



1. บทนำ

ปัจจุบันนี้มีเชื้อก่อโรคมามากมายหลายชนิดที่ได้มีการกลายพันธุ์และนำไปสู่การก่อโรคชนิดใหม่ๆขึ้น ทั้งโรคที่เกิดขึ้นกับคน พืช และสัตว์ เช่นโรคซาร์ โรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 โรคไข้หวัดนก โรคแอนแทรกซ์ที่ก่อโรคในพืชได้หลายชนิด เช่น มะละกอ มะม่วง พริก ทั้งนี้อาจเกิดมาจากเชื้อที่ก่อโรคนั้นได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ของตัวเอง หรืออาจเกิดจากการติดต่อกันจากสัตว์สู่คนแล้วนำไปสู่การดัดแปลงสายพันธุ์สามารถก่อโรคในคนได้ร้ายแรงขึ้น ทางด้านการแพทย์และเภสัชวิทยานั้นได้คิดค้นวัคซีนและยาตัวใหม่ขึ้นเพื่อรักษาโรคดังกล่าว แต่ก็ยังมีเชื้อโรคบางชนิดที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ จึงมีการคิดค้นวิธีการแก้ปัญหาเชื้อดื้อยา เช่น การใช้สารเคมีหรือสารชีวภาพที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นมาและสารจากธรรมชาติ พืชสมุนไพรเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการพัฒนาสู่ยารักษาโรคและทดแทนการดื้อยาของเชื้อก่อโรค

ประเทศไทยนั้นเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีพืชพรรณต่าง ๆ มากมายทั้งที่เป็นอาหาร และพืชที่มีฤทธิ์เป็นยารักษาโรคอยู่ในตัว คนสมัยก่อนนั้นจึงได้นำพืชชนิดต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์ในการเป็นอาหารและรักษาอาการของโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น อาการไอ เป็นไข้ บาดแผล อักเสบ เป็นต้น ตัวอย่างพืชที่เป็นยารักษาโรคและมีฤทธิ์ในการกำจัดศัตรูพืชและโรคพืชได้ เช่น หนอนตายอยาก สามสิบ สะเดา เป็นต้น

หนอนตายอยาก เป็นพืชล้มลุกที่จัดอยู่ในวงศ์ *Stemonaceae* มีชื่อสามัญว่า *Stemona tuberosa*. เป็นพืชที่ถูกบันทึกไว้ในตำรายาโบราณของชาวจีนมานานนับร้อยปี ซึ่งชาวจีนสมัยก่อนนั้นใช้ในการรักษาอาการไอ (Jiangsu New Medical College, 1986; Tsi and Duyfjes, 2000) โดยส่วนที่นำมาใช้คือส่วนราก เนื่องจากมีสารกลุ่ม alkaloid ซึ่งสกัดได้จากรากของหนอนตายอยากนี้ สามารถใช้บรรเทาอาการการหายใจที่ผิดปกติ รวมทั้ง วัณโรค โรคปอด และโรคหลอดลมอักเสบ และยังสามารวกำจัดแมลงได้อีกด้วย (Philli and Ferreira de Oliveira, 2000; Xu, 2000) การศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาคพบว่ารากหนอนตายอยากที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราได้หลายชนิด (Zhao et al., 1995) ส่วนในประเทศไทยนั้นได้นำหนอนตายอยากมาใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตรและใช้สำหรับรักษาโรคหลายชนิด โดยใช้พืชชนิดนี้ในการกำจัดแมลง ใช้เป็นยาทาภายนอกสำหรับแผลที่เกิดจากหนอนหรือตัวอ่อนของแมลงบางชนิด ใส่แผลของโคกระบือที่มีหนอนไชอยู่หรือทาตามแผลเพื่อป้องกันแมลงตอมหรือวางไข่ ทำเป็นยาต้มเพื่อรับประทานแก้โรคผื่นคัน ใช้รากสดทุบใส่ไหปลาร้าเพื่อกำจัดหนอน ใช้ในการฆ่าเห็บและเหา รักษาโรคผิวหนัง ฆ่าพยาธิตัวกลมและพยาธิตัวจืด ฆ่าแมลงและหนอน และยังเชื่อว่าสามารถใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งได้อีกด้วย

ในงานวิจัยหลายรายงานพบว่าสารสกัดในกลุ่มของอัลคาลอยด์จากรากหนอนตายอยากมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค แต่อย่างไรก็ดียังไม่มีรายงานถึงการศึกษาในเชิงลึกในระดับโมเลกุลถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารที่สกัดจากรากหนอนตายอยาก ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารอัลคาลอยด์จากรากหนอนตายอยากต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในคนโดยใช้เทคนิคทางชีวเคมีพื้นฐานและประยุกต์ โดยผู้วิจัยมีความคาดหวังว่าการเข้าใจการทำงานของสาร secondary metabolite ที่มีผลต่อการยับยั้งการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จะเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่และจะเป็นต้นแบบในการศึกษา antimicrobial agent ตัวใหม่ๆที่ได้จากสัตว์หรือพืชท้องถิ่นในประเทศไทย และโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยองค์ความรู้จากพืชสมุนไพรหนอนตายอยากอาจจะถูกทำให้พัฒนาและดัดแปลงเพื่อใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์และเชิงพาณิชย์ต่อไปได้



2. วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1. หนอนตายอยาก (*Stemona sp.*)

หนอนตายอยาก (*Stemona sp.*) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ *Stemonaceae* (Gagnepain, 1934) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Stemona sp.* มีลักษณะเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี มีเหง้าหรือหัวอยู่ใต้ดิน ลำต้นเหนือดินตั้งตรงหรือเลื้อยตามพื้นดินหรือพาดพันตามต้นไม้อื่น ใบเลี้ยงเดี่ยว ปลายใบเรียวแหลม คล้ายใบ พลู เส้นลายในใบถี่ละเอียด ใบเรียงสลับหรืออยู่ตรงข้ามกันเป็นคู่หรือเป็นวงรอบข้อ ต้นเป็นเถาคล้ายพลู ดอกออกเป็นดอกเดี่ยว คล้ายดอกจำปา ข้างนอกสีขาวด้านในดอกเป็นสีม่วงแดง มีกลีบ 4 กลีบ เรียงกัน 2 วง เกสรตัวผู้ 4 อัน ก้านเกสรตัวผู้สั้นมาก เกสรตัวเมีย 1 อัน รังไข่อยู่เหนือชั้นต่างๆ ของดอก ผลเป็นแบบผลแห้งแก่แล้วแตก ดังแสดงลักษณะของราก ดอก และลำต้นในภาพที่ 2.1 (ภาควิชาพฤกษศาสตร์, 2535) หนอนตายอยากเป็นไม้ล้มลุกเจริญในฤดูฝน สืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยเมล็ดจะงอกขึ้นตามลำต้นหรือตามกิ่งก้าน มีมากบนเขาเขียว จังหวัดชลบุรี และในภาคตะวันออกทั้งหมด ภาคอีสาน ภาคเหนือและภาคกลาง ลำต้นใต้ดินจะมีรากออกเป็นพวงสีขาวเหลืองรูปกระสวย มีจำนวน 50-80 รากแต่ละรากยาว 12-20 เซนติเมตร พืชสกุล *Stemona* มีอยู่ประมาณ 30 ชนิด (Gagnepain, 1934) โดยพบกระจายอยู่ตามประเทศต่างๆ เช่น ญี่ปุ่น จีน ฮอลแลนด์ ฟิลิปปินส์ ฯ สำหรับประเทศไทยพบพืชชนิดนี้ได้ตามภาคต่างๆ ของประเทศ และได้มีผู้รวบรวมพืชสกุลนี้พบว่ามีทั้งหมด 8 ชนิด โดยมีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน (สงศรี พิพิธกุล , ม.ป.ป.) คือ

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อท้องถิ่น
<i>Stemona aphylla</i> Craib	เครือปรง (ลำปาง)
<i>Stemona burkillii</i> Prain	ปงมดงาม โปงมดงาม (เชียงใหม่)
<i>Stemona collinsae</i> Craib	หนอนตายอยาก (ภาคกลาง) ปงช้าง (ภาคเหนือ)
<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	รากลิง (พัทลุง) หนอนตายอยาก
<i>Stemona griffithiana</i> Kurz.	- (พบที่จังหวัดแพร่)
<i>Stemona kerrii</i> Craib.	- (พบที่จังหวัดเชียงใหม่)
<i>Stemona phyllantha</i> Gange.	- (พบที่จังหวัดเพชรบุรี และภูเก็ต)
<i>Stemona sp.</i>	หนอนตายอยาก (แม่ฮ่องสอน นครสวรรค์) กะเพียด (ประจวบคีรีขันธ์)



ภาพที่ 1 ลักษณะราก ดอก และ ต้นของหนอนตายอยาก (สมุนไพรหนอนตายอยาก, ม.ป.ป.)

2.1.1. ประโยชน์ของหนอนตายอยาก

ประโยชน์ของหนอนตายอยากเป็นที่รู้จักทั่วไป โดยจะนำรากมาใช้เป็นยาทางการแพทย์แผนโบราณ และการสาธารณสุข ตลอดทั้งทางด้านการเกษตร ทางด้านการแพทย์แผนโบราณ ในประเทศจีนได้นำพืช *Stemona* sp. มาใช้เป็นยาแก้ไอและขับเสมหะ ยาขับลม ยาถ่ายพยาธิ และใช้กำจัดแมลง (Stuart, 1911) ในประเทศไทยนั้นใช้พืชชนิดนี้ในการกำจัดแมลง ใช้เป็นยาทาภายนอกสำหรับแผลที่เกิดจากหนอนหรือตัวอ่อนของแมลงบางชนิด เป็นยาต้มเพื่อรับประทานแก้โรคคื่น ใช้รากสดทุบใส่ไหปลาร้าเพื่อกำจัดหนอน (นิจศิริ เรืองรังษี และ พยอม ตันติวิวัฒน์, 2534) และพบว่าในประเทศลาวได้นำพืช *Stemona collinsae* Craib มาใช้ในการกำจัดปรสิตภายนอกร่างกาย เช่น หมัดและเหา (Vidal, 1958) มีบางประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ใช้ *Stemona collinsae* Craib, *Stemona japonica* (Bl.) Miq. *Stemona moluccana* (Bl.) Wright, *Stemona* sp. และ *Stemona sessilifolia* (Miq.) Franch. ในการกำจัดแมลง ส่วนการนำหนอนตายอยากมาใช้ทางด้านการเกษตรนั้น ได้มีการนำเอารากของหนอนตายอยากมาตำให้ละเอียด ละลายน้ำและนำมากรองเอาน้ำส่วนที่กรองได้มาใช้ในการกำจัดศัตรูพืช (เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2522) หรือทาตามแผลเพื่อป้องกันแมลงตอมหรือวางไข่ (เลาณา อีร์ ภักตรสกุล และ ประคอง พันธุ์โอไร, 2520)

2.1.2. สารออกฤทธิ์ และสารอื่นๆ ในรากหนอนตายอยาก

จากการศึกษาวิจัยสารออกฤทธิ์ (Active ingredient) และสารอื่นๆ ในรากของหนอนตายอยากชนิดต่างๆ โดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่นและนักวิจัยชาวจีนพบสารออกฤทธิ์มากมายในรากของหนอนตายอยากโดยเฉพาะสารในกลุ่มของอัลคาลอยด์ เช่น Stemonamide, Isostemonamide, Neostemonine, Bisdehydroneostemonine, Bisdehydroprotostemonine, Isoprotostemonine จาก *Stemona japonica* และยังพบอัลคาลอยด์อีก 2 ชนิดคือ Neotuberostemonine และ Bisdehydroneotuberostemonine จาก *Stemona* sp. (Ye et al., 1994) และหนอนตายอยากอีกชนิดที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางก็คือ *Stemona* sp. พบอัลคาลอยด์ 2 กลุ่มใหญ่คือ Tuberostemoninol และ Stemoninoamide (Ye et al., 1994) นอกจากอัลคาลอยด์แล้วยังพบ



Bibenzyl 3 ชนิดใหม่จาก *Stemona* sp. ดังนี้ 3,5-dihydroxy-4-methylbenzyl, 3,5-dihydroxy-2-methyl-4-methylbibenzyl และ 3-hydroxy-2,5-dimethoxy-2-methylbibenzyl (Zhao et al., 1995) และในปี 2007 จากการศึกษาพบสารออกฤทธิ์จาก *Stemona* sp. คือ Dihydrostilbenes, Stilbostemins N-Y, Phenanthraquinone และ Stemanthraquinone และจากการศึกษาโครงสร้างเป็นที่ยอมรับได้ โดยศึกษาเกี่ยวกับ 1D และ 2D NMR และการวิเคราะห์ทางด้าน Spectroscopic (Lin et al., 2008) และในปีต่อมาพบอัลคาลอยด์ 4 ชนิดที่แสดงกิจกรรมในการต้านอาการไอได้ดี คือ Protostemonamide, Protostemonine, Stemospironine และ Maistemonine จาก *Stemona sessilifolia* (Lin et al., 2008)

สำหรับในประเทศไทยนั้นได้ทำการทดสอบประเภทสารเคมีในพืชสมุนไพร และมี การรายงาน ว่า ในส่วนของรากและลำต้นหนอนตายอยากให้ผลบวกกับอัลคาลอยด์ รีเอเจนต์ (Alkaloid reagent) และสารออกฤทธิ์ที่ถูกสกัดออกมาด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ประกอบด้วยสารที่เรียกว่า Stemonacetal, Stemonal และ Stemonone ซึ่งสารเหล่านี้เป็นพวก Oxygen ring compounds ซึ่งมี Skeleton structure คล้ายพวกโรทีโนน (Rotenone) ที่สกัดมาจากพืชหลายชนิดที่ใช้ในการกำจัดแมลง เช่น รากของหางไหลหรือโล่ตื้น (เทพ เชียงทอง และ วิจิตร ภักเกษม, 2517) ต่อมาผู้ศึกษาเกี่ยวกับโรทีโนนและ รายงานว่า โรทีโนน เป็นอนุพันธ์ของ Isoflavanone และมีชีวสังเคราะห์มาจาก Acetate mevalonate และ Phenylalanine กับ Extra carbon ที่เกิดจาก c-1 pool ซึ่งโรทีโนนจะมีลักษณะเป็นผลึกรูปสี่เหลี่ยมขนม เปียกปูนไม่มีสี ไม่มีกลิ่น หลอมตัวที่อุณหภูมิ 163 °C ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์หลาย ชนิด สารละลายของโรทีโนนเป็น Strongly laevorotatory และคงตัวได้ดีเมื่ออยู่ในสภาพสารละลายเบนซีน (บำรุง ตันติเสรี และคณะ , 2526) นอกจากนี้แล้วยังพบอัลคาลอยด์อีก 4 ชนิดคือ Stemonine, Tuberstemonine, Stemonidine, Isostemonidine และยังมีพบ Retinoid compound stemonacetal, Stemonal และ Stemonone (นิจศิริ เรืองรังษี และ พยอม ตันติวัฒน์, 2534)

2.2 สารประกอบทุติยภูมิ (Secondary metabolite)

สารประกอบทุติยภูมิ คือ กลุ่มของสารเคมีที่สร้างโดยพืช สัตว์ ราหรือแบคทีเรีย ที่ไม่มีความ จำเป็นในขั้นวิกฤตต่อสิ่งมีชีวิตผู้ผลิต หากแต่ถูกสร้างโดยขบวนการทางชีวเคมีของผู้ผลิตเป็นสารจำเพาะต่อ ผู้ผลิตนั้นๆ เป็นสารที่ให้กลิ่นสี หรือสรรพคุณจำเพาะของพืชที่พบในอาหาร ยาและสารพิษต่างๆ จากพืช และมีการกระจายตัวอย่างจำกัด สารประกอบทุติยภูมิถูกสร้างจากสารประกอบปฐมภูมิเพียงไม่กี่ชนิด ได้แก่ กรดอะมิโนอัลฟา (α -amino acid) อะเซทิลโคเอนไซม์-เอ กรดเมวาโลนิค และสารประกอบที่อยู่กลาง เส้นทางสังเคราะห์กรดชิคิมิก (Shikimic acid) สารประกอบปฐมภูมิเหล่านี้ล้วนเป็นจุดตั้งต้นของ สารประกอบทุติยภูมิและเอื้อประโยชน์ในการจำแนกสารเหล่านี้ ออกเป็นกลุ่มต่างๆ (สุธาทิพ ภมรประวัติ , 2549)

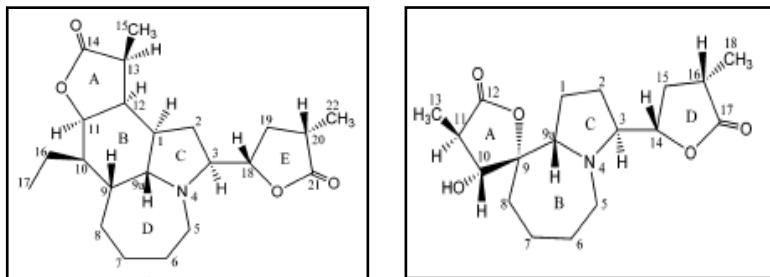
2.2.1 สารประกอบทุติยภูมิในพืช

สารประกอบทุติยภูมิในพืช ได้แก่ สารกลุ่มที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมาใช้งานเฉพาะเพื่อ ปกป้องตัวเองจากศัตรู เป็นสารประกอบที่มี ลักษณะค่อนข้างพิเศษ พบต่างกันพืชแต่ละชนิด คาดหมายว่า เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis) ที่มีเอนไซม์ (Enzyme) เข้าร่วม เช่น ยางไม้ น้ำมันหอม ระเหย (Essential oil) สารเคมีต่าง ๆ ทั้งแอนทราควิโนน (Anthraquinone) แทนนิน (มีรสฝาด) อัลคาลอยด์ (Alkaloid) (มีรสขม) ตลอดจนสารที่มีลักษณะเฉพาะต่างๆ นอกจากนั้นสาร ทุติยภูมิยังหมายถึงสารกลุ่มที่พืชใช้ เพื่อบ่งบอกแสดงความเป็นตัวตน สารกลุ่มที่พืชสร้างขึ้นเพื่อรักษาตนเองเมื่อเกิดบาดแผลบาดเจ็บหรือสร้างขึ้น ในสภาพที่วิกฤตจำเป็น เพื่อการดำรงเผ่าพันธุ์เหล่านี้เป็นสารที่พืชแต่ละชนิดสร้างขึ้นเป็นพิเศษ จึงมีฤทธิ์มี



สรรพคุณซึ่งเราสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ นอกเหนือจากอาหาร เช่น ใช้เป็นยา เป็นสารเสริมสุขภาพ บำบัดรักษา เป็นเวชสำอาง เป็นต้น ส่วน ใหญ่สารพวกทุติยภูมิจะมีสรรพคุณทางยา แต่ก็มีได้แน่นอนตายตัวเสมอไป จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารพวกปฐมภูมิบางตัวก็ออกฤทธิ์ในการรักษาได้

