



## โครงการย่อยที่ 2

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากแก่นครี

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

ภายใต้ชุดโครงการ : การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากแก่นครี

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

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น

และ

เทพพร โลมารักษ์

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

พ.ศ. 2558

(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์)



โครงการย่อยที่ 2

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากแก่นครี

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

ภายใต้ชุดโครงการ : การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากแก่นครี

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

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น

และ

เทพพร โลมารักษ์

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

พ.ศ. 2558

(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์)

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนจากงบประมาณเพื่อจัดสรรทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี  
งบประมาณ 2558 คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

## บทคัดย่อ

แก่นครีเป็นสมุนไพรไทยที่มีสารพฤษเคมีกลุ่มฟลาโวนอยด์หลากหลายชนิด การศึกษาครั้งนี้จึงใช้สารสกัดหยาบจากแก่นครีที่สกัดด้วยเมทานอลมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราชนิดต่างๆ 4 สายพันธุ์ (*Alternaria brassicicola*, *Candida albicans*, *Curvularia lunata* และ *Magnaporthe grisea*) การทดสอบใช้เทคนิควิธีทางสเปกโตรฟลูออโรเมตรี ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากแก่นครีมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Magnaporthe grisea* ได้เพียงเล็กน้อย โดยมีค่า  $IC_{50}$  เป็น 91.31  $\mu\text{g/mL}$  ซึ่งยังถือมีประสิทธิภาพต่ำกว่ายาปฏิชีวนะ Amphotericin B ที่ใช้เป็นชุดการทดลองควบคุมผลบวก ในขณะเดียวกันผลการศึกษาศึกษาการยับยั้งการเจริญในเชื้อราชนิดอื่นๆ พบว่าสารสกัดไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้เลยในความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้ในการทดลองนี้ (50  $\mu\text{g/mL}$ )

**คำสำคัญ :** ฤทธิ์ต้านเชื้อรา สมุนไพร แก่นครี

**ABSTRACT**

*Dalbergia parviflora*, the Thai medicinal plant which is a rich source of flavonoids. The methanolic extract of *D. parviflora* was evaluated for its antifungal activity against 4 strains of fungi (*Alternaria brassicicola*, *Candida albicans*, *Curvularia lunata* and *Magnaporthe grisea*). The antifungal activity was determined by spectrofluorometry method. The results revealed that the methanolic extract of *D. parviflora* exhibited slightly antifungal activity against *Magnaporthe grisea* with  $IC_{50}$  value is 91.31  $\mu\text{g/mL}$  which antifungal activity was lower than positive control positive control Amphotericin B. In the same way, the *D. parviflora* extract did not inhibit the other strains of fungi at the maximum concentration of this experiment (50  $\mu\text{g/mL}$ ).

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

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	(i)
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	(ii)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	(iii)
สารบัญเรื่อง.....	(iv)
สารบัญรูปภาพ.....	(vi)
สารบัญตาราง.....	(vii)
<b>บทที่ 1</b>	
บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำกาวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	2
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	4
<b>บทที่ 2</b>	
ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	5
ครี.....	5
ฟลาโวนอยด์และไอโซฟลาโวนอยด์.....	7
ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์.....	9
เชื้อรา.....	10

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

### บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย.....	14
เครื่องมือวิทยาศาสตร์.....	14
สารเคมี.....	14
จุลินทรีย์ (เชื้อรา) .....	14
การเตรียมเชื้อราเพื่อใช้ทดสอบ.....	15
การวัดฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยวิธี 5,(6) carboxy fluorescein diacetate (CFDA) assay.....	15
ตัวอย่างขั้นตอนการวัดผลและการคำนวณค่า % inhibition ค่า MIC <sub>90</sub> และ ค่า IC <sub>50</sub> .....	17

### บทที่ 4

ผลการวิจัย.....	21
ผลการวัดฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากแก่นศรี.....	21

### บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	26
บรรณานุกรม.....	27
ภาคผนวก.....	31
ประวัตินักวิจัย.....	32

## สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1	แผนผังแสดงขอบเขตและขั้นตอนของงานวิจัย.....	3
ภาพที่ 2.1	<i>Dalbergia parviflora</i> Roxb. แสดงลักษณะของใบและผล.....	6
ภาพที่ 2.2	<i>Dalbergia parviflora</i> Roxb. แสดงลักษณะของแก่นครี (วัตถุดิบแห้ง) และเมื่อ บดละเอียดเป็นผง .....	6
ภาพที่ 2.3	โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์.....	8
ภาพที่ 2.4	โครงสร้างทางเคมีของไอโซฟลาโวนอยด์.....	8
ภาพที่ 2.5	<i>Curvularia lunata</i> แสดงลักษณะของ conidia.....	11
ภาพที่ 2.6	<i>Magnaporthe grisea</i> แสดงลักษณะของ Spores.....	11
ภาพที่ 2.7	โรคไหม้ในข้าว (Rice blast lesions on plant nodes) จากเชื้อรา <i>M. grisea</i> .....	12
ภาพที่ 2.8	<i>Candida albicans</i> แสดงลักษณะ Chlamydospore .....	12
ภาพที่ 2.9	<i>Alternaria brassicicola</i> แสดงลักษณะของ Conidia.....	13
ภาพที่ 3.1	กราฟระหว่างความเข้มข้นและค่า % inhibition แสดงสมการ logarithmic และค่า สหสัมพันธ์ ของการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง.....	20



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายสารสกัดหยาบของแก่นครีในถาดหลุม micro-plate ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ศึกษาผลของความเข้มข้นต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา.....	16
ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างตารางบันทึกผลของการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดแก่นครี โดยวิธี Resazurin Microplate assay กรณีของ <i>Bacillus cereus</i> .....	18
ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างตารางบันทึกผลการคำนวณค่า % inhibition.....	18
ตารางที่ 4.1 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครีต่อการยับยั้งเชื้อ <i>Magnaporthe grisea</i> โดยวิธี 5,(6) carboxy fluorescence diacetate (CFDA) fluorometric detection.....	22
ตารางที่ 4.2 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครีต่อการยับยั้งเชื้อ <i>Curvularia lunata</i> โดยวิธี 5,(6) carboxy fluorescence diacetate (CFDA) fluorometric detection.....	23
ตารางที่ 4.3 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครีต่อการยับยั้งเชื้อ <i>Alternaria brassicicola</i> โดยวิธี 5,(6) carboxy fluorescence diacetate (CFDA) fluorometric detection.....	24
ตารางที่ 4.4 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครีต่อการยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> โดยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA).....	25

