โครงการย่อยที่ 1

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกของสารสกัดจากแก่นครี้

Studies on the antibacterial activity of *Dalbergia parviflora* heartwood extract against Gram-negative and Gram-positive bacteria

ภายใต้ชุดโครงการ : การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากแก่นครี้

Studies on the antimicrobial activity of heartwood extract of *Dalbergia parviflora*

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น

และ

เทพพร โลมารักษ์

โครงงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

พ.ศ. 2558

(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์)

เลขที่สัญญา 52 /2558

โครงการย่อยที่ 1

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกของสารสกัดจากแก่นครี้

Studies on the antibacterial activity of *Dalbergia parviflora* heartwood extract against Gram-negative and Gram-positive bacteria

ภายใต้ชุดโครงการ : การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากแก่นครี้

Studies on the antimicrobial activity of heartwood extract of *Dalbergia parviflora*

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น

และ

เทพพร โลมารักษ์

โครงงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

พ.ศ. 2558

(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนจากงบประมาณเพื่อจัดสรรทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2558 คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

บทคัดย่อ

แก่นครี้เป็นสมุนไพรไทยที่มีสารพฤกษเคมีกลุ่มฟลาโวนอยด์หลากหลายชนิด การศึกษาครั้งนี้จึงใช้สารสกัดหยาบจากแก่นครี้ที่สกัดด้วยเมทานอลมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ (*Bacillus cereus* และ *Enterococcus faecium)* และแบคทีเรียแกรมลบ 4 สายพันธุ์ (*Acenetobactor baumannii* ATCC 19606 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 และ *Pseudomonsa aeruginosa* PAO1) การทดสอบใช้เทคนิควิธีทางสเปกโตรโฟโตรเมตรีและสเปกโตรฟลูออโรเมตรี และรายงานค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ที่ร้อยละ 90 (MIC_{90}) ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากแก่นครี้มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่าและมีค่า MIC_{90} เป็น 12.5 µg/mL และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ถึง 99.85% และ 100% ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 µg/mL ตามลำดับ ศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *B. Cereus* ของสารสกัดจากแก่นครี้จะสามารถนำไปพัฒนาเป็นสารป้องกันการบูดเน่าของอาหารประเภทแป้งได้ ในขณะที่การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เมื่อใช้สารสกัดจากแก่นครี้ที่ความเข้มข้นสูงสุดในการทดลอง (50 µg/mL) พบว่ายังไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ ดังนั้นจึงประเมินได้ว่าสารสกัดจากแก่นครี้ยังไม่มีประสิทธิภาพพอที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้านแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ยกเว้น *B. cereus*

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย สมุนไพร แก่นครี้

ABSTRACT

Dalbergia parviflora, the Thai medicianl plant which is a rich source of flavonoids. The methanolic extract of *D. parviflora* was evaluated for its antibacterial activity against 2 stains of Gram-positive bacteira (*Bacillus cereus* and *Enterococcus faecium*) and 4 strains of Gram-negative bacteria (*Acenetobactor baumannii ATCC 19606, Escherichia coli ATCC 25922, Klebsiella pneumoniae ATCC 700603* and *Pseudomonsa aeruginosa PAO1*) by assay for 90% minimum inhibitory concentration (MIC_{90}). The antibacterial activity was determined by spectrophotometry and spectrofluorometry methods. The results revealed that the methanolic extract of *D. parviflora* exhibited the highest antibacterial activity against *B. cereus* MIC_{90} value is 12.5 µg/mL. The extract also exhibited 99.8 and 100% inhibition at concentration of 25 and 50 µg/mL respectively. This study shows the potential of *D. parviflora* extract can be used as food bio-preservative especially rice-based foods. In contrast, the *D. parviflora* extract did not inhibit the other bacterial at the maximum concentration of this experiment (50 µg/mL). These results suggest that *D. parviflora* extract is not an efficient for application of antibacterial except *B. cereus*

Keywords: Antibacterial, Medicinal plant, *Dalbergia parviflora*,

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....*(i)*

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....*(ii)*

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....*(iii)*

สารบัญเรื่อง.....*(iv)*

สารบัญรูปภาพ.....*(vi)*

สารบัญตาราง.....*(vii)*

บทที่ 1

บทนำ.....1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำกาวิจัย.....1

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....2

ขอบเขตของโครงการวิจัย.....2

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....4

บทที่ 2

ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....5

ครี้ 5

ฟลาโวนอยด์และไอโซฟลาโวนอยด์.....7

ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์.....9

แบคทีเรีย.....10

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย.....14

เครื่องมือวิทยาศาสตร์.....14

สารเคมี.....14

จุลินทรีย์.....15

การเตรียมเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้ทดสอบ 15

การวัดฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดแก่นครี้โดยวิธีการวัดค่าความขุ่น..... 15

การวัดฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดแก่นครี้โดยวิธี Resazurin Microplate assay.....17

ตัวอย่างขั้นตอนการวัดผลและการคำนวณค่า % inhibition ค่า MIC_{90} และ ค่า IC_{50} 19

บทที่ 4

ผลการวิจัย.....22

ผลการวัดฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบของสารสกัดจากแก่นครี้.....22

ผลการวัดฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกของสารสกัดจากแก่นครี้.....22

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....30

บรรณานุกรม.....33

ภาคผนวก.....38

ประวัตินักวิจัย.....39

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1 แผนผังแสดงขอบเขตและขั้นตอนของงานวิจัย……..……3

ภาพที่ 2.1 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของใบและผล……..……6

ภาพที่ 2.2 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของแก่นครี้ (วัตถุดิบแห้ง) และเมื่อบดละเอียดเป็นผง ……7

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์……..……8

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของไอโซฟลาโวนอยด์……..……9

ภาพที่ 3.1 กราฟระหว่างความเข้มข้นและค่า % inhibition แสดงสมการ logarithmic และค่าสหสัมพันธ์ ของการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง…….....21

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายสารสกัดหยาบของแก่นครี้ในถาดหลุม micro-plate ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ศึกษาผลของความเข้มข้นต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย……..17

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างตารางบันทึกผลของการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดแก่นครี้ โดยวิธี Resazurin Microplate assay กรณีของ *Bacillus cereus*……19

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างตารางบันทึกผลการคำนวณค่า % inhibition……..19

ตารางที่ 4.1 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครี้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 โดยวิธี Optical density microplate assay (OD)……..24

ตารางที่ 4.2 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครี้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 โดยวิธี Optical density microplate assay (OD) ……..25

ตารางที่ 4.3 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครี้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 โดยวิธี Optical density microplate assay (OD) ……26

ตารางที่ 4.4 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครี้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 โดยวิธี Optical density microplate assay (OD)……27

ตารางที่ 4.5 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครี้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecium* โดยวิธี Optical density microplate assay (OD) ……28

ตารางที่ 4.6 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครี้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* โดยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA)……29

ตารางที่ 5.1 สรุปผลของสารสกัดจากแก่นครี้ (*D. parviflora*) ต่อการเจริญของแบคทีเรีย……32

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคในมนุษย์ สัตว์ และพืชรวมถึงเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหาร ทั้งนี้ในปัจจุบันมีการใช้สารออกฤทธิ์ฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุแบคทีเรียที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก เป็นเหตุให้มีการขาดดุลการค้าและสูญเสียงบประมาณของประเทศในด้านสาธารณสุขอย่างมหาศาล นอกจากนี้ยังพบปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่ถูกวิธี ซึ่งปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดมีการดื้อยาปฏิชีวนะจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ เพื่อใช้ในการรักษาโรคหรือประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง ทั้งนี้พบว่าพืชสมุนไพรต่างๆ เป็นแหล่งที่จะสามารถค้นพบสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ และประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิประเทศเขตร้อนชื้นที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ ดังนั้นจึงมีโอกาสสูงที่จะค้นพบสารพฤกษเคมีจากพืชสมุนไพรของไทยที่จะสามารถออกฤทธิ์ต้านจุลชีพได้และสามารถนำมาพัฒนาใช้เพื่อทดแทนยาปฏิชีวินะในการรักษาโรคหรือทดแทนการใช้สารเคมีที่ใช้ยับยั้งจุลชีพ ซึ่งจะก่อให้เกิดผลดีในด้านการสร้างนวัตกรรมที่มีรากฐานจากทรัพยากรภายในประเทศและมีความได้เปรียบในเชิงเศรษฐกิจตามมา

ครี้หรือสักขี (*Dalbergia parviflora*) เป็นพืชยืนต้นที่มีแก่นไม้ซึ่งมีการใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาแผลเปื่อยพุพองตามหลักภูมิปัญญาท้องถิ่นแต่ยังมิได้มีการศึกษาในเชิงการทดลองทางวิทยาศาสตร์เพื่อสนับสนุนภูมิปัญญาการใช้สมุนไพร และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบในแก่นครี้พบว่ามีสารประกอบฟลาโวนอยด์มากกว่า 60 ชนิด ในขณะที่มีงานวิจัยอื่นๆ ได้กล่าวถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบฟลาโวนอยด์ไว้อย่างหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และรวมถึงฤทธิ์ในการต้านจุลชีพประเภทแบคทีเรีย เชื่อรา และไวรัส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวโน้มที่จะค้นพบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดแก่นครี้ และการค้นพบนี้อาจจะสามารถนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังบางชนิดหรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดธรรมชาติที่ใช้ต้านการเจริญของแบคทีเรียใน