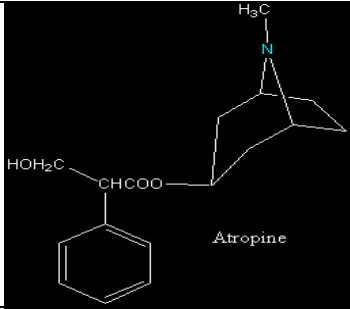
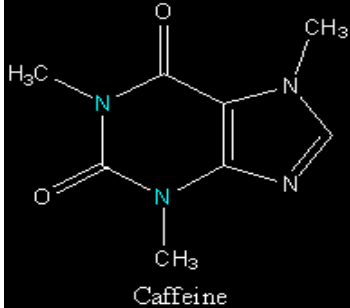
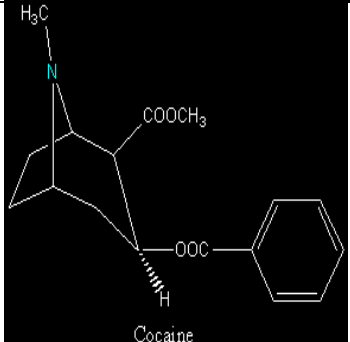
- Alkaloid คือสารจากพืชที่มีคุณสมบัติในทางการแพทย์ อัลคาลอยด์ เป็นสารประกอบเคมีที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติและมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบดังแสดงตัวอย่างในภาพ ที่ 2. อัลคาลอยด์เป็นสารที่มีความเป็นด่างสูง มีรสขม อัลคาลอยด์เป็นสารที่เกิดขึ้นได้จากสิ่งมีชีวิตที่หลากหลาย เช่น แบคทีเรีย รา พืช และสัตว์ และเป็นส่วนหนึ่งในกลุ่มของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ อัลคาลอยด์สามารถแยกบริสุทธิ์ออกมาได้จากสารสกัดหยาบ โดยสกัดซ้ำด้วย กระบวนการ Acid-base extraction (Wikipedia) สารอัลคาลอยด์ส่วนมากจะก่อกพิษได้และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มีการนำมาใช้เป็นยารักษาโรค การนำมาใช้ประโยชน์ทางยาจึงควรใช้ในปริมาณเล็กน้อยและอยู่ภายใต้การดูแลของแพทย์ ตัวอย่างสาร Alkaloids ที่สำคัญๆ ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 2. ตัวอย่างโครงสร้างของ Alkaloid ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (Tuberostemonine K and Tuberospironine) (Jiang, 2006)

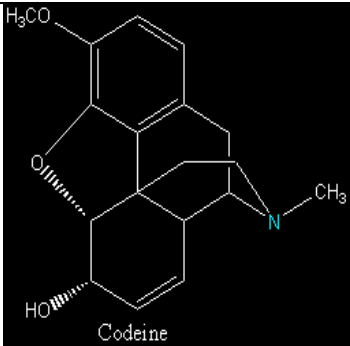
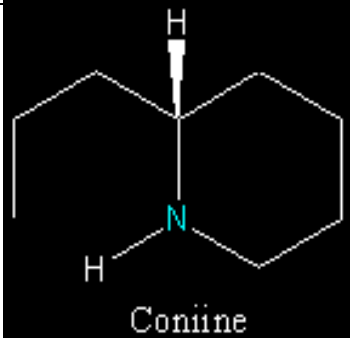
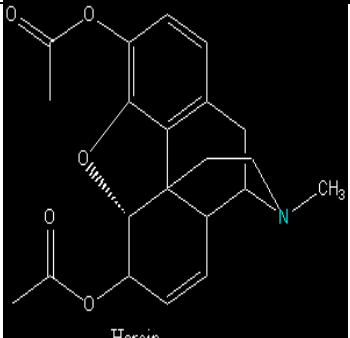
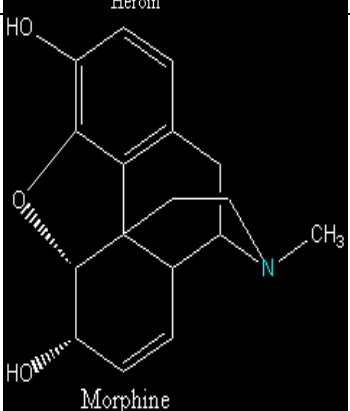


ตารางที่ 1. สารอัลคาลอยด์ที่พบได้ในพืช คุณสมบัติและแสดงสูตรโครงสร้าง

สารอัลคาลอยด์	ได้จากพืช	คุณสมบัติ	โครงสร้างทางเคมี
Atropine	<i>Hyoscyamus niger</i>	ใช้เป็นยาแก้อาการที่เกิดจากแก๊สพิษ ที่มีผลต่อระบบประสาท	 Atropine
Caffeine	<i>Coffea arabica</i>	มีผลในการกระตุ้นระบบประสาท	 Caffeine
Cocaine	<i>Erythroxylon coca</i>	สามารถใช้เป็นยาสลบได้ มีผลในเชิงกระตุ้นระบบประสาทอย่างแรง เป็นยาเสพติด	 Cocaine

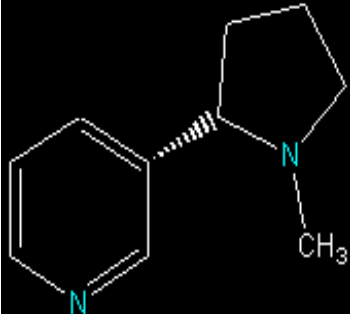
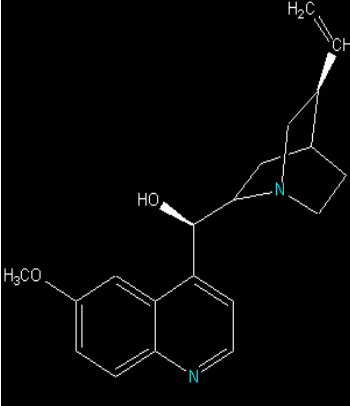


ตารางที่ 1. สารอัลคาลอยด์ที่พบได้ในพืช คุณสมบัติและแสดงสูตรโครงสร้าง (ต่อ)

สารอัลคาลอยด์	ได้จากพืช	คุณสมบัติ	โครงสร้างทางเคมี
Codeine	<i>Papaver somniferum</i>	มีผลในทางแก้ปวดและแก้ไอสามารถเสพติดได้ แต่มีผลในเชิงยาเสพติดน้อยกว่าเฮโรอีน และมอร์ฟีน	 Codeine
Coniine	<i>Conium maculatum</i>	เป็นพิษอย่างรุนแรงทำลายระบบประสาท	 Coniine
Heroin	<i>Papaver somniferum</i>	เป็นอนุพันธ์ของมอร์ฟีน เป็นยาเสพติดที่มีฤทธิ์สูง	 Heroin
Morphine	<i>Papaver somniferum</i>	มีผลระงับอาการปวดได้อย่างเฉียบขาด แต่ก็มีผลในเชิงเสพติดเช่นกัน	 Morphine



ตารางที่ 1. สารอัลคาลอยด์ที่พบได้ในพืช คุณสมบัติและแสดงสูตรโครงสร้าง (ต่อ)

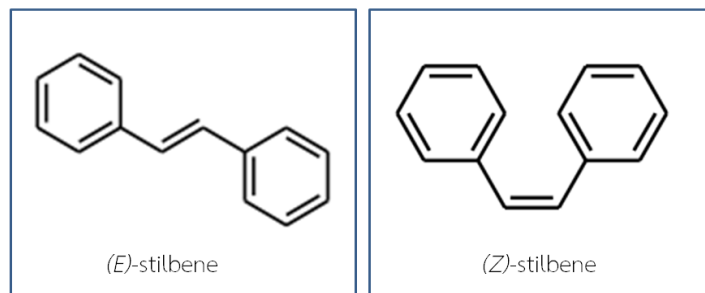
สารอัลคาลอยด์	ได้จากพืช	คุณสมบัติ	โครงสร้างทางเคมี
Nicotine	<i>Nicotina tabacum</i>	เป็นพิษต่อระบบหายใจ เป็นยาฆ่าแมลง และเป็นสารเสพติดในบุหรี่	 Nicotine
Quinine	<i>Cinchona officinalis</i>	มีผลในเชิงรักษาและป้องกันโรคมาลาเรีย	 Quinine

- Stemonine เป็น สารสกัดกลุ่ม Alkaloids phenols terpenoids ประกอบด้วย Stemonine, Pyridine, Glycoside, TanninPinene, Saponin, Epoxylupeol และ Cineol คุณสมบัติ คือ ออกฤทธิ์ทางผิวหนังสัมผัสมีผลต่อระบบประสาทของแมลงซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งผ่านโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในเซลล์ประสาท ยับยั้งการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ประสาท ยับยั้งการหายใจ โดยขัดขวางการส่งผ่านอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียของแมลง เมื่อแมลงสัมผัสกับสาร จะเกิดการตื่นเต้น สั่น ชักกระตุก และเป็นอัมพาตอย่างรวดเร็ว ยับยั้งการกิน ยับยั้งการเจริญเติบโต ยับยั้งการวางไข่ ยับยั้งการลอกคราบ ไล่แมลง กำจัดแมลง ออกฤทธิ์ทางเดินอาหาร หนอน เมื่อได้รับพิษ จะกินอาหารได้น้อยลง และอาจตายได้ใน 2-3 วัน (ขึ้นอยู่กับจำนวนยาที่ได้รับ) ทางผิวหนัง หนอน เปลือยอ่อน แมลงหัวขาว เปลือยไฟ ไชขาว ไชแดง อาจตายใน 30-45 นาที หยุดการลอกคราบ ไม่เข้าดักแด้ ไข่ไม่เป็นตัว ยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อรา สาเหตุของโรคพืชทั้งราขึ้นสูงและราขึ้นต่ำ เช่น โรคเน่าคอดินที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Pythium spp. fusarium sclerotium, rhizoctonia* และ *phytophthora spp.* โรคราน้ำค้าง สาเหตุจากเชื้อ *Peronospora* โรคใบจุด(ตากบ) สาเหตุจากเชื้อ *Cercospora* โรคราแป้ง สาเหตุจากเชื้อ *Oidiopsis* โรคเน่าเปียก สาเหตุจากเชื้อ *Choanephora* โรคแอนแทรคโนส ของ พริก หอม กระเทียม สาเหตุจากเชื้อ *colletotrichum* โรคต้นไหม้แห้ง โรคใบเหลืองของมะเขือเทศโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น แคงเกอร์ของส้ม มะนาว ขอบใบไหม้ผลจุดใน



ใบและลำต้นของพริก โรคขอบใบทองหรือเน่าดำของผัก สาเหตุจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* โรคเหี่ยวของพืชล้มลุก เช่น มะเขือเทศ พริก มัฟรัง สาเหตุจากเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* และโรคเน่าของกะหล่ำ สาเหตุจากเชื้อ *Erwinia carotovora*.

- **Stilbene** เป็นสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลพบได้ทั่วไปในพืชชั้นสูง Stilbene นี้คือสารที่เรียกว่า Diarylethene คือ สารประกอบที่มีวงแหวนอะโรมาติกเป็นองค์ประกอบและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ carbon-carbon double bond ซึ่ง Stilbene นี้จะมีสองไอโซเมอร์ที่เป็นไปได้คือ แบบซิส (Z) และ ทราน (E) ดังแสดงในภาพที่ 4.

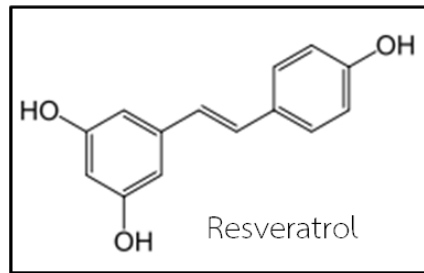


ภาพที่ 3. โครงสร้างของทรานและซิสstilben ((E)-Stilbene (Wikipedia, ม.ป.ป.)

จากภาพที่ 4 (E)-stilbene หรือ *trans*-1,2-diphenylethylene หรือ *trans*-stilbene และอีกรูปคือ *cis*-1,2-diphenylethylene หรือ (Z)-stilbene หรือที่เรียกว่า *cis*-stilbene จากโครงสร้างที่ต่างกันทำให้ *cis*-stilbene มีจุดหลอมเหลวที่ 5-6 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *trans*-stilbene มีจุดหลอมเหลวที่ประมาณ 125 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าสารชนิดเดียวกันแต่อยู่กันคนละไอโซเมอร์มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ต่างกันอย่างมาก

นอกจาก Stilbene จะมีสองไอโซเมอร์แล้วจากรูปจะสังเกตเห็นว่าโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนอะโรมาติกสองวงถูกเชื่อมต่อเข้ากันด้วยพันธะคู่ของสายไฮโดรคาร์บอน และคาร์บอนที่ตำแหน่งของพันธะนั้นสามารถถูกแทนที่ได้ด้วยฟีนิลหรือสารประกอบตัวอื่นๆ ทำให้ได้สารประกอบตัวอื่นๆ ที่เป็นอนุพันธ์ของstilben เกิดขึ้นมากมาย เช่น Stilbenoids (Wikipedia, 2554)

- Stilbenoids เป็นสารประกอบทุติยภูมิที่ได้จากแก่นไม้ ซึ่ง Stilbenoids บางชนิดเป็นอนุพันธ์ของ Stilbene ที่เกิดจากการเติมของหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ในโครงสร้างของ Stilbene ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า Hydroxylation ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 4. สารประกอบ Resveraatrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene)
(Wikipedia, ม.ป.ป.)

Resveraatrol เป็นสารในกลุ่ม ของ Stilbenoids ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Stilbene ที่ถูกแทนที่ไฮโดรเจนด้วย ฟีนอล (-OH) จำนวน 3 หมู่ทั้งนี้ในเชิงชีวเคมีถือว่า Stilbenoids เป็นสารที่อยู่ใน Family ของ Phenylpropanoids และส่วนมากได้จากการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ chalcones

2.3 การศึกษาสารออกฤทธิ์ของสารสกัดของหนอนตายอยาก และการศึกษาประสิทธิภาพ ด้านต่างๆ ของหนอนตายอยาก แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2. การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับหนอนตายอยาก

ผู้ศึกษาวิจัย	ปี พ.ศ.	การวิจัย พบว่า
เลาจนา อีร์ภัทรสกุลและ ประคอง พันธุ์อุไร	2520	สารสกัดของ <i>Stemona curtisii</i> Hook.f. มีผลทำให้หนอน แมลงวันตายหรือทำให้ตัวหนอนมีสีเขียว คล้ำ จนถึงสีน้ำตาล ดำ ตัวหนอนที่รอดตายสามารถเจริญ เป็น ดักแด้ได้ แต่ดักแด้ จะมีลักษณะผิดปกติ คือผนังของดักแด้จะโป่งนูนออก ดักแด้มี ขนาดเล็ก เจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้
ประคอง พันธุ์อุไร	2520	สารสกัดจากหนอนตายอยากไม่มีฤทธิ์แบบสัมผัสตาย (Contact poisoning) ต่อยุงลาย แต่มีผลต่อลูก น้ำยุงลาย โดยจะมีผลทำให้การปิดเปิดของปากท่อหายใจ (Abdominal spiracles) และปลายสุดของท่อหายใจ (Siphon) ไม่เป็น จังหวะ
ประคอง พันธุ์อุไร และคณะ	2523	ว่าสารสกัดจากรากหนอนตายอยากที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่ อยู่ในรูปของยาครีมจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเหาได้ดีกว่า ในรูปของยาน้ำ และมีพิษตกค้าง เพียงหนึ่งสัปดาห์เท่านั้น 10



ตารางที่ 2. การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับหนอนตายเอยาก (ต่อ)

ผู้ศึกษาวิจัย	ปี พ.ศ.	การวิจัย พบว่า
ประคอง พันธุ์ไธ	2525	<i>S.curtisii</i> ที่สกัดด้วย 50% Ethanol มีประสิทธิภาพในการฆ่าเหามากที่สุด และพบว่าสารออกฤทธิ์ละลายได้ไม่มากนักในเอทิล อะซีเตตและคลอโรฟอร์ม และเมื่อนำไปทดลองประสิทธิภาพในการกำจัดเหา พบว่า ในขณะแรกที่เหาได้สัมผัสกับตัวยา เหาจะดูดกินสารสกัดเข้าไปและต่อมาจะพยายามหนีออกจากเส้นผมที่เคลือบน้ำยา เมื่อนำไปทดลองกำจัดเหาในนักเรียนโดยผสมน้ำ 1:2 คลุกเคล้าเส้นผมนาน 4 ชั่วโมง ปรากฏว่าเหาตายทั้งหมด และจากการทดสอบไม่ปรากฏว่ามีอาการคัน ปวด แสบร้อน หรือแพ้แต่อย่างใด
วิสุทธิ เสงศรี	2527	สารสกัดจากรากหนอนตายเอยากที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย และเมื่อนำมาทดสอบกับหนอนหลอดหอม (<i>Spodoptera exqua</i>) วัยที่ 2 และ 3 โดยวิธี Dipping และ วิธี Feeding พบว่า สารสกัดจากรากหนอนตายเอยากมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนหลอดหอมได้
ไศรยา พันธุ์วิริยะพงษ์	2531	สารสกัดจากรากหนอนตายเอยากที่สกัดด้วยอัตราส่วนรากหนอนตายเอยากแห้ง 200 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตรทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วกรองเอาเฉพาะส่วนที่ใสไปฉีดพ่นแปล งผัก พบว่าสามารถกำจัดหนอนหลอดหอมได้ดี
วีระพล จันทร์สุวรรณ และคณะ	2536	ได้ศึกษาสารสกัดจากรากหนอนตายเอยาก (<i>Stemona collinsae</i>) ในความเข้มข้นต่างๆ กัน ที่มีผลต่อเห็บโค (<i>Boophilus microplus</i>) ในระยะตัวอ่อน และระยะตัวเต็มวัยในห้องปฏิบัติการและใน สัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 50 % จะฆ่าเห็บในระยะตัวอ่อนและระยะตัวเต็มวัยได้สูงที่สุดคือ 100 % และ 93.33 % ตามลำดับ



ตารางที่ 2. การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับหนอนตายอยาก (ต่อ)

ผู้ศึกษาวิจัย	ปี พ.ศ.	การวิจัย พบว่า
ขจรศักดิ์ ตระกูลพั้ว	2538	ได้ศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช และเชื้อราสาเหตุของโรคผิวหนัง โดยนำผงสมุนไพรบดแห้งมาผสมในอาหาร Potato dextrose agar ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า หนอนตายอยากมีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและโรคผิวหนัง รองลงมาจากการใช้สารสกัดจากกานพลูและว่านน้ำ
เสถียร เพ็ชรโก	2538	ได้ศึกษาประสิทธิภาพของพืชสมุนไพร 9 ชนิด ได้แก่ น้อยหน่า(ใบ , เมล็ด), ตะไคร้, หางไหล (โล่ตื้น), ยูคาลิปตัส, กระเพราแดง, สะเดา(ใบ, ผล), สะระแหน่, ยาสูบ และ หนอนตายอยาก(ใบ) ในการกำจัดแมลงศัตรูภายนอกบางชนิดของปศุสัตว์ การทดลองที่ 1 ทำในห้องปฏิบัติการโดยการทดลองใช้สารสกัดกับตัวเห็บ พบว่าหางไหล (โล่ตื้น) มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดเห็บ การทดลองที่ 2 ทำการทดลองกับเห็บซึ่งอยู่ตามตัวของกระบือ พบว่าหางไหลและยาสูบให้ประสิทธิภาพดีที่สุด ส่วนน้อยหน่าและหนอนตายอยากมีประสิทธิภาพปานกลาง
Zhao et al.	2538	พบว่าสารสกัดจากรากหนอนตายอยากที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราได้หลายชนิด
วุฒิกรณ์ รอดความทุกข์	2539	หนอนตายอยากที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ณ อุณหภูมิห้อง และหนอนตายอยากที่สกัดด้วยน้ำ ณ อุณหภูมิห้อง มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนและด้วงหมัดผักดีที่สุดและสารสกัดด้วยน้ำ ณ อุณหภูมิห้อง มีประสิทธิภาพในการกำจัดเพลี้ยอ่อนดี



