

ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดลูปีนิฟอลินจากลำต้นชะเอมเหนือ ต่อเชื้อ *Bacillus cereus*

Antibacterial activity of Lupinifolin, bioactive compound from the stem of *Derris reticulata* Craib., against *Bacillus cereus*

กมล อยู่สุข¹

Kamol Yusook¹

¹อาจารย์ประจำสาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

บทคัดย่อ

ปัจจุบัน การปนเปื้อนในอาหาร มีสาเหตุมาจากเชื้อโรคหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย ไวรัส และ พยาธิต่างๆ เชื้อ *Bacillus cereus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบการปนเปื้อนในอาหารในอัตราสูง และพบบ่อย เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ ทำให้ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อมีอาการท้องเสียและ อาเจียน การรักษา จะใช้ยาต้านเชื้อซึ่งเป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นและนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมาก การคิดค้นยาชนิดใหม่ ที่สกัดได้จากพืชสมุนไพร จึงมีประโยชน์ในการลดปัญหานี้ ดังนั้น การศึกษานี้จึงได้ทำการสกัดหาสารลูปีนิฟอลิน ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ จากลำต้นชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) โดยใช้วิธี Soxhlet extraction ด้วยเฮกเซน และ วิเคราะห์ผลึกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารที่สกัดได้ เพื่อหาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *B. cereus* จากการวิจัยในครั้งนี้พบว่า สารลูปีนิฟอลิน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ทำให้เกิด inhibition zone เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion ทดสอบหาฤทธิ์การต้านเชื้อด้วยวิธี microdilution method มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 8 และ 16 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สังเกตเห็นเซลล์แบคทีเรียมีลักษณะบวม มีการทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* ดังนั้น สารลูปีนิฟอลิน ที่สกัดได้จากลำต้นชะเอมเหนือ สามารถนำไปพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียได้ในอนาคต และยังเป็นการส่งเสริมการแพทย์แผนไทย ด้านการรักษาโรคด้วยพืชสมุนไพรไทย ให้เป็นที่ยอมรับในวงการวิทยาศาสตร์มากขึ้น

คำสำคัญ : ลูปีนิฟอลิน, ชะเอมเหนือ, บาซิลลัส ซีเลียส

Abstract

In present day, food contamination is caused by many pathogens such as bacteria, viruses and parasites. *Bacillus cereus* is bacteria found in contaminated food at a high rate and is a common cause of food poisoning resulting in diarrhea and vomiting. Antibiotics used to treat those symptoms are synthesized from a chemical substance and imported at high costs. Discovery of new medicines extracted from medicinal plants are useful to reduce this problem. This study involves lupinifolin, the

bioactive compound from *Derris reticulata* Craib. stems extracted using soxhlet method with hexane and crystallized to increase the purity of the compound. The study intends to find the effectiveness antibacterial activity of lupinifolin against *B. cereus* in growth of bacteria cultured on MHB agar when compared with ampicillin ($p < 0.05$). The extract showed inhibitory effect against *B. cereus* when tested with disc diffusion method, microdilution method shown with MIC and MBC were 8 and 16 $\mu\text{g/ml}$, respectively. An electron microscope observed bacterial cells and found swelling and destruction of the cell wall or cell membrane. However, the mechanism of action for a specific inhibition with *B. cereus* need for further study.

Keywords : Lupinifolin, *Derris Reticulata* Craib., *Bacillus Cereus*

บทนำ

โรคอาหารเป็นพิษ มีสาเหตุมาจากปัจจัยหลายอย่าง อาจเกิดจากสิ่งปนเปื้อนหรือเชื้อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร *Bacillus cereus* เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่เป็นสาเหตุของโรคนี้ โดยจะทำให้ผู้ที่ได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย เกิดอาการอาเจียนและท้องเสีย อาการอาเจียนมักเกิดจากการได้รับสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้นชนิดที่มีความคงทนเป็นกรด - ด่างสูง มักปรากฏอาการภายหลังจากบริโภคอาหารที่มีสารพิษเข้าไป 30 นาทีถึง 6 ชั่วโมง ต่อมาจะถ่ายอุจจาระเหลว โดยทั่วไปอาการจะทุเลาลงภายใน 24 ชั่วโมง (สำนักโรคติดต่อทั่วไป, 2557)

