



รายงานการวิจัย

กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดลูปีนิฟอลิน จากลำต้นชะเอมเหนือ
ต่อการต้านเชื้อสแตฟฟีโลคอคคัส ออเรียส ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลลิน

**Mechanism of Action Underlying the Antibacterial Activity
of Lupinifolin, Bioactive Compound from the Stem of
Derris reticulata Craib., Against Methicillin-Resistant
*Staphylococcus aureus***

กมล อยู่สุขและคณะ

สาขาสาธารณสุขศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดลูปีนิฟอลิน จากลำต้นชะเอมเหนือ
ต่อการต้านเชื้อสแตฟฟีโลคอคคัส ออเรียส ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลลิน

**Mechanism of Action Underlying the Antibacterial Activity
of Lupinifolin, Bioactive Compound from the Stem of
Derris reticulata Craib., Against Methicillin-Resistant
*Staphylococcus aureus***

กมล อยู่สุข

สาขาสาธารณสุขศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เพชรธยา เป็นวนงษา

สาขาสาธารณสุขศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ทุนอุดหนุนโดย สำนักงานบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา
และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ /มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์/งบประมาณ
แผ่นดินที่พิจารณาจากโดยผ่านความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ 2560

(ก)

ชื่องานวิจัย กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดลูปีนิฟอลิน จากลำต้นชะเอมเหนือต่อการต้านเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลลิน
Mechanism of Action Underlying the Antibacterial Activity of Lupinifolin, Bioactive Compound from the Stem of *Derris reticulata* Craib., Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

ผู้วิจัย กมล อยู่สุข
ผู้ร่วมวิจัย เพชรธยา เป็นวนงษา
สาขาวิชา สาธารณสุขศาสตร์
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ 2561

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารลูปีนิฟอลิน ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างอยู่ในกลุ่ม prenylated flavonoid ที่สกัดได้จากลำต้นชะเอมเหนือ (*Derris reticulata*) ตรวจสอบความถูกต้องด้วยวิธี NMR สเปกตรัมและตรวจยืนยันด้วยการตรวจมวลสาร (Mass spectrometry) สารลูปีนิฟอลินถูกเตรียมโดยละลายใน 0.1 N NaOH และละลายทันทีในอาหารเลี้ยงเชื้อ Müller-Hinton สำหรับการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรีย Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ MRSA 4738, MRSA 20646 และ MRSA 20649 จากการทดสอบด้วยวิธี two-fold microdilution พบว่า สารลูปีนิฟอลินออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA ทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) เท่ากับ 32 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารลูปีนิฟอลินต่อเชื้อ MRSA จากภาพถ่ายของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เพื่อสังเกตโครงสร้างขนาดเล็กภายในเซลล์แบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่า ลูปีนิฟอลินทำให้เกิดการฉีกขาดของเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ เนื่องจากการออกฤทธิ์ที่รวดเร็ว แสดงให้เห็นว่า ลูปีนิฟอลินน่าจะออกฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง สมมติฐานนี้ได้รับการพิสูจน์ยืนยันด้วยวิธี

(๖)

Flow cytometer ใช้สี Propidium iodide (PI) เป็นสารบ่งชี้ในการทดสอบ ผลการศึกษาพบว่า การซึมผ่านเข้าออกเซลล์ของปริมาณสี PI ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีการถูกทำลาย อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับยา Ampicillin และเซลล์ปกติ นอกจากนี้เมื่อทดสอบผลของสารลูปีนิฟอลินต่อโครงสร้างของ DNA พบว่า สารลูปีนิฟอลินไม่ก่อให้เกิดการ Autolysis เมื่อเปรียบเทียบกับ Triton-X และเพื่อเป็นการยืนยันว่า สารลูปีนิฟอลินมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ มากกว่ายับยั้งการสร้างผนังเซลล์ จึงทดสอบการแสดงออกของยีน Drp35 ซึ่งเป็นยีนที่จะแสดงออกมาเมื่อมีการขัดขวางการทำงานที่ผนังเซลล์ ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) พบว่า ไม่พบการแสดงออกของยีน Drp35 ในเชื้อ MRSA จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า ลูปีนิฟอลินมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA โดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ จากการศึกษาในครั้งนี้ สารลูปีนิฟอลินน่าจะมีความสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์สามารถใช้เป็นสารสำคัญในการต้านเชื้อ MRSA ได้

คำสำคัญ : ลูปีนิฟอลิน, อะมเพซิลลิน, MRSA, Drp35

Title Mechanism of Action underlying the Antibacterial Activity of Lupinifolin, Bioactive Compound from the Stem of *Derris reticulata* Craib., Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Author Kamol Yusook

Co-author Phethaya Panwongsa

Department Public Health
Phetchabun Rajabhat University **2018**

Abstract

In this study, lupinifolin, a prenylated flavonoid, was isolated from *Derris reticulata* stem, identified by NMR spectra and confirmed with mass spectrometry. Lupinifolin was freshly prepared by solubilizing in 0.1 N NaOH and immediately diluted in Müller-Hinton broth for antibacterial testing. The data showed that Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) of three strains such as MRSA 4738, MRSA 20646 and MRSA 20649 were susceptible to lupinifolin. Using the two-fold microdilution method, it was found that lupinifolin possessed antimicrobial activity against MRSA with minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of 32 and 64 µg/ml, respectively. To investigate the mechanism of action of lupinifolin, transmission electron microscopy (TEM) was performed to observe the ultrastructure of MRSA. The TEM images showed that lupinifolin ruptured the bacterial cell membrane and cell wall. Due to its fast onset, it is suggested that the action of lupinifolin is likely to be the direct disruption of the cell membrane. This hypothesis was substantiated by the data from flow cytometry using Propidium iodide (PI) as an indicator. The result showed that the cell membrane permeability which indicated bacterial membrane integrity was significantly disrupted, compared with ampicillin treated cells and normal cells. Furthermore, DNA laddering assay demonstrated no effect on genomic DNA autolysis that compared with

(3)

Triton-X. It is suggested that the action of lupinifolin is likely to be the direct disruption of the cell membrane. This hypothesis was substantiated by the data from Drp 35 gene expression by using Polymerase chain reaction (PCR). The result showed that no Drp35 expressed . It is concluded that lupinifolin inhibits the growth of MRSA by damaging the bacterial cytoplasmic membrane. The data obtained from this study suggested that lupinifolin may have the potential to be used as antibacterial agent against MRSA.

Key words : Lupinifolin, *Derris reticulata* Craib., MRSA, Drp35

(จ)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยคำแนะนำต่าง ๆ จากคณาจารย์ในมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ และความร่วมมือช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายฝ่าย ที่สละเวลาให้คำแนะนำ คำปรึกษา รวมถึงข้อเสนอแนะต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อาจารย์เพชรธา เป้นวงษา ผู้ร่วมวิจัย และ คุณสมเพียร พิภทอง นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการชีววิทยาเป็นอย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณา ให้คำปรึกษาแนะนำ ให้แก่ผู้วิจัย รวมทั้งขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้มา ณ ที่นี้ด้วย

กมล อยู่สุข

31 กรกฎาคม 2561

(จ)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
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 ขอบเขตการศึกษา.....	2
1.6 ประโยชน์ของการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	16
3.1 การเตรียมตัวอย่างลำต้นชะเอมเหนือ	16
3.2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารลูปินิฟอลิน	16
3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ความถูกต้องของสารลูปินิฟอลิน.....	16
3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย	16
3.5 วิธีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารลูปินิฟอลินต่อเชื้อแบคทีเรีย.....	18
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	21
4.1 การเตรียมลำต้นชะเอมเหนือ.....	21
4.2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารลูปินิฟอลิน	21
4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ความถูกต้องของสารลูปินิฟอลิน.....	23
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย	27
4.5 วิธีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารลูปินิฟอลินต่อเชื้อแบคทีเรีย.....	28
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	46

(ข)

สารบัญ (ต่อ)

บรรณานุกรม	49
ภาคผนวก.....	51
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	54

(ซ)

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากพืชสกุล <i>Derris</i>	13
4.1	ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของลูปีนฟอลินด้วยวิธี NMR.	24
4.2	ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>S.aureus</i> และ MRSA ด้วยวิธี Disc diffusion	27
4.3	ผลการตรวจฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>S. aureus</i> ด้วยวิธี Minimum inhibition concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC).....	28

(ฉ)

สารบัญรูป

ภาพที่	หน้า
2.1	แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> 3
2.2	ต้นชะเอมเหนือ <i>Derris reticulata</i> Craib. 11
2.3	ดอกของต้นชะเอมเหนือ <i>Derris reticulata</i> Craib..... 12
2.4	โครงสร้างหลักของ flavones ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoids. 14
2.5	โครงสร้างทางเคมีของลูปีนิฟอลิน. 15
3.1	วิธี Disc diffusion ในการวัด zone of inhibition. 17
3.2	แสดงการหาค่า Minimum bactericidal concentration (MBC). 18
4.1	ลำต้นชะเอมเหนือหลังจากอบด้วย Hot air oven 21
4.2	ผลึกสีเหลืองรูปเข็ม และรูปโครงสร้างทางเคมี ของสรลูปีนิฟอลิน 22
4.3	ผล TLC บนแผ่นกระดาษ Silica gel G ₆₀ F ₂₅₄ อะลูมิเนียม ดูภายใต้แสง UV 23
4.4	Mass spectrum ของลูปีนิฟอลิน 26
4.5	ผลจากการดูด้วยกล้อง TEM แสดง เชื้อ MRSA ปกติ (Normal control) 29
4.6	ผลจากการดูด้วยกล้อง TEM แสดง เชื้อ MRSA หลังจากเติมสารลูปีนิฟอลิน 30
4.7	ผลจากการดูด้วยกล้อง TEM แสดง เชื้อ MRSA หลังจากเติมยา Ampicillin. 31
4.8	Histogram แสดง Normal control ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่เวลา 0 h..... 32
4.9	Histogram แสดง Ampicillin treated cells ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่เวลา 0 h.....34
4.10	Histogram แสดง Lupinifolin treated cells ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่เวลา 0 h.....36
4.11	Histogram แสดง Normal control ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่เวลา 2 h.....38
4.12	Histogram แสดง Ampicillin treated cells ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่เวลา 2 h.....40
4.13	Histogram แสดง Lupinifolin treated cells ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่เวลา 2 h42
4.14	แสดงลักษณะ band ของ genomic DNA บนแผ่น 0.7% gel electrophoresis ที่เวลา 0, 1 และ h.....44
4.15	Gel electrophoresis แสดงการเพิ่มจำนวนจีน <i>Drp35</i>45

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบัน ปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะ ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นทุกปี ทำให้ประเทศไทยเสียค่าใช้จ่ายมหาศาลในการซื้อยา ที่ผลิตจากต่างประเทศ ซึ่งบางชนิดอาจมีราคาแพงมาก เพื่อมารักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อให้หายเป็นปกติ ดังนั้นการคิดค้นยาใหม่ๆ ที่ผลิตขึ้นได้ภายในประเทศ จึงมีความสำคัญในการแก้ปัญหาต่างๆเหล่านี้ ในพืชสมุนไพรของประเทศไทย ที่ใช้รักษาโรคในแพทย์แผนไทย มีสารที่สำคัญหลายชนิดที่ยังไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุน แต่มีสรรพคุณในการรักษาโรคที่ได้ผลดี ตั้งแต่ปี 2560 เป็นต้นมา ประเทศไทยได้มีนโยบายรณรงค์ให้ใช้ยาที่ได้จากพืชสมุนไพร ร่วมกับยาแผนปัจจุบัน เพื่อเป็นการรักษาภูมิปัญญาของชาวบ้าน

การรักษาโรคด้วยพืชสมุนไพร เป็นภูมิปัญญาของชาวบ้านทั่วทุกท้องถิ่น โดยเฉพาะในประเทศไทยมีพืชสมุนไพรหลายชนิดทั้งที่หาได้ทั่วไปตามบ้านและหาได้ยาก เพราะอาจอยู่ในป่าลึก แต่มีคุณประโยชน์มหาศาลทางการแพทย์แผนไทย ที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อต่างๆ ได้หลายชนิด ชะเอมเหนื่อ (*Derris reticulata* Craib.) หรือ อ้อยสามสวน มีสรรพคุณในการขับเสมหะ บรรเทาอาการเจ็บคอ เป็น สารต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Kumkrai, Kamonwannasit, and Chudapongse, 2014) สารสำคัญที่พบส่วนใหญ่ในพืชชนิดนี้ ได้แก่สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ชนิดฟลาโวนอน เช่น ลูปีนิฟอลิน (Mahidol et al., 1997) นอกจากนี้ มีการศึกษาว่า ลูปีนิฟอลินที่สกัดได้จากลำต้นชะเอมเหนื่อ มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Soonthornchareonnon et al., 2004) โดยเฉพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นการติดเชื้อที่พบบ่อยในโรงพยาบาล (Nosocomial infection) แต่ยังไม่เคยมีรายงานฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยา ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้เห็นความสำคัญของสารลูปีนิฟอลิน ว่าน่าจะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ซึ่งถือว่า เชื้อชนิดนี้มีผลกระทบต่อระบบสาธารณสุขและสุขภาพของผู้ป่วยอย่างมาก นอกจากนี้ ยังได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารชนิดนี้ ว่ามีผลยับยั้งต่อกระบวนการใดของแบคทีเรีย เพื่อนำผลที่ได้จากการวิจัยไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ MRSA และ เป็นการลดต้นทุนในการนำเข้ามาซื้อจากต่างประเทศในอนาคตอีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA ของลูปินิฟอลิน
2. เพื่อสกัดสารลูปินิฟอลินจากลำต้นชะเอมเหนือ และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีนำไปพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อดื้อยาในอนาคต
3. เพื่อสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่เข้าสู่วงการวิจัย
4. เพื่อส่งเสริมความร่วมมือระหว่างสาขาวิชาชีพทางสาธารณสุขในการดำเนินการวิจัย

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

สารลูปินิฟอลิน มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration, MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration, MBC) ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะ Ampicillin

1.4 ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาในชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) ที่ทำการวิเคราะห์ในหลอดทดลอง (*in vitro*) และทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* และ MRSA

1.5 ขอบเขตการศึกษา

- 1.5.1 ทดสอบหาสารสกัดลูปินิฟอลินด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน
- 1.5.2 พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารลูปินิฟอลิน ด้วยวิธี NMR
- 1.5.3 ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion, Minimum inhibition concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC)
- 1.5.4 ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารลูปินิฟอลินต่อเชื้อแบคทีเรีย

1.6 ประโยชน์ของการวิจัย

- 1.6.1 ตีพิมพ์เพื่อเผยแพร่ความรู้ในวารสารระดับชาติหรือระดับนานาชาติ
- 1.6.2 เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อพัฒนาการใช้สมุนไพรพื้นบ้านในการรักษาโรค
- 1.6.3 พัฒนาไปเป็นยาต้านเชื้อ MRSA ในอนาคต เพื่อทดแทนการนำเข้ายาจากต่างประเทศ
- 1.6.4 สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่เข้าสู่วงการวิจัย
- 1.6.5 สามารถต่อยอดการวิจัยสมุนไพรไทยให้เป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สแตฟฟีโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus* , *S. aureus*)

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม มักพบเป็นคู่เกาะกันด้วยสายสั้นๆ เป็นกิ่งหรือเป็นลักษณะพวงอ้วน (spherical shape) (รูปที่ 1) สามารถเจริญได้ในสภาพที่ไม่มีอากาศและมีอากาศ (facultative anaerobes) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ 15 – 45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ระดับความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 15 เปอร์เซ็นต์เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่นการติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อ และโรคอาหารเป็นพิษ (Todar, 2005) มีการสร้างเม็ดสี (pigment) เหลืองในโคโลนี



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อ *Staphylococcus aureus*
(ที่มา : Journal of BioScience Published October 15,2015)

S. aureus จัดอยู่ใน Family Micrococcaceae เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก สร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ใช้กลูโคสได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไร้อากาศ เซลล์เรียงตัวเป็นกลุ่มทำให้ดูเหมือนพวงอ้วน บางครั้งอยู่เป็นคู่หรือเป็นสาย โคโลนีมีสีเหลืองทอง แต่บางครั้งอาจพบเป็นสีครีมได้ โดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลายๆ ครั้ง สีเกิดจากสารประกอบพวกคาโรทีนอยด์ (carotenoid) แต่การเกิดสีบนโคโลนีมีความแตกต่างกันสูงมาก ส่วนใหญ่จำแนกเชื้อ *S. aureus* จากเชื้อชนิดอื่นๆ ของ *Staphylococcus* โดยใช้ความสามารถในการทำให้พลาสมาแข็งตัวเนื่องจากการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase)

S. aureus มียีนทั้งหมดประมาณ 2,600 ยีน และมีดีเอ็นเอทั้งหมดในโครโมโซม 2.8 ล้านเบสแพร์ *S. aureus* แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ *S. aureus* และ *S. aureus anaerobius* และยังสามารถสร้างสารหรือโครงสร้างที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนต่างๆ ได้แก่

แคปซูล (Capsule) เป็นโครงสร้างที่หุ้มอยู่ชั้นนอกสุดของเซลล์ การสร้างแคปซูลจะพบในสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรค เชื้อ *S. aureus* สามารถสร้างแคปซูลเมื่ออยู่ในสิ่งมีชีวิต และอาจสูญเสียการสร้างไปเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายพันธุ์ที่สร้างแคปซูลได้นั้นไม่สามารถใช้วิธีการจัดจำแนกด้วย phage (phage typable) และไม่สามารถสร้างเอ็นไซม์โคแอกกูเลส ชนิดติดกับเซลล์ (Clumping Factor)

