



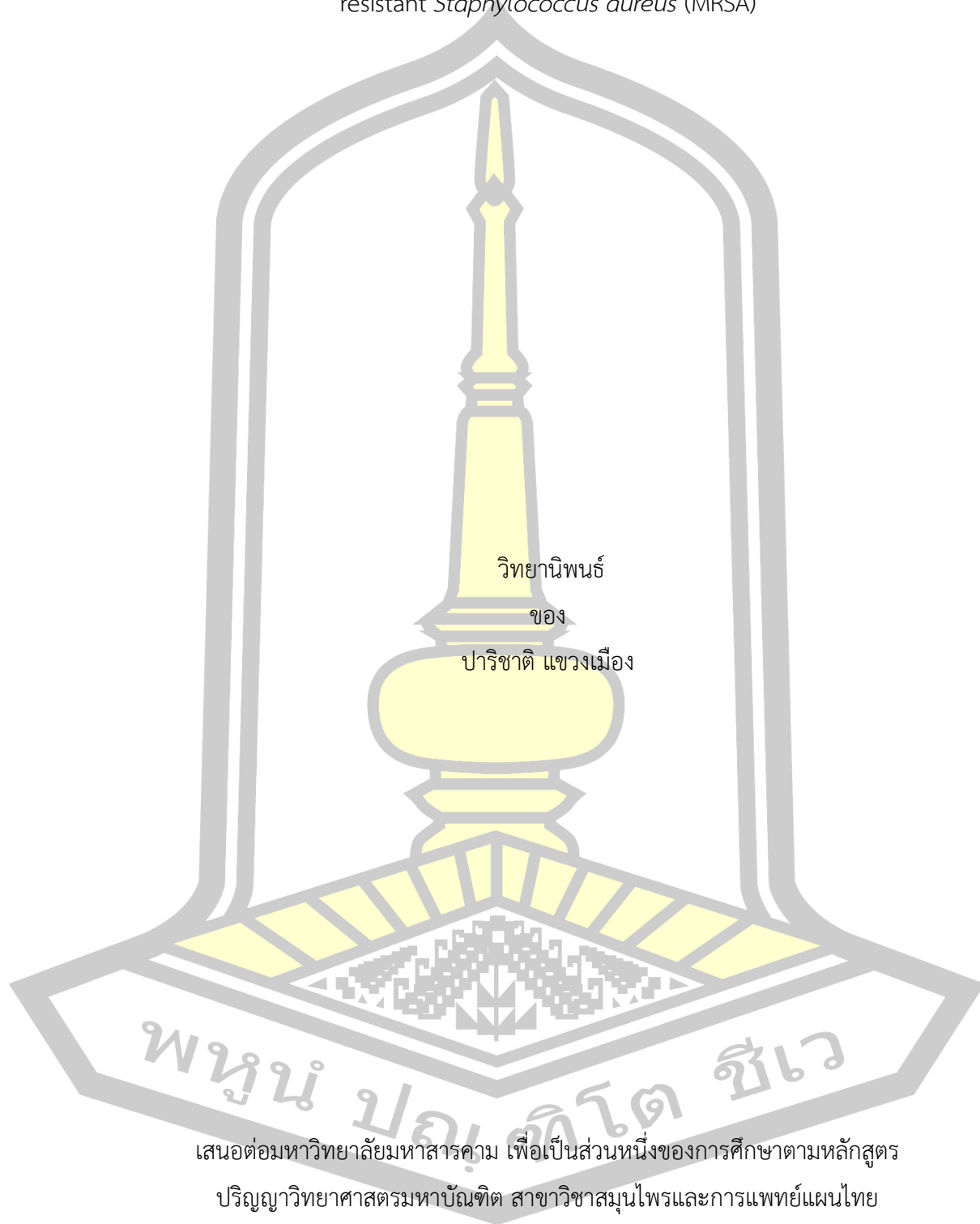
ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียในการต้านไปโอฟิล์มของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

วิทยานิพนธ์  
ของ  
ปาริชาติ แขวงเมือง

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและการแพทย์แผนไทย  
พฤศจิกายน 2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

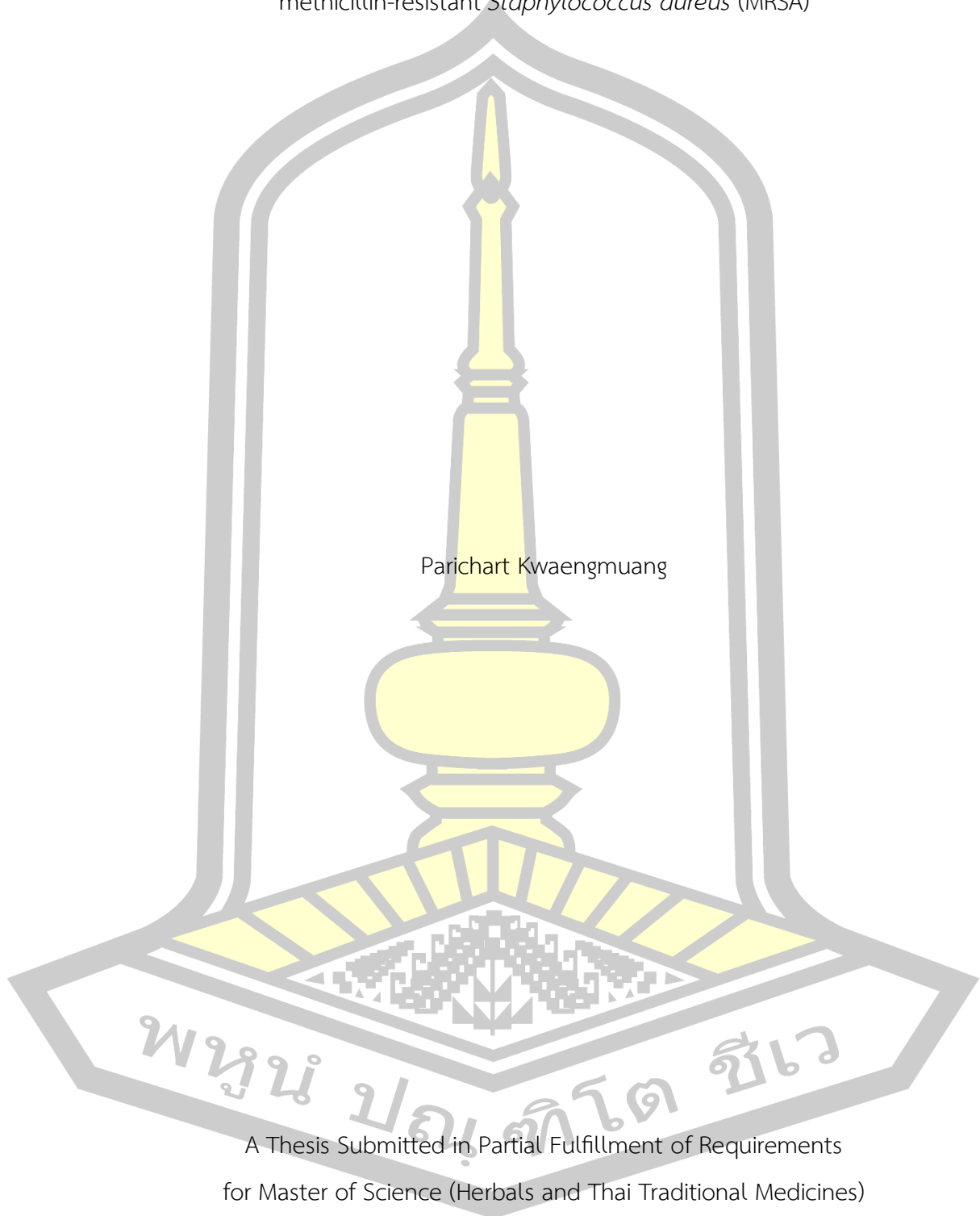
ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)



เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและการแพทย์แผนไทย  
พฤศจิกายน 2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Antibiofilm activities of lupinifolin in combination with antibacterial agents against  
methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)



Parichart Kwaengmuang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements  
for Master of Science (Herbals and Thai Traditional Medicines)

November 2023

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวปาริชาติ แขวงเมือง  
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาสมุนไพรและการแพทย์แผนไทย ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. วิลาสินี หิรัญพานิช ชำโตะ )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รศ. ดร. ปวีตรา พูลบุตร )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รศ. ดร. สกฤรัตน์ รัตนาเกียรติ์ )

กรรมการ

(ผศ. ดร. วนิตา ไทรชมภู )

กรรมการ

(ผศ. ดร. เมธิน ผดุงกิจ )

มหาวิทยาลัยขอนแก่นให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและการแพทย์แผนไทย ของมหาวิทยาลัย  
มหาสารคาม

(ผศ. ดร. ชนัดดา พลอยล้อมแสง )

คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)		
ผู้วิจัย	ปาริชาติ แขวงเมือง		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ปวีตรา พูลบุตร รองศาสตราจารย์ ดร. สกฤตน์ รัตนาเกียรติ์		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	สมุนไพรและการแพทย์แผนไทย
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2566

### บทคัดย่อ

เชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกก่อโรคที่ดื้อยาต้านแบคทีเรียหลายชนิด ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย MRSA เป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญหนึ่งที่ทำให้เชื้อ MRSA ไม่ตอบสนองต่อยาที่ใช้ในการรักษา การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเป็นกลยุทธ์หนึ่งที่มีความน่าสนใจของการจัดการโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์ม สาร lupinifolin เป็นสารพฤษเคมีกลุ่ม prenylated flavanones ที่สกัดได้จากลำต้นของชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) ที่มีรายงานว่ามียฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแกรมบวกหลายชนิดรวมทั้งเชื้อ MRSA อย่างไรก็ตามฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในแต่ละช่วงเวลาของการสร้างไบโอฟิล์มยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ และยาต้านแบคทีเรียกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มด้วยวิธี crystal violet biofilm formation assay ผลการศึกษาพบว่าสาร lupinifolin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) และมีความแรงสูงสุดที่เวลา 10 ชั่วโมง โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $6.73 \pm 3.47 \mu\text{g/mL}$  ( $n=12$ ) การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น  $8 \mu\text{g/mL}$  (1/2MIC) ร่วมกับยาต้านแบคทีเรียกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ tetracycline, streptomycin และ clindamycin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ ฤทธิ์ที่ดีที่สุดพบเมื่อให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น  $8 \mu\text{g/mL}$  (1/2MIC) ร่วมกับยา tetracycline ที่ความเข้มข้น  $16 \mu\text{g/mL}$  (1/2MIC) โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งไบโอฟิล์มเท่ากับ  $102.97 \pm 1.78\%$  ( $p < 0.01$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับ control,  $n=6$ ) ที่เวลา 10 ชั่วโมง การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 1/2MIC ร่วมกับยาต้านแบคทีเรียกลุ่มที่ออกฤทธิ์

ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ได้แก่ ampicillin, cloxacillin และ vancomycin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ฤทธิ์ที่ดีที่สุดพบจากการให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1/2MIC) ร่วมกับยา ampicillin ที่ความเข้มข้น 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1/2MIC) โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งไบโอฟิล์มเท่ากับ  $91.80 \pm 3.92\%$  ( $p < 0.01$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control,  $n=6$ ) ที่เวลา 10 ชั่วโมง สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 1/2MIC ยังสามารถเสริมฤทธิ์กับยาต้านแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ ณ หลายช่วงเวลาของการทดสอบ โดยทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่สูงกว่าการให้สาร lupinifolin เพียงชนิดเดียวอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ การให้สาร lupinifolin ร่วมกับยาต้านแบคทีเรีย ยังสามารถต้านฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของยา clindamycin, cloxacillin และ vancomycin ได้อีกด้วย ทั้งนี้ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียในการยับยั้ง การสร้างไบโอฟิล์มขึ้นกับระดับความเข้มข้นของทั้งสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรีย โดยมีฤทธิ์ที่ลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นของสาร lupinifolin ที่ 1/4MIC (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และ 1/8MIC (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเกิดขึ้นได้ดีที่สุดในระยะแรกของการสร้างไบโอฟิล์มที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ เช่นเดียวกับฤทธิ์ของสาร lupinifolin เมื่อให้เป็นสารเดี่ยว ดังนั้นคาดว่าสาร lupinifolin สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเข้ายึดเกาะบนพื้นผิว ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของการสร้างไบโอฟิล์ม ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสาร lupinifolin ในการช่วยเสริมประสิทธิภาพของยาต้านแบคทีเรีย คาดว่าผ่านการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสาร lupinifolin ทั้งเมื่อให้เป็นสารเดี่ยวและเมื่อให้ร่วมกับยาต้านแบคทีเรียเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ : ลูปีนิโฟลิน, ซะแอมเหนือ, ไบโอฟิล์ม, เชื้อ methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย MRSA, ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย MRSA

วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนีนครศรีธรรมราช

<b>TITLE</b>	Antibiofilm activities of lupinifolin in combination with antibacterial agents against methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)		
<b>AUTHOR</b>	Parichart Kwaengmuang		
<b>ADVISORS</b>	Associate Professor Pawitra Pulbutr , Ph.D. Associate Professor Sakulrat Rattanakiat , Ph.D.		
<b>DEGREE</b>	Master of Science	<b>MAJOR</b>	Herbals and Thai Traditional Medicines
<b>UNIVERSITY</b>	Maharakham University	<b>YEAR</b>	2023

### ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a pathogenic gram-positive bacterium that is apparently resistant to multiple antibacterial drugs. Biofilm formation capability is one of the crucial virulence factors that lead to antibacterial resistance in MRSA. Antibiofilm formation is thus an interesting strategy to combat biofilm-associated bacterial infections. Lupinifolin, a prenylated flavanone isolated from *Derris reticulata* Craib. stem, has been shown to possess antibacterial and antibiofilm formation activities in various gram-positive bacteria, including MRSA. However, the effects of lupinifolin in combination with antimicrobial drugs on MRSA biofilm formation at different times have not been clearly established. This study aimed to investigate the effects of lupinifolin in combination with antibacterial drugs acting as protein synthesis inhibitors and cell wall synthesis inhibitors on MRSA biofilm formation. Antibiofilm formation activity was determined by crystal violet biofilm formation assay. Lupinifolin caused significant inhibition against MRSA biofilm formation at every incubation period (10, 18, 24, and 36 hours). The highest antibiofilm formation potency of lupinifolin was found at 10-hour incubation with the  $IC_{50}$  of  $6.73 \pm 3.47 \mu\text{g/mL}$  ( $n=12$ ). The combination of lupinifolin at a concentration of  $8 \mu\text{g/mL}$  (1/2MIC) with protein synthesis inhibitors, tetracycline, streptomycin, and clindamycin, at their sub-MICs significantly inhibited biofilm formation. Lupinifolin ( $8 \mu\text{g/mL}$ , 1/2MIC) in combination with tetracycline ( $16 \mu\text{g/mL}$ , 1/2MIC) contributed the

highest antibiofilm activity, with the % inhibition of biofilm formation of  $102.97 \pm 1.78\%$  ( $p < 0.01$  as compared with control,  $n=6$ ) at 10-hour incubation. The combination of lupinifolin ( $8 \mu\text{g/mL}$ ,  $1/2\text{MIC}$ ) and cell wall synthesis inhibitors, ampicillin, cloxacillin, and vancomycin, at their sub-MICs also produced significant antibiofilm formation activities. The maximum % inhibition of biofilm formation of  $91.80 \pm 3.92\%$  ( $p < 0.01$  as compared with control,  $n=6$ ) was detected in the presence of lupinifolin ( $8 \mu\text{g/mL}$ ,  $1/2\text{MIC}$ ) and ampicillin ( $32 \mu\text{g/mL}$ ,  $1/2\text{MIC}$ ). Lupinifolin at a concentration of  $1/2\text{MIC}$  also produced synergistic effects toward antibiofilm activities with either group of antibacterial drugs at their sub-MICs at various incubation times, since the antibiofilm activities of the combination of lupinifolin and antibacterial drugs were significantly higher than those of lupinifolin alone. Lupinifolin was also able to antagonize the biofilm-inducing effects of the single treatment of clindamycin, cloxacillin, and vancomycin. However, the combined antibiofilm formation activities basically depended on the concentrations of both lupinifolin and antibacterial drugs. The antibiofilm activity substantially decreased when the lower concentrations of lupinifolin at  $1/4\text{MIC}$  ( $4 \mu\text{g/mL}$ ) and  $1/8\text{MIC}$  ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) were used. The combined antibiofilm formation activity was prominently found at the early stage of biofilm formation (10-hour incubation). This was similar to the effect of lupinifolin alone. Thus, lupinifolin may have performed its antibiofilm formation via an inhibition against bacterial surface attachment. These findings suggest that lupinifolin could be used as an antibacterial enhancer by inhibiting MRSA biofilm formation. Nonetheless, further experiments are required to explore the antibiofilm mechanism of lupinifolin, either alone or in combination with antibacterial drugs.

Keyword : lupinifolin, *Derris reticulata* Craib, biofilm, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), antibacterial activity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, antibiofilm activity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*



## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความรู้และความอนุเคราะห์อย่างสูงยิ่งจาก รศ.ดร. ปวีตรา พูลบุตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รศ.ดร.สกุรัตน์ รัตนาเกียรติ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ดร.วิลาสินี หิรัญพานิช ซาโตะ ประธานกรรมการสอบ ผศ.ดร.วนิดา ไทรชมภู กรรมการ และ ผศ.ดร.เมธิน ผดุงกิจ กรรมการ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง ทุกขั้นตอนการศึกษารั้งนี้

ผู้วิจัยขอกราบ ขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ปวีตรา พูลบุตร และ อ.รัฐศาสตร์ เต๋นชัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการสกัดสาร lupinifolin ที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้

ขอขอบพระคุณบุคลากรประจำห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความช่วยเหลือในการอำนวยความสะดวกให้ใช้อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ ดำเนินงานวิจัยภายในห้องปฏิบัติการ

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจและส่งเสริมสนับสนุนการศึกษาวิจัยของผู้วิจัยในทุก ๆ ด้านจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีไว้ ณ ที่นี้

ปาริชาติ แขวงเมือง

พูน ปณุ ทิโต ชีเว

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	7
1.3 สมมติฐาน.....	7
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	8
1.5 นิยามคำศัพท์เฉพาะ.....	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	10
2.1 เชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> ).....	10
2.1.1 คุณสมบัติของเชื้อ <i>S. aureus</i> .....	10
2.2 เชื้อ methicillin-resistant <i>S. aureus</i> (MRSA).....	11
2.2.1 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>S. aureus</i> .....	12
2.2.2 การหลุดออกของเชื้อจากไบโอฟิล์ม (detachment).....	14
2.2.3 โรคติดเชื้อ MRSA และการรักษา.....	15
2.3 สมุนไพรชะเอมเหนื่อ ( <i>Derris reticulata</i> Craib.).....	23
2.3.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์.....	23

2.3.2	สรรพคุณทางยา.....	25
2.3.3	สารพฤกษเคมีที่พบในลำต้นชะเอมเหนือ.....	25
2.4	คุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของสาร lupinifolin.....	27
2.5	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ lupinifolin.....	28
2.5.1	ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity).....	28
2.6	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ.....	32
2.6.1	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ $\alpha$ -glucosidase.....	32
2.6.2	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	33
2.6.3	ฤทธิ์ต้านการอักเสบ.....	33
2.7	การศึกษาทางพิษวิทยา.....	34
2.7.1	การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity study).....	34
2.7.2	การศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง (Animal toxicity study).....	35
บทที่ 3	วิธีดำเนินการศึกษา.....	36
3.1	กรอบแนวคิด.....	36
3.2	รูปแบบการวิจัย.....	37
3.3	วัสดุอุปกรณ์.....	37
3.4	การเตรียมสาร lupinifolin.....	39
3.4.1	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรชะเอมเหนือ.....	39
3.4.2	การเตรียมสาร lupinifolin.....	39
3.4.3	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัด hexane ของชะเอมเหนือและสาร lupinifolin วิเคราะห์ด้วยวิธีรังคเลขพิวบาง (Thin layer Chromatography, TLC).....	40
3.5	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Tryptic Soy Broth (TSB).....	40
3.6	การทดสอบฤทธิ์ของ lupinifolin หรือยาด้านแบคทีเรียในการต้านเชื้อแบคทีเรีย MRSA ด้วย microbroth dilution technique.....	41

3.7 การทดสอบฤทธิ์ของ lupinifolin หรือยาต้านแบคทีเรียต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ด้วย crystal violet biofilm formation assay .....	42
3.8 การทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ด้วย crystal violet biofilm formation assay .....	44
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	46
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล .....	48
4.1 ผลการเตรียมสาร lupinifolin .....	48
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA ของสาร lupinifolin ยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม protein synthesis inhibitors และยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม cell wall synthesis inhibitors .....	48
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสาร lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA.....	49
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ของยากกลุ่ม protein synthesis inhibitors ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA .....	51
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยากกลุ่ม protein synthesis inhibitors ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA.....	56
4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ของยากกลุ่ม cell wall synthesis inhibitors ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA .....	71
4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยากกลุ่ม cell wall synthesis inhibitors ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA.....	75
บทที่ 5 สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ .....	87
5.1 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย MRSA .....	87
5.2 ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย MRSA.....	90
5.3 ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม .....	107
บรรณานุกรม.....	109
ประวัติผู้เขียน .....	131

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แนวทางการใช้ยาต้านแบคทีเรียสำหรับ bacteremia และ infective endocarditis จากการติดเชื้อ MRSA.....	17
ตารางที่ 2 แนวทางการใช้ยาต้านแบคทีเรียสำหรับ skin and soft tissue infections จากการติดเชื้อ MRSA .....	19
ตารางที่ 3 แนวทางการใช้ยาต้านแบคทีเรียสำหรับ osteomyelitis จากการติดเชื้อ MRSA.....	22
ตารางที่ 4 คุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของสาร lupinifolin.....	27
ตารางที่ 5 แผนการทดลองที่แสดงความเข้มข้นของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA .....	47
ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรีย .....	48
ตารางที่ 7 ค่า mean inhibitory concentration (IC <sub>50</sub> ) ของสาร lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ .....	49
ตารางที่ 8 ค่า mean inhibitory concentration (IC <sub>50</sub> ) ของยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ.....	51
ตารางที่ 9 ค่า mean inhibitory concentration (IC <sub>50</sub> ) ของยา ampicillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ .....	71

พจน ปรณ ทิโต ชีเว

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพประกอบที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
ภาพประกอบที่ 2 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA และ MRSA .....	14
ภาพประกอบที่ 3 ส่วนของลำต้นชะเอมเหนือ (A) และใบ (B) .....	24
ภาพประกอบที่ 4 ส่วนประกอบของฝักอ่อนชะเอมเหนือ.....	24
ภาพประกอบที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของสารพฤษเคมี 2 ชนิดที่สกัดแยกได้จากลำต้นชะเอมเหนือ	26
ภาพประกอบที่ 6 ลักษณะผลึกของสาร lupinifolin ที่สกัดแยกได้จากลำต้นชะเอมเหนือ .....	27
ภาพประกอบที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของสาร lupinifolin .....	28
ภาพประกอบที่ 8 ผลของสาร lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA.....	49
ภาพประกอบที่ 9 ผลของยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA.....	51
ภาพประกอบที่ 10 ผลของยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA.....	53
ภาพประกอบที่ 11 ผลของยา clindamycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA.....	55
ภาพประกอบที่ 12 ผลของการให้สาร lupinifolin (8 µg/mL) ร่วมกับยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA.....	56
ภาพประกอบที่ 13 ผลของการให้สาร lupinifolin (4 µg/mL) ร่วมกับยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA .....	58
ภาพประกอบที่ 14 ผลของการให้สาร lupinifolin (2 µg/mL) ร่วมกับยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA.....	60
ภาพประกอบที่ 15 ผลของการให้สาร lupinifolin (8 µg/mL) ร่วมกับยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA.....	61
ภาพประกอบที่ 16 ผลของการให้สาร lupinifolin (4 µg/mL) ร่วมกับยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA.....	63
ภาพประกอบที่ 17 ผลของการให้สาร lupinifolin (2 µg/mL) ร่วมกับยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA.....	65







# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม (gram positive cocci) ที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญหลายชนิดทั้งการติดเชื้อในโรงพยาบาล (hospital-acquired infections หรือ nosocomial infections) และการติดเชื้อในชุมชน (community-acquired infections) เช่น เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (endocarditis) การติดเชื้อของผิวหนัง และเนื้อเยื่ออ่อน (skin and soft tissue infections) การติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteremia) กระดูกอักเสบจากการติดเชื้อ (osteomyelitis) และการติดเชื้อบริเวณวัสดุหรืออุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ใส่ในร่างกาย (medical device-related infections) เป็นต้น (Craft *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020) เชื้อ *S. aureus* มีความสามารถในการสร้างปัจจัยที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรค (virulence factor) หลายชนิด เชื้อจึงมีความไวในการตอบสนองต่อยาต้านแบคทีเรีย (antibacterial drugs) ที่ลดลง ส่งผลให้เกิดการดื้อยาต้านแบคทีเรียได้หลายชนิด (multidrug resistance) หรือเรียกได้ว่าเชื้อ *S. aureus* เป็น “superbug” ทำให้การจัดการเพื่อรักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* เป็นไปได้ยากและมีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น การติดเชื้อดื้อยาจัดเป็นปัญหาทางการแพทย์และสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก และจัดเป็นภัยคุกคามที่จำเป็นต้องได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วน มีรายงานว่าโรคติดเชื้อดื้อยาเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของผู้ป่วยอย่างน้อย 1.27 ล้านคนทั่วโลกในปี ค.ศ. 2019 ข้อมูลในประเทศสหรัฐอเมริกา Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ได้รายงานว่าผู้ติดเชื้อดื้อยามากกว่า 2.8 ล้านคนในแต่ละปี (CDC, 2022) สำหรับประเทศไทย มีรายงานในปี พ.ศ.2558 คาดการณ์เบื้องต้นว่ามีการติดเชื้อดื้อยาประมาณปีละ 87,751 ครั้ง และมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากการติดเชื้อดื้อยาถึง 38,481 ราย ซึ่งคิดเป็นประมาณร้อยละ 40 ของผู้ติดเชื้อดื้อยา (คณะกรรมการประสานและบูรณาการงานด้านการดื้อยาต้านจุลชีพ, 2558) สาเหตุหลักที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียรวมทั้งเชื้อ *S. aureus* มีพัฒนาการในการดื้อยาเกิดขึ้น คือการใช้ยาต้านแบคทีเรียอย่างไม่เหมาะสมทั้งทางด้านการแพทย์เพื่อการรักษาโรค (เช่น การใช้ยาต้านแบคทีเรียเพื่อการรักษาโรคหวัดที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส เป็นต้น) รวมทั้งการใช้ยาต้านแบคทีเรียในภาคการเกษตรและอุตสาหกรรม (เช่น การใช้ยาต้านแบคทีเรียเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชหรือสัตว์ เป็นต้น) ส่งผลให้มีการปนเปื้อนของยาต้านแบคทีเรียสู่สิ่งแวดล้อม ทำให้เชื้อแบคทีเรียหลายชนิดในธรรมชาติมีวิวัฒนาการเพื่อการอยู่รอดด้วยการสร้างกลไกในการทำลายหรือกำจัดยาต้านแบคทีเรีย เชื้อ *S.*

*aureus* สามารถดื้อยาต้านแบคทีเรียผ่านหลายกลไกด้วยกัน เช่น การสร้างเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ทำลายยาต้านแบคทีเรีย (เช่น เอนไซม์  $\beta$ -lactamase เป็นต้น) การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเป้าหมายการออกฤทธิ์ (เช่น การสร้าง penicillin-binding protein (PBP) ชนิด PBP2a เป็นต้น) และการมี transporter protein ที่ทำหน้าที่กำจัดยาออกจากเซลล์ของแบคทีเรีย (efflux pump) เป็นต้น (Bao *et al.*, 2020)

