โครงการย่อยที่ 2

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากแก่นครี้

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

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 53/2558

โครงการย่อยที่ 2
การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากแก่นครี้

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

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 การศึกษาครั้งนี้จึงใช้สารสกัดหยาบจากแก่นครี้ที่สกัดด้วยเมทานอลมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราชนิดต่างๆ 4 สายพันธุ์ (*Alternaria brassicicola*, *Candida albicans*, *Curvularia lunata* และ *Magnaporthe grisea)* การทดสอบใช้เทคนิควิธีทางสเปกโตรฟลูออโรเมตรี ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากแก่นครี้มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Magnaporthe grisea* ได้เพียงเล็กน้อย โดยมีค่า IC_{50} เป็น 91.31 µg/mL ซึ่งยังถือมีประสิทธิภาพต่ำกว่ายาปฏิชีวนะ Amphotericin B ที่ใช้เป็นเป็นชุดการทดลองควบคุมผลบวก ในขณะเดียวกันผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญในเชื้อราชนิดอื่นๆ พบว่าสารสกัดไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้เลยในความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้ในการทดลองนี้ (50 µg/mL)

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านเชื้อรา 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 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 µg/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 µg/mL).

Keywords: Antifungal, 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

คริ้ 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_{90} และ ค่า IC_{50} 17

บทที่ 4

ผลการวิจัย.....21

ผลการวัดฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากแก่นครี้.....21

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....26

บรรณานุกรม.....27

ภาคผนวก.....31

ประวัตินักวิจัย.....32

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1 แผนผังแสดงขอบเขตและขั้นตอนของงานวิจัย.....3

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

ภาพที่ 2.2 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของแก่นคึ้ (วัตถุดิบแห้ง) และเมื่อบดละเอียดเป็นผง 6

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์.....8

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของไอโซฟลาโวนอยด์.....8

ภาพที่ 2.5 *Curvularia lunata* แสดงลักษณะของ conidia.....11

ภาพที่ 2.6 *Magnaporthe grisea* แสดงลักษณะของ Spores.....11

ภาพที่ 2.7 โรคไหม้ในข้าว (Rice blast lesions on plant nodes) จากเชื้อรา *M. grisea* 12

ภาพที่ 2.8 *Candida albicans* แสดงลักษณะ Chlamydospore 12

ภาพที่ 2.9 *Alternaria brassicicola* แสดงลักษณะของ Conidia.....13

ภาพที่ 3.1 กราฟระหว่างความเข้มข้นและค่า % inhibition แสดงสมการ logarithmic และค่าสหสัมพันธ์ ของการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง.....20

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายสารสกัดหยาบของแก่นคริ้ในถาดหลุม micro-plate ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ศึกษาผลของความเข้มข้นต่อการยับยั้งการเจริญของแชื้อรา.....16

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างตารางบันทึกผลของการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดแก่นคริ้ โดยวิธี Resazurin Microplate assay กรณีของ *Bacillus cereus*.....18

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างตารางบันทึกผลการคำนวณค่า % inhibition.....18

ตารางที่ 4.1 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นคริ้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Magnaporthe grisea* โดยวิธี 5,(6) carboxy fluorescence diacetate (CFDA) fluorometric detection.....22

ตารางที่ 4.2 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นคริ้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Curvularia lunata* โดยวิธี 5,(6) carboxy fluorescence diacetate (CFDA) fluorometric detection.....23

ตารางที่ 4.3 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นคริ้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Alternaria brassicicola* โดยวิธี 5,(6) carboxy fluorescence diacetate (CFDA) fluorometric detection.....24

ตารางที่ 4.4 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นคริ้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* โดยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA).....25

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เชื้อราที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคในมนุษย์ สัตว์ และพืช ทั้งนี้ในปัจจุบันมีการใช้สารออกฤทธิ์ฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก เป็นเหตุให้มีการขาดดุลการค้าและสูญเสียงบประมาณของประเทศในด้านสาธารณสุขอย่างมหาศาล ทั้งนี้พบว่าพืชสมุนไพรต่างๆ เป็นแหล่งที่จะสามารถค้นพบสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ และประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิประเทศเขตร้อนชื้นที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ ดังนั้นจึงมีโอกาสสูงที่จะค้นพบสารพฤกษเคมีจากพืชสมุนไพรของไทยที่จะสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อราได้และสามารถนำมาพัฒนาใช้เพื่อทดแทนยาปฏิชีวินะในการรักษาโรคหรือทดแทนการใช้สารเคมีที่ใช้ยับยั้งเชื้อราในด้านการเกษตร ซึ่งจะก่อให้เกิดผลดีในด้านการสร้างนวัตกรรมที่มีรากฐานจากทรัพยากรภายในประเทศและมีความได้เปรียบในเชิงเศรษฐกิจตามมา

