# ผลของสารสกัดหยาบจากดอกถั่งเช่าสีทองต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

**พรพรรณ รัตนะสัจจะ[1] และสามารถ ต่ายขาว[2*]**

[1]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ พระนครศรีอยุธยา 13000; [2]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ นนทบุรี 11000

[*]E-mail: samart.ta@rmutsb.ac.th

**รับบทความ: 15 มกราคม 2567 แก้ไขบทความ: 20 เมษายน 2567 ยอมรับตีพิมพ์: 23 เมษายน 2567**

**บทคัดย่อ**

การศึกษาวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารสกัดหยาบจากดอกของถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ โดยสกัดสารจากดอกของ *C. militaris* อบแห้งด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.8 และนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผลการทดลองพบว่ามีปริมาณสารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีนในสารสกัดหยาบเท่ากับ 2,588.60±58.68 และ 33.70±3.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อนำสารที่ได้ไปทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ *Escherichai coli* *Enterobacter aerogenes* *Klebsiella pneumoniae* *Proteus vulgaris* *Pseudomonas aeruginosa* *Salmonella* Typhi *Sal.* Typhimurium *Shigella dysenteriae* *Bacillus cereus* *B. subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี paper disc diffusion method พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ 9 ชนิด (คิดเป็นร้อยละ 81.81) และให้วงใสการยับยั้งที่มีขนาด 10.06±0.04 – 13.67±1.97 มิลลิเมตร เมื่อทดสอบปริมาณความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารต่อการยับยั้ง (MIC) และปริมาณความเข้มข้นน้อยที่สุดที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (MBC) พบว่าแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* *Ent. aerogenes* *Pro. vulgaris* *Sal.* Typhi *Sal.* Typhimurium และ *Shi. dysenteriae* มีค่า MIC และ MBC เท่ากันที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรีย *K. pneumoniae* มีค่า MIC และ MBC ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 2,000 ppm ตามลำดับ และแบคทีเรีย *Ps. aeruginosa* มีค่า MIC และ MBC ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 ppm ตามลำดับ ทั้งนี้แบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* มีผลของค่า MIC และ MBC ที่ความเข้มข้น 500 และ 600 ppm ตามลำดับ จากผลการศึกษาสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาเพิ่มเติมสำหรับการนำไปใช้ในการป้องกันการเกิดโรคในระบบทางเดินอาหารอันมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ดังกล่าวได้

**คำสำคัญ:** คอร์ไดเซปิน ถั่งเช่าสีทอง แบคทีเรียก่อโรค สารยับยั้งแบคทีเรีย โรคทางเดินอาหาร

# Effects of Crude Extract in Stroma of *Cordyceps militaris* for Human Enteropathogenic Bacterial Inhibition

**Pornpan Ruttanasutja[1] and Samart Taikhao[2*]**

[1]Division of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Suvarnnabhumi, Phra Nakorn Si Ayutthaya 13000, Thailand; [2]Division of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Suvarnnabhumi, Nonthaburi 11000, Thailand

[*]E-mail: samart.ta@rmutsb.ac.th

**Received: 15 January 2024 Revised: 20 April 2024 Accepted: 23 April 2024**

**Abstract**

The objective of this research was to study the crude extract from the stroma of *Cordyceps militaris*, which was tested for its inhibition of enteropathogenic bacteria. The crude extract was obtained from the dry stroma of *C. militaris* with 99.8% ethanol solvent. Cordycepin and adenosine were analyzed by high–performance liquid chromatography. The results showed that the cordycepin and adenosine concentrations in the crude extract were 2,588.60±58.68 and 33.70±3.03 mg/kg, respectively. Then, the crude extract was tested for the inhibition of 11 bacterial pathogen, including *Escherichai coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhi, *Sal.* Typhimurium, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* and *Staphylococcus aureus* using the paper disc diffusion method. It exhibited antimicrobial activity against only 9 bacterial pathogens (81.81%) with halo zone sizes ranging from 10.06±0.04 – 13.67±1.97 mm. However, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests showed that Gram–negative bacteria such as *E. coli*, *Ent. aerogenes*, *Pro. vulgaris*, *Sal.* Typhi, *Sal.* Typhimurium and *Shi. dysenteriae* had the same MIC and MBC values at concentrations of 100 and 200 ppm, respectively. *K. pneumoniae* had MIC and MBC values at concentrations of 1,000 and 2,000 ppm, respectively. *Ps. aeruginosa* exhibited MIC and MBC values at concentrations of 200 and 400 ppm, respectively. Finally, Gram–positive bacteria such as *S. aureus* had the MIC and MBC at concentrations of 500 and 600 ppm, respectively. The results of this study can be used as preliminary information for the prevention of gastrointestinal disease caused by such microorganisms.

**Keywords:** Cordycepin, *Cordyceps militaris*, Bacterial pathogen, Antimicrobial, Gastrointestinal disease

**บทนำ**

ราแมลง (insect fungi) เป็นราที่มีการดำรงชีวิตในสภาวะปรสิตบนสิ่งมีชีวิตจำพวกแมลงต่าง ๆ พบเจริญกระจายอยู่ทั่วไป มีการศึกษาและการนำไปใช้ประโยชน์มากที่สุด คือ ประเทศจีน (Dong *et al*., 2014; Quy *et al*., 2019; Zhou *et al*., 2009) ราแมลงที่สำคัญคือสกุล *Cordyceps* หรือที่รู้จักกันดีในชื่อของ “เห็ดถั่งเช่า” ที่พบมีความหลากหลายของชนิดมากกว่า 400 ชนิด (Liu *et al*., 2015; Ng and Wang, 2005) สมาชิกที่สำคัญคือถั่งเช่าสีทอง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cordyceps militaris* (L.) Link (Doung *et al*., 2014; Jedrejko *et al*., 2021) และมีการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน พบว่า อยู่ในโดเมน (domain) Eukaryota อาณาจักร (kingdom) Fungi ไฟลัม (phylum) Ascomycota ไฟลัมย่อย (subphylum) Pezizomycotina ชั้น (class) Sordariomycetes ชั้นย่อย (subclass) *Hypocreomycetidae* อันดับ (order) *Hypocreales* วงศ์ (family) *Clavicipitaceae* สกุล (genus) *Cordyceps* ชนิด (species) *Cordyceps militaris* ซึ่งได้รับความนิยมในการนำมาใช้ประโยชน์จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) และสรรพคุณทางยาที่สำคัญมากมาย และไม่มีพิษหรือสารตกค้างในร่างกายของผู้บริโภค (Hong *et al*., 2010; Lim *et al*., 2012; Marsup *et al*., 2020) สารออกฤทธิ์ที่พบในถั่งเช่าสีทอง ได้แก่ สารคอร์ไดเซิปิน (cordycepins) กรดคอร์ไดเซปิก (cordycepic acid) สารอะดิโนซีน (adenosine) พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) สารเออร์โกสเตอรอล (ergosterol) เพปไทด์ (peptide) กรดอะมิโน (amino acid) กรดอินทรีย์ (organic acid) กรดซินามิก (cinnamic acid) กรดไขมันทั้งแบบไขมันไม่อิ่มตัวและอิ่มตัว (polyunsaturated and saturated fatty acid) (Doung *et al*., 2014; Liu *et al*., 2015; Jedrejko *et al*., 2021; Laohaphatanalert and Gavinlertvatana, 2020; Li *et al*., 2021; Marsup *et al*., 2020; Ng and Wang, 2005; Reis *et al*., 2013; Sornprasert and Hambananda, 2016; Quy *et al*., 2019) ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายแบบ อาทิ การบำบัดอาการและต้านการเกิดของโรคมะเร็ง (anti–cancer) ยับยั้งหรือต้านการเกิดเนื้องอก (anti–tumor) (Joshi *et al*., 2019; Li *et al*., 2021; Quy *et al*., 2019) การสร้างภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) (Liu *et al*., 2016; Quy *et al*., 2019) ลดคลอเรสเตอรอลในหลอดเลือด (reduce cholesterol) (Kim *et al*., 2014; Quy *et al*., 2019; Zhou *et al*., 2009) ลดการอักเสบ (anti–inflammation) (Laohaphatanalert and Gavinlertvatana, 2020; Quy *et al*., 2019) ลดน้ำตาลในเลือดสูง (anti–hyperglycemia) (Kim *et al*., 2014; Quy *et al*., 2019; Zhou *et al*., 2009) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Joshi *et al*., 2019; Liu *et al*., 2016; Quy *et al*., 2019) รวมถึงฤทธิ์ในการยับยั้งหรือต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคสำคัญต่าง ๆ ในมนุษย์ (anti–microbial) (Ahn *et al*., 2000; Sornprasert and Hambananda, 2016; Joshi *et al*., 2019; Laohaphatanalert and Gavinlertvatana, 2020; Marsup *et al*., 2020; Quy *et al*., 2019)

