



รายงานการวิจัย
เรื่อง
การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์
ในดินเปรี้ยวและดินอินทรีย์ ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส

โดย

ผศ.ดร. สุกัญญา เดชอดิคุ้ม
ผศ. ดร. จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์
ผศ. ดร. สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์
รศ. ดร. สุกัญญา ติวตระกูล

สาขาวิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

และ

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

จากเงินงบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2558-2559

ปี พ.ศ. 2564

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงาน กปร. ปีงบประมาณ 2558-2559 คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์ศึกษากาการพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดนราธิวาส นักวิจัยและเจ้าหน้าที่ในศูนย์ฯ ทุกท่าน รวมทั้งนักวิจัยและเจ้าหน้าที่ที่ศูนย์วิจัยและศึกษาระบบชาติป่าพรุสิรินธร ที่อำนวยความสะดวกและให้ความอนุเคราะห์ในการเข้าพื้นที่เก็บตัวอย่าง สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ช่วยติดต่อประสานงานและอำนวยความสะดวกในการเข้าพื้นที่ มา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณ สาขาวิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในการสนับสนุนพื้นที่และอุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ในการทำวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนขอบคุณ นักศึกษาปริญญาโท นางสาวนริศร แก้วชุติมา และ นางสาวนัชรีน บาซอ และนักศึกษาปริญญาเอก นายเสถียรพงษ์ ภูผา ขณะนั้น ที่เป็นผู้ช่วยวิจัยในโครงการนี้

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2564

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 104 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดจากเชื้อ *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Gongronella* sp., *Penicillium* sp. จำนวน 4, 12, 2 และ 83 ตัวอย่าง ตามลำดับ และอีก 3 ตัวอย่างที่ ขณะนี้ยังไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อราได้ (unidentified) ว่าเป็นเชื้อชนิดใด โดยนำตัวอย่าง ทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 5 อย่าง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (รักษาความผิดปกติของเม็ดสี) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (รักษาเบาหวาน) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลโคลินเอสเตอเรส (รักษาโรคสมองเสื่อม, Alzheimer's disease) ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (รักษาโรคมะเร็ง) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (รักษาอาการอักเสบต่างๆ)

จากผลการทดลอง พบว่ามี 3 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากเชื้อ *Penicillium* sp. มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส > 50% ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml) ได้แก่ SPSF0318BE, SPSF0318CE และ SPSF045BE (สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ ปวกหาด (water extract of *Artocarpus lakoocha*) และ kojic acid โดยมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 98.82 ± 3.97 และ $75.46 \pm 1.80\%$ ตามลำดับ)

และพบ 1 ตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลโคลินเอสเตอเรสที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลโคลินเอสเตอเรส > 80% ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml) ได้แก่ SPSF013BE (*Trichoderma* sp.) (สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ Galantamine มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลโคลินเอสเตอเรส $97.69 \pm 0.95\%$)

พบ 14 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ดี (มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ที่ความเข้มข้น 25 µg/ml > 80%) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดเชื้อรากลุ่ม *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. และ *Trichoderma* sp. จำนวน 10, 3 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่าง ที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Human gingival fibroblast (HGF)) พบว่าทุกตัวอย่าง มีพิษต่อเซลล์ปกติมากกว่า 20% (สารมาตรฐานในการทดสอบนี้ คือ Camptothecin โดยมีพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม เท่ากับ $94.01 \pm 0.17\%$ และพิษต่อเซลล์ปกติ (HGF) $73.14 \pm 3.63\%$)

สำหรับฤทธิ์ต้านการอักเสบ ผลการทดสอบพบ 39 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี (ยับยั้งการหลั่ง nitric oxide จาก macrophage cell (RAW 264.7) ที่ความเข้มข้น 25 µg/ml > 60%) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อรากลุ่ม *Penicillium* sp. และ *Aspergillus* sp. จำนวน 34 และ 5 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยมี 18 ตัวอย่าง ที่มีพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบมากกว่า 20% ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ใช้ Indomethacin เป็นสารมาตรฐาน โดยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ $61.08 \pm 0.68 \%$ และมีพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ $25.42 \pm 2.99 \%$

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบ 62 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml > 70%) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อรา กลุ่ม *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. และ *Gongronella* sp. จำนวน 54, 4, 2 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ใช้ Acarbose เป็นสารมาตรฐาน โดยมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส $86.87 \pm 0.66\%$

จากผลการทดลองทั้งหมด พบว่ามี 4 ตัวอย่างที่น่าสนใจ คือ SPSF318BE, SPSF318CE, SPSF224BE และ SPSF224CE โดยตัวอย่างทั้ง 4 ตัว มาจากเชื้อ 2 ชนิด คือ SPSF318 และ SPSF224 ซึ่งเชื้อราทั้งสองเป็นเชื้อราสกุล *Penicillium* sp. เหมือนกัน โดยเชื้อราทั้งสอง แยกเป็น 2 ตัวอย่าง คือ ส่วนที่เป็นสารสกัดชั้น ethyl acetate ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth, BE) และ ส่วนของสารสกัดชั้น ethyl acetate ของเซลล์ (cell, CE)

เนื่องจากตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Penicillium* sp. (SPSF318) มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาเพื่อหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเอนไซม์ดังกล่าว ค่อนข้างหาได้ยาก นอกจากนั้น ตัวอย่างจากส่วนของสารสกัดชั้น ethyl acetate ของเซลล์ (SPSF318CE) ยังมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านการอักเสบ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ดังนั้น *Penicillium* sp. (SPSF318) จึงน่าสนใจในการนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compound) ต่อไป

นอกจากนั้นยังมีสารตัวอย่างที่น่าสนใจอีก 2 ตัวอย่าง คือ SPSF224BE และ SPSF224CE เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ดี และตัวอย่างทั้งสองได้จากเชื้อเดียวกัน คือ *Penicillium* sp. (SPSF224) และตัวอย่างทั้งสองยังมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านการอักเสบ โดยไม่เป็นพิษกับเซลล์ที่ใช้ทดสอบ นอกจากนั้น SPSF224CE ยังมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมปานกลาง โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ดังนั้น *Penicillium* sp. (SPSF224) จึงเป็นอีกหนึ่งตัวอย่างที่น่าสนใจ ในการนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compound) ต่อไป

เพราะฉะนั้นในการศึกษาครั้งนี้เราสามารถพบสารสกัดที่น่าสนใจ จากเชื้อ *Penicillium* sp. 2 ชนิด คือ SPSF318 และ SPSF224 ที่จะนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compounds) ทางชีวภาพในโครงการต่อไป

คำหลัก: ฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอรีนเอสเตอเรส ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ฤทธิ์ต้านการอักเสบ เชื้อรา พรุโตะแดง ดินอินทรีย์

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อและคำหลัก	ii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญรูป	vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	vii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การทบทวนวรรณกรรม	3
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	14
ผลและวิจารณ์ผล	27
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	46
ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย	50
ภาคผนวก	65

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากเชื้อรา	6
2	สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลโคซิเดสที่ได้จากเชื้อรา	9
3	ตัวอย่างสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง	27
4	ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง	33

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	Pathway of melanin biosynthesis in mammalian	4
2	โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทซิเนสที่แยกได้จากเชื้อรา	7
3	ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส	12
4	การเลี้ยงและสกัดเชื้อรา	16
5	ขั้นตอนการเกิด dopachrome	17
6	แสดงปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสาร <i>p</i> -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside ด้วยเอนไซม์ α -glucosidase ไปเป็นผลิตภัณฑ์ <i>p</i> -nitrophenol ที่มีสีเหลืองใส และน้ำตาล glucose	19

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

μl	=	Microliter
AChE	=	Acetylcholinesterase
BE	=	Broth ethyl acetate
BSA	=	Bovine serum albumin
BT	=	Broth
CE	=	Cell ethyl acetate
CH	=	Cell hexane
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
EtOAc	=	Ethyl acetate
IC ₅₀	=	The half-maximal inhibitory concentration
LPS	=	Lipopolysaccharide (LPS)
M	=	Molar
MCF-7	=	Human breast adenocarcinoma
MeOH	=	Methanol
ml	=	Milliliter
Na ₂ HPO ₄	=	Disodium hydrogen phosphate,
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	=	Sodium dihydrogen phosphate monohydrate,
NaN ₃	=	Sodium azide
PDB	=	Potato Dextrose Broth (อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อราซึ่งเตรียมมาจากมันฝรั่ง)
SRB	=	Sulphorhodamine B assay
TLC	=	Thin layer chromatography
U	=	Unit
UV-Vis	=	Ultraviolet Visible (UV-Vis) Spectroscopy,
V _i	=	Initial velocity (อัตราเร็วเริ่มต้น)

บทนำ

สืบเนื่องจากสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้มีพระราชดำริให้ทำการศึกษา จุลินทรีย์ทนกรดในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส เพื่อให้ทราบชนิดของจุลินทรีย์ที่ทนต่อสภาพความเป็นกรดจัด ซึ่งอาจสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งในด้านการเกษตรและด้านการแพทย์

ทางกรมพัฒนาที่ดินได้ทำการแยก คัดเลือก และศึกษากิจกรรมจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอินทรีย์ และจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ในระดับห้องปฏิบัติการแล้ว และอยู่ ระหว่างการศึกษาในโรงเรือนกระจกและภาคสนาม เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ต่อไป

ทั้งนี้ทางคณะผู้วิจัย ได้นำเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน และนำสารสกัดที่ได้ อย่างน้อย 40 ตัวอย่าง มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น โดยฤทธิ์ทางชีวภาพที่ศึกษา จะเป็นฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ 5 อย่าง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลโคซิเดส ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลินเอสเตอเรส ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาเพื่อนำจุลินทรีย์มาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยอาจเป็นแหล่งผลิตสารที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นยาใหม่ ต่อไปในอนาคตได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสนองพระราชดำริให้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ทนกรดในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นที่น่าสนใจ 5 อย่าง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลโคซิเดส ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลิเนสเตอเรส ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ และ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ของจุลินทรีย์ในดินเปรี้ยวและดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส
3. เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการนำใช้จุลินทรีย์ในดินเปรี้ยวและดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส ในการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางการแพทย์หรือการต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ
4. เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดินเปรี้ยวและดินอินทรีย์ ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส
5. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาหรือเวชสำอางจากจุลินทรีย์ในดินเปรี้ยวและดินอินทรีย์ ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส

การทบทวนวรรณกรรม

ในงานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นที่น่าสนใจ 5 อย่าง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิโกลิเนสเอสเตอเรส ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ และ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ของสารสกัดอย่างน้อย 100 ตัวอย่าง จากจุลินทรีย์ในดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส โดยมุ่งเน้นหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งหาได้ยาก และฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาเป็นยาต้นแบบสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน ที่มีจำนวนสูงขึ้นตลอดเวลา

การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (Study on anti-tyrosinase activity)

Melanin เป็น pigment ที่สำคัญ พบใน แบคทีเรีย รา พืช สัตว์ และคน ถูกหลั่งโดยเซลล์ melanocyte ในชั้นใต้ผิวหนัง ทำหน้าที่ปกป้องผิวจากรังสี UV โดยดูดกลืนแสง UV เอาไว้ ไม่ให้ทำลายผิวหนัง สีของ pigment ที่พบมีตั้งแต่สีเหลืองจนถึงสีดำ ขึ้นกับปริมาณ และการกระจาย ของ melanin โดยที่ melanin นั้นถูกสร้างโดยกระบวนการ melanogenesis ด้วย enzyme tyrosinase ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ขึ้น เปลี่ยนสารตั้งต้นคือ amino acid tyrosine ไปเป็นสารตัวกลาง ที่จะเปลี่ยนไปเป็น melanin ต่อไป หากกระบวนการ melanogenesis เกิดมากเกินไป จะทำให้เกิดภาวะ hyperpigment นำไปสู่ความผิดปกติ เช่น ฝ้า กระ มะเร็งผิวหนัง ซึ่งการรักษาหรือแก้ไขภาวะผิดปกติ ที่เกิดจากการสร้าง melanin มากเกินไป ทำได้โดยการยับยั้งการสร้าง melanin ผ่านการยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ซึ่งมีบทบาทความสำคัญในกระบวนการสร้าง melanin และการยับยั้งเอนไซม์นี้ยังสามารถประยุกต์ใช้เป็น whitening agent ในด้านความสวยความงาม ส่วนในทางการเกษตร อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มคุณภาพผลผลิตทางการเกษตร ในการป้องกันการเกิดรอยคล้ำ (browning) ของพืช ผัก ผลไม้ จากการถูกกระแทกได้ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาเพื่อหา สารที่มีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ tyrosinase (tyrosinase inhibitor) โดยส่วนใหญ่จะสกัดสารจากแหล่งธรรมชาติ เช่น พืช และจุลินทรีย์ต่างๆ หรือ สังเคราะห์สารใหม่ขึ้นมา

Tyrosinase inhibitor ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีและมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น kojic acid และ arbutin โดยทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นสารที่ได้มาจากธรรมชาติ ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ เครื่องสำอาง เพื่อผิวขาวและใช้เป็น positive control ในการทดสอบฤทธิ์การต้านเอนไซม์ tyrosinase (Kim and Uyama, 2005) สารทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ โดย kojic acid เป็นสารที่ได้จากเชื้อรา และนำมาใช้ในเวชสำอาง (Bentley, 2006) ในปัจจุบันมีการค้นคว้า วิจัยหาสารที่เป็น tyrosinase inhibitor กันมากขึ้นเพื่อหาสารที่มีประสิทธิภาพที่ดี ปลอดภัยและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ สำหรับประเทศไทย เครื่องสำอาง หรือยาที่มีคุณสมบัติเป็น whitening agent นั้น เป็นที่ต้องการของตลาดเป็นอย่างมาก ซึ่งสารที่เป็น whitening agent ที่ปลอดภัย และมีคุณภาพดีนั้นมีอยู่ไม่กี่ชนิด ทั้งยังมีราคาแพงอีกด้วย ทำให้มีความสนใจที่จะศึกษาวิจัยหาสารที่เป็น tyrosinase inhibitor จากจุลินทรีย์ในดินเปรี้ยวและดินอินทรีย์ ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส ในการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางการแพทย์หรือการต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ

เนื่องจากในประเทศของเรานั้น มีสมุนไพรอยู่เป็นจำนวนมาก และมีเพียงบางชนิดเท่านั้น ที่ได้ทดสอบฤทธิ์นี้แล้ว เช่น ปวกหาด (Tengamnuay *et al.*, 2006) ซึ่งพบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์

tyrosinase ที่ดี โดยการทดสอบฤทธิ์นี้ในสมุนไพรไทยหรือจุลินทรีย์ จะทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ๆ ขึ้น และหากพบสารที่มีฤทธิ์น่าสนใจ ก็สามารถนำไปพัฒนาประยุกต์ใช้ต่อไปได้

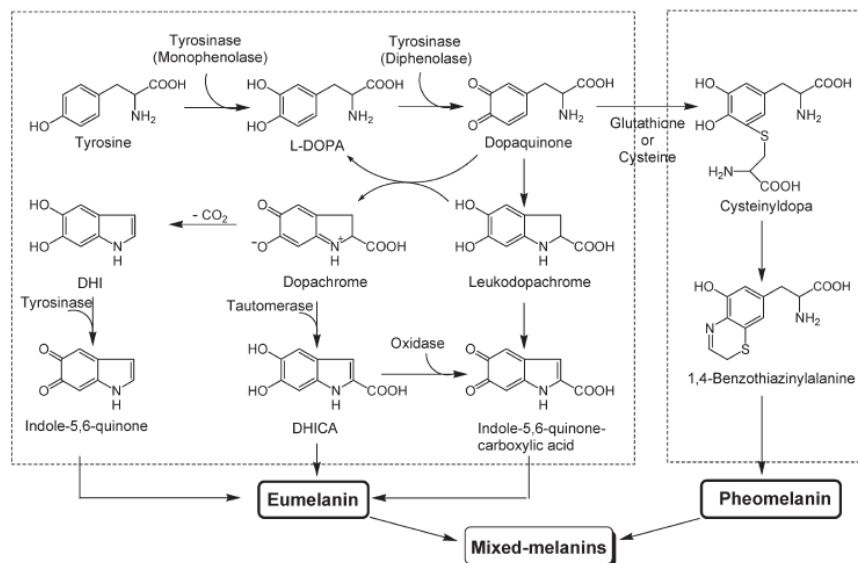
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Melanin เป็นสารสีชนิดหนึ่งที่พบได้มาก สามารถพบได้ในพวกแบคทีเรีย รา พืช และสัตว์ เป็น heterogenous polyphenol-like biopolymer โครงสร้างเป็นสารประกอบมีสีตั้งแต่ สีเหลือง จนถึงสีดำ ชนิดและปริมาณของ melanin ที่ถูกสร้างจากเซลล์ melanocyte ซึ่งกระจายรอบ ๆ เซลล์ keratinocyte จะเป็นตัวกำหนดสีที่แท้จริงของผิวหนัง ลักษณะลายของม้ายลาย ยีราฟและสัตว์ที่มีลายต่างๆ เกิดจากการที่เซลล์ melanocyte กระจายไม่สม่ำเสมอ เช่นเดียวกับสีผิว และสีผมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ซึ่งปัจจัยที่สำคัญที่สุดคือ ปริมาณและการกระจายของ melanin โดยถูกสร้างจากเซลล์ melanocyte ซึ่งกระจายอยู่ในชั้น dermis ของผิวหนัง บทบาทของ melanin คือ ปกป้องผิว จากรังสี UV และกำจัดสารอนุมูลอิสระพวก reactive oxygen species การที่มีการสร้างหรือมีการสะสม melanin มากเกินไปจะทำให้เกิดภาวะผิดปกติเช่น ฝ้า กระ มะเร็งผิวหนัง เป็นต้น การสร้าง melanin นั้น สร้างผ่านกระบวนการ oxidation โดยมี amino acid tyrosine เป็นสารตั้งต้น (Riley, 1993)

Melanin มี 2 ชนิด คือ

Eumelanin: สีดำหรือสีน้ำตาล

Pheomelanin: สีเหลืองหรือสีแดง



รูปที่ 1 Pathway of melanin biosynthesis in mammalian (Riley, 1993)

Pathway ในการสังเคราะห์ eumelanin (ดังรูปที่ 1)

แบ่งเป็น 2 phase คือ proximal และ distal phase ใน proximal phase จะเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ tyrosine หรือ L-DOPA ไปเป็น o-dopaquinone โดยอาศัยเอนไซม์ tyrosinase ซึ่ง o-dopaquinone ที่เกิดขึ้นนี้สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ 2 ทาง คือ

- เกิด intramolecular 1,4 addition คือ amino group ที่เป็น side chain ของ o-dopaquinone เกิด cyclization เข้ากับวง benzene ได้เป็น leukodopachrome ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็น

dopachrome อย่างรวดเร็วโดยอาศัย *o*-dopaquinone ตัวอื่นๆช่วยในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่ง *o*-dopaquinone เหล่านี้จะถูก reduce กลับไปเป็น L-DOPA

- อีกปฏิกิริยาหนึ่ง คือ *o*-dopaquinone จะเกิดปฏิกิริยา water addition ที่วง benzene ได้เป็น 2,4,5-trihydroxyphenylalanine (TOPA) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยา oxidation ไปเป็น *p*-topaquinone ซึ่งก็อาศัย *o*-dopaquinone ตัวอื่นๆในการเกิดปฏิกิริยาเช่นเดียวกัน ซึ่ง *p*-topaquinone นี้จะเกิดปฏิกิริยาต่อไปจนได้เป็น dopachrome

ส่วน distal phase นั้น จะเป็นขั้นตอนที่เกี่ยวกับการเกิดปฏิกิริยาของ dopachrome ซึ่งได้จาก proximal phase โดยจะอาศัยเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์จนได้เป็น eumelanin

Pathway ในการสังเคราะห์ pheomelanin

เกิดจากสารที่มี thiol group เช่น glutathione และ cysteine จับกับ *o*-dopaquinone ได้เป็น cysteinyl-dopa หรือ glutathionyl-dopa ซึ่งจะเกิด cyclization และ polymerization ต่อไปจนได้เป็น pheomelanin (Riley, 1993)

Tyrosinase หรืออาจเรียกว่า phenolase, monophenol oxidase, catechol oxidase เป็นเอนไซม์ที่มี copper อยู่ พบทั่วไปในพืชและสัตว์ มีความสำคัญในกระบวนการสร้าง melanin โดยเร่งปฏิกิริยา 2 อย่างคือ

- hydroxylation ของ tyrosine ได้เป็น 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)
- oxidation ของ 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ไปเป็น *o*-dopaquinone

ในอุตสาหกรรมอาหาร tyrosinase เป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยา oxidation ของสาร กลุ่ม phenolic ในผักผลไม้ไปเป็นสารกลุ่ม quinones เมื่อเซลล์ของพืชถูกทำลาย ทำให้ผัก ผลไม้เกิด เป็นรอยช้ำสีคล้ำและมีกลิ่น ทำให้เสียคุณค่าทางอาหารและเสียมูลค่าทางการค้า นอกจากนี้ tyrosinase ยังมีความสำคัญในการเจริญเติบโตของแมลง ช่วยในเรื่องการพรางตัว การสร้างเปลือกแข็ง ของแมลง การหายใจของแผลและการสร้างแคปซูลของพวกแบคทีเรีย (Kim and Uyama, 2005)

วิธีวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ในปัจจุบันมีหลายวิธีอาทิ เช่น การวัดการใช้ ออกซิเจนขณะเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ enzyme tyrosinase การจับเวลาที่ใช้ใน การกระตุ้นปฏิกิริยา โดยจำกัดปริมาณ enzyme tyrosinase แต่วิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบคือ spectrophotometry ซึ่งเป็นการประเมินการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ที่เหลืออยู่จากการวัดปริมาณ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ dopachrome ซึ่งค่าจากการทดลองจะถูกคำนวณและแสดงเป็น tyrosinase inhibition (%) (Sasaki and Yoshizaki, 2002) หรือ tyrosinase activity (%) (Lee *et al.*, 2002) ซึ่งมีหลักการทดลองเช่นเดียวกัน เพียงแต่คำนวณต่างกัน ดังนี้

Tyrosinase inhibition (%)

แสดงค่าเป็น % ของเอนไซม์ tyrosinase ที่ถูกยับยั้งการทำงาน ซึ่งคำนวณจากปริมาณของเอนไซม์ที่เหลือที่สามารถทำงานได้อยู่ โดยวัดจากปริมาณ dopachrome ที่เกิดขึ้นซึ่งเป็น product จากการเกิดปฏิกิริยาของ L-DOPA หรือ L-tyrosine และมีเอนไซม์ tyrosinase เร่งปฏิกิริยา ดังนั้นหากสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเอนไซม์ จะพบว่า dopachrome ก็ก็จะเกิดขึ้นน้อย ซึ่งวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสง เมื่อคำนวณเป็น % inhibition จะได้ค่า % ที่สูง

Tyrosinase activity (%)

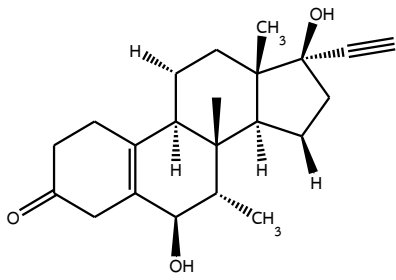
แสดงค่าเป็น % ของเอนไซม์ tyrosinase ที่ยังมี activity อยู่ หากสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ที่ดี ในการยับยั้งเอนไซม์ ค่า tyrosinase activity (%) ที่ได้จะมีค่าน้อย ซึ่งหลักการทดสอบคล้ายกันกับการทดสอบ เพื่อหาค่า tyrosinase inhibition (%)

จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่ามีรายงานสารที่แยกได้จากเชื้อราและมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนส ดังแสดงในตารางที่ 1 และโครงสร้างของสารดังกล่าวแสดงในรูปที่ 2

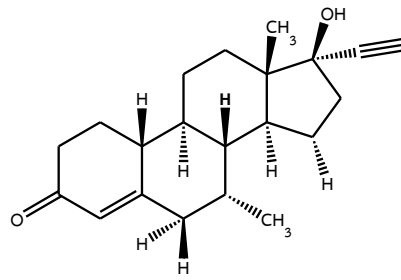
ตารางที่ 1 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากเชื้อรา

Fungus	Compound	IC ₅₀ (μM)*	Reference
<i>Rhizopus stolonifer</i>	6β-Hydroxytibolone [1]	7.45	Choudhary <i>et al.</i> , 2010
	Δ ⁴ -Tibolone [2]	8.19	
<i>Fusarium oxysporum</i>	11α, 15β -Dihydroxytibolone [3]	5.12	
	11α, 15β -Dihydroxy-Δ ⁵ -tibolone [4]	7.10	
<i>Phellinus linteus</i>	Protocatechualdehyde [5]	32.23	Kang <i>et al.</i> , 2004
<i>Phallus indusiatus</i>	5-(Hydroxymethyl)-2-furfural [6]	45.0	Sharma <i>et al.</i> , 2004
<i>Paecilomyces gunnii</i>	Paecilomycones A [7]	0.11	Lu <i>et al.</i> , 2014
	Paecilomycones B [8]	0.17	
	Paecilomycones C [9]	0.14	
<i>Metarhizium sp.</i>	2-Hydroxytyrosol [10]	13.0	Uchida <i>et al.</i> , 2014

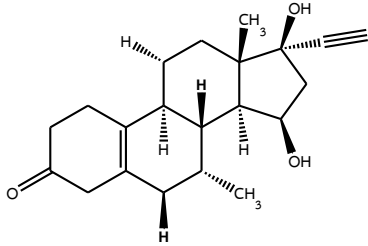
* IC₅₀ = The half-maximal inhibitory concentration



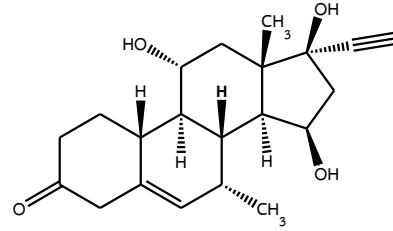
6β-Hydroxytibolone [1]



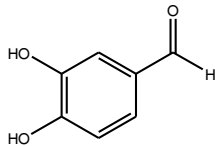
Δ⁴-Tibolone [2]



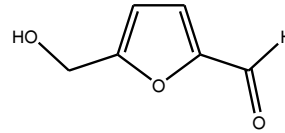
11α, 15β -Dihydroxytibolone [3]



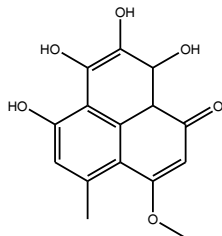
11α, 15β -Dihydroxy-Δ⁵-tibolone [4]



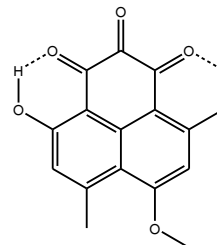
Protocatechualdehyde [5]



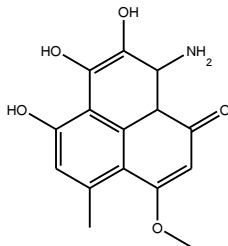
5-(Hydroxymethyl)-2-furfural [6]



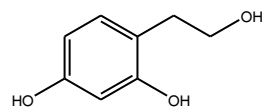
Paecilomyces A [7]



Paecilomyces B [8]



Paecilomyces C [9]



2-Hydroxytyrosol [10]

รูปที่ 2 โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทซิเนสที่แยกได้จากเชื้อรา

การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (Study on anti- α -glucosidase activity)

ปัจจุบันโรคเบาหวานถือเป็นปัญหาสุขภาพ ที่มีความสำคัญและมีอุบัติการณ์การเกิดโรคในทิศทางที่เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ในปี พ.ศ. 2556 มีผู้เป็นเบาหวานทั่วโลกทั้งสิ้น 382 ล้านคน โดยมีประเทศจีน มาเป็นอันดับหนึ่ง ตามด้วยอินเดียและสหรัฐอเมริกา เป็นอันดับ 2 และ 3 ตามลำดับ สำหรับประเทศไทย มีผู้เป็นเบาหวานแล้วกว่า 3.5 ล้านคน และคาดว่าหากไม่มีการดำเนินการใดๆ ในปี พ.ศ. 2573 ผู้ป่วยเบาหวานจะเพิ่มมากขึ้นเป็น 552 ล้านคน ดังนั้นโรคนี้อาจถือว่าเป็นความเจ็บป่วยเรื้อรังอันดับต้นๆ ของประเทศ จึงมีความจำเป็นในการคิดค้น และพัฒนาแนวทางการรักษาอย่างต่อเนื่อง เพื่อลดความรุนแรง ของโรค และอัตราการเกิดผู้ป่วยโรคเบาหวาน (IDF, 2013)

โรคเบาหวานเป็นภาวะเรื้อรังของการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง ซึ่งเกิดจากความบกพร่องของร่างกาย การผลิตฮอร์โมนอินซูลินหรือการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินหรือทั้งสองกรณี โดยสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการโรคเบาหวาน เกิดขึ้นเนื่องจากการที่ร่างกายไม่สามารถใช้น้ำตาลได้อย่างเหมาะสม ซึ่งโดยปกติ น้ำตาลจะเข้าสู่เซลล์ร่างกายเพื่อใช้เป็นพลังงานภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนอินซูลิน ซึ่งผู้ที่เป็นโรคเบาหวานร่างกายจะไม่สามารถนำน้ำตาลไปใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลที่เกิดขึ้นทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น ในระยะยาวจะมีผลในการทำลายหลอดเลือด หากไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม อาจนำไปสู่สภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงได้

ยาที่ใช้เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานในปัจจุบันมีหลายชนิด จำแนก ตามกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน โดยกลไกหนึ่งที่สำคัญเกี่ยวข้องกับเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในร่างกายผลิตจากตับอ่อนทำหน้าที่ ในการย่อยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ ให้เป็นโมเลกุลเดี่ยว เพื่อให้ร่างกายสามารถดูดซึมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนี้ออกสู่กระแสเลือดได้ ดังนั้นจึงมีการคิดค้นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ที่ผนังลำไส้ ทำให้การดูดซึมกลูโคสจากทางเดินอาหารเกิดขึ้นช้าลง ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ acarbose, voglibose และ miglitol เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความพยายามในการคิดค้นหาสารอื่นๆที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและพัฒนายาในกลุ่มนี้ต่อไป โดยเฉพาะสารที่ได้จากธรรมชาติโดยแหล่งของสารสำคัญ ทางยาอาจมาจากพืชสมุนไพร สิ่งมีชีวิตอื่นๆ ตลอดจนจากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา ซึ่งมีรายงานการค้นพบสารที่แยกได้จากเชื้อราหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ได้จากเชื้อรา

No.	Scientific name	Compound name	IC ₅₀	Reference
1	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Aspergillusol A	465±2 µM	Ingavat et al., 2009
2	<i>Aspergillus</i> sp. 16-5B	1H-2-benzopyran-1-one, 3,4-dihydro-4,6,8-trihydroxy-3-methoxy-3,7-dimethyl-	90.4±2.9 µM	Liu et al., 2015b
		Aspergifuranone	9.05±0.60 µM	
		Pestaphthalides A	69.6±3.5 µM	
3	<i>Aspergillus terreus</i>	Aspernolides A	175.18±5.95 µM	Dewi et al., 2014
		Butyrolactone I	52.17±5.68 µM	
		Butyrolactone II	96.01±3.70 µM	
		Butyrolactone I 4',4''-triacetate	84.18±8.98 µM	
4	<i>Epicoccum</i> sp. HS-1	11-deoxydiaporthein A	11.9±0.4 µM	Xia et al., 2015b
		Isopimarane diterpene	4.6±0.1 µM	
5	<i>Ganoderma eucocontextum</i>	Ganoderone A	13.7±2.3 µM	Wang et al., 2015
		Ganoleuconin E	12.7±2.1 µM	
		Ganoleuconin M	13.6±3.1 µM	
		Ganoleuconin N	2.5±0.7 µM	
		Ganoleuconin P	5.9±2.2 µM	
6	<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganoderol B	48.5±6.2 µg/ml	Fatmawati et al., 2011
7	<i>Inonotus obliquus</i>	3β-hydroxycinnamolide	3.39±0.07 mM	Ying et al., 2014
		Inotolactones A	0.24±0.01 mM	
		Inotolactones B	0.24±0.01 mM	
8	<i>Nectria</i> sp. HN001	Citreoisocoumarinol	392.5±1.7 µM	Cui et al., 2016
		Citreoisocoumarin	538.7±4.3 µM	
		Epicitreoisocoumarinol	343.7±1.0 µM	
		Nectriacids A	121.8±0.4 µM	
		Nectriacids B	23.5±0.3 µM	
		Nectriacids C	42.3±0.2 µM	
9	<i>Penicillium chermesinum</i>	3-hydroxy-6'-O-desmethylterphenyllin	4.9 µM	Huang et al., 2011
		3,3''-dihydroxy-6'-O-desmethylterphenyllin	2.9 µM	
		6'-O-desmethylterphenyllin	0.9 µM	
		Chermesinones A	24.5 µM	

ตารางที่ 2 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ได้จากเชื้อรา (ต่อ)

No.	Scientific name	Compound name	IC ₅₀	Reference
10	<i>Penicillium pinophilum</i>	(±)-penifupyrone	14.4±0.5 µM	Liu et al., 2015c
		6'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3,3',4',5-tetraol	2.2±0.1 µM	
		Pinazaphilones A	81.7±0.5 µM	Liu et al., 2015c
		Pinazaphilones B	28.0±0.2 µM	
		Sch1385568	16.6±0.5 µM	
11	<i>Penicillium</i> sp. F70614	Diketopiperazine	35 µg/ml	Kwon et al., 2000
12	<i>Xylaria</i> sp. BL321	07H239-A	6.54 µM	Song et al., 2012b

การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส
(Study on anti-acetylcholinesterase activity)

ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's Disease (AD)) หรือ Dementia of Alzheimer's type (DAT) เป็นโรคที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการทางสมองเสื่อมในผู้สูงอายุที่พบบ่อยที่สุดในโลกทางตะวันตก ในประเทศสหรัฐอเมริกา ประมาณว่ามีผู้ป่วยเป็นโรคนี้กว่า 3-4 ล้านคน ในประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคนี้ ประมาณ 2-4 % ของผู้ที่มีอายุมากกว่า 60 ปี ยิ่งอายุมากขึ้นก็จะพบผู้ป่วยด้วยโรคนี้มากขึ้น กล่าวคือ จะพบเพิ่มขึ้น 2 เท่าทุก 5 ปี หลังอายุ 60 ปี โรคนี้ในวันจะเป็นปัญหาเพิ่มขึ้น โรคอัลไซเมอร์ เกิดจากการเสื่อมของเซลล์สมองทุกส่วน เป็นแล้วไม่มีวันหาย ผู้ป่วยจะไม่สามารถควบคุมอารมณ์ตัวเอง ไม่สามารถแยกถูกผิด มีปัญหาในเรื่องการใช้ภาษา การประสานงานของกล้ามเนื้อเสียไป ความจำเสื่อม ในระยะท้ายของโรคจะสูญเสียความจำทั้งหมด

สำหรับยาแผนปัจจุบัน ที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, Tacrine และ Memantine ซึ่งการออกฤทธิ์ของยาส่วนใหญ่จะไปเพิ่มสาร acetylcholine หรือยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ในสมอง สำหรับอาการข้างเคียงที่พบได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ ปวดท้อง ท้องผูก ทำให้ตับและไตทำงานผิดปกติ ดังนั้นผู้ป่วยที่ได้รับยา จะต้องตรวจวัด การทำงานของตับและไต นอกจากนี้มีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารบางประเภท ที่นำมาใช้ในโรคนี้ เช่น สารสกัด จากใบแปะก๊วย น้ำมันปลา และ Lecithin เป็นต้น ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของอาหารเสริมเหล่านี้ ได้แก่ การเพิ่มเลือดไปเลี้ยงสมองเพิ่มสารโคลีนเข้าสู่สมองเพื่อใช้ผลิตสารสื่อประสาทในสมอง เป็นต้น (website: www.siamhealth.net; www.pharmacy.cmu.ac.th)

