รายงานการวิจัย

ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดลูปินิฟอลินจากลำต้นชะเอมเหนือต่อเชื้อ *Bacillus cereus*

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

กมล อยู่สุข

สาขาสาธารณสุขศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2559

PCRU_2559_N034

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดลูปินิฟอลินจากลำต้นชะเอมเหนือต่อเชื้อ *Bacillus cereus*

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

กมล อยู่สุข

สาขาสาธารณสุขศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ทุนอุดหนุนโดย สำนักงานบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา

และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ /มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์/งบประมาณแผ่นดิน

ที่พิจารณาจากโดยผ่านความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ 2559

ชื่องานวิจัย ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดลูปินิฟอลินจากลำต้นชะเอมเหนือต่อเชื้อ *Bacillus cereus*

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

ผู้วิจัย กมล อยู่สุข

สาขาวิชา สาธารณสุขศาสตร์

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ 2559

บทคัดย่อ

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

สามารถนำไปพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียได้ในอนาคตและยังเป็นการส่งเสริมการแพทย์แผนไทย ด้านการรักษาโรคด้วยพืชสมุนไพรไทย ให้เป็นที่ยอมรับในวงการวิทยาศาสตร์มากขึ้น

คำสำคัญ : ลูปินิฟอลิน, ชะเอมเหนือ, บาซิลลัส ซีเลียส

Abstract

The bacteria named *Bacillus cereus* which are the commonly cause of food poisoning in human have been found at a high rate in contaminated food. This study aimed to investigate the antibacterial effects of lupinifolin, a bioactive compound extracted from *Derris reticulata* against this pathogen. Treatment of lupinifolin showed the inhibition effect in *B.cereus* growth both on MHB agar cultured-bacteria and disc diffusion method different from ampicillin (p<0.05). Furthermore, microdilution method showed MIC and MBC of the pure compound were 8 and 16 µg/ml , respectively. Lupinifolin destructed bacterial cell wall and swelled cell membrane under electron microscope. In conclusion, the present results suggests that the lupinofolin discourage *B.cereus* growth by effecting cell wall and cell membrane.

Key words : Lupinifolin, *Derris reticulata* Craib., *Bacillus cereus*

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยคำแนะนำต่าง ๆ จากคณาจารย์ในมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ และความร่วมมือช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายฝ่าย ที่สละเวลาให้คำแนะนำ คำปรึกษา รวมถึงข้อเสนอแนะต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ผู้วิจัยขอบพระคุณ อาจารย์เพชรธยา แป้นวงศา และ รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง นวลน้อย จูฑะพงษ์ เป็นอย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณา ให้คำปรึกษาแนะนำ ให้แก่ผู้วิจัย รวมทั้งขอขอบพระคุณ **สถาบันวิจัยและพัฒนา** มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้มา ณ ที่นี้ด้วย

กมล อยู่สุข

12 สิงหาคม 2559

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 สมมุติฐานการวิจัย 2
1.4 ระเบียบวิธีวิจัย 2
1.5 ประโยชน์ของการวิจัย 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 13
3.1 การเตรียมตัวอย่างลำต้นชะเอมเหนือ 14
3.2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารลูปินิฟอลิน 14
3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 14
บทที่ 4 ผลการวิจัย 17
4.1 ลำต้นชะเอมเหนือ 17
4.2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารลูปินิฟอลิน 17
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 18
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 21
5.1 สรุปผลการวิจัย 21
5.1 อภิปรายผล 21
5.2 ข้อเสนอแนะ 22
บรรณานุกรม 23
ประวัติคณะผู้วิจัย 24

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *B.cereus* ด้วยวิธี Disc diffusion 19

4.2 ผลการตรวจฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Minimum inhibition concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC)…….20

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

4.1 ลำต้นชะเอมเหนือหลังจากอบด้วย Hot air oven 17

4.2 ผลึกสีเหลืองรูปเข็ม และรูปโครงสร้างทางเคมี ของสรลูปินิฟอลิน 18

4.3 ผล TLC บนแผ่นกระดาษ Silica gel $G_{60}F_{254}$ อะลูมิเนียม ดูภายใต้แสง UV 18

4.4 แสดงการเกิด inhibition zone ของสารลูปินิฟอลินต่อเชื้อ *B.cereus* 19

4.5 เชื้อ B.cereus หลังจากเติมสารลูปินิฟอลิน 20

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียที่พบในดิน สามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษ อาการที่พบบ่อยคือ อาเจียน และท้องเสีย ลักษณะและรูปร่าง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง (rod) เจริญได้ดีทั้งในสภาพมีและไม่มีออกซิเจน สวนใหญ่การปนเปื้อนมักเกิดจากสปอร์ปนเปื้อนลงไปในอาหารที่ได้รับการปรุงไม่เหมาะสม เมื่อสปอร์เจริญเป็น vegetative cell จะสร้างสารพิษ (enterotoxin) และทำให้เกิดโรคเมื่อบริโภคอาหารนั้นเข้าไป ปริมาณที่ก่อโรคได้คือ มากกว่า 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร สิ่งแวดล้อมอื่นที่พบเชื้อได้นอกจากดิน ได้แก่ อากาศ ฝุ่น สารพิษ enterotoxin เป็นสารพิษประเภทโปรตีน ที่ถูกสร้างโดยจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กตอนล่าง มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เยื่อบุผนังลำไส้ สวนใหญ่เป็นสารพิษที่ขับออกมาโดยแบคทีเรียที่ไปทำให้เกิดรูพรุนในเซลล์เมมเบรน มีผลทำให้เซลล์ตาย หลังจากเซลล์บุผนังลำไส้เล็กตาย ของเหลวตางๆ จึงไหลออกมา ทำให้เกิดอาการท้องร่วง ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สร้าง enterotoxin ได้แก่ *E. coli 0157:H7*, *Clostridium perfringens,Vibrio cholerae, Staphylococcus aureus, Rota virus* และ *Yersinia enterocolitica* สารพิษที่สร้างโดย *B. cereus* มีสองชนิดคือ ชนิดที่ทำให้ท้องร่วง (diarrhea toxin) ซึ่งเป็น enterotoxin และชนิดที่ทำให้อาเจียน (emetic toxin) โรคอาหารเป็นพิษ มีสาเหตุมาจากปัจจัยหลายอย่าง อาจเกิดจากสิ่งปนเปื้อนหรือเชื้อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร *Bacillus cereus* เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่เป็นสาเหตุของโรคนี้ โดยจะทำให้ผู้ที่ได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย เกิดอาการอาเจียนและท้องเสีย อาการอาเจียนมักเกิดจากการได้รับสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ชนิดทีมีความคงทนเป็นกรด -ด่างสูง มักปรากฏอาการภายหลังจากบริโภคอาหารที่มีสารพิษเข้าไป 30 นาทีถึง 6 ชั่วโมง ต่อมาจะถ่ายอุจจาระเหลว โดยทั่วไปอาการจะทุเลาลงภายใน 24 ชั่วโมง (สำนักโรคติดต่อทั่วไป, 2557)