ครี้หรือสักขี (*Dalbergia parviflora*) เป็นพืชยืนต้นที่มีแก่นไม้ซึ่งมีการใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาแผลเปื่อยพุพองตามหลักภูมิปัญญาท้องถิ่นแต่ยังมิได้มีการศึกษาในเชิงการทดลองทางวิทยาศาสตร์เพื่อสนับสนุนภูมิปัญญาการใช้สมุนไพร และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบในแก่นครี้พบว่ามีสารประกอบฟลาโวนอยด์มากกว่า 60 ชนิด ในขณะที่มีงานวิจัยอื่นๆ ได้กล่าวถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบฟลาโวนอยด์ไว้อย่างหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และรวมถึงฤทธิ์ในการต้านจุลชีพประเภทแบคทีเรีย เชื่อรา และไวรัส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวโน้มที่จะค้นพบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดแก่นครี้ และการค้นพบนี้อาจจะสามารถนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังบางชนิดหรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดธรรมชาติที่ใช้ต้านการเจริญของแบคทีเรียในอาหารที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสีย รวมทั้งอาจสามารถนำมาประยุกต์ใช้แทนสารเคมีกำจัดโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์บางชนิด ทั้งนี้การส่งเสริมการวิจัยด้านสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นการสร้างความพร้อมทางด้านการผลิตยารักษาโรค เครื่องสำอาง อาหาร รวมถึงยา

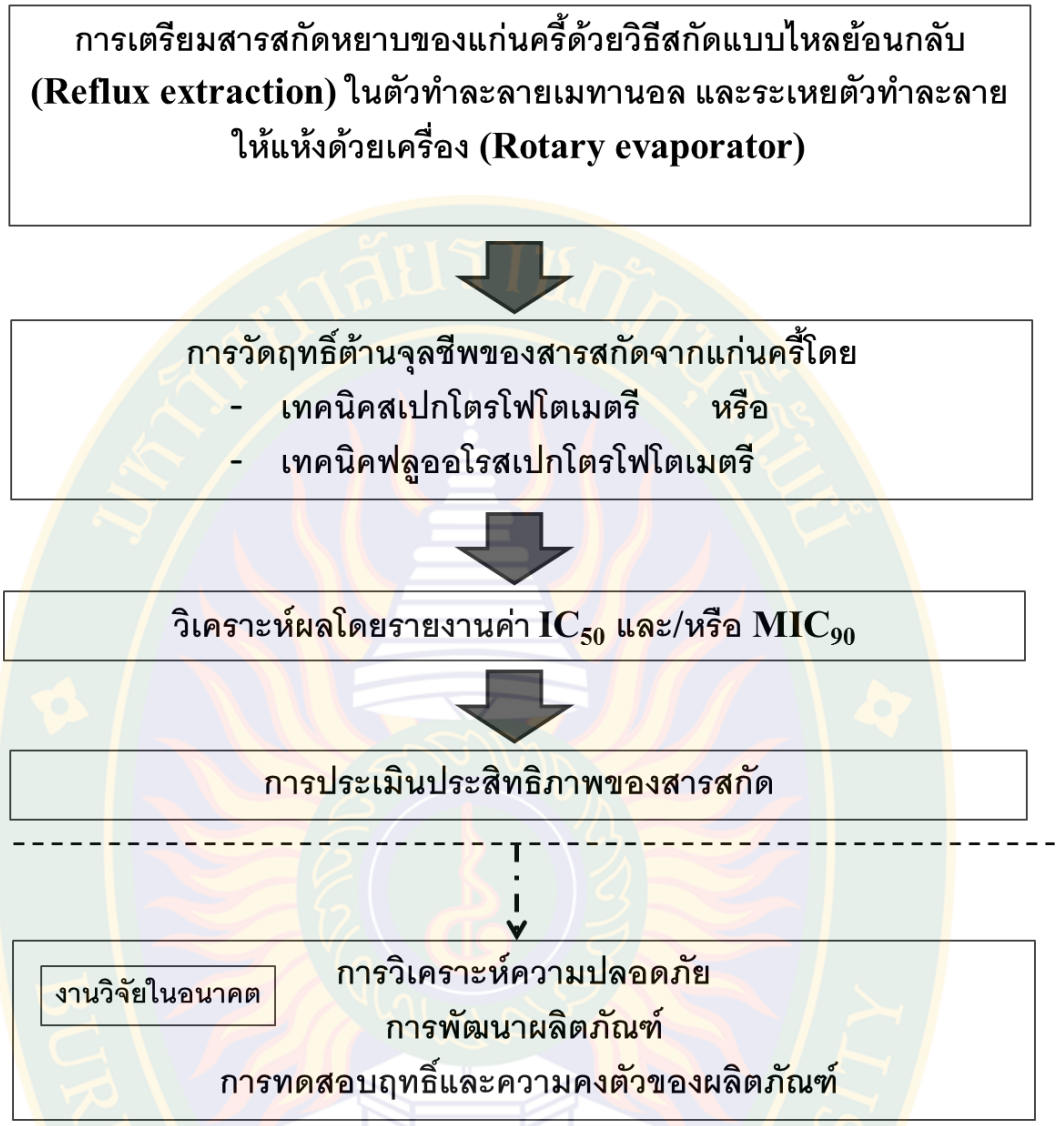
กำจัดโรคพืช และเป็นแผนหนึ่งของการพัฒนานวัตกรรมด้านสมุนไพรไทยให้มีประสิทธิภาพและได้รับการยอมรับมากขึ้น ในทางเศรษฐกิจจะนำไปสู่การลดการนำเข้าของยาปฏิชีวนะหรือสารสังเคราะห์ รวมถึงการส่งเสริมให้มีการอนุรักษ์พืชพรรณสมุนไพร และประชาสัมพันธ์ให้ทราบถึงคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติในท้องถิ่น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราที่สำคัญบางชนิดจากสารสกัดแก่นครี้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาวิจัยภายในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราในระดับหลอดทดลอง โดยยังไม่มีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการใช้เป็นยาหรืออาหาร และการวิจัยนี้ยังไม่มีการทดลองในมนุษย์หรือสัตว์ โดยใช้เทคนิคการติดตามการเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียภายหลังได้รับสารสกัดจากแก่นครี้ด้วยวิธีทางสเปกโตรฟลูออโรเมตรี