กรดไทโคอิก (Teichoic acid) เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่มีฟอสเฟตชนิดจำเพาะกับสายพันธุ์ (species – specific carbohydrate antigens) เชื้อชนิดที่สร้างแอนติเจนนี้ได้แก่ *S. aureus* ที่มี polysaccharide A และ *S. epidermidis* ที่มี polysaccharide B

โปรตีนเอ (Protein A) เป็นโปรตีนที่อยู่บนผนังเซลล์ โดยเชื่อมติดกับผนังเซลล์ชั้น เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) (Murray et al. 1990)

เอ็นไซม์โคแอกกูเลสชนิดติดกับเซลล์อาจเรียกว่า clumping factor สร้างโดย *S. aureus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างแคปซูล โดยจะเกาะกันอยู่ในพลาสมา (plasma) ที่มีสารไฟบริโนเจน (fibrinogen) อยู่ด้วย เชื่อกันว่าเอ็นไซม์โคแอกกูเลส ชนิดติดกับเซลล์นี้เป็นส่วนของผิวเซลล์ซึ่งทำปฏิกิริยากับ α และ β chain ของไฟบริโนเจน ทำให้เกิดการเชื่อมต่อกันแบบไขว้ (cross linking)

2.1.1 *Staphylococcus aureus* ในสิ่งแวดล้อม

มักพบเชื้อ *Staphylococcus* ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะในคนที่มีความสกปรก ผิดปกติเช่นเป็นฝี แผลผ่าตัด แผลอักเสบ เป็นต้น เชื้อนี้ยังแยกได้จากสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข เป็ด ไก่ โค กระบือ สุกร ห่าน และในอาหารสัตว์ *S. aureus* ก่อให้เกิดโรค mastitis ในสัตว์ โดยเฉพาะโค กระบือ แพะและแกะ *S. aureus* (Alberton et al. 2001) สายพันธุ์ที่สร้าง เอ็นเตอโรท็อกซิน ที่พบในสัตว์จะมีน้อยกว่าที่พบในคน

S. aureus มีความทนทาน ต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ดีมากทำให้สามารถมีชีวิตอยู่ภายนอกร่างกายสัตว์ได้ดีมักก่อให้เกิดน้ำเน่าเสียแบบระยะยาว และสามารถ พบเชื้อแพร่กระจายอยู่รอบสิ่งแวดล้อมในโรงงานผลิตอาหาร เช่น ในโรงงานบรรจุหีบห่อสัตว์ปีก (poultry packing plants) โดยเชื้อสามารถเกาะติดอยู่กับเครื่องมือคิงขนและปนเปื้อนลงในสัตว์ปีก ขณะบรรจุหีบห่อได้

2.1.2 ความเกี่ยวข้องระหว่าง *Staphylococcus aureus* กับคน

มักพบว่าคนเป็นพาหะของ *S. aureus* ได้มากพอๆกับที่พบเชื้อในอาหาร ถ้าผู้เป็นพาหะจับต้องอาหารด้วยมือ จะทำให้เชื้อปนเปื้อนไปและอาจก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษเมื่อบริโภคอาหาร

การเข้มงวดเรื่องสุขลักษณะ เนื่องจาก *Staphylococcus aureus* มักพบในมนุษย์ เช่น ในน้ำมูก น้ำลาย น้ำคัดหลั่ง สิว ฝี หนอง โดยเฉพาะที่กำลังอักเสบ ดังนั้นจึงต้องควบคุมสุขลักษณะของผู้สัมผัสอาหารโดยตรง ควรมีผ้าปิดปาก เพื่อป้องกันการไอ หรือจามรดอาหาร ใส่ถุงมือป้องกันการล้าง แคะ แทะ เกาขณะปฏิบัติงาน ซึ่งทำให้เชื้อหรือสารพิษแพร่กระจายลงไปในอาหารได้ แหล่งที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย *Staphylococcus aureus* เป็นพวกที่ปรับตัวอาศัยเฉพาะในสัตว์บางชนิด ประมาณครึ่งหนึ่งของ species ที่รู้จักพบอยู่ในคนเท่านั้น เช่น *S. cohnii* spp. พบตามผิวหนัง ทางเดินปัสสาวะและบาดแผล หรือชนิดที่อาศัยอยู่ในคนและสัตว์ด้วย เช่น *S. aureus* ซึ่งพบเซลล์ของเชื้อชนิดนี้จำนวนมากใกล้บริเวณเปิดของผิวหนัง สัตว์เลี้ยงจำนวนมากเป็นแหล่งของ *S. aureus* เช่น วัว น้านมดิบอาจปนเปื้อนเชื้อจากวัวที่เป็น โรคเต้านมอักเสบ ถ้าดื่มน้ำนม หรือเนยแข็งที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนจะมีโอกาสเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อนี้ได้มาก

การปนเปื้อนในอาหาร โดยทั่วไปพบเชื้อชนิดนี้ปริมาณต่ำ ในอาหารชนิดใดก็ตามที่ผลิตมาจากสัตว์ หรืออาหารที่สัมผัสโดยมือคน ถ้าอาหารนั้นไม่ได้ผ่านความร้อนที่มีผลทำลายเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้

2.2 Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA)

MRSA คือ เชื้อแบคทีเรียที่พัฒนาจนเกิดอาการต่อต้าน หรือที่เราเรียกว่าการดื้อยา โดยเฉพาะประเภทยาปฏิชีวนะ ดังนั้นเมื่อเกิดการติดเชื้อประเภทนี้ จึงทำให้รักษาได้ยากกว่าการติดเชื้อจากแบคทีเรียประเภทอื่นๆ ในบางครั้ง เราจึงเรียกเชื้อโรคประเภทนี้ว่า *Super-bug MRSA* แม้ว่า MRSA อาจสามารถทำให้เกิดอาการติดเชื้อทางผิวหนัง ในระดับความรุนแรงเพียงปานกลาง แต่มันก็ยังสามารถก่อให้เกิดระดับความรุนแรงที่สาหัสขึ้นในกลุ่มคนไข้บางกลุ่ม เช่น ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยโรคเรื้อรัง และในเด็กทารกแรกเกิด

ภาวะการติดเชื้อจาก MRSA จะพบได้มากในโรงพยาบาลและสถานพักฟื้นของผู้ป่วย เนื่องด้วยสถานที่เหล่านี้มักจะเป็นจุดที่เสี่ยงต่อการที่ร่างกายเปิดรับเชื้อ เช่น แผลผ่าตัด โดยเฉพาะในกลุ่ม

ผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่กำลังพักรักษาตัว ซึ่งร่างกายมักจะมีภูมิคุ้มกันในระดับต่ำ จึงสามารถเกิดการติดเชื้อโรคได้ง่าย ทั้งจากการพบปะติดต่อกับผู้อื่น ด้วยเหตุนี้ การแพร่กระจายของเชื้อโรค MRSA จึงเป็นไปได้มากในสถานที่ดังกล่าว โดยเฉพาะเมื่อไม่มีการรักษาความสะอาดและสุขอนามัยที่ดี อาการของการติดเชื้อจากโรค MRSA แตกต่างกันไปตามจุดที่พบการติดเชื้อบนร่างกาย ซึ่งในบางกรณี อาจรุนแรงถึงขั้นเกิดภาวะเสียชีวิตได้

2.2.1 สาเหตุของโรค

เชื้อ MRSA สามารถแพร่กระจายโดยผ่านทางสัมผัสทางผิวหนังกับผู้ป่วยซึ่งติดเชื้อ MRSA หรือแม้กระทั่งการสัมผัสกับผู้ที่มีเชื้อแบคทีเรียแฝงอยู่โดยไม่แสดงอาการเชื้อ MRSA ยังสามารถอยู่รอดได้เป็นระยะเวลานาน จุดที่สามารถพบเชื้อ MRSA ได้ เช่น วัสดุตกแต่ง แผล ผ้าเช็ดตัว ผ้าปูเตียง หรือเสื้อผ้า เครื่องนุ่งห่ม

2.2.2 วิธีการแพร่กระจายของ MRSA

มีกลไกที่สำคัญอยู่ 2 อย่างสำหรับการนำ MRSA เข้าสู่โรงพยาบาลแห่งใดแห่งหนึ่ง กลไกสำคัญที่สุดคือการรับผู้ป่วยติดเชื้อหรือมีการสร้างนิคม MRSA เข้าไว้ใช้ที่โรงพยาบาล โดยผู้ป่วยอื่นๆ ทางมือของบุคลากรของโรงพยาบาล ซึ่งมีเชื้อสร้างนิคมอยู่ชั่วคราว (transient colonization) หลังจากที่ได้สัมผัสกับผู้ป่วยที่เป็นแหล่งเก็บเชื้อ โดยตรงหรือโดยจับสิ่งของที่ปนเปื้อนเชื้อ พบการสร้างนิคมของ MRSA อยู่ชั่วคราวได้ถึงร้อยละ 50 ของบุคลากรเมื่อทำการเพาะเชื้อที่มือและในรูจมูกหลายๆ ครั้ง แม้ว่าบุคลากรของโรงพยาบาลที่เป็นพาหะเรื้อรังจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการแพร่กระจายเชื้อในโรงพยาบาล แต่โอกาสเช่นนั้นเกิดขึ้นได้บ่อย

การแพร่กระจายของเชื้อทางสิ่งแวดล้อมอาจมีความสำคัญในผู้ป่วยบางกลุ่ม เช่น ผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก หรือผู้ป่วยในหอผู้ป่วยวิกฤตซึ่งมี MRSA ปนเปื้อนอย่างมากในสิ่งแวดล้อม พบ MRSA ได้จากตำแหน่งต่างๆ เช่น พื้น ผ้า ต่างๆ อุปกรณ์ทางการแพทย์ แผ่นรายงาน (chart) ของผู้ป่วย ฯลฯ

การแพร่กระจายของเชื้อทางอากาศ (airborne transmission) ของ MRSA อาจมีความสำคัญสำหรับผู้ป่วยที่มี tracheostomy ซึ่งไม่สามารถดูแลเรื่องเสมหะได้ การเก็บตัวอย่างของอากาศไปตรวจส่วนใหญ่ไม่พบว่ามีเชื้อขึ้น ยกเว้นในหน่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก ผู้ป่วยที่มี dermatitis มีความเสี่ยงสูงที่จะได้รับ MRSA และยังสามารถแพร่กระจายเชื้อทางเซลล์ epithelial ที่หลุดลอกอีกด้วย

โดยสรุป MRSA มีการแพร่กระจายบ่อยที่สุดโดยมือของบุคลากรของโรงพยาบาล ซึ่งมี MRSA สร้างนิคมอยู่ชั่วคราวหลังจากการสัมผัสกับผู้ป่วยที่เป็นแหล่งเก็บเชื้อ ส่วนการ

แพร่กระจายทางอื่นๆซึ่งมีความสำคัญน้อย คือ บุคลากรทางการแพทย์ที่มีเชื้อนี้สร้างนิคมอยู่ หรือ จากอากาศและสิ่งแวดล้อม

2.3 เพนิซิลลิน (Penicillin)

เพนิซิลลิน (Penicillin, ย่อว่า พีซีเอ็น/PCN หรือ เพ็น/Pen) เป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างทางเคมีที่เรียกว่า เบต้า-แลคแทม (Beta-lactam antibiotics) วงการแพทย์นำยานี้มาใช้ต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งยานี้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1897 (พ.ศ.2440) โดยแพทย์ชาวฝรั่งเศสชื่อ Ernest Duchesne การสังเคราะห์ยาเพนิซิลลินได้จากต้นกำเนิดของเชื้อราที่มีชื่อว่า *Penicillium*

ยาเพนิซิลลินยังสามารถแบ่งออกเป็นชนิดย่อยได้อีก เช่น เพนิซิลลิน วี (Penicillin V) ซึ่งจะพบได้ในรูปแบบของยารับประทาน, ส่วนเพนิซิลลิน จี (Penicillin G), โพรเคนเพนิซิลลิน (Procaine penicillin) และ เบนซาทีน เพนิซิลลิน (Benzathine penicillin) จะพบเห็นในรูปแบบยาฉีด เป็นส่วนมาก ยาเพนิซิลลิน ถือเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มแรกที่ถูกนำมาใช้บำบัดรักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococci* และ *Streptococci* สำหรับเชื้อที่ตอบสนองต่อเพนิซิลลินได้ดีจะเป็นแบคทีเรียกลุ่ม แกรมบวก (Gram positive) ปัจจุบันยังมีการใช้ยาในกลุ่มเพนิซิลลินอยู่ ถึงแม้จะมีเชื้อหลายตัวเกิดการดื้อยาด้วยผลของการใช้ยาที่ผิดวิธี แต่ก็ยังมีแบคทีเรียบางกลุ่มที่ตอบสนองกับยานี้

2.3.1 ชนิดของเพนิซิลลินที่เหมาะสมกับผู้ป่วย

1. เพนิซิลลิน วี (Penicillin V) ใช้ในการรักษาโรคดังต่อไปนี้เช่น ทอนซิลอักเสบ, คออักเสบ, โรค Anthrax (โรคติดเชื้อจากแบคทีเรียชื่อ *Bacillus anthracis*), โรคไลม์ (Lyme disease, โรคติดเชื้อจากกลุ่มแบคทีเรียในสกุล/Genus *Borrelia*), โรคไขรูมาติก, การติดเชื้อ *Streptococci* ในบริเวณผิวหนัง และเหงือกอักเสบ

2. เพนิซิลลิน จี (Penicillin G): ใช้ในการรักษาโรคดังต่อไปนี้เช่น ผิวหนังอักเสบ เชื้อหูหัว ใจอักเสบติดเชื้อ โรคหนองใน โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โรคฝีในปอด โรคปอดบวม เนื้อเยื่อตายเน่า โรคคอติบ โรคซิฟิลิส การติดเชื้อในกระแสเลือด/ภาวะพิษเหตุติดเชื้อ และกระดูกอักเสบ

3. โพรเคนเพนิซิลลิน (Procaine penicillin): ใช้ในการรักษาโรคดังต่อไปนี้เช่น โรคซิฟิลิส ผิวหนังอักเสบ โรคไฟลามทุ่ง โรค Anthrax และการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ

4. เบนซาทีน เพนิซิลลิน (Benzathine penicillin): ใช้ในการรักษาโรคดังต่อไปนี้ เช่น โรคไขรูมาติก โรคซิฟิลิส

2.3.2 กลไกการออกฤทธิ์ เพนนิซิลินออกฤทธิ์ โดยการขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก โดยการยับยั้งการสร้าง ครอสลิงค์ (crosslink) ระหว่างสายของเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียอ่อนแอและถูกทำลายปัจจุบันนี้พบการดื้อยาของแบคทีเรียที่มีต่อเพนนิซิลิน ผ่านกลไกที่ตัวของแบคทีเรียสร้างสารเคมีมาทำลายส่วนประกอบของยา ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ เช่น β -lactamase ที่แบคทีเรียบางชนิดสร้างขึ้นจะไปตัดวงบีตาแลคแทมในโมเลกุลของเพนนิซิลิน หรือยากลุ่มบีตาแลคแทมอื่นๆ ได้ จึงต้องใช้ยาอื่นในการรักษาแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาเหล่านี้

2.3.3 ผลข้างเคียง/อาการข้างเคียง อาจพบอาการหายใจลำบาก มีไข้ ปวดตามข้อ เป็นลม ผื่นคันตามผิวหนัง ปวดและเป็นตะคริวที่ท้อง ภาวะชัก ปัสสาวะน้อยลง ท้องเสียหรือถ่ายเหลว ภาวะซึมเศร้า คลื่นไส้ อาเจียน วิดกกังวล สับสน จิต/ประสาทหลอน ปวดศีรษะ คันบริเวณอวัยวะเพศ แผลในปากในลิ้น กรณียาฉีดจะพบอาการปวดบริเวณเนื้อเยื่อที่ได้รับการฉีดยา

2.3.4 กลไกการดื้อยา Methicillin ของ *S. aureus* การดื้อยากลุ่ม penicillin's – resistant penicillin เช่น Methicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin และ Nafcillin เรียกว่า intrinsic resistance หรือ Methicillin Resistance โดยเชื้อจะดื้อทั้ง เพนนิซิลิน และเบต้าแลคแทมอื่นๆ

เบต้าแลคแทมออกฤทธิ์โดยจับกับ เอ็มไซม์ ที่เรียกว่า Penicillin-binding protein (PBP) ใน เชื้อ *Staphylococcus*.PBP ทำหน้าที่เกี่ยวกับ ปฏิกิริยา Transpeptidation และ Carboxypeptidation ซึ่งสำคัญสำหรับ cross-linking ของ peptidoglycan back bone ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เบต้าแลคแทมออกฤทธิ์ทำให้ PBP ทำงานไม่ได้ จึงเกิดการแตกสลายของชั้น Peptidoglycan และทำให้เชื้อตาย *S.aureus* ที่ไวต่อ Methicillin (MSSA) สร้าง PBP 4 ชนิด PBP1, PBP2, PBP3, และ PBP4, PBP1, PBP2 และ PBP3 เป็นเป้าหมายสำคัญสำหรับ เบต้าแลคแทม MRSA สร้าง PBP ที่ผิดปกติ เรียกว่า PBP 2' หรือ PBP2a ซึ่งจับกับ เบต้าแลคแทมไม่ได้ (เนื่องจากมี affinity ต่ำ) PBP2a ในเชื้อคือยานี้ทำหน้าที่แทน PBP ปกติ จึงทำให้เบต้าแลคแทมออกฤทธิ์ไม่ได้ MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยทุกสายพันธุ์ PBP2a ยีนที่ควบคุมการสร้าง PBP2a มีชื่อว่า mecA

ลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งของ MRSA คือมีปรากฏการณ์ของการดื้อยาโดยมี phenotypic expression แบบ heterogeneous ซึ่งทุกเซลล์มี genetic marker ของการดื้อ Methicillin แต่มีเพียงส่วนน้อยของ population เท่านั้นที่แสดงลักษณะการดื้อยา ส่วน phenotype แบบ homogeneous resistance ซึ่งเซลล์ต่างๆใน population ถูกยับยั้งด้วยระดับยาปฏิชีวนะที่ใกล้เคียงกัน

มากนั้นพบได้น้อยกว่า สำหรับข้อมูลในประเทศไทยที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (พ.ศ.2538) พบว่า MRSA จำนวน 7 สายพันธุ์ มีการแสดงออกของการดื้อยาแบบ homogeneous ร้อยละ 72.9 แบบ heterogeneous ร้อยละ 6.3 ส่วนอีกร้อยละ 20.8 แบบระบุกลุ่มไม่ได้ ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ (พ.ศ.2541) พบว่า MRSA 100 สายพันธุ์ แสดงออกของการดื้อยาแบบ homogeneous ร้อยละ 100

Staphylococcus ที่มีการดื้อยาแบบ intrinsic ต่อ Methicillin มี MIC ของ Methicillin มากกว่าหรือเท่ากับ 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บางสายพันธุ์ของ *Staphylococcus* มี MIC ของ Methicillin 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือของ oxacillin 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่าจุดตัด สาระสำคัญ ที่เกี่ยวกับ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ความไว (susceptibility break point) และไม่สร้าง PBP2a พบว่ากลไกที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาแบบหลังนี้คือ

(1) มีการสร้างเอ็นไซม์ เบต้าแลคทาเมส มากเกินไป (hyper-production) ทำให้สามารถย่อยสลายบางส่วนของ Penicillinase-resistant penicillin ได้สายพันธุ์เหล่านี้กลับไวต่อเบต้าแลคแทมได้อีกเมื่อทดสอบร่วมกับสารยับยั้งเอ็นไซม์เบต้า-แลคทาเมส เช่น กรด Clavulanic หรือ Sulbactam เชื่อเหล่านี้มีชื่อว่า Borderline oxacillin-resistant *S.aureus* หรือ BORSA

(2) มีการเปลี่ยนแปลงใน affinity ของ PBP ที่ปกติหลายตัวต่อการจับกับ เบต้าแลคแทม PBP4 เพิ่มขึ้น ในสายพันธุ์เหล่านี้สายพันธุ์นี้มีชื่อว่า modified resistant *S. aureus* (MODSA)

สายพันธุ์ borderline resistant นี้มีความชุกตั้งแต่ร้อยละ 0.9-12.5 และมีความแตกต่างจาก MRSA สายพันธุ์ที่สร้างPBP2a โดยสายพันธุ์ borderline resistant ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ การศึกษาในสัตว์ทดลอง ที่คิดชื่อ BORSA พบว่า สามารถรักษาได้ผลด้วย ยาเบต้าแลคแทมขนาดสูง หรือเบต้าแลคแทม ร่วมกับสารต้านเบต้าแลค-ทาเมส แต่การรักษาดังกล่าวยังมีข้อมูลทางคลินิกน้อย

2.3.5 การทดสอบหาการดื้อยา Methicillin แม้ว่าเซลล์ทุกตัวของ MRSA ใน pure culture มียีนที่สามารถแสดงลักษณะดื้อยาเบต้าแลคแทม แต่พบว่ามีเพียง 1 ใน 10 เซลล์ที่แสดงลักษณะดื้อยา การแสดงลักษณะดื้อยาเพิ่มขึ้นหลังการอบที่อุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียส การเติม NaCl ในอาหารเลี้ยงเชื้อและอบนาน 24 ชั่วโมง วิธีมาตรฐานที่ใช้ทดสอบหา MRSA คือ วิธี disc diffusion, agar dilution และ broth microdilution

The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) กำหนดวิธีทดสอบการดื้อยา Methicillin ของ *Staphylococcus* โดยใช้วิธี disc diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton (MH) และใช้ Oxacillin disc เนื่องจาก Oxacillin คงทนต่อการเก็บรักษา มากกว่ายาอื่นๆ มีการเตรียม Inoculum โดยตรงจากงานเพาะเชื้อและอบนาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส

ถ้าการทดสอบวิธี disc diffusion ได้ผลแน่ชัด ก็ทดสอบด้วยวิธี agar dilution หรือ broth microdilution โดยใช้ MH agar หรือ cationic adjusted MH broth ซึ่งเติม 2 % NaCl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย การทดสอบนี้จะตรวจ intrinsic MRSA ได้ดี และแยกจาก BORSA ได้ด้วยค่า MIC ที่ต่างกัน ค่าจุดตัดความไวสำหรับความไวต่อ methicillin คือ <8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และการดื้อยาคือ > 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับ oxacillin ใช้ค่า < 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ > 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

การทดสอบมาตรฐานอีกวิธีหนึ่งคือวิธี oxacillin – salt agar screen ซึ่งทดสอบโดยใส่เชื้อบน MH agar ที่เติม 4 % NaCl และ oxacillin (4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ถ้ามีเชื้อขึ้นหลังจากอบที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แสดงว่าเชื้อนั้นคือ oxacillin

การใช้ DNA probe หรือ PCR ตรวจหายีน mecA มีประโยชน์ในการหา MRSA ในการวิจัย แต่ยังไม่ทราบคุณค่าทางเทคนิค การทดสอบด้วย E test เพื่อตรวจหาการดื้อยา methicillin ใน *S.aureus* ได้ผลตรงกับการตรวจด้วย agar dilution และการตรวจหา mecA E test มีข้อดีคือทำได้ง่าย จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ทดสอบหา MRSA ได้

2.4 ชะเอมเหนื่อ (*Derris reticulata* Craib.)

ชะเอมเหนื่อ 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 2.2) มีข้อมูลทางยาสมุนไพรดังนี้

ราก รสหวาน ราก มีสรรพคุณ ขับเสมหะ

ต้น รสหวานเอียน ถ่ายลม แก้โรคในคอ ทำให้ผิวหนังสดชื่น แก้โรคตา

เนื้อไม้ รสหวาน แก้โรคในคอ แก้ลม แก้เลือดออกตามไรฟัน บำรุงธาตุ บำรุงกำลัง บำรุงกล้ามเนื้อให้เจริญ ขับเสมหะ แก่น้ำลายเหนียว

ใบ รสร้อนเพื่อน มีสรรพคุณ ช่วยขับโลหิตระดู

ดอก รสขมร้อน ช่วยย่อยอาหาร ทำเสมหะให้จืด แก้ดีและโลหิต



รูปที่ 2.2 ต้นชะเอมเหนือ *Derris reticulata* Craib.

(ที่มา : หนังสือ 20ปี สวนสมุนไพร, สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ เจริญยาไทย, วุฒิ วุฒิ
 ธรรมเวช อุทยานธรรมชาติวิทยาสิริรุกษชาติ, มหาวิทยาลัยมหิดล)



รูปที่ 2.3 ดอกของต้นชะเอมเหนือ *Derris reticulata* Craib.

(ที่มา : หนังสือ 20ปี สวนสมุนไพร, สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, วุฒิ วุฒิ
 ธรรมเวช อุทยานธรรมชาติวิทยาสิริรุกษชาติ, มหาวิทยาลัยมหิดล)

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) ที่จำเป็นในการสร้างสาร

โพรสตาแกลนดินในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น สารสกัดยังยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA ของไซโตคายน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้แก่ TNF- α , IL-1 β and IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น

ตาราง 2.1 การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากพืชตระกูล *Derris* (Kongjinda, 2004).

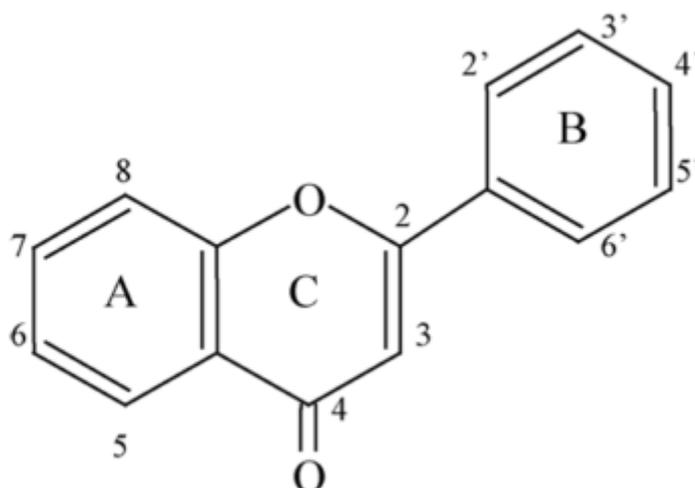
Sources	Plant part	Ethnomedical activity
<i>D. amazonica</i>	Dried root	Fish poison
<i>D. elliptica</i>	Root	Insecticide
	Dried root	Blood purification Fish poison
<i>D. indica</i>	Dried seed	Fish poison
<i>D. malaccensis</i>	Dried root	Fish poison
	Dried root	Leprosy
<i>D. oblonga</i>	Root	Insecticide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

ตาราง 2.1 (ต่อ)

Sources	Plant part	Ethnomedical activity
<i>D. trifoliata</i>	Root	Insecticide
	Dried entire plant	Stimulant
	Dried entire plant	Antipasmotic

2.5 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารสำคัญที่พบได้มากมายในพืชที่มีการสังเคราะห์แสงในการเจริญเติบโต ได้แก่ ผลไม้ ผัก เมล็ดธัญพืช ลำต้น และส่วนดอกของพืช ชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังพบในปริมาณมากในชา และ น้ำผึ้ง หน้าที่โดยทั่วไปแล้ว ฟลาโวนอยด์จะสร้างสีในพืช ทำให้ดอกไม้มีสีแตกต่างกันในการดึงดูดแมลง รักษาสภาพทางกายภาพของพืชและ ปกป้องการทำลายจากเชื้อรา โครงสร้างพื้นฐานโดยทั่วไปของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ประกอบด้วย 2-phenyl-benzol (α) pyrane ซึ่งประกอบด้วยวงแหวนกลุ่ม benzene (A และ B) ที่เชื่อมต่อกับ วงแหวน heterocyclic pyrane (C) ดังรูปที่ 2.4



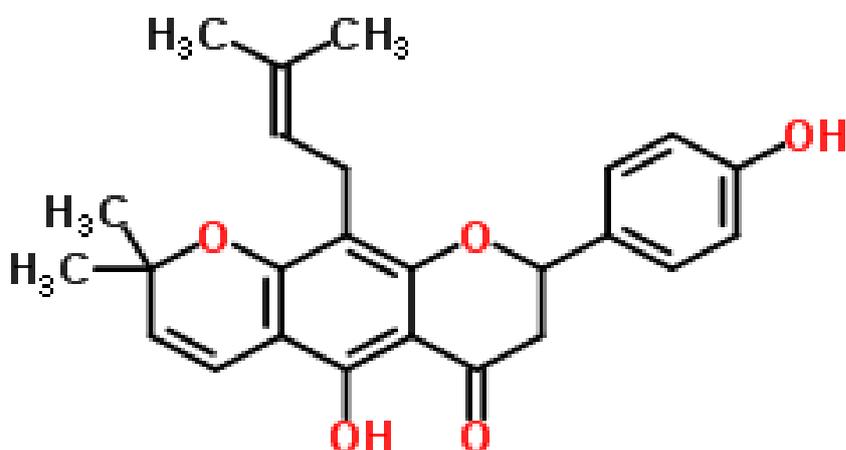
รูปที่ 2.4 โครงสร้างหลักของ flavones ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoids (Cushnie,2005)

2.6 คุณสมบัติทางการแพทย์ของฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ได้ใช้เป็นองค์ประกอบหลักในการวิจัยทางการแพทย์ มีการรายงานคุณสมบัติทางการรักษาโรค เช่น ด้านการอักเสบ (Tangpu and Yadav 2004) รักษาโรคกระดูก ยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ ด้านเชื้อแบคทีเรีย ด้านภูมิแพ้ ด้านอนุมูลอิสระ และด้านการเกิดเนื้องอก (Cushnie and Lamb 2005) นอกจากนี้สารสำคัญที่สกัดได้จากฟลาโวนอยด์ ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางโมเลกุลของสารแต่ละชนิด เช่น คาร์โบไฮเดรต, phenyl ring, phenol และ benzopyrone ring เป็นต้น

2.7 สารลูปีนิฟอลิน

สารลูปีนิฟอลิน เป็น สารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอน (Flavonone) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ดังนั้น คุณสมบัติทางเคมีและฤทธิ์ในด้านทางเภสัชวิทยาจึงมีความน่าสนใจ และมีประโยชน์เป็นอย่างมากในทางการแพทย์ โครงสร้างทางเคมี ของลูปีนิฟอลิน แสดงไว้ในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของลูปีนิฟอลิน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่างลำต้นชะเอมเหนือ

นำลำต้นของชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน ลำต้นที่อบแล้วเก็บไว้ในที่แห้ง ไม้มีความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะใช้นำไปใช้ในการทดลอง

3.2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารลูปีนิฟอลิน

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

3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ความถูกต้องของสารลูปีนิฟอลิน

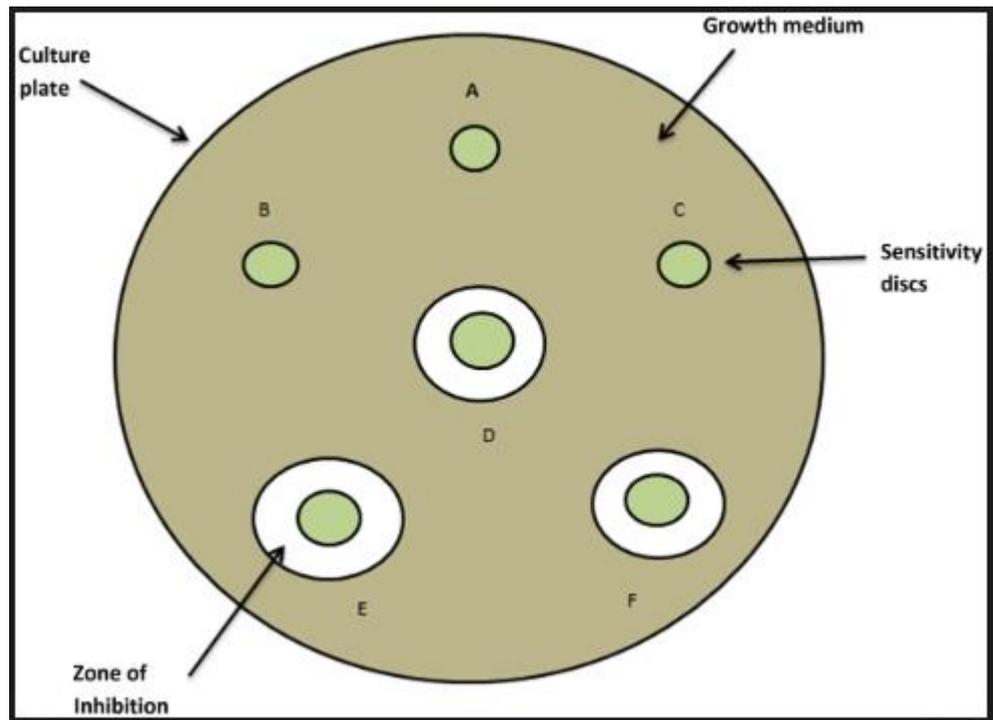
นำผลึกของสารลูปีนิฟอลินที่สกัดได้ไปตรวจวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ความถูกต้องด้วยวิธี Nuclear magnetic resonance (NMR) และ วิธี Mass spectrometry (MS) โดยส่งตรวจที่ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

3.4.1 วิธี Disc diffusion

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคือ *S. aureus* 19376, *S. aureus* (MRSA) 4738, *S. aureus* (MRSA) 20646 และ *S. aureus* (MRSA) 20649 โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Mueller-Hinton Broth (MHB) บ่มเชื้อให้เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (CLSI, 2016) แล้วนำมาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85 % NaCl เทียบความขุ่นกับ 0.5 McFarland เพื่อให้ได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^8 cfu/ml หลังจากนั้น ป้ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Agar (MHA) วางแผ่นกระดาษกรอง What man No.1

ขนาด 6 มิลลิเมตร ที่มีสารลูปีนิฟอลิน จำนวน 25, 50, และ 75 $\mu\text{g}/\text{disc}$ ตามลำดับ ใช้ 10% NaOH (1 N) และยาปฏิชีวนะ Ampicillin เป็น Vehicle control และ Positive control ตามลำดับ นำงานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้บเพาะเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาด Inhibition zones รอบแผ่นกระดาษกรองแล้วบันทึกผล ทำการทดลอง 3 ครั้ง

