วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 29 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2567
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 29 (No.3) September – December 2024 บทความวิจัย

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบฟรุติโคสไลเคนสกุล *Usnea*

Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts from Fruticose Lichen genus *Usnea*

อารีรัตน์ ใสส่อง[1,2*], ขวัญุเรือน นาคสุวรรณ์กุล[1,2], กวินนาถ บัวเรือง[3] และ H. Thorsten Lumbsch[4]

Areerat Saisong[1,2*],Khwanyuruan Naksuwankul[1,2], Kawinnat Buaruang[3] and H. Thorsten Lumbsch[4]

[1]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประเทศไทย*

[2]*หน่วยวิจัยเห็ดและไลเคนส์เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประเทศไทย*

[3]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ประเทศไทย*

[4]*Science & Education, The Field Museum, USA*

[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Thailand*

[2]*Research Unit of Mushroom and Lichens for Sustainable Utilization, Mahasarakham University, Thailand*

[3]*Department of Biology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Thailand*

[4]*Science & Education, The Field Museum, USA*

Received : 25 July 2024, Received in revised form : 9 October 2024, Accepted : 25 October 2024

Available online : 6 November 2024

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรีย และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และแทนนินของสารสกัดหยาบฟรุติโคสไลเคนสกุล *Usnea*

วิธีดำเนินการวิจัย : นำไลเคนสกุล *Usnea* มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เอทานอลร้อยละ 95 อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และน้ำร้อน การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP assay ส่วนการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion และวิธี Broth microdilution ในการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration; MBC)

ผลการวิจัย : ผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดในทั้ง 3 วิธี โดย DPPH assay มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.741±0.021 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิธี ABTS assay มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.001±0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในวิธี FRAP assay มีค่า FRAP value เท่ากับ 27.927±0.129 มิลลิกรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัดหยาบตามลำดับ การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 อะซิโตน และเอทิลอะซิเตท สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus cereus* TISTR 1449, *Staphylococcus epidermidis* TISTR 2162 และ *Escherichia coli* TISTR 527 ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287 สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลร้อยละ 95 สามารถยับยั้งและฆ่า

แบคทีเรียทั้งสามชนิด มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียชนิดเดียวคือ *B. cereus* TISTR 1449 มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์ และแทนนินสูงที่สุดเท่ากับ 93.772±2.847, 36.847±0.613, 90.467±2.784 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย : งานวิจัยนี้เป็นรายงานการทดสอบฤทธิ์ต้านนอุมูลอิสระและยับยั้งแบคทีเรียของไลเคนสกุล *Usnea* จากการศึกษางานวิจัยนี้ให้ข้อมูลเชิงลึกอันมีค่าที่เป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาและการประยุกต์ใช้ในอนาคตในอุตสาหกรรมยาและอาหาร ช่วยเพิ่มการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมากขึ้น

คำสำคัญ : การต้านอนุมูลอิสระ ; การยับยั้งแบคทีเรีย ; สารสกัดหยาบ ; ไลเคน

Abstract

Background and Objectives : This research aims to evaluate the potential of antioxidant and antibacterial potential of crude extracts from the lichen genus *Usnea*, along with the analysis of total phenolic, flavonoid, and tannin contents. The study investigates the effectiveness of these extracts against various bacterial strains and their potential applications in the pharmaceutical and food industries.

Methodology : The lichen genus *Usnea* was extracted using four solvents: 95% ethanol, acetone, ethyl acetate, and boiling water, to isolate bioactive compounds. Antioxidant activities were assessed using DPPH, ABTS, and FRAP assays. Antibacterial activities were evaluated using agar well diffusion and broth microdilution methods, with further analysis of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC).

Main Results : The results show the highest antioxidant activities in boiling water, with DPPH having an IC_{50} of 0.741±0.021 mg/ml, ABTS having an IC_{50} of 1.001±0.005 mg/ml, and the FRAP value being 27.927±0.129 mg $FeSO_4$/g extract. The antibacterial properties of the ethanolic, acetone, and ethyl acetate extracts showed that they have a capacity to inhibit *Bacillus cereus* TISTR 1449, *Staphylococcus epidermidis* TISTR 2162, and *Escherichia coli* TISTR 527, but they are not effective against *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287. Three stains showed ethanolic extract with MIC and MBC values of 20 mg/ml. The aqueous extract had MIC and MBC values of 40 mg/ml, resulting in a inhibition of *B. cereus* TISTR 1449. Furthermore, the ethanolic extract contained a high amount of total phenolic content (93.772±2.847 mg/g extract), total flavonoid content (36.847±0.613 mg/g extract), and tannin content (90.467±2.784 mg/g extract).

Conclusions : This study demonstrates the antioxidant and antibacterial effects of *Usnea* lichen extracts, providing insights for potential applications in various industries. These findings provide valuable insights for future

development and application in pharmaceutical and food industries, enhancing the use of natural products for health-related benefits.

