

บทนำ

การเกิดโรคติดเชื้อในระบบต่างๆ ของร่างกาย มีสาเหตุจากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด จุลินทรีย์บางชนิดอาจมีอยู่ในระบบของร่างกายโดยไม่ก่อโรค แต่เมื่อมีเหตุให้ไปอยู่ในต่างระบบหรือร่างกายมีปัญหาความพร่องในระบบภูมิคุ้มกันขึ้น จุลินทรีย์เหล่านั้นก็ก่อให้เกิดโรคได้ การค้นหายาปฏิชีวนะหรือยาด้านเชื้อเพื่อใช้ในโรคติดเชื้อเหล่านั้นจึงมีความสำคัญ โดยต้องคำนึงถึงชนิดของเชื้อที่ก่อโรคในระบบนั้นๆ และต้องมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้ด้วยการศึกษาค้นคว้าหาตัวยาใหม่ๆ จากแหล่งธรรมชาติ เช่น สมุนไพร มีโอกาสได้ยาหรือสารต้นแบบใหม่ๆ ในการใช้ต้านเชื้อ ชาวพม่ามีการใช้ผลลำพูเป็นยาพอก และชาวอินโดนีเซียพอกลำพูที่บดและผสมกับเกลือแล้วบริเวณบาดแผลหรือแผลฟกช้ำ ซึ่งคาดว่าอาศัยฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องเนื่องกับการยับยั้งเชื้อโรคจากลำพูด้วย การศึกษาในครั้งนี้มุ่งเน้นการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพู ประเมินความแรงของฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อพิจารณานำสารสกัดส่วนที่มีฤทธิ์ในระดับที่น่าสนใจมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์

ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ ปัญหาหนึ่งที่พบเสมอคือการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่มาจากวัตถุดิบที่ใช้ การเตรียมที่ไม่ถูกสุขลักษณะ และสิ่งแวดล้อม รวมทั้งการปนเปื้อนขณะใช้งาน ในกระบวนการจึงมักมีการควบคุมปริมาณเชื้อปนเปื้อนตามข้อกำหนดมาตรฐานที่บังคับใช้ในแต่ละประเทศ แต่วิธีมาตรฐานที่กำหนดไว้อาจไม่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มีสารต้านเชื้ออยู่ในสูตรตำรับ หรือมีความเป็นกรดต่ำหรือความดันออสโมติกที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อในสภาวะการทดสอบที่ใช้ การวิจัยนี้จึงรวมการประเมินวิธีตรวจสอบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ครอบคลุมการพัฒนาผลิตภัณฑ์โดยรวม

บททวนวรรณกรรม

จากการทบทวนวรรณกรรมปรากฏว่ามีการนำลำพูมาศึกษาวิจัยน้อยมาก จากการศึกษาในเบื้องต้นของทีมวิจัยนี้ พบว่าสารสกัดจากผลของลำพูมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ (ธวัชชัย, 2549) ทำให้เป็นที่น่าสนใจว่าน่าจะมีผลต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่มีปัญหาทางการแพทย์หรือเป็นปัญหาต่อสุขภาพเช่นกัน และส่วนอื่นๆ ของลำพูอาจมีฤทธิ์ทำนองเดียวกันในระดับที่น่าจะนำมาใช้ประโยชน์ได้ การพัฒนาสารสกัดจากลำพูมาใช้ประโยชน์ในเชิงผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคหรือฤทธิ์ป้องกันการติดเชื้อ มีความน่าสนใจอย่างมาก เช่นการใช้ร่วมกับฤทธิ์ปกป้องเซลล์และต้านอนุมูลอิสระทำเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันเชื้อโรคและสมานแผลให้หายเร็วขึ้น หรือใช้ในรูปแบบผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อป้องกันและลดรอยสิ่ว เป็นต้น ในการศึกษาในช่วงแรกได้เปรียบเทียบกษมาเชื้อกับสารสกัดจากดอกโศกน้ำ ซึ่งเป็นสารสกัดดอกโศกน้ำที่ต้มด้วยน้ำในสัดส่วนดอกโศกต่อน้ำ 1:4 และต้มเป็นเวลา 30 นาที ก่อนผ่านการ spray drying ที่สภาวะ inlet air temperature 150°C และ outlet air temperature 80°C อัตราการป้อนสาร 1 มล/นาที เนื่องจากคณะผู้วิจัยได้พบสารสกัดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรคเช่นกัน จึงนำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรคร่วมด้วยกับการทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวของสารสกัดจากลำพู

Periodontal disease เป็นสภาวะของโรคที่มีการทำลายของเยื่อหุ้มฟันหรือเกิดจากเยื่อหุ้มฟันอักเสบ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดการทำลายของ Periodontal ligament มีการสูญเสีย alveolar bone ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ช่วยในการค้ำจุนฟัน ทำให้มีร่องฟัน (periodontal pocket) เกิดขึ้น การรักษาจำเป็นต้องยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบริเวณร่องฟันที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค การรักษา Periodontal disease ในปัจจุบันนี้จะใช้วิธีการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะโดยบริหารยาทาง systemic แต่กลับพบว่าการกลับมาเป็นซ้ำของโรคได้เนื่องมาจากความเข้มข้นของยาที่บริเวณ periodontal pocket ไม่เพียงพอในการรักษา และระดับความเข้มข้น

ของยาในเลือดลดลงต่ำกว่าระดับที่ให้ผลการรักษาอย่างรวดเร็ว (sub-therapeutic level) ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อ นอกจากนั้นการบริหารยาทาง systemic ยังส่งผลให้เกิด side effect จากยาอย่างมากด้วย เช่นการเกิด hypersensitivity และ gastrointestinal intolerance ข้อเสียเหล่านี้ทำให้เป็นที่น่าสนใจในการใช้การรักษาแบบเฉพาะที่ (localized therapy) เพื่อทำให้มีระดับความเข้มข้นของยาที่ pocket site เพียงพอต่อการรักษา ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและลด side effect จากยาได้ (Schwach-bdellaoui และคณะ, 2000)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดมีหลายวิธีที่เลือกใช้ได้ (Reynold และ Meikle, 1997) อาจใช้วิธี Agar diffusion method ซึ่งดูผลจากวงกว้างของการยับยั้งเชื้อจากจุดกลางที่มีสารสกัดอยู่ วิธี Dilution method ดูผลการยับยั้งเชื้อของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิธี Bioautographic method ซึ่งมีการแยกสารสกัดด้วย TLC plates แล้ววาดทับด้วยเชื้อทดสอบเพื่อดูผลการยับยั้งเชื้อที่ตำแหน่งต่างๆ ของสารสกัดที่แยกได้ สองวิธีแรกเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น ส่วนวิธีหลังมักใช้เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกวิธีแยกสารสกัดที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อโดยพิจารณาจากความสัมพันธ์ของ inhibition spot กับ solvent system ที่ใช้ แต่มีข้อจำกัดใน Bioautographic method เนื่องจากจุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ต้องสามารถเจริญได้ดีในสภาวะทดสอบที่ใช้ จึงไม่เหมาะในการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญยากหรือมี generation time สูง ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือในการอ่านผลโดยตรงเพื่อลดความคลาดเคลื่อนของการอ่านผลโดยผู้ทดลอง เช่นการใช้ microtiter plate-based assay method โดยใช้เครื่องวัดความขุ่นในการเจริญของเชื้อที่เวลาเหมาะสม แทนการอ่านผลแบบ all-or-none ที่เคยใช้ดั้งเดิม (Lorian, 1991)

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ ควรเลือกให้เป็นตัวแทนของกลุ่มที่สนใจ โดยมีสายพันธุ์มาตรฐาน (เช่นมีหมายเลข ATCC) อยู่ด้วย สายพันธุ์ที่นิยมใช้เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 หากมีการใช้สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยก็ควรทดสอบแบบแผนการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะของเชื่อนั้นๆ ก่อนใช้ เพื่อเป็นประโยชน์ในการเลือกใช้ให้เหมาะสมและวิเคราะห์ผลได้ถูกต้อง การทดสอบควรมีเชื้อที่มีการเจริญที่ให้ลักษณะ biofilm อยู่ด้วย เช่น *Staphylococcus aureus* เนื่องจากการเกิด biofilm เป็นปัจจัยหนึ่งที่เชื้อตอบสนองต่อยาต้านเชื้อและเกิดการดื้อยา เชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารในการต้านเชื้อราในการทดลองนี้คือ *Candida albicans* (Lorian, 1991; Reynold และ Meikle, 1997; Csey และคณะ, 2004)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ ควรเลือกชนิดที่ไม่รบกวนการออกฤทธิ์ของสารสกัด และสามารถให้เชื้อทดสอบเจริญได้ด้วย อาหารที่นิยมใช้สำหรับแบคทีเรียได้แก่ Mueller-Hinton (MH) medium และ Tryptic soy medium ส่วนการทดสอบกับเชื้อรานิยมใช้ Sabouraud dextrose medium โดยอาจอยู่ในรูปอาหารเหลว (broth) หรืออาหารแข็ง (agar) ขึ้นอยู่กับวิธีการทดสอบที่ใช้ (Lorian, 1991; Reynold และ Meikle, 1997; Csey และคณะ, 2004)

ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ ปัญหาหนึ่งที่พบเสมอคือการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่มาจากวัตถุดิบที่ใช้ การเตรียมที่ไม่ถูกสุขลักษณะ และสิ่งแวดล้อม รวมทั้งการปนเปื้อนขณะใช้งาน วัตถุดิบที่เป็นผงแห้งได้จากการสังเคราะห์จะมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนในปริมาณน้อยและส่วนใหญ่เป็นพวก aerobes ในรูปสปอร์ ส่วนวัตถุดิบที่ได้จากธรรมชาติจะมีปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนปริมาณมากและส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่สร้างสปอร์และราเส้นใย (moulds) บางครั้งอาจมีโคลิฟอร์มและแบคทีเรียแกรมลบด้วย สารต่างๆ เช่น gums, dispersing agents, sugars และ flavors สามารถเป็นตัวกลางนำจุลินทรีย์ไปปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ได้ น้ำและสารละลายที่ไม่ใช้สารกันบูด หากเตรียมไม่เหมาะสมและเก็บไม่ถูกต้อง จะเป็นแหล่งสำคัญของจุลินทรีย์ แบคทีเรียแกรมลบที่พบในน้ำกลั่นได้แก่

Acinetobacter, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* และ *Pseudomonas* จุลินทรีย์ที่ปกติพบในลำไส้ เช่น *E. coli* และ *Salmonella* แม้ต้องการ host ในการเจริญเติบโตก็ยังสามารถอยู่ในน้ำเสียได้ระยะหนึ่ง จุลินทรีย์ที่พบบ่อยในน้ำได้แก่ *Pseudomonas* spp. ซึ่งแม้ถูกทำลายได้ที่ 60°C 5 นาที แต่ crude enzyme ของจุลินทรีย์ก็ยังทำงานได้แม้ผ่านการต้มที่ 80°C 10 นาที นอกจากนั้น การปนเปื้อนจุลินทรีย์จากผู้ปฏิบัติงาน เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องระวังเช่นกัน ในสภาพการเคลื่อนไหวกิจจะมีส่วนของผิวหนังหลุดออกมา 10⁴ เซลล์ต่อนาที ซึ่งส่วนใหญ่จะมี skin flora ติดมาด้วย จุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่เป็น micrococci ที่ไม่ทำให้เกิดโรค diphtheroids และ staphylococci บางครั้งอาจเจอ *Staphylococcus aureus* ด้วย ถ้าสุขอนามัยไม่ดีก็อาจเจอเชื้ออื่น เช่น *E. coli* และ *Salmonella* การเปิดตัวอย่างช้า อาจมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้ ส่วนใหญ่มาจากผู้ขาย และบางส่วนเกิดจากการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในยาเตรียม ผลของจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ ทำให้เกิดการบูดเสียของผลิตภัณฑ์ และทำให้เกิดโรคจากจุลินทรีย์นั้น การเตรียมผลิตภัณฑ์มักมีการนำสารกันบูดหรือวัตถุกันเสียมาใช้เพื่อลดปัญหาการบูดเสียของผลิตภัณฑ์ แต่เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดก็ยังสามารถทำลายสารกันบูดได้ เช่น เชื้อกลุ่ม pseudomonads และพบว่า *Acinetobacter*, *Moxarella* และ *Nocardia* ก็สามารถใช้สารประกอบพวก chlorhexidine, cetrimide, phenolics, phenylethyl alcohol, benzoic acid, benzalkonium chloride และ p-hydroxybenzoate ได้เช่นกัน ดังนั้น จากปัญหาเรื่องจุลินทรีย์ปนเปื้อนเหล่านี้ ในกระบวนการผลิตจึงมักมีการควบคุมปริมาณเชื้อปนเปื้อนตามข้อกำหนดมาตรฐานที่บังคับใช้ในแต่ละประเทศ แต่วิธีการทดสอบอาจมีผลรบกวนจากฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของตัวอย่าง หากเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในรูปสปอร์ก็จะไม่สามารถให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องได้ (Pul และคณะ, 2006) การวิจัยนี้จึงรวมการพัฒนาและประเมินวิธีตรวจสอบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในสารสกัดไว้ด้วย (Collins และคณะ, 1989; Denyer และ Baird, 1990; Bloomfield และคณะ, 1998)

คำสำคัญ:

(ภาษาไทย) ลำพู, การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

(ภาษาอังกฤษ) *Sonneratia caseolaris*, antimicrobial activity

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

1. Gallic acid (Sigma-Aldrich Chemic GmbH เมือง Buchs ประเทศ Spain)
2. N-methyl pyrrolidone (NMP) (Solubilizer N) (Sigma-Aldrich Chemic GmbH ประเทศ Switzerland)
3. สารละลาย Ethanol (Merck KGa A เมือง Darmstadt ประเทศ Germany)
4. SDA (Difcotm Sabouraud Dextrose Agar: Becton, Dickenson and Company Sparks)
5. SDB (Difcotm Sabouraud Dextrose Broth: Becton, Dickenson and Company Sparks)
6. TSA (Difcotm Tryptic Soy Agar(Soybean-casein Digest Agar): Becton, Dickenson and Company, Sparks, MD, USA)
7. TSB (Difcotm Tryptic Soy Broth(Soybean-casein Digest Agar): Becton, Dickenson and Company, Sparks, MD, USA)
8. ยา ampicillin disc 10 µg (OXOID – Antimicrobial Susceptibility test discs, Oxoid Limited เมือง Hampshire ประเทศ England)
9. ยา ceftazidime disc 10 µg (OXOID – Antimicrobial Susceptibility test discs, Oxoid Limited เมือง Hampshire ประเทศ England)
10. สารสกัดดอกโศกน้ำที่ต้มด้วยน้ำในสัดส่วนดอกโศกต่อน้ำ 1:4 และต้มเป็นเวลา 30 นาทีก่อนผ่านการ spray drying ที่สภาวะ inlet air temperature 150^oซ และ outlet air temperature 80^oซ อัตราการป้อนสาร 1 มล/นาที
11. สารสกัดจากลำพูชนิดต่างๆ
12. Sterile phosphate buffer pH 7.2
13. Tetrathionate broth/ selenite F broth (for *Salmonella*)
14. MacConkey/EMB agar (for *E. coli*)
15. Mannitol salt/ VJ agar (for *S. aureus*)
16. Cetrimide agar/ Pseudomonas agar P & F (for *P. aeruginosa*)
17. XLD agar (for *Salmonella*)
18. MYP agar (for *Bacillus* หรือ *Clostridium*)
19. Cooked meat medium (& hard paraffin) (for *Clostridium*)

เครื่องมือที่ใช้

1. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C ยี่ห้อ Sanden intercool
2. ตู้อบ Climatic chamber รุ่น KBF 240 บริษัท Binder GmbH Bergsh
3. เครื่อง Vortex-2 ของบริษัท Scientific industries,inc เมือง New York ประเทศ USA
4. Autoclave (REXALL-LS-ZD: Rexall industries co; Ltd, Kaohsiung ประเทศไต้หวัน)

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

การทดสอบหาการปนเปื้อนเชื้อโรคของสารสกัด

วิธีการ

1. ชั่งสารสกัดตัวอย่าง มา 10 กรัม เพื่อเจือจางในสัดส่วน 1:10, 1:100, 1:1000 ด้วยสารละลาย Sterile phosphate buffer pH 7.2
2. นำสารละลายที่เจือจาง มาตรวจหาจุลินทรีย์โดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

2.1 Pour plate method

- ปิเปิดตัวอย่างแต่ละสารละลายเจือจางนั้น 1 มล ใส่ในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำกับสารเจือจางจำนวน 2 จาน และทำกลุ่มควบคุมโดยใช้ สารละลาย Sterile phosphate buffer pH 7.2 จานละ 1 มล จำนวน 2 จาน
- ใช้ SDA ที่หลอมเหลวแล้วและอุ่นอยู่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 45°C มาเทลงจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างที่ปิเปิดใส่ไว้ ปิดฝาจานแล้วหมุน เพื่อผสมตัวอย่างและอาหารให้เข้ากัน
- ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวแล้วจึงนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4-6 วัน
- นับจำนวนโคโลนีและบันทึกลักษณะโคโลนีเดี่ยวแต่ละชนิด
- คำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ในสารตั้งต้น โดยระบุอาหารเลี้ยงที่ใช้