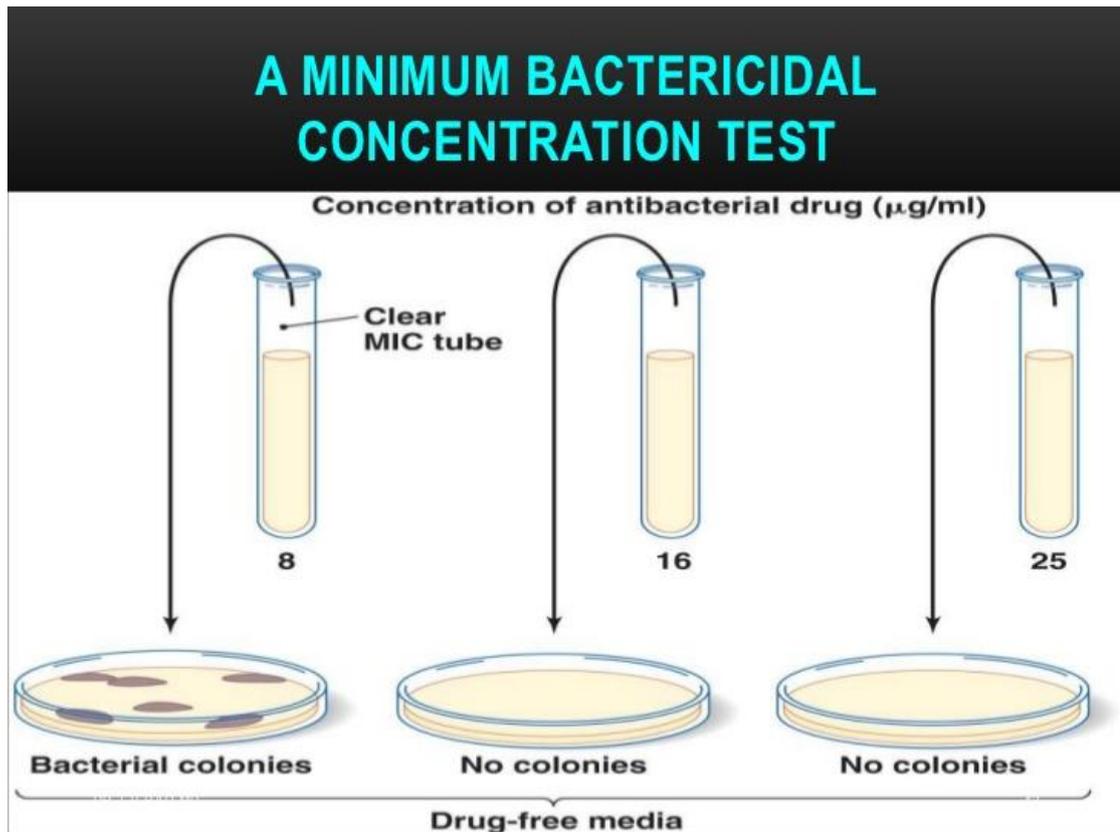


ภาพที่ 3.1 วิธี Disc diffusion ในการวัด zone of inhibition (CLSI,2016)

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

ทำการทดสอบด้วยวิธี microdilution method ใน หลุมเพาะเลี้ยงเชื้อ 96 well plate (Joycharat et al., 2013) ละลายสารลูปีนิฟอลิน ใน 10% NaOH (1 N) แล้วเติมลงในหลุมเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ให้มีความเข้มข้นของสารลูปีนิฟอลินตั้งแต่ 0.25-512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ด้วยวิธี two-fold serial dilutions หลังจากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรีย ให้มีจำนวนเชื้อสุดท้ายในหลุมทดลองเท่ากับ 5×10^5 cfu/ml การทดลองด้วยวิธีนี้ใช้ยาปฏิชีวนะ Ampicillin, 0.5% NaOH (1 N) และ หลุมที่ไม่ใส่สารลูปีนิฟอลิน เป็น positive, vehicle control และ negative control ตามลำดับ นำ หลุมเพาะเลี้ยง

เชื้อ 96 well plate ไป บ่มในตู้บเพาะเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย หรือ ไม่เกิดความขุ่น วิเคราะห์ค่า MBC ด้วยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อจากหลุมที่ไม่เกิดความขุ่นไปเพาะเลี้ยงเชื้อบน MHA แล้วนำไปบ่มในตู้บเพาะเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่เห็นเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโต จะเป็นค่า MBC การทดลองทุกวิธีจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง



ภาพที่ 3.2 แสดงการหาค่า Minimum bactericidal concentration (MBC) (Joycharat et al., 2013)

3.5 วิธีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารลูปินโฟลีนต่อเชื้อแบคทีเรีย

3.5.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน หรือ Transmission electron microscope (TEM) มีประโยชน์ในการศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อแบคทีเรียแบบตัดขวาง สามารถมองเห็นองค์ประกอบที่เปลี่ยนแปลงหลังได้รับสารลูปินโฟลีน ได้แก่ cell wall, cell membrane และ ลักษณะโครงสร้างภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย (Ghosh, Indukuri, Bondalapati, Saikia, and Rangan, 2013) ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบกับสารตัวอย่างแล้วจะล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer (PBS, pH 7.2) ทำการ fixed ตัวอย่างด้วย 0.25% glutaraldehyde ล้างด้วย 0.1 M PBS อีกครั้ง แล้ว fixed ด้วย 1%

osmium tetroxide หลังจากนั้น dehydrate ด้วย acetone จากความเข้มข้น 20 %-100 % นำตัวอย่างไปแทนที่ด้วย Spurr's resin เพื่อเก็บตัวอย่างให้อยู่ในแท่งพลาสติก นำไปตัด section ด้วยเครื่อง ultramicrotome ให้ตัวอย่างอยู่บนแผ่น copper grids ย้อมสีด้วย 2% uranyl acetate และ lead citrate แล้วตรวจตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพื่อคุณลักษณะของเซลล์แบคทีเรีย

3.5.2 Flow cytometry

การศึกษานี้ วิเคราะห์ความแข็งแรงของเชื้อหุ้มเซลล์โดยใช้วิธี Flow cytometry เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจนอยู่ในช่วง mid-logarithmic phase ทำการทดสอบโดยการเติมสารสัคคูลูปีนิฟอลินลงไปให้ได้ความเข้มข้น 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาแล้ว นำหลอดทดลองออกมาเติมสี Propidium iodide (5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน PBS) นำไปตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer (FACScan; BD Biosciences, San Jose, CA, U.S.A.) ร่วมกับโปรแกรม CellQuest software (BD Biosciences) โดยเปรียบเทียบกับหลอดทดลองที่เติมยา ampicillin (positive control)

3.5.3 DNA laddering assay

นำเชื้อ *S. aureus* cells (5×10^5 cfu/ml) ไปบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อหลังจากเติมสารสัคคูลูปีนิฟอลินความเข้มข้น 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสกัด genomic DNA ของ *S. aureus* โดยใช้ชุดสกัด NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany) เมื่อได้ DNA ออกมาแล้วทำการตรวจสอบคุณภาพโดยใช้เครื่อง Nanodrop100

ทำการวิเคราะห์ผลของสารสัคคูลูปีนิฟอลินต่อ DNA โดยวิธี electrophoresis เมื่อนำ DNA ไปย้อมสี MaestroSafe nucleic acid gel stain reagent (Maestrogen, USA) แล้วเปิดลงบน 0.7% agarose gel ภายใต้อสง ultraviolet เพื่อสังเกตลักษณะของ band ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับ Triton-X และ untreated cells ตามลำดับ

3.5.4 Drp 35 gene expression โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

การศึกษาการเพิ่มจำนวนจีน Drp35 ของเชื้อ *Staphylococcus* spp. ที่ปนเปื้อนกับสาร lupinifolin สามารถทำได้โดยสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของเชื้อ *Staphylococcus* สายพันธุ์ต่างๆ (ATCC29213, DMST20646, DMST20649 และ DMST4738) ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงร่วมกับสาร lupinifolin จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จะถูกนำไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA templates) เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ไพร์เมอร์ (primers) ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ คือ

Drp35-F (5'-TGAAATGAAAGGATCCATCATGATGT-3' และ

Drp35-R 5(5'-CCCTAAATTTAAGTCGACTTTCATTC-3') (Morikawa et al., 2005)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมลำต้นชะเอมเหนือ

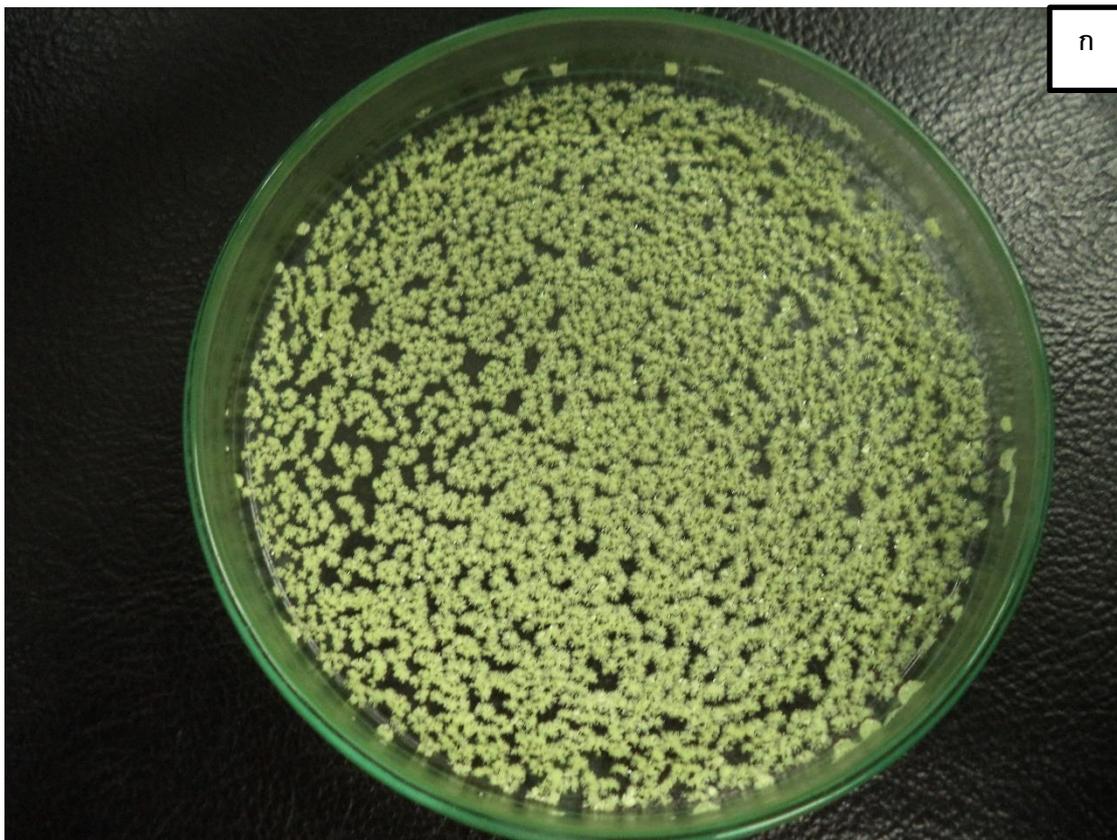
ลำต้นชะเอมเหนือที่ใช้สำหรับการวิจัย เมื่อนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำอบด้วย Hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะ 2 วัน จะมีลักษณะสีน้ำตาลอ่อน ถึงสีน้ำตาลเข้ม ดังภาพที่ 4.1



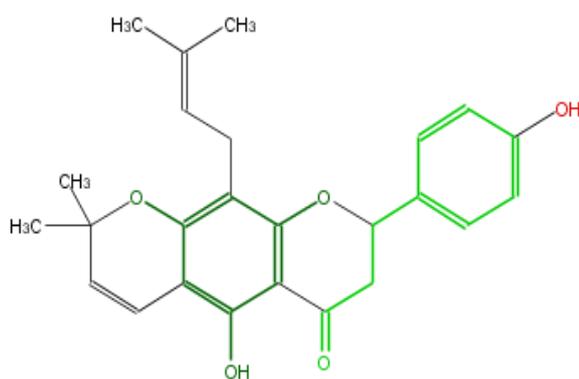
ภาพที่ 4.1 ลำต้นชะเอมเหนือหลังจากอบด้วย Hot air oven

4.2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารลูปินิฟอลิน

จากการสกัดลำต้นชะเอมเหนือ เพื่อหาสารลูปินิฟอลิน ด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย และวิธีการ Crystallization จะได้ ผลึกสีเหลืองรูปเข็ม (ภาพที่ 4.2) ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของสารชนิดนี้ ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้น ด้วยวิธี TLC เกิด band 1 band วัดค่า Rf ได้เท่ากับ 0.75 (ภาพที่ 4.3)

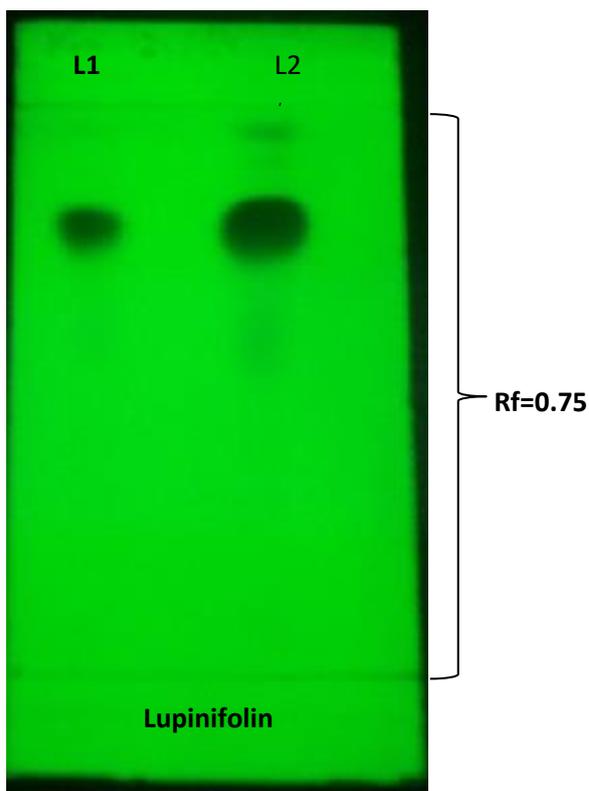


ก



ข

ภาพที่ 4.2 (ก) ผลึกสีเขียว และ (ข) รูปโครงสร้างทางเคมี ของสารดูปนิฟอลิน



ภาพที่ 4.3 ผล TLC บนแผ่นกระดาษ Silica gel G₆₀F₂₅₄ อะลูมิเนียม ดูภายใต้แสง UV

4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ความถูกต้องของสารลูปีนิฟอลิน

4.3.1 การวิเคราะห์ด้วยวิธี Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

หลังจากการทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี TLC เพื่อดูว่าสารที่สกัดได้ มีเพียงสารเดียว นำสารที่สกัดได้ไปตรวจดูโครงสร้างทางเคมีเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา โดยการดูตำแหน่งของ ¹H และ ¹³C ด้วยวิธี NMR (ภาคผนวก) พบว่า มีโครงสร้างทางเคมีของสารลูปีนิฟอลิน ดังตารางที่ 4.1 หลังจากนั้นนำไปตรวจหามวลสารของลูปีนิฟอลิน ได้ค่า 407.1850 ดังภาพที่ 4.4

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของลูปีนโฟลีนด้วยวิธี NMR

Position	Yellow needle-shaped compound ^a		Lupinifolin ^b	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
4	196.68		196.84	
7	159.75		160.13	
8a	159.53		159.44	
5	157.50		156.48	
4'	156.56		156.09	
3'''	130.99		131.11	
1'	129.62		130.60	
2'/6'	127.56	7.32 (d, 8.4)	127.66	7.31 (d, 8.4)
3''	125.91	5.50 (d, 10.0)	126.02	5.52 (d, 10.1)
2'''	122.56	5.14 (dd, 7.2,7.2)	122.40	5.16 (dd, 7.2,7.2)
4''	115.67	6.64 (d, 10.0)	115.53	6.64 (d, 10.1)
3'/5'	115.67	6.87 (d, 8.4)	115.53	6.89 (d, 8.4)
8	108.59		108.73	
6	102.70		102.79	
4a	102.69		102.61	
2	78.80	5.34 (dd, 12.8,2.8)	78.47	5.33(dd, 12.6,3.0)
2''	78.05		78.20	
CDCl ₃	77.37			
CDCl ₃	77.11			

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Position	Yellow needle-shaped compound ^a		Lupinifolin ^b	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
CDCl ₃	76.86			
3	43.23	3.04 (dd,17.6,12.8) 2.80 (dd,17.6,3.0)	42.97	3.06(dd,17.1,12.6) 2.81 (dd,17.1,3.0)
6''	28.39	1.45 (s)	28.25	1.46 (s)
5''	28.29	1.44 (s)	28.33	1.45 (s)
4'''	25.80	1.65 (s)	25.78	1.66 (s)
1'''	21.47	3.21 (d, 7.2)	21.42	3.22 (d, 7.2)
5'''	25.80	1.65 (s)	25.78	1.66 (s)
5-OH		12.24 (s)		12.24 (s)