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เชื้อราที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคในมนุษย์ สัตว์ และพืช ทั้งนี้ในปัจจุบันมีการใช้สารออกฤทธิ์ฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก เป็นเหตุให้มีการขาดดุลการค้าและสูญเสียงบประมาณของประเทศในด้านสาธารณสุขอย่างมหาศาล ทั้งนี้พบว่าพืชสมุนไพรต่างๆ เป็นแหล่งที่จะสามารถค้นพบสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ และประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิภาคเขตร้อนชื้นที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ ดังนั้นจึงมีโอกาสดูสูงที่จะค้นพบสารพฤกษเคมีจากพืชสมุนไพรของไทยที่จะสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ และสามารถนำมาพัฒนาใช้เพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคหรือทดแทนการใช้สารเคมีที่ยับยั้งเชื้อราในด้านการเกษตร ซึ่งจะก่อให้เกิดผลดีในด้านการสร้างนวัตกรรมที่มีรากฐานจากทรัพยากรภายในประเทศและมีความได้เปรียบในเชิงเศรษฐกิจตามมา

ครีหรือส็กซี (*Dalbergia parviflora*) เป็นพืชยืนต้นที่มีแก่นไม้ซึ่งมีการใช้เป็นยาสมุนไพร รักษาแผลเปื่อยพุพองตามหลักภูมิปัญญาท้องถิ่นแต่ยังมิได้มีการศึกษาในเชิงการทดลองทางวิทยาศาสตร์เพื่อสนับสนุนภูมิปัญญาการใช้สมุนไพร และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบในแก่นครีพบว่ามีการประกอบฟลาโวนอยด์มากกว่า 60 ชนิด ในขณะที่มีงานวิจัยอื่นๆ ได้กล่าวถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบฟลาโวนอยด์ไว้อย่างหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ด้านการอักเสบ และรวมถึงฤทธิ์ในการต้านจุลชีพประเภทแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวโน้มที่จะค้นพบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดแก่นครี และการค้นพบนี้อาจจะสามารถนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังบางชนิดหรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดธรรมชาติที่ใช้ด้านการเจริญของแบคทีเรียในอาหารที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสีย รวมทั้งอาจสามารถนำมาประยุกต์ใช้แทนสารเคมีกำจัดโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์บางชนิด ทั้งนี้การส่งเสริมการวิจัยด้านสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นการสร้างความพร้อมทางด้านการผลิตยารักษาโรค เครื่องสำอาง อาหาร รวมถึงยา

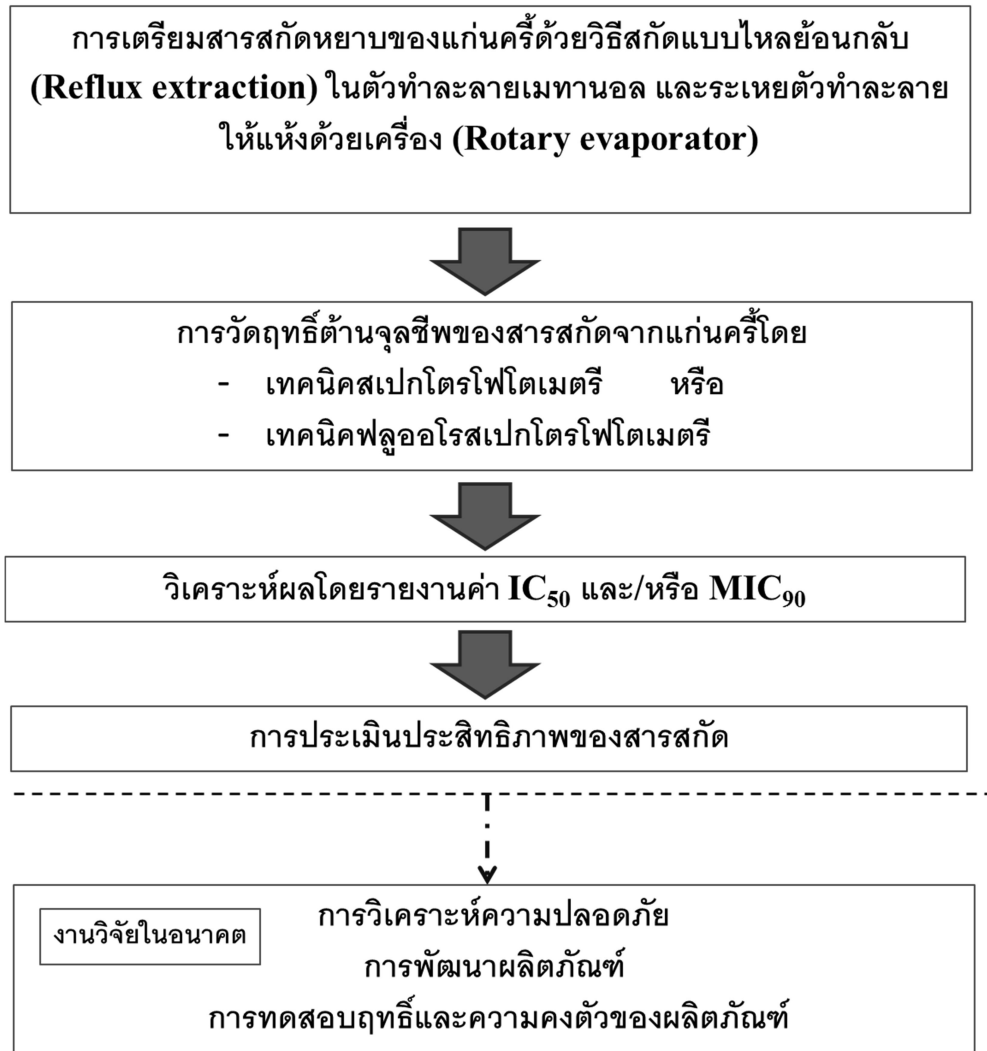
กำจัดโรคพืช และเป็นแผนหนึ่งของการพัฒนานวัตกรรมด้านสมุนไพรไทยให้มีประสิทธิภาพและได้รับการยอมรับมากขึ้น ในทางเศรษฐกิจจะนำไปสู่การลดการนำเข้าของยาปฏิชีวนะหรือสารสังเคราะห์ รวมถึงการส่งเสริมให้มีการอนุรักษ์พืชพรรณสมุนไพร และประชาสัมพันธ์ให้ทราบถึงคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติในท้องถิ่น

### **วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

เพื่อทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเชื้อราที่สำคัญบางชนิดจากสารสกัดแก่นครี

### **ขอบเขตของโครงการวิจัย**

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาวิจัยภายในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราในระดับหลอดทดลอง โดยยังไม่มีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการใช้เป็นยาหรืออาหาร และการวิจัยนี้ยังไม่มีทำการทดลองในมนุษย์หรือสัตว์ โดยใช้เทคนิคการติดตามการเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียภายหลังได้รับสารสกัดจากแก่นครีด้วยวิธีทางสเปกโตรฟลูออโรเมตรี