ภาพที่ 1.1 แผนผังแสดงขอบเขตและขั้นตอนของงานวิจัย

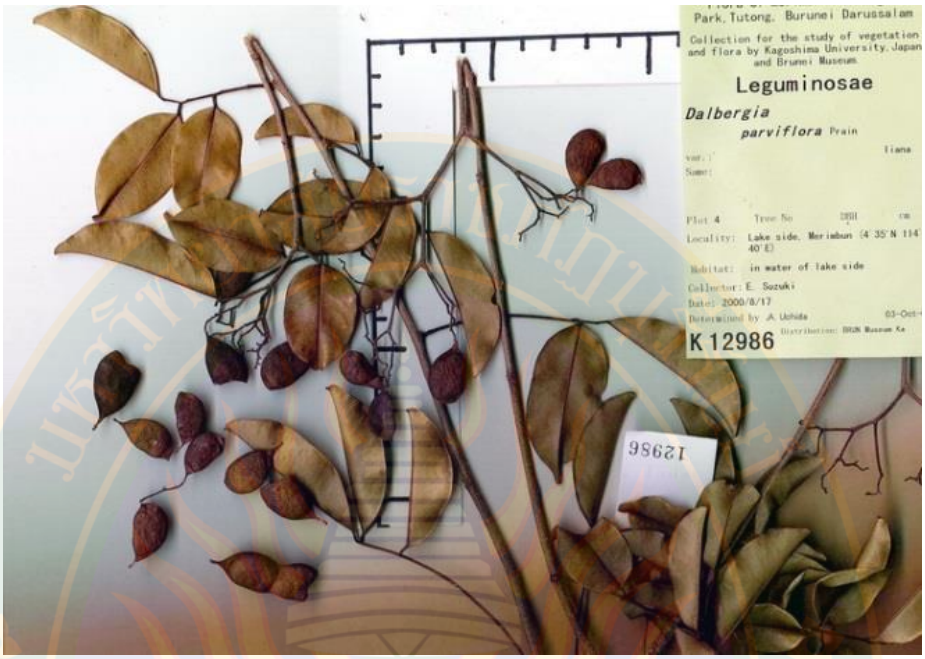
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