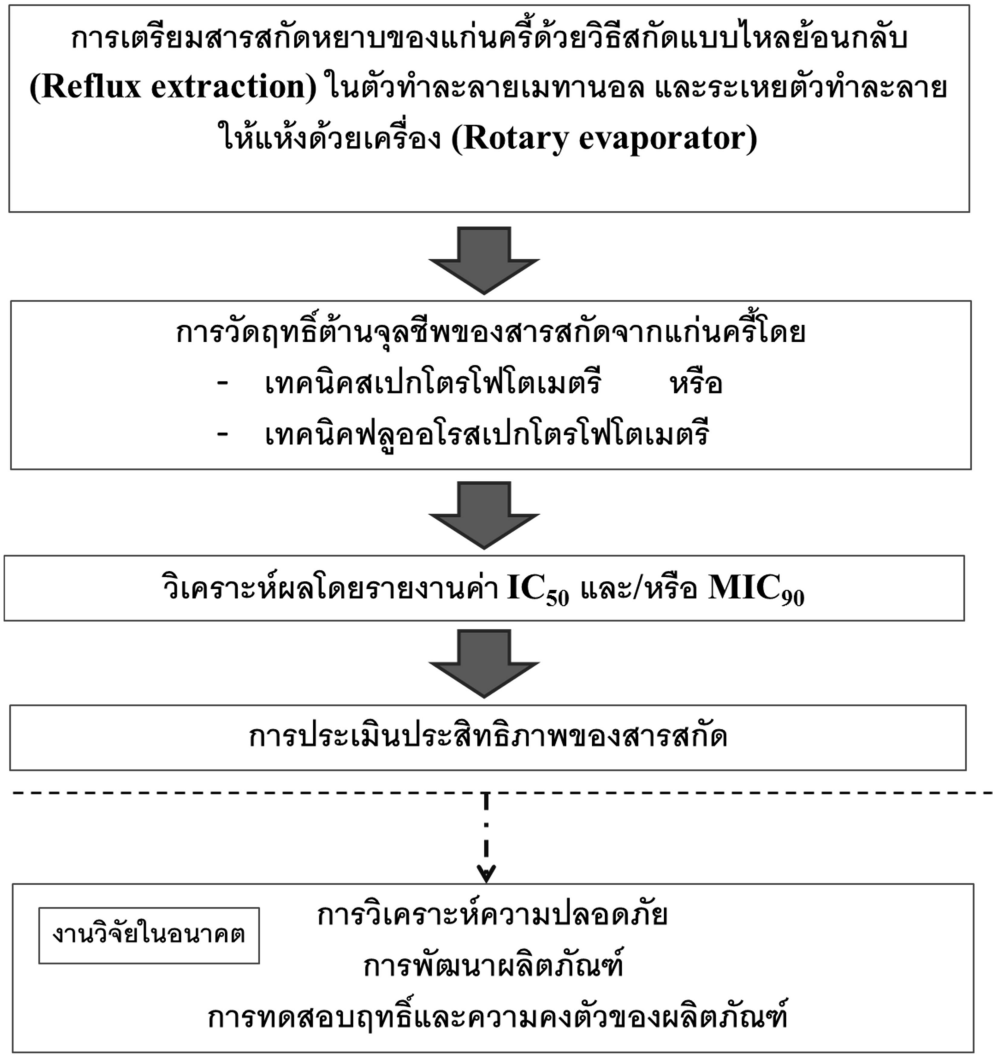
อาหารที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสีย รวมทั้งอาจสามารถนำมาประยุกต์ใช้แทนสารเคมีกำจัดโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์บางชนิด ทั้งนี้การส่งเสริมการวิจัยด้านสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นการสร้างความพร้อมทางด้านการผลิตยารักษาโรค เครื่องสำอาง อาหาร รวมถึงยากำจัดโรคพืช และเป็นแผนหนึ่งของการพัฒนานวัตกรรมด้านสมุนไพรไทยให้มีประสิทธิภาพและได้รับการยอมรับมากขึ้น ในทางเศรษฐกิจจะนำไปสู่การลดการนำเข้าของยาปฏิชีวนะหรือสารสังเคราะห์ รวมถึงการส่งเสริมให้มีการอนุรักษ์พืชพรรณสมุนไพร และประชาสัมพันธ์ให้ทราบถึงคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติในท้องถิ่น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรียและเชื้อราที่สำคัญบางชนิดจากสารสกัดแก่นครี้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาวิจัยภายในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในระดับหลอดทดลอง โดยยังไม่มีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการใช้เป็นยาหรืออาหาร และการวิจัยนี้ยังไม่มีการทดลองในมนุษย์หรือสัตว์ โดยใช้เทคนิคการติดตามการเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียภายหลังได้รับสารสกัดจากแก่นครี้ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตรเมตรีและสเปกโตรฟลูออโรเมตรี



ภาพที่ 1.1 แผนผังแสดงขอบเขตและขั้นตอนของงานวิจัย

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

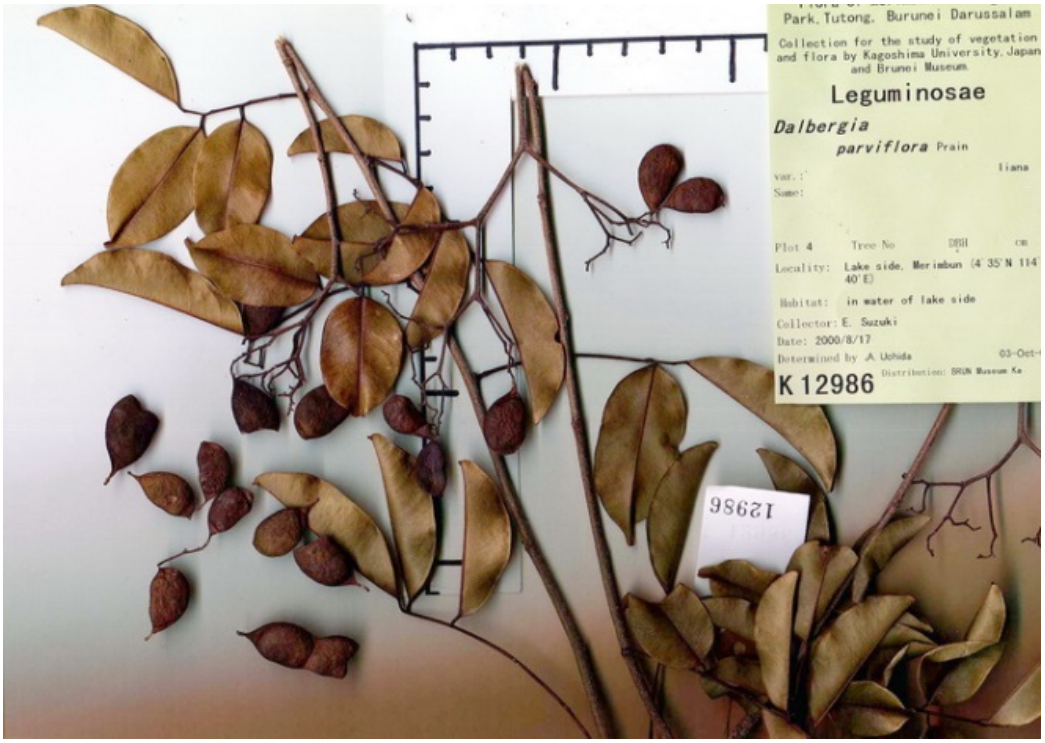
แก่นครี้เป็นสมุนไพรที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทย โดยพบว่ามีการใช้เป็นยาบำรุงร่างกายและยาสำหรับสตรีรวมทั้งเป็นยารักษาแผลเปื่อยพุพอง และคณะผู้วิจัยได้ศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง จึงเห็นสมควรศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ให้รอบด้าน โครงการวิจัยนี้จึงได้พัฒนางานวิจัยเดิมให้มีการแตกแขนงการวิจัยออกไปในเชิงลึก โดยมุ่งประเด็นหลักไปที่การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ เพื่อยืนยันผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับหลอดทดลองก่อนการประเมินแนวทางพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้การนำภูมิปัญญาท้องถิ่นมาตรวจสอบในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ จะทำให้สามารถพัฒนาขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นที่ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านยารักษาโรคและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพ และเป็นการสร้างโอกาสในการพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นเพื่อกลับคืนสู่ท้องถิ่น อันจะนำมาซึ่งโอกาสในการสร้างรายได้และความยั่งยืน

บทที่ 2
ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรกำลังเป็นที่สนใจโดยเฉพาะการพัฒนาเป็นสารต้านแบคทีเรียเพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ และทดแทนตัวยาเดิมที่พบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดสามารถต้านยาที่มีอยู่ได้มากขึ้น ตัวอย่างการศึกษาวิจัยในประเทศไทยเกี่ยวกับสารสกัดสมุนไพรที่สามารถต้านแบคทีเรียได้แก่ ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าและสารสมุนไพรสกัดสดบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* (พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์ และคณะ 2553.) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* ของสารสำคัญจากผลยอ (จีราภรณ์ สุวรรณชาตรี และคณะ 2554.) การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดใบฟักข้าว (บงกชวรรณ สุตะพาหะและบรรยง คันธวะ 2554.) การศึกษาเรื่องประสิทธิภาพสารสกัดน้ำของส้มแขกในการยับยั้งแบคทีเรีย (ปิยุกฤษฎ์ ทองบุญ และคณะ 2555.) ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรต่อเชื้อก่อโรคทางทันตกรรม (ปรมาภรณ์ จิ๋วพัฒนกุล และคณะ 2555.) ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันจากเปลือกอบเชยเทศ (ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร และคณะ 2555.) การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น (ณัฐกานต์ วงศ์สีสม และคณะ 2557.) เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรจึงยังคงมีแนวโน้มที่จะค้นพบองค์ความรู้ใหม่และก่อให้เกิดนวัตกรรมเพื่อพัฒนาทางวิทยาศาสตร์

ครี้ (***Dalbergia parviflora*** **Roxb.)** มีชื่อสามัญคือ Blackwood และชื่อท้องถิ่นได้แก่ กระซิก ซิก สรี้ และ สักขี เป็นต้น จัดอยู่วงศ์ (family) *Fabaceae* วงศ์ย่อย (subfamily) *Faboideae* อาจมีการสับสนกับต้นสักขี (*Dalbergia candenatensis*) ซึ่งเป็นพรรณไม้ในวงศ์เดียวกัน งานวิจัยเกี่ยวกับสารพฤกษเคมี (phytochemical) จากแก่นครี้พบว่ามีสารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มากกว่า 60 ชนิด และพบว่าหลายชนิดมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเอสโตรเจน (Songsiang et al., 2009; Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009) นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์ยังมีรายงานว่าเป็นสารพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Chen, Chan, Ho, Fung, & Wang, 1996; Croft, 1998; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996) คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสารกลุ่ม

ไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากแก่นครี้โดยวิธี DPPH วิธี ORAC และวิธี xanthine/xanthine oxidase ซึ่งพบว่ามีสารหลายชนิดที่แสดงสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ อีกทั้งยังได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Promden, Monthakantirat, Umehara, Noguchi, & De-Eknamkul, 2014) สารฟลาโวนอยด์จากแก่นครี้จึงเป็นเป้าหมายที่จะนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการต้านจุลชีพ



ภาพที่ 2.1 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของใบและผล

ที่มาของภาพ : US National Herbarium. Barcode 01188456 (©Smithsonian Institution, National Museum of Natural History, Department of Botany)

ภาพที่ 2.2 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของแก่นครี้ (วัตถุดิบแห้ง) และเมื่อบดละเอียดเป็นผง

ที่มาของภาพ : วรวัฒน์ พรหมเด่น (2557)

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoids)

