Extraction and Evaluation of Antifungal Compounds against Mucormycosis and Aspergillosis from Thai Herbal GPO Products Used for COVID-19 Patients

Yordhathai Thongsri[1*], Narathit Chanraeng[2], Peeranut Poorungreang[2], Chatchawan Bampenchao[2] , Kanchana Usuwanthim[1], Pachuen Potup[1] and Sophit Khanthawong[3]

[1]*Cellular and Molecular Immunology Research Unit, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok Province, Thailand*
[2]*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok Province, Thailand*
[3]*Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science and Center of Excellence in Fungal Research, Naresuan University, Phitsanulok Province, Thailand*

Abstract

The affecting of current COVID-19 epidemic in patients complication with COVID-19 associated mucormycosis (CAM) and COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA) results in fatal and life-threatening. *Andrographis paniculata* (AP) and *Curcuma longa* (CL) herbal products by the Government Pharmaceutical Organization are used as an alternative treatment for COVID-19 patients while the antifungal activity data are still unknown. We aimed to test the antifungal activity of herbal products against CAM and CAPA pathogenic fungi together with suitable solvent extraction of active compounds from both products. A screening antifungal activity test using powder of AP and CL (200 mg/mL) in hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol was conducted with agar toxicity method against five pathogenic fungi: *Rhizopus* sp., *Absidia* sp., *Mucor* sp., *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus*. The results showed that CL powder in ethyl acetate produced better antifungal effect than AP. The highest inhibition effect on *A. fumigatus* was detected with the mycelial growth inhibition (MGI) of 100%. For the extraction with partition method, % yield of CL with methanol was 24.35% and 18.24% from AP crude extracts. The crude extracts (0.6 mg/mL) in 1% DMSO were tested for antifungal activity by disc diffusion method. The crude extract from

***Corresponding author E-mail address:** yordhathait@nu.ac.th
Received: 6 June 2023 Revised: 13 July 2023 Accepted: 27 July 2023

#52-3-66 .indd 8756 7/12/2566 BE 12:33

CL could inhibit the mycelial growth of 4 species of fungi, *Mucor* sp. *Absidia* sp. *A. flavas* and *A. fumigatus*. The highest effect was on *A. fumigatus* with an inhibition zone of 12.10 mm while AP could not show any effect against the tested fungi. The antifungal properties of AP and CL herbal products here supported and added value to Thai medicinal herbs used in alternative treatments for COVID-19 patients infected with opportunistic fungi that may be found in COVID-19 patients in the future.

Keywords: *Andrographis paniculata*, *Curcuma longa*, Mucormycosis, Aspergillosis, COVID-19

#52-3-66 .indd 8757 7/12/2566 BE 12:33

การสกัดและทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโคสิสและโรคแอสเปอร์จิลโลสิสจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโควิด 19

ยอดหทัย ทองศรี[1*] นราทิตย์ จันแรง[2] พีรณัฐ ผู้รุ่งเรือง[2] ชัชวาลย์ บำเพ็ญเชาว์[2]
กาญจนา อู่สุวรรณทิม[1] พาชื่น โพทัพ[1] และ โศภิศ คันธวงศ์[3]

[1]หน่วยวิจัยภูมิคุ้มกันวิทยาระดับเซลล์และโมเลกุล ภาควิชาเทคนิคการแพทย์
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
[2]ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
[3]ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา และ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเห็ดและรา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อราฉวยโอกาสแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคโควิด 19 ชนิด COVID-19 associated mucormycosis (CAM) และ COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA) มีความรุนแรงและอันตรายถึงชีวิต ประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันเป็นยาทางเลือกสำหรับโรคโควิด 19 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาชนิดของสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมและประเมินการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคแทรกซ้อนดังกล่าวจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่เชื้อ *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. *Mucor* sp. *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* โดยสารที่ใช้เป็นตัวทำละลายและ/หรือสารสกัดสมุนไพร ได้แก่ น้ำกลั่น เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นด้วยวิธี agar toxicity ของสารละลายสมุนไพรที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า ขมิ้นชันมีฤทธิ์ต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงกว่าฟ้าทะลายโจร โดยผงขมิ้นชันที่ละลายด้วยเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งเชื้อ *A. fumigatus* ได้ร้อยละ 100 และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตสารสกัดหยาบจากผงสมุนไพรด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดพบว่า เมทานอลให้ปริมาณสารสกัดหยาบจากผงขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจรมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 24.35 และ 18.24 ตามลำดับ การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบผงสมุนไพรจากตัวทำละลายต่างชนิดที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากผงขมิ้นชันด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 4 สายพันธุ์ คือ *Mucor* sp. *Absidia* sp. *A. flavas* และ *A. fumigatus* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ได้ดีที่สุด