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

บทที่ 2
ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรกำลังเป็นที่สนใจโดยเฉพาะการพัฒนาเป็นสารต้านเชื้อราเพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ ตัวอย่างการศึกษาวิจัยในประเทศไทยเกี่ยวกับสารสกัดสมุนไพรที่สามารถต้านเชื้อราได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* ของสารสำคัญจากผลยอ (จีราภรณ์ สุวรรณชาตรี และคณะ 2554.) การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดใบฟักข้าว (บงกชวรรณ สุตะพาหะและบรรยง คันธวะ 2554.) ฤทธิ์ยับยั้ง *Alternaria brassicicola* ของราเอนโดไฟท์ TH121 ที่แยกได้จากใบโพทะเล (จิราภรณ์ ธนากุลปกรณ์ และอภิรดี ปิลันธนภาคย์, 2555) 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) คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากแก่นครี้โดยวิธี 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. แสดงลักษณะของแก่นคริ้ (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)

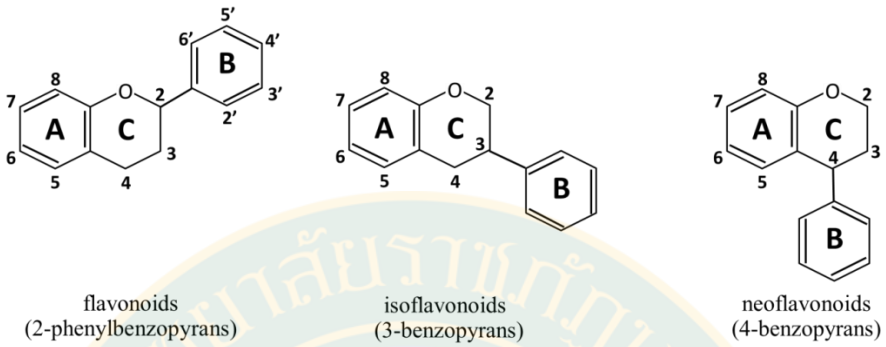
ในเชิงโครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีในธรรมชาติพบว่ามีโครงสร้างหลักเป็น C6-C3-C6 ประกอบกับการมีหมู่แทนที่ (substitution group) ในตำแหน่งต่างๆ ตามระบบการเรียกชื่อ IUPAC สามารถจัดจำแนกฟลาโวนอยด์ได้ดังนี้

1) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) หรือ ไบโอฟลาโวนอยด์ (bioflavonoid)

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

3) นีโอฟลาโวนอยด์ (neoflavonoid) เกิดจากโครงสร้างของ4-phenylcoumarine

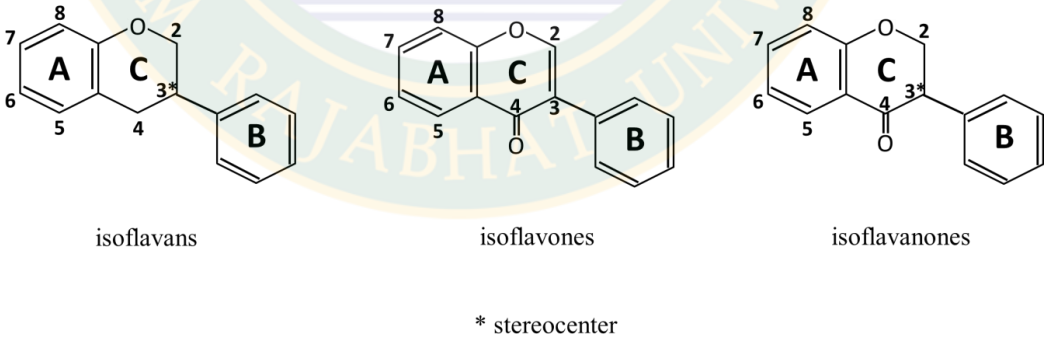
ฟลาโวนอยด์ทั้ง 3 ชนิด เป็นสารประกอบที่มีหมู่คีโทนและมีโครงสร้างวงแหวน 3 วง เป็นโครงหลัก (flavonoid backbone) โดยทั่วไปวงแหวนแต่ละวงจะมีชื่อคือ A B และ C



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)

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

quercetin-3-O-α-glucopyranosyl-(1 □ 2)- β -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) อย่างไรก็ตามฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการต้านเชื้อรายังไม่มีรายงานในสารสกัดจากแก่นครี้ การศึกษาวิจัยนี้จะเป็นการสร้างองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์และสร้างแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราจากสมุนไพร

เชื้อรา (Fungi)

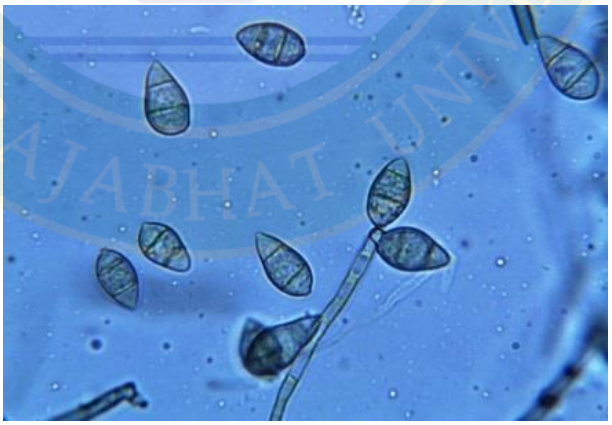
เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในอาณาจักรเห็ดราหรือฟังไจ (Kingdom Fungi) เป็นเซลล์ชนิดยูแคริโอต (eukaryote) พบได้ทั้งที่เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว เส้นใย และ ดอกเห็ด ไม่มีคลอโรฟิลล์ ได้รับสารอาหารจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยจะปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และซับซ้อนจนเป็นโมเลกุลเล็กและดูดซึมเข้าเซลล์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

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



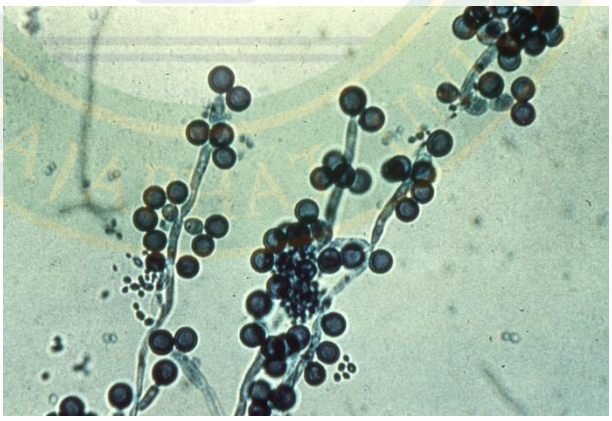
ภาพที่ 2.6 *Magnaporthe grisea* แสดงลักษณะของ Spores

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

ภาพที่ 2.7 โรคไหม้ในข้าว (Rice blast lesions on plant nodes) จา*กเชื้อรา 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 pseudohyphea ทั้งนี้พบว่าเชื้อ *C. albicans* เป็นสาเหตุหลักของโรคติดเชื้อราในมนุษย์ โดยทั่วไปแล้ว *C. albicans* ที่พบในคนปกติที่บริเวณเยื่อบุในช่องปาก 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*** เป็นเชื้อราในจีนัส *Alternaria* วงศ์ *Pleosporaceae* ลักษณะโคโลนีมีสีเขียวมะกอกอมเทาถึงสีน้ำตาลดำ เส้นใยแตกแขนงมีผนังกั้น (septate mycelium) ตอนแรกใสต่อมามีสีน้ำตาลหรือเขียวมะกอกอมเทา ผนังเซลล์เรียบ ความกว้างระหว่างเซลล์ 1.5 – 7.5 ไมครอน สร้างก้านชูสปอร์สีน้ำตาลอ่อน มักเกิดเดี่ยวๆ หรือเกิดเป็นกลุ่ม 2-12 ก้านหรือมากกว่า มีลักษณะตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย รูปร่างเป็นทรงกระบอกที่ปลายมีลักษณะพองออกเล็กน้อย มีผนังกั้นตามขวางขนาดกว้าง 5-8 ไมครอน และอาจยาวถึง 70 ไมครอน สร้าง conidia ต่อกันเป็นลูกโซ่ยาว อาจพบต่อกันถึง 20 conidia บางครั้งลูกโซ่แตกแขนงด้วย conidia มีรูปร่างทรงกระบอก หรือกระบองหัวกลับ เชื้อ *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดดำของพืชตระกูลกะหล่ำจะผลิตสารพิษที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืช (host-specific protein toxin) ชื่อ AB-toxin ซึ่งจะถูกชักนำให้ถูกปลดปล่อยในขณะที่สปอร์ของเชื้อสาเหตุมีการงอก germ tube เข้าสู่พืชอาศัยเท่านั้น โดยจะไม่ถูกผลิตขึ้นใน non-host plant ในจานอาหาร หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ โรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* ก่อให้เกิดโรคแก่พืชผักตระกูลกะหล่ำหลายชนิด เช่น กะหล่ำดอก กะหล่ำดาว กะหล่ำปม กะหล่ำปลี คะน้า บรอคโคลี่ ผักกาดกวางตุ้ง ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวปลี ผักกาดหัว และแรดิช (สกุลศักดิ์, 2540) การแพร่ระบาดจะสร้างความเสียหายมากขึ้นในช่วงที่สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรค เช่น ฝนตกชุก หรือ แปลงที่ให้น้ำมากเกินไป (ศศิธร, 2545) พืชตระกูลกะหล่ำหลายชนิดมีความอ่อนแอต่อโรคใบจุด โดยเชื้อจะสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนทุกระยะการเจริญเติบโต ในระยะกล้าก่อให้เกิดโรคเน่าคอดิน 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 flurorescein 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, Diffco, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ loop ขูดเซลล์ที่อยู่ผิวหน้าวุ้นและกระจายเซลล์ในสารละลาย normal saline ให้ได้ความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน 0.5 McFarland ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์ประมาณ 1-5 x10^6 CFU/mLจากนั้นจึงเจือจางเซลล์ใน Sabouraud dextrose broth ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 1x10^5 CFU/mL โดยใช้การคำนวณจาก factor ค่าความขุ่น 1 unit ที่ OD_{600} จะมีเซลล์ 3x10^7 CFU/mL (Mitchell, Wu, Jackson, & Wilhelmus, 2007)