ตารางที่ 2. การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับหนอนตายอยาก (ต่อ)

ผู้ศึกษาวิจัย	ปี พ.ศ.	การวิจัย พบว่า
วุฒิกรณ์ รอดความทุกข์ (ต่อ)	2539	ที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ สารฆ่าแมลงเมวินฟอส
กวิณหาญ พลหาญ	2539	ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากพืชต่อหนอนกระทู้หอม <i>Spodoptera exigua</i> (Hubne) โดยนำพืช 56 ชนิด มาสกัดสารออกฤทธิ์ด้วยแอลกอฮอล์ ผลการศึกษา พบว่าสารสกัดจากรากของหนอนตายอยากมี ประสิทธิภาพกำจัดแมลงดีที่สุดต่อหนอนกระทู้หอม
การะเกด สายบรรดาศักดิ์	2540	ได้ศึกษาผลของ 6-deoxyclitriacetal ซึ่งเป็นสาร Retonoids ที่สกัดได้จากรากของหนอนตายอยากต่อ การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบจากอวัยวะต่างๆ ที่แยก จากร่างกายของหนูทดลอง พบว่า 6- deoxyclitriacetal 0.2 mg/ml. สามารถลดการหด ตัวของกล้ามเนื้อเรียบของมดลูกหนูขาวทั้งที่เกิดขึ้นเอง หรือเกิดจากการกระตุ้นด้วย Serotonin และ Norepinephrine แบบความเข้มข้นสะสม และยัง สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอด เลือดแดงใหญ่ของหนูขาวจากการกระตุ้นด้วย สารละลายแคลเซียมคลอไรด์แบบความเข้มข้นสะสม นอกจากนี้ยังสามารถมีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ เรียบลำไส้เล็กส่วน Ileum ของหนูตะเภา เมื่อมีการ กระตุ้นด้วย Acetylcholine จากผลการทดลองทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitriacetal มีฤทธิ์ยับยั้งการ หดตัวของกล้ามเนื้อเรียบจากอวัยวะต่างๆ และกลไก ของการยับยั้งการหดตัวนี้เป็นแบบไม่เฉพาะเจาะจง



ตารางที่ 2. การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับหนอนตายอยาก (ต่อ)

ผู้ศึกษาวิจัย	ปี พ.ศ.	การวิจัย พบว่า
ประทุมวัน เสาร์ประโคน	2542	ได้ศึกษาผลของ Benzylladenine(BA) และ Naphthalene Acetic Acid (NAA) ที่มีต่อการเพาะเลี้ยง ใบ ราก และตาข้อของต้นหนอนตายอยากชนิด <i>S. collinsae</i> Craib. ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS (Murashige and Shooog) พบว่า ชิ้นส่วนของข้อ ต้นหนอนตายอยากสามารถเจริญพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้
ประทุมวัน เสาร์ประโคน	2542	สารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 ppm ร่วมกับ NAA 0.5 ppm มีจำนวนต้นเฉลี่ย 2.8 ต้น (80%)
กนกอร แสงอรุณ	2543	ได้ทดสอบผลของสารสกัดจากรากของหนอนตายอยาก <i>S. kerrii</i> Craib. ต่อการตายของหนุขาว น้ำห นั ก อัณ ทะ จำนวนอสุจิ Epididymis และน้ำหนั ก ตั บ สรุ ป ได้ ว่า สาร สกัดจากรากหนอนตายอยากที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ไม่ ทำให้เกิดพาเจียบพลันในสัตว์ทดลอง การศึกษาพิษ เรื้อรังของสารสกัดพบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของ น้ำหนักอัณ ทะและจำนวนอสุจิใน Epididymis อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ แต่ทำให้น้ำห นั ก ตั บ มีแนวโน้ม เปลี่ยนแปลง
อรุณ วงศ์จิรัฐติ	2543	ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากพืช 4 ชนิด ได้แก่ กานพลู, สารภี, ว่านน้ำและหนอนตายอยากต่อการยับยั้งการ เจริญเติบโตของเชื้อ <i>Alternaria</i> sp. และ <i>Cladosporium</i> sp. ซึ่งแยกสกัดได้จากกุหลาบ ที่ระดับ ความเข้มข้น 5,000, 10,000, 15,000 และ 25,000 ppm ของสารสกัด ผลการทดลองพบว่าสารสกัดว่านน้ำที่ ระดับความ เข้มข้น 25,000 ppm ให้ผลการยับยั้งการ เจริญเติบโต



ตารางที่ 2. การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับหนอนตายอยาก (ต่อ)

ผู้ศึกษาวิจัย	ปี พ.ศ.	การวิจัย พบว่า
อรุณ วงศ์จิรฐิติ (ต่อ)	2543	ของเชื้อ <i>Alternaria sp.</i> สูงสุดที่ 98.32% ส่วนสารสกัดจากสารสีและหนอนตายอยากนั้นยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดได้น้อยมากหรือแทบไม่มีเลย
วาสนา ไชยคำ	2544	ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากรากหนอนตายอยากที่มีฤทธิ์ในการฆ่าแมลง โดยการสกัดใช้ตัวทำละลายอินทรีย์แตกต่างกันสามชนิดคือ เฮกเซน ไดคลอโลมีเทน และ 70% เมทานอล พบว่าสารสกัดหยาบด้วย ไดคลอโลมีเทนจากรากหนอนตายอยากแสดงความเป็นพิษสูงต่อหนอนกระทู้ผัก โดยมีอัตราการตายที่ระดับความเข้มข้น 40,000 ppm เป็น 44% ส่วนสารสกัดหยาบด้วย 70% เมทานอล แสดงความเป็นพิษสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm กับด้วงวงข้าวโพดมีอัตราการตาย 48%
สุทธาพันธ์ โพธิ์กำเนิด	2544	ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สมุนไพรหนอนตายอยากชนิด <i>Stemona sp.</i> ผสมอาหารไก่เพื่อควบคุมปริมาณหนอนแมลงวันในมูลไก่ ผลการศึกษาพบว่า จำนวนขนาด และน้ำหนักของหนอนแมลงวันที่เพาะจากมูลไก่ที่กินอาหารทดลองทุกระดับมีแนวโน้มลดลง ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการใช้รากสมุนไพรหนอนตายอยากสภาพสดและแห้งคลุกผสมกับมูลไก่โดยตรง คือมีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของสมุนไพรหนอนตายอยากเพิ่มขึ้น



ตารางที่ 2. การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับหนอนตายอยาก (ต่อ)

ผู้ศึกษาวิจัย	ปี พ.ศ.	การวิจัย พบว่า
สุริยะ วงศ์คงคาเทพ	(ม.ป.ป.)	ได้ศึกษาเปรียบเทียบการฆ่าเหาของหนอนตายอยาก 2 พันธุ์คือ <i>Clitoria macroptlla</i> และ <i>S. Collinsae</i> กับ ยา Benzyl Benzoate ผลการศึกษาพบว่าหนอนตายอยากพันธุ์ <i>S.Collinsae</i> มีฤทธิ์ในการฆ่าเหาตาย 41.67% ที่ 6 ชั่วโมง และ 83.85% ที่ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับยา Benzyl Benzoate ซึ่งฆ่าเหาตายที่ 81.90% ที่ 6 ชั่วโมง และ 78.12% ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงว่า <i>S. Collinsae</i> ใช้ได้ผลใกล้เคียงกับ Benzyl Benzoate ส่วนหนอนตายอยาก <i>C.macroptlla</i> มีผลในการฆ่าเหาน้อยมาก
Ye et al.	2550	พบว่า Dihydrostilbene 8 จาก <i>S. tuberosa</i> สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ <i>Bacillus pumilus</i> ได้ดีโดยมีค่า MIC 12.5-25 µg/ml

2.4 การดื้อยา

การดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคเกิดได้จากการที่แบคทีเรียไม่ถูกยับยั้งหรือทำลายด้วยยาต้านจุลชีพที่เคยใช้ได้ผล การดื้อต่อยาต้านจุลชีพ อาจพบในแบคทีเรียกลุ่มจุลชีพประจำถิ่น (Normal flora) ซึ่งปกติอาศัยอยู่ในร่างกายมนุษย์โดยไม่ก่อให้เกิดโรคแต่จะทำหน้าที่ในการป้องกันร่างกายจากการติดเชื้อของแบคทีเรียก่อโรค การเกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียเหล่านี้ อาจไม่เห็นผลโดยตรงต่อมนุษย์ แต่จุลชีพประจำถิ่นเหล่านี้จะเป็นแหล่งสะสมของสารพันธุกรรม (Gene) ที่ควบคุมการดื้อยาและพร้อมที่จะถ่ายทอดให้แก่เชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ตลอดเวลา ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial agents) เป็นคำรวมที่ใช้เรียกสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือทำลายจุลชีพ หากเป็นยาที่ได้จากสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น ยา Penicillin ซึ่งได้จากเชื้อรา จะเรียกอีกอย่างหนึ่งได้ว่า ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) (พิณทิพย์ พงษ์เพชร, ม.ป.ป.) ในปัจจุบันแบคทีเรียได้มีการพัฒนาในการดื้อต่อยาต้านเพิ่มมากขึ้นเป็นเงาตามตัวของการผลิตและการใช้ยาต้านจุลชีพใหม่ๆ การดื้อยาของแบคทีเรียเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Mutation) ของแบคทีเรีย โดยการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดขึ้นที่ส่วนของสารพันธุกรรมหลักของเชื้อที่เรียกว่า โครโมโซม ส่วนของโครโมโซมมีขนาดใหญ่ ประกอบด้วยยีน (Gene) ที่จะแสดงออกเป็นลักษณะต่างๆ ของเชื้อมากมายรวมทั้งการดื้อยา การพบสารพันธุกรรมหรือ ยีนดื้อยาที่บริเวณนี้ไม่มากเหมือนการพบที่ส่วนของสารพันธุกรรมนอกโครโมโซมซึ่งเรียกว่า พลาสมิด (Plasmid) และทรานสโปซอน (Transposon) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าโครโมโซมมาก ยีน ที่ควบคุมการดื้อยาที่อยู่บนพลาสมิดและทรานสโปซอนของแบคทีเรียชนิดหนึ่ง สามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ง่าย ทำให้เกิดการแพร่กระจายการดื้อยาจากเชื้อหนึ่งไปสู่อีกเชื้อหนึ่งได้รวดเร็ว

2.4.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพ



การออกฤทธิ์อาจจะเป็นเพียงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อหรือฆ่าเชื้อ สำหรับการออกฤทธิ์ของยาต้านแบคทีเรีย แบ่งเป็นกลไกหลัก 4 กลไก คือ

1. ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ได้แก่ ยาในกลุ่ม *beta*-lactam เช่น Penicillins และ Cephalosporins เป็นต้น
2. ยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย (โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหรือเป็นเอ็นไซม์ที่มีบทบาทในการมีชีวิตของแบคทีเรีย) ได้แก่ ยาในกลุ่ม Tetracyclines, Chloramphenicals และ Macrolides เป็นต้น
3. ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ของแบคทีเรีย ได้แก่ ยาในกลุ่ม Quinolones
4. ยับยั้งขบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งเกี่ยวกับการสร้างสารอาหารและพลังงานของแบคทีเรีย ได้แก่ ยาในกลุ่ม Sulfamethoxazole และ Trimethoprim

2.4.2 การเกิดการดื้อยา

สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทดังนี้

1. เกิดจากการเลือกสรรตามธรรมชาติ (Natural selection) แนวทางนี้กล่าวว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมียีนดื้อยาอยู่ในตัวปะปนอยู่แล้วตามธรรมชาติ แต่เป็นจำนวนน้อย โดยไม่เกี่ยวข้องกับการมียาต้านแบคทีเรียหรือไม่ แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นก็คือเมื่อเชื้อแบคทีเรียชนิดดังกล่าวมีการสัมผัสยาต้านแบคทีเรียมาก และนานขึ้น ยาจะทำลายส่วนที่ไว (ไม่ดื้อ) ต่อยาให้หมดไป เหลือส่วนที่ดื้อต่อยาไว้ ซึ่งส่วนนี้ก็จะทำการเจริญเพิ่มจำนวนและแสดงออกเป็นแบคทีเรียดื้อยาอย่างสมบูรณ์
2. เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโดยการใช้อยาต้านแบคทีเรีย แนวทางนี้กล่าวว่าแบคทีเรียแต่ละชนิด เดิมมีความไวต่อยาต้านจุลชีพ แต่เมื่อได้มีโอกาสสัมผัสกับยาต้านจุลชีพ โดยเฉพาะในขนาดและระยะเวลาในการให้ที่ไม่เหมาะสมที่จะทำให้ตายเชื้อได้หมด เชื้อก็จะพัฒนาการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม ให้สามารถทนทานต่อการทำลายของยาได้

2.4.3 กลไกการดื้อยา

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของตัวมันทำให้มีคุณสมบัติพิเศษต่างๆ เพิ่มขึ้นเพื่อใช้ป้องกันตัวมันจากการถูกทำลายด้วยยาต้านจุลชีพ คุณสมบัติเหล่านี้พอจะสรุปรวมเป็นกลไกการดื้อยาของแบคทีเรียได้ 5 กลไก คือ

1. การสร้างเอ็นไซม์ทำลายยา
ตัวอย่างเช่น การสร้างเอ็นไซม์ที่มีชื่อว่า *beta*-lactamase ซึ่งสามารถทำลายโครงสร้างหลักของยาในกลุ่ม *beta*-lactams ทำให้ยาหมดฤทธิ์ เช่น Penicillins, Cephalosporins เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอ็นไซม์ทำลายยาได้มีหลายชนิด เช่น เชื้อที่เป็นสาเหตุของฝี, หนอง คือ *Staphylococcus aureus* บางสายพันธุ์ เชื้อทำให้เกิดโรคหนองในคือ *Neisseria gonorrhoea* บางสายพันธุ์ เป็นต้น
2. การลดการผ่านเข้าสู่เซลล์ของยา
แบคทีเรียที่ดื้อยาอาจสร้างผนังกั้นการผ่านเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียของยา บางชนิดจะสร้างสิ่งที่ทำหน้าที่เป็นปั๊ม (Pump) เพื่อเร่งการขับยาออกนอกเซลล์ ทำให้ไม่มีปริมาณยาภายในเซลล์มากพอที่จะทำลายแบคทีเรียได้ ตัวอย่างการดื้อยาโดยกลไกนี้ พบในเชื้อมากมายหลายชนิดที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม Tetracyclines และ Aminoglycosides
3. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตัวรับยา



โดยปกติการเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียของยาจะต้องไปจับกับตัวรับจำเพาะของมัน ซึ่งส่วนมากเป็นสารโปรตีนที่เยื่อหุ้มผนังเซลล์หรือภายในเซลล์ การดื้อยาโดยกลไกนี้เชื้อแบคทีเรีย จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวรับยา ทำให้ยาไม่สามารถจับกับตัวรับของมันหรือจับได้ไม่แน่น ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ แบคทีเรียหลายชนิดดื้อต่อยาในกลุ่ม Erythromycin โดยใช้กลไกนี้

4. การเปลี่ยนแปลงขบวนการเมตาบอลิซึมของตัวแบคทีเรีย โดยใช้ขบวนการอื่นที่ไม่ใช่ขบวนการเดิมที่ยาเคยออกฤทธิ์ขัดขวางได้

ตัวอย่างเช่น การดื้อต่อยา Sulfamethoxazole และ Trimethoprim

5. การใช้กลไกทางอ้อมต่างๆ

เช่น ยากลุ่ม Penicillin จะไม่สามารถทำลายแบคทีเรียกลุ่ม Mycoplasma ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญหนึ่งของโรคติดเชื้อทางเดินหายใจ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สร้างผนังเซลล์ ซึ่งเป็นเป้าหมายในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของยากลุ่มนี้ (พิณทิพย์ พงษ์เพชร, ม.ป.ป.)



3. แผนการดำเนินงานโครงการ

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

รากหนอนตายอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้มาจาก อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย โดยเก็บเป็นรากสดล้างดินออกด้วยน้ำสะอาดและนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งไว้ในที่ร่มให้แห้ง

3.1.1 การสกัดสารออกฤทธิ์จากรากหนอนตายอย่าง

การสกัดสารออกฤทธิ์ในการทดลองนี้สกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดได้แก่ 95% Methyl alcohol และ 95% Ethyl alcohol และการสกัดด้วยน้ำรวมทั้งสกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำเพื่อเปรียบเทียบว่าวิธีไหนที่ให้สารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ แบคทีเรีย ได้ดีที่สุด โดยการสกัดสารออกฤทธิ์จากรากหนอนตายอย่างทำได้โดยการนำรากหนอนตายอย่างสดมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วผึ่งไว้ในที่ร่มให้แห้ง จากนั้นนำมาบดหรือปั่นให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก 100 กรัมแล้วแช่ในตัวทำละลาย 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน แล้วกรองเอากากออกด้วยกระดาษกรอง Whatman paper no.1 นำกากหลังจากที่กรองแล้วมาแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์เดิมซ้ำอีกเป็นเวลา 3 วัน แล้วกรองเอากากออกเช่นเดิม (ทำซ้ำสามครั้ง) นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมด 3 ครั้งมารวมกัน แล้วนำไปประเหยตัวทำละลายออกจากด้วย Rotary evaporator แบบลดความดัน สำหรับสารสกัดหยาบจาก 95% methyl alcohol (Methanolic extract) จะใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 60 °C ในขณะที่สารสกัดหยาบจาก 95% ethyl alcohol (Ethanolic extract) จะใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 65 °C จะได้สารสีน้ำตาลเข้มในลักษณะขุ่นหนืด ละลายด้วย DMSO อัตราส่วน 1:5 จะได้สารสกัดหยาบส่วนสารสกัดหยาบจากน้ำนั้นนำมาระเหยน้ำออกจากด้วย Lyophilized จะได้สารสกัดหยาบจึงนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ส่วนการกลั่นด้วยไอน้ำนั้นทำได้โดย นำรากหนอนตายอย่างที่บดพอหยาบ ชั่ง น้ำหนัก 100 กรัม ลงในขวดกลั่นแล้วเติมน้ำ 250 มิลลิลิตรพร้อมกับใส่เศษกระเบื้อง (Boiling chips) 2-3 ชิ้นเพื่อป้องกันการเดือดฟู่ของน้ำ แล้วนำขวดกลั่นต่อเข้ากับชุดกลั่น ควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 100 °C เมื่อเกิดการควบแน่นไอน้ำที่เกิดจากการกลั่นจะ ควบแน่นกับน้ำเย็นและตกลงมา สามารถ ไข เอา ชั้นของสารที่ควบแน่นลงมาออกมาจากก๊อกได้

3.1.2 การแยกบริสุทธิ์บางส่วน

3.1.2.1 การแยกด้วยบริสุทธิ์บางส่วนด้วย High performance liquid chromatography (HPLC)

นำสารสกัดหยาบมากรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 μ M ใช้ตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่คือ 50% Acetonitrile และน้ำ โดยเพิ่มความเข้มข้นของ Acetonitrile ขึ้นและตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm)

3.1.2.2 การแยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย Dichloromethane (CH_2Cl_2)

