

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ กองทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้อนุมัติทุนสนับสนุนการวิจัยปีงบประมาณ 2552 พร้อมนี้ ขอขอบคุณ อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก และเจ้าหน้าที่นำทาง สำหรับการศึกษาดูตัวอย่างในพื้นที่การทำวิจัย ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา และให้ความอนุเคราะห์ ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆในการทำวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยคาดหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผลการวิจัยในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ของผู้ที่สนใจเกี่ยวกับการศึกษาเห็ดป่าต่อไป

อุรรัตน์ พิมลศรี ลี

ศรียุตา กวยาสกุล

อารี ทองทุ่ง

สิทธิศักดิ์ สร้อยเพชรเกษม

อุราภรณ์ สอาดสุด

Research Title Diversity of wild mushrooms and their anticandida activity from Phu Hin Rong Kla National Park in Phitsanulok

Researcher

1. Ms. Urat Pimolsri
2. Ass. Prof. Srisuda Kawayasakul
3. Ass. Prof.Dr. Uraporn Sa-ardsud
4. Ms. Aree Thongthung
5. Mr. Sittud Soypetcasem

Abstract

Candida, (*Candida albicans*) is a fungal disease which has become increasingly significant threaten in Thailand because of the opportunistic behavior towards the altered and/or compromised conditions of its host. There has been much interest in the resources of bioactive compounds for treatment fungal diseases. There are a wide range of mushrooms which regularly produce antifungals in world-wide, especially in the Asia region. Therefore, this study sought for diversity of wild mushrooms which generally grow in nature and investigated their anticandida activity. The samples of wild mushrooms were randomly collected from Phu Hin Rong Kla National Park in the Phitsanulok province during 2009. Each sample was morphologically characterized both macroscopically and microscopically to identify the genus. They were then dried at 45°C until brittle (3-7 days). The dried samples were ground with a motorized stone grinder and extracted with chloroform, ethyl acetate and methanol (25 g/L). The anticandida activity of extracts was determined by paper disc agar diffusion method using three species of *Candida* including *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. The diameter of the inhibition zone was measured and minimal inhibitory concentration (MIC) was determined using broth tube dilution. The thin layer chromatographic method was used to separate into fractions with chloroform and methanol ratio (10:1) as a mobile phase with extracted mushroom which showed the highest diameter of inhibition zone. Then the active fraction was calculated and checked its activity by bioautography method with *Candida* spp. The 69 wild mushroom samples were found and identified to 55 genus into 25 families and unidentified 3 samples. The anticandida activity of extracted mushroom samples with ethyl acetate were generally given diameter of the inhibition zone higher than the methanolic and chloroform extracts. The methanolic extract of *Polyporus* PHK 24 provided the highest of diameter of clear zone 15.0 mm. The minimal inhibitory concentration was 6.25 mg/ml. The retention factor (R_f) of active fraction was 0.56 which could inhibit the growth of three tested organism. Thus wild mushrooms vary markedly in their potency of anticandida activity. Some of these may be amenable to commercial exploration for development to medical benefits.

Keywords: Anticandida activity, Wild mushrooms, Phu Hin Rong Kla National Park

ชื่อเรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านแคนดิดาของเห็ดป่าในอุทยานแห่งชาติ
ภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก

ชื่อผู้วิจัย นางอุรรัตน์ พิมลศรี ลี
ผศ.ศรีสุดา กวยาสกุล
นางอารี ทองทุ่ง
นายสิทธิศักดิ์ สร้อยเพชรเกษม

ที่ปรึกษาโครงการ ผศ.ดร. อูราภรณ์ สอาดสุด

แหล่งทุนวิจัย งบประมาณแผ่นดิน พุทธศักราช 2552 มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

Candida albicans ทำให้เกิดโรคเชื้อรา candidiasis ที่คุกคามสุขภาพของคนไทยมากขึ้น ในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีความสนใจในการค้นหาแหล่งสารต้านเชื้อรา เพื่อใช้ในการรักษาโรคนี้ มีเห็ดจำนวนหลายชนิดที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อราได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงได้ศึกษาความหลากหลายของเห็ดป่าในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก ในปี พ.ศ. 2552 และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida* spp. โดยนำตัวอย่างเห็ดแต่ละชนิด ที่ได้จากการสำรวจนำมาจัดจำแนกชนิดโดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในระดับ genus แล้วนำตัวอย่างเห็ดมาทำแห้ง และมาบดด้วยเครื่องบดให้เป็นผงละเอียด จากนั้นนำผงละเอียดของเห็ดแต่ละชนิดมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ chloroform , ethylacetate และ methanol ปริมาณ 25 กรัม/ลิตรของตัวทำละลาย นำสารสกัดหยาบมาศึกษาฤทธิ์ต้านแคนดิดา โดยวิธี paper disc agar diffusion โดยทดสอบกับเชื้อทดสอบ 3 ชนิดคือ *C. albicans*, *C. krusei* และ *C. tropicalis* แล้ววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส และหาค่า MIC โดยวิธี broth tube dilution ส่วน active fraction ทำการแยกโดยวิธี TLC ด้วยอัตราส่วนสารผสมของ mobile phase คือ chloroform : methanol 10:1 (v/v) ตรวจทดสอบ active fraction ต่อเชื้อทดสอบ โดยวิธี Bioautography งานวิจัยครั้งนี้ สรรวจพบเห็ดป่า 69 ชนิด จัดจำแนกชนิดเป็น 55 genus จัดอยู่ใน 25 family และไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้ 3 ตัวอย่าง โดยทั่วไปฤทธิ์ต้านแคนดิดาของสารสกัดเห็ดที่สกัดด้วย ethyl acetate ให้ผลบวกมากกว่าการสกัดด้วย methanol และ chloroform แต่พบว่าสารสกัดหยาบของ *Polyporus* PHK 24. ที่สกัดด้วย methanol ให้ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากที่สุด ประมาณ 15 มิลลิเมตร มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่า Rf ของ active fraction ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ มีค่าเท่ากับ 0.56 จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเห็ดป่าบางชนิดมีศักยภาพสามารถผลิตสารต้านการเจริญของ *Candida* spp. ได้