การรักษาโรคด้วยพืชสมุนไพร เป็นภูมิปัญญาของชาวบ้านทั่วทุกท้องถิ่น โดยเฉพาะในประเทศไทยมีพืชสมุนไพรหลายชนิดทั้งที่หาได้ทั่วไปตามบ้านและหาได้ยาก เพราะอาจอยู่ในป่าลึก แต่มีคุณสมบัติทางด้านการแพทย์แผนไทย ที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อต่างๆ ได้หลายชนิด ชะเอมเหนือ(*Derris reticulata* Craib.) เป็นพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส แบคทีเรีย และ มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Kumkrai, Kamonwannasit, and Chudapongse, 2014) สารที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในพืชเหล่านี้ ส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มฟลาโวนอยด์ อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบหาสารที่เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในพืชสมุนไพรยังเป็นสิ่งสำคัญ นำไปสู่การพัฒนาและวิจัยเพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ ทำให้มีการยอมรับและเพิ่มความปลอดภัยต่อมนุษย์มากขึ้น ดังนั้น การวิจัยเรื่องนี้ จึงได้ทำการศึกษาสารลูปีนิฟอลิน ที่สกัดได้จากลำต้นชะเอมเหนือ เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus cereus* สาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ ที่พบได้บ่อยในปัจจุบัน ผลของการศึกษาสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาด้านเชื้อแบคทีเรียได้ในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารลูปีนิฟอลิน สกัดจากลำต้นชะเอมเหนือต่อการต้านเชื้อ *Bacillus cereus*

วรรณกรรมและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียที่พบในดิน สามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษ อาการที่พบบ่อยคือ อาเจียน และท้องเสีย ลักษณะและรูปร่าง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง (rod) เจริญได้ดีทั้งในสภาพมีและไม่มีออกซิเจน ส่วนใหญ่การปนเปื้อนมักเกิดจากสปอร์ปนเปื้อนลงไปในอาหารที่ได้รับการปรุงไม่เหมาะสม เมื่อสปอร์เจริญเป็น vegetative cell จะสร้างสารพิษ (enterotoxin) และทำให้เกิดโรคเมื่อบริโภคอาหารนั้นเข้าไป ปริมาณที่ก่อโรคได้คือ มากกว่า 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร สิ่งแวดล้อมอื่นที่พบเชื้อมากนอกจากดิน ได้แก่ อากาศ ฝุ่น สารพิษ enterotoxin เป็นสารพิษประเภทโปรตีน ที่ถูกสร้างโดยจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กตอนล่าง มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เยื่อพวงลำไส้ ส่วนใหญ่เป็นสารพิษที่ขับออกมาโดยแบคทีเรียที่ไปทำให้เกิดรูพรุนในเซลล์เมมเบรน มีผลทำให้เซลล์ตาย หลังจากเซลล์พวงลำไส้เล็กตายของเหลวต่างๆ จึงไหลออกมา ทำให้เกิดอาการท้องร่วง ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สร้าง enterotoxin ได้แก่ *E. coli* 0157:H7, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Rota virus* และ *Yersinia enterocolitica* สารพิษที่สร้างโดย *B. cereus* มีสองชนิดคือ ชนิดที่ทำให้ท้องร่วง (diarrhea toxin) ซึ่งเป็น enterotoxin และชนิดที่ทำให้อาเจียน (emetic toxin)

ชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) เป็นพืชในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ เป็นไม้เลื้อย สรรพคุณทางแพทย์แผนไทยใช้แก้ไอและขับเสมหะ พบได้ทุกภาคของประเทศไทย การศึกษาหาสารที่เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ พบว่า มีสารฟลาโวนิน ที่มีชื่อว่า ลูบินิฟอลิน (Mahidol et al, 1997) เป็นที่ทราบกันแพร่หลายว่า สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์สำคัญในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส ต้านสารอนุมูลอิสระ ต้านการเกิดบาดแผล ต้านการเกิดพิษในตับ และต้านการอักเสบ (Cushnie and Lamp, 2005) ดังนั้น หากนำสารที่เป็นส่วนประกอบหลักในชะเอมเหนือมาทำการศึกษา การต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคอาหารเป็นพิษ จะสามารถเป็นประโยชน์ในการพัฒนาพืชสมุนไพรที่หาได้ง่ายตามท้องถิ่น มาเป็นยารักษาโรคทดแทนการใช้ยาที่ผลิตจากสารเคมี ได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างลำต้นชะเอมเหนือ