Keywords : antioxidant ; antibacterial ; crude extract ; lichen

***Corresponding author. E-mail:** areratsaisong99@gmail.com

บทนำ

ไลเคนเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในอาณาจักรฟังไจ เกิดจากการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกันระหว่างราและสาหร่ายสีเขียวหรือในบางชนิดอาจเป็นไซยาโนแบคทีเรีย โดยราทำหน้าที่กักเก็บความชุ่มชื้นในบรรยากาศ สาหร่ายทำหน้าที่สร้างอาหารด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยใช้น้ำจากรา ส่วนราได้ประโยชน์จากอาหารที่สาหร่ายสร้าง (Lagostina *et al*., 2018) ไลเคนมีความสำคัญและประโยชน์อย่างมาก ที่สำคัญได้แก่ เป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพทางอากาศ ใช้เป็นสีย้อม ใช้เป็นยารักษาโรค เป็นอาหารของกวางเรนเดียร์ ใช้เป็นส่วนผสมในน้ำหอม ใช้ทำกระดาษลิสมัส ใช้เป็นส่วนผสมในขนมปังและซุป เป็นยาช่วยย่อย (Römpp, 1995; Nash III, 1996) นอกจากนี้สารที่ไลเคนยังสร้างสารกลุ่มทุติยภูมิ (Secondary metabolite) หรือเรียกว่า สารไลเคน (Lichen substances) ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่สร้างจำเพาะในไลเคนเท่านั้น ซึ่งมีรายงานการศึกษาค้นพบว่าสารเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รายงานตีพิมพ์ครั้งแรกในปีค.ศ. 1944 โดยผู้วิจัยรายงานว่าพบสารไลเคนทั้งหมด 27 ชนิด จากไลเคน 42 ชนิด โดย พบว่าสารสกัดจากไลเคนยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Proteus vulgaris* และ *Alcaligenes faecalis* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ได้ (Naksuwankul, 2015; Zhao *et al*., 2021) ไลเคนส่วนใหญ่สามารถสร้างสารประกอบกลุ่มพอลีฟีนอล ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและกำจัดสารอนุมูลอิสระและไอออน นอกจากนี้ สารพวกฟีนอลิกยังใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหาร ป้องกันการออกซิเดชันในอาหารได้อีกด้วย (Muangsan *et al*., 2018)

ไลเคนสกุล *Usnea* จัดอยู่ในไฟลัมแอสโคไมโคตา (Phylum Ascomycota) หนึ่งในสกุลที่มีสมาชิกมากที่สุดในวงศ์ Parmeliaceae (Funk *et al*., 2018) ทั่วโลกมีไลเคนสกุล *Usnea* ประมาณ 600 สปีชีส์ (Jannah *et al*., 2021) ไลเคนสกุลนี้เป็นไลเคนที่มีรูปแบบการเจริญเติบโตแบบฟรุติโคส (Fruticose) มีลักษณะสัณฐานเป็นเส้นสาย มักเรียกว่า หนวดเคราฤๅษี (Old Man's beard) มีสีเขียวอมเหลืองอันเนื่องมาจากการสร้างสารสำคัญที่เรียกว่า กรดอูสนิก (Usnic acid) (Figure 1) ไลเคนกลุ่มนี้สามารถพบการกระจายได้ทุกทวีป ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับไลเคนนั้นยังมีอยู่อย่างจำกัด ก่อนหน้านี้การจำแนกไลเคนจะศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างภายในและสารเคมี ปัจจุบันมีการศึกษาโดยใช้ข้อมูลทางโมเลกุลร่วมด้วยเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องมากขึ้น (Lamb, 1964)

Figure 1 The morphological characteristic of the lichen genus *Usnea*

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากไลเคนสกุล *Usnea* พบมากในงานวิจัยต่างประเทศ ซึ่งในประเทศไทยมีการรายงานการระบุชนิดไลเคนสกุล *Usnea* ไว้เพียง 13 ชนิดเท่านั้น (Buaruang *et al*, 2017) และยังไม่มีการศึกษาสารไลเคนและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากไลเคนกลุ่มนี้ ผนวกกับมีการรายงานว่าในอดีตมีการใช้ไลเคนต้มเป็นยารักษาโรค เช่น โรคท้องผูก พบในภูมิปัญญาของชาวยุโรป อินเดีย และจีน (Khwanruan, 2012) ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญต่อการศึกษาสารออกฤทธิ์ในไลเคนกลุ่มนี้ การวิจัยนี้เป็นการทดสอบศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบไลเคนสกุล *Usnea* ซึ่งเป็นไลเคนกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีการเจริญเติบโตเป็นเส้นสาย ทำให้ง่ายต่อการสกัด นอกจากนี้ไลเคนชนิดนี้ยังพบในบริเวณที่มีสภาพอากาศบริสุทธิ์ ทำให้ไม่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักซึ่งอาจส่งผลต่อการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียและการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยความสำคัญและประโยชน์ของไลเคนสกุล *Usnea* ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ของไลเคนชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาเชิงลึกในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงสำหรับการทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Bacillus cereus* TISTR 1449, *Staphylococcus epidermidis* TISTR 2162, *Escherichia coli* TISTR 527, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287