คำสำคัญ: ฟ้าทะลายโจร ขมิ้นชัน โรคมิวคอร์ไมโคสิส โรคแอสเปอร์จิลโลสิส โควิด 19

***ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address:** yordhathait@nu.ac.th
รับบทความ: 6 มิถุนายน 2566 แก้ไขบทความ: 13 กรกฎาคม 2566 รับตีพิมพ์บทความ: 27 กรกฎาคม 2566

#52-3-66 .indd 8758 7/12/2566 BE 12:33

บทนำ

ปัจจุบันมีการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อโคโรนาไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่เรียกว่า severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ไวรัสและโรคอุบัติใหม่นี้เริ่มมีการระบาดในเมืองอู่ฮั่น ประเทศจีนในเดือนธันวาคมปี พ.ศ. 2562 และมีการระบาดใหญ่ไปทั่วส่งผลกระทบแก่หลายประเทศทั่วโลก[1] อีกทั้งผู้ป่วยหลายรายได้รับผลกระทบจากการเป็นโรคเป็นระยะเวลานานทำให้ร่างกายอ่อนแอลง เรียกว่าเกิดภาวะ long COVID โดยภาวะ long-COVID-19 syndrome หรือ post-COVID-19 syndrome คืออาการหลงเหลือหลังการติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว เนื่องจากในขณะที่ป่วย ร่างกายมีการสร้างแอนติบอดีบางอย่างซึ่งไปจับกับโปรตีนในเซลล์ของอวัยวะบางส่วนในร่างกายและไปทำลายอวัยวะต่าง ๆ โดยบางรายอาจมีภาวะแทรกซ้อนรุนแรงขณะรับการรักษา ซึ่งผลกระทบของ long Covid สามารถเกิดขึ้นได้ทั่วร่างกายตั้งแต่ระบบหายใจ ระบบประสาท ระบบทางเดินอาหาร และระบบหัวใจและหลอดเลือด

ภาวะแทรกซ้อนรุนแรงที่พบได้ในผู้ป่วยติดเชื้อโควิด 19 มักเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราแทรกซ้อนในระบบทางเดินหายใจที่มีพยาธิสภาพถูกทำลายจากการติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยเชื้อแทรกซ้อนส่วนใหญ่ เช่น แบคทีเรีย *Mycoplasma pneumoniae* เชื้อราก่อโรคแอสเปอร์จิลโลสิส (aspergillosis) และแคนดิดิเอสิส (candidiasis) ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถพบได้บ่อยในกลุ่มคนที่มีภาวะ long-COVID-19 syndrome[1] นอกจากนี้ยังพบรายงานเกี่ยวกับโรคติดเชื้อมิวคอร์ไมโคสิส (mucormycosis) ในผู้ป่วยโควิด 19 ที่เพิ่มขึ้นทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศอินเดีย โรคมิวคอร์ไมโคสิสหรือโรคราดำ (black fungus) เป็นโรคติดเชื้อราที่ลุกลามอย่างรวดเร็วทางหลอดเลือด (angioinvasive) เป็นภาวะร้ายแรงที่ส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยหลายกลุ่ม เชื้อราที่ก่อโรคมิวคอร์ไมโคสิส ได้แก่ *Mucor* sp. *Rhizopus* sp. และ *Absidia* sp. นอกจากนี้ยังอาจส่งผลให้ผู้ป่วยติดเชื้อราฉวยโอกาสอื่น ๆ ได้ เช่น โรค COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA) ที่มีเชื้อก่อโรคหลักคือเชื้อ *Aspergillus fumigatus* โดยสาเหตุหลักที่ส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อราฉวยโอกาส คือ สภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนต่ำ (hypoxia) กลูโคสสูง (โรคเบาหวาน, new-onset hyperglycemia, steroid induced hyperglycemia) ภาวะที่เป็นกรด (metabolic acidosis, diabetic ketoacidosis) ระดับธาตุเหล็กสูง และการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวลดลงจากการกดภูมิคุ้มกันร่วมกับปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ รวมถึงการรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นระยะเวลานาน[2, 3] ปัจจุบันยังไม่มียาต้านไวรัสที่จำเพาะสำหรับการรักษาโรคโควิด 19 จึงมีการรักษาด้วยยาที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงมากที่สุด เช่น เรมเดซิเวียร์ (GS-5734) ฟาวิพิราเวียร์ (T-705) และคลอโรควิน[4] แต่การรักษาด้วยยาแผนปัจจุบันอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วยได้ อีกทั้งยังมีราคาแพงและหาซื้อได้ยาก จึงมีการนำสมุนไพรธรรมชาติบางชนิดมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคโควิด 19 เช่น ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) เนื่องจากผลการศึกษาวิจัยพบว่ามีกลไกต้านไวรัส ป้องกันไม่ให้ไวรัสเข้าเซลล์ ลดการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ เพิ่มภูมิคุ้มกันในการต่อสู้กับไวรัส และลดการอักเสบที่ปอดจากการติดเชื้อไวรัสได้[5, 6] ซึ่งการรักษาด้วยยาสมุนไพรให้ผลการรักษาได้ดีใกล้เคียงกับยาแผนปัจจุบัน มีความปลอดภัยแก่ผู้ใช้มากกว่า และสามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่นเพราะส่วนใหญ่เป็นพืชซึ่งมีอยู่ทั่วไปทั้งในเมืองและชนบท และ