ภาพที่ 1.1 แผนผังแสดงขอบเขตและขั้นตอนของงานวิจัย

## กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

แก่นครีเป็นสมุนไพรที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทย โดยพบว่ามีการใช้เป็นยาบำรุงร่างกายและยาสำหรับสตรีรวมทั้งเป็นยารักษาแผลเปื่อยพุพอง และคณะผู้วิจัยได้ศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและพบว่ามียูทิต้านอนุมูลอิสระสูง จึงเห็นสมควรศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ให้รอบด้าน โครงการวิจัยนี้จึงได้พัฒนางานวิจัยเดิมให้มีการแตกแขนงการวิจัยออกไปในเชิงลึก โดยมุ่งประเด็นหลักไปที่การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ เพื่อยืนยันผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับหลอดทดลองก่อนการประเมินแนวทางพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้การนำภูมิปัญญาท้องถิ่นมาตรวจสอบในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ จะทำให้สามารถพัฒนาขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นที่ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านยารักษาโรคและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพ และเป็นการสร้างโอกาสในการพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นเพื่อกลับคืนสู่ท้องถิ่น อันจะนำมาซึ่งโอกาสในการสร้างรายได้และความยั่งยืน

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรกำลังเป็นที่สนใจโดยเฉพาะการพัฒนาเป็นสารต้านเชื้อราเพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ ตัวอย่างการศึกษาวิจัยในประเทศไทยเกี่ยวกับสารสกัดสมุนไพรที่สามารถต้านเชื้อราได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* ของสารสำคัญจากผลยอ (จิราภรณ์ สุวรรณชาติ และคณะ 2554.) การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดใบผักขาว (บงกชวรรณ สุตะพาหะและบรรยง คันธวะ 2554.) ฤทธิ์ยับยั้ง *Alternaria brassicicola* ของราเอนโดไฟท์ TH121 ที่แยกได้จากใบโพทะเล (จิราภรณ์ ธนากุล ปกรณ์ และอภิรดี ปิลันธนาภคย์, 2555) เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาศักยภาพของสมุนไพรจึงยังคงมีแนวโน้มที่จะค้นพบองค์ความรู้ใหม่และก่อให้เกิดนวัตกรรมเพื่อพัฒนาทางวิทยาศาสตร์

**ครี** (*Dalbergia parviflora* Roxb.) มีชื่อสามัญคือ Blackwood และชื่อท้องถิ่นได้แก่ กระซิก ซิก และ สักชี เป็นต้น จัดอยู่ในวงศ์ (family) *Fabaceae* วงศ์ย่อย (subfamily) *Faboideae* อาจมีการสับสนกับต้นสักชี (*Dalbergia candenatensis*) ซึ่งเป็นพรรณไม้ในวงศ์เดียวกัน งานวิจัยเกี่ยวกับสารพฤกษเคมี (phytochemical) จากแก่นครีพบว่ามีส่วนประกอบของสารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มากกว่า 60 ชนิด และพบว่าหลายชนิดมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (Songsiang et al., 2009; Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009) นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์ยังมีรายงานว่ามีส่วนประกอบที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Chen, Chan, Ho, Fung, & Wang, 1996; Croft, 1998; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996) คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษากลุ่มไฮโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากแก่นครีโดยวิธี DPPH วิธี ORAC และวิธี xanthine/xanthine oxidase ซึ่งพบว่ามีส่วนประกอบหลายชนิดที่แสดงสมบัตินี้ได้ อีกทั้งยังได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Promden, Monthakantirat, Umehara, Noguchi, & De-Eknamkul, 2014) สารฟลาโวนอยด์จากแก่นครีจึงเป็นเป้าหมายที่จะนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการต้านจุลชีพ



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. แสดงลักษณะของแก่นครี (วัตถุดิบแห้ง) และเมื่อ บดละเอียดเป็นผง

ที่มาของภาพ : วรวัฒน์ พรหมเด่น (2557)

## ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoids)

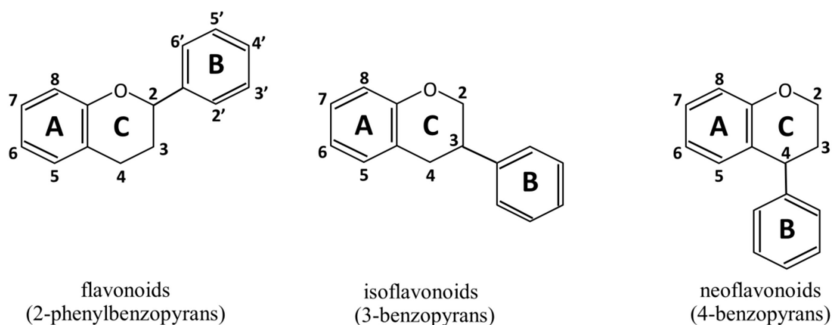
ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มาจากภาษาละตินคำว่า flavus หมายถึงสีเหลืองซึ่งเป็นสีที่พบในพืชตามธรรมชาติ ฟลาโวนอยด์เป็นสารทุติยภูมิของพืช (secondary metabolite) นอกจากนี้ในช่วงราวๆ ปี ค.ศ. 1930 – 1950 ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฟลาโวนอยด์มากขึ้นและมีการจัดให้ฟลาโวนอยด์เป็นวิตามิน P (Bentgsath, Rusznyak, & Szent-Gyorgyl,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

ในเชิงโครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารพฤษเคมีในธรรมชาติพบว่ามีโครงสร้างหลักเป็น 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) เกิดจากโครงสร้างของ 4-phenylcoumarine

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

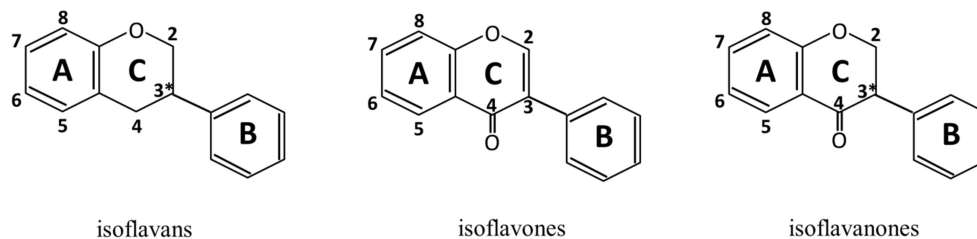




**ภาพที่ 2.3** โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์ (2-phenylbenzopyran) ไอโซฟลาโวนอยด์ (3-benzopyran) และ นีโอฟลาโวนอยด์ (4-benzopyran) แสดงการระบุหมายเลขตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงแหวน A B และ C

ไอโซฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีโครงสร้างหลักมาจาก 3-phenylchroman เป็นสารประกอบที่พบอยู่ในสิ่งมีชีวิตอาณาจักรพืช ความหลากหลายของชนิดของไอโซฟลาโวนอยด์ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงแหวน และยังมี ความแตกต่างหลากหลายของระดับออกซิเดชันบนวงแหวน (Grotewold, 2006) ไอโซฟลาโวนอยด์จึงสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้

1. ไอโซฟลาเวน (isoflavan)
2. ไอโซฟลาโวน (isoflavone)
3. ไอโซฟลาวาโนน (isoflavanone)