การเก็บตัวอย่างไลเคน

เก็บตัวอย่างไลเคนสกุล *Usnea* ในเส้นทางศึกษาธรรมชาติ อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก ระบุรายละเอียดข้อมูลภาคสนาม ได้แก่ ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง หมายเลขตัวอย่าง วันเดือนปีที่เก็บ ระดับความสูงน้ำทะเล แหล่งอาศัยและสถานที่ เพื่อนำไประบุชนิดในห้องปฏิบัติการโดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างภายใน และสารเคมีร่วมกัน

สารสกัดหยาบไลเคน

นำตัวอย่างไลเคนไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อเพิ่มพื้นที่ในการสกัด นำไปชั่ง 6 กรัม เติมตัวทำละลายปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยทำการสกัด 2 วิธี คือ 1) การสกัดด้วยการหมัก (Maceration) ด้วยเอทานอลร้อยละ 95 อะซิโตน และเอทิลอะซิเตท หมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาสารละลายใสในขวดดูแรนแล้วนำกากตัวอย่างไลเคนที่เหลือจากการกรองไปหมักซ้ำและกรองรวมกันอีก 2 ครั้ง และ 2) การสกัดด้วยการต้มด้วยน้ำร้อน (Boiling) โดยต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาสารและทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน และทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จะได้สารสกัดหยาบไลเคนที่มีลักษณะเป็นผง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยละลายด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัดให้มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทำได้โดยปิเปตตัวอย่างลงใน 96 เวลเพลท ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 75 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายเฟอรินเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 45 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างสารสกัดไลเคนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Rattana & Sungthong, 2017; Lertcanawanichakul *et al*., 2019)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยละลายด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัดให้มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทำได้โดยปิเปตตัวอย่างลงใน 96 เวลเพลท ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างสารสกัดไลเคนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Daupor *et al*., 2017; Phoprapai & Oontawee, 2019)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบแทนนิน

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยละลายด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัดให้มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบแทนนินทำได้โดยปิเปตตัวอย่างลงใน 96 เวลเพลท ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 75 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายเฟอรินเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 45 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบแทนนินในตัวอย่างสารสกัดไลเคนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Rattana & Sungthong, 2017; Lertcanawanichakul *et al*., 2019)

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

หลักการของวิธีนี้จะวัดความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยละลายด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัดให้มีความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระโดยปิเปตตัวอย่างลงใน 96 เวลเพลท ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติมสารละลายดีพีพีเอชความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร (Lertcanawanichakul *et al*., 2019; Wannawet & Thiangphet, 2017) คำนวณหาร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (%radical scavenging) ของตัวอย่างสารสกัดไลเคนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ดังสมการที่ (1) และรายงานค่าเป็นความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) หาได้จากการสร้างกราฟเส้นตรงระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัด กับ % inhibition โดยใช้สมการเส้นตรง y = ax + b และคำนวณค่า IC_{50} โดยแทน y เท่ากับ 50

$$\%\,\text{radical scavenging} = \left[\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}}\right] x100 \qquad (1)$$

โดยที่ A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายปฏิกิริยาของชุดควบคุมซึ่งไม่เติมสารสกัด

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

หลักการของวิธีนี้จะวัดความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกันกับวิธี DPPH assay ทดสอบโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยละลายด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัดให้มีความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระโดยปิเปตตัวอย่างลงใน 96 เวลเพลท ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอบีทีเอสความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 4 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (Lertcanawanichakul *et al*., 2019; Sae-chan *et al*., 2020) คำนวณหาร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (%radical scavenging) ของตัวอย่างสารสกัดไลเคนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ ดังสมการที่ (1) และรายงานค่าเป็นความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) หาได้จากการสร้างกราฟเส้นตรงระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัด กับ % inhibition โดยใช้สมการเส้นตรง y = ax + b และคำนวณค่า IC_{50} โดยแทน y เท่ากับ 50

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

หลักการของวิธีนี้จะวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระ เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยละลายด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัดให้มีความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์ปริมาณการต้านอนุมูลอิสระโดยปิเปตตัวอย่างลงใน 96 เวลเพลท ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย FRAP (เตรียมได้จากเฟอริกคลอไรด์ TPTZ และอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 3.6 อัตราส่วน 1:1:10) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 4 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดไลเคนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟตและรายงานค่าเป็นมิลลิกรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อกรัมของสารสกัด (Sae-chan *et al*., 2020; Xiao *et al*., 2020)

การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar Well Diffusion

เตรียมสารสกัดไลเคนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ร้อยละ 3 ให้มีความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น 1.5 x 10^8 CFU/ml ในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 เทียบความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland จากนั้นนำแบคทีเรียที่เตรียมไปเกลี่ยบนหน้าจานอาหาร MHA เจาะหลุมอาหารด้วยคอร์กบอเรอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หยดสารสกัดไลเคนลงในหลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำ 3 ซ้ำโดยใช้ยาปฏิชีวนะTetracycline และ Ciprofloxacin เป็นตัวควบคุมบวก และ 3% DMSO เป็นตัวควบคุมลบ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) (Goel *et al*., 2021)

การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)

ทดสอบด้วยเทคนิค Broth dilution techniques ในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) โดยการเตรียมสารสกัดไลเคนให้มีความเข้มข้น 1.25-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน MHB เติมแบคทีเรียที่เตรียมในโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยใช้ยาปฏิชีวนะTetracycline และ Ciprofloxacin เป็นตัวควบคุมบวก และ 3% DMSO เป็นตัวควบคุมลบ จากนั้นอ่านผลการทดสอบโดยการหยดสี Resazurin เข้มข้นร้อยละ 0.01 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลุม 96 เวลเพลต ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี หากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูแสดงว่ามีเชื้อเจริญ และหากสารไม่เปลี่ยนสีหรือเป็นสีเดิมแสดงว่าไม่มีเชื้อเจริญ นั่นหมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่นำมาทดสอบที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย (Srivastava *et al*., 2013)

การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าแบคทีเรียได้ (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)

ทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าแบคทีเรียด้วยเทคนิค Broth dilution techniques ทำได้โดยการนำเชื้อที่ทดสอบจากวิธี MIC ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก่อนหยดสี Resazurin) มาเขี่ยบนจานอาหาร MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ยาปฏิชีวนะ Tetracycline และ Ciprofloxacin เป็นตัวควบคุมบวก และ 3% DMSO เป็นตัว

ควบคุมลบ จากนั้นอ่านผลโดยการสังเกตโคโลนีของแบคทีเรียบนหน้าจานอาหาร หากไม่มีเชื้อเจริญบนจานอาหารแสดงถึงความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดที่นำมาทดสอบที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย (Srivastava *et al*., 2013)

ผลการวิจัย

ร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบฟรูติโคสไลเคน

การสกัดสารจากไลเคนด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ เอทานอลร้อยละ 95 อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และการต้มด้วยน้ำร้อน พบว่า สารสกัดไลเคนที่ต้มด้วยน้ำร้อนมีร้อยละผลผลิตมากที่สุด โดยมีร้อยละผลผลิตเท่ากับ 24.73 รองลงมาคือ สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เอทานอลร้อยละ 95 และอะซิโตน ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Extraction yields of lichen genus *Usnea* with four different solvents

Solvents	%Yield	Color
95% Ethanol	14.37	Reddish brown
Acetone	9.32	Pale yellow
Ethyl acetate	13.78	Creamy
Boil	24.73	Brown

นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันนั้นส่งผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบและลักษณะทางกายภาพ เช่น สี เนื้อสาร ที่แตกต่างกันด้วย (Figure 2)

Figure 2 Lichen extracts (A) 95% ethanol (B) acetone (C) ethyl acetate (D) boiling water

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบฟรุติโคสไลเคน

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบฟรุติโคสไลเคน พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด 93.772±2.847 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ โดยสารสกัดหยาบไลเคนที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากรองลงมาได้แก่ สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท อะซิโตน และน้ำร้อน ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Total phenolic, flavonoid, and tannin content in lichen extracts with 4 different solvents

Lichen crude extracts	Total Phenolic Content (mgGAE/gExtract)	Total Flavonoid Content (mgQE/gExtract)	Total Tannin Content (mgTannic acid/gExtract)
95% Ethanol	93.772±2.847[a]	36.847±0.613[a]	90.467±2.784[a]
Acetone	48.247±2.299[c]	24.294±0.240[b]	46.385±2.245[c]
Ethyl Acetate	53.809±0.523[b]	9.318±0.399[d]	51.759±0.507[b]
Boiling water	15.750±1.223[d]	11.839±0.393[c]	15.564±0.112[d]

**Note:* a, b, c, d represent statistically significant differences in data sets ($p<0.05$)

ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบฟรุติโคสไลเคน

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบฟรุติโคสไลเคน พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุด เท่ากับ 36.847±0.613 มิลลิกรัมสมมูลย์ของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัดหยาบ โดยสารสกัดหยาบไลเคนที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากรองลงมาได้แก่ สารสกัดด้วยอะซิโตน น้ำร้อน และเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ (Table 2)

ปริมาณสารประกอบแทนนินในสารสกัดหยาบฟรุติโคสไลเคน

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินในสารสกัดหยาบฟรุติโคสไลเคน พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีปริมาณสารประกอบแทนนินมากที่สุด เท่ากับ 90.467±2.784 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแทนนิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ รองลงมาได้แก่ สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท อะซิโตน และน้ำ ตามลำดับ (Table 2)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบฟรุติโคสไลเคน พบว่า สารสกัดด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.741±0.021 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท อะซิโตน และเอทานอลร้อยละ 95 ตามลำดับ (Table 3)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบฟรุติโคสไลเคน พบว่า สารสกัดด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 1.001±0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท อะซิโตน และเอทานอลร้อยละ 95 ตามลำดับ (Table 3)