ปัจจุบันการศึกษาและวิจัยทางด้านผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน *C. militaris* ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ต่าง ๆ ยังมีรายงานการศึกษาไม่มากนัก (Ahn *et al*., 2000; Bibi *et al*., 2021; Jedrejko *et al*., 2021; Liu *et al*., 2015; Laohaphatanalert and Gavinlertvatana, 2020; Rabie, 2022; Reis *et al*., 2013; Verma *et al*., 2020) จากการศึกษาก่อนหน้ามีรายงานการศึกษาผลของ

สารสำคัญอย่างคอร์ไดเซปินที่ได้ส่วนของน้ำเลี้ยงเส้นใยถั่งเช่ามีความสามารถในการการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ แบคทีเรียทั้งที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ คือ *Clostridium paraputrificum* และ *C. perfringens* การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus Micrococcus Listeria Staphylococcus Streptococcus* และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบ ได้แก่ *Acinetobacter Escherichia coli Enterococcus Enterobacter Klebsiella Salmonella Shigella Proteus Pseudomonas* (Fan and Zhu, 2012; Laohaphatanalert and Gavinlertvatana, 2020; Reis *et al*., 2013) เชื้อรา (fungi) สาเหตุของโรคในมนุษย์ ได้แก่ *Aspergillus Mycosphaerella Penicillium Rhizoctonia Trichoderma* และยีสต์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida albicans* (Jedrejko *et al*., 2021; Fan and Zhu, 2012; Reis *et al*., 2013) และไวรัสก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่ Rhinovirus Poliovirus Murine sarcoma virus Western equine encephalitis virus Influenza virus Epstein–Bar virus (EBV) Herpes simplex virus (HSV) และ Human immunodeficiency virus type I (HIV–I) (Fan and Zhu, 2012; Jedrejko *et al*., 2021) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเป็นไปได้ที่สารคอร์ไดเซปินอาจมีความสามารถยับยั้งการก่อโรคของไวรัส SAR–CoV–2 ที่เป็นสาเหตุของโรคอุบัติใหม่ COVID–19 ที่มีการระบาดอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน (Bibi *et al*., 2021; Rabie, 2022) และอาจเป็นทางเลือกในอนาคตที่นำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคไวรัส COVID–19 ที่แสดงอาการปอดอักเสบได้ (Du *et al*., 2021; Rabie, 2022; Verma *et al*., 2020)

จากการวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษาพบว่าประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จาก *C. militaris* มีความแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และวิธีการสกัดสารสำหรับการทดสอบที่แตกต่างกัน (Ahn *et al*., 2000; Hong *et al*., 2010; Jedrejko *et al*., 2021; Kontogiannatos *et al*., 2021; Li *et al.,*2021; Lim *et al*., 2012; Liu *et al*., 2015; Marsup *et al*., 2020; Sornprasert and Hambananda, 2016; Quy *et al*., 2019; Reis *et al*., 2013) จึงเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้จาก *C. militaris* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งที่เตรียมจากวัตถุดิบท้องถิ่นและสถานที่เพาะปลูกในประเทศไทย จะให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ที่แตกต่างจากรายงานที่มีก่อนหน้านี้ ซึ่งส่วนใหญ่ศึกษาในประเทศจีนเป็นหลัก (Jedrejko *et al*., 2021; Kontogiannatos *et al*., 2021; Sornprasert and Hambananda, 2016; Zhou *et al*., 2009) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารสกัดหยาบจากดอกของ *C. militaris* ซึ่งเป็นชนิดที่มีการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารบางชนิด รวมถึงศึกษาปริมาณน้อยที่สุดของสารสกัดหยาบในการยับยั้งและกำจัดแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าว

## วิธีดำเนินการวิจัย

### การเพาะเลี้ยง *Cordyceps militaris*

ตัวอย่าง *C. militaris* ในรูปดอกสดที่เพาะเลี้ยงภายในขวดแก้วได้รับจากฟาร์มแห่งหนึ่งในเขตอำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ โดยเก็บรักษาตัวอย่างในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งก่อนนำไปศึกษาในห้องปฏิบัติการ ตัดส่วนดอก (stroma) บริเวณก้านให้มีขนาดเท่า ๆ กันมาวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) (Dang *et al*., 2018) บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 14

วัน (Singpoonga *et al*., 2019) ใช้ Cork borer เจาะบริเวณวุ้นที่มีเส้นใยให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น ใส่ลงไปในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ในที่มืด อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเทียมแบบแข็งที่มีส่วนประกอบของเมล็ดข้าว ดักแด้ไหม และอาหารเสริมอื่น ๆ เช่น กลูโคส ซูโครส เพปโทน สกัดจากยีสต์ แมกนีเซียมซัลเฟต วิตามินบี1 และมันฝรั่ง เพาะเลี้ยงโดยการบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นให้แสงที่ความเข้มข้นแสง 1000 ลักซ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน (Tapingkae, 2016)

**การสกัดสารและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญจาก *C. militaris***

เก็บเกี่ยวส่วนของดอก *C. militaris* นำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นบดละเอียดให้มีขนาดประมาณ 50 mesh และนำไปสกัดด้วยการแช่ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.8 อัตราส่วน 50 กรัม: 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จะได้ส่วนของเหลวใส เพื่อนำไปใช้ในการระเหยตัวทำละลาย ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

นำสารสกัดหยาบจากส่วนดอกที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography: HPLC) โดยใช้คอลัมน์ AcclaimTM 120 C18 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ร่วมกับตัวตรวจวัด diode array detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในหน่วย mg/kg เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนบริสุทธิ์ (Huang *et al*., 2009)

**การทดสอบสารสกัดหยาบจาก *C. militaris* ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร**

การทดสอบสารสกัดหยาบจากส่วนดอกต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์จำนวน 11 ชนิด โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 8 ชนิด คือ *Escherichai coli Enterobacter aerogenes Klebsiella pneumoniae Proteus vulgaris Pseudomonas aeruginosa Salmonella* Typhi *Sal.* Typhimurium และ *Shigella dysenteriae* และแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด คือ *Bacillus cereus B. subtilis* และ *Staphylococcus aureus* เตรียมแบคทีเรียก่อโรคสำหรับใช้ในการทดสอบด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) แล้วนำไปบ่มบนเครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าซ้าย–ขวา ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง นำมาตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5–10 นาที จากนั้นเจือจางตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 เพื่อปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียก่อโรคให้ได้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ $1\times10^8$ CFU/mL ด้วยวิธีการเปรียบเทียบความขุ่นกับสารละลาย McFarland standard No. 0.5