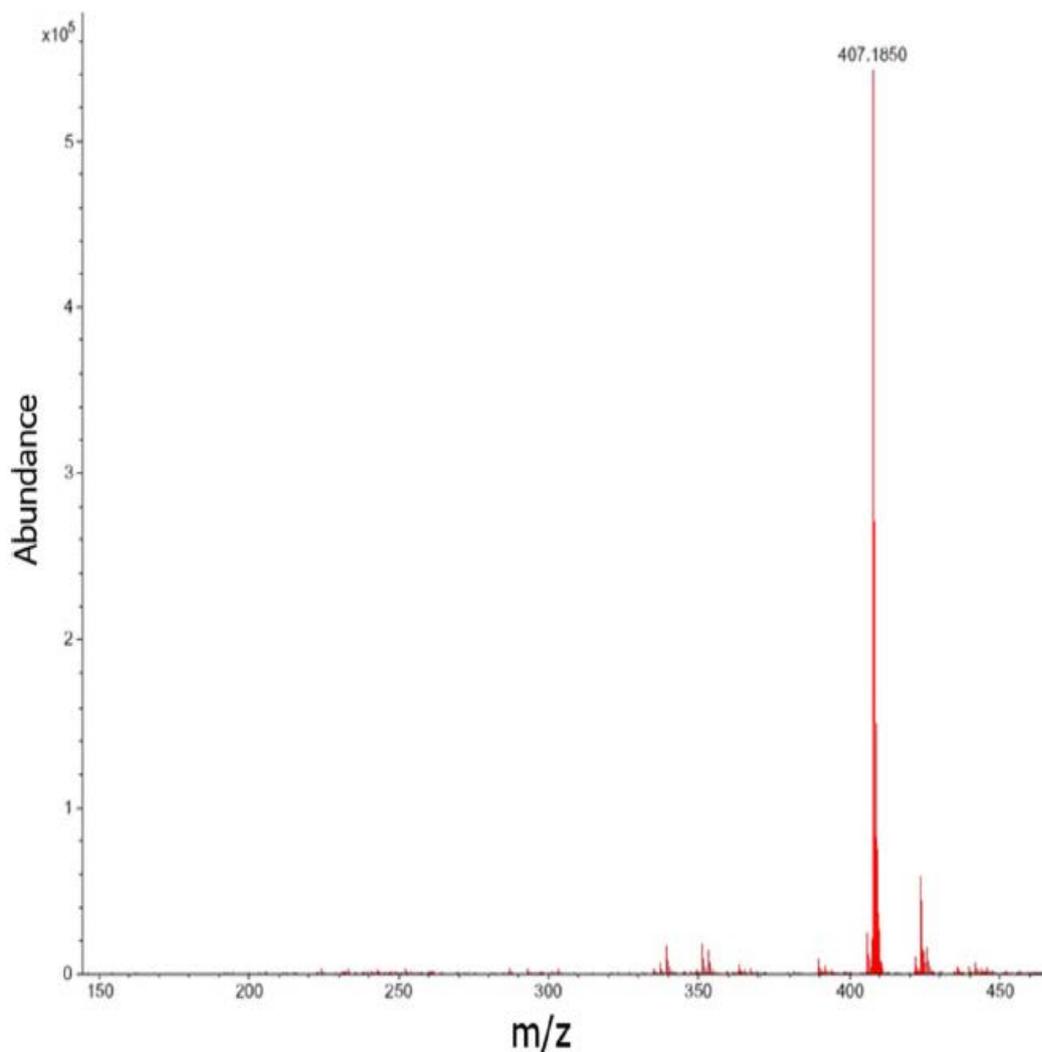
^a Recorded in CDCl₃ at 500 MHz for ¹H-NMR and 125 MHz for ¹³C-NMR

^b Recorded in CDCl₃ at 300 MHz for ¹H-NMR and 75.6 MHz for ¹³C-NMR, cited in

(Mahidol et al., 1997)

4.3.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Mass spectrometry (MS)

จากการวิเคราะห์สารลูปีนโฟลิน เพื่อดูมวลน้ำหนัก พบว่า เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Mass spectrometry มวลน้ำหนักมีค่าเท่ากับ 407.1850



ภาพที่ 4.4 Mass spectrum ของลูปีนโฟลิน

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

4.4.1 วิธี Disc diffusion

ผลการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ด้วยวิธี Disc diffusion วัดค่า inhibition zone ได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ด้วยวิธี Disc diffusion

Microorganism	Diameter of inhibitions zone (mm)			
	Lupinifolin (μg)			Ampicillin (μg)
	25	50	75	10
<i>Staphylococcus aureus</i> 19376	10 \pm 0.2	25 \pm 0.6	26 \pm 0.2	37 \pm 0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 4738	12 \pm 0.5	23 \pm 0.6	25 \pm 0.3	10 \pm 0.7
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 20646	10 \pm 0.3	20 \pm 0.6	23 \pm 0.3	10 \pm 0.6
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 20649	10 \pm 0.1	23 \pm 0.2	26 \pm 0.5	10 \pm 0.7

n.i.; no inhibition zone, Data are means \pm SD ($n=3$)

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

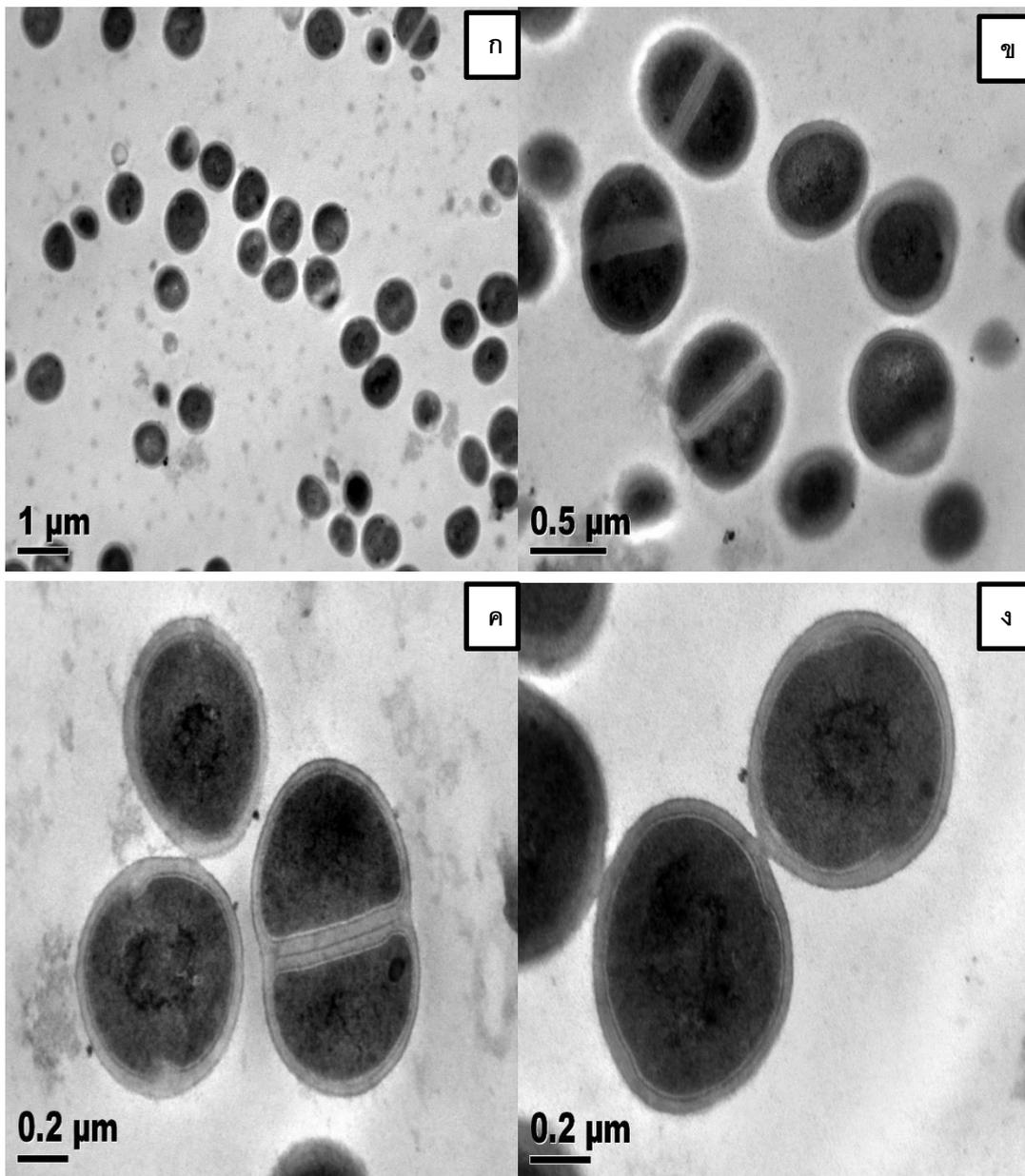
ตารางที่ 4.3 ผลการตรวจฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ด้วยวิธี Minimum inhibition concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC)

Microorganisms	Lupinifolin		Ampicillin	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> 19376	32	64	0.5	1
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 4738	32	64	> 512	> 512
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 20646	32	64	> 512	> 512
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 20649	32	64	> 512	> 512

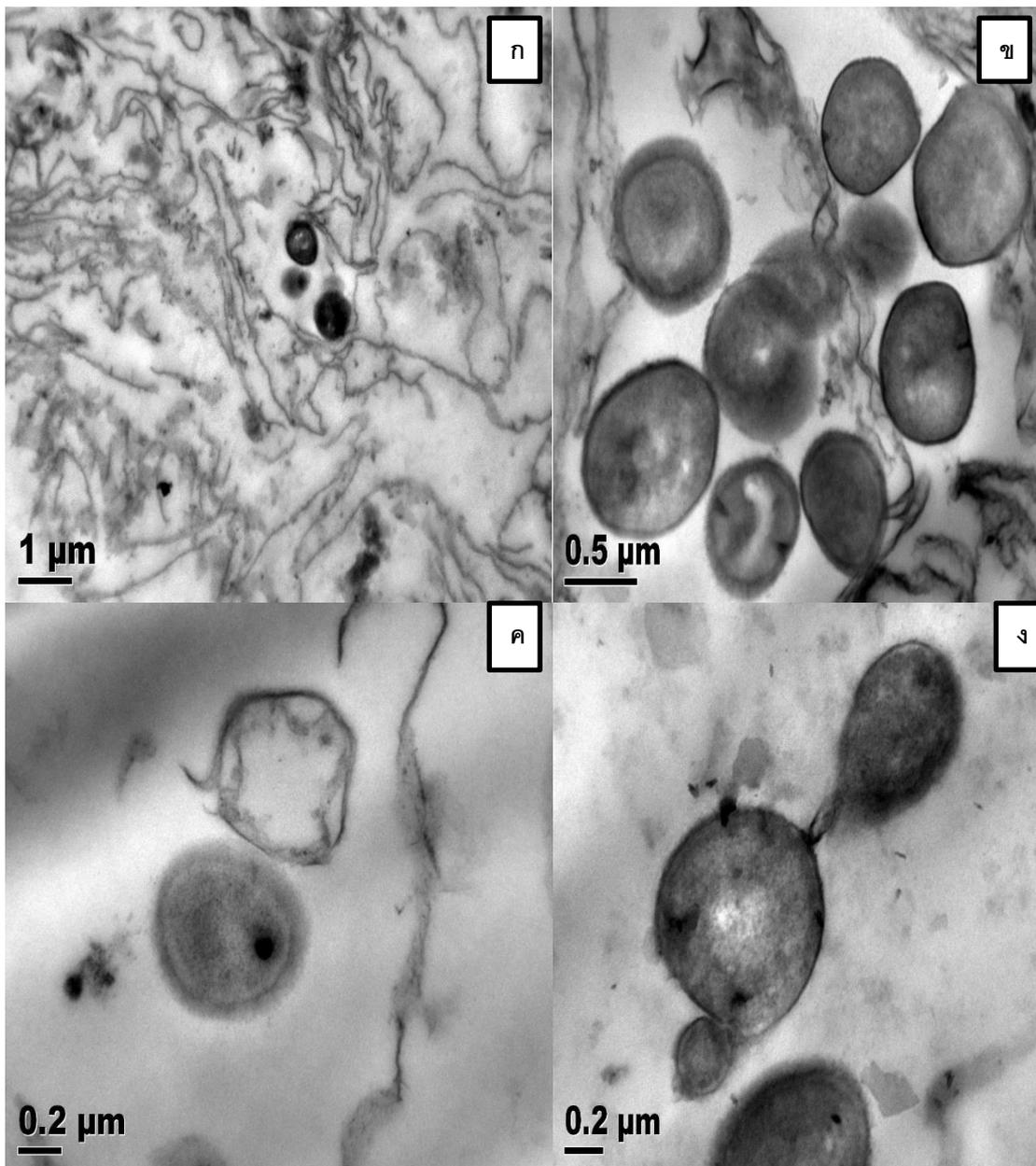
4.5 วิธีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารลูปีนิฟอลินต่อเชื้อแบคทีเรีย

4.5.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

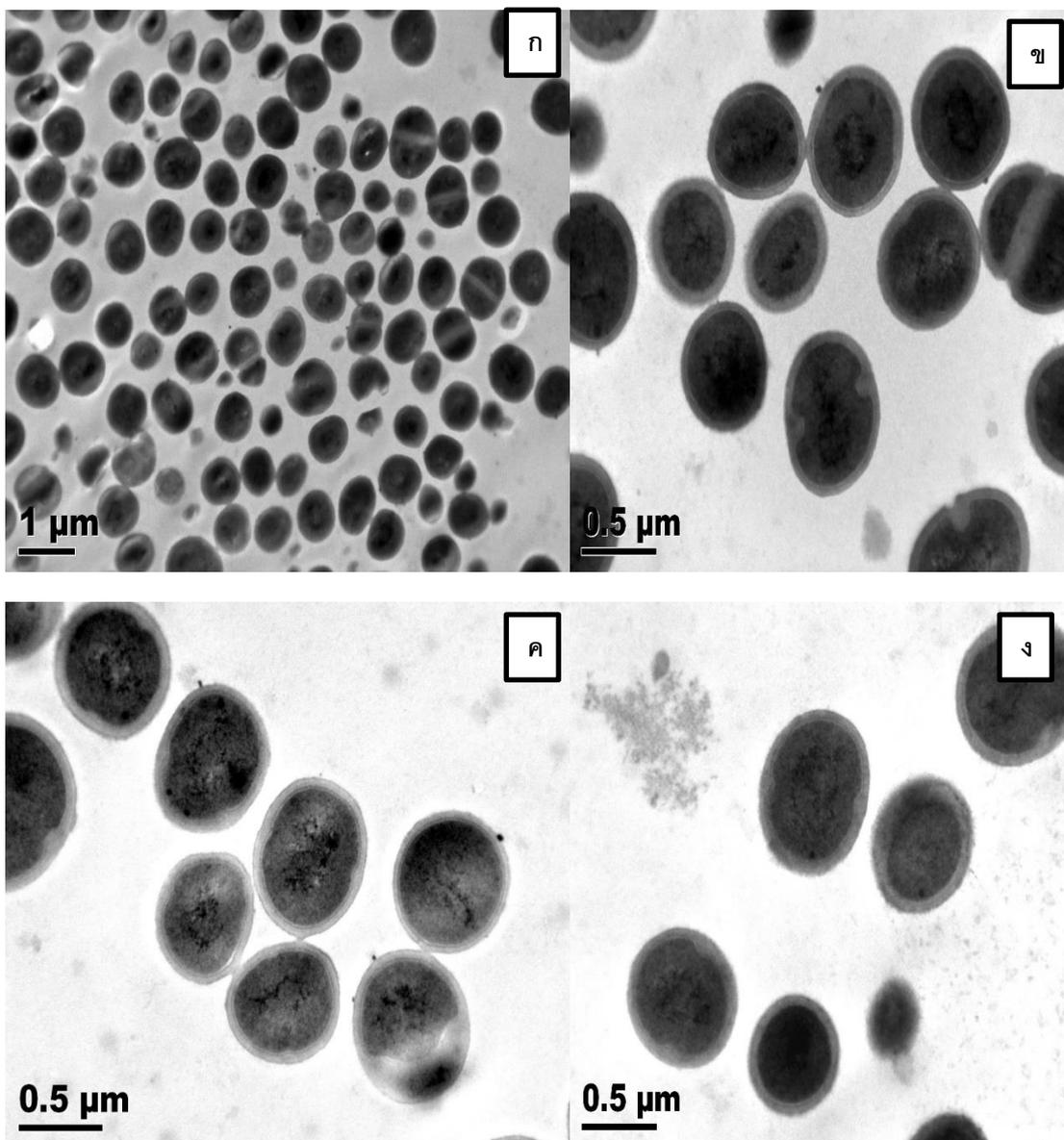
ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า เซลล์ของ MRSA ที่เติมสารสารลูปีนิฟอลิน มีลักษณะเปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับเซลล์แบคทีเรียปกติที่ไม่ได้เติมสารสกัด โดยลักษณะที่สังเกตเห็น มีรูปร่างบวม และ บางเซลล์จะติดสีเข้ม อาจเกิดจาก ผนังเซลล์ และ ผนังเซลล์ อาจถูกทำลาย ดังภาพที่ 4.5-4.7



ภาพที่ 4.5 ผลจากการดูด้วยกล้อง TEM แสดง เซลล์ MRSA (Normal control) ที่ไม่ได้เติมสารลูปีนิฟอลิน, (ก) – (ง) มีลักษณะเซลล์ที่ สมบูรณ์ สังเกตเห็นผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์ได้ชัดเจน