การรักษาโรคด้วยพืชสมุนไพร เป็นภูมิปัญญาของชาวบ้านทั่วทุกท้องถิ่น โดยเฉพาะในประเทศไทยมีพืชสมุนไพรหลายชนิดทั้งที่หาได้ทั่วไปตามบ้านและหาได้ยาก เพราะอาจอยู่ในป่าลึก แต่มีคุณประโยชน์มหาศาลทางด้านการแพทย์แผนไทย ที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อต่างๆ ได้หลายชนิด ชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) เป็นพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส แบคทีเรีย ได้แก่เชื้อ *B. cereus*, *Corynybacterium diphtheria* และ *Staphylococcus epidermidis* (Soonthornchareonnon et al,2004: 26) ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Kumkrai, Kamonwannasit, and Chudapongse, 2014: 675) ต้านสารอนุมูลอิสระ ต้านการเกิดบาดแผล ต้านการเกิดพิษในตับ และต้านการอักเสบ (Cushnie and Lamp,2005: 343) สารที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในพืชเหล่านี้ ส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มฟลาวานอยด์ ได้แก่ ลูปินิฟอลิน

(Mahidol et al, 1997: 825) อย่างไรก็ตามการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารลูปินิฟอลินที่มีฤทธิ์ยับยั้งและความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน และการตรวจหาสารที่เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในพืชสมุนไพรยังเป็นสิ่งสำคัญ นำไปสู่การพัฒนาและวิจัยเพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ เพื่อให้มีการยอมรับและเพิ่มความปลอดภัยต่อมนุษย์มากขึ้น ดังนั้น การวิจัยเรื่องนี้ จึงได้ทำการศึกษาสารลูปินิฟอลิน ที่สกัดได้จากลำต้นชะเอมเหนือ เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* สาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ ที่พบได้บ่อยในปัจจุบันและหาเป้าหมายที่สำคัญของเซลล์แบคทีเรียซึ่งได้รับผลกระทบจากการทำลายของสารสกัดลูปินิฟอลิน ผลของการศึกษาสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียได้ในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารลูปินิฟอลิน สารสกัดจากลำต้นชะเอมเหนือต่อการต้านเชื้อ *Bacillus cereus*

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

สารลูปินิฟอลิน เป็นสารชนิด flavanone ในกลุ่ม flavonoid มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus cereus* และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration, MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration, MBC) ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะ Ampicillin

1.4 ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาในชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) ที่เก็บจากสวนสมุนไพร ในจังหวัดปราจีนบุรี ทำการวิเคราะห์ในหลอดทดลอง (*in vitro*) และทดลองในห้องปฏิบัติการเท่านั้น โดยทดสอบกับเชื้อ *Bacillus cereus* (TISTR 687)

.

ขอบเขตการศึกษา

1.1 ขอบเขตทั่วไป

1.1.1 ทดสอบหาสารสกัดลูปินิฟอลินด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้เฮกเซน

1.1.2 ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion, Minimum inhibition concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC)

1.1.3 ตรวจดูลักษณะเชื้อแบคทีเรียด้วยกล้องอิเลคตรอนไมโครสโคป

1.5 ประโยชน์ของการวิจัย

1.5.1 ตีพิมพ์เพื่อเผยแพร่ความรู้ในวารสารระดับชาติหรือระดับนานาชาติ

1.5.2 เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อพัฒนาการใช้สมุนไพรพื้นบ้านในการรักษาโรค

1.5.3 นำสมุนไพรท้องถิ่นเข้าสู่กระบวนการวิจัยให้เป็นที่ยอมรับทางวิทยาศาสตร์

1.5.3 เพิ่มคุณค่าและความสำคัญของการแพทย์แผนไทย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.)

ชะเอมเหนือ หรือ อ้อยสามสวน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Derris reticulata* Craib. วงศ์ : LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDEAE เป็นไม้เถาขนาดใหญ่ เปลือกเถาหนา สีน้ำตาลอ่อน เนื้อสีนวลขาว ใบประกอบแบบขนนก รูปใบหอก 3-5 คู่ ปลายแหลม เรียงสลับ ดอกช่อ แบบช่อแยกแขนงกลีบดอกรูปดอกถั่ว สีขาวถึงขาวแกมม่วงอ่อน ฝักแบนรูปใบหอกกลับ (รูปที่ 1) มีข้อมูลทางยาสมุนไพรดังนี้

ราก รสหวาน ราก มีสรรพคุณ ขับเสมหะ

ต้น รสหวานเอียน ถ่ายลม แก้โรคในคอ ทำให้ผิวหนังสดชื่น แก้โรคตา

เนื้อไม้ รสหวาน แก้โรคในคอ แก้ลม แก้เลือดออกตามไรฟัน บำรุงธาตุ บำรุงกำลัง บำรุงกล้ามเนื้อให้เจริญ ขับเสมหะ แก้น้ำลายเหนียว

ใบ รสร้อนเฝื่อน มีสรรพคุณ ช่วยขับโลหิตระดู

ดอก รสขมร้อน ช่วยย่อยอาหาร ทำเสมหะให้งวด แก้ดีและโลหิต

รูปที่ 1 ต้นชะเอมเหนือ *Derris reticulata* Craib.

(ที่มา หนังสือ 20ปี สวนสมุนไพร, สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ เครื่องยาไทย, วุฒิ วุฒิธรรมเวช อุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ, มหาวิทยาลัยมหิดล)

รูปที่ 2 ดอกของต้นชะเอมเหนือ *Derris reticulata* Craib.

ฤทธิ์ในทางเภสัชวิทยาของชะเอมเหนือ พบว่า เป็นพืชที่มีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับพืชชนิดอื่นในสกุล *Derris* (ตาราง 1) ซึ่งสารฟลาโวนอยด์หลายตัวพบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสารสกัดเอทานอลจากลำต้น *D. reticulata* มีฤทธิ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ทำการทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจ J774A.1 จากหนู เมื่อเซลล์ได้รับสิ่งสกัดที่ความเข้มข้น 6.25-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 24 ชม. ตามด้วยการกระตุ้นด้วย LPS นาน 24 ชม. พบว่าสารสกัดเอทานอลจากลำต้น *D. reticulata* ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ J774A.1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สิ่งสกัดที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยับยั้งความสามารถของเซลล์ J774A.1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในการจับกิน zymosan ได้ตามความเข้มข้นของสาร สารสกัดยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA ของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ที่ทำหน้าที่สร้างไนตริกออกไซด์และยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA ของเอนไซม์ cyclo-oxygenase 2 (COX-2) ที่จำเป็นในการสร้างสารโพรสตาแกลนดินในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น สารสกัดยังยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA

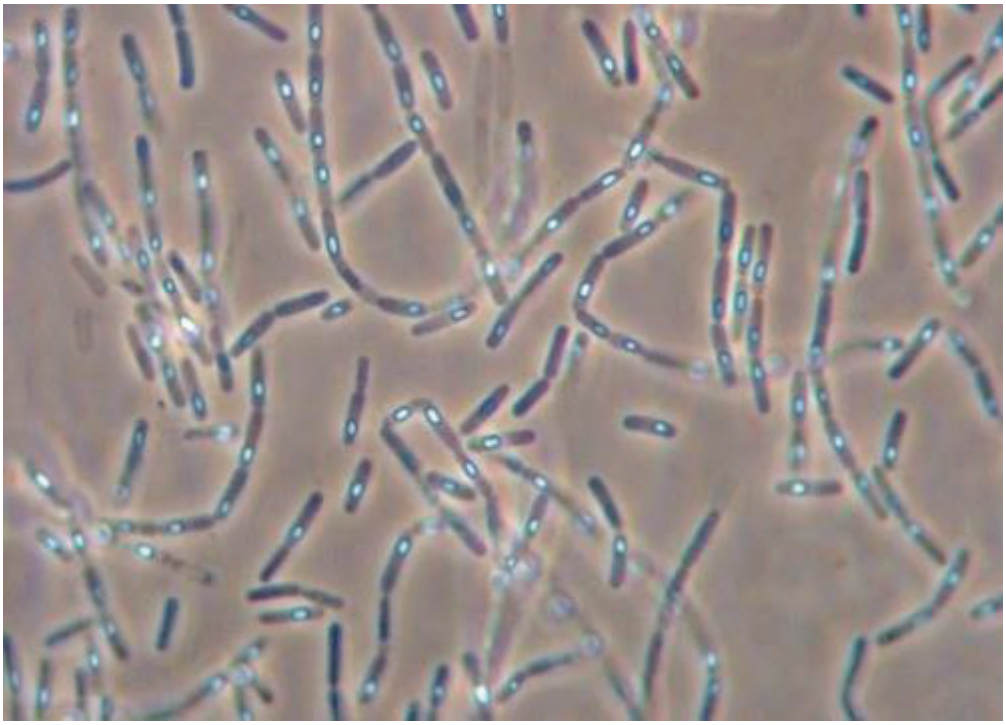
ของไซโตคายน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้แก่ TNF-α, IL-1β and IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น

ตาราง 1 Selected ethnomedical applications of *Derris* plants (Kongjinda 2004).

Sources	Plant part	Ethnomedical activity
D. amazonica	Dried root	Fish poison
D. elliptica	Root	Insecticide
	Dried root	Blood purification
		Fish poison
D. indica	Dried seed	Fish poison
D. malaccensis	Dried root	Fish poison
	Dried root	Leprosy
D. oblonga	Root	Insecticide
D. robusta	Fresh root	Sore throat
D. scandens	Dried stem	Rheumatism
	Dried entire plant	Fish poison
	Dried stem	Analgesic
	Dried stem	Antipyretic
	Dried stem	Arthistic symptoms
	Dried stem	Antidysenteric
	Dried stem	Antidiuretic
D. spruceana	Dried leaf	Fish poison
D. trifoliata	Root	Insecticide
	Dried entire plant	Stimulant
	Dried entire plant	Antipasmodic

2.2 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียที่พบในดิน สามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษ อาการที่พบบ่อยคือ อาเจียน และท้องเสีย ลักษณะและรูปร่าง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง (rod) เจริญได้ดีทั้งในสภาพมีและไม่มีออกซิเจน (รูปที่ 3) สวนใหญ่การปนเปื้อนมักเกิดจากสปอร์ปนเปื้อนลงไปในห่วงโซอาหารที่ได้รับการปรุงไม่เหมาะสม เมื่อสปอร์เจริญเป็น vegetative cell จะสร้างสารพิษ (enterotoxin) และทำให้เกิดโรคเมื่อบริโภคอาหารนั้นเข้าไป ปริมาณที่ก่อโรคได้คือ มากกว่า 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร สิ่งแวดล้อมอื่นที่พบเชื้อได้นอกจากดิน ได้แก่ อากาศ ฝุ่น สารพิษ enterotoxin เป็นสารพิษประเภทโปรตีน ที่ถูกสร้างโดยจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กตอนล่าง มีความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ สวนใหญ่เป็นสารพิษที่ขับออกมาโดยแบคทีเรียที่ไปทำให้เกิดรูพรุนในเซลล์เมมเบรน มีผลทำให้เซลล์ตาย หลังจากเซลล์บุผนังลำไส้เล็กตาย ของเหลวตางๆ จึงไหลออกมา ทำให้เกิดอาการท้องร่วง ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สร้าง enterotoxin ได้แก่ *E. coli 0157:H7*, *Clostridium perfringens,Vibrio cholerae, Staphylococcus aureus, Rota virus* และ *Yersinia enterocolitica* สารพิษที่สร้างโดย *B. cereus* มีสองชนิดคือ ชนิดที่ทำให้ท้องร่วง (diarrhea toxin) ซึ่งเป็น enterotoxin และชนิดที่ทำให้อาเจียน (emetic toxin)



รูปที่ 3 ลักษณะการเรียงตัวของเชื้อ *Bacillus cereus*

(http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1116/bacillus-cereus)

B. cereus เป็นแบคทีเรียในสกุล Bacillus อีกชนิดหนึ่งที่มีรายงานการก่อโรคในคนได้ การติดเชื้อบริเวณต่างๆในร่างกายและเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษ *B. cereus* มีรูปร่างและลักษณะของเซลล์คล้ายคลึงกับ *B.anthracis* คือรูปร่างเป็นแท่งและอาจเรียงตัวเป็นสาย (รูปที่ 3) เชื้อ *B. cereus* เจริญได้ดีบน nutrient agar และ blood agar ลักษณะโคโลนีบน Blood agar มีขนาดใหญ่ แบน มีแกรนูลละเอียดคล้ายกระจกฝ้า สลายเม็ดเลือดแดงได้ และมีสีเขียวเล็กน้อย บางสายพันธุ์สร้าง pigment สีแดง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งและเหล็กในปริมาณที่เพียงพอ บางสายพันธุ์สร้าง pigment สีเหลืองซีดเขียว สะท้อนแสงในอาหารเพาะเชื้อชนิดต่างๆได้ บน nutrient agar บางสายพันธุ์ทำให้อาหารเพาะเชื้อมีสีเข้มขึ้นเล็กน้อยและบางสายพันธุ์สร้าง pigment สีน้ำตาลชมพูแพร่กระจายไปรอบๆโคโลนีได้ เชื้อ *B. cereus* เคลื่อนที่ได้ สลายเม็ดเลือดแดง และดื้อต่อยาเพนนิซิลลิน อย่างไรก็ตาม *B. cereus* คงมีสายพันธุ์ที่ไม่เคลื่อนที่และสลายเม็ดเลือดแดงได้เล็กน้อยใต้โคโลนี ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทดสอบคุณสมบัติการสร้างสปอร์ โดยเฉพาะใน nutrient agar ซึ่งมีส่วนผสมของโซเดียม ไบคาร์บอเนต เข้มข้นร้อยละ 0.7 บ่มเชื้อภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเชื้อที่เจริญนั้นมาย้อมด้วยสี polychrome methylene blue หรือที่เรียกว่า M'Fadyean stain แอนติเจนที่สำคัญของเชื้อ *B. cereus* ไดแก่ แอนติเจนของสปอร์ (spore antigen),แอนติเจนบนผิวเซลล์ (somatic antigen ; O antigen) และแอนติเจนของแฟลกเจลลา (flagella antigen ; H antigen) จากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านพบว่า แอนติเจนของแฟลกเจลลา มีอยู่ 42 ซีโรทัยป์ และในจำนวน 23 ซีโรทัยป์มีความสัมพันธ์กับการก่อโรค เชื้อ *B. cereus* สร้างเอกโซทอกซินหลายชนิดคือ เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) อีมีติกทอกซิน (emetic toxin) ฮีโมลัยซิน (hemolysin), ฟอสโฟไลเปส ซี (phospholipase C) เอนเทอโรทอกซิน เอนเทอโรทอกซิน
ของ *B. cereus* ประกอบด้วยองค์ประกอบโปรตีนสำคัญสามส่วน มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 38 – 57 กิโลดาลตัน (kDa) ซึ่งโปรตีนทั้งสามส่วนนี้ต้องออกฤทธิ์ร่วมกัน ทอกซินนี้ทำให้เกิดการสะสมของน้ำคัดหลั่งภายในลำไส้ส่วนไอเลียมของกระต่าย (Rabbit Illeal Loops ; RIL) ซึ่งสัมพันธ์กับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และอะดีนิล ซัยเคลส นอกจากนี้ยังพบว่า Vascular permeability reaction (VRP) เพิ่มขึ้นรวมทั้งเกิดเนื้อเยื่อเน่าตาย ทอกซินที่บริสุทธิ์ออกฤทธิ์ฆ่าหนูได้ ดังนั้นทอกซิน *B. cereus* ซึ่งรวมๆ กันอยู่หลายชนิด จึงได้รับการขนานนามว่า mouse-lethal factor 1, diarrhegenic factor, necrotic factor, vascular permeability factor และ edema factor เอนเทอโรทอกซินของ *B. cereus* ย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน และไม่ทนความร้อน