แบคทีเรียทดสอบที่เตรียมปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ $1\times10^8$ CFU/mL นำไปเจือจางแบบลำดับส่วน (serial dilution method) ตรวจนับจำนวนโคโลนีด้วยการเพาะเลี้ยงบนจานอาหารแข็ง nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 24–48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียก่อโรคทดสอบเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียต่อไป

เตรียมแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ $1\times10^8$ CFU/mL นำไปทดสอบด้วยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคบนจานอาหาร NA ด้วยวิธี swab plate technique และทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี paper disc diffusion method (Imtiaj and Lee, 2007) ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการยับยั้งโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดของวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น และเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดหยาบในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one–way analysis of variance: ANOVA) ที่ $p < 0.05$

**การศึกษาปริมาณความเข้มข้นน้อยที่สุดที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ (minimum inhibitory concentration: MIC) และปริมาณความเข้มข้นน้อยที่สุดที่มีผลต่อการฆ่าแบคทีเรียทดสอบ (minimum bactericidal concentration: MBC)**

เตรียมเซลล์แบคทีเรียก่อโรคทดสอบในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น $1\times10^8$ CFU/mL (0.5 McFarland standard) จากนั้นเจือจางสารสกัดหยาบถั่งเช่าสีทองที่ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 20,000–100,000 ppm และผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้นต่อปริมาณแบคทีเรียทดสอบเท่ากับ 1:1 มิลลิลิตร (ทดลองซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง (Reis *et al*., 2013) บันทึกผลค่า MIC จากหลอดทดสอบความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ไม่มีการเจริญของโคโลนีแบคทีเรียหรือสังเกตหลอดทดสอบความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ไม่มีความขุ่น (Reis *et al*., 2013)

นำหลอดทดสอบทุกความเข้มข้นเกลี่ยบนอาหาร NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง และบันทึกผลค่า MBC จากความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Reis *et al*., 2013)

## ผลการวิจัยและอภิปรายผล

### การสกัดสารและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญจาก *C. Militaris*

จากการเก็บเกี่ยวส่วนดอกของ *C. militaris* ไปอบให้แห้ง บด และนำไปสกัดด้วยเอทานอล ได้ผลสารสกัดหยาบเท่ากับ 6.67±0.02 g/kg นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณของสารคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนในสารด้วยเทคนิค HPLC พบปริมาณของสารคอร์ไดเซปินเท่ากับ 2,588.6± 58.68 mg/kg และมีปริมาณสารอะดีโนซีนเท่ากับ 33.70±3.03 mg/kg สารสกัดหยาบนี้จะเตรียมไว้เป็นสารทดสอบต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

จากการศึกษาก่อนหน้าพบรายงานการสกัดสารสำคัญจากส่วนต่าง ๆ ของ *C. militaris* เช่น ดอกและเส้นใยในอาหารแข็ง (substrate mycelium) ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้สารสำคัญ เช่น คอร์ไดเซปินในสารสกัดหยาบจากดอกมีปริมาณมากกว่าส่วนเส้นใยในอาหารแข็ง (Jedrejko *et al*., 2021) อีกทั้งกระบวนการสกัดสาร อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ระยะเวลาในการสกัด และความมีขั้วของตัวทำละลายมีผลอย่างมากต่อชนิดและปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ (Eiamthaworn *et al*., 2022; Tiwari *et al*., 2011) ใน

การศึกษาครั้งนี้สารสกัดหยาบที่ได้มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูง แต่ปริมาณสารอะดีโนซีนค่อนข้างต่ำ เนื่องจากในขั้นตอนการสกัดสารเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายชนิดมีขั้ว อาจมีความเหมาะสมในการสกัดสารคอร์ไดเซปินมากกว่าอะดีโนซีน เนื่องจากอะดีโนซีนละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วสูงหรือมีสภาวะเบส เช่น น้ำ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ แอมเนียมไฮดอกไซด์ แต่ละลายในเอทานอลได้น้อย (Chen *et al*., 2017) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Marsup *et al*. (2020) ที่เปรียบเทียบการสกัดสารจาก *C. militaris* ด้วยการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยรายงานว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงอย่างน้ำและแอลกอฮอล์ให้ปริมาณสารสกัดหยาบและปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงกว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำหรือไม่มีขั้ว เนื่องจากสารคอร์ไดเซปินมีโครงสร้างประกอบด้วยหมู่เอมีน (amine group) และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) จึงทำให้คอร์ไดเซปินเป็นสารมีขั้วสูงมากกว่าสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์ที่อาจพบได้จากการสกัดส่วนดอก นอกจากนี้ Quy *et al*. (2019) ยังรายงานผลการศึกษาการใช้ชนิดตัวทำละลายและวิธีการสกัดส่วนดอกที่ส่งผลต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปินและสาระสำคัญอื่น ๆ ที่อาจปนอยู่ในสารสกัดหยาบเช่นกัน การศึกษาครั้งนี้อาจมีสารอื่นปนในสารสกัดหยาบดังกล่าวที่อาจไม่ได้ตรวจวัดทั้งชนิดและปริมาณ เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ เพปไทด์ เออร์โกสเตอรอล แซนโทฟิลล์ (Ahn *et al*., 2000; Dong *et al*., 2014; Ng and Wang, 2005; Reis *et al*., 2013) ปริมาณสารคอร์ไดเซปินที่ตรวจวัดได้ในการศึกษานี้มีปริมาณใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Wen *et al*. (2014) ที่เพาะเลี้ยง *C. militaris* CGMCC2459 บนอาหารแข็งที่มีข้าวโพดเป็นองค์ประกอบ (ค่าคอร์ไดเซปินเท่ากับ 2,590 mg/kg) แต่มีปริมาณแตกต่างจากงานวิจัยของ Kang *et al*. (2017) ที่เพาะเลี้ยง *C. militaris* จำนวน 12 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งที่มีข้าวกล้องเป็นส่วนประกอบได้ค่าคอร์ไดเซปินเฉลี่ยประมาณ 3,060 mg/kg โดยสายพันธุ์ที่ให้ค่าคอร์ไดเซปินสูงสุด คือ *C. militaris* SPNU1006 ที่มีค่าคอร์ไดเซปินเท่ากับ 4,220 mg/kg แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของสายพันธุ์ สูตรอาหารเพาะเลี้ยง และสภาวะในการเพาะเลี้ยง รวมถึงส่วนประกอบโครงสร้างของการเก็บเกี่ยวของ *C. militaris* (เส้นใย ดอก และฐาน) ที่แตกต่างกัน เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณของสารสกัดคอร์ไดเซปินและสาระสำคัญอื่น ๆ ในถั่งเช่าสีทอง (Ahn *et al*., 2000; Hong *et al*., 2010; Kang *et al*., 2017; Lim *et al*., 2012; Wen *et al*., 2014; Zhou *et al*., 2009)