เชื้อ *S. aureus* แบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักตามความไวในการตอบสนองต่อยาต้านแบคทีเรีย ได้แก่ 1) เชื้อ methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) คือเชื้อ *S. aureus* ที่ยังคงไวต่อยาต้านแบคทีเรียในกลุ่ม  $\beta$ -lactamase resistant penicillins และ 2) methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ซึ่งเป็นเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ตอบสนองต่อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactamase resistant penicillins รวมทั้งยาในกลุ่ม b-lactam antibiotics ทุกชนิด เชื้อ MRSA เป็นเชื้อ *S. aureus* ที่มีการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียจากการสร้าง PBP2a ที่มีคุณสมบัติทำให้ยาในกลุ่ม b-lactam antibiotics เข้าจับได้ลดลง จึงทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA ได้ PBP2a เป็น membrane-bound enzyme ที่เร่งปฏิกิริยา transpeptidation ที่จำเป็นในการเชื่อมต่อกับ peptidoglycan chain ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (cell wall) ของเชื้อแบคทีเรีย การสร้าง PBP2a ถูกควบคุมโดยยีน *mecA* พบอยู่ที่ mobile genetic element ที่เรียกว่า Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) (Daod *et al.*, 2015)

เชื้อ MRSA เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด ผู้ป่วยที่มีแผลน้ำร้อนลวก แผลไฟไหม้ ผู้ป่วยที่มีการใส่สายสวนปัสสาวะหรืออุปกรณ์ทางการแพทย์ และผู้ป่วยที่มีการใช้เครื่องช่วยหายใจ เป็นต้น การแพร่ระบาดของเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลสามารถเกิดขึ้นได้ง่ายจากการสัมผัสทำให้มีการติดต่อจากผู้ป่วยหนึ่งไปยังผู้ป่วยอื่น ๆ หรือจากบุคลากรทางการแพทย์สู่ผู้ป่วย ปัจจุบันเชื้อแบคทีเรียชนิด MRSA จัดเป็นเชื้อก่อโรคที่จัดการได้ยากชนิดหนึ่ง และเป็นสาเหตุของการเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรียมากกว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ดื้อยาหลายชนิด (multi-drug resistant gram-negative bacteria) ทุกสายพันธุ์รวมกันถึง 10 เท่า (Craft *et al.*, 2019) เชื้อ MRSA ยังได้รับการจัดให้เป็น 1 ใน 12 เชื้อก่อโรคที่เป็นภัยคุกคามต่อสุขภาพมนุษย์ที่สำคัญจากองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) อีกด้วย ข้อมูลจาก WHO ได้รายงานว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MRSA มีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตมากกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่ไวต่อยาถึง 64% (WHO, 2021) แม้ว่าขณะนี้จะมีการพัฒนายาต้านแบคทีเรียหลายชนิดขึ้นเพื่อจัดการเชื้อ MRSA เช่น vancomycin, linezolid, daptomycin

เป็นต้น แต่เชื้อ MRSA ก็ได้มีวิวัฒนาการที่ทำให้เชื้อสามารถดื้อยาเหล่านี้ได้ด้วยเช่นกัน ตัวอย่างเช่น การดื้อยา vancomycin ของเชื้อ MRSA (vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA) ซึ่งมีกลไกการดื้อยาจากการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา vancomycin คือ terminal dipeptide ที่เป็นองค์ประกอบในการสร้าง peptidoglycan จาก D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) ไปเป็น D-alanyl-D-lactate (D-Ala-D-Lac) ทำให้ยา vancomycin เข้าจับกับเป้าหมายการออกฤทธิ์ได้ลดลง (Beauduy & Winston, 2022)

นอกจากกลไกการดื้อยาต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นแล้ว อีกปัจจัยสำคัญหนึ่งที่ทำให้เชื้อ MRSA กำจัดได้ยาก คือความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียเข้าเกาะจับบนพื้นผิวต่าง ๆ ทั้งพื้นผิวของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกาย และพื้นผิวของวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์ เกิดเป็นชุมชนของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่อย่างหนาแน่นและมีการสร้างสารที่เรียกว่า Extracellular Polymeric Substance (EPS) ซึ่งมีคุณสมบัติที่ช่วยทำให้แบคทีเรียสามารถยึดเกาะบนพื้นผิวได้อย่างมั่นคงแข็งแรง อีกทั้งยังทำหน้าที่ส่งเสริมการอยู่รอดของแบคทีเรียภายในไบโอฟิล์มอีกด้วย เชื้อ *S. aureus* ทั้งชนิด MSSA และเชื้อ MRSA สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ อย่างไรก็ตามไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA และ MRSA มีองค์ประกอบและกลไกการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างกัน (McCarthy *et al.*, 2015) กระบวนการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ประกอบด้วยขั้นตอนหลักได้แก่ 1) การเข้ายึดเกาะบนพื้นผิว (attachment) 2) การเพิ่มจำนวน (growth) และการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (maturation) โดยในขั้นตอนนี้จะมีการสร้างสาร EPS และ 3) การหลุดออกของเชื้อแบคทีเรียจากไบโอฟิล์ม (detachment) ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการสร้างไบโอฟิล์ม เมื่อแบคทีเรียหลุดออกจากไบโอฟิล์มแล้ว จะสามารถไปเข้ายึดเกาะบนพื้นผิวในตำแหน่งอื่น และสร้างไบโอฟิล์มขึ้นใหม่ได้ต่อไป (Craft *et al.*, 2019) ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้เพิ่มขึ้น จากการที่ไบโอฟิล์มทำหน้าที่เสมือนเป็นเกราะกำบัง (barrier) ปกป้องแบคทีเรียจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและยาต้านแบคทีเรีย ทำให้ทั้งเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและยาต้านแบคทีเรียไม่สามารถแพร่ผ่านเข้าไปทำลายแบคทีเรียได้ โดยมีการศึกษาพบว่ายาต้านแบคทีเรียหลายชนิด เช่น oxacillin, cefotaxime และ vancomycin เป็นต้น ไม่สามารถแทรกผ่านไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ได้ (Singh *et al.*, 2010) สาร EPS ที่สร้างขึ้นซึ่งมีประจุลบยังสามารถเข้าจับกับ ยาต้าน แบคทีเรียบางชนิดที่มีประจุบวกทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ อีกทั้งไบโอฟิล์มมีโครงสร้างทำให้แบคทีเรียอยู่รวมกันในบริเวณที่จำกัด จึงมีผลให้เอนไซม์ที่มีฤทธิ์ทำลายยาต้านแบคทีเรียซึ่งผลิตจากเชื้อมีความเข้มข้นที่สูงขึ้น และมีฤทธิ์ทำลายยาได้เพิ่มขึ้น

ด้วย เชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันอย่างหนาแน่นและใกล้ชิดกันมากขึ้นในไบโอฟิล์ม ยังทำให้การส่งต่อสารพันธุกรรม (genetic element) ที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยาสามารถเกิดขึ้นได้โดยง่าย การสร้างไบโอฟิล์มมีผลให้เชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะเชื้อที่อยู่ในบริเวณส่วนลึกของไบโอฟิล์มมีการปรับเปลี่ยนรูปแบบการเจริญเติบโตไปเป็นเชื้อที่มีการเจริญเติบโตได้ช้า (dormant cells หรือ persister cells) เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้ที่ได้รับสารอาหารและออกซิเจนที่น้อยลง แบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ช้าเหล่านี้ จะมีความไวลดลงต่อยาต้านแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อที่กำลังเจริญเติบโต (active growing cells) เช่น ยาต้านแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ เป็นต้น หรือทำให้ยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์เหล่านี้ไม่มีประสิทธิภาพในการรักษา มีรายงานการศึกษาพบว่าเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มสามารถทนต่อยาต้านแบคทีเรียได้สูงกว่าเชื้อแบคทีเรียที่ลอยเป็นอิสระ (planktonic cells) 10 ถึง 1,000 เท่า (Singh *et al.*, 2009) EPS ของไบโอฟิล์มยังทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เชื้อแบคทีเรียในไบโอฟิล์มสามารถที่จะอยู่รอดได้ แม้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม หรือขาดแคลนสารอาหารอีกด้วย นอกจากนี้ไบโอฟิล์มยังทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บสะสมเชื้อแบคทีเรีย (reservoir) ทำให้มีการสะสมเชื้อแบคทีเรียไว้ในร่างกายของผู้ป่วย ทั้งนี้แบคทีเรียที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มสามารถที่จะหลุดออก (detachment) และแพร่กระจายไปตั้งถิ่นฐานใหม่ในบริเวณอื่น ๆ ของร่างกายและทำให้เกิดกลับมาติดเชื้อซ้ำต่อไปได้อีกด้วย (Kaplan *et al.*, 2010) ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA จึงจัดเป็นอีกหนึ่งปัจจัยก่อโรคสำคัญที่ทำให้การจัดการโรคติดเชื้อ MRSA เป็นไปได้ยาก ดังนั้นการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (anti-biofilm formation) และ/หรือการกำจัดไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย (biofilm destruction) จึงจัดเป็นอีกหนึ่งวิธีการจัดการโรคติดเชื้อ MRSA ที่จะสามารถช่วยลดความรุนแรงของการติดเชื้อได้ นอกเหนือจากการใช้ยาต้านแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatics) หรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidals)

การใช้สารพฤกษเคมี (phytochemicals) จากพืชสมุนไพรในการจัดการเชื้อ MRSA จัดเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาที่มีความน่าสนใจ โดยมีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าสารพฤกษเคมีในกลุ่ม flavonoids มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ (Slobodnikova *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016) หนึ่งในสมุนไพรที่มี

ความน่าสนใจคือ ชะเอมเหนื่อ ซึ่งเป็นไม้พุ่มกึ่งเลื้อย (Climbing shrub) ที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Derris reticulata* Craib. อยู่ในวงศ์ FABACEAE (LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDEAE) ถิ่นกำเนิดของชะเอมเหนื่ออยู่ในทวีปเอเชียและแอฟริกาตะวันออก (Tewtrakul et al., 2009) ส่วนเนื้อไม้ของชะเอมเหนื่อมีสารพฤกษเคมีกลุ่ม flavonoids ชนิด prenylated flavanones ที่สำคัญได้แก่ lupinifolin ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย ได้แก่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเบาหวาน ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเสริม รวมทั้งมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด (Mahidol et al., 1997) มีรายงานพบว่าสาร lupinifolin สามารถพบได้มากที่สุดในส่วนของเนื้อไม้ชะเอมเหนื่อ (% yield เท่ากับ 0.55 %)(Mahidol et al., 1997) จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสาร lupinifolin มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมได้หลายชนิด สาร lupinifolin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus mutans* ได้ โดยมีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เท่ากับ 1 µg/mL และมีค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) เท่ากับ 2 µg/mL (Joycharat et al., 2013) และมีรายงานว่าสาร lupinifolin มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ทั้งชนิด MSSA และ MRSA ได้ โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 8 µg/mL และ 16 µg/mL ตามลำดับ จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์พบว่าสาร lupinifolin มีกลไกการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ทั้งชนิด MSSA และ MRSA ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของเชื้อแบคทีเรียโดยตรง โดยสามารถทำให้เกิดการแตกและเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสาร lupinifolin ต่อ DNA ของเชื้อ MRSA พบว่า lupinifolin ไม่มีผลทำให้เกิดการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) แต่อย่างใด แสดงให้เห็นว่า lupinifolin ไม่ได้ออกฤทธิ์ที่บริเวณ DNA ของเชื้อ MRSA (Yusook et al., 2017) อีกทั้งมีรายงานการศึกษาพบว่า lupinifolin มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมอีก 2 สายพันธุ์คือเชื้อ *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus faecium* ที่ดื้อยาซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย (multidrug-resistant enterococci clinical isolates) ได้อีกด้วย โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.5 - 2 µg/mL และมีค่า MBC เท่ากับ 2-16 µg/mL (Sianglum et al., 2019) อย่างไรก็ตามสาร lupinifolin ไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดที่ได้มีการทดสอบ เช่น *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis* เป็นต้น (Yusook et al., 2017) ผลการศึกษาของ Rattanakiat et al. (2021) ยังพบว่าสาร lupinifolin สามารถเสริมฤทธิ์ (synergism) กับยา ampicillin หรือ cloxacillin ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MSSA ได้ โดยมีค่า Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index

เท่ากับ 0.5000 และ 0.5078 ตามลำดับ และสาร lupinifolin ยังมีแนวโน้มในการเสริมฤทธิ์กับยา ampicillin หรือ cloxacillin ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ได้ด้วยเช่นกัน โดยมีค่า FIC index เท่ากับ  $<0.5625$  และ  $<0.5156$  ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้สาร lupinifolin ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ร่วมกับยาต้านแบคทีเรียที่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างไปคือ ampicillin และ cloxacillin ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ มีแนวโน้มที่จะช่วยส่งเสริมทำให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย MRSA เพิ่มสูงขึ้นได้ ดังนั้นการใช้สารพฤษเคมีเพื่อช่วยเสริมประสิทธิภาพของยาต้านแบคทีเรียเดิมที่มีอยู่ จึงจัดเป็นอีกวิธีการจัดการโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่มีความน่าสนใจเช่นกัน นอกเหนือจากการค้นคว้าเพื่อพัฒนายาหรือสารพฤษเคมีชนิดเดี่ยว (single active agent) ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย นอกจากฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงถึงฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (anti-biofilm formation activity) ของสาร lupinifolin อีกด้วย การศึกษาฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่ได้จากเนื้อไม้ชะเอมเหนือ ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* และ *S. aureus* ชนิด MSSA มีผลการศึกษาพบว่า lupinifolin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC (sub-MICs) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* และ MSSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า median inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA มีค่า  $IC_{50}$  ต่ำที่สุดเท่ากับ  $0.22 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 6 ชั่วโมงของการทดสอบ (Pulbutr *et al.*, 2020) และมีรายงานการวิจัยที่พบฤทธิ์ของสาร lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA เช่นกัน โดยจากการวิจัยของขวัญชนก แจ่มอำพร และคณะ (2565) พบว่าสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น  $8 \mu\text{g/mL}$  (0.5MIC),  $16 \mu\text{g/mL}$  (MIC) และ  $32 \mu\text{g/mL}$  (2MIC) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาร lupinifolin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย MRSA อย่างไรก็ตามยังคงขาดข้อมูลในส่วนของฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรีย ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA อีกทั้งยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มดังกล่าวส่งผลต่อแต่ละระยะ (stage) ของการสร้างไบโอฟิล์มได้แตกต่างกันหรือไม่ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในกลุ่มยาต้านแบคทีเรียกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ (cell wall synthesis inhibitors) ได้แก่ ampicillin, cloxacillin และ vancomycin และยาต้านแบคทีเรีย

กลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis inhibitors) ได้แก่ tetracycline, clindamycin และ streptomycin ในระยะเวลาของการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างกัน โดยคาดว่าผลการทดลองที่ได้ อาจจะเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น ผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอกประเภทแผ่นติดผิวหนัง เพื่อลดการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน ทั้งนี้ขึ้นกับคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร lupinifolin ที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป เพื่อยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม และสามารถนำไปสู่วิธีการที่เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการจัดการโรคติดเชื้อ MRSA ได้ต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร lupinifolin ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในหลอดทดลอง เมื่อทำการทดสอบในระยะเวลาที่แตกต่างกัน
- 2) เพื่อทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ (cell wall synthesis inhibitors) ได้แก่ ampicillin, cloxacillin และ vancomycin ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในหลอดทดลอง เมื่อทำการทดสอบในระยะเวลาที่แตกต่างกัน
- 3) เพื่อทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis inhibitors) ได้แก่ tetracycline, clindamycin และ streptomycin ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในหลอดทดลอง เมื่อทำการทดสอบในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

## 1.3 สมมติฐาน

- 1) สาร lupinifolin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA โดยมีผลต่อระยะเวลาของการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างกัน
- 2) สาร lupinifolin มีผลเสริมฤทธิ์กับยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม cell wall synthesis inhibitors หรือยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม protein synthesis inhibitors ที่นำมาทดสอบในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย MRSA ได้ โดยมีผลต่อระยะเวลาของการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างกัน

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลทางเภสัชวิทยาของสาร lupinifolin ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ทั้งเมื่อให้เป็นสารเดี่ยวและเมื่อให้ร่วมกับยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม cell wall synthesis inhibitors หรือยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม protein synthesis inhibitors ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA ต่อไป

เช่น ผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอก ประเภทแผ่นติดผิวหนัง เพื่อลดการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน ทั้งนี้ขึ้นกับคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร lupinifolin ที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

#### 1.5 นิยามคำศัพท์เฉพาะ

1) Minimum Inhibitory Concentration (MIC) คือ ความเข้มข้นของยาหรือสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้จากการทดสอบด้วยวิธี microbroth dilution technique ในหลอดทดลอง เมื่ออ่านผลการทดลองจากการสังเกตด้วยตาเปล่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ประสาทรพร บริสุทธิ์, 2551)

2) ไบโอฟิล์ม (biofilm) คือ กลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอย่างหนาแน่น (colonization)

โดยแบคทีเรียมีการสร้าง Extracellular Polymeric Substance (EPS) ออกมานอกเซลล์ ซึ่งมีคุณสมบัติยึดเกาะบนพื้นผิวของอวัยวะหรืออุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ใส่เข้าไปในร่างกาย เพื่อเป็นชั้นปกป้องและเป็นการสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตอยู่ของเชื้อแบคทีเรีย (Boonbumrung, 2018)

3) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) คือ เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่มีการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียจากการสร้าง Penicillin-Binding Protein (PBP) ชนิด PBP2a ที่มีคุณสมบัติจับกับยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม b-lactam antibiotics ได้ไม่ดี ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ เชื้อ MRSA ที่ใช้ในการศึกษา ครั้งนี้คือ เชื้อ MRSA สายพันธุ์ DMST 20645 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2563)

4) Lupinifolin เป็นสารในกลุ่ม prenylated flavanones มีลักษณะทางกายภาพผลึก รูปเข็มหรืออสัณฐาน (amorphous) สีเหลือง มีสูตรโมเลกุลคือ  $C_{25}H_{26}O_5$  สาร lupinifolin ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นสารพฤษเคมีที่เป็นสกัดแยกได้จากลำต้นของชะเอมเหนือ (*Derris reticulata*)



Craib.) โดยดัดแปลงจากวิธีการของกมล อยู่สุข (2560) และ Pulbutr *et al.*, 2020 (กมล อยู่สุข, 2560; Pulbutr *et al.*, 2020)

5) Median inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) คือ ค่าความเข้มข้นของสารทดสอบสามารถยับยั้งการสร้างไปโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียได้ครึ่งหนึ่งของฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด ค่า  $IC_{50}$  ในการทดลองนี้ได้จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม GraphPad Prism version 8.0.2



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

##### 2.1.1 คุณสมบัติของเชื้อ *S. aureus*

*Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม (gram positive cocci) จัดอยู่ในวงศ์ Staphylococcaceae ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีการเคลื่อนที่ เซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1  $\mu\text{m}$  มีรูปร่างกลม เรียงตัวกันเป็นกลุ่มคล้ายองุ่น แต่อาจพบเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือต่อกัน เป็นสายสั้น ๆ (ภาพประกอบที่ 1) เป็นเชื้อประจำถิ่นพบได้บริเวณผิวหนัง ต่อมาไขมัน ส่วนใหญ่จะพบที่บริเวณเยื่อเมือกในโพรงจมูก *S. aureus* เป็นเชื้อในกลุ่ม coagulase-positive *Staphylococci* แยกได้จากคน และสัตว์ เป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อยในโรคติดเชื้อแบคทีเรียในโรงพยาบาล เชื้อ *S. aureus* มีความสามารถในการสร้างปัจจัยที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรค (virulence factor) หลายชนิด ส่งผลทำให้เชื้อสามารถทำลายหรือยับยั้งการออกฤทธิ์ของยาต้านแบคทีเรีย (antibacterial drugs) หรือยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ได้ เหตุนี้จึงเป็นปัจจัยเสริมในการเพิ่มจำนวนของเชื้อ จึงจัดได้ว่าเชื้อ *S. aureus* เป็น “superbug” คือเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาต้านจุลชีพ ทำให้การจัดการเพื่อรักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* ทำได้ยากมากยิ่งขึ้นในทางคลินิก นอกจากนี้การใส่ยาต้านแบคทีเรียบางชนิด ยังส่งผลนำไปสู่การพัฒนาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย เชื้อ *S. aureus* เป็นจุลชีพที่มีการปรับตัวให้สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ และสามารถทนต่อยาต้านแบคทีเรียหลายชนิด การดื้อยาและการส่งต่อความสามารถในการดื้อยาเกิดจากการส่งต่อยีนดื้อยา (horizontal gene transfer, HGT) ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เกิดการดื้อยาได้โดยไม่ต้องมีการผ่าเหล่าของยีน ซึ่งในโรงพยาบาลพบการดื้อยาผ่านการส่งต่อยีนระหว่างเชื้อได้บ่อยมาก ซึ่งการพัฒนาของเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาลอาจมีการแพร่กระจายทำให้เกิดการติดเชื้อในชุมชนได้ด้วย (Craft et al., 2019) การดื้อยาของเชื้อ *S. aureus* มีรายงานตั้งแต่ยุคปี 1940s หลังจากที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่ม penicillins ในการรักษาโรคติดเชื้อ (Craft et al., 2019) โดยเชื้อ *S. aureus* เริ่มมีการดื้อยาจากการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ที่มีฤทธิ์ทำลายยาในกลุ่ม penicillins ที่ไม่ทนต่อเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ได้หลายชนิด เช่น penicillin, ampicillin, amoxicillin เป็นต้น ขณะนี้เชื้อ *S. aureus* มากกว่า 90% มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ได้ จึงทำให้ไม่สามารถใช้ยาในกลุ่ม penicillins ข้างต้นในการรักษาได้ ต่อมาในยุคปีค.ศ. 1960s เมื่อได้มีการพัฒนายากลุ่ม penicillins ที่ทนต่อเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ( $\beta$ -lactamase resistant penicillins) เช่น methicillin, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin เป็นต้น เพื่อใช้ใน

การจัดการรักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* ยาในกลุ่มนี้สามารถจัดการเชื้อ *S. aureus* ชนิดที่ไวต่อยา หรือ methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) ได้

อย่างไรก็ตามหลังจากเริ่มมีการใช้ยาในกลุ่มนี้เพียง 2 ปี ก็ได้มีรายงานพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มีวิวัฒนาการดื้อต่อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactamase resistant penicillins ขึ้นอีก ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ชนิดนี้เรียกได้ว่า methicillin-resistant *S. aureus* หรือเชื้อ MRSA (Lakhundi & Zhang, 2018) ปัจจุบันเชื้อแบคทีเรียชนิด MRSA จัดเป็นเชื้อก่อโรคเป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ที่จัดการได้ยากชนิดหนึ่ง และแม้ว่าจะมีการพัฒนายาหลายชนิดขึ้นเพื่อจัดการเชื้อ MRSA เช่น vancomycin, linezolid, daptomycin เป็นต้น ปัจจุบันเชื้อ MRSA ก็ได้มีการพัฒนาการดื้อยาเหล่านี้ด้วยเช่นกัน ตัวอย่างเช่น การดื้อยา vancomycin ของเชื้อ MRSA (vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA) ซึ่งมีกลไกการดื้อยาจากการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา vancomycin คือ terminal dipeptide จาก D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) ไปเป็น D-alanyl-D-lactate (D-Ala-D-Lac) ทำให้ยา vancomycin เข้าจับกับเป้าหมายการออกฤทธิ์ได้ลดลง

## 2.2 เชื้อ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)

เชื้อ MRSA เป็นเชื้อ *S. aureus* ที่มีการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียโดยมีการสร้าง Penicillin-Binding Protein (PBP) ชนิด PBP2a ที่มีคุณสมบัติจับกับยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam ได้ไม่ดี ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ PBPs เป็น membrane-bound enzyme ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิด cross-link หรือ transpeptidation ในการเชื่อมต่อ peptidoglycan chain ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (cell wall) ของเชื้อแบคทีเรีย การสร้าง PBP2a ถูกควบคุมโดยยีน *mecA* พบอยู่ที่ mobile genetic element ที่เรียกว่า Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) (Daod *et al.*, 2015) PBP2a ของเชื้อ MRSA มีความชอบจับกับยาในกลุ่ม beta-lactams ทุกชนิดที่ต่ำลง ดังนั้นจึงทำให้การเกิด cross-link ของ peptidoglycan และการสังเคราะห์ cell wall ของเชื้อแบคทีเรียยังคงเกิดขึ้นได้ นั่นคือยาต้านแบคทีเรียไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ส่งผลให้เกิดการดื้อยา การแสดงออกของ PBP2a ส่งผลให้มีการดื้อต่อยาในกลุ่ม beta-lactams antibiotics หลายชนิดไม่ว่าจะเป็น penicillins, cephalosporins, carbapenems นอกจากนี้เชื้อ MRSA ยังดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ เช่น tetracyclines, sulfonamides, aminoglycosides เป็นต้น อีกด้วย ดังนั้นเชื้อ MRSA จึงจัดเป็นเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยาต้านแบคทีเรียหลายชนิด (multi-drug resistant bacteria)

นอกจากความสามารถในการสร้าง PBP2a ที่ทำให้ยาไม่สามารถเข้าจับกับเชื้อ MRSA ได้แล้ว อีกปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อ MRSA จัดการได้ยาก คือความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ซึ่งเชื้อ *S. aureus* ทั้งชนิด MSSA และเชื้อ MRSA สามารถสร้างไบโอฟิล์มที่ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากระบบภูมิคุ้มกันและยาต้านแบคทีเรีย ส่งผลทำให้เชื้อมีความต้านทานต่อยาต้านแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งไบโอฟิล์มยังทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถเกาะติดบนพื้นผิวต่าง ๆ ได้ยาวนานและกำจัดออกได้ยากอีกด้วย ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* จึงจัดเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งที่ทำให้การจัดการโรคติดเชื้อ *S. aureus* เป็นไปได้ยาก



ภาพประกอบที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus*  
บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Muller-Hinton agar  
(ที่มา (Cervantes-García *et al.*, 2015))

### 2.2.1 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus*

ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการเข้าจับหรือยึดเกาะบนพื้นผิวของอุปกรณ์ทางการแพทย์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ส่งผลให้เพิ่มอัตราการเจ็บป่วยและการเสียชีวิต การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm-associated infections) (Boonbumrung, 2018) โดยเชื้อ *S. aureus* เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อที่สัมพันธ์กับการใส่อุปกรณ์ทางการแพทย์ในร่างกาย (device-related infection) การรักษาการติดเชื้อที่มีการสร้างไบโอฟิล์มทำได้ยากเนื่องจากแบคทีเรียภายในไบโอฟิล์มมีความทนต่อยาต้านแบคทีเรียและระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย การสร้าง ไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA และ MRSA มีขั้นตอนและรายละเอียดขององค์ประกอบในการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างกันในบางส่วน