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มาจากภาษาละตินคำว่า flavus หมายถึงสีเหลืองซึ่งเป็นสีที่พบในพืชตามธรรมชาติ ฟลาโวนอยด์เป็นสารทุติยภูมิของพืช (secondary metabolite) นอกจากนี้ในช่วงราวๆ ปี ค.ศ. 1930 – 1950 ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฟลาโวนอยด์มากขึ้นและมีการจัดให้ฟลาโวนอยด์เป็นวิตามิน P (Bentgsath, Rusznyak, & Szent-Gyorgyl, 1937) จนกระทั่งในปัจจุบันฟลาโวนอยด์ยังคงมีความน่าสนใจและมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในหลายๆ ด้านมากขึ้น เช่นด้านโภชนาการ ด้านสุขภาพ และด้านความงาม พบว่าฟลาโวนอยด์ที่รับประทานจากอาหารมีความสัมพันธ์กับระบบการต้านอนุมูลอิสระในมนุษย์ จึงเป็นที่มาของการศึกษาปริมาณและชนิดของฟลาโวนอยด์ในแหล่งอาหา ทั้งนี้พบว่าในผักและผลไม้เป็นแหล่งของฟลาโวนอยด์ที่สำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่ามีฟลาโวนอยด์ใน ช้อกโกแลต ชา และไวน์อีกด้วย (Yao et al., 2004)

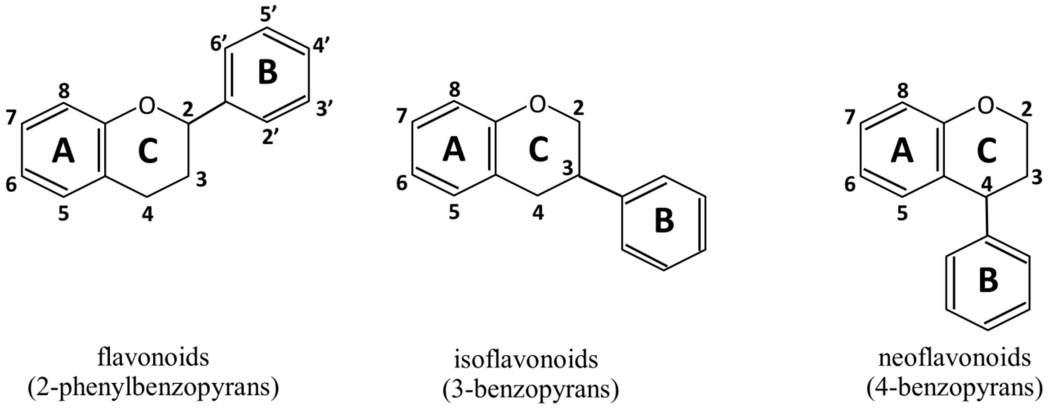
ในเชิงโครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีในธรรมชาติพบว่ามีโครงสร้างหลักเป็น C6-C3-C6 ประกอบกับการมีหมู่แทนที่ (substitution group) ในตำแหน่งต่างๆ ตามระบบการเรียกชื่อ IUPAC สามารถจัดจำแนกฟลาโวนอยด์ได้ดังนี้

1) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) หรือ ไบโอฟลาโวนอยด์ (bioflavonoid)

2) ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) เกิดจากโครงสร้างของ 3-phenylchromen-4-one

3) นีโอฟลาโวนอยด์ (neoflavonoid) เกิดจากโครงสร้างของ4-phenylcoumarine

ฟลาโวนอยด์ทั้ง 3 ชนิด เป็นสารประกอบที่มีหมู่คีโทนและมีโครงสร้างวงแหวน 3 วง เป็นโครงหลัก (flavonoid backbone) โดยทั่วไปวงแหวนแต่ละวงจะมีชื่อคือ A B และ C



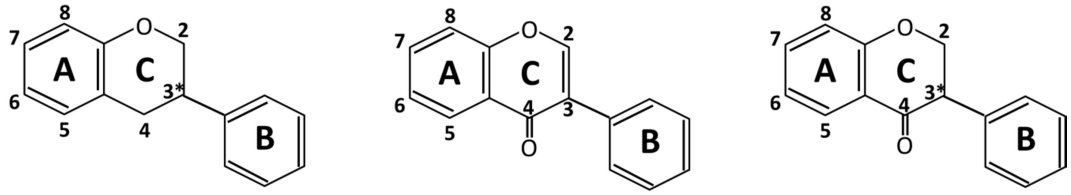
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์ (2-phenylbenzopyran) ไอโซฟลาโวนอยด์ (3-benzopyran) และ นีโอฟลาโวนอยด์ (4-benzopyran) แสดงการระบุหมายเลขตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงแหวน A B และ C

ไอโซฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีโครงสร้างหลักมาจาก 3-phenylchroman เป็นสารประกอบที่พบอยู่ในสิ่งมีชีวิตอาณาจักรพืช ความหลากของชนิดของไอโซฟลาโวนอยด์ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงแหวน และยังมีความแตกต่างหลากหลายของระดับออกซิเดชั่นบนวงแหวน (Grotewold, 2006) ไอโซฟลาโวนอยด์จึงสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้

1. ไอโซฟลาแวน (isoflavan)

2. ไอโซฟลาโวน (isoflavone)

3. ไอโซฟลาวาโนน (isoflavanone)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของไอโซฟลาโวนอยด์ 3 ชนิด คือ ไอโซฟลาแวน ไอโซฟลาโวน และไอโซฟลาวาโนน แสดงการระบุหมายเลขตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงแหวน A B และ C

ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์

ในอดีตมีการใช้ยาสมุนไพรพื้นบ้านเพื่อรักษาความเจ็บป่วยและโรคเสื่อม (degenerative disease) ซึ่งเกี่ยวเนื่องกับความชราภาพรวมถึงโรคมะเร็ง เบาหวาน โรคหัวใจ ความดัน เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีสารพฤกษเคมี (phytochemical) หลายชนิดเป็นองค์ประกอบในพืชสมุนไพรเหล่านั้น ซึ่งได้แก่ สารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ไกลโคไซด์ (glycoside) เทอร์ปีนอนด์ (terpenoid) อัลคาลอยด์ (alkaloid) เป็นต้น จากการศึกษาวิจัยพบว่าสารพฤกาเคมีเหล่านี้สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่น example, อัลคาลอยด์มีผลต่อระบบสรีระวิทยาของมนุษย์และสัตว์ (Ferraz et al., 1999), สารประกอบฟีนอลซึ่งรวมถึงฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Fernandez-Panchon, Villano, Troncoso, & Garcia-Parrilla, 2008; Prochazkova, Bousova, & Wilhelmova, 2011), ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง (estrogen-like activity) (De-Eknamkul et al., 2011; Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009; Wungsintaweekul, Umehara, Miyase, & Noguchi, 2011) และยังสามารถยับยั้งเอนไซม์นิวรามินิเดส (neuraminidase) ของ avian influenza virus ได้ (Kongkamnerd et al., 2012; Kongkamnerd et al., 2011)

ในปัจจุบันนี้ฟลาโวนอยด์กำลังเป็นที่สนใจในวงการที่ศึกษาเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงมาก (Devasagayam et al., 2004; Nijveldt et al., 2001) สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารฟลาโวนอยด์พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น การต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Kim, Son, Chang, & Kang, 2004) ยับยั้งเอนไซม์บางกลุ่ม เช่น hydrolytic enzyme และ oxidative enzyme (Robinson, Robinson, & Martin, 1984; Yang et al.) นอกจากนี้ยังพบว่าฟลาโวนอยด์สามารถป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และฟลาโวนอยด์บางชนิดอาจมีศักยภาพที่สามารถยับยั้งไวรัส HIV ได้ (Yao et al., 2004)

ฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในสารประกอบฟลาโวนอยด์ ได้แก่ สารสกัดจากใบ *Tagetes minuta* ซึ่งการใช้เป็นยาพื้นบ้านเพื่อรักษาโรคติดเชื้อในประเทศแถบอาร์เจนตินา พบว่ามีสารฟลาโวนอยด์ quercetagetin-7-arabinosyl-galactoside *(Tereschuk, Riera, Castro, & Abdala, 1997) Scutellaria baicalensis* เป็นพืชสมุนไพรจีนที่ใช้รักษาโรคเยื่อหุ้มฟันอักเสบและแผลติดเชื้อในช่องปาก ซึ่งพบว่ามีสารฟลาโวน baicalein เป็นสารออกฤทธิ์หลัก (Tsao, Newman, Kwok, & Horikoshi, 1982) อย่างไรก็ตามฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการต้านจุลชีพยังไม่มีรายงานในสารสกัดจากแก่นคร้ี การศึกษาวิจัยนี้จะเป็นการสร้างองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์และสร้างแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพจากสมุนไพร

แบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์มากที่สุดชนิดหนึ่ง แบคทีเรียแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ แกรมลบ (Gram-Negative bacteria) และแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-Positive Bacteria) และโดยแบคทีเรียแกรมบวกจะมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วย Peptidoglycan ที่หนาประมาณ 30 นาโนเมตร ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบจะมีชั้นของ Peptidoglycan หนาเพียง 2 – 3 นาโนเมตร และมี Outer membrane หุ้มอยู่ด้านนอกอีกชั้นหนึ่ง เมื่อทำการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยเทคนิค Gram staining จะพบว่าแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของ Safranin O ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีน้ำเงินของ Crystal violet ตัวอย่างของแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวกที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้แก่

1. ***Pseudomonsa aeruginosa*** เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปทรงท่อน อยู่ในจีนัส *Pseudomonas* วงศ์ *Pseudomonadaceae* มีขนาด 0.5-1 × 1.5-5 ไมโครเมตร เจริญได้ในที่มีอากาศ สามารถที่จะเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา *P.aeruginosa* จะเป็นเชื้อฉวยโอกาสซึ่งจะไม่ค่อยก่อโรคในคนที่มีสุขภาพดี แต่จะสามารถก่อดโรคได้ในคนที่อ่อนแอหรือคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำผ่านทางบาดแผลผิวหนังถลอก แผลเปื่อยอักเสบ แผลไฟไหม้และเยื่อเมือก ผู้ป่วยที่อยู่ในโรงพยาบาลจะมีโอกาสติดเชื้อ *Pseudomonas* ได้ง่ายและรุนแรง เชื้อ *P. aeruginosa* จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ปัจจุบันจึงมีการทดสอบความไวของเชื้อเชื้อ *P.aeruginosa* ต่อยาปฏิชีวนะก่อนใช้ ซึ่งการใช้ยาชนิดเดียวจะไม่ค่อยได้ผลในการรักษาจากการติดเชื้อนี้ ส่วนใหญ่จึงใช้ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ เช่น เจนตาไมซิน โทบราไมซิน หรือการใช้ยาอะมิคาซันร่วมกับยากลุ่มเพนิซิลลิน เช่น เมสโลซิลลิน (mezlocilln) ไพเพอราซิลลิน (piperacillin) และไทคาร์ซิลลิน (ticarcillin) ส่วนยาอื่นที่ได้ผลที่ใช้ในการรักษาคือ ไซโพรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) ซีโพเพอราโซน(cefoperaxone) และเซฟตาซีดีน (ceftazidime)