ดังนั้นหากสารสกัดผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น จากสมุนไพรหรือเชื้อจุลินทรีย์ใด ช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้ ก็สามารถ ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ในจุลินทรีย์ในดินเปรี้ยวและดินอินทรีย์ ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส ก็จะเป็นหนทางหนึ่งในการแสวงหายา หรืออาหารเสริม ที่ใช้ในการป้องกันโรคอัลไซเมอร์ได้

การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Study on cytotoxicity in cancer cells)

ในปัจจุบันมะเร็งกลายเป็นโรคร้ายที่คุกคามคุณภาพชีวิตของผู้คนทั้งในประเทศและนอกประเทศทั่วโลกเป็นจำนวนมาก ข้อมูลจาก Global cancer statistics 2008 ได้เปิดเผยตัวเลขของผู้ป่วยมะเร็งจำนวน 12.7 ล้านคนทั่วโลก และมีผู้ที่ต้องเสียชีวิตจากโรคมะเร็งจำนวน 7.6 ล้านคน พบว่าในเพศหญิงมีอุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งเต้านมมากที่สุด และโรคมะเร็งปอดพบมากที่สุดในเพศชาย จากการสำรวจของสถาบันมะเร็งแห่งชาติในประเทศไทย ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2542-2552 เป็นระยะเวลา 10 ปี แสดงให้เห็นถึงอุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งในคนไทย ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ และในปี พ.ศ. 2553 สถิติการเกิดโรคมะเร็งในประเทศไทยเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2552 ร้อยละ 1.2 โดยประชากรในภาคกลางมีอุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งสูงสุด (51.6 %) กรุงเทพมหานคร (24 %) ภาคอีสาน (10.3 %) ภาคเหนือ (9.6 %) และภาคใต้ (4.5 %) ตามลำดับ (Attasara, 2009)

มะเร็ง คือ กลุ่มโรคที่เกิดเนื่องจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติ ที่ DNA หรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ รวดเร็ว และมากกว่าปกติ (National Cancer Institute, 2012) ซึ่งในเซลล์ปกติกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์ประกอบไปด้วย 3 กระบวนการย่อย คือ กระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth) กระบวนการแบ่งโครโมโซม (chromosome replication) กระบวนการแบ่งเซลล์ (cell division) กระบวนการทั้งหมดนี้รวมเรียกว่า วงจรชีวิตของเซลล์ หรือ cell cycle โดยปกติกระบวนการเหล่านี้จะอยู่ในภาวะที่สมดุลกัน และดำเนินไปด้วยกันอย่างเป็นระบบ (วรชัย รัตนธรร, 2541) แต่ในกรณีของมะเร็งนั้นเกิดจากวงจรชีวิตของเซลล์ที่ผิดปกติ ทำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มากผิดปกติ

ปัจจุบันสาเหตุของการเกิดมะเร็งนั้นมีมากมาย และอาการแสดงของโรคมะเร็งนั้นมีความแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับจุดกำเนิดโรค แต่มีบางอาการที่สามารถตรวจพบได้ทั่วไปเช่น น้ำหนักลดลง โดยไม่ทราบสาเหตุ มีไข้ อ่อนเพลีย คลำพบก้อนและมีอาการปวด เป็นต้น การรักษามะเร็งนั้นส่วนใหญ่ จะใช้วิธีผ่าตัดนำก้อนมะเร็งออกให้มากที่สุด แต่ในกรณีที่เซลล์มะเร็งนั้นได้แพร่กระจายไปทั่วร่างกาย การรักษาจึงทำได้เพียงบรรเทาอาการแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคเท่านั้น นอกเหนือจากการผ่าตัดนำก้อนมะเร็งออกแล้วนั้น ยังมีวิธีการอื่นที่ใช้ในการรักษามะเร็ง เช่น การใช้รังสีรักษา เคมีบำบัด ฮอโมนบำบัด ภูมิคุ้มกันบำบัด เป็นต้น แต่ทั้งนี้ผลการรักษามะเร็งจะประสบผลสำเร็จมากน้อยเพียงใด ก็ขึ้นอยู่กับสภาพ ร่างกายของผู้ป่วยเป็นหลัก (สุรเกียรติ์ อาชานูภาพ, 2551)

จากปัญหาโรคมะเร็งดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยในภูมิภาคแพทยแผนไทยมีประวัติการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคมะเร็งมายาวนาน ด้วยคุณสมบัติที่หลากหลายและองค์ประกอบทางเคมีจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ทำให้เกิดการศึกษาค้นคว้า เพื่อพัฒนาสารจากธรรมชาติมาใช้เป็นยารักษาโรค (Liu *et al.*, 2009) สำหรับผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ที่ได้มีการศึกษาค้นคว้าโดยสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งนั้นพบว่า พิษกว่า 35,000 สายพันธุ์ จาก 20 ประเทศทั่วโลก ได้ถูกนำมา ทดสอบเพื่อหาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและยังพบว่าในปี 1983-1994 ยาต้านมะเร็งที่มีการผลิตอยู่นั้นร้อยละ 60 มีต้นกำเนิดมาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ซึ่งยาดังกล่าวได้ผ่านกระบวนการศึกษาค้นคว้า ปรับปรุงและพัฒนา จนเป็นยาต้านมะเร็ง ด้วยกระบวนการสังเคราะห์และกึ่งสังเคราะห์ การดำเนินการดังกล่าวนี้มีรูปแบบ การพัฒนาโดยตั้งยี่ดสารจากธรรมชาติเป็นต้นแบบ (Shoeb, 2006)

ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ของจุลินทรีย์ในดินเปรี้ยวและดินอินทรีย์ ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่ง เพื่อหาทางเลือกในการป้องกันหรือรักษามะเร็ง ซึ่งเป็น คุกคามที่น่ากลัวในปัจจุบัน

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Study on anti-inflammatory activity)

สำหรับการอักเสบนั้น มีกลไกการเกิดการอักเสบจากการที่ activated macrophages และ eosinophils หลั่ง reactive oxygen species เช่น O_2^- , H_2O_2 , HOCl, NO, และ OH^\cdot ซึ่ง oxygen species เหล่านี้จะกระตุ้นให้ macrophages และ eosinophils เคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่เกิดการอักเสบ แล้วกระตุ้นให้มีการหลั่ง cytokines และกระตุ้นการทำงานของ complements ที่ใช้ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย มีรายงานว่า reactive oxygens radicals เหล่านี้เหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย และมีบทบาทสำคัญ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคตับ โรคไขข้ออักเสบ และ โรคชรา เป็นต้น ใน การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ จะใช้การตรวจวัดหาปริมาณ nitric oxide ที่ macrophage สร้างขึ้น โดยการ ตรวจวัดด้วยเทคนิค UV-Visible spectrophotometry

ดังนั้นการวิจัยหาสารสำคัญจากสารสกัดจากธรรมชาติ หรือจากสมุนไพร ที่สามารถยับยั้งการ เกิด nitric oxide ซึ่งเป็นตัวการในการเกิดการอักเสบ จึงเป็นหนทางหนึ่งในการค้นคว้าหาสารสำคัญ ที่ สามารถรักษาและป้องกัน ไม่ให้เกิดโรคต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยไม่เกิดอาการข้างเคียง หรือเกิด อาการข้างเคียงน้อยที่สุด

ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส

ที่มา: <https://www.google.com/search?q=ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร> (สืบค้นวันที่ 16 พฤศจิกายน 2564)

ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร หรือ ป่าพรุโต๊ะแดง เป็นป่าพรุที่มีเนื้อที่และอุดมสมบูรณ์มากที่สุดที่ยังเหลืออยู่ในประเทศไทย ตั้งอยู่ในอำเภอสุโงโกลก จังหวัดนราธิวาส ป่าพรุแห่งนี้ถือเป็นผืนสุดท้ายของภาคใต้ที่มีความอุดมสมบูรณ์ธรรมชาติรุ่มรื่น มีลักษณะเด่นที่สำคัญ คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรม ความหลากหลายของพันธุ์พืชและสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในป่าตมดึกที่มีน้ำท่วมขังตลอดปี อุดมสมบูรณ์ไปด้วยสัตว์ป่าและพรรณไม้ โดยมีลำน้ำสำคัญหลายสายไหลผ่าน ได้แก่ คลองสุโงโกปาตี แม่น้ำบางนรา และคลองโต๊ะแดง อันเป็นที่มาของชื่อป่านั่นเอง เป็นป่าพรุที่สมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้าฯ ทรงสนพระทัยและทรงงานวิจัยป่าพรุด้วยพระองค์เอง โดยเสด็จมาทรงงานยังป่าพรุโต๊ะแดงหลายครั้ง จนคนนราธิวาสยกป่าพรุโต๊ะแดงให้เป็นของสมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้าฯ และเรียกป่าพรุแห่งนี้ว่า “ป่าพรุสิรินธร”

ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธรเป็นส่วนหนึ่งของป่าพรุโต๊ะแดง ป่าพรุแห่งสุดท้ายของประเทศไทย ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ของ 3 อำเภอ คือ อำเภอตากใบ อำเภอสุโงโกลก และอำเภอสุโงโกปาตี มีพื้นที่ประมาณ 120,000 ไร่ แต่ส่วนที่สมบูรณ์โดยประมาณมีเพียง 50,000 ไร่ เป็นป่าที่ยังคงความอุดมสมบูรณ์ด้วยสัตว์ป่าและพันธุ์ไม้นานาพรรณ และยังมีสัตว์ป่าที่พบหลายชนิด เช่น ค่าง ชะมด หมูป่า หมีขอ แมวป่าหัวแบน ซึ่งเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองที่หายากชนิดหนึ่งของไทย

ความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่ป่าพรุโต๊ะแดง จึงเป็นแหล่งที่น่าสนใจในการศึกษาเชื้อราดินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี และความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราดินชนิดใหม่ๆ ที่อาจจะพบได้ เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ ตลอดจนการวิจัยหาสารต้นแบบ (lead compound) ใหม่ ๆ เพื่อนำมาเป็นสารตั้งต้นในการพัฒนายาต่างๆ ต่อไป

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1) เตรียมสารสกัดจากเชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นผู้แยกเชื้อและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อรา ซึ่งเป็นเชื้อราที่ได้จากดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุจังหวัดนครราชสีมา โดยเชื้อราที่สนใจ จะส่งไปจำแนกเชื้อราโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม (Molecular genetic identification) และเทคนิคอื่นๆ เพื่อให้ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง หากเป็นเชื้อที่เคยค้นพบแล้ว ในกรณีที่เป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ จะดำเนินการขอพระราชทานชื่อใหม่ นอกจากนี้เชื้อที่สนใจจะถูกนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในการเตรียมสารสกัดในลำดับต่อไป (รูปที่ 4)

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)

ส่วนผสม

1. น้ำที่ได้จากการต้มมันฝรั่ง 3 ลิตร (มันฝรั่งปอกเปลือก 8 กิโลกรัมและน้ำ 8 ลิตรหรืออัตราส่วน 1:1)
2. น้ำกลั่น 12 ลิตร
3. Dextrose 300 กรัม

**หมายเหตุสูตรการเตรียม PDB 15 ลิตร (บรรจุ 250/1 flask; ได้จำนวน 65 flask)

ขั้นตอนการเตรียมเตรียมน้ำมันฝรั่งต้ม

น้ำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกมาหั่นเป็นลูกเต๋านำมาต้มกับน้ำประมาณ 1 ชั่วโมง ปิดไฟและรอให้เย็นประมาณ 15 นาที ปรับปริมาตรให้ได้น้ำหนักที่ชั่งไว้ครั้งแรกด้วยน้ำกรองเอาส่วนที่เป็นน้ำ บรรจุใส่ถุงพลาสติกทนความร้อน และนำไปแช่แข็งเพื่อให้ส่วนที่เป็นแป้งเกาะตัว

ขั้นตอนการทำ

1. ตวงน้ำ 10 ลิตรใส่ภาชนะที่เตรียมไว้
2. ตวงน้ำมันฝรั่ง (ที่ได้จากการต้มแช่แข็งและกรองแล้ว) 3 ลิตร
3. ชั่งน้ำตาล D-glucose 300 กรัม ต้มกับน้ำกลั่นที่เหลืออีก 2 ลิตร และเทรวมในภาชนะคนให้เข้ากัน
4. ตวง 250 มิลลิลิตรลงใน Flask ที่เตรียมไว้และอุดจุกสำลีไว้
5. นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 15-30 นาที
6. นำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ: อาหารที่เตรียมไว้เก็บได้นานเป็นเดือนหรือจนกว่าจะ Contaminate แต่ส่วนใหญ่จะเตรียม PDB ก่อน subculture เชื้อ ประมาณ 1 วัน (ให้แน่ใจก่อนว่าเชื้อโตเต็มที่แล้ว แล้วค่อยเตรียมอาหาร ทั้งนี้ ก็เพื่อป้องกันการเกิด Contaminate ของอาหารเลี้ยงเชื้อ)

1.2 การเตรียมอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA); 400 ml / 1 ขวด

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้

- Plate 5 cm
- Plate 10 cm
- Duran 500 ml
- ถุงพลาสติกบรรจุ

วัตถุดิบ

- Dextrose
- Agar
- น้ำกลั่น
- หัวมันฝรั่งสด

ขั้นตอนการทำ

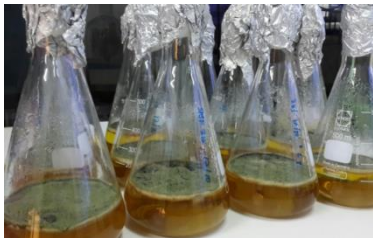
1. นำมันฝรั่งที่ได้มาทำความสะอาด และปอกเปลือกใส่ในถุง และชั่งน้ำหนักเปลือกที่ได้ ลบกับน้ำหนักมันฝรั่ง ในตอนแรกได้เท่ากับ 8 กิโลกรัม
2. หั่นมันฝรั่งที่ได้เป็นลูกเต๋า $1 \times 1 \text{ cm}^2$ ใส่ลงในหม้อที่บรรจุน้ำปริมาณ 8 ลิตร (ในอัตราส่วน 1:1)
3. นำไปตั้งไฟ ประมาณ 1 ชั่วโมง ปิดไฟและรอประมาณ 15 นาที และกรองเอาแต่น้ำด้วยตะแกรง นำน้ำที่กรองได้ ไปปรับปริมาณให้ได้น้ำหนักที่ชั่งไว้ครั้งแรกด้วยน้ำ คือ 8 ลิตร และบรรจุใส่ถุงพลาสติกทนความร้อน และนำไปแช่แข็งที่ -20°C เพื่อให้ส่วนที่เป็นแป้งเกาะตัว ทิ้งไว้
4. นำน้ำมันฝรั่งออกจากช่องแช่แข็งอุณหภูมิ -20°C นำไปทำให้ละลายด้วยไมโครเวฟ เวลา 8 นาที
5. น้ำมันฝรั่งที่ละลายเรียบร้อยแล้ว มากรองด้วยผ้าขาวบาง จนเป็นสารละลายใส พักไว้
6. ชั่งส่วนผสมอื่น ๆ เพื่อทำ Potato dextrose agar (PDA) คือ Dextrose 8 กรัม และ Agar 6 กรัม ใส่ในขวดบรรจุ Duran[®] ขนาด 500 ml นำน้ำมันฝรั่งที่กรองเรียบร้อยแล้ว มาใส่ในขวด Duran[®] ปริมาณ 80 ml และน้ำกลั่น 320 ml
7. นำขวด Duran[®] ที่ผสมส่วนผสมเรียบร้อยแล้ว เข้าเครื่อง autoclave 121°C เป็นเวลา 15 นาที และนำออก มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
8. เมื่อต้องการนำ PDA มาใช้ อาจแข็งเป็นวัน ให้นำมาให้ความร้อนจนละลายเป็นสารละลายและนำมาเทใส่ plate ที่เตรียมไว้ โดยเทใส่ plate เล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter, d) = 5 cm) จำนวน 3 plate, plate ใหญ่ (d = 10 cm) จำนวน 8 plate และรอจนอาหารใน plate แข็ง นำไปเก็บในตู้เย็นที่ 25°C

1.3 การ subculture เชื้อจาก slant ลง plate มีวิธีการดังนี้:

1. นำเชื้อที่แยกได้ มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ โดย subculture ลงใน plate เล็ก จำนวน 3 plate ที่บรรจุอาหาร PDA ไว้แล้ว
2. โดยลน needle ให้ร้อนจนแดง และลนปากขวด slant ทุกครั้งที่เปิดปิด
3. เชี่ยวเชื้อใส่ตรงกลาง plate ปริมาณเล็กน้อย
4. ทิ้งไว้ 5-7 วัน รอตุการเติบโตของเชื้อรา เพื่อ subculture เชื้อลง plate ใหญ่ต่อไป
5. นำเชื้อใน plate เล็ก subculture เชื้อลง plate ใหญ่ จำนวน 6 plate และรอเชื้อโตตุการเปลี่ยนแปลง 5-7 วัน

1.4 การ subculture เชื้อจาก plate ลง flask

1. นำ PDB ที่เตรียมไว้ใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 ml ปริมาตร 250 ml เตรียมไว้ จำนวน 6 flask
2. นำ plate ใหญ่ ที่เชื้อโตเต็มที่แล้ว มา subculture ลงใน flask เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ โดยใช้ไปมีดจุ่ม 95% ethanol นำไปผ่านเปลวไฟ แล้วรอให้เย็น
3. หลังจากนั้นนำไปตัดชิ้นส่วนบริเวณขอบของ colony ให้มีขนาดชิ้นละ 1×1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 250 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 500 ml
4. นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์



รูปที่ 4 การเลี้ยงและสกัดเชื้อรา

1.5 การสกัดเชื้อรา

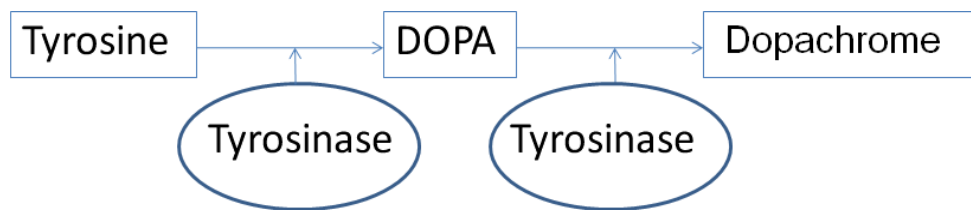
1. นำน้ำเลี้ยงเชื้อรา ไปสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี เพื่อหาสาร โดยการกรองเส้นใยของเชื้อราออกโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
2. การสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราโดยใช้ ethyl acetate (EtOAc) โดยใช้อัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อรา ต่อ EtOAc เท่ากับ 2:1 ทำการสกัดทั้งหมด 2 ครั้ง แล้วนำ EtOAc ที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมารวมกัน ส่วนที่เหลือนำไปทำแห้ง ด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BT, Broth)
3. นำน้ำเลี้ยงเชื้อราที่สกัดด้วย EtOAc มาใส่สารกำจัดน้ำ (dehydrating agent) คือ sodium sulphate anhydrous ลงไป
4. หลังจากนั้นกรอง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ อุณหภูมิ 40 -50 °C จนได้สารสกัดหยากจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BE, Broth EtOAc)
5. การสกัดเส้นใยเชื้อราโดยนำเส้นใยของเชื้อราแช่ใน methanol (MeOH) เป็นเวลา 2 วัน
6. นำสารละลาย MeOH ไปทำให้เข้มข้น โดยการระเหยตัวทำละลายบางส่วนออกไป จากนั้นเติมน้ำลงไป แล้วนำไปสกัดด้วย hexane ในอัตราส่วน 2:1 โดยทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำ hexane ที่ได้จากการสกัดไปทำแห้ง หลังจากนั้นนำสารละลาย aqueous MeOH ที่ผ่านการสกัดด้วย hexane แล้ว นำไปสกัดต่อด้วย EtOAc ในอัตราส่วน 2:1 เช่นกัน โดยสกัดด้วย EtOAc 2 ครั้งซึ่งจากการสกัดดังกล่าวจะได้ สารสกัด 2 ส่วน คือ Cell hexane (CH) และ Cell EtOAc (CE) ตามลำดับ

2) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (Study on anti-tyrosinase activity)

หลักการ

หลักการที่นิยมใช้ในการทดสอบคือ spectrophotometry ซึ่งเป็นการประเมินการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ที่เหลืออยู่ จากการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ dopachrome (รูปที่ 5) ซึ่งเป็นสารที่มีสีแดง สารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในการทดลองครั้งนี้คือ L-DOPA และในการทดสอบจะเปรียบเทียบกับ positive control 2 ชนิด คือ kojic acid ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ดีและมีการใช้อยู่ในปัจจุบัน และ positive control อีกชนิด คือ ปวกหาด ซึ่งเป็นสารสกัดชั้นน้ำจากแก่นมะหาด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง tyrosinase enzyme ได้ดี



รูปที่ 5 ขั้นตอนการเกิด dopachrome

ค่าที่คำนวณได้สามารถแสดงเป็น

-tyrosinase inhibition (%) (Sasaki and Yoshizaki, 2002)

-tyrosinase activity (%) (Lee *et al.*, 2002)

ซึ่งทั้ง 2 วิธีมีหลักการทดลองเช่นเดียวกันเพียงแต่คำนวณต่างกัน โดยการทดลองในครั้งนี้จะคำนวณเป็น % tyrosinase inhibition ซึ่งหมายถึงความสามารถของสารสกัดที่สามารถยับยั้ง tyrosinase enzyme ได้ โดยวัดจากปริมาณ dopachrome ที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็น product จากการเกิดปฏิกิริยาของ L-DOPA หรือ L-tyrosine และมีเอนไซม์ tyrosinase เร่งปฏิกิริยา ดังนั้นหากสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเอนไซม์ จะพบว่า dopachrome ก็จะมีเกิดขึ้นน้อย ซึ่งวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสง เมื่อคำนวณเป็น % inhibition จะได้ค่า % ที่สูง

ค่าที่คำนวณได้จะเปรียบเทียบกับ positive control นอกจากนี้ยังสามารถหาค่า IC_{50} ได้ ซึ่งต้องเตรียมสารที่ต้องการทดสอบและ positive control เป็นความเข้มข้นต่างๆ ค่าของ tyrosinase inhibition (%) ของแต่ละความเข้มข้นแล้วนำค่า % ที่ได้มา plot กราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้น ก็จะสามารถหาค่า IC_{50} ได้

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม 20 mM Phosphate buffer pH 6.8

Solution A: $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (312 mg) ละลายในน้ำกลั่น 100 mL

Solution B: Na_2HPO_4 (284 mg) ละลายในน้ำกลั่น 100 mL

ผสมและปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 6.8

2. เตรียม Tyrosinase solution:

ละลาย Mushroom tyrosinase 0.5 mg

ด้วย 20 mM Phosphate buffer (pH 6.8) 5 mL

3. เตรียม L-DOPA solution:

ละลาย L-DOPA 0.8 mg

ด้วย 20 mM Phosphate buffer (pH 6.8) 5 mL

4. เตรียม Kojic acid solution: ละลาย Kojic acid 1 mg ใน solvent ที่เหมาะสม 5 mL

5. การเตรียม test sample solution: ละลาย extract 1 mg ใน solvent ที่เหมาะสม 5 mL

การทดลองและแปลผล

1. ผสมสารลงใน microplate ลงในแต่ละ wells โดยแบ่งเป็น

A (control)	Mushroom tyrosinase solution 20 μ L Phosphate buffer (pH 6.8) 140 μ L Solvent ที่ใช้ 20 μ L
B (blank ของ control)	Phosphate buffer (pH 6.8) 160 μ L Solvent ที่ใช้ 20 μ L
C (test sample)	Mushroom tyrosinase solution 20 μ L Phosphate buffer (pH 6.8) 140 μ L 20 μ L ของ test sample ใน solvent
D (blank ของ test sample)	Phosphate buffer (pH 6.8) 160 μ L 20 μ L ของ test sample ใน solvent

2. หลังจากผสมสารตามขั้นตอนที่ 1 แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 10 นาที

3. เติม L- DOPA ความเข้มข้น 0.85 mM จำนวน 20 μ L ในทุก wells

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วย microplate reader

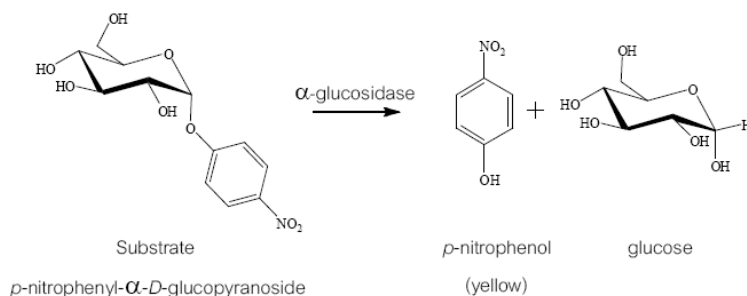
5. วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 20 นาที

6. วัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง

7. บันทึกและแปลผลตามสูตรดังนี้ % inhibitory = [(A-B)-(C-D)] x 100/(A-B)

2.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (Study on anti- α -glucosidase activity)

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เป็นการศึกษาที่อาศัยปฏิกิริยาการเกิดสี (colorimetric method) ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป ด้วยเครื่อง UV-visible spectroscopy ในการติดตามผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสาร *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside ซึ่งเป็นสารละลายไม่มีสี ด้วยเอนไซม์ α -glucosidase ไปเป็นผลิตภัณฑ์ *p*-nitrophenol ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลืองใสที่ความยาวคลื่น 405 nm (รูปที่ 6) ซึ่งถ้าสารตัวอย่างมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase สีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะน้อยและค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จะมีค่าต่ำ (Walker *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2008; You *et al.*, 2011; Dej-adisai & Pitakbut, 2015)



รูปที่ 6 แสดงปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสาร p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside ด้วยเอนไซม์ α -glucosidase ไปเป็นผลิตภัณฑ์ p-nitrophenol ที่มีสีเหลืองใส และน้ำตาล glucose (Rungporn *et al.*, 2009)

ขั้นตอนการเตรียม

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 (0.01 M)

สารละลาย A: เตรียมสารละลาย $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 0.02 M โดยนำ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ มา 0.312 g มาละลายน้ำ 100 ml

สารละลาย B: เตรียมสารละลาย Na_2HPO_4 ความเข้มข้น 0.02 M โดยนำ Na_2HPO_4 มา 0.284 g มาละลายน้ำ 100 ml

หลังจากนั้นนำสารละลาย A 19.5 ml และ B 30.5 ml ผสมกันจนได้สารละลาย AB ที่มี pH 7 แล้วนำสารละลายที่ได้มาปรับความเข้มข้นให้ได้ 0.01 M โดยการเติมน้ำ 50 ml ลงไปใน สารละลาย AB จากนั้นนำ Bovine serum albumin (BSA) 0.2 g และ NaN_3 0.02 g มาละลายใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ 100 ml

2. การเตรียมสารละลายเอนไซม์ α -glucosidase (1 Unit/ml)

ชั่งเอนไซม์ α -glucosidase 1 Unit (from *Saccharomyces cerevisiae*, Type I, lyophilized powder, Sigma, G5003-1KU) มาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ จำนวน 1 ml

3. การเตรียมสารละลายสารตั้งต้น (4 mM)

ชั่งสาร p-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside 1.21 mg (เท่ากับ 4 μmole) มาละลาย ใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ จำนวน 1 ml

4. ขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน (8 mg/ml)

ชั่งสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน Acarbose อย่างละ 8 mg มาละลายในน้ำหรือ DMSO (ตามความสามารถในการละลายของสารตัวอย่าง) จำนวน 1 ml

ขั้นตอนการทดสอบ

ในการทดลองจะนำสารละลายทั้งหมดที่เตรียมไว้มาทำปฏิกิริยาใน well-plate จำนวน 4 wells (A, B, C, D) โดยแต่ละ well จะมีปริมาตรเท่ากับ 200 μl โดยนำสารละลายที่เตรียมใส่ลงใน well-plate ดังต่อไปนี้

- Well A	100 μl ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 M pH 7
(Control)	50 μl สารละลายเอนไซม์ α -glucosidase ที่ความเข้มข้น 1 U/ml

- Well B	50 µl ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 M pH 7
(Blank)	50µl สารละลายเอนไซม์ α-glucosidase ที่ความเข้มข้น 1 U/ml 50µl น้ำหรือ DMSO (ตามความสามารถในการละลายของสารตัวอย่าง)
- Well C	50 µl ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 M pH 7
(Positive control)	50µl สารละลายเอนไซม์ α-glucosidase ที่ความเข้มข้น 1 U/ml 50µl สารละลายมาตรฐาน Acarbose ที่ความเข้มข้น 8 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 mg/ml)
- Well D	50 µl ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 M pH 7
(Test sample)	50µl สารละลายเอนไซม์ α-glucosidase ที่ความเข้มข้น 1 U/ml 50µl สารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 8 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 mg/ml)

หลังจากใส่สารละลายต่าง ๆ ครบแล้ว จึงนำไป incubate ที่ 37 °C นาน 2 นาที หลังจากนั้นใส่สารละลายสารตั้งต้นที่ความเข้มข้น 4 µmole/ml จำนวน 50µl ลงในแต่ละ well แล้วนำไปทำ ปฏิกิริยาที่ 37 °C โดยทำการวัดปริมาณสาร p-nitrophenol ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 nm ทุก ๆ 30 วินาที นาน 10 นาทีด้วยเครื่อง microplate reader

ขั้นตอนการวิเคราะห์ผล

1. การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm (แกน Y) กับเวลา (แกน X) กราฟที่ได้จะเป็นเส้นตรงในช่วงแรกและเป็นเส้นโค้งในช่วงหลัง ค่าเปอร์เซ็นต์ในการ ยับยั้งจะคำนวณจากอัตราเร็วเริ่มต้น (initial velocity, V_i) ซึ่งจะคำนวณได้จากช่วงแรกที่เป็นเส้นตรง โดยคำนวณหาค่าความชันจากการลากเส้นตรง (linarity line) โดยเลือกค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้น จริงที่ใกล้เคียงกับเส้นตรงในอุดมคติมากที่สุด มาคำนวณดังแสดงในสมการต่อไปนี้

$$\text{อัตราเร็วเริ่มต้น (initial velocity, } V_i) = \text{slope} = \frac{\text{การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง } \Delta Y}{\text{การเปลี่ยนแปลงเวลา } \Delta X}$$

จากนั้นนำค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของกลุ่มควบคุมมาลบด้วยอัตราเร็วเริ่มต้นของกลุ่มทดลอง (สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน) นำผลต่างที่ได้หารด้วยอัตราเร็วเริ่มต้นของกลุ่มควบคุม และคูณ 100 จะได้ค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง ดังสมการต่อไปนี้

$$\begin{aligned} \text{ค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง} &= \frac{(V_i \text{ control} - V_i \text{ treatment}) \times 100}{V_i \text{ control}} \\ (\% \text{ alpha-glucosidase inhibition}) & \end{aligned}$$

2. การคำนวณค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀)

คำนวณโดยการสร้างกราฟเส้นตรงระหว่างค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง และสารมาตรฐาน (แกน X) และค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase (แกน Y) โดยใช้ความ เข้มข้นของสารตัวอย่างและสารมาตรฐานอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น คำนวณค่า IC₅₀ โดยแทนค่า $y = 50$ ลงในสมการเส้นตรง

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

หลักการ

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรียและรา มีวิธีหลัก 2 รูปแบบคือ วิธี ทดสอบด้วยการให้สารซึมผ่านในอาหารวุ้น (agar diffusion method) และวิธีทดสอบด้วยการเจือจางสาร (dilution method)

วิธีทดสอบด้วยการให้สารซึมผ่านในอาหารวุ้น (agar diffusion method)

หลักการของวิธีนี้คือ กระจายเชื้อบนอาหารวุ้น แล้วใส่สารสกัดในสิ่งรองรับ เพื่อให้ สามารถซึมผ่านเข้าไปในอาหารวุ้น หลังการบ่มเพาะ สารประกอบ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ ในสารสกัด ทั้งชนิดยับยั้งการเจริญและฆ่า จะก่อให้เกิดวงใสรอบสิ่งรองรับที่ใส่สารสกัด แล้ววัดขนาด บริเวณใสที่เกิดขึ้น ซึ่งจะวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง บริเวณใสนี้เป็นหน่วยมิลลิเมตร วิธีการนี้ โดยทั่วไปมักทำการทดสอบยาเพียงความเข้มข้นเดียว เพราะขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลาง บริเวณใสที่ได้ พบว่าเป็นสัดส่วนโดยตรง กับความไวของเชื้อที่ทดสอบ ตัวอย่างที่ต้องการ ทดสอบ แต่ทั้งนี้วิธีการทดสอบชนิดนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่ของสารผ่านเนื้อวุ้น

วิธีนี้ทำได้หลายรูปแบบขึ้นกับชนิดของสิ่งรองรับ และมักเรียกชื่อวิธีการตามสิ่งรองรับที่ ใช้ เช่น

- สิ่งรองรับที่เป็นหลุม ซึ่งได้จากการเจาะหลุมในอาหารวุ้น แล้วเติมสารละลายลงไป จะเรียกว่า

วิธี agar-well diffusion method

- สิ่งรองรับเป็นกระดาษชับลกลม ซึ่งใส่สารละลายก่อนวางบนอาหารวุ้น จะเรียกว่าวิธี agar disk diffusion method

- สิ่งรองรับเป็นถ้วยโลหะไม่เป็นสนิมทรงกระบอก จะเรียกว่า cup-diffusion method

ในขั้นตอน ของการตรวจสอบศักยภาพ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัด ส่วนใหญ่จะ ใช้วิธี agar disk diffusion method ในการทดสอบ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกที่สุด และง่ายที่สุด

วิธีทดสอบด้วยการเจือจางสาร (dilution method)

ทำโดยการเจือจางสารสกัดในอาหารเหลว (broth dilution method) หรืออาหารวุ้น (agar dilution method) ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ แล้วจึงใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบ ลงใน หรือบนอาหารเหล่านี้ ภายหลังจากบ่มเพาะ สังเกตความขุ่นใสในอาหารเหลว และมีหรือไม่มี เชื้อเจริญบนอาหารวุ้น จากนั้น ดูว่าความเข้มข้นใดที่ต่ำที่สุด ที่ไม่มีเชื้อเจริญ ค่าที่ได้ถือว่า เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibitory concentration, MIC) กรณีต้องการรู้ว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อเป็นชนิดยับยั้งหรือฆ่า เชื้อ ให้ทดสอบ ต่อไป โดยการใช้ loop ปราศจากเชื้อแต่ละลงในอาหารเหลว หรือเขี่ยบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ บน อาหารวุ้นตั้งแต่ช่วงค่า MIC ขึ้นไป แล้วตะบนอาหารวุ้น ภายหลังจากบ่มเพาะ สังเกตว่า มีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้นมา และดูว่าความเข้มข้นใดต่ำที่สุดที่ไม่มีเชื้อเจริญ หรือเกือบไม่มี เชื้อเจริญ (99.9% ถูกฆ่า) ค่าที่ได้ถือว่าเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (minimal microbicidal concentration, MMC) ถ้าเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรียจะเป็น minimal bactericidal concentration, MBC และถ้าเจาะจงกับเชื้อราจะเป็น minimal fungicidal concentration , MFC นำค่าที่ได้นี้ไปเปรียบเทียบกับค่า MIC ถ้าค่าทั้งสองเท่ากัน หรือไม่เกินสองความ เข้มข้น แสดงว่าสารสกัดมีศักยภาพฆ่าเชื้อ แต่ถ้าต่างกันหลายความเข้มข้น แสดงว่าสารสกัด มีศักยภาพเฉพาะยับยั้งการเจริญของเชื้อ

สำหรับสารสกัดที่มีสีหรือมีความขุ่นถ้าทดสอบโดยวิธี เจือจางในอาหารเหลว อาจไม่ สามารถหาค่า MIC ได้ ต้องใช้วิธีการเจือจางในอาหารแข็ง