**การทดสอบสารสกัดหยาบจากส่วนดอกของ *C. militaris* ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร**

จากการทดสอบสารสกัดหยาบจากส่วนดอกต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 11 ชนิด พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 100,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้จำนวน 9 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 81.81 (ตาราง 1 และภาพที่ 1) มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 10.06±0.04 ถึง 13.67±1.97 mm ชี้ให้เห็นประสิทธิภาพของการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบเบื้องต้นได้ว่าสารสกัดหยาบจากส่วนของดอกมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (คิดเป็นร้อยละ 100 ของแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ในการทดสอบ) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (คิดเป็นร้อยละ 33.33 ของแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ในการทดสอบ) โดย

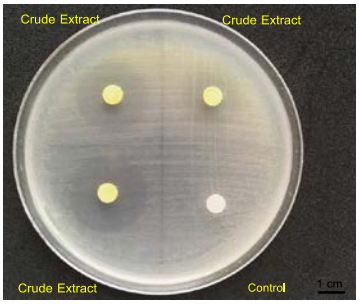
ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบสูงสุด จำนวน 3 ชนิด ($p < 0.05$) ได้แก่ *K. pneumonia* *E. coli* และ *Ps. aeruginosa* มีขนาดของวงใสของการยับยั้งเท่ากับ 13.67±1.97 13.30±1.32 และ 13.04± 0.05 mm ตามลำดับ แบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ให้ผลการยับยั้งรองลงมา โดยมีขนาดของวงใสเท่ากับ 12.80±1.80 mm มีค่าใกล้เคียงกับการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Sal.* Typhi ที่มีขนาดของวงใสเท่ากับ 12.00±0.51 mm ($p \geq 0.05$) ผลการยับยั้งรองลงมาคือ *P. vulgaris* มีขนาดของวงใสที่ 11.09±0.07 mm และ *Ent. aerugines Sal.* Typhimurium และ *Shi. dysenteriae* ให้ผลการยับยั้งน้อยที่สุดโดยมีขนาดวงใสประมาณ 10 mm

**ตาราง 1** ผลของสารสกัดหยาบจากส่วนดอกของ *C. militaris* ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

| Bacteria | Bacterial Inhibition* | Diameter (mm)** |
|---|---|---|
| *Escherichia coli* | + | 13.30$^{ab}$±1.32 |
| *Enterobacter aerugines* | + | 10.09$^{d}$±0.06 |
| *Klebsiella pneumoniae* | + | 13.67$^{ab}$±1.97 |
| *Proteus vulgaris* | + | 11.09$^{d}$±0.08 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | + | 13.04$^{b}$±0.05 |
| *Salmonella* Typhi | + | 12.00$^{c}$±0.51 |
| *Salmonella* Typhimurium | + | 10.09$^{d}$±0.07 |
| *Shigella dysenteriae* | + | 10.06$^{d}$±0.04 |
| *Bacillus cereus* | – | 0.00$^{e}$ |
| *Bacillus subtilis* | – | 0.00$^{e}$ |
| *Staphylococcus aureus* | + | 12.80$^{cd}$±1.80 |

*ความสามารถในการยับยั้ง (+) คือ มีการยับยั้ง และ (–) ไม่มีการยับยั้ง และ **ตัวอักษรที่อยู่บนค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากส่วนดอก *C. militaris* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่เกี่ยวข้องในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้จำนวน 9 ชนิด จากทั้งหมด 11 ชนิด ผลของการยับยั้งบ่งชี้ถึงสารสกัดหยาบยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้




**ภาพที่ 1** วงใสการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทดสอบ *Klebsiella pneumoniae* ของสารสกัดหยาบจากส่วนดอกของ *C. militaris* เปรียบเทียบกับตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.8 (control)

ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่รายงานสมบัติของสารคอร์ไดเซปินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ลดการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด การทำงานของสารคอร์ไดเซปินในการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดขึ้นโดยการทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้สารคอร์ไดเซปินผ่านเข้าไปภายในเซลล์ได้มากขึ้น ทำให้โครงสร้างของเซลล์ถูกทำลายและมีการขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (Kato *et al*., 2017) ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ แบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ที่บางกว่าแบคทีเรียแกรมบวกจึงทำให้สารคอร์ไดเซปินทำลายผนังเซลล์ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

แบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกยับยั้งได้เพียง *S. aureus* แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* และ *B. subtilis* อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียดังกล่าวมีการสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ที่มีความทนต่อภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี รวมถึงทนต่อการทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์จากสารคอร์ไดเซปิน ผลที่ได้แตกต่างจากงานวิจัยของ

Reis *et al*. (2013) ที่สกัดสารจากส่วนดอก *C. militaris* MCI10304 ด้วยเมทานอลที่ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวก *B. cereus* และ *S. aureus* ได้ และ Dong *et al*. (2014) พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนดอก *C. militaris* CGMCC 3.16322 ด้วยตัวทำละลายเมทานอลสามารถยับยั้งได้ทั้ง *B. cereus B. subtilis* และ *S. aureus* เมื่อวิเคราะห์สารคอร์ไดเซปิน พบว่า มีปริมาณสูงถึง 23,910 mg/kg ซึ่งมากกว่าการศึกษานี้ถึง 9 เท่า (ปริมาณคอร์ไดเซปินในการศึกษานี้เท่ากับ 2,588.60 mg/kg) การใช้ตัวทำละลายและกระบวนการสกัดสารจาก *C. militaris* ต่างกันมีผลต่อปริมาณและชนิดของสารสำคัญ นอกจากนี้สายพันธุ์ของ *C. militaris* สภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยง ตลอดจนอาหารและวัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน เช่น ข้าว เมล็ดธัญพืช และแมลง อาจส่งผลต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปินและสารอื่น ๆ ต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่แตกต่างกัน (Dong *et al*., 2014; Hong *et al*., 2010; Kontogiannatos *et al*., 2021; Zhou *et al*., 2009; Reis *et al*., 2013; Somprasert and Hambananda, 2016) จึงต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบผลการวิจัยให้มีความถูกต้องแม่นยำขึ้นโดยใช้ชีววิทยาโมเลกุลในการระบุสายพันธุ์ *C. militaris* ที่ใช้การศึกษานี้ ร่วมกับการเปรียบเทียบการใช้ตัวทำละลายที่ต่างกันในการสกัดและกระบวนการในการสกัดสารสำคัญจากส่วนดอกของ *C. militaris* ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคต่อไป

**การศึกษาปริมาณความเข้มข้นน้อยที่สุดที่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ (MIC) และความเข้มข้นน้อยที่สุดที่มีผลต่อการฆ่าแบคทีเรียทดสอบ (MBC)**

แบคทีเรียก่อโรคทุกชนิดที่ให้ผลของการยับยั้งของสารสกัดคอร์ไดเซปินจากส่วนดอกของ *C. militaris* จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ *E. coli Ent. aerogenes K. pneumonia Pro. vulgaris Ps. aeruginosa Sal.* Typhi *Sal.* Typhimurium *Shi. dysenteriae* และ *S. aureus* นำมาใช้ในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดหยาบต่อการยับยั้ง ในการทดลองใช้สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 10,000–100,000 ppm และเปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดหยาบ พบว่า สารสกัดหยาบจากดอกที่มีค่าความเข้มข้นต่ำสุด คือ 20,000 ppm มีผลต่อการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ (ฆ่าแบคทีเรียทดสอบได้) ทำให้ไม่สามารถอ่านค่า MIC ได้ ดังนั้นจึงปรับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพื่อหาค่า MIC อยู่ในช่วง 100–10,000 ppm และได้ผลของ MIC ที่แตกต่างกัน (ตาราง 2) โดย MIC ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบทั้งหมด 6 ชนิด (คิดเป็นร้อยละ 66.67) คือ *E. coli Ent. aerogenes Pro. vulgaris Sal.* Typhi *Sal.* Typhimurium และ *Shi. dysenteriae* ส่วนแบคทีเรียแกรมลบอีก 2 ชนิด คือ *K. pneumoniae* และ *Ps. aeruginosa* มีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 200 ppm ตามลำดับ ค่า MIC ของการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* คือ ที่ความเข้มข้น 500 ppm

จากผลของการทดสอบความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค นำมาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าแบคทีเรียก่อโรค (MBC) โดยนำผลของการทดสอบสารสกัดหยาบจากส่วนดอกที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA ด้วยวิธี spread plate เพื่อดูการรอดชีวิตและหา

ค่า MBC ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนดอกมีค่า MBC คือ ที่ความเข้มข้น 200 ppm โดยฆ่าแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบได้ 6 ชนิด (คิดเป็นร้อยละ 66.67) ได้แก่ *E. coli Ent. aerogenes Pro. vulgaris Sal.* Typhi *Sal.* Typhimurium และ *Shi. dysenteriae* ส่วนแบคทีเรียแกรมลบอีก 2 ชนิด คือ *K. pneumoniae* และ *Ps. aeruginosa* มีค่า MBC ได้แก่ ที่ความเข้มข้น 2,000 และ 400 ppm ตามลำดับ และค่า MBC ของสารสกัดหยาบจากส่วนดอกในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* คือ ที่ความเข้มข้น 600 ppm ผลของ MBC ที่ได้มีค่าสอดคล้องกับผลของการทดสอบหาค่า MIC (ตาราง 2)

**ตาราง 2** ผลของสารสกัดหยาบจากส่วนดอก *C. militaris* ปริมาณความเข้มข้นน้อยที่สุดในการยับยั้ง (MIC) และการฆ่า (MBC) แบคทีเรียก่อโรค

| Bacteria | MIC (ppm) | MBC (ppm) |
|---|---|---|
| *Escherichai coli* | 100 | 200 |
| *Enterobacter aerugines* | 100 | 200 |
| *Klebsiella pneumoniae* | 1,000 | 2,000 |
| *Proteus vulgaris* | 100 | 200 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 200 | 400 |
| *Salmonella* Typhi | 100 | 200 |
| *Salmonella* Typhimurium | 100 | 200 |
| *Shigella dysenteriae* | 100 | 200 |
| *Staphylococcus aureus* | 500 | 600 |

ข้อมูลความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดหยาบจากส่วนดอก *C. militaris* ที่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบน้อยที่สุดที่มีผลต่อการฆ่าแบคทีเรียจากการวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี paper disc diffusion method ที่แสดงขนาดของวงใสของการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ใกล้เคียงกันจะมีค่า MIC และ MBC ที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นแบคทีเรีย *K. pneumoniae* ที่มีค่า MIC และ MBC ที่ความเข้มข้นของสารสูงถึง 1,000 และ 2,000 ppm แม้ว่าจะเป็นแบคทีเรียแกรมลบเช่นเดียวกับแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ แต่เนื่องจากแบคทีเรีย *K. pneumoniae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีการสร้างโครงสร้างพิเศษแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น คือ การสร้างแคปซูล ซึ่งเป็นสารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลล์เอาไว้ สามารถป้องกันการทำลายจากสิ่งต่าง ๆ ภายนอกได้ดี (Burakorn and Praphruet, 2012) ส่งผลให้กลไกการทำงานของสารสำคัญในสารสกัดหยาบมีประสิทธิภาพในการย่อยแคปซูล ย่อยผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อยับยั้งการเจริญและฆ่าเซลล์ที่แตกต่างไปจากแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น (Kato *et al*., 2017) ในการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ครั้งนี้เป็นการทดสอบปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากดอก *C. militaris* ที่สามารถสกัดสารออกมาได้มากกว่า 1 ชนิด ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาไม่ได้เป็นผลที่เกิดจากประสิทธิภาพของสารคอร์ไดเซปินเพียงอย่างเดียว โดยอาจมีความเป็นไปได้ว่าสารสำคัญตัวอื่นอาจมีส่วนช่วยส่งเสริมหรือลดประสิทธิภาพของการยับยั้งและการฆ่าแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวได้ (Reis *et al*., 2013)

จากรายงานผลของสารสกัดหยาบของ *C. militaris* สายพันธุ์ต่าง ๆ ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และกระบวนการสกัดสารสำคัญในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่าง ๆ (ตาราง 3) สังเกตได้ว่า *C. militaris* สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน รวมถึงตัวทำละลายและกระบวนการสกัดสารส่งผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้แตกต่างกัน ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสารสำคัญได้แก่ เอทานอล เมทานอล และน้ำกลั่น

กระบวนการในการสกัดสารสำคัญมีทั้งแบบแช่ทิ้งไว้ แบบเขย่า แบบกวน และวิธี Soxhlet ที่ระยะเวลา และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน โดยสารสกัดจาก *C. militaris* สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* โดยมีขนาดของวงใสใกล้เคียงกันในช่วง 13.30–15.96 มิลลิเมตร แต่มีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วงกว้างคือ 100–12,500 ppm และ 200–3,000 ppm ตามลำดับ (Dong *et. al*., 2014; Deshmukh and Bhasharan, 2023; Laohaphatanalert and Gavinlertvatana, 2020; Reis *et al*., 2013) การยับยั้งแบคทีเรีย *Ent. aerugines* พบว่ามีขนาดของวงใสอยู่ในช่วง 10.09–13.19 mm และมีค่า MIC อยู่ในช่วง 100–12,500 ppm (Deshmukh and Bhasharan, 2023) การยับยั้งแบคทีเรีย *K. pneumoniae* พบว่า มีค่า MIC อยู่ในช่วง 1000–มากกว่า 10,000 ppm (Laohaphatanalert and Gavinlertvatana, 2020) การยับยั้งแบคทีเรีย *Pro. vulgaris* พบว่ามีขนาดของวงใสอยู่ในช่วง 11.09-18.33 มิลลิเมตร และมีค่า MIC อยู่ในช่วง 23.44–100 ppm (Gawas *et. al*., 2023) อย่างไรก็ตาม การทดสอบสารสกัดจาก *C. militaris* ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Pro. vulgaris* ในงานวิจัยของ Gawas *et. al*. (2023) เป็นการผสมระหว่างสารสกัด *C. militaris* และทองคำอนุภาคนาโน (gold nanoparticles) ทำให้ขนาดของวงใสมีขนาดใหญ่และค่า MIC มีปริมาณต่ำ การยับยั้งแบคทีเรีย *Ps. aeruginosa* มีขนาดของวงใสใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 11.00–14.08 mm แต่มีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วงกว้างคือ 15–12,250 ppm และ 30–400 ppm ตามลำดับ (Dong *et al*., 2014; Deshmukh and Bhasharan, 2023; Laohaphatanalert and Gavinlertvatana, 2020; Reis *et al*., 2013) การยับยั้งแบคทีเรีย *Sal.* Typhi พบว่ายังไม่มีการรายงานผลขนาดของวงใส ค่า MIC และ MBC มีแต่เพียงการรายงานผลของสารระเหยของ *C. militaris* ในการยับยั้ง *Sal.* Typhi โดยวัดจากค่าความขุ่นของแบคทีเรียที่ลดลงที่ระยะเวลา 0–36 ชั่วโมง (Choi *et al*., 1999) ในการศึกษานี้พบการยับยั้งแบคทีเรีย *Sal.* Typhi โดยมีขนาดวงใสเท่ากับ 12.00 mm ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 100 และ 200 ppm ตามลำดับ การยับยั้งแบคทีเรีย *Sal.* Typhimurium พบว่ามีขนาดของวงใสอยู่ในช่วง 10.09–16.70 มิลลิเมตร มีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วงกว้างคือ 100–12,500 ppm และ 200–6,250 ppm ตามลำดับ (Dong *et al*., 2014; Reis *et al.,* 2013) การยับยั้งแบคทีเรีย *Shi. dysenteriae* พบว่ามีขนาดของวงใสอยู่ในช่วง 10.00–12.20 mm และมีค่า MIC อยู่ในช่วงกว้างคือ 100–12,000 ppm มีรายงานผลการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* โดยมีขนาดวงใสเท่ากับ 16.7 มิลลิเมตร (Dong *et al*., 2014) มีค่า MIC อยู่ในช่วง 15–6,250 ppm 30–7,810 ppm ตามลำดับ (Dong *et al*., 2014; Reis *et al*., 2013) ค่า MBC เท่ากับ 30 ppm (Reis *et al.* 2013) การยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis* พบว่ามีขนาดของวงใสอยู่ในช่วง 11.02–17.50 mm และมีค่า MIC อยู่ในช่วงคือ 3,125–25,000 ppm (Deshmukh and Bhasharan, 2023; Dong *et al*., 2014) และการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* พบว่ามีขนาดของวงใสอยู่ในช่วง 12.06–18.00 mm และมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วงกว้างคือ 100–12,500 ppm และ 600–1,750 ppm ตามลำดับ (Dong *et al*., 2014; Deshmukh and Bhasharan, 2023; Laohaphatanalert and Gavinlertvatana, 2020; Reis *et al.,* 2013)