ขั้นตอนการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ได้แก่

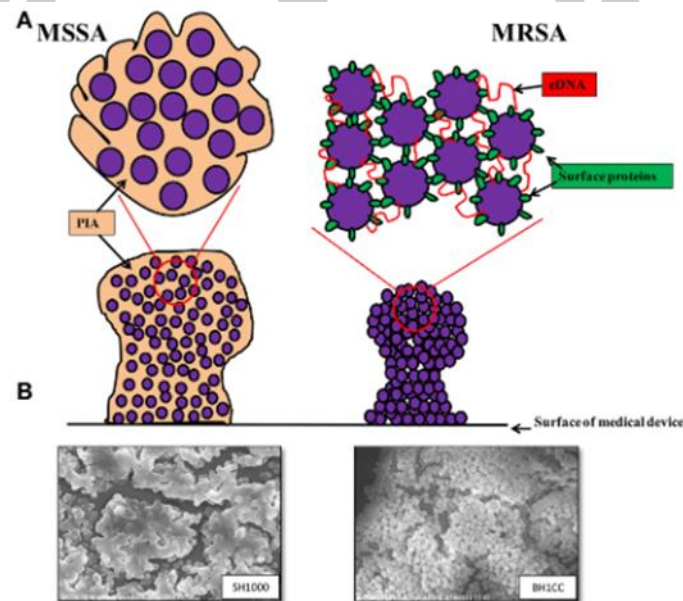
- 1) การยึดเกาะบนพื้นผิว (attachment) ทั้งพื้นผิวของสิ่งมีชีวิตคือเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่าง ๆ และพื้นผิวของสิ่งของที่ไม่มีชีวิต ในระยะนี้เซลล์แบคทีเรียที่ล่องลอยเป็นอิสระ (planktonic cells) จะเข้ามายึดเกาะบนพื้นผิว และมีการส่งสัญญาณที่เรียกว่า quorum sensing ทำให้เกิดการรวมตัวกันของเซลล์แบคทีเรีย โดยในช่วงแรกการเข้าเกาะจะเป็นแบบผันกลับ (reversible) คือเซลล์ยังคงหลุดออกจากพื้นผิวได้โดยง่าย แต่ต่อมากการยึดเกาะจะแข็งแรงมากขึ้น จนเป็นแบบไม่ผันกลับ (irreversible) คือเซลล์ไม่สามารถหลุดออกกลับไปเป็นเซลล์อิสระได้เอง โดยในระยะนี้ใช้เวลา 2-4 ชั่วโมง
- 2) การเพิ่มจำนวน (growth) และการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (maturation) ในขั้นตอนนี้เซลล์ที่อาศัยอยู่ในไบโอฟิล์มจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น และมีการสร้างองค์ประกอบของไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้นจนเกิดการขยายของชั้นไบโอฟิล์มไปเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (mature biofilm) ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตใช้ระยะเวลาประมาณ 6-12 ชั่วโมง

ไบโอฟิล์มประกอบด้วย extracellular polymeric substance (EPS) ได้แก่ oligosaccharides, DNA และ proteins องค์ประกอบของไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA และ MRSA ความแตกต่างกัน (ภาพประกอบที่ 2.2)

- a. ไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA มีองค์ประกอบหลักคือ oligosaccharides โดย oligosaccharides หลักที่พบในไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA คือ polymers ของ N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine (polysaccharide intercellular adhesin หรือ PIA) PIA ถูก encode โดย icaADBC operon ส่วนประกอบอื่นของไบโอฟิล์ม ได้แก่ โปรตีน ซึ่ง biofilm-associated proteins ที่พบบ่อยได้แก่ accumulation-associated protein (Aap) นอกจากนี้ยังพบ teichoic acids อีกด้วย จากการที่ไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA มี PIA เป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นจึงจัดได้ว่าเป็นไบโอฟิล์มชนิด PIA-dependent biofilm
- b. ไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA มีองค์ประกอบหลักคือ extracellular DNA (eDNA) และการแสดงออกของโปรตีนบางชนิดบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียได้แก่ sortase-anchored proteins และ major autolysin จึงเรียกได้ว่าไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA เป็นไบโอฟิล์มชนิด PIA-independent biofilm

### 2.2.2 การหลุดออกของเชื้อจากไบโอฟิล์ม (detachment)

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการสร้างไบโอฟิล์ม เกิดจากการแสดงออกของ surfactant-like peptides ที่สำคัญต่อการคงสภาพรูปร่างของไบโอฟิล์ม เมื่อหลุดออกจากไบโอฟิล์มแล้ว แบคทีเรียสามารถที่จะไปเกาะบนพื้นผิวใหม่และสร้างไบโอฟิล์มใหม่ได้ต่อไป ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง



ภาพประกอบที่ 2 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA และ MRSA

(A) ภาพแสดงกราฟฟิกของฟิโนไทป์ที่แสดงโดย MSSA และ MRSA พบ polysaccharide intercellular adhesin หรือ PIA เป็นองค์ประกอบหลักในขณะที่ MRSA มีองค์ประกอบหลักคือ extracellular DNA (eDNA) และมีการแสดงออก surface protein

(B) ภาพแสดงไมโครกราฟฟิอิเล็กตรอน MSSA (ซ้าย) และภาพแสดงไมโครกราฟฟิอิเล็กตรอน MRSA (ขวา)

(ที่มา (McCarthy et al., 2015))

ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย ส่งผลเพิ่มการดื้อยาต้านแบคทีเรียได้จากกลไกหลัก 2 กลไกคือ

- 1) การป้องกันการผ่านของยาต้านแบคทีเรียเข้าไปสู่เป้าหมายการออกฤทธิ์ โดยองค์ประกอบของ biofilm matrix สามารถจำกัดการแพร่ผ่านของยา หรือมีผลกำจัดยาออกจากบริเวณที่อยู่ของเชื้อแบคทีเรีย ไบโอฟิล์มยังเป็นเกราะป้องกันเชื้อจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

ทำให้ยาต้านแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic drugs) ซึ่งต้องอาศัยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการกำจัดเชื้อร่วมด้วย ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย

- 2) การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางชีวภาพของแบคทีเรียที่อยู่ภายในไบโอฟิล์ม โดยมีลักษณะที่แตกต่างไปจากเชื้อแบคทีเรียที่ลอยลอยหรือแบคทีเรียที่ไม่ได้ยึดเกาะบนพื้นผิว (planktonic cells)

เชื้อแบคทีเรียที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มโดยเฉพาะส่วนที่อยู่ลึกจะอยู่ในสภาวะที่เรียกว่า slow-growing state คือแบ่งตัวได้ช้ามาก (dormant cells หรือ persister cells) ทำให้เชื้อเหล่านี้ไม่ตอบสนองต่อยาต้านแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อที่กำลังมีการเจริญเติบโต ตัวอย่างเช่น ยากลุ่ม beta-lactams antibiotics หรือยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ (cell wall synthesis inhibitors) ความสามารถของ dormant cells เหล่านี้ในการต่อต้านยาต้านแบคทีเรียเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การรักษาโรคติดเชื้อที่มีการสร้างไบโอฟิล์มเป็นไปได้ยากมากยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ extracellular matrix ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไบโอฟิล์มยังสามารถถูกใช้เป็นแหล่งอาหารของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้แม้อยู่ในสภาวะที่ขาดอาหารหรือไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต อีกทั้งการเข้าเกาะกลุ่มกันของเชื้อแบคทีเรียภายในไบโอฟิล์มทำให้การส่งผ่านยีนที่ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยา (drug resistant genes) เกิดขึ้นได้ง่ายมากขึ้นอีกด้วย การจัดการไบโอฟิล์มจึงจัดว่าเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญในการรักษาการติดเชื้อ *S. aureus* วิธีการที่สำคัญคือการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่สามารถใช้ร่วมกับยาต้านแบคทีเรียเพื่อทำให้ยาต้านแบคทีเรียกลับมามีประสิทธิภาพต่อเชื้อได้ การจัดการไบโอฟิล์มแบ่งออกเป็น 2 วิธีการได้แก่ 1) การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (anti-biofilm formation) และ 2) การทำลายไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นแล้ว (biofilm destruction)

### 2.2.3 โรคติดเชื้อ MRSA และการรักษา

เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เป็นเชื้อที่พบได้บ่อยว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญหนึ่งทั่วโลก โดยพบว่าประมาณ 5% ของผู้ป่วยในประเทศที่พัฒนาแล้ว และประมาณ 10% ของผู้ป่วยในประเทศกำลังพัฒนาเกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล สำหรับผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาในหอผู้ป่วยวิกฤตอัตราการติดเชื้อในโรงพยาบาลจะเพิ่มขึ้นเป็นถึง 50% (Craft *et al.*, 2019) เชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อที่พบได้บริเวณผิวหนังและเยื่อต่างๆ ในคนทั่วไป โดยประชากรประมาณ 30% พบการเพิ่มจำนวนและตั้งถิ่นฐานของเชื้อ (colonization) ของเชื้ออย่างต่อเนื่อง ส่วนอีก 60% พบการ colonization ของเชื้อแบบชั่วคราว

เชื้อ *S. aureus* ทำให้เกิดการติดเชื้อได้หลาย ตำแหน่งตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ตัวอย่างเช่น การติดเชื้อที่ผิวหนัง โดยเฉพาะที่รูขุมขน (hair follicle) และต่อมไขมัน (sebaceous gland) สำหรับในเด็กการติดเชื้อที่พบบ่อยคือ impetigo ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่ผิวหนังทำให้มีแผลเกิดขึ้นบนใบหน้าใกล้กับปากและจมูก นอกจากนี้ *S. aureus* ยังทำให้เกิดโรคติดเชื้อที่รุนแรง เช่น เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (endocarditis) การติดเชื้อที่บริเวณข้อต่อ (osteoarticular infection) ปอดอักเสบติดเชื้อ (pneumonia) การติดเชื้อที่บริเวณอุปกรณ์เทียมอวัยวะและสายสวน (prosthetic device and catheter infections) เป็นต้น

การติดเชื้อ *S. aureus* มักเกิดขึ้นเมื่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำงานได้ลดลง เช่น การได้รับยากดภูมิคุ้มกัน การเกิดการเจ็บป่วยที่รุนแรง เป็นต้น เชื้อ *S. aureus* จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่มีปัจจัยก่อโรค (virulence factor) หลายปัจจัยด้วยกัน นอกจากนี้เชื้อยังมีกลไกการดื้อยาต้านแบคทีเรียที่หลากหลาย อีกทั้งยังมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวต่าง ๆ ทั้งพื้นผิวบนเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่าง ๆ ที่มีชีวิต (biotic surface) และพื้นผิวของสิ่งของที่ไม่มีชีวิต (abiotic surface) การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียทำให้เชื้อสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้เพิ่มขึ้น โดยที่ไบโอฟิล์มจะปกป้องเชื้อจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นอันตรายต่อเชื้อ และยังส่งผลทำให้เกิดการดื้อยาต้านแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอีกด้วยดังที่ได้กล่าวข้างต้นในหัวข้อการสร้างไบโอฟิล์ม

เชื้อ MRSA เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยที่มีแผลผ่าตัด แผลน้ำร้อนลวก ไฟไหม้ ผู้ป่วยที่มีการใส่สายสวนปัสสาวะ การใช้เครื่องช่วยหายใจ นอกจากนี้ยังมีการติดต่อจากผู้ป่วยหนึ่งไปยังผู้ป่วยอื่น ๆ หรือจากบุคลากรทางการแพทย์สู่ผู้ป่วยโดยการสัมผัส ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลได้

ในที่นี้ ขอยกตัวอย่างโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ MRSA ที่สำคัญ 3 ชนิดได้แก่

1) โรคติดเชื้อของเยื่อหุ้มหัวใจ ลิ้นหัวใจ และหลอดเลือด (Infective Endocarditis, IE) Infective endocarditis เป็นการอักเสบโดยตรงจากการติดเชื้อบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ ลิ้นหัวใจ และหลอดเลือด พบการติดเชื้อมากที่สุดที่บริเวณลิ้นหัวใจ โดยมีการเกิด vegetation ซึ่งเป็นกลุ่มก้อนของเชื้อและเซลล์อักเสบ (inflammatory cell) ซึ่ง vegetation เกิดได้จากเยื่อหุ้มชั้นในของผนังหัวใจบาดเจ็บ ภายใต้กลไกการเกิดการไหลวนผิดปกติของกระแสเลือด (turbulent flow) เมื่อมีการกระตุ้นของเซลล์บุผนังหลอดเลือด (subendothelial cells) ทำให้เกิดการผลิตโปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์ กระตุ้นให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดและเส้นใย fibrin กลายเป็นลิ่มเลือด (sterile thrombus) ซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดได้ (Cheung *et al.*, 2021) as cited in (Que & Moreillon, 2011)

การรักษา



ผู้ป่วย Infective Endocarditis (IE) ควรได้รับยาปฏิชีวนะทุกราย ผู้ป่วยมากกว่าครึ่งตอบสนองต่อยาต้านแบคทีเรียได้ดี ส่งผลให้ไม่ต้องรับการผ่าตัด จากการที่ vegetation ทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (bacteremia) ได้ ดังนั้นควรให้ยาต้านแบคทีเรียทางหลอดเลือดมากกว่ายาต้านแบคทีเรียชนิดรับประทาน เพื่อให้ระดับยาคงที่ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 1 แนวทางการใช้ยาต้านแบคทีเรียสำหรับ bacteremia และ infective endocarditis จากการติดเชื้อ MRSA (Liu et al., 2011)

โรคหรือความผิดปกติ	การรักษา	ขนาดยาสำหรับผู้ใหญ่	ขนาดยาสำหรับเด็ก	คำแนะนำ
Bacteremia	Vancomycin	15–20 มก./กก./ขนาดยาต่อครั้ง ให้ยาทางหลอดเลือดดำ ทุกๆ 8–12 ชั่วโมง	15 มก./กก./ขนาดยาต่อครั้ง ให้ยาทางหลอดเลือดดำ ทุกๆ 6 ชั่วโมง	โดยปกติไม่แนะนำให้เพิ่ม gentamicin หรือ rifampicin
	Daptomycin	6 mg/kg/dose IV QD	6–10 mg/kg/dose IV QD	สำหรับผู้ป่วยที่เป็นผู้ใหญ่ แพทย์บางคนแนะนำให้ยาขนาดสูงขึ้นคือ 8–10 mg/kg/dose IV QD ยาจัดอยู่ใน Pregnancy category B. (สตรีมีครรภ์ใช้อย่างปลอดภัย)
Infective endocarditis, native valve	Same as for bacteremia			

ตารางที่ 1 แนวทางการใช้ยาต้านแบคทีเรียสำหรับ bacteremia และ infective endocarditis จาก การติดเชื้อ MRSA (Liu *et al.*, 2011) (ต่อ)

โรคหรือความผิดปกติ	การรักษา	ขนาดยาสำหรับผู้ใหญ่	ขนาดยาสำหรับเด็ก	คำแนะนำ
Infective endocarditis, Prosthetic valve	Vancomycin	15–20 มก./กก./ครั้ง ให้ยาทางหลอดเลือดดำ ทุกๆ 8–12 ชั่วโมง	15 มก./กก./ครั้ง ให้ยาทางหลอดเลือดดำ ทุกๆ 6 ชั่วโมง	
	AND			
	Gentamicin	1 มก./กก./ครั้ง ให้ยาทางหลอดเลือดดำ ทุกๆ 8 ชั่วโมง	1 มก./กก./ครั้ง ให้ยาทางหลอดเลือดดำ ทุกๆ 8 ชั่วโมง	
	AND			
	Rifampin	300 มก. ทางปากหรือหลอดเลือดดำ ทุกๆ 8 ชั่วโมง	1 มก./กก./ครั้ง ให้ยาทางหลอดเลือดดำ ทุกๆ 8 ชั่วโมง	

หมายเหตุ ความหมายอักษรย่อ: BID, twice daily; CA-MRSA, community-associated MRSA; DS, double strength; IV, intravenous; ND, no data; PO, oral; QD, every day; TID, 3 times per day; TMP-SMX, trimethoprim-sulfamethoxazole.

## 2) การติดเชื้อที่ผิวหนังและเยื่ออ่อน (skin and soft tissue infections)

เมื่อเชื้อ MRSA เข้าสู่ผิวหนัง neutrophils และ macrophages จะทำหน้าที่ไปจับสิ่งแปลกปลอม บริเวณที่มีการติดเชื้อ ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย จะหลีกเลี่ยงการถูกกำจัดหลากหลายวิธี รวมถึงการยับยั้ง chemotaxis ของเม็ดเลือดขาว, การกักเก็บแอนติบอดีของโฮสต์, การสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) และการต้านการถูกทำลาย ด้วยวิธี phagocytes (G. Chen *et al.*, 2018) การติดเชื้อ MRSA พบได้ในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล โดยพบได้บ่อยในผู้ป่วยสูงอายุ ผู้ป่วยหนัก หรือผู้ป่วยมีแผล (Sriaudtha, 2006)

## การรักษา

แนวทางการรักษา skin and soft tissue infections จากการติดเชื้อ MRSA แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2 แนวทางการใช้ยาต้านแบคทีเรียสำหรับ skin and soft tissue infections จากการติดเชื้อ MRSA

(Liu et al., 2011)

โรคหรือความผิดปกติ	การรักษา	ขนาดยาสำหรับผู้ใหญ่	ขนาดยาสำหรับเด็ก	คำแนะนำ
Purulent cellulitis (defined as cellulitis associated with purulent drainage or exudate in the absence of a drainable abscess)	Clindamycin	300-450 มก. รับประทานวัน ละ 3 ครั้ง	10-13 มก./กก./ครั้ง รับประทานทุกๆ 6-8 ชั่วโมง , ไม่เกิน 40 มก./ กก./วัน	การให้ยา clindamycin รับประทานอาจพบ การเกิด <i>Clostridium difficile</i> -associated disease ได้บ่อยกว่ายา รับประทานชนิดอื่น
	Doxycycline	100 มก. รับประทานวัน ละ 2 ครั้ง	≤ 45 kg; 2 มก./กก./ ครั้ง รับประทานทุกๆ 12 hr >45 kg: ใช้ขนาด ยาของผู้ใหญ่	ไม่ใช่ยากลุ่ม tetracyclines ในเด็ก อายุต่ำกว่า 8 ปี ยาอยู่ ใน pregnancy category D (ไม่ควรใช้ ในสตรีมีครรภ์)
	Minocycline	200 มก. 1 ครั้ง ตามด้วย 100 มก. รับประทาน วันละ 2 ครั้ง	4 มก./กก. รับประทาน 1 ครั้ง ตามด้วย 2 มก./ กก./ครั้ง รับประทาน ทุกๆ 12 ชั่วโมง	
	Linezolid	600 มก. รับประทานวัน ละ 2 ครั้ง	10 มก./กก./ครั้ง รับประทานทุกๆ 8 ชั่วโมง ไม่เกิน 600 มก./ครั้ง	ยามีราคาสูงกว่ายา ชนิดอื่น

ตารางที่ 2 แนวทางการใช้ยาต้านแบคทีเรียสำหรับ skin and soft tissue infections จากการติดเชื้อ MRSA (ต่อ)

โรคหรือความผิดปกติ	การรักษา	ขนาดยาสำหรับผู้ใหญ่	ขนาดยาสำหรับเด็ก	คำแนะนำ
Non-purulent cellulitis (defined as cellulitis with no purulent drainage or exudate and no associated abscess)	$\beta$ -lactam (ต.ย. cephalexin และ dicloxacillin)	500 มก. รับประทานวันละ 3 ครั้ง		ให้ $\beta$ -lactam antibiotics เป็น empirical therapy เพื่อครอบคลุม $\beta$ -hemolytic streptococci ก่อนส่วน empirical therapy สำหรับการติดเชื้อ community acquired MRSA (CA-MRSA) จะให้ในผู้ที่ไม่มีอาการตอบสนองต่อ lactam therapy และอาจพิจารณาให้ในผู้ที่มีอาการ systemic toxicity
	Clindamycin	300-450 มก. รับประทานวันละ 3 ครั้ง	10-13 มก./กก./ครั้ง รับประทานทุกๆ 6-8 ชั่วโมง, ไม่เกิน 40 มก./กก./ครั้ง	ครอบคลุมทั้ง $\beta$ -hemolytic streptococci และ CA-MRSA
	$\beta$ -lactam (ต.ย. amoxicillin) และ TMP-SMX หรือ tetracycline	Amoxicillin: 500 มก. รับประทานวันละ 3 ครั้ง TMP-SMX และ tetracycline		ครอบคลุมทั้ง $\beta$ -hemolytic streptococci และ CA-MRSA

โรคหรือความผิดปกติ	การรักษา	ขนาดยาสำหรับผู้ใหญ่	ขนาดยาสำหรับเด็ก	คำแนะนำ
	Linezolid	600 มก. รับประทานวันละ 2 ครั้ง	10 มก./กก./ครั้ง รับประทานทุกๆ 8 ชั่วโมง ไม่เกิน 600 มก./ครั้ง	ครอบคลุมทั้ง $\beta$ -hemolytic streptococci และ CA-MRSA
Complicated SSTI	Vancomycin	15-20 มก./กก./ครั้ง รับประทาน ทุกๆ 8-12 ชั่วโมง	15 มก./กก./ครั้ง ให้ยา ทางหลอดเลือดดำ ทุกๆ 6 ชั่วโมง	
	Linezolid	600 มก. รับประทานวันละ 2 ครั้ง	10 มก./กก./ครั้ง รับประทานทุกๆ 8 ชั่วโมง ไม่เกิน 600 มก./ครั้ง	ในเด็กอายุตั้งแต่ 12 ปีให้ ขนาด 600 มก. รับประทาน/ให้ยาทาง หลอดเลือดดำ
	Daptomycin	4 มก./กก./ครั้ง ให้ยาทางหลอดเลือดดำทุกวัน	อยู่ระหว่างการศึกษา ขนาดยาที่เหมาะสม	
	Telavancin	10 มก./กก./ครั้ง	ไม่มีข้อมูล	Pregnancy category C
	Clindamycin	600 มก. PO/IV TID	10-13 mg/kg/dose PO Every 6-8 h, ไม่เกิน 40 mg/kg/day	Pregnancy category B

หมายเหตุ ความหมายอักษรย่อ: BID, twice daily; CA-MRSA, community-associated MRSA; DS, double strength; IV, intravenous; ND, no data; PO, oral; QD, every day; TID, 3 times per day; TMP-SMX, trimethoprim-sulfamethoxazole.

### 3) กระดูกอักเสบจากการติดเชื้อ (Osteomyelitis)

โรคกระดูกอักเสบจากการติดเชื้อพบมากในเด็กอายุระหว่าง 3-10 ปี (prepubertal children) มักพบบ่อยบริเวณกระดูกขา ผู้ป่วยมักมีประวัติการติดเชื้อดังกล่าวมาก่อนหรือประวัติการได้รับบาดเจ็บในผู้สูงอายุพบการอักเสบบริเวณกระดูกไขสันหลัง (vertebral osteomyelitis) ส่วนมากเกิดจากการติดเชื้อ *S. aureus* หลังการผ่าตัด โดยเชื้อสามารถกระจายทั้งทางกระแสเลือดหรือเข้าทางบาดแผลโดยตรงและทำให้เกิดการอักเสบบริเวณดังกล่าวได้ (Laoprasobwittaya, 2017)

#### การรักษา

แนวทางการรักษา skin and soft tissue infections จากการติดเชื้อ MRSA แสดงดังตารางที่ 2.3 ตารางที่ 3 แนวทางการใช้ยาต้านแบคทีเรียสำหรับ osteomyelitis จากการติดเชื้อ MRSA (Liu *et al.*, 2011)

โรคหรือความผิดปกติ	การรักษา	ขนาดยา สำหรับผู้ใหญ่	ขนาดยาสำหรับ เด็ก	คำแนะนำ
Osteomyelitis	Vancomycin	15-20 มก./กก./ ครั้ง ให้ยาทาง หลอดเลือดดำ ทุกๆ 8-12 ชั่วโมง	15 มก./กก./ครั้ง ให้ยาทางหลอดเลือดดำ ทุกๆ 6 ชั่วโมง	การรักษาหลักคือการผ่าตัดเพื่อนำเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อและเนื้อเยื่อที่ตายออก (surgical debridement) และกำจัดหนองที่บริเวณ soft tissue ออกไป ผู้เชี่ยวชาญบางท่านแนะนำการให้ rifampicin 600 mg วันละครั้งหรือ 300-450 mg วันละ 2 ครั้งร่วมด้วย สำหรับเด็กที่อายุตั้งแต่ 12 ปีขึ้นไป ควรใช้ linezolid 600 mg (PO/IV) วันละ 2 ครั้ง

โรคหรือความผิดปกติ	การรักษา	ขนาดยา สำหรับผู้ใหญ่	ขนาดยาสำหรับ เด็ก	คำแนะนำ
Osteomyelitis	Daptomycin	6 มก./กก./วัน ให้ยาทางหลอดเลือดดำวันละ 3 ครั้ง	6-10 มก./กก./วันให้ยาทางหลอดเลือดดำวันละ 3 ครั้ง	
	Linezolid	600 มก รับประทาน/ให้ยาทางหลอดเลือดดำ	10 มก./กก./ครั้ง รับประทาน/ให้ยาทางหลอดเลือดดำ, ไม่เกิน 600 มก./ครั้ง	
	Clindamycin	600 มก รับประทาน/ให้ยาทางหลอดเลือดดำวันละ 3 ครั้ง	10-13 มก./กก./ครั้ง รับประทาน/ให้ยาทางหลอดเลือดดำ ทุกๆ 6-8 ชั่วโมงไม่เกิน 40 มก./กก./วัน	ประกอบด้วย TMP 80 และ 160 มก.ตามลำดับ สำหรับผู้ใหญ่หนัก 80 กก. การให้ DS tablet ทำให้ได้ยาขนาด 4 มก./กก.