คำสำคัญ เห็ดป่า ฤทธิ์ต้านแคนดิดา อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
Abstract	ข
บทคัดย่อ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการวิจัย	9
บทที่ 4 ผลการวิจัย	13
บทที่ 5 อภิปราย และสรุปผลการวิจัย	27
ข้อเสนอแนะ	30
เอกสารอ้างอิง	31
ประโยชน์ที่ได้รับ	35
ภาคผนวก	36

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.	แสดงจำนวนตัวอย่างเห็ดทั้งหมดที่สามารถได้ในแต่ละฤดู	13
ตารางที่ 2.	จำนวน วงศ์ และ ชนิด ของเห็ดราที่พบในไฟลัม Basidiomycota และ Ascomycota ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า ในระหว่าง ธันวาคม 2551– ธันวาคม 2552	15
ตารางที่ 3.	แสดงผลของฤทธิ์ต้านแคนดิดาของน้ำสกัดของของเส้นใย และน้ำสกัดของดอกเห็ด (ชนิดของตัวทำละลาย)	25

สารบัญรูปร่างภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงแผนที่ที่ตั้งของอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก	3
รูปที่ 2. แสดงลักษณะโครงสร้างของเห็ด	4
รูปที่ 3. แสดงวงชีวิตของเห็ด	5
รูปที่ 4. ก. ลักษณะโคโลนีของ <i>Candida albicans</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose broth ข. ลักษณะ budding cell ของ <i>Candida albicans</i>	6
รูปที่ 5. ก. ลักษณะ chlamyospore (C) และ pseudohypha (P) ของ <i>Candida albicans</i> ข. รอยแผ่นฝ้าลักษณะเป็นปื้น บนลิ้นของผู้ป่วยโรค candidiasis	6
รูปที่ 6. แสดงตำแหน่งบริเวณเก็บตัวอย่างเห็ดป่าในพื้นที่อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จำนวน 14 จุด	14
รูปที่ 7. ตัวอย่างเห็ดสกุล <i>Amanita</i> spp. ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Amanita</i> sp.1 (2) <i>Amanita hemibapha</i> (3) <i>Amanita</i> sp.2 (4) <i>Amanita pantherina</i>	17
รูปที่ 8. เห็ดกระด้างที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Ganoderma lucidum</i> (2) <i>Fomitopsis</i> sp. (3) <i>Ganoderma applanatum</i> (4) <i>Trametes</i> sp. (5) <i>Lentizite vespacea</i> (6) <i>Amauroderma rugosum</i>	18
รูปที่ 9. เห็ดโคนที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Termitomyces eurrhiza</i> และรังปลวก (2) <i>Termitomyces eurrhiza</i> (3) <i>Termitomyces clypeatus</i>	19
รูปที่ 10. เห็ดในวงศ์ boletaceae ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Boletus</i> sp. (2) <i>Boletus chromapes</i>	19
รูปที่ 11. เห็ดในวงศ์ russulaceae ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Russula</i> sp. (2) <i>Russula fragilis</i>	20
รูปที่ 12. Coral fungi ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Thelephora vialis</i> . (2) <i>Pterula verticella</i> (3) Unidentified (4) <i>Scyntinoogon angulisporus</i>	20
รูปที่ 13. เห็ดกระด้างที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Stereum ostrea</i> (2) <i>Microporus xanthopus</i> (3) <i>Pycnoporus sanguineus</i>	21
รูปที่ 14. Coral fungi ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Thelephora vialis</i> . (2) <i>Pterula verticella</i> (3) Unidentified (4) <i>Scyntinoogon angulisporus</i>	22
รูปที่ 15. เห็ด class Gasteromycetes ที่สำรวจพบในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า (1) <i>Scleroderma polyrhizum</i> (2) <i>Scleroderma sinnamariense</i> (3) <i>Lycopodon</i> sp.	23

รูปที่ 16. แสดงตัวอย่างเห็ดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแคนดิดาดีที่สุด

26

- ก. ลักษณะของดอกเห็ด *Polyporus* PHK 24
- ข. เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol (A1:15 มม.)
Chloroform (A2 : 9 mm) ethyl acetate (A3: 7 mm)
- ค. แสดงภาพโครมาโตแกรม ของ active fraction ของ methnolic crude extract