อาการอาหารเป็นพิษโดยไม่มีอาการอาเจียน ผู้ป่วยมีอาการอุจจาระร่วงคล้ายกับอาการอาหารเป็นพิษซึ่งมีเชื้อ *Clostridium perfringens* ซึ่งสัมพันธ์กับเอนเทอโรทอกซิน เอนเทอโรทอกซินนี้อาจปนเปื้อนอยู่ในอาหารหรือสร้างขึ้นขณะที่เชื้ออาศัยอยู่ในลำไส้เล็กก็ได้ ผู้ป่วยมีอาการอุจจาระร่วง

ร่วมกับปวดท้องรุนแรงแต่มักไม่มีอาการอาเจียนหรือไข้ร่วมด้วย อาการเหล่านี้เกิดขึ้นหลังจากกินอาหารปนเปื้อนเข้าไปประมาณ 8-16 ชั่วโมง ผู้ป่วยยังมีอาการดีขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 12 ชั่วโมง ซึ่งไม่จำเป็นต้องให้สารต้านจุลชีพกับผู้ป่วยแต่ให้สารน้ำและอิเลคโตรไลท์ทดแทน

B.cereus สายพันธุ์ที่แอนติเจนแฟลกเจลา 1,2,6,8,10,12 และ 19 มีความสัมพันธ์กับอาหารเป็นพิษของเชื้อ *B.cereus* ที่สร้างเอนเทอโรทอกซินได้ มักให้ผลบวกต่อการทดสอบการย่อยสลายแป้ง (starch hydrolysis) และเชื้อนั้นต่อให้เกิดอาหารเป็นพิษโดยไม่มีอาการอาเจียน อาหารเป็นพิษร่วมกับอาเจียน ผู้ป่วยมีอาการหลังจากการรับประทานอาหารปนเปื้อนประมาณ 1 – 5 ชั่วโมง โดยการออกฤทธิ์ของทอกซินชนิดหนึ่งเรียกว่า **ทอกซินอีมีติก** (emetic toxin) กระตุ้นให้เกิดอาการคลื่นเหียนอาเจียนและปวดท้องรุนแรง และอาจมีอาการดีขึ้นเป็นลำดับ และหายจากอาการภายใน 24 ชั่วโมง อาการจากพิษ *B.cereus* ชนิดนี้คล้ายคลึงกับอาการจาก *Staphylococcus aureus* ทั้งอาการและระยะฟักตัว

2.3 การติดเชื้อนอกระบบทางเดินอาหาร

เชื้อ *B.cereus* เป็นสาเหตุของการติดเชื้อเฉพาะที่ตามอวัยวะอื่นๆ เยื่อบุตา,การติดเชื้อในเลือด,หัวใจ,ระบบทางเดินหายใจ.ระบบประสาทส่วนกลาง โดยเฉพาะอย่างเช่นเยื้อหุ้มสมองอักเสบและบาดแผลติดเชื้อ

2.4 การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติ

การวินิจฉัยทางการติดเชื้อ *B.cereus* โดยการเพาะเชื้อ ขึ้นกับอาการทางคลินิก และพยาธิสภาพ กรณีที่เป็นการติดเชื้อในเลือด ให้เจาะเลือดประมาณ 5 มิลลิลิตรเติมลงใน typticase soy broth ซึ่งมีส่วนผสมของโซเดียมโปลีแอนนิทอล ซัลโฟเนต (sodium polynetholsulfonate) ซึ่งเป็นสารกันเลือดแข็งและตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อทุกวันส่วนสิ่งตรวจชนิดอื่นๆ เช่น สิ่งส่งตรวจจากตา บาดแผล น้ำไขสันหลัง รวมทั้งสิ่งส่งตรวจอื่นๆ ให้เพาะเชื้อลงบน blood agar หรืออาหารเพาะเชื้อสำหรับเพาะเชื้อสิ่งส่งตรวจเพื่อการวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการติดเชื้อในอวัยวะนั้นๆ บ่มเชื้อไว้ 18 – 24 ชั่วโมง ตรวจหานิคมที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ Bacillus และทำการย้อมสีแกรม จากนั้นพิสูจน์ชนิดโดยทำการทดสอบทางชีวเคมี

กรณีผู้ป่วยแสดงอาการในระบบทางเดินอาหาร ให้นำส่งอุจจาระ,อาเจียน, และ อาหารที่ต้องสงสัยว่าปนเปื้อนเชื้อ *B.cereus* นำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อเพาะเชื้อต่อไป และต้องแจ้งให้ห้องปฏิบัติการทราบว่า ต้องการเพาะเชื้อ *B.cereus* ซึ่งจำเป็นต้องเพาะเชื้อลงบน blood agar

เนื่องจากการเพาะเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารในงานประจำนั้นจะไม่เลือกใช้ blood agar เนื่องจากเชื้อส่วนใหญ่ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ทรงแท่ง ซึ่งเจริญเติบโตได้บน blood agar และให้ลักษณะนิคมไม่แตกต่าง

สิ่งส่งตรวจจากสิ่งแวดล้อมและอาหารมักปนเปื้อนด้วยสปอร์ ดังนั้นการเพาะเชื้อ *B.cereus* จากสิ่งส่งตรวจเหล่านี้จึงมีข้อแนะนำในการจัดเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ ดังนี้ วิธีที่ 1 ให้นำสิ่งส่งตรวจผสมกับเอธานอล ปราศจากเชื้อเข้มข้นร้อยละ 50 ปล่อยทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง หรือ วิธีที่ 2 ให้เติมน้ำปราศจากอิออน(deionizedwater) ปริมาตรเท่ากับสิ่งส่งตรวจ แล้วอุ่นที่ 62.5 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเพาะเชื้อลงบนอาหารเพาะเชื้อจำเพาะชนิด (selective media)