\* stereocenter

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

## ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์

ในอดีตมีการใช้ยาสมุนไพรพื้นบ้านเพื่อรักษาความเจ็บป่วยและโรคเสื่อม (degenerative disease) ซึ่งเกี่ยวข้องกับความชราภาพรวมถึงโรคมะเร็ง เบาหวาน โรคหัวใจ ความดัน เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีส่วนประกอบเคมี (phytochemical) หลายชนิดเป็นองค์ประกอบในพืชสมุนไพรเหล่านั้น ซึ่งได้แก่ สารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ไกลโคไซด์ (glycoside) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoid) อัลคาลอยด์ (alkaloid) เป็นต้น จากการศึกษาวิจัยพบว่าสารพฤกษเคมีเหล่านี้สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่น example, อัลคาลอยด์มีผลต่อระบบสรีรวิทยาของมนุษย์และสัตว์ (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) สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารฟลาโวนอยด์พบว่ามีผลเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น การต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Kim, Son, Chang, & Kang, 2004) ยับยั้งเอนไซม์บางกลุ่ม เช่น hydrolytic enzyme และ oxidative enzyme (Robinson, Robinson, & Martin, 1984; Yang et al.) นอกจากนี้ยังพบว่าฟลาโวนอยด์สามารถป้องกันโรคหัวใจ และหลอดเลือด ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และฟลาโวนอยด์บางชนิดอาจมีศักยภาพที่สามารถยับยั้งไวรัส HIV ได้ (Yao et al., 2004)

ฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อราในสารประกอบฟลาโวนอยด์มีการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวาง ได้แก่ สารฟลาโวนอยด์ที่สกัดจากใบมะม่วง (*Mangifera indica* L.) ที่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Alternaria alternate*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium citrii* และ *Aspergillus nige* เช่น epicatechin-3-O- $\beta$ -glucopyranoside, 5-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)pyrano[3,2-g]chromene-4(8H)-one, 6-(p-hydroxybenzyl) taxifolin-7-O- $\beta$ -D-glucoside (tricuspid) ,

quercetin-3-O- $\alpha$ -glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-  $\beta$  -D-glucopyranoside และ (-)-epicatechin(2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol (Kanwal, Hussain, Latif Siddiqui, & Javaid) สารสกัดจากรากของต้น *Hildegardia barteri* พบว่ามีฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา ได้แก่ (3R)-6,2'-dihydroxy-7-methoxy-4',5'-methylenedioxyisoflavan, hildegardiol, 2-hydroxymaackiain และ farrerol (Meragelman, Tucker, McCloud, Cardellina, & Shoemaker, 2005) สารสกัดจากส่วนที่อยู่เหนือพื้นดินทั้งหมดของต้น *Eysenhardtia texana* พบว่ามีฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา ได้แก่ 4',5,7-trihydroxy-8-methyl-6-(3-methyl-[2-butenyl])-(2S)-flavanone, 4',5,7-trihydroxy-6-methyl-8-(3-methyl-[2-butenyl])-(2S)-flavanone และ 4',5-dihydroxy-7-methoxy-6-(3-methyl-[2-butenyl])-(2S)-flavanone (Wachter, Hoffmann, Furbacher, Blake, & Timmermann, 1999) อย่างไรก็ตามฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการต้านเชื้อรายังไม่มีรายงานในสารสกัดจากแก่นครี การศึกษาวิจัยนี้จะเป็นการสร้างองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์และสร้างแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราจากสมุนไพร

### เชื้อรา (Fungi)

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในอาณาจักรเห็ดราหรือฟังไจ (Kingdom Fungi) เป็นเซลล์ชนิดยูแคริโอต (eukaryote) พบได้ทั้งที่เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว เส้นใย และ ดอกเห็ด ไม่มีคลอโรฟิลล์ ได้รับสารอาหารจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยจะปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และซับซ้อนจนเป็นโมเลกุลเล็กและดูดซึมเข้าเซลล์ เชื้อราที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มี 4 ชนิด ดังนี้

1. *Curvularia lunata* เป็นเชื้อราในจิ้นส์ *Curvularia* วงศ์ *Pleosporaceae* โดยเชื้อราจะสร้าง conidium ที่มี 3-5 เซลล์ รูปร่างโค้ง เซลตรงกลางมีสีเข้มกว่าเซลล์หัวท้าย เกิดบนก้าน conidiophore สีเข้มไม่แตกกิ่งก้าน เชื้อรา *Curvularia* เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญของพืชไร่และพืชสวนหลายชนิด มีรายงานโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *C. lunata* บนข้าวโพด แตงฝรั่ง แตงเทศ โรคผลเน่าดำบนมะละกอ โรคเมล็ดเน่าดำบนข้าวฟ่าง โรคดอกสนิมหรือโรคจุดสนิมบนกล้วยไม้ โรคใบไหม้บนปาล์มน้ำมัน โรคฝักจุดหรือฝักลายบนกระเจี๊ยบเขียว โรคใบจุดบนต้นกล้าของมะพร้าว และโรคใบจุดบนยางพารา เป็นต้น



ภาพที่ 2.5 *Curvularia lunata* แสดงลักษณะของ conidia

ที่มาของภาพ : Medmyco, University of Toronto in the Dalla Lana School of Public Health, 2013.

2. *Magnaporthe grisea* เป็นเชื้อราในจำพวก *Magnaporthe* วงศ์ *Magnaporthaceae* เป็น ascomycete fungus สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ เป็นเชื้อราที่ก่อโรคในพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในข้าวซึ่งจะทำให้เกิดโรคใบไหม้และไหม้คอรวง จึงมีชื่อเรียกเชื้อราชนิดนี้ว่า rice blast fungus ทั้งนี้เชื้อรา *M. grisea* มีผลกระทบสำคัญต่อเศรษฐกิจของการผลิตข้าวในประเทศไทยและประเทศผู้ผลิตข้าวอื่นๆ ทั่วโลก เชื้อดังกล่าวสามารถเข้าทำลายข้าวในทุกระยะการเจริญเติบโตและสามารถทำให้ผลผลิตข้าวลดลงอย่างน้อย 10 เปอร์เซ็นต์ ถ้ามีการระบาดรุนแรงมากและพันธุ์ข้าวไม่มีความต้านทาน ความเสียหายจะมากขึ้นจนถึงขั้นไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้



ภาพที่ 2.6 *Magnaporthe grisea* แสดงลักษณะของ Spores

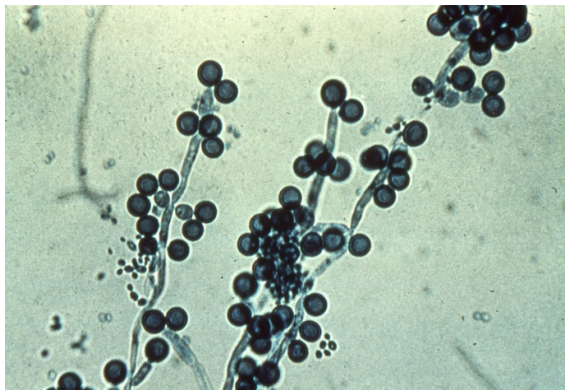
ที่มาของภาพ : Donald Groth, Louisiana State University AgCenter USA, 2010.



ภาพที่ 2.7 โรคไหม้ในข้าว (Rice blast lesions on plant nodes) จากเชื้อรา *M. grisea*

ที่มาของภาพ : Donald Groth, Louisiana State University AgCenter USA, 2010.