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบประกอบด้วย

(1) Gram positive bacteria:

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Cutibacterium acnes

(2) Gram negative bacteria:

Pseudomonas aeruginosa

Escherichia coli

(3) Yeast

Candida albicans

(4) Fungi

Trichophyton rubrum

Trichophyton mentagrophytes

Microsporum gypseum

การทดสอบ ใช้วิธีการทดสอบ 2 วิธี

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น

โดยวิธี Agar disc diffusion method (Lorian, 2005)

1.1 การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 100-500 mg/ml บนแผ่น paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm จำนวน 10 μ l จะได้ ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 1-5 mg/disc โดยมี positive control คือ ยา oxacillin (1 μ g/disc) สำหรับแบคทีเรีย เชื้อยีสต์ใช้ ยา amphotericin B (25 μ g/disc), เชื้อราก่อโรคกลากใช้ ยา ketoconazole (25 μ g/disc)

1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* บนอาหาร Mueller hinton agar (MHA) ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acnes* บนอาหาร Brain heart infusion agar (BHIA) ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน anaerobic jar

เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ บนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อเชื้อมา 2-3 โคโลนี ใส่ใน 0.85% NaCl ไร่เชื้อ และปรับ ความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard

เพาะเลี้ยงเชื้อราก่อโรคกลากบนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา ประมาณ 10 วัน เติม 0.85 % NaCl ประมาณ 5 ml ล้างสปอร์ของเชื้อออกจากอาหาร SDA slant นำสารละลายของเชื้อรามา กรองผ่านสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองได้ ปรับให้มี จำนวนสปอร์ประมาณ 10⁶ spore/ml โดยวัด ค่า O.D. ให้อยู่ในช่วง 0.14-0.17 ที่ความยาวคลื่น 530 nm

1.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ใช้ cotton swab ไร่เชื้อ จุ่มแบคทีเรียและยีสต์ที่ปรับความขุ่นเสร็จแล้ว มาป้าย ให้ทั่วผิว วนอาหาร MHA, BHIA และ SDA วางแผ่น disc ที่หยดสารสกัดไว้แล้ว และ ชุดควบคุม incubate ที่อุณหภูมิ

35 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงสำหรับเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* และ 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *P. acnes* และเชื้อยีสต์ตามลำดับ

ดูน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อราก่อโรคกลากที่ปรับความเข้มข้นแล้ว จำนวน 0.5 ml ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่หลอมเหลว (45 °C) จำนวน 24.5 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนวันแข็งตัว วาง disc ที่หยดสารสกัดไว้ นำไป incubate ที่ อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วัน

สังเกตการเกิดวงใสรอบแผ่น disc และวัดขนาดวงใส ด้วย vernier caliper

2. การทดสอบหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC), Minimal bactericidal concentration (MBC) และ Minimal fungicidal concentration (MFC)

นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี Disc diffusion มาหาค่า MIC, MBC และ MFC โดยวิธี micro broth dilution ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lorian, 1996, CLSI, 2000 และ CLSI, 2002 โดยมีวิธีการดังนี้

2.1 วิธีการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ตามวิธี Disc diffusion เจือจางเชื้อต่อด้วยอาหาร Mueller hinton broth (MHB) สำหรับเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis*, Brain heart infusion broth (BHIB) สำหรับเชื้อ *P. acnes* และ อาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB) สำหรับเชื้อยีสต์และเชื้อราก่อโรคกลาก ในอัตราส่วน 1 : 100 เท่า

วิธีการทดสอบ

หาค่า MIC

นำสารสกัดมาเตรียมความเข้มข้นเริ่มต้นมากกว่าที่ต้องการ 50 เท่า จากนั้น เจือจางในอาหารเหลว MHB, BHIB หรือ SDB แบบลำดับสอง ใน microtiter plate ประมาณ 10 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือ 2000 µg/ml แล้วเติมเชื้อ จุลินทรีย์ในข้อ 2.1 ลงไป ทุกหลุม (10⁵ CFU/หลุม) นำไปเพาะเลี้ยง incubate ที่ 35 °C เป็น เวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis*, 48 ชั่วโมง สำหรับ เชื้อ *P. acnes* และ *C. albicans* ส่วนเชื้อราก่อโรคกลาก incubate ที่ 30 °C เป็นเวลา 4-7 วัน

อ่านผลค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุด ของสารสกัดหรือยาปฏิชีวนะ ที่ยับยั้ง เชื้อได้ (well ใส)

หาค่า MBC หรือ MFC

โดยการเพาะเชื้อจากทุกหลุมที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) สำหรับเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis*, BHIA สำหรับเชื้อ *P. acnes* และ SDA สำหรับเชื้อรา ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปเพาะเลี้ยง ที่เวลา และ อุณหภูมิ เช่นเดียวกับวิธีการหาค่า MIC

อ่านผล ค่า MBC หรือค่า MFC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุด ของสารสกัดและ ยาปฏิชีวนะที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้

Positive control:

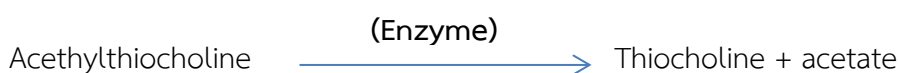
- แบคทีเรีย ใช้ยา oxacillin
- เชื้อราก่อโรคกลาก ใช้ยา ketoconazole
- เชื้อยีสต์ ใช้ยา amphotericin B

หมายเหตุ หากสารสกัดขุ่น เมื่อผสมในอาหารเหลว จะทำการทดสอบโดยวิธี agar dilution โดยผสมสารสกัดในวุ้นอาหารหลอมเหลว แล้วหยดเชื้อ 10^4 cfu/spot incubate ที่ อุณหภูมิและเวลาเช่นเดียวกับการทดสอบวิธี micro broth dilution อ่านผล ค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อ ขึ้นบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ การทดสอบโดยวิธีจะหาได้เฉพาะค่า MIC

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเตอเรส

หลักการ

หลักการที่นิยมใช้ในการทดสอบคือ spectrophotometry ซึ่งเป็นการประเมินการทำงานของ เอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) จากการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น จากการทำปฏิกิริยาของ thiocholine กับ dithiobisnitrobenzoate ion ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลือง สารตั้งต้นที่ใช้คือ acetylthiocholine ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ acetylcholine ดังปฏิกิริยาที่แสดงด้านล่าง



วิธีการทดลอง: Thin layer chromatography (TLC) with bioassay detection for AChE inhibition, modified from the study of Rhee *et al.*, 2001

1. ใช้แผ่น TLC ชนิดที่เป็น silica gel GF254
2. เตรียม mobile phase 2 ระบบ (dichloromethane:ethanol:water 4:4:0.5 (v/v/v) และ chloroform: methanol 9:1 (v/v))
3. เตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 5 mg/ml โดยใช้ ethanol
4. spot สารตัวอย่างที่เตรียมจำนวน 3 microliter ลงบน TLC-plate จากนั้นนำไป developed ใน tank ของ mobile phase ทั้งสองระบบ
5. เมื่อตัวทำละลายขึ้นถึงที่กำหนด นำออกมาทำให้แห้งที่ room temperature แล้วนำไป spray ด้วย 30mM ATCI แล้ว spray ตามด้วย 20mM DTNB แล้วทิ้งไว้ที่ room temperature เป็นเวลา 45 นาที
6. นำ plate ไป spray ด้วย 10.17 U/ml AChE ทิ้งไว้ 20 นาที แล้วดูสีที่เกิดขึ้น

หมายเหตุ:

- สังเกตสีที่เกิดขึ้นด้วย visible light.
- A positive spot indicating AChE inhibitor was a colorless spot on the yellow background
- ใช้ galantamine เป็น positive test

- The result was compared to that from the TLC analysis of the same sample after spraying with Anisaldehyde and Dragendroff reagents

2.5 การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

Protocol for cytotoxic assay (Skehan, *et al.*, 1990)

1. เซลล์มะเร็งเต้านม (human breast adenocarcinoma, MCF-7) เป็น cell line ที่ได้จากสถาบันมะเร็ง กรุงเทพมหานคร
2. เลี้ยงเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงชนิด EMEM (with glutamine) ที่ supplement ด้วย 10% inactivated newborn calf serum, 50 IU/ml penicillin G sodium, 25 IU/ml streptomycin sulfate และ 0.125 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B (Fungizone[®]) นำมาเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่ 37°C, 5% CO₂ ที่ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 95%
3. หาอัตราการเจริญเติบโต (determination of growth profile) ของเซลล์ เพื่อกำหนด จำนวนเซลล์มะเร็งที่ใส่ต่อหลุมในการทดลองเพื่อให้เซลล์อยู่ในช่วง exponential growth ตลอดการทดลอง (culture period = 7 วัน)
4. เตรียม cell suspension โดยการล้าง cell monolayer ด้วย phosphate buffer saline pH 7.4 และย่อย monolayer ออกจากพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงด้วย 0.1% trypsin-EDTA ให้ได้ single cells แขนวลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง คำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับ viable cells ด้วย haemocytometer (trypan blue exclusion) ทำ dilution ด้วยอาหารเพาะเลี้ยง ถ่ายเซลล์เลี้ยงใน 96-well microtiter plate หลุมละ 100 μl เลี้ยงใน CO₂ incubator นาน 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ เกาะผิวกันหลุมเป็น monolayer
5. นำ plate ออกมาเติมสารต้นแบบ และสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ที่เตรียมเป็นสารละลายใน culture medium ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจำนวน 5 ความเข้มข้น (two-fold concentrations) ลงไป หลุมละ 100 μl (ในกรณีที่ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายเบื้องต้น เมื่อทำการเจือจางด้วย culture medium แล้วจะมีความเข้มข้นของ DMSO สูงสุดไม่เกิน 0.5% (ซึ่งความเข้มข้นนี้ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์) ทำซ้ำความเข้มข้นละ 6 หลุม (6 replicates) เลี้ยงใน CO₂ incubator นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นค่อย ๆ ดูด culture medium ออก ล้างเซลล์ (monolayer) ด้วย 200 μl ของ culture medium 1 ครั้ง หลังจากนั้นเติม culture medium ลงไปใหม่อีกหลุมละ 200 μl นำไปเลี้ยงต่อใน CO₂ incubator นาน 72 ชั่วโมง [รวมเวลาในการเลี้ยง (culture period) ทั้งหมด 7 วัน]
6. จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาอัตราการรอดตายของเซลล์ (percent survival) ของเซลล์มะเร็ง เมื่อเทียบกับ non-treated control) โดยใช้วิธี Sulphorhodamine B assay (SRB assay) ซึ่งทำได้โดย fixed live cell ที่มีอยู่ในแต่ละหลุมด้วยการเติม 40% trichloroacetic acid หลุมละ 100 μl เก็บ plate ไว้ที่ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง นำ plate มาล้างน้ำ 5 ครั้ง แล้วเติม 0.4% Sulphorhodamine B เตรียมใน 1% acetic acid ลงไปหลุมละ 50 ml ตั้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำมาล้างด้วย 1% acetic acid 5 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ plate แห้ง
7. เติม 10 mM Tris base ลงไปหลุมละ 100 μl นำไปเขย่าบน gyratory shaker ประมาณ 20 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง UV-Visible light ด้วย plate reader (Power X: Bio-TEK Instrument, Inc.) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร วัด OD ที่ได้ซึ่งแปรผันตรงกับ จำนวนของ

เซลล์ที่ถูกยึด (fixed) ไว้ในแต่ละหลุม โดยกำหนดให้ค่า OD ของ non-treated control มีค่าเป็น 100% survival

8. นำค่า % survival ที่ได้มาคำนวณทางสถิติหาค่าความเข้มข้นที่ให้เซลล์ตาย 50% (IC_{50}) จาก dose-response curve ซึ่งเป็นดัชนีบ่งถึงความเป็นพิษของเซลล์ (cytotoxic activity)

2.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ

การทดสอบฤทธิ์ต้านการสร้าง nitric oxide จาก cell macrophages

(nitric oxide production inhibitory activity) (Banskota *et al.*, 2003)

เลี้ยง Cell macrophages, RAW 264.7 ใน 96 well-plate ที่มี RPMI medium ที่ประกอบด้วย 10% fetal calf serum, penicillin (100 units/ml) และ streptomycin (100 μ g/ml) โดย incubate cells ใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที ล้าง cells ด้วย PBS solution เติม RPMI medium ที่ประกอบด้วย 10 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) 100 μ l ลงในแต่ละ well เติม test sample ลงไป 100 μ l incubate cells ใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณ nitric oxide ที่ cell สร้างขึ้น ที่ความยาวคลื่น 570 nm

ผลและวิจารณ์ผล

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 104 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดจากเชื้อ *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Gongronella* sp., *Penicillium* sp. จำนวน 4, 12, 2 และ 83 ตัวอย่าง ตามลำดับ และอีก 3 ตัวอย่างที่ขณะนี้ยังไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเราได้ (unidentified) ว่าเป็นเชื้อชนิดใด โดยนำตัวอย่าง ทั้งหมด มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 5 อย่าง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (รักษาความผิดปกติของ เม็ดสี) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลโคซิเดส (รักษาเบาหวาน) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิetylคอลีนเอสเตอเรส (รักษาโรคสมองเสื่อม, Alzheimer's disease) ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (รักษาโรคมะเร็ง) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (รักษาอาการอักเสบต่างๆ)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง

Lot.	No.	Extracts	เชื้อ
1 (8/1/2559)	1.	SPSF001BE	<i>Trichoderma</i> sp.
	2.	SPSF002BE	Unidentified
	3.	SPSF003BE	<i>Aspergillus</i> sp.
	4.	SPSF004BE	Unidentified
	5.	SPSF005BE	<i>Aspergillus</i> sp.
	6.	SPSF006BE	Unidentified
	7.	SPSF007BE	<i>Gongronella</i> sp.
	8.	SPSF008BE	<i>Gongronella</i> sp.
	9.	SPSF009BE	<i>Aspergillus</i> sp.
	10.	SPSF0010BE	<i>Trichoderma</i> sp.
	11.	SPSF0011BE	<i>Penicillium</i> sp.
	12.	SPSF0012BE	<i>Trichoderma</i> sp.
	13.	SPSF0013BE	<i>Trichoderma</i> sp.
2 (4/4/2559)	14.	SPSF028BE	<i>Penicillium</i> sp.
	15.	SPSF029BE	<i>Penicillium</i> sp.
	16.	SPSF030BE	<i>Penicillium</i> sp.
	17.	SPSF031BE	<i>Penicillium</i> sp.
	18.	SPSF032BE	<i>Penicillium</i> sp.
	19.	SPSF033BE	<i>Penicillium</i> sp.
	20.	SPSF034BE	<i>Penicillium</i> sp.
	21.	SPSF035BE	<i>Penicillium</i> sp.
	22.	SPSF037BE	<i>Penicillium</i> sp.
	23.	SPSF039BE	<i>Penicillium</i> sp.

*CH = Cell Hexane, CE = Cell Ethyl acetate, BE = Broth Ethyl acetate และ BT = Broth

ตารางที่ 3 ตัวอย่างสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง (ต่อ)

Lot	No.	Extracts	เชื้อ
3 (1/8/2559)	24.	SPSF225CE	<i>Penicillium</i> sp.
	25.	SPSF225BE	<i>Penicillium</i> sp.
	26.	SPSF221CE	<i>Penicillium</i> sp.
	27.	SPSF221CH	<i>Penicillium</i> sp.
	28.	SPSF221BE	<i>Penicillium</i> sp.
	29.	SPSF211CE	<i>Penicillium</i> sp.
	30.	SPSF211BE	<i>Penicillium</i> sp.
	31.	SPSF234CE	<i>Penicillium</i> sp.
	32.	SPSF234BE	<i>Penicillium</i> sp.
	33.	SPSF244CE	<i>Penicillium</i> sp.
	34.	SPSF244BE	<i>Penicillium</i> sp.
	35.	SPSF248CH	<i>Penicillium</i> sp.
	36.	SPSF248CE	<i>Penicillium</i> sp.
	37.	SPSF248BE	<i>Penicillium</i> sp.
	38.	SPSF236BE	<i>Penicillium</i> sp.
	39.	SPSF236CE	<i>Penicillium</i> sp.
	40.	SPSF209CE	<i>Penicillium</i> sp.
	41.	SPSF209BE	<i>Penicillium</i> sp.
	42.	SPSF213BE	<i>Penicillium</i> sp.
	43.	SPSF238CE	<i>Penicillium</i> sp.
	44.	SPSF208BE	<i>Aspergillus</i> sp.
	45.	SPSF208CE	<i>Aspergillus</i> sp.
	46.	SPSF208CH	<i>Aspergillus</i> sp.
	47.	SPSF226BE	<i>Penicillium</i> sp.
	48.	SPSF226CE	<i>Penicillium</i> sp.
	49.	SPSF226CH	<i>Penicillium</i> sp.
	50.	SPSF227BE	<i>Penicillium</i> sp.
	51.	SPSF227CE	<i>Penicillium</i> sp.

ตารางที่ 3 ตัวอย่างสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง (ต่อ)

Lot	No.	Extracts	เชื้อ
3 (1/8/2559)	52.	SPSF240BE	<i>Penicillium</i> sp.
	53.	SPSF240CE	<i>Penicillium</i> sp.
	54.	SPSF240CH	<i>Penicillium</i> sp.
	55.	SPSF310BE	<i>Penicillium</i> sp.
	56.	SPSF310CE	<i>Penicillium</i> sp.
	57.	SPSF318BE	<i>Penicillium</i> sp.
	58.	SPSF318CE	<i>Penicillium</i> sp.
	59.	SPSF325BE	<i>Penicillium</i> sp.
	60.	SPSF325CE	<i>Penicillium</i> sp.
	61.	SPSF325CH	<i>Penicillium</i> sp.
	62.	SPSF329BE	<i>Penicillium</i> sp.
	63.	SPSF329CE	<i>Penicillium</i> sp.
	64.	SPSF329CH	<i>Penicillium</i> sp.
	65.	SPSF330BE	<i>Aspergillus</i> sp.
	66.	SPSF330CE	<i>Aspergillus</i> sp.
	67.	SPSF339BE	<i>Penicillium</i> sp.
	68.	SPSF339CE	<i>Penicillium</i> sp.
	69.	SPSF339BT	<i>Penicillium</i> sp.
	70.	SPSF358BE	<i>Penicillium</i> sp.
	71.	SPSF358CE	<i>Penicillium</i> sp.

*CH = Cell Hexane, CE = Cell Ethyl acetate, BE = Broth Ethyl acetate และ BT = Broth

ตารางที่ 3 ตัวอย่างสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง (ต่อ)

Lot	No.	Extracts	เชื้อ
4 (20/8/59)	72.	SPSF206 CM	<i>Aspergillus</i> sp.
	73.	SPSF360 BE	<i>Aspergillus</i> sp.
	74.	SPSF360 CH	<i>Aspergillus</i> sp.
	75.	SPSF360 BT	<i>Aspergillus</i> sp.
	76.	SPSF206 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	77.	SPSF209 BT	<i>Penicillium</i> sp.
	78.	SPSF219 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	79.	SPSF224 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	80.	SPSF224 CE	<i>Penicillium</i> sp.
	81.	SPSF227 BT	<i>Penicillium</i> sp.
	82.	SPSF234 BT	<i>Penicillium</i> sp.
	83.	SPSF241 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	84.	SPSF250 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	85.	SPSF304 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	86.	SPSF304 CH	<i>Penicillium</i> sp.
	87.	SPSF304 BT	<i>Penicillium</i> sp.
	88.	SPSF310 BT	<i>Penicillium</i> sp.
	89.	SPSF312 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	90.	SPSF312 CE	<i>Penicillium</i> sp.
	91.	SPSF328 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	92.	SPSF347 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	93.	SPSF358 BT	<i>Penicillium</i> sp.
	94.	SPSF038 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	95.	SPSF040 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	96.	SPSF042 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	97.	SPSF043 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	98.	SPSF044 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	99.	SPSF045 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	100.	SPSF046 BE	<i>Penicillium</i> sp.
	101.	SPSF047 BE	<i>Penicillium</i> sp.
102.	SPSF048 CE	<i>Penicillium</i> sp.	
103.	SPSF049 BT	<i>Penicillium</i> sp.	
104.	SPSF051 BT	<i>Penicillium</i> sp.	

*CH = Cell Hexane, CE = Cell Ethyl acetate, BE = Broth Ethyl acetate และ BT = Broth

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่ามี 3 ตัวอย่างซึ่งได้จากเชื้อ *Penicillium* sp. มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส > 50% ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml) ได้แก่ SPSF0318BE, SPSF0318CE และ SPSF045BE (สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ ปวกหาด (water extract of *Artocarpus lakoocha*) และ kojic acid โดยมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 98.82 ± 3.97 และ $75.46 \pm 1.80\%$ ตามลำดับ)

และพบ 1 ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิทิลคอลินเอสเตอเรสที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิทิลคอลินเอสเตอเรส > 80% ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml) ได้แก่ SPSF013BE (*Trichoderma* sp.) (สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ Galantamine มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิทิลคอลินเอสเตอเรส $97.69 \pm 0.95\%$)

พบ 14 ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ดี (มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ความเข้มข้น 25 µg/ml > 80%) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดเชื้อรากลุ่ม *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. และ *Trichoderma* sp. จำนวน 10, 3 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่าง ที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Human gingival fibroblast (HGF)) พบว่าทุกตัวอย่างมีพิษต่อเซลล์ปกติมากกว่า 20% (สารมาตรฐานในการทดสอบนี้ คือ Camptothecin โดยมีพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเท่ากับ $94.01 \pm 0.17\%$ และพิษต่อเซลล์ปกติ (HGF) $73.14 \pm 3.63\%$)

สำหรับฤทธิ์ต้านการอักเสบ ผลการทดสอบพบ 39 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี (ยับยั้งการหลั่ง nitric oxide จาก macrophage cell (RAW 264.7) ที่ความเข้มข้น 25 µg/ml > 60%) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อรากลุ่ม *Penicillium* sp. และ *Aspergillus* sp. จำนวน 34 และ 5 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยมี 18 ตัวอย่าง ที่มีพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบมากกว่า 20% ในการทดสอบฤทธิ์ต้าน การอักเสบ ใช้ Indomethacin เป็นสารมาตรฐาน โดยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ $61.08 \pm 0.68 \%$ และมีพิษ ต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ $25.42 \pm 2.99 \%$

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบ 62 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ต้าน เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml > 70%) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อรา กลุ่ม *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. และ *Gongronella* sp. จำนวน 54, 4, 2 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ใช้ Acarbose เป็นสารมาตรฐาน โดยมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส $86.87 \pm 0.66\%$

จากผลการทดลองทั้งหมด พบว่ามี 4 ตัวอย่างที่น่าสนใจ คือ SPSF318BE, SPSF318CE, SPSF224BE และ SPSF224CE โดยตัวอย่างทั้ง 4 ตัว มาจากเชื้อ 2 ชนิด คือ SPSF318 และ SPSF224 ซึ่งเชื้อราทั้งสองเป็นเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* sp. เหมือนกัน โดยเชื้อราทั้งสอง แยกเป็น 2 ตัวอย่าง คือ ส่วนที่เป็นสารสกัดชั้น ethyl acetate ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth, BE) และ ส่วนของสารสกัดชั้น ethyl acetate ของเซลล์ (cell, CE)

เนื่องจากตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อรากลุ่ม *Penicillium* sp. (SPSF318) มีฤทธิ์ต้าน เอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาเพื่อหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเอนไซม์ดังกล่าวค่อนข้างหาได้ยาก นอกจากนั้นตัวอย่างจากส่วนของสารสกัดชั้น ethyl acetate ของเซลล์ (SPSF318CE) ยังมี ฤทธิ์ที่ดีในการ

ด้านการอักเสบ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ดังนั้น *Penicillium* sp. (SPSF318) จึงน่าสนใจ ในการนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compound) ต่อไป

นอกจากนี้ยังมีสารตัวอย่างที่น่าสนใจอีก 2 ตัวอย่าง คือ SPSF224BE และ SPSF224CE เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ดี และตัวอย่างทั้งสองได้จากเชื้อเดียวกัน คือ *Penicillium* sp. (SPSF224) และตัวอย่างทั้งสองยังมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านการอักเสบ โดยไม่เป็นพิษกับเซลล์ที่ใช้ทดสอบ นอกจากนี้ SPSF224CE ยังมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมปานกลาง โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ปกติ ดังนั้น *Penicillium* sp. (SPSF224) จึงเป็นอีกหนึ่งตัวอย่างที่น่าสนใจ ในการนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compound) ต่อไป

เพราะฉะนั้นในการศึกษาครั้งนี้เราสามารถพบสารสกัดที่น่าสนใจ จากเชื้อ *Penicillium* sp. 2 ชนิด คือ SPSF318 และ SPSF224 ที่จะนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compounds) ทางชีวภาพใน ลำดับต่อไป

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง

No.	Extract	Screening activities						
		% Tyrosinase inhibition at 20 µg/ml	% Alpha-glucosidase inhibition at 2 mg/ml	Anti-inflammatory activity at 25 µg/ml Raw 264.7 cells		Cytotoxic activity at 25 µg/ml		% acetylcholine esterase inhibition at 100 µg/ml
				Nitric oxide inhibitory effect	Cytotoxic effect	Human breast cancer (MCF-7)	Human gingival fibroblast (HGF)	
1.	SPSF001BE	9.23 ± 2.81	43.95 ± 3.65	35.39 ± 3.57	-2.13 ± 3.78	18.88 ± 5.36	-	0
2.	SPSF002BE	41.42 ± 3.61	27.80 ± 3.73	43.63 ± 2.78	0.94 ± 1.30	59.42 ± 4.08	-	6.98 ± 4.03
3.	SPSF003BE	-2.80 ± 3.44	99.71 ± 0.29	37.73 ± 2.22	1.26 ± 4.89	11.24 ± 5.36	-	0
4.	SPSF004BE	13.57 ± 4.95	63.98 ± 3.62	32.22 ± 4.55	0.46 ± 3.48	9.90 ± 5.97	-	3.88 ± 3.50
5.	SPSF005BE	7.00 ± 6.84	18.19 ± 4.00	108.64 ± 2.04	85.23 ± 1.71	99.32 ± 0.22	98.47 ± 0.87	12.94 ± 0.68
6.	SPSF006BE	8.41 ± 8.41	50.07 ± 4.29	56.57 ± 3.43	-2.94 ± 2.90	38.63 ± 2.57	-	14.51 ± 2.03
7.	SPSF007BE	2.95 ± 3.24	100.20 ± 0.24	26.24 ± 2.80	2.69 ± 3.39	39.10 ± 1.30	-	7.25 ± 1.40
8.	SPSF008BE	-2.99 ± 5.53	99.55 ± 0.08	23.42 ± 3.15	1.12 ± 1.04	11.78 ± 5.60	-	2.47 ± 3.24
9.	SPSF009BE	45.91 ± 7.53	99.75 ± 0.27	33.71 ± 2.37	3.56 ± 1.95	-3.90 ± 5.39	-	12.40 ± 3.07
10.	SPSF0010BE	30.14 ± 2.16	7.18 ± 5.33	22.95 ± 1.21	3.86 ± 0.92	66.00 ± 4.00	-	43.51 ± 3.16
11.	SPSF0011BE	-10.14 ± 4.46	60.27 ± 2.15	67.69 ± 4.72	2.19 ± 2.64	58.51 ± 3.13	-	0
12.	SPSF0012BE	5.86 ± 6.54	100.56 ± 2.86	51.01 ± 4.30	2.24 ± 2.13	0.85 ± 4.99	-	0
13.	SPSF0013BE	11.64 ± 1.62	70.74 ± 2.30	30.45 ± 3.31	1.08 ± 2.93	85.14 ± 2.70	79.49 ± 0.49	82.50 ± 0.80

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง (ต่อ)

No.	Extract	Screening activities						
		% Tyrosinase inhibition at 20 µg/ml	% Alpha-glucosidase inhibition at 2 mg/ml	Anti-inflammatory activity at 25 µg/ml Raw 264.7 cells		Cytotoxic activity at 25 µg/ml		% Acetylcholine esterase inhibition at 100 µg/ml
				Nitric oxide inhibitory effect	Cytotoxic effect	Human breast cancer (MCF-7)	Human gingival fibroblast (HGF)	
14.	SPSF028BE	-2.21 ± 6.37	99.71 ± 0.29	123.29 ± 2.13	87.81 ± 0.76	92.18 ± 0.15	79.24 ± 2.33	21.39 ± 1.58
15.	SPSF029BE	5.5 ± 4.50	83.63 ± 1.89	123.37 ± 2.04	78.21 ± 0.78	97.10 ± 0.18	89.02 ± 3.92	35.52 ± 1.89
16.	SPSF030BE	10.00 ± 3.96	68.62 ± 7.05 (0.5 mg/mL)	47.42 ± 3.37	10.07 ± 1.76	10.31 ± 2.43	-	22.64 ± 1.79
17.	SPSF031BE	15.04 ± 5.29	98.55 ± 2.69	35.87 ± 1.76	11.89 ± 1.02	34.92 ± 2.62	-	18.69 ± 3.74
18.	SPSF032BE	13.65 ± 1.57	98.05 ± 0.63	21.25 ± 0.86	11.99 ± 1.75	12.00 ± 4.68	-	27.59 ± 3.23
19.	SPSF033BE	5.64 ± 4.71	99.50 ± 0.09	124.72 ± 2.27	76.14 ± 1.16	87.49 ± 1.15	58.22 ± 3.96	22.70 ± 2.69
20.	SPSF034BE	3.50 ± 1.26	91.26 ± 0.65	28.02 ± 2.88	14.27 ± 2.50	4.43 ± 1.57	-	49.12 ± 2.94
21.	SPSF035BE	-4.26 ± 3.93	99.27 ± 0.34	35.93 ± 3.06	14.53 ± 2.47	7.98 ± 0.22	-	20.98 ± 3.17
22.	SPSF037BE	-18.95 ± 2.99	97.61 ± 28.28 (1 mg/mL)	19.86 ± 2.06	22.80 ± 2.69	74.12 ± 1.64	43.65 ± 1.19	22.58 ± 1.19
23.	SPSF039BE	5.5 ± 4.60	76.91 ± 0.55	31.88 ± 2.13	15.02 ± 3.12	5.48 ± 1.90	49.44 ± 4.77	40.00 ± 2.27

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง (ต่อ)

No.	Extract	Screening activities						
		% Tyrosinase inhibition at 20 µg/ml	% Alpha-glucosidase inhibition at 2 mg/ml	Anti-inflammatory activity at 25 µg/ml Raw 264.7 cells		Cytotoxic activity at 25 µg/ml		% Acetylcholine esterase inhibition at 100 µg/ml
				Nitric oxide inhibitory effect	Cytotoxic effect	Human breast cancer (MCF-7)	Human gingival fibroblast (HGF)	
24.	SPSF225CE	19.55 ± 1.45	51.23 ± 1.28	52.13 ± 4.25	16.59 ± 3.59	53.98 ± 0.97	-	23.18 ± 2.40
25.	SPSF225BE	8.10 ± 4.19	88.02 ± 1.71	-2.74 ± 2.57	6.72 ± 2.72	19.33 ± 1.50	-	23.04 ± 0.77
26.	SPSF221CE	18.95 ± 5.54	27.00 ± 2.80	69.44 ± 2.22	54.79 ± 1.63	86.15 ± 1.03	52.91 ± 4.83	24.21 ± 2.31
27.	SPSF221CH	30.18 ± 3.91	18.90 ± 1.20	78.33 ± 1.48	59.95 ± 3.02	89.21 ± 1.18	67.73 ± 3.85	28.84 ± 0.30
28.	SPSF221BE	22.19 ± 3.03	89.86 ± 4.55	81.60 ± 1.59	41.67 ± 1.99	34.61 ± 1.29	-	44.84 ± 3.64
29.	SPSF211CE	5.62 ± 3.89	81.43 ± 3.26	43.32 ± 5.68	17.42 ± 2.90	7.63 ± 1.68	-	31.95 ± 1.35
30.	SPSF211BE	6.45 ± 2.87	101.26 ± 1.73	-26.87 ± 3.20	11.987 ± 4.55	9.84 ± 3.43	-	21.21 ± 1.85
31.	SPSF234CE	8.10 ± 4.19	100.32 ± 0.36	17.71 ± 2.50	18.94 ± 2.47	33.28 ± 1.01	-	22.91 ± 2.17
32.	SPSF234BE	-1.22 ± 3.08	99.97 ± 1.33	7.83 ± 2.73	13.57 ± 3.93	21.58 ± 3.44	-	17.70 ± 1.41
33.	SPSF244CE	13.92 ± 4.20	44.84 ± 1.14	88.40 ± 2.66	22.00 ± 5.72	74.00 ± 0.80	87.68 ± 1.94	42.49 ± 1.45
34.	SPSF244BE	12.51 ± 1.55	51.29 ± 1.87	27.26 ± 2.09	7.28 ± 0.22	16.22 ± 3.81	-	32.85 ± 2.44
35.	SPSF248CH	17.78 ± 4.13	82.27 ± 2.24	41.81 ± 189	0.01 ± 5.91	19.57 ± 3.80	-	19.81 ± 1.02

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง (ต่อ)

No.	Extract	Screening activities						
		% Tyrosinase inhibition at 20 µg/ml	% Alpha-glucosidase inhibition at 2 mg/ml	Anti-inflammatory activity at 25 µg/ml Raw 264.7 cells		Cytotoxic activity at 25 µg/ml		% Acetylcholine esterase inhibition at 100 µg/ml
				Nitric oxide inhibitory effect	Cytotoxic effect	Human breast cancer (MCF-7)	Human gingival fibroblast (HGF)	
36.	SPSF248CE	6.23 ± 3.60	69.61 ± 0.79	95.63 ± 2.32	-4.28 ± 5.95	61.16 ± 1.78	-	25.12 ± 2.71
37.	SPSF248BE	4.15 ± 2.98	86.91 ± 1.94	103.34 ± 1.94	35.60 ± 0.45	81.46 ± 1.08	66.48 ± 4.04	18.23 ± 1.25
38.	SPSF236BE	24.43 ± 5.01	61.00 ± 2.34	45.59 ± 1.35	16.54 ± 5.70	27.39 ± 1.34	-	38.59 ± 0.98
39.	SPSF236CE	11.55 ± 1.39	52.05 ± 2.73	55.46 ± 4.41	15.75 ± 2.32	31.16 ± 2.54	-	52.72 ± 0.59
40.	SPSF209CE	-13.64 ± 1.26	60.34 ± 1.41	56.99 ± 0.99	4.97 ± 5.9	25.51 ± 1.83	-	35.74 ± 2.23
41.	SPSF209BE	6.51 ± 1.71	84.76 ± 2.89	30.29 ± 5.10	14.50 ± 2.98	19.36 ± 1.96	-	27.04 ± 1.38
42.	SPSF213BE	22.09 ± 3.88	64.55 ± 0.98	32.73 ± 2.66	11.35 ± 1.45	1.12 ± 2.28	-	35.71 ± 2.11
43.	SPSF238CE	1.11 ± 0.89	54.05 ± 1.68	48.16 ± 1.83	22.35 ± 2.05	51.68 ± 1.10	-	27.00 ± 0.55
44.	SPSF208BE	7.39 ± 4.50	98.31 ± 1.19	49.56 ± 1.84	3.63 ± 3.35	30.30 ± 3.79	-	7.94 ± 0.84
45.	SPSF208CE	-3.78 ± 2.84	56.45 ± 2.57	87.78 ± 4.80	47.18 ± 0.96	69.91 ± 2.07	-	0 ± 1.36
46.	SPSF208CH	-3.25 ± 3.56	69.61 ± 0.79	53.48 ± 0.87	8.58 ± 5.15	31.94 ± 1.39	-	16.86 ± 1.34
47.	SPSF226BE	0.46 ± 4.19	86.91 ± 1.94	55.37 ± 1.36	18.10 ± 1.13	40.49 ± 2.47	-	5.90 ± 1.05

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง (ต่อ)