ด้วยสรรพคุณการออกฤทธิ์ของสมุนไพรส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์กว้างรักษาโรคได้หลายชนิด จึงสามารถพบรายงานผลของสมุนไพรในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้านการเจริญของเชื้อจุลชีพได้มากมาย

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาชนิดของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ใช้รักษาโรคโควิด 19 และประเมินการออกฤทธิ์ของสมุนไพรต่อการต้านเชื้อราก่อโรคฉวยโอกาส มิวคอร์ไมโคสิสและแอสเปอร์จิลโลสิส ซึ่งข้อมูลผลการศึกษาอาจช่วยเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรในการรักษาโรคได้

วัสดุและวิธีการ

1. สายพันธุ์เชื้อราและการเพาะเลี้ยง

งานวิจัยนี้ใช้เชื้อราเพื่อการศึกษาทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. *Mucor* sp. *A. fumigatus* และ *A. flavus* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.โศภิศ คันธวงศ์ สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (เอกสารรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพ NUIBC MI 61-08-49) โดยนำเชื้อรามาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud dextrose agar (SDA) slant และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-5 วัน เพื่อเก็บเป็นสต็อก ซึ่งเชื้อที่ใช้สำหรับการทดสอบ antifungal susceptibility test จะ subculture จากหลอดสต็อกโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด SDA plate ที่สภาวะเดิม เมื่อเชื้อเจริญแล้วจึงตัดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากการเพาะเลี้ยงและเป็นการควบคุมปริมาณของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันด้วยวิธี agar toxicity

สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ใช้ในการศึกษาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรบรรจุแคปซูลพร้อมทานจำหน่ายโดยองค์การเภสัชกรรมของประเทศไทย ภายใต้เลขทะเบียนเลขที่ G468/41 และ G447/41 ตามลำดับ โดยในการทดสอบใช้ความเข้มข้นของสมุนไพรแต่ละชนิดเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในตัวทำละลายน้ำกลั่นและตัวทำละลายมีขั้ว ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล

การทดสอบด้วยวิธี agar toxicity[13] ทำโดยนำสารละลายสมุนไพรที่เตรียมจากตัวทำละลายแต่ละชนิดในปริมาตรสุทธิ 2 มิลลิลิตร มาผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ปราศจากเชื้อ 18 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้วจึงเทลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำเชื้อราที่ต้องการทดสอบวางลงตรงกลางจานอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยในการทดสอบมีการควบคุมผลของตัวทำละลายต่อการเจริญของเชื้อราด้วยการใช้อาหาร SDA ผสมน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ (negative control) หรือผสมตัวทำละลายแต่ละชนิดเป็น solvent control นอกจากนี้ในการศึกษาได้ใช้ยาแอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

การอ่านผลทำโดยวัดและบันทึกค่าเส้นผ่าศูนย์กลางในหน่วยมิลลิเมตรของโคโลนีของเชื้อทุก 24 ชั่วโมง จนเชื้อในจานควบคุมลบเจริญเติบโตจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำผลการวัดการเจริญของเชื้อราบนจานควบคุมและจานทดสอบมาคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (mycelial growth inhibition rate, % MGI) ของการทดสอบ agar toxicity ด้วยสูตรตามแสดง

MGI = (DC-DT)/DC x 100

DC = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อบนจานควบคุม

DT = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อบนจานทดสอบ

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันด้วยวิธี disc diffusion

นำผงสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันจากผลิตภัณฑ์มาละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 50 กรัมต่อ 500 มิลลิลิตร และนำมาสกัดหยาบด้วยวิธีแยกชั้น (partition method) โดยใช้กรวยแยก (separatory funnel) และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 การสกัดทำทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำชั้นของสารละลายที่สกัดได้กรองด้วยสำลีและโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ชั้นของสารสกัดอินทรีย์ที่ได้แต่ละชนิดนำไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การคำนวณปริมาณผลผลิตร้อยละ (% yield) ของสารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata* extract, AP) และสารสกัดหยาบขมิ้นชัน (*C. longa* extract, CL) ที่เตรียมได้สามารถคำนวณได้จากสูตร