2.2 Spread plate method

- ใช้สารละลายเจือจาง 0.1 มล หยดบนผิวหน้า TSA โดยทำกับสารเจือจางจำนวน 2 จาน และทำกลุ่มควบคุมโดยใช้ สารละลาย Sterile phosphate buffer pH 7.2 จานละ 1 มล จำนวน 2 จาน
- ใช้ loop หรือแท่งแก้วรูปตัว L ช่วยเกลี่ยให้สารละลายกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร
- นำไปบ่มเลี้ยงที่ 32-35°C เป็นเวลา 48 ชม.
- นับจำนวนโคโลนีในแต่ละจานอาหาร บันทึกผลทุกความเข้มข้น
- คำนวณหาปริมาณเชื้อในสารสกัดตั้งต้น

2.3 Most probable number estimate

- ปิเปิดแต่ละสารละลายใส่ในหลอดที่มี TSB อยู่ 9 มล. โดยใส่สารละลายละ 3 หลอดๆ ละ 1 มล. และทำหลอดควบคุมจำนวน 3 หลอด
- นำไปบ่มเลี้ยงที่ 32-35°C เป็นเวลา 48 ชม.
- บันทึกจำนวนหลอด TSB ที่ขึ้นในแต่ละสารละลายที่เจือจางมา และลักษณะการขึ้นของแต่ละหลอด และหาค่า Most Probable Number (MPN) โดยเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงของการทดสอบแบบ Multiple Tube Method

การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์อันตรายในสารสกัด

วิธีการ

A. การตรวจหา *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*

- ชั่งตัวอย่างสารสกัด 10 กรัม เพื่อทำการเจือจางในสัดส่วน 1:10 โดยใช้ Sterile phosphate buffer pH 7.2
- ปิเปตมา 10 มล ใส่ใน TSB 100 มล นำเข้าบ่มที่ 32-35°C เป็นเวลา 24 ชม.
- เขี่ยมาจำนวน 1 loop เพื่อใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะสำหรับเชื้อแต่ละชนิด โดยให้ได้โคโลนีที่แยกกันในอาหารเหล่านั้น เพื่อให้อ่านผลได้ถูกต้อง นำเข้าบ่มที่ 32-35°C เป็นเวลา 24 ชม.
- อ่านผลการทดสอบ บันทึกและแปลผล

B. การตรวจหา *Salmonella*, *Bacillus anthracis*

- ชั่ง ดย สารสกัด 10 กรัม ใส่ใน TSB 100 มล. นำเข้าบ่มที่ 32-35°C เป็นเวลา 12-18 ชม.
- แล้วนำมา 50 ไมโครลิตร เพื่อเติมลงใน tetrathionate broth และ/หรือ selenite F broth นำเข้าบ่มที่ 32-35°C เป็นเวลา 18-24 ชม.
- จาก TSB ให้นำมาแยกเชื้อใน MYP agar medium นำเข้าบ่มที่ 32-35°C เป็นเวลา 18-24 ชม.
- อ่านผลการทดสอบ ย้อมแกรม บันทึกผล

C. การตรวจหา *Clostridium*

- ชั่ง ดย สารสกัด 10 กรัม ใส่ใน Cooked meat medium 100 มล. โดยทำ 2 ซ้ำ
- นำชุดหนึ่งมาต้ม 80°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นโดยเร็ว
- ปิดทับอาหารทั้งสองหลอดด้วยพาราฟิน แล้วนำเข้าบ่มที่ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชม.
- ดูผล หากไม่เห็นผลการเปลี่ยนแปลงในอาหาร ให้บ่มต่อจนถึง 4 วัน โดยดูผลซ้ำทุกวัน
- บันทึกการเกิดกาซ และผลการย้อมแกรม และบันทึกผลการทดสอบ

ผลการทดสอบหาการปนเปื้อนเชื้อโรคในสารสกัดชนิดต่าง ๆ

พบว่าสารสกัดที่ใช้ในการทดลองนี้ เมื่อนำมาทดสอบหาการปนเปื้อนเชื้อโรค มีการตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนทั้งหมด 300 cfu/g โดยมีเชื้อราและยีสต์ปนเปื้อน <10 cfu/g และไม่พบเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ได้แก่ *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. ในปริมาณตัวอย่าง 10 กรัม

การเปรียบเทียบเทคนิคการทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี agar diffusion

รายละเอียดเกี่ยวกับตัวอย่างที่ใช้ทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureas*, *E. coli* และ *C. albicans* ด้วยวิธี agar diffusion แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

ตัวอย่าง	น้ำหนักที่ชั่งจริง(g)		ตัวทำละลาย	เชื้อทดสอบ	วิธีการลงเชื้อ
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2			
สารสกัดดอก โศกสดที่ผ่าน การ spray dry	0.1009	0.1004	DMSO	- <i>S. aureas</i> - <i>E. coli</i> - <i>C. albicans</i> (เทียบ Macfaland)	-spread plate -swab test -over lare
สารสกัดจาก เมล็ดลำพูที่ได้ จากการผ่าน soxhlet โดย ใช้ MeOH	0.1005	0.1008			
Gallic acid	0.1005	0.1006			
Amp	แผ่นยาสำเร็จรูป				
caz					

1. ขั้นตอนการเตรียมสารทดสอบ

1. การเตรียม 0.2% DMSO ในน้ำ (เตรียมปริมาตร 100 ml)

น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 100 ml + DMSO 200 ul

2. การเตรียมสารสกัดความเข้มข้น 1 % w/v (เตรียมปริมาตร 10 ml)

-เตรียมชุดที่ 1

ชั่งสารสกัดหนักประมาณ 0.1000 g + 0.2 % DMSO ในน้ำ 10 ml



Sonicate นาน 45 นาที

-เตรียมชุดที่ 2

ชั่งสารสกัดหนักประมาณ 0.1000 g + DMSO 20 ul + น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ml



Sonicate นาน 30 นาที



เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 8 ml



Sonicate นาน 20 นาที

3. การเตรียมน้ำเกลือ 0.9 %

ชั่ง NaCl หนัก 0.9 กรัม + น้ำกลั่น 100 ml



นำไป autoclave

4. การเตรียมเชื้อทดสอบ

4.1 นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาทำให้เกิด isolate colony จะใช้วิธี spread plate หรือ streak plate ก็ได้ แล้วบ่มที่ 37 °C

- *E. coli* และ *S. aureas* ทำใน TSA plate

- *C. albicans* ทำใน SDA plate

**หมายเหตุ เชื้อ *S.aureas* และ *C.albicans* ควรบ่ม 2 คืน เพื่อให้ได้ colony ที่ใหญ่ขึ้น ส่วน *E.coli* บ่มเพียง 1 คืน

4.2 นำเชื้อลง MHB โดยการใช้ loop หรือ needle และบริเวณส่วนยอดของ colony มาลงใน MHB โดย 1 หลอดอาหารเหลว อาจใช้ประมาณ 2-3 colony ซึ่งแต่ละ colony จะแตะเพียง 1 ครั้งเท่านั้น

4.3 นำเชื้อที่ลง MHB แล้วไปเขย่าที่ 37 °C ประมาณ 4 ชั่วโมง

4.4 นำเชื้อจาก 4.3 มาเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.9% ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ Macfaland โดย

- *E. coli* และ *S. aureas* ให้เทียบกับ Macfaland เบอร์ 0.5

- *C. albicans* ให้เทียบกับ Macfaland เบอร์ 1.0

**เชื้อที่เจือจางแล้วจะใช้เป็นหลอดความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดลองครั้งนี้

4.5 นำเชื้อจาก 4.4 ไปลง MHA โดยวิธี

- spread plate
- swab
- over lare (pore plate)

4.6 ขั้นตอนการลงเชือบน MHA แต่ละวิธีทำดังต่อไปนี้

4.6.1 การ spread plate (เตรียม เชื้อละ 2 plate)

Pipette เชื้อจาก 4.4 ปริมาตร 0.1 ml ลงบน MHA



ใช้แท่งแก้วรูปตัว L เป็นตัว spread

4.6.2 การ swab เชื้อ(เตรียมเชื้อละ 3 plate)

จุ่มไม้ swab ลงในหลอดเชื้อ 4.4 แล้วรีดเอาน้ำออกให้หมดบริเวณข้างหลอด



นำไม้ swab มาลากลงบนอาหารโดยหมุนจานอาหาร 3 ครั้ง ครั้งละ 60 °C

(จุ่มเพียง 1 ครั้งต่อ 1 plate)

4.6.3 การ over lare (poure plate)(เตรียมเชื้อละ 2 plate)

เตรียมอาหารวุ้นเหลวในหลอดทดลองปริมาตร 20 ml (อุ่นอยู่ใน water bath 55-60 °C)



Pipette เชื้อจาก 4.4 มา 0.5 ml ใส่ลงในอาหารวุ้นเหลวโดยใช้ pipette ปลายตัดแล้วหมุนหลอดให้เข้ากัน

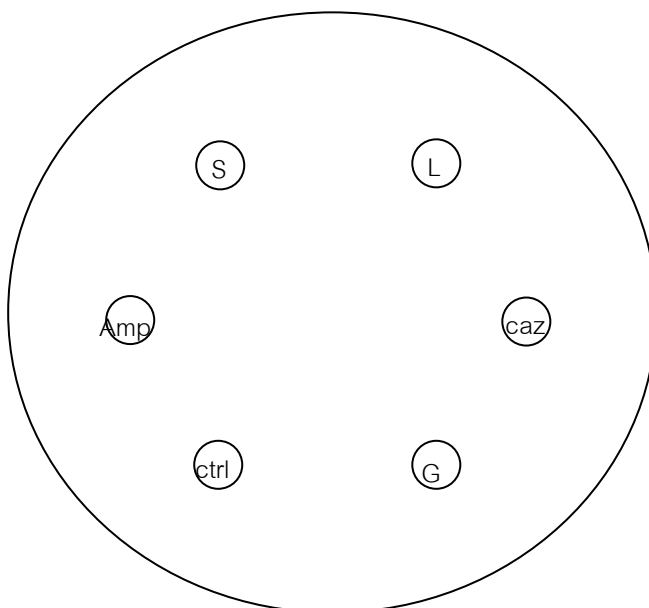


ดูดเชื้อที่ผสมอาหารวุ้นเหลวแล้วลง MHA เฟลทละ 4 ml แล้วเอียงให้อาหารวุ้นเหลวกระจายทั่วผิวหน้าอย่างสม่ำเสมอ

5. ขั้นตอนการดำเนินการ

5. ขั้นตอนการดำเนินการทดสอบ

5.1 ทำแผ่นวางตำแหน่ง cup ดังนี้



S	=	สารสกัดดอกโศกสดที่ผ่านการ spray dry
L	=	สารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ได้จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH
G	=	gallic acid
Ctrl	=	0.2 % DMSO ในน้ำ
Amp	=	ampicillin
Caz	=	ceftazidime

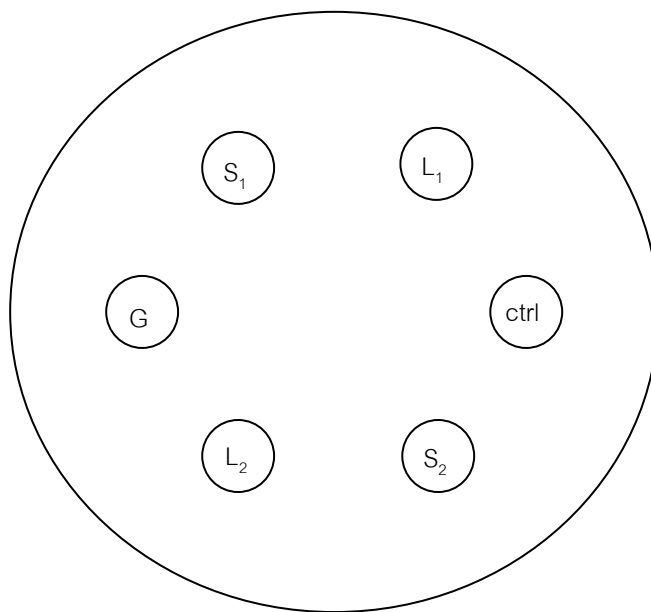
**หมายเหตุ Amp และ Caz เป็นแผ่นสำเร็จรูป

5.2 วาง cup ลงบน plate ที่ลงเชื้อแต่ละวิธีอย่างละ 2 ซ้ำดังแผนภาพข้างบนให้อยู่ในตำแหน่งเดียวกันทุก plate

5.3 ใส่สารสกัดชุดที่ 1 ปริมาตร 300 ul/cup แล้วค่อยวางแผ่นยาสำเร็จรูป (สารสกัดต้องเขย่าให้เข้ากันขณะหยอด)

5.4 สำหรับชุดที่ 2 ทำเหมือนข้อ 5.1-5.2 แต่เปลี่ยนเป็นยาชุดที่ 2

5.5 นำ plate ของ swab ที่เหลืออีกเชื้อละ 1 plate มาวาง cup ตามแผนภาพต่อไปนี้



S ₁	=	สารสกัดดอกโศกสดที่ผ่านการ spray dry
S ₂	=	สารสกัดดอกโศกสดที่ผ่านการ spray dry
L ₁	=	สารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ได้จากการหมักด้วย MeOH
L ₂	=	สารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ได้จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH
G	=	gallic acid
Ctrl	=	0.2 % DMSO ในน้ำ

**หมายเหตุ 1 = สารทดสอบชุดที่ 1
2 = สารทดสอบชุดที่ 2

- 5.6 รอให้สารสกัดตกตะกอนก่อนแล้วค่อยหยอดลง cup ละ 300 ul
- 5.7 วาง plate ที่ใส่สารทดสอบแล้วไว้ข้างนอกประมาณ ครึ่งชั่วโมง
- 5.8 นำ plate ที่วาง cup และใส่สารสกัดทั้งหมดไปบ่มที่ 37 °C นาน 1 คืน
- 5.9 นำออกตรวจสอบ clear zone
- 5.10 ใช้ loop หรือ needleแตะบริเวณที่เป็น clear zone ไป streak ลงบน plate agar ใหม่อาจเป็น TSA, SDA หรือ MHA ก็ได้ เพื่อตรวจสอบว่า สารทดสอบที่ทำให้เกิด clear zone นั้น ถ้า
 - ไม่เกิด colony ในอาหารใหม่ แสดงว่าสารทดสอบนั้น มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ
 - เกิด colony ในอาหารใหม่ แสดงว่าสารทดสอบนั้น ไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแต่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเท่านั้น

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone

จากการทดสอบสารทดสอบกับเชื้อทดสอบพบว่าการเกิด clear zone เป็นดังนี้ (ตารางที่ 2 และ 3)

1. สารสกัดดอกโศกสดที่ผ่านการ **spray dry** ทำให้เกิด clear zone ได้เฉพาะเชื้อ *S. aureas* วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้เฉลี่ยจากการลงเชื้อทั้ง 3 วิธี ได้ประมาณ 1 cm
2. สารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ได้จากการผ่าน **soxhlet** โดยใช้ **MeOH** ทำให้เกิด clear zone ได้กับเชื้อ *S. aureas* และ *C. albicans* วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้เฉลี่ยจากทั้ง 3 วิธี ได้ประมาณ 1.27 cm และ 1.75 cm ตามลำดับ
3. **gallic acid** ทำให้เกิด clear zone เฉพาะเชื้อ *S. aureas* วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้เฉลี่ยจากการลงเชื้อทั้ง 2 วิธี ได้ประมาณ 1 cm (วิธีการลงเชื้อแบบ over lare ไม่พบ clear zone)
4. **Amp** ทำให้เกิด clear zone ได้ดีกับเชื้อ *S. aureas* โดยเห็น clear zone ได้ในทั้ง 3 วิธีลงเชื้อ โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยได้ประมาณ 3.31 cm ส่วนเชื้อ *E. coli* พบ clear zone เฉพาะวิธีการลงเชื้อแบบ spread plate และ swab test ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยได้ประมาณ 0.98 cm (ในแบบ over lare ไม่พบ) และสำหรับเชื้อ *C. albicans* ไม่พบ clear zone ในทุกวิธีการลงเชื้อ
5. **caz** ทำให้เกิด clear zone ได้กับเชื้อ *S. aureas* โดยเห็น clear zone ได้ในทั้ง 3 วิธีลงเชื้อ โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยได้ประมาณ 2.37 cm ส่วนเชื้อ *E. coli* พบ clear zone ในวิธีการลงเชื้อแบบ spread plate และ swab test ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยได้ประมาณ 2.55cm ส่วนในแบบ over lare พบว่าจะเห็น clear zone มีขนาดใหญ่กว่า 2 วิธีแรกซึ่งวัดได้ประมาณ 3.35 cm และสำหรับเชื้อ *C. albicans* ไม่พบ clear zone ในทุกวิธีการลงเชื้อ