นำสารสกัดหยาบของหนอนตายอย่างที่สกัดได้จากข้อ 3.1.1 มาทำการแยกสกัดแบบแบ่งส่วนด้วย CH_2Cl_2 และน้ำ อัตราส่วน 1:2:2 โดยใช้กรวยแยกเขย่าให้สารละลายทั้งหมดเข้ากันแล้วเปิดจุกกรวยด้านบนให้อากาศออก น้ำ และ CH_2Cl_2 จะแยกชั้นกันโดยน้ำจะอยู่ด้านบน และสารสกัดจากรากหนอนตายอย่างจะละลายอยู่ในชั้นของ CH_2Cl_2 นำสารสกัดส่วน CH_2Cl_2 ไประเหย CH_2Cl_2 ออกจากด้วย Rotary evaporator แบบลดความดัน ภายใต้อุณหภูมิ 50 °C จะได้สารสีน้ำตาลเข้ม มีลักษณะขุ่นหนืดคล้ายสารสกัดหยาบ ละลายออกมาด้วย 100% DMSO ด้วยอัตราส่วน 1:5

3.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ



3.2.1 การเลี้ยงเชื้อ

การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบทั้งหมด 20 strains โดยทำการ cross streak บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น (Nutrient agar) และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการ Inoculate เชื้อที่มีโคโลนีเดียวจาก Agar plate ลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (Nutrient broth) อยู่ 3 มิลลิลิตรและเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C, 160 rpm เป็นระยะเวลาประมาณ 5-6 ชั่วโมง จนได้เซลล์ที่มีความขุ่น (OD₆₅₀) ประมาณ 0.5 - 0.6 (Log phase)

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรีย

3.2.2.1 Disc diffusion assay

นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ที่มีค่า OD₆₅₀ ประมาณ 0.5 - 0.6 มาทำการเจือจางลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวให้ได้จำนวนเชื้อเริ่มต้น 1×10^8 CFU/mL (0.5 McFaland) ใช้ Cotton swab ที่ปราศจากเชื้อจุ่มแล้วแตะข้างหลอดเพื่อไม่ให้ชุ่มเกินไป แล้วนำไปป้ายบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น 3 ระบาย ทิ้งไว้ให้เซลล์แห้งพอหมาด หลังจากนั้นใช้คีมหนีบ (Forceps) คีบ Paper disc (Diameter 0.6 cm) ที่ปราศจากเชื้อมาวางไว้บนผิวหน้าอาหารในตำแหน่งที่ได้เขียนกำหนดไว้แล้วว่าจะทดสอบสารชนิดใด เมื่อวางครบทุกจุดแล้วจึงใช้ Auto pipette ทำการปิเปตสารสกัดและสารสกัดที่ทำการแยกบริสุทธิ์บางส่วนลงไปใน Paper disc ปริมาณ 30 µl รวมทั้ง Positive control ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ 0.1 mg/ml Gentamicin เป็น Positive control ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วเก็บใส่ถุงพลาสติก บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง แล้วจึงนำเพลตมาสังเกตพื้นที่ของการยับยั้ง (Inhibition zone) รอบๆ Paper disc ถ้าสารที่ทดสอบมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตได้จะไม่เห็นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียรอบๆ Paper disc

3.2.2.2 Broth microdilution assay

นำเชื้อที่เลี้ยงได้ OD₆₅₀ ประมาณ 0.5-0.6 มาเจือจางให้ได้จำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 1×10^8 CFU/ml ปิเปตลง 96-well plate ปริมาตร 100 µl หลังจากนั้นจึงปิเปตสารที่ต้องการทดสอบคือ สารสกัดหยาบ และสารที่ทำการแยกบริสุทธิ์บางส่วนลงไปปริมาตร 30 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ 650 nm แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ความยาวคลื่น 650 nm เพื่อวัดความขุ่นของเซลล์ (Turbidity) และนำค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นและค่าดูดกลืนแสงที่เวลาผ่านไปข้ามคืน มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

3.2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mamalian cell)

3.2.3.1 Hemolytic assay

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเม็ดเลือดแดงทำได้โดยนำเม็ดเลือดแดงของคนจากคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มาปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 1,500 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำส่วนที่เป็นตะกอน (Pellet) มาล้างด้วย 0.9% NaCl 3 ครั้ง จากนั้นเติม 0.9% NaCl ปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาณเลือดที่มี เติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.2% (v/v) จำนวน 100 µl ลงไป บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง ที่ 1,500 g เป็นเวลา 5 นาที โหลดตัวอย่างเลือดที่ปั่นเหวี่ยงแล้วลงใน Flat-bottom 96 well plat วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วยเครื่อง Micro-plate reader บันทึกค่า และวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยคำนวณค่า % Hemolysis จากสมการ

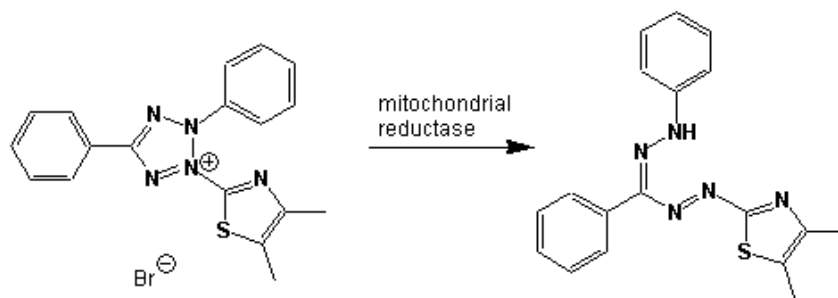


$$\% \text{ Hemolysis} = 100 \times \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{triton X 100}} - A_{\text{blank}}}$$

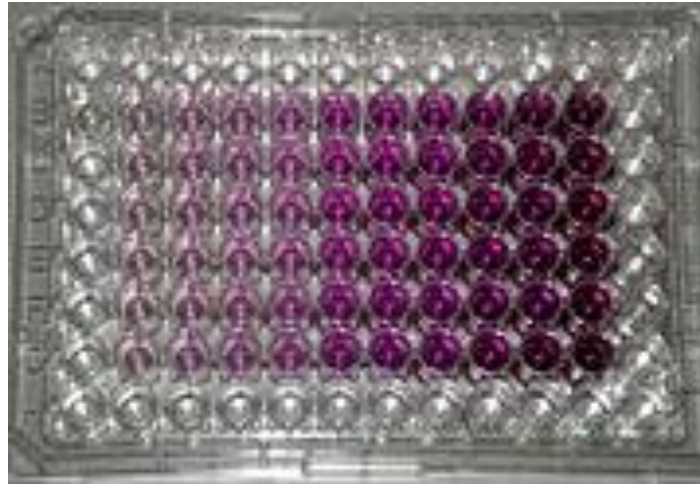
(Travis et al., 2000)

3.2.3.2 Cytotoxicity

เป็นการทดสอบความเป็นพิษต่อ Mamalian cell โดยวิธี Cytotoxicity assay ทำได้โดยการเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 และนำ Cell suspension 6×10^3 cells เลี้ยงใน Tissue culture plate ที่ 37°C ข้ามคืน หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารสกัดหยาบที่เจือจางความเข้มข้นลดลงครึ่งละ 10 เท่า (Tenfold serial dilution) จากความเข้มข้นของ Stock 20% (v/v) ใน DMSO ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง $20 - 2 \times 10^{-9}$ % (v/v) จำนวน 100 μl ลงไป บ่มที่ 37°C ข้ามคืน เติม (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT reagent) หลังจากนั้น เติม DMSO 10 μl เพื่อละลาย Purple formazan และจะได้สารละลายสีม่วงซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น สามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้ในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm Cytotoxicity เป็นการวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณ โดยทดสอบหา Cell viability โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้ Enzyme succinate dehydrogenase ใน Mitochondria ทำปฏิกิริยากับสาร MTT ที่มีสีเหลือง เปลี่ยนเป็น Formazan product ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงิน หลังจากละลายสีภายในเซลล์ด้วย DMSO จึงทำการวัดหาปริมาณ Formazan product ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่า Optical Density (OD) ที่ความยาวคลื่น 570 nm (หน่วยปฏิบัติการทดสอบทางชีวภาพสำหรับวัสดุทางการแพทย์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2554)



ภาพที่ 5. แสดงการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไมโทคอนเดรีย (Wikipedia, ม.ป.ป.)



ภาพที่ 6 แสดงสีของ Formazan product ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 550-570 nm
(Wikipedia, ม.ป.ป.)

จากภาพระดับความเข้มของสีจะบ่งบอกถึงการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยที่เรียงลำดับการรอดชีวิตได้จากความเข้มของสีจากมากไปน้อย

3.3 การทดสอบการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Membrane permeabilization)

3.3.1 การทดสอบการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (membrane permeabilization)

นำเซลล์แบคทีเรียแกรมลบคือ *Klebsilla pneumonia* 17736 และแกรมบวกคือ *Bacillus pumilus* TISTR 905 เลี้ยงที่ 37 °C, 160 rpm จนได้ OD₆₅₀ ประมาณ 0.5-0.6 ปั่นเก็บเซลล์ที่ 5,000 rpm 5 นาที นำส่วนตะกอน (pellet) มาล้างด้วย PBS pH 7.0 จำนวน 2 ครั้ง และเจือจางเซลล์ใน PBS ให้มีความหนาแน่นของเซลล์ที่ OD₆₅₀ ประมาณ 1.2 ปีบเซลล์ปริมาตร 1,940 µl ลงในเอเบเพนดอบตามด้วย Hydrophobic fluorescent probe คือ 1-N-phenyl naphthylamine (NPN) ปริมาตร 40 µl และ สารสกัดความเข้มข้น 0.2% (v/v) 20 µl และวัดการซึมผ่านได้ของเยื่อเซลล์ด้วยเครื่อง Fluorescent

3.3.2 การทดสอบการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (Plasma membrane permeabilization)

เป็นการศึกษาการแพร่เข้าสู่เซลล์ของ *ortho*-Nitrophenyl-β-galactoside (ONPG) และถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β-galactosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในไซโตพลาสซึมได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ *o*-nitrophenol ที่มีสีเหลืองสามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วง 415-420 nm และศึกษาการรั่วออกมาของเอนไซม์ β-galactosidase ซึ่งอยู่ภายในไซโตพลาสซึม ทำการทดสอบเฉพาะกับเซลล์แบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบสามารถสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ได้ โดยในการทดลองนี้ใช้ *Escherichia coli* MG 1655 ในการทดสอบเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงการรบกวนจากแลคโตส เพราะ *E. coli* MG 1655 ไม่มียีนในการนำแลคโตสเข้าสู่เซลล์ เนื่องจากแลคโตสนั้นเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ β-galactosidase โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Nutrient Broth) ที่มี 2 % แลคโตสเพื่อกระตุ้นให้เซลล์แบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ β-galactosidase เมื่อเลี้ยงเซลล์ได้ค่า OD₆₅₀ ประมาณ 0.5-0.6 จึงนำเซลล์มาปั่นเก็บเซลล์ที่ 5,000 rpm 5 นาที นำส่วนตะกอน (pellet) มาล้างด้วย 0.5% NaCl 2 ครั้ง โดยปั่น



เหวี่ยงที่ 5,000 rpm 5 นาที หลังจากนั้นเจือจางเซลล์ให้มีความเข้มข้นที่ A_{650} ประมาณ 1.2 แบ่งเซลล์ออกเป็นสามส่วน นำเซลล์ส่วนแรกมา Sonicate (15 W, pulses of 20 seconds) ประมาณ 5-10 นาที เพื่อใช้เป็น Positive control นำส่วนที่สองมาปิเปตลง 96 well plate เติมสารสกัดความเข้มข้น 0.2% (v/v) 30 μ l และ ONPG 10 μ l เพื่อวัด o-nitrophenol ที่มีสีเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก ONPG เมื่อบ่มเซลล์แบคทีเรียกับสารสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 5 นาที และนำเซลล์ส่วนที่เหลือมาปิเปตลงเอบเพนดอบ ปริมาตร 100 μ l และทดสอบด้วยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 0.2% (v/v) 30 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 30 นาที แล้วนำเฉพาะส่วนใส (Supernatant) มาปิเปตลงใน 96 well plate แล้วเติม Substrate analog (ONPG) ลงไป 10 μ l บ่มประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง ถ้าสารสกัดสามารถทำให้เอนไซม์ β -galactosidase รั่วออกมาได้เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับ ONPG และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลืองเกิดขึ้นคือ o-nitrophenol สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 415 nm

3.4 การศึกษาการยับยั้งการหลั่งของโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรีย (Protein release inhibition)

นำเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงจนได้ค่า OD₆₅₀ ประมาณ 0.6 (อยู่ในช่วง log phase) มาทำการทดสอบ โดยเซลล์แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบแกรมลบคือ *K. pneumonia* 17736 และแกรมบวกคือ *B. pumilus* TISTR 905 ปิเปตเซลล์แบคทีเรียลงในหลอดไมโครพิพิจปริมาตร 100 μ l แล้วจึงเติมสารที่ต้องการทดสอบได้แก่ สารสกัดหยาบความเข้มข้น 0.2% (v/v) และ สารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย CH₂Cl₂ (CH₂Cl₂ fraction) ความเข้มข้น 0.2% (v/v) ลงไปปริมาตร 50 μ l บ่มที่ 37 °C ข้ามคืน หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที นำเฉพาะส่วนใส (Supernatant) มาปริมาตร 10 μ l เติม Solubilizing buffer ลงไป 10 μ l แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปโหลดใน SDS-PAGE เพื่อดูแบบแผนของโปรตีน หลังจากที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue

3.5 การศึกษาโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียที่ทดสอบด้วยสารสกัด

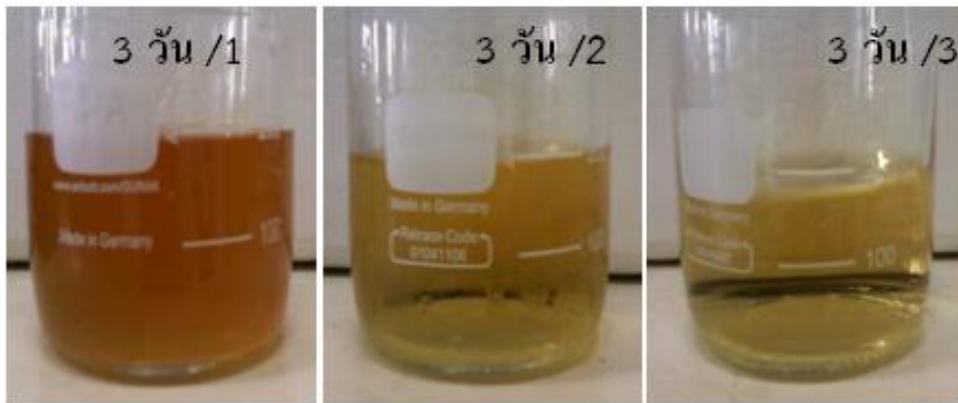
นำเซลล์แบคทีเรียแกรมลบคือ *K. pneumonia* 17736 และแกรมบวกคือ *B. pumilus* TISTR 905 เลี้ยงที่ 37 °C, 160 rpm จนได้ OD₅₅₀ ประมาณ 0.5-0.6 ปั่นเก็บเซลล์ที่ 5,000 rpm 5 นาที นำส่วนตะกอน (pellet) มาล้างด้วย PBS pH 7.0 จำนวน 2 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 rpm 5-10 นาที เจือจางเซลล์ใน PBS pH 7.0 ให้ได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.01-0.1% ทดสอบเซลล์ในเอบเพนดอบโดยอัตราส่วนสารสกัด 50 μ l ต่อเซลล์ 100 μ l บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมงตามลำดับ หลังจากนั้นปิเปตเซลล์ลงบนเมมเบรน (Polycarbonate membrane 0.2 μ M) ตรึงเซลล์ด้วย 100% Glutaraldehyde 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการ Dehydration ในเอทานอลจาก 30%, 50%, 70%, 90%, และ 100% (2ครั้ง) ความเข้มข้นละ 15 นาที นำไปเคลือบด้วยทองคำแล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy)



4. ผลการดำเนินงาน

4.1 การสกัดสารออกฤทธิ์จากรากหนอนตายอยากและฤทธิ์ทางชีวภาพ

การสกัดสารออกฤทธิ์จากรากหนอนตายอยากใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สองชนิดคือ 95% methyl alcohol และ 95% ethyl alcohol เมื่อผ่านไประยะเวลา 3 วัน จะได้สารละลายสีเหลืองใส ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 สารสกัดหยาบที่สกัดได้จาก 95% methyl alcohol ในระยะเวลา 3, 6 และ 9 วัน ตามลำดับ

เมื่อนำสารละลายที่สกัดทั้ง 3 ครั้งมารวมกันแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator โดยสารสกัดหยาบจากเมทานอลระเหยที่อุณหภูมิ 60 °C และสกัดหยาบจากเอทานอลระเหยที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นระยะเวลา 2-3 ชั่วโมง พบว่าได้สารละลายสีน้ำตาลเข้มมีลักษณะข้นหนืด ละลายออกมาด้วย DMSO จะมีสีน้ำตาลเข้มดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 สารสกัดหยาบจากเมทานอลหลังจากที่ระเหยตัวทำละลายออกด้วย Rotary evaporator และละลายใน 100% DMSO ในอัตราส่วน 1:5

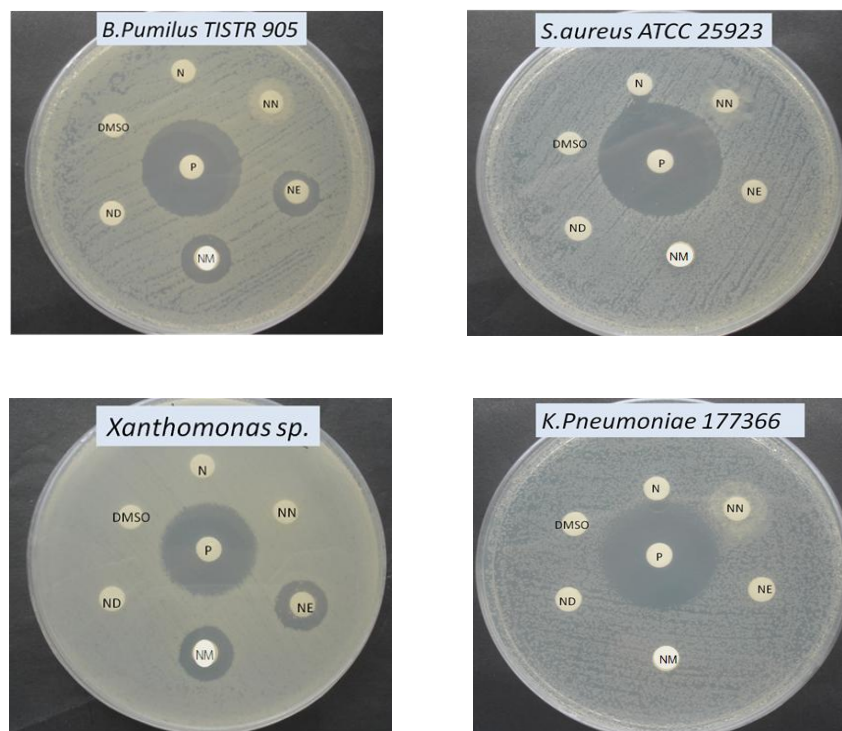
สารสกัดหยาบทั้ง 4 ชนิดหลังจากทำให้แห้งด้วย Rotary evaporator และ Lyophilized แล้ว แสดงเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบ ดังตารางที่ 3



ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์ของสารสกัดหยาบทั้ง 4 ชนิด จากน้ำหนักรากหนอนตายอย่างแห้ง 100 กรัม

ชนิดของสารสกัด	เปอร์เซ็นต์สารสกัด (w/v)
สารสกัดหยาบจากเมทานอล	5.7 %
สารสกัดหยาบจากเอทานอล	5.04%
สารสกัดหยาบจากน้ำ	2.57%
สารสกัดหยาบจากการกลั่นด้วยไอน้ำ	0.5%

และเมื่อนำสารสกัดทั้งหมด 4 ชนิดที่สกัดได้ ได้แก่ 5.7% สารสกัดหยาบจากเมทานอล (Methanolic extract) 5.04 % สารสกัดหยาบจากเอทานอล 2.57% สารสกัดหยาบจากน้ำ และ 0.5% สารสกัดหยาบจากการกลั่นด้วยไอน้ำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Disc diffusion assay กับแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบทั้งหมด 20 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีที่สุดโดยเฉพาะในแกรมบวก รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากเอทานอล ส่วนสารสกัดหยาบจากน้ำและสารสกัดหยาบจากการกลั่นด้วยไอน้ำนั้นไม่พบการยับยั้ง ดังแสดงตัวอย่างการยับยั้งในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Disc diffusion assay กับเชื้อ *B. pumilus* TISTR 905, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (แกรมบวก), *Xanthomonas sp.*, *K. pneumoniae* 177366 (แกรมลบ), ตามลำดับ

P = 0.1 mg/ml Gentamicin (Positive control) N = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (negative control)

NN = สารสกัดหยาบจากน้ำ

NE = สารสกัดหยาบจากเอทานอล

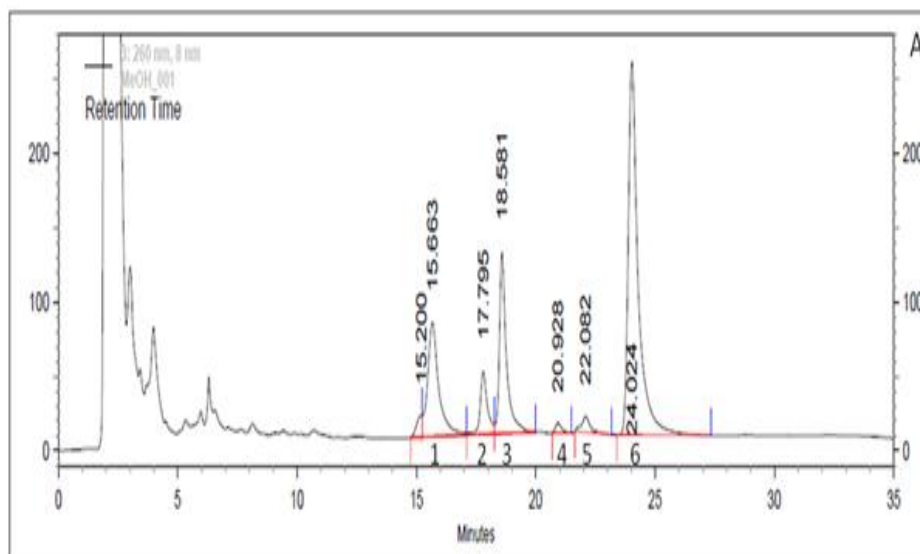


NM = สารสกัดหยาบมากเมทานอล
Dimethyl sulfoxide (Control)

ND = สารสกัดหยาบจากการกลั่นไอน้ำ DMSO =

จากภาพที่ 9 จะเห็นวงใสหรือที่เรียกว่าพื้นที่ในการยับยั้ง (Inhibition zone) รอบๆ Paper disc ซึ่งแสดงถึงความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ จากภาพจะเห็นว่านอกจากยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบเป็น Positive control คือ 0.1 mg/ml Gentamicin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรคได้แล้ว พบว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอล (NM) และสารสกัดหยาบจากเอทานอล (NE) เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรคได้โดยจะพบวงใสๆรอบๆ Paper disc ส่วนสารสกัดหยาบจากน้ำและสารสกัดหยาบจากไอน้ำนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรคได้ จากผลการทดลองนี้ที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอลและสารสกัดหยาบจากเอทานอลเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรคได้ และมีพื้นที่ในการยับยั้งไม่แตกต่างกันมาก แต่ผู้วิจัยได้เลือกสารสกัดหยาบจากเมทานอลในการแยกบริสุทธิ์ต่อไปเนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้มากกว่าการสกัดจากเอทานอลและสามารถระเหยตัวทำละลายออกได้ง่ายและรวดเร็วกว่า

จากที่ผู้วิจัยได้เลือกสารสกัดหยาบจากเมทานอลในการศึกษาต่อไปนั้น โดยนำมาทำการแยกบริสุทธิ์บางส่วน ด้วย HPLC โดยใช้ C18 reverse phase HPLC column และตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm ในการตรวจสอบองค์ประกอบในสารสกัดหยาบที่มีหมู่ Aromatic ring พบว่ามีพีคหลักออกมาทั้งหมด 6 พีคที่ตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 260 nm ที่เวลาแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 พีค (Peak) ที่เกิดจากการแยกบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดหยาบจากเมทานอล ด้วย HPLC โดยแสดง Retention time และ Peak ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ

จากภาพที่ 10 พบว่ามีพีคออกมาทั้งหมด 6 Peak ที่เวลา 15.50, 18.00, 18.50, 21.00, 22.00 และ 24.00 นาที ตามลำดับ และกำหนดให้พีคที่ 1-6 เรียกว่า Fraction ที่ 1-6 และเมื่อนำ Fraction ที่ 1-6 มาทดสอบ Antimicrobial activity ด้วยวิธี Disc diffusion assay และ Broth microdilution assay กับแบคทีเรียทั้งหมด 6 สายพันธุ์ พบว่าทั้ง 6 Peak ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรคได้เลย



ผู้วิจัยคาดว่าที่เป็นเช่นนี้อาจ เกิดจากในสารสกัดหยาบมี Active ingredient มากกว่าและสามารถทำงานเสริมฤทธิ์ (Synergistic effect) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีกว่า

4.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเมทานอลและสารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรค

4.2.1 Disc diffusion assay

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเมทานอลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพโดยในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis*, *S. pneumonia* DMS 5851, *S. aureus* 1466, *B. pumilus* TISTR 905, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. shaericus* TISTR 678, *B. liceniformis* TISTR 1010, *B. subtilis* TISTR 008, *B. cereus* ATCC 11778 และ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045, และแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* 0157 :H7, *K. pneumoniae* 17736, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholera*, *S. typhi* ATCC 5784, *S. typhi* B, *S. typhi*, *S. paratyphi* B และ *Xanthomonas* sp. จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* 1466, *B. pumilus* TISTR 905, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. shaericus* TISTR 678, *B. liceniformis* TISTR 1010, *B. subtilis* TISTR 008, *B. cereus* ATCC 11778 และ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 และแบคทีเรียแกรมลบได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Xanthomonas*, *S. typhi* และ *K. pneumoniae* 17736 โดยมีพื้นที่ในการยับยั้งแสดงในตารางที่ 4 จากผลการทดลองจะสังเกตเห็นว่าโดยส่วนมากแล้วสารสกัดหยาบนั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีในแบคทีเรียแกรมบวก โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ในการทดสอบได้เพียง 3 สายพันธุ์



ตารางที่ 4. ผลของสารสกัดหยาบจากเมทานอลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรคที่ทดสอบ
ด้วยวิธี Disc diffusion assay: Inhibition zone (mm) mean $\pm$ SD; Paper disc diameter 6.0 mm

Bacteria strains (Gram+)	Inhibition zone (mm)	Gentamicin (mm)
<i>B. shaericus</i> TISTR 678	13.6 $\pm$ 1.5	25 $\pm$ 1.73
<i>B. pumilus</i> TISTR 905	12.3 $\pm$ 0.05	27.66 $\pm$ 3.21
<i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045	12.3 $\pm$ 1.15	26.66 $\pm$ 0.57
<i>B. liceniformis</i> TISTR 1010	12 $\pm$ 1	24.33 $\pm$ 1.52
<i>B. subtilis</i> TISTR 008	11.33 $\pm$ 0.57	26.33 $\pm$ 1.52
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	11 $\pm$ 1	24 $\pm$ 1.7

Bacteria strains (Gram-)	Inhibition zone (mm)	Gentamycin (mm)
<i>Xanthomonas</i>	12.3 $\pm$ 0.5	22 $\pm$ 0
<i>S. typhi</i>	8.0 $\pm$ 0	21 $\pm$ 1.73
<i>K. pneumoniae</i> 17736	9.0 $\pm$ 0	22 $\pm$ 4.58
<i>P. aeruginosa</i>	No inhibition	11.33 $\pm$ 2.3
<i>Vibrio cholerae</i>	No inhibition	20 $\pm$ 0
<i>S. typhi</i> ATCC 5784	No inhibition	21.66 $\pm$ 1.52
<i>S. typhi</i> B	No inhibition	20.66 $\pm$ 0.57
<i>S. paratyphi</i> B	No inhibition	18.66 $\pm$ 2.88
<i>E. coli</i> 0157:H7	No inhibition	22.66 $\pm$ 3.78
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	11 $\pm$ 1	23 $\pm$ 2.64
<i>S. aureus</i> 1466	10.3 $\pm$ 0.5	20.6 $\pm$ 1.5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	No inhibition	25.6 $\pm$ 2.51
<i>S. epidermidis</i>	No inhibition	25 $\pm$ 1
<i>S. pneumonia</i> DMS 5851	No inhibition	28.66 $\pm$ 2.08

จากตารางที่ 4 พบว่าโดยส่วนมากสารสกัดหยาบจากเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรคแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ โดยมีพื้นที่ในการยับยั้งเฉลี่ย 11.79 $\pm$ 0.98 mm และ 9.10 $\pm$ 2.81 mm ตามลำดับ โดยพื้นที่ในการยับยั้งที่ถือว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งได้คือมากกว่า 7.0 mm ขึ้นไป และเมื่อนำสารสกัดที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย HPLC fraction ที่ 1-6 มาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* 1466 และ *B. subtilis* ATCC 6633 และแกรมลบ ได้แก่ *Xanthomonas* sp, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* 17736 และ *E. coli* 0157 :H7 พบว่าสารสกัดที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย HPLC ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้เลย (ดังแสดงในตารางที่ 5

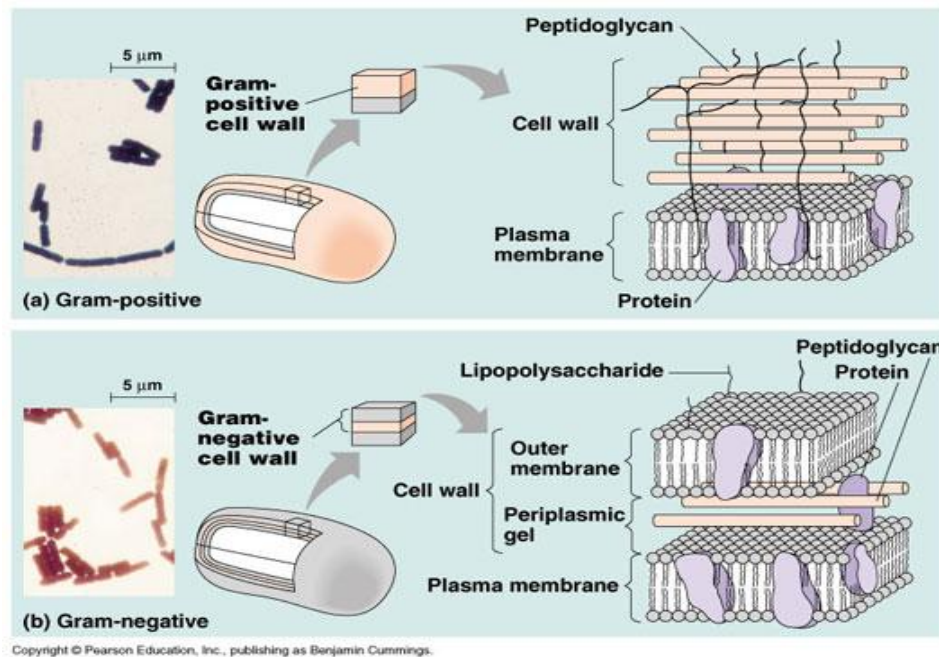


ตารางที่ 5 ผลของ fraction 1-6 เปรียบเทียบกับสารสกัดยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรค: Inhibition zone (mm) mean $\pm$ SD ; Paper disc diameter 6.0mm

Bacteria strains	Inhibition zone (mm)		
	Crude extract of methanol	Purified fraction 1-6	Gentamicin
<i>S. aureus</i> 1466	10.3 $\pm$ 0.5	No inhibition	20.6 $\pm$ 1.5
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	11 $\pm$ 1	No inhibition	24 $\pm$ 1.7
<i>X. sp.</i>	12.3 $\pm$ 0.5	No inhibition	22 $\pm$ 0
<i>P. aeruginosa</i>	No inhibition	No inhibition	11.33 $\pm$ 2.3
<i>K. pneumonia</i> 17736	9.0 $\pm$ 0	No inhibition	22 $\pm$ 4.58
<i>E. coli</i> 0157.H7	No inhibition	No inhibition	22.66 $\pm$ 3.78

จากตารางที่ 5 จะเห็นว่า สารสกัดที่ทำการแยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย HPLC ตั้งแต่ Fraction ที่ 1-6 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้เลย ทั้งในแกรมบวกและแกรมลบ

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบได้เพียง 3 สายพันธุ์ และสารสกัดที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย HPLC ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบได้เลยเมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion assay อาจจะเป็นเนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบนั้นมีผนังเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane) ทำให้สารสกัดไม่สามารถเข้าไปมีผลได้ (ดังแสดงในภาพที่ 4.6) ในขณะที่ผนังเซลล์ชั้นนอกไม่มีในแบคทีเรียแกรมบวก โดยชั้นนอกสุดของเซลล์นั้นเป็น Peptidoglycan จึงส่งผลให้สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นจึงใช้วิธีทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความไวสูงโดยคาดว่าจะเห็นผลการยับยั้ง เนื่องจาก Disc diffusion assay เป็นวิธีที่มีความไวต่ำ สารสกัดต้องมีความสามารถในการยับยั้งสูง จึงจะสามารถเห็นผลในการยับยั้งได้ จึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Broth microdilution assay ต่อไป



ภาพที่ 11 องค์ประกอบผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและลบ (Campbell, n.d.)

จากภาพที่ 11 แสดงองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ จากภาพผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและลบต่างกันที่แกรมบวกนั้นจะมีผนังเซลล์ 1 ชั้น ในขณะที่แกรมลบมี 2 ชั้น และชั้นนอกสุดของแบคทีเรียแกรมบวกเป็น Peptidoglycan 40 เส้น ซึ่ง Peptidoglycan คือโพลิเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลและกรดอะมิโน ประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ 1. ส่วนที่เป็น Backbone เป็น Polysaccharide สายยาวเรียกว่า Glycan สาย Glycan ประกอบด้วยน้ำตาล N-acetylmuramic (M) และ N-acetyl glucosamine (G) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ beta-1-4-glycosidic (M-G-M-G-M-G-M-G-M) 2. ส่วนที่เป็น Tetra peptide ซึ่งเกาะกับ M ได้แก่กรดอะมิโน L-alanine, D-alanine, D-glutamic acid, diamino pimelic acid (DPA) ซึ่ง Tetra peptide ที่เกาะอยู่กับ M ตัวที่ 3 จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย 3. มีเปปไทด์อีกชุดที่เชื่อมต่อกับ Tetrapeptide ด้วยพันธะโควาเลนต์ทำให้สาย Glycan สองสายมาต่อกันและยังช่วยเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์ขึ้น

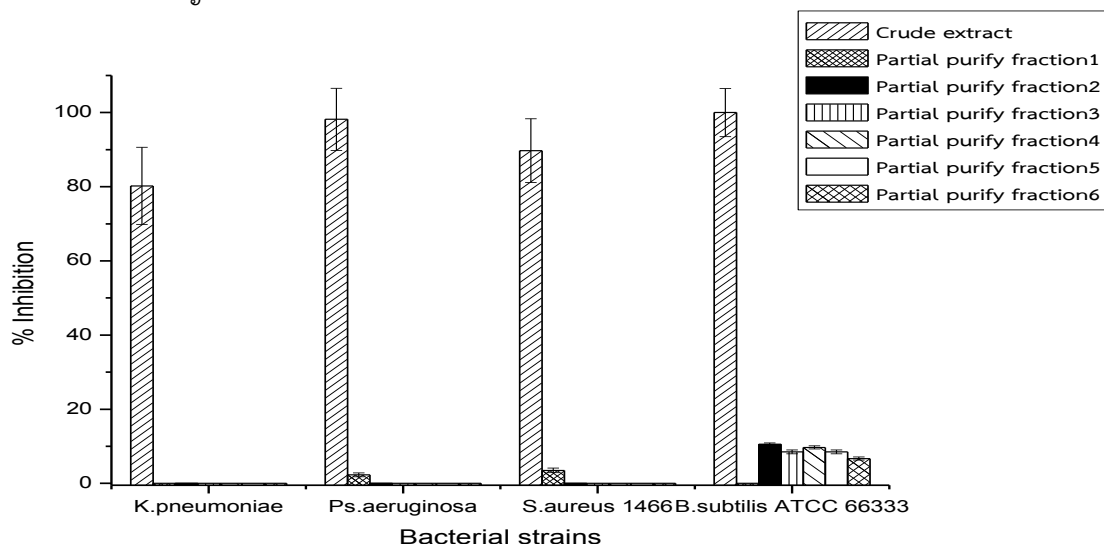
4.2.2 Broth microdilution assay

การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยวิธี Broth microdilution assay เป็นการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (Nutrient broth) และคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งจากการดูกลืนแสงที่วัดได้เปรียบเทียบกับค่าการดูกลืนแสงเริ่มต้น

โดยในการทดลองนี้ได้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดได้แก่ *S. aureus* 1466 และ *B. subtilis* ATCC 6633 และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดได้แก่ *P. aeruginosa* และ *K. pneumonia* 17736 จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาดจากเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิดได้แก่ *S. aureus* 1466, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* และ *K. pneumonia* 17736 โดยมีเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้ง 95.32%, 100%, 100% และ 80.41% ตามลำดับ ซึ่งจากที่ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion assay แล้วไม่เห็นผลการยับยั้งในแบคทีเรียแกรมลบ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า Broth dilution assay มีความไวในการทดสอบสูงกว่าวิธี Disc diffusion assay และเมื่อ



ทดสอบกับสารสกัดที่ทำการแยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย HPLC พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้เลย จะเห็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้เพียงเล็กน้อยใน *B. subtilis* ATCC 6633 (ดังแสดงในภาพที่ 12) จากผลการทดลองนี้ผู้วิจัยคาดว่าในสารสกัดที่ทำการแยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย HPLC นั้นมีผลทำให้ Active ingredient ที่ประกอบอยู่ในสารสกัดแยกออกจากกันและมีความเข้มข้นลดลง ดังนั้นจึงส่งผลให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้



ภาพที่ 12 ผลของสารสกัดหยาบจากเมทานอลและสารสกัดที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย HPLC ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ โดยวิธี Broth microdilution assay