ปริมาณผลผลิตร้อยละ (% yields) = W1/W2 x 100

W1 = ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้

W2 = ปริมาณสาร (ผงสมุนไพร) เริ่มต้น

สารสกัดหยาบจากผงสมุนไพรที่มาจากตัวทำละลายแต่ละชนิดนำไปเตรียมสารละลายความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เข้มข้นร้อยละ 1 เป็นตัวทำละลาย และส่วนของชั้นน้ำ (aqueous phase) ที่เหลือจากการสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยวิธี agar disc diffusion[12, 14] โดยดูดสารละลายดังกล่าว 20 ไมโครลิตร มาหยดลงบนแผ่นดิสก์ปลอดเชื้อ (sterile disc) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตร นำวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA แล้วจึงนำเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบวางลงตรงกลางของจานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยในการทดสอบมีการควบคุมผลของตัวทำละลายต่อการเจริญของเชื้อราด้วยการใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ (negative control, NC) DMSO เข้มข้นร้อยละ 1 เป็น DMSO control (DC) และตัวทำละลายอินทรีย์มีขั้วแต่ละชนิดเป็นตัวทำละลายควบคุม (solvent control, SC) หยดลงบนแผ่นดิสก์ปลอดเชื้อในปริมาตรเท่ากัน วางทดสอบในจานเพาะเชื้อเดียวกัน นอกจากนี้ในการศึกษาได้ใช้แผ่นยาไอทราโคนาโซล (itraconazole) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมบวก (positive control, PC) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ การอ่านผลทำโดยวัดโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อรอบแผ่นดิสก์ (inhibition zone) และบันทึกค่าเส้นผ่าศูนย์กลางในหน่วยมิลลิเมตร จนกว่าเชื้อเจริญถึงแผ่นควบคุมลบ (negative control disc) โดยรายงานผลการทดสอบเป็น active หรือ non-active หากพบหรือไม่พบโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อรอบแผ่นดิสก์ทดสอบตามลำดับ

4. สถิติในการวิจัย

บันทึกผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากการทดสอบ agar toxicity โดยบันทึกการเจริญของเชื้อราโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ตำแหน่ง บันทึกค่าการเจริญของเชื้อทั้งหมด 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ย (mean) การเจริญของเชื้อ ในหน่วยมิลลิเมตรมาคำนวณ

หาค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (mycelial growth inhibition rate, % MGI) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่า MGI ที่มากกว่าร้อยละ 50 ถือว่ามีการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดี การทดสอบวิธี disc diffusion บันทึกค่าโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อ (inhibition zone) โดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์วัดรอบมุมทั้งสามด้านรอบแผ่นดิสก์ บันทึกค่าการเจริญของเชื้อทั้งหมด 3 ซ้ำ รายงานผลค่าโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ในหน่วยมิลลิเมตร

ผลการวิจัย

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันด้วยวิธี agar toxicity

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพร 2 ชนิด คือ ฟ้าทะลายโจร และขมิ้นชัน ละลายในน้ำกลั่นและในตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดคือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโคสิสจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Rhizopus* sp. *Mucor* sp. และ *Absidia* sp. และเชื้อราก่อโรคแอสเปอร์จิลโลสิสจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่เชื้อ *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* ด้วยวิธี agar toxicity ตัวทำละลายที่ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุดของผงขมิ้นชันคือเอทิลอะซิเตท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. *A. fumigatus* และ *A. flavus* โดยมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ดีที่สุด มีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ร้อยละ 100 (Table 1, Fig. 1) และผงฟ้าทะลายโจรที่ละลายด้วยเอทิลอะซิเตท ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดต่อเชื้อราก่อโรค 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *A. fumigatus* และ *A. flavus* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ได้ดีที่สุด มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ร้อยละ 67.21 (Table 1, Fig. 1) จากผลการทดสอบสรุปได้ว่าผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคที่ทดสอบได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร โดยพบว่าผงสมุนไพรที่ละลายด้วยตัวทำละลายดังกล่าวมีค่า MGI ที่มากกว่าร้อยละ 50 โดยผงขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคที่นำมาทดสอบได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ส่วนผงฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทดสอบได้เพียง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Mucor* sp. *Absidia* sp. *A. fumigatus* และ *A. flavus*

Table 1 Mycelial growth inhibition rate of *Andrographis paniculata* (AP) and *Curcuma longa* (CL) against five human pathogenic fungi by agar toxicity assay.

solvent	Herbal type	Mycelial growth inhibition (MGI) (%)				
		***Rhizopus* sp.**	***Absidia* sp.**	***Mucor* sp.**	***A. flavus***	***A. fumigatus***
DI	**AP**	0.00	0.00	7.01	0.00	0.00
	CL	33.88	58.32	53.34	60.97	12.64
	PC	84.50	66.89	84.50	84.50	84.50
Hex	**AP**	0.00	4.01	18.63	0.00	39.46
	CL	42.27	56.08	54.64	54.83	25.97
	PC	84.50	64.39	63.06	84.50	55.91
DCM	**AP**	0.00	0.00	38.06	0.00	0.00
	CL	64.84	51.40	73.75	65.85	18.05
	PC	84.50	60.29	60.83	84.50	32.69
EtOAc	**AP**	0.00	0.00	N/A	11.03	67.21
	CL	79.90	53.79	N/A	71.08	100.00
	PC	62.38	39.10	55.19	84.50	70.56
MeOH	**AP**	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	CL	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	PC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