2. **Acenetobactor baumannii** เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปทรงกลม-แท่ง อยู่ในจีนัส *Acinetobacter* วงศ์ *Moraxellaceae* เซลล์ไม่มีการเคลื่อนไหว เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญมากขึ้นในฐานะที่เป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลที่พบได้บ่อยขึ้นและมักเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด *Acinetobacter* spp. เป็นสาเหตุของโรคปอดบวม (pneumonia) ชนิด ventilator-associated ที่พบบ่อยที่สุดในหอผู้ป่วยหนัก (Intensive Care Unit, ICU; Intermediate Care Unit) ของโรงพยาบาลรามาธิบดี ในพ.ศ. 2542 (ศิริลักษณ์ อภิวาณิชย์ และคณะ 2542) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อนี้มากขึ้นในหลายๆ ประเทศ โดยส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อในโรงพยาบาลแม้ว่าจะมีรายงานการติดเชื้อ *Acinatobacter* จากชุมชนแต่ก็ไม่มากนักเมื่อเทียบกับการติดเชื้อในโรงพยาบาล *Acinetobacter* spp. มักจะดื้อต่อยาปฏิชีวนะพร้อมๆ กันหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการดื้อต่อยาในกลุ่ม Carbapenems โดยเชื้อที่ดื้อต่อ Carbapenems มักจะดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดในเวลาเดียวกัน ทำให้มีความยากลำบากในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาภาวะติดเชื้อ *Acinetobacter* spp.

3. ***Klebsiella pneumoniae*** เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปทรงแท่ง อยู่ในจีนัส *Klebsiella* วงศ์ *Enterobacteriaceae* เซลล์ไม่มีการเคลื่อนไหว เชื้อ *Klebsiella* สายพันธุ์ที่สามารถแยกได้มากที่สุดและเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญที่สุดต่อมนุษย์ คือ *K. pneumonia* โดยเป็นสาเหตุของอาการปอดบวม รวมทั้งปอดบวมที่เกิดจากการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยมีการทำลายเนื้อเยื่อในปอดทำให้เกิดโพรงหนองและทำให้เสมหะมีเลือดและข้นเหนียว นอกจากปอดบวมแล้ว *K. pneumonia* ยังทำให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อที่แผลไฟไหม้ หรือติดเชื้อซ้ำในระบบหายใจ การติดเชื้อ K. pneumoniae สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด เป็นปัญหาสำคัญในการรักษาผู้ป่วยในโรงพยาบาล เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวมักดื้อต่อยาในกลุ่มที่เคยใช้รักษาได้ผล เช่น aminoglycoside (gentamicin, amikacin), cephalosporin รุ่นที่ 3 (cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime), penicillin (piperacillin), co-trimoxazole รวมทั้ง quinolone(ciprofloxacin) (Domenech-Sanchez et al., 2000; Martinez-Martinez et al., 1996) เชื้อยังสามารถถ่ายทอดคุณสมบัติการดื้อยาให้แก่เชื้ออื่นๆ ที่อยู่ในกลุ่ม enterobacteriaceae ด้วยกัน เช่น *Escherichia coli*, *Enterobacter* species ทำให้เป็นปัญหามากขึ้น

4. ***Escherichia coli*** เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปทรงแท่ง อยู่ในจีนัส *Escherichia* วงศ์ *Enterobacteriaceae* เชื้อ *E. coli* มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ *E. coli* ในทางเดินอาหารอาจแบ่งออกเป็นชนิดต่างๆ ตามคุณสมบัติทางวิทยาภูมิคุ้มกันและคุณสมบัติในการทำให้เกิดโรค การแบ่งชนิดตามคุณสมบัติที่ทำให้เกิดโรคอาจแบ่งได้ดังนี้

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เชื่อชนิดนี้จะสร้างสารซึ่งเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหารทำให้ท้องเสีย

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เชื้อชนิดนี้จะเกาะที่ลำไส้เล็กและทำให้ถ่ายเหลว

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เชื้อชนิดนี้รุกรานเซลล์เยื่อบุลำไส้ ทำให้มีอาการคล้ายโรคบิดจากเชื้อชิเกลลา ทำให้มีไข้สูง ท้องเสียรุนแรง

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) เชื้อในกลุ่มนี้ที่เป็นที่รู้จักมากที่สุดคือเชื้อชนิด O157:H7 ทำให้มีถ่ายเป็นเลือดนอกจากนี้ยังสามารถทำให้เกิด Hemolytic-uremic syndrome และไตวายเฉียบพลันได้

5. ***Bacillus cereus*** เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปทรงท่อน จัดอยู่ในจีนัส Bacillus วงศ์ *Bacillaceae* เซลล์สามารถสร้างสปอร์ (spore forming bacteria) สามารถสร้างสารพิษ (toxin) ที่ทนต่อความร้อนได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางในร่างกายมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น ทั้งนี้เชื้อ *B. cereus* สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในดิน ฝุ่นละออง อาหารที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ได้แก่ อาหารประเภทแป้ง เช่น ข้าว มักกะโรนี ข้าวผัด เส้นขนมจีน ผลิตภัณฑ์จากแป้งในลักษณะสอดไส้ครีม ซึ่งก่อให้เกิดลักษณะอาการของอาหารเป็นพิษชนิดที่มีอาการอาเจียน (Emetic syndrome) ซึ่งเกิดจากที่ร่างกายได้รับสารพิษ (intoxication) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในอาหารก่อนที่จะบริโภคเข้าไป สารพิษนี้ทนต่ออุณหภูมิสูงและทนต่อความเป็นกรดในกระเพาะอาหารได้ดี ผู้ป่วยจะเกิดอาการคลื่นไส้และอาเจียน ภายหลังจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษเข้าไปประมาณ 5 ชั่วโมง โดยทั่วไปอาการเป็นอยู่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง โรคอาหารเป็นพิษลักษณะนี้ มักเรียกว่า Chinese restaurant syndrome เนื่องจากมักพบในผู้ป่วยรับประทานอาหารจีน ซึ่งมักเป็นข้าวผัด ที่ทำจากข้าวสุกที่หุงค้างไว้นาน ทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตและสร้างสารพิษชนิดที่ทนต่อความร้อนสะสมไว้ในอาหาร อีกอาการหนึ่งของอาหารเป็นพิษจาก *B. cereus* คือมีอาการถ่ายเหลว (Diarrhea syndrome) ซึ่งเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตเข้าไปโดยตรง เช่น ผักสด เนื้อสัตว์ ซอส ซุป และอาหารที่มีแป้งและครีมเป็นส่วนประกอบ เชื้อจะเพิ่มจำนวนในลำไส้ของมนุษย์ โดยใช้เวลาฟักตัวประมาณ 8-16 ชั่วโมง มีสารพิษเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่ไม่ทนต่อความร้อน ทำให้เกิดอาการการปวดท้อง เป็นตะคริวที่ท้องและถ่ายอุจจาระเหลว โดยทั่วไปอาการเป็นอยู่ไม่เกิน 14 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดโรค (infective dose) 100-100,000 เซลล์ต่อกรัม (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์)

6. ***Enterococcus faecium*** เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปทรงกลม จัดอยู่ในจีนัส *Enterococcus* วงศ์ *Enterococcaceae* เชื้อกลุ่มนี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในอัตราที่สูง มักทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในกระแสเลือดและการติดเชื้อของแผลผ่าตัด ปัญหา เชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะแวนโคมัยซิน (vancomycin-resistant enterococci หรือ VRE) ถือว่าเป็นปัญหาสำคัญต่อระบบสาธารณสุข ทั้งนี้ในประเทศไทยพบว่า *E. faecium* มีอัตราดื้อยา vancomycin จากเฉลี่ย 0.8% ในรอบ 10 ปี (2545-2555) เพิ่มเป็น 3.2% ในปี 2556 (อภิชัย มงคล, 2557.)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบ microplate reader (Visible)
3. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบ microplate reader (Fluorescence)
4. ปิเปต และ มัลติชัลเนลปิเปตขนาดต่างๆ
5. จานหลุมขนาด 96 ช่อง (96 well plate)
6. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37 ˚C สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย
7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำและความดัน
8. ตู้ปลอดเชื้อ

สารเคมี

1. Amikacin
2. Tetracycline
3. Rifampicin
4. Erythromycin
5. Ofloxacin
6. Vancomycin
7. 5,(6)-carboxy flurorescein diacetate (CFDA)
8. LB medium / Agar
9. DMSO
10. resazurin

จุลินทรีย์ (แบคทีเรีย)

1. *Pseudomonsa aeruginosa* PAO1 (Gram Negative)

2. *Acenetobactor baumannii* ATCC 19606 (Gram Negative)

3. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Gram Negative)

4. *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram Negative)

5. *Bacillus cereus* (Gram Positive)

6. *Enterococcus faecium* (Gram Positive)

การเตรียมเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้ทดสอบ

แบคทีเรีย *Pseudomonsa aeruginosa* PAO1 *Acenetobactor baumannii* ATCC 19606 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Bacillus cereus* เลี้ยงโดยใช้อาหารชนิดเดียวกันคือ LB medium ในขณะที่ *Enterococcus faecium* ใช้อาหารเป็น Brain Heart Infusion medium ทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวและบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC พร้อมกับเขย่าที่อัตราเร็ว 250 รอบต่อนาทีเพื่อให้เกิดสภาวะมีออกซิเจน เป็นระยะเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ก่อนนำมาใช้งาน

การวัดฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดแก่นครี้โดยวิธีการวัดค่าความขุ่น

เซลล์แบคทีเรีย *Pseudomonsa aeruginosa* PAO1 *Acenetobactor baumannii* ATCC 19606 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Enterococcus faecium* ที่ผ่านการเตรียมไว้โดยการเลี้ยงในอาหารเหลวข้ามคืนจะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตโดยวิธีการวัดค่าความขุ่น (optical density assay) ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี (ยกเว้น *Bacillus cereus* จะวิเคราะห์ด้วยวิธี Resazurin Microplate assay) ดังนี้

1. เตรียมสารละลายสารสกัดหยาบของแก่นครี้ให้มีความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25 3.13 และ 0 µg/mL ซึ่งละลายอยู่ใน 50 mL LB medium ที่มีความเข้มข้นของ DMSO สุดท้ายเป็น 1% โดยเริ่มต้นจาก stock solution ของสารสกัด 5000 µg/mL ใน 100% DMSO ดังตารางที่ 3.1

2. นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมได้จากข้อ 1 ปิเปตลงในถาดหลุมไมโครเพลทปลอดเชื้อชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 µL แล้วนำไปบ่มที่ 37ºC เป็นระยะเวลา 30 นาที เพื่อปรับอุณหภูมิอาหารให้พร้อมใช้งาน

3. เจือจางเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมไว้จากการเลี้ยงข้ามคืนแต่ละชนิดด้วยอาหารเหลวใหม่ให้มีค่าความขุ่น 0.4 เมื่อวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บ่มนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นระยะเวลา 30 นาที เพื่อปรับอุณหภูมิและสภาพของเซลล์ภายหลังการเปลี่ยนอาหารใหม่

4. ปิเปตเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดจากข้อ 3 จำนวน 100 µL ลงในถาดหลุมไมโครเพลทที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ซึ่งจะมีผลให้ปริมาตรสุดท้ายของแต่ละหลุมเป็น 200 µL และความเข้มข้นของสารสกัดและ DMSO ลดลงครึ่งหนึ่ง ให้บันทึกความเข้มข้นของสารสกัดที่จุดนี้เป็นความเข้มข้นสุดท้าย และความเข้มข้น DMSO จะมีค่าเป็น 0.5% (ยกเว้นที่ความเข้มข้นสารสกัด 50 จะมีความเข้มข้น DMSO เป็น 1%) ใช้ยาปฏิชีวนะมาตรฐาน Amikacin Tetracycline Rifampicin Erythromycin Ofloxacin และ Vancomycin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ระหว่าง 50, 25, 12.5,… 0.0977 µg/mL เป็น positive control

5. ปิดฝาถาดหลุมไมโครเพลทและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง

6. เมื่อครบกำหนด 18 ชั่วโมง ให้นำถาดหลุมไมโครเพลทออกมาวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

7. คำนวนค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโต (% inhibition) จากสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [\,(100 \times OD_{600\ test}) / OD_{600\ control}\,]$$

เมื่อกำหนดให้ $OD_{600\ test}$ คือค่าความขุ่นของตัวอย่างชุดทดสอบ (มีการเติมสารสกัด)

$OD_{600\ control}$ คือค่าความขุ่นของตัวอย่างชุดควบคุม (ไม่มีการเติมสารสกัด)

8. วาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและค่า (% inhibition) เพื่อคำนวณค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตเพียงร้อยละ 50)

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายสารสกัดหยาบของแก่นครี้ในถาดหลุม micro-plate ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ศึกษาผลของความเข้มข้นต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

Final conc. **ของสารสกัด** (µg/mL)	**เติม** LB medium (mL)	**เติม** stock solution (5000 µg/mL **ใน** 100% DMSO) (µL)	**เติม** 100% DMSO (µL)	Final conc. DMSO (%)
100	49.0	1000	0	2%
50	49.5	500	0	1%
25	49.5	250	250	1%
12.5	49.5	125	375	1%
6.25	49.5	62.5	437.5	1%
3.13	49.5	31.25	468.75	1%
0	49.5	0	500	1%

การวัดฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดแก่นครี้โดยวิธี Resazurin Microplate assay

ในกรณีของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* จะใช้วิธีการวัดการมีชีวิตรอดจองเซลล์ด้วยวิธี Resazurin Microplate assay ซึ่งเป็นเทคนิคทางสปเกโตรฟลูออโรเมตรี มีวิธีการดังนี้

1. ดำเนินการเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับวิธีการวัดฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดแก่นครี้โดยวิธีการวัดค่าความขุ่น ในข้อที่ 1-5

2. เมื่อครบกำหนด 18 ชั่วโมง ให้นำถาดหลุมไมโครเพลทออกมาเติมสารละลาย 0.2% resazurin ปริมาตร 10 µL เขย่าถาดหลุมไมโครเพลทเล็กน้อยแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นระยะเวลา 60 นาที

3. นำไปวัดค่าฟลูออเรสเซนต์ที่ excitation wavelength 530 นาโนเมตร และ emission wavelength 590 นาโนเมตร

4. คำนวนค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโต (% inhibition) จากสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [(100 \times FLU_{test}) / FLU_{control}]$$

เมื่อกำหนดให้ FLU_{test} คือค่าฟลูออเรสเซนต์ของตัวอย่างชุดทดสอบ (มีการเติมสารสกัด)

$FLU_{control}$ คือค่าฟลูออเรสเซนต์ตัวอย่างชุดควบคุม (ไม่มีการเติมสารสกัด)

5. วาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและค่า (% inhibition) เพื่อคำนวณค่า IC_{50} (IC_{50} หรือ Inhibition Concentration at 50% หมายถึง ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อหรือเซลล์ได้ 50% เมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม)

6. วิเคราะห์หาค่า MIC_{90} (MIC หรือ Minimum Inhibition Concentration หมายถึง ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ตั้งแต่ 90% ขึ้นไป เมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม)

ตัวอย่างขั้นตอนการวัดผลและการคำนวณค่า % inhibition ค่า MIC_{90} และค่า IC_{50}

1. ภายหลังจากอ่านค่าในเครื่อง microplate reader ทั้งในกรณีวิธีการวัดค่าความขุ่นและวิธี Resazurin Microplate assay บันทึกผลได้ดังตารางที่ 3.2

2. คำนวน % inhibition ในแต่ละการทดลองที่ ด้วยสูตร

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [(100 \times FLU_{test}) / FLU_{control}]$$

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างตารางบันทึกผลของการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดแก่นคร้ีโดยวิธี Resazurin Microplate assay กรณีของ *Bacillus cereus*

ค่าฟลูออเรสเซนต์	ความเข้มข้นสารสกัดแก่นคร้ี µg/mL						
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0 (ชุดควบคุม)
ซ้ำครั้งที่ 1	-127	45	717	10290	20811	29805	29560
ซ้ำครั้งที่ 2	-199	4	2068	13273	26038	28863	29016
ซ้ำครั้งที่ 3	-382	-185	1019	8870	21043	26014	28405

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างตารางบันทึกผลการคำนวณค่า % inhibition โดยใช้ข้อมูลดิบในตารางที่ 3.2

% inhibition ต่อเชื้อ *Bacillus cereus*	ความเข้มข้นสารสกัดแก่นคร้ี µg/mL					
	50	25	12.50	6.25	3.13	1.56
ซ้ำครั้งที่ 1	100.43	99.85	97.57	65.19	29.60	-0.83
ซ้ำครั้งที่ 2	100.69	99.99	92.87	54.26	10.26	0.53
ซ้ำครั้งที่ 3	101.47	100.65	96.41	68.77	25.92	8.42

3. วิเคราะห์หาค่า MIC_{90} โดยการพิจารณาตารางที่ 3.4 ซึ่งจะพบว่าที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีการยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากกว่า 90% ขึ้นไป อยู่ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 12.5 µg/mL ดังนั้น MIC_{90} ของสารสกัดจากแก่นคริ้ที่มีต่อเชื้อ *Bacillus cereus* คือ 12.5 µg/mL

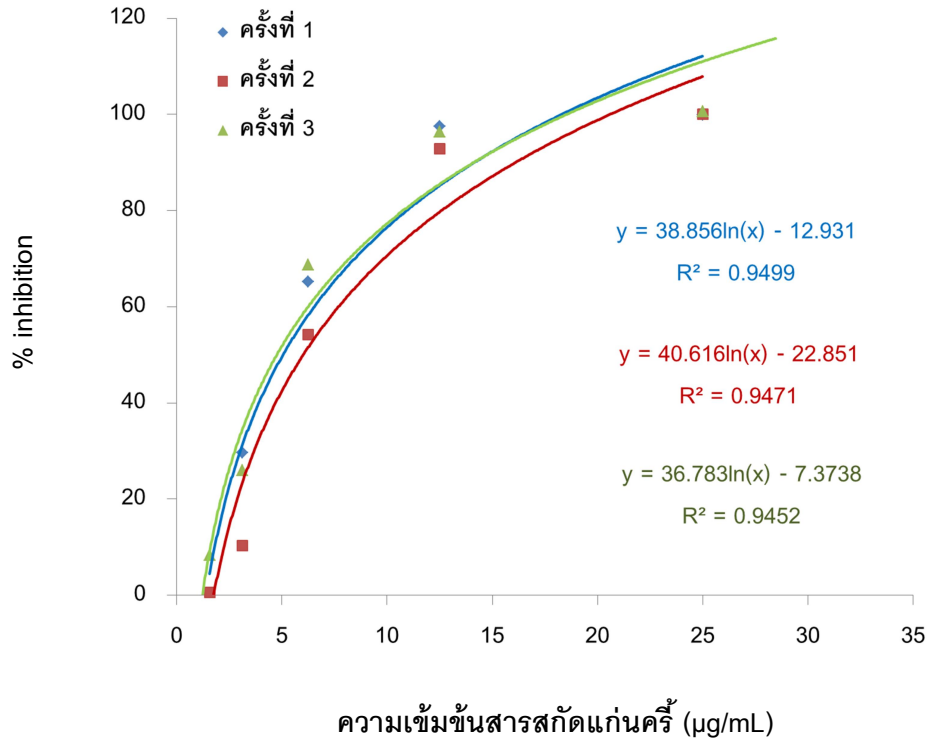
4. คำนวณค่า IC_{50} โดยการวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นและค่า % inhibition ดังภาพที่ 3.1 ลากเส้นแนวโน้มและสร้างสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น เมื่อแทนค่า y เป็น 50% จะสามารถคำนวณหาค่า x ได้ ซึ่งจะเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 50% ในกรณีนี้จะได้

ซ้ำครั้งที่ 1 y = 5.05 µ/mL

ซ้ำครั้งที่ 2 y = 6.01 µg/mL

ซ้ำครั้งที่ 3 y = 4.76 µg/mL

5. ทำการหาค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ครั้ง จะได้ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ของสารสกัดแก่นคริ้ต่อเชื้อ *Bacillus cereus* เป็น 5.27 ± 0.66 µg/mL



ภาพที่ 3.1 กราฟระหว่างความเข้มข้นและค่า % inhibition แสดงสมการ logarithmic และค่าสหสัมพันธ์ ของการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อใช้ในการคำนวณค่า IC_{50} ของสารสกัดแก่นคริ้ที่มีผลต่อ *Bacillus cereus*

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการวัดฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบของสารสกัดจากแก่นครี้