จากผลการทดลองจะเห็นว่าการละลายสารทั้ง 2 วิธีนั้นให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน แต่วิธีการลงเชื้อที่ต่างกันบางสารทดสอบจะให้ผลที่ต่างกัน

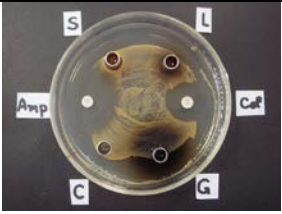
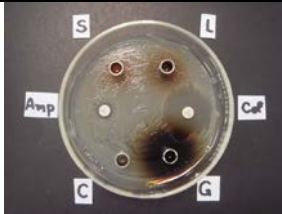
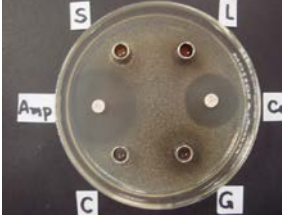
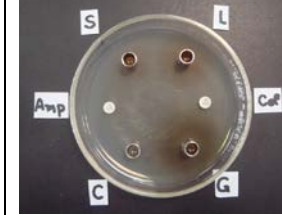
****หมายเหตุ :** เนื่องจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแต่ละสารทดสอบในแต่ละเชื้อทดสอบมีขนาดใกล้เคียงกัน จึงนำมาเฉลี่ยรวมกัน, และในการทดสอบ gallic acid ด้วยวิธี over layer สีของ gallic acid จะอ่อนมาก

จากการทดสอบกับสารทดสอบเมื่อตกตะกอน (ใช้ส่วนใสในการนำมาทดสอบ) กับเชื้อทดสอบพบว่าการเกิด clear zone เป็นดังตารางที่ 4-6 โดยในการทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และ *C. albicans* ไม่พบ clear zone และพบ

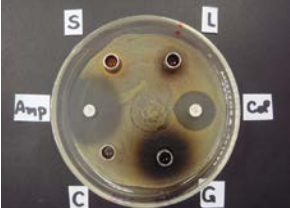
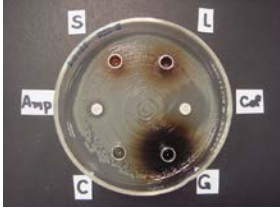
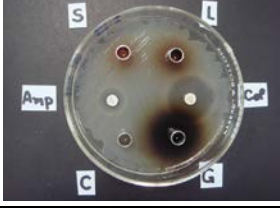
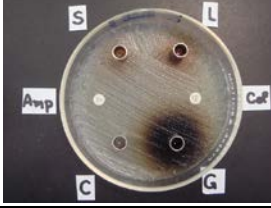
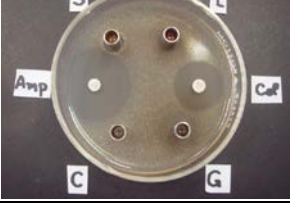
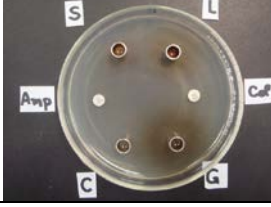
การยับยั้งเชื้อ *S. aureas* ซึ่ง clear zone ที่เกิดของแต่ละสารทดสอบที่ตกตะกอนที่ได้นั้นใกล้เคียงกับสารทดสอบที่ยังไม่ตกตะกอน แสดงว่า สารทดสอบไม่ว่าจะทดสอบขณะมีตะกอนหรือหลังตกตะกอนแล้วไม่แตกต่างกันสำหรับเชื้อ *S. aureas* และ *E. coli* สำหรับเชื้อ *C. albicans* จากที่เคยเห็น clear zone ของสารสกัดเมล็ดลำพู กลับไม่เห็นในการทดลองนี้ สำหรับการไม่เห็น clear zone ของเชื้อ *C. albicans* ของสารทดสอบเมล็ดลำพูอาจเป็นเพราะว่าสารที่มีฤทธิ์น่าจะลอยอยู่ใกล้ๆ กับตะกอนส่วนข้างบนที่เป็นส่วนใส่นั้นน่าจะเป็นเพียงแค่ตัวทำลายเท่านั้น ส่วนการนำอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณ clear zone ไปลงใน media ใหม่ เพื่อทดสอบว่า สารทดสอบมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อหรือยับยั้งเชื้อ ได้ผลการทดสอบดังนี้

1. สำหรับเชื้อ *S. aureas* พบว่าสารสกัดดอกโศกสดที่ผ่านการ spray dry และสารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ได้จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH มีเชื้อขึ้น แสดงว่า มีฤทธิ์แค่ยับยั้งเชื้อ ส่วน Amp, Caz และ gallic acid ไม่มีเชื้อขึ้น แสดงว่า มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ
2. สำหรับเชื้อ *E. coli* พบว่า Amp และ Caz มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ
3. สำหรับเชื้อ *C. albicans* พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ได้จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH มีฤทธิ์แค่ยับยั้งเชื้อ

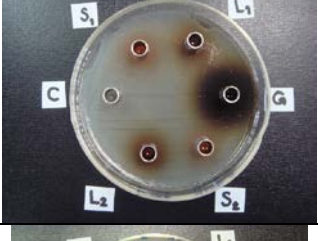
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อโรคของสารทดสอบชุดที่ 1

วิธีลงเชื้อ	รูปเชื้อทดสอบ		
	<i>S. aureas</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
1. spread plate			
2. swab test			
3. over layer			

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อโรคของสารทดสอบชุดที่ 2

วิธีลงเชื้อ	รูปเชื้อทดสอบ		
	<i>S. aureas</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
1. spread plate			
2. swab test			
3. over layer			

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อโรคของสารทดสอบชุดที่ 1 และ 2 เมื่อสารทดสอบตกตะกอนแล้วนำส่วนใสมาทดสอบ

เชื้อ	รูป	
<i>S. aureas</i>		
<i>E. coli</i>		
<i>C. albicans</i>		

ตารางที่ 5 ผลการยับยั้งเชื้อโรคของสารสกัดที่ทดสอบเมื่อสารทดสอบยังไม่ตกตะกอน (สารทดสอบชุดที่ 1)
สารทดสอบชุดที่ 1/ วิธี spread plate

เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (cm)					
	สารสกัดดอกโศกสด ที่ผ่านการ spray dry	สารสกัดจาก เมล็ดลำพูที่ได้ จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH	gallic acid	Amp	Caz	ctrl
<i>S.aureas.</i>	1.1	1.2	0.9	2.8	2.2	/
<i>E.coli</i>	/	/	/	0.9	2.5	/
<i>C.albicans</i>	/	1.9	/	/	/	/

สารทดสอบชุดที่ 1/ วิธี swab test

เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (cm)					
	สารสกัดดอกโศกสด ที่ผ่านการ spray dry	สารสกัดจาก เมล็ดลำพูที่ได้ จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH	gallic acid	Amp	Caz	ctrl
<i>S.aureas.</i>	1.1	1.4	1.1	3.5	2.4	/
<i>E.coli</i>	/	/	/	1	2.6	/
<i>C.albicans</i>	/	1.7	/	/	/	/

สารทดสอบชุดที่ 1/ วิธี over lare

เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (cm)					
	สารสกัดดอกโศกสด ที่ผ่านการ spray dry	สารสกัดจาก เมล็ดลำพูที่ได้ จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH	gallic acid	Amp	Caz	ctrl
<i>S.aureas.</i>	1	1.2	/	3.6	2.6	/
<i>E.coli</i>	/	/	/	/	3.5	/
<i>C.albicans</i>	/	1.7	/	/	/	/

/ หมายถึง ไม่พบ clear zone

ตารางที่ 6 ผลการยับยั้งเชื้อโรคของสารสกัดที่ทดสอบเมื่อสารทดสอบยังไม่ตกตะกอน (สารทดสอบชุดที่ 2)
สารทดสอบชุดที่ 2/ วิธี spread plate

เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (cm)					
	สารสกัดดอกโศกสด ที่ผ่านการ spray dry	สารสกัดจาก เมล็ดลำพูที่ได้ จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH	gallic acid	Amp	Caz	ctrl
<i>S. aureas.</i>	1	1.2	0.9	3	2.1	/
<i>E. coli</i>	/	/	/	1	2.5	/
<i>C. albicans</i>	/	1.8	/	/	/	/

สารทดสอบชุดที่ 2/ วิธี swab test

เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (cm)					
	สารสกัดดอกโศกสด ที่ผ่านการ spray dry	สารสกัดจาก เมล็ดลำพูที่ได้ จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH	gallic acid	Amp	Caz	ctrl
<i>S. aureas.</i>	1.1	1.4	1.1	3.5	2.4	/
<i>E. coli</i>	/	/	/	1	2.6	/
<i>C. albicans</i>	/	1.7	/	/	/	/

สารทดสอบชุดที่ 2/ วิธี over lare

เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (cm)					
	สารสกัดดอกโศกสด ที่ผ่านการ spray dry	สารสกัดจาก เมล็ดลำพูที่ได้ จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH	gallic acid	Amp	Caz	ctrl
<i>S. aureas.</i>	1.1	1.2	/	3.5	2.5	/
<i>E. coli</i>	/	/	/	/	3.2	/
<i>C. albicans</i>	/	1.7	/	/	/	/

/ หมายถึง ไม่พบ clear zone

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของลำพู

คัดเลือกจุลินทรีย์ 3 ชนิดเพื่อการศึกษาเป็นเบื้องต้นก่อนการทดสอบกับจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Candida albicans* เพื่อเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และราตามลำดับ

วิธีการศึกษา

1. เตรียมจุลินทรีย์ทดสอบ

1.1 ตรวจสอบความถูกต้องเบื้องต้น ของชนิดจุลินทรีย์ที่ใช้

- ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บน agar plate โดยแบคทีเรียใช้ Tryptic soy agar และราใช้ Sabouraud dextrose agar บ่มที่ 35-37 องศา เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ
- ย้อมแกรม
- ตรวจสอบคุณสมบัติด้วย biochemical tests
S. aureus ใช้ Mannitol salt agar และ coagulase test
E. coli ใช้ MacConkey agar, TSI, Indole test และ Citrate test
C. albicans ตรวจ germ tube test

1.2 การเตรียมความเข้มข้นเชื้อทดสอบ

- แยกเชื้อทดสอบให้ได้ isolate colonies
E. coli และ *S. aureus* ทำใน TSA plate บ่มที่ 35-37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
C. albicans ทำใน SDA plate บ่มที่ 35-37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- นำเชื้อลง MHB โดย การใช้ loop หรือ needle และบริเวณส่วนยอดของ colony มาลงใน MHB โดย 1 หลอดอาหารเหลว อาจใช้ประมาณ 2-3 colony ซึ่งแต่ละ colony จะแตะเพียง 1 ครั้งเท่านั้น
- นำเชื้อที่ลง MHB แล้วไปเขย่าที่ 37 °C ประมาณ 4 ชั่วโมง (*C. albicans* บ่ม overnight)
- เจือจางเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.9% ให้มีความเข้มข้นเทียบเท่ากับ McFarland โดย
E. coli และ *S. aureus* ให้เทียบกับ McFarland เบอร์ 0.5
C. albicans ให้เทียบกับ McFarland เบอร์ 1.0
**เชื้อที่เจือจางแล้วจะใช้เป็นหลอดความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดลองครั้งนี้
- นำเชื้อไปลง MHA โดยวิธี swab
จุ่มไม้ swab ลงในหลอดเชื้อ แล้วรีดเอาน้ำออกให้หมดบริเวณข้างหลอด
↓
นำไม้ swab มาลากลงบนอาหารโดยหมุนจานอาหาร 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำมุม 60 องศา (จุ่มเพียง 1 ครั้งต่อ 1 plate)

2. การเตรียมตัวอย่างสารสกัด (1.0% w/v, 10 ml)

ชั่งสารสกัดหนักประมาณ 0.1000 g + DMSO 20 ul + น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ml

↓
Sonicate นาน 30 นาที

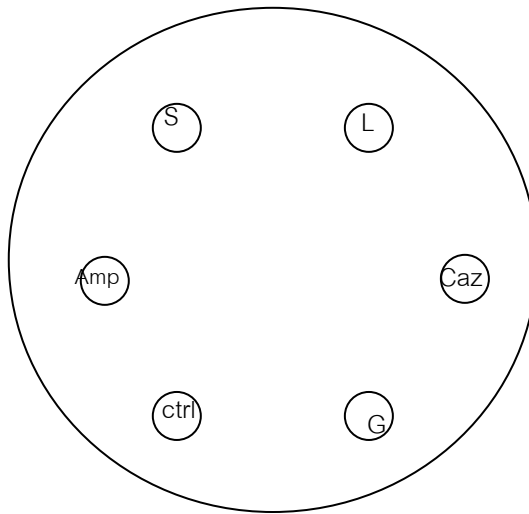
↓
เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 8 ml

↓
Sonicate นาน 20 นาที

3. การทดสอบ

3.1 ทดสอบความไวของจุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ (*S. aureus* และ *E. coli*)

- ทำแผ่นวางตำแหน่ง cup ดังนี้



L = สารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ได้จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH

S = สารสกัดดอกโศกสดที่ผ่านการ spray dry

G = gallic acid

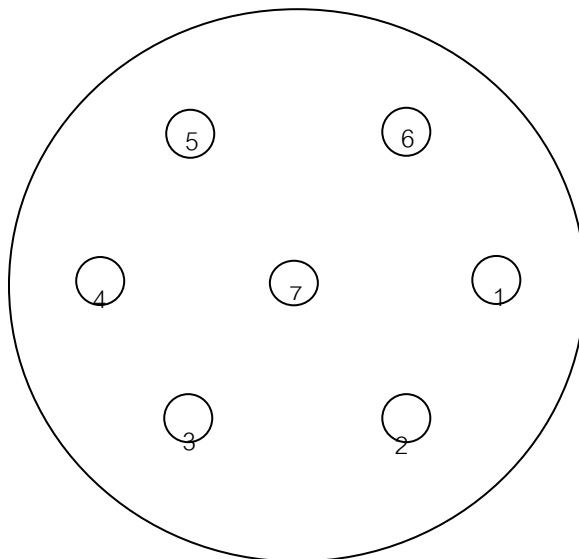
Ctrl = 0.2 % DMSO ในน้ำ

Amp = ampicillin

Caz = ceftazidime

- วาง cup ลงบน plate ที่ลงเชื้อแต่ละวิธีอย่างละ 2 ซ้ำ ดังแผนภาพข้างบนให้อยู่ในตำแหน่งเดียวกันทุก plate
- ใส่สารสกัดลงใน cup ปริมาตร 300 ul/cup และวาง antibiotic disc (Ampicillin และ Ceftazidime)
- วาง plate ทั้งไว้ในอุณหภูมิห้องประมาณครึ่งชั่วโมง
- นำเข้าบ่มที่ 35-37 °C 18-24 ชั่วโมง
- ตรวจสอบ clear zone

3.2 ทดสอบฤทธิ์สารสกัดต่อจุลินทรีย์ทดสอบ



หมายเลข	สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของลำพู ที่สกัดด้วยการหมักด้วย MeOH
1	ที่หุ้มดอก (P0)
2	เมล็ด (S0)
3.	รากอากาศ (E0)
4	เกสร (T0)
5	เนื้อผล (F0)
6	เปลือกผล (C)
7	ใบ (L)

- วาง cup ลงบน plate ที่ลงเชื้อตั้งแผนภาพข้างบน ทำ 3 ซ้ำโดยให้แต่ละ cup อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน
- รอให้สารสกัดตกตะกอนก่อนแล้วค่อยหยอดลง cup ละ 300 ul
- วาง plate ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องประมาณครึ่งชั่วโมง
- นำเข้าบ่มที่ 35-37 °C 18-24 ชั่วโมง
- ตรวจสอบ clear zone
- ทดสอบฤทธิ์สารทดสอบ ว่ามีฤทธิ์ฆ่าเชื้อหรือเพียงยับยั้งเชื้อ โดยใช้ loop หรือ needleแตะบริเวณที่เป็น clear zone ไป streak ลงบน agar plate ใหม่

ผลการทดสอบ

การตรวจสอบคุณสมบัติจุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ จากผลในตารางที่ 7 และ 8 สรุปได้ว่าจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดให้ลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีตรงตามชนิดของสายพันธุ์นั้นๆ และแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีความไวต่อการทดสอบ antimicrobial susceptibility ได้ทดสอบสารสกัดดอกโศกด้วยเพราะเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่งในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากดอกไม้ชนิดรับประทานได้