สำหรับสิ่งส่งตรวจที่คาดว่าจะไม่มีสปอร์ให้เพาะเชื้อลงบนอาหารเพาะเชื้อจำเพาะชนิด ซึ่งได้แก่ mannitol-egg yolk-polymyxin หรือ polymyxin-pyruvate-egg yolk-mannitol ผสมกับบรอมไทมอล บลู (bromthymolblue) หรือบรอมครีซอล เพอเพิล (bromcresolpurpie) ยาโปลีมิกซิน บี ทำหน้าที่กำจัดเชื้อจุลชีพอื่นๆ ส่วนไข่แดง ช่วยในการตรวจสอบแอกติวิตีของเอ็นไซม์เลซิเนสและน้ำตาลแมนนิทอล ตรวจสอบคุณสมบัติการย่อยสลายน้ำตาลแมนนิทอล ซึ่ง *B.cereus* ให้ผลลบ

การตรวจสอบนับนิคมในอาหารเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อการตัดสินการติดเชื้อ จำนวนเชื้อที่ถือว่ามีความสัมพันธ์กับการก่อโรคคือ จำนวน100,000 เซลล์/อาหาร 1 กรัม และผลสรุปยืนยันว่าติดเชื้อ *B.cereus* สายพันธุ์นั้นจริงก็คือการแยกเชื้อซีโรทัยป์เดียวกันได้จากสิ่งตรวจจากผู้ป่วยและอาหารที่ต้องสงสัย

เชื้อ *B.cereus* แตกต่างจากเชื้อ Bacillus อื่นๆ คือมีคุณสมบัติในการสร้างเอ็นไซม์เลซิเนสให้ผลบวกต่อการทดสอบ Voges-Proskauer รวมทั้งสปอร์ที่สร้างโดย *B.cereus* อยู่ตรงกลางหรือเกือบกลางเซลล์ และแยกจาก *B.anthracis* โดยอาศัยคุณสมบัติที่เคลื่อนที่ได้ สลายเม็ดเลือดแดงได้ ดื้อต่อยาเพนิซิลลิน และไม่สร้างแคปซูล

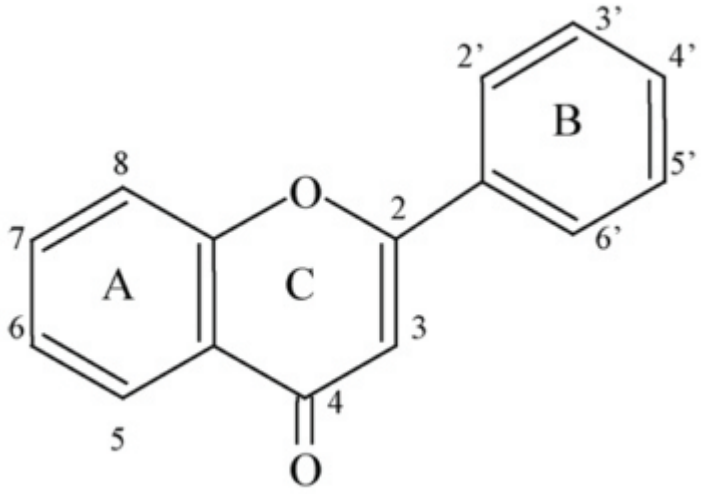
2.5 การรักษาโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อ *B.cereus*

เชื้อ *B.cereus* สร้างเอนไซม์เบต้าแลคแตมเมสได้ จึงทำให้เชื้อดื้อต่อเพนนิซิลลินแอมพิซิลลิน และเซฟาโลสปอริน รวมทั้งไตรมาโตรปริม แต่ส่วนใหญ่ไวต่อยาคลินดามัยซิน อิริโธมัยซิน, คลอแรมเฟนิคอล,แวนโคมัยซิน,อะมิโนโกล์โคไซด์ รวมทั้งเตตร้าซัยคลินและซัลโฟนาไมด์

นอกเหนือจาก *B.anthracis* และ *B.cereus* จะก่อให้เกิดโรคในคนแล้ว ยังมีรายงานการก่อโรคโดยเชื้อ *B.subtilis* , *B.thuringiensis* , *B.alvei* , *B.circulans* , *B.licheniformis* , *B.macerans* , *B.pumilus* , *B.sphaenricis* อีกด้วยแต่พบน้อยกว่าเชื้อ *B.anthracis* และ *B.cereus*

2.6 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารสำคัญที่พบได้มากมายในพืชที่มีการสังเคราะห์แสงในกาเจริญเติบโต ได้แก่ ผลไม้ ผัก เมล็ดธัญพืช ลำต้น และส่วนดอกของพืช ชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังพบในปริมาณมากในชา และ น้ำผึ้ง หน้าที่โดยทั่วไปแล้ว ฟลาโวนอยด์จะสร้างสีในพืช ทำให้ดอกไม้มีสีสันต่างๆ ในการดึงดูดแมลง รักษาสภาพทางกายภาพของพืชและ ปกป้องการทำลายจากเชื้อรา โครงสร้างพื้นฐานโดยทั่วไปของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ประกอบด้วย 2-phenyl-benzol (α) pyrane ซึ่งประกอบด้วยวงแหวนกลุ่ม benzene (A และ B) ที่เชื่อมต่อกับ วงแหวน heterocyclic pyrane (C) ดังรูปที่ 4



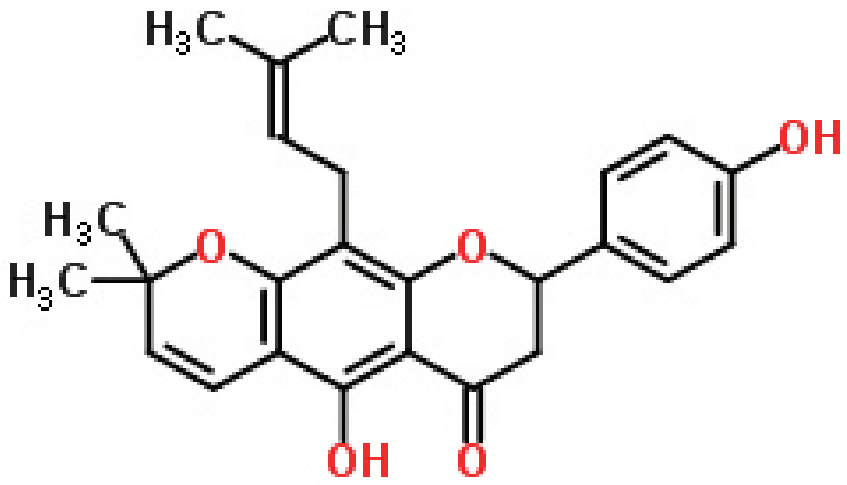
รูปที่ 4 โครงสร้างหลักของ flavones ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoids (Cushnie,2005)