AP; *Andrographis paniculata*, CL; *Curcuma longa*, DI; Deionized water, Hex; Hexane, DCM; Dichloromethane, EtOAc; Ethyl acetate, MeOH; Methanol, PC; Positive control (Amphotericin B 1 mg/mL), N/A : Not available (no colony growth)

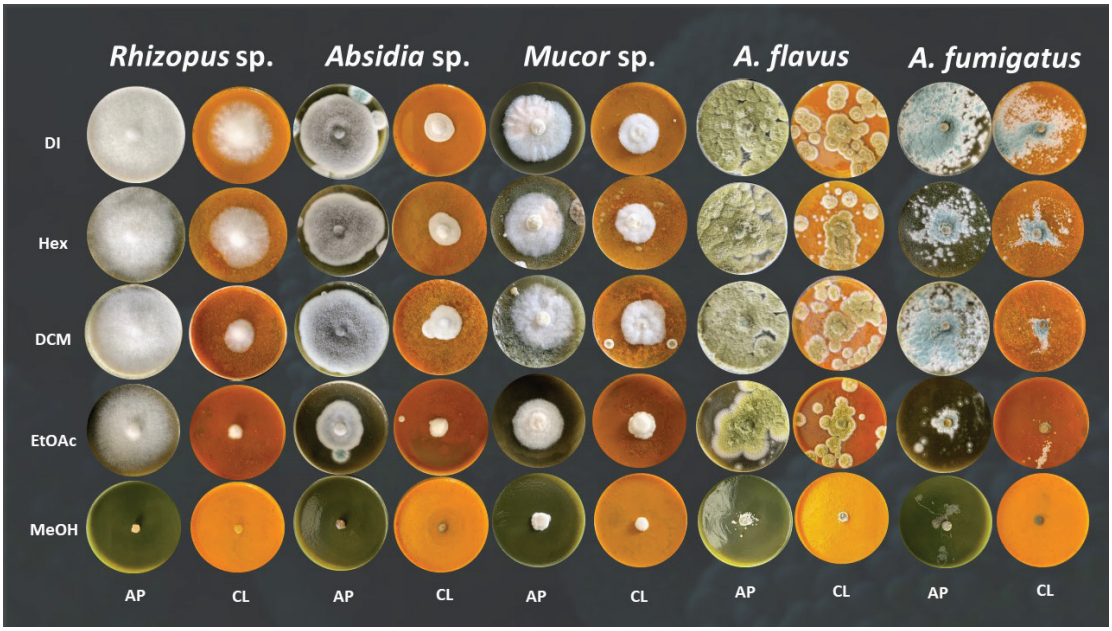


Fig. 1 Mycelial growth inhibition of *Andrographis paniculata* (AP) and *Curcuma longa* (CL) dissolved in various types of organic solvent against five strains of human pathogenic fungi by agar toxicity assay. AP; *Andrographis paniculata*, CL; *Curcuma longa*, DI; Deionized water, Hex; Hexane, DCM; Dichloromethane, EtOAc; Ethyl acetate, MeOH; Methanol.

2. การสกัดสารต้านเชื้อราจากฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

การสกัดสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโคสิส และโรคแอสเปอร์จิลโลสิสด้วยวิธีแยกชั้น (partition method) และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้วที่แตกต่างกัน ได้แก่ สารละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน เมื่อได้สารสกัดหยาบจากผงสมุนไพรแล้วนำไปคำนวณหาปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้ดังแสดงใน Table 2 สารสกัดหยาบเมทานอลจากขมิ้นชัน มีน้ำหนักของสารสกัดหยาบสูงที่สุดเท่ากับ 12.17 กรัม เมื่อนำมาคำนวณปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบได้เท่ากับร้อยละ 24.34 การสกัดสารสำคัญจากฟ้าทะลายโจรพบว่าตัวทำละลายเมทานอล มีน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่สกัดได้สูงที่สุดเช่นเดียวกันโดยมีน้ำหนักเท่ากับ 9.12 กรัม เมื่อนำมาคำนวณปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบได้เท่ากับร้อยละ 18.24

Table 2 Weight and % yield of crude extracts from *Andrographis paniculata* (AP) and *Curcuma longa* (CL) with different types of organic solvent by partition method.