ตารางที่ 7 คุณสมบัติของเชื้อที่ใช้

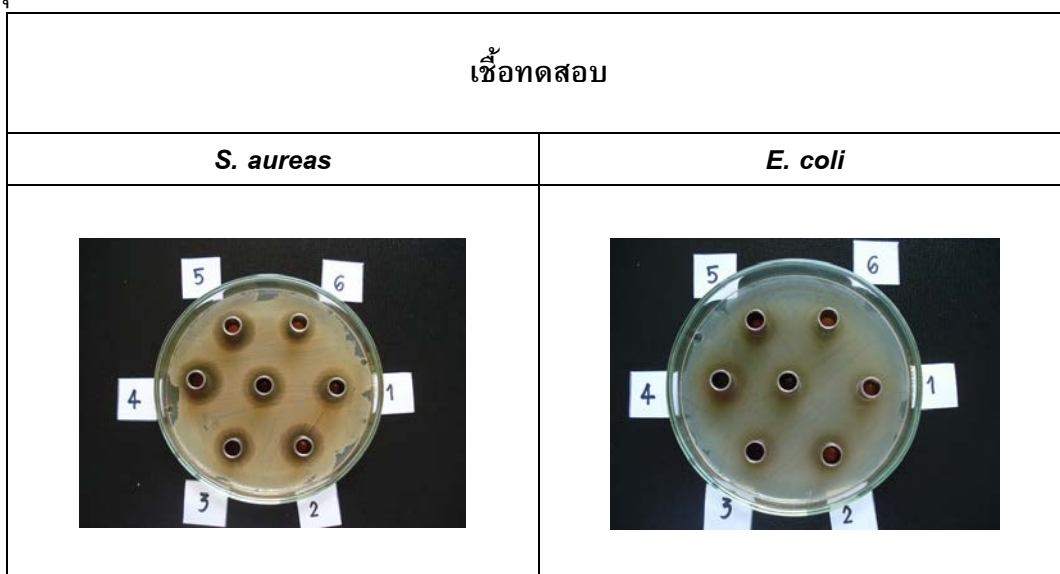
Microorganism	Gram staining	Biochemical tests
<i>S. aureus</i>	Gram positive cocci, grape-like cluster	MSA:- Yellow colonies, round and convex, media surrounding change to yellow. Coagulase test:- positive.
<i>E. coli</i>	Gram negative bacilli, scatter in single cell	MacConkey:- pink colonies, opaque, with pink precipitin surrounded in agar. TSI:- A/A with gas Indole test:- positive Citrate test:- negative
<i>C. albicans</i>	Oval shape with strong Gram positive	Germ tube test:- positive

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยของ clear zone ในการทดสอบความไวของเชื้อ

Test organism	Average clear zone diameter (mm)					
	สารสกัดดอกโศกสดที่ผ่านการ spray dry	สารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ได้จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH	G	Amp	Caz	ctrl
<i>S. aureus.</i>	11	14	11	35	24	/
<i>E. coli</i>	/	/	/	10	26	/
<i>C. albicans</i>	/	17	/	-	-	/

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ
/ หมายถึง ไม่พบ clear zone

จากการสุ่มสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโดยใช้ agar diffusion method ผลการทดลองในตารางที่ 9 และ 10 สรุปผลจากการทดสอบวิธีนี้ได้ว่า สารสกัดจากลำพู มีผลยับยั้งถึงฆ่าเชื้อ *S. aureus* ยกเว้นสารสกัดจากเนื้อผล และ ปีกผลที่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ แต่สารสกัดเหล่านี้ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* แต่อย่างใดในการทดสอบวิธีนี้ ผลการทดสอบกับรา ยังมิได้สุ่มทดสอบกับสารสกัดในแต่ละส่วนของพืช แต่สารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ใช้สุ่มทดสอบฤทธิ์เทียบกับสารสกัดอื่นๆ พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง *C. albicans* ทั้งนี้ การทดสอบดังกล่าวปริมาณเชื้อทดสอบที่ใช้ยังมิได้ปรับมาตรฐานกับสารต้านเชื้อรามาตรฐาน จึงยังไม่สามารถชี้บ่งได้ว่า สารสกัดดังกล่าวมีผลต่อเชื้อราดีกว่าแบคทีเรีย จากผลการทดลองในรูปที่ 1 และตารางที่ 9 แสดงว่า สารสกัดจากแต่ละส่วนของลำพูที่สกัดด้วยการหมักกับเมธานอลมีความหลากหลายและให้ขอบเขต (spectrum) ในการฆ่าเชื้อแตกต่างกันไปด้วย (ตารางที่ 10) โดยพบว่าสารสกัดจากหลายส่วนของลำพูมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ ฤทธิ์ต่อเชื้อที่ได้ในการทดลองอาจมาจากสารชนิดเดียวหรือมากกว่า ต้องมีการทดสอบต่อไป การทดสอบที่เริ่มดำเนินการนี้ ได้ทดลองกับ agar diffusion method ซึ่งมีความจำกัดกับสารที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายได้ยาก ส่วนของพืชที่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจึงควรทดสอบกับวิธีอื่นประกอบด้วย ก่อนที่จะสรุปว่า ไม่มีสารออกฤทธิ์ ดังนั้นในการทดลองต่อไปได้ทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ด้วยวิธี broth microdilution method



รูปที่ 1 Clear zone diameter จากการยับยั้งเชื้อโรคของสารสกัดจากส่วนต่างๆของลำพูที่สกัดด้วยการหมักด้วยเมธานอล

ตารางที่ 9 ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเชื้อโรคของสารสกัดส่วนต่างๆ ของลำพู

		Average clear zone diameter (mm)									
หมายเลข	สารสกัด	S. aureas					E. coli				
		1	2	3	average	SD	1	2	3	average	SD
1	ที่หุ้มดอก	12	12	12	12	0.00	ไม่พบ clear zone				
2	เมล็ด	12	12	10	11.33	1.15					
3	หน่อ	11	11	11	11	0.00					
4	เกสร	14	14	14	14	0.00					
5	เนื้อผล	ไม่พบ clear zone									
6	เปลือกและปีกผล										
7	ใบ	11	12	12	11.67	0.58					

จากผลการทดลองในตารางที่ 9 แสดงว่าสารสกัดจากแต่ละส่วนของลำพูที่สกัดด้วยการหมักกับเมธานอลมีความหลากหลายและให้ขอบเขต (spectrum) ในการฆ่าเชื้อแตกต่างกันไปด้วย โดยพบว่าสารสกัดจากหลายส่วนของลำพูมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ ฤทธิ์ต่อเชื้อที่ได้ในการทดลองอาจมาจากสารชนิดเดียวหรือมากกว่า ต้องมีการทดสอบต่อไป การทดสอบที่เริ่มดำเนินการนี้ ได้ทดลองกับ agar diffusion method ซึ่งมีความจำกัดกับสารที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายได้ยาก ส่วนของพืชที่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจึงควรทดสอบกับวิธีอื่นประกอบด้วย ก่อนที่จะสรุปว่า ไม่มีสารออกฤทธิ์ ดังนั้นในการทดลองต่อไปได้ทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ด้วยวิธี broth microdilution method

ตารางที่ 10 ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเชื้อโรคของสารสกัดส่วนต่างๆของลำพูภายหลังย้ายมายังตัวกลางใหม่

หมายเลข	สารสกัดจากลำพู	<i>S. aureas</i>		ผล
		ขึ้น	ไม่ขึ้น	
1	ที่หุ้มดอก (P0)		*	มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ
2	เมล็ด (S0)	*		มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ
3	รากอากาศ (E0)		*	มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ
4	เกสร (T0)		*	มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ
7	ใบ (L0)		*	มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากลำพูด้วยวิธี **broth microdilution method**

วิธีการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพนั้น โดยทั่วไปนิยมใช้วิธี agar diffusion method เช่นวิธี agar well diffusion method และ disc diffusion method เนื่องจากวิธีดังกล่าวทำง่าย สะดวก ใช้เวลาน้อย และสามารถอ่านผลได้จากตาเปล่าด้วยการวัด inhibition zone แต่สามารถทดสอบความไวของเชื้อได้แต่ในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณเท่านั้น สำหรับการศึกษาศารสกัดจากธรรมชาติด้วยวิธีนี้ ยังมีข้อจำกัดในด้านการละลายของสาร ความสามารถในการแพร่ของสาร รวมไปถึงขนาดโมเลกุลของสาร กล่าวคือสารสกัดจากธรรมชาติแต่ละชนิดนั้น มีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายได้แตกต่างกัน โดยส่วนมากจะละลายได้น้อยในตัวทำละลายแบบมีขี้ เป็นผลทำให้ความสามารถในการแพร่บน agar ของแต่ละสารแตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone จึงไม่แปรผันตรงตามฤทธิ์ต้านจุลชีพในสารสกัดธรรมชาติ ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากธรรมชาตินั้น ควรเลือกใช้วิธีที่เหมาะสม เช่นวิธี broth microdilution method (Sader และคณะ, 2006) เนื่องจากวิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถทราบความไวของเชื้อต่อสารทดสอบทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ประหยัดปริมาณตัวอย่างทดสอบ การอ่านผลถูกต้อง โดยอ่านผลได้จากการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยตาเปล่าหรือวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อจะแปรผกผันกับฤทธิ์ต้านจุลชีพ นอกจากนี้ยังสามารถบอกได้ถึงค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของสารได้ทันที

Broth microdilution method

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างสารสกัดจากต้นลำพู

- สารสกัดจากส่วนใบลำพู (L), รากอากาศ (E), ที่หุ้มดอก (P), เกสร (T), เนื้อผล (F), ปีกผล (C) และ เมล็ด (S) ที่สกัดด้วยการหมักด้วยเมทานอล
- สารสกัดจากส่วนใบลำพูที่สกัดด้วยการผ่านสารทำละลายที่ละชนิดผ่าน soxhet ด้วย hexane (L1), dichloromethane (L2), ethyl acetate (L3) และ เมทานอล (L4) ตามลำดับ
- สารสกัดจากส่วนที่หุ้มดอกลำพูที่สกัดด้วยการผ่าน soxhet ด้วย hexane (P1), dichloromethane (P2), ethyl acetate (P3) และ เมทานอล (P4) ตามลำดับ
- สารสกัดจากส่วนเมล็ดลำพูที่สกัดด้วยการผ่าน soxhet ด้วย hexane (S1), dichloromethane (S2), ethyl acetate (S3) และ เมทานอล (S4) ตามลำดับ

2. 96 well plates (Flat bottom with lid) (Corning Incorporated, USA)

3. Muller Hinton broth / Muller hinton agar (Becton Dickinson, USA)

4. Pipette / tips

5. 0.85% NaCl

6. DMSO

7. Chloramphenicol (Sigma-aldrich, USA)

8. เครื่องวัดความขุ่น (Colorimeter) (Biomerieux, France)

9. Microorganisms

ใช้เชื้อทดสอบทั้งหมด 12 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อในกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ รวมไปถึงเชื้อสายพันธุ์ดื้อยา โดยแสดงดังในตารางที่ 11 และ 12

ตารางที่ 11 เชื้อทดสอบแกรมบวกที่ใช้ในการทดลอง

Microorganisms	แกรมบวก	ที่มา
Drug sensitive strains	- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 - <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 - <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 19213	-กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ -กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ -กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Drug resistance strains	- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (MRSA) - <i>Enterococcus faecalis</i> * - <i>Enterococcus faecium</i> * * มีแนวโน้มดื้อยา	-กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ -โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า -โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

ตารางที่ 12 เชื้อทดสอบแกรมลบที่ใช้ในการทดลอง

Microorganisms	แกรมลบ	ที่มา
Drug sensitive strains	- <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ -กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Drug resistance strains	- <i>Escherichia coli</i> ESBL - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (multidrug resistance) - <i>Klebsiella pneumoniae</i> - <i>Acinetobacter baumannii</i>	-โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า -โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า -โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า -โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

วิธีการทดลอง

1. ปรับความขุ่นเริ่มต้นของเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้ได้เท่ากับ 0.5 Macfarland (10^8 cfu/ml) เจือจางปริมาณเชื้อให้ได้ 10^6 cfu/ml
2. ใส่ Muller Hinton broth 40 μ l ลงในหลุม 96 well plates
3. ใส่ตัวอย่างสารสกัดที่ละลายด้วย DMSO ความเข้มข้น 2 mg/ml ใส่ลงในหลุมแรกปริมาตร 40 μ l ทำการผสม จากนั้นดูดสารละลาย ปริมาตร 40 μ l ใส่ในหลุมที่ 2 แล้วทำการเจือจางแบบอนุกรม 2 เท่าในหลุมถัดไป
4. ใส่เชื้อ 10^6 cfu/ml ปริมาตร 20 μ l ในแต่ละหลุม ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 μ l ในทุกหลุม โดยการเติม Muller Hinton broth
5. กำหนดให้การทดสอบในแต่ละตัวอย่างสารสกัดต้องมีชุดควบคุมผลบวก ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Muller Hinton ผสมเชื้อทดสอบ ชุดควบคุมผลลบ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Muller Hinton ผสมตัวอย่างสารสกัด ชุดควบคุมมาตรฐาน ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Muller Hinton ผสมเชื้อทดสอบ และยามาตรฐานในที่นี้ใช้ยา Chloramphenicol ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2 mg/ml
6. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผลชุดควบคุมมาตรฐานและเทียบความถูกต้องกับค่ามาตรฐานของ CLSI (2010)

ผลบวก : เกิดความขุ่นของเชื้อในหลุม โดยเทียบกับชุดควบคุมผลบวก

ผลลบ : ไม่เกิดความขุ่นของเชื้อในหลุม โดยเทียบกับชุดควบคุมผลลบ

การอ่านค่า MIC = ค่าความเข้มข้นของสารสกัดในหลุมสุดท้ายที่ไม่เกิดความขุ่นของเชื้อในหลุม

7. ทำการทดสอบหาค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC) จากหลุมที่ได้ผลลบ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปหยดลงบน Muller Hinton agar และ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง และอ่านผลโดย

เชื้อเจริญ : ตัวอย่างสารสกัดไม่มีสารออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อทดสอบได้ที่ความเข้มข้นนั้น

เชื้อไม่เจริญ : ตัวอย่างสารสกัดมีสารออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อทดสอบได้ที่ความเข้มข้นนั้น

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเปรียบเทียบค่า MIC จากชุดควบคุมมาตรฐานกับมาตรฐานของ CLSI ปี 2010 ของเชื้อทดสอบ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 พบว่าค่าที่ได้อยู่ในช่วงมาตรฐานที่ CLSI ยอมรับได้ ตัวอย่างสารสกัด S4, P4 และ L4 มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ใกล้เคียงกัน แต่ใน S 1-3 , P 1-3 และ L 1-3 ไม่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบ ดังในตารางที่ 13 และเห็นได้ว่าตัวอย่างสารสกัด S4 , P4 และ L4 มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบแกรมลบได้ดีกว่าแกรมบวกเล็กน้อย และสามารถฆ่าเชื้อทดสอบแกรมลบได้ดี ยกเว้นเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ในขณะที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบแกรมบวกได้ ยกเว้น *Bacillus megaterium*

ฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่เป็นแบบการฆ่าเชื้อโรค ขณะที่ฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตสำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ยกเว้นเชื้อ *B. megaterium* ซึ่งสารสกัดแสดงฤทธิ์การฆ่าเชื้อโรค ดังแสดงในตารางที่ 14 ค่า MIC และ MBC สำหรับสารสกัดเมธานอลหลังที่ได้ที่ผ่านการสกัดด้วยเมธานอล ไดคลอโรมีเทน และ ethyl acetate มาก่อนแล้ว ให้ผลคล้ายกับการสกัดด้วยการหมักเมธานอลในสารสกัดส่วนใหญ่ที่สกัดจากเมล็ดและที่หุ้มดอก แสดงว่าการสกัดด้วย hexane, dichloromethane และ ethyl acetate ไม่ได้สกัดสารออกฤทธิ์ออกไป อย่างไรก็ตามฤทธิ์การฆ่าเชื้อของสารสกัดจากใบต่อเชื้อแกรมลบลดลงจาก 0.2 เป็น 0.4 mg/ml ใน 4/5 กรณี ดังแสดงในตารางที่ 15

จากตารางที่ 14 ตัวอย่างสารสกัด S4, P4 และ L4 ให้ผลคล้ายกับผลของตัวอย่างสารสกัด S4 , P4 และ L4 ที่ทดสอบในครั้งแรก สำหรับตัวอย่างสารสกัดลำพูที่สกัดด้วยการหมักด้วยเมธานอล คือ L (ใบ), E (หน่อ), S (เมล็ด), P (ที่หุ้มดอก), T (เกสร), F (เนื้อผล) และ C (เปลือก) ทั้งหมดมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแกรมบวกและแกรมลบได้ แต่มีสารออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ แกรมลบ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ESBL, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* (multidrug resistance), *Klebsiella pneumoniae* และ *Acinetobacter baumannii* ได้ยกเว้นตัวอย่างสารสกัดจากเนื้อผล (F) ไม่สามารถฆ่า *Klebsiella pneumoniae* ได้ สำหรับฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทดสอบแกรมบวก พบว่าตัวอย่างสารสกัดจากใบ (L) สามารถฆ่าเชื้อแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ได้ทั้งสายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์ดื้อยา ในขณะที่ตัวอย่างสารสกัดอื่นๆ ไม่สามารถฆ่าเชื้อแกรมบวกได้