2.7 คุณสมบัติทางการแพทย์ของฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ได้ใช้เป็นองค์ประกอบหลักในการวิจัยทางการแพทย์ มีการรายงานคุณสมบติทางการรักษาโรค เช่น ต้านการอักเสบ (Tangpu and Yadav 2004) รักษาโรคกระดูก ยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านภูมิแพ้ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการเกิดเนื้องอก (Cushnie and Lamb 2005) นอกจากนี้สารสำคัญที่สกัดได้จากฟลาโวนอยด์ ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางโมเลกุลของสารแต่ละชนิด เช่น คาร์โบไฮเดรต, phenyl ring, phenol และ benzopyrone ring เป็นต้น

2.8 สารลูปินิฟอลิน

สารลูปินิฟอลิน เป็น สารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวโนน (Flavonone) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ดังนั้น คุณสมบัติทางเคมีและฤทธิ์ในด้านทางเภสัชวิทยาจึงมีความน่าสนใจ และมีประโยชน์เป็นอย่างมากในทางการแพทย์ โครงสร้างทางเคมี ของลูปินิฟอลิน แสดงไว้ในรูปที่ 5



รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของลูปินิฟอลิน

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. Hot air Oven
2. Soxhlet extractor
3. แผ่น Silica gel $G_{60}F_{254}$ อะลูมิเนียม
4. ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
5. แผ่นกระดาษกรอง What man No.1
6. 96 well plate
7. จานเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
8. หลอดทดลอง
9. กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน
10. บีกเกอร์
11. Flasks

สารเคมี

1. Hexane
2. Dichrolomethane
3. Methanol
4. Mueller-Hinton Broth (MHB)
5. Agar
6. 0.85 % NaCl
7. 0.5 McFarland
8. 10% NaOH (1 N)
9. Ampicillin
10. 0.1 M phosphate buffer (PBS, pH 7.2)
11. 0.25% glutaraldehyde
12. 1% osmium tetroxide
13. Acetone
14. Spurr's resin

15. copper grids
16. 2% uranyl acetate
17. lead citrate

1. การเตรียมตัวอย่างลำต้นชะเอมเหนือ

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

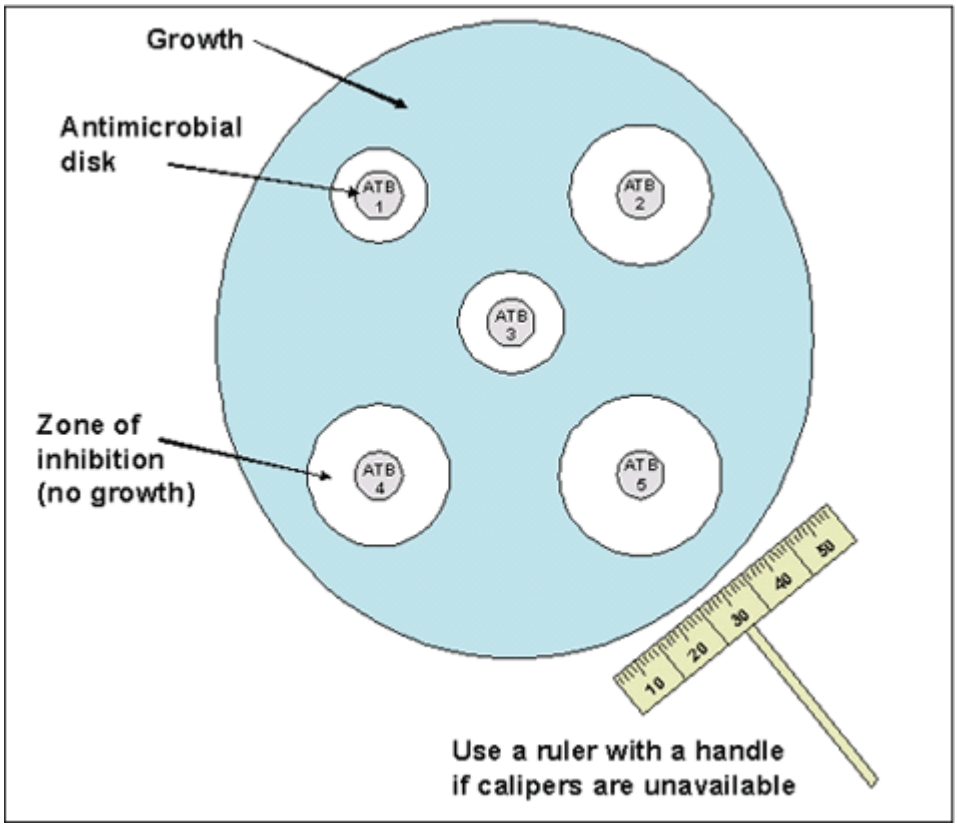
2. การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารลูปินิฟอลิน

ลำต้นชะเอมเหนือที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก นำมาสกัดด้วย เฮกเซน โดยใช้ Soxhlet extractor หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้นำมาล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง นำส่วนบนที่เป็นชั้นของ Hexane แยกออกมา แล้วทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Crystallization และ วิธี Thin layer chromatography บนแผ่น Silica gel G_{60} F_{254} อะลูมิเนียม โดยใช้ Dichrolomethane : Methanol ในอัตราส่วน 95 : 5 (สมิตา วิเศษสุทธิชัย, สุวภาพ เตชะมหามณีรัตน์, วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ และ นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2548) เพื่อทดสอบหาความบริสุทธิ์ของลูปินิฟอลิน

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

3.1 วิธี Disc diffusion

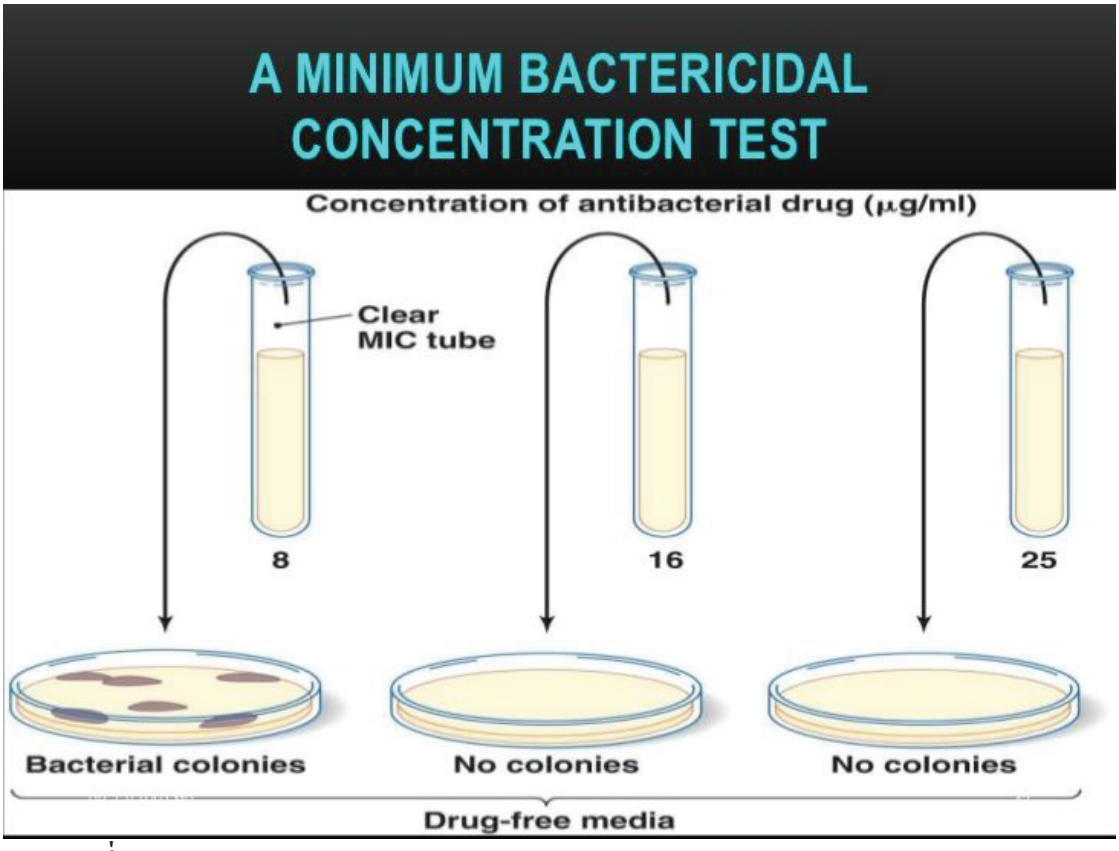
แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคือ *Bacillus cereus* (TISTR 687) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Mueller-Hinton Broth (MHB) บ่มเชื้อให้เจริญเติบโตที่ตู้อบเพาะเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (CLSI, 2012) แล้วนำมาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85 % NaCl เทียบความขุ่นกับ 0.5 McFarland เพื่อให้ได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียประมาณ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