4.2.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 ทำได้โดยวิธี Disc diffusion assay และ Broth microdilution assay เพื่อหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) ซึ่งค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพได้อย่างน้อย 99% เมื่อบ่มที่ 37 °C ข้ามคืน ผลการทดลองจาก Disc diffusion assay พบว่า สารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากเมทานอล ซึ่งมี Inhibition zone ที่มากกว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอล (ดังแสดงในตารางที่ 6)



ตารางที่ 6 ผลของสารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพเปรียบเทียบกับ
สารสกัดหยาบจากเมทานอล : Inhibition zone (mm) mean $\pm$ SD; paper disc diameter
6.0mm

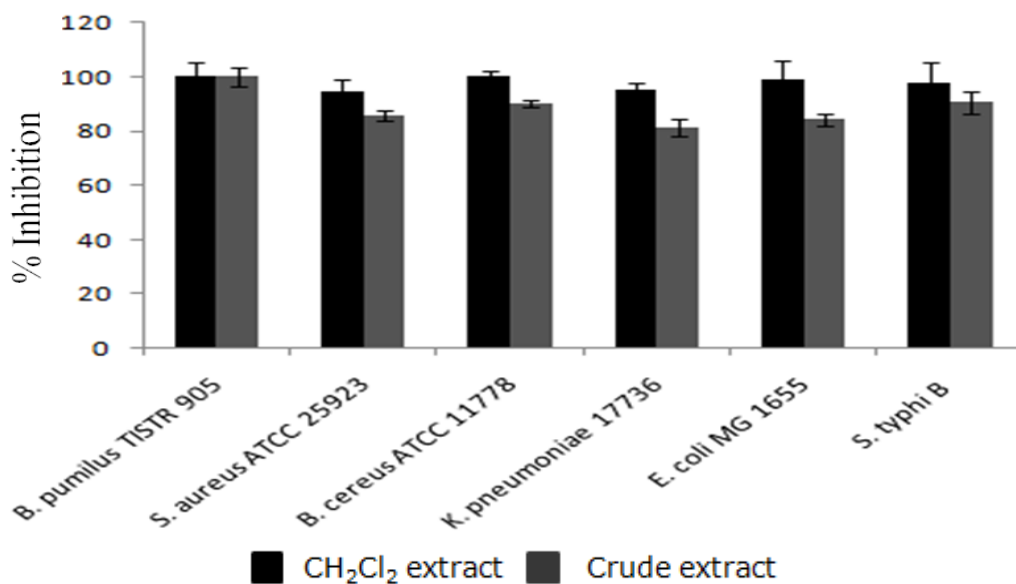
		Inhibition zone (mm)			
Bacteria strains		100% DMSO	Methanolic extract	CH_2Cl_2 extract	0.1 mg/ml Gentamicin
Gram +	<i>B. megaterium</i>	0	13.5 $\pm$ 0.21	15.25 $\pm$ 0.17	40.0 $\pm$ 0
	<i>B. cereus</i>	0	11.5 $\pm$ 0	15.0 $\pm$ 0	25.5 $\pm$ 0.07
	<i>B. pumilus</i> TISTR 905	0	11.0 $\pm$ 0	13.0 $\pm$ 0	26.0 $\pm$ 0
	<i>B. subtilis</i> TISTR 008	0	11.0 $\pm$ 0	13.0 $\pm$ 0	30.0 $\pm$ 0
	<i>B. liceniformis</i> TISTR 1010	0	12.0 $\pm$ 1	12.5 $\pm$ 0.04	24.5 $\pm$ 0.03
	<i>S. epidermidis</i>	0	11.0 $\pm$ 0	12.5 $\pm$ 0.07	39.5 $\pm$ 0.21
	<i>B. amyloliquefaciens</i> TISTR 1045	10.0 $\pm$ 0	9.5 $\pm$ 0.21	12.0 $\pm$ 0	32.5 $\pm$ 0.07
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0	9.0 $\pm$ 0	11.75 $\pm$.04	29.0 $\pm$ 0
	<i>B. shaericus</i>	0	9.5 $\pm$ 0.02	11.05 $\pm$ 0	29.0 $\pm$ 0.14
	<i>S. aureus</i> 1466	0	9.0 $\pm$ 0.28	0	24.5 $\pm$ 0.07
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	25.0 $\pm$ 0.14
	<i>S. pneumonia</i> DMS 5851	0	0	0	23.5 $\pm$ 0.07



ตารางที่ 6 ผลของสารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพเปรียบเทียบกับ สารสกัดหยาบจากเมทานอล : Inhibition zone (mm) mean $\pm$ SD; paper disc diameter 6.0mm (ต่อ)

Gram -	<i>Xantromonas</i>	0	12.3 $\pm$ 0.5	14.0 $\pm$ 0.14	24.0 $\pm$ 0
	<i>E. coli</i> 0157:H7	11.5 $\pm$ 0.07	0	12.0 $\pm$ 0	21.0 $\pm$ 0.07
	<i>P. aeruginosa</i>	11.5	0	12.0 $\pm$ 0.14	7.0 $\pm$ 0
	<i>E. coli</i> MG 1655	0	9.0 $\pm$ 0	10.0 $\pm$ 0	24.5 $\pm$ 0.07
	<i>K. pneumoniae</i> 17736	9.0 $\pm$ 0	9.0 $\pm$ 0	9.5 $\pm$ 0.07	20.5 $\pm$ 0.07
	<i>S. typhi</i>	0	8.0 $\pm$ 0	9.0 $\pm$ 0	22.5 $\pm$ 0.07
	<i>S. typhi</i> B	0	0	8.0 $\pm$ 0	21.25 $\pm$ 0.03
	<i>S. typhi</i> ATCC 5784	12.5 $\pm$ 0.07	0	8.0 $\pm$ 0	25.5 $\pm$ 0.07
	<i>S. paratyphi</i> B	0	0	0	21.5 $\pm$ 0.02
	<i>Vibrio cholerae</i>	0	0	0	21.25 $\pm$ 0.03

จากตารางที่ 6 จะเห็นว่าสารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 มี Inhibition zone มากกว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอลในแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่สารสกัดหยาบจากเมทานอลและสารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 สามารถยับยั้งได้ สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรคได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอล และจากผลการหาค่า MIC โดยวิธี Broth dilution assay แสดงดังภาพที่ 4.8

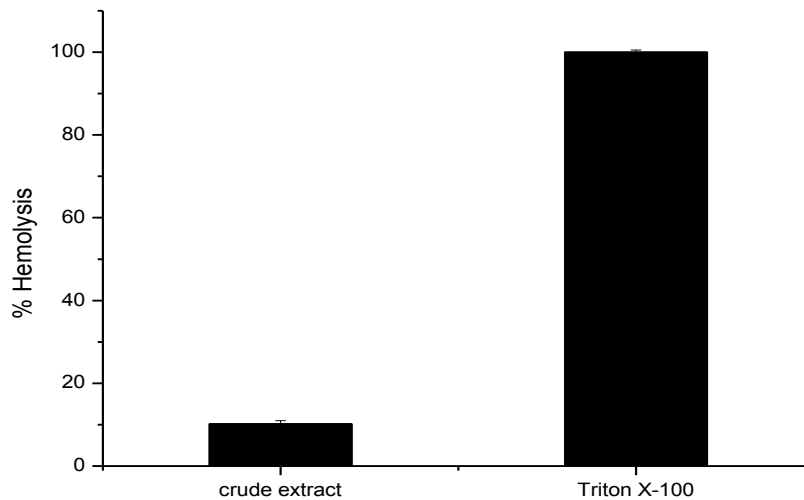


ภาพที่ 13 ผลของสารสกัดหยาบจาก CH₂Cl₂ และสารสกัดหยาบจากเมทานอลต่อการยับยั้ง
การเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรคโดยทดสอบด้วยวิธี Broth dilution assay

จากภาพที่ 13 เป็นกราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของจุลชีพก่อโรคที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจาก CH₂Cl₂ และสารสกัดหยาบจากเมทานอลโดยวิธี Broth dilution assay กับตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. pumilus* TISTR 905, *S. aureus* ATCC 23923, *B. cereus* ATCC 11778, *K. pneumoniae* 17736, *E. coli* MG 1655 และ *S. typhi* B จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจาก CH₂Cl₂ และสารสกัดหยาบจากเมทานอลที่ความเข้มข้นสุดท้าย 4.61% (v/v) ใน DMSO มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ 80% ในทุกเชื้อ และพบว่าสารสกัดหยาบจาก CH₂Cl₂ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพได้มากกว่า 99% ในเชื้อ *B. pumilus* TISTR 905, *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* MG 1655 และ *S. typhi* B ในขณะที่สารสกัดหยาบจากเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพได้มากกว่า 99% ในเชื้อ *B. pumilus* TISTR 905 เพียงสายพันธุ์เดียว จากการทดลองนี้สามารถบอกได้ว่า สารสกัดหยาบจาก CH₂Cl₂ และสารสกัดหยาบจากเมทานอล มีค่า MIC ที่มากกว่า 4.61% (v/v) ใน DMSO

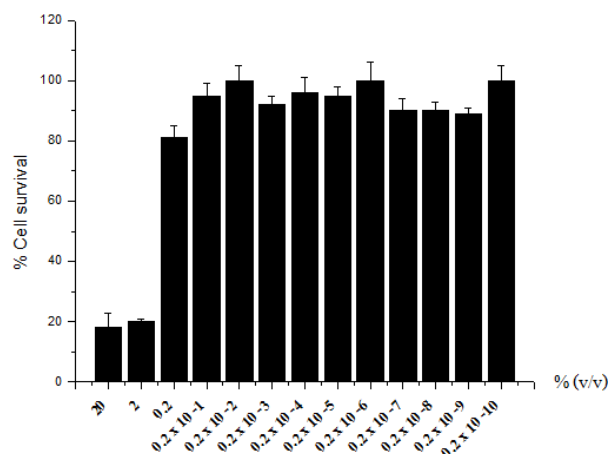
4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อเป็นการยืนยันว่าสารสกัดสามารถนำไปใช้ได้จริงกับสิ่งมีชีวิตเช่น มนุษย์หรือสัตว์ และเพื่อกำหนดค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการทดลองนี้ได้ทดสอบความสามารถของสารสกัดที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Hemolysis) โดยในการทดลองนี้ใช้ Triton X- 100 เป็น Positive control ที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ 100% ผลการทดลองพบว่า สารสกัดมีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 10% ที่ความเข้มข้น 0.2% (v/v) เมื่อเปรียบเทียบกับ Triton X - 100 (ดังแสดงในภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 14 ผลของสารสกัด และ Triton X -100 ต่อการแตกของเม็ดเลือดแดง

จากภาพที่ 14 แสดงให้เห็นชัดเจนว่าสารสกัดมีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเพียง 10% ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Triton X- 100 จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากรากหนอนตายอย่างไม่มีผลต่อการทำให้เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลื้อยถูกด้วยนมแตกที่ความเข้มข้น 0.2 % (v/v) และเมื่อได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาดต่อเซลล์ Macrophage RAW264.7 พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัด 20 % (v/v) และ 2% (v/v) ทำให้เซลล์สามารถรอดชีวิตได้ 18% และ 20% ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 0.2% (v/v) เซลล์รอดชีวิต 80% (ดังแสดงในภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ผลของสารสกัดต่อการรอดชีวิตของเซลล์ Macrophage RAW264.7 ที่ทดสอบด้วยวิธี MTT assay

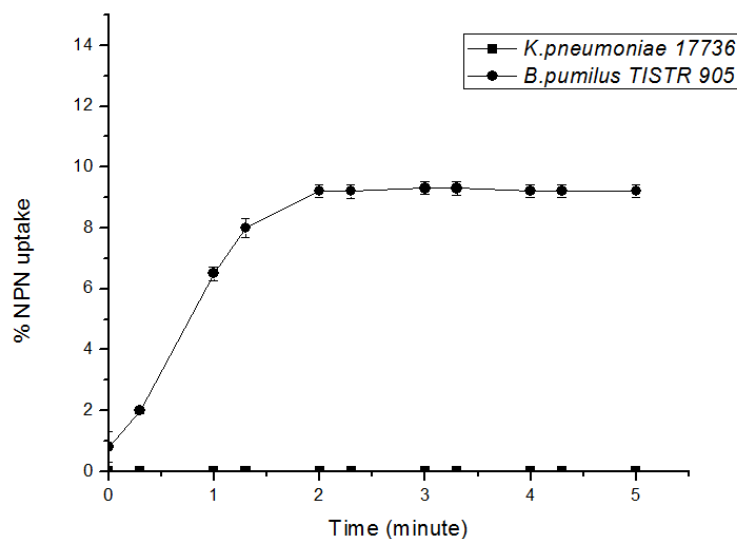
จากภาพที่ 15 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลดน้อยลงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์จะเพิ่มมากขึ้นและจากกราฟที่ความเข้มข้น 0.2% (v/v) ส่งผลให้เซลล์รอดชีวิตได้ 80% ซึ่งถือว่าเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และสามารถนำไปใช้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้



4.4 การทดสอบการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Membrane permeabilization)

4.4.1 การทดสอบการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Membrane permeabilization)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย (Outer membrane) โดยที่ต้องการทดสอบว่าสารสีกัดมีผลที่ทำให้เกิดการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียหรือไม่ โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกคือ *B. pumilus* TISTR 905 และแบคทีเรียแกรมลบคือ *K. pneumoniae* 17736 โดยวัดการเรืองแสงของของ Hydrophobic fluorescent probe คือ 1-N-phenyl naphthylamine (NPN) โดยปกติแล้ว NPN จะไม่เรืองแสงในสารละลาย แต่จะเรืองแสงเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม คือ สภาพแวดล้อมที่เป็น Hydrophobic ดังนั้นเมื่อสารสีกัดมีผลทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเกิดการซึมผ่านได้ (Permeabilization) และส่งผลให้ NPN ซึมผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่เป็น Hydrophobic สูง ดังนั้น NPN จึงสามารถเรืองแสงได้โดยวัดการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น Excitation 350 nm และ Emission 410 nm จากผลการทดลองพบว่า *K. pneumoniae* 17736 ไม่เกิดการเรืองแสงของ NPN โดยเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น % NPN uptake ก็ยังคง 0% เท่าเดิม จนกระทั่งที่เวลา 5 นาที ในขณะที่ *B. pumilus* TISTR 905 เกิดการเรืองแสงของ NPN อย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 60 วินาทีแรก ประมาณ 8% หลังจากนั้น % NPN uptake คงที่ที่ 8% จนกระทั่งที่เวลา 5 นาที (ดังแสดงในภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 ผลของสารสีกัดต่อการแพร่ของ NPN เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *K. pneumoniae* 17736 และ *B. pumilus* TISTR 905 โดยเทียบกับ Triron X-100 เป็น 100%

จากภาพที่ 16 จะเห็นผลการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์เฉพาะในแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้นแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่แตกต่างกันเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดอันตรกิริยาของสารสีกัดที่มีต่อผนังเซลล์ในการซึมผ่านได้ของเยื่อเซลล์และในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยสารสีกัด

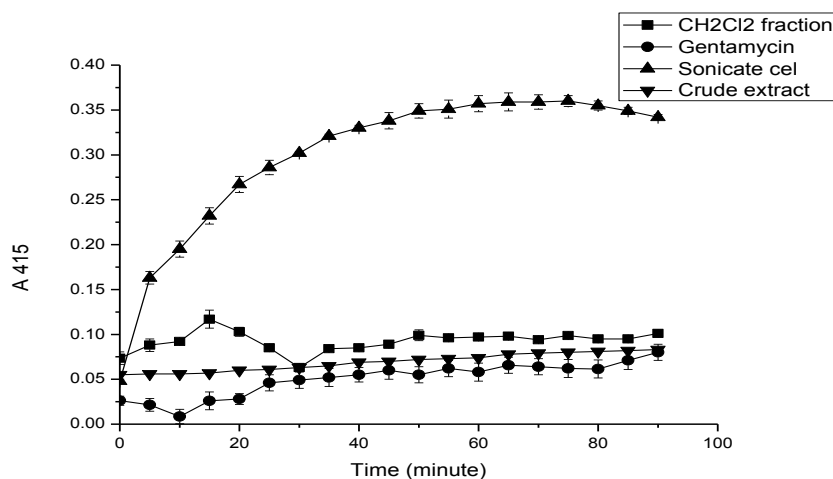
4.4.2 การทดสอบการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (Plasma membrane permeabilization)



การทดสอบการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (Plasma membrane permeabilization) นั้นทดสอบเพื่อต้องการทราบว่าสารสกัดจากรากหนอนตายอยากนั้นทำให้เกิดการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในได้หรือไม่ โดยจะทำการทดสอบเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น เนื่องจากสามารถสร้างเอนไซม์ β -galactosidase ได้ โดยในการทดลองนี้ทดสอบกับ *E. coli* MG 1655 สามารถทำได้ 2 วิธีด้วยกันคือ การศึกษาการ Uptake ของ *ortho*-Nitrophenyl- β -galactoside (ONPG) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ β -galactosidase โดยถ้าสารสกัดสามารถทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดรูถึงเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในได้จะทำให้ ONPG รั่วเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ และจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β -galactosidase ได้ผลิตภัณฑ์คือ *o*-nitrophenol ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลืองสามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 415-420 nm ส่วนอีกวิธีคือศึกษาการรั่วของเอนไซม์ β -galactosidase ซึ่งอยู่ภายในไซโตพลาสซึม จากเซลล์แบคทีเรีย ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด

(1) ONPG uptake

ทดสอบกับแบคทีเรีย *E. coli* MG 1655 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่มียีนส์ในการนำแลคโตสเข้าสู่เซลล์ใช้ในการศึกษาการเกิดการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยวัดการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ *o*-nitrophenol ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 17

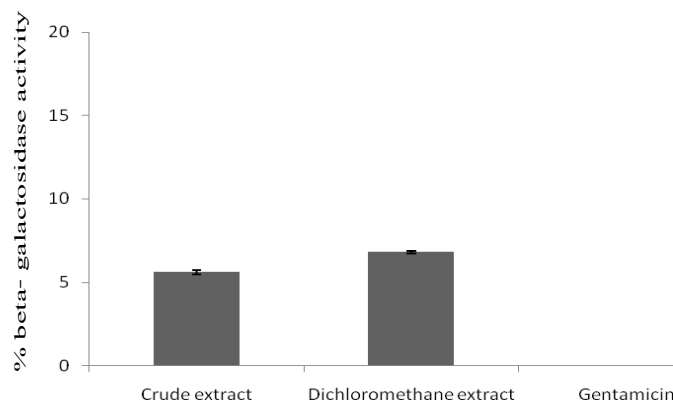


ภาพที่ 17 ผลของสารสกัด , Gentamicin และ Sonicate ต่อการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน

จากภาพที่ 17 พบว่าเซลล์ที่ถูกทำให้เซลล์แตกโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) มีปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมากที่สุดจากที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด ลองลงมาคือเซลล์แบคทีเรียที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจาก CH₂Cl₂ ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 0.1 และจากกราฟพบว่าแบคทีเรียที่ทดสอบด้วย Gentamicin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะสามารถทำให้เกิด Plasma membrane permeabilization ได้น้อยที่สุด