หมายเหตุ ความหมายอักษรย่อ: BID, twice daily; CA-MRSA, community-associated MRSA; DS, double strength; IV, intravenous; ND, no data; PO, oral; QD, every day; TID, 3 times per day; TMP-SMX, trimethoprim-sulfamethoxazole

### 2.3 สมุนไพรชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.)

#### 2.3.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

ชะเอมเหนือ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ ว่า *Derris reticulata* Craib. อยู่ในวงศ์ FABACEAE (LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDEAE) ถิ่นกำเนิดของชะเอมเหนืออยู่ในทวีปเอเชียและแอฟริกาตะวันออก (Tewtrakul *et al.*, 2009) ชะเอมเหนือมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นไม้เถาขนาดใหญ่ เปลือกเถาหนา สีน้ำตาลอ่อน (ภาพประกอบที่ 3 (A)) เนื้อไม้สีขาวนวล ใบมีลักษณะเป็นใบประกอบแบบขนนกปลายคี่ เรียงสลับ ใบย่อยประมาณ 5 ใบ รูปใบหอกถึงรูปใบหอกแคบ กว้าง 1.5 - 4 เซนติเมตร ยาวได้ถึง 18 เซนติเมตร ปลายใบเรียวแหลม โคนใบรูปลิ่ม (ภาพประกอบที่ 3 (B)) ดอกมีลักษณะเป็นดอกช่อ แบบช่อแยกแขนง ออกที่ซอกใบ กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน สีม่วงแดง กลีบดอกรูป

ดอกถั่ว หรือกลีบดอกคล้ายผีเสื้อ (papilionaceous corolla) สีขาวถึงขาวแกมม่วงอ่อน (ภาพประกอบที่ 4 (C)) ผลเป็นฝัก เมื่อแห้งฝักจะแตกออก (ภาพประกอบที่ 4 (A) และ 4 (B)) มีปีกตามแนวยาว กว้าง 1.7 - 2 เซนติเมตร ยาวประมาณ 4 เซนติเมตร เมล็ดรูปไต



ภาพประกอบที่ 3 ส่วนของลำต้นชะเอมเหนือ (A) และใบ (B)  
(ที่มา : Siri Ruckhachati Nature Park, 2010)



ภาพประกอบที่ 4 ส่วนประกอบของฝักอ่อนชะเอมเหนือ  
ฝักแก่ (A), ฝักแก่เมื่อแห้ง(B) และช่อดอก (C)  
(ที่มา : Siri Ruckhachati Nature Park, 2010)



### 2.3.2 สรรพคุณทางยา

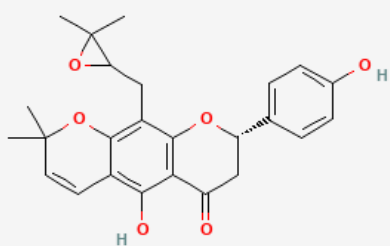
(วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2552)

- 1) ใบ มีรสร้อนเผื่อน ใช้ขับโลหิตระดู
- 2) ดอก มีรสร้อนขม ช่วยย่อยอาหาร ทำเสมหะให้งวด แก้ดีและโลหิต
- 3) เนื้อไม้ มีรสหวาน แก้โรคในคอ แก้ลม แก้เลือดออกตามไรฟัน บำรุงธาตุ บำรุงกำลังบำรุงกล้ามเนื้อให้เจริญ ขับเสมหะ แก้ น้ำลายเหนียว
- 4) ลำต้น มีรสหวานเอียน ถ่ายลม แก้โรคในคอ ทำผิวหนังให้สดชื่น แก้โรคตา

### 2.3.3 สารพฤษเคมีที่พบในลำต้นชะเอมเหนือ

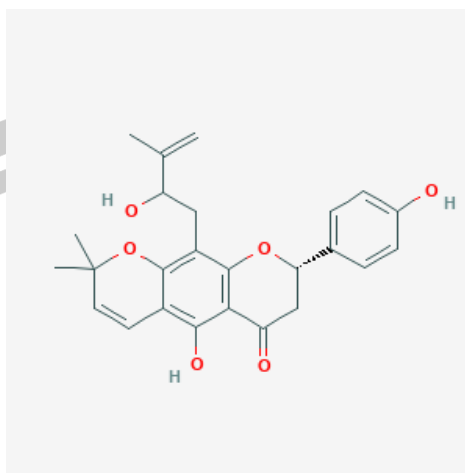
จากการศึกษาของ Mahidol และคณะ 1997 ได้ทำการศึกษาสารพฤษเคมีจากลำต้นของชะเอมเหนือ พบว่าประกอบด้วยสารพฤษเคมีกลุ่ม flavonoids ชนิด flavanones ได้แก่ lupinifolin (% yield เท่ากับ 0.55%) ซึ่งเป็นสารชนิด prenylated flavanones และสารพฤษเคมีในกลุ่ม pyranoflavanones ได้แก่ 2",3"-epoxylupinifolin (% yield เท่ากับ 0.0025%) และ dereticulatin (% yield เท่ากับ 0.012%) ซึ่งสาร 2 ชนิดนี้เป็นสารพฤษเคมีกลุ่ม flavanones ชนิดใหม่ ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน (Mahidol *et al.*, 1997)

(A)



พหุบัน ปณุ ทิโต มเว

(B)



ภาพประกอบที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของสารพฤษเคมี 2 ชนิดที่สกัดแยกได้จากลำต้นชะเอมเหนือ ได้แก่ 2''',3''-epoxylupinifolin (A) และ dereticulatin (B)

(Mahidol *et al.*, 1997)

การศึกษาของ Prawat และคณะ 2000 ได้ทำการศึกษาสารพฤษเคมีที่พบในลำต้นของชะเอมเหนือ และรายงานการพบสารพฤษเคมีชนิด pyranoflavanones 3 ชนิด ได้แก่ lupinifolin, 2''',3''-epoxylupinifolin และ dereticulatin จากลำต้นของชะเอมเหนือเช่นเดียวกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Mahidol และคณะในปี ค.ศ.2017 นอกจากนี้ยังพบสารพฤษเคมีชนิดใหม่คือ 1''-hydroxy2''',3''-epoxylupinifolin (% yield เท่ากับ 0.0075%) ซึ่งสกัดแยกได้จากลำต้นชะเอมเหนือด้วยตัวทำละลายคือ dichloromethane สารดังกล่าวมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองแข็ง มีจุดหลอมเหลวที่ 137–140 องศาเซลเซียส, และมีสูตรโมเลกุลคือ  $C_{25}H_{26}O_7$  (Prawat *et al.*, 2000)

การศึกษาของ Issarachot และคณะ (2019) ได้ทำการศึกษาพบสารในกลุ่ม pyranoflavanones 2 ชนิดในลำต้นของชะเอมเหนือ ได้แก่ 4'-methoxydereticulatin และ 2''-hydroxy,3''-ethoxylupinifolin และยังพบสารอื่น ๆ อีก 5 ชนิด ได้แก่ lupinifolin, 2''',3''-dihydroxylupinifolin (สารกลุ่ม flavanones), genistein (สารกลุ่ม isoflavones), lupeol (สารกลุ่ม triterpenes),  $\beta$ -sitosterol (สารกลุ่ม phytosterols) (Issarachot *et al.*, 2019)

นอกจากสาร lupinifolin ซึ่งเป็นสารพฤษเคมีหลักที่พบได้ในลำต้นของชะเอมเหนือแล้ว สาร lupinifolin ยังสามารถพบได้ในพืชอื่น ๆ ได้แก่ ชะเอมไทย (*Albizia myriophylla* Benth.) (Joycharat *et al.*, 2013) ชะเอม (*Myriopterum extensum* Schum.) (Soonthornchareonnon

*et al.*, 2004) หัวประทู๋ (*Eriosema chinense Vogel.*) (Prasad *et al.*, 2013) และทองหลางน้ำ (*Erythrina fusca Lour.*) (Khaomek *et al.*, 2008).

#### 2.4 คุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของสาร lupinifolin

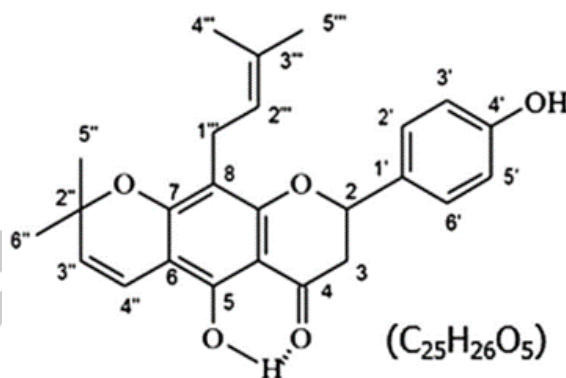
ข้อมูลของคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของสาร lupinifolin แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 4 คุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของสาร lupinifolin

คุณสมบัติ	ข้อมูล
ลักษณะทางกายภาพ	ผลึกรูปเข็มหรืออสัณฐาน (amorphous) สีเหลือง
สูตรโมเลกุล	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>
น้ำหนักโมเลกุล	406.478 g/mole
IUPAC Name	(8S)-5-hydroxy-8-(4-hydroxyphenyl)-2,2-dimethyl-10-(3-methylbut-2-enyl)-7,8-dihydropyranol[3,2-g]chromen-6-one
UV/VIS	$\lambda_{max}$ 254, 274, 311, 367 nm
จุดหลอมเหลว	110 °C



ภาพประกอบที่ 6 ลักษณะผลึกของสาร lupinifolin ที่สกัดแยกได้จากลำต้นชะเอมเหนือ  
ที่มา (Pulbutr *et al.*, 2020)



ภาพประกอบที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของสาร lupinifolin  
ที่มา (Yusook *et al.*, 2017)

## 2.5ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ lupinifolin

### 2.5.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

จากการศึกษาของ Joycharat และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ lupinifolin ที่สกัดจากเนื้อไม้ชะเอมไทย (*Albizia myriophylla*) เปรียบเทียบกับยาต้านแบคทีเรียและสารมาตรฐานที่ใช้เป็น positive control คือ penicillin G และสาร chlorhexidine ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* สายพันธุ์ ATCC 25175 และเชื้อ *S. mutans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคฟันผุ (clinical isolates) พบว่าสาร lupinifolin มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1 µg/mL และมีค่า MBC เท่ากับ 2 µg/mL ในขณะที่ยา penicillin G มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.00156 µg/mL และ 1 µg/mL ตามลำดับ และสาร chlorhexidine มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.5 µg/mL และ 1 µg/mL ตามลำดับ เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย lupinifolin ต่อเชื้อ *S. mutans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยพบว่า โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในระหว่าง 0.25 - 2 µg/mL และ 0.5-8 µg/mL ตามลำดับ (Joycharat *et al.*, 2013)

จากการศึกษาของ Joycharat และคณะ (2016) รายงานว่าสารพฤกษเคมีที่พบในเนื้อไม้ชะเอมไทย (*Albizia myriophylla*) มีทั้งหมดจำนวน 9 ชนิด สารพฤกษเคมีที่พบส่วนใหญ่เป็นสารพฤกษเคมีกลุ่ม flavonoids สารพฤกษเคมีชนิดที่พบมากที่สุดคือ lupinifolin ปริมาณที่พบคือ  $93.85 \pm 0.07$  mg/g ซึ่งได้จากการสกัดเนื้อไม้ชะเอมไทยด้วยเอทานอลที่เก็บตัวอย่างจากพื้นที่ภาคกลาง (Joycharat *et al.*, 2016) และในการศึกษาเดียวกันนี้ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่สกัดแยกจากลำต้นชะเอมไทย (*Albizia myriophylla*) ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, และ *Streptococcus mutans* พบว่า lupinifolin สามารถมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Streptococcus mutans* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.98 µg/mL และมีค่า MBC เท่ากับ 1.96 µg/mL นอกจากนี้ยังพบว่า lupinifolin มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* และ *B. cereus* โดยค่า MIC และ MBC ของสาร lupinifolin ต่อเชื้อทั้ง 2 ชนิด ที่เท่ากัน คือมีค่าเท่ากับ 15.63 µg/mL และ 31.25 µg/mL ตามลำดับ (Joycharat et al., 2016)

จากการศึกษาของ Yusook และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ lupinifolin ที่ได้สกัดจากลำต้นชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) ต่อเชื้อ *S. aureus* พบว่า lupinifolin สามารถมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 8 µg/mL และมีค่า MBC เท่ากับ 16 µg/mL ในขณะที่ยา ampicillin ซึ่งเป็น positive control มีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 0.25 µg/mL ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบด้วยว่าสาร lupinifolin มีกลไกการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของเชื้อแบคทีเรียโดยตรง โดยสามารถทำให้เกิดการแตกของเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ด้วยวิธีการทดสอบ flow cytometry อีกทั้งเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสาร lupinifolin ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* พบว่า lupinifolin ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแต่อย่างใด เมื่อทำการทดสอบที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25 - 75 µg/mL (Yusook et al., 2017)

จากการศึกษาของ Limsuwan และคณะ (2018) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ lupinifolin ที่สกัดจากเนื้อไม้ชะเอมไทย (*Albizia myriophylla*) ต่อเชื้อ *S. mutans* พบว่า lupinifolin สามารถมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* สายพันธุ์ ATCC 25175 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2 µg/mL และมีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. mutans* ที่แยกจากผู้ป่วย จำนวน 5 ชนิด อยู่ในระหว่าง 2 - 4 µg/mL จากการทดสอบ time-kill assay พบว่า สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4 เท่าของค่า MIC (4MIC) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. mutans* ได้ 90 % ที่เวลา 24 ชั่วโมง สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 8 เท่าของค่า MIC (8MIC) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. mutans* ได้ 90% ที่เวลา 20 ชั่วโมง ในขณะที่สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 16 เท่าของค่า MIC (16MIC) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ 90 - 99.99% ที่เวลา 8, 16 และ 20 ชั่วโมง การทดสอบฤทธิ์ของสาร lupinifolin ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกออกของเซลล์แบคทีเรีย (bacteriolysis activity) เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 16MIC พบว่า lupinifolin ไม่มีผลต่อการแตกของเซลล์แบคทีเรียแต่อย่างใด ในขณะที่ สาร Triton X-100 ความเข้มข้น 10% ซึ่งเป็น positive control เหนี่ยวนำให้เซลล์แบคทีเรียมีการแตกออกได้หลังจากได้รับสารที่เวลา 2

ชั่วโมง การทดสอบการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane permeability) พบว่า ทุกความเข้มข้นของ สาร lupinifolin ที่ทดสอบ (4MIC, 8MIC และ 16MIC) สามารถทำให้เกิดการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ยอมให้สารต่าง ๆ ผ่านออกจากเซลล์ได้เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่า lupinifolin มีกลไกการออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* คือทำให้เกิดการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ ออกจากภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนยังพบว่า lupinifolin ที่ความเข้มข้น 16MIC ยังมีผลทำให้เซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์มีลักษณะผิดปกติ เซลล์มีความยาวมากขึ้น และเกิดการยุบรวมกันระหว่างเซลล์ และ lupinifolin ที่ความเข้มข้นระหว่าง 8 - 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ยังทำให้เกิดการรั่วของ cytoplasm ออกจากเซลล์อีกด้วย (Limsuwan *et al.*, 2018)

จากการศึกษาของ Sianglum และคณะ (2019) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาร lupinifolin ที่สกัดได้จากเนื้อไม้ชะเอมไทย ในการยับยั้งเชื้อ enterococci ที่ดื้อยาต้านแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยและฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสาร lupinifolin ผลการศึกษาพบว่า lupinifolin สามารถมีฤทธิ์ต้านเชื้อ MDR ( multidrug – resistant enterococci clinical isolates ) ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.5-2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และมีค่า MBC เท่ากับ 2-16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  จากการทดสอบ time-kill assay พบว่า สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น MIC มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ ATCC29212 ได้ 99.99% ที่เวลา 2 ชั่วโมง สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 2 เท่า ของค่า MIC (2MIC) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ HTY0037 ที่แยกได้จากผู้ป่วย ได้ 99.99% ที่เวลา 4 ชั่วโมง ในขณะที่สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น MIC มีฤทธิ์ ฆ่าเชื้อ *E. faecium* สายพันธุ์ HTY0256 ได้ 99.99% ที่ 2 ชั่วโมง การทดสอบการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane permeability) พบว่า lupinifolin ที่ความเข้มข้น 2MIC สามารถทำให้เกิดการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ยอมให้สารต่าง ๆ ผ่านออกจากเซลล์ได้เพิ่มขึ้น ภายในระยะเวลา 30 นาที การทดสอบการทนต่อสภาวะเกลือ (salt sensitivity) พบว่า lupinifolin ที่ความเข้มข้น MIC และ 2MIC ทำให้ปริมาณของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ ATCC29212 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NaCl ทุกความเข้มข้น (0%, 2%, 4%, และ 6% ) จากภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนยังพบว่า lupinifolin ที่ความเข้มข้น MIC ยังมีผลทำให้เซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์มีลักษณะผิดปกติ เซลล์มีความยาวมากขึ้น และเกิดการยุบรวมกันระหว่างเซลล์ และ lupinifolin ที่ความเข้มข้นระหว่าง 4MIC ยังทำให้เซลล์เกิดช่องว่างบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ (Sianglum *et al.*, 2019)

จากการศึกษาของ Yusook และคณะ (2020) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ lupinifolin ที่ได้ชะเอมเหนือ (*Derris reticulata*) ต่อเชื้อ MRSA ผลการศึกษา พบว่า lupinifolin สามารถมีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และมีค่า MBC เท่ากับ 16

$\mu\text{g/mL}$  โดยสาร lupinifolin มีกลไกการออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย MRSA คือ เหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และเมื่อทำการทดสอบผลของสาร lupinifolin ต่อ DNA ของเชื้อ MRSA พบว่า lupinifolin ไม่มีผลต่อการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) แต่อย่างใด แสดงให้เห็นว่า lupinifolin ไม่ได้เกิดการออกฤทธิ์ที่บริเวณ DNA ของเชื้อ MRSA (Yusook & Panvongsa, 2020)

จากการศึกษาของ Pulbutr และคณะ (2020) ได้ทำการศึกษากฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ lupinifolin ที่ได้จากชะเอมเหนือ (*Derris reticulata*) ในการยับยั้งการก่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* และ *S. aureus* ผลการศึกษาพบว่า lupinifolin สามารถมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* และ *S. aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ  $4 \mu\text{g/mL}$  และ  $8 \mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ นอกจากนี้ สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ทั้งแบบอาศัยและไม่อาศัยน้ำตาล sucrose โดยพบว่าในช่วงเวลา ที่ 12 ชั่วโมง และ ที่ 20 ชั่วโมง มีค่า  $\text{IC}_{50}$  ต่ำที่สุด เท่ากับ  $0.57 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$  และ  $0.21 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ และ lupinifolin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ที่เวลา 6 ชั่วโมง มีค่า  $\text{IC}_{50}$  ต่ำที่สุด เท่ากับ  $0.22 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$  (Pulbutr et al., 2020)

จากการศึกษาของ Rattanakit และคณะ (2021) ได้ทำการศึกษากการเสริมฤทธิ์กันของ lupinifolin ที่ได้จาก ชะเอมเหนือ (*Derris reticulata*) เมื่อให้ร่วมกับยาต้านแบคทีเรีย โดยทำการศึกษาในเชื้อ *Streptococcus mutans*, methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) และ ชนิด methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) โดยยาต้านแบคทีเรีย ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ คือ ampicillin, cloxacillin, vancomycin ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์การยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (cell wall synthesis inhibitors) ผลการศึกษา lupinifolin สามารถมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* สายพันธุ์ DMST 18777, MSSA สายพันธุ์ DMST 8013 และ MRSA สายพันธุ์ DMST 20645 ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ  $8 \mu\text{g/mL}$ ,  $16 \mu\text{g/mL}$ ,  $16 \mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ การทดสอบของสาร lupinifolin ร่วมกับการให้ยาต้านแบคทีเรีย (ampicillin, cloxacillin, vancomycin) ด้วยวิธี checkerboard determination พบว่าการทดสอบฤทธิ์ lupinifolin ร่วมกับ ampicillin หรือ cloxacillin ต่อเชื้อ *S. mutans* อยู่ในระหว่างการเสริมฤทธิ์ และไม่เสริมฤทธิ์ โดยมีค่า The fractional inhibitory concentration index (FICI) เท่ากับ 0.5156 และ 0.5625 ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ lupinifolin ร่วมกับ ampicillin หรือ cloxacillin ต่อเชื้อ MSSA พบว่าสามารถออกฤทธิ์เสริมกัน โดยมีค่า FICI เท่ากับ 0.5000 และ 0.5078 ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ lupinifolin ร่วมกับ ampicillin หรือ cloxacillin ต่อเชื้อ MRSA พบว่ามีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ โดยมีค่า FICI

เท่ากับ  $<0.5625$  ,  $<0.5156$  ตามลำดับ และ ในขณะที่ การทดสอบฤทธิ์ lupinifolin ร่วมกับ vancomycin ต่อเชื้อ MRSA พบว่ามีค่า FICI เท่ากับ  $0.7500$  ซึ่งต้านการออกฤทธิ์ (Rattanakit *et al.*, 2021)

## 2.6 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ

### 2.6.1 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ $\alpha$ -glucosidase

จากการศึกษาของ Joycharat และคณะ (2018) ได้ทำการศึกษา ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ของสารสกัดจากเนื้อไม้ชะเอมไทย (*Albizia myriophylla*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีรายงานว่าพบสาร lupinifolin เป็นองค์ประกอบ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลของเนื้อไม้ชะเอมไทย และ dichloromethane fraction ที่ความเข้มข้น  $2,000 \mu\text{g/mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ได้ใกล้เคียงกันคือ  $67.93\%$  และ  $69.30\%$  ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับฤทธิ์ของยา acarbose ที่ความเข้มข้น  $1,000 \mu\text{g/mL}$  สามารถยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ได้  $68.65\%$  ทั้งนี้สารพฤกษเคมีที่แยกได้จากสารสกัดดังกล่าว และพบว่ามีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ได้แก่ 1) indenoic acid, 2) 8-methoxy-7, 3',4'-trihydroxyflavone และ 3) 3, 4, 7, 3'-tetrahydroxyflavan โดยที่สาร 3, 4, 7, 3'-tetrahydroxyflavan มีฤทธิ์ที่ดีที่สุดคือมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $98.59 \mu\text{g/mL}$  และสารนี้ยังมีฤทธิ์ที่แรงกว่า acarbose ด้วยเล็กน้อย โดยที่ในการศึกษาดังกล่าวได้รายงานว่า acarbose มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $125 \mu\text{g/mL}$  (Joycharat *et al.*, 2018)

จากการศึกษาของ Pulbutr และคณะ (2020) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสาร lupinifolin ในการยับยั้ง เอนไซม์  $\alpha$ -amylase ผลการศึกษาพบว่า lupinifolin ที่ความเข้มข้น  $12.5 \mu\text{g/mL}$  สามารถยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ได้  $75.85\%$  โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $3.43 \mu\text{g/mL}$  และเมื่อเปรียบเทียบกับ Acarbose ที่ความเข้มข้น  $1,000 \mu\text{g/mL}$  สามารถยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ได้  $44.10\%$  และในขณะที่ lupinifolin มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ซึ่ง lupinifolin ที่ความเข้มข้น  $250 \mu\text{g/mL}$  เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้  $98.58\%$  โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $56.29 \mu\text{g/mL}$  เมื่อเปรียบเทียบกับ Acarbose ซึ่งเป็น positive control ที่ความเข้มข้น  $1,000 \mu\text{g/mL}$  สามารถยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ได้  $68.18\%$  (Pulbutr *et al.*, 2020)



### 2.6.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาของ Bakasatae และคณะ 2018 ได้ทำการศึกษารทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเนื้อไม้ชะเอมไทย (*Albizia myriophylla*) ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) assay และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay พบว่า สารสกัด dichloromethane fraction มีฤทธิ์ที่ตีที่สุดในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 29.54 µg/mL, การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 40.36 µg/mL และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay เท่ากับ 946.69 mM Fe<sup>2+</sup>/g แต่ฤทธิ์ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบเอทานอล (ethanol extract) และจากการทดสอบฤทธิ์ของสารฟลักซ์เคมีที่แยกได้จากเนื้อไม้ชะเอมไทยพบว่ามีสาร 8-methoxy-7,3',4'-trihydroxyflavone มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตีที่สุด โดยเรียงลำดับฤทธิ์จากมากที่ตีไปน้อยที่ตี ดังนี้คือ 8-methoxy-7,3',4'-trihydroxyflavone มีฤทธิ์ที่ตีดีกว่า indenoic acid และ 3,4,7,3'-tetrahydroxyflavan ตามลำดับ (Bakasatae *et al.*, 2018)

### 2.6.3 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

การศึกษาของ Bakasatae และคณะ 2018 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเนื้อไม้ชะเอมไทย และสารฟลักซ์เคมีที่แยกได้จากเนื้อไม้ชะเอมไทย โดยทำการศึกษาทั้งในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลอง ผลการทดลองพบว่าสารสกัดเอทานอลของเนื้อไม้ชะเอมไทยมีฤทธิ์ยับยั้ง lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide production ในเซลล์ murine macrophage ได้ โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 13.8 µg/mL และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบใน ethyl phenylpropiolate (EPP)-induced ear edema model ในหนูขาวพบว่าสารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 15 %w/v ฤทธิ์สูงที่สุดในการยับยั้งการอักเสบ (81-95%) ในทุกช่วงเวลาติดตามคือ 15, 30, 60 และ 120 นาที ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวใกล้เคียงกับฤทธิ์ของ indomethacin (positive control) ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ear โดยผู้วิจัยได้คาดว่าฤทธิ์ต้านการอักเสบนี้มีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง nitric oxide และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร (Bakasatae *et al.*, 2018)

### 2.6.4 ฤทธิ์ต้านไวรัส Herpes simplex

การศึกษาของ Soonthornchareonnon และคณะ 2004 ได้ทำการศึกษา lupinifolin สาร flavonone ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของลำต้นชะเอม (*Myriopterion extensum*) ในการต้านเชื้อเริ่ม HSV-1 (herpes simplex virus type 1) เปรียบเทียบกับยา acyclovir ซึ่งเป็นยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษาโรคเริ่ม ผลการศึกษาพบว่าสาร lupinifolin สามารถยับยั้ง HSV-1 ได้ โดยมีค่า IC<sub>50</sub>

เท่ากับ 0.1  $\mu\text{g/mL}$  ในขณะที่ acyclovir มีค่า 1.3  $\mu\text{g/mL}$  แสดงให้เห็นถึง สาร lupinifolin มีฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ได้ดีกว่ายามาตรฐาน acyclovir ประมาณ 13 เท่า และในงานวิจัยเดียวกันนี้ได้ทำการศึกษากฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Antimycobacterial) พบว่า lupinifolin มีค่า MIC เท่ากับ 12.5  $\mu\text{g/mL}$  ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลชีพในระดับปานกลาง (Soonthornchareonnon *et al.*, 2004)

การศึกษาของ Wisetsutthichai และคณะ 2005 ได้ทำการศึกษาการพัฒนาเจลจากสารสกัดแอลกอฮอล์ชะเอมเหนือ (*Derris reticulata*) เพื่อใช้เป็นยาต้านไวรัสชนิด HSV-1 ที่ผิวหนัง พบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HSV-1 โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 2.8  $\mu\text{g/mL}$  ในขณะที่ acyclovir ยามาตรฐานในการรักษาเริ่ม มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 2.0  $\mu\text{g/mL}$  (Wisetsutthichai *et al.*, 2005)

## 2.7 การศึกษาทางพิษวิทยา

### 2.7.1 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity study)

จากการศึกษาของ Soonthornchareonnon และคณะ 2004 ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของ lupinifolin ที่สกัดได้จากชะเอม (*Myriopterion extensum*) สามารถทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด human breast cancer โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 3.3  $\mu\text{g/mL}$  และในงานวิจัยเดียวกันนี้ได้ทำการศึกษา ความเป็นพิษของ lupinifolin ต่อเซลล์มะเร็ง ชนิด KB (oral human epidermoid carcinoma) และเซลล์มะเร็งชนิด NCI-H187 (human small cell lung cancer) พบว่า lupinifolin มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 15  $\mu\text{g/mL}$  และ 11.1  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ (Soonthornchareonnon *et al.*, 2004)

จากการศึกษาของ Joycharat และคณะ 2016 ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของ lupinifolin ต่อเซลล์มะเร็ง ผลการศึกษา พบว่าสาร lupinifolin สามารถทำให้เซลล์มะเร็งชนิด human oral epidermoid carcinoma (KB) cells เกิดการตาย คือสาร lupinifolin มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ โดยมีค่า median inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) เท่ากับ 4.95  $\mu\text{g/mL}$  (Joycharat *et al.*, 2016)

จากการศึกษาของ Yusook และคณะ 2017 ได้ทำการศึกษา ความเป็นพิษของสาร lupinifolin ที่สกัดได้จากลำต้นชะเอมเหนือ (*Derris reticulata*) ต่อเซลล์ชนิด HepG2 cells (human hepatoma cell line) ด้วยวิธี MTT assay และ trypan blue assay ผลการศึกษา พบว่าสาร lupinifolin มีค่า  $\text{IC}_{50}$  ในการยับยั้งการเจริญของ HepG2 cells เท่ากับ  $78.3 \pm 5.6$  and  $66.7 \pm 13.3$   $\text{mg/mL}$  ตามลำดับ โดยที่สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในการศึกษาดังกล่าว (MIC เท่ากับ 8  $\text{mg/mL}$  และ MBC เท่ากับ 16  $\text{mg/mL}$ ) ไม่มีความเป็นพิษต่อ HepG2 cells แต่อย่างใด และในงานวิจัยเดียวกันนี้ได้ทำการศึกษา ความเป็นพิษของ

สาร lupinifolin ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย ผลการศึกษาพบว่า lupinifolin ที่ความเข้มข้น  $\leq 40 \mu\text{g/mL}$  ไม่มีผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายแตก เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง แต่สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้นตั้งแต่  $80 \text{ mg/mL}$  ขึ้นไป มีผลทำให้เม็ดเลือดแดงของกระต่ายแตกได้ ตั้งแต่ภายในชั่วโมงแรกของการทดสอบ (Yusook *et al.*, 2017)