พบค่า MIC ของสารที่สกัดลำพูทั้ง 7 ส่วนที่สกัดด้วยเมธานอล แต่ MBC มีค่าที่แตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 15 ทั้งนี้พบฤทธิ์การฆ่าเชื้อกลุ่มแกรมลบได้ทั้งหมด ทั้งเชื้อที่ไวต่อยา (*E. coli* and *P. aeruginosa*) และ

กลุ่มที่ดื้อยา (MDR (ESBL-producing *E. coli*, MDR-*P. aeruginosa*, and PDR-*A. baumannii*) strains)) อย่างไรก็ตามพบฤทธิ์ฆ่าเชื้อแกรมบวกเฉพาะจากสารสกัดของใบลำพูต่อเชื้อที่ดื้อยา และสารสกัดจากใบ เมล็ด และรากอากาศลำพู ต่อเชื้อ *B. megaterium* และ *S. aureus* แต่ไม่มีฤทธิ์ต่อ *B. subtilis* เชื้อที่ดื้อต่อยา และเชื้อที่ไวต่อยาตามลำดับ สำหรับส่วนที่เหลือจะพบเฉพาะการแสดงฤทธิ์การยับยั้งการเติบโต (bacteriostatic effect) ต่อเชื้อแกรมบวก

จากข้อมูลข้างต้น จากผลของค่า MBC และ MIC ต่อเชื้อทดสอบต่างๆ สามารถแบ่งส่วนต่างๆ ของลำพูในการยับยั้งเชื้อโรคได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยส่วนของใบ ซึ่งแสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (anti-bactericidal activity) ที่แรงต่อเชื้อสองชนิดที่ไวต่อยา คือ *B. megaterium* และ *S. aureus* และเชื้อแกรมบวกที่ดื้อยา (MRSA)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสารสกัดจากรากอากาศ และเมล็ด ที่สามารถฆ่าเชื้อแกรมบวก คือ *B. megaterium* และหยุดการเติบโตของเชื้อ (bacteriostatic effect) ต่อเชื้อแกรมบวกที่นำมาทดสอบ

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสารสกัดจากเกสร ที่หุ้มดอก เนื้อผล และเปลือก ซึ่งยับยั้งการเติบโต (bacteriostatic activity) ต่อเชื้อแกรมบวกทั้งหมด

จากภาพรวมของการทดลองนี้สารสกัดจากลำพูมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ รวมทั้งชนิดที่ดื้อต่อยาด้วย สารสกัดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรค (bactericidal action) ต่อเชื้อแกรมลบดีกว่าเชื้อแกรมบวก และพบว่าส่วนที่สกัดด้วยเมธานอลแสดงฤทธิ์ได้โดยการสกัดมาก่อนด้วยสารทำละลายอื่นไม่ค่อยมีต่อฤทธิ์ดังกล่าวนัก ซึ่งแสดงว่าสารที่แสดงฤทธิ์ต่อเชื้อเหล่านี้ได้ค่อนข้างเป็นสารที่ชอบน้ำ แม้ว่าส่วนต่างๆ ของลำพูทั้งเจ็ดส่วนสามารถแสดงฤทธิ์ต่อเชื้อได้แต่ก็มีระดับความแรงแตกต่างกัน โดยพบฤทธิ์ที่ดีในสารสกัดจากใบลำพูที่สกัดด้วยเมธานอล ซึ่งเป็นส่วนที่เก็บเกี่ยวได้ง่ายและมีเพิ่มทดแทนใบเดิมได้จากการแตกใบใหม่ สารประกอบที่แสดงฤทธิ์ดังกล่าวอาจมาจากสารฟลาโวนอยด์ในพืชนี้ โดยทั่วไปมักพบว่าสารสกัดจากพืชมักมีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ (Paz และคณะ, 1995; Vlietinck และคณะ, 1995; Kudi และคณะ, 1999; Palombo และ Semple, 2001) ดังนั้นผลที่ได้จากการวิจัยนี้จึงน่าสนใจที่สารสกัดจากลำพูส่วนใหญ่มีผลต่อเชื้อแกรมลบที่ดีกว่า ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าสารที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างมีขั้วน้อย และละลายน้ำได้ไม่ดี (Parekh และคณะ, 2006) ส่วนประกอบที่เป็นเมมเบรนภายนอกของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเป็นสารประกอบประเภท lipopolysaccharide ทำให้ผนังเซลล์ไม่ค่อยยอมให้สารที่ชอบไขมันผ่านได้ และ porin-based pores มีลักษณะเป็นตัวกันขวางที่เฉพาะเจาะจง และจำกัดขนาดโมเลกุลที่ประมาณ 600 Da (Nikaido และ Vaara, 1985) ขณะที่เชื้อแกรมบวกไวต่อสารที่มีขั้วต่ำเนื่องจากผิวนอกของเซลล์เป็น peptidoglycan ซึ่งเป็นตัวกันขวางการซึมผ่านของสาร ที่ไม่ค่อยมีประสิทธิภาพ (Scherrer และ Gerhardt, 1971; Arias และคณะ, 2004) สำหรับสารสกัดจากลำพูที่สกัดด้วยเมธานอลค่อนข้างเป็นสารที่มีขั้ว ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพต่อเชื้อแกรมลบมากกว่าเชื้อแกรมบวก โดยมีสารมากกว่าหนึ่งชนิดในการออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรคแกรมลบและยับยั้งการเติบโตของเชื้อแกรมบวก

ตารางที่ 13 การยับยั้งเชื้อโรคต่างๆที่ทดสอบด้วยวิธี broth microdilution method ของสารสกัดจากลำพู (S (1-4), P (1-4) และ L (1-4))

Samples ^b	Test bacterial strains											
	MIC/MBC (mg/ml)	Gram-positive						Gram-negative				
		Drug-sensitive			Drug-resistant			Drug- sensitive		Drug-resistant		
		<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>S. aureus</i> (MRSA)	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> (ESBL)	<i>P. aeruginosa</i> (MDR)	<i>A. baumannii</i>
S1	MIC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
S2	MIC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
S3	MIC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
S4	MIC	0.4	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4
	MBC	NA	0.2	NA	NA	NA	NA	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
P1	MIC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P2	MIC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P3	MIC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P4	MIC	0.4	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
L1	MIC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
L2	MIC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
L3	MIC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
L4	MIC	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4
	MBC	NA	0.2	0.4	0.4	NA	NA	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

^aData are shown as the representative values from one trial, and represent that seen from 3 replications per trial and 3 independent trials. (NA = Non Active)

^bSamples, coded as X1-4, represent the sequential extracts of hexane (1), dichloromethane (2), ethyl acetate (3) and methanol (4) from the seeds (S), calyx (P) and leaves (L) of the crabapple mangrove tree.

ตารางที่ 14 การยับยั้งเชื้อโรคต่างๆที่ทดสอบด้วยวิธี broth microdilution method ของสารสกัดจากลำพู S4 , P4 และ L4 ซึ่งทำการทดสอบซ้ำ

Samples	MIC/MBC (mg/ml)	Microorganisms											
		Gram-positive						Gram-negative					
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> (ESBL)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i> (MDR)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>
S4	MIC	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	NA	0.4
P4	MIC	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4
	MBC	NA	NA	NA	NA	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	NA	NA
L4	MIC	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4
	MBC	0.4	0.4	NA	NA	NA	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	NA	0.4

NA = non active

ตารางที่ 15 การยับยั้งเชื้อโรคต่างๆ ที่ทดสอบด้วยวิธี broth microdilution method ของสารสกัด L, E, S, P, T, F และ C ซึ่งเป็นส่วนต่างๆของลำพูที่สกัดด้วยการหมักด้วยเมธานอล

Samples ^b	MIC/MBC (mg/ml)	Test bacterial strains										
		Gram-positive						Gram-negative				
		Drug-sensitive			Drug-resistant			Drug-sensitive		Drug-resistant		
		<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> (ESBL)	<i>P. aeruginosa</i> (MDR)	<i>A. baumannii</i>
L	MIC	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4
	MBC	NA	0.2	0.4	0.4	NA	NA	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4
E	MIC	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4
	MBC	NA	0.2	NA	NA	NA	NA	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4
S	MIC	0.4	0.2	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4
	MBC	NA	0.2	NA	NA	NA	NA	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4
P	MIC	0.4	0.2	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
T	MIC	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4
F	MIC	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
C	MIC	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	MBC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4
	Chloram ^c	0.0015	0.0015	0.0062	0.0062	0.0062	0.0062	0.0062	0.025	0.0062	0.1	NA
	CLSI ^d	-	-	0.002-0.016	-	-	-	0.002-0.008	-	-	-	-

^aData are shown as the representative values from one trial, and represent that seen from 3 replications per trial and 3 independent trials.

^bSamples are the ethanolic extracts from the leaf (L), pneumatophore (E), seed (S), calyx (P), stamen (T), fruit (F) and calyx (C) of the crabapple mangrove tree

^cChloram: Chloramphenical

^dCLSI: Clinical Laboratory Standard Institute

สรุป

สรุปได้ว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และสามารถฆ่าเชื้อแกรมลบได้ดีกว่าแกรมบวก สารที่สกัดด้วยเมธานอลจากส่วนต่างๆของลำพูแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรคแบคทีเรียทั้งเชื้อแกรมบวกและลบ สารสกัดจากใบที่สกัดด้วยเมธานอลแสดงฤทธิ์ได้ดีและสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาคือ MDR Gram-positive (MRSA) และ Gram-negative pathogens (ESBL-producing *E. coli*, MDR-*P. aeruginosa* and the PDR- *A. baumannii*)

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่องปากและความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบาจากเนื้อเยื่อเหงือกของสารสกัดลำพู

1 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก

1. ทดสอบความไวของจุลินทรีย์

1.1 การเตรียมตัวอย่าง เตรียมสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยละลายด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) ทั้งนี้สารสกัดจากลำพูที่นำมาใช้ในการทดสอบได้แก่

- สารสกัดจากส่วนใบลำพูที่สกัดด้วยการหมักด้วยเมธานอล (L0)
- สารสกัดจากส่วนใบลำพูที่สกัดด้วยการผ่าน soxhet ด้วยเมธานอล (L4)
- สารสกัดจากที่หุ้มดอกลำพูที่สกัดด้วยการหมักด้วยเมธานอล (P0)
- สารสกัดจากที่หุ้มดอกลำพูที่สกัดด้วยการผ่าน soxhlet ด้วยเมธานอล (P4)
- สารสกัดจากเมล็ดลำพูที่สกัดด้วยการหมักด้วยเมธานอล (S0)
- สารสกัดจากเมล็ดลำพูที่สกัดด้วยการผ่าน soxhlet ด้วยเมธานอล (S4)

1.2 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบกับแบคทีเรียที่เป็น normal flora ในช่องปาก ได้แก่ *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus milleri* group, *Streptococcus salivarius* NO1, *Streptococcus salivarius* NO2, *Streptococcus mitis* โดยมีเชื้อกลุ่มก่อโรค ได้แก่ *Streptococcus mutans* ATCC 27175

1.3 วิธีการ Disk diffusion susceptibility testing ตามวิธีของ NCCLS¹ โดยใช้เชื้อใน Mueller Hinton broth ที่มีความขุ่น 0.10 ที่ความยาวคลื่น 625 nm ทำการ spread บน Mueller Hinton agar ทิ้งไว้ให้ absorb นาน 10 นาที ก่อนที่จะวางแผ่น disks ที่มีสารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ โดยใช้ negative control :DMSO 10 ไมโครลิตร และ positive control คือ vancomycin 30 ไมโครกรัม/disc ใช้วิธีนี้เพื่อคัดเลือกตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ก่อนที่จะนำไปหาค่า MIC โดยวิธี Broth microdilution method ต่อไป

1.4 การทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารทดสอบ ทำวิธี Broth microdilution testing ตามวิธีของ NCCLS² การอ่านผล อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นค่า MIC โดยอ่านความขุ่นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบความขุ่นกับ positive control ที่มีเชื้อ (ไม่มีสารทดสอบ) โดยอ่านค่าความเข้มข้นของสารที่มีค่าความขุ่นต่ำกว่าความขุ่นของหลุม positive control ≥ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นค่า MIC

ผลการทดสอบและอภิปรายผล

จากการทดสอบสารตัวอย่างทั้งหมดด้วยวิธี disk diffusion พบว่าสารไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mitis* และ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 โดยสารสกัดทุกชนิดมีผลยับยั้งเชื้อ *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus milleri* group ยกเว้นสาร S4 สำหรับสารสกัดทุกชนิดมีผลยับยั้งเชื้อ *Streptococcus salivarius* NO1, *Streptococcus salivarius* NO2 (ตารางที่ 16)

จากการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution method สารสกัดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในช่องปากกลุ่มที่เป็นเชื้อประจำถิ่นส่วนใหญ่ที่ระดับความเข้มข้น $>1000 \mu\text{g/ml}$ ยกเว้น P0 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus salivarius* NO1, *Streptococcus salivarius* NO2 โดยมีค่า MIC ที่ระดับความเข้มข้น 125 และ $62.5 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สำหรับ S0 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus salivarius* NO2 โดยมีค่า MIC ที่ระดับความเข้มข้น $1000 \mu\text{g/ml}$ สำหรับ L0 และ L4 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus salivarius* NO2 โดยมีค่า MIC ที่ระดับความเข้มข้น 3.9063 และ $62.5 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 16 การยับยั้งเชื้อโรคของสารสกัดจากลำพูด้วยการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion

Sample	Zone of Inhibition (mm)					
	<i>S. milleri</i> group	<i>S. mitis</i>	<i>S. salivarius</i> NO1	<i>S. salivarius</i> NO2	<i>S. mutans</i> ATCC 27175	<i>S. sobrinus</i>
L0	11	< 8	14	16	< 8	13
L4	16	< 8	14	17	< 8	15
P0	12	< 8	14	16	< 8	13
P4	10	< 8	14	15	< 8	12
S0	11	< 8	15	16	< 8	12
S4	< 8	< 8	10	11	< 8	<8

*Note: ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทดสอบ 1000 ไมโครกรัมต่อแผ่นดิสก์

ตารางที่ 17 ค่า MIC การยับยั้งเชื้อโรคของสารสกัดจากลำพูจากการทดสอบวิธี Microdilution method

Sample	MIC (µg/ml)					
	<i>S. milleri</i> group	<i>S. mitis</i>	<i>S. salivarius</i> N01	<i>S. salivarius</i> N02	<i>S. mutans</i> ATCC 27175	<i>S. sobrinus</i>
L0	> 1000	> 1000	1000	3.9063	> 1000	> 1000
L4	> 1000	> 1000	> 1000	62.50	> 1000	> 1000
P0	> 1000	> 1000	125	62.50	> 1000	> 1000
P4	> 1000	> 1000	> 1000	125.00	> 1000	> 1000
S0	> 1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000
S4	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000

นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นของสารสกัดลำพู คือ ส่วนที่หุ้มดอกที่สกัดด้วยเมธานอลด้วยการหมัก (P0) และผ่าน soxhlet ในส่วนเมธานอล (P0 hM หรือ P4) และ ส่วนเมล็ดที่สกัดด้วยเมธานอลด้วยการหมัก (S0)

การทดสอบฤทธิ์ Anti-leptospira

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์อ้างอิง
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วย

วิธีทดสอบ

- 1) เตรียมสารสกัดจากลำพูส่วนต่างๆ คือ PO, PO hM และ SO โดยเจือจางด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5% ให้ได้สารสกัดในความเข้มข้นในช่วง 5 mg/mL-0.01mg/mL
- 2) เชื้อจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ: *Leptospira interrogans*
สายพันธุ์อ้างอิง 13 สายพันธุ์ คือ : Serogroup: Australis, Autumnalis, Canicola, Cynopteri, Bataviae, Javanica, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Hebdomadis, Panama, Pyrogenes, Sejroe, Shermanii รวมทั้ง Clinical isolates จำนวน 5 สายพันธุ์
- 3) วิธีที่ใช้ในการทดสอบ:
Broth microdilution
Broth macrodilution Technique
- 4) วิเคราะห์ข้อมูล
คำนวณค่า Minimal bacteriocidal concentration (MBC) 90/50
Minimal inhibition concentration (MIC) 90/50

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดังตารางที่ 18 โดย สาร PO และ SO ยับยั้งเชื้อได้ทั้งทั้งสองกลุ่ม แต่ P4 ไม่ยับยั้งเชื้อใดเลย ทั้งนี้แสดงว่าสารสกัดลำพูสองชนิดแรกออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกลุ่มนี้ได้บางสายพันธุ์