Table 3 Antioxidant potential in lichen extracts with 4 different solvents

Lichen crude extracts	DPPH IC_{50} (mg/ml)	ABTS IC_{50} (mg/ml)	FRAP value (mg $FeSO_4$/g extract)
95% Ethanol	1.945±0.044[a]	3.250±0.015[a]	17.921±0.386[c]
Acetone	1.304±0.034[b]	3.151±0.009[b]	13.626±0.614[d]
Ethyl Acetate	1.143±0.048[c]	3.107±0.012[c]	18.978±0.117[b]
Boiling water	0.741±0.021[d]	1.001±0.005[d]	27.972±0.129[a]

**Note:* a,b,c,d represent statistically significant differences in data sets ($p<0.05$)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบฟรุติโคสไลเคน พบว่า สารสกัดด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีค่า FRAP value สูงที่สุดเท่ากับ 27.972 มิลลิกรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัดหยาบ รองลงมาได้แก่ สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เอทานอลร้อยละ 95 และอะซิโตน ตามลำดับ (Table 3)

ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar Well Diffusion

ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่า สารสกัดหยาบฟรุติโคสไลเคนที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 อะซิโตน และเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus S. epidermidis* และ *E. coli* ได้ ส่วนสารสกัดด้วยน้ำร้อนยับยั้งได้เพียงแบคทีเรีย *B. cereus* เท่านั้น โดยสารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* และ *S. epidermidis* ได้ดีที่สุด (Figure 3) มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 24.00±0.87 และ 20.67±0.57 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดด้วยอะซิโตนสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ได้ดีที่สุด มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 19.17±0.58 มิลลิเมตร สารสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิดไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ได้ โดยที่ยาปฏิชีวนะ Tetracycline และ Ciprofloxacin ตัวควบคุมบวก มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 38.50±0.87, 47.17±4.16, 49.50±0.58, 47.33±1.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วน 3% DMSO ตัวควบคุมลบไม่แสดงบริเวณยับยั้ง ดังแสดงใน Figure 3 และ Table 4

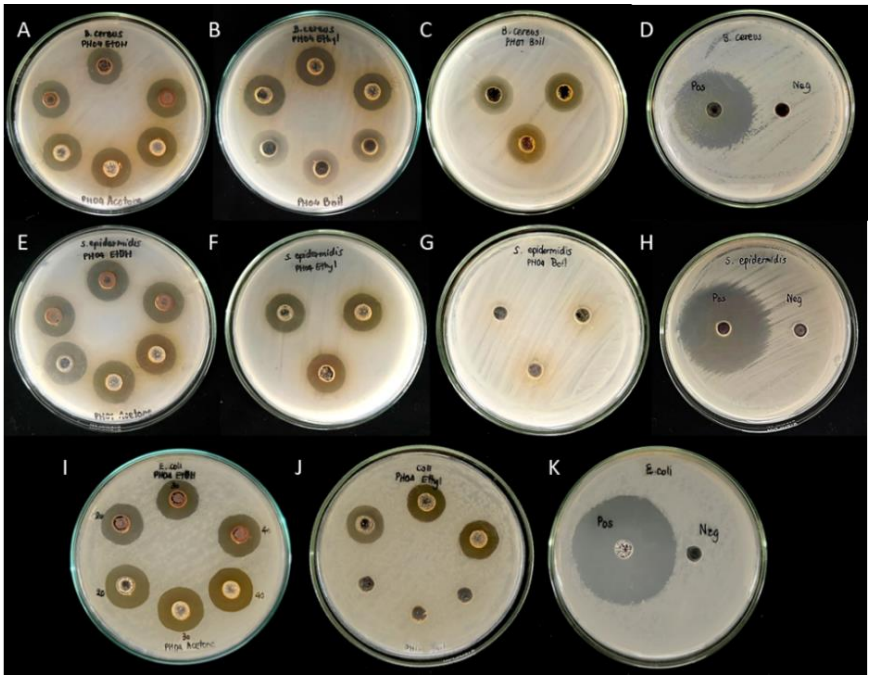

Figure 3 Inhibition zone of lichen extracts using four solvents to inhibit bacterial strains (A-D) *B. cereus* TISTR 1449 (E-H) *S. epidermidis* TISTR 2162 (I-K) *E. coli* TISTR 527

Table 4 Diameters of inhibition zone (mm) of lichen extracts

Lichen extracts	Diameters of inhibition zone (mm)			
	B. cereus TISTR 1449	*S. epidermidis* TISTR 2162	*E. coli* TISTR 527	*P. aeruginosa* TISTR 1287
95% Ethanol	24.00±0.87	20.67±0.57	18.89±1.15	-
Acetone	23.67±0.76	19.83±0.76	19.17±0.58	-
Ethyl acetate	21.50±0.87	19.83±0.29	18.83±0.58	-
Boiling water	16.17±2.31	-	-	-
Positive control	38.50±0.87	47.17±4.16	49.50±0.58	47.33±1.15