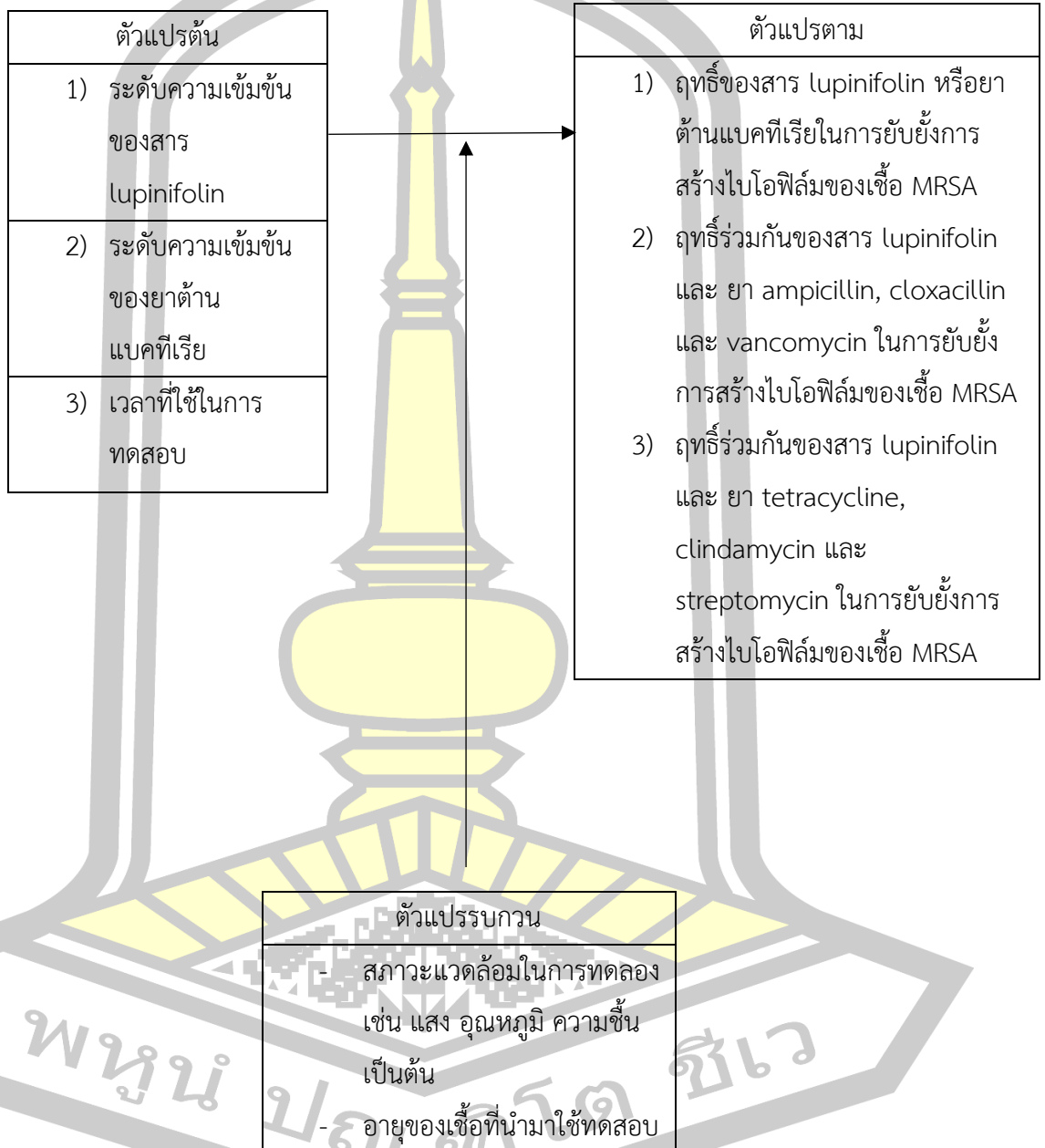
#### 2.7.2 การศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง (Animal toxicity study)

Chivapat และคณะ 2009 ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของสาร lupinifolin จากลำต้น ชะเอมเหนือ (*Derris reticulata Craib*) ในสัตว์ทดลอง ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity study) ในหนูถีบจักร พบว่า ไม่เกิดความเป็นพิษเฉียบพลันขึ้นในสัตว์ทดลองเมื่อป้อนสาร lupinifolin ทางปากแก่หนูถีบจักรในขนาด  $5 \text{ g/kg}$  ในขณะที่ผลจากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน (subacute toxicity study) เป็นระยะเวลา 28 วัน ในหนูขาว พบว่า กลุ่มหนูขาวได้รับสาร lupinifolin ในรูปแบบสารแขวนตะกอนในตัวทำละลายคือ tragacanth 1% โดยการป้อนทางปาก ในขนาดวันละ  $0.6, 6.0, 30$  และ  $60 \text{ mg/kg}$  ต่อวัน (หรือเทียบเท่า  $1, 10, 50$  และ  $100$  เท่าของขนาดที่ใช้ในการรักษาเริ่มในคน) ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน ผลการศึกษาพบว่า สาร lupinifolin ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว สุขภาพโดยรวม และการกินอาหารของหนูขาวแต่อย่างใด แม้จะพบการเปลี่ยนแปลงของระดับเม็ดเลือดขาว ในหนูเพศเมียที่ได้รับสาร lupinifolin ขนาด  $60 \text{ mg/kg}$  ต่อวัน และการเปลี่ยนแปลงของระดับอิลคโตรไลต์ คือโซเดียมและโปแทสเซียมในหนูทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสาร lupinifolin ขนาด  $30$  และ  $60 \text{ mg/kg}$  ต่อวัน แต่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวยังคงอยู่ในช่วงของค่าปกติ และผลจากการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่สัมพันธ์กับขนาดของ lupinifolin ที่ได้รับด้วยเช่นกัน ดังนั้นสาร lupinifolin จึงไม่มีผลทำให้เกิดความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันเมื่อทดสอบที่ขนาดสูงสุดคือ  $60 \text{ mg/kg}$  ต่อวันในการศึกษาดังกล่าว (Chivapat *et al.*, 2009)

พจน ปรณ ทิโต ชีเว

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการศึกษา

#### 3.1 กรอบแนวคิด



### 3.2 รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental study) โดยทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ของเชื้อ MRSA ของสาร lupinifolin ที่สกัดได้จากสมุนไพรชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) ในหลอดทดลอง และ/หรือยาต้านแบคทีเรียกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (ได้แก่ ampicillin, cloxacillin และ vancomycin) และยาต้านแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (ได้แก่ tetracycline, clindamycin และ streptomycin) ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

### 3.3 วัสดุอุปกรณ์

- 1) เชื้อที่นำมาทดสอบ
  - Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) DMST 20645
- 2) สารเคมี
  - สาร lupinifolin ที่สกัดแยกจากลำต้นชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.)
  - อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) media (Bacto™ 211825)
  - Sodium acetate ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (RCI Labscan AR1165-P500G )
  - Glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) (UNIVAR 783-500G)
  - Sodium hydroxide (NaOH) (CARLO ERBA 480507)
  - Crystal violet ( $\text{C}_{25}\text{N}_3\text{H}_{30}\text{Cl}$ ) (Panreac 251762.1606)
  - Distilled water (DW) และ Sterile distilled water
  - 95% Ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) (RCI Labscan AR1069-P2.5L)
  - 37% Formalin ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) (CARLO ERBA 415666)
  - Ammonium oxalate (Qręc A5110-1-0500)
- 3) วัสดุ อุปกรณ์
  - 3.1) ครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์
    - เครื่องชั่งตวงวัด 5 ตำแหน่ง (Sartorius, ME215P)
    - เครื่อง Autoclave (Hirayama)
    - Vortex mixer (Gemmy industrial corp, 9100433)
    - Microplate reader (Spectro star nano BMG Labtech)
    - เครื่อง Hot-air oven (Contherm)

- เครื่อง Water bath (Crest)
- เครื่อง Laminar air flow hood (Hera safe,40446290)
- ตู้บ่มเชื้อ Incubator (Contherm)
- Hot plate and stirrer
- Orbital shaker (Bio san, 010144-1405-0298)

### 3.2) เครื่องแก้ว

- Beaker
- Cylinder
- Test tube
- Glass pipette
- Erlenmeyer flask

### 3.3) อุปกรณ์วิทยาศาสตร์อื่นๆ

- Aluminium foil
- Forceps
- Micropipette ขนาด 100-1000  $\mu\text{L}$  พร้อม tip
- Micropipette ขนาด 10-200  $\mu\text{L}$  พร้อม tip
- Multichannel pipette พร้อม tip
- 96-well microplate
- Test tube rack
- Microfuge tube ขนาด 1.5 mL

### 4) ยาต้านแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

- Ampicillin (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, A8351)
- Cloxacillin (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, C9393)
- Vancomycin (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, V2002)
- Tetracycline (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, T7660)
- Clindamycin (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, C5269)
- Streptomycin (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, S6501)

### 3.4 การเตรียมสาร lupinifolin

สาร lupinifolin ที่สกัดแยกจากลำต้นชะเอมเหนือ ซึ่งใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์ในการจัดเตรียมจาก รศ.ดร.ปวีตรา พูลบุตร และอ.รัฐศาสตร์ เด่นชัย

#### 3.4.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรชะเอมเหนือ

- 1) นำผงสมุนไพรแห้งชะเอมเหนือ ที่ซื้อจากร้านขายยาสมุนไพร จังหวัดกรุงเทพมหานคร มาสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยชั่งผงสมุนไพรชะเอมเหนือ 60 g ต่อปริมาณ hexane 400 mL ใช้เวลา รอบละ 2 ชั่วโมง โดยทำซ้ำ 8 ครั้ง
- 2) กรองแยกผงสมุนไพรออกด้วยกระดาษเบอร์ 1 (Whatman No.1)
- 3) นำสารสกัดที่ได้มาทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator)
- 4) เก็บตัวอย่างสารสกัด hexane ที่ได้ และนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีรังคเลขฝิวบาง (TLC) ต่อไป (ข้อที่ 3.4.3)

#### 3.4.2 การเตรียมสาร lupinifolin

(ดัดแปลงวิธีจาก ทรงพล ชีวะพัฒน์และคณะ,2552; กมล อยู่สุข, 2560)

- 1) นำผงสมุนไพรชะเอมเหนือที่ผ่านการพิสูจน์เอกลักษณ์ มาสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยชั่งผงสมุนไพรชะเอมเหนือ 60 g ต่อปริมาณ hexane 400 mL ใช้เวลา รอบละ 2 ชั่วโมง โดยทำซ้ำทั้งหมด 8 ครั้ง
- 2) นำสารสกัดที่ได้มากรองในขณะร้อน และนำสารสกัดไปให้ความร้อนบนอ่างไอน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 65 ° C จนสารสกัดมีเหลือใส
- 3) นำสารสกัดไปสกัดแยกชั้นด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) และเก็บสารสกัดชั้น hexane ไว้
- 4) นำสารสกัดไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบหมุน (rotary evaporator) จนสารสกัดเริ่มขุ่นมีตะกอนแขวนลอย จึงนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึกที่อุณหภูมิห้อง
- 5) นำสารสกัดมากรองเอาผลึกและล้างผลึกที่ได้ด้วย hexane เก็บผลึกใสในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 0.5 - 1 ชั่วโมงและนำมาหาค่า % yield แล้วนำ

ผลึกเก็บใส่ภาชนะปิดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  และนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยวิธีรังคเลขผิวบางต่อไป (ข้อที่ 3.4.3)

สาร lupinifolin ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ ได้รับการอนุเคราะห์ในการ จัดเตรียม ในเดือนเมษายน พ.ศ.2565 โดยมีค่า % yield เท่ากับ 0.7251% w/w

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักของสาร lupinifolin ที่สกัดได้จากผงแห้งสมุนไพรรชะเอมเหนือ (g)}}{\text{น้ำหนักของผงแห้งสมุนไพรรชะเอมเหนือที่ใช้ในการสกัด (g)}} \times 100$$

### 3.4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัด hexane ของชะเอมเหนือและสาร lupinifolin วิเคราะห์ด้วยวิธีรังคเลขผิวบาง (Thin layer Chromatography, TLC)

- 1) นำสารสกัด hexane ของชะเอมเหนือ (ข้อที่ 3.4.1) หรือ สาร lupinifolin ที่สกัดได้จากลำต้นชะเอมเหนือ (ข้อที่ 3.4.2) และสารมาตรฐาน lupinifolin ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ปวีตรา พูลบุตร (5 mg/mL) ไปหยดบน TLC silica gel 60 GF254 plate ขนาด 10x10 cm ด้วยเครื่อง sample applicator (CAMAG Linomat 5) ในปริมาตร 5.0  $\mu\text{L}$  โดยมีความกว้างแถบละ 0.6 mm
- 2) นำ plate ไปวางในระบวภูมิภาคเคลื่อนที่ hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 6:4
- 3) เมื่อเคลื่อนที่ได้ระยะทาง 8.0 cm จึงนำออกมาตรวจสอบภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 254 และ 366 nm
- 4) ตรวจสอบด้วยน้ำยาฟ่น 10 % sulfuric acid แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ  $110^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที

### 3.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Tryptic Soy Broth (TSB)

- 1) ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB และน้ำกลั่นเข้าด้วยในอัตราส่วน TSB : DW= 30:1,000
- 2) นำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ผสมเข้ากัน บรรจุใส่ Erlenmeyer flask และห่อด้วยถุงพลาสติก
- 3) นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีอายุ 7 วันเมื่อเก็บในตู้เย็น



หมายเหตุ: อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมหากยังไม่ได้ใช้ทันทีหลังการเตรียมให้เก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ 2-8 ° C และใช้ภายใน 7 วัน

### 3.6 การทดสอบฤทธิ์ของ lupinifolin หรือยาด้านแบคทีเรียในการต้านเชื้อแบคทีเรีย MRSA ด้วย microbroth dilution technique

- 1) ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 130  $\mu$ L เข้ากับ lupinifolin ในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ละลายใน 0.1 M NaOH ปริมาตร 20  $\mu$ L หรือยาด้านแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 20  $\mu$ L ลงในหลุมของ 96-well plate จากนั้นทำให้มีความเข้มข้นลดลงแบบสองเท่าลำดับส่วน (two-fold serial dilution)
- 2) เติมเชื้อแบคทีเรีย MRSA ปริมาตร 50  $\mu$ L ที่ทำการปรับปริมาณเชื้อด้วยการวัดค่าความขุ่นให้ได้ค่า OD เริ่มต้นเท่ากับ 0.08-0.1 ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer (ประมาณ  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL) หลังจากนั้นเจือจางเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ  $1.5 \times 10^6$  cfu/mL ลงในหลุมข้อที่ 1 ที่เตรียมไว้โดยมี control ดังนี้
  - sterility control คือ TSB ปริมาตร 180  $\mu$ L (ที่ไม่มีการเติมเชื้อ MRSA) และสาร lupinifolin ที่ละลายใน 0.1 M NaOH หรือยาด้านแบคทีเรียที่ทดสอบ ละลายใน sterile distilled water ปริมาตร 20  $\mu$ L เพื่อทดสอบว่าสาร lupinifolin หรือยาด้านแบคทีเรียที่ทดสอบ มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์หรือไม่
  - vehicle control คือ MRSA (50  $\mu$ L) ที่เลี้ยงใน TSB ปริมาตร 130  $\mu$ L และ 0.1 M NaOH (vehicle ของสาร lupinifolin) หรือ sterile distilled water (vehicle ของยาด้านแบคทีเรียที่ทดสอบ) ปริมาตร 20  $\mu$ L เพื่อทดสอบว่า vehicle มีฤทธิ์ต่อการเจริญของเชื้อหรือไม่
  - growth control คือ MRSA (50  $\mu$ L) ที่เลี้ยงใน TSB ปริมาตร 150  $\mu$ L เพื่อทดสอบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้หรือไม่
- 3) นำไปบ่มที่ตู้เชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดลองโดยหลุม 96-well plate ที่สารละลายใส คือไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย MRSA บันทึกค่าความเข้มข้นของสาร lupinifolin ที่ต่ำที่สุดที่พบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อเป็นค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า (no visible growth)
- 4) ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้ง

- 5) นำความเข้มข้นของ MIC ที่ได้ ไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ เชื้อ MRSA ต่อไป

### 3.7 การทดสอบฤทธิ์ของ lupinifolin หรือยาต้านแบคทีเรียต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ด้วย crystal violet biofilm formation assay

- 1) เติมเชื้อ MRSA ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  ที่ทำการปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยการวัดความขุ่นให้ได้ค่า OD เริ่มต้นเท่ากับ 0.08-0.1 ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer (ประมาณ  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL) หลังจากนั้นเจือจางเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ  $1.5 \times 10^6$  cfu/mL ลงใน 96-well microplate ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (ที่มีน้ำตาลกลูโคส 1% (w/v)) ปริมาตร 130  $\mu\text{L}$  และสาร lupinifolin หรือยาต้านแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นแตกต่างกันจำนวน 7 ความเข้มข้น (ได้แก่  $0.03125 \times \text{MIC}$ ,  $0.0625 \times \text{MIC}$ ,  $0.125 \times \text{MIC}$ ,  $0.25 \times \text{MIC}$ ,  $0.5 \times \text{MIC}$ ,  $\text{MIC}$  และ  $2 \times \text{MIC}$ ) หรือ vehicle (0.1 M NaOH หรือ sterile distilled water) ปริมาตร 20  $\mu\text{L}$  นำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง โดยมี blank และ vehicle control ดังนี้
  - vehicle blank คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติม vehicle ของสารทดสอบ (0.1 M NaOH หรือ sterile distilled water) แต่ไม่มีการเติมเชื้อ MRSA
  - test blank คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติม lupinifolin หรือยาต้านแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แต่ไม่มีการเติมเชื้อ MRSA
  - vehicle control คือ เชื้อ MRSA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และเติม 0.1 M NaOH (vehicle ของสาร lupinifolin) หรือ sterile distilled water (vehicle ของยาต้านแบคทีเรียที่ทดสอบ)
- 2) เทเอา media และเซลล์ที่ไม่เกาะติดกับ microplate ออกและล้างเซลล์ด้วย sterile distilled water ปริมาตร 200  $\mu\text{L}$  จำนวน 2 ครั้ง
- 3) เติม formalin (37%, diluted 1:10) ที่ผสม 2 % sodium acetate ปริมาตร 200  $\mu\text{L}$  ลงใน microplate ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อ fix เซลล์แบคทีเรียที่เกาะจับกันเป็นไบโอฟิล์มใน 96-well microplate
- 4) ย้อมสีด้วย 0.1% crystal violet ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

- 5) ล้างด้วย sterile distilled water 3 ครั้ง ครั้งละ 300  $\mu$ L จากนั้นเติม 95% ethanol ปริมาตร 120  $\mu$ L เพื่อให้สีที่เกาะจับกับแบคทีเรียหลุดออกมา
- 6) นำ 96-well microplate ไปเขย่า 10 นาที เพื่อให้สีหลุดออกจากเซลล์แบคทีเรียให้สมบูรณ์
- 7) ดูดสารละลายปริมาตร 80  $\mu$ L ออกมาใส่ 96-well microplate อันใหม่
- 8) นำ 96-well microplate ไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อวัด ปริมาณของไบโอฟิล์ม
- 9) คำนวณร้อยละของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (% inhibition of biofilm formation) (Caiazza *et al.*, 2007) จากสมการคำนวณ คือ

$$\frac{(\text{OD of vehicle} - \text{OD of vehicle blank}) - (\text{OD of test} - \text{OD of test blank})}{(\text{OD of vehicle} - \text{OD of vehicle blank})}$$

- OD of vehicle คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของ broth ที่มีเชื้อ MRSA และตัวทำละลายของสาร lupinifolin (0.1 M NaOH) หรือตัวทำละลายของยาต้านแบคทีเรียที่ทดสอบ (sterile distilled water) ที่ความยาวคลื่น 600 nm
  - OD of vehicle blank คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของ broth ที่เติม 0.1 M NaOH หรือ sterile distilled water แต่ไม่มีการเติมเชื้อ MRSA ที่ความยาวคลื่น 600 nm
  - OD of test คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของ broth ที่มีเชื้อ MRSA และ lupinifolin หรือยาต้านแบคทีเรียที่ทดสอบ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 600 nm
  - OD of test blank คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของ broth ที่เติม lupinifolin หรือยาต้านแบคทีเรียที่ทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แต่ไม่มีการเติมเชื้อ MRSA ที่ความยาวคลื่น 600 nm
- 10) ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้ง
  - 11) นำค่าร้อยละการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม และความเข้มข้นของสาร lupinifolin หรือยาต้านแบคทีเรียที่ทดสอบ มาวาดกราฟ concentration-inhibitory curve

โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism software version 8.0.2 เพื่อหาค่า median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>)

### 3.8 การทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ด้วย crystal violet biofilm formation assay

- 1) เติมเชื้อ MRSA ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  ที่ทำการปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยการวัดความขุ่นให้ได้ค่า OD เริ่มต้นเท่ากับ 0.08-0.1 ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer (ประมาณ  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL) หลังจากนั้นเจือจางเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ  $1.5 \times 10^6$  cfu/mL ลงใน 96-well microplate ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (ที่มีน้ำตาลกลูโคส 1% (w/v)) ปริมาตร 130  $\mu\text{L}$
- 2) เติมสาร lupinifolin (10  $\mu\text{L}$ ) และยาต้านแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ (10  $\mu\text{L}$ ) โดยใช้ความเข้มข้นของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 0.125xMIC, 0.25xMIC และ 0.5xMIC และใช้ความเข้มข้นของยาต้านแบคทีเรียที่ทดสอบที่แตกต่างกัน (ดังแผนการทดลองที่แสดงในตารางที่ 3.1) หรือ vehicle (0.1 M NaOH (10  $\mu\text{L}$ ) และ sterile distilled water (10  $\mu\text{L}$ ) ปริมาตรรวม 20  $\mu\text{L}$  นำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมในตู้บ่มเชื้อในเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง โดยมี blank และ vehicle control ดังนี้
  - vehicle blank คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติม vehicle ของสารทดสอบ (0.1 M NaOH และ sterile distilled water) แต่ไม่มีการเติมเชื้อ MRSA
  - test blank คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติม lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แต่ไม่มีการเติมเชื้อ MRSA
  - vehicle control คือ เชื้อ MRSA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และเติม 0.1 M NaOH (vehicle ของสาร lupinifolin) และ sterile distilled water (vehicle ของยาต้านแบคทีเรียที่ทดสอบ)
- 3) เทเอา media และเซลล์ที่ไม่เกาะติดกับ microplate ออก
- 4) เติม formalin (37%, diluted 1:10) ที่ผสม 2% sodium acetate ปริมาตร 200  $\mu\text{L}$  ลงใน microplate ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที เพื่อ fix เซลล์แบคทีเรียที่เกาะจับกันเป็นไบโอฟิล์มใน 96-well microplate

- 5) ย้อมสีด้วย 0.1% crystal violet ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 6) ล้างด้วย sterile distilled water 3 ครั้ง ครั้งละ 300  $\mu\text{L}$  จากนั้นเติม 95% ethanol ปริมาตร 120  $\mu\text{L}$  เพื่อให้สีที่เกาะจับกับแบคทีเรียหลุดออกมา
- 7) นำ 96-well microplate ไปเขย่า 10 นาที เพื่อให้สีหลุดออกจากเซลล์แบคทีเรียให้สมบูรณ์
- 8) ดูดสารละลายปริมาตร 80  $\mu\text{L}$  ออกมาใส่ 96-well microplate อันใหม่
- 9) นำ 96-well microplate ไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อวัดปริมาณของไบโอฟิล์ม
- 10) คำนวณร้อยละของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (% inhibition of biofilm formation) (Caiazza *et al.*, 2007) จากสมการคำนวณ คือ
 
$$\frac{(\text{OD of vehicle} - \text{OD of vehicle blank}) - (\text{OD of test} - \text{OD of test blank})}{(\text{OD of vehicle} - \text{OD of vehicle blank})}$$

OD of vehicle คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของ broth ที่มีเชื้อ MRSA และตัวทำละลายของสารทดสอบ (0.1 M NaOH และ sterile distilled water) ที่ความยาวคลื่น 600 nm

  - OD of vehicle blank คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของ broth ที่เติม ตัวทำละลายของสารทดสอบ (0.1 M NaOH และ sterile distilled water) แต่ไม่มีการเติมเชื้อ MRSA ที่ความยาวคลื่น 600 nm
  - OD of test คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของ broth ที่มีเชื้อ MRSA และสารทดสอบ (lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 600 nm
  - OD of test blank คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของ broth ที่เติมสารทดสอบ (lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แต่ไม่มีการเติมเชื้อ MRSA ที่ความยาวคลื่น 600 nm
- 10) ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้ง

### 3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย คือค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) รายงานด้วยค่ามัธยฐาน (median)

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม รายงานดังนี้

1. ค่า median inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) ของสารทดสอบ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม รายงานด้วยค่า mean  $\pm$  standard deviation (SD) ซึ่งค่า  $IC_{50}$  เป็นค่าที่ได้จากการวาดกราฟ concentration inhibitory curve โดยตรง
2. ร้อยละของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (% inhibition of biofilm formation) ของเชื้อ MRSA รายงานด้วยค่า mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) เนื่องจากร้อยละของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ที่ได้จากการทดลองแต่ละครั้งเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ของการทดสอบซ้ำจาก 2 หลุมของ 96-well plate

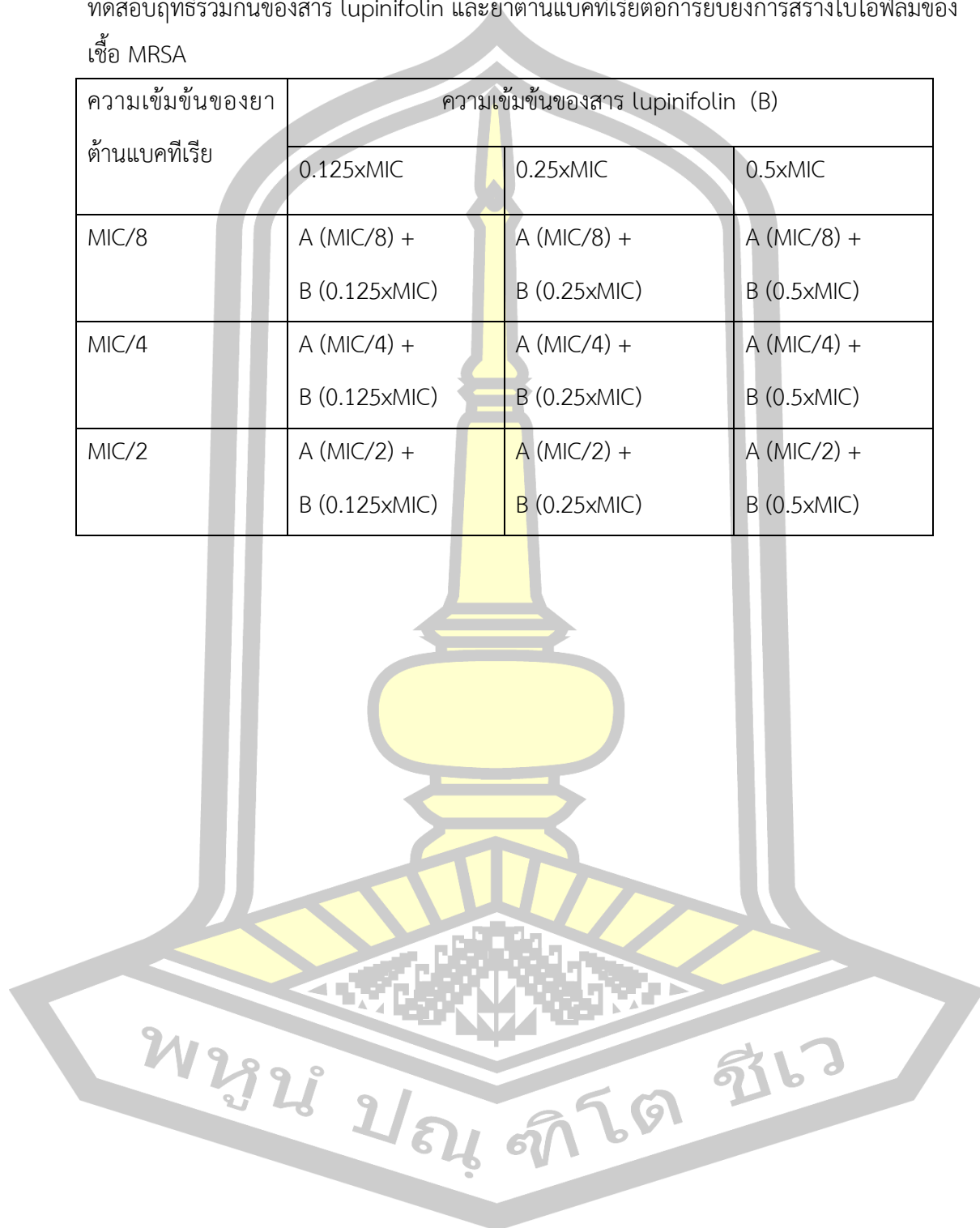
5.4 ทดสอบการกระจายตัวของข้อมูล % inhibition of biofilm formation ด้วยสถิติ Kolmogorov–Smirnov test (K–S test)