Solvent	Crude extract (g)		% Yield of crude extract	
	AP	CL	AP	CL
Hexane	0.77	2.36	1.54	4.73
Dichloromethane	1.01	6.28	2.20	12.55
Ethyl acetate	7.15	7.31	14.30	14.63
Methanol	9.12	12.17	18.24	24.34

AP; *Andrographis paniculata*, CL; *Curcuma longa*

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันด้วยวิธี disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม ได้แก่ ฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชัน ต่อเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโคสิส จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. และ *Mucor* sp. และเชื้อราก่อโรคแอสเปอร์จิลโลสิสจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* โดยการสกัดสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล นำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี agar disc diffusion ผลการทดสอบดังแสดงใน Table 3 พบว่าสารสกัดหยาบ hexane จากผงขมิ้นชันให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อดีที่สุด จากเชื้อ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Absidia* sp. *A. fumigatus* และ *A. flavus* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ดีที่สุด มีค่าโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 12.10 มิลลิเมตร (Fig. 2) การทดสอบสารสกัดหยาบเมทานอล จากผงฟ้าทะลายโจรให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อดีที่สุดจากเชื้อ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Mucor* sp. และ *A. flavus* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Mucor* sp. ดีที่สุด มีค่าโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 8.95 มิลลิเมตร (Fig. 3)

Table 3 Antifungal activity of crude extracts from *Andrographis paniculata* (AP) and *Curcuma longa* (CL) against five human pathogenic fungi by disc diffusion method.

Solvent	Herb type	Inhibition zone (mm.)				
		***Rhizopus* sp.**	***Absidia* sp.**	***Mucor* sp.**	***A. flavus***	***A. fumigatus***
Hex	**AP**	0	0	6.35	0	0
	CL	0	8.01	6.46	5.3	12.1
	PC	8.72	19.44	6.38	22.06	21.71
DCM	**AP**	0	0	0	0	0
	CL	0	0	0	0	3.49
	PC	8.75	11.27	4.93	17.78	19.38
EtOAc	**AP**	0	0	0	8.51	0
	CL	0	0	0	9.34	0
	PC	9.25	10.41	4.95	23.20	23.14
MeOH	**AP**	0	0	8.95	0	0
	CL	0	0	0	0	0
	PC	9.28	10.85	9.15	23.98	22.89

AP; *Andrographis paniculata*, CL; *Curcuma longa*, DI; Deionized water, Hex; Hexane, DCM; Dichloro-methane, EtOAc; Ethyl acetate, MeOH; Methanol, PC = Positive control (Itraconazole 30 µg/mL)

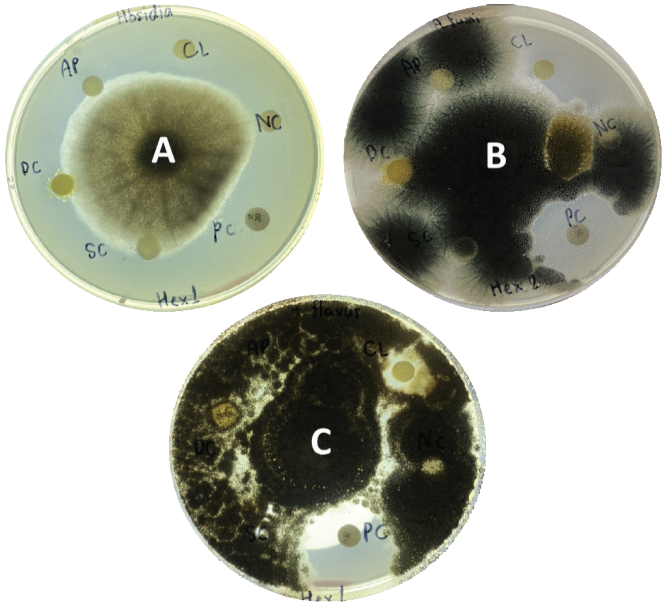


Fig. 2 Antifungal activity of crude hexane extract from *Curcuma longa* (CL) against human pathogenic fungi by disc diffusion method; A) antifungal activity of *Absidia* sp. B) *Aspergillus fumigatus* and C) *Aspergillus flavus*.: AP; Andrographis paniculata, CL; *Curcuma longa*, NC; Negative control (Deionized water), PC; Positive control (Itraconazole, 30 µg/mL); DC; 1%DMSO control and SC; Solvent control (Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, and Methanol).

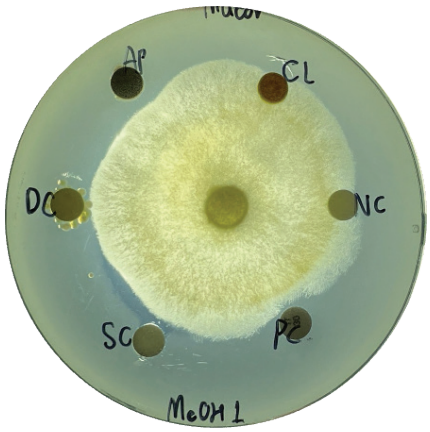


Fig. 3 Antifungal activity of crude methanol extract from *Andrographis paniculata* (AP) against *Mucor* spp. by disc diffusion method: AP; *Andrographis paniculata*, CL; *Curcuma longa*, NC; Negative control (Deionized water), PC; Positive control (Itraconazole (30 µg/mL); DC; 1%DMSO control and SC; Solvent control (Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, and Methanol).