นำลำต้นของชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ลำต้นที่อบแล้วเก็บไว้ในที่แห้ง ไม่มีความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลอง

2. การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารลูบินิฟอลิน

ลำต้นชะเอมเหนือที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก นำมาสกัดด้วย เฮกเซน โดยใช้ Soxhlet extractor หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้นำมาล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง นำส่วนบนที่เป็นชั้นของ Hexane แยกออกมา แล้วทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Crystallization และ วิธี Thin layer chromatography บนแผ่น Silica gel G₆₀ F₂₅₄ อะลูมิเนียม โดยใช้ Dichloromethane : Methanol ในอัตราส่วน 95 : 5 (สมิตา วิเศษสุทธิชัย, สุภาพ เทชะมาหามณีนรัตน์, วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ และ นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2548) เพื่อทดสอบหาความบริสุทธิ์ของลูบินิฟอลิน

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

3.1 วิธี Disc diffusion

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคือ *Bacillus cereus* (TISTR 687) โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Mueller-Hinton Broth (MHB) บ่มเชื้อให้เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (CLSI, 2012) แล้วนำมาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85 % NaCl เทียบความขุ่นกับ 0.5 McFarland เพื่อให้ได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^8 cfu/ml หลังจากนั้น ป้ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Agar (MHA) วางแผ่นกระดาษกรอง What man No.1 ขนาด 6 มิลลิเมตร ที่มีสารลูปินโฟลีน จำนวน 25, 50, และ 75 µg/disc ตามลำดับ ใช้ 10% NaOH (1 N) และยาปฏิชีวนะ Ampicillin เป็น Vehicle control และ Positive control ตามลำดับ นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาด Inhibition zones รอบแผ่นกระดาษกรองแล้วบันทึกผล ทำการทดลอง 3 ครั้ง

3.2 วิธี Minimum inhibition concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC)

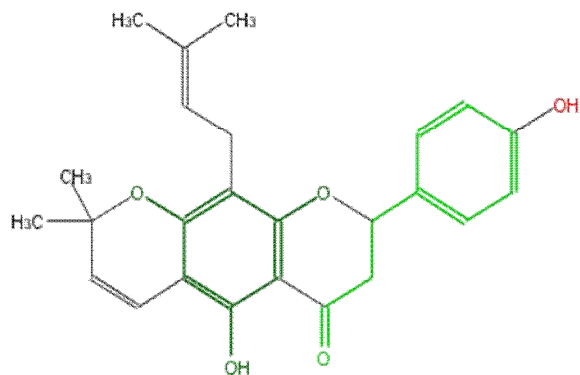
ทำการทดสอบด้วยวิธี microdilution method ใน หลุมเพาะเลี้ยงเชื้อ 96 well plate (Joycharat et al., 2013) ละลายสารลูปินโฟลีน ใน 10% NaOH (1 N) แล้วเติมลงในหลุมเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ให้มีความเข้มข้นของสารลูปินโฟลีนตั้งแต่ 0.25-512 µg/ml ด้วยวิธี two-fold serial dilutions หลังจากนั้นเติมเชื้อ *Bacillus cereus* ให้มีจำนวนเชื้อสุดท้ายในหลุมทดลองเท่ากับ 5×10^5 cfu/ml การทดลองด้วยวิธีนี้ใช้ยาปฏิชีวนะ Ampicillin, 0.5% NaOH (1 N) และ หลุมที่ไม่ใส่สารลูปินโฟลีน เป็น positive, vehicle control และ negative control ตามลำดับ นำ หลุมเพาะเลี้ยงเชื้อ 96 well plate ไป บ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย หรือ ไม่เกิดความขุ่น วิเคราะห์ค่า MBC ด้วยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อจากหลุมที่ไม่เกิดความขุ่นไปเพาะเลี้ยงเชื้อบน MHA แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่เห็นเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโต จะเป็นค่า MBC การทดลองทุกวิธีจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน หรือ Transmission electron microscope (TEM) มีประโยชน์ในการศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อแบคทีเรียแบบตัดขวาง สามารถมองเห็นองค์ประกอบที่เปลี่ยนแปลงหลังได้รับสารลูปินโฟลีน ได้แก่ cell wall, cell membrane และ ลักษณะโครงสร้างภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย (Ghosh, Indukuri, Bondalapati, Saikia, and Rangan, 2013) ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบกับสารตัวอย่างแล้วจะล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer (PBS, pH 7.2) ทำการ fixed ตัวอย่างด้วย 0.25% glutaraldehyde ล้างด้วย 0.1 M PBS อีกครั้ง แล้ว fixed ด้วย 1% osmium tetroxide หลังจากนั้น dehydrate ด้วย acetone จากความเข้มข้น 20 %-100 % นำตัวอย่างไปแทนที่ด้วย Spurr's resin เพื่อเก็บตัวอย่างให้อยู่ในแท่งพลาสติก นำไปตัด section ด้วยเครื่อง ultramicrotome ให้ตัวอย่างอยู่บนแผ่น copper grids ย้อมสีด้วย 2% uranyl acetate และ lead citrate แล้วตรวจตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพื่อดูลักษณะของเซลล์แบคทีเรีย