แบคทีเรียแกรมลบจำนวน 4 สายพันธุ์ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้แก่ *Acenetobactor baumannii* ATCC 19606 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 และ *Pseudomonsa aeruginosa* PAO1 ทำการวัดฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นครี้โดยวิธีการวัดค่าความขุ่น (optical density) ด้วยหลักการทางสเปกโตรโฟโตเมตรี ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งภายใต้สภาวะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีจะมีผลทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นมากขึ้นและวัดค่าความขุ่นได้สูง ในทางตรงกันข้ามหากเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตหรือมีการตายจะมีผลทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อใสขึ้นและวัดค่าความขุ่นได้น้อยลง ผลของสารสกัดจากแก่นครี้ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบแสดงดังตารางที่ 4.1- 4.4

จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นครี้ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 4 ชนิดได้ค่า IC_{50} ต่อเชื้อ *A. baumannii* คือ 453.54 µg/mL ค่า IC_{50} ต่อเชื้อ *K. pneumoniae* คือ 7,925.1 µg/mL ค่า IC_{50} ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* คือ 332.25 µg/mL และไม่สามารถหาค่า IC_{50} ต่อเชื้อ *E. coli* ได้เนื่องจากเชื้อสามารถเจริญเติบโตดีแม้ในความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงสุดที่ใช้ในการทดลอง และไม่สามารถวิเคราะห์หาค่า MIC_{90} ได้ในการทดสอบกับเชื้อทั้ง 4 ชนิด เนื่องจากไม่มีการทดลองใดที่สามารถทำให้แบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ที่ร้อยละ 90

ผลการวัดฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกของสารสกัดจากแก่นครี้

แบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 2 สายพันธุ์ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้แก่ *Enterococcus faecium* และ *Bacillus cereus* โดยในกรณีของ *E. faecium* ทำการวัดฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นครี้โดยวิธีการวัดค่าความขุ่น (optical density) ในขณะที่กรณีของ *B. cereus* ใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA) โดยการเติม resazurin ลงไปเพื่อตรวจวัดการมีชีวิตของเซลล์ ทั้งนี้ในเซลล์ที่มีชีวิตจะยังคงมีกระบวนการเมแทบอลิซึมและสังเคราะห์ NADPH อยู่ตามปกติเป็ นอกจากนี้ในเซลล์ยังมีเอนไซม์ diaphores ที่เมื่อทำงานร่วมกับ NADPH จะสามารถเปลี่ยน

resazurin ให้เป็น resorufin และสามารถตรวจวัดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ได้ ในกรณีที่สารสกัดจากแก่นครี้มีผลทำให้เซลล์ตายหรือยับยั้งการเจริญเติบโต การตรวจวัดค่าฟลูออเรสเซนต์จะได้ค่าที่น้อยลงกว่าการทดลองชุดควบคุม ผลของสารสกัดจากแก่นครี้ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกแสดงดังตารางที่ 4.5- 4.6 พบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดจากแก่นครี้ต่อเชื้อ *E. faecium* คือ 178.15 µg/mL แต่ไม่สามารถวิเคราะห์หาค่า MIC_{90} ได้ และค่า IC_{50} ต่อเชื้อ *B. cereus* คือ 5.05 µg/mL และมีค่า MIC_{90} คือ 12.5 µg/mL ทั้งนี้ในกรณีเชื้อ *B. cereus* ได้ทำการทดลองยืนยันซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งเป็นการทดลองที่อิสระต่อกัน ได้ค่า IC_{50} เฉลี่ยคือ 5.27 ± 0.66 µg/mL และ MIC_{90} ยังคงเป็น 12.5 µg/mL

ตารางที่ 4.1 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครี้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 โดยวิธี Optical density microplate assay (OD)

Experiments	Sample code	Final concentration (µg/mL)	Optical density		% Inhibition	IC_{50} (µg/mL)	MIC_{90} (µg/mL)
			Average	SD	Average		
Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	1.020	0.029	-	-	-
Positive 1	Rifampicin	3.13	0.029	0.013	97.21	-	3.13
		1.565	1.028	0.050	-0.75		
		0.781	1.030	0.042	-1.01		
		0.391	1.028	0.041	-0.75		
		0.195	1.036	0.029	-1.57		
		0.098	1.037	0.042	-1.63		
Positive 2	Erythromycin	50	0.012	0.003	98.82	3.75	12.5
		25	0.006	0.002	99.46		
		12.5	0.050	0.001	95.10		
		6.25	0.217	0.033	78.73		
		3.13	0.514	0.008	49.61		
		1.56	0.919	0.015	9.87		
Test	*D. parviflaora* extract	50	0.893	0.060	12.42	453.54	-
		25	0.853	0.055	16.41		
		12.5	0.922	0.014	9.58		
		6.25	1.015	0.014	0.52		
		3.13	1.017	0.004	0.29		
		1.56	1.005	0.016	1.50		

ตารางที่ 4.2 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นคร้ีต่อการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 โดยวิธี Optical density microplate assay (OD)

Experiments	Sample code	Final concentration (µg/mL)	Optical density		% Inhibition	IC_{50} (µg/mL)	MIC_{90} (µg/mL)
			Average	SD	Average		
Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	0.973	0.035	-	-	-
Positive 1	Amikacin	6.25	0.006	0.007	99.39	0.44	1.56
		3.13	0.002	0.001	99.80		
		1.56	0.014	0.005	98.52		
		0.781	0.394	0.024	59.48		
		0.391	0.530	0.008	45.57		
		0.195	0.702	0.018	27.83		
Positive 2	Tetracycline	1.565	-0.003	0.002	100.28	0.12	0.39
		0.781	0.001	0.004	99.91		
		0.391	0.097	0.011	90.04		
		0.195	0.303	0.007	68.90		
		0.098	0.517	0.010	46.87		
		0.049	0.823	0.014	15.39		
Test	*D. parviflaora* extract	50	1.107	0.002	-13.80	-	-
		25	1.144	0.009	-17.57		
		12.5	1.175	0.005	-20.79		
		6.25	1.183	0.006	-21.61		
		3.13	1.102	0.019	-13.28		
		1.56	1.105	0.033	-13.52		

ตารางที่ 4.3 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นคร้ีต่อการยับยั้งเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 โดยวิธี Optical density microplate assay (OD)

Experiments	Sample code	Final concentration (µg/mL)	Optical density		% Inhibition	IC_{50} (µg/mL)	MIC_{90} (µg/mL)
			Average	SD	Average		
Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	0.524	0.082	-	-	-
Positive 1	Amikacin	1.565	0.001	0.001	99.90	0.27	0.391
		0.781	0.002	0.001	99.55		
		0.391	0.003	0.001	99.52		
		0.195	0.319	0.016	39.09		
		0.098	0.397	0.014	24.27		
		0.049	0.543	0.024	-3.59		
Positive 2	Tetracycline	6.25	0.011	0.008	97.83	1.84	6.25
		3.13	0.218	0.004	58.43		
		1.565	0.325	0.018	38.01		
		0.781	0.397	0.017	24.33		
		0.391	0.493	0.063	5.88		
		0.195	0.535	0.089	-2.00		
Test	*D. parviflaora* extract	50	0.468	0.035	10.78	7925.1	-
		25	0.438	0.022	16.44		
		12.5	0.472	0.020	10.02		
		6.25	0.456	0.022	13.07		
		3.13	0.507	0.144	3.18		
		1.56	0.513	0.088	2.07		

ตารางที่ 4.4 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นคร้ีต่อการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 โดยวิธี Optical density microplate assay (OD)

Experiments	Sample code	Final concentration (µg/mL)	Optical density		% Inhibition	IC_{50} (µg/mL)	MIC_{90} (µg/mL)
			Average	SD	Average		
Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	0.701	0.061	-	-	-
Positive 1	Amikacin	3.13	0.007	0.003	99.04	0.12	0.391
		1.565	0.000	0.004	100.01		
		0.781	-0.006	0.003	100.84		
		0.391	0.023	0.005	96.70		
		0.195	0.270	0.010	61.53		
		0.0977	0.398	0.023	43.17		
Positive 2	Ofloxacin	3.13	0.013	0.004	98.22	0.093	0.391
		1.565	0.001	0.004	99.84		
		0.781	-0.006	0.001	100.79		
		0.391	0.029	0.005	95.82		
		0.195	0.225	0.021	67.95		
		0.0977	0.353	0.010	49.62		
Test	*D. parviflaora* extract	50	0.449	0.019	35.88	332.25	-
		25	0.481	0.031	31.41		
		12.5	0.494	0.049	29.55		
		6.25	0.549	0.009	21.63		
		3.13	0.595	0.008	15.06		
		1.56	0.609	0.021	13.06		

ตารางที่ 4.5 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครี้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecium* โดยวิธี Optical density microplate assay (OD)

Experiments	Sample code	Final concentration (µg/mL)	Optical density		% Inhibition	IC_{50} (µg/mL)	MIC_{90} (µg/mL)
			Average	SD	Average		
Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	0.802	0.043	-	-	-
Positive 1	Rifampicin	25	-0.022	0.002	102.73	3.11	6.25
		12.5	-0.027	0.002	103.42		
		6.25	-0.014	0.007	101.69		
		3.13	0.448	0.057	44.16		
		1.56	0.763	0.037	4.93		
		0.781	0.794	0.028	1.06		
Positive 2	Tetracycline	0.781	-0.026	0.009	103.28	0.058	0.195
		0.391	-0.011	0.011	101.41		
		0.195	0.0150	0.015	98.13		
		0.0976	0.0832	0.018	89.63		
		0.0488	0.529	0.057	34.07		
		0.0244	0.024	0.024	9.98		
Test	*D. parviflaora* extract	50	0.578	0.010	27.94	178.15	-
		25	0.709	0.008	11.61		
		12.5	0.782	0.018	2.55		
		6.25	0.814	0.007	-1.52		
		3.13	0.813	0.003	-1.39		
		1.56	0.830	0.005	-3.51		

ตารางที่ 4.6 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครี้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* โดยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA)

Experiments	Sample code	Final concentration (µg/mL)	Fluorescence unit		% Inhibition	IC_{50} (µg/mL)	MIC_{90} (µg/mL)
			Average	SD	Average		
Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	29560	958	-	-	-
Positive 1	Vancomycin	8.00	886	160	97.00	0.94	2.00
		4.00	990	75	96.65		
		2.00	898	69	96.96		
		1.00	9928	915	66.41		
		0.500	29802	621	-0.819		
		0.250	30315	847	-2.56		
Test	*D. parviflaora* extract	50	-127	30	100.43	5.05	12.50
		25	45	34	99.85		
		12.50	717	200	97.58		
		6.25	10290	955	65.19		
		3.13	20811	543	29.60		
		1.56	29805	190	-0.831		