3. *Candida albicans* เป็นเชื้อยีสต์ในจีนัส *Candida* วงศ์ *Saccharomycetaceae* มีรูปกลมหรือรี สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อได้เป็น blastoconidia และพบสร้างได้ทั้ง true hyphae และ pseudohyphae ทั้งนี้พบว่าเชื้อ *C. albicans* เป็นสาเหตุหลักของโรคติดเชื้อราในมนุษย์ โดยทั่วไปแล้ว *C. albicans* ที่พบในคนปกติที่บริเวณเยื่อในช่องปาก ลำคอ ลำไส้ และอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศหญิงโดยจะไม่ก่อโรคในผู้ที่มีสุขภาพดี แต่ในผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกัน รังสีบำบัด เคมีบำบัด และผู้ที่ใช้สายสวนเป็นเวลานาน รวมถึงในผู้ป่วยโรคเอดส์ เชื้อ *C. albicans* นี้จะสามารถก่อให้เกิดโรคได้กับเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายและเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อราฉวยโอกาสในโรงพยาบาลในกลุ่มอาการของโรค candidiasis



ภาพที่ 2.8 *Candida albicans* แสดงลักษณะ Chlamydospore

ที่มาของภาพ : American Society for Microbiology

4. *Alternaria brassicicola* เป็นเชื้อราในจำพวก *Alternaria* วงศ์ *Pleosporaceae* ลักษณะโคโลนีมีสีเขียวอมเทาถึงสีน้ำตาลดำ เส้นใยแตกแขนงมีผนังกัน (septate mycelium) ตอนแรกใสต่อมาสีน้ำตาลหรือเขียวอมเทา ผนังเซลล์เรียบ ความกว้างระหว่างเซลล์ 1.5 – 7.5 ไมครอน สร้างก้านชูสปอร์สีน้ำตาลอ่อน มักเกิดเดี่ยวๆ หรือเกิดเป็นกลุ่ม 2-12 ก้านหรือมากกว่า มีลักษณะตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย รูปร่างเป็นทรงกระบอกที่ปลายมีลักษณะพองออกเล็กน้อย มีผนังกันตามขวางขนาดกว้าง 5-8 ไมครอน และอาจยาวถึง 70 ไมครอน สร้าง conidia ต่อกันเป็นลูกโซ่ยาว อาจพบต่อกันถึง 20 conidia บางครั้งลูกโซ่แตกแขนงด้วย conidia มีรูปร่างทรงกระบอกหรือทรงบองหัวกลับ เชื้อ *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดดำของพืชตระกูลกะหล่ำจะผลิตสารพิษที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืช (host-specific protein toxin) ชื่อ AB-toxin ซึ่งจะถูกชักนำให้ถูกปลดปล่อยในขณะสปอร์ของเชื้อสาเหตุมีการงอก germ tube เข้าสู่พืชอาศัยเท่านั้น โดยจะไม่ถูกผลิตขึ้นใน non-host plant ในจานอาหาร หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ โรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* ก่อให้เกิดโรคแก่พืชผักตระกูลกะหล่ำหลายชนิด เช่น กะหล่ำดอก กะหล่ำดาว กะหล่ำปลม กะหล่ำปลี คะน้า บรอกโคลี ผักกาดขวางตุ้ง ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวปลี ผักกาดหัว และ แรดิช (สกุลศุกดิ์, 2540) การแพร่ระบาดจะสร้างความเสียหายมากขึ้นในช่วงที่สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรค เช่น ฝนตกชุก หรือ แปร่งที่ให้น้ำมากเกินไป (ศศิธร, 2545) พืชตระกูลกะหล่ำหลายชนิดมีความอ่อนแอต่อโรคใบจุด โดยเชื้อจะสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนทุกระยะการเจริญเติบโต ในระยะกล้าก่อก่อให้เกิดโรคเน่าคอดิน ถ้าเป็นกับต้นที่โตแล้วจะพบอาการชัดเจนบริเวณใบแก่ที่อยู่ใกล้ผิวดิน โดยปรากฏเป็นจุดแผลเนื้อเยื่อตายสีเหลืองขนาดเล็ก ต่อมาแผลจะขยายขนาดกลายเป็นสีน้ำตาล และมีสีเหลืองล้อมรอบแผล



ภาพที่ 2.9 *Alternaria brassicicola* แสดงลักษณะของ Conidia

ที่มาของภาพ : Seemadua, S. Department of Agriculture, Thailand

## 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. Amphotericin B
2. 5,(6)-carboxy fluorescein diacetate (CFDA)
3. Sabouraud dextrose agar
4. Potato dextrose agar
5. Rice Polished Agar
6. Resazurin
7. DMSO

#### จุลินทรีย์ (เชื้อรา)

1. *Alternaria brassicicola*
2. *Candida albicans*
3. *Curvularia lunata*
4. *Magnaporthe grisea*

### การเตรียมเชื้อราเพื่อใช้ทดสอบ

เชื้อรา *Candida albicans* เพาะบนอาหารแข็ง Sabouraud dextrose agar (SDA, Difco, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ loop ขูดเซลล์ที่อยู่ผิวหน้าวุ้นและกระจายเซลล์ในสารละลาย normal saline ให้ได้ความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน 0.5 McFarland ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์ประมาณ  $1-5 \times 10^6$  CFU/mL จากนั้นจึงเจือจางเซลล์ใน Sabouraud dextrose broth ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ  $1 \times 10^5$  CFU/mL โดยใช้การคำนวณจาก factor ค่าความขุ่น 1 unit ที่  $OD_{600}$  จะมีเซลล์  $3 \times 10^7$  CFU/mL (Mitchell, Wu, Jackson, & Wilhelmus, 2007)

เชื้อรา *Alternaria brassicicola* และ *Curvularia lunata* เพาะบนอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5-7 วัน เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในจานอาหาร 10 mL ใช้หวงเขี่ยเชื้อขูดบริเวณผิวหน้าอาหาร กรองด้วยผ้าก๊อชปลอดเชื้อเพื่อแยกเส้นใยที่ติดมาออก ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์มานับจำนวนสปอร์ด้วย Haemocytometer และเจือจางสปอร์ด้วยอาหารเหลว minimal medium ให้ได้ระดับความเข้มข้นของสปอร์เป็น  $10^5$  spore/mL

เชื้อรา *Magnaporthe grisea* เพาะบนอาหารแข็ง Rice Polished Agar (RPA; 20 g of polished rice, 2.0 g of yeast extract, 15 g of Bacto agar and 1000 mL of distilled water) บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7-10 วัน เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในจานอาหาร 10 mL ใช้หวงเขี่ยเชื้อขูดบริเวณผิวหน้าอาหาร กรองด้วยผ้าก๊อชปลอดเชื้อเพื่อแยกเส้นใยที่ติดมาออก ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์มานับจำนวนสปอร์ด้วย Haemocytometer และเจือจางสปอร์ด้วยอาหารเหลว minimal medium ให้ได้ระดับความเข้มข้นของสปอร์เป็น  $10^5$  spore/mL

### การวัดฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยวิธี 5,(6) carboxy fluorescein diacetate (CFDA) assay

1. เตรียมสารละลายสารสกัดหยาบของแก่นครีให้มีความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 และ 0  $\mu\text{g/mL}$  ซึ่งละลายอยู่ใน 50 mL Sabouraud dextrose broth หรือ minimal medium ที่มีความเข้มข้นของ DMSO สูดทำยเป็น 1% โดยเริ่มต้นจาก stock solution ของสารสกัด 5000  $\mu\text{g/mL}$  ใน 100% DMSO ดังตารางที่ 3.1



**ตารางที่ 3.1** การเตรียมสารละลายสารสกัดหยาบของแก่นครีในถาดหลุม micro-plate ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ศึกษาผลของความเข้มข้นต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

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%

2. นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมได้จากข้อ 1 บีบลงในถาดหลุมไมโครเพลทปลอดเชื้อชนิด 96 หลุม หลุมละ 50 µL แล้วนำไปบ่มที่ 30°C เป็นระยะเวลา 30 นาที เพื่อปรับอุณหภูมิอาหารให้พร้อมใช้งาน

3. เตรียมสารแขวนลอยของเซลล์ *Candida albicans* และสารแขวนลอยสปอร์ของ *Alternaria brassicicola* *Curvularia lunata* และ *Magnaporthe grisea* ที่ความเข้มข้น  $10^5$  เซลล์ (สปอร์) / mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องก่อนเริ่มทดสอบเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นจึงบีบใส่สารแขวนลอยของเซลล์หรือสปอร์แต่ละชนิดลงในถาดหลุมไมโครเพลทที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ซึ่งจะมีผลให้ปริมาตรสุดท้ายของแต่ละหลุมเป็น 100 µL และความเข้มข้นของสารสกัดและ DMSO ลดลงครึ่งหนึ่ง ให้บันทึกความเข้มข้นของสารสกัดที่จุดนี้เป็นความเข้มข้นสุดท้าย และความเข้มข้น DMSO จะมีค่าเป็น 0.5% (ยกเว้นที่ความเข้มข้นสารสกัด 50 จะมีความเข้มข้น DMSO เป็น 1%) ให้ทำหลุม

ที่ไม่เติมเซลล์หรือสปอร์เพื่อเป็น negative control และใช้ amphotericin B (Sigma, USA) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 12.5, 6.25, 3.125, ... 0.195 µg/mL เป็น positive control

4. ปิดฝาภาชนะหลอดไมโครเพลทและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง

6. เมื่อครบกำหนด 18 ชั่วโมง ให้นำภาชนะหลอดไมโครเพลทออกมาเติมสารละลาย 10 µg/mL 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) จำนวน 100 µL และนำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 นาที

7. นำไปวัดค่าฟลูออเรสเซนซ์ที่ excitation wavelength 485 นาโนเมตร และ emission wavelength 535 นาโนเมตร

4. คำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโต (% inhibition) จากสูตรต่อไปนี้

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

เมื่อกำหนดให้  $\text{FLU}_{\text{test}}$  คือค่าฟลูออเรสเซนซ์ของตัวอย่างชุดทดสอบ (มีการเติมสารสกัด)

$\text{FLU}_{\text{control}}$  คือค่าฟลูออเรสเซนซ์ตัวอย่างชุดควบคุม (ไม่มีการเติมสารสกัด)

5. วาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและค่า (% inhibition) เพื่อคำนวณค่า  $\text{IC}_{50}$  (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เชื้อรามีการเจริญเติบโตเพียง 50%)

**ตัวอย่างขั้นตอนการวัดผลและการคำนวณค่า % inhibition ค่า  $\text{MIC}_{90}$  และค่า  $\text{IC}_{50}$**

1. ภายหลังจากอ่านค่าในเครื่อง microplate reader ทั้งในกรณีวิธีการวัดค่าจากวิธี Resazurin Microplate assay หรือวิธี 5,(6) carboxy fluorescein diacetate บันทึกผลได้ดังตารางที่ 3.2

2. คำนวณ % inhibition ในแต่ละการทดลองที่ ด้วยสูตร

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

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างตารางบันทึกผลของการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดแก่นครีโดยวิธี

Resazurin Microplate assay

ค่าฟลูออเรสเซนซ์	ความเข้มข้นสารสกัดแก่นครี $\mu\text{g/mL}$						
	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 3.3

% inhibition ต่อ เชื้อ A	ความเข้มข้นสารสกัดแก่นครี $\mu\text{g/mL}$					
	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  $\text{MIC}_{90}$  โดยการพิจารณาตารางที่ 3.3 ซึ่งจะพบว่าที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีการยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากกว่า 90% ขึ้นไป อยู่ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 12.5  $\mu\text{g/mL}$  ดังนั้น  $\text{MIC}_{90}$  ของสารสกัดจากแก่นครีที่มีต่อเชื้อ A คือ 12.5  $\mu\text{g/mL}$

4. คำนวณค่า  $\text{IC}_{50}$  โดยการวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นและค่า % inhibition ดังภาพที่ 3.1 ลากเส้นแนวโน้มและสร้างสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น เมื่อแทนค่า y เป็น 50% จะสามารถ

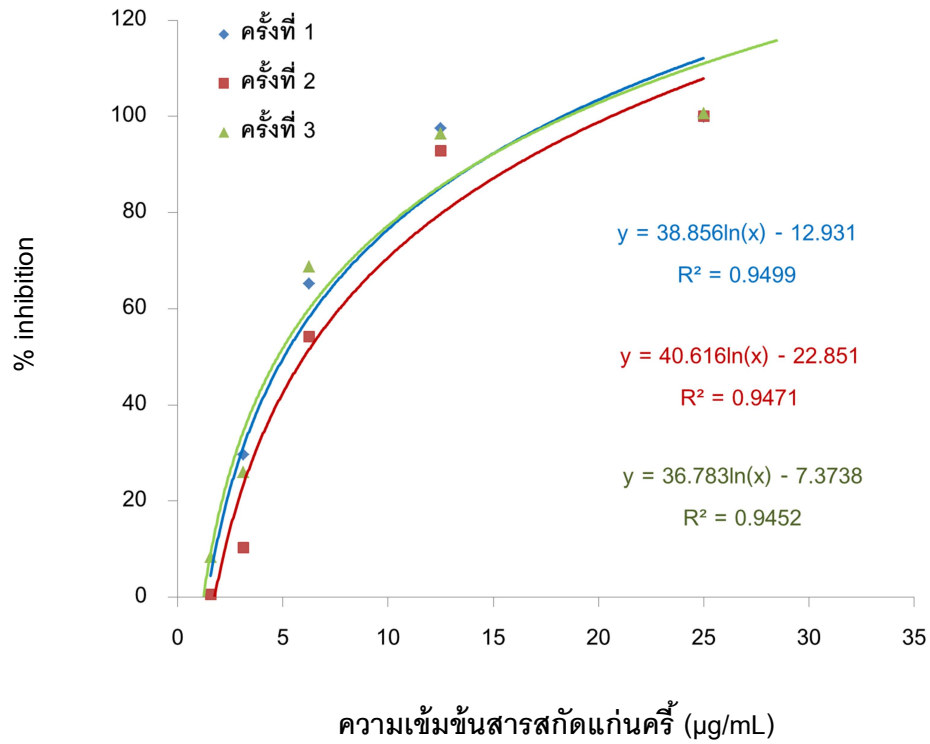
คำนวณหาค่า  $x$  ได้ ซึ่งจะเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 50% ในกรณีนี้จะได้

$$\text{ซ้ำครั้งที่ 1} \quad y = 5.05 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{ซ้ำครั้งที่ 2} \quad y = 6.01 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{ซ้ำครั้งที่ 3} \quad y = 4.76 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