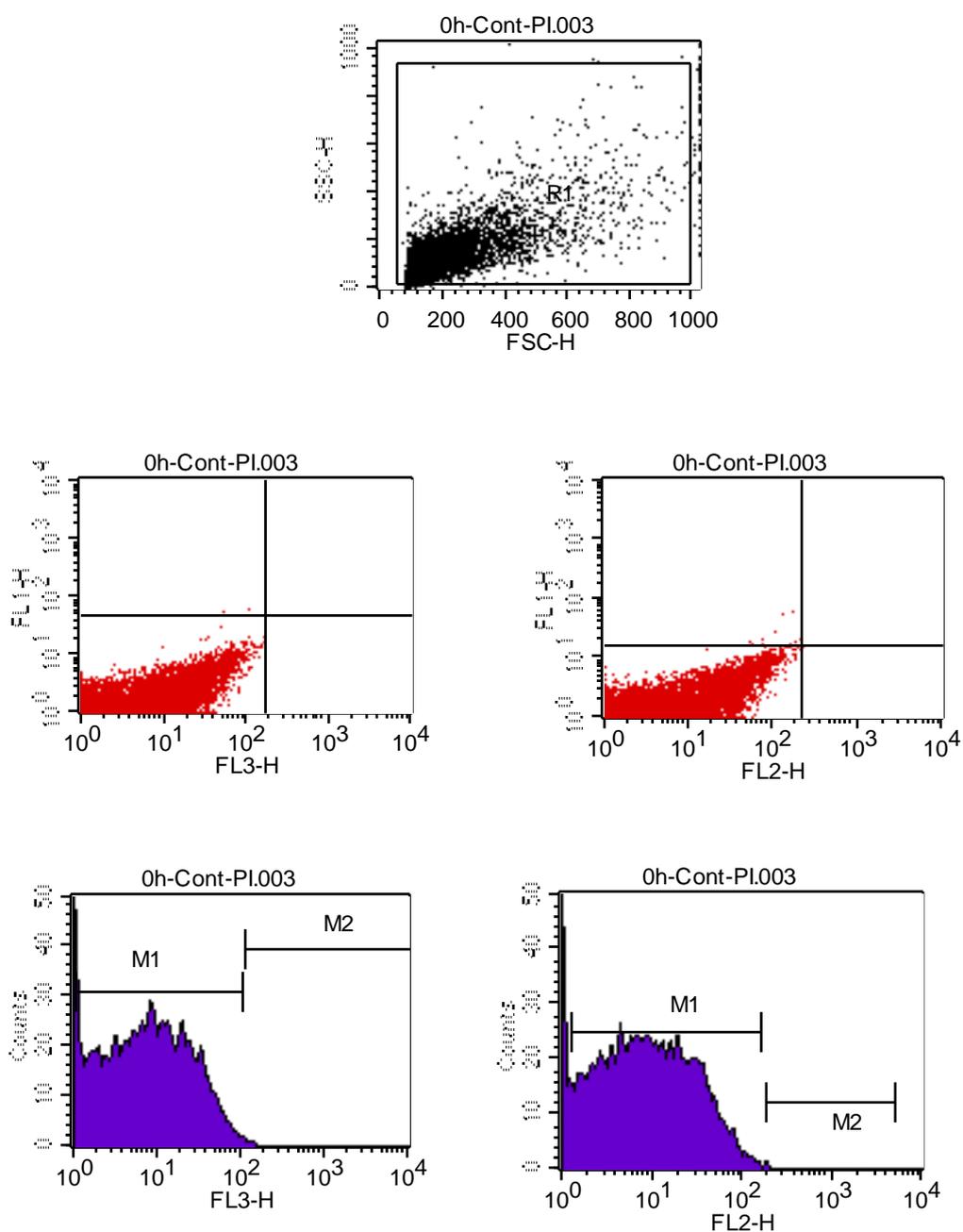


ภาพที่ 4.6 ผลจากการดูด้วยกล้อง TEM แสดง ซื่อ MRSA หลังจากเติมสารลูปีนิฟอลิน (lupinifolin treated cells) สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ มีลักษณะถูกทำลาย ทำให้เกิดการแตกสลายของเซลล์, (ก) เซลล์ MRSA กำลังแตกสลาย, (ข) เซลล์ MRSA เกิดการบวมขยายตัว, (ค) ผนังเซลล์ถูกทำลาย, (ง) เซลล์ MRSA เกิดการรั่วเนื่องจากการถูกทำลายของสารลูปีนิฟอลิน



ภาพที่ 4.7 ผลจากการดูด้วยกล้อง TEM แสดง ซ็ื่อ MRSA หลังจากเติมยา Ampicillin (Ampicillin treated cells), (ก) – (ง) มีลักษณะเซลล์ที่ สมบูรณ์ สังเกตเห็นผนังเซลล์ และเชื้อหุ้มเซลล์ได้ชัดเจน เนื่องจากเป็น เชื้อดื้อยา จึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมยาลงไป ในหลอดทดลอง

4.5.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometry



ภาพที่ 4.8 Histogram แสดง Normal control ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่เวลา 0 h

ตารางที่ 4.1 ค่าแสดงพื้นที่ทางสถิติ ของ Normal control ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่เวลา 0 h

Quadrant Statistics

File: 0h-Cont-PI.003 Gate: G1
 Gated Events: 9852 Total Events: 10000
 X Parameter: FL3-H (Log) Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	2	0.02	0.02	79.17	74.65	57.79	57.77
UR	0	0.00	0.00	***	***	***	***
LL	9850	99.98	98.50	11.78	5.68	2.19	1.76
LR	0	0.00	0.00	***	***	***	***

Quadrant Statistics

File: 0h-Cont-PI.003 Sample ID: 0h-Cont-PI
 Gate: G1 Gated Events: 9852
 X Parameter: FL2-H (Log) Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	16	0.16	0.16	117.96	109.60	23.03	20.63
UR	1	0.01	0.01	226.71	226.71	15.82	15.82
LL	9835	99.83	98.35	13.82	6.41	2.17	1.75
LR	0	0.00	0.00	***	***	***	***

Histogram Statistics

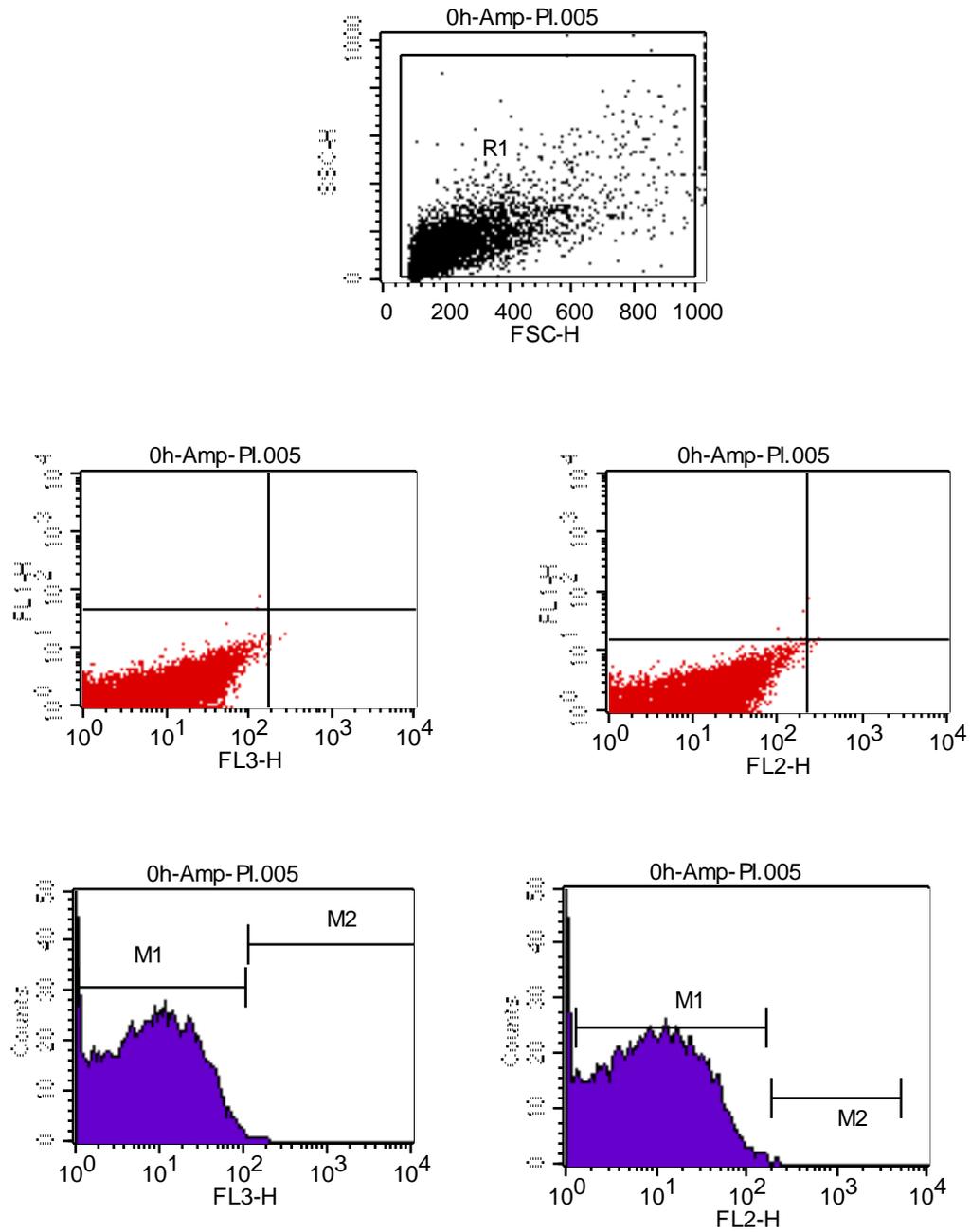
File: 0h-Cont-PI.003 Gate: G1
 Gated Events: 9852 Total Events: 10000
 X Parameter: FL3-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9852	100.00	98.52	11.79	5.68	132.46	5.88	1
M1	1, 101	8377	85.03	83.77	13.38	7.62	113.32	7.77	6
M2	114, 9910	14	0.14	0.14	138.37	137.62	11.04	135.16	127

Histogram Statistics

File: 0h-Cont-PI.003 Gate: G1
 Gated Events: 9852 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9852	100.00	98.52	14.01	6.45	139.38	6.49	1
M1	1, 16	8239	83.63	82.39	16.33	9.17	119.58	8.90	8
M2	191, 5180	3	0.03	0.03	209.43	209.08	7.16	201.69	199



ภาพที่ 4.9 Histogram แสดง Ampicillin treated cells ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่เวลา 0 h

ตารางที่ 4.2 ค่าแสดงพื้นที่ทางสถิติ ของ Ampicillin treated cells ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่

เวลา 0 h

Quadrant Statistics

File: 0h-Amp-PI.005 Gate: G1
 Gated Events: 9846 Total Events: 10000
 X Parameter: FL3-H (Log) Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	2	0.02	0.02	127.07	126.92	64.23	62.64
UR	0	0.00	0.00	***	***	***	***
LL	9839	99.93	98.39	12.77	6.22	2.05	1.68
LR	5	0.05	0.05	208.19	204.98	15.42	15.37

Quadrant Statistics

File: 0h-Amp-PI.005 Sample ID: 0h-Amp-PI
 Gate: G1 Gated Events: 9846
 X Parameter: FL2-H (Log) Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	9	0.09	0.09	175.26	169.33	28.42	23.67
UR	1	0.01	0.01	291.64	291.64	17.47	17.47
LL	9831	99.85	98.31	14.55	6.70	2.04	1.68
LR	5	0.05	0.05	243.72	243.19	13.03	12.91

Histogram Statistics

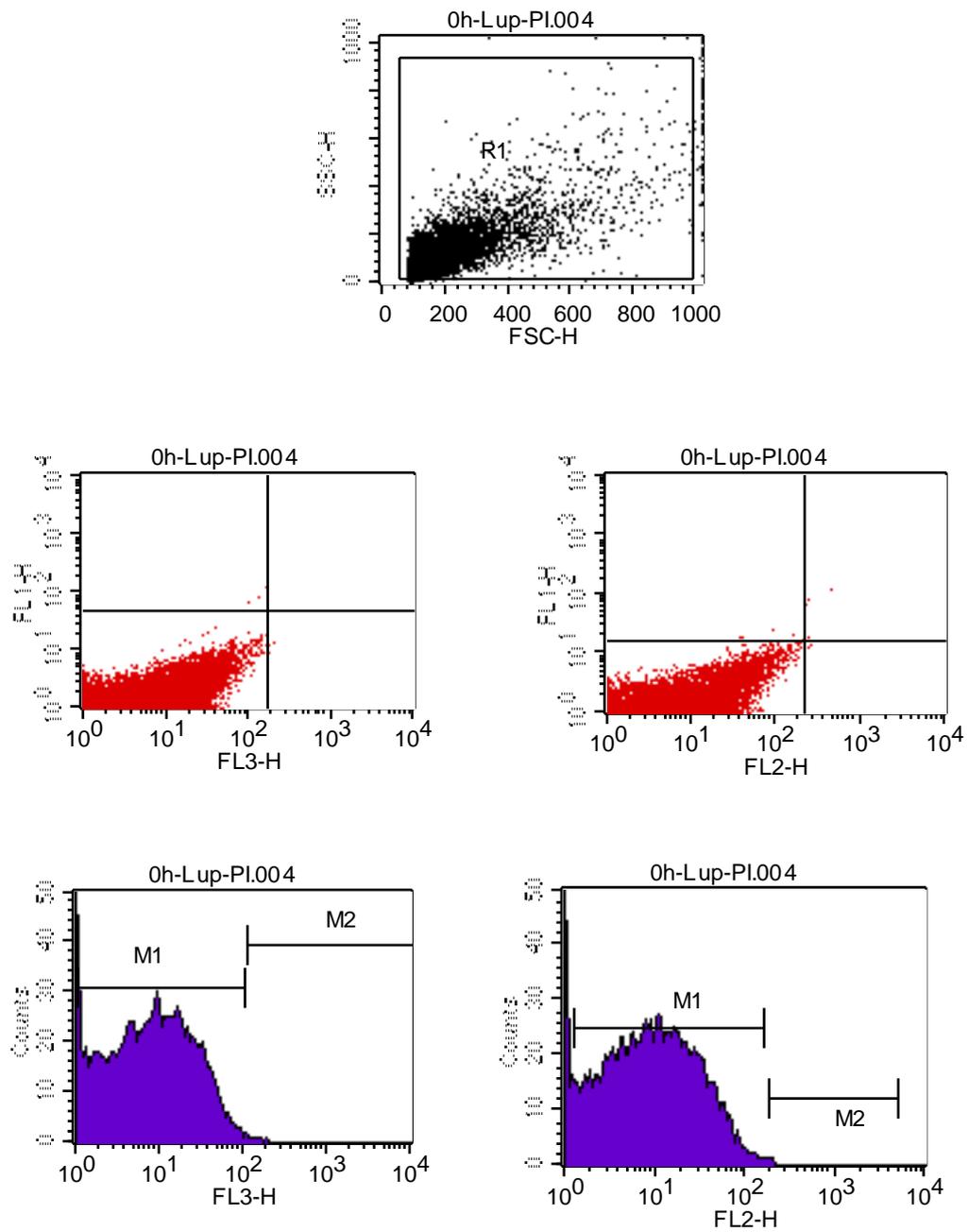
File: 0h-Amp-PI.005 Gate: G1
 Gated Events: 9846 Total Events: 10000
 X Parameter: FL3-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9846	100.00	98.46	12.89	6.24	133.72	6.55	1
M1	1, 100	8507	86.40	85.07	14.13	8.13	109.55	8.51	11
M2	114, 9910	31	0.31	0.31	150.71	147.39	23.18	144.60	127

Histogram Statistics

File: 0h-Amp-PI.005 Gate: G1
 Gated Events: 9846 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9846	100.00	98.46	14.84	6.74	142.81	7.10	1
M1	1, 160	8179	83.07	81.79	17.14	9.75	116.73	9.73	12
M2	191, 5180	15	0.15	0.15	222.19	220.41	13.60	216.74	192



ภาพที่ 4.10 Histogram แสดง Lupinifolin treated cells ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่เวลา 0 h

ตารางที่ 4.3 ค่าแสดงพื้นที่ทางสถิติ ของ Lupinifolin treated cells ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่

เวลา 0 h

Quadrant Statistics

File: 0h-Lup-PI.004 Gate: G1
 Gated Events: 9848 Total Events: 10000
 X Parameter: FL3-H (Log) Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	3	0.03	0.03	131.76	128.64	89.94	87.38
UR	0	0.00	0.00	***	***	***	***
LL	9844	99.96	98.44	12.34	6.06	2.13	1.72
LR	1	0.01	0.01	203.51	203.51	14.07	14.07

Quadrant Statistics

File: 0h-Lup-PI.004 Sample ID: 0h-Lup-PI
 Gate: G1 Gated Events: 9848
 X Parameter: FL2-H (Log) Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	8	0.08	0.08	126.41	103.90	25.06	22.04
UR	3	0.03	0.03	301.23	289.03	73.81	57.25
LL	9835	99.87	98.35	14.23	6.66	2.12	1.72
LR	2	0.02	0.02	251.62	251.41	13.13	13.10