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครี้ (*D. parviflora*) ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลชีพชนิดแบคทีเรียและเชื้อรา พบว่าสารสกัดหยาบจากแก่นครี้มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *Bacillus cereus* ได้ดีที่สุด โดยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้ถึง 99.85% ที่ความเข้มข้น 25 µg/mL โดยมีค่า IC_{50} เป็น 5.05 µg/mL และมีค่า MIC_{90} เป็น 12.5 µg/mL โดยเชื้อ *B. cereus* เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษที่พบมากจากการรับประทานอาหารประเภทแป้งที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ เช่น เส้นขนมจีน เส้นก๋วยเตี๋ยว ขนมที่ทำด้วยแป้งต่างๆ เป็นต้น มีตัวอย่างการศึกษาวิจัยพบว่าเส้นขนมจีนที่จำหน่ายในจังหวัดภูเก็ต ร้อยละ 48.8 มีการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* เกินเกณฑ์มาตรฐาน ทั้งนี้พบว่าเส้นขนมจีนจากตลาดมีอัตราปนเปื้อนเชื้อสูงกว่าตัวอย่างจากโรงงาน เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนหรือปริมาณของเชื้อเพิ่มขึ้นระหว่างการขนส่ง การเก็บรักษาระหว่างรอจำหน่ายรวมถึงการใช้มือหยิบจับเส้นขนมจีน (จำรัส พูลเกื้อ, 2557) นอกจากนี้มีการศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. cereus* ในขนมจีนโดยสารสกัดจากผิวมะกรูด (อาญาสิทธิ พณารัตน์, 2550) และการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดต่อการยับยั้ง *B. cereus* ในข้าวหุกสุก ซึ่งพบว่าน้ำมันผิวมะกรูดสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* โดยวิธี microbroth dilution test ได้ที่ความเข้มข้น 2% v/v (นวลจันทร์ ใจใส และสุภาพร ล้ำเลิศธน, 2550) ในขณะที่การศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่น (*Zanthoxylum limonella*) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* พบว่ามีค่า MIC ที่ 26.56 mg/mL และสารสำคัญส่วนใหญ่ในผลมะแขว่นคือ Limonene ซึ่งพบมากในพืชตระกูลส้ม (ณัฐกานต์ วงศ์สีสม และคณะ, 2557) อย่างไรก็ตามสารสกัดจากแก่นครี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. cereus* เนื่องจากสารสกัดแก่นครี้สามารถสกัดได้ง่ายกว่าเนื่องจากใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแอลกอฮอล์ สามารถผลิตได้ในปริมาณที่มากกว่าพร้อมทั้งมีราคาถูกกว่าน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรอื่นๆ ประการสำคัญคือสารสกัดจากแก่นครี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *B. cereus* สูงกว่า โดยเมื่อสังเกตค่า MIC ต่อเชื้อ *B. cereus* ของสารสกัดจากแก่นครี้พบว่ามี

ค่า 12.5 µg/mL ในขณะที่สารสกัดจากมะแขว่นต้องใช้เข้มข้นสูงถึง 26.56 mg/mL ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าสารสกัดจากแก่นคริ้ถึง 2,100 เท่า นอกจากนี้สารสกัดจากแก่นคริ้ยังพบว่ามีสารพฤกษเคมีประเภทไอโซฟลาโวนอยด์อยู่เป็นจำนวนมาก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์เหล่านี้มีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงและเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพในด้านการต้านโรคเสื่อมและชะลอความชรา นอกจากนี้มีการรายงานถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดของสารพฤกษเคมีกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น สาร catechins และ theaflavins ที่สกัดจากใบชามีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* (Friedman, Henika, Levin, Mandrell, & Kozukue, 2006) และการผสมผสานของสารฟลาโวนอยด์หลายๆ ชนิด เช่น quercetin quercitrin morin และ rutin จะเสริมฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* (Arima, Ashida, & Danno, 2002) ซึ่งเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *B. cereus* ที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้อาจเกิดจากฤทธิ์ส่วนหนึ่งของสารไอโซฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของแก่นคริ้และมีมากถึง 60 ชนิด เจน (Songsiang et al., 2009; Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009) แต่ทั้งนี้ยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตโดยการนำสารสกัดหยาบมาแยกให้บริสุทธิ์และทดสอบสารบริสุทธิ์แต่ละชนิดว่าสารใดที่มีผลต่อการต้านเชื้อ *B. cereus* และนอกจากนี้จะมีการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญในเชื้อ *Bacillus sp.* สายพันธุ์ต่างๆ รวมถึงการค้นคว้าฤทธิ์ต้านจุลชีพสายพันธุ์อื่นๆ จากสมุนไพรไทยอื่นๆ เพิ่มเติมอีก เพื่อนำมาผสมและกำหนดสัดส่วนในการผลิตเป็นยารักษาแผลติดเชื้อได้

การวิจัยในส่วนของการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ พบว่าสารสกัดจากแก่นคริ้มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำในการยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียแกรมลบ และในกรณีของ *Enterococcus faecium* ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเช่นเดียวกับ *B. cereus* แม้ว่าจะสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ได้ (178.15 µg/mL) แต่ถือว่ามีประสิทธิภาพต่ำต่อการยับยั้ง *E. faecium* อีกทั้งเมื่อพิจารณาค่า MIC_{90} แล้วพบว่าไม่มีการทดลองใดนอกจาก *B. cereus* ที่จะสามารถรายงานค่า MIC_{90} ได้ ซึ่งสะท้อนถึงความไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและไม่สามารถนำสารสกัดนี้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับต่อต้านการเจริญแบคทีเรียได้ยกเว้น *B. cereus*

ตารางที่ 5.1 สรุปผลของสารสกัดจากแก่นครี้ (*D. parviflora*) ต่อการเจริญของจุลชีพ

สายพันธุ์จุลชีพ	**ค่า IC_{50} (µg/mL)**	**ค่า MIC_{90} (µg/mL)**
แบคทีเรียแกรมบวก		
Bacillus cereus	5.05	12.50
Enterococcus faecium	178.15	-
แบคทีเรียแกรมลบ		
Acenetobactor baumannii ATCC 19606	453.54	-
Escherichia coli ATCC 25922	-	-
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	7,925.1	-
Pseudomonsa aeruginosa PAO1	332.25	-

บรรณานุกรม

จำรัส พูลเกื้อ. (2557). **การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ของเส้นขนมจีนในจังหวัดภูเก็ต**. การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 22 ประจำปี 2557. หัวข้อข่าว “วิจัยพบ 'เส้นขนมจีน' ปนจุลินทรีย์ก่อโรค” สำนักข่าว AEC-News วันที่ 15 กรกฎาคม 2557. เข้าถึงได้จากเวบไซต์ www.aecnews.co.th/health/read/259 สืบค้นวันที่ 1กรกฎาคม 2558.

บงกชวรรณ สุตะพาหะ และ บรรยง คันธวะ. **การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดใบฟักข้าว. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่**. 44(1). หน้า 31-37.

ปรมาภรณ์ จิ๋วพัฒนกุล, พีรพัฒน์ กวีวงศ์ประเสริฐ, วิบุลย์ ไพศาลกอบฤทธิ์ และ ทิพาพร วงศ์สุรสิทธิ์. (2555). **ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรต่อเชื้อก่อโรคทางทันตกรรม**. ว.ทันต. มศว. 5(1). หน้า 34-41.

ปิยุกฤษฎ์ ทองบุญ, สุวิทย์ สุวรรณโณ, และ สุธีรา เสาวภาคย์. (2555). **ประสิทธิภาพสารสกัดน้ำของส้มแขกในการยับยั้งแบคทีเรีย**. Journal of Community Development Research. 5(1). หน้า 52-59.

ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร,กรองกาญน์ มนตรี, จารุวรรณ บรรจง, เบญจวรรณ สำรวล และ ศิรินภา โคตรจันทร์. (2555). **ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันจากเปลือกอบเชยเทศ**. ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ. 7(1). หน้า 39-43.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. (ม.ป.ป.). **Bacillus cereus / บาซิลลัส ซีเรียส**. สืบค้นเมื่อ 30 เมษายน 2558, จาก ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร (Food Network Solution) เว็บไซต์: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1626/เคมีอาหาร

พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย และ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2553). **ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าและสารสมุนไพรสกัดสดบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*.** วารสารพิษวิทยาไทย. 25(1). หน้า 15-28.

ณัฐกานต์ วงศ์สีสม, จามจุรี จินะตาม บุษบา มะโนแสน, จิรรัชต์ กันทะขู้, สุรีพร วันควร และสุภาวดี ศรีแย้ม. (2557). **การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น**. วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. 37(1). หน้า 3-15.

ศิริลักษณ์ อภิวาณิชย์, วาทินี คัชมาตย์ และบรรณจง วรรณยิ่ง. (2542). **การเฝ้าระวังโรคปอดบวมจากการใช้เครื่องช่วยหายใจของผู้ป่วยอายุรกรรมในโรงพยาบาลรามาธิบดี**. จุลสารชมรมควบคุมโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลแห่งประเทศไทยแห่งประเทศไทย. 10. หน้า 33-41.

อภิชัย มงคล. (2557). **อึ้ง! ไทยพบเชื้อดื้อยาเพียบ 20 ปีไร้ยาตัวใหม่สู้ เร่งเก็บข้อมูลเล็งแก้ กม. การใช้ยา**. ข่าว ASTV ผู้จัดการออนไลน์ วันที่ 17 มิถุนายน 2557. เข้าถึงได้จากเวบไซต์ http://www.manager.co.th/QOL/ViewNews.aspx?NewsID=9570000067889 สืบค้นเมื่อวันที่ 25 มิถุนายน 2558.

Arima, H., Ashida, H., & Danno, G. (2002). **Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis***. Biosci Biotechnol Biochem, 66(5), 1009-1014.

Bentgsath, A., Rusznyak, S., & Szent-Gyorgyl, A. (1937). **Vitamin P**. Nature, 139, 326-327.

Chen, Z. Y., Chan, P. T., Ho, K. Y., Fung, K. P., & Wang, J. (1996). **Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups.** Chem Phys Lipids, 79(2), 157-163.

Croft, K. D. (1998). **The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids.** Ann N Y Acad Sci, 854, 435-442.

De-Eknamkul, W., Umehara, K., Monthakantirat, O., Toth, R., Frecer, V., Knapic, L., et al. (2011). **QSAR study of natural estrogen-like isoflavonoids and diphenolics from Thai medicinal plants.** J Mol Graph Model.

Devasagayam, T. P., Tilak, J. C., Boloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). **Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects.** J Assoc Physicians India, 52, 794-804.

Domenech-Sanchez, A., Pascual, A., Suarez, A. I., Alvarez, D., Benedi, V. J., & Martinez-Martinez, L. (2000). **Activity of nine antimicrobial agents against clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases and deficient or not in porins.** J Antimicrob Chemother, 46(5), 858-859.

Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2008). **Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to *in vivo* evidence.** Crit Rev Food Sci Nutr, 48(7), 649-671.

Ferraz, A. C., Angelucci, M. E., Da Costa, M. L., Batista, I. R., De Oliveira, B. H., & Da Cunha, C. (1999). **Pharmacological evaluation of ricinine, a central nervous system stimulant isolated from *Ricinus communis*.** Pharmacol Biochem Behav, 63(3), 367-375.

Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E., Mandrell, R. E., & Kozukue, N. (2006). **Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*.** J Food Prot, 69(2), 354-361.

Grotewold, E. (2006). **The Science of Flavonoids (Vol. VII).** Ohio, USA: Springer.

Hernandez-Alles, S., Benedi, V. J., Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Aguilar, A., Tomas, J. M., et al. (1999). **Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes.** Antimicrob Agents Chemother, 43(4), 937-939.

Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004). **Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms.** J Pharmacol Sci, 96(3), 229-245.

Kongkamnerd, J., Milani, A., Cattoli, G., Terregino, C., Capua, I., Beneduce, L., et al. (2012). **A screening assay for neuraminidase inhibitors using neuraminidases N1 and N3 from a baculovirus expression system.** J Enzyme Inhib Med Chem, 27(1), 5-11.

Kongkamnerd, J., Milani, A., Cattoli, G., Terregino, C., Capua, I., Beneduce, L., et al. (2011). **The quenching effect of flavonoids on 4-methylumbelliferone, a potential pitfall in fluorimetric neuraminidase inhibition assays.** J Biomol Screen, 16(7), 755-764.

Martinez-Martinez, L., Hernandez-Alles, S., Alberti, S., Tomas, J. M., Benedi, V. J., & Jacoby, G. A. (1996). ***In vivo* selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins.** Antimicrob Agents Chemother, 40(2), 342-348.

Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., & van Leeuwen, P. A. (2001). **Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications.** Am J Clin Nutr, 74(4), 418-425.

Prochazkova, D., Bousova, I., & Wilhelmova, N. (2011). **Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids.** Fitoterapia.

Promden, W., Monthakantirat, O., Umehara, K., Noguchi, H., & De-Eknamkul, W. (2014). **Structure and antioxidant activity relationships of isoflavonoids from *Dalbergia parviflora*.** Molecules, 19(2), 2226-2237.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.** Free Radic Biol Med, 20(7), 933-956.

Robinson, J. D., Robinson, L. J., & Martin, N. J. (1984). **Effects of oligomycin and quercetin on the hydrolytic activities of the (Na^++K^+)-dependent ATPase.** Biochim Biophys Acta, 772(3), 295-306.

Songsiang, U., Wanich, S., Pitchuanchom, S., Netsopa, S., Uanporn, K., & Yenjai, C. (2009). **Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*.** Fitoterapia, 80(7), 427-431.

Tereschuk, M. L., Riera, M. V., Castro, G. R., & Abdala, L. R. (1997). **Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta***. J Ethnopharmacol, 56(3), 227-232.

Tsao, T. F., Newman, M. G., Kwok, Y. Y., & Horikoshi, A. K. (1982). **Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria**. J Dent Res,61(9), 1103-1106.

Umehara, K., Nemoto, K., Kimijima, K., Matsushita, A., Terada, E., Monthakantirat, O. & De-Eknamkul (2008). **Estrogenic constituents of the heartwood of *Dalbergia parviflora*.** Phytochemistry, 69(2), 546-552.

Umehara, K., Nemoto, K., Matsushita, A., Terada, E., Monthakantirat, O., & De-Eknamkul, W.(2009**). Flavonoids from the heartwood of the Thai medicinal plant *Dalbergia parviflora* and their effects on estrogenic-responsive human breast cancer cells**. J Nat Prod, 72(12), 2163-2168.

Wungsintaweekul, B., Umehara, K., Miyase, T., & Noguchi, H. (2011). **Estrogenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal plant, Smilax corbularia (Smilacaceae).** Phytochemistry.

Yang, H. L., Chen, S. C., Senthil Kumar, K. J., Yu, K. N., Lee Chao, P. D., Tsai, S. Y. (2012). **Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an ex vivo approach.** J Agric Food Chem, 60(1), 522-532.

Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R. (2004). **Flavonoids in food and their health benefits.** Plant Foods Hum Nutr, 59(3), 113-122.

ภาคผนวก

ประวัตินักวิจัย

1. **นายวรวัฒน์ พรมเด่น** (Worrawat Promden, Ph.D)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3311100069820

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)

หน่วยงานที่สังกัดและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ เลขที่ 439 ถ.จิระ ต. ในเมือง อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ 31000

หมายเลขโทรศัพท์เคลื่อนที่ 089-424-2324

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) p_worrawat@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ชื่อสถานศึกษา	ได้รับปริญญา/สาขา
พ.ศ. 2547	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ) สาขาชีวเคมี
พ.ศ. 2550	มหาวิทยาลัยรามคำแหง	ศิลปศาสตรบัณฑิต (ศศ.บ) สาขาปรัชญา
พ.ศ. 2551	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วท.ด) สาขาชีวเคมี

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

อณูชีววิทยาและพันธุวิศกรรมในแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารต้านอนุมูลอิสระ

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

พ.ศ. 2553-2555 ผู้ประสานงานหลัก หน่วยปฏิบัติงานวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเผยแพร่ผลงานวิจัย Publications (5 **ปีย้อนหลัง)**

งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

1. **Worrawat Promden**, Alisa S. Vangnai, Piamsook Pongsawasdi, Osao Adachi, Kazunobu Matsushita & Hirohide Toyama. Disruption of quinoprotein ethanol dehydrogenase gene and adjacent genes in *Pseudomonas putida* HK5. FEMS Microbiology Letters, 280 (2), 203-209, March 2008.

2. **Worrawat Promden**, Alisa S. Vangnai, Hirohide Toyama, Kazunobu Matsushita, and Piamsook Pongsawasdi. Analysis of promoter activities of the genes encoding three quinoprotein alcohol dehydrogenases of *Pseudomonas putida* HK5. Microbiology, 155, 594-603, February 2009.

3. Fuminori Fukaya, **Worrawat Promden**, Takashi Hibino, Yoshito Tanaka, Tatsunosuke Nakamura, and Teruhiro Takabe. An Mrp-like cluster in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* functions as a Na^+/H^+ antiporter. Applied and Environmental Microbiology, 75, 6626-6629, October 2009.

4. Nana Yamada, **Worrawat Promden**, Koji Yamane, Hideto Tamagake, Takashi Hibino, Yoshito Tanaka, and Teruhiro Takabe. Preferential accumulation of betaine uncoupled to choline monooxygenase in young leaves of Sugar beet -Importance of
long distance translocation of betaine under normal and salt-stressed conditions.
Journal of Plant Physiology, 116(18), 2058-2070, December 2009.

5. Alisa S. Vangnai, **Worawat Promden**, Wanchai De-Eknamkul, Kazunobu Matsushita, and Hirohide Toyama. Molecular characterization and heterologous expression of quinate dehydrogenase gene from *Gluconobacter oxydans* IFO3244. Biochemistry (Moscow), 75(4), 452-459, May 2010.

6. Kanteera Soontharapirakkul, **Worrawat Promden**, Nana Yamada, Hakuto Kageyama, Aran Incharoensakdi, Atsuko Iwamoto-Kihara, and Teruhiro Takabe.
Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains a Na+-dependent F1F0-ATP synthase with potential role in salt tolerance. Journal of Biological Chemistry, 286(12), 10169–10176, March, 2011

7. Nana Yamada, Suriyan Cha-Um, Hakuto Kageyama, **Worrawat Promden**, Yoshito Tanaka, Chalermpol Kirdmanee and Teruhiro Takabe. Isolation and characterization of proline/betaine transporter gene from oil palm. Tree Physiology 31, 462–468, April, 2011

8. Pithi Chanvorachote, Sudjit Luanpitpong, Preedakorn Chunhacha, **Worrawat Promden**, Virote Sriuranpong, Expression of CA125 and cisplatin susceptibility of pleural effusion-derived human lung cancer cells from a Thai patient. Oncology Letters, 252-256, May,2012

9. **Worrawat Promden**, Orawan Monthakantirat, Kaoru Umehara, Hiroshi Noguchi and Wanchai De-Eknamkul. Structure and Antioxidant Activity Relationships of Isoflavonoids from *Dalbergia parviflora*. Molecules, 19, pp. 2226-2237. February, 2014

บทความวิชาการ

วรวัฒน์ พรหมเด่น. (2556). ชีวเคมีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรีย. วารสารวิจัย มข., 18(6), หน้า 1003-1020.

ประวัติการได้รับทุน

1. พ.ศ. 2548-2550 : ทุน โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 8 สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

2. พ.ศ. 2551-2552 : ทุนนักวิจัย สถาบันวิจัยมหาวิทยาลัยเมโจ (Meijo University) เมืองนาโกยา ประเทศญี่ปุ่น

3. พ.ศ. 2553-2554 : ทุนนักวิจัยหลังปริญญากองทุนเอกรัชดาภิเษกสมโภช บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. พ.ศ. 2557 : ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2557 โดยสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

2. **นายเทพพร โลมารักษ์** (Tepporn Lomarak, Ph.D)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3349900038624

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)

หน่วยงานที่สังกัด สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ เลขที่ 439 ถ.จิระ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ 31000

สถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ เลขที่ 439 ถ.จิระ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ 31000

หมายเลขโทรศัพท์เคลื่อนที่ 0817046945

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) tlomarak@gmail.com

ประวัติการศึกษา

การศึกษา	**ระดับการศึกษา**	**สถานศึกษา**
2554	การศึกษาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตรศึกษา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
2546	ประกาศนียบัตรบัณฑิต สาขาวิชาชีพครู	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2545	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) : การวิจัยทางด้านการสอนวิทยาศาสตร์การใช้สื่อออนไลน์สำหรับการสอนวิทยาศาสตร์ และการนิเทศนักศึกษาฝึกประสบกาณ์วิชาชีพครู

ผลงานวิจัย:

1. Enhancing High School Students' Conceptual Understanding of Chemical Bonding by Using Learning Units Incorporated with Information Processing Theory

2. A Development of High School Chemical Bonding Learning Units Incorporated with Information Processing Theory

ปริญญาการศึกษาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตรศึกษา)

ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จินดา แต้มบรรจง

กรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. สมสรร วงษ์อยู่น้อย

ดร. ปรีชาญ เดชศรี

แหล่งตีพิมพ์: วารสารศรีนครินทรวิโรฒวิจัยและพัฒนา (สาขามนุษย์ศาสตร์และสังคมศาสตร์) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปีที่ 5ฉบับที่ 9 มกราคม-มิถุนายน พ.ศ. 2556