(2) β -galactosidase release

ศึกษาการรั่วของเอนไซม์ β -galactosidase จากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* MG 1655 โดยวัด Supernatant ที่เติมสารตั้งต้นอะนาลอกลงไป หลังจากเซลล์แบคทีเรียถูกบ่มกับสารสกัดที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ผลของสารสกัดหยาบจากเมทานอล, สารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 และ Gentamicin ต่อการรั่วของเอนไซม์ β -galactosidase เมื่อเทียบกับค่าเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาเมื่อนำเซลล์ไปทำให้แตกโดยวิธี Sonication เป็น 100 %

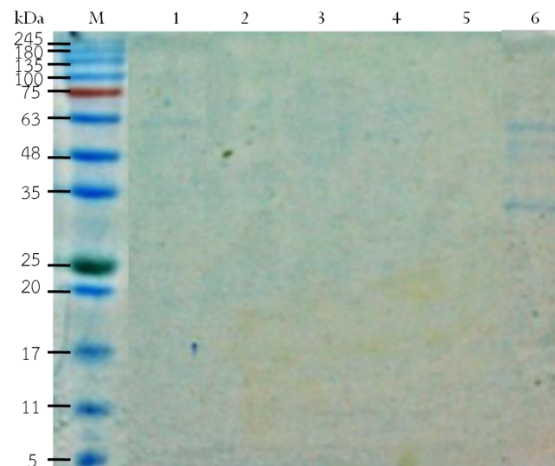
จากภาพที่ 18 พบว่าเซลล์แบคทีเรียที่ทดสอบด้วย Gentamicin นั้นไม่สามารถทำให้ผนังเซลล์ชั้นในเกิดรูขนาดใหญ่พอที่จะทำให้เอนไซม์ β -galactosidase รั่วออกมาได้ ส่วนเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วย สารสกัดหยาบจากเมทานอลและ สารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 มีเปอร์เซ็นต์ของการทำให้เอนไซม์ β -galactosidase รั่วออกมาได้ 5.6% และ 6.8% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์แบคทีเรียที่ถูกทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicate) พบว่ามีเอนไซม์ β -galactosidase รั่วออกมาจำนวนมากซึ่งเติมเมื่อ substrate แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ประมาณ OD_{415} 0.7 โดยกำหนดให้เป็นการรั่วของเอนไซม์ 100% จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดหยาบจากเมทานอลและสารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 สามารถทำให้เอนไซม์ β -galactosidase รั่วออกมาภายนอกเซลล์ได้เพียงเล็กน้อย

4.5 การศึกษาการยับยั้งการหลั่งของโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรีย (Protein release inhibition)

โดยส่วนใหญ่เซลล์แบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกที่มีชีวิตจะมีการสร้างโปรตีนในกลุ่มของ Exotoxins เป็นโปรตีนที่ไม่ทนความร้อน และขับออกภายนอกเซลล์ และจะมีการหลั่งของ Exotoxins มากขึ้นเมื่อแบคทีเรียนั้นบุกรุกเซลล์โฮสต์เพื่อทำลายเซลล์ (ชัยวัฒน์ กิตติกุล, ม.ป.ป.) แต่ถ้าเมื่อใดที่เซลล์ตายหรือถูกยับยั้งการสร้างโปรตีน ปริมาณของโปรตีนที่ถูกขับออกมาก็จะลดลง โดยในแบคทีเรียแกรมลบจะปลดปล่อย Endotoxins ออกมาซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Lipopolysaccharide ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้คาดว่าสารสกัดจะไปมีผลในการยับยั้งการสร้างโปรตีนของเซลล์แบคทีเรีย โดยใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin เป็น Positive control ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycosides) ที่เข้าไปมีผลออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย (ไตรรัตน์ แก้วเรือง, 2553) ในการทดลองนี้ได้ทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกคือ *B. pumilus* TISTR 905 และแบคทีเรียแกรมลบคือ *K. pneumonia* 17736 โดยการทดสอบแบคทีเรียด้วยสารสกัดแล้วบ่มที่ 37°C ข้ามคืน หลังจากนั้นจึงตรวจสอบแบบแผนของโปรตีนด้วย SDS-PAGE ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 19



แบบรายงานผลความก้าวหน้า โครงการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป
: กรณีคณะบดีหรือผู้ที่คณะมอบหมายเป็นผู้ประเมิน



ภาพที่ 19 แบบแผนโปรตีนของ *B. pumilus* TISTR 905 ที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

Lane 1 : *B. pumilus* TISTR 905

Lane 2 : *B. pumilus* TISTR 905 ที่ทดสอบด้วย 100% DMSO

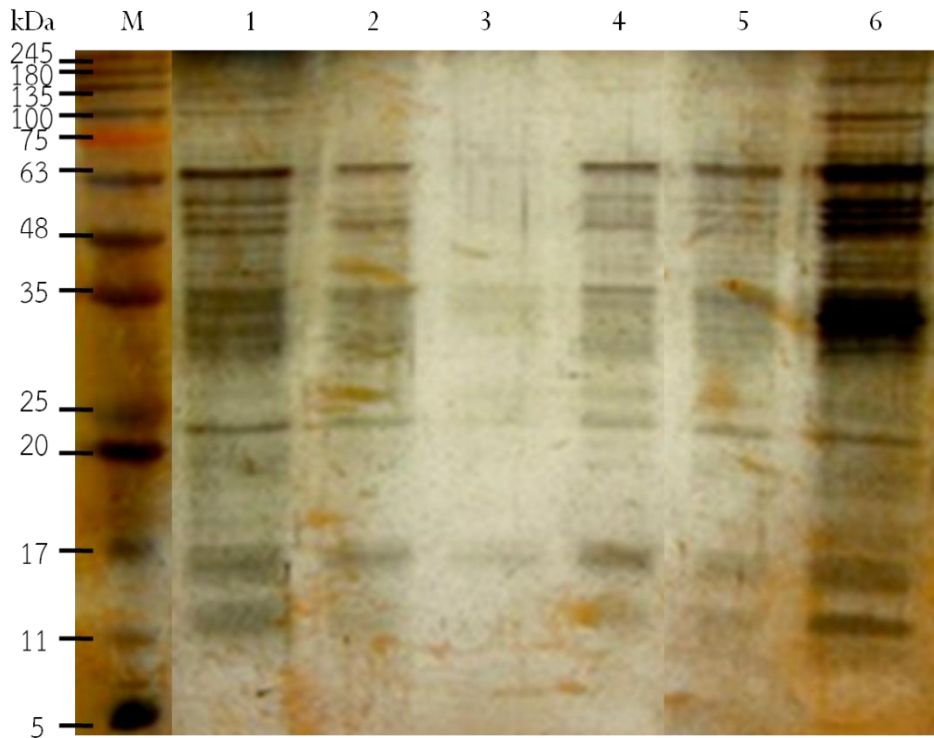
Lane 3 : *B. pumilus* TISTR 905 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเมทานอล

Lane 4 : *B. pumilus* TISTR 905 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2

Lane 5 : *B. pumilus* TISTR 905 ที่ทดสอบด้วย 0.1 mg/ml Gentamicin

Lane 6 : *B. pumilus* TISTR 905 ที่ทดสอบด้วย Lysis buffer รวมทั้งทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

จากภาพที่ 19 แสดงให้เห็นแถบแบนของโปรตีนจำนวนมากเมื่อย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ซึ่งจะเห็นแถบแบนโปรตีนต่างๆใน Lane ที่ 1 ซึ่งก็คือ *B. pumilus* TISTR 905 ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารชนิดใดเลย แสดงให้เห็นว่าเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตปกติจะมีการสร้างโปรตีนและขับออกนอกเซลล์ และอีก lane ที่เห็นแถบแบนของโปรตีนคือ lane ที่ 6 คือแบคทีเรียที่ถูกทำให้เซลล์แตกด้วยบัฟเฟอร์และคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicate) จากผลการทดลองตรงนี้ยังไม่สามารถจะสรุปได้ ผู้วิจัยจึงได้ย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 20

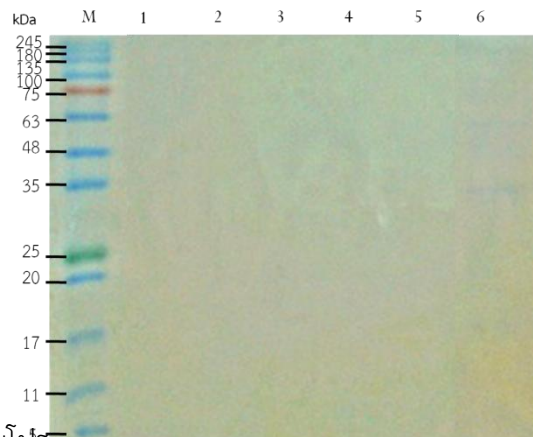


ภาพที่ 20 แบบแผนโปรตีนของ *B. pumilus* TISTR 905 ที่ย้อมด้วย Silver strain
Lane 1 : *B. pumilus* TISTR 905
Lane 2 : *B. pumilus* TISTR 905 ที่ทดสอบด้วย 100% DMSO
Lane 3 : *B. pumilus* TISTR 905 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาดจากเมทานอล
Lane 4 : *B. pumilus* TISTR 905 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาดจาก CH_2Cl_2
Lane 5 : *B. pumilus* TISTR 905 ที่ทดสอบด้วย 0.1 mg/ml Gentamicin
Lane 6 : *B. pumilus* TISTR 905 ที่ทดสอบด้วย Lysis buffer รวมทั้งทำให้เซลล์แตก
ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

จากภาพแสดงที่ 20 ให้เห็นแถบแบนของโปรตีนชัดเจน โดยพบแถบแบนโปรตีนเข้มที่สุดใน Lane 6 (*B. pumilus* TISTR 905+ lysis condition) รองลงมาคือใน Lane 1 (*B. pumilus* TISTR 905), และพบความเข้มของแบนโปรตีนที่ใกล้เคียงกันใน 3 lane คือ Lane 2 (*B. pumilus* TISTR 905+ 100% DMSO), Lane 4 (*B. pumilus* TISTR 905+ สารสกัดหยาดจาก CH_2Cl_2), และ Lane 5 (*B. pumilus* TISTR 905 + Gentamicin) ตามลำดับ และพบแถบแบนโปรตีนที่จางที่สุดใน Lane 3 (*B. pumilus* TISTR 905 + Crude extract) จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่า แบคทีเรียที่ถูกทดสอบด้วย Gentamicin ที่เป็นยาปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างโปรตีน พบว่าจะเห็นความเข้มของแถบแบนโปรตีนจางลงเมื่อเปรียบเทียบกับ Lane ที่ 1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ได้ถูกทดสอบ เช่นเดียวกับที่ถูกทดสอบด้วย DMSO และ สารสกัดหยาดจาก CH_2Cl_2 จะเห็นว่าความเข้มของแถบแบนของโปรตีนก็ลดลงเช่นกันเมื่อเทียบกับ Lane ที่ 1 แต่จะพบว่าใน Lane ที่ 3 เป็นแบคทีเรียที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหยาดจากเมทานอลมีความเข้มของแถบแบนโปรตีนน้อยที่สุด จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาด และ สารสกัดหยาดจาก CH_2Cl_2 สามารถยับยั้งการหลั่งของโปรตีนออกภายนอกเซลล์ได้เมื่อทดสอบเซลล์แบคทีเรียกับสารสกัดผ่านไประยะหนึ่ง



ส่วนในแบคทีเรียแกรมลบได้ทำการทดสอบกับ *K. pneumoniae* 17736 ผลการทดลองแสดงดัง
ภาพที่ 21



ภาพที่ 21 แบบแผนโปรตีนของ *K. pneumoniae* 17736 ที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

Lane 1 : *K. pneumoniae* 17736

Lane 2 : *K. pneumoniae* 17736 ที่ทดสอบด้วย 100% DMSO

Lane 3 : *K. pneumoniae* 17736 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาดจากเมทานอล

Lane 4 : *K. pneumoniae* 17736 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาดจาก CH_2Cl_2

Lane 5 : *K. pneumoniae* 17736 ที่ทดสอบด้วย 0.1 mg/ml Gentamicin

Lane 6 : *K. pneumoniae* 17736 ที่ทดสอบด้วย Lysis buffer รวมทั้งทำให้เซลล์

แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

จากภาพที่ 21 แสดงให้เห็นแถบแบนของโปรตีนจากเมื่อย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ซึ่งจะเห็นแถบแบนโปรตีนจากใน Lane ที่ 1 ซึ่งก็คือ *K. pneumoniae* 17736 ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารชนิดใดเลย เช่นเดียวกับในแบคทีเรียแกรมบวกแสดงให้เห็นว่าเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตปกติจะมีการสร้างโปรตีนและขับออกนอกเซลล์ และอีก Lane ที่เห็นแถบแบนของโปรตีนคือ Lane ที่ 6 คือแบคทีเรียที่ถูกทำให้เซลล์แตกด้วยบัฟเฟอร์และคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicate) จากผลการทดลองตรงนี้ไม่สามารถจะสรุปอะไรได้ดังเช่นในแกรมบวกดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 22



ภาพที่ 22 แบบแผนโปรตีนของ *K. pneumoniae* 17736 ที่ย้อมด้วย Silver strain

Lane 1 : *K. pneumoniae* 17736

Lane 2 : *K. pneumoniae* 17736 ที่ทดสอบด้วย 100% DMSO

Lane 3 : *K. pneumoniae* 17736 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาดจากเมทานอล

Lane 4 : *K. pneumoniae* 17736 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาดจาก CH_2Cl_2

Lane 5 : *K. pneumoniae* 17736 ที่ทดสอบด้วย 0.1 mg/ml Gentamicin

Lane 6 : *K. pneumoniae* 17736 ที่ทดสอบด้วย Lysis buffer รวมทั้งทำให้เซลล์ แตก ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

จากภาพที่ 22 แสดงให้เห็นแถบแบนของโปรตีนชัดเจนขึ้น โดยพบแถบแบนโปรตีนเข้มที่สุดใน Lane 6 (*K. pneumoniae* 17736 + lysis condition) ลองลงมาคือใน Lane 1 (*K. pneumoniae* 17736) ในขณะที่แทบจะไม่พบแถบแบนโปรตีนเลยในเลนที่ทดสอบด้วย DMSO, สารสกัดหยาดจาก CH_2Cl_2 , สารสกัดหยาดจากเมทานอล และ Gentamicin จากผลการทดลองตรงนี้สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดหยาดจาก CH_2Cl_2 และ สารสกัดหยาดจากเมทานอล สามารถยับยั้งการหลั่งของโปรตีนออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียได้เมื่อทดสอบเซลล์แบคทีเรียกับสารสกัดผ่านไประยะเวลาหนึ่ง เนื่องจากให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับ Gentamicin ซึ่งได้กล่าวไว้แล้วในข้างต้นว่าเป็นยาปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

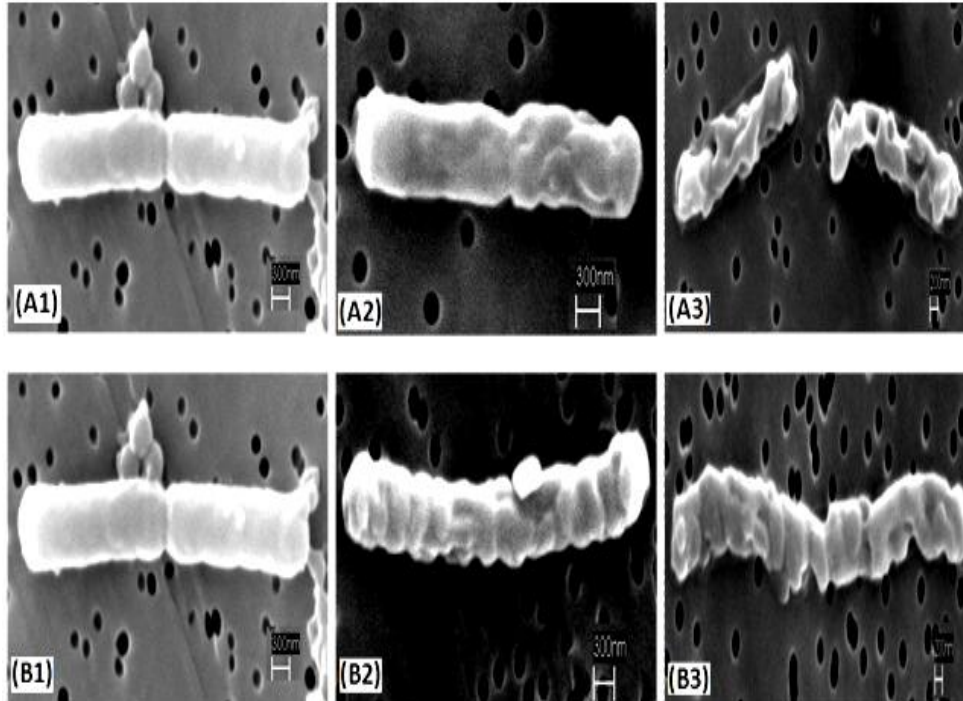
4.6 การศึกษาโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียที่ทดสอบด้วยสารสกัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอน แบบส่องกราด

จากการศึกษาโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกคือ *B. pumilus* TISTR 905 และแกรมลบคือ *K. pneumoniae* 17736 ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาดจากเมทานอลและสารสกัดที่แยกบริสุทธิ์บางส่วน เพื่อเป็นการยืนยันผลเปรียบเทียบกับกับการทดลองก่อนหน้านี้ โดยกำหนดให้บ่มเซลล์แบคทีเรียกับสารสกัดเป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าในเชื้อ *B. pumilus* TISTR 905 เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง ผนังของเซลล์เริ่มยุบตัวเล็กน้อยแต่ยังคงโครงสร้างเดิมอยู่ (Intact Cell) และเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดหยาดจากเมทานอลมีผลทำให้ผนังเซลล์ของ *B. pumilus* TISTR 905 เกิดการยุบตัวเซลล์มีลักษณะเหี่ยวและเสียรูปร่างเดิมอย่างเห็นได้ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 4.18 ส่วนที่ทดสอบด้วยสารสกัดที่แยกบริสุทธิ์



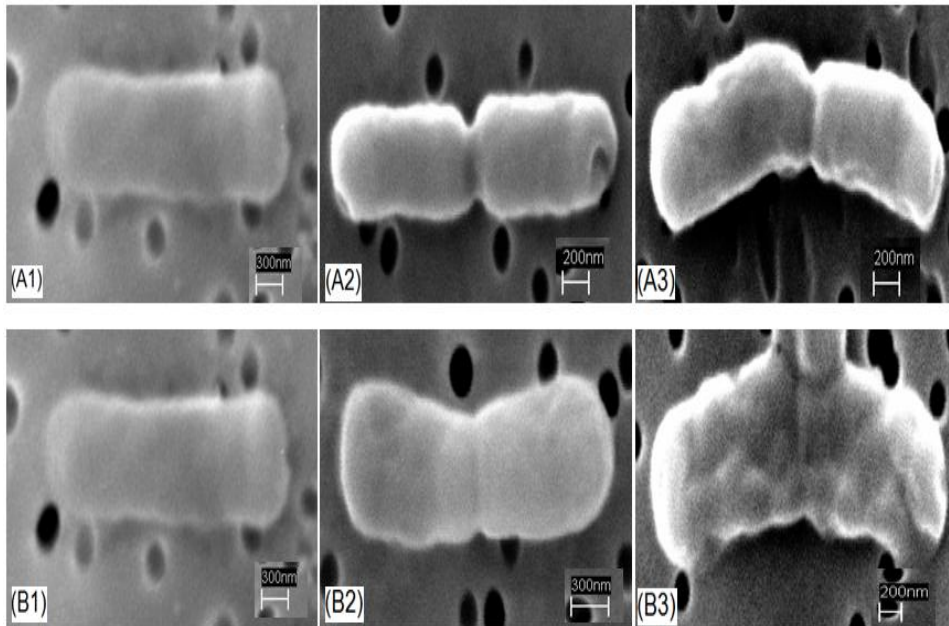
บางส่วนนั้นพบว่าผนังเซลล์มีการเสียรูปทรง เซลล์ได้เสียรูปร่างไปจากเดิมแต่เซลล์ยังคงโครงสร้างเดิมอยู่ ส่วนใน *K. pneumoniae* 17736 พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง เซลล์แบคทีเรียยังคงโครงสร้างเดิมอยู่ และเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงจะเห็นว่าผนังเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 4.19 เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบจะเห็นได้ชัดเจน ว่าทั้งสารสกัดหยาบจากเมทานอลและสารสกัดที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนมีผลโดยตรงต่อแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้