Histogram Statistics

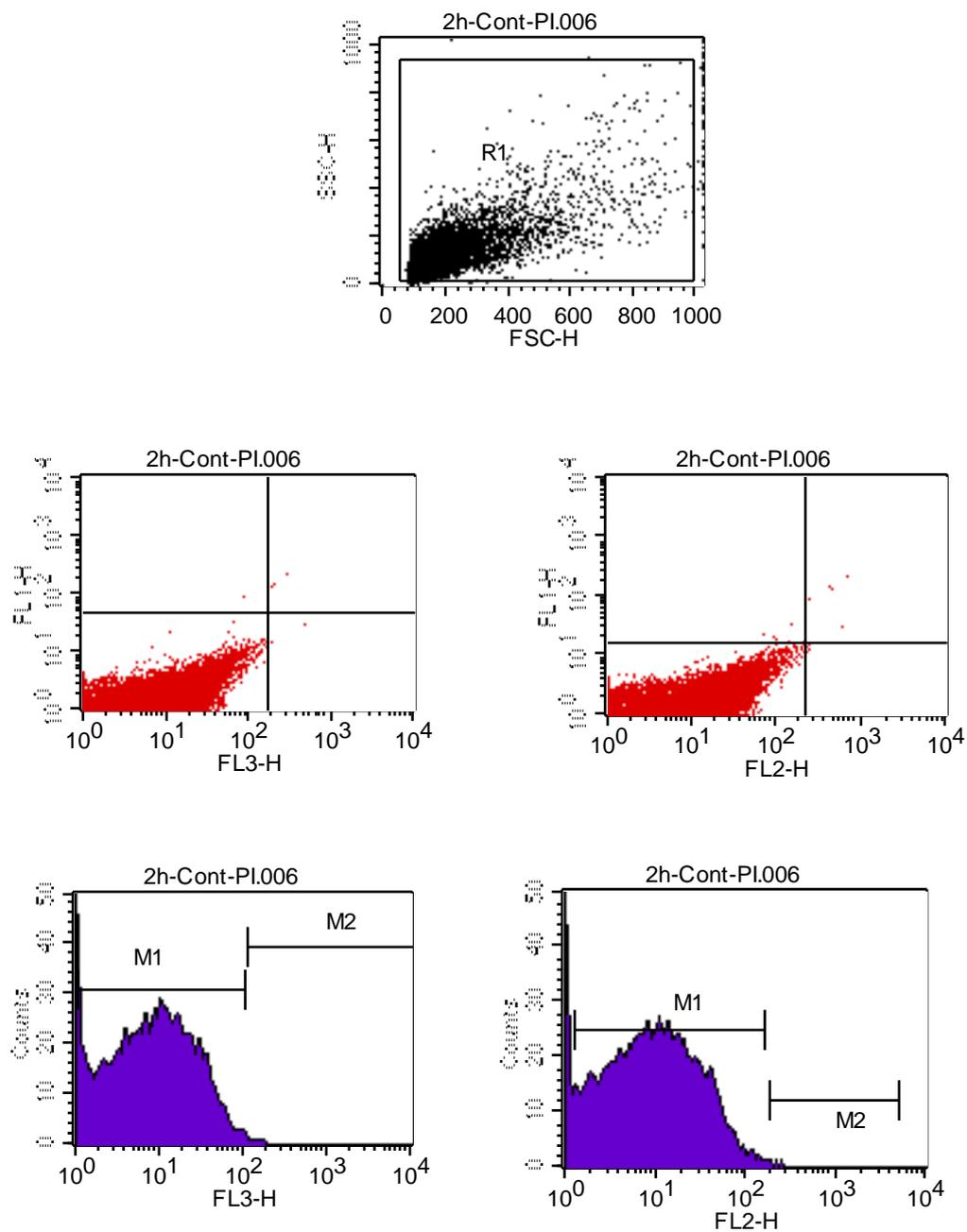
File: 0h-Lup-PI.004 Gate: G1
 Gated Events: 9848 Total Events: 10000
 X Parameter: FL3-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9848	100.00	98.48	12.39	6.07	132.57	6.46	1
M1	1, 100	8472	86.03	84.72	13.63	7.95	109.44	8.28	9
M2	114, 9910	30	0.30	0.30	139.69	138.32	14.89	135.16	130

Histogram Statistics

File: 0h-Lup-PI.004 Gate: G1
 Gated Events: 9848 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9848	100.00	98.48	14.46	6.69	143.24	7.04	1
M1	1, 160	8204	83.31	82.04	16.75	9.63	117.96	9.56	7
M2	191, 5180	7	0.07	0.07	261.03	253.52	29.33	241.44	241



ภาพที่ 4.11 Histogram แสดง Normal control ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่เวลา 2 h

ตารางที่ 4.4 ค่าแสดงพื้นที่ทางสถิติ ของ Normal control cells แบบที่เรีย MRSA ที่เวลา 2 h

Quadrant Statistics

File: 2h-Cont-PI006 Gate: G1
 Gated Events: 9862 Total Events: 10000
 X Parameter: FL3-H (Log) Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	1	0.01	0.01	88.17	88.17	91.40	91.40
UR	3	0.03	0.03	229.98	226.03	165.51	162.53
LL	9856	99.94	98.56	12.37	6.08	2.04	1.67
LR	2	0.02	0.02	325.78	294.27	22.82	21.38

Quadrant Statistics

File: 2h-Cont-PI006 Sample ID: 2h-Cont-PI
 Gate: G1 Gated Events: 9862
 X Parameter: FL2-H (Log) Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	9	0.09	0.09	144.47	134.96	19.82	19.24
UR	5	0.05	0.05	463.34	436.36	123.74	103.85
LL	9844	99.82	98.44	14.18	6.64	2.02	1.66
LR	4	0.04	0.04	227.83	227.73	13.37	13.31

Histogram Statistics

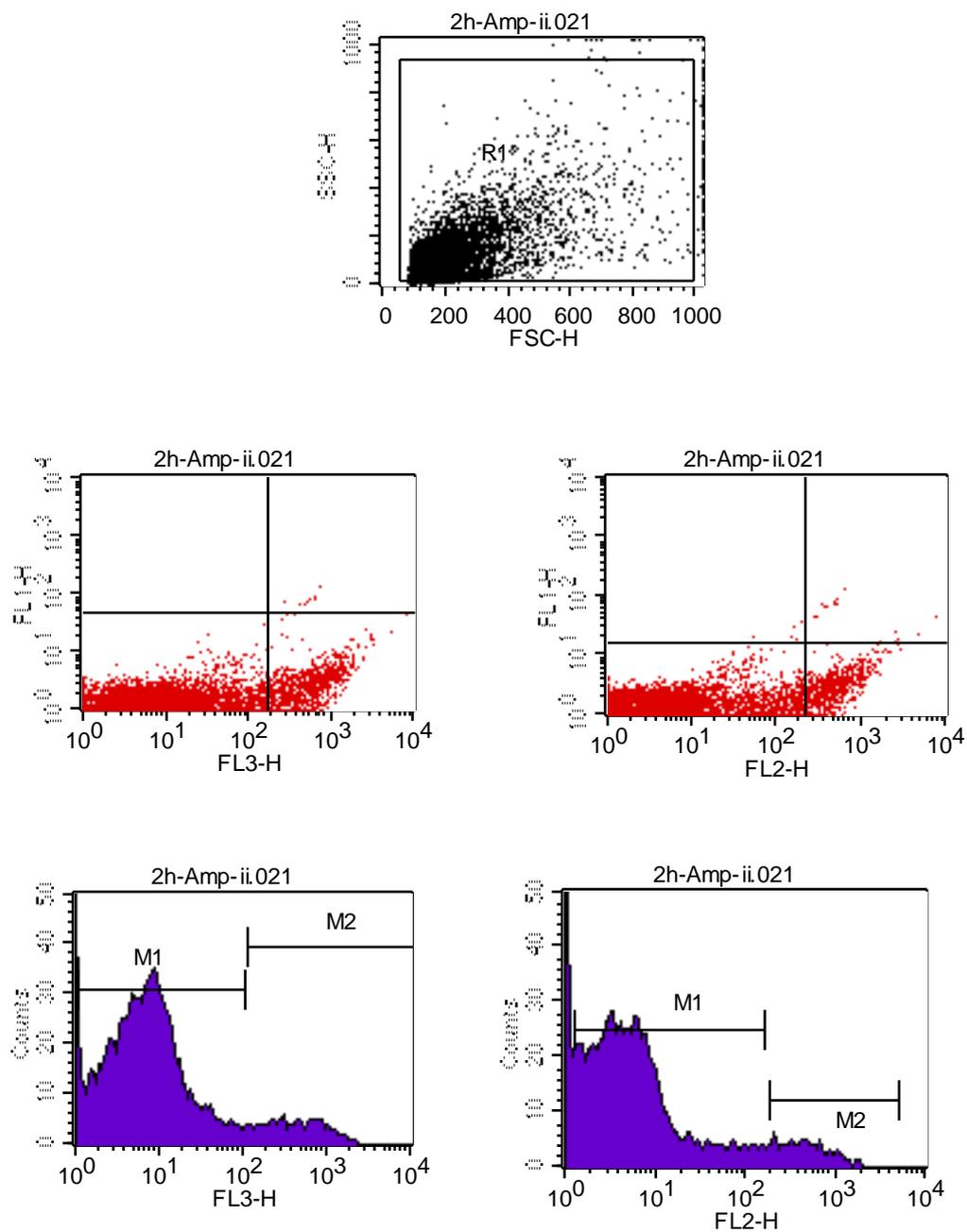
File: 2h-Cont-PI006 Gate: G1
 Gated Events: 9862 Total Events: 10000
 X Parameter: FL3-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9862	100.00	98.62	12.51	6.10	139.18	6.49	1
M1	1, 100	8451	85.69	84.51	13.76	8.06	109.82	8.43	8
M2	114, 9910	37	0.37	0.37	157.25	149.43	42.15	140.75	143

Histogram Statistics

File: 2h-Cont-PI006 Gate: G1
 Gated Events: 9862 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9862	100.00	98.62	14.62	6.68	157.40	7.04	1
M1	1, 160	8238	83.53	82.38	16.61	9.52	118.59	9.56	10
M2	191, 5180	15	0.15	0.15	296.02	269.61	51.18	224.68	194



ภาพที่ 4.12 Histogram แสดง Ampicillin treated cells ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่เวลา 2 h

ตารางที่ 4.5 ค่าแสดงพื้นที่ทางสถิติ ของ Ampicillin treated cells ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่

เวลา 2 h

Quadrant Statistics

File: 2h-Amp-ii.021 Gate: G1
Gated Events: 9686 Total Events: 10000
X Parameter: FL3-H (Log) Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	11	0.11	0.11	1140.98	589.65	73.38	70.01
LL	8805	90.90	88.05	13.48	6.17	1.32	1.22
LR	870	8.98	8.70	631.14	507.00	3.25	2.57

Quadrant Statistics

File: 2h-Amp-ii.021 Sample ID: 2h-Amp-ii
Gate: G1 Gated Events: 9686
X Parameter: FL2-H (Log) Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	5	0.05	0.05	139.32	127.49	25.34	24.36
UR	20	0.21	0.20	1659.93	966.40	48.78	38.42
LL	9053	93.46	90.53	12.18	3.82	1.33	1.23
LR	608	6.28	6.08	543.91	474.58	3.44	2.91

Histogram Statistics

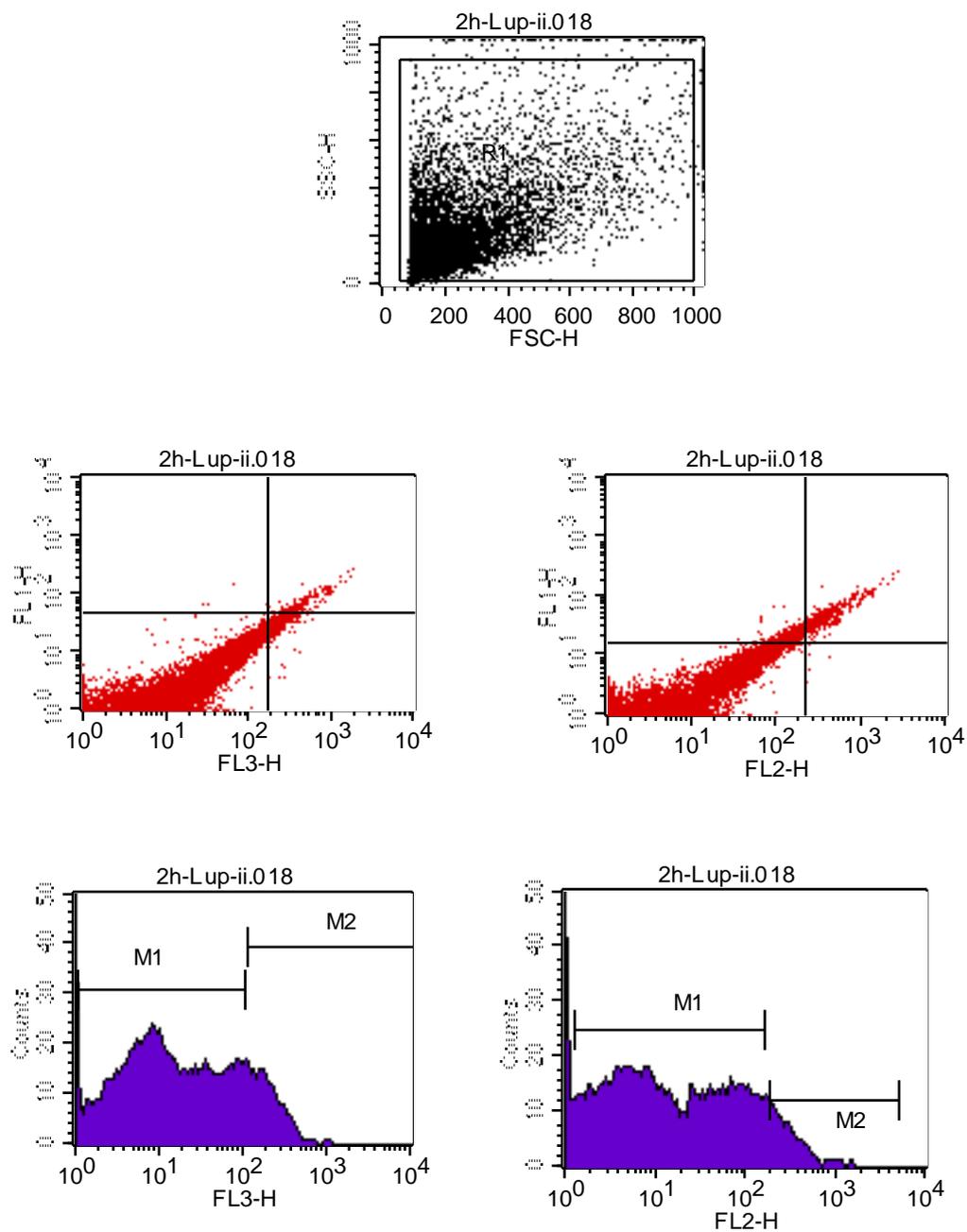
File: 2h-Amp-ii.021 Gate: G1
Gated Events: 9686 Total Events: 10000
X Parameter: FL3-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9686	100.00	96.86	70.24	9.21	344.63	6.98	1
M1	1, 100	7815	80.68	78.15	11.65	6.88	134.51	6.73	8
M2	114, 9910	1048	10.82	10.48	558.95	415.25	93.28	406.79	649

Histogram Statistics

File: 2h-Amp-ii.021 Gate: G1
Gated Events: 9686 Total Events: 10000
X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9686	100.00	96.86	49.03	5.24	389.03	3.49	1
M1	1, 160	6490	67.00	64.90	13.29	5.86	193.82	4.83	3
M2	191, 5180	689	7.11	6.89	534.97	446.63	75.01	421.70	198



ภาพที่ 4.13 Histogram แสดง Lupinifolin treated cells ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่เวลา 2 h

ตารางที่ 4.6 ค่าแสดงพื้นที่ทางสถิติ ของ Lupinifolin treated cells ของเซลล์แบคทีเรีย MRSA ที่

เวลา 2 h

Quadrant Statistics

File: 2h-Lup-ii.018 Gate: G1
 Gated Events: 9523 Total Events: 10000
 X Parameter: FL3-H (Log) Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	6	0.06	0.06	76.04	55.98	72.78	67.12
UR	231	2.43	2.31	440.39	397.18	67.97	63.36
LL	8756	91.95	87.56	32.10	12.92	4.90	2.65
LR	530	5.57	5.30	232.20	227.36	32.00	30.94

Quadrant Statistics

File: 2h-Lup-ii.018 Sample ID: 2h-Lup-ii
 Gate: G1 Gated Events: 9523
 X Parameter: FL2-H (Log) Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	944	9.91	9.44	146.15	140.97	22.34	21.73
UR	553	5.81	5.53	397.46	350.70	49.46	45.21
LL	8022	84.24	80.22	19.64	7.45	3.43	2.19
LR	4	0.04	0.04	285.35	275.70	10.30	9.69

Histogram Statistics

File: 2h-Lup-ii.018 Gate: G1
 Gated Events: 9523 Total Events: 10000
 X Parameter: FL3-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9523	100.00	95.23	53.17	16.48	179.20	14.20	1
M1	1, 100	7520	78.97	75.20	23.82	12.18	113.20	10.94	7
M2	114, 9910	1409	14.80	14.09	224.93	200.05	66.26	182.69	142

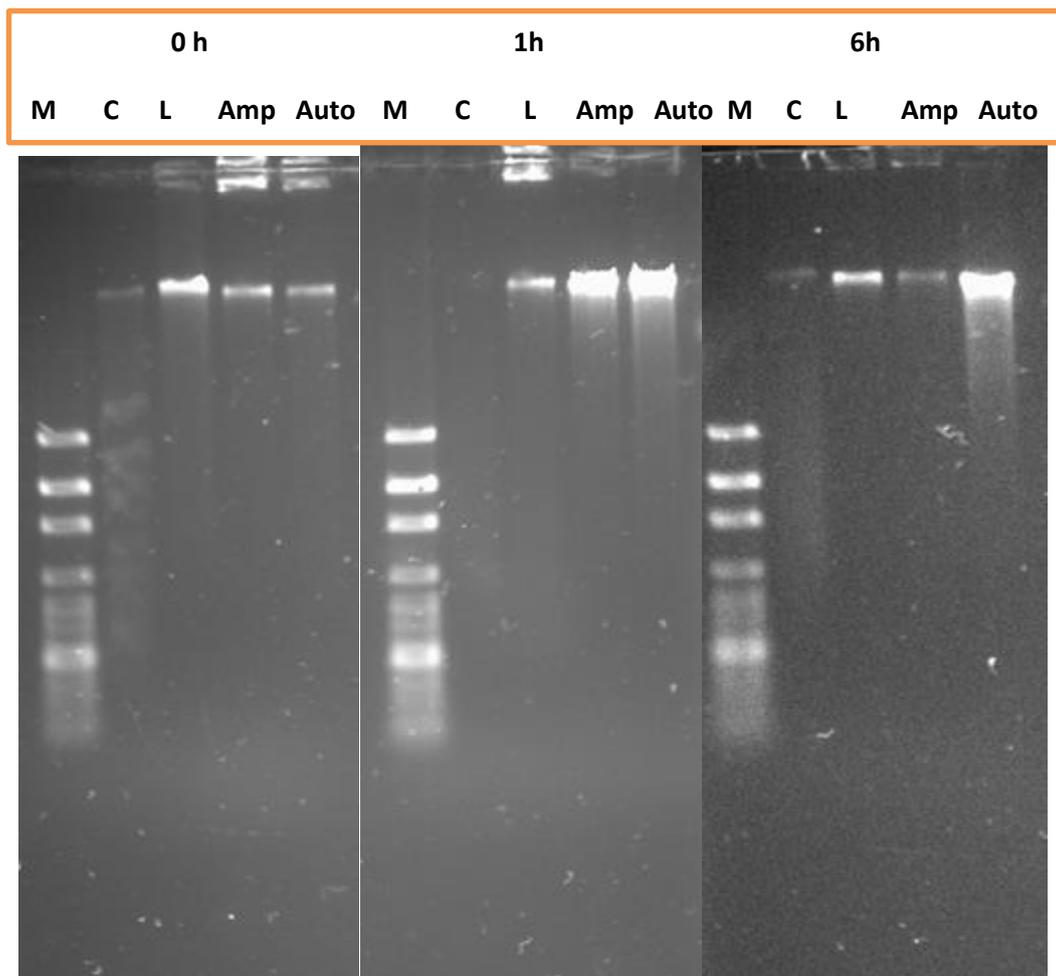
Histogram Statistics

File: 2h-Lup-ii.018 Gate: G1
 Gated Events: 9523 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9523	100.00	95.23	54.23	12.49	217.89	10.00	1
M1	1, 160	7309	76.75	73.09	32.75	13.91	124.37	11.86	6
M2	191, 5180	704	7.39	7.04	356.22	312.38	72.75	278.81	191