**ตาราง 3** เปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบของ *C. militaris* สายพันธุ์ต่าง ๆ ชนิดของตัวทำละลาย และกระบวนการสกัดต่อบริเวณการยับยั้ง (zone of inhibition) ปริมาณความเข้มข้นน้อยที่สุดที่มีผลต่อการยับยั้ง (MIC) และผลต่อการฆ่า (MBC) แบคทีเรียก่อโรคทดสอบชนิดต่าง ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูล

| Bacteria | Different strains of *C. militaris*, types of solvent and processes for extraction | Zone of inhibition (mm) | MIC (ppm) | MBC (ppm) | References |
|---|---|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* | *C. militaris*, Ethanol for 48 h at room temperature | 13.30±1.32 | 100 | 200 | This study |
| | *C. militaris* CGMCC 3.16322, Methanol overnight in a shaker at room temperature | 13.70±0.50 | 12,500 | – | Dong *et al.*, 2014 |
| | *C. militaris* MCI 10304, Methanol for 1 h under stirring | – | 2,250 | 3,000 | Reis *et al.*, 2013 |
| | *C. militaris* TOLA00, Ethanol for 5 days at 50$^{0}$C | – | 10,000 | – | Laohaphatanalert and Gavinlertvatana, 2020 |
| | *C. militaris*, Methanol using Soxhlet apparatus | 15.96 ± 0.68 | 6,250 | – | Deshmukh and Bhasharan, 2023 |
| *Enterobacter aerugines* | *C. militaris*, Ethanol for 48 h at room temperature | 10.09±0.06 | 100 | 200 | This study |
| | *C. militaris*, Methanol using Soxhlet apparatus | 13.19±0.62 | 12,500 | - | Deshmukh and Bhasharan, 2023 |
| *Klebsiella pneumoniae* | *C. militaris*, Ethanol for 48 h at room temperature | 13.67±1.97 | 1,000 | 2,000 | This study |
| | *C. militaris* TOLA00, Ethanol for 5 days at 50$^{0}$C | - | >10,000 | - | Laohaphatanalert and Gavinlertvatana, 2020 |
| *Proteus vulgaris* | *C. militaris*, Ethanol for 48 h at room temperature | 11.09±0.08 | 100 | 200 | This study |
| | *C. militaris* with Gold Nanoparticles, Distilled water and boiled at 60 ˚C for 15 min | 18.33±2.08 | 23.44 | – | Gawas *et al.*, (2023) |
| *Pseudomonas aeruginosa* | *C. militaris*, Ethanol for 48 h at room temperature | 13.04±0.05 | 200 | 400 | This study |
| | *C. militaris* MCI 10304, Methanol for 1 h under stirring | – | 15 | 30 | Reis *et al.*, 2013 |
| | *C. militaris* CGMCC 3.16322, Methanol overnight in a shaker at room temperature | 11.00±0.50 | 12,500 | – | Dong *et al.*, 2014 |
| | *C. militaris* TOLA00, Ethanol for 5 days at 50°C | – | 10,000 | – | Laohaphatanalert and Gavinlertvatana, 2020 |
| | *C. militaris*, Methanol using Soxhlet apparatus | 14.08±0.44 | 12,500 | – | Deshmukh and Bhasharan, 2023 |
| *Salmonella* Typhi | *C. militaris*, Ethanol for 48 h at room temperature | 12.00±0.51 | 100 | 200 | This study |
| *Salmonella* Typhimurium | *C. militaris*, Ethanol for 48 h at room temperature | 10.09±0.07 | 100 | 200 | This study |
| | *C. militaris* MCI 10304, Methanol for 1 h under stirring | – | 3,000 | 6,250 | Reis *et al.*, 2013 |
| | *C. militaris* CGMCC 3.16322, Methanol overnight in a shaker at room temperature | 16.70±1.10 | 12,500 | – | Dong *et al.*, 2014 |
| *Shigella dysenteriae* | *C. militaris*, Ethanol for 48 h at room temperature | 10.06±0.04 | 100 | 200 | This study |
| | *C. militaris* CGMCC 3.16322, Methanol overnight in a shaker at room temperature | 12.20±0.50 | 12,500 | – | Dong *et. al.*, 2014 |
| *Bacillus cereus* | *C. militaris*, Ethanol for 48 h at room temperature | 0.00 | – | – | This study |
| | *C. militaris* CGMCC 3.16322, Methanol overnight in a shaker at room temperature | 16.70±0.50 | 6,250 | – | Dong *et al.*, 2014 |
| | *C. militaris* MCI 10304, Methanol for 1 h under stirring | – | 15 | 30 | Reis *et al.*, 2013 |
| *Bacillus subtilis* | *C. militaris*, Ethanol for 48 h at room temperature | 0.00 | - | – | This study |
| | *C. militaris* CGMCC 3.16322, Methanol overnight in a shaker at room temperature | 17.50±3.00 | 3,125 | – | Dong *et al.*, 2014 |
| | *C. militaris*, Methanol using Soxhlet apparatus | 11.02±0.39 | 25,000 | – | Deshmukh and Bhasharan (2023) |

**ตาราง 3** เปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบของ *C. militaris* สายพันธุ์ต่าง ๆ ชนิดของตัวทำละลาย และกระบวนการสกัดต่อบริเวณการยับยั้ง (zone of inhibition) ปริมาณความเข้มข้นน้อยที่สุดที่มีผลต่อการยับยั้ง (MIC) และผลต่อการฆ่า (MBC) แบคทีเรียก่อโรคทดสอบชนิดต่าง ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูล (ต่อ)

| Bacteria | Different strains of *C. militaris*, types of solvent and processes for extraction | Zone of inhibition (mm) | MIC (ppm) | MBC (ppm) | References |
|---|---|---|---|---|---|
| *Staphylococcus aureus* | *C. militaris*, Ethanol for 48 h at room temperature | 12.80±1.80 | 100 | 600 | This study |
| | *C. militaris* CGMCC 3.16322, Methanol overnight in a shaker at room temperature | 18.00±1.50 | 3,125 | – | Dong *et al.*, 2014 |
| | *C. militaris* MCI 10304, Methanol for 1 h under stirring | – | 750 | 1,750 | Reis *et al.*, 2013 |
| | *C. militaris* TOLA00, Ethanol for 5 days at 50$^0$C | – | 10,000 | – | Laohaphatanalert and Gavinlertvatana, 2020 |
| | *C. militaris*, Methanol using Soxhlet apparatus | 12.06 ± 0.35 | 12,500 | – | Deshmukh and Bhasharan (2023) |