5. ทำการหาค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ครั้ง จะได้ค่าเฉลี่ยของ  $IC_{50}$  ของสารสกัดแก่นครีต่อเชื้อ A เป็น  $5.27 \pm 0.66 \text{ } \mu\text{g/mL}$



ภาพที่ 3.1 กราฟระหว่างความเข้มข้นและค่า % inhibition แสดงสมการ logarithmic และค่าสหสัมพันธ์ ของการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อใช้ในการคำนวณค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดแก่นครีที่มีผลต่อเชื้อ A

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### ผลการวัดฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากแก่นครี

เชื้อราจำนวน 3 สายพันธุ์ที่ก่อโรคในพืชที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ *Magnaporthe grisea* *Curvularia lunata* และ *Alternaria brassicicola* ทำการวัดฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยวิธี 5,(6) carboxy fluorescence diacetate (CFDA) fluorometric detection ซึ่งอาศัยหลักการเติมสาร CFDA ที่เป็นซับสเตรทของเอนไซม์ esterase เซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถเปลี่ยนโครงสร้างซับสเตรทนี้ ให้กลายเป็นสารฟลูออเรสเซนต์และสามารถตรวจวัดได้ และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่ก่อโรคในมนุษย์ 1 สายพันธุ์คือ *Candida albicans* ทำการวัดฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA) ผลของสารสกัดจากแก่นครีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราแสดงดังตารางที่ 4.1-4.4 พบว่าสารสกัดจากแก่นครีมีค่า  $IC_{50}$  ต่อ *M. grisea* คือ  $91.31 \mu\text{g/mL}$  แต่ไม่พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราชนิดอื่นๆ โดยไม่สามารถวิเคราะห์หาค่า  $IC_{50}$  และค่า  $MIC_{90}$  ได้

ตารางที่ 4.1 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครีต่อการยับยั้งเชื้อ *Magnaporthe grisea*

โดยวิธี 5,(6) carboxy fluorescence diacetate (CFDA) fluorometric detection

Experiments	Sample code	Final concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fluorescence unit		% Inhibition	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
			Average	SD	Average		
Negative	Spore+DMSO	0.5% DMSO	3879	283	-	-	-
Positive 1	Amphotericin B	6.25	943	29	94.85	0.380	1.565
		3.13	1007	21	92.76		
		1.565	1061	37	91.02		
		0.781	1820	70	67.09		
		0.391	2555	74	42.79		
		0.195	2769	200	35.88		
Positive 2	Amphotericin B	6.25	944	44	94.80	0.56	3.13
		3.13	1031	49	92.01		
		1.565	1256	38	84.73		
		0.781	1557	22	75.01		
		0.391	2444	222	46.36		
		0.195	3683	279	6.33		
Test	<i>D. parviflora</i> extract	50	2236	95	53.09	91.31	-
		25	3330	203	17.74		
		12.5	3793	212	2.78		
		6.25	3540	111	10.98		
		3.13	3606	185	8.84		
		1.56	4362	256	-15.58		

ตารางที่ 4.2 ผลของสารสกัดยับยั้งจากแก่นครีต่อการยับยั้งเชื้อ *Curvularia lunata* โดยวิธี 5,(6) carboxy fluorescence diacetate (CFDA) fluorometric detection

Experiments	Sample code	Final concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fluorescence unit		% Inhibition	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
			Average	SD	Average		
Negative	Spore+DMSO	0.5% DMSO	2200	212	-	-	
Positive 1	Amphotericin B	12.50	191	14	93.57	0.0017	3.13
		6.25	208	16	92.80		
		3.13	226	10	91.97		
		1.56	304	21	88.35		
		0.78	407	22	83.51		
		0.39	601	34	74.51		
Test	<i>D. parviflora</i> extract	50	2904	225	-32.78	-	-
		25	3355	178	-53.79		
		12.5	3690	170	-69.42		
		6.25	3844	175	-76.60		
		3.13	3900	130	-79.19		
		1.56	3679	181	-68.92		



ตารางที่ 4.3 ผลของสารสกัดยับยั้งจากแก่นครีต่อการยับยั้งเชื้อ *Alternaria brassicicola*

โดยวิธี 5,(6) carboxy fluorecence diacetate (CFDA) fluorometric detection

Experiments	Sample code	Final concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fluorescence unit		% Inhibition	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
			Average	SD	Average		
Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	2288	226	-	-	-
Positive 1	Amphotericin B	6.25	142	26	93.81	0.12	3.13
		3.13	154	18	93.29		
		1.565	264	34	88.46		
		0.781	425	39	81.41		
		0.391	855	76	62.63		
		0.195	1117	72	51.17		
Test	<i>D. parviflora</i> extract	50	1848	140	19.26	-	-
		25	2312	96	-1.04		
		12.5	2347	110	-2.59		
		6.25	2521	167	-10.17		
		3.13	2553	47	-11.57		
		1.56	2807	82	-22.65		

ตารางที่ 4.4 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นครีต่อการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans*

โดยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA)

Experiments	Sample code	Final concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fluorescence unit		% Inhibition	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
			Average	SD	Average		
Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	16055	1696	-	-	-
Positive 1	Amphotericin B	0.400	952	320	94.07	0.060	0.200
		0.200	1304	196	91.88		
		0.100	3114	500	80.61		
		0.0500	8641	1450	46.18		
		0.0250	14016	2074	12.70		
		0.0125	15436	2872	3.85		
Test	<i>D. parviflora</i> extract	50	14571	806	9.25	-	-
		25	14660	1029	8.69		
		12.5	16257	398	-1.26		
		6.25	16927	331	-5.43		
		3.13	16702	345	-4.03		
		1.56	16326	364	-1.69		