รูปที่ 6 วิธี Disc diffusion ในการวัด zone of inhibition

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

ทำการทดสอบด้วยวิธี microdilution method ใน หลุมเพาะเลี้ยงเชื้อ 96 well plate (Joycharat et al., 2013) ละลายสารลูปินิฟอลิน ใน 10% NaOH (1 N) แล้วเติมลงในหลุมเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ให้มีความเข้มข้นของสารลูปินิฟอลินตั้งแต่ 0.25-512 µg/ml ด้วยวิธี two-fold serial dilutions หลังจากนั้นเติมเชื้อ *Bacillus cereus* ให้มีจำนวนเชื้อสุดท้ายในหลุมทดลองเท่ากับ $5x10^5$ cfu/ml การทดลองด้วยวิธีนี้ใช้ยาปฏิชีวนะ Ampicillin, 0.5% NaOH (1 N) และ หลุมที่ไม่ใส่สารลูปินิฟอลิน เป็น positive, vehicle control และ negative control ตามลำดับ นำ หลุมเพาะเลี้ยงเชื้อ 96 well plate ไป บ่มในตู้อบเพาะเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย หรือ ไม่เกิดความขุ่น วิเคราะห์ค่า MBC ด้วยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อจากหลุมที่ไม่เกิดความขุ่นไปเพาะเลี้ยงเชื้อบน MHA แล้วนำไปบ่มในตู้อบเพาะเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่เห็นเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโต จะเป็นค่า MBC การทดลองทุกวิธีจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง



รูปที่ 7 แสดงการหาค่า Minimum bactericidal concentration (MBC)

3.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

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

บทที่ 4
ผลการวิจัย

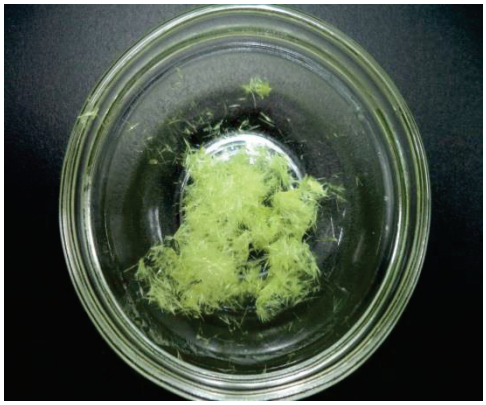
4.1 ลำต้นชะเอมเหนือ

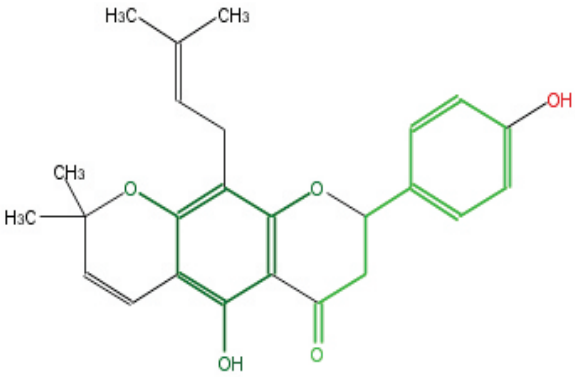
ลำต้นชะเอมเหนือที่ใช้สำหรับการวิจัย เมื่อนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำอบด้วย Hot air oven ที่อุณหมิ 50 องศาเซลเซียส จะมีลักษณะสีน้ำตาลอ่อน ถึงสีน้ำตาลเข้ม ดังภาพที่ 4-1

ภาพที่ 4-1 ลำต้นชะเอมเหนือหลังจากอบด้วย Hot air oven

4.2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารลูปินิฟอลิน

จากการสกัดลำต้นชะเอมเหนือ เพื่อหาสารลูปินิฟอลิน ด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย และวิธีการ Crystallization จะได้ ผลึกสีเหลืองรูปเข็ม (ภาพที่ 4-2) ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของสารชนิดนี้ ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธี TLC (ภาพที่ 4-3)





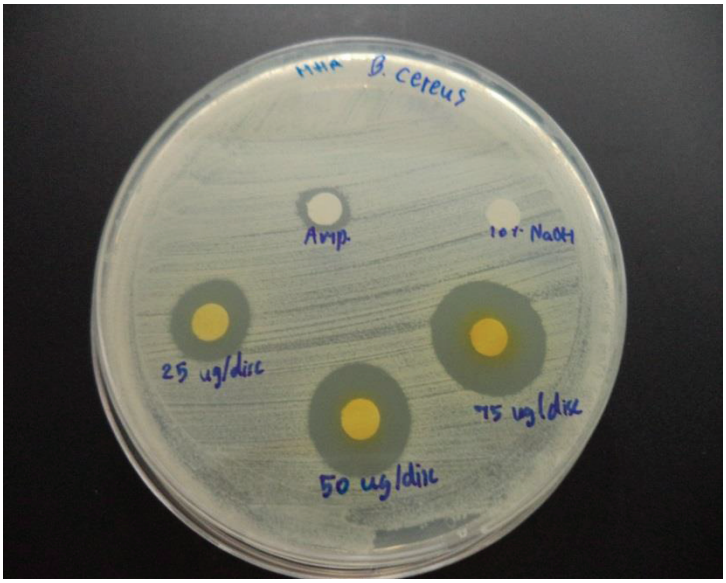
ภาพที่ 4-2 ผลึกสีเหลืองรูปเข็ม และ รูปโครงสร้างทางเคมี ของสารลูปินิฟอลิน

ภาพที่ 4-3 ผล TLC บนแผ่นกระดาษ Silica gel $G_{60}F_{254}$ อะลูมิเนียม ดูภายใต้แสง UV