ผลการวิจัย

จากการสกัดลำต้นชะเอมเหนือ เพื่อหาสารลูปินโฟลิน ด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย และวิธีการ Crystallization จะได้ ผลึกสีเหลืองรูปเข็ม (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของสารชนิดนี้ ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้น ด้วยวิธี TLC (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 ผลึกสีเหลืองรูปเข็ม และ รูปโครงสร้างทางเคมี ของสารลูปินโฟลิน



รูปที่ 2 ผล TLC บนแผ่นกระดาษ Silica gel G₆₀ F₂₅₄ อะลูมิเนียม ภายใต้อาสง UV

ผลการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Disc diffusion วัดค่า inhibition zone ได้ผลดังตารางที่ 1 พบว่า สารลูปินโฟลิน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus*

ตารางที่ 1. Antibacterial activity of Lupinifolin

Microorganism	Diameter of inhibitions zone (mm)			Ampicillin (μg)
	Lupinifolin (μg)			
	25	50	75	
<i>Bacillus cereus</i>	10 ± 1.1*	13 ± 0.6	25 ± 0.6*	13 ± 0.6*

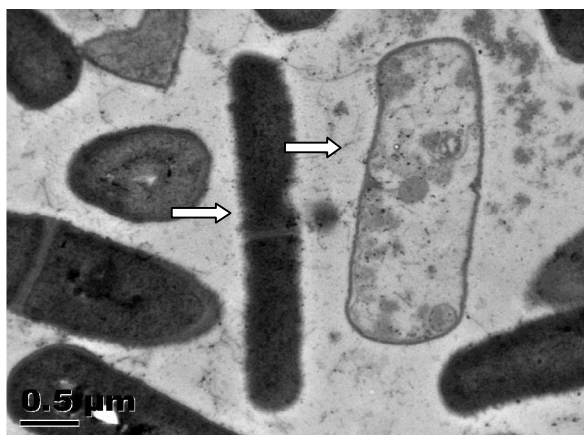
(n=3, * = $p < 0.05$)

เมื่อทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อด้วยวิธี MIC และ MBC ด้วยวิธี microdilution method ได้ค่าเท่ากับ 8 μg/ml และ 16 μg/ml ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of lupinifolin from *D.reticulata* against gram positive bacteria compared with ampicillin.

Microorganisms	Lupinifolin		Ampicillin	
	MIC (μg/ml)	MBC (μg/ml)	MIC (μg/ml)	MBC (μg/ml)
<i>B.cereus</i>	8	16	8	16

(n=3, $p > 0.05$)



รูปที่ 3 เชื้อ *B. cereus* หลังจากเติมสารลูปีนโฟลีน มีลักษณะบวมและ บางเซลล์มีขนาดเล็กลง

ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า เซลล์ของ *B.cereus* ที่เติมสารสารลูปีนโฟลีน มีลักษณะเปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับเซลล์แบคทีเรียปกติที่ไม่ได้เติมสารสกัด โดยลักษณะที่สังเกตเห็น มีรูปร่างบวม และ บางเซลล์จะติดสีเข้ม อาจเกิดจาก ผนังเซลล์ และ ผนังเซลล์อาจถูกทำลาย