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การวิจัยในส่วนของการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นครีในการยับยั้งเชื้อเชื้อรา 4 ชนิด คือ *Magnaporthe grisea*, *Curvularia lunata*, *Candida albicans* และ *Alternaria brassicicola* พบว่าสารสกัดจากแก่นครีไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ ถึงแม้จะสามารถคำนวณหาค่าการยับยั้งเชื้อรา *Magnaporthe grisea* ที่ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) ได้ที่ความเข้มข้น 91.31  $\mu\text{g/mL}$  และหากต้องการให้ยับยั้งได้มากถึง 90% อาจจะต้องใช้สารสกัดที่เข้มข้นสูงกว่านี้ 2-5 เท่า ซึ่งถือว่าเป็นค่าความเข้มข้นที่สูงเกินไปในการประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ยับยั้งเชื้อราและอาจไม่สามารถปฏิบัติได้จริงในด้านการหาตัวทำลายที่เหมาะสม และเมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน Amphotericin B ที่มีค่าการยับยั้งเชื้อรา *M. grisea* ได้ที่ร้อยละ 90 ( $MIC_{90}$ ) โดยใช้ความเข้มข้นเพียง 3.13  $\mu\text{g/mL}$  ทำให้สามารถประเมินได้ว่าสารสกัดจากแก่นครีนั้นไม่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารยับยั้งเชื้อรา ฤทธิ์อ่อนในการต้านเชื้อรา *M. grisea* ของสารสกัดจากแก่นครี สันนิษฐานว่าจะมาจากสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบหลักในแก่นครี อย่างไรก็ตาม แม้ว่าสารสกัดจากแก่นครีจะไม่สามารถกำจัดเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่อาจสามารถนำมาใช้เสริมประสิทธิภาพร่วมกับสารสกัดสมุนไพรอื่นๆ ในการพัฒนาเป็นสารต้านเชื้อราเพื่อป้องกันโรคใบไหม้ในข้าวที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *M. grisea* โดยเคยมีรายงานว่าฟุคซิมิบางชนิดสามารถช่วยเสริมประสิทธิภาพการต้านจุลชีพให้แก่สารต้านจุลชีพหลักได้ดียิ่งขึ้น ทั้งนี้จะต้องมีการศึกษาวิจัยต่อไป

## บรรณานุกรม

- จิราภรณ์ ธนากุลปกรณ์ และอมิรดี ปิลันธนาภคย์. (2555). **ฤทธิ์ยับยั้ง *Alternaria brassicicola* ของราเอนโดไฟท์ TH121 ที่แยกได้จากใบโพทะเล**. Thai Journal of Science and Technology. 1(1). หน้า 33-41.
- จิราภรณ์ สุวรรณชาติรี, นัฐพล คำธร, วีรวรรณ หนูแดง, มณฑล เลิศคนวานิชกุล. (2554). **ฤทธิ์ต้าน *Candida albicans* ของสารสำคัญจากผลยอ**. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด. 23(1). หน้า 7-18.
- จำรัส พูลเกื้อ. (2557). **การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ของเส้นขนมจีนในจังหวัดภูเก็ต**. การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 22 ประจำปี 2557. หัวข้อข่าว "วิจัยพบ 'เส้นขนมจีน' ปนจุลินทรีย์ก่อโรค" สำนักข่าว AEC-News วันที่ 15 กรกฎาคม 2557. เข้าถึงได้จากเว็บไซต์ [www.aecnews.co.th/health/read/259](http://www.aecnews.co.th/health/read/259) สืบค้นวันที่ 1 กรกฎาคม 2558.
- บงกชวรรณ สุตะพาหะ และ บรรยง คันธวะ. **การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดใบผักขาว**. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่. 44(1). หน้า 31-37.
- ศศิธร วุฒิมณีชัย. 2545. **โรคของผักและการควบคุมโรค**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 173 หน้า.
- สกุลศักดิ์ โอฟารกุล. 2540. **โรคของพืชประเภทผักและการควบคุม**. ภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันราชภัฏลำปาง. 542 หน้า.
- 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., Bloor, 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.
- 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., Kanwal, Q., Hussain, I., Latif Siddiqui, H., & Javaid, A. **Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves.** *Nat Prod Res*, 24(20), 1907-1914.
- 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.
- Meragelman, T. L., Tucker, K. D., McCloud, T. G., Cardellina, J. H., & Shoemaker, R.H. (2005). Antifungal flavonoids from *Hildegardia barteri*. *J Nat Prod*, 68(12), 1790-1792.
- Mitchell, B. M., Wu, T. G., Jackson, B. E., & Wilhelmus, K. R. (2007). *Candida albicans* strain-dependent virulence and Rim13p-mediated filamentation in experimental keratomycosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(2), 774-780.
- 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<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-dependent ATPase.** *Biochim Biophys Acta*, 772(3), 295-306.
- Songsiang, U., Wanich, S., Pitchuanom, S., Netsopa, S., Uanporn, K., & Yenjai, C. (2009). **Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*.** *Fitoterapia*, 80(7), 427-431.
- 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.
- Wachter, G. A., Hoffmann, J. J., Furbacher, T., Blake, M. E., & Timmermann, B. N. (1999). **Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*.** *Phytochemistry*, 52(8), 1469-1471.
- 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 พรหมเด่น (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	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ) สาขาชีวเคมี
พ.ศ. 2550	มหาวิทยาลัยรามคำแหง	ศิลปศาสตรบัณฑิต (ศศ.บ) สาขาปรัชญา
พ.ศ. 2551	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์ดุซงู้บัณฑิต (วท.ด) สาขาชีวเคมี

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมการศึกษา)

อณูชีววิทยาและพันธุวิศวกรรมในแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารต้านอนุมูลอิสระ

### ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

พ.ศ. 2553-2555 ผู้ประสานงานหลัก หน่วยปฏิบัติงานวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเทคโนโลยีชีว

ภาพ 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 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, Worrawat 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<sup>+</sup>-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, Chalernpol 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-Eknankul. Structure and Antioxidant Activity Relationships of Isoflavonoids from *Dalbergia parviflora*. *Molecules*, 19, pp. 2226-2237. February, 2014

#### **บทความวิชาการ**

วรวัฒน์ พรหมเด่น. (2556). ชีวเคมีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรีย. *วารสารวิจัย มช.*, 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) เมืองนาโงยา ประเทศญี่ปุ่น
3. พ.ศ. 2553-2554 : ทุนนักวิจัยหลังปริญญากองทุนเพชรดาภิเษกสมโภช 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 มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

เลขที่ 439 ถ.จระ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ 31000

สถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราช

ภัฏรำไพพรรณี เลขที่ 439 ถ.จระ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ 31000

หมายเลขโทรศัพท์เคลื่อนที่ 0817046945

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) tlomarak@gmail.com

### ประวัติการศึกษา

การศึกษา	ระดับการศึกษา	สถานศึกษา
2554	การศึกษาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ศึกษา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
2546	ประกาศนียบัตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวคหุ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2545	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมการศึกษ): การวิจัยทางการสอน  
วิทยาศาสตร์การใช้สื่อออนไลน์สำหรับการสอนวิทยาศาสตร์ และการนิเทศนคศึกษาฝักประสบการณ์  
วิชาชีวคหุ

### 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 (วิทยาศาสตร์ศึกษา)

ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จินดา แต่มบรรจง

กรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. สมสรร วงษ์อยู่น้อย

ดร. ปรีชาญ เดชศรี

แหล่งตีพิมพ์: วารสารศรีนครินทรวิโรฒวิจัยและพัฒนา (สาขามนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์)

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปีที่ 5ฉบับที่ 9 มกราคม-มิถุนายน พ.ศ. 2556