- : No inhibition zone observed; Positive control = Tetracycline (*B. cereus, S. epidermidis*), Ciprofloxacin (*E. coli, P. aeruginosa*)

ผลการทดสอบ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

การทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ยับยั้งแบคทีเรียได้ พบว่า สารสกัดไลเคน ที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารอื่นใช้ความเข้มข้นต่ำสุด 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบกับเชื้อ *S. epidermidis* พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล อะซิโตน และเอทิลอะซิเตทใช้ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการทดสอบกับเชื้อ *E. coli* พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตทของไลเคน ยับยั้งเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 5)

ผลการทดสอบ Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าแบคทีเรียได้ พบว่า สารสกัดไลเคนที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ฆ่าแบคทีเรีย *B. cereus* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารอื่นใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุด 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบกับเชื้อ *S. epidermidis* พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล อะซิโตน และเอทิลอะซิเตท ใช้ความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการทดสอบกับเชื้อ *E. coli* พบว่าสารสกัดด้วยอะซิโตนของไลเคนฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงใน Table 5

Table 5 Evaluation of Antibacterial activity of MICs and MBCs (mg/ml)

Lichen extracts	MICs (mg/ml)			MBCs (mg/ml)		
	B. cereus TISTR 1449	*S. epidermidis* TISTR 2162	*E. coli* TISTR 527	*B. cereus* TISTR 1449	*S. epidermidis* TISTR 2162	*E. coli* TISTR 527
95% Ethanol	20	20	20	20	20	40
Acetone	40	20	40	40	20	40
Ethyl acetate	40	20	20	40	20	40
Boiling water	40	-	-	40	-	-

- : No inhibition observed

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการทดสอบวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบไลเคนที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีสารประกอบฟีนอลิกฟลาโวนอยด์ และแทนนินมากที่สุด อาจเนื่องจากตัวทำละลายที่เป็นเอทานอลเป็นสารละลายที่มีขั้วสามารถดึงเอาสารทุติยภูมิที่สำคัญในไลเคน ซึ่งเป็นสารละลายที่มีขั้วเช่นเดียวกัน ตามหลักการละลาย like dissolve like สอดคล้องกับการศึกษาของ Popovici *et al.* (2022) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดหยาบไลเคน *U. barbata* พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดเท่ากับ 573.234 ± 42.308 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด ในขณะที่ผลการศึกษา

การประเมินปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดไลเคนของ Aydin *et al*. (2018) พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลก็มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงที่สุดเท่ากับ 20.85 ± 0.005 ไมโครกรัมเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบแทนนินพบว่างานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรก

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบไลเคน *Usnea* พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดทั้ง 3 วิธีทดสอบ ได้แก่ DPPH, ABTS และ FRAP assay ซึ่งแตกต่างงานวิจัยของ Pavithra *et al*. (2013) ที่ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของไลเคน *U. pictoides* ด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay พบว่าสารสกัดด้วยอะซิโตนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และงานวิจัยของ Londoñe-Bailon *et al*. (2019) ทดสอบด้วยวิธี ABTS assay พบว่า สารสกัดไลเคนที่สกัดด้วยเมทานอลและอะซิโตนแสดงศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 19.422 ± 0.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดด้วยน้ำแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดแม้ว่าไม่ได้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุด อาจเนื่องจากสารสกัดไลเคนที่สกัดด้วยน้ำร้อนดึงเอาสารออกฤทธิ์ในกลุ่มปฐมภูมิ (Primary metabolite) ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ ซึ่งเป็นสารจำพวกโปรตีนและพอลีแซคคาไรด์ มีการรายงานว่าพอลีแซคคาไรด์มีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ โดยพอลีแซคคาไรด์จะยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่เป็นตัวดักจับและรับอิเล็กตรอนทำให้ปริมาณสารอนุมูลอิสระลดลงได้ (Fernandes & Coimbra, 2023)

การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ของสารสกัดจากไลเคน *Usnea* พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* และ *S. epidermidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* และ *P. aeruginosa* อาจเนื่องจากโครงสร้างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Suwanphinij & Suwanphinij, 1998) โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นเพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) บางกว่า ประกอบด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น คือ เยื่อหุ้มชั้นนอก (Outer membrane) และเยื่อหุ้มชั้นใน (Inner membrane) ซึ่งส่วนของเมมเบรนชั้นนอกทำให้แบคทีเรียมีคุณสมบัติทนต่อการทำลายได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วยสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) เป็นโครงสร้างที่ไม่สมมาตร มีประโยชน์ในการช่วยปกป้องเซลล์ทนต่อการทำลายของสารได้ (Srisukong *et al*., 2016) นอกจากนี้ จากการหาสารสำคัญก่อนหน้าพบว่าสารสกัดไลเคนมีสารประกอบแทนนิน ซึ่งแทนนินมีประจุเป็นลบจะไปจับกับสารประจุบวกที่อาจพบได้ในไลเคน สามารถทำให้โครโมโซมของแบคทีเรียแตกได้ (Farha *et al*., 2020) หรือแทนนินสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้โดยการทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ผนังเซลล์ไม่ทำงานหรือโดยการจับกับผนังเซลล์โดยตรง (Trentin *et al*., 2013) ส่วนการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และ *P. aeruginosa* พบว่าสารสกัดไลเคนไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ได้ อาจเนื่องจาก *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการสร้างแคปซูลห่อหุ้มและสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (Nunez *et al*., 2023) ซึ่งในไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแกรมลบประกอบไปด้วยสารพอลีแซคคาไรด์ที่ทำให้แบคทีเรียแกรมลบสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ ส่งผลต่อการอยู่รอดและการเจริญของแบคทีเรีย ช่วยให้แบคทีเรียมีความต้านทานต่อการยับยั้งมากขึ้น (Laverty *et al*., 2014) อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dieu *et al*. (2020) ศึกษาการยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจาก

ไลเคน *U. florida* ด้วยอะซิโตน พบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus*, *C. albicans* และ *A. brasiliensis* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้

จากการศึกษางานวิจัยนี้พบข้อจำกัดในเรื่องของการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากตัวอย่างไลเคนสกุล *Usnea* เป็นไลเคนที่พบได้ในสภาพแวดล้อมที่มีอากาศบริสุทธิ์เท่านั้น บริเวณที่พบมักจะอยู่บนเขาสูงและบนต้นไม้สูง ทำให้การเก็บค่อนข้างยากลำบากและปริมาณตัวอย่างแต่ละบริเวณพบได้น้อย ส่งผลต่อการนำมาสกัดสารซึ่งอาจไม่เพียงพอต่อการนำมาทดสอบ นอกจากนี้ งานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดไลเคนเท่านั้น เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาที่จำเพาะมากขึ้น อาจมีการศึกษาจำแนกสารสำคัญที่พบในไลเคนเพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์เพิ่มเติมได้ โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมี เช่น การวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) เป็นต้น

สรุปผลการวิจัย

ไลเคนเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีการนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน ทั้งเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพทางอากาศ นำไปใช้ในอุตสาหกรรมยารวมไปถึงผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบไลเคนสกุล *Usnea* ประกอบไปด้วยสารประกอบกลุ่มพอลีฟีนอล ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบบางชนิดได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้อาจเป็นแนวทางที่จะนำไปสู่การพัฒนาและประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมยาและอาหาร หรือการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ดีมากขึ้นในอนาคต ที่สำคัญงานวิจัยนี้ยังเป็นข้อมูลสำคัญที่นำไปสู่งานวิจัยใหม่ที่ศึกษาต่อยอดจากผลการวิจัยนี้ได้ เช่น การศึกษากลไกทางชีวเคมีหรือการทดสอบกับจุลชีพอื่น ๆ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม สนับสนุนอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการปฏิบัติการทดลอง ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Aydin, S., Kinalioğlu, K., & Sökmen, B. B. (2018). Antioxidant, anti-urease, and anti-elastase activities of *Usnea longissima* Ach. *Bangladesh Journal of Botany, 47*(3), 429-435.

Buaruang, K., Boonpragob, K., Mongkolsuk, P., Sangvichien, E., Vongshewarat, K., Polyiam, W., & Lumbsch, T. (2017). A new checklist of lichenized fungi occurring in Thailand. *MycoKeys*, *23*, 1.

Daupor, Saha, Chelong, Meechai & Waema. (2017). Determination of Total Flavonoid Content from *Propolis Stingless* Bee and Bacterial Inhibition of *Escherichia coli* in Soap Product. *In The Sixth National Conference. Fatoni University, Yala*. (in Thai)

Dieu, A., Mambu, L., Champavier, Y., Chaleix, V., Sol, V., Gloaguen, V., & Millot, M. (2020). Antibacterial activity of the lichens *Usnea Florida* and *Flavoparmelia caperata* (Parmeliaceae). *Natural product research*, *34*(23), 3358-3362.

Farha, A. K., Yang, Q. Q., Kim, G., Li, H. B., Zhu, F., Liu, H. Y., & Corke, H. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*, *38*, 100751.

Fernandes, P. A., & Coimbra, M. A. (2023). The antioxidant activity of polysaccharides: A structure-function relationship overview. *Carbohydrate Polymers*, *314*, 120965.

Funk, E. R., Adams, A. N., Spotten, S. M., Van Hove, R. A., Whittington, K. T., Keepers, K. G., & Kane, N. C. (2018). The complete mitochondrial genomes of five lichenized fungi in the genus *Usnea* (Ascomycota: Parmeliaceae). *Mitochondrial DNA Part B*, *3*(1), 305-308.

Goel, M., Singh, R., Kumar, A., & Singh, S. (2021). Inhibition of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by combination of oxacillin and a bioactive compound from *Ramalina roesleri*. *Microbial Pathogenesis*, *150*, 104676.