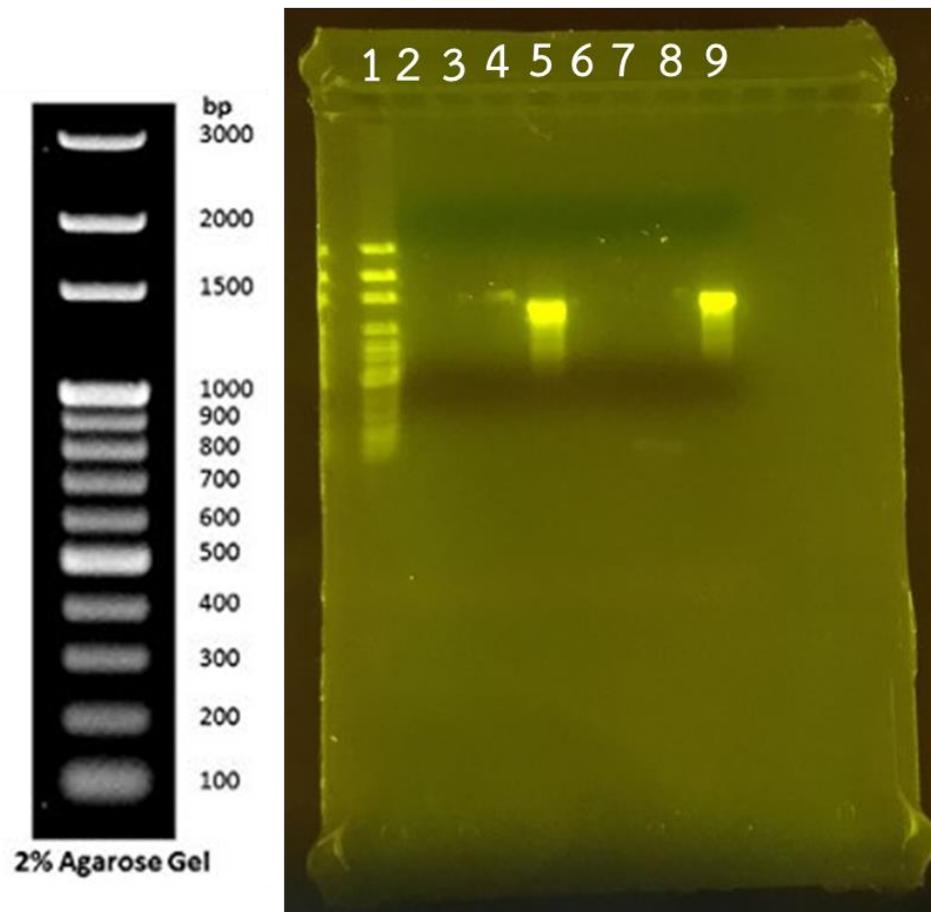
4.5.3 DNA laddering assay

เมื่อทำการศึกษาผลของสารลูปีนฟอลินต่อ DNA ของเชื้อ MRSA พบว่า สารลูปีนฟอลินไม่ได้มีผลต่อ โครงสร้างของ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรีย โดยการเปรียบเทียบกับ Triton-X (positive control) จากการสังเกตลักษณะ band ที่เกิด autolysis ดังภาพที่ 4-13



ภาพที่ 4.14 แสดงลักษณะ band ของ genomic DNA บนแผ่น 0.7% gel electrophoresis ที่เวลา 0, 1 และ 6 h

4.5.4 ผลการแสดงผลของ Drp35 ด้วยวิธี PCR



ภาพที่ 4.15 Gel electrophoresis แสดงการเพิ่มจำนวนจีน *Drp35* โดยเทคนิค Polymerase chain reaction ของเชื้อ *Staphylococcus* สายพันธุ์ (1) 100bp marker (2) DMST20646 (3) DMST20646 บ่มร่วมกับสาร Lupinifolin (4) ATCC29213 (5) ATCC29213 บ่มร่วมกับสาร lupinifolin (6) DMST20649 (7) DMST20649 บ่มร่วมกับสาร lupinifolin (8) DMST4738 (9) DMST4738 บ่มร่วมกับสาร lupinifolin

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผล

การสกัดหาสารลูปินิฟอลิน จากลำต้นชะเอมเหนือ (*D. reticulata* Craib.) พบว่า สารที่สกัดได้มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลือง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารชนิดนี้ สอดคล้องกับการสกัดหาสารลูปินิฟอลินในลำต้นชะเอม *Myriopteron extensum* (Wight) K. Schum. ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี Disc diffusion ซึ่งเป็นการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราชนิด dermatophytes (Soonthornchareonnon et al., 2004) เมื่อตรวจสอบพิสูจน์เอกลักษณ์ความถูกต้องของสารลูปินิฟอลิน ด้วยวิธี TLC, NMR และ Mass spectrometry แสดงว่า สารที่สกัดได้เป็นสารลูปินิฟอลิน (Mahidol et al, 1997)

ในการศึกษาที่ผ่านมา สารลูปินิฟอลิน จัดเป็นสารประเภทฟลาโวนอยด์ จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนิน ซึ่งพบมากในพืชสมุนไพร และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ด้วยวิธี Minimal inhibitory concentration (MIC) และ Minimal bactericidal concentration (MBC) นอกจากนี้ยังทำการตรวจหาบริเวณเป้าหมายของเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับผลกระทบจากสารลูปินิฟอลินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ผลการวิจัย พบว่า สารลูปินิฟอลินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยทำให้เกิด inhibition zones บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB เมื่อเปรียบเทียบกับยา Ampicillin มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งเหมือนกับการศึกษาฤทธิ์ของลูปินิฟอลินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจาก *Eriosema chinense* (Prasad et al., 2013) และสารสกัดจาก *Myriopteron extensum* (Wight) K. Schum. ซึ่งเป็นการศึกษาจากสารสกัดสมุนไพรแบบหยาบ ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA ด้วยวิธี microdilution method ได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดลูปินิฟอลินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) เท่ากับ 32 และ 64 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบว่า เชื้อ MRSA ทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นเชื้อดื้อยา Methicillin โดยดูจากค่า MIC พบว่า มีค่า มากกว่า 512 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย สามารถทำได้หลายวิธี ในการศึกษาเนื่องจากมีข้อมูลเบื้องต้นหลายงานวิจัยที่ผ่านมา เคยรายงานว่า สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่มีกลไกการออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และ กรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ (Cushnie and Lamb, 2005) ดังนั้น ผู้วิจัย จึงใช้การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) เพื่อศึกษาโครงสร้างจากภาพถ่าย พบว่า เซลล์แบคทีเรีย ที่เติมสารสกัดcupinifolin มีลักษณะบวม และสังเกตเห็นการถูกทำลายบริเวณ cytoplasmic membrane เมื่อเทียบกับเซลล์แบคทีเรียในกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 4.5-4.7 นอกจากนี้เพื่อเป็นการยืนยันสมมติฐานดังกล่าว จึงใช้วิธี Flow cytometry เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองทางกายภาพของแบคทีเรีย เทคนิคนี้เป็นการประยุกต์ใช้เพื่อบอกลักษณะความแตกต่างทางกายภาพของแบคทีเรีย รวมทั้งการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ พิษอนุมูลไพร ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อก่อโรคและคน การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ระหว่างการสร้าง Biofilm และกลไกที่เกี่ยวกับกระบวนการพัฒนาการต่างๆ การตรวจสอบและการแบ่งแยกเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีชีวิตกับเซลล์ที่ไม่มีชีวิต ถูกทดสอบโดยการย้อมสี fluorescent เช่น สี Propidium iodide หรือการใช้ fluorogenic substrate ร่วมกับการตรวจด้วยวิธี Flow cytometry การวิเคราะห์ด้วยวิธี multi-color flow cytometry สามารถใช้แยกความแตกต่างการมีชีวิตของเซลล์ได้ Dye retention และ Dye exclusion ได้ถูกใช้ในการตรวจสอบความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ในสถานะที่ไม่มี metabolic activity (Gottfredsson et al., 1998; Nebe-von-Caron et al., 2000; Novo et al., 1999) การเพิ่มจำนวนเซลล์และ metabolic activity ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของ cytoplasmic membrane เซลล์ที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ถูกสันนิษฐานว่ามีความสามารถในการ metabolic activity หรือการซ่อมแซมและสามารถสร้างขยายพลังงานชั่วคราวให้มีความสมดุล เซลล์ที่ไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ไม่สามารถรักษาหรือสร้างเยื่อหุ้มที่สมบูรณ์ได้ ดังนั้นจะถือว่าเป็นเซลล์ตาย ในการศึกษาที่ผ่านมา แบคทีเรียได้ถูกตรวจวิเคราะห์ว่าไม่เจริญเติบโตหรือตายเนื่องจากลักษณะดังกล่าวนี้ (Ambriz-Avina et al., 2014) จากการศึกษาพบว่า สารต้านแบคทีเรียมีฤทธิ์ต่อการรบกวนการสร้างความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสามารถตรวจสอบด้วยวิธี Flow cytometry ดังนั้น วิธี Flow cytometry จึงมีความรวดเร็ว ถูกต้อง และสามารถทำการทดลองซ้ำได้หลายครั้ง

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ เมื่อใช้สี Propidium iodide (PI) เป็นตัวทดสอบความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ต่อเชื้อ MRSA พบว่า เมื่อเติมสารลูปีนิฟอลินลงไป 2 ชั่วโมง สังเกตเห็นปริมาณสีที่แสดงออกมามีปริมาณสูงขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่า การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวนหรือทำลายโดยสารลูปีนิฟอลิน (Tyagi et al., 2015) แต่อย่างไรก็ตาม การทำงานของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ มีความเกี่ยวข้องกัน ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน Drp35 ร่วมด้วย ซึ่งยีน Drp 35 นี้ เป็นยีนที่จะสังเกตเห็นในปริมาณที่สูงเมื่อผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียถูกทำลาย (Morikawa et al., 2005; Murakami et al., 1999) ด้วยวิธี PCR พบว่า ไม่มีการแสดงออกยีน Drp35 ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNA laddering assays เพื่อดูการเกิด Autolysis ที่เป็นคุณลักษณะอย่างหนึ่งที่จะสังเกตเห็นได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์แบคทีเรีย (Rahbar Saadat et al., 2015) ดังนั้น กลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญ ของสารลูปีนิฟอลินต่อเชื้อ MRSA น่าจะเป็นการยับยั้งกระบวนการสร้างหรือการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย จากผลวิจัยดังกล่าวสามารถพัฒนาสารลูปีนิฟอลินไปทดลองในสัตว์ทดลองเพื่อหาค่า bioavailability ในทางเภสัชวิทยา ก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตยาต้านเชื้อ MRSA ต่อไปในการวิจัยระยะต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาระยะต่อไป ควรมีการศึกษาด้วยวิธีทาง อณูชีวภาพและการแสดงออกของยีน เพื่อพัฒนาในการคิดค้นยาต้านเชื้อชนิดใหม่ต่อไป

บรรณานุกรม

- พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์ และ อรุณลักษณ์ ลุติตานนท์. **แบคทีเรียวิทยาคลินิก. ภาควิชาจุลชีววิทยา
คลินิก, คณะเทคนิคการแพทย์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2547.**
- สมिता วิเศษสุทธิชัย และคณะ. **การพัฒนาเจลสารสกัดชะเอมเหนือเป็นยาต้านริมน.วารสารสมุนไพร
12, 2548.**
- สำนักโรคติดต่อทั่วไป. **กรมควบคุมโรค, กระทรวงสาธารณสุข, 2557.**
- วุฒิ วุฒิธรรมเวช. **หนังสือ 20ปี สวนสมุนไพร, สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ เกรียงไกร อุทยาน
ธรรมชาติวิทยาสิรินธรราชชาติ, มหาวิทยาลัยมหิดล, 2560.**
- Ambriz-Avina, V., J.A. Contreras-Garduno, and M. Pedraza-Reyes. 2014. Applications of flow
cytometry to characterize bacterial physiological responses. *BioMed research
international* 2014:461941.
- 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, 2016.
- Cushnie, T.P., and Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of
Antimicrobial Agents.** 26, 2005.
- Gottfredsson, M., H. Erlendsdottir, A. Sigfusson, and S. Gudmundsson. 1998. Characteristics and
dynamics of bacterial populations during postantibiotic effect determined by flow
cytometry. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42:1005-1011.
- Ghosh, S., et al. Unveiling the mode of action of antibacterial labdane diterpenes from *Alpinia
nigra* (Gaertn.) B. L. Burt 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)**.
- Morikawa, K., T. Hidaka, H. Murakami, H. Hayashi, and T. Ohta. 2005. Staphylococcal Drp35 is the functional counterpart of the eukaryotic PONs. *FEMS microbiology letters* 249:185-190.
- Murakami, H., H. Matsumaru, M. Kanamori, H. Hayashi, and T. Ohta. 1999. Cell Wall-Affecting Antibiotics Induce Expression of a Novel Gene, drp35, in *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264:348-351.
- Mahidol, C. et al. Prenylated flavanones from *Derris reticulata*. **Phytochemistry**. 45:825-829, 1997.
- Nebe-von-Caron, G., P.J. Stephens, C.J. Hewitt, J.R. Powell, and R.A. Badley. 2000. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of microbiological methods* 42:97-114.
- Novo, D., N.G. Perlmutter, R.H. Hunt, and H.M. Shapiro. 1999. Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a ratiometric technique. *Cytometry* 35:55-63.
- Rahbar Saadat, Y., N. Saeidi, S. Zununi Vahed, A. Barzegari, and J. Barar. 2015. An update to DNA ladder assay for apoptosis detection. *BioImpacts : BI* 5:25-28.
- Soonthornchareonnon, N., Ubonopas, L., Kaewsuwan, S., and Wuttiudomlert, M. (2004). Lupinifolin, a bioactive flavanone from *Myriopteron extensum* (Wight) K. Schum. stem. **Thai Journal of Phytopharmacy**. 11: 19-27.
- Tangpu, V. and A. K. Yadav (2004). "Antidiarrhoeal activity of *Rhus javanica* ripen fruit extract in albino mice." **Fitoterapia** 75(1): 39-44.
- Tyagi, P., M. Singh, H. Kumari, A. Kumari, and K. Mukhopadhyay. 2015. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PloS one* 10:e0121313.

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

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
ศ.ม. (สาธารณสุขศาสตร์)
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
วท.ค. (ชีวเวชศาสตร์)
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
การตรวจทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์
เภสัชวิทยา
จุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล นางเพชรธา เป้ณวงษา
Mrs. Phethaya Panwongsa
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3189900088208
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ.เมือง จ. เพชรบูรณ์ 76000
โทรศัพท์ 056-717122, 081-7527969
E-mail pet_ya@hotmail.com
6. ประวัติการศึกษา
ปริญญาตรี ประกาศนียบัตรการพยาบาลและการผดุงครรภ์ (พยาบาล
เทคนิค)
วิทยาลัยพยาบาลชั้นนาท 2558
ปริญญาตรี พย.บ.(พยาบาลศาสตร์) สาขาพยาบาลศาสตร์
มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช 2537
ปริญญาโท พย.ม. สาขาการพยาบาลชุมชน มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2545
7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
การพยาบาลชุมชน

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อุปกรณ์

1. Hot air Oven
2. Soxhlet extractor
3. แผ่น Silica gel G₆₀F₂₅₄ อะลูมิเนียม
4. ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
5. แผ่นกระดาษกรอง What man No.1
6. 96 well plate
7. งานเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
8. หลอดทดลอง
9. ถังจุ่มความร้อนอิเล็กตรอน
10. ปีกเกอร์
11. Flasks

สารเคมี

1. Hexane
2. Dichloromethane
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
18. Agarose gel
19. Ethidium bromide
20. TBE buffer
21. Taq DNA polymerase
22. MgCl
23. TE buffer
24. Drp35 primer
25. RNaseA
26. Sodium citrate
27. NaCl