ตารางที่ 18 การยับยั้งเชื้อ *Leptospira interrogans* ของสารสกัดจากลำพู

สมุนไพร	Reference strains				Clinical isolates			
	ฤทธิ์ยับยั้ง		ฤทธิ์ทำลายเชื้อ		ฤทธิ์ยับยั้ง		ฤทธิ์ทำลายเชื้อ	
PO	3/13	1 mg/mL	0/13	1 mg/mL	3/5	1.5 mg/mL	1/5	1.25 mg/mL
SO	5/13	1 mg/mL	1/13	1 mg/mL	5/5	1.75 mg/mL	2/5	1.66 mg/mL
P4	0/5	2.5 mg/mL	0/5	2.5 mg/mL	0/5	2.5 mg/mL	0/5	2.5 mg/mL

ตารางที่ 19 ฤทธิ์ทำลายเชื้อ (MBC) และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ (MIC) ของสารสกัดจากลำพู

No.	สารสกัด	MIC	MBC
1	PO	1.1	1.3
2	SO	1	1
3	P4	1.3	1.3

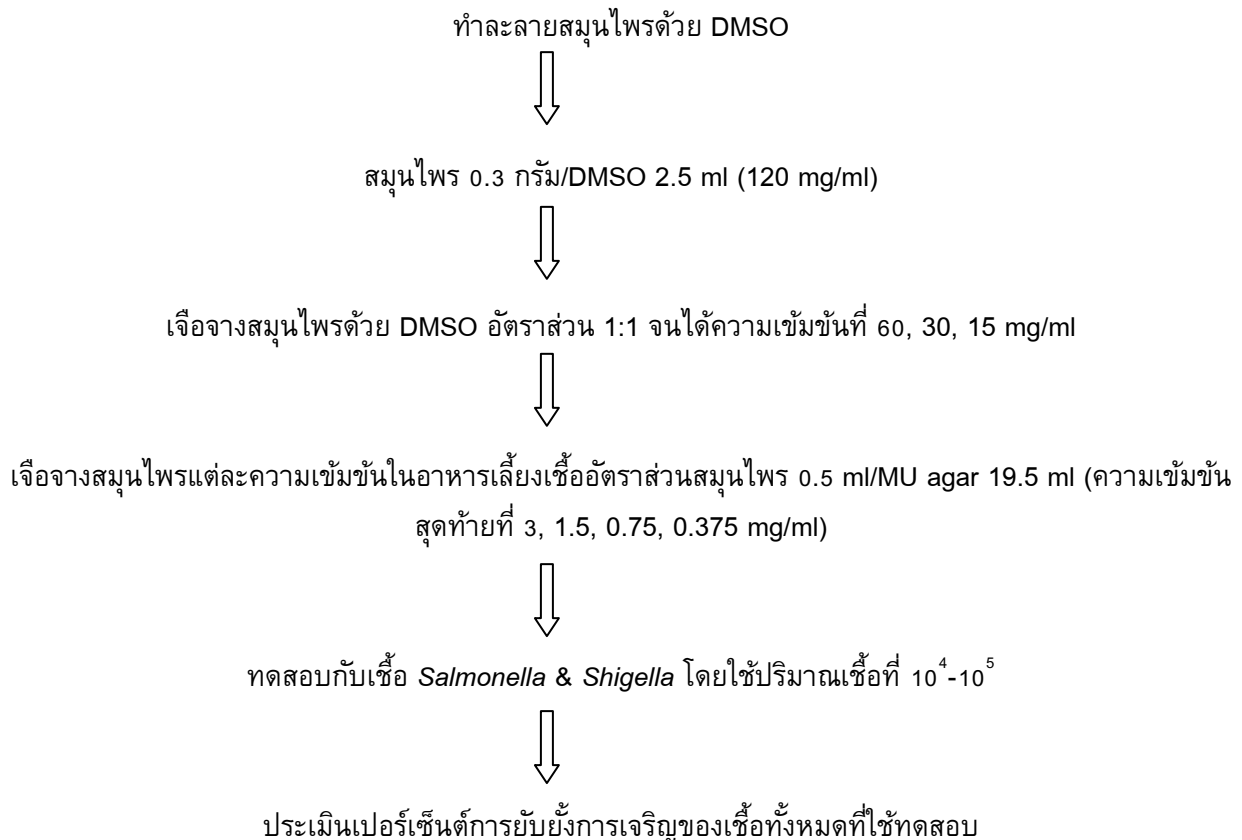
การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในการต้านเชื้อ *Salmonella* และ *Shigella*

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *Salmonella* และ *Shigella*

วิธีทดสอบ

ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรด้วยเทคนิค agar dilution



ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

สารสกัดที่สามารถยับยั้ง *Salmonella* และ *Shigella* ที่ความเข้มข้น 3 mg/ml โดย

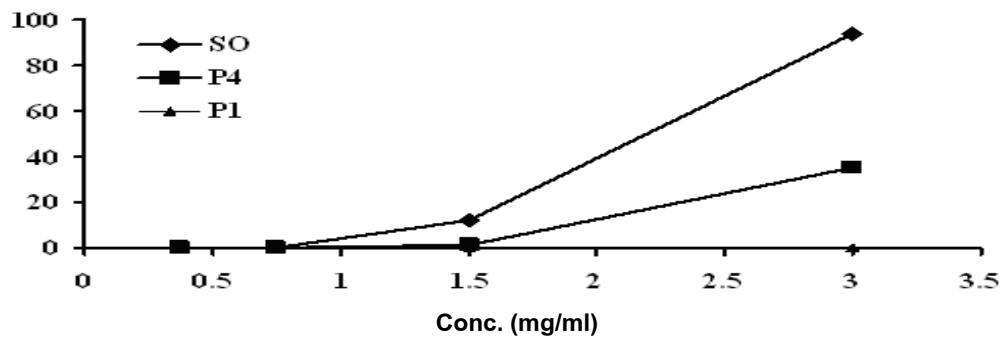
SO ยับยั้งเชื้อ *Salmonella* 94 % / *Shigella* 88 %

P4 ยับยั้งเชื้อ *Salmonella* 85.3 % / *Shigella* 100 %

P1 ไม่สามารถยับยั้งได้

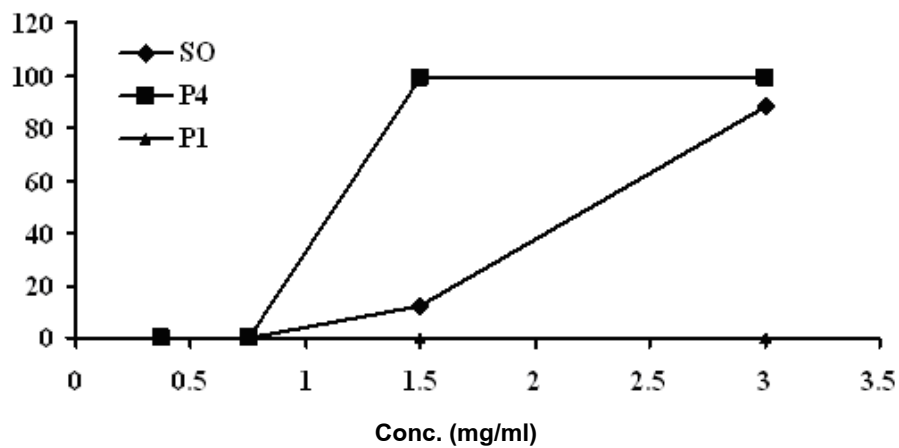
อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นดังกล่าวค่อนข้างสูงมากถึงจะทำให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงดังกล่าวได้ โดยฤทธิ์ดังกล่าวขึ้นกับความเข้มข้นของสารทดสอบ

%Inhibition



รูปที่ 2 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรต่อเชื้อ *Salmonella* 100 สายพันธุ์ (สมุนไพร SO, P4 และ P1 ที่ 3 mg/ml มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่ทดสอบทั้งหมดเป็น 94, 35 และ 0 % ตามลำดับ)

%Inhibition



รูปที่ 3 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อเชื้อ *Shigella* 100 สายพันธุ์ (สมุนไพร P4, SO และ P1 ที่ 3 mg/ml มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่ทดสอบทั้งหมดเป็น 99, 88 และ 0% ตามลำดับ)

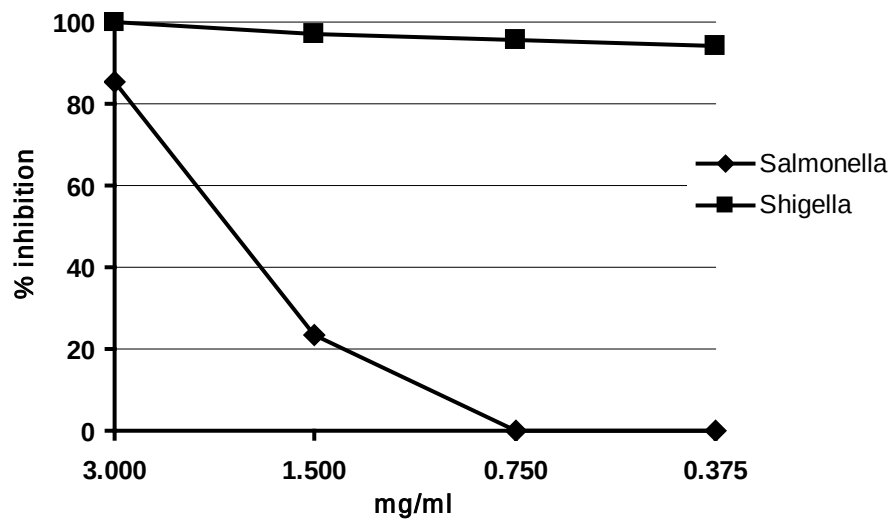
ตารางที่ 20 ฤทธิ์ของ P4 ต่อเชื้อ *Salmonella* & *Shigella* 34 สายพันธุ์

Salmonella

สมุนไพร	ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจากการทดสอบกับเชื้อ 34 สายพันธุ์ (%)			
	3 mg/ml	1.5 mg/ml	0.75 mg/ml	0.375 mg/ml
P4	85.3	23.5	0	0

Shigella

สมุนไพร	ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจากการทดสอบกับเชื้อ 34 สายพันธุ์ (%)			
	3 mg/ml	1.5 mg/ml	0.75 mg/ml	0.375 mg/ml
P4	100	97.1	94.1	94.1



รูปที่ 4ฤทธิ์ของสารสกัด P4 ต่อเชื้อ *Salmonella* & *Shigella* 34 สายพันธุ์

- ที่ 3 mg/ml สามารถยับยั้ง *Salmonella* และ *Shigella* ได้ 85.3% และ 100% ตามลำดับ
- 1.5 mg/ml คือความเข้มข้นสุดท้ายที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* ได้ 23.5%
- ที่ 0.375 mg/ml คือความเข้มข้นสุดท้ายที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Shigella* ได้ 94.1%

การทดสอบฤทธิ์สารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อวัณโรค

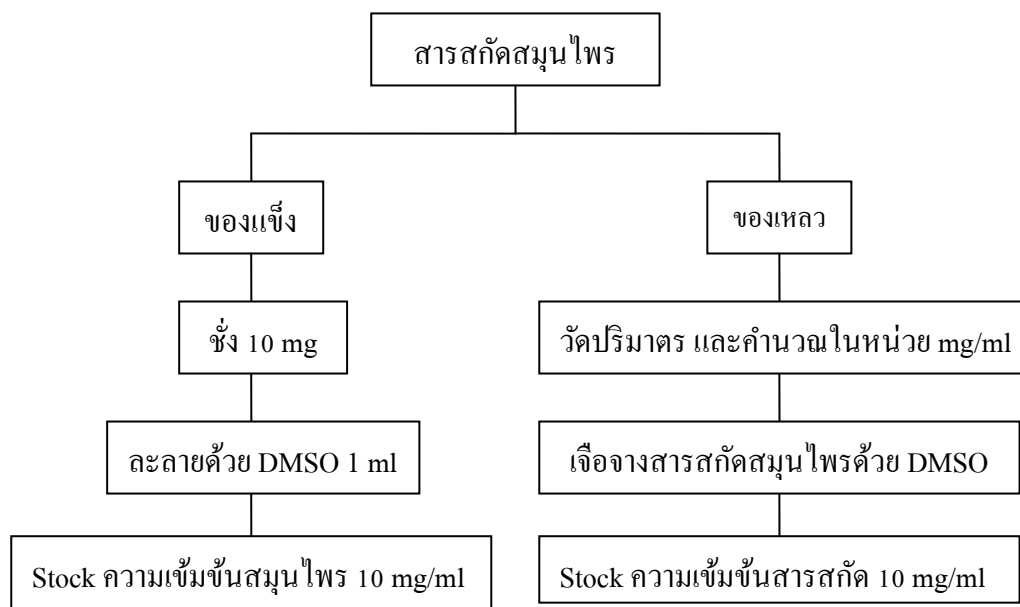
วัตถุประสงค์

1. ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) ของสารสกัดจากลำพู
2. ศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากลำพูที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

วัสดุอุปกรณ์ วิธีการ

1. สารสกัดสมุนไพร
2. สารเปรียบเทียบซึ่งเป็น Anti-TB drug คือ Isoniazid (INH) และ Rifampin (RIE)
3. เชื้อที่ใช้ทดสอบ *M. tuberculosis* H37Ra
Clinical isolates: Sensitive-, MDR-strains
4. Antimycobacterial assays ทั้งนี้อ้างอิงวิธีการทดสอบจาก Suksamrarn (1995, 2003, 2004)

การเตรียมสารละลายสมุนไพร



Antimycobacterial assay (Anti-tuberculosis assay)

1. Microplate Alamar Blue Assay (MABA)
Rapid screening method
2. Rapid liquid based culturing (Becton MGIT 960 system)
Quantitative detection of bacterial growth
3. Conventional solid based culturing
Agar proportional test

Microplate Alamar Blue Assay (MABA)

(Resazurin reduction test)

ALAMARBLUE™: (Resazurin fluorescence dye)

Fluorometric/colorimetric growth indicator

- ตรวจการมีชีวิตโดยวิเคราะห์ขบวนการ Redox ที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่มีชีวิตทำให้ Alamar Blue เปลี่ยนแปลงจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูอ่อนเรืองแสง และสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยตาเปล่า หรือวัดปริมาณสารเรืองแสงได้ด้วย Fluorescence detector

Resazurin (Blue and nonfluorescent)
↓
Resorufin (Pink and highly fluorescent)

Preparing of *M. tuberculosis* inoculum

Number of *M. tuberculosis* cells (H37Ra)

M. tuberculosis cell density (MacFarland No.1)

↓ 10 folds dilution
 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ..., 10^{-6} of cell density

↓ 100 ul of each cell dilutions

↓ 7H11 Agar plate count culture

M. tuberculosis cell density MacFarland No. 1 มีจำนวนเชื้อวัณโรค *M. tuberculosis* H₃₇Ra ที่เจริญบนอาหาร 7H11 ประมาณ 4.6×10^6 CFU

Time	Mc1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	Neg
4 hrs						
24 hrs						
4 days						
5 days						
7 days						

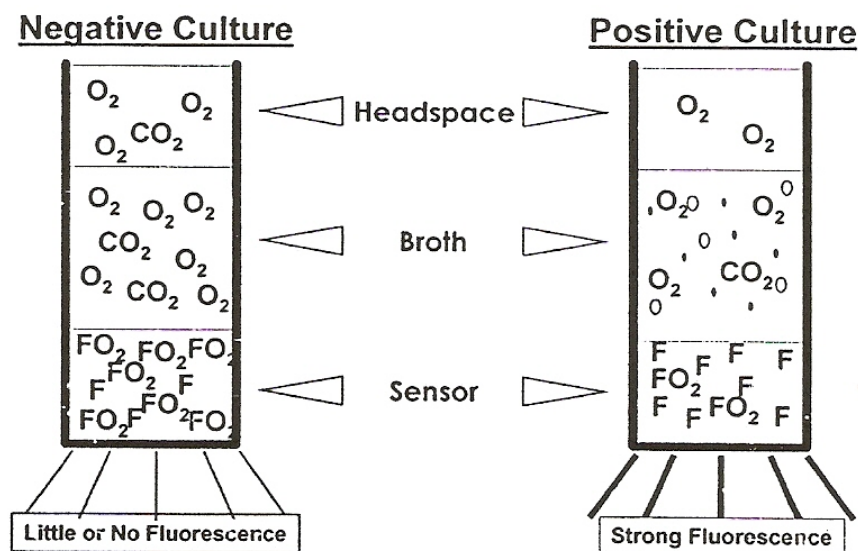
รูปที่ 5 Microplate Alamar Blue Assay (MABA): จำนวนเซลล์และการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสีอ่านผลวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยปฏิกิริยาของ Alamar blue

* Cell density ของ Mac No.1 ภายใน 24 ชั่วโมง

* Cell density ของ Mac No.1 เจือจาง 10 เท่า อ่านผลวันที่ 7

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากภาพรวมการทดสอบที่ได้และแสดงใน ตารางที่ 21-23 และรูปที่ 7 สมุนไพรที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีผลยับยั้งเชื้อวัณโรค (4.6×10^{-5}) เมื่อเทียบกับฤทธิ์ของยา INH และ RIF ในการศึกษาที่ใช้เครื่อง BACTEC™ MGIT™ 960 System ซึ่งใช้วัดสำหรับ Mycobacteria Detection and Susceptibility Testing