No.	Extract	Screening activities						
		% Tyrosinase inhibition at 20 µg/ml	% Alpha-glucosidase inhibition at 2 mg/ml	Anti-inflammatory activity at 25 µg/ml Raw 264.7 cells		Cytotoxic activity at 25 µg/ml		% Acetylcholine esterase inhibition at 100 µg/ml
				Nitric oxide inhibitory effect	Cytotoxic effect	Human breast cancer (MCF-7)	Human gingival fibroblast (HGF)	
48.	SPSF226CE	4.10 ± 1.13	54.70 ± 4.90	55.82 ± 2.54	5.38 ± 2.55	28.49 ± 1.82	-	25.60 ± 1.61
49.	SPSF226CH	30.88 ± 1.27	29.86 ± 3.83	47.69 ± 1.43	16.99 ± 1.99	30.81 ± 1.64	-	8.85 ± 2.47
50.	SPSF227BE	11.61 ± 2.77	57.93 ± 1.11	59.60 ± 2.51	9.87 ± 3.11	35.95 ± 2.81	-	9.16 ± 2.13
51.	SPSF227CE	5.07 ± 1.52	18.55 ± 0.16	79.97 ± 1.55	3.58 ± 0.07	43.53 ± 1.70	-	44.20 ± 0.22
52.	SPSF240BE	36.63 ± 1.88	93.63 ± 2.19	37.60 ± 0.75	3.44 ± 2.64	14.99 ± 2.80	-	11.22 ± 1.89
53.	SPSF240CE	17.83 ± 4.89	62.57 ± 3.85	68.24 ± 1.09	7.45 ± 3.44	60.05 ± 2.44	-	13.57 ± 1.46
54.	SPSF240CH	11.70 ± 3.53	77.42 ± 4.69	84.38 ± 2.40	16.16 ± 2.69	67.47 ± 1.55	-	15.57 ± 2.67
55.	SPSF310BE	0.29 ± 3.10	119.00 ± 2.91	40.05 ± 2.46	-24.76 ± 6.66	15.08 ± 2.77	-	8.69 ± 1.75
56.	SPSF310CE	4.57 ± 2.92	67.96 ± 2.27	71.33 ± 3.08	-7.60 ± 7.98	20.42 ± 1.30	-	32.19 ± 1.25
57.	SPSF318BE	78.83 ± 2.72	53.42 ± 1.51	53.16 ± 1.44	2.73 ± 2.20	21.58 ± 2.80	-	13.09 ± 2.56
58.	SPSF318CE	72.45 ± 3.55	53.04 ± 1.44	84.00 ± 2.30	18.05 ± 1.50	84.27 ± 1.10	60.82 ± 4.86	22.42 ± 1.93
59.	SPSF325BE	26.81 ± 4.71	100.00 ± 00	25.83 ± 1.72	4.16 ± 1.89	70.96 ± 4.20	45.06 ± 2.13	21.27 ± 1.46

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง (ต่อ)

No.	Extract	Screening activities						
		% Tyrosinase inhibition at 20 µg/ml	% Alpha-glucosidase inhibition at 2 mg/ml	Anti-inflammatory activity at 25 µg/ml Raw 264.7 cells		Cytotoxic activity at 25 µg/ml		% Acetylcholine esterase inhibition at 100 µg/ml
				Nitric oxide inhibitory effect	Cytotoxic effect	Human breast cancer (MCF-7)	Human gingival fibroblast (HGF)	
60.	SPSF325CE	7.31 ± 3.17	100.00 ± 00	25.98 ± 3.36	17.27 ± 2.27	34.52 ± 2.06	-	32.39 ± 1.37
61.	SPSF325CH	0.06 ± 4.45	100.00 ± 00	31.76 ± 6.15	22.57 ± 1.83	17.53 ± 3.26	-	18.91 ± 3.91
62.	SPSF329BE	12.26 ± 3.79	86.27 ± 3.19	27.53 ± 2.42	13.96 ± 3.06	-2.60 ± 1.63	-	37.64 ± 3.91
63.	SPSF329CE	5.28 ± 1.96	100.00 ± 00	-0.92 ± 2.54	20.46 ± 5.41	78.68 ± 1.47	28.13 ± 1.49	21.06 ± 2.21
64.	SPSF329CH	2.02 ± 4.68	100.00 ± 00	10.69 ± 1.47	35.15 ± 4.35	55.29 ± 2.21	-	24.37 ± 1.23
65.	SPSF330BE	16.57 ± 4.92	55.29 ± 2.57	61.32 ± 1.49	16.57 ± 1.97	36.87 ± 4.10	-	7.77 ± 0.52
66.	SPSF330CE	3.29 ± 2.62	98.49 ± 1.23	37.64 ± 1.56	11.59 ± 1.39	15.18 ± 1.16	-	11.31 ± 3.29
67.	SPSF339BE	9.96 ± 2.36	94.35 ± 0.69	105.03 ± 0.62	57.78 ± 2.05	85.23 ± 0.23	73.88 ± 4.26	12.69 ± 1.83
68.	SPSF339CE	2.90 ± 1.79	96.87 ± 0.60	98.44 ± 0.57	16.25 ± 3.11	24.43 ± 2.10	-	26.65 ± 0.63
69.	SPSF339BT	4.58 ± 2.58	51.24 ± 0.25	70.23 ± 1.10	3.53 ± 2.59	78.80 ± 1.50	88.84 ± 3.20	5.05 ± 2.93
70.	SPSF358BE	-5.49 ± 1.99	59.77 ± 3.95	9.41 ± 1.05	9.31 ± 0.86	10.20 ± 1.39	-	0 ± 3.71
71.	SPSF358CE	1.55 ± 0.82	98.90 ± 3.72	28.65 ± 1.01	5.22 ± 4.23	16.98 ± 2.24	-	8.47 ± 2.63

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง (ต่อ)

No.	Extract	Screening activities						
		% Tyrosinase inhibition at 20 µg/ml	% Alpha-glucosidase inhibition at 2 mg/ml	Anti-inflammatory activity at 25 µg/ml Raw 264.7 cells		Cytotoxic activity at 25 µg/ml		% Acetylcholine esterase inhibition at 100 µg/ml
				Nitric oxide inhibitory effect	Cytotoxic effect	Human breast cancer (MCF-7)	Human gingival fibroblast (HGF)	
72.	SPSF206CM	10.48 ± 4.53	17.98 ± 2.89	29.19 ± 3.30	20.58 ± 2.08	10.60 ± 1.28	-	23.96 ± 1.41
73.	SPSF360BE	31.11 ± 2.97	32.08 ± 0.15	105.04 ± 0.89	72.32 ± 0.71	97.33 ± 0.10	79.00 ± 0.96	36.34 ± 1.59
74.	SPSF360CH	24.38 ± 1.71	13.12 ± 4.26	105.22 ± 1.07	89.32 ± 0.29	98.90 ± 0.20	105.42 ± 0.96	16.35 ± 2.04
75.	SPSF360BT	-34.93 ± 2.96	64.63 ± 1.57	30.96 ± 1.57	27.93 ± 1.43	6.74 ± 1.61	-	8.12 ± 2.36
76.	SPSF206BE	27.18 ± 2.53	79.43 ± 1.19	66.72 ± 1.47	12.77 ± 2.51	47.12 ± 1.08	-	43.62 ± 1.75
77.	SPSF209BT	-24.20 ± 1.87	27.98 ± 3.35	23.05 ± 2.55	15.63 ± 2.04	3.10 ± 2.20	-	15.55 ± 3.76
78.	SPSF219BE	-32.06 ± 2.45	98.29 ± 3.64	72.42 ± 1.29	8.92 ± 1.74	61.34 ± 0.95	-	41.31 ± 3.04
79.	SPSF224BE	22.17 ± 1.54	104.83 ± 3.40	76.13 ± 2.25	15.84 ± 1.85	46.84 ± 2.28	-	22.06 ± 2.20
80.	SPSF224CE	-3.75 ± 1.68	100.00 ± 0.00	91.07 ± 2.32	22.83 ± 1.79	76.62 ± 1.39	-12.90 ± 6.26	27.26 ± 0.91
81.	SPSF227BT	-7.96 ± 1.62	91.04 ± 0.19	21.39 ± 3.31	17.16 ± 2.36	0.29 ± 1.10	-	22.28 ± 1.96
82.	SPSF234BT	-47.56 ± 2.36	74.81 ± 2.17	21.58 ± 3.09	18.51 ± 2.54	-5.90 ± 1.40	-	14.08 ± 1.32
83.	SPSF241BE	-2.47 ± 1.79	85.43 ± 0.48	65.92 ± 1.54	11.48 ± 4.19	22.65 ± 2.12	-	30.34 ± 2.06

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง (ต่อ)

No.	Extract	Screening activities						
		% Tyrosinase inhibition at 20 µg/ml	% Alpha-glucosidase inhibition at 2 mg/ml	Anti-inflammatory activity at 25 µg/ml Raw 264.7 cells		Cytotoxic activity at 25 µg/ml		% Acetylcholine esterase inhibition at 100 µg/ml
				Nitric oxide inhibitory effect	Cytotoxic effect	Human breast cancer (MCF-7)	Human gingival fibroblast (HGF)	
84.	SPSF250BE	-4.19 ± 2.30	103.70 ± 2.01	56.98 ± 4.65	55.96 ± 0.61	3.42 ± 1.73	-	15.02 ± 1.87
85.	SPSF304BE	22.76 ± 2.35	84.80 ± 0.74	82.98 ± 1.31	8.60 ± 3.55	59.79 ± 4.21	-	36.79 ± 1.73
86.	SPSF304CH	-9.09 ± 1.49	100.00 ± 0.00	92.93 ± 2.39	17.96 ± 2.27	69.50 ± 1.85	-	27.77 ± 261
87.	SPSF304BT	-3.05 ± 1.46	52.97 ± 1.23	51.44 ± 3.15	20.26 ± 1.69	6.56 ± 3.73	-	45.79 ± 2.58
88.	SPSF310BT	10.21 ± 1.15	84.37 ± 2.21	62.61 ± 1.34	20.82 ± 3.09	11.83 ± 4.56	-	23.94 ± 2.56
89.	SPSF312BE	35.05 ± 2.55	85.73 ± 1.09	85.23 ± 2.13	15.40 ± 2.22	86.36 ± 0.88	75.16 ± 4.30	27.86 ± 2.51
90.	SPSF312CE	-22.36 ± 3.58	79.36 ± 1.75	80.29 ± 5.31	26.00 ± 2.61	64.01 ± 2.36	-	12.74 ± 2.98
91.	SPSF328BE	27.41 ± 3.50	100.00 ± 0.00	38.77 ± 2.39	4.96 ± 3.75	31.69 ± 4.20	-	23.60 ± 2.27
92.	SPSF347BE	-1.02 ± 4.21	77.16 ± 2.57	39.60 ± 3.54	16.07 ± 1.66	24.57 ± 3.57	-	42.84 ± 2.76
93.	SPSF358BT	6.21 ± 0.95	83.21 ± 3.35	23.88 ± 2.73	10.81 ± 1.03	-2.36 ± 1.44	-	21.40 ± 2.60
94.	SPSF038BE	23.12 ± 4.82	36.72 ± 1.52	29.12 ± 2.91	15.58 ± 1.68	3.40 ± 3.60	-	40.55 ± 2.57
95.	SPSF040BE	-13.86 ± 4.03	96.72 ± 0.82	36.10 ± 4.11	18.17 ± 0.53	5.27 ± 2.84	-	49.39 ± 2.43

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง (ต่อ)

No.	Extract	Screening activities						
		% Tyrosinase inhibition at 20 µg/ml	% Alpha-glucosidase inhibition at 2 mg/ml	Anti-inflammatory activity at 25 µg/ml Raw 264.7 cells		Cytotoxic activity at 25 µg/ml		% Acetylcholine esterase inhibition at 100 µg/ml
				Nitric oxide inhibitory effect	Cytotoxic effect	Human breast cancer (MCF-7)	Human gingival fibroblast (HGF)	
96.	SPSF042BE	24.47 ± 1.91	66.24 ± 4.05	91.71 ± 5.17	11.45 ± 2.89	64.38 ± 4.08	-	48.07 ± 2.85
97.	SPSF043BE	24.49 ± 2.73	96.87 ± 0.34	81.32 ± 1.14	7.58 ± 2.08	24.63 ± 1.65	-	29.21 ± 2.84
98.	SPSF044BE	18.04 ± 2.63	61.11 ± 0.51	101.08 ± 1.85	47.26 ± 2.26	75.90 ± 0.76	39.00 ± 1.40	30.43 ± 3.63
99.	SPSF045BE	58.04 ± 1.46	82.56 ± 0.96	47.38 ± 2.42	14.09 ± 3.07	19.99 ± 2.34	-	20.51 ± 1.46
100.	SPSF046BE	14.65 ± 1.78	82.54 ± 2.91	36.26 ± 2.46	17.26 ± 0.64	2.76 ± 4.27	-	24.83 ± 2.52
101.	SPSF047BE	14.94 ± 2.83	91.51 ± 0.68	67.22 ± 1.75	15.86 ± 2.28	17.17 ± 2.44	-	63.16 ± 1.00
102.	SPSF048CE	5.05 ± 0.22	88.92 ± 1.42	45.87 ± 2.66	15.37 ± 1.10	1.48 ± 1.96	-	43.15 ± 2.94
103.	SPSF049BT	4.51 ± 2.35	54.69 ± 3.32	100.73 ± 2.93	16.54 ± 0.58	73.93 ± 0.94	-	53.63 ± 0.43
104.	SPSF051BT	6.24 ± 3.40	91.44 ± 2.23	95.85 ± 3.58	47.76 ± 2.91	95.54 ± 3.12	93.34 ± 2.48	65.41 ± 2.08

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากสารสกัดเชื้อราจากดินพรุโต๊ะแดง จำนวน 104 ตัวอย่าง (ต่อ)

No.	Extract	Screening activities						
		% Tyrosinase inhibition at 20 µg/ml	% Alpha-glucosidase inhibition at 2 mg/ml	Anti-inflammatory activity at 25 µg/ml Raw 264.7 cells		Cytotoxic activity at 25 µg/ml		% Acetylcholine esterase inhibition at 100 µg/ml
				Nitric oxide inhibitory effect	Cytotoxic effect	Human breast cancer (MCF-7)	Human gingival fibroblast (HGF)	
Std.	Acarbose		86.87 ± 0.66	-	-	-	-	-
	ปวกหาด	98.82 ± 3.97	-	-	-	-	-	-
	Kojic acid	75.46 ± 1.80	-	-	-	-	-	-
	Camptothecin	-	-	-	-	94.01 ± 0.17	73.14 ± 3.63	-
	Galantamine	-	-	-	-	-	-	97.69 ± 0.95
	Indomethacin	-	-	61.08 ± 0.68	25.42 ± 2.99	-	-	-

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 104 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดจากเชื้อ *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Gongronella* sp., *Penicillium* sp. จำนวน 4, 12, 2 และ 83 ตัวอย่าง ตามลำดับ และอีก 3 ตัวอย่างที่ ขณะนี้ยังไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเราได้ (unidentified) ว่าเป็นเชื้อชนิดใด โดยนำตัวอย่าง ทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 5 อย่าง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (รักษาความผิดปกติของเม็ดสี) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส (รักษาเบาหวาน) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลินเอสเตอเรส (รักษาโรคสมองเสื่อม, Alzheimer's disease) ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (รักษาโรคมะเร็ง) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (รักษาอาการอักเสบต่างๆ)

จากผลการทดลอง พบว่ามี 3 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากเชื้อ *Penicillium* sp. มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส > 50% ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml) ได้แก่ SPSF0318BE, SPSF0318CE และ SPSF045BE (สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ ปวกหาด (water extract of *Artocarpus lakoocha*) และ kojic acid โดยมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 98.82 ± 3.97 และ $75.46 \pm 1.80\%$ ตามลำดับ)

และพบ 1 ตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลินเอสเตอเรสที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลินเอสเตอเรส > 80% ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml) ได้แก่ SPSF013BE (*Trichoderma* sp.) (สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ Galantamine มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลินเอสเตอเรส $97.69 \pm 0.95\%$)

พบ 14 ตัวอย่างมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ดี (มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ความเข้มข้น 25 µg/ml > 80%) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. และ *Trichoderma* sp. จำนวน 10, 3 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่าง ที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Human gingival fibroblast (HGF)) พบว่า ทุกตัวอย่างมีพิษต่อเซลล์ปกติมากกว่า 20% (สารมาตรฐานในการทดสอบนี้ คือ Camptothecin โดยมีพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเท่ากับ $94.01 \pm 0.17\%$ และพิษต่อเซลล์ปกติ (HGF) $73.14 \pm 3.63\%$)

สำหรับฤทธิ์ต้านการอักเสบ ผลการทดสอบพบ 39 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี (ยับยั้งการผลิต nitric oxide จาก macrophage cell (RAW 264.7) ที่ความเข้มข้น 25 µg/ml > 60%) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* sp. และ *Aspergillus* sp. จำนวน 34 และ 5 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยมี 18 ตัวอย่าง ที่มีพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบมากกว่า 20% ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ใช้ Indomethacin เป็นสารมาตรฐาน โดยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ $61.08 \pm 0.68 \%$ และมีพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ $25.42 \pm 2.99 \%$

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส พบ 62 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ต้าน เอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดสที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml > 70%) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อรา กลุ่ม *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. และ

Gongronella sp. จำนวน 54, 4, 2 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ใช้ Acarbose เป็นสารมาตรฐาน โดยมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส $86.87 \pm 0.66\%$

จากผลการทดลองทั้งหมด พบว่ามี 4 ตัวอย่างที่น่าสนใจ คือ SPSF318BE, SPSF318CE, SPSF224BE และ SPSF224CE โดยตัวอย่างทั้ง 4 ตัว มาจากเชื้อ 2 ชนิด คือ SPSF318 และ SPSF224 ซึ่งเชื้อราทั้งสองเป็นเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* sp. เหมือนกัน โดยเชื้อราทั้งสอง แยกเป็น 2 ตัวอย่าง คือ ส่วนที่เป็นสารสกัดชั้น ethyl acetate ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth, BE) และ ส่วนของสารสกัดชั้น ethyl acetate ของเซลล์ (cell, CE)

เนื่องจากตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* sp. (SPSF318) มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาเพื่อหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเอนไซม์ดังกล่าวค่อนข้างหาได้ยาก นอกจากนั้นตัวอย่างจากส่วนของสารสกัดชั้น ethyl acetate ของเซลล์ (SPSF318CE) ยังมี ฤทธิ์ที่ดีในการต้านการอักเสบ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ดังนั้น *Penicillium* sp. (SPSF318) จึงน่าสนใจในการนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compound) ต่อไป

นอกจากนั้นยังมีสารตัวอย่างที่น่าสนใจอีก 2 ตัวอย่าง คือ SPSF224BE และ SPSF224CE เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ดี และตัวอย่างทั้งสองได้จากเชื้อเดียวกัน คือ *Penicillium* sp. (SPSF224) และตัวอย่างทั้งสองยังมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านการอักเสบ โดยไม่เป็นพิษกับเซลล์ที่ใช้ทดสอบ นอกจากนั้น SPSF224CE ยังมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมปานกลาง โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ปกติ ดังนั้น *Penicillium* sp. (SPSF224) จึงเป็นอีกหนึ่งตัวอย่างที่น่าสนใจ ในการนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compound) ต่อไป

เพราะฉะนั้นจากการศึกษาครั้งนี้เราสามารถพบสารสกัดที่น่าสนใจ จากเชื้อ *Penicillium* sp. 2 ชนิด คือ SPSF318 และ SPSF224 ที่จะนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compounds) ทางชีวภาพในโครงการลำดับต่อไป (โครงการ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเชื้อรา จากดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส)

อนึ่ง จากผลของโครงการต่อเนื่องจากโครงการนี้ (โครงการองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเชื้อรา จากดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส) เมื่อนำ SPSF318 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี และ SPSF224 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ที่ดี ส่งจำแนกชนิดจุลินทรีย์ โดยใช้ Molecular method พบว่า SPSF318 เป็นเชื้อราชนิด *Aspergillus flavus* (ซึ่งต่างจากผลการศึกษา ลักษณะทาง morphology เดิมคาดว่า SPSF318 เป็นเชื้อราในสกุล *Penicillium*) สำหรับ SPSF224 เป็นเชื้อราชนิด *Penicillium maximae*

โดยสรุปพบว่า พื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส เป็นแหล่งที่ตรวจพบเชื้อราที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ดังนั้นพื้นที่ดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจ ที่จะใช้เป็นแหล่งศึกษาเกี่ยวกับสารจากธรรมชาติ โดยเฉพาะการหาสารใหม่ที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาต้นแบบ (lead compound) ในการรักษาโรคต่างๆต่อไป

อุปสรรคสำคัญในการศึกษากลุ่มเชื้อราคือ การพิสูจน์เอกลักษณ์ชนิดของเชื้อรา เนื่องจากการใช้ลักษณะทาง morphology อาจคลาดเคลื่อน ต้องใช้ molecular method ซึ่งเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง หากใช้เทคนิคนี้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อราทุกชนิด จึงแก้ปัญหาด้วยการใช้การพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้น

โดยการใช้ morphology และเมื่อมีเชื้อราที่น่าสนใจ ที่จะศึกษาต่อ จะต้องยืนยันชนิดของเชื้อราอีกครั้งโดยการใช้ molecular method เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อราทั้งหมดด้วยวิธีดังกล่าว

หมายเหตุ: งานวิจัยชิ้นนี้ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวิชาการในวารสารระดับนานาชาติ ในฐานข้อมูล Web of Science 2 ฉบับ (ภาคผนวก) ดังนี้:

- **Dej-adisai, S.***, Basow, N., Wattanapiromsakul, C., Nuankaew, W., Kang, T.H. (2021) Effect of isolated soil fungi from Sirindhorn Peat Swamp Forest Narathiwat province, Thailand on tyrosinase enzyme and melanin content. *Chiang Mai Journal of Science*, 48(1): 27-41.
- **Dej-adisai, S.***, Kaewchutima, N., Wattanapiromsakul, C. & Phoopha, S. (2021) Biological activities and chemical profiles of selected soil fungi isolated from Sirindhorn Peat Swamp Forest of Narathiwat, Thailand. *Sains Malaysiana*. 50(9): 2563-2577.

เอกสารอ้างอิง

- วรชัย รัตนธรราช. 2541. ตำราการรักษาโรคมะเร็ง 2. กรุงเทพฯ: โอเอสติก พับลิชชิ่ง.
- สุรเกียรติ์ อาชานุกาพ. 2551. ตำราการตรวจโรคทั่วไป 2: 350 โรคกับการดูแลรักษาและการป้องกัน. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: โอเอสติก พับลิชชิ่ง.
- Battaini G., Monzani E., Casella L., Santagostini L., and Pagliarin R. 2000. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. **J. Biol. Inorg. Chem.** 5 (2): 262-268
- Attasara P. and Buasom R. 2011. **Hospital-based cancer registry 2010**. Bangkok: Cancer registry Unit National Cancer Institute.
- Banskota A.H., Tezuka Y., Nguyen N.H., Awale S., Nobukawa T., and Kadota S. 2003. DPPH radical scavenging and nitric oxide inhibitory activities of the constituents from the wood of *Taxus yunnanensis*. **Planta Med.**, 69: 500-505.
- Chan J.O.T., Arsianti A., Marcelia M., Wijoyo S.J., Fadilah F., and Putrianingsih R. 2018. Synthesis and anticancer effect of 3, 4, 5-N-alkyl-benzamides on colon carcinoma HCT-116 cells. **Orient. J. Chem.** 34 (3): 1362-1367.
- Choudhary M.I., Shah S.A.A., Khan S.N., and Khan M.T.H. 2010. Alpha-glucosidase and tyrosinase inhibitors from fungal hydroxylation of tibolone and hydroxytibolones. **Steroids.** 75 (12): 956-966.
- Cui H., Liu Y., Nie Y., Liu Z., Chen S., Zhang Z., Lu Y., He L., Huang X. and She Z. 2016. Polyketides from the mangrove-derived endophytic fungus *Nectria* sp. HN001 and their α -glucosidase inhibitory activity. **Mar. Drugs**, 14(5): 86-94.
- Dej-adisai S. and Pitakbut T. 2015. Determination of α -glucosidase inhibitory activity from selected Fabaceae plants. **Pak. J. Pharm. Sci.** 8 (5):1679-1683.
- Dewi R.T., Tachibana S. and Darmawan A. 2014. Effect on α -glucosidase inhibition and antioxidant activities of butyrolactone derivatives from *Aspergillus terreus* MC751. **Med. Chem. Res.**, 23(1): 454-460.
- Fatmawati S., Shimizu K. and Kondo R. 2011. Ganoderol B: A potent α -glucosidase inhibitor isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. **Phytomed.**, 18(12): 1053-1055.
- Huang H., Feng X., Xiao Z., Liu L., Li H., Ma L., Lu Y., Ju J., She Z. and Lin Y. 2011. Azaphilones and *p*-terphenyls from the mangrove endophytic fungus *Penicillium chermesinum* (ZH4-E2) isolated from the South China Sea. **J. Nat. Prod.**, 74(5): 997-1002.
- IDF Diabetes Atlas update, 2013 [cited 2014 Nov 1]. Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas/introduction/summary>
- Ingavat N., Dobereiner J., Wiyakrutta S., Mahidol C., Ruchirawat S. and Kittakoop P. 2009. Aspergillusol A, an alpha-glucosidase inhibitor from the marine-derived fungus *Aspergillus aculeatus*. **J. Nat. Prod.**, 72(11): 2049-2052.

- Kang H.S., Jin H.C., Won K.C., Jong C.P., and Jae S.C. 2004. A sphingolipid and tyrosinase inhibitors from the fruiting body of *Phellinus linteus*. **Arch. Pharm. Res.** 27 (7): 742–750.
- Kim Y.J. and Uyama H. 2005. Review tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, **Cell. Mol. Life Sci.**, 62: 1707-1723.
- Kim Y.J. and Uyama H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cell. Mol. Life Sci.** 62 (15): 1707–1723.
- Kim Y.K., Nam A.K., Kurihara H. and Kim M.S. 2008. Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red algae *Grateloupia elliptica*. **Phytochem.** 60. 2820–2825.
- Kim Y.K., Nam A.K., Kurihara H. and Kim M.S. 2008. Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. **Phytochem.**, 60: 2820–2825.
- Lee S., Ullah S., Park C., Lee H.W., Kang D., Yang J. and Moon H.R. 2019. Inhibitory effects of N-(acryloyl) benzamide derivatives on tyrosinase and melanogenesis. **Bioorg. Med. Chem.** 27 (17): 3929-3937.
- Lee S.H., Choi S.H., Kim H., Hwang J.S., Lee B.G., Gao J.J. and Kim, S.Y. 2002. Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis, **Biol. Pharm. Bull.**, 25(8): 1045-1048.
- Likhitwitayawuid K. and Sritularak, B. 2001. A new dimeric stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Artocarpus gomezianus*, **J. Nat. Prod.**, 64: 1457-1459.
- Likhitwitayawuid, K. 2008. Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity, **Curr. Sci.**, 94(1): 44-52.
- Liu Y., Chen S., Liu Z., Lu Y., Xia G., Liu H., He L. and She Z. 2015. Bioactive metabolites from mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. 16-5B. **Mar. Drugs**, 13(5): 3091-3102.
- Lorian V. 2005. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Lu R., Liu X., Gao S., Zhang W., Peng F., Hu F. and Li, Z. 2014. New tyrosinase inhibitors from *Paecilomyces gunnii*. **J. Agric. Food Chem.** 62 (49): 11917–11923.
- National Cancer Institute. 2012. ความรู้เรื่องมะเร็ง. National Cancer Institute 2012 [cited 25 April 2012]. Available from <http://www.nci.go.th/knowledge/index.html>.
- Radhakrishnan N., Phil M., Gnanamani A. and Sadulla S. 2005. Effect of licorice (*Glycyhrriza glabra* Linn.), a skin-whitening agent on black molly (*Poecilia latipinna*), **J. of Appl. Cosmetol.**, 23(4):149-158.
- Rhee I.K., van der Meent M., Ingkaninan K., Verpoorte R. 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **J. of Chromato A.** 915: 217–223.
- Riley P.A. 1993. Mechanistic aspects of the control of tyrosinase activity, **Pigment Cell Res.**, 6: 182-185.

- Rungprom W., Siripornvisal S. and Lianthong S. 2009. Alpha-glucosidase inhibitor from *Morina oleifera* Lamk. **Thai J. Agric. Sci.** 40(Suppl.): 49-52.
- Rungprom W., Siripornvisal, S., and Lianthong, S. 2009. α -glucosidase inhibitor from *Moringa oleifera* Lamk. **Thai J. Agri. Sci.**, 40 (Suppl.): 49-52.
- Sasaki K. and Yoshizaki F. 2002. Nobiletin as a tyrosinase inhibitor from the peel of *Citrus* fruit. **Biol. Pharm. Bull.** 25 (6): 806-808.
- Sasaki, K. and Yoshizaki, F. 2002. Nobiletin as tyrosinase inhibitor from the peel of *Citrus* fruit, **Biol. Pharm. Bull.**, 25(6): 806-808.
- Sharma V.K., Jinsuk C., Niti S., Miyoung C. and Sung-Yum S. 2004. *In vitro* anti-tyrosinase activity of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural isolated from *Dictyophora indusiata*. **Phytother. Res.** 18 (10): 841-844.
- Shen X., Yongyun Z., Yongkai X., Jingfeng Z. and Hongbin Z. 2016. Total synthesis of dimeric HPI alkaloids. **Nat. Prod. Bioprospect.** 6 (2): 117-139.
- Shoeb M. 2006. Anticancer agents from medicinal plants. **Bangladesh J. Pharmacol.** 1:35-41.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer. Inst.** 82:1107-1112.
- Sritularak B., De-eknamkul W. and Likhitwitayawuid K. 1998. Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus lakoocha*. **Thai J. Pharm. Sci.**, 22(4): 149-155.
- Sun K., Ye L., Lei G., Yi W., Peipei L. and Weiming Z. 2014. Indole diterpenoids and isocoumarin from the fungus, *Aspergillus flavus*, isolated from the prawn, *Penaeus vannamei*. **Mar. Drugs** 12 (7): 3970-3981.
- Tengamnuay, P., Pengrungruangwong, K., Pheansri, I., and Likhitwitayawuid, K. 2006. *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the *in vitro* anti-tyrosinase and *in vivo* skin whitening activities. **Int. J. Cosmet. Sci.**, 28: 269-276.
- Tryznowski M., Żółek-Tryznowska Z., Świdarska A. and Parzuchowski P.G. 2016. Synthesis, characterization and reactivity of a six-membered cyclic glycerol carbonate bearing a free hydroxyl group. **Green Chem.** 18 (3): 802-807.
- Uchida R., Seiko I. and Hiroshi T. 2014. Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. **Acta Pharm. Sin. B.** 4 (2): 141-145.
- Visagie C.M., Houbraken J., Frisvad J.C., Hong S.B., Klaassen C.H.W., Perrone G., Seifert K.A., Varga J., Yaguchi T. and Samson R.A. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Stud. Mycol.** 78: 343-371.
- Visagie C.M., Houbraken J., Rodrigues C., Silva P.C., Dijksterhuis J., Seifert K.A., Jacobs K., Samson R.A. 2013. Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: a tribute to the Dutch Royal family. **Persoonia.** 31:42-62.

- Walker J.M., Winder J.S. and Kellam S.J. 1995. High-throughput microtiter plate-based chromogenic assays for glycosidase inhibitors. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 38. 141-146.
- Walker, J.M., Winder, J.S., and Kellam, S.J. 1995. High-Throughput Microtiter Plate-Based Chromogenic Assays for Glycosidase Inhibitors. **App. Biochem. and Biotech.**, 38. 141-146.
- Wang K., Bao L., Xiong W., Ma K., Han J., Wang W., Yin W. and Liu H. 2015. Lanostane triterpenes from the Tibetan medicinal mushroom *Ganoderma leucocontextum* and their Inhibitory effects on HMG-CoA reductase and α -glucosidase. **J. Nat. Prod.**, 78(8): 1977-1989.
- Xia X., Qi J., Liu Y., Jia A., Zhang Y., Liu C., Gao C. and She Z. 2015. Bioactive isopimarane diterpenes from the fungus, *Epicoccum* sp. HS-1, associated with *Apostichopus japonicus*. **Mar. Drugs**, 13(3): 1124-1132.
- Ying Y.M., Zhang L.Y., Zhang X., Bai H.B., Liang D.E., Ma L.F., Shan W.G. and Zhan Z.J. 2014. Terpenoids with alpha-glucosidase inhibitory activity from the submerged culture of *Inonotus obliquus*. **Phytochem.**, 108: 171-176.
- You Q., Chen F., Wang X., Luo P.G. and Jiang Y. 2011. Inhibitory effects of muscadine anthocyanins on α -glucosidase and pancreatic lipase activities. **J. Agric. Food Chem.** 59. 9506–9511.
- You Q., Chen F., Wang X., Luo P.G. and Jiang Y. 2011. Inhibitory Effects of muscadine anthocyanins on α -Glucosidase and pancreatic lipase activities. **J. Agri. And Food Chem.** 59: 9506–9511.

ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล: ผศ.ดร. สุกัญญา เดชอดิศัย

(Assist.Prof.Dr. Sukanya Dej-adisai)

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน: 3 9005 00045 35 2

ประวัติการศึกษา

วุฒิ	สาขา	สถาบัน	ประเทศ	ปีที่จบ
Dr.rer.nat	Pharmaceutical Biology	Ruprecht-Karls- Universitaet Heidelberg	สหพันธ์สาธารณรัฐ เยอรมนี	2548
ภ.ม.	เภสัชเวช	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย	2541
ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	ไทย	2539

(เกียรตินิยมอันดับ 2)

ตำแหน่งบริหาร หัวหน้าภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ (พฤศจิกายน 2550-สิงหาคม 2559)
หัวหน้าภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ (พฤศจิกายน 2560-17 กรกฎาคม 2563)
หัวหน้าสาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ (18 กรกฎาคม 2563-ปัจจุบัน)

ตำแหน่งปัจจุบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สาขาวิชา/คณะ/หน่วยงาน

สาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

โทรศัพท์/โทรสาร/e-mail

โทรศัพท์ 074-288888, 086-9687822
โทรสาร 074-288891
E-mail: sukanya.d@psu.ac.th

Publications:

- Itharat, A., Sungkarak, S., **Dej-adisai, S.**, and Eng, S. (1997) Stability of *Aloe Vera* powder and *Aloe Vera* powder with diluent by hemagglutination titration. . *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 19:437-443.
- **Dej-adisai, S. *** (1997) Quinone from roots of *Prismatomeris sessiliflora* and *Diospyros montana* (Master thesis, Master of Science in Pharmacy (Pharmacognosy)), Graduate School, Chulalongkorn University.
- Likhitwitayawuid, K., **Dej-adisai, S.**, Jongbunprasert, V., Krungkrai, J. (1999) Antimalarials from *Stephania venosa*, *Prismatomeris sessiliflora*, *Diospyros montana* and *Murraya siamensis*. *Planta Medica*, 65:754-756.