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

4.3.1 วิธี Disc diffusion

ผลการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Disc diffusion วัดค่า inhibition zone ได้ผลดังตารางที่ 4-1 พบว่า สารลูปินิฟอลิน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* โดยวัดค่า Diameter of inhibitions zone (mm) ดังภาพที่ 4-4



ภาพที่ 4-4 แสดงการเกิด inhibition zone ของสารลูปินิฟอลินต่อเชื้อ *B. cereus* บนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Agar (MHA)

ตารางที่ 4-1 ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Disc diffusion

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

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

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

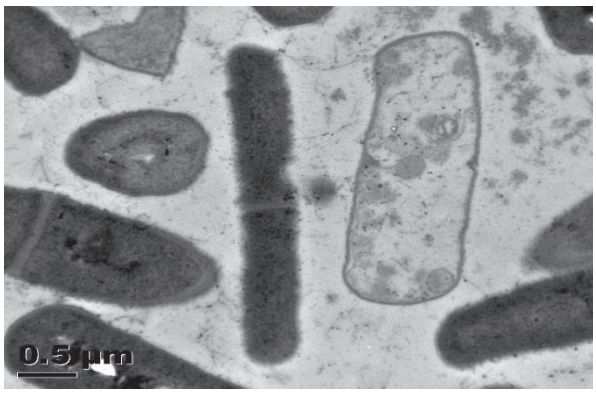
ตารางที่ 4-2 ผลการตรวจฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Minimum inhibition concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC)

Microorganisms	**Lupinifolin**		**Ampicillin**	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
B.cereus	8	16	8	16

(n=3, $p > 0.05$)

4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่า เซลล์ของ *B.cereus* ที่เติมสารสารลูปินิฟอลิน มีลักษณะเปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับเซลล์แบคทีเรียปกติที่ไม่ได้เติมสารสกัด โดยลักษณะที่สังเกตเห็น มีรูปร่างบวม และ บางเซลล์จะติดสีเข้ม อาจเกิดจาก ผนังเซลล์ และ ผนังเซลล์อาจถูกทำลาย



ภาพที่ 4-5 เชื้อ *B. cereus* หลังจากเติมสารลูปินิฟอลิน มีลักษณะบวมและ บางเซลล์มีขนาดเล็กลง

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผล

การสกัดหาสารลูปีนิฟอลิน จากลำต้นชะเอมเหนือ (*D. reticulata* Craib.) พบว่า สารที่สกัดได้มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลือง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารชนิดนี้ สอดคล้องกับการสกัดหาสารลูปีนิฟอลินในลำต้นชะเอม *Myriopteron extensum (Wight) K. Schum.* ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* โดยวิธี Disc diffusion เท่านั้น ซึ่งเป็นการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราชนิด dermatophytes (Soonthornchareonnon, Ubonopas, Kaewsuwan, & Wuttiudomlert, 2004) ในการศึกษาที่ผ่านมา สารลูปีนิฟอลิน จัดเป็นสารประเภทฟลาโวนอยด์ จัดอยู่ในกลุ่ม ฟลาโวโนน ซึ่งพบมากในพืชสมุนไพร และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Minimal inhibitory concentration (MIC) และ Minimal bactericidal concentration (MBC) นอกจากนี้ยังทำการตรวจหาบริเวณเป้าหมายของเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับผลกระทบจากสารลูปีนิฟอลินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ผลการวิจัย พบว่า สารลูปีนิฟอลินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยทำให้เกิด inhibition zones บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB เมื่อเปรียบเทียบกับยา Ampicillin มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งเหมือนกับการศึกษาฤทธิ์ของลูปีนิฟอลินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจาก *Eriosema chinense* (Prasad, Laloo, Kumar, & Hemalatha, 2013) และสารสกัดจาก *Myriopteron extensum (Wight) K. Schum.* ซึ่งเป็นการศึกษาจากสารสกัดสมุนไพรแบบหยาบ ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี microdilution method ได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดลูปีนิฟอลินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) เท่ากับ 8 และ 16 µg/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับยา Ampicillin พบว่า ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถือว่าสารสกัดลูปีนิฟอลินมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* อยู่ในระดับดี

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์แบคทีเรีย ที่เติมสารสกัดลูปินิฟอลิน มีลักษณะบวม และสังเกตเห็นการถูกทำลายบริเวณ cell wall หรืออาจทำลายที่ cytoplasmic membrane เมื่อเทียบกับเซลล์แบคทีเรียในกลุ่มควบคุม

ข้อเสนอแนะ

อย่างไรก็ตามการศึกษาหากลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียที่เฉพาะเจาะจง ของสารสกัดชนิดนี้ ยังต้องมีการศึกษาวิจัยในอนาคตด้วยวิธีทาง อณูชีวภาพและการแสดงออกของยีน เพื่อพัฒนาในการคิดค้นยาต้านเชื้อชนิดใหม่ต่อไป

บรรณานุกรม

พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์ และ อรุณลักษณ์ ลุลิตานนท์. **แบคทีเรียวิทยาคลินิก.**ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก, คณะเทคนิคการแพทย์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น,2547.

สมิตา วิเศษสุทธิชัย และคณะ. การพัฒนาเจลสารสกัดชะเอมเหนือเป็นยาต้านเริม. **วารสารสมุนไพร**,12, 2548.

สำนักโรคติดต่อทั่วไป. กรมควบคุมโรค, กระทรวงสาธารณสุขม, 2557.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard.** Clinical and Laboratory Standards Institute document M07-A8, 2012.

Cushnie, T.P., and Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 26,2005.

Ghosh, S., et al. Unveiling the mode of action of antibacterial labdane diterpenes from *Alpinia nigra* (Gaertn.) B. L. Burtt seeds. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 66, 2013

Joycharat, N. et al. Antibacterial substances from *Albizia myriophylla* wood against cariogenic *Streptococcus mutans*. **Archives of Pharmacal Research**. 36: 723-730, 2013.

Kumkrai, P., et al. Cytoprotective and anti-diabetic effects of *Derris reticulata* aqueous extract. **Journal of Physiology and Biochemistry**. 70: 675-684, 2014.

Kongjinda, V. (2004). Chemical Constituents and its Biological Activities from Derris malaccensis. **Chemistry**, Kasetsart university. **Master of Science (Chemistry)**.

Mahidol, C.et al. Prenylated flavanones from *Derris reticulata*. **Phytochemistry**. 45: 825-829, 1997.

Tangpu, V. and A. K. Yadav (2004). "Antidiarrhoeal activity of Rhus javanica ripen fruit extract in albino mice." **Fitoterapia** 75(1): 39-44.

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล นายกมล อยู่สุข

   Mr. Kamol Yusook

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3670100940896

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์

5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

   สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

   มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ.เมือง จ. เพชรบูรณ์ 76000

   โทรศัพท์ 056-717122, 081-7527969

   E-mail vetgetmoonlight@hotmail.com

6. ประวัติการศึกษา

   วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

   มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

   ส.ม. (สาธารณสุขศาสตร์)

   มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

   การตรวจทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

   เภสัชวิทยา