รูปที่ 6 BACTEC™ MGIT™ 960 Indicator System

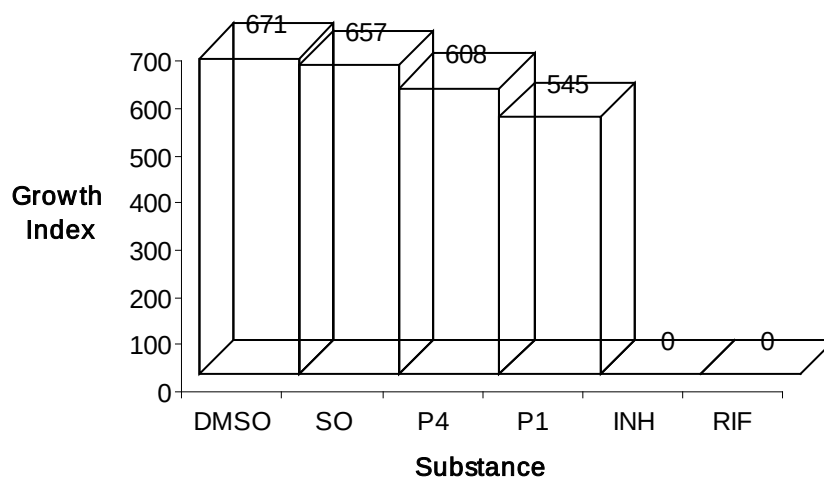
ตารางที่ 21 Plate count colony

วันที่เลี้ยงใน MGIT	CFU	Growth Unit
0	5.7×10^6	0
3	1.0×10^7	367.0
4	14.3×10^7	1345.5
5	3.79×10^7	1533.0

ตารางที่ 22 การยับยั้งเชื้อด้วย BACTEC MGIT 960 : Antimycobacterial activity

M. tuberculosis H37Ra

Medicinal plants 100 ug/ml	Growth Index (inhibition)	
	2 days	3 days
1. DMSO	4.5	671
2. SO	6.5	657
3. P4	7	608
4. P1	3.5	545



รูปที่ 7ฤทธิ์สารสกัดลำพู (100 ug/ml) ต่อการต้านเชื้อวัณโรค *M. tuberculosis* H37Ra

ตารางที่ 23 การยับยั้งเชื้อวัณโรค (TB*) ของสารสกัดจากลำพู

Extract	% inhibition
SO	5.1
P1	7.0
P4	21.3

* *M. tuberculosis* H37Ra / ใช้ความเข้มข้นสมุนไพรในการทดสอบ 100 mg/ml

สมุนไพรต้านแบคทีเรียสาเหตุของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ และโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล

Antimicrobial Activity of Medicinal Plant against Bacteria, the Cause of Respiratory Tract Hospital Infection

วัตถุประสงค์

1. ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสาเหตุของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ และโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลของสารสกัดจากลำพู
2. ศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากลำพูที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสาเหตุของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ และโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล

วัสดุอุปกรณ์ วิธีการ

1. สารสกัดสมุนไพร
2. สารเปรียบเทียบซึ่งเป็น Anti-TB drug คือ Isoniazid (INH) และ Rifampin (RIE)
3. เชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้

Respiratory tract infection

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	(25) penicillin R (19), I (5)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	(50)
<i>Haemophilus influenzae</i>	(50) serotype: b, not b
<i>Neisseria meningitidis</i>	(50) serogroup A, B, C, Y, W135
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	(51)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	(50)

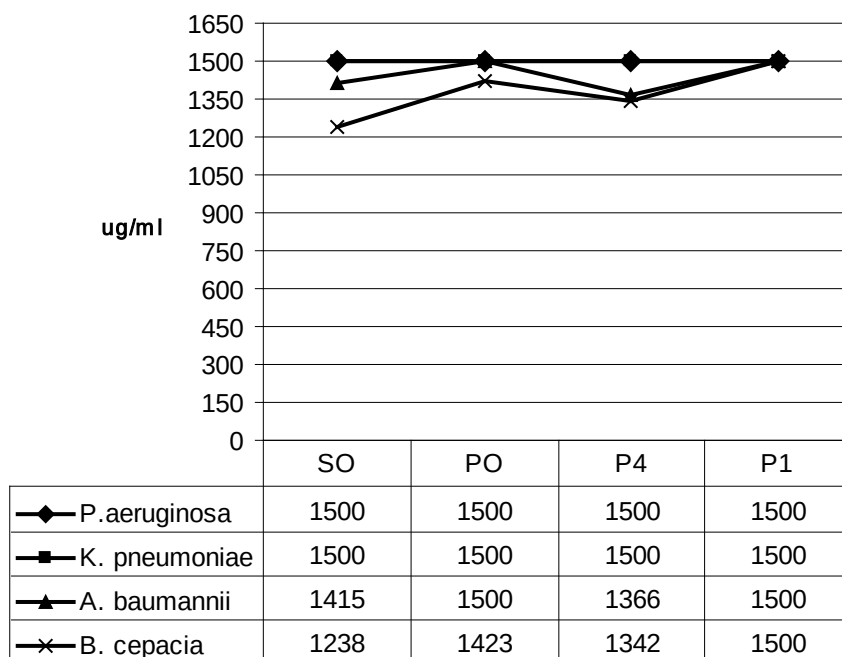
Hospital Infection

<i>Acinetobacter baumannii</i>	(50) penicillin R (19), I (5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(51)
<i>Burkholderia cepacia</i>	(42) serotype: b, not b
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(51) ESBL pos (36), ESBL neg (15)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(50) MRSA, MSSA

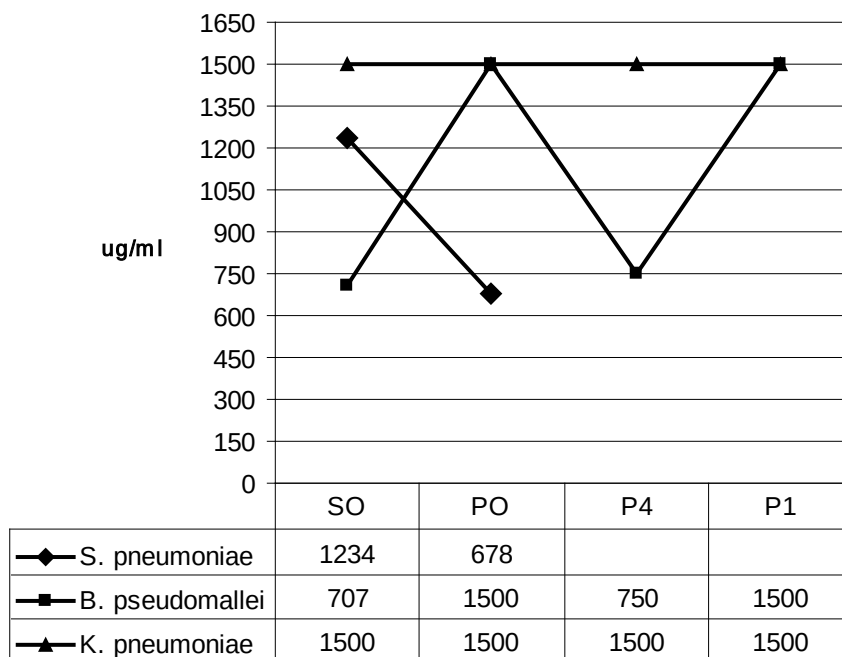
การเตรียมสารละลายสมุนไพร โดยการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยตัวเลขในวงเล็บเป็นจำนวนสายพันธุ์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นๆ

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากลำพูแต่ละชนิดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและแบคทีเรียสาเหตุของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจแตกต่างกัน ทั้งนี้แสดงผลในรูปที่ 8 และ 9 ตามลำดับ โดยค่า MIC₉₀ ของสารสกัดจากลำพูต่อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล และแบคทีเรียสาเหตุของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ ทดสอบในช่วงความเข้มข้น 1050-1500 ug/ml และ 375-1500 ug/ml ตามลำดับ โดยค่า MIC ต่อเชื้อโรคในภาพรวมคือ 0.06-128 ug/ml



รูปที่ 8 MIC₉₀ ของสารสกัดต่อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลทดสอบในช่วง 1050-1500 ug/ml



รูปที่ 9 MIC₉₀ ของสารสกัดต่อแบคทีเรียสาเหตุของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจทดสอบในช่วง 375-1500 ug/ml

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดลำพูที่ใช้ในการทดลองนี้มีการปนเปื้อนเชื้อโรคในระดับต่ำซึ่งน่าจะเนื่องมาจากสารได้ผ่านการหมักในสารทำละลายมาก่อนทำให้ทำลายเชื้อไปได้ โดยไม่พบเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ได้แก่ *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. ในปริมาณตัวอย่าง 10 กรัม จากการศึกษาดังวิธี agar diffusion สารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ได้จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH ทำให้เกิด clear zone ได้กับเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* สำหรับ gallic acid ทำให้เกิด clear zone เฉพาะเชื้อ *S. aureus* วิธีการลงเชื้อที่ต่างกัน (spread plate, swab test และ over layer) ในบางสารทดสอบจะให้ผลที่ต่างกัน สำหรับเชื้อ *S. aureus* พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ได้จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ ส่วน gallic acid มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ สำหรับเชื้อ *C. albicans* พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ได้จากการผ่าน soxhlet โดยใช้ MeOH มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ สารสกัดจากแต่ละส่วนของลำพูที่สกัดด้วยการหมักกับเมธานอลมีความหลากหลายและให้ขอบเขตในการฆ่าเชื้อแตกต่างกันไปด้วย โดยพบว่าสารสกัดจากหลายส่วนของลำพูมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ จากผลการทดสอบด้วยวิธี broth dilution พบว่าสารสกัดที่เตรียมด้วยสารทำละลายที่มีความเป็นขี้ดต่ำกว่าเมธานอลในการทดลองนี้ไม่ค่อยแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรค ขณะที่สารสกัดที่ได้จากการหมักด้วยเมธานอลมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบแกรมลบได้ดีกว่าแกรมบวกเล็กน้อย และสามารถฆ่าเชื้อทดสอบแกรมลบได้ดี ในขณะที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบแกรมบวกได้ ฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่เป็นแบบการฆ่าเชื้อโรค ขณะที่ฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตสำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก สำหรับสารสกัดเมธานอลภายหลังที่ได้ที่ผ่านการสกัดด้วย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และ ethyl acetate มาก่อนแล้ว ให้ผลคล้ายกับการสกัดด้วยการหมักเมธานอลในสารสกัดส่วนใหญ่ที่สกัดจากเมล็ดและที่หุ้มดอก สำหรับตัวอย่างสารสกัดลำพูที่สกัดด้วยการหมักด้วยเมธานอล คือ L (ใบ), E (หน่อ), S (เมล็ด), P (ที่หุ้มดอก), T (เกสร), F (เนื้อผล) และ C (เปลือก) ทั้งหมดมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแกรมบวกและแกรมลบได้ แต่มีสารออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ แกรมลบ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ESBL, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* (multidrug resistance), *Klebsiella pneumoniae* และ *Acinetobacter baumannii* ได้ ยกเว้นตัวอย่างสารสกัดจากเนื้อผล (F) ไม่สามารถฆ่า *Klebsiella pneumoniae* ได้ สำหรับฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทดสอบแกรมบวก พบว่าตัวอย่างสารสกัดจากใบ (L) สามารถฆ่าเชื้อแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ได้ทั้งสายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์ดื้อยา ในขณะที่ตัวอย่างสารสกัดอื่นๆ ไม่สามารถฆ่าเชื้อแกรมบวกได้ ค่า MIC ของสารที่สกัดลำพูทั้ง 7 ส่วนที่สกัดด้วยเมธานอล แต่ MBC มีค่าที่แตกต่างกันไป ทั้งนี้พบฤทธิ์การฆ่าเชื้อกลุ่มแกรมลบได้ทั้งหมด ทั้งเชื้อที่ไวต่อยา (*E. coli* and *P. aeruginosa*) และกลุ่มที่ดื้อยา (MDR (ESBL-producing *E. coli*, MDR-*P. aeruginosa*, and PDR-*A. baumannii*) strains)) อย่างไรก็ตามพบฤทธิ์ฆ่าเชื้อแกรมบวกเฉพาะจากสารสกัดของใบลำพูต่อเชื้อที่ดื้อยา และสารสกัดจากใบ เมล็ด และรากอากาศ ลำพู ต่อเชื้อ *B. megaterium* และ *S. aureus* แต่ไม่มีฤทธิ์ต่อ *B. subtilis* ชนิดเชื้อที่ดื้อต่อยา และเชื้อที่ไวต่อยาตามลำดับ สำหรับส่วนที่เหลือจะพบเฉพาะการแสดงฤทธิ์การยับยั้งการเติบโตต่อเชื้อแกรมบวก สารสกัดจากลำพูส่วนใหญ่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในช่องปากกลุ่มที่เป็นเชื้อประจำถิ่นส่วนใหญ่ที่ระดับความเข้มข้น >1000 µg/ml ส่วนที่หุ้มดอกที่สกัดด้วยเมธานอลด้วยการหมัก (PO) และผ่าน soxhlet ในส่วนเมธานอล PO hM และ ส่วนเมล็ดที่สกัดด้วยเมธานอลด้วยการหมัก (SO) มีผลต่อเชื้อ *Leptospira interrogans*, *Salmonella* และ *Shigella* แบบขึ้นกับความเข้มข้นสารสกัด แต่สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีผลยับยั้งเชื้อวัณโรคหรือยับยั้งได้น้อยมากต่อเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) H37Ra สำหรับการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจและโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลของสารสกัดจากลำพูพบว่ามีค่า MIC ค่อนข้างสูง

กิตติกรรมประกาศ: ขอขอบคุณ คุณ วิมล เพชรกาญจนางค์ ปรด.(เทคนิคการแพทย์) คุณ ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ วทม.(อายุรศาสตร์เขตร้อน) คุณ วิไล แสงปาก วทบ.(เทคโนโลยีชีววิทยา) ในคำแนะนำในการทดสอบฤทธิ์ Anti-leptospira ขอขอบคุณ คุณ อรุณ ป่างตระกูลนนท์ นางสาวศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ นายชัยวัฒน์ พูลศรีภักดิ์ และ นาง กรวรรณ นพพรพรรณ จาก WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center ในคำแนะนำในการทดสอบฤทธิ์ ของสารสกัดในการต้านเชื้อ *Salmonella* และ *Shigella* ขอขอบคุณ คุณ เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ ฝ่ายไมโครแบคทีเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในคำแนะนำในการทดสอบฤทธิ์ สารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อวัณโรค ขอขอบคุณ คุณ สุรางค์ เตชศิริเลิศ, ประภาวดี ดิษยาธิคม, ปิตินน พลวิชัย, สมใจ ไผ่สมบูรณ์, เสาวลักษณ์ ศรีภักดี, ดิสพงษ์ วุฒิเวทย์, อรทัย ทองมะลิ, สไบ อินทโชติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในคำแนะนำในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสาเหตุของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ และโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล รวมทั้งขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิง ดร. เยวภา พงษ์สุวรรณ และ นายแพทย์ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บรรณานุกรม

- รัชชัย และคณะ 2549 รายงานการวิจัยเรื่อง พืชเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ไทยบางชนิดและการเตรียมในรูปแบบเจลและครีม โครงการพัฒนายาจากสมุนไพรไทยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
- Arias ME, Gómez JD, Cudmani N, Vattuone MA, Isla MI. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extract of *Acacia aroma* Gill ex Hook et. Arn Life Sci 2004;75:191-202.
- Bloomfield SF, Baired R, Leak RE, Leech R. Microbial quality assurance in pharmaceuticals, cosmetics and toiletries. Ellis Horwood Lim., England, 1988.
- Casey JT, O'Cleirigh C, Walsh PK, O'Shea DG. Development of a robust microtiter plate-based assay method for assessment of bioactivity. J. Microbiological method. 2004;58:327-334.
- CLSI 2010 (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth information supplement. M100-S20. Wayne, PA; 2010.
- Collins CH, Lyne PM, Grange JM. Collins and Lyne's Microbiological methods, 6th ed. Butterworths&Co. (Publishers) Ltd., 1989.
- Denyer SP, Baird RM. Guide to microbiological control in pharmaceuticals. Ellis Horwood Limited, 1990
- Kudi AC, Uhoh JU, Eduvie LO, Gefu J. Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. J Ethnopharmacol 1999;67:225-8.
- Lorian V. Antibiotics in Laboratory Medicine 3rd ed. Williams&Wilkins, Maryland. 1991, pp1-257.
- Medlicott NJ, Rathbone MJ, Tucker IG, Holborow DW. Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket. Adv Drug Deliv Rev. 1994;13:181-203.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests-Sixth Edition: Approved standard M2-A6, NCCLS, Wayne, PA, 1997.