- Tewtrakul, S., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Kawahata, T., Otake, T., Yoshinaga, T., Fujiwara, T., Supavita, T., Yuenyongsawad, S., Rattanasuwon, P., **Dej-adisai, S. (2001)** HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius*. *Phytotherapy Research*, 17:232-239.
- Keawpradub, N., **Dej-adisai, S.**, and Yuenyongsawad, S. **(2005)** Antioxidant and cytotoxic activities of Thai medicinal plants named Khaminkhrua: *Arcangelisia flava*, *Coscinium blumeum* and *Fibraurea tinctoria*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27 (Suppl. 2): 455-467.
- ดวงทิพย์ อรัญดร สร้อย แซ่ลิ้ม สิรินทิพย์ วิชญวรนนท์ อภินัฐ คล้ายสถิต และ **สุกัญญา เดชอดิษฐ์** การศึกษาการปนปลอมของสารสเตียรอยด์ เพรดนิโซลันและเด็กซ่าเมทธาโซนในยาแผนโบราณ ในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา (Study on adulteration of steroids, prednisolone and dexamethasone in Traditional Thai medicines in Hat-Yai, Songkhla) **วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ** ปีที่13 ฉบับที่ 1 (มกราคม – มิถุนายน 2553). หน้า 20-30.
(Dounghthip Arandorn, Sareeya Saelim, Sirinthip Vitchayavoranan, Apinat Klaysatit, **Sukanya Dej-adisai***. **(2010)** Study on adulteration of steroids, prednisolone and dexamethasone in Traditional Thai medicines in Hat-Yai, Songkhla. *Thaksin University Journal*, 13(1): 20-30.)
- ดาเรศ พรหมสวัสดิ์ นงลักษณ์ มหาวิจิตร พรพิมล นิลบวร และ **สุกัญญา เดชอดิษฐ์**ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสของพื้กัตยาในการแพทย์แผนไทย **วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ** ปีที่15 ฉบับที่ 2 (กรกฎาคม – ธันวาคม 2555). หน้า 34-43.
(Daret Phromswat, Nongluck Mahawijit, Pornpimon Nilborworn and **Sukanya Dej-adisai***. **(2012)** Anti-acetylcholinesterase activity of traditional Thai herbal combination medicines. *Thaksin University Journal*, 15(2): 34-43.)
- นุรฮายานา โต๊ะเก็ง มาริณี ปลาปง อารีนา ดาราบากอ อัสมัน ดือลอง และ**สุกัญญา เดชอดิษฐ์*** ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของผลิตภัณฑ์สมุนไพรทำให้ผิวขาว **วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ** ปีที่15 ฉบับที่ 2 (กรกฎาคม – ธันวาคม 2555). หน้า 44-51.
(Nurhayana Tohkeng, Marinee Plapong, Arina Darabakor, Azman Delong and **Sukanya Dej-adisai***. **(2012)** Anti-tyrosinase activity of herbal whitening products. *Thaksin University Journal*, 15(2): 44-51.)
- Joycharat, N., Thamavong, S., Limsuwan, S., Homlaead, S., Voravuthikunchai, S.P., Yingyongnarongkul, B., **Dej-adisai, S.**, Subhadhirasakul, S. **(2013)** Antibacterial substances from *Albizia myriophylla* wood against cariogenic *Streptococcus mutans*. *Archives of Pharmacal Research*, 36(6): 723-730.
- **Dej-adisai, S.***, Meechai, I., Puripattanavong, J., and Kummee, S. **(2014)** Antityrosinase and antimicrobial activities from Thai medicinal plants. *Archives of Pharmacal Research*, 37(4): 473-483.
- **Dej-adisai, S.***, Tinpun, K., Wattanapiromsakul, C., Keawpradub, N. **(2015)** Bio-activities and Phytochemical investigation of *Cnestis palala* (Lour.) Merr. *African Journal of*

Traditional, Complementary and Alternative medicines, 12(3): 27-37.
(<http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v12i3.3>)

- **Dej-adisai, S.***, Pitakbut, T. (2015) Determination of α -glucosidase inhibitory activity from selected Fabaceae plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(5): 1679-1683.
- **Dej-adisai, S.***, Parndaeng, K. and Wattanapiromsakul, C. (2016) Determination of phytochemical compounds, and tyrosinase inhibitory and antimicrobial activities of bioactive compounds from *Streblus ilicifolius* (S Vidal) Corner. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15 (3): 497-506.
- **Dej-adisai, S.***, Pitakbut, T. and Wattanapiromsakul, C. (2017) Alpha-glucosidase inhibitory activity and phytochemical investigation of *Borassus flabellifer* Linn. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 11(3): 45-52.
- **Dej-adisai, S.***, Phoopha, S., Puripattanavong, J. (2018) Phytochemical investigation and bioactivities of *Alternanthera ramosissima* (Mart.) Chodat and Hassl. *Pharmacognosy Magazine*, 14(57): S346-S351.
- **Dej-adisai, S.***, Parndaeng, K., and Wattanapiromsakul, C., Nuankaew, W., Kang, T.H. (2019) Effects of selected Moraceae plants on tyrosinase enzyme and melanin content. *Pharmacognosy Magazine*, 15(65): 708-714.
- Ruanglertboon, W., Kumarnsit, E., **Dej-adisai, S.**, Vongvatcharanon, U., Udomuksorn, W.* (2019) The neuroprotective effect of *Nasturtium officinale* on learning ability and density of parvalbumin neurons in the hippocampus of neurodegenerative-induced mice model. *Sains Malaysiana*. 48(10): 2191-2199. (<http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2019-4810-15>).
- Phoopha, S., Wattanapiromsakul, C., Pitakbut, T, **Dej-adisai, S.*** (2020) A new stilbene derivative and isolated compounds from *Bauhinia pottsii* var. *pottsii* with their anti-alpha-glucosidase activity. *Pharmacognosy Magazine*. 16(68): S161-S167
DOI: 10.4103/pm.pm_433_19
- Phoopha, S., Wattanapiromsakul, C., Pitakbut, T, **Dej-adisai, S.*** (2020) Chemical constituents of *Litsea elliptica* and their alpha-glucosidase inhibition with molecular docking. *Pharmacognosy Magazine*. 16(70): S327-S334.
- **Dej-adisai, S.***, Basow, N., Wattanapiromsakul, C., Nuankaew, W., Kang, T.H. (2021) Effect of isolated soil fungi from Sirindhorn Peat Swamp Forest Narathiwat province, Thailand on tyrosinase enzyme and melanin content. *Chiang Mai Journal of Science*, 48(1): 27-41.
- Nuankaew, W., Heemman, A., Wattanapiromsakul, C., Shim, J.H., Kim N.W., Yasmin, T., Jeong, S.Y., Nam, Y.H., Hong, B.N., **Dej-adisai, S.**, Kang, T.H. (2021) Anti-insulin resistance effect of constituents from *Senna siamea* on zebrafish model, its

molecular docking, and structure-activity relationships. *Journal of Natural Medicines*. (2021) 75:520–531.

<https://doi.org/10.1007/s11418-021-01490-5>, Q3, IF 2.343

- **Dej-adisai, S.***, Kaewchutima, N., Wattanapiromsakul, C. & Phoopha, S. (2021) Biological activities and chemical profiles of selected soil fungi isolated from Sirindhorn Peat Swamp Forest of Narathiwat, Thailand. *Sains Malaysiana*. 50(9): 2563-2577.
- **Dej-adisai, S.***, Rais, I.R., Wattanapiromsakul, C., Pitakbut, T. (2021) Alpha-glucosidase inhibitory assay-screened isolation and molecular docking model from *Bauhinia pulla* active compounds. *Molecules*. 26, 5970. <https://doi.org/10.3390/molecules26195970>
- **Dej-adisai, S.***, Rais, I.R., Wattanapiromsakul, C., Pitakbut, T. (2021) Phytochemical investigation of *Bauhinia winitii* based on alpha-glucosidase inhibitory effect and molecular docking affirmation. *Pharmacognosy Magazine*. (Accepted).

* Corresponding author

Poster presentation:

- The wound-induced effects of methyljasmonate on quinolizidine alkaloids accumulation in Fabaceous species. **The fifth Princess Chulabhorn international science congress: Evolving genetics and its global impact**, August 16-20, 2004 Bangkok, Thailand.
- Anti-tyrosinase and anti-microbial activities from the root of *Artocarpus integer*. **การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2553** (Thailand Research Expo 2010), 26-30 สิงหาคม 2553 ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ ราชประสงค์ กรุงเทพมหานคร.
- Monographs of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle and citronella oil. **การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2553** (Thailand Research Expo 2010), 26-30 สิงหาคม 2553 ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ ราชประสงค์ กรุงเทพมหานคร.
- Screening of cytotoxic activity against human cancer cells from *Alternanthera* sp. (Amaranthaceae) extract. **The 2nd Current Drug Development 2012 (CDD2012)**, 2nd – 4th May 2012. at the Phuket Graceland Resort & Spa, Phuket, Thailand.
- Screening of anti-tyrosinase and anti-microbial activities of Thai Plants from Rajjaprabha Dam in Surat Thani Province. **The 2nd Current Drug Development 2012 (CDD2012)**, 2nd – 4th May 2012. at the Phuket Graceland Resort & Spa, Phuket, Thailand.
- Screening of anti-tyrosinase and anti-microbial activities of Fabaceae plants. **The 3rd Current Drug Development 2014 (CDD2014)**, 1st-3rd May 2014. At the Pavilion Queen's Bay Krabi, Ao Nang Beach, Krabi, Thailand.
- Screening of selected Thai medicinal plants in anti- α -glucosidase activity. **The 3rd Current Drug Development 2014 (CDD2014)**, 1st-3rd May 2014. At the Pavilion Queen's Bay Krabi, Ao Nang Beach, Krabi, Thailand.
- Investigation of alpha-glucosidase inhibitory activity of isolated soil fungi from Sirindhorn peat swamp forest, Narathiwat, Thailand. **The 6th Current Drug Development**

- International Conference (CDD 2020)**, 10th-12th September 2020 At Lee Gardens Plaza Hotel, Hat-Yai, Songkhla, Thailand.
- Investigation of tyrosinase inhibitory activity of isolated soil fungi from Sirindhorn swamp forest Narathiwat Thailand. **The 6th Current Drug Development International Conference (CDD 2020)**, 10th-12th September 2020 At Lee Gardens Plaza Hotel, Hat-Yai, Songkhla, Thailand.
 - Phytochemical investigation and alpha glucosidase inhibitory activity of *Lepionurus sylvestris* Blume leaves extract. **The 6th Current Drug Development International Conference (CDD 2020)**, 10th-12th September 2020 At Lee Gardens Plaza Hotel, Hat-Yai, Songkhla, Thailand.

Oral presentation:

- **Antityrosinase and antimicrobial activities from Thai medicinal plants.** Aceh International Pharmacy Conference 2013 in Banda Aceh, Indonesia (September, 12th-16th, 2013), invited speaker.
- Determination of α -glucosidase inhibitory activity from selected Fabaceae plants **The 8th International Seminar of the Asian Network of Research on Antidiabetes Plants (ANRAP 2015)**, Shah Alan, Selangor, Malaysia, November, 23-25th 2015
- **Alpha-glucosidase inhibitory activity and phytochemical investigation of *Borassus flabellifer* Linn.** International Conference on Contemporary Science and Clinical Pharmacy (ICCSCP 2017) at Grand Inna Hotel, Padang-Indonesia and the guest of Andalas University, Padang, Indonesia, 9-14 November 2017, **keynote speaker (international conference).**
- **Production of herbal medicine in Thailand: from research to market.** 54th National Seminar on Working group on Traditional Medicines and medicines in 2018 at Hotel Polonia, Medan -Indonesia, 26th-27th April 2018, **plenary lecture**, (guest of Faculty of Pharmacy, Sumatera Utara).
- **Bioactivity of Thai Traditional Medicine (TTM).** Summer Course on “Translating Jamu, Indonesian Herbal Medicine: from Ancient Knowledge to Evidence - Based Medicine”. 5th-18th August 2018, **giving lecture**, (7th August 2018), Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada Indonesia.
- **Determination of alpha-glucosidase inhibitory activity from Korean ginseng-Thai herbal mixture tea.** 12th International Symposium on Ginseng, 2018; “Ginseng, A Super Nutraceutical”. Seoul, Korea, October 23-26, 2018 (<http://www.ginsengsymposium.org/>), hosted by The Korean Ginseng Society, **invited speaker (international conference).**
- **Herbal medicines used for Covid-19 in Thailand.** Virtual Course on Herbal Medicines as Supportive Therapies for COVID-19 in Various Countries. March 6th-7th, 2021; hosted by

Faculty of Pharmacy Universitas Ahmad Dahlan, Indonesia, invited speaker (international conference).

Research area: Phytochemistry, Bioassay, Plant defense mechanism, Toxic plant, Biological activities of natural products (เช่น Anti-tyrosinase activity, Anti-microbial activity, Anti-alpha glucosidase activity เป็นต้น)

2. ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 1

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) MR. JINDAPORN PURIPATTANAVONG
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 5 1014 00057 90 6
- ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
สาขาวิชาเภสัชเวช และเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
โทรศัพท์ 074-288987 โทรสาร 074-428220
E-mail : jindaporn.p@psu.ac.th
- ประวัติการศึกษา
2543 Doctor of Philosophy (Dr.rer.nat.) Pharmaceutical Chemistry, Albert Ludwigs University of Freiburg, Germany
2534 เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2531 เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ผลงานวิชาการ
6.1 อนุสิทธิบัตรต่างๆ:
 - อนุสิทธิบัตร เลขที่ 14539 เรื่อง สูตรการเตรียมผลิตภัณฑ์เซรัมผสมผงน้ำมะพร้าวอ่อน โดยมีคณะผู้ประดิษฐ์ ประกอบด้วย นายจินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์ นางสาวธนภร อำนวยกิจ และนางสาวพิมลมาศ รัตนบุรี (ระยะเวลาของอนุสิทธิบัตร 22 ต.ค. 2561 – 30 ส.ค. 2566)
 - อนุสิทธิบัตร เลขที่ 9079 เรื่องผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบยาสูบในรูปแบบอิมัลชันเข้มข้นและกรรมวิธีการผลิต โดยมีคณะผู้ประดิษฐ์ประกอบด้วย นายจินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์ นางสาวธนภร อำนวยกิจ นายเฉลิมเกียรติ สงคราม และนางสาวลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม (ระยะเวลาของอนุสิทธิบัตร 18 ส.ค. 2557 - 19 ต.ค. 2560)
 - อนุสิทธิบัตร เลขที่ 10686 เรื่อง องค์ประกอบที่มีส่วนผสมของสารสกัดมะหาดและเพชรสังฆาตที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปากและกระตุ้น การเจริญเติบโตเซลล์กระดูก โดยมีคณะผู้ประดิษฐ์ประกอบด้วย นางสาวรวี เถียรไพศาล นางสาวสมพิศ คินทร์ักษ์ และนายจินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์ (ระยะเวลาของอนุสิทธิบัตร 26 ต.ค. 2558 - 12 ธ.ค. 2560)
 - อนุสิทธิบัตร เลขที่คำขอ 1101003891 เรื่อง กรรมวิธีการผลิตน้ำมะพร้าวอ่อนผงโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกรรมวิธีนี้ วันรับคำขอ 4

พฤษภาคม 2559 โดยมีคณะผู้ประดิษฐ์ประกอบด้วย นายจินดาพร ภูมิพัฒนางษ์ นางสาวธนกร
อำนาจกิจ และนางสาวพิมลมาศ รัตนบุรี

5. อนุสิทธิบัตร เลขที่คำขอ 1703000783 เรื่อง สูตรผลิตภัณฑ์เจลน้ำมะพร้าวอ่อนผง วันรับคำขอ
9 พฤษภาคม 2560 โดยมีคณะผู้ประดิษฐ์ประกอบด้วย นายจินดาพร ภูมิพัฒนางษ์ และนางสาว
ธนกร อำนาจกิจ
6. อนุสิทธิบัตร เลขที่คำขอ 1703000784 เรื่อง กรรมวิธีการผลิตแป้งผงหนาทัวผสมน้ำมะพร้าวอ่อน
โดยใช้วิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying powder) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกรรมวิธีนี้ วัน
รับคำขอ 4 พฤษภาคม 2560 โดยมีคณะผู้ประดิษฐ์ประกอบด้วย นายจินดาพร ภูมิพัฒนางษ์
และนางสาวธนกร อำนาจกิจ

6.2 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่างประเทศ

1. Kumpanich, J., Eiampongpaiboon, T., Kanchanasita, W., Chitmongkolsuk, S.,
Puripattanavong, J. (2020) Effect of Piper betle extract on anti-candidal activity,
gelation time, and surface hardness of a short-term soft lining material, Dent
Mater J. 39 :1016-1021.
2. Kara, J., Suwanhom, P., Wattanapiromsakul, C., Nualnoi, T., Puripattanavong, J.,
Khongkow, P., Sanghiran, V., Gaurav, L.A., Lomlim, L. (2019) Synthesis of 2-(2-
oxo-2H-chromen-4-yl)acetamides as potent acetylcholinesterase inhibitors and
molecular insights into binding interactions, Arch Pharm Chem Life Sci. 352:
1800310
3. Harmayani, I, Anal, A.K., Wichienchot, S., Bhat, R., Gardjito, M., Santoso, U.,
Siripongvutikorn, S., Puripattanavong, J. Payyappallimana, U. (2019) Healthy food
traditions of Asia: exploratory case studies from Indonesia, Thailand, Malaysia and
Nepal, Journal of Ethnic Foods 6:1 18 pp.
4. Dej-Adisai, S, Phoopha, S., Puripattanavong, J (2018) Phytochemical Investigation
and Bioactivities of *Alternanthera ramosissima* (Mar t.) Chodat and Hassl.,
PHARMACOGNOSY MAGAZINE, 14(57): S346-S351
5. Rattanaburee, P., Puripattanavong, J., Amnuait, T (2018) Development of Serum
Formulation Containing Young Coconut Juice Powder and Skin Permeation Test,
LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY, 37(11): 2289-2297
6. Puripattanavong, J., Amnuait, T., Rattanaburee, P. (2017) Physicochemical
Properties of Spray-Dried Young Coconut Juice, International Journal of Pharma
Medicine and Biological Sciences. 6 (2): 43-47.
7. Puripattanavong, J., Chaniad, P., Langyanai, S. (2017) "Acetylcholinesterase
Inhibitory and Antioxidant Properties of Thai Vegetables, International Journal of
Pharma Medicine and Biological Sciences. 6(2): 67-72.
8. Teanpaisan, R. , Pahumunto, N. , Puripattanavong, J., Kawsud, P. (2017) Screening
for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against

oral microorganisms" Journal of Traditional and Complementary Medicine. 7 (2): 172-177.

9. Puripattanavong, J., Tungcharoen, P., Chaniad, P., Pianwanit, S., Tewtrakul, S. (2016) Anti-HIV-1 integrase effect of compounds from *Aglaia andamanica* leaves and molecular docking study with acute toxicity test in mice, Pharm Biol, 54 (4): 654-659.
10. Tewtrakul, S., Puripattanavong, J., Tungcharoen, P., Chaiad, P., Painwanit, S. (2016) Anti-HIV-1 integrase effect of compounds from *Aglaia andamanica* leaves and molecular docking study with acute toxicity test in mice, Pharmaceutical Biology. 54 (4): 654-659.
11. Puripattanavong, J., Tewtrakul, S. (2015) Anti-allergic and anti-inflammatory compounds from *Aglaia andamanica* leaves. Songklanakarin J. Sci. Technol. 37, 1, 37-41.
12. Kawsud, P., Puripattanavong, J., Teanpaisan, R. (2014) Screening for Anticandidal and Antibiofilm Activity of Some Herbs in Thailand. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 13, 9, 1495-1501.
13. Teanpaisan, R., Senapong, S., Puripattanavong, J., (2014) *In vitro* Antimicrobial and Antibiofilm Activity of *Artocarpus lakoocha* (Moraceae) Extract against Some Oral Pathogens. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 13, 7, 1149-1155.
14. Dej-adisai, S., Meechai, I., Puripattanavong, J., Kummee, S. (2014) Antityrosinase and antimicrobial activities from Thai medicinal plants. Arch. Pharm. Res. 37, 473-483.
15. Puripattanavong, J., Amnuakit, T., Radenahmad, N., Rattanaburee, P. (2014) Phytochemical study and its Quantity and Quality of Fresh and Freeze-dried Young Coconut Juice (*Cocos nucifera* L.). Advanced Materials Research. 884-885, 490-493.
16. Puripattanavong, J., Songkram, C., Lomlim, L., Amnuakit, T. (2013) Development of Concentrated Emulsion containing *Nicotiana tabaccum* Extract for Use as Pesticide. JAPS. 3, 11, 16-21.

7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษ) ระบุสาขาวิชาการ

- Phytochemistry and Bioassay of natural products
- Formulation of Medicinal Herbs and Stability
- Standardization of Medicinal Herbs
- เป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการพิจารณาทะเบียนยา/สมุนไพร/ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของ สนบ. อย.
- เป็นคณะทำงานพัฒนาคู่มือประเมินผลิตภัณฑ์สมุนไพร ของกองผลิตภัณฑ์สมุนไพร

3. ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 2

1. ชื่อ-นามสกุล นางสุปรียา ยืนยงสวัสดิ์ (Mrs. Supreeya Yuenyongsawad)

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3909800882363
3. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรีสาขา พฤษศาสตร์ ปีที่จบ 2523	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
ปริญญาโทสาขา เกษศาสตร์ (เภสัชพฤษศาสตร์) ปีที่จบ 2526	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ประเทศไทย
ปริญญาเอกสาขา เกษศาสตร์ ปีที่จบ 2550	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	ประเทศไทย
4. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
5. หน่วยงาน พนักงานมหาวิทยาลัย ม. สงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112
(ข้าราชการบำนาญ สาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)
6. โทรศัพท์/โทรสาร 0897387940
e-mail : ysupreey@gmail.com
7. ผลงานตีพิมพ์
 1. สุนทร พิพิธแสงจันทร์ ทิวา บุตรมา ปารีชาติ ปาลินทร สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์ และสนั่น ศุภธีรสกุล. 2543 การศึกษาฤทธิ์ของพืชบางชนิดในท้องถิ่นภาคใต้ประเทศไทยต่อการตายของหนอนใยผัก. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22(4) : 447-455.
 2. Hiranyachattada,S., Nualplub, S. and Yuenyongsawad, S. 2000. Investigation of the diuretic effect of *Ananas comosus* rhizome extract in rat. Songklanakarin J.Sci. Technol. 22 : 199-207.
 3. Panichayupakaranant, P., Yuenyongsawad, S. and Reanmongkol,W. 2000. Lawsone methyl ether in oral base and its chemical stability. Songklanakarin J. Sci. Technol. 22 : 523-527
 4. Subhadhirasakul, S., Yuenyongsawad, S. Ketjinda, W., Phadungsombat, N. and Faroongsarng, D. 2001. Study on tablet binding and disintegrating properties of alternative starches prepared from taro and sweet potato tubers. Drug Dev. Ind. Pharm. 27:81-88.
 5. Tewtrakul, S., miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Kawahata, T., Otake,T., Yoshinaga, T., Fujiwara, Supavita, T., Yuenyongsawad, S., Rattanasuwan, P., and Dej-adisai, S. 2003. HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius*. Phytother. Res. 17 :232-239.
 6. Okuyama, E., Shimamura, K., Nagamatsu, C., Fujimoto, H., Ishibashi, M., Shirota, O., Sekita, S., Satake, M., Ruiz, J., Flores, F.A. and Yuenyongsawad, S. 2003. Bioactive components of a Peruvian herbal medicine, Chucuhuasi (*Maytenus amazonica*). Biodiversity : Biomolecular aspects of Biodiversity and Innovative Utilization. Kluwer academic Pub. pp. 85-90.
 7. Plubrukarn, A., Yuenyongsawad, S., Thammasaroj, T., and Jitsue, A. 2003. Cytotoxic isoquinoline quinines from the Thai sponge *Cribrochalina*. Pharm. Biol. 41 :439-442.

8. Wonganuchitmeta, S., Yuenyongsawad, S., Keawpradub, N. and Plubrukarn, A. 2004. Antitubercular sesterterpenes from the Thai sponge *Brachiaster* sp. *J. Nat. Prod.* 67 :1767-177.
9. Tewtrakul, S., Yuenyongsawad, S., Kummee, S. and Atsawajaruwan, L. 2005. Chemical components and biological activities of volatile oil of *Kaempferia galanga* Linn. *Songklanakarin J.Sci. Technol.* 27 (supp.2) 503-507.
10. Yuenyongsawad, S., Tewtrakul, S. 2005. Essential oil components and biological activities of *Coleus parvifolius* Benth. Leaves. *Songklanakarin J.Sci. Technol.* 27(supp.2) 497-502.
11. Keawpradub, N. Yuenyongsawad, S., Dej-adisai, S. 2005. Cytotoxic activity of *Arcangelisia flava*, *Cosciniium blumeianum* and *Fibraurea tinctoria* against tumor cells. *Songklanakarin J.Sci. Technol.* 27(supp.2) 455-467.
12. Pipithsangchan, S., Subhadhirasakul, S., Palintorn, P., Yuenyongsawad, S. and Chantrapromma, K. 2005. Effects of extract Tiam seeds on cotton leafworm. *Songklanakarin J.Sci. Technol.* 27(3): 511-521.
13. Kornkanok Ingkaninan, Preeda phengpa, Supreeya Yuenyongsawad and Nantaka Khorana 2006. Acetylcholinesterase inhibitions from *Stephania venosa* tuber. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58:695-700.
14. Roosanee Langjae, Somchai Bussarawit, Supreeya Yuenyongsawad, Kornkanok Ingkaninan, Anuchit Plubrukarn 2007. Acetylcholinesterase-inhibiting steroidal alkaloid from the sponge *Corticium* sp. *Steroids*.72:682-685.
15. Boonsin Tangtrakulwanich Vechasilp Jaruwat, Kwunchit Oungbho, Supreeya Yuenyongsawad 2007. The efficacy of methotrexate-impregnated hydroxyapatite composites on human mammary carcinoma Cells. *J. Orthopaed. Surg.* 15(1): 56-61.
16. Sanan Subhadhirasakul, Niwat Keawpradub, Charuporn Promwong and Supreeya Yuenyongsawad. 2008. Free radical Scavenging and Cytoprotective Activity of *Salacia euphlebica* Merr. *Natural Product Communications.* 3(2) 211-214.
17. Yutthapong Sangnoi, Oraphan Sakulkeo, Supreeya Yuenyongsawad, Akkharawit Kanjana-opas, Kornkanok Ingkaninan, Anuchit Plubrukarn and Khanit Suwanborirux, 2008. Acetylcholinesterase-inhibiting activity of pyrrole derivatives from a novel marine gliding bacterium, *Rapidithrix thailandica*. *Mar. Drugs* 6: 578-586.
18. Anuchit Plubrukarn, Supreeya Yuenyongsawad, Chatchanok Karalai, Sunan Jaisamut, Suriyan Thengyai, Khanit Suwanborirux 2009. Structure-activity relationships of antitubercular scalaranes: Heteronemin revisited. *Pure and Applied Chemistry* 91:1019-1026.
19. P. Panichayupakaranant, S. Tewtrakul, S. Yuenyongsawad 2010. Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardized pomegranate rind extract. *Food Chemistry* 123: 400-403.

20. Abdul-Wahab Salae, Chatchanok Karalai, Chanita Ponglimanont, Akkharawit Kanjana-Opas, and Supreeya Yuenyongsawad 2010. Naphthalene derivatives from *Diospyros wallichii*. *Can. J. Chem.* 88: 922-927.
21. Thanchanok Sirirak, Niwan Intaraksa, Sireewan Kaewsuwan, Supreeya Yuenyongsawad, Khanit Suwanborirux, and Anuchit Plubrukarn 2011. Intracolonic Allocation of Trisoxazole Macrolides in the Sponge *Pachastrissa nux*. *Chemistry & Biodiversity*. 8: 2238-2246.
22. Thanchanok Sirirak, Siriporn Kittiwisut, Chittrawan Janma, Supreeya Yuenyongsawad, Khanit Suwanborirux and Anuchit Plubrukarn 2011. Kabiramide J and K, Trisoxazole Macrolides from the Sponge *Pachastrissa nux*. *J. Nat. Prod.* 74: 1288–1292.
23. Naphatson Chanthathamrongsiri, Supreeya Yuenyongsawad, Chatchai Wattanapiromsakul and Anuchit Plubrukarn 2012. Bifunctionalized Amphilectane Diterpenes from the Sponge *Stylissa cf. massa*. *J. Nat. Prod.* 75, 789-792.
24. Afsaneh Yegdaneh, Sumaitt Putchakarn, Supreeya Yuenyongsawad, Alireza Ghannadi and Anuchit Plubrukarn. 2013 3-oxoabolene and 1-Oxocurcuphenol, Aromatic Bisabolanes from the Sponge *Myrmekioderma* sp. *Natural Product Communications*, 8(10):1355-1357.
25. Supreeya Yuenyongsawad, Kingkan Bunluepuech, Chatchai Wattanapiromsakul, Supinya Tewtrakul 2013. Anti-cancer activity of compounds from *Bauhinia strychnifolia* stem, *Journal of Ethnopharmacology*, 150:765-769.
26. Sunan Jaisamut, Supreeya Yuenyongsawad, Samran Prabpai, Chompoonuch Tancharoen, Palangpon Kongsaree, Supa Hannongbua and Anuchit Plubrukarn 2013. Bridged Tricyclic Sesquiterpenes from the Tubercle Nudibranch *Phyllidia coelestis* Bergh, *Journal of Natural product* 76 (11), pp 2158–2161
27. Siriporn Kittiwisut, Cristina Rohena, Supreeya Yuenyongsawad, Susan Mooberry, Anuchit Plubrukarn 2014 Antiproliferative effects of 12-oxoheteronemin vs heteronemin *Natural Product Communications*, 9(3):359-60.
28. Plyduang, T., Lomlim, L., Yuenyongsawad, S. and Wiwattanapatpee, R. 2014. Carboxymethylcellulose-tetrahydrocurcumin conjugates for colon-specific delivery of a novel anti-cancer agent, 4-amino tetrahydrocurcumin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 88(2), 351–360.
29. Supreeya Yuenyongsawad, Kingkan Bunluepuech, Chatchai Wattanapiromsakul, Supinya Tewtrakul 2014. Anti-cancer activity of compounds from *Cassia garrettiana* heartwood. *Songklanakarin Journal of Sciences and Technology* 36(2): 189-194.
30. Opeyemi Olatunji, Akintayo Ogundajo, Ibrahim Oladosu, Kanokwan Changwichit, Kornkanok Ingkaninan, Supreeya Yuenyongsawad, Anuchit Plubrukarn 2014. Non-competitive inhibition of acetylcholinesterase by bromotyrosine alkaloids. *Natural Product Communications* 9(11):1559-1561

31. Nawong Boonnak, Suchada Chanpromma, Hoong-Kun Fun, Supreeya Yuenyongsawad, Brian O. Patrick, Wisanu Maneerat, David E. and Raymond J. Andersen 2014 Three types of cytotoxic natural caged-scaffolds: Pure enantiomers or partial racemates. *Journal of Natural Products* 77:1562-1571.
32. Sireewan Kaewsuwan, Supreeya Yuenyongsawad, Anuchit Plubrukarn, Arpaporn Kaewchoothong, Achara Raksawong, Panupong Puttarak, Chucheep Apirug 2015 Bioactive interruptins A and B from *Cyclosorus terminans*: antibacterial, anticancer, stem cell proliferation and ROS scavenging activities *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 37 (3) : 309-317.
33. Atitaya Sookkasem, Surapong Chatpun, Supreeya Yuenyongsawad, Ruedeekorn Wiwattanapatapee 2015. Alginate beads for colon specific delivery of self-emulsifying curcumin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 29 (oct) :159-166.
34. ธีญญารัตน์ สมสุ, สุธา วัฒนสิทธิ์, สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์, ศิริวัฒน์ วาสิกศิริ 2560 องค์ประกอบทางโภชนาการและปริมาณสารอัลลิซินในกระเทียมผงสายพันธุ์ศรีสะเกษ เชียงใหม่ และจีน วารสารเกษตร 33(1) :131-140.
35. Saranya Amad, Supreeya Yuenyongsawad and Chatchai Wattanapiromsakul 2017, Investigation on Antitubercular and Cytotoxic Activities of Fruit Extract and Isolated Compounds from *Piper retrofractum* Vahl. *Walailak Journal of Science and Technology* 14 (9) :731-739.
36. Atitaya SOOKKASEM , Surapong CHATPUN , Supreeya YUENYONGSAWAD , Yaowaporn SANGSEN & Ruedeekorn WIWATTANAPATAPEE 2017 Colon Targeting of Self-Emulsifying and Solid Dispersions of Curcumin Using Pectin Beads as a Delivery Vehicle *Lat. Am. J. Pharm.* 36 (12): 2482-93
37. Treechada Sirirak, Khadar Syed Musthafa, Sakkarin Lethongkam, Supreeya Yuenyongsawad, Supayang P. Voravuthikunchai 2019 Eleutherine americana extract inhibits adherence to and invasion of Caco-2 cells by commonly contaminated *Campylobacter* spp. in food. *Journal of Food Processing and Preservation* 43(8):1-9.
38. Pirunrat sae-Lim, Supreeya Yuenyongsawad, Pharkphoom Panichayupakaranant 2019 Chamuangone-Enriched *Garcinia cowa* Leaf Extract with Rice Bran oil: Extract and Cytotoxic Activity against cancer Cells. *Pharmacognosy Magazine* 15(61): 183-188.
39. Likit Lateh, Supreeya Yuenyongsawad, Haixia Chen, Pharkphoom Panichayupakaranant 2019 A green method for preparation of curcuminoid-rich *Curcuma longa* extract and evaluation of its anticancer activity. *Pharmacognosy Magazine* 15(65): 730-735.
40. Premprasert C, Yuenyongsawad S, Tewtrakul S, Wungsintaweekul J. 2019. Plaunotol from *Croton stellatopilosus* Ohba inhibited cell growth and induced apoptosis in

human cancer cell lines. Songklanakarin Journal of Science and Technology 41(4): 846-855.

41. Apisada Jiso, Siriporn Kittiwisut, Ruttanaporn Chantakul, Supreeya Yuenyongsawad, Sumaitt Putchakarn, Till F. Schaberle, Prapapan Temkitthaworn, Kornkanok Ingkaninan, Kulathida Chaithirayanon, and Anuchit Plubrukarn 2020. Quinone, a Merosesquiterpene from the Yellow Sponge *Verongula cf. rigida* Esper. Journal of Natural Products 83 (2), 532-536

4. ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 3

1. ชื่อ สกุล: รศ.ดร.สุภิญญา ตีวตระกุล (Assoc. Prof. Dr. Supinya Tewtrakul)
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน: 31005 01447 869
3. ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษาที่จบ	ระดับการศึกษา	สถาบัน	สาขาวิชา
2534	ปริญญาตรี	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	เภสัชศาสตร์
2536	ปริญญาโท	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เภสัชเวช
2545	ปริญญาเอก	Toyama Medical and Pharmaceutical University	Pharmaceutical Sciences

4. ตำแหน่งปัจจุบัน: รองศาสตราจารย์ ระดับ 9
5. ระยะเวลาตามสัญญาจ้าง ในกรณีที่เป็นพนักงานมหาวิทยาลัย: -
6. สาขาวิชา/คณะ/หน่วยงาน
สาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
7. โทรศัพท์/โทรสาร/e-mail
โทรศัพท์ 074-288888 โทรสาร 074-428220
e-mail address: supinya.t@psu.ac.th
8. ประสบการณ์ในงานวิจัย
-Biological activities of Thai plants including anti-inflammatory, antioxidant and wound healing effects.
9. ผลงานวิจัยที่พิมพ์ออกเผยแพร่
 1. Thanasakdecha, S., **Tewtrakul, S***. 2021. Wound healing gel containing compound 2 α -acetoxysandaracopimaradien-1 α -ol from *Kaempferia marginata* rhizome. Journal of Herbal Medicine. 28, Article number 100437.
 2. Tungcharoen, P., Wattanapiromsakul, C., Tansakul, P., Nakamura, S., Matsuda, M., and **Tewtrakul, S***. 2020. Antiinflammatory effect of isopimarane diterpenoids from

- Kaempferia galanga*. *Phytotherapy Research*. 34 (3): 612-623.
3. Srirod, S., and **Tewtrakul, S***. 2019. Anti-inflammatory and wound healing effects of cream containing *Curcuma mangga* extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 238, Article number 111828.
 4. Muthachan, T., and **Tewtrakul, S***. 2019. Anti-inflammatory and wound healing effects of gel containing *Kaempferia marginata* extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 240, Article number 111964.
 5. Tungcharoen, P., Wattanapiromsakul, C., Tansakul, P., Nakamura, S., Matsuda, M., and **Tewtrakul, S***. 2018. Antiinflammation constituents from *Curcuma zedoaroides*. *Phytotherapy Research*. 32 (11), 2312-2320.
 6. Seeka, C., Prabpai, S., Kongsaree, P., **Tewtrakul, S.**, Lhinhatrakool, T., and Sutthivaiyakit, S. 2017. Anti-inflammatory 12, 20-epoxypregnane and 11, 12-seco-pregnane glycosides from the stems of *Hoya kerrii*. *Journal of Natural Products*. 80, 1714-1724.
 7. Sudsai, T., Wattanapiromsakul, C., and **Tewtrakul, S***. 2016. Wound healing property of isolated compounds from *Boesenbergia kingii* rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology*. 184, 42-48.
 8. **Tewtrakul, S***, Tungcharoen, P., Sudsai, T., Karalai, C., Ponglimanont, C., and Yodsaoue, O. 2015. Anti-inflammatory and wound healing effects of compounds from *Caesalpinia sappan* L. *Phytotherapy Research*. 29(6), 850-856.
 9. **Tewtrakul, S***, Chaniad, P., Wattanapiromsakul, C., and Painwanit, S. 2015. Anti-HIV-1 integrase activity and molecular docking study of compounds from *Caesalpinia sappan* L. *Phytotherapy Research*. 29(5), 724-729.
 10. Sudsai, T., Prabpai, S., Kongsaree, P., Wattanapiromsakul, C. and **Tewtrakul, S***. 2014. Anti-inflammatory activity of compounds from *Boesenbergia longiflora* rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology*. 154(2), 453-461.
 11. Tupchiangmai, W., Choksakulporn, S., **Tewtrakul, S.**, Pianwanit, S. and Sritana-anant, Y. 2014. Use of a Hexasubstituted Benzene Scaffold in the Development of Multivalent HIV-1 Integrase Inhibitors. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 62(8), 754-763.
 12. Suedee, A., **Tewtrakul, S.** and Panichayupakaranant, P. 2014. Anti-HIV-1 integrase activity of *Mimusops elengi* leaf extracts. *Pharmaceutical Biology*. 52(1), 58-61.
 13. Sudsai, T., Wattanapiromsakul, C., Nakpheng, T. and **Tewtrakul, S***. 2013. Evaluation of the wound healing property of *Boesenbergia longiflora* rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology*. 150(1), 223-231.
 14. Yuenyongsawad, S., Bunluepuech, K., Wattanapiromsakul, C. and **Tewtrakul, S.** 2013. Anti-cancer activity of compounds from *Bauhinia strychnifolia* stem. *Journal of Ethnopharmacology*. 150, 765-769.