6.4 เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มทดลองโดยใช้สถิติ

ในการวิเคราะห์ข้อมูลคือ Two-way analysis of variance (two-way ANOVA) และ Pairwise comparison of two-way ANOVA เมื่อ  $p$ -value มีค่า  $< 0.01$  แสดงว่าข้อมูลระหว่างกลุ่มที่เปรียบเทียบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป Statistics Package for Social Sciences (SPSS) version 16.0

ตารางที่ 5 แผนการทดลองที่แสดงความเข้มข้นของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

ความเข้มข้นของยา ต้านแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของสาร lupinifolin (B)		
	0.125xMIC	0.25xMIC	0.5xMIC
MIC/8	A (MIC/8) + B (0.125xMIC)	A (MIC/8) + B (0.25xMIC)	A (MIC/8) + B (0.5xMIC)
MIC/4	A (MIC/4) + B (0.125xMIC)	A (MIC/4) + B (0.25xMIC)	A (MIC/4) + B (0.5xMIC)
MIC/2	A (MIC/2) + B (0.125xMIC)	A (MIC/2) + B (0.25xMIC)	A (MIC/2) + B (0.5xMIC)



## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 4.1 ผลการเตรียมสาร lupinifolin

สาร lupinifolin ที่สกัดแยกจากลำต้นชะเอมเหนือซึ่งใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้รับการอนุเคราะห์ในการจัดเตรียมจาก อ.รัฐศาสตร์ เต็มชัย และ รศ.ดร.ปวีตรา พูลบุตร สกัดในเดือนเมษายน พ.ศ. 2565 สารสกัดที่ได้มีลักษณะผลึกสีเหลือง โดยมีค่า % yield เท่ากับ 0.7251 w/w

#### 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA ของสาร lupinifolin ยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม protein synthesis inhibitors และยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม cell wall synthesis inhibitors

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย MRSA ของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียได้แก่ 1) ยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม cell wall synthesis inhibitors (ampicillin, cloxacillin และ vancomycin) และ 2) ยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม protein synthesis inhibitors (tetracycline, streptomycin และ clindamycin) แสดงด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรีย

Test agents	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	n
Lupinifolin	16	19
Tetracycline	32	7
Streptomycin	>64	6
Clindamycin	>16	7
Ampicillin	64	6
Cloxacillin	>128	8
Vancomycin	4	6

หมายเหตุ: ค่า MIC แสดงด้วยค่ามัธยฐาน (median)

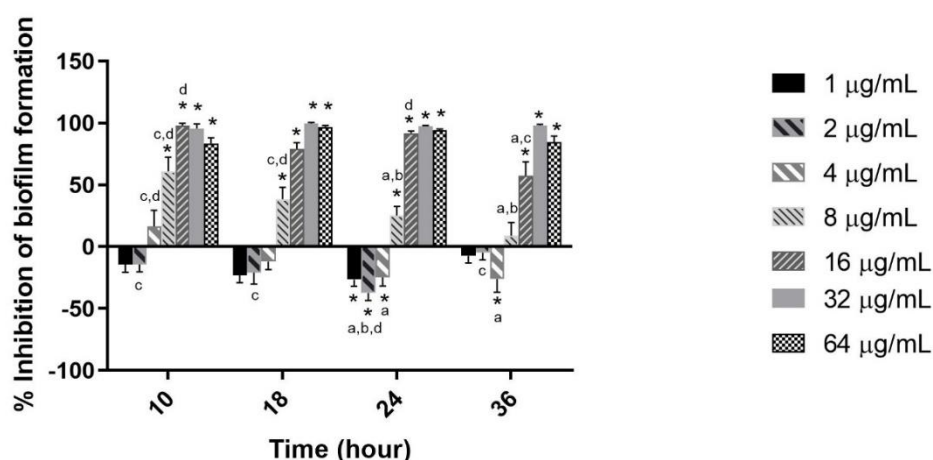


#### 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสาร lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

สาร lupinifolin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แบบ concentration-dependent inhibition ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) โดยมีค่า  $IC_{50}$  ของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มดังแสดงในตารางที่ 4.2 ค่า  $IC_{50}$  ของสาร lupinifolin มีค่าต่ำที่สุดที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $6.73 \pm 3.47 \mu\text{g/mL}$  (n=12)

ตารางที่ 7 ค่า mean inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) ของสาร lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ

Incubation time (hours)	$IC_{50}$ (mean $\pm$ SD)	n
10	$6.73 \pm 3.47$	12
18	$11.33 \pm 4.31$	14
24	$14.73 \pm 4.67$	19
36	$18.95 \pm 6.22$	14



ภาพประกอบที่ 8 ผลของสาร lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA  
<sup>\*</sup>p<0.01 vs. vehicle control at the same incubation time; <sup>a</sup>p<0.01 vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup>p<0.01 vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup>p<0.01 vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup>p<0.01 vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA, n=11-21)

สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 16, 32 และ 64  $\mu\text{g/mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36

ชั่วโมง) สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 32 และ 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $99.42 \pm 1.03$  และ  $96.68 \pm 1.28\%$  ตามลำดับ ( $p < 0.01$ ,  $n=14$ ) ทั้งนี้ฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 32 และ 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ

สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $97.84 \pm 1.74\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=12$ ) ทั้งนี้ฤทธิ์ของสาร lupinifolin (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ที่เวลา 10 และ 24 ชั่วโมงของการทดสอบ มีความแตกต่างจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ที่เวลา 36 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 10, 18 และ 24 ชั่วโมงเท่านั้น ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $60.83 \pm 11.50\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=14$ ) ฤทธิ์ของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมง มีความแตกต่างจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เฉพาะที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-24.79 \pm 6.99\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=19$ ) และ  $-26.14 \pm 10.57\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=14$ ) โดยที่ฤทธิ์ของ lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบมีความแตกต่างจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลา 10 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ทั้งนี้ lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ไม่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมงของการทดสอบแต่อย่างใด

สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 1 และ 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เฉพาะที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบเท่านั้น โดยมีค่า % inhibition เท่ากับ  $-26.58 \pm 5.43$  และ  $-37.43 \pm 6.11\%$  ตามลำดับ ( $p < 0.01$ ,  $n=19$ ) ทั้งนี้ฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ณ เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบมีความแตกต่างจากที่เวลา 10, 18 และ 36 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ในขณะที่ฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อทำการทดสอบทางสถิติ

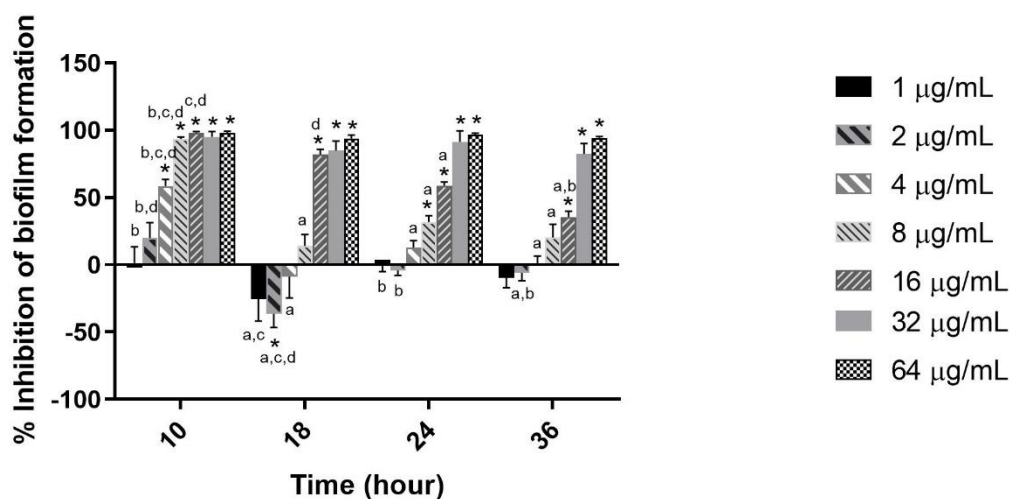
#### 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ของยากลุ่ม protein synthesis inhibitors ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

##### 4.4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

ยา tetracycline มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แบบ concentration-dependent inhibition ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) โดยมีค่า median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) ของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มดังแสดงในตารางที่ 8 ค่า IC<sub>50</sub> ของยา tetracycline มีค่าต่ำที่สุดที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ  $3.34 \pm 1.53$  µg/mL (n=6)

ตารางที่ 8 ค่า mean inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) ของยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ

Incubation time (hours)	IC <sub>50</sub> (mean ± SD)	n
10	3.34 ± 1.53	6
18	17.21 ± 7.63	6
24	13.42 ± 5.90	7
36	20.75 ± 6.44	6



ภาพประกอบที่ 9 ผลของยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n=6-7$ )

ผลการทดสอบฤทธิ์ของยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แสดงดังภาพประกอบที่ 9

ยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 16, 32 และ 64  $\mu\text{g/mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) ( $p < 0.01$ ) ยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 64  $\mu\text{g/mL}$  ทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มสูงสุด ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $98.07 \pm 1.26\%$  ( $n=6$ ) ยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 32 และ 64  $\mu\text{g/mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบที่ไม่แตกต่างกันเมื่อทำการทดสอบทางสถิติ อย่างไรก็ตามฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 16  $\mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบมีค่าที่สูงกว่าฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของยา tetracycline ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

ยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g/mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะที่เวลา 10 และ 24 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $93.37 \pm 1.59$  และ  $31.85 \pm 4.81\%$  ตามลำดับ ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบมีค่าแตกต่างจากฤทธิ์ของยา tetracycline ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (18, 24 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

ยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g/mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบเท่านั้น โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $58.48 \pm 4.97\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบมีค่าแตกต่างจากฤทธิ์ของ

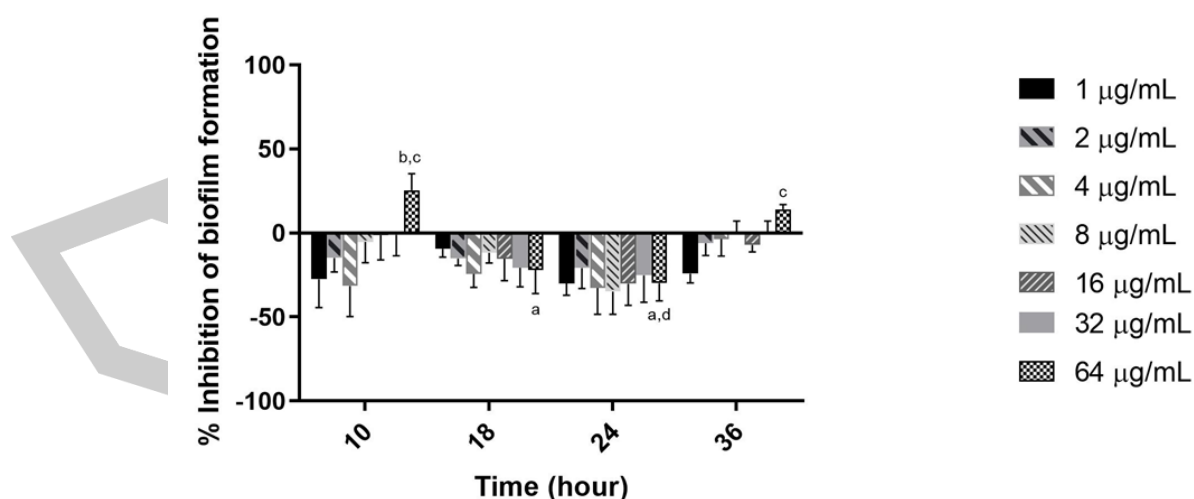
ยา tetracycline ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (18, 24 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

ยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะที่เวลา 18 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-36.43 \pm 10.08\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) ค่านี้มีความแตกต่างจากฤทธิ์ของยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่เวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (18, 24 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

ยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ไม่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA เมื่อทำการทดสอบทางสถิติ อย่างไรก็ตามที่เวลา 18 ชั่วโมงของการทดสอบ ยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีแนวโน้มในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้ และมีฤทธิ์ที่แตกต่างไปจากยา tetracycline ที่ความเข้มข้นนี้ ที่เวลา 10 และ 24 ชั่วโมงของการทดสอบ

#### 4.4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

ผลการทดสอบฤทธิ์ของยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แสดงดังภาพประกอบที่ 10



ภาพประกอบที่ 10 ผลของยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n=6-7$ )

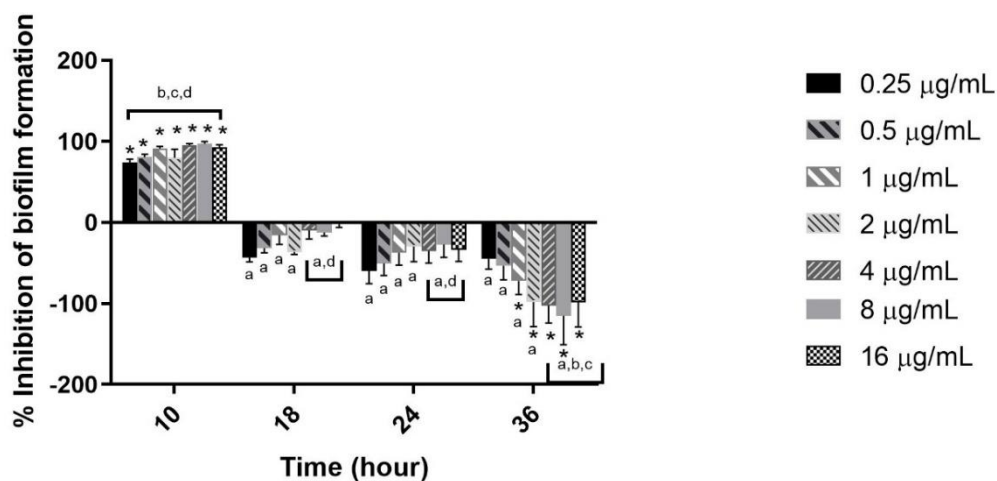
ยา streptomycin ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (1, 2, 4, 8, 16, 32 และ 64  $\mu\text{g/mL}$ ) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA เมื่อทำการทดสอบทางสถิติ ยา streptomycin ที่ความเข้มข้น 64  $\mu\text{g/mL}$  เฉพาะที่เวลา 10 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบเท่านั้น มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้เล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $25.50 \pm 9.71\%$  ( $n=6$ ) อย่างไรก็ตามยา streptomycin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ณ ช่วงเวลา 18 และ 24 ชั่วโมงของการทดสอบมีแนวโน้มในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ยา streptomycin ที่ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8, 16 และ 32  $\mu\text{g/mL}$  ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) มีแนวโน้มในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่ายา streptomycin ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g/mL}$  ณ เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบ มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้สูงสุด โดยมี % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-34.97 \pm 14.92\%$  ( $n=7$ )

#### 4.4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของยา clindamycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

ผลการทดสอบฤทธิ์ของยา clindamycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แสดงดังภาพประกอบที่ 11

พหุ ประถมศึกษา



ภาพประกอบที่ 11 ผลของยา clindamycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA  
 $*p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time;  $^ap < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested;  $^bp < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested;  $^cp < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested;  $^dp < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n=5-8$ )

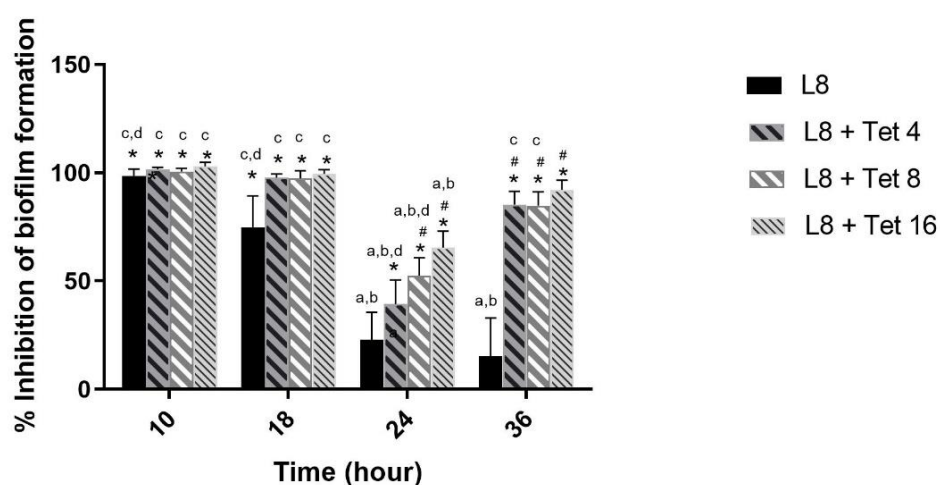
ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ ยา clindamycin ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 และ 16 µg/mL) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ยา clindamycin ที่ความเข้มข้น 8 µg/mL มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้สูงสุด โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $97.08 \pm 2.62$  % ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ )

ในขณะที่ ณ เวลาอื่นของการทดสอบ คือ 18, 24 และ 36 ชั่วโมง ยา clindamycin กลับมีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ โดยเฉพาะที่เวลา 36 ชั่วโมงพบว่ายา clindamycin ที่ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 µg/mL มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยา clindamycin ที่ความเข้มข้น 8 µg/mL มีฤทธิ์สูงสุดในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์ม โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-115.17 \pm 35.55$  % ( $p < 0.01$ ,  $n=8$ )

#### 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยากลุ่ม protein synthesis inhibitors ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

##### 4.5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

1) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 12 ผลของการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n = 6-9$ )

การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา tetracycline ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC คือ 4, 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ภาพประกอบที่ 12) ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบจากการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline (16



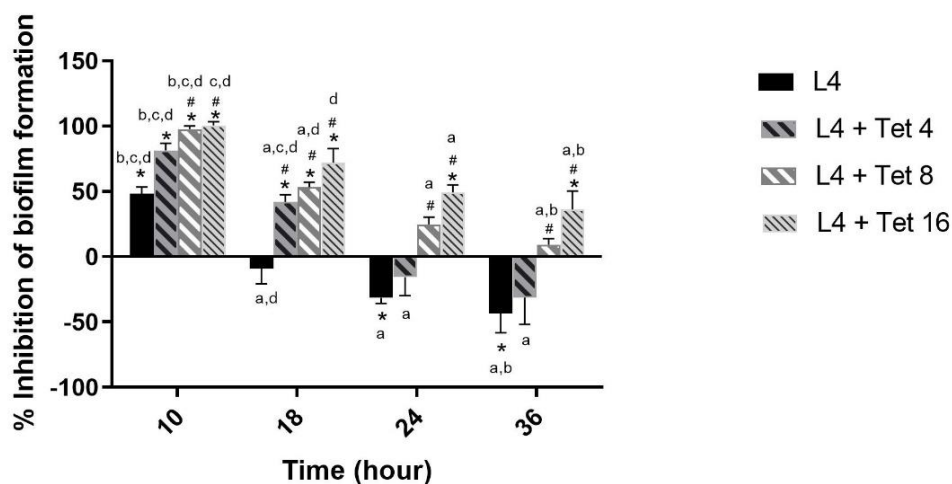
$\mu\text{g/mL}$ ) ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $102.97 \pm 1.78\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ )

ที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมงของการทดสอบ การให้สาร lupinifolin ( $8 \mu\text{g/mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ในทุกความเข้มข้นที่ในการทดสอบ ให้ผลไม่แตกต่างจากการให้สาร lupinifolin ( $8 \mu\text{g/mL}$ ) เพียงอย่างเดียว เมื่อทำการทดสอบทางสถิติ ในขณะที่การให้สาร lupinifolin ( $8 \mu\text{g/mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 8 และ  $16 \mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบ มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่มากกว่าการได้รับสาร lupinifolin ( $8 \mu\text{g/mL}$ ) เพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) นอกจากนี้ที่เวลา 36 ชั่วโมงพบว่า การให้สาร lupinifolin ( $8 \mu\text{g/mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทดสอบคือ  $4 \mu\text{g/mL}$  ยังทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่มากกว่าการได้รับสาร lupinifolin ( $8 \mu\text{g/mL}$ ) เพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ด้วยเช่นกัน ทั้งนี้ฤทธิ์ของสาร lupinifolin ความเข้มข้น  $8 \mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบ มีค่าที่ต่ำกว่าฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้นนี้ที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin ( $8 \mu\text{g/mL}$ ) และยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 4 และ  $8 \mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบ มีฤทธิ์ที่แตกต่างจากฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา tetracycline ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลา 10, 18 และ 36 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ขณะที่ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin ( $8 \mu\text{g/mL}$ ) และยา tetracycline ที่ความเข้มข้น  $16 \mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบ มีฤทธิ์ที่แตกต่างจากฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา tetracycline ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลา 10 และ 18 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) เช่นกัน

พหุ ประถมศึกษา

2) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 13 ผลของการให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n = 6-9$ )

การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา tetracycline ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (4, 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ เวลา 10 และ 18 ชั่วโมงของการทดสอบ ( $p < 0.01$ ) ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบเมื่อให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $100.55 \pm 2.95\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ) (ภาพประกอบที่ 4.6) ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของการให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ ยังมีค่าที่สูงกว่าฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) อีกด้วย

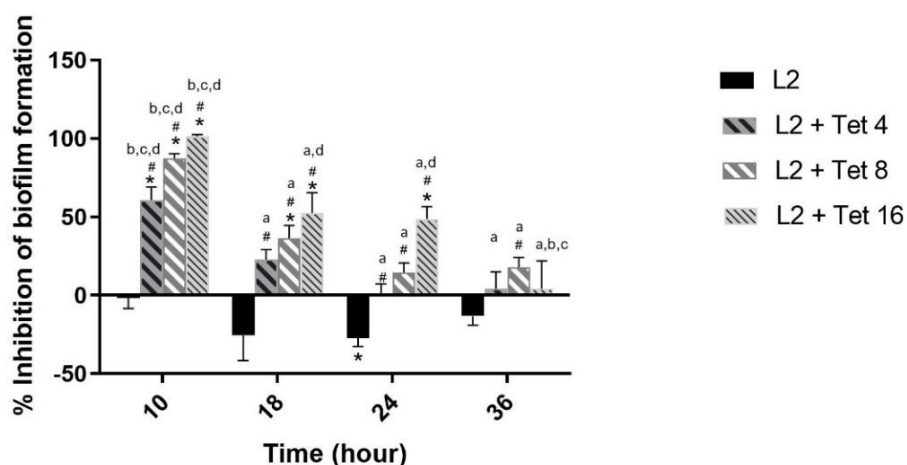
สำหรับที่เวลา 18 ชั่วโมงของการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของการให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 4, 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ก็มีค่าที่สูงกว่าฤทธิ์ของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยเช่นกัน ( $p < 0.01$ ) อย่างไรก็ตามเมื่อให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียวที่เวลา 18 ชั่วโมงพบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่เวลา 18 ชั่วโมงของการทดสอบแต่อย่างใด

ที่ในเวลา 24 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบพบว่ามีเพียงการให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ในขนาดสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) อีกทั้งยังมีฤทธิ์ที่แตกต่างจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย ( $p < 0.01$ ) ทั้งนี้ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบ สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-31.59 \pm 4.16 \%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=10$ ) และ  $-43.48 \pm 14.84 \%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=8$ ) ตามลำดับ

ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา tetracycline ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (4, 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบ มีฤทธิ์ที่แตกต่างไปจากฤทธิ์ของการให้สารร่วมกันที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) นอกจากนี้ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่เวลา 36 ชั่วโมงของการทดสอบ มีฤทธิ์ที่แตกต่างไปจากฤทธิ์ของการให้สารร่วมกันที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลา 18 ชั่วโมงของการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ( $p < 0.01$ )

พจนัน ปณฺ ทิโต ชีเว

- 3) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 14 ผลของการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n = 6-10$ )

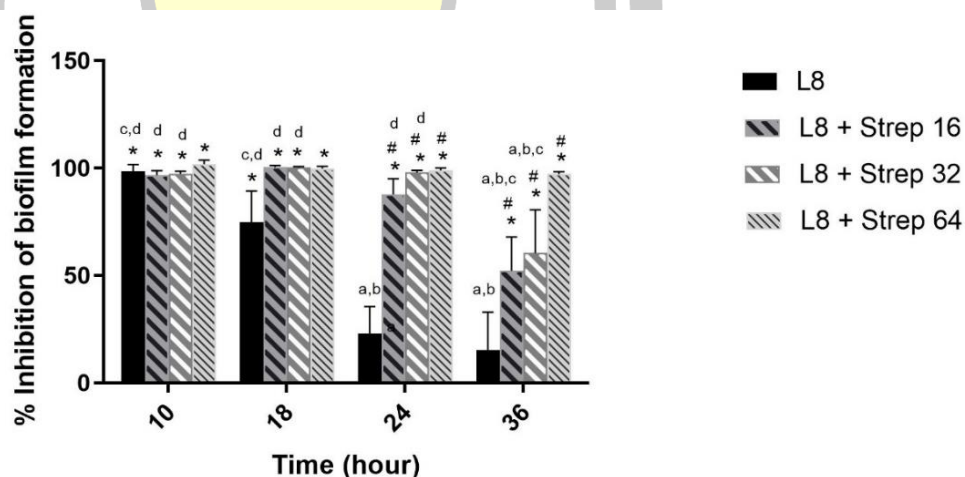
การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา tetracycline ทุกความเข้มข้นที่ใช้การทดสอบ (4, 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบเมื่อให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $101.24 \pm 1.24$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ) (ภาพประกอบที่ 14) ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline (4, 8, 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ยังมีฤทธิ์ที่แตกต่างไปจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงอย่างเดียวที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ( $p < 0.01$ ) อย่างไรก็ตามสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในทุกช่วงเวลาของการทดสอบแต่อย่างใด อีกทั้งที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบ การให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงอย่างเดียว ยังมีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ( $p < 0.01$ )

ที่เวลา 18 และ 24 ชั่วโมงของการทดสอบ การให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน อีกทั้งฤทธิ์ยังแตกต่างจากฤทธิ์ของการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) อย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย ( $p < 0.01$ ) ที่เวลา 18 ชั่วโมงพบว่าการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีความแตกต่างจากการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เช่นกัน ( $p < 0.01$ ) การให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline (4, 8, 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ที่เวลา 36 ชั่วโมงของการทดสอบไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มแต่อย่างใด

ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา tetracycline (4, 8, 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่เวลา 10 ชั่วโมงมีค่าที่แตกต่างจากฤทธิ์ของการให้สารร่วมกันที่เวลาอื่นๆ ของการทดสอบ (18, 24 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

#### 4.5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

- 1) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 15 ผลของการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time =

24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n = 6-10$ )