วิจารณ์

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ที่ละลายในน้ำกลั่นและตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดคือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ต่อเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโคสิส จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Rhizopus* sp. *Mucor* sp. และ *Absidia* sp. และเชื้อราก่อโรคแอสเปอร์จิลโลสิส จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* ด้วยวิธี agar toxicity พบว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท สารสกัดที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่น ผลการทดสอบเมื่อใช้ตัวทำละลายเมทานอล ไม่สามารถแปลผลได้ เนื่องจากปริมาณเมทานอล ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบ ด้วยวิธี agar toxicity มีความเข้มข้นสูง เมื่อเพาะเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่พบการเจริญเติบโตเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นพิษสูง แต่เมื่อนำสมุนไพรมาสกัดสารต้านเชื้อราด้วยวิธีแยกชั้น (partition method) พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ดีทั้งจากขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายเมทานอลสามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดี จากการสกัดสารสำคัญของฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชัน พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลจากขมิ้นชัน มีน้ำหนักของสารสกัดหยาบสูงที่สุด เท่ากับ 12.17 กรัม เมื่อนำมาคำนวณปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบได้เท่ากับร้อยละ 24.34 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Popuri และ Pagara ในปี พ.ศ. 2556 ที่ศึกษาการสกัดสารเคอคูมิน จากรากของขมิ้นชันด้วยตัวทำละลาย อะซิโตน เอทิลอะซิเตท เอทานอล เมทานอล ไอโซโพรพานอล และเฮกเซน พบว่าตัวทำละลายเมทานอลละลายผงขมิ้นชันได้ดี และสามารถสกัดสารเคอคูมินที่เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญของขมิ้นชันได้ดีที่สุด[7] การสกัดสารสำคัญจากฟ้าทะลายโจรพบว่าตัวทำละลาย เมทานอล ให้น้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้สูงที่สุดเช่นเดียวกันจากงานวิจัยของ Farhana และคณะ ในปี พ.ศ. 2565 ได้สกัดสารสำคัญจากรากฟ้าทะลายโจรด้วยตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท เอทานอล และ เมทานอล พบว่าตัวทำละลาย เมทานอล ให้ปริมาณผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 12.60[8] และ ในปี พ.ศ. 2552 Kumoro และ Hasan ได้สกัดสารแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของใบฟ้าทะลายโจรด้วยวิธี standard soxhlet method โดยใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม อะซิโตน เอทานอล และเมทานอล พบว่าตัวทำละลาย เมทานอล สามารถสกัดสารแอนโดรกราโฟไลด์ จากใบฟ้าทะลายโจรได้ดีที่สุด โดยได้ปริมาณผลผลิตเท่ากับร้อยละ 38.08[9]

การทดสอบสารสกัดหยาบเฮกเซน จากผงขมิ้นชันให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ดีที่สุด (ค่าโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อ เท่ากับ 12.10 มิลลิเมตร) ซึ่งจากงานวิจัยของ Das และ Bhatnagar ในปี พ.ศ. 2563 ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันและขิง (ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าสารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* ได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน (อัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อร้อยละ 47.19)[10] การทดสอบสารสกัดหยาบเมทานอลจากผงฟ้าทะลายโจรให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อดีที่สุด จากเชื้อ *Mucor* sp. (ค่าโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อ เท่ากับ 8.95 มิลลิเมตร) (Table 3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chuku

และคณะ ในปี พ.ศ. 2563 ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วยสารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยตัวทำละลาย เอทานอล และเมทานอล ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. *A. niger A.flavus* และ *Mucor* sp. พบว่าสารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทดสอบได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน[11] ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นที่พบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ละลายด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด ในขณะที่เมื่อนำผงผลิตภัณฑ์สมุนไพรมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกันพบว่าสารละลายเฮกเซนให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมที่ดีที่สุด ทั้งนี้อาจเกิดจากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นได้มีการผสมตัวทำละลายลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นสารประกอบที่สามารถออกฤทธิ์ได้ดีเมื่อละลายด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท แต่เมื่อได้สกัดสารสำคัญให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ตัวทำละลายเฮกเซนสามารถสกัดออกมาได้ดีกว่าจึงทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีกว่า จากการศึกษาในครั้งนี้ได้มีการใช้ตัวทำละลายเพียง 4 ชนิด ในการสกัดสารสำคัญ และจากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันขององค์การเภสัชกรรมในครั้งนี้ ที่พบว่ามีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา จึงสามารถนำสารสกัดหยาบที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปวิเคราะห์หาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและนำไปทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อใช้ในการผลิตยาต้านเชื้อราที่สกัดได้จากธรรมชาติต่อไปได้ นอกจากนี้ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัดสารต้านเชื้อราจากผงสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันขององค์การเภสัชกรรมที่ใช้ในผู้ป่วยโควิด 19 เพื่อเพิ่มโอกาสในการค้นหาสารสำคัญที่สามารถป้องกันการติดเชื้อราฉวยโอกาสที่อาจเกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยโควิด 19 ได้อีกด้วย