15. Kaewkroek, K., Wattanapiromsakul, C., Kongsaree, P. and **Tewtrakul, S***. 2013. Nitric Oxide and Tumor Necrosis factor-alpha Inhibitory Substances from the Rhizomes of *Kaempferia marginata*. Natural Product Communications. 8(9), 1205-1208.
16. Premprasert, C., **Tewtrakul, S.**, Plubrukarn, A. and Wungsintaweekul, J. 2013. Anti-inflammatory activity of diterpenes from *Croton stellatopilosus* on LPS-induced RAW264.7 cells. Journal of Natural Medicines. 67(1), 174-181.
17. Panthong, K., Srisud, Y., Rukachaisirikul, V., Hutadilok-Towatana, N., Voravuthikunchai, SP. and **Tewtrakul, S.** 2013. Benzene, coumarin and quinolinone derivatives from roots of *Citrus hystrix*. Phytochemistry. 88, 79-84.
18. Yodsaoue O, Sonprasit J, Karalai C, Ponglimanont C, **Tewtrakul S**, Chantrapromma S. 2012. Diterpenoids and triterpenoids with potential anti-inflammatory activity from the leaves of *Aglaia odorata*. Phytochemistry. 76: 83-91.
19. Salae, AW., Rodjun, A., Karalai, C., Ponglimanont, C., Chantrapromma, S., Kanjana-Opas, A., **Tewtrakul, S.**, and Fun, HK. 2012. Potential anti-inflammatory diterpenes from *Premna obtusifolia*. Tetrahedron. 68(3), 819-829.
20. Yodsaoue, O., Sonprasit, J., Karalai, C., Ponglimanont, C., **Tewtrakul, S.** and Chantrapromma, S. 2012. Diterpenoids and triterpenoids with potential anti-inflammatory activity from the leaves of *Aglaia odorata*. Phytochemistry. 76(1), 83-91.
21. Kaewchoothong, A., **Tewtrakul, S.**, and Panichayupakaranant, P. 2012. Inhibitory effect of phenylbutanoid-rich *Zingiber cassumunar* extracts on nitric oxide production by murine macrophage-like RAW264.7 cells. Phytotherapy Research. 26(12), 1789-1792.
22. **Tewtrakul S***, Subhadhirasakul S, Tansakul P, Cheenpracha S, and Karalai C. 2011. Anti-inflammatory constituents from *Eclipta prostrata* using RAW264.7 macrophage cells. Phytotherapy Research. 25: 1313-1316.
23. **Tewtrakul S***, Subhadhirasakul S, Cheenpracha S, Yodsaoue O, Ponglimanont C, and Karalai C. 2011. Anti-inflammatory principles of *Suregada multiflora* against nitric oxide and prostaglandin E₂ releases. Journal of Ethnopharmacology. 133: 63-66.
23. Sae-Wong, C., Matsuda, H., **Tewtrakul, S.**, Tansakul, P., Nakamura, S. Nomura, Y. and Yoshikawa, M. 2011. Suppressive effects of methoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora* on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells. Journal of Ethnopharmacology. 136, 488-495.

*= corresponding author

10. งานวิจัยที่กำลังทำ

-Wound healing gel containing compounds from *Kaempferia galanga* rhizomes.

ภาคผนวก



Effect of Isolated Soil Fungi from Sirindhorn Peat Swamp Forest Narathiwat Province, Thailand on Tyrosinase Enzyme and Melanin Content

Sukanya Dej-adisai*[a], Nasrin Basow [a], Chatchai Wattanapiromsakul [a], Wanlapa Nuankaew [b] and Tong Ho Kang [b]

[a] Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand.

[b] Graduate School of Biotechnology, Department of Oriental Medicinal Biotechnology, College of Life Sciences, Kyung Hee University, Gyeonggi-do, 17104, Republic of Korea.

*Author for correspondence; e-mail: sukanya.d@psu.ac.th

Received: 28 May 2020

Revised: 7 July 2020

Accepted: 8 July 2020

ABSTRACT

Tyrosinase is the most important enzyme that can approach towards controlling melanin production for hyperpigmentation treatment. The 104 samples were extracted from 54 fungi which were isolated from organic soil at Sirindhorn peat swamp forest, Narathiwat province, Thailand. They were screened on tyrosinase inhibition. From the results, four samples as SPSF318BE, SPSF011BE, SPSF318CE and SPSF045BE showed the potent tyrosinase inhibitory activity with more than 50% at 20 µg/ml. Their tyrosinase inhibitions were $78.83 \pm 2.72\%$, $75.80 \pm 2.65\%$, $72.45 \pm 3.55\%$ and $58.04 \pm 1.46\%$, respectively. While positive controls as the water extract of *Artocarpus lakoocha* wood and kojic acid could inhibit this enzyme with $94.26 \pm 0.65\%$ and $80.18 \pm 0.84\%$, respectively. The most active sample was selected for further study, the fungus SPSF318 was identified by using molecular method as *Aspergillus flavus*. The crude extracts of *A. flavus* were evaluated for inhibition of cellular tyrosinase, melanin synthesis on B16F1 melanoma cells, pigmentation inhibitory effects on zebrafish, antioxidant and anti-microbial activities against *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. In addition, *A. flavus* has to further study of chemical constituents in order to figure out the active compound which might be the lead compound for whitening agent. Therefore, isolated soil fungi in this area could be considered as good sources of various bioactive natural products, especially, to identify new inhibitor with drug-like properties on tyrosinase enzyme activity.

Keywords: fungal extracts, biological activities, anti-tyrosinase activity, *Aspergillus flavus*, Sirindhorn Peat Swamp Forest

1. INTRODUCTION

Human skin color occurs from the epidermis where the pigment producing cells, melanocytes, produce melanin [1]. Melanin plays a crucial role

in protecting the skin against harmful effects from ultraviolet (UV) and oxidative stress from various environmental pollutants [2]. However, the

accumulation of melanin in keratinocyte due to the overexpression of tyrosinase leads to various dermatological disorders such as melasma, age spots, and sites of actinic damage [3]. Fungi are universal sources of various bioactive metabolites. A number of these fungal metabolites have found significant commercial medicinal success, such as penicillin, cyclosporine, and lovastatin [4-5]. During recent years, many new secondary metabolites have been reported, and several compounds exhibited interesting biological activities such as anti-bacterial, anti-malarial, anti-oxidant, and anti-proliferation against NCI-H187 and KB cells, COX-2 inhibitory, cytotoxic against HL-60, BEL-7402 and A-549 cell lines, and HMG-CoA reductase inhibitory activities [6-7]. In addition, many tyrosinase inhibitors were isolated from fungi for example kojic acid. This compound could be produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* [8]. 6 β -Hydroxytibolone and 10 β -hydroxy-4-tibolone were isolated from *Rhizopus stolonifer* while paecilomyces A, B and C were isolated from *Paecilomyces gunnii* [9]. Thus, to seek the anti-tyrosinase inhibitor from fungi is interesting to provide a new source of active compounds from nature to treat pigmentation disorder. This study was initiated to screen the anti-tyrosinase, anti-inflammatory, and cytotoxic activity against human breast adenocarcinoma, human gingival fibroblasts cells and anti-acetylcholinesterase of 104 crude extracts from fifty-four isolate cultures which classified into two genera based on their morphology. The crude extracts which showed potential effects were selected for further study in B16F1 melanoma cells, intracellular anti-tyrosinase activity and melanin content. In addition, their pigmentation inhibitory effects on zebrafish were studied.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Fungal Material

Soil fungi were isolated from Sirindhorn peat swamp forest's organic soil in Narathiwat Province, Thailand. The genus of these fungi was identified

by morphological characteristics and deposited at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University. The most effective sample on anti-tyrosinase activity screening tests was further identified the species by molecular method appertaining to an analysis of their ITS sequences by BIOTEC, Thailand.

2.2 Culture Conditions and Extractions

The soil fungi were cultured on potato dextrose agar incubated at 25 °C for 5 days. Five pieces of mycelial agar plugs were inoculated into flasks that contained 250 ml potato dextrose broth (PDB; per liter involved potato water, 200 ml, distilled water, 800 ml, and glucose, 20 g) incubated for 3 weeks. Broth media were filtered to divide the broth media and mycelia cell and most of them were extracted with ethyl acetate [Table 1]. All broth media from selected fungus were extracted with ethyl acetate and were divided into two parts which were broth ethyl acetate (BE) and broth water (BW) after evaporation until they were dried using a rotary evaporator. The mycelia cells were macerated with methanol for two days, after that the methanol layer was partition with hexane to obtained hexane extract (CH). Then the remaining methanol layer after discharged the hexane part was further partition with ethyl acetate to obtain two extracts as methanol extract (CM) and ethyl acetate extract (CE). Finally, all extracts were evaporated until dried and were kept at 4°C until examination.

2.3 Biological Activity Assays

2.3.1 Determination of tyrosinase inhibition and melanin content

2.3.1.1 Extracellular experiment: anti-tyrosinase activity

The anti-tyrosinase activity was evaluated according to Dej-adisai *et al.* 2014 [10] using the dopachrome method with L-Dopa as a substrate. All samples were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The reaction mixture (200 μ l) contained with 140 μ l of phosphate buffer (20 mM, pH 6.8),

Table 1. Tyrosinase inhibitory activity at concentration 20 µg/ml of fungal extracts from Sirindhorn Peat Swamp Forest Nature Research and Study Center Narathiwat province, Thailand.

No.	Fungal isolate number	Sample code*	Fungal identification by morphological characteristics	% Tyrosinase inhibition ± SD at concentration 20 µg/ml
1.	SPSF001	SPSF001BE	<i>Trichoderma</i> sp.	9.23±2.81
2.	SPSF002	SPSF002BE	Unidentified species	41.42±3.61
3.	SPSF003	SPSF003BE	<i>Aspergillus</i> sp.	-2.80±3.44
4.	SPSF004	SPSF004BE	Unidentified species	13.57±4.95
5.	SPSF005	SPSF005BE	<i>Aspergillus</i> sp.	7.00±6.84
6.	SPSF006	SPSF006BE	Unidentified species	8.41±8.41
7.	SPSF007	SPSF007BE	<i>Gongronella</i> sp.	2.95±3.24
8.	SPSF008	SPSF008BE	<i>Gongronella</i> sp.	-2.99±5.53
9.	SPSF009	SPSF009BE	<i>Aspergillus</i> sp.	45.91±7.53
10.	SPSF010	SPSF010BE	<i>Trichoderma</i> sp.	30.14±2.16
11.	SPSF011	SPSF011BE	<i>Penicillium</i> sp.	75.80±2.65
12.	SPSF012	SPSF012BE	<i>Trichoderma</i> sp.	5.86±6.54
13.	SPSF013	SPSF013BE	<i>Trichoderma</i> sp.	11.64±1.62
14.	SPSF028	SPSF028BE	<i>Penicillium</i> sp.	-2.21±6.37
15.	SPSF029	SPSF029BE	<i>Penicillium</i> sp.	5.5±4.50
16.	SPSF030	SPSF030BE	<i>Penicillium</i> sp.	10.00±3.96
17.	SPSF031	SPSF031BE	<i>Penicillium</i> sp.	15.04±5.29
18.	SPSF032	SPSF032BE	<i>Penicillium</i> sp.	13.65±1.57
19.	SPSF033	SPSF033BE	<i>Penicillium</i> sp.	5.64±4.71
20.	SPSF034	SPSF034BE	<i>Penicillium</i> sp.	3.50±1.26
21.	SPSF035	SPSF035BE	<i>Penicillium</i> sp.	-4.26±3.93
22.	SPSF037	SPSF037BE	<i>Penicillium</i> sp.	-18.95±2.99
23.	SPSF038	SPSF038BE	<i>Penicillium</i> sp.	23.12±4.82
24.	SPSF039	SPSF039BE	<i>Penicillium</i> sp.	5.5±4.60
25.	SPSF040	SPSF040BE	<i>Penicillium</i> sp.	-13.86±4.03
26.	SPSF042	SPSF042BE	<i>Penicillium</i> sp.	24.47±1.91
27.	SPSF043	SPSF043BE	<i>Penicillium</i> sp.	24.49±2.73
28.	SPSF044	SPSF044BE	<i>Penicillium</i> sp.	18.04±2.63
29.	SPSF045	SPSF045BE	<i>Penicillium</i> sp.	58.04±1.46
30.	SPSF046	SPSF046BE	<i>Penicillium</i> sp.	14.65±1.78
31.	SPSF047	SPSF047BE	<i>Penicillium</i> sp.	14.94±2.83
32.	SPSF048	SPSF048CE	<i>Penicillium</i> sp.	5.05±0.22

* BE = Broth ethyl acetate extract; BW = Broth water extract;
CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract.

Table 1. (Continued).

No.	Fungal isolate number	Sample code*	Fungal identification by morphological characteristics	% Tyrosinase inhibition \pm SD at concentration 20 μ g/ml
33.	SPSF049	SPSF049BW	<i>Penicillium</i> sp.	4.51 \pm 2.35
34.	SPSF051	SPSF051BW	<i>Penicillium</i> sp.	6.24 \pm 3.40
35.	SPSF206	SPSF206CM	<i>Penicillium</i> sp.	10.48 \pm 4.53
36.	SPSF206	SPSF206BE	<i>Penicillium</i> sp.	27.18 \pm 2.53
37.	SPSF208	SPSF208BE	<i>Aspergillus</i> sp.	7.39 \pm 4.50
38.	SPSF208	SPSF208CE	<i>Aspergillus</i> sp.	-3.78 \pm 2.84
39.	SPSF208	SPSF208CH	<i>Aspergillus</i> sp.	-3.25 \pm 3.56
40.	SPSF209	SPSF209CE	<i>Penicillium</i> sp.	-13.64 \pm 1.26
41.	SPSF209	SPSF209BE	<i>Penicillium</i> sp.	6.51 \pm 1.71
42.	SPSF209	SPSF209BW	<i>Penicillium</i> sp.	-24.20 \pm 1.87
43.	SPSF211	SPSF211CE	<i>Penicillium</i> sp.	5.62 \pm 3.89
44.	SPSF211	SPSF211BE	<i>Penicillium</i> sp.	6.45 \pm 2.87
45.	SPSF213	SPSF213BE	<i>Penicillium</i> sp.	22.09 \pm 3.88
46.	SPSF219	SPSF219BE	<i>Penicillium</i> sp.	-32.06 \pm 2.45
47.	SPSF221	SPSF221CE	<i>Penicillium</i> sp.	18.95 \pm 5.54
48.	SPSF221	SPSF221CH	<i>Penicillium</i> sp.	30.18 \pm 3.91
49.	SPSF221	SPSF221BE	<i>Penicillium</i> sp.	22.19 \pm 3.03
50.	SPSF224	SPSF224BE	<i>Penicillium</i> sp.	22.17 \pm 1.54
51.	SPSF224	SPSF224CE	<i>Penicillium</i> sp.	-3.75 \pm 1.68
52.	SPSF225	SPSF225CE	<i>Penicillium</i> sp.	19.55 \pm 1.45
53.	SPSF225	SPSF225BE	<i>Penicillium</i> sp.	8.10 \pm 4.19
54.	SPSF226	SPSF226BE	<i>Penicillium</i> sp.	0.46 \pm 4.19
55.	SPSF226	SPSF226CE	<i>Penicillium</i> sp.	4.10 \pm 1.13
56.	SPSF226	SPSF226CH	<i>Penicillium</i> sp.	30.88 \pm 1.27
57.	SPSF227	SPSF227BE	<i>Penicillium</i> sp.	11.61 \pm 2.77
58.	SPSF227	SPSF227CE	<i>Penicillium</i> sp.	5.07 \pm 1.52
59.	SPSF227	SPSF227BW	<i>Penicillium</i> sp.	-7.96 \pm 1.62
60.	SPSF243	SPSF234CE	<i>Penicillium</i> sp.	8.10 \pm 4.19
61.	SPSF234	SPSF234BE	<i>Penicillium</i> sp.	-1.22 \pm 3.08
62.	SPSF234	SPSF234BW	<i>Penicillium</i> sp.	-47.56 \pm 2.36
63.	SPSF236	SPSF236BE	<i>Penicillium</i> sp.	24.43 \pm 5.01
64.	SPSF236	SPSF236CE	<i>Penicillium</i> sp.	11.55 \pm 1.39
65.	SPSF238	SPSF238CE	<i>Penicillium</i> sp.	1.11 \pm 0.89

* BE = Broth ethyl acetate extract; BW = Broth water extract;
CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract.

Table 1. (Continued).

No.	Fungal isolate number	Sample code*	Fungal identification by morphological characteristics	% Tyrosinase inhibition \pm SD at concentration 20 μ g/ml
66.	SPSF240	SPSF240BE	<i>Penicillium</i> sp.	36.63 \pm 1.88
67.	SPSF240	SPSF240CE	<i>Penicillium</i> sp.	17.83 \pm 4.89
68.	SPSF240	SPSF240CH	<i>Penicillium</i> sp.	11.70 \pm 3.53
69.	SPSF241	SPSF241BE	<i>Penicillium</i> sp.	-2.47 \pm 1.79
70.	SPSF244	SPSF244CE	<i>Penicillium</i> sp.	13.92 \pm 4.20
71.	SPSF244	SPSF244BE	<i>Penicillium</i> sp.	12.51 \pm 1.55
72.	SPSF248	SPSF248CH	<i>Penicillium</i> sp.	17.78 \pm 4.13
73.	SPSF248	SPSF248CE	<i>Penicillium</i> sp.	6.23 \pm 3.60
74.	SPSF248	SPSF248BE	<i>Penicillium</i> sp.	4.15 \pm 2.98
75.	SPSF250	SPSF250BE	<i>Penicillium</i> sp.	-4.19 \pm 2.30
76.	SPSF304	SPSF304BE	<i>Penicillium</i> sp.	22.76 \pm 2.35
77.	SPSF304	SPSF304CH	<i>Penicillium</i> sp.	-9.09 \pm 1.49
78.	SPSF304	SPSF304BW	<i>Penicillium</i> sp.	-3.05 \pm 1.46
79.	SPSF310	SPSF310BE	<i>Penicillium</i> sp.	0.29 \pm 3.10
80.	SPSF310	SPSF310CE	<i>Penicillium</i> sp.	4.57 \pm 2.92
81.	SPSF310	SPSF310BW	<i>Penicillium</i> sp.	10.21 \pm 1.15
82.	SPSF312	SPSF312BE	<i>Penicillium</i> sp.	35.05 \pm 2.55
83.	SPSF312	SPSF312CE	<i>Penicillium</i> sp.	-22.36 \pm 3.58
84.	SPSF318	SPSF318BE	<i>Aspergillus</i> sp.	78.83\pm2.72
85.	SPSF318	SPSF318CE	<i>Aspergillus</i> sp.	72.45\pm3.55
86.	SPSF325	SPSF325BE	<i>Penicillium</i> sp.	26.81 \pm 4.71
87.	SPSF325	SPSF325CE	<i>Penicillium</i> sp.	7.31 \pm 3.17
88.	SPSF325	SPSF325CH	<i>Penicillium</i> sp.	0.06 \pm 4.45
89.	SPSF328	SPSF328BE	<i>Penicillium</i> sp.	27.41 \pm 3.50
90.	SPSF329	SPSF329BE	<i>Penicillium</i> sp.	12.26 \pm 3.79
91.	SPSF329	SPSF329CE	<i>Penicillium</i> sp.	5.28 \pm 1.96
92.	SPSF329	SPSF329CH	<i>Penicillium</i> sp.	2.02 \pm 4.68
93.	SPSF330	SPSF330BE	<i>Aspergillus</i> sp.	16.57 \pm 4.92
94.	SPSF330	SPSF330CE	<i>Aspergillus</i> sp.	3.29 \pm 2.62
95.	SPSF339	SPSF339BE	<i>Penicillium</i> sp.	9.96 \pm 2.36
96.	SPSF339	SPSF339CE	<i>Penicillium</i> sp.	2.90 \pm 1.79
97.	SPSF339	SPSF339BW	<i>Penicillium</i> sp.	4.58 \pm 2.58
98.	SPSF347	SPSF347BE	<i>Penicillium</i> sp.	-1.02 \pm 4.21

* BE = Broth ethyl acetate extract; BW = Broth water extract;
CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract.

Table 1. (Continued).

No.	Fungal isolate number	Sample code*	Fungal identification by morphological characteristics	% Tyrosinase inhibition \pm SD at concentration 20 μ g/ml
99.	SPSF358	SPSF358BW	<i>Penicillium</i> sp.	6.21 \pm 0.95
100.	SPSF358	SPSF358BE	<i>Penicillium</i> sp.	-5.49 \pm 1.99
101.	SPSF358	SPSF358CE	<i>Penicillium</i> sp.	1.55 \pm 0.82
102.	SPSF360	SPSF360BE	<i>Aspergillus</i> sp.	31.11 \pm 2.97
103.	SPSF360	SPSF360CH	<i>Aspergillus</i> sp.	24.38 \pm 1.71
104.	SPSF360	SPSF360BW	<i>Aspergillus</i> sp.	-34.93 \pm 2.96
Std.	-	<i>A. lakoocha</i>	Positive standard	80.18 \pm 0.84
Std.	-	Kojic acid	Positive standard	94.26 \pm 0.65

* BE = Broth ethyl acetate extract; BW = Broth water extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract.

20 μ l of 20 μ g/ml fungal extract solution, 20 μ l of tyrosinase solution (Sigma-Aldrich, Germany; 203.30 units/ml) and 20 μ l of L-Dopa solution (0.85 mM). After the addition of L-Dopa, the reaction was immediately monitored at 492 nm by microplate reader for dopachrome formation in the reaction. Kojic acid (Fluka, Sigma-Aldrich, Germany) and water extract of *Artocarpus lakoocha* wood were utilized as an anti-tyrosinase standards for comparison.

2.3.1.2 Cell culture experiments

B16F1 murine melanoma cells were cultured in DMEM with 10% w/v fetal bovine serum in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air at 37°C. When cells obtained 70-80% confluence, cell viability, cellular tyrosinase activity and melanin content were measured [11-13].

2.3.1.2.1 Determination of cell viability

Cell viability was evaluated by sulforhodamine B (SRB) assay [14-15] with slight modification. The B16F1 melanoma cells (5×10^3 cells/well) were seeded in a 96-well plate for 24 h. On the next day, the cells were treated with test samples. After 48 h incubation, cells were fixed with 10% trichloroacetic acid and kept at 4°C. After 1 h, cells

were stained with 0.45% SRB. Then, 10 mM Tris base was added onto the strained cells, and after that the SRB color was dissolved by shaking. The absorbance was determined at 492 nm. DMSO 0.5% was used as a negative control in this study.

2.3.1.2.2 Intracellular anti-tyrosinase activity and melanin content assays

B16F1 melanoma cells were seeded in 12 well plates (3×10^5 cells/well) and incubated at 37°C for 12 h. Then, cells were treated with test samples, after 48 h incubation, cells were lysed with radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) and centrifuged 14,000 rpm for 20 min (4°C) to separate the supernatant.

Intracellular anti-tyrosinase activity

Cellular tyrosinase activity was determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard. The supernatant of lysate cells and 2 mg/ml L-Dopa in phosphate-buffered saline were added to 96-well plate. The mixture was incubated at 25°C for 1 h, and the absorbance was measured at 492 nm.

Melanin content

Cells were dissolved with 1 M NaOH and

incubated at 55°C for 1 h. and the absorbance was determined at 475 nm using microplate reader. Anti-melanin activity was expressed by the percentage of melanin content in crude extracts to that of untreated melanoma cells. Arbutin and kojic acid, a widely used whitening agent, were used as references.

2.3.1.3 *In vivo* study: Pigmentation inhibitory activity on zebrafish

Zebrafish was used to evaluate the pigmentation inhibitory effect. Briefly, embryos at 9 h postfertilization (hpf) were collected in 96-well plates, 20 embryos/well, filled with 0.03% sea salt solution 100 µl/well and each sample solution. 25 µM 1-phenyl-2-thiourea (PTU) was used as a positive control. Phenotype-based evaluations of body pigmentation were carried out at 72 hpf, after embryos hatched, the larvae were put on glass slides and embedded using 2% low melting agarose. The dorsal view of the zebrafish fry was photographed, and the size of black spots in the head-dorsal region at 81 hpf was measured [16-17].

2.3.2 Anti-microbial assay

The agar disc diffusion method was used to determine the anti-microbial activity [18-19]. The samples were dissolved in DMSO and diluted to achieve a concentration of 200 mg/mL (2 mg/disc). The positive controls (antibiotics) included oxacillin (1 µg/disc) for testing of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes*, norfloxacin (10 µg/disc) for *Pseudomonas aeruginosa*, vancomycin (30 µg/disc) for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), amphotericin B (25 µg/disc) for *Candida albicans* and ketoconazole (25 µg/disc) for testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporium gypseum*.

2.3.3 Antioxidant activity (DPPH radical scavenging assay)

DPPH is a consistent free radical which has a blue color that could measure the absorbance at 515 nm. In the presence of antioxidant, it was

reduced to diphenyl-β-picrylhydrazine which is yellow in color. The DPPH radical scavenging assay estimates the capability of samples to donate hydrogen or scavenge free radicals by evaluating the absorption change spectrophotometrically [20-21]. 2 ml of stock solution was added into a vial, mixed well with 2 ml of 6x10⁻⁵ M DPPH and incubated for 20 min. 2 ml of stock solution and ethanol were mixed and used as blank. 2 ml of 6x10⁻⁵ M DPPH and ethanol were mixed and used as control. Measurement of absorbance at 520 nm using UV-vis spectrophotometers and the percentage of antioxidant activity was calculated by following equation 1:

$$\% \text{ inhibition} = \left[\frac{\text{OD blank} - \text{OD control}}{\text{OD blank}} \right] \times 100$$

Equation 1

2.4 Determination of Chemical Contents

2.4.1 Determination of total phenolic content

Total phenolic content was evaluated using Folin-Ciocalteu method with some modifications [22]. The different concentrations of gallic acid (4 - 80 µg/ml) were used to provide the standard curve. 100 µl of each sample concentration was added into the vial. Then it was oxidized with 500 µl Folin-Ciocalteu reagent, and incubated for 3 minutes. The reaction was started by adding sodium carbonate (400 µl, 75 g/l) and the mixture was incubated in the dark at room temperature for 30 min until it was measured the absorbance at 765 nm. Total phenolic content was expressed as gallic acid equivalent (GAE)/g dry weight of sample by extrapolation of the gallic acid standard curve. The total phenolic content (mg/g) could be calculated by the following equation 2:

$$T = C \times DF \times (V/W)$$

Equation 2

T : Total phenolic content (mg/g)

C : The concentration of sample by

extrapolation from the gallic acid standard curve ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

DF : Dilution factor (50)

V : Volume of the extract solution (μl)

W : Weight of sample (mg)

2.4.2 Determination of total flavonoid content

Total flavonoid was evaluated by Aluminum Chloride Colorimetric method [23]. 5 mg of quercetin was dissolved in 80 % ethanol and then diluted to 20, 40, 50, 80 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The diluted standard solutions 500 μl were separately mixed with 1,500 μl of 95 % ethanol, 100 μl of 10% aluminum chloride, 100 μl of 1M potassium acetate and 2,800 μl of distilled water. After 30 minutes, the absorbance was measured at 415 nm against a blank. The total flavonoid content was evaluated by using a standard curve from quercetin (20 - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The results showed in mg quercetin equivalent (QE)/g dry weight of sample.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Bioactivities of Soil Fungal Extracts

104 crude extracts from 54 fungi, consisting of *Penicillium* sp. (38 isolates), *Aspergillus* sp. (7 isolates), *Trichoderma* sp. (4 isolates), *Gongronella* sp. (2 isolates) and unidentified species (3 isolates) of fungi were screened on tyrosinase inhibition. From the results, four samples as SPSF318BE,

SPSF011BE, SPSF318CE and SPSF045BE showed the potent tyrosinase inhibition with more than 50% at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Their tyrosinase inhibitions were as $78.83 \pm 2.72\%$, $75.80 \pm 2.65\%$, $72.45 \pm 3.55\%$ and $58.04 \pm 1.46\%$, respectively. The ethyl acetate extracts from broth (BE) and mycelia (CE) of isolate SPSF318 displayed strong anti-tyrosinase activity (as shown in Table 1). Thus, the crude extracts of SPSF318 were selected for further study on biological activities for anti-hyperpigmentation by determination of tyrosinase inhibition and melanin content via *in vitro* and *in vivo* studies.

3.2 Identification of the Selected Fungus

The fungus SPSF318 was isolated in pure culture from organic soil. The colony was green, granular, velvety, and had a white peripheral apron. The microscopic observation of the isolate revealed unbranched conidiophores arising from foot cells. The conidiophores were enlarged at the tip forming vesicle, and the vesicle was completely covered with phialides [Figure 1]. Based on these morphological and microscopic observations such as the color and margin of the colonies, structure of hyphae, and conidiophores, the isolate SPSF318 was as species of *Aspergillus*.

The fungus SPSF 318 was further identified based on an analysis of their ITS sequences by BIOTEC, Thailand. The genomic DNA was extracted from mycelia and sequencing of the

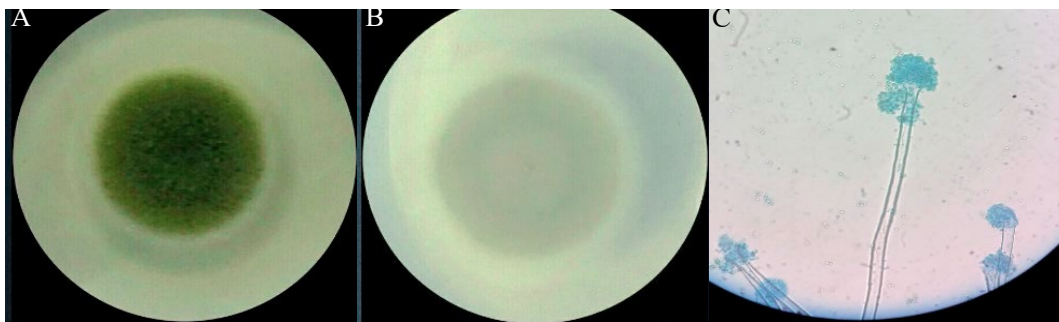


Figure 1. Morphological characteristics of the selected fungus, SFSF318, on PDA (A. Dorsal view, B. Ventral view, C. Microscopic characteristics).

ACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTG
 CTTCGGCGGGCCGCCATTCTGGCCGCGGGGGCTCTCAGCCCCGGCCCGCCGCGGAGACACCACGAACTCT
 GTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCAT
 CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT
 TGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTC
 GTCGTCCCCTCCGGGGGGGACGGGCCAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTG
 TCACCCGCTCTGTAGGCCGCGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
 GATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG

Figure 2. Nucleotide region of ITS rDNA; Nucleotide sequence (5' -> 3') of SPSF318.

Table 2. Tyrosinase inhibitory activity of SPSF318 crude extracts at 20 µg/ml.

No.	Crude extracts	Sample code	% Tyrosinase inhibition ± SD
1.	Broth ethyl acetate	BE	78.83 ± 2.72
2.	Broth water	BW	48.33 ± 2.32
3.	Cell ethyl acetate	CE	72.45 ± 3.55
4.	Cell hexane	CH	-11.98 ± 1.23
5.	Cell methanol	CM	-9.10 ± 1.28
Std.	<i>A. lakoocha</i>	Positive standard	80.18 ± 0.84
Std.	Kojic acid	Positive standard	94.26 ± 0.65

rDNA ITS fragment, it showed 100 % similarity with the members of the genus *Aspergillus*. The nucleotide sequence data of SPSF318 [Figure 2], belongs to *Aspergillus flavus*.

3.3 Anti-tyrosinase Activity of SPSF318 Crude Extracts

Inhibitory effects of five crude extracts; BE, CE, CH, CM and BW on mushroom tyrosinase activity is illustrated in Table 2. At a concentration of 20 µg/ml, BE could inhibit tyrosinase enzyme as 78.83 ± 2.72% while the positive controls, kojic acid and water extract of *Artocarpus lakoocha* wood, could inhibit this enzyme with 80.18 ± 0.84% and 94.26 ± 0.65%, respectively.

3.4 Cytotoxicity Effect of SPSF318 Crude Extracts

The cell viability was determined by SRB assay. The results showed that BE, BW and CM crude extracts of *A. flavus* were not considered

cytotoxic after incubation of pigmented B16F1 melanoma cells. More than 80% of the cells were still viable at a dose 200 µg/ml. While CE and CH cell viability was more than 80% at concentrations of 50 µg/ml. At the same time, viable cells were decreased at 0.50% of DMSO which was used as a negative control.

3.5 Intracellular Anti-tyrosinase Activity and Melanin Content

The inhibitory effect of crude extracts was evaluated at nontoxic doses; 200 µg/ml excluding CE and CH were prepared at 50 µg/ml. After the incubation of pigmented melanoma B16F1 cells with all sample extracts, the supernatant was measured anti-tyrosinase activity. The results showed that the extracts from SPSF318 exhibited the significant reduction in cellular tyrosinase activity; furthermore, CH at 50 µg/ml showed tyrosinase inhibition as 52.15 ± 1.88 % while BE showed 66.18 ± 1.35% at 200 µg/ml. The

inhibition of tyrosinase enzyme led to a reduction in the number of melanin content as the results showed when they were compared with control that was without tyrosinase inhibition [Figure 3].

3.6 Pigmentation Inhibitory Activity on Zebrafish

Depigmentation effect of crude extracts from SPSF318 was observed on zebrafish embryos by measuring the size of the black spots. The results showed that at a concentration of 200 µg/ml crude extracts appeared significantly reduced pigmentation comparing with the untreated group [Figure 4a-4b] except CE and CH which showed toxicity to zebrafish embryos by the detection of coagulation of fertilize eggs, lack of somite formation, lack of detachment of the tail, and lack of heartbeat.