เชื้อรา *Alternaria brassicicola* และ *Curvularia lunata* เพาะบนอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 5-7 วัน เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในจานอาหาร 10 mL ใช้หว่งเขี่ยชื้อขูดบริเวณผิวหน้าอาหาร กรองด้วยผ้าก๊อซปลอดเชื้อเพื่อแยกเส้นใยที่ติดมาออก ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์มานับจำนวนสปอร์ด้วย Haemacytometer 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 ºC เป็นเวลา 7-10 วัน เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในจานอาหาร 10 mL ใช้หว่งเขี่ยชื้อขูดบริเวณผิวหน้าอาหาร กรองด้วยผ้าก๊อซปลอดเชื้อเพื่อแยกเส้นใยที่ติดมาออก ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์มานับจำนวนสปอร์ด้วย Haemacytometer และเจือจางสปอร์ด้วยอาหารเหลว minimal medium ให้ได้ระดับความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^5 spore/mL

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

1. เตรียมสารละลายสารสกัดหยาบของแก่นคร้ีให้มีความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25 3.13 และ 0 µg/mL ซึ่งละลายอยู่ใน 50 mL Sabouraud dextrose broth หรือ minimal medium ที่มีความเข้มข้นของ DMSO สุดท้ายเป็น 1% โดยเริ่มต้นจาก stock solution ของสารสกัด 5000 µg/mL ใน 100% DMSO ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายสารสกัดหยาบของแก่นครี้ในถาดหลุม 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 ปิเปตลงในถาดหลุมไมโครเพลทปลอดเชื้อชนิด 96 หลุม หลุมละ 50 µL แล้วนำไปบ่มที่ 30ºC 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 จากนั้นจึงปิเปตสารแขวนลอยของเซลล์หรือสปอร์แต่ละชนิดลงในถาดหลุมไมโครเพลทที่เตรียมไว้ในข้อ 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. ปิดฝาถาดหลุมไมโครเพลทและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25ºC เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง

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

7. นำไปวัดค่าฟลูออเรสเซนต์ที่ excitation wavelength 485 นาโนเมตร และ emission wavelength 535 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} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เชื้อรามีการเจริญเติบโตเพียง 50%)

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

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

2. คำนวน % inhibition ในแต่ละการทดลองที่ ด้วยสูตร

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

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างตารางบันทึกผลของการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดแก่นคริ้โดยวิธี Resazurin Microplate assay

ค่าฟลูออเรสเซนต์	ความเข้มข้นสารสกัดแก่นคริ้ 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 3.3

% inhibition ต่อ เชื้อ A	ความเข้มข้นสารสกัดแก่นคริ้ 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 3.3 ซึ่งจะพบว่าที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีการยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากกว่า 90% ขึ้นไป อยู่ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 12.5 µg/mL ดังนั้น MIC_{90} ของสารสกัดจากแก่นคริ้ที่มีต่อเชื้อ A คือ 12.5 µg/mL

