophyllum commune*. Inter. J. Chem. Envi. & Biol. Sci. 1(1): 165-168.

Mirfat, A. H. S., Noorlidah. A. and Vikineswary. S, 2010. Scavenging activity of *Schizophyllum commune* extracts and its correlation to total phenolic content. J. Trop. Agri. Food Sci. 38(2): 231-238.

Mirfat, A. H. S., Noorlidah. A. andVikineswary. S, 2014. Antimicrobial activities of split gill mushroom *Schizophyllum commune* Fr. Am. J. Res. Com. 2(7): 113-124.

Natarajan, D., Britto, S. J., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C. and Perumal, G. 2005. Antibacterial activity of *Euphorbia fusiformis* rare medicinal herb.Ethnopharmacol. 6: 102-123.

Naz. S. 2014. Health benefits of mushrooms. Online Inter. Interdisp. Res. J. IV: 285-291

Reyes, R. G., Grabl, W. and Rau, U. 2007.Mycelial wastes of *Schizophyllum commune* ATCC 38548 from the biotechnological production of schizophyllan with antibacytrial activity. J. Trop. Biol. 6: 3-5.

Sardar, M. R., Thompson, K. D., Penman, D. J. and McAndrew, B. J.2001.Immune responses of Nile tilapia clones developmental and comparative. Fish and Shell. Immunol. 25, 37-46.

Shah, S. L. 2010.Haemotological changes in*Tincatinca* after exposure to lethal and sublethal doses of mercury, cadmium and lead. Iranian J. Fish. Sci. 9: 434-443.

Shah, S. L. and Altindag, A. 2005. Alteration in the immnunological parameters of tench (*Tincatinca* L.) after acute and choric exposure to lethal and sublethal treatments with mercury, cadmium and lead.Turkish J. Vet. Anim. Sci. 29: 1163-1168.

Seeley, J. R., Gillespie, P. D. and Weeks, B. A. 1990. A sample technique for the rapid spectrophotometric determination of phagocytosis by fish macrophages. Mar. Environ. Res. 1990(30): 37-41.

Steel, R. G. D. and Torrie. J. H. 1986. Principle and Procedure of Statistics.2nd Edition.McGraw-Hill Book, Singapore.633 p.

Teoh, Y. P. and Mat Don. M. 2013. In vitro antifungal activities and phytochemical analysis of filamentous white-rot fungi, *Schizophyllum commune*.SainsMalasiana 42(9): 1267-1272.

Wedemeyer, G. J., Gould, R. W. and Yasutake, W. T. 1983. Some potentials and limits of the leucocrit test as fish health assessment method. J. Fish Biol. 23: 711-716.

Wintrobe, M. M. 1978. Clinical Heamatology. H. Kimpton, London.