3.7 Anti-microbial Activity

Five crude extracts from SPSF318 were evaluated for their anti-microbial activity. The

results found that BE, CE and BW had anti-bacterial effect against gram-positive bacteria as shown in Table 3. The BE showed strong inhibitory effect against *S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* and *E. coli* with inhibition zone 13.75 ± 0.70 , 10.85 ± 2.00 , 15.10 ± 0.74 , 18.50 ± 0.10 and 14.65 ± 0.29 mm, respectively.

3.8 Antioxidant Activity

All five crude extracts showed some degree of antioxidant activity [Table 4]. The percentages of DPPH radical scavenging effect of each sample ranged from 2.40 % to 97.30 %. The BW showed the highest scavenging effect (97.30 %), followed by BE, CE, CH, and CM, respectively.

3.9 Chemical Contents

3.9.1 Total phenolic content

In this study, total phenolic content in SPSF318 crude extracts was evaluated by the Folin-Ciocalteu procedure, quantified using a standard curve of gallic acid. Total phenolic content of SPSF318

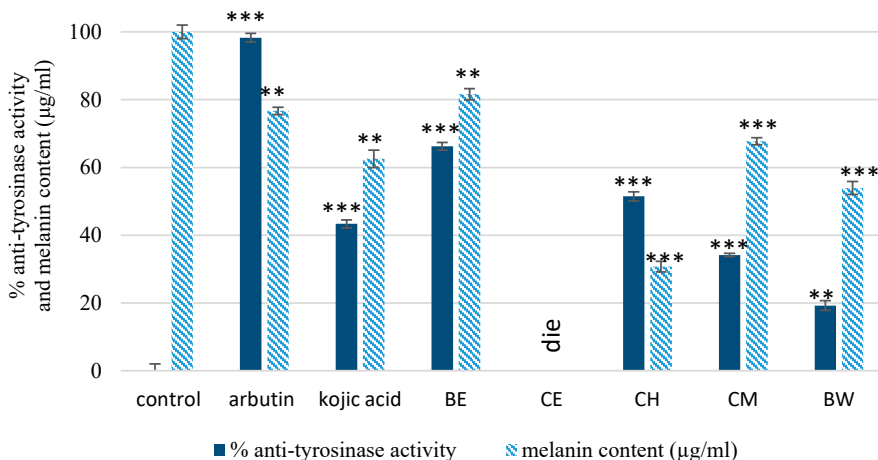


Figure 3. The effects of SPSF318 crude extracts on intracellular anti-tyrosinase activity and melanin content on B16F1 melanoma cells. BE = Broth ethyl acetate extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract; BW = Broth water extract. Arbutin and Kojic acid = positive controls.

Data were expressed as mean \pm standard deviation from three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to the untreated control.

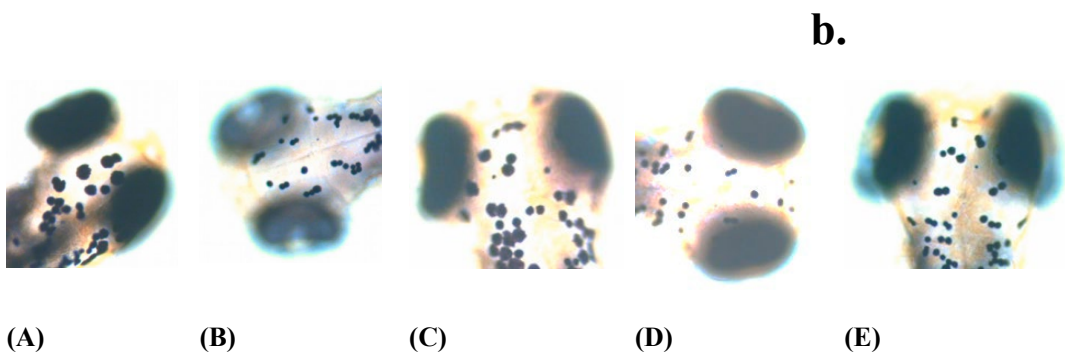
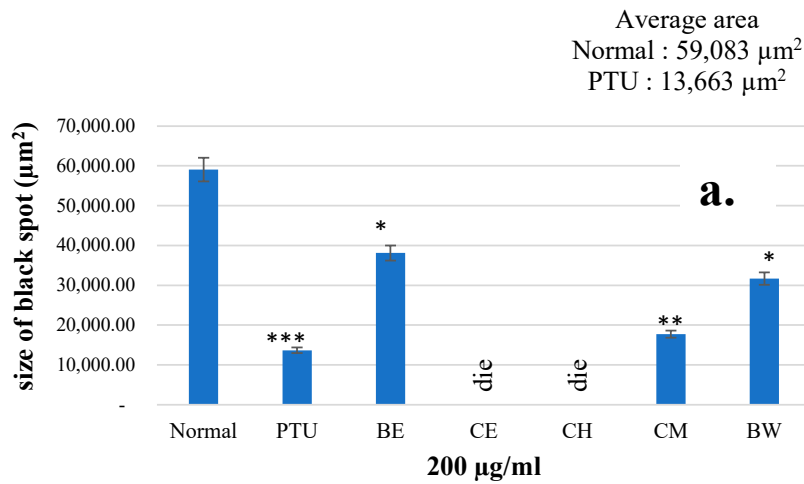


Figure 4. Pigmentation inhibitory effects on Zebrafish.

a. PTU (phenylthiourea) was used as positive control. Crude extracts from SPSF318: BE = Broth ethyl acetate extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract; BW = Broth water extract. Data are expressed as mean \pm standard deviation from three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ indicate a significant difference from the control group

b. Effect of melanogenic inhibitors on pigmentation in zebrafish embryos. Zebrafish pigmentation was evaluated using a microscope. (A) = A control group; untreated zebrafish embryos; (B) = PTU (phenylthiourea) as a positive control; (C, D, and E) = BE, CM and BW extracts of SPSF318, respectively.

Table 3. Anti-microbial activity of SPSF318 crude extracts at 2 mg/disc by agar disc diffusion method.

Microbes	Inhibition zone (mm)					
	Standard drugs*	BE	BW	CE	CH	CM
Gram positive bacteria						
<i>S. aureus</i>	23.05±0.85	13.75±0.70	13.50±0.85	8.45±0.86	-	-
MRSA	22.35±0.40	10.85±2.00	11.85±1.48	10.65±0.90	-	-
<i>S. epidermidis</i>	22.35±0.40	15.10±0.74	14.60±1.08	-	-	11.55±0.98
<i>P. acnes</i>	38.80±0.35	-	9.40±0.60	-	-	-
Gram negative bacteria						
<i>P. aeruginosa</i>	29.55±0.40	18.50±0.10	-	8.30±0.75	-	-
<i>E. coli</i>	23.30±0.45	14.65±0.29	19.20±0.10	8.15±0.75	-	-

* Standard drugs: Norfloxacin for *P. aeruginosa* and *E. coli*, concentration 10 µg/disc. Oxacillin for *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes*, concentration 1 µg/disc. Vancomycin for MRSA, concentration 30 µg/disc. BE = Broth ethyl acetate extract; BW = Broth water extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract.

Table 4. DPPH radical scavenging activity of SPSF318 crude extracts.

No.	Sample	Scavenging effect (%) at 100 µg/ml
1.	BE	35.28±3.65
2.	BW	97.37±1.88
3.	CE	28.45±5.92
4.	CH	6.47±3.61
5.	CM	2.40±14.65
Positive standard	Ascorbic acid	116.14 ± 0.76

BE = Broth ethyl acetate extract; BW = Broth water extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract.

crude extracts was shown in Figure 5 which ranged from 508.46 mg GAE/g to 12.88 mg GAE/g. The maximum value of total phenolic content was observed to be 508.46 mg GAE/g of broth ethyl acetate (BE) and minimum value was demonstrated in the methanol extract of cell (CM) as 12.88 mg GAE/g.

3.9.2 Total flavonoid content

In this study, total flavonoid content was quantified by the aluminum chloride colorimetric assay; the total flavonoid content of the extracts was calculated using a quercetin standard curve.

The flavonoid content of BW was observed to be highest, that is 23.40 mg QE/g [Figure 6] whereas the flavonoid content in CE, CM, CH and BE was 17.44 ± 1.18 , 16.62 ± 1.00 , 10.53 ± 1.26 , and 4.73 ± 0.84 , respectively.

Since, crude extracts of *A. flavus* SPSF318 showed the potent tyrosinase inhibitory activity against tyrosinase enzyme both enzymatic and cellular assays. They also exhibited the inhibition of melanin synthesis on B16F1 melanoma cells. Incidentally, they also significantly reduced pigmentation on zebrafish. *Aspergillus* sp. is the fungal genus of greatest interesting for study

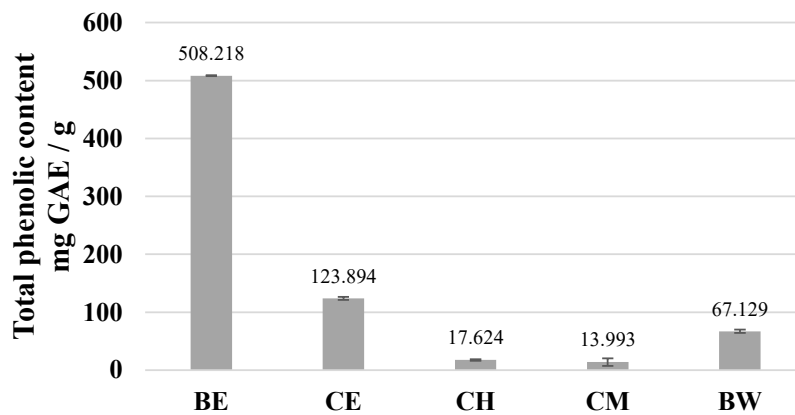


Figure 5. Total phenolic content (mg GAE/g) of five crude extracts from SPSF318. BE = Broth ethyl acetate extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract; BW = Broth water extract.

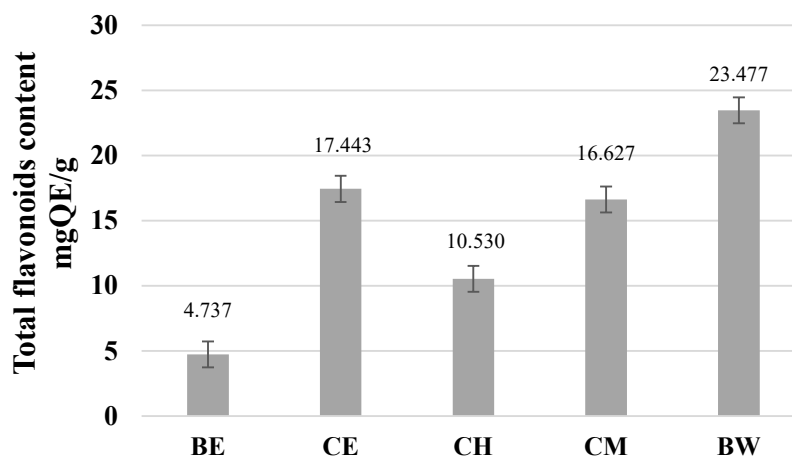


Figure 6. Total flavonoids content (mg QE/g) of five crude extracts from SPSF318. BE = Broth ethyl acetate extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract; BW = Broth water extract.

on biological activities, especially anti-tyrosinase activity because the members of this family have long been known to produce phenolic compounds of various structural types [15]. Since various reports have shown a close relationship between anti-tyrosinase activity and total phenolic content [24] then *Aspergillus* sp. will be the good choice for further study in order to figure out the active compound to be the anti-hyperpigment agent.

4. CONCLUSIONS

A total of 104 crude extracts from 54 fungi, consisting of *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Gongronella* sp. and unidentified fungal species were evaluated the biological activity on tyrosinase inhibition. The most active sample as SPSF318 was selected for further study. Then, the SPSF318 was identified by molecular method as *Aspergillus flavus*. *A. flavus* extracts showed high potential activity against tyrosinase enzyme on both intracellular and extracellular enzymatic assays by significantly reduced pigmentation on zebrafish. Furthermore, they showed moderate potential effect on antioxidant and antibacterial activities. Thus, *A. flavus* is potential fungus for further study of chemical constituents in order to figure out the active compound which might be the lead compound for whitening agent.

In addition, SPSF011BE and SPSF045BE which were identified by morphology as *Penicillium* sp. also exhibited tyrosinase inhibition. So, they are interesting for further study to seek the bioactive compounds from these species deeply. Therefore, fungal extracts isolated from organic soil in this area could be considered as good sources of various bioactive natural products, especially, to identify new inhibitor with drug-like properties on tyrosinase enzyme activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Prof. Dr. Souwalak Phongpaichit, Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University for supporting and identification of isolated

fungal samples in this study. The authors also would like to thank the financial support from the office of the Royal Development Projects Board (ORDPB) under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG project). The research was also supported by scholarship which supported tuition fees issued by the Discipline of Excellence in Pharmacy Project, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University.

CONFLICT OF INTEREST

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

- [1] Chang T.S., *Materials*, 2012; **5**: 1661-1685. DOI 10.3390/ma5091661.
- [2] Chang T.S., *Int. J. Mol. Sci.*, 2009; **10**: 2440-2475. DOI 10.3390/ijms10104257.
- [3] Kim Y.J. and Uyama H., *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005; **62**: 1707-1723. DOI 10.1007/s00018-005-5054-y.
- [4] Adrio J.L. and Demain A.L., *Int. Microbiol.*, 2003; **6(3)**: 191-199. DOI 10.1007/s10123-003-0133-0.
- [5] Raina S., De Vizio D., Palonen E.K., Odell M., Brandt A.M., Soini J.T. and Keshavarz T., *Process Biochem.*, 2012; **47(5)**: 843-852. DOI 10.1016/j.procbio.2012.02.021.
- [6] Phainuphong P., Rukachaisirikul V., Phongpaichit S., Sakayaroj J., Kanjanasirirat P., Borwornpinyo S. and Muanprasat C., *Tetrahedron*, 2018; **74**: 5691-5699. DOI 5691-99. 10.1016/j.tet.2018.07.059.
- [7] Phongpaichit S., Nikom J., Rungjindamai N., Sakayaroj J., Hutadilok-Towatana N., Rukachaisirikul V. and Kirtikara K., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2007; **51**: 517-525. DOI 10.1111/j.1574-695X.2007.00331.x.
- [8] Loizzo M.R., Tundis R. and Menichini F., *Compr. Rev. Food. Sci. F.*, 2012; **11(4)**: 378-398.

- DOI 10.1111/j.1541-4337.2012.00191.x.
- [9] Zolghadri S., Bahrami A., Hassan Khan M.T., Munoz-Munoz J., Garcia-Molina F., Garcia-Canovas F. and Saboury A.A., *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 2019; **34(1)**: 279-309. DOI 10.1080/14756366.2018.1545767.
- [10] Dej-adisai S., Meechai I., Puripattanavong J. and Kummee S., *Arch. Pharm. Res.*, 2014; **37**: 473-483. DOI 10.1007/s12272-013-0198-z.
- [11] Lajis A., Basri M., Mohamad R., Hamid M., Ashari S., Ishak N. and Ariff A., *Chem Pap.*, 2013; **67**: 573-585. DOI 10.2478/s11696-013-0336-6.
- [12] Chang M.S., Choi M.J., Park S.Y. and Park S.K., *Phytother. Res.*, 2010; **24(9)**: 1359-1364. DOI 10.1002/ptr.3123.
- [13] Ye Y., Chou G.X., Mu D.D., Wang H., Chu J.H., Leung A.K., Fong W. and Yu Z., *J. Ethnopharmacol.*, 2010; **129**: 387-390. DOI 10.1016/j.jep.2010.04.009.
- [14] Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bpkesch H., Kenney S. and Boyd M.R., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990; **82**: 1107-1112. DOI 10.1093/jnci/82.13.1107.
- [15] Vanicha V. and Kanyawim K., *Nat. Protoc.*, 2006; **1(3)**: 1112-1116. DOI 10.1038/nprot.2006.179.
- [16] Lee Y.R., Park J.H., Molina R.C., Nam Y.H., Lee Y.G., Hong B.N., Baek N.I. and Kang T.H., *Arch. Dermatol. Res.*, 2018; **310**: 245-253. DOI 10.1007/s00403-018-1804-1.
- [17] Le H.T., Hong B.N., Lee Y.R., Cheon J.H., Kang T.H. and Kim T.W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016; **26**: 699-705. DOI 10.1016/j.bmcl.2015.09.059.
- [18] Lorian V., *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5th Edn., Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2005.
- [19] Dej-adisai S., Parndaeng K. and Wattanapiromsakul C., *Trop. J. Pharm. Res.*, 2016; **15**: 497-506. DOI 10.4314/tjpr.v15i3.10.
- [20] Ramamoorthy P.K. and Bono A., *J. Eng. Sci. Technol.*, 2007; **2(1)**: 70-80.
- [21] Ebrahimzadeh M.A., Pourmorad F. and Bekhradnia A.R., *Afr. J. Biotechnol.*, 2008; **7(18)**: 3188-3192.
- [22] Baba S.A. and Malik S.A., *J. Taibab Univ. Sci.*, 2005; **9**: 449-454. DOI 10.1016/j.jtusci.2014.11.001.
- [23] Chang C.C., Yang M.H., Wen H.M. and Chern J.C., *J. Food Drug Anal.*, 2002; **10(3)**: 178-182.
- [24] Prasad K.N., Yang B., Yang S., Chen Y., Zhao M., Ashraf M. and Jiang Y., *Food Chem.*, 2009; **116(1)**: 1-7. DOI 10.1016/j.foodchem.2009.01.079.

Biological Activities and Chemical Profiles of Selected Soil Fungi Isolated from Sirindhorn Peat Swamp Forest of Narathiwat, Thailand

(Aktiviti Biologi dan Profil Kimia Kulat Tanah Terpilih yang Dipencilkan dari Hutan Paya Gambut Sirindhorn di Narathiwat, Thailand)

SUKANYA DEJ-ADISAI*, NARISORN KAEWCHUTIMA, CHATCHAI WATTANAPIROMSAKUL & SATHIANPONG PHOOPHA

ABSTRACT

*A total of 54 soil fungi were collected from Sirindhorn peat swamp forest in Narathiwat Province which is the last peat swamp forests in Thailand. They were extracted using four different solvents and 104 crude extracts were obtained. The bioactivity screening of these samples was done employing alpha-glucosidase inhibition, anti-inflammation using nitric oxide inhibition and cytotoxicity using cancer cell line (MCF-7). The results showed that SPSF224 crude extract had the best biological activities in the screening tests and was then selected for further study. The SPSF224 was identified as *Penicillium maximae*. The crude extracts of *P. maximae* were determined for chemical profile, IC_{50} value of alpha-glucosidase inhibition, antioxidant and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *T. rubrum*. This was the first report of chemical investigation and biological activity evaluation of *P. maximae*.*

Keywords: Alpha-glucosidase inhibition; antidiabetic; anti-microbial; antioxidant; Penicillium maximae

ABSTRAK

*Sebanyak 54 kulat tanah telah dikumpulkan daripada hutan paya gambut Sirindhorn di Wilayah Narathiwat yang merupakan hutan paya gambut terakhir di Thailand. Kesemuanya diekstrak menggunakan empat pelarut yang berbeza dan 104 ekstrak kasar diperolehi. Penyaringan bioaktiviti sampel ini dilakukan dengan menggunakan aktiviti perencatan alfa-glukosidase, anti-radang menggunakan perencatan nitrik oksida dan sitotoksitas menggunakan titisan sel kanser (MCF-7). Hasil kajian menunjukkan bahawa ekstrak kasar SPSF224 mempunyai aktiviti biologi terbaik dalam ujian saringan dan kemudian dipilih untuk kajian lebih lanjut. SPSF224 dikenal pasti sebagai *Penicillium maximae*. Ekstrak kasar *P. maximae* ditentukan untuk profil kimia, nilai IC_{50} perencatan alfa-glukosidase, aktiviti antioksidan dan antimikrob terhadap *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton mentagrophytes* dan *T. rubrum*. Ini adalah laporan pertama penyelidikan kimia dan penilaian aktiviti biologi *P. maximae*.*

Kata kunci: Antidiabetik; antimikrob; antioksidan; Penicillium maximae; perencatan alfa-glukosidase

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases characterised by hyperglycemia due to the lack of insulin secretion, action or both. DM is a major non-communicable disease or NCDs in the world. The number of people with diabetes worldwide between the ages of 20 and 79 in 2017 was 425 million peoples and will

be increased to 629 million by 2045 (WHO 2019). The Bureau of Non-Communicable Diseases, Ministry of Public Health, Thailand showed the statistics of diabetic patients per 100,000 population per year in Thailand in 2007 and 2015 were 500,347 and 802,017, respectively (Bureau of NCD 2019).

A defect in insulin production is the primary cause of rising blood sugar levels. Alpha-glucosidase enzyme is a key enzyme located at the brush border of the small intestine used for delaying blood glucose absorption which hydrolyses 1, 4 alpha-glycosidase bonds in the terminal position of the polysaccharide chain (Gao et al. 2008). The complex carbohydrates in the lumen of the small intestine have to be broken up by alpha-glucosidase before the resulting glucose molecules can be taken up and finally reach the bloodstream. Postprandial hyperglycemia can be improved by inhibition of small intestinal alpha-glucosidase activity (Hakamata et al. 2009). The drugs currently being used for hyperglycemia treatment by alpha-glucosidase inhibitory mechanism include miglitol (Kalra 2014), voglibose (Horii et al. 1986) and acarbose (Bischoff 1994) which have been initially isolated from microorganisms.

It is well known that long term DM is often associated with secondary complications due to over production of free radicals and malfunction of antioxidant process giving rise to increasing oxidative stress. From previous clinical studies, the results of antioxidant treatments showed that they could improve symptoms of diabetic polyneuropathy and increased glucose transport in skeletal muscle cells. The report also presented that the intake of antioxidant could reduce the risk of development on type 2 DM (Scott & King 2004).

Moreover, DM patients are susceptible to be infected with pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and *Streptococcus pneumoniae* because their immune systems are weak (Casqueiro & Alves 2012). Therefore, combination treatment with antioxidant and antibacterial agents could help to improve DM treatment effectively (Fuchs et al. 2013). The antimicrobial effects of some of active ingredients of *Penicillium* species including griseofulvin, is one of antifungal antibiotics currently used for systematic fungal infection treatment which was isolated from *P. griseofulvum* (MacMillan 1954).

Fungi are found in a variety of habitats such as soil, associated with plants, water, associated with other fungi and ruminant guts (Dighton & White 2017). Secondary metabolites produced by fungi usually show inhibitory or toxicity effects on other organisms. Accordingly, fungal metabolites have been developed to be used in pharmaceuticals (Shwab & Keller 2008) due to their antibacterial, antifungal, anticancer (Zhao et al. 2013), anti-inflammatory (Deshmukh et al. 2009), antioxidant

(Sadananda et al. 2014) and cytotoxic activities (Turbyville et al. 2006).

Peat swamp forests are tropical moist forests and they create a thick layer of acid soil (Thawai 2004) with high relative biodiversity and humidity (Boonyuen et al. 2012). The microbes living in this area can survive in this harsh environment. The Sirindhorn Peat Swamp Forest Nature Research and Study Centre is located in one of the last remaining peat swamp forests in Thailand. This forest area is reported to spread over 224 square kilometers (ORDPB 2019). Preliminary study showed that various fungi such as *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., and *Gongronella* sp. have been isolated from soil obtained from Sirindhorn peat swamp forest. Pharmacological activities of these fungi such as antifungal (Wang et al. 2012), cytotoxic, insecticide (Rukachaisirikul et al. 2013), antibacterial (Cazar et al. 2005), antioxidant (Trisuwan et al. 2011), antimalarial and anticancer (Trisuwan et al. 2014) have been reported. This study aimed to search for the active substances for antidiabetic activity from fungi isolated from the soil of Sirindhorn peat swamp forest by assessing alpha-glucosidase inhibitory efficacy. The effective compound or extract could serve as a lead substance for further development of anti-diabetic drug. Additionally, bioactivity screening of alpha-glucosidase inhibition, antiinflammation and cytotoxicity of the fungal crude extracts from Sirindhorn peat swamp forest are herewith reported.

MATERIALS AND METHODS

FUNGAL MATERIALS

The 54 soil fungi were collected from Sirindhorn peat swamp forest, Narathiwat, Thailand. They were isolated by the researchers from Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand. The isolated fungi were cultivated and extracted using four different solvents to obtain 104 sample extracts which were then screened for bioactivity determination. The bioactivity screening performed on these samples were alpha-glucosidase inhibition, anti-inflammation (nitric oxide inhibition) and cytotoxicity using cancer cell line (MCF-7).

DETERMINATION OF ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITY

This assay was modified from previously reported

protocol using colorimetric method in 96-well plate (Dej-adisai & Pitakbut 2015). Samples (2 mg/mL) were added to 50 μ L of 10 mM phosphate buffer solution (pH7), which contained 2 mg/mL of bovine serum albumin and 0.2 mg/mL of sodium azide, and then incubated at 37 °C for 2 min with 50 μ L of α -glucosidase enzyme (1 unit/mL). The result of α -glucosidase inhibition activity was processed using the following equations:

$$\text{Velocity} = \frac{\Delta \text{Absorbance at 405 nm}}{\Delta \text{Time}}$$

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{V \text{ control} - V \text{ sample}}{V \text{ control}} \times 100$$

DETERMINATION OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

Inhibitory effect on nitric oxide (NO) production by the 104 fungal extracts (25 μ g/mL) were carried out using RAW264.7 cells following Dej-adisai et al. (2018). NO production was determined by measuring the accumulation of nitrite in the culture supernatant using the Griess reagent. The reagent consisted of *N*-(1-naphthalenediamine) and sulfanilic acid. Under acidic conditions, sulfanilic acid (sulfanilamide) was converted by nitrite to a diazonium salt. *N*-(1-naphthalenediamine) was added into diazonium salt to form a colored azo dye (red-pink color). The optical density was measured with a 570 nm using microplate reader. L-nitroarginine (L-NA), indomethacin and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) were used as positive controls.

DETERMINATION OF CYTOTOXIC ACTIVITY

Cytotoxic activity against human cancer cells for 104 fungal extract samples (25 μ g/mL) were determined by performing sulforhodamine B (SRB) colorimetric assay. SRB assay was used for measuring the cellular protein content using two of the sulfonic groups to bind to basic amino acid in the cell under mild acid condition, which show pink color. Human cancer cells (human breast carcinoma cell line (MCF-7)) and a human normal cell (human gingival fibroblast cell line (HGF)) were used for cytotoxicity test. Camptothecin was used as a positive control. The experiment was tested in 96 well plates and detected using microplate reader at wavelength 492 nm (Dej-adisai et al. 2018).

FUNGAL IDENTIFICATION

Fifty-four soiled fungi were collected from Sirindhorn peat swamp forest in Narathiwat Province which is the last peat swamp forests in Thailand. They were extracted by 4 different solvents and obtained 104 crude extracts. The bioactivity screening of the 104 crude extracts showed that SPSF224 crude extract had the best biological activities. SPSF224 was selected for further species identification which was performed by Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany. The fungus was subjected to DNA extraction and sequencing of the rDNA ITS fragment (Schoch et al. 2012). Additionally, we amplified and sequenced the large subunit of rDNA (LSU) and partial calmodulin gene (Visagie et al. 2013). The fungus rDNA-ITS fragment showed two different operons and was therefore not useful for identification. Comparison of assembled calmodulin sequences was performed with GenBank, Myco ID and various databases as well as with the type species of *Penicillium maximae* (GenBank Accession: KC773821). *P. maximae* belongs to the section Sclerotiora within the genus *Penicillium* (Visagie et al. 2014).

FUNGAL FERMENTATION AND EXTRACTION OF SPSF224

SPSF224 was grown on potato dextrose agar (PDA) at 25 °C for five days. Five pieces of 0.5 \times 0.5 cm² mycelial agar plugs were inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 300 mL of PDA at room temperature for 21 days. The fungal culture (60 L) was filtered to separate into wet mycelia and the filtrate. The filtrated broth was transferred to a separatory funnel and the same volume of ethyl acetate was added each time. The organic layer was evaporated to dry under reduced pressure to provide broth ethyl acetate extract, BE (red-brown paste, 5.77 g). The fungal mycelium was soaked for 3 days in methanol. The MeOH layer was concentrated by an evaporator and added to 150 mL of distilled water. The mixture was then shaken with 500 mL of hexane. The aqueous layer was extracted three times with an equal volume of ethyl acetate and then evaporated to obtain cell hexane extract, CH (yellow-brown paste, 1.35 g), cell ethyl acetate extract, CE (red-brown paste, 2.47 g) and cell methanol extract, CM (black-brown paste, 3.59 g). Then these extracts from SPSF224 were further studied for chemical profiling and biological activities.

FUNGAL PURIFICATION

The extract from SPSF224 BE (5.767 g) was loaded onto the quick column by dry-loading technique. Then, a gradient solvent system as a mobile phase was eluted through the column with a mixture of hexane, ethyl acetate, methanol and water from 100:0:0:0 to 0:50:40:10 to yield 19 subfractions F1 to F19. F12 (0.972 g) was further purified using classical column chromatographic technique. The separation was carried out using a mixture of chloroform and methanol from 100:0 to 50:50 to obtain 11 subfractions. F12-8 (0.121 g) was loaded on the surface of Sephadex® LH-20 column chromatography using methanol as eluent to produce 8 fractions. F12-8-8 (68 mg) was purified by Sephadex® LH-20 column chromatography. The same elution protocol was repeated giving 7 subfractions. Fraction F12-8-8-4 was isolated and determined as semi-purified PM1 (30.2 mg).

GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS) (5977A Series GC/MSD System, Agilent Technologies, USA) was used to analyse the crude extracts. The samples were chromatographed on capillary columns, size 30 m × 250 μm × 0.25 μm. One microliter of extract was injected into an injector at 70 °C and held for 3 min. The temperature was increased by 15 °C/min until it reached 200 °C without holding. It was then increased with a program rate of 3 °C/min to 300 °C and was held for 10 min. The identification of the components in the extract was carried out by comparison of their retention time and mass spectral fragmentation pattern with those stored in the computer library.

CHEMICAL SCREENING

The extracts from SPSF224 were further studied for its chemical profile by identification of the presence of tannin, alkaloids, steroid, triterpenoid, cardiac glycoside, saponin, anthraquinone, coumarin, and flavonoid. The chemical screening tests were performed according to previously reported methods (Farnsworth 1966; Harborne 1984; Trease & Evans 1983) with some modifications.

DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT (TPC)

Total phenolic content of *P. maximae* extracts was estimated using the Folin-Ciocalteu colorimetric assay according to the method of Singleton and Rossi (1965) with some modifications. Stock solutions of samples and

standard (gallic acid) at the concentration of 5 mg/mL were dissolved in absolute ethanol. Total phenolic contents were obtained from regression equation $Y = 0.0101X + 0.0111$ with R^2 value of 0.999 and expressed as mg/g gallic acid equivalent using the equation below:

$$\text{Total phenolic content (mg/g)} = \frac{c \times DF \times V}{W}$$

where C is the concentration of gallic acid (μg/mL); DF is the dilution factor; V is the volume of fungal extract (mL); and W is the weight of fungal extract (mg).

DETERMINATION OF TOTAL FLAVONOID CONTENT

The total flavonoid content of *P. maximae* extracts was determined by aluminum chloride colorimetric method as described by Chang et al. (2002) with some modifications. The sample (500 μL of 1 mg/mL) was mixed well with 1.5 mL of 95% ethanol, 100 μL of 10% AlCl₃, 100 μL of 1M CH₃COOK and 2.8 mL of distilled water. Five varying concentrations of quercetin were used in preparing the standard curve. Regression equation of the curve, $Y = 0.0033X + 0.0072$ with R^2 value of 0.999 was obtained. The equation was used to calculate the quercetin content in 1 g of sample (mg quercetin equivalence (QE)/g of sample).

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY

The radical scavenging activity of the various extracts of *P. maximae* were determined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil free radical scavenging assay. The samples (200 μg/mL) or 2 mL of 200 μg/mL quercetin were mixed well with 2 mL of 6 × 10⁻⁵ M DPPH. Ethanol was used as blank. The mixtures were incubated for 20 min in the dark. Measurement of absorbance at 520 nm was done using UV-vis spectrometers and percentage of antioxidant activity was calculated using the following equation:

$$\% \text{ inhibition} = \left(\frac{OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{control}}} \right) \times 100$$

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY

The preliminary screening of antimicrobial activity was carried out using the agar disc diffusion assay (Lorian 2005). *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923), *S. epidermis* (TISTR 517), *Propionibacterium acnes* (DMTS 14916) and Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA 1350II06) were selected for Gram positive bacteria. *Escherichia*

coli (ATCC35218) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC10145) were selected for Gram negative bacteria. *Candida albicans* (TISTR 5779) was selected for yeast and *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum*, and *T. mentagrophytes* were selected for fungi. Five fungal extracts of SPSF224 were dissolved in DMSO and diluted to achieve a concentration of 200 µg/mL and then 10 µL of samples were dropped on the sterile paper disc. All test plates were incubated for 24 h at 37 °C for bacteria, 24 to 48 h at 35 °C for yeast and 7 days at 30 °C for fungi. The appearance of zone of inhibition on the plates was measured in diameter (mm).

RESULTS AND DISCUSSION

BIOACTIVITY DETERMINATION OF FUNGAL EXTRACTS

A total of 104 crude extract samples from 54 fungi collected from Sirindhorn peat swamp forest were determined for their biological activities as anti-alpha-glucosidase, anti-inflammatory and cytotoxic (Table 1). Thirty-eight samples showed anti-alpha-glucosidase activity of over 90% inhibition. Only two samples showed potential effects of anti-inflammatory and cytotoxic activities at 25 µg/mL which SPSF224BE and SPSF224CE. Hence, SPSF224 was selected for further studies.