4. คำนวณค่า IC_{50} โดยการวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นและค่า % inhibition ดังภาพที่ 3.1 ลากเส้นแนวโน้มและสร้างสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น เมื่อแทนค่า y เป็น 50% จะสามารถ

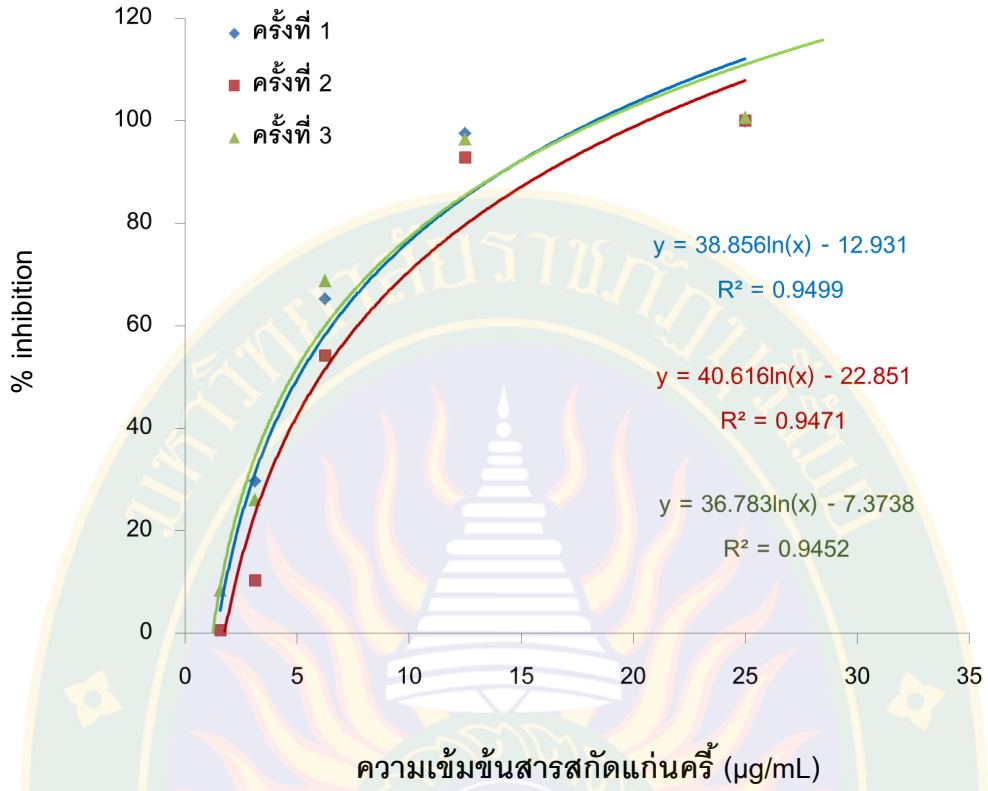
คำนวณหาค่า x ได้ ซึ่งจะเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 50% ในกรณีนี้จะได้

ซ้ำครั้งที่ 1 y = 5.05 µg/mL

ซ้ำครั้งที่ 2 y = 6.01 µg/mL

ซ้ำครั้งที่ 3 y = 4.76 µg/mL

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



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

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการวัดฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากแก่นครี้

เชื้อราจำนวน 3 สายพันธุ์ที่ก่อโรคในพืชที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ *Magnaporthe grisea* *Curvularia lunata* และ *Alternaria brassicicola* ทำการวัดฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยวิธี 5,(6) carboxy fluorescence diacetate (CFDA) fluorometric detection ซึ่งอาศัยหลักการเติมสาร CFDA ที่เป็นซับเสตรทของเอนไซม์ esterase เซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถเปลี่ยนโครงสร้างซับเสตรทนี้ให้กลายเป็นสารฟลูออเรสเซนต์และสามารถตรวจวัดได้ และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่ก่อโรคในมนุษย์ 1 สายพันธุ์คือ *Candida albicans* ทำการวัดฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA) ผลของสารสกัดจากแก่นครี้ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราแสดงดังตารางที่ 4.1-4.4 พบว่าสารสกัดจากแก่นครี้มีค่า IC_{50} ต่อ *M. grisea* คือ 91.31 μg/mL แต่ไม่พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราชนิดอื่นๆ โดยไม่สามารถวิเคราะห์หาค่า IC_{50} และค่า MIC_{90} ได้