ภาพที่ 22 เซลล์แบคทีเรียแกรมบวก *B. pumilus* TISTR 905 โดย A คือ ทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเมทานอล B คือ สารสกัดที่แยกบริสุทธิ์บางส่วน (1) คือ ปราศจากสารสกัด (2) คือ เซลล์ที่ถูกทดสอบเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง และ (3) คือ เซลล์ที่ถูกทดสอบเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง



แบบรายงานผลความก้าวหน้า โครงการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป
: กรณีคณะบดีหรือผู้ที่คณะมอบหมายเป็นผู้ประเมิน



ภาพที่ 23 เซลล์แบคทีเรียแกรมลบ *K. pneumoniae* 17736 โดย A คือ ทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจาก
เมทานอล B คือ สารสกัดที่แยกบริสุทธิ์บางส่วน (1) คือ ปราศจากสารสกัด (2) คือ เซลล์ที่ถูก
ทดสอบเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง และ (3) คือ เซลล์ที่ถูกทดสอบเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง



5. สรุปและวิจารณ์ผล

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์จากรากหนอนตายอยากและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรค รวมทั้งศึกษากลไกการเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียของสารออกฤทธิ์ เพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐานสำหรับการนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้ทั้งในทางด้านการแพทย์และเกษตรกรรม

จากการศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์จากรากหนอนตายอยากด้วยตัวทำละลายอินทรีย์สองชนิดคือ 95% Methanol และ 95% Ethanol รวมทั้งการสกัดด้วยน้ำและการกลั่นด้วยไอน้ำ เมื่อนำ มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งหมด 20 สายพันธุ์ด้วยวิธี Disc diffusion assay พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วย 95% Methanol สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยพบว่าส่วนมากสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้โดยเฉพาะแกรมบวก ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* 1466, *B. pumilus* TISTR 905, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. shaericus* TISTR 678, *B. licheniformis* TISTR 1010, *B. subtilis* TISTR 008, *B. cereus* ATCC 11778 และ *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045 โดยมีพื้นที่ในการยับยั้ง (Inhibition zone) 10.3 ± 0.5 , 12.3 ± 0.5 , 11 ± 1 , 13.6 ± 1.5 , 12 ± 1 , 11.3 ± 0.5 , 11 ± 1 , 12.3 ± 1.1 , 12.3 ± 0.5 mm ตามลำดับ โดยเฉลี่ยแล้วสารสกัดหยาบจากเมทานอลมีพื้นที่ในการยับยั้งในแบคทีเรียแกรมบวก 11.79 ± 0.98 mm และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบได้เพียง 1 สายพันธุ์คือ *Xanthomonas* sp. โดยในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทดสอบสารที่แยกบริสุทธิ์ได้จากรากหนอนตายอยาก *Stemona tuberosa*. กับเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *B. pumilus*, *K. pneumonia* และ *C. neoformans* (Yang Ye, 2007)

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเมทานอลมาทำการแยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย HPLC พบว่า มีฟิเคกิตขึ้นทั้งหมด 6 ฟิเค ที่เวลา 15.50, 18.00, 18.50, 21.00, 22.00 และ 24.00 นาที ตามลำดับ แต่เมื่อนำฟิเคที่ได้จากการแยกด้วย HPLC ทั้งหมด 6 ฟิเคมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้เลย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อทำสารสกัดหยาบให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นกลับทำให้คุณสมบัติในการต้านการเจริญของจุลชีพลดลง สามารถสรุปได้ว่าเมื่อสารออกฤทธิ์ถูกแยกออกจากกันจึงไม่เกิดคุณสมบัติในการต้านการเจริญของจุลชีพ ในขณะที่ในสารสกัดหยาบสารออกฤทธิ์สามารถทำงานร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้ จากที่ไม่ประสบความสำเร็จในการแยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย HPLC ผู้วิจัยจึงนำสารสกัดหยาบจากเมทานอลมาทำการแยกต่อด้วย Dichloromethane นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วย Rotary evaporator และทำให้สารสกัดเข้มข้นขึ้นโดยเครื่อง SpeedVac และเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับแบคทีเรียก่อโรคทั้งหมด 22 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disc diffusion assay พบว่าสารสกัดที่ได้จากการแยกด้วย Dichloromethane (CH_2Cl_2 fraction) มีคุณสมบัติในการต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดหยาบโดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ในแบคทีเรียแกรมบวกสามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งหมด 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. pumilus* TISTR 905, *B. subtilis* 008, *B. licheniformis* TISTR 1010, *S. epidermidis*, *B. amyloliquefaciens* TISTR 1045, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. shaericus* โดยมีพื้นที่ในการยับยั้ง (Inhibition zone) 15.25 ± 0.17 , 15.0 ± 0 , 13.0 ± 0 , 13.0 ± 0 , 12.5 ± 0.04 , 12.5 ± 0.07 , 12.0 ± 0 , 11.75 ± 0.04 , 11.05 ± 0 mm ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบได้ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *X. sp.*, *E. coli* 0157:H7, *P. aeruginosa*, *E. coli* MG 1655, *K. pneumoniae* 17736, *S. typhi*, *S. typhi* B, *S. typhi* ATCC 5784 โดยมีพื้นที่ในการยับยั้ง (Inhibition zone) $14.0 \pm$



0.14, 12.0 ± 0 , 12.0 ± 0.14 , 10.0 ± 0 , 9.5 ± 0.07 , 9.0 ± 0 , 8.0 ± 0 , 8.0 ± 0 mm ตามลำดับ โดยเฉลี่ยแล้ว CH_2Cl_2 fraction มีพื้นที่ในการยับยั้งเฉลี่ยในแกรมบวกและแกรมลบ 12.89 ± 1.4 mm และ 10.31 ± 2.15 mm ตามลำดับ

ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบและสารสกัดที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย CH_2Cl_2 ที่ความเข้มข้น 0.2% (v/v) พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงต่ำโดยสามารถทำให้ เซลล์แตกได้เล็กน้อย ประมาณ 10.02% เมื่อเทียบกับ Triton X-100 ที่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกได้ 100% และพบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW364.7 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.2% (v/v) ดังนั้นจึงสามารถนำสารสกัดจากรากหนอนตายออกไปประยุกต์ใช้ได้ แต่ต้องอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม

การศึกษากการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Membrane permeabilization) ของแบคทีเรียเมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดหยาบเพื่อดูการเรืองแสงของ 1-N-phenyl naphthylamine (NPN) ที่จะเรืองแสงได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็น Hydrophobic สูง โดย NPN จะสามารถแพร่เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์เกิดรู จากการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกคือ *B. pumilus* TISTR 905 พบว่าเกิดการเรืองแสงของ NPN อย่างรวดเร็วในช่วงของ 60 วินาทีแรก ประมาณ 8% หลังจากนั้นเปอร์เซ็นต์การแพร่ของ NPN คงที่ที่ 8% จนกระทั่งเวลา 5 นาที ในขณะที่ไม่เกิดการเรืองแสงใน *K. pneumoniae* 17736 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ทดสอบ จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอลสามารถทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมบวกเกิดการซึมผ่านได้เท่านั้น คาดว่าอาจเกิดจากความแตกต่างของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ในแบคทีเรียแกรมบวกนั้นชั้นนอกสุดเป็นเปปติโดไกลแคน

ผลการวิเคราะห์การซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (Plasma membrane) ของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* MG 1655 จากการศึกษานำ ONPG เข้าสู่เซลล์เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในเกิดรูจากอิทธิพลของสารสกัด ผลการทดลองพบว่า CH_2Cl_2 extract ที่ความเข้มข้น 0.2% (v/v) สามารถทำให้เกิดการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในได้มากกว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอลและ Gentamicin จากการวัด o-nitrophenol

ผลการวิเคราะห์การเกิดรูของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน โดยการวัดการรั่วของเอนไซม์ β -galactosidase ของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* MG 1655 เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดหยาบจากเมทานอลทำให้เกิดการรั่วของเอนไซม์ β -galactosidase ได้ 5.6% ในขณะที่ สารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 ที่ความเข้มข้น 0.2% (v/v) สามารถทำให้เกิดการรั่วของเอนไซม์ β -galactosidase ได้ 6.8% เมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่มีการทำให้เซลล์แตกโดยคลื่นเสียงความถี่สูงโดยกำหนดให้มีการรั่วของเอนไซม์ β -galactosidase เป็น 100% จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอลและสารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 มีผลทำให้เกิดการรั่วของเอนไซม์ β -galactosidase ไม่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาการยับยั้งการหลั่งของโปรตีนโดยสารสกัดหยาบจากเมทานอลและสารสกัด หยาบ CH_2Cl_2 ใน *B. pumilus* TISTR 905 และ *K. pneumoniae* 17736 พบว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอลและสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 มีผลการทดลองที่คล้ายคลึงกับ Gentamicin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย ผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอลและสารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 มีกลไกที่ไม่ทราบแน่ชัดโดยจะไปมีผลทำให้การหลั่งโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรียลดลงจากปกติ

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียเมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเมทานอลและสารสกัดที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนเป็นระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ใน *B. pumilus* TISTR 905 เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง ผนังของเซลล์เริ่มยุบตัวเล็กน้อยแต่ยังคงโครงสร้างเดิมอยู่ (Intact cell) และเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงพบว่าสารสกัดหยาบมีผลทำให้ผนังเซลล์ของ *B. pumilus* TISTR



905 เกิดการยุบตัวอย่างรุนแรงเซลล์มีลักษณะเหี่ยวและเสียรูปร่างเดิมอย่างเห็นได้ชัดเจน ส่วนใน *pneumoniae* 17736 พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง เซลล์แบคทีเรียยังคงโครงสร้างเดิมอยู่ และเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงจะเห็นว่าผนังเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเพียงเล็กน้อย

6. บรรณานุกรม

- กนกอร แสงอรุณ. (2543). ผลของการใช้สารสกัดจากรากหนอนตายอยาก (*Stemona kerrii* Craib.) ต่อน้ำหนักอัมพาตและตับในหนูขาว. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- กวิญหาญ พลหาญ. (2539). ผลของสารสกัดจากพืชต่อหนอนกระทุ้หอม, *Spodoptera exiqua* (Hubne). วิทยานิพนธ์ปริญญาเกษตรศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ขจรศักดิ์ ตระกูลพั. (2539). ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรแปดชนิดต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและโรคผิวหนังที่คัดเลือก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ชัยวัฒน์ กิตติกุล. [ม.ป.ป.]. การทำให้เกิดโรคของจุลินทรีย์. ค้นเมื่อ 3 มิถุนายน 2554, จาก <http://micro.sci.ku.ac.th/fscicvk/patho.htm>
- ไตรรัตน์ แก้วเรือง. (2553). Gantamicin. ค้นเมื่อ 3 มิถุนายน 2554, จาก [http://healthy.in.th/drug/gentamicin%20\(otic\)/](http://healthy.in.th/drug/gentamicin%20(otic)/)
- เทพ เชียงทอง และ วิจิตร ภัคเกษม. (2517). สารประกอบบางอย่างที่มีในรากหนอนตายอยาก. ใน รายงานผลการวิจัยประจำปี 2517. (หน้า 69-82). กรุงเทพฯ: สภาวิจัยแห่งชาติ.
- ธนีสร์ ปทุมมานนท์. (2552). แหล่งทางพฤกษศาสตร์และการศึกษาทางเคมีเบื้องต้นของเครื่องยาฝักชิลลา. ขอนแก่น: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- นิจศิริ เรืองรังสี และ พยอม ตันติวัฒน์. (2534). พืชสมุนไพร. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- บำรุง ตันติเสรี, ธราดล ภราไธย, และ สุรัตนา อำนวยผล. (2526). เภสัชเวท เล่ม 2. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ประคอง พันธุ์ไร. (2525). สารสกัดจากรากหนอนตายอยากเพื่อใช้ฆ่าเหา ว.กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 3-4.
- ประทุมวัน เสาร์ประโคน. (2542). ผลของ BA และ NAA ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ราก และตาข้อของต้นหนอนตายอยาก (*Stemona collinsae* Craib.) ในสภาพปลอดเชื้อ. ขอนแก่น: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ฝ่ายเผยแพร่กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2536). ฆ่าแมลงด้วยสารสกัดจากรากหนอนตายอยาก. อาชีพชาวเกษตร, 13(146), 67-68.
- พิณทิพย์ พงษ์เพชร. [ม.ป.ป.]. แบคทีเรียดี้อย่า. ค้นเมื่อ 3 มิถุนายน 2554, จาก http://www.pharm.chula.ac.th/clinic101_5/article/Radio81.htm
- ภาควิชาพฤกษศาสตร์. (2535). พรรณพฤกษชาติประเทศไทย. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.



- เลาจนา อธิราษฎร์กุล และ ประคอง พันธุ์ไร. (2520). การศึกษาพิษของหนอนตายอยากที่มีกับหนอนแมลงวันบ้าน. *ว.กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*, 19(4), 217-227.
- วิสุทธิ เสงศรี. (2527). **ศึกษาประสิทธิภาพของหนอนตายอยากในการใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช**. รายงานผลการค้นคว้าวิจัยปี 2527. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.
- วีระพล จันทรสวรรค์, สถาพร จิตपालพงศ์, และ นงนุช จันทราข. (2536). ประสิทธิภาพของสารสกัดจากหนอนตายอยากต่อเห็บโค. *ว.ข่าวสารเกษตรศาสตร์*, 38(6), 77-78.
- วุฒิกรณ รอดความทุกข์. (2539). **ผลของสารสกัดจากหนอนตายอยากและสารเคมีต่อแมลงศัตรูผักคะน้า**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ไศรยา พันธุ์วิริยะพงษ์. (2531). **พิษกำจัดแมลง**. การประชุมสัมมนาพืชสารกำจัดแมลงในการทำการเกษตร 2531. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.
- สงศรี พิพิธกุล. [ม.ป.ป.]. **สมุนไพรหนอนตายอยาก**. ค้นเมื่อ 15 มีนาคม 2553, จาก <http://www.qsbg.org/Database/Article/Image/Stemona.pdf>
- สุธาทิพ ภมรประวดี. (2549). **สารประกอบทุติยภูมิ (Secondary Metabolites)**. ค้นเมื่อ 3 มิถุนายน 2554, จาก <http://med.tu.ac.th/Uploads/sheet/D14.pdf>
- สุธาพันธ์ โพธิ์กำเนิด. (2544). **การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สมุนไพรหนอนตายอยากผสมอาหารไก่เพื่อควบคุมปริมาณหนอนแมลงวันในมูลไก่**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนาทรัพยากร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สุริยะ วงศ์คงคาเทพ. [ม.ป.ป.]. **โครงการวิจัยศึกษาผลของสมุนไพรหนอนตายอยากต่อการรักษาเหาในเด็กนักเรียนเปรียบเทียบกับยา Benzyl Benzoate**. ขอนแก่น: โรงพยาบาลพล.
- เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. (2522). **ไม้เทศเมืองไทย : สรรพคุณของยาเทศและยาไทย**. กรุงเทพฯ: [ม.ป.พ.].
- หน่วยปฏิบัติการทดสอบทางชีวภาพสำหรับวัสดุทางการแพทย์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. [ม.ป.ป.]. **MTT Cytotoxicity assay**. ค้นเมื่อ 15 มิถุนายน 2554, จาก <http://www.mtec.or.th/laboratory/cellunit/index.php/tools-and-services/29>
- Brem, B., Seger, C., and Pacher T. et al. (2004). Antioxidant dehydrotocopherols as a new chemical character of *Stemona* species. *Phytochemistry* 65, 2719-2729.
- Gagnepain, F. (1934). *Stemonaceae (Roxburghiaceae)*. *Flore Cenerale de L Indo-Chine T.VI*. [n.p.].
- Jiangsu New Medical College. (1986). **Chinese Dictionary of Crude Drugs**. Shanghai: Shanghai Scientific and Technologic Pub.
- Jiang, R.W., Hon, P.M., and But, P.P. et al. (2002). Isolation and stereochemistry of two new alkaloids from *Stemona tuberosa*. *Tetrahedron* 58, 6705-6712.
- Jiang, R.W., Hon, P.M., and Zhou, Y. et al. (2006). Alkaloids and chemical diversity of *Stemona tuberosa*. *J. Nat. Prod. Phytochemistry* 69, 749-754.
- Liang, X., Jin, Y., and Wang, Y. et al. (2009). Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A* 1216,



2033-2044.

Lin, L.G., Li, K.M., and Tang, C.P. et al. (2008). Antitussive stemoninine alkaloids from the roots

of *Stemona tuberosa*. **Journal of natural products** **71**, 1107-1110.

Lin, L.G., Yang, X.Z., and Tang, C.P. et al. (2008). Antibacterial stilbenoids from the roots of *Stemona tuberosa*. **Phytochemistry** **69**, 457-463.

Lin, L.G., Zhong, Q.X., and Cheng, T.Y. et al. (2006). Stemoninines from the roots of *Stemona*

tuberosa. **Journal of Natural Products** **69**, 1051-1054.

P. Limtrakul, S. Siwanon, S. Yodkeeree, C. Duangrat. (2007). Effect of *Stemona curtisii* root extract on P-glycoprotein and MRP-1 function in multidrug-resistant cancer cells.

Phytomedicine, **14**, 381-389.

Philli, R.A., and Ferreira de Oliveira, M.C. (2000). Recent progress in the chemistry of the *Stemona* alkaloids. **Nat. Prod. Rep.**, **17**, 117-127.

Stuart, G.A. (1911). **Chinese Materia Medica: Vegetable Kingdom**. Shanghai: [n.p.].

Sultanbawa. Y., Cusack, A., and Currie M, Davis C. (2009). An Innovative Microplate Assay To Facilitate The Detection Of Antimicrobial Activity In Plant Extracts. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology** **17**, 519-534.

Vidal, J. (1958). La therapeutique par les Plantes au Laos. **Agr. Trop. Bot. Appl.**, **5**, 601-616.

Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R.E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances.

Nature Protocols, **3**, 163-175.

Yang, X.Z., Zhu, J.Y., and Tang, C.P. et al. (2009). Alkaloids from Roots of *Stemona sessilifolia*

and Their Antitussive Activities. **Planta medica**, **75**, 174-177.

Ye, Y., Qin, G.W., and Xu, R.S. (1994). Alkaloids of *Stemona japonica*. **Phytochemistry**, **37**, 1205-1208.

Zhao, W.M., Qin, G.W., Ye, Y., Xu, R.S., and Le, X.F. (1995). Bibenzyls from *Stemona tuberosa*. **Phytochemistry**, **38**, 711-713.