TABLE 1. Bioactivity determination of 104 fungal extracts

No.	Extract	Anti-alpha-glucosidase activity (% inhibition)	Anti-inflammation (% inhibition)		Cytotoxicity on MCF-7 (% inhibition)
			Nitric oxide inhibition	Cytotoxic effect	
1.	SPSF001BE	43.95±3.65	35.39±3.57	-2.13±3.78	18.88±5.36
2.	SPSF002BE	27.80±3.73	43.63±2.78	0.94±1.30	59.42±4.08
3.	SPSF003BE	99.71±0.29	37.73±2.22	1.26±4.89	11.24±5.36
4.	SPSF004BE	63.98±3.62	32.22±4.55	0.46±3.48	9.90±5.97
5.	SPSF005BE	18.19±4.00	108.64±2.04	85.23±1.71	99.32±0.22
6.	SPSF006BE	50.07±4.29	56.57±3.43	-2.94±2.90	38.63±2.57
7.	SPSF007BE	100.20±0.24	26.24±2.80	2.69±3.39	39.10±1.30
8.	SPSF008BE	99.55±0.08	23.42±3.15	1.12±1.04	11.78±5.60
9.	SPSF009BE	99.75±0.27	33.71±2.37	3.56±1.95	-3.90±5.39
10.	SPSF010BE	7.18±5.33	22.95±1.21	3.86±0.92	66.00±4.00
11.	SPSF001BE	43.95±3.65	35.39±3.57	-2.13±3.78	18.88±5.36
12.	SPSF012BE	100.56±2.86	51.01±4.30	2.24±2.13	0.85±4.99
13.	SPSF013BE	70.74±2.30	30.45±3.31	1.08±2.93	85.14±2.70
14.	SPSF028BE	99.71±0.29	123.29±2.13	87.81±0.76	92.18±0.15
15.	SPSF029BE	83.63±1.89	123.37±2.04	78.21±0.78	97.10±0.18
16.	SPSF030BE	68.62±7.05*	47.42±3.37	10.07±1.76	10.31±2.43
17.	SPSF031BE	98.55±2.69	35.87±1.76	11.89±1.02	34.92±2.62
18.	SPSF032BE	98.05±0.63	21.25±0.86	11.99±1.75	12.00±4.68
19.	SPSF033BE	99.50±0.09	124.72± 2.27	76.14±1.16	87.49±1.15
20.	SPSF034BE	91.26±0.65	28.02±2.88	14.27±2.50	4.43±1.57
21.	SPSF035BE	99.27±0.34	35.93±3.06	14.53±2.47	7.98±0.22
22.	SPSF037BE	97.61±2.82**	19.86±2.06	22.80±2.69	74.12±1.64
23.	SPSF038BE	36.72±1.52	29.12±2.91	15.58±1.68	3.40±3.60

24.	SPSF039BE	76.91±0.55	31.88±2.13	15.02±3.12	5.48±1.90
25.	SPSF040BE	96.72±0.82	36.10±4.11	18.17±0.53	5.27±2.84
26.	SPSF042BE	66.24±4.05	91.71±5.17	11.45±2.89	64.38±4.08
27.	SPSF043BE	96.87±0.34	81.32±1.14	7.58±2.08	24.63±1.65
28.	SPSF044BE	61.11±0.51	101.08±1.85	47.26±2.26	75.90±0.76
29.	SPSF045BE	82.56±0.96	47.38±2.42	14.09±3.07	19.99±2.34
30.	SPSF046BE	82.54±2.91	36.26±2.46	17.26±0.64	2.76±4.27
31.	SPSF047BE	91.51±0.68	67.22±1.75	15.86±2.28	17.17±2.44
32.	SPSF048CE	88.92±1.42	45.87±2.66	15.37±1.10	1.48±1.96
33.	SPSF049BW	54.69±3.32	100.73±2.93	16.54±0.58	73.93±0.94
34.	SPSF051BW	91.44±2.23	95.85±3.58	47.76±2.91	95.54±3.12
35.	SPSF206CM	17.98±2.89	29.19±3.30	20.58±2.08	10.60±1.28
36.	SPSF206BE	79.43±1.19	66.72±1.47	12.77±2.51	47.12±1.08
37.	SPSF208BE	98.31±1.19	49.56±1.84	3.63±3.35	30.30±3.79
38.	SPSF208CE	56.45± 2.57	87.78±4.80	47.18±0.96	69.91±2.07
39.	SPSF208CH	69.61±0.79	53.48±0.87	8.58±5.15	31.94±1.39
40.	SPSF209CE	60.34±1.41	56.99±0.99	4.97±5.9	25.51±1.83
41.	SPSF209BE	84.76±2.89	30.29±5.10	14.50±2.98	19.36±1.96
42.	SPSF209BW	27.98±3.35	23.05±2.55	15.63±2.04	3.10±2.20
43.	SPSF211CE	81.43±3.26	43.32±5.68	17.42±2.90	7.63±1.68
44.	SPSF211BE	101.26±1.73	-26.87±3.20	11.987±4.55	9.84±3.43
45.	SPSF213BE	64.55±0.98	32.73±2.66	11.35±1.45	1.12±2.28
46.	SPSF219BE	98.29±3.64	72.42±1.29	8.92±1.74	61.34±0.95
47.	SPSF221CE	27.00±2.80	69.44±2.22	54.79±1.63	86.15±1.03
48.	SPSF221CH	18.90±1.20	78.33±1.48	59.95±3.02	89.21±1.18
49.	SPSF221BE	89.86±4.55	81.60±1.59	41.67±1.99	34.61±1.29
50.	SPSF224BE	104.83±3.40	76.13±2.25	15.84±1.85	46.84±2.28
51.	SPSF224CE	100.00±00	91.07±2.32	22.83±1.79	76.62±1.39
52.	SPSF225CE	51.23±1.28	52.13±4.25	16.59±3.59	53.98±0.97
53.	SPSF225BE	88.02±1.71	-2.74±2.57	6.72±2.72	19.33±1.50
54.	SPSF226BE	86.91±1.94	55.37±1.36	18.10±1.13	40.49±2.47
55.	SPSF226CE	54.70±4.90	55.82±2.54	5.38±2.55	28.49±1.82
56.	SPSF226CH	29.86±3.83	47.69±1.43	16.99±1.99	30.81±1.64
57.	SPSF227BE	57.93±1.11	59.60±2.51	9.87±3.11	35.95±2.81
58.	SPSF227CE	18.55±0.16	79.97±1.55	3.58±0.07	43.53±1.70
59.	SPSF227BW	91.04±0.19	21.39±3.31	17.16±2.36	0.29±1.10
60.	SPSF234CE	100.32±0.36	17.71±2.50	18.94±2.47	33.28±1.01
61.	SPSF234BE	99.97±1.33	7.83±2.73	13..57±3.93	21.58±3.44
62.	SPSF234BW	74.81±2.17	21.58±3.09	18.51±2.54	-5.90±1.40
63.	SPSF236BE	61.00±2.34	45.59±1.35	16.54±5.70	27.39±1.34
64.	SPSF236CE	52.05±2.73	55.46±4.41	15.75±2.32	31.16±2.54
65.	SPSF238CE	54.05±1.68	48.16±1.83	22.35±2.05	51.68±1.10
66.	SPSF240BE	93.63±2.19	37.60±0.75	3.44±2.64	14.99±2.80
67.	SPSF240CE	62.57±3.85	68.24±1.09	7.45±3.44	60.05±2.44

68.	SPSF240CH	77.42±4.69	84.38±2.40	16.16±2.69	67.47±1.55
69.	SPSF241BE	85.43±0.48	65.92±1.54	11.48±4.19	22.65±2.12
70.	SPSF244CE	44.84±1.14	88.40±2.66	22.00±5.72	74.00±0.80
71.	SPSF244BE	51.29±1.87	27.26±2.09	7.28±0.22	16.22±3.81
72.	SPSF248CH	82.27±2.24	41.81±1.89	0.01±5.91	19.57±3.80
73.	SPSF248CE	69.61±0.79	95.63±2.32	-4.28±5.95	61.16±1.78
74.	SPSF248BE	86.91±1.94	103.34±1.94	35.60±0.45	81.46±1.08
75.	SPSF250BE	103.70±2.01	56.98±4.65	55.96±0.61	3.42±1.73
76.	SPSF304BE	84.80±0.74	82.98±1.31	8.60±3.55	59.79±4.21
77.	SPSF304CH	100.00±00	92.93±2.39	17.96±2.27	69.50±1.85
78.	SPSF304BW	52.97±1.23	51.44±3.15	20.26±1.69	6.56±3.73
79.	SPSF310BE	119.00±2.91	40.05±2.46	-24.76±6.66	15.08±2.77
80.	SPSF310CE	67.96±2.27	71.33±3.08	-7.60±7.98	20.42±1.30
81.	SPSF310BW	84.37±2.21	62.61±1.34	20.82±3.09	11.83±4.56
82.	SPSF312BE	85.73±1.09	85.23±2.13	15.40±2.22	86.36±0.88
83.	SPSF312CE	79.36±1.75	80.29±5.31	26.00±2.61	64.01±2.36
84.	SPSF318BE	53.42±1.51	53.16±1.44	2.73±2.20	21.58±2.80
85.	SPSF318CE	53.04±1.44	84.00±2.30	18.05±1.50	84.27±1.10
86.	SPSF325BE	100.00±00	25.83±1.72	4.16±1.89	70.96±4.20
87.	SPSF325CE	100.00±00	25.98±3.36	17.27±2.27	34.52±2.06
88.	SPSF325CH	100.00±00	31.76±6.15	22.57±1.83	17.53±3.26
89.	SPSF328BE	100.00±00	38.77±2.39	4.96±3.75	31.69±4.20
90.	SPSF329BE	86.27±3.19	27.53±2.42	13.96±3.06	-2.60±1.63
91.	SPSF329CE	100.00±00	-0.92±2.54	20.46±5.41	78.68±1.47
92.	SPSF329CH	100.00±00	10.69±1.47	35.15±4.35	55.29±2.21
93.	SPSF330BE	55.29±2.57	61.32±1.49	16.57±1.97	36.87±4.10
94.	SPSF330CE	98.49±1.23	37.64±1.56	11.59±1.39	15.18±1.16
95.	SPSF339BE	94.35±0.69	105.03±0.62	57.78±2.05	85.23±0.23
96.	SPSF339CE	96.87±0.60	98.44±0.57	16.25±3.11	24.43±2.10
97.	SPSF339BW	51.24±0.25	70.23±1.10	3.53±2.59	78.80±1.50
98.	SPSF347BE	77.16±2.57	39.60±3.54	16.07±1.66	24.57±3.57
99.	SPSF358BW	83.21±3.35	23.88±2.73	10.81±1.03	-2.36±1.44
100.	SPSF358BE	59.77±3.95	9.41±1.05	9.31±0.86	10.20±1.39
101.	SPSF358CE	98.90±3.72	28.65±1.01	5.22±4.23	16.98±2.24
102.	SPSF360BE	32.08±0.15	105.04±0.89	72.32±0.71	97.33±0.10
103.	SPSF360CH	13.12±4.26	105.22±1.07	89.32±0.29	98.90±0.20
104.	SPSF360BW	64.63±1.57	30.96±1.57	27.93±1.43	6.74±1.61
	Acarbose	86.87±0.66	-	-	-
	Camptothecin				94.01±0.17
	Indomethacin		61.08±0.68	25.42±2.99	

Values are mean±standard deviation of three replication (n=3); *0.5 mg/mL; **1 mg/mL; P= Positive control

PRELIMINARY QUALITATIVE CHEMICAL SCREENING OF
P. maximae EXTRACTS

The qualitative metabolite analysis of *P. maximae* extracts was obtained as shown in Table 2. The results showed that tannin and alkaloid were present in all the crude extracts while cardiac glycoside, steroid, saponin, and terpenoid were absent. Flavonoid was found in cell ethyl acetate extract (CE), broth ethyl acetate extract (BE), and cell hexane extract (CH). Coumarin and anthraquinone were absent in cell ethyl acetate extract (CE).

This result showed that *P. maximae* produced various types of secondary metabolites. Moreover, the data were in accordance with previous reports that alkaloids, tannins, flavonoids, coumarins and anthraquinones had been found in *Penicillium* genus. Alkaloids were found in *P. aurantiogriseum*, *P. terlikowskii*, and *P. citrinum*, respectively (Kalinina et al. 2018; Lai et al. 2013; Waring et al. 1987). Tannins were found in *P. frequentans* (Bhardwaj et al. 2015). Flavonoids, coumarins and anthraquinones were obtained from *P. setosum* (George et al. 2019), *P. oxalicum* (Wang et al. 2014), and *P. chrysogenum* (Brunati et al. 2009).

TABLE 2. Chemical screening of *P. maximae*

Chemicals	Extracts*				
	CE	BE	BW	CM	CH
Tannin	/	/	/	/	/
Alkaloid	/	/	/	/	/
Cardiac glycoside	X	X	X	X	X
Steroid	X	X	X	X	X
Saponin	X	X	X	X	X
Flavonoid	/	/	X	X	/
Triterpenoid	X	X	X	X	X
Coumarin	/	X	X	X	X
Anthraquinone	/	X	X	X	X

/ = Present, X = Absent

*CE: cell ethyl acetate extract; BE: broth ethyl acetate extract; BW: broth water extract; CM: cell methanol extract; CH: cell hexane extract

SECONDARY QUANTITATIVE CHEMICAL SCREENING OF
P. maximae EXTRACTS

DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT

The total phenolic content of *P. maximae* extracts were shown in Table 3. Broth water extract (BW) and cell methanol extract (CM) showed low amounts of total phenolic content at 1.83 ± 0.41 and 0.97 ± 0.20 mg GAE/g dry weight of sample, respectively. Meanwhile, cell ethyl acetate extract (CE) contained the highest amount of

phenolic content up to 8.89 ± 0.40 mg GAE/g dry weight of sample.

DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT

Total flavonoid content of *P. maximae* extracts quantified using the aluminum chloride colorimetric method showed that the total flavonoid content was highest in CE (7.73 mg QE/g dry w.), while flavonoid was absent in BW and CM (Table 3). The maximum phenolic and flavonoid

content were found in CE at 8.89 ± 0.40 mg GAE/g and 7.73 mg QE/g, respectively. The results suggested that ethyl acetate was the most suitable solvent to isolate *P. maximae* secondary metabolites. This may be due to the low polarity property of ethyl acetate which selectively extracts low molecular weight phenol and flavonoid (Bhardwaj et al. 2015). Phenolic and flavonoid are major secondary metabolites of fungi and have been associated

with antioxidative action in biological systems (Devi et al. 2012). The presence of phenolic and flavonoid compounds has been reported in *Penicillium* species including *P. chrysogenum* (Sikandar et al. 2020), *P. granulatum* (Chandra & Arora 2012), and *P. fusiculosum* (Jakovljević et al. 2014). Therefore, the phenolic and flavonoid compounds found in this study possibly possess antioxidant activity.

TABLE 3. Total phenolic and flavonoid contents of *P. maximae* extracts

Extracts*	Total phenolic content (mg GAE/g)	SD	Total flavonoid content (mg QE/g)	SD
CE	8.89	0.40	7.73	0.19
BE	6.12	0.20	2.24	0.15
BW	1.83	0.41	n/d**	n/d**
CM	0.97	0.20	n/d**	n/d**
CH	5.33	0.40	1.36	0.18

*CE: cell ethyl acetate extract; BE: broth ethyl acetate extract; BW: broth water extract; CM: cell methanol extract; CH: cell hexane extract

CHEMICAL PROFILING OF CELL HEXANE EXTRACT OF *P. maximae*

From this investigation, CH of *P. maximae* showed the highest activity of alpha-glucosidase inhibition. Thus, CH was selected for further analysis. The GC-MS chromatogram showed three dominant peaks at retention times of 15.9212, 26.6168, and 37.8967 min, respectively (Figure 1; Table 4). These peaks represented the *n*-Hexadecanoic acid ($C_{16}H_{32}O_2$), 2,6-dimethyl-N-(2-methyl-alpha-phenylbenzyl) aniline ($C_{22}H_{23}N$) and 3Beta-acetoxy-6-nitroandrost-5-en-17-one ($C_{21}H_{29}NO_5$),

respectively. From the previous report (Artanti et al. 2012), *n*-Hexadecanoic acid had a low activity of alpha-glucosidase inhibition. Therefore, alpha-glucosidase inhibition potency of CH might be from 2,6-dimethyl-N-(2-methyl-alpha-phenylbenzyl) aniline ($C_{22}H_{23}N$) and 3Beta-acetoxy-6-nitroandrost-5-en-17-one ($C_{21}H_{29}NO_5$). However, the anti-alpha-glucosidase efficacy of these two compounds should be further studied to determine whether the anti-alpha-glucosidase capacity of CH possibly was due to the effect of each individual constituent or the synergistic action of the components in the extract.

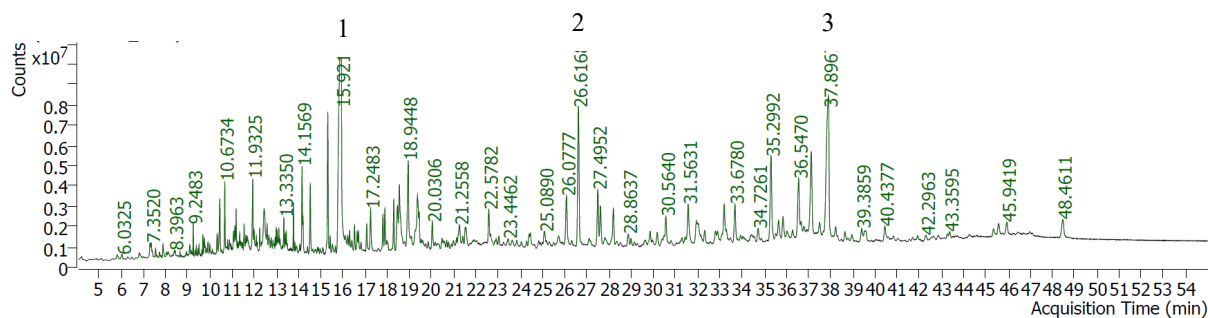


FIGURE 1. GC-MS chromatogram of cell hexane extract of *P. maximae*

TABLE 4. Dominant peaks from GC-MS chromatogram of cell hexane extract of *P. maximae*

No.	Component RT	Compound name	CAS#	Formula	Component Area	Match factor
1	15.9212	n-Hexadecanoic acid	57-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	99116607.0	96.4
2	26.6168	2,6 dimethyl-N-(2 methyl-alpha.- phenylbenzyl)aniline	119971-00-5	C ₂₂ H ₂₃ N	31006746.8	81.4
3	37.8967	3Beta-acetoxy-6-nitroandrost-5-en-17-one	31559-86-1	C ₂₁ H ₂₉ NO ₅	54667640.7	71.4

CHEMICAL PROFILING OF SEMI-PURIFIED PM1

GC-MS analysis of semi-purified PM1 was shown in Figure 2. The chromatogram illustrated two dominant peaks at retention times (RT) of 14.1728 and 12.3793 min, respectively (Table 5). The highest peak (RT 14.1728) represented 3-(1-methylbutyl)-1,2,4-

cyclopentanetrione (C₁₀H₁₄O₃) and the other (RT 12.3793) represented suberic dihydrazide (C₈H₁₈N₄O₂). Their alpha-glucosidase inhibitory efficacies have not been reported yet. To the best of our knowledge, the exact active substances of semi-purified PM1 on anti-alpha-glucosidase are still undefined. Thus, anti-alpha-glucosidase efficacy of these two ingredients should be further evaluated.

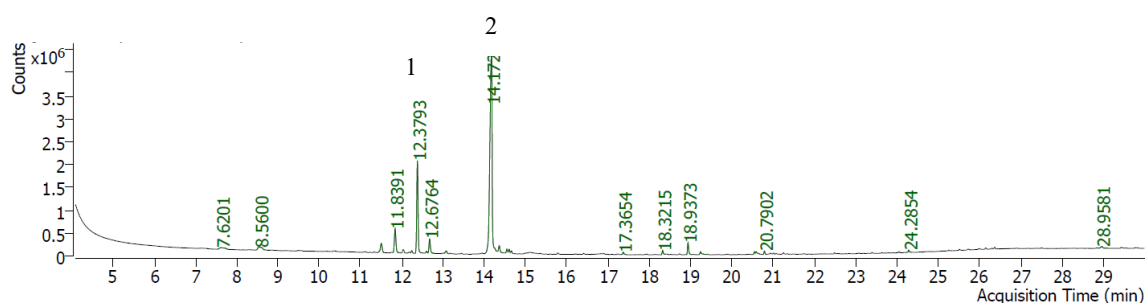


FIGURE 2. GC-MS chromatogram of semi-purified PM1

TABLE 5. Dominant peaks from GC-MS chromatogram of semi-purified PM1

No.	Component RT	Compound name	CAS#	Formula	Component area	Match factor
1	12.3793	Suberic dihydrazide	20247-84-1	C ₈ H ₁₈ N ₄ O ₂	4511271	68.4
2	14.1728	3-(1-methylbutyl)-1,2,4-cyclopentanetrione	54644-19-8	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	16922005	82.3

BIOACTIVITIES OF *P. maximae*
ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITY

P. maximae extracts were determined for alpha-glucosidase inhibition and the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀). The results showed that CH was the most active extract for alpha-glucosidase inhibition with IC₅₀ of 490 µg/mL whereas acarbose as standard drug showed the IC₅₀ value at 205 µg/mL (Table 6). The comparison of alpha-glucosidase inhibition from

all SPSF224 extracts, CH, CE, and BE showed that their alpha-glucosidase inhibitory activities were higher than the others. Previous studies have reported that phenolic and flavonoid compounds could act as alpha-glucosidase inhibitors and regulators of hyperglycemia (Montefusco-Pereira et al. 2013). Therefore, phenolic and flavonoid compounds present in CH, CE, and BE could be the chemical groups in these extracts that exhibited the alpha-glucosidase inhibition.

TABLE 6. The alpha-glucosidase inhibitory activity of *P. maximae* extracts

Extracts/Compound	Anti-alpha-glucosidase activity (% inhibition)	IC ₅₀ (µg/mL)
Broth ethyl acetate (BE)	97.12±1.01	1008
Broth water (BW)	45.63±0.21	-
Cell ethyl acetate (CE)	118.59±2.71	1080
Cell hexane (CH)	104.03±0.42	490
Cell methanol (CM)	27.77±0.11	-
Semi-purified PM1	91.83±1.59	-*
Acarbose ^P	87.66±0.21	205

Data were expressed as mean±SD

^P = Positive control

* = insufficient amount

ANTIOXIDANT ACTIVITY

Antioxidant activities of *P. maximae* extracts were determined by the DPPH radical scavenging activity. The highest activity of antioxidant was found in CE. However, its ability was less than a standard quercetin (Table 7). Huang et al. (2005) reported that phenolic compounds were the major antioxidant constituents of

the endophytes. In addition, previous report showed the correlation between the phenolic and flavonoid contents with antioxidant activity (Shweta et al. 2010). In this study, CE exerted highest DPPH radical scavenging activity. Hence, it was possibly due to the highest level of phenolic and flavonoid contents in the extract.

TABLE 7. Inhibition of DPPH radical scavenging activity for *P. maximae* extracts

Samples*	% inhibition at 200 µg/mL**	SD
CE	31.25	5.89
BE	28.40	2.39
BW	2.66	0.33
CM	1.47	0.26
CH	11.69	2.14
quercetin	93.44	1.54

*CE: cell ethyl acetate extract; BE: broth ethyl acetate extract; BW: broth water extract; CM: cell methanol extract; CH: cell hexane extract.

**Values were represented with mean±standard deviation of three replications (n=3)

ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Crude extracts of *P. maximae* were tested for antimicrobial activity using the disc diffusion method. Broth ethyl acetate extract (BE) showed inhibition zone against *S. aureus*, *T. mentagrophytes*, and *T. rubrum* at 8.1 ± 0.1 , 6.4 ± 0.5 , and 11.2 ± 2.6 mm, respectively. Cell methanol extract (CM) also exhibited inhibition against *T. rubrum* at 12.6 ± 3.5 mm. However, all extracts did not inhibit the Gram-negative bacteria, *E. coli*, *P. aeruginosa*, and yeast (*C. albicans*) (Table 8). This study was consistent with

previous report that the extracts from *Penicillium* species also have the antibacterial potency on Gram positive bacteria including griseofulvin from *P. brasilianum* (Tang et al. 2015) and scleroderolide from *Penicillium* sp. FO-5637 (Tomoda et al. 1998). The result suggested that the extracts were potent in killing Gram-positive bacteria. Nevertheless, the extracts from other *Penicillium* species such as *P. Janthinellum* (Do Rosário Marinho et al. 2005) and *P. herquei* (Marinho et al. 2013) possessed bactericidal activity on Gram negative bacteria.

TABLE 8. Anti-microbial activity of *P. maximae*

Organisms	Zone of inhibition (Diameter, mm)					
	Standard drug*	CE**	BE**	BW**	CM**	CH**
<i>P. aeruginosa</i>	32.7±0.7	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	23.1±0.1	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	22.0±1.8	0	8.1±0.1	0	0	0
<i>S. epidermis</i>	30.6±0.1	0	0	0	0	0
MRSA	21.3±1.0	0	0	0	0	0
<i>P. acnes</i>	25.4±1.1	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	13.5±0.4	0	0	0	0	0
<i>T. mentagrophytes</i>	42.4±1.5	0	6.4±0.5	0	0	0
<i>T. rubrum</i>	50.3±2.1	0	11.2±2.6	0	12.6 ±3.5	0
<i>M. gypseum</i>	27.0±1.0	0	0	0	0	0

* Standard drugs:

Norfloxacin : *P. aeruginosa*, *E. coli* 10 µg/disc
 Oxacillin : *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes* 1 µg/disc
 Vancomycin : MRSA 30 µg/disc
 Amphotericin B : *C. albicans* 25 µg/disc

** Concentration at 200 mg/mL

CE: cell ethyl acetate extract; BE: broth ethyl acetate extract; BW: broth water extract; CM: cell methanol extract; CH: cell hexane extract

CONCLUSION

Fifty-four soil fungi were collected from Sirindhorn peat swamp forest in Narathiwat Province, Thailand and 104 crude extracts were obtained from them. SPSF224 was

selected for further study because of the potential effects on biological activities. SPSF224 was identified by molecular method as *P. maximae*. From phytochemical investigation, its crude extracts contained a variety of

secondary metabolites including tannins, alkaloids, flavonoids, coumarins and anthraquinones. *P. maximae* extracts also showed high potential effect on alpha-glucosidase inhibition and moderate potential effect on antimicrobial, anti-inflammation, and antioxidant activities. This study was the first report of chemical investigation and biological activities of the isolated fungus, *P. maximae*. Hence, this information could be used as database for further study of the lead compound for antidiabetic drug from fungi in the future.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the financial support from the office of the Royal Development Projects Board (ORDPB) under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG project). The research was also supported by scholarship which supported tuition fees issued by the Discipline of Excellence in Pharmacy Project, The Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University.

REFERENCES

- Artanti, N., Tachibana, S., Kardono, L.B. & Sukiman, H. 2012. Isolation of alpha-glucosidase inhibitors produced by an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. TSC13 from *Taxus sumatrana*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 15(14): 673-679.
- Bischoff, H. 1994. Pharmacology of a-glucosidase inhibition. *European Journal of Clinical Investigation* 24(3): 3-10.
- Bhardwaj, A., Sharma, D., Jadon, N. & Agrawal, P.K. 2015. Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spikes of *Pinus roxburghii*. *Archives of Clinical Microbiology* 6(3): 1-9.
- Boonyuen, N., Sri-Indrasutdhi, V., Suetrong, S., Sivichai, S. & Jones, E.G. 2012. *Annulatascus aquatorba* sp. nov., a lignicolous freshwater ascomycete from Sirindhorn peat swamp forest, Narathiwat, Thailand. *Mycologia* 104(3): 746-757.
- Brunati, M., Rojas, J.L., Sponga, F., Ciciliato, I., Losi, D., Göttlich, E. & Marinelli, F. 2009. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. *Marine Genomics* 2(1): 43-50.
- Bureau of Non Communicable Disease (NCD). 2019. *The Number of Thais with Diagnosed Diabetes*. www.thaincd.com/2016/mission/documents.php. Accessed on December 24, 2019.
- Casqueiro, J. & Alves, C. 2012. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 16(Suppl1): S27.
- Cazar, M., Schmeda-Hirschmann, G. & Astudillo, L. 2005. Antimicrobial butyrolactone I derivatives from the Ecuadorian soil fungus *Aspergillus terreus* Thorn. var *terreus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(6-7): 1067-1075.
- Chandra, P. & Arora, D.S. 2012. Optimization of antioxidant potential of *Penicillium granulatum* Bainier by statistical approaches. *International Scholarly Research Notices Microbiology* 2012(1): 452024.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. & Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10(3): 178-182.
- Dej-adisai, S. & Pitakbut, T. 2015. Determination of a-glucosidase inhibitory activity from selected Fabaceae plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 28(5): 1679-1683.
- Dej-adisai, S., Phoopha, S. & Puripattavong, J. 2018. Phytochemical investigation and bioactivities of *Alternanthera ramosissima* (Mart.) Chodat and Hassl. *Pharmacognosy Magazine* 14(57): 346-351.
- Deshmukh, S.K., Mishra, P.D., Kulkarni-Almeida, A., Verekar, S., Sahoo, M.R., Periyasamy, G., Goswami, H., Khanna, A., Balakrishnan, A. & Vishwakarma, R. 2009. Anti-inflammatory and anticancer activity of ergoflavin isolated from an endophytic fungus. *Chemistry & Biodiversity* 6(5): 784-789.
- Devi, N.N., Prabakaran, J.J. & Wahab, F. 2012. Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(3): 1280-1284.
- Dighton, J. & White, J.F. 2017. *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. Boca Raton: CRC Press.
- Do Rosário Marinho, A.M., Rodrigues-Filho, E., Maria da Luz, R.M. & Santos, L.S. 2005. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16(2): 280-283.
- Farnsworth, N.R. 1966. Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 55(3): 225-276.
- Fuchs, P., Perez-Pinzon, M.A. & Dave, K.R. 2013. Cerebral ischemia in diabetics and oxidative stress. In *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Elsevier Inc. pp. 15-23.
- Gao, H., Huang, Y.N., Gao, B., Xu, P.Y., Inagaki, C. & Kawabata, J. 2008. A-glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food Chemistry* 106(3): 1195-1201.
- George, T.K., Devadasan, D. & Jisha, M.S. 2019. Chemotaxonomic profiling of *Penicillium setosum* using high-resolution mass spectrometry (LC-Q-ToF-MS). *Heliyon* 5(9): e02484.
- Hakamata, W., Kurihara, M., Okuda, H., Nishio, T. & Oku, T. 2009. Design and screening strategies for a-glucosidase

- inhibitors based on enzymological information. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 9(1): 3-12.
- Harborne, J.B. 1984. Methods of plant analysis. *Phytochemical Methods*. Dordrecht: Springer. Dordrecht pp. 1-36.
- Horii, S., Fukase, H., Matsuo, T., Kameda, Y., Asano, N. & Matsui, K. 1986. Synthesis and α -D-glucosidase inhibitory activity of N-substituted valiolamine derivatives as potential oral antidiabetic agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 29(6): 1038-1046.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6): 1841-1856.
- Jakovljević, V.D., Milićević, J.M., Stojanović, J.D., Solujić, S.R. & Vrvic, M.M. 2014. Antioxidant activity of ethanolic extract of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium funiculosum*. *Hemijaska Industrija* 68(1): 43-49.
- Kalinina, S.A., Kalinin, D.V., Hövelmann, Y., Daniliuc, C.G., Mück-Lichtenfeld, C., Cramer, B. & Humpf, H.U. 2018. Auranthine, a benzodiazepinone from *Penicillium aurantiogriseum*: Refined structure, absolute configuration, and cytotoxicity. *Journal of Natural Products* 81(10): 2177-2186.
- Kalra, S. 2014. Alpha glucosidase inhibitors. *The Journal of the Pakistan Medical Association* 64(4): 474-476.
- Lai, D., Brötz-Oesterhelt, H., Müller, W.E., Wray, V. & Proksch, P. 2013. Bioactive polyketides and alkaloids from *Penicillium citrinum*, a fungal endophyte isolated from *Ocimum tenuiflorum*. *Fitoterapia* 91: 100-106.
- Lorian, V. 2005. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- MacMillan, J. 1954. Griseofulvin. Part IX. Isolation of the bromo-analogue from *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium nigricans*. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 1954: 2585-2587.
- Marinho, A.M., Marinho, P.S., Santos, L.S., Rodrigues Filho, E. & Ferreira, I.C. 2013. Active polyketides isolated from *Penicillium herquei*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85(3): 909-912.
- Montefusco-Pereira, C.V., de Carvalho, M.J., de Araújo Boleti, A.P., Teixeira, L.S., Matos, H.R. & Lima, E.S. 2013. Antioxidant, anti-inflammatory, and hypoglycemic effects of the leaf extract from *Passiflora nitida* Kunth. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170(6): 1367-1378.
- Office of the Royal Development Projects Board (ORDPB) 2019. *Pa Phru to Daeng*. www.rdpb.go.th. Accessed on September 15, 2019.
- Rukachaisirikul, V., Rungsaiwattana, N., Klaiklay, S., Pakawatchai, C., Saithong, S., Phongpaichit, S., Borwornwiriyan, K. & Sakayaroj, J. 2013. Indole-benzodiazepine-2, 5-dione derivatives from a soil fungus *Aspergillus* sp. PSU-RSPG185. *Tetrahedron* 69(52): 11116-11121.
- Sadananda, T., Govindappa, M., Vinay Dutt, G., Bhat, B., Baishya, P. & Chandrappa, C. 2014. Isolation and characterization of antiviral and ribosome inactivating protein from the endophytic fungi *Alternaria* sp. from *Viscum album* using MADLI-TOF-MS and their antibacterial activity. *Drug Invention Today* 6(2): 105-112.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W. & Consortium, F.B. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(16): 6241-6246.
- Scott, J.A. & King, G.L. 2004. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1031(1): 204-213.
- Shwab, E.K. & Keller, N.P. 2008. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research* 112(2): 225-230.
- Shweta, S., Ritesh, T., Khadabadi, S.S. & Deokate, U.A. 2010. *In vitro* antioxidant activity and total phenolic, flavonoid contents of the crude extracts of *Pterospermum acerifolium* Willd leaves (Sterculiaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2(3): 417-423.
- Sikandar, A., Zhang, M., Wang, Y., Zhu, X., Liu, X., Fan, H. & Duan, Y. 2020. Mycochemical screening and analysis, antioxidant activity, and biochemical composition of fermentation strain Snef1216 (*Penicillium chrysogenum*). *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2020(2): 1-8.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3): 144-158.
- Tang, H.Y., Zhang, Q., Li, H. & Gao, J.M. 2015. Antimicrobial and allelopathic metabolites produced by *Penicillium brasilianum*. *Natural Product Research* 29(4): 345-348.
- Thawai, C. 2004. Taxonomy of *Micromonospora* strains from Thai peat swamp forest soils and secondary metabolites of a selected isolate. PhD. Thesis. Chulalongkorn University (Unpublished).
- Tomoda, H., Tabata, N., Masuma, R., Si, S.Y. & Omura, S. 1998. Erabulenols, inhibitors of cholesteryl ester transfer protein produced by *Penicillium* sp. FO-5637. *The Journal of Antibiotics* 51(7): 618-623.
- Trease, G.E. & Evans, W.C. 1983. *Textbook of Pharmacognosy*. 12th ed. London: Balliers Tindall. pp. 343-384.
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Borwornwiriyan, K., Phongpaichit, S. & Sakayaroj, J. 2014. Benzopyranone, benzophenone, and xanthone derivatives from the soil fungus *Penicillium citrinum* PSU-RSPG95. *Tetrahedron Letters* 55(7): 1336-1338.
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Kaewpet, M., Phongpaichit, S., Hutadilok-Tawatana, N., Preedanon, S. & Sakayaroj, J. 2011. Sesquiterpene and xanthone derivatives from the sea fan-derived fungus *Aspergillus sydowii* PSU-F154. *Journal of Natural Products* 74(7): 1663-1667.

- Turbyville, T.J., Wijeratne, E.K., Liu, M.X., Burns, A.M., Seliga, C.J., Luevano, L.A., David, C.L., Faeth, S.H., Whitesell, L. & Gunatilaka, A.L. 2006. Search for Hsp90 inhibitors with potential anticancer activity: Isolation and SAR studies of radicicol and monocillin I from two plant-associated fungi of the Sonoran desert. *Journal of Natural Products* 69(2): 178-184.
- Visagie, C.M., Houbraeken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T. & Samson, R.A. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 78: 343-371.
- Visagie, C.M., Houbraeken, J., Rodrigues, C., Pereira, C.S., Dijksterhuis, J., Seifert, K.A., Jacobs, K. & Samson, R.A. 2013. Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: A tribute to the Dutch Royal family. *Persoonia* 31: 42-62.
- Wang, P.L., Li, D.Y., Xie, L.R., Wu, X., Hua, H.M. & Li, Z.L. 2014. Two new compounds from a marine-derived fungus *Penicillium oxalicum*. *Natural Product Research* 28(5): 290-293.
- Wang, X., You, J., King, J.B., Powell, D.R. & Cichewicz, R.H. 2012. Waikialoid a suppresses hyphal morphogenesis and inhibits biofilm development in pathogenic *Candida albicans*. *Journal of Natural Products* 75(4): 707-715.
- Waring, P., Eichner, R.D., Tiwari-Palni, U. & Mullbacher, A. 1987. Gliotoxin-E: A new biologically-active epipolythiodioxopiperazine isolated from *Penicillium terlikowskii*. *Australian Journal of Chemistry* 40(5): 991-997.
- World Health Organization (WHO). 2019. *Guidelines on Second-and Third-Line Medicines and Type of Insulin for the Control of Blood Glucose Levels in Non-Pregnant Adults with Diabetes Mellitus*. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272433>. Accessed July 7, 2019.
- Zhao, J., Li, C., Wang, W., Zhao, C., Luo, M., Mu, F., Fu, Y., Zu, Y. & Yao, M. 2013. Hypocrea lixii, novel endophytic fungi producing anticancer agent cajanol, isolated from pigeon pea (*Cajanus cajan* [L.] Millsp.). *Journal of Applied Microbiology* 115(1): 102-113.

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Prince of Songkla University
Songkhla 90112
Thailand

*Corresponding author; email: sukanya.d@psu.ac.th

Received: 3 February 2020

Accepted: 6 January 2021