สรุปและวิจารณ์ผล

การสกัดหาสารลูปินิฟอลิน จากลำต้นชะเอมเหนือ (*D. reticulata* Craib.) พบว่า สารที่สกัดได้มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสี่เหลี่ยม ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารชนิดนี้ สอดคล้องกับการสกัดหาสารลูปินิฟอลินในลำต้นชะเอม *Myriopterion extensum* (Wight) K. Schum. ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* เช่นกัน (Soonthornchareonnon et al., 2004) ในการศึกษาที่ผ่านมา สารลูปินิฟอลิน จัดเป็นสารประเภทฟลาโวนอยด์ จัดอยู่ในกลุ่ม ฟลาโวนิน ซึ่งพบมากในพืชสมุนไพร และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เมื่อนำสารชนิดนี้ มาทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ผลการวิจัย พบว่า ลูปินิฟอลินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยทำให้เกิด inhibition zones บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB เมื่อเปรียบเทียบกับยา Ampicillin มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งเหมือนกับการศึกษาฤทธิ์ของลูปินิฟอลินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจาก *Eriosema chinense* (Prasad et al., 2013) หลังจากนั้น ทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี microdilution method ได้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 8 และ 16 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับยา Ampicillin พบว่า ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์แบคทีเรีย ที่เติมสารสกัดลูปินิฟอลิน มีลักษณะบวม และสังเกตเห็นการถูกทำลายบริเวณ cell wall หรืออาจทำลายที่ cytoplasmic membrane เมื่อเทียบกับเซลล์แบคทีเรียในกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียที่เฉพาะเจาะจง ของสารสกัดชนิดนี้ ยังต้องมีการศึกษาวิจัยในอนาคต เพื่อพัฒนาในการคิดค้นยาต้านเชื้อชนิดใหม่ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่จัดสรรทุนสนับสนุนงานวิจัย ประเภทงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 ในครั้งนี้ ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความรู้และอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการด้านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เอกสารอ้างอิง

- สมिता วิเศษสุทธิชัย, สุภาพ เตชะมхамณรัตน์, วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ และ นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2548). การพัฒนาเจลสารสกัดชะเอมเหนือเป็นยาต้านริณ. **วารสารสมุนไพร**. 12 : 11-22.
- สำนักโรคติดต่อทั่วไป. (2557). กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
- 3.Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard. Clinical and Laboratory Standards Institute document M07-A8. pp 16-18.
- Cushnie, T.P., and Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 26: 343-356.

- Ghosh, S., Indukuri, K., Bondalapati, S., Saikia, A.K., and Rangan, L. (2013). Unveiling the mode of action of antibacterial labdane diterpenes from *Alpinia nigra* (Gaertn.) B. L. Burtt seeds. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 66: 101-105.
- Joycharat, N., Thammavong, S., Limsuwan, S., Homlaead, S., Voravuthikunchai, S.P., Yingyongnarongkul, B.E., Dej-Adisai, S., and Subhadhirasakul, S. (2013). Antibacterial substances from *Albizia myriophylla* wood against cariogenic *Streptococcus mutans*. **Archives of Pharmacal Research**. 36: 723-730.
- Kumkrai, P., Kamonwannasit, S., and Chudapongse, N. (2014). Cytoprotective and anti-diabetic effects of *Derris reticulata* aqueous extract. **Journal of Physiology and Biochemistry**. 70: 675-684.
- Mahidol, C., Prawat, H., Ruchirawat, S., Lihkitwitayawuid, K., Lin, L.-Z., and Cordell, G.A. (1997). Prenylated flavanones from *Derris reticulata*. **Phytochemistry**. 45: 825-829.
- Prasad, S.K., D. Laloo, M. Kumar, and S. Hemalatha. 2013. Antidiarrhoeal evaluation of root extract, its bioactive fraction, and lupinifolin isolated from *Eriosema chinense*. *Planta medica* 79:1620-1627.
- Soonthornchareonnon, N., L. Ubonopas, S. Kaewsuwan, and M. Wuttiudomlert. 2004. Lupinifolin, a bioactive flavanone from *Myriopterion extensum* (Wight) K. Schum. stem. *Thai Journal of Phytopharmacy* 11:19-27.