Jannah, M., Hariri, M. R., Kasiamdari, R. S., & Handayani, N. S. N. (2021). The Use of DNA Barcoding and Phylogenetic Analysis to Improve Identification of *Usnea* spp. Based on ITS rDNA. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, *6*(1), 58635.

Khwanruan Papong. (2012). Lichen for Traditional Medicine. *Thai Journal of Botany*, *4*(1), 1-13.

Lagostina, E., Dal Grande, F., Andreev, M., & Printzen, C. (2018). The use of microsatellite markers for species delimitation in Antarctic *Usnea* subgenus Neuropogon. *Mycologia*, *110*(6), 1047-1057.

Lamb, I. M. (1964). Antarctic lichens: I. The genera *Usnea*, *Ramalina*, *Himantormia*, *Alectoria*, *Cornicularia*.

Laverty, G., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2014). Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. *Pathogens*, *3*(3), 596-632.

Lertcanawanichakul, Chawawisit, & Hiransai. (2019). Biological Activities of Extracts from Some Local Plants in Pakpanang, Nakhon Si Thammarat Province: Antioxidant and Antibacterial Activity. *Rajamangala University of Technology Srivijaya Research Journal*, *11(2)*, 279-289. (in Thai)

Londoñe-Bailon, P., Sánchez-Robinet, C., & Alvarez-Guzman, G. (2019). In vitro antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activity of methanol-acetone extracts from Antarctic lichens (*Usnea antarctica* and *Usnea aurantiacoatra*). *Polar Science, 22*, 100477.

Muangsan, Suwanwaree & Papong. (2018). Ecology, distribution and genetic diversity of the lichens genus *Graphis* in Thailand. (in Thai)

Naksuwankul. (2015). *Taxonomy of Lichens*. Khon Kaen: Siriphan (2497) Company Limited. (in Thai)

Nash III, T.H. (1996). Introduction. In: Nash III, T.H (ed). *Lichen Biology*. Cambridge University 94 Press.3

Nunez, C., Kostoulias, X., Peleg, A. Y., Short, F., & Qu, Y. (2023). A comprehensive comparison of biofilm formation and capsule production for bacterial survival on hospital surfaces. *Biofilm*, *5*, 100105.

Pavithra, G. M., Vinayaka, K. S., Rakesh, K. N., Junaid, S., Dileep, N., TR, P. K., & Naik, A. S. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of a macrolichen *Usnea pictoides* G. Awasthi (Parmeliaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *3*(8), 154-160.

Phonprapai C., & Oontawee S. (2019). Development of Extraction Process for Preparing High Anti-oxidant Extracts from Thai Herbs. *Journal of Science and Technology, 8(5)*, 479-492. (in Thai)

Popovici, V., Nistor, M., Ene, C., & Barbu, M. (2022). Phenolic Secondary Metabolites and Antiradical and Antibacterial Activities of Different Extracts of *Usnea barbata* (L.) Weber ex FH Wigg from Călimani Mountains, Romania. *Pharmaceuticals, 15*(7), 829.

Rattana, S., & Sungthong, B. (2017). Antioxidant activities and total phenolic contents of methanolic extract from five fragrant flowers. In The 12th Mahasarakham University Research Conference, Mahasarakham. (in Thai) (pp. 360-365).

Römpp C.L. (1995). Version 1.0, Stuttgurt/New York: Georg Thieme Verlag (Germany).

Sae-chan, Rinkha, Lankaew, Visutthithada & Sriyam (2020). *Journal of Innovative Technology Research*, *4*(2), 12-21. (in Thai)

Srisukong A., Jantree K. & Hanpakphum S. (2016). The Study of Antibacterial in Weed Extracts. *VRU Research and Development Journal Science and Technology, 11*(1), 69-82. (in Thai)

Srivastava, P., Upreti, D. K., Dhole, T. N., Srivastava, A. K., & Nayak, M. T. (2013). Antimicrobial property of extracts of Indian lichen against human pathogenic bacteria. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, *2013*(1), 709348.

Suwanphinij N. & Suwanphinij P. (1998). Culture Media and Microbial Culture. *General Microbiology*. Chulalongkorn University. 74–96. (in Thai)

Trentin, D. S., Silva, D. B., Amaral, M. W., Zimmer, K. R., Silva, M. V., Lopes, N. P., & Macedo, A. J. (2013). Tannins possessing bacteriostatic effect impair Pseudomonas aeruginosa adhesion and biofilm formation. *PloS one*, *8*(6), e66257.

Wannawet & Thiangphet. (2017). Determination Antioxidant Activity and Total Phenolic Compounds of Bean Sprouts. *In The Fourth National Conference Research and Development Institute, Kamphaeng Phet Rajabhat University.* (in Thai)

Xiao, F., Zhu, Y., & Zhang, Q. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers, 1*(1), 60-69.

Zhao, Y., Wang, M., & Xu, B. (2021). A comprehensive review on secondary metabolites and health-promoting effects of edible lichen. *Journal of Functional Foods*, *80*, 104283.