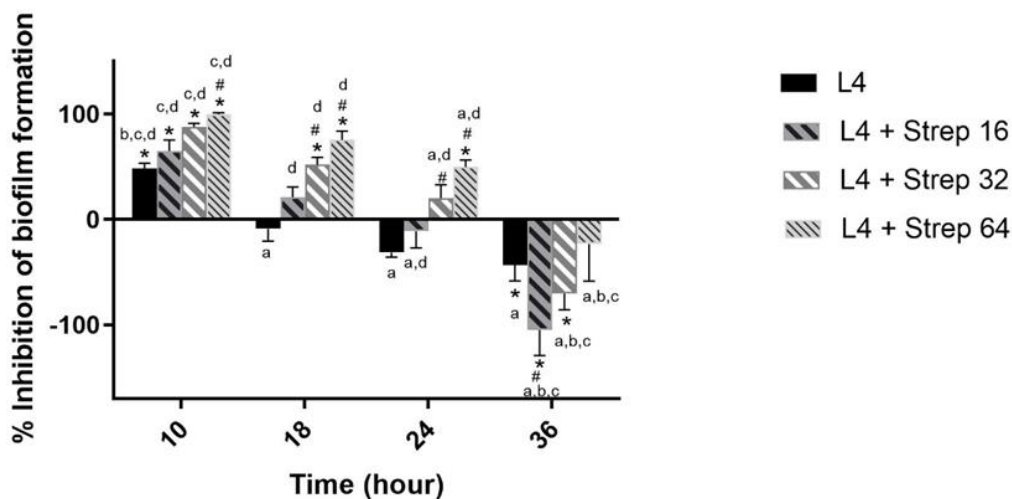
การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g/mL}$  ร่วมกับยา streptomycin ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (16, 32 และ 64  $\mu\text{g/mL}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบเมื่อให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) ร่วมกับยา tetracycline ที่ความเข้มข้น 64  $\mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 10 ชั่วโมง โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $101.85 \pm 1.85\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ) ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) และยา tetracycline (64  $\mu\text{g/mL}$ ) นี้ไม่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ ภาพประกอบที่ 15

ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) เมื่อให้ร่วมกับยา tetracycline ทุกความเข้มข้น (16, 32 และ 64  $\mu\text{g/mL}$ ) ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบ มีฤทธิ์ที่แตกต่างจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ทั้งนี้ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบพบว่าสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้แต่ไม่มีนัยสำคัญเมื่อทำการทดสอบทางสถิติ ในขณะที่ในเวลา 10 และ 18 ชั่วโมงพบว่าสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) และยา streptomycin ที่ความเข้มข้น 16 และ 32  $\mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 36 ชั่วโมงของการทดสอบมีความแตกต่างจากฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา streptomycin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลา 10, 18 และ 24 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

พหุ ประถมศึกษา

- 2) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 16 ผลของการให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

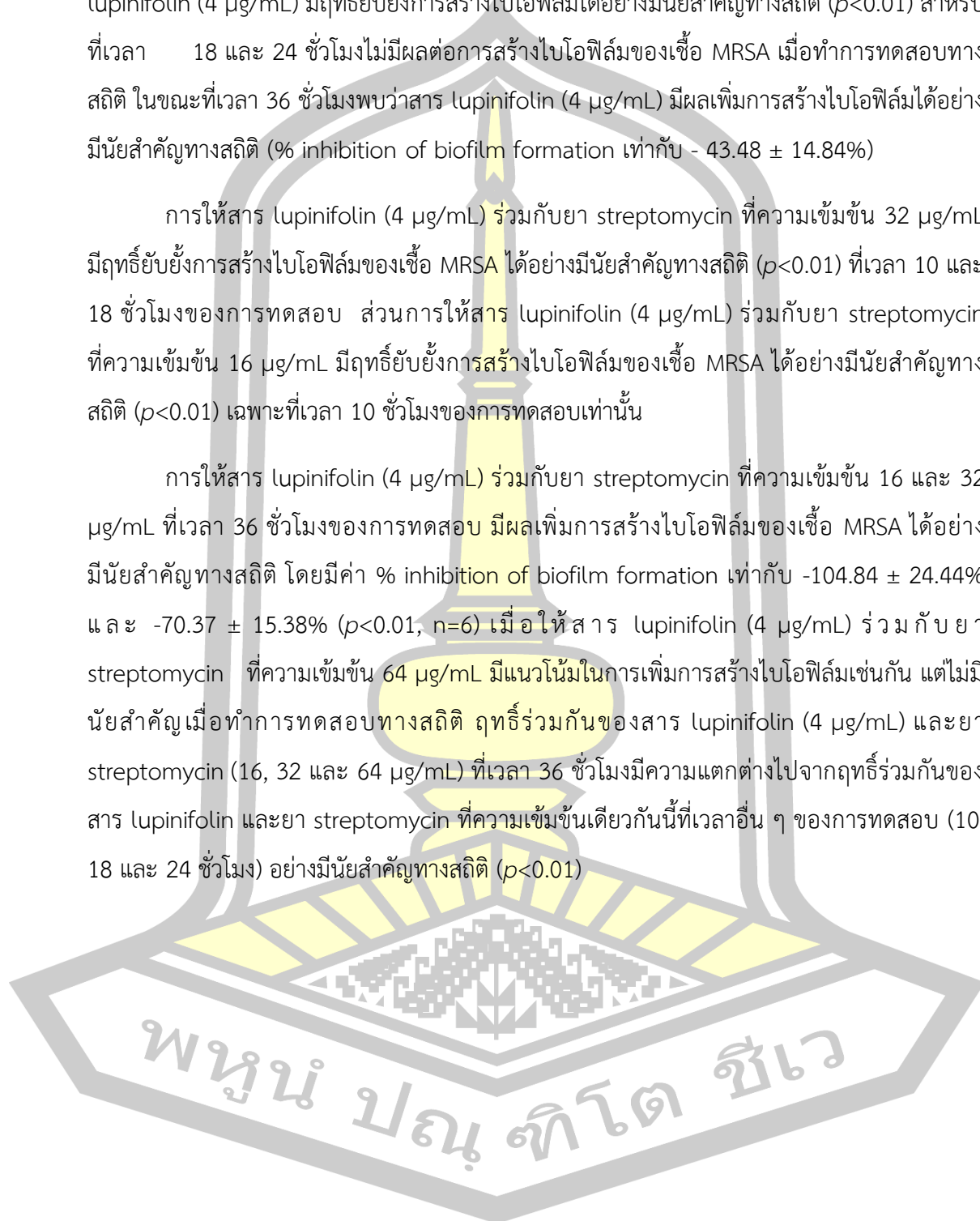
\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n=6-10$ )

การให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา streptomycin ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ (64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ที่เวลา 10, 18 และ 24 ชั่วโมงของการทดสอบ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบเมื่อให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา streptomycin ที่ความเข้มข้น 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $99.50 \pm 1.69\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) (ภาพประกอบที่ 16) อีกทั้งฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา streptomycin (64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ยังมีฤทธิ์ที่แตกต่างจากการให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียว ณ ช่วงเวลาเดียวกันของการ

ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย ( $p < 0.01$ ) ทั้งนี้มีเพียงที่เวลา 10 ชั่วโมงเท่านั้นที่การให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) สำหรับที่เวลา 18 และ 24 ชั่วโมงไม่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA เมื่อทำการทดสอบทางสถิติ ในขณะที่เวลา 36 ชั่วโมงพบว่าสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีผลเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (% inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-43.48 \pm 14.84\%$ )

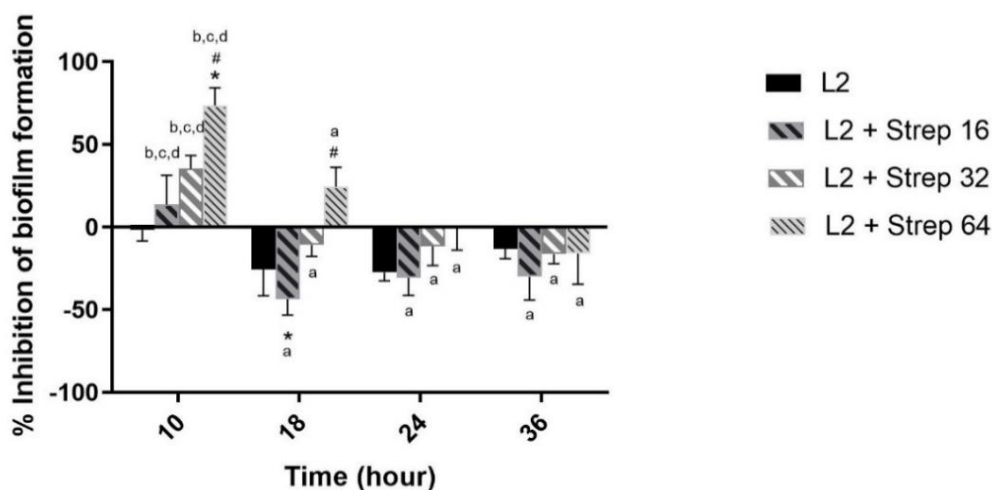
การให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา streptomycin ที่ความเข้มข้น 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมงของการทดสอบ ส่วนการให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา streptomycin ที่ความเข้มข้น 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) เฉพาะที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบเท่านั้น

การให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา streptomycin ที่ความเข้มข้น 16 และ 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่เวลา 36 ชั่วโมงของการทดสอบ มีผลเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-104.84 \pm 24.44\%$  และ  $-70.37 \pm 15.38\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) เมื่อให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา streptomycin ที่ความเข้มข้น 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีแนวโน้มในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มเช่นกัน แต่ไม่มีนัยสำคัญเมื่อทำการทดสอบทางสถิติ ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา streptomycin (16, 32 และ 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ที่เวลา 36 ชั่วโมงมีความแตกต่างไปจากฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา streptomycin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (10, 18 และ 24 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )





- 3) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 17 ผลของการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา streptomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n = 6-10$ )

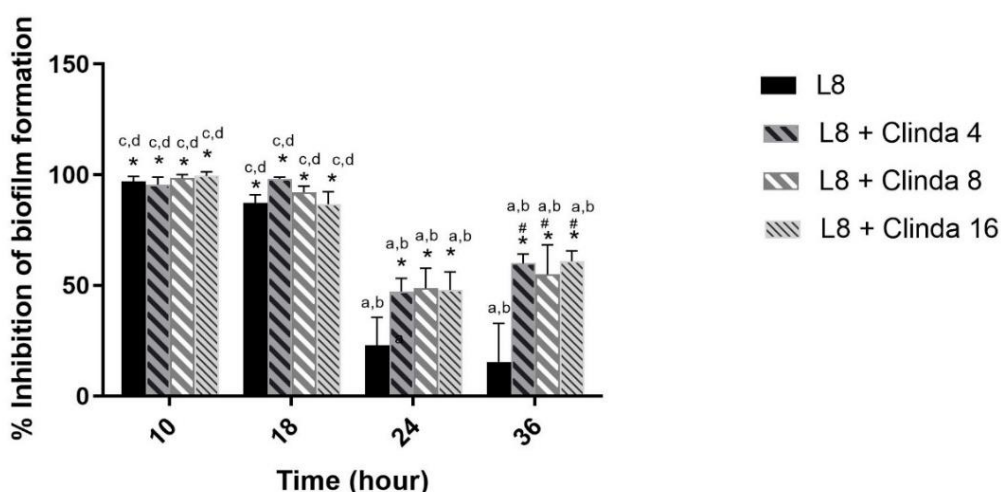
ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา streptomycin ที่ความเข้มข้น 16, 32 และ 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  พบว่ามีเพียงการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา streptomycin ที่ความเข้มข้น 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $73.50 \pm 10.75\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ) ซึ่งค่านี้มีความแตกต่างจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ( $p < 0.01$ ) (ภาพประกอบที่ 17)

ส่วนการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา streptomycin ณ เวลาอื่น ๆ ของการทดสอบพบว่าไม่มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แต่อย่างใด อีกทั้งการให้สารร่วมกันยังมีแนวโน้มในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อีกด้วย โดยเฉพาะการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา streptomycin ความเข้มข้น 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่เวลา 18 ชั่วโมงมีผลเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-43.53 \pm 9.78\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ )

ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา streptomycin (16, 32 และ 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ที่เวลา 10 ชั่วโมง มีความแตกต่างไปจากฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา streptomycin ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ณ เวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (18, 24 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

#### 4.5.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา clindamycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

- 1) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา clindamycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 18 ผลของการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา clindamycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration

tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n=6-10$ )

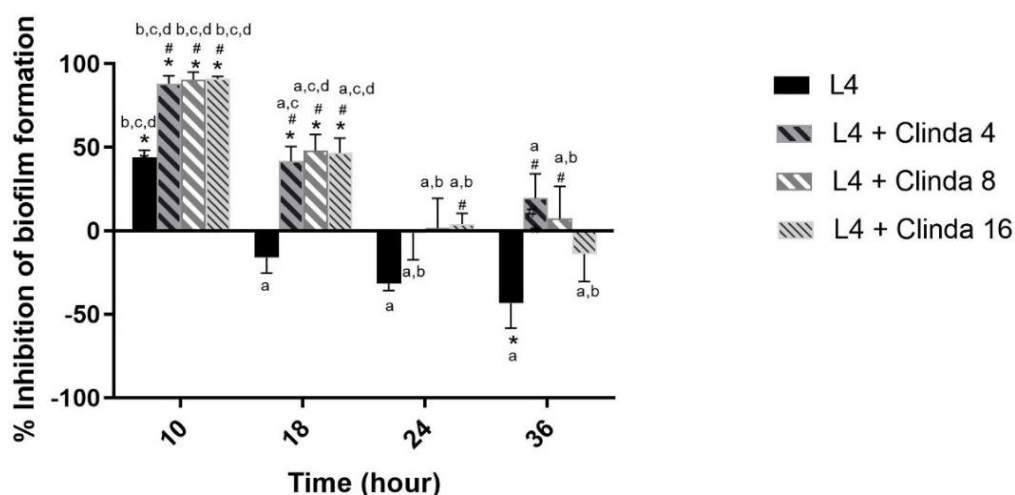
การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา clindamycin ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (4, 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบจากการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา clindamycin ที่ความเข้มข้น 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่เวลา 10 ชั่วโมง โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $99.40 \pm 1.91\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) ( ภาพประกอบที่ 18 )

อย่างไรก็ตามมีเพียงการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา clindamycin (4, 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ที่เวลา 36 ชั่วโมงของการทดสอบเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างไปจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้การให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียวมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เฉพาะที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมงเท่านั้น ในขณะที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง การให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียว มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้เล็กน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญเมื่อทำการทดสอบทางสถิติ

ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา clindamycin (4, 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมง มีความแตกต่างไปจากฤทธิ์ร่วมกันของสารที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ณ เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

พหุ ประถมศึกษา

- 2) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา clindamycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 19 ผลของการให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา clindamycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n = 6-10$ )

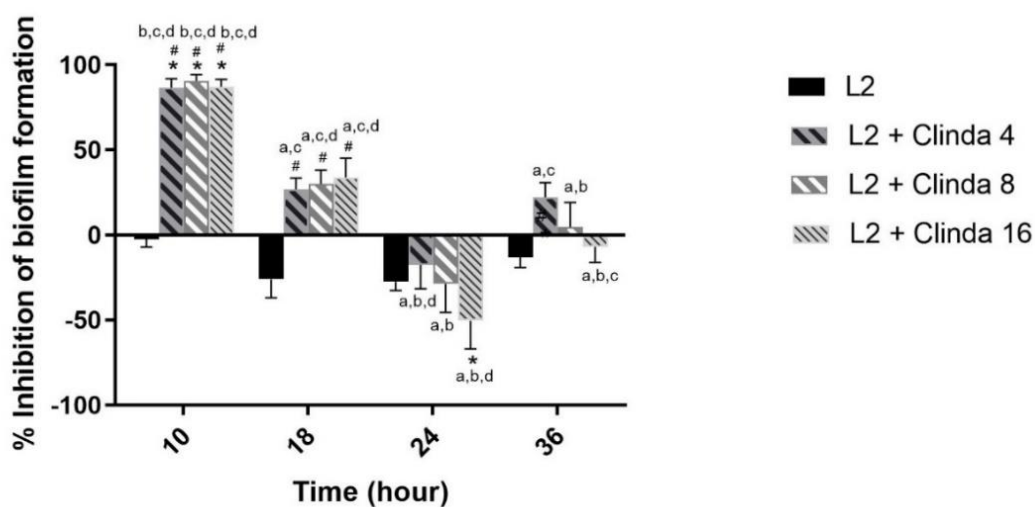
เมื่อให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา clindamycin ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (4, 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมงของการทดสอบ ( $p < 0.01$ ) ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบเมื่อให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา clindamycin ที่ความเข้มข้น 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ณ เวลา 10 ชั่วโมง โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $90.92 \pm 1.48\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ) (ภาพประกอบที่ 19)

ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา clindamycin ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (4, 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมงของการทดสอบ ยังมีฤทธิ์ที่แตกต่างจาก

ฤทธิ์ของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เมื่อให้เพียงชนิดเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ( $p < 0.01$ ) ทั้งนี้การให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียวมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ที่เวลา 10 ชั่วโมงเท่านั้น ส่วนที่เวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (18, 24 และ 36 ชั่วโมง) พบว่าการให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียวมีแนวโน้มในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้ โดยเฉพาะที่เวลา 36 ชั่วโมงพบว่าสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีผลเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-43.48 \pm 18.84\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 8$ )

ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา clindamycin (4, 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ที่เวลา 10 ชั่วโมง มีความแตกต่างจากฤทธิ์ร่วมกันของสารที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ณ เวลาอื่น ๆ ที่ทดสอบทั้งหมด (18, 24 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

- 3) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา clindamycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 20 ผลของการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา clindamycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested;

<sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n=5-10$ )

การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 2  $\mu\text{g/mL}$  ร่วมกับยา clindamycin ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (4, 8 และ 16  $\mu\text{g/mL}$ ) เฉพาะที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ภาพประกอบที่ 20) ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบจากการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) ร่วมกับยา clindamycin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $90.43 \pm 3.90\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ ) ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (2  $\mu\text{g/mL}$ ) และยา clindamycin (4, 8 และ 16  $\mu\text{g/mL}$ ) ที่เวลา 10 ชั่วโมงนี้ ยังมีความแตกต่างไปจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin (2  $\mu\text{g/mL}$ ) เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ( $p < 0.01$ ) ทั้งนี้การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 2  $\mu\text{g/mL}$  เพียงชนิดเดียว ไม่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มเมื่อทำการทดสอบทางสถิติ

การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 2  $\mu\text{g/mL}$  ร่วมกับยา clindamycin ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (4, 8 และ 16  $\mu\text{g/mL}$ ) ที่เวลา 18 ชั่วโมงของการทดสอบ มีแนวโน้มในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ แต่ไม่มีนัยสำคัญเมื่อทำการทดสอบทางสถิติ การให้สารร่วมกันนี้ทำให้เกิดฤทธิ์ต่อการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างไปจากการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g/mL}$ ) เพียงชนิดเดียวที่เวลา 18 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ( $p < 0.01$ )

ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบพบว่าการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g/mL}$ ) ร่วมกับยา clindamycin (4, 8 และ 16  $\mu\text{g/mL}$ ) มีแนวโน้มในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ โดยเฉพาะการให้ให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g/mL}$ ) ร่วมกับยา clindamycin (16  $\mu\text{g/mL}$ ) มีผลเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-50.47 \pm 16.49\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=8$ )

ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (2  $\mu\text{g/mL}$ ) และยา clindamycin (4, 8 และ 16  $\mu\text{g/mL}$ ) ที่เวลา 10 ชั่วโมง มีความแตกต่างจากฤทธิ์ร่วมกันของสารที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ณ เวลาอื่น ๆ ทั้งหมดที่ทดสอบ (18, 24 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

#### 4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ของยาในกลุ่ม cell wall synthesis inhibitors ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

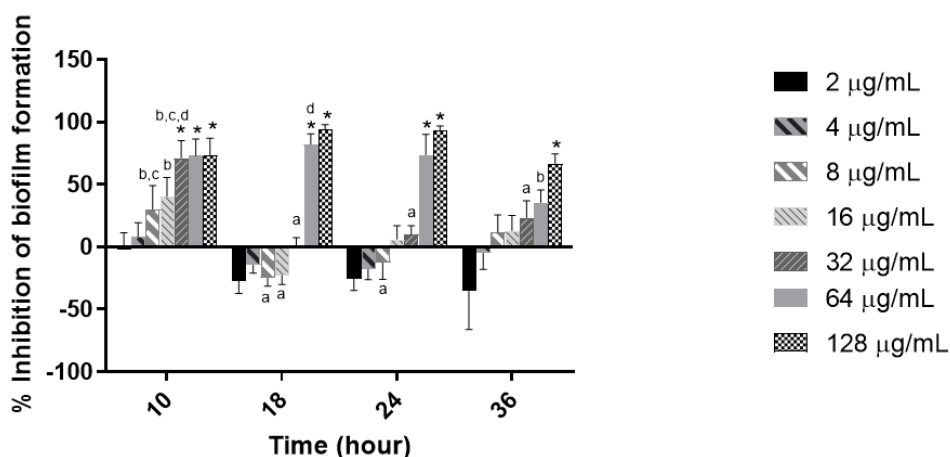
##### 4.6.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของยา ampicillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

ยา ampicillin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แบบ concentration-dependent inhibition ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) โดยมีค่า median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) ของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มดังแสดงในตารางที่ 9 ค่า IC<sub>50</sub> ของสาร ampicillin มีค่าต่ำที่สุดที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ  $21.88 \pm 16.08 \mu\text{g/mL}$  (n=5)

ตารางที่ 9 ค่า mean inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) ของยา ampicillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ

Incubation time (hours)	IC <sub>50</sub> (mean $\pm$ SD)	n
10	21.88 $\pm$ 16.08	5
18	71.20 $\pm$ 25.19	5
24	70.20 $\pm$ 25.42	6
36	125.20 $\pm$ 102.76	6

ผลการทดสอบฤทธิ์ของยา ampicillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แสดงดังภาพประกอบที่ 22



ภาพประกอบที่ 21 ผลของยา ampicillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n=5-6$ )

ยา ampicillin ที่ความเข้มข้น 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) ( $p < 0.01$ ) ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบที่เวลา 18 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $82.01 \pm 8.47\%$  ( $p < 0.01$ ;  $n=7$ ) เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของยา ampicillin (128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ไม่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบแต่อย่างใด (ภาพประกอบที่ 22)

ยา ampicillin ที่ความเข้มข้น 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะที่เวลา 10, 18 และ 24 ชั่วโมงของการทดสอบ ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบที่เวลา 18 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $93.84 \pm 3.95\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=7$ ) ทั้งนี้ฤทธิ์ของยา ampicillin (64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ที่เวลา 18 ชั่วโมงของการทดสอบ มีความแตกต่างจากฤทธิ์ของยา ampicillin ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ที่เวลา 36 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

ยา ampicillin ที่ความเข้มข้น 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $71.18 \pm 13.86\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ ) ทั้งนี้ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของยา ampicillin ที่ความเข้มข้น 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบมีค่าแตกต่างจากฤทธิ์ของยา ampicillin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (18, 24 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

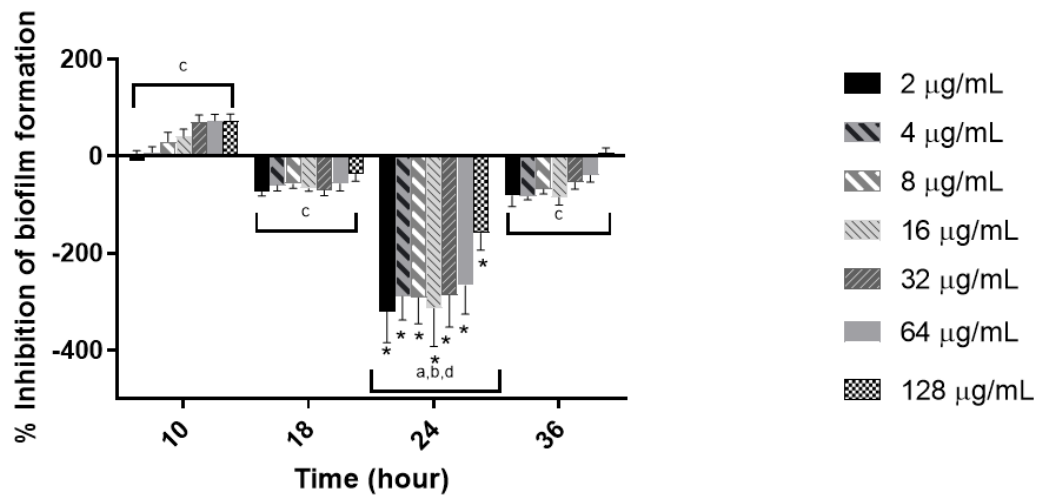
ยา ampicillin ที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ได้แก่ 2, 4, 8 และ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ไม่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA เมื่อทำการทดสอบทางสถิติ นอกจากนี้ยา ampicillin ที่ความเข้มข้นดังกล่าวยังมีแนวโน้มในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์ม ณ เวลา 18 ชั่วโมงของการทดสอบอีกด้วย



#### 4.6.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของยา cloxacillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ

MRSA

ผลการทดสอบฤทธิ์ของยา cloxacillin ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แสดงดังภาพประกอบที่ 23



ภาพประกอบที่ 22 ผลของยา cloxacillin ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n=5$ )

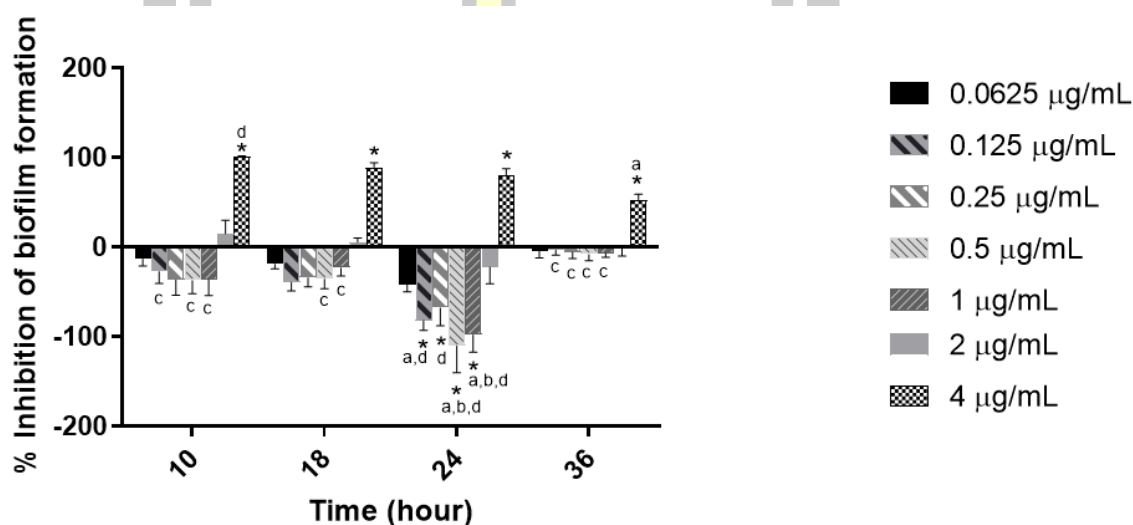
ยา cloxacillin ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (2, 4, 8, 16, 32, 64 และ 128 µg/mL) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) จากการทดสอบทางสถิติ (ภาพประกอบที่ 22 )

นอกจากนี้ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบ ยา cloxacillin ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบกลับมีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยา cloxacillin ที่ความเข้มข้น 2 µg/mL มีฤทธิ์สูงสุดในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มโดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-320.30 \pm 64.32\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ ) โดยฤทธิ์ของยา cloxacillin

ที่เวลา 24 ชั่วโมงมีความแตกต่างจากฤทธิ์ของยา cloxacillin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (10, 18 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

#### 4.6.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของยา vancomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

ผลการทดสอบฤทธิ์ของยา vancomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แสดงดังภาพประกอบที่ 24



ภาพประกอบที่ 23 ผลของยา vancomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n = 5-6$ )

ยา vancomycin ที่ความเข้มข้น 4 µg/mL มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) ( $p < 0.01$ ) ยา vancomycin ที่ความเข้มข้น 4 µg/mL ทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มสูงสุดที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $101.40 \pm 0.39\%$  ( $n = 5$ ) อีกทั้งฤทธิ์ของ vancomycin (4 µg/mL) ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบมีความแตกต่าง