## สรุปผลการวิจัย

การสกัดสารและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญจากส่วนดอก *C. militaris* ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง พบมีปริมาณของสารคอร์ไดเซปินสูงถึง 2,588.6±58.68 mg/kg และมีปริมาณสารอะดีโนซีนเท่ากับ 33.70±3.03 mg/kg และสารสกัดที่เตรียมได้นำไปใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากส่วนดอก *C. militaris* ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 11 ชนิด แบ่งออกเป็นแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 8 ชนิด *ได้แก่ E. coli En. aerogenes K. Pneumoniae Pro. vulgaris Ps. aeruginosa Sal.* Typhi *Sal.* Typhimurium และ *Shi. dysenteriae* และแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *B. cereus B. subtilis* และ *S. aureus* ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 100,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 9 ชนิด (คิดเป็นร้อยละ 81.81) มีเส้นผ่านศูนย์วงใสของการยับยั้งโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 10.06±0.04 ถึง 13.67±1.97 mm โดยแบ่งเป็นการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ทั้งหมด และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้เพียง 1 ชนิด คือ *S. aureus*

ผลการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากส่วนดอก *C. militaris* น้อยที่สุดที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบช่วง 20,000–100,000 ppm ไม่พบมีการเจริญของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร จึงปรับช่วงปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดในการทดสอบ MIC อยู่ในช่วง 100–10,000 ppm ค่า MIC ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ 6 ชนิด (คิดเป็นร้อยละ 66.67) ส่วนค่า MIC ต่อแบคทีเรียแกรมลบ *K. pneumoniae* และ *Ps. aeruginosa* มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 และ 200 ppm ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกทดสอบยับยั้ง *S. aureus* มีค่า MIC ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 500 ppm

การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากส่วนดอก *C. militaris* น้อยที่สุดที่มีผลต่อการฆ่าแบคทีเรีย พบว่า ค่า MBC ต่อการทดสอบแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 6 ชนิด มีค่า MIC เท่ากัน (ที่ความเข้มข้น 100 ppm) แสดงผลการทดสอบของค่า MBC ที่เท่ากันด้วย คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 200 ppm ส่วนค่า MBC ในแบคทีเรียแกรมลบอีก 2 ชนิด คือ *K. pneumo-*

*niae* และ *Ps. aeruginosa* มีค่าเท่ากับ 2,000 และ 400 ppm ตามลำดับ ส่วนค่า MBC ของแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 600 ppm

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้เป็นเพียงข้อมูลพื้นฐานของการศึกษาสารสกัดหยาบที่มีอยู่ในส่วนของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ที่มีการค้นพบ พัฒนาและเพาะเลี้ยงในประเทศไทย และมีการประยุกต์ใช้วัตถุดิบสำหรับใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอยู่ในประเทศไทย โดยสารสกัดหยาบดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารบางชนิดในมนุษย์ได้ สะท้อนให้เห็นว่าการรับประทานถั่งเช่าสีทองจะช่วยป้องกันและบรรเทาอาการของโรคทางเดินอาหารที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้ และเป็นทางเลือกให้ผู้บริโภคนำไปใช้บำบัดรักษาโรคดังกล่าว รวมถึงการนำไปใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ยาปฏิชีวนะ หรือยาในการรักษาโรคสำหรับใช้ในการรักษาโรคทางการแพทย์ หรือนำไปใช้ในส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องเพื่อเพิ่มมูลค่าทางการค้าเชิงพาณิชย์ แต่อาจต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการระบุสายพันธุ์ของถั่งเช่าสีทอง ความเป็นพิษต่อเซลล์ การทดสอบและทดลองในสัตว์ทดลอง รวมถึงการนำไปใช้จริงในมนุษย์ตามกระบวนการมาตรฐานของการศึกษาทางยาและสมุนไพร เพื่อสร้างความมั่นใจต่อผู้บริโภคในการนำไปใช้บำบัดและรักษาโรคอย่างปลอดภัย

**กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (สกสว.) และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย แผนบูรณาการพัฒนาศักยภาพ วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัย และนวัตกรรม ภายใต้แผนบูรณาการงานวิจัยเพื่อสร้างนวัตกรรมจากการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองสู่การเป็นเกษตร 4.0 ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 และขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ (ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ที่อนุเคราะห์สถานที่และสนับสนุนด้านวัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือทางด้านวิทยาศาสตร์ สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

**เอกสารอ้างอิง**

Ahn, Y. J., Park, S. J., Lee, S. G., Shin, S. C. and Choi, D. H. (2000). Cordycepin: Selective growth inhibition derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48: 2744–2748.

Ashraf, S. A., Elkhalifa, A. E. O., Siddiqui, A. J., Patel, M., Awadelkareem, A. M., Anoussi, M., Ashraf, M.S., Adnan, M. and Hadi, S. (2020). Cordycepin for health and wellbeing: A potent bioactive metabolite of an entomopathogenic medicinal fungus *Cordyceps* with its nutraceutical and therapeutic potential. **Molecules** 25(12): 2735–2756.

Bibi, S., Hasan, M. M., Wang, Y. B., Papadakos, S. P., and Yu, H. (2021). Cordycepin as a promising inhibitor of SAR–CoV–2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp). **Current Medicinal Chemistry**

28: 1–11.

Burakorn, J., and Praphruet, R. (2012). Antibacterial activities of seven indigenous vegetable. **Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine** 10(1): 11–21. (in Thai)

Chen, J., Chen, G., Cheng, C., Cong, Y., Li, X., and Zhao, H. (2017). Equilibrium solubility, dissolution thermodynamics and preferential solvation of adenosine in aqueous solutions of N,N–dimethylformamide, N–methyl–2–pyrrolidone, dimethylsulfoxide and propylene glycol. **The Journal of Chemical Thermodynamics** 15: 52–62.

Choi, M. A., Lee, W. K., and Kim, M. S. (1999). Identification and antibacterial activity of volatile flavor components of *Cordyceps militaris*. **Journal of Food Science and Nutrition** 4(1): 18–22.

Dang, H. N., Wang, C. L., and Lay, H. L. (2018). Effect of nutrition, vitamin, grains, and temperature on the mycelium growth and antioxidant capacity of *Cordyceps militaris* (strains AG–1 and PSJ–1). **Journal of Radiation Research and Applied Sciences** 11(2): 130–138.

Deshmukh, N., and Bhaskaran, L. (2023). Comparative analysis of the antioxidant and antibacterial activity of methanolic mycelium extract from *Cordyceps militaris*: A comprehensive study. **Biological Forum – An International Journal** 15(5): 1681–1686.

Dong, C., Yang, T., and Lian, T. (2014). A comparative study of the antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities of methanol extracts from fruit bodies and fermented mycelia of cateroillar medicinal mushroom *Cordyceps militaris* (Ascomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms** 16(5): 485–495.