- National Committee For Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M7-A5. 5th edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 1985;1:1-32.
- Palombo EA, Semple SJ. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2001;77:151-7.
- Parekh J, Karathia N, Chanda S. Screening of some traditionally used medicinal plants for potential antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2006;68:832-4.
- Paul C, Arnold JV, Dirk VB, Louis M. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept. *J Ethnopharmacology*. 2006:(Article in Press).
- Paz EA, Cerdeiras MP, Fernandez J, Ferreira F, Moyna P, Soubes M, et al. Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 1995;45:67-70.
- Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontology* 1997;2000:144-157.
- Sader HS, Streit JM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated from European medical centres: results of the Daptomycin Surveillance Programme 92002-2004). *Clinical Microbio Infect* 12(9):844-52.
- Scherrer R, Gerhardt P. Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *J Bacteriol* 1971;107:718-35.
- Schwach-Abdellaoui K, Vivien-Castioni N, Gurny R. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal disease. *Eur J Pharm Biopharm*. 2000;50:83-99.
- Suksamrarn S, Suwannapoch N, Phakhodee W, Thanuhiranlert J, Ratananukul P, Chimnoi N, Suksamrarn A. Antimycobacterial activity of *Phenylated Xanthones* from fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull* 2003;51:853-857.
- Suksamrarn A, Poomsing P, Aroonrerk N, Punjanon T, Suksamrarn S, Kongkun S. Antimycobacterial and antioxidant flavones from *Limnophila geoffrayi*. *Arch Phar Res*. 2003;26:816-20.
- Suksamrarn A, Chotipong A, Suavansri T, Boongird S, Timsuksai P, Vimuttipong S, Chuaynugul A. Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*. *Arch Pharm Res*. 2004; 507-511.
- Vlietinck AJ, Van Hoof L, Totte J, Lasure A, Vanden BD, Rwangabo PC, et al. Screening of a hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. *J Ethnopharmacol* 1995;46:31-47.

ประวัติและผลงานของผู้วิจัย

ประวัติและผลงานของผู้วิจัย

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย). นางสาวจันทนา เวสพันธ์
(ภาษาอังกฤษ). Ms. Chantana Wessapan

2. วัน เดือน ปีเกิด 14 มีนาคม 2498

3. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานและที่อยู่ติดต่อได้

สถานที่ทำงาน ภาควิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวัง
สนามจันทร์ นครปฐม 73000 โทรศัพท์: 034 255800 โทรสาร: 034

ที่อยู่ปัจจุบัน 99/5 ถนนสวนตะไคร้ ตำบลสนามจันทร์ อำเภอเมือง นครปฐม 73000

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาโท สาขา จุลชีววิทยา M.Sc. (Microbiology) 2529 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาตรี เภสัชศาสตรบัณฑิต 2522 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

6. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีที่ดำเนินการทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาโท

Antimicrobial preservative effectiveness of ophthalmic solutions used in Thailand.

7. สาขาวิชาที่มีเชี่ยวชาญ

☐ Biological activity research

☐ Microbial standard development of products

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

8.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

-โครงการพัฒนาตำรับยาสฟีนผสมสมุนไพรของชุมชนปฐมอโคก สนับสนุนจากกระทรวงสาธารณสุข 2547 (ผู้ร่วมวิจัย)

-โครงการพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์สุขภาพชุมชน : เครื่องสำอางผสมพืชสมุนไพร สนับสนุนจากกระทรวงสาธารณสุข 2548 (ผู้ร่วมวิจัย)

8.2 Publications

-

8.3 Proceedings and Presentations

1. Asavapichayont P , Kongmuang S, Wessapan C, Chinpaisal C, and Nawanopparatsakul S. (2004). "Development of herbal toothpaste formulation for a local community in Nakorn pathom province" The 20th FAPA Congress, Bangkok, Thailand, 30 November -3 December 2004.
2. Panomsuk S, Wessapan C, Ngawhirunpat T, and Opanasopit P. (2004). "The effect of preservatives and gamma radiation on the physical and chemical stability of gel bases." การประชุมวิชาการเภสัชกรรมประจำปี 2547, กรุงเทพฯ, 26-27 มีนาคม 2547.
3. Phaechamud T, Vesapun C, Kraisit P, et. al. (2004) "Ya Hom in dosage form of buccal tablet" The 10th World Congress on Clinical Nutrition. Phuket, Thailand, 30 Nov-3 Dec 2004.

8.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด (Anti-microbial activity of the extracts from fruit hull of mangosteen) เป็นโครงการย่อยที่ 5 จากชุดโครงการวิจัย การพัฒนาสารสกัดมาตรฐานจากเปลือกผลมังคุดและการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง งบประมาณสนับสนุนโครงการพัฒนายาจากสมุนไพรไทย 2549 (หัวหน้าโครงการย่อย) (ทำวิจัยลุล่วงประมาณ 50%)

ประวัติและผลงานของผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย). นางชูลี ยมภักดี
(ภาษาอังกฤษ). Mrs. Chulee Yompakdee
2. วัน เดือน ปีเกิด 18 พฤศจิกายน 2506
3. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและที่อยู่ติดต่อได้

สถานที่ทำงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ.พญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ

โทรศัพท์: 02-2185070 โทรสาร: 02-2527576

Email: chulee.y@chula.ac.th

ที่อยู่ปัจจุบัน

หอพักวิทยนิเวศน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ.พญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ

5. ประวัติการศึกษา

- ปริญญาเอก Ph.D. (Fermentation Technology), Osaka University, Japan, 2539
- ปริญญาโท วท.ม (จุลชีววิทยา), มหาวิทยาลัยมหิดล, 2531
- ปริญญาตรี วท.บ (เทคนิคการแพทย์), มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2528

6. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีที่ดำเนินการทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาโท

Monoclonal neutralizing neurotoxin of venom from snake *Naja naja siamensis* ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2531

- ระดับปริญญาเอก

A complex system for inorganic phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae* ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2539

7. สาขาวิชาที่มีเชี่ยวชาญ

- Molecular Biology of Yeasts
- Yeast Biotechnology
 - Development of yeast-based assay for drug discovery
 - Genetic Engineered yeast for biotechnology applications
- Molecular mechanism of bioactive compounds
- Biological activities of natural products

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

8.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Anti microbial resistant compound from *Zanthoxylum limonella* Alston.
- Biological activity of Pinostrobin from *Boesenbergia pandurata*, a calcium signaling pathway inhibitor in *Saccharomyces cerevisiae*
- Resazurin microtitre plate method for screening of anti-microbial resistance from Thai medicinal plants
- Microbial population and quality of Sato: comparison between the use of Loogpang and the mixed pure cultures isolated from the Loogpang
- Yeast species and their roles in aroma compound production in Sato

8.2 Publications

1. Tangjitjaroenkun J, Chavasiri W, Thunyaharn S, **Yompakdee C**. 2012. Bactericidal effects and time-kill studies of the essential oil from the fruits of *Zanthoxylum limonella* on multi-drug resistant bacteria. J Essent Oil Res. In press.
2. Boonkerd, S., **Yompakdee, C.**, Miyakawa, T. and Chavasiri, W. 2011. Screening of Thai medicinal plants for inhibitor of Ca^{2+} signaling using a yeast cell growth-based assay. RJPBCS. 2(2): 549-557.
3. Wangkangwan W, Boonkerd S, Chavasiri W, Sukapirom K, Pattanapanyasat K, Kongkathip N, Miyakawa T, **Yompakdee C**. (2009). Pinostrobin from *Boesenbergia pandurata* is an inhibitor of Ca^{2+} - signal-mediated cell-cycle regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73 (7): 1679-1682.

4. Mickle K L, Ramanathan S, Oliva A, Chaudari A, **Yompakdee C**, Scott D, Rosebrock A, Leatherwood J and Huberman J. (2007). Checkpoint- Independence of Most DNA Replication Origins in fission yeast. *BMC Molecular Biology* 8:112.

5. **Yompakdee C** and Huberman JA (2004). Enforcement of Late Replication Origin Firing by Clusters of Short G-rich DNA Sequences. *J Biol Chem.* 279(40):42337-42344.

6. **Yompakdee C**, Ogawa N, Harashima S, Oshima Y (1996). A putative membrane protein, Pho88p, involved in inorganic phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 251 : 580-590

7. **Yompakdee C**, Bun-ya M, Shikata K, Ogawa N, Harashima S, Oshima Y (1996). A putative new membrane protein, Pho86p, in the inorganic phosphate uptake system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 171: 41-47

8. Bun-ya M, Shikata K, Nakade S, **Yompakdee C**, Harashima S, Oshima Y (1996). Two new genes, *PHO86* and *PHO87*, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 29 : 344-351

9. Ogawa N, Noguchi K, Sawai H, Yamashita Y, **Yompakdee C**, Oshima Y (1995). Functional domains of Pho81p, an inhibitor of Pho85p protein kinase, in the transduction pathway of P_i signals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15 : 997-1004

10. **Masathien (Yompakdee) C**, Billings P, Ratananbanangkoon (1994). Production and characterization of monoclonal antibodies neutralizing the postsynaptic neurotoxin 3 From *Naja Kaouthia* Venom. *J Natural Toxins*, 3(2) : 155-163

11. **Masathien (Yompakdee) C**, Siripong P, Permmongkol C (1991) *In vitro* immunopotentiating effect(s) of *Acanthus ebracteatus* Vahl. roots on Human Lymphocytes. *Bull Fac Med Tech Mahidol Univ.* 15(2): 97-103

12. Srivatanakul P, Parkin DM, Sukarayodhin S, **Masathien (Yompakdee) C** (1989) Cholangiocarcinoma Association with *Opisthorchis viverrini* and CA19-9 Antigen. *Cancer Detection and Prevention* 14, Issue 1

13. **Masathien (Yompakdee) C** (1988) Carbohydrate Antigen 19-9 (CA19-9), A Review Article. *Thai Cancer Journal* 15(4): 163-170

8.3 Proceedings and Presentations

Suauam P, Yingyongnarongkul B, Miyakawa T, **Yompakdee C.** (2011) A coumarin compound from *Clausena harmandiana* (Pierre) possesses a calcium signal inhibiting activity in a mutant *Saccharomyces cerevisiae*. The 23rd Annual Meeting of the Thai Society of Biotechnology "Systems Biotechnology" February 1-2, 2012. Bangkok, Thailand.

Panthan B, Krungkrai J, **Yompakdee C.** (2011) *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase cannot functionally complement *Saccharomyces cerevisiae* lacking the carbonic anhydrase-like protein NCE103. The 37th Congress on Science and Technology (STT37) "Creative Sciences for Creating the Future" October 10-12, 2011. Bangkok, Thailand. (Oral Presentation)

Borphol S, Leepipatpiboon N, **Yompakdee C.** (2010) Influence of the selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains on the production of volatile compounds in Sato. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "International Conference on Biotechnology for Healthy Living" October 20-22, 2010. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand. (Oral presentation)

Suksawatamnuay S, Wangkangwan W, Palaga T, Chavasiri W, Miyakawa T, **Yompakdee C.** (2010) Pinostrobin Downregulate Swe1 kinase in Mutant Budding Yeast and Against Proliferation of Human Cancer Cell Lines. The 48th Kasetsart University Annual Conference. February 3-5, 2010. Kasetsart University, Bangkok, Thailand. (Oral presentation)

Yompakdee C, Suksawatamnuay S, Wangkangwan W, Palaga T, Chavasiri W, Miyakawa T. (2009) Pinostrobin from *Boesenbergia pandurata* inhibits Ca²⁺-signal mediated cell cycle regulation by inhibition of Swe1 kinase accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. 27th International Specialized Symposium on Yeast (ISSY27). August 26-29, Pasteur Institute, Paris, France. (Oral presentation)

Luangkhlaypho A, **Yompakdee C,** Pattaragulwanit K, Leepipatpiboon N. (2009) Analysis of fungal communities during sato fermentation process accessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. 21st Annual Conference of the Thai Society for Biotechnology (TSB2009), September 24 - 25, 2009 Queen Sirikit Convention Center, Bangkok, Thailand. (Oral presentation)

Suksawatamnuay S, Wangkangwan W, Palaga T, Boonkerd S, Chavasiri W, Miyakawa, T, **Yompakdee C.** (2008) Mode of action of pinostrobin from *Boesenbergia pandurata* that suppresses the Ca²⁺-signal mediated cell-cycle regulation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology "TSB 2008: Biotechnology for Global Care" October 14-17, 2008, Maha Sarakam, Thailand.

Taechavasonyoo A, Thaneeyavarn J, **Yompakdee C** (2007) Diversity and population dynamics of molds and yeasts during production of Sato, a traditional Thai rice wine from Nan province. Oral presentation at the 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology on TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness. October 9-12, Pathum Thani, Thailand. (Oral presentation)

Wangkangwan W, Chavasiri W, Kongkathip N, Miyakawa T, **Yompakdee C** (2006). Screening and some characterizations on bioactive compounds from Thai medicinal plants using yeast as a screening system: I. System optimizations. Poster presentation at the 18th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology on "Biotechnology: Benefits & Bioethics" November 2-3. Bangkok, Thailand.

Trinetra N, Thaniyavarn J, **Yompakdee C**, Leepipatpiboon N (2005) The effect of different rice strains on the flavor of Sato. Poster presentation at the 31st Congress on Science and Technology of Thailand (STT31) October 18-21, Nakhon Ratchasima, Thailand.

Yompakdee C, Huberman JA (2004). A Cis-Acting Late Replication Timing Sequence: A Key to the Mechanism(s) that Control Late Replication Timing. Poster presentation at the 5th Princess Chulabhorn International Science Congress: Evolving Genetic And Its Global Impact. August 16-20, 2004. Bangkok, Thailand.

Yompakdee C, Scott DL, Huberman JA (2003). Enforcing Late Replication Timing. Oral presented at Eukaryotic DNA Replication meeting at Cold Spring Harbor, September ??, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Yompakdee C, Scott DL, Huberman JA (2003). Enforcing Late Replication Timing. Oral presentation at Buffalo DNA Replication Group meeting. May ??, Roswell Park Cancer Institute, New York, USA.

Yompakdee C, Huberman JA. (2002). *Cis*-acting sequences that determine replication timing in *Schizosaccharomyces pombe* Poster presentation at Northeast Regional Yeast Meeting 2002, July12-13, Cornell University, Ithaca, New York, USA.

Yompakdee C, Huberman JA. (2002). A novel strategy for identification of *cis*-acting sequences that determine time of DNA replication. Poster presentation at the 2nd International Fission Yeast Conference, March 25-30, Kyoto International Conference Hall, Kyoto, Japan.

Yompakdee C, Huberman JA.(2001). *Cis*-acting sequences that determine time of DNA replication. Oral Presentation at Buffalo DNA Replication Group meeting. December 7, University at Buffalo, New York, USA.

Yompakdee C, Huberman JA.(2001). Progress towards identification of *cis*-acting elements that determine time of replication in *Schizosaccharomyces pombe*. II. Poster presented at Eukaryotic DNA Replication meeting at Cold Spring Harbor, September 5-9, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Yompakdee C, Huberman JA.(2001). Progress towards identification of *cis*-acting elements that determine time of replication in *Schizosaccharomyces pombe*. I. Poster presented at Northeast Regional Yeast Meeting 2001, July13-14, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

Yompakdee C, Tongta A, Jeankarakul O (1999). Expression of Gene Encoded Dengue Enveloped Protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Poster presented at the 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference and the 11th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, November 15-18, Phuket, Thailand.

Yompakdee C, Malasit P, Cheevadhanarak S (1998). Inorganic phosphate controlled expression of dengue envelope protein by *Saccharomyces cerevisiae*. Poster presented at the 10th Annual meeting of the Thai Society for Biotechnology: Biotechnology for a Self Sufficient Economy, 25th-27th November, Sol Twin Hotel, Bangkok, Thailand.

Tongta A, **Yompakdee C**, Jeankarakul O (1998). A mathematical model for the derepression of acid phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* under inorganic phosphate regulation. The 10th Annual meeting of the Thai Society for Biotechnology: Biotechnology for a Self Sufficient Economy, November 25-27, Bangkok, Thailand.

Chongchittapiban S, Tongta A, **Yompakdee C** (1998). Application of a cell cycling model to the quality improvement of baker's yeast. The 10th Annual meeting of the Thai Society for Biotechnology: Biotechnology for a Self Sufficient Economy, November 25-27, Bangkok, Thailand.

8.9 งานวิจัยที่กำลังทำ

- Development of yeast based screening system to search for growth inhibitor of *Plasmodium falciparum* (หัวหน้าโครงการ)
- Molecular mechanism of pure compounds isolated from Krachai (*Boesenbergia pandurata* and *Kaempferia parviflora*) on calicium signaling pathway in yeast (หัวหน้าโครงการ)