ตารางที่ 4.1 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นคริ้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Magnaporthe grisea* โดยวิธี 5,(6) carboxy fluorescence diacetate (CFDA) fluorometric detection

Experiments	Sample code	Final concentration (µg/mL)	Fluorescence unit		% Inhibition	IC_{50} (µg/mL)	MIC_{90} (µg/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	*D. parviflaora* 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 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นคริ้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Curvularia lunata* โดยวิธี 5,(6) carboxy fluorescence diacetate (CFDA) fluorometric detection

Experiments	Sample code	Final concentration (µg/mL)	Fluorescence unit		% Inhibition	IC_{50} (µg/mL)	MIC_{90} (µg/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	*D. parviflaora* 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 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นคริ้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Alternaria brassicicola* โดยวิธี 5,(6) carboxy fluorescence diacetate (CFDA) fluorometric detection

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	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	*D. parviflaora* 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 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นคริ้ต่อการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* 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	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	*D. parviflaora* 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

การวิจัยในส่วนของการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นคร้ีในการยับยั้งเชื้อเชื้อรา 4 ชนิด คือ *Magnaporthe grisea, Curvularia lunata, Candida albicans* และ *Alternaria brassicicola* พบว่าสารสกัดจากแก่นคร้ีไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ ถึงแม้จะสามารถคำนวณหาค่าการยับยั้งเชื้อรา *Magnaporthe grisea* ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ได้ที่ความเข้มข้น 91.31 µg/mL และหากต้องการให้ยับยั้งได้มากถึง 90% อาจจะต้องใช้สารสกัดที่เข้มข้นสูงกว่านี้ 2-5 เท่า ซึ่งถือว่าเป็นค่าความเข้มข้นที่สูงเกินไปในการประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ยับยั้งเชื้อรา และอาจไม่สามารถปฏิบัติได้จริงในด้านการหาตัวทำละลายที่เหมาะสม และเมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน Amphotericin B ที่มีค่าการยับยั้งเชื้อรา *M. grisea* ได้ที่ร้อยละ 90 (MIC_{90}) โดยใช้ความเข้มข้นเพียง 3.13 µg/mL ทำให้สามารถประเมินได้ว่าสารสกัดจากแก่นคร้ีนั้นไม่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารยับยั้งเชื้อรา ฤทธิ์อย่างอ่อนในการต้านเชื้อรา *M. grisea* ของสารสกัดจากแก่นคร้ีสันนิษฐานว่าจะมาจากสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบหลักในแก่นคร้ี อย่างไรก็ตามแม้ว่าสารสกัดจากแก่นคร้ีจะไม่สามารถกำจัดเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่อาจสามารถนำมาใช้เสริมประสิทธิภาพร่วมกับสารสกัดสมุนไพรอื่นๆ ในการพัฒนาเป็นสารต้านเชื้อราเพื่อป้องกันโรคใบไหม้ในข้าวที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *M. grisea* โดยเคยมีรายงานว่าพฤกษเคมีบางชนิดสามารถช่วยเสริมประสิทธิภาพการต้านจุลชีพให้แก่สารต้านจุลชีพหลักได้ดียิ่งขึ้น ทั้งนี้จะต้องมีการศึกษาวิจัยต่อไป

บรรณานุกรม

จิราภรณ์ ธนากุลปกรณ์ และอภิรดี ปิลันธนภาคย์. (2555). **ฤทธิ์ยับยั้ง *Alternaria brassicicola* ของราเอนโดไฟท์ TH121 ที่แยกได้จากใบโพทะเล**. Thai Journal of Science and Technology. 1(1). หน้า 33-41.

จีราภรณ์ สุวรรณชาตรี, นัฐพล คำธร, วีรวรรณ หนูแดง, มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. (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. เข้าถึงได้จากเวบไซต์ www.aecnews.co.th/health/read/259 สืบค้นวันที่ 1กรกฎาคม 2558.

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

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2545. **โรคของผักและการควบคุมโรค**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 173 หน้า.

สกุลศักดิ์ โอฬารกุล. 2540. **โรคของพืชประเภทผักและการควบคุม**. ภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตร และอุตสาหกรรมการเกษตร 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., 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.

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^++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.

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 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 หน่วยปฏิบัติงานวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเทคโนโลยีชีวิภาพ 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

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
BURIRAM RAJABHAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
BURIRAM RAJABHAT UNIVERSITY