สรุป

การใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรในการรักษาโรคโควิด 19 ในช่วงที่มีการระบาดของโรครุนแรงที่ผ่านมาด้วยผลิตภัณฑ์ สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม 2 ชนิด คือ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) และการที่พบโรคติดเชื้อรา โรคแอสเปอร์จิลโลสิส และมิวคอร์ไมโคสิส การศึกษานี้ได้ทดสอบสกัดสารต้านเชื้อราด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ 4 ชนิด และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นด้วยวิธี agar toxicity เพื่อเลือกชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม พบว่าตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น เมื่อสกัดสารสกัดหยาบจากผงสมุนไพรแล้วทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนจากผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร การวิจัยนี้เป็นการศึกษานำร่องในการเลือกใช้ตัวทำละลายโดยใช้คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อราก่อโรคเป็นตัวบ่งชี้ (antifungal activity guided) เพื่อนำไปสู่การสกัดสารต้านเชื้อราให้บริสุทธิ์ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงาน คณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรมปีงบประมาณ 2565 (R2565B092) ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. วรศักดิ์ แก้วก่อง และนางสาวชนนิกานต์ ตู้ทอง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร นายกิตติ ปานมณี

และนายปาน สถานทุง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้ชุดระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศ และสถานที่การทำวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

1. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. J Infect 2020; 81: 266-75.
2. Singh AK, Singh R, Joshi SR, Misra A. Mucormycosis in COVID-19: A systematic review of cases reported worldwide and in India. Diabetes Metab Syndr 2021; 15.
3. Martin Hoenigl, Danila Seidel, Agostinho Carvalho SMR, *et al*. The emergence of COVID-19 associated mucormycosis: Analysis of cases from 18 countries. The Lancet. Microbe 2022; 3: 543-52.
4. Tidwong N, Montakantikul P, Manosuthi W. Pharmacological treatment for the novel coronavirus disease 2019 (COVID-19 infection). Pharm Sci Asia 2020; 47: 97-103.
5. Satayavivad J. *Andrographis Paniculate* : from integrated research to clinical use as anti COVID-19. J Chulabhorn Royal Acad 2022; 4: 1-14.
6. Bormann M, Alt M, Schipper L, *et al*. Turmeric root and its bioactive ingredient curcumin effectively neutralize SARS-CoV-2 *in vitro*. Viruses. 2021; 13: 1914.
7. Asshok Kumar Popuri, Bangaraiah Pagala. Extraction of curcumin from tumeric roots. IJIRS 2013; 2: 290-9.
8. Farhana S, Aziz S, Rahman S, Afrin S, Bhuiyan MNI, Al-Reza SM. Chemical composition of fixed oil and *in vitro* antimicrobial activity of *Andrographis paniculata* root. J King Saud Univ Sci 2022; 34: 101921.
9. Andri Cahyo Kumoro, Masitah Has. Experimental and modeling studies of Andrographolide extraction from *Andrographis paniculata* in a soxhlet extractor. Proceedings of the 1st International Conference on Natural Resources Engineering & Technology 2006 (24-25th July 2006); Putrajaya, Malaysia, 664-70.
10. Rashmi Das, Sunita Bhatnagar. Evaluation of *curcuma longa* and *curcuma amada* against aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. World J Pharm Sci 2020; 8: 8-12.
11. Chuku EC, Chika B, Nmom FW. Fungicidal property of *Andrographis paniculata* extract on fungal organisms from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (Melon Seeds). IJISRT 2020; 5.

12. Thanaboripat D, Thawai C, Jindaporn N, Mathurot O, Kongniam O. Growth inhibition of *Aspergillus flavus* IMI 242684 by crude extract of *Penicillium* sp. KMITL Sci Tech 2011; 11: 79-84.
13. Mulatu A, Megersa N, Tolcha T, Alemu T, Vetukuri RR. Antifungal compounds, GC-MS analysis and toxicity assessment of methanolic extracts of *Trichoderma* species in an animal model. PLoS ONE 2022; 17: e0274062.
14. Arikan S, Paetznick V, Rex JH. Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3084-7.