Du, J., Kan, W., Bao, H., Jia, Y., Yang, J., and Jia, H. (2021). Interactions between adenosine receptors and cordycepin (3′-deoxyadenosine) from *Cordyceps Militaris*: Possible pharmacological mechanisms for protection of the brain and the amelioration of COVID–19 pneumonia. **Journal of Biotechnology and Biomedicine** 4(2): 26–62.

Eiamthaworn, K., Kaewkod, T., Bovonsombut, S., and Tragoolpua, Y. (2022). Efficacy of *Cordyceps militaris* extracts against some skin pathogenic bacteria and antioxidant activity. **Journal of Fungi** 8(4): 327–341.

Fan, B., and Zhu, H. (2012). Cordycepin: Pharmacological properties and their relevant mechanisms. **Association of Humanitas Medicine** 2(2): e14–20.

Gawas, G., Ayyanar, M., Gurav, N., Hase, D., Murade, V., Nadaf, S., Khan, M.S., Chikhale, R., Kalaskar, M., and Gurav, S. (2023). Process optimization for the bio-inspired synthesis of gold nanoparticles using *Cordyceps militaris*, its character-

rization, and assessment of enhanced therapeutic efficacy. **Pharmaceuticals** 16(9): 1–16.

Hong, I. P., Kang, P. D., Kim, K. Y., Nam, S. H., Lee, M. Y., Choi, Y. S., Kim, N. S., Kim, H. K., Lee, K. G., and Humber, R. A. (2010). Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. **Mycobiology** 38: 128–132.

Huang, L., Li, Q., Chen, Y., Wang, X., and Zhou, X. (2009). Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. **African Journal of Microbiology Research** 3(12): 957–961.

Imtiaj, A., and Lee, T. S. (2007). Screening of antifungal activities from Korean wild mushrooms. **World Journal of Agricultural Sciences** 3(3): 316–321.

Jedrejko, K. J., Lazur, J., and Muszynska, B. (2021). *Cordyceps militaris*: An overview of its chemical constituents in relation to biological activity. **Foods** 10: 2634–2658.

Joshi, M., Sagar, A., Kanwar, S. S., and Singh, S. (2019). Anticancer, antibacterial and antioxidant activities of *Cordyceps militaris*. **Indian Journal of Experimental Biology** 57(1): 15–20.

Kang, N., Lee, H. H., Park, I., and Seo, Y. S. (2017). Development of High Cordycepin–producing *Cordyceps militaris* strains. **Microbiology** 45(1): 31–38.

Kato, T., Ahmad, S., and Park, E. Y. (2017). Functional analysis of ribonucleotide reductase from *Cordyceps militaris* expressed in *Escherichia coli*. **Applied Biochemical Biotechnology** 182: 1307–1317.

Kim, S. B., Ahn, B., Kim, B., Ji, H. J., Shin, S. K., Hing, I. P., Kim, C. Y., Hwang, B. Y., and Lee, M. K. (2014). Effect of *Cordyceps militaris* extract and active constituents on metabolic parameters of obesity induced by high–fat diet in C58BL/6 mice. **Journal of Ethnopharmacology** 151(1): 478–484.

Kontogiannatos, D., Koutrotsios, G., Xekalaki, S., and Zervakis, G. I. (2021). Biomass and cordycepin production by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* – A review of various aspects and recent trends towards the exploitation of a valuable fungus. **Journal of Fungi** 7: 986–1014.

Laohaphatanalert, K., and Gavinlertvatana, P. (2020). Potential of Chinese herb "*Cordyceps militaris*" as a medicinal food. **RICE Journal of Creative Entrepreneurship and Management** 1(3): 23–35.

Li, L., Zuo, J. H., Yang, Y. L., Dong, Y. M., Li, Q. Y., and Li, M.H. (2021). Improved bioactivity and composition of *Cordyceps militaris* cultured with Panax ginseng. **Food Science and Technology (Campinas)** 41(2): 660–666.

Lim, L., Lee, C., and Chang, E. (2012). Op-

timization of solid stage culture conditions for the production of adenosine, cordycepin and *D*–mannitol in fruiting body of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps militaris* (L.:Fr) Link (Ascomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms** 14: 181–187.

Liu, J. Y., Feng, C. P., Li, X., Chang, M. C., Meng, J. L., and Xu, L. J. (2016). Immunomodulatory and antioxidative activity of *Cordyceps militaris* polysaccharides in mice. **International Journal of Biological Macromolecules** 86: 594–598.

Liu, Y., Wang, W., Zhang, H., Zang, X., and Han, C. (2015). The chemical constituents and pharmacological actions of *Cordyceps sinensis*. **Evidence–Based Complementary and Alternative Medicine** 2015: 1–12.

Marsup, P., Yeerong, K., Neimkhum, W., Sirithynyalug, J., Anuchapreeda, S., To–auun, C., and Chaiyana, W. (2020). Enhancement of chemical stability and dermal delivery of *Cordyceps militais* extracts by nanoemulsion. **Nanomaterial** 10: 1565–1590.

Ng, T. B., and Wang, H. X. (2005). Pharmacological action of *Cordyceps*, a prized folk medicine. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 57: 1509–1519.

Oh, J., Yoon, D. H., Shrestha, B., Choi, H. K., and Sung, G. H. (2019). Metabolomic profiling reveals enrichment of cordycepin in senescence–process of *Cordyceps militaris* fruit bodies. **Journal of Microbiology** 57(1): 54–63.

Patel, K. J., and Ingalhalli, R. S. (2013). *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Link – An important medicinal mushroom. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** 2(1): 315–319.

Quy, T. N., Xuan, T. D., Andriana, Y., Tran, H. D., and Khanh, T. D. (2019). Cordycepin isolated from *Cordyceps militaris*: Its newly discovered herbicidal property and potential plant–based novel alternative to glyphosate. **Molecules** 24(16): 2901–2918.

Rabie, A. M. (2022). Potent inhibitory activities of the adenosine analogue cordycepin on SARS–CoV–2 replication. **ACS Omega** 7: 2960–2969.

Reis, F. S., Barros, L., Calhelha, R. C., Ciric, A., Griensven, L. J. L. D., Sokovic, M., and Ferreira, I. C. F. R. (2013). The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antimicrobial, antifungal and antihuman tumor cell line properties. **Food and Chemical Toxicology** 62: 91–98.

Singpoonga, N., Sang–on, B. and Chaiprasart, P. (2019). Effects of preservation method on fruiting body formation and cordycepin production of *Cordyceps militaris* culture.

**Agriculture and Nature Resources** 53(2): 106–113.

Sornprasert, R., and Hambananda, A. (2016). Cultivation of *Cordyceps militaris* using different cereal grains and local insect and inhibition efficiency against *Trichopgyton rubrum* and *Staphylococcus aureus*. **The Journal of KMUTNB** 26(2): 239–251. (in Thai)

Tapingkae, T. (2016). ***Cordyceps* Mushroom Cultivation** 2nd ed. Bangkok: Frame–up design.

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., and Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: A review. **Internationale Pharmaceutica Sciencia** 1(1) 98–106.

Verma, A. K. (2020). Cordycepin: A bioactive metabolite of *Cordyceps militaris* and polyadenylation inhibitor with therapeutic potential against COVID–19. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics** 40(8): 3745–3752.

Wen, T., Li, G., Kang, J., Kangand, C., and Hyde, K. D. (2014). Optimization of solid–state fermentation for fruiting body growth and cordycepin production by *Cordyceps militaris.* **Chiang Mai Journal of Science** 41(4): 858–872.

Zhou, X., Gong, Z., Su, Y., Lin, J., and Tang, K. (2009). *Cordyceps* fungi: Natural products, pharmacological functions and developmental products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 61: 279–291.