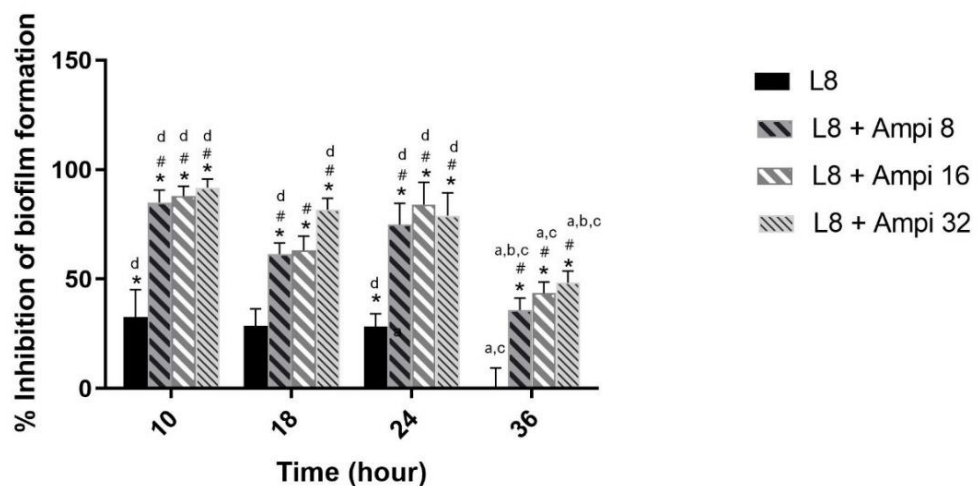
จากฤทธิ์ของยา vancomycin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลา 36 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ภาพประกอบที่ 24)

ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบพบว่ายา vancomycin ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2  $\mu\text{g/mL}$  มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ยา vancomycin ที่ความเข้มข้น 0.5  $\mu\text{g/mL}$  มีฤทธิ์สูงสุดในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มโดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-110.43 \pm 30.19\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) ซึ่งฤทธิ์นี้มีความแตกต่างจากฤทธิ์ของยา vancomycin ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ณ ช่วงเวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (10, 18 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ในขณะที่ ณ ช่วงเวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) พบว่ายา vancomycin ที่ความเข้มข้นเหล่านี้ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA เมื่อทำการทดสอบทางสถิติ

#### 4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยากลุ่ม cell wall synthesis inhibitors ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

##### 4.7.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา ampicillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

- 1) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) และยา ampicillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 24 ผลของการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) ร่วมกับยา ampicillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

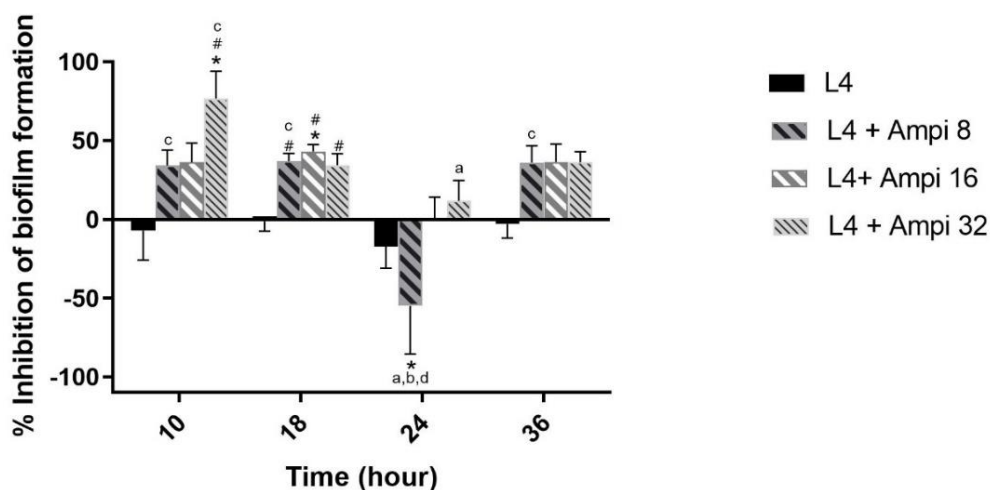
\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n=5-10$ )

การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g/mL}$  ร่วมกับยา ampicillin ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (8, 16 และ 32  $\mu\text{g/mL}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ในทุกช่วงเวลา (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบจากการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) ร่วมกับยา ampicillin ความเข้มข้น 32  $\mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $91.80 \pm 3.92\%$  ( $p < 0.01$ ;  $n=6$ ) (ภาพประกอบที่ 25)

ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) และยา ampicillin (8, 16 และ 32  $\mu\text{g/mL}$ ) ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ยังมีค่าที่สูงกว่าการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) เพียงชนิดเดียว ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบอีกด้วย ทั้งนี้การให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) เป็นสารเดี่ยวสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ที่เวลา 10 และ 24 ชั่วโมง แต่ที่เวลา 18 และ 36 ชั่วโมง การให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) เพียงอย่างเดียว ไม่มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มแต่อย่างใดจากการทดสอบทางสถิติ

ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) และยา ampicillin (8 และ 32  $\mu\text{g/mL}$ ) ที่เวลา 36 ชั่วโมง แตกต่างจากฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา ampicillin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (10, 18 และ 24 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ขณะเดียวกันฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) และยา ampicillin (16  $\mu\text{g/mL}$ ) ที่เวลา 36 ชั่วโมง ก็แตกต่างจากฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา ampicillin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลา 10 และ 24 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) เช่นกัน

- 2) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา ampicillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 25 ผลของการให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา ampicillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n=5-11$ )

ที่เวลา 10 ชั่วโมงพบว่ามีเพียงการให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา ampicillin ความเข้มข้น 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมี % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $76.57 \pm 17.43\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) (ภาพประกอบที่ 26) ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา ampicillin นี้มีค่าที่สูงกว่าฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และแตกต่างจากฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา ampicillin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ณ เวลา 24 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

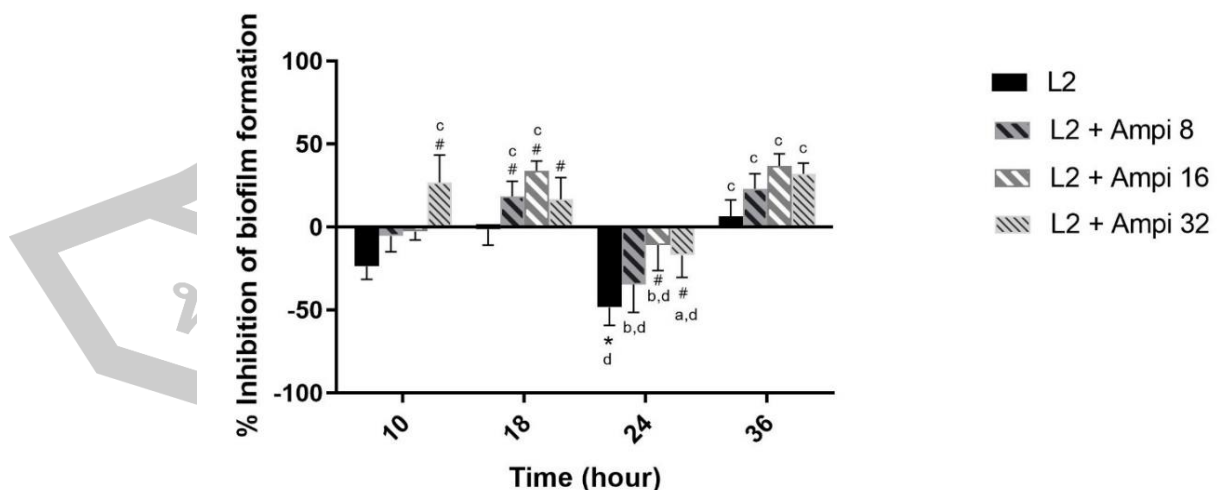
ที่เวลา 18 ชั่วโมงของการทดสอบ มีเพียงการให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา ampicillin ความเข้มข้น 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ

MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมี % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $42.96 \pm 4.53\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=8$ ) )ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา ampicillin นี้มีค่าที่สูงกว่าฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น  $4 \mu\text{g/mL}$  อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย ( $p < 0.01$ )

ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบพบว่า การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น  $4 \mu\text{g/mL}$  ร่วมกับยา ampicillin ที่ความเข้มข้น  $8 \mu\text{g/mL}$  กลับมีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-55.03 \pm 30.45\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) ฤทธิ์นี้มีความแตกต่างจากฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา ampicillin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ณ เวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (10, 18 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

ส่วนที่เวลา 36 ชั่วโมงพบว่า การให้สาร lupinifolin ( $4 \mu\text{g/mL}$ ) ร่วมกับยา ampicillin (8, 16 และ  $32 \mu\text{g/mL}$ ) มีแนวโน้มในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แต่ไม่มีนัยสำคัญจากการทดสอบทางสถิติ

### 3) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin $2 \mu\text{g/mL}$ และยา ampicillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 26 ผลของการให้สาร lupinifolin ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) ร่วมกับยา ampicillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n=5-10$ )

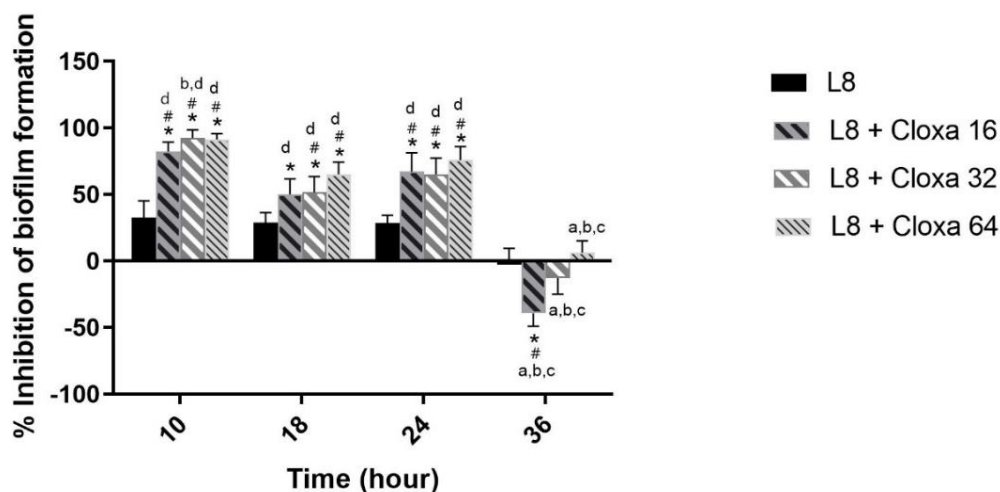
การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา ampicillin ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (8, 16 และ 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) ไม่มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA จากการทดสอบทางสถิติ แม้ว่า จะพบแนวโน้มในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้เล็กน้อยที่เวลา 36 ชั่วโมง แต่ผลดังกล่าวไม่มีนัยสำคัญจากการทดสอบทางสถิติ (ภาพประกอบที่ 27)

ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบพบว่า การให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา ampicillin ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (8, 16 และ 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีแนวโน้มในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แต่ยังไม่มีความสำคัญจากการทดสอบทางสถิติ ทั้งนี้การให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียว มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (% inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-48.47 \pm 10.74\%$  ( $p < 0.01$ ;  $n=9$ ) แม้ว่าการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา ampicillin ที่ความเข้มข้น 16 และ 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  จะมีแนวโน้มในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA เช่นกัน แต่มีค่าที่แตกต่างไปจากการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียวมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

#### 4.7.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา cloxacillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

พหุ ประถมศึกษา

- 1) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา cloxacillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 27 ผลของการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา cloxacillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

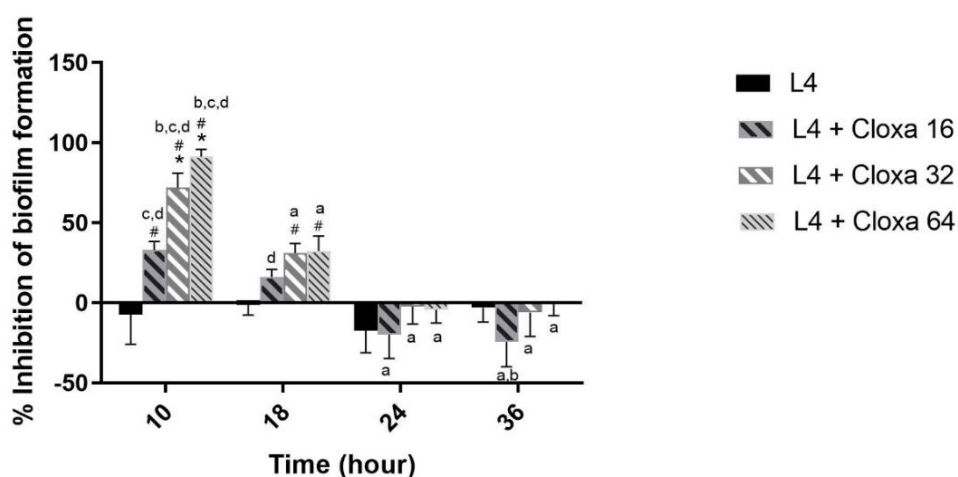
\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n = 5-11$ )

การให้สาร lupinifolin ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา cloxacillin ที่ความเข้มข้น 16, 32 และ 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ที่เวลา 10, 18 และ 24 ชั่วโมง ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบจากการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา cloxacillin ที่ความเข้มข้น 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $92.47 \pm 5.98\%$  ( $p < 0.01$ ;  $n = 6$ ) (ภาพประกอบที่ 28) ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา cloxacillin (16, 32 และ 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ที่เวลา 10 และ 24 ชั่วโมง ยังแตกต่างจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เมื่อให้เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ด้วย สำหรับที่เวลา 18 ชั่วโมงพบว่าฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา cloxacillin (32 และ 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีความแตกต่างจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เมื่อให้เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )



ส่วนที่เวลา 36 ชั่วโมงพบว่า การให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา cloxacillin ที่ความเข้มข้น 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมี % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-39.34 \pm 9.72\%$  ( $p < 0.01$ ;  $n = 6$ ) ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา cloxacillin (16, 32 และ 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ที่เวลา 36 ชั่วโมง มีความแตกต่างไปจากฤทธิ์ร่วมกันของสารที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ณ เวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (10, 18 และ 24 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

- 2) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา cloxacillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 28 ผลของการให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา cloxacillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

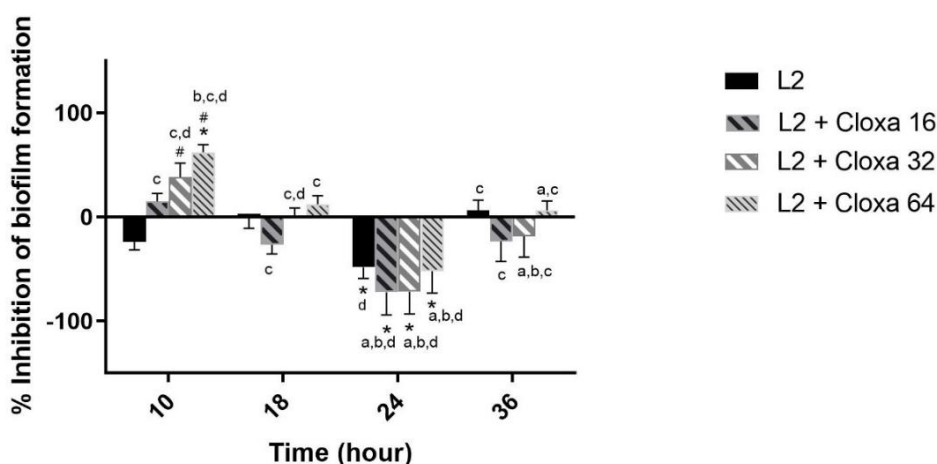
\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n = 5-11$ )

การให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา cloxacillin ที่ความเข้มข้น 32 และ 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เฉพาะที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $71.87 \pm 9.10$  และ  $82.13 \pm$

7.04% ตามลำดับ ( $p < 0.01$ ;  $n = 6$ )ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา cloxacillin นี้ยังมีค่าที่แตกต่างจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g/mL}$  เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) อีกทั้งฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g/mL}$ ) และยา cloxacillin (32 และ 64  $\mu\text{g/mL}$ ) ที่เวลา 10 ชั่วโมง ยังแตกต่างจากเวลาอื่น ๆ (18, 24 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย ( $p < 0.01$ ) (ภาพประกอบที่ 29)

สำหรับที่เวลาอื่น ๆ ของการทดสอบ (18, 24 และ 36 ชั่วโมง) การให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g/mL}$ ) ร่วมกับยา cloxacillin ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ ไม่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์ม จากการทดสอบทางสถิติ

3) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin 2  $\mu\text{g/mL}$  และยา cloxacillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 29 ผลของการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g/mL}$ ) ร่วมกับยา cloxacillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n = 5-11$ )

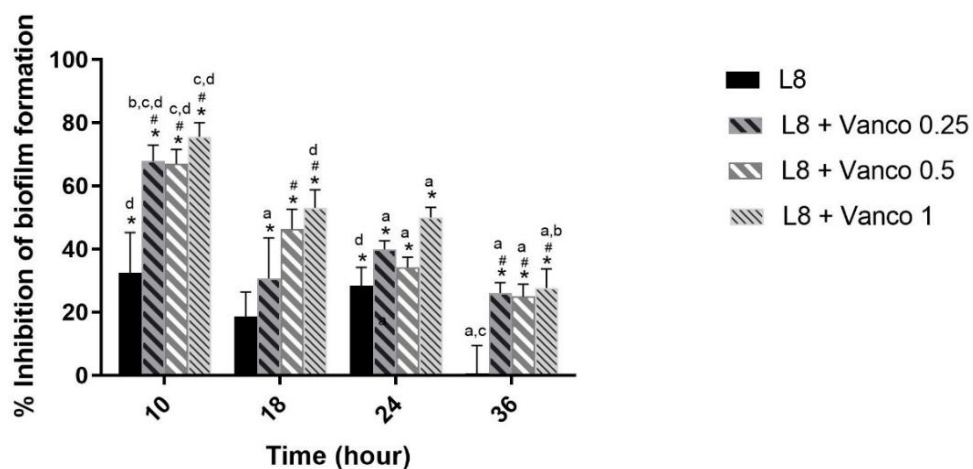
การให้สาร lupinifolin ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา cloxacillin ที่ความเข้มข้น  $64 \mu\text{g}/\text{mL}$  เฉพาะที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $62.02 \pm 7.47\%$  ( $p < 0.01$ ;  $n=6$ ) ซึ่งค่านี้มีความแตกต่างจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) เมื่อให้เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) อีกทั้งยังแตกต่างจากฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา cloxacillin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ณ เวลาอื่น ๆ (18, 24 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย ( $p < 0.01$ ) (ภาพประกอบที่ 30)

ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบพบว่าการให้สาร lupinifolin ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา cloxacillin ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (16, 32 และ  $64 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การให้สาร lupinifolin ร่วมกับยา cloxacillin ที่ความเข้มข้น  $32 \mu\text{g}/\text{mL}$  ทำให้เกิดฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้สูงสุด โดยมี % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-72.46 \pm 21.66\%$  ( $p < 0.01$ ;  $n=6$ ) ทั้งนี้การให้สาร lupinifolin ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียวมีผลเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบเช่นกัน (% inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-48.47 \pm 10.74\%$  ( $p < 0.01$ ;  $n=9$ ) ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา cloxacillin (16, 32 และ  $64 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) ที่เวลา 24 ชั่วโมงมีความแตกต่างจากเวลาอื่น ๆ (10, 18 และ 36 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

#### 4.7.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา vancomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

- 1) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin ( $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา vancomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

พหุ ประถมศึกษา



ภาพประกอบที่ 30 ผลของการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา vancomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n=5-11$ )

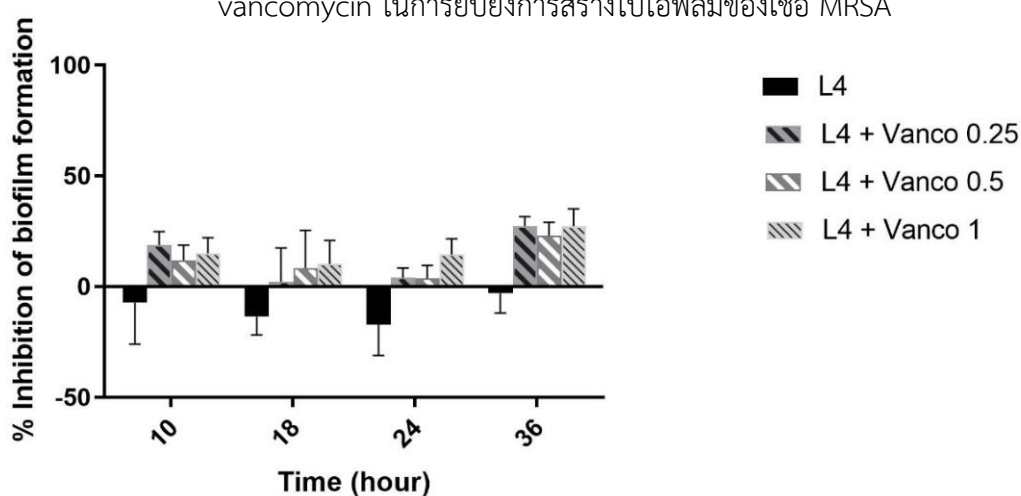
การให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา vancomycin ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (0.25, 0.5 และ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดพบจากการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา vancomycin ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $75.56 \pm 4.42\%$  ( $p < 0.01$ ;  $n=6$ ) (ภาพประกอบที่ 31)

ที่เวลา 10 และ 36 ชั่วโมงพบว่า การให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา vancomycin ในทุกความเข้มข้น (0.25, 0.5 และ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้สูงกว่าฤทธิ์ของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย ( $p < 0.01$ ) ทั้งนี้ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา vancomycin ที่ความเข้มข้นดังกล่าว ณ เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบมีค่าที่สูงกว่าฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

และยา vancomycin ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

การให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา vancomycin ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่เวลา 18 ชั่วโมงมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้สูงกว่าฤทธิ์ของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) เช่นกัน

2) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา vancomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

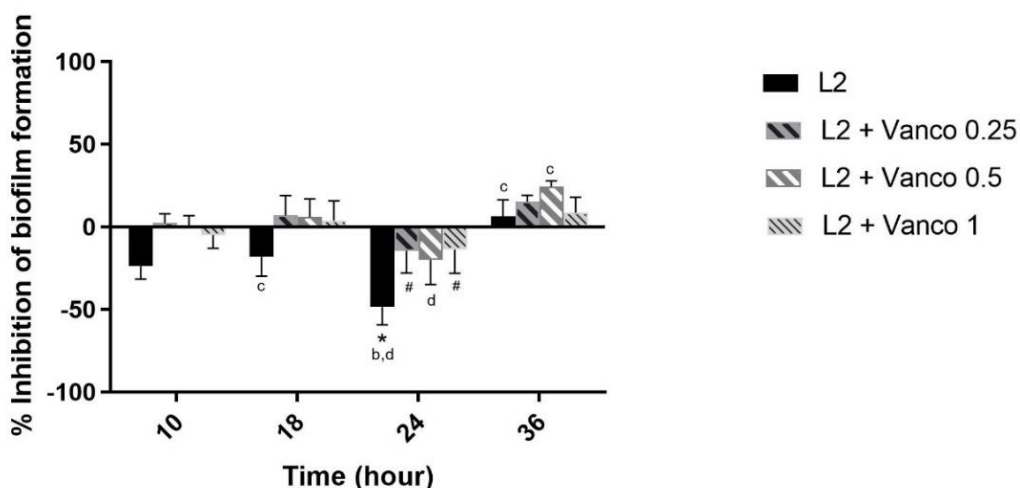


ภาพประกอบที่ 31 ผลของการให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา vancomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n = 6-11$ )

การให้สาร lupinifolin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา vancomycin ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (0.25, 0.5 และ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ มีแนวโน้มในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้เล็กน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญจากการทดสอบทางสถิติ (ภาพประกอบที่

3) ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และยา vancomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA



ภาพประกอบที่ 32 ผลของการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา vancomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA

\* $p < 0.01$  vs. vehicle control at the same incubation time; # $p < 0.01$  vs. lupinifolin alone at the same incubation time; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. time = 10 hr, at the same concentration tested; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. time = 18 hr, at the same concentration tested; <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. time = 24 hr, at the same concentration tested; <sup>d</sup> $p < 0.01$  vs. time = 36 hr, at the same concentration tested (Pairwise comparisons of Two-way ANOVA,  $n = 6-11$ )

การให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา vancomycin ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (0.25, 0.5 และ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) ไม่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA จากการทดสอบทางสถิติ (ภาพประกอบที่ 33)

อย่างไรก็ตามที่เวลา 24 ชั่วโมงการให้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา vancomycin มีแนวโน้มในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้เล็กน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญจากการทดสอบทางสถิติ ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และยา vancomycin ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีความแตกต่างจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เมื่อให้เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ทั้งนี้สาร lupinifolin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีผลเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า % inhibition of biofilm formation เท่ากับ  $-48.47 \pm 10.74\%$  ( $p < 0.01$ ;  $n = 9$ )

## บทที่ 5

### สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย MRSA

สาร lupinifolin มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย MRSA สายพันธุ์ DMST 20645 ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) เท่ากับ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (median,  $n=19$ ) ผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าสาร lupinifolin มีค่า MIC ในการต้านเชื้อ MRSA สายพันธุ์ DMST 20645 เท่ากับ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เช่นเดียวกัน ค่า MIC นี้มีความแตกต่างไปเล็กน้อยจากงานวิจัยของ Yusook and Panvongsa (2020) ที่ได้รายงานค่า MIC ของสาร lupinifolin ในการต้านเชื้อ MRSA สายพันธุ์ TISTR 4738 ไว้ที่ 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ความแตกต่างของสายพันธุ์ของเชื้อ MRSA ที่ใช้ในการทดสอบอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ค่า MIC มีความแตกต่างกัน อีกทั้งความแตกต่างของสภาวะของการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมสารทดสอบ (vehicle) รวมทั้งชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อก็อาจส่งผลกระทบต่อความไวในการตอบสนองของแบคทีเรียต่อสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้เช่นกัน (Hulankova, 2022; Van de Vel *et al.*, 2019) ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Tryptic Soy Broth (TSB) ในขณะที่ในการศึกษาของ Yusook and Panvongsa (2022) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hinton Broth (MHB) มีรายงานการศึกษาพบว่าค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยในการต้านเชื้อ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ MHB มีความแตกต่างกันได้ถึง 122-138  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Hulankova, 2022) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MHB มีองค์ประกอบคือ Starch (1.5 g/L) และโปรตีน (ได้แก่ beef extract และ acid digest ของ casein) เป็นส่วนประกอบในปริมาณสูง (317.5 g/L) ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB มีโปรตีน (ได้แก่ pancreatic digest ของ casein และ enzymatic digest ของถั่วเหลือง) ในปริมาณที่ต่ำกว่า (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และมี phosphate buffer ของ NaCl (5 g/L) เป็นส่วนประกอบร่วมกับด้วยส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันนี้อาจส่งผลกระทบต่อเมแทบอลิซึมของความไวในการตอบสนองของเชื้อแบคทีเรียได้ (Johnson, 2014) ได้รายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกันสามารถส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบและลักษณะเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MHB มีปริมาณของ branched-chain fatty acids ที่สูงกว่าเซลล์เมมเบรนของเชื้อ *S. aureus* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB และเซลล์เมมเบรนของเชื้อ *S. aureus* ที่เลี้ยงใน

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB และเซลล์เมมเบรนของเชื้อ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MHB ยังมีลักษณะความเป็นของเหลว (fluidity) ที่ต่ำกว่าเซลล์เมมเบรนของเชื้อ *S. aureus* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB ด้วย ซึ่งความแตกต่างของ cell membrane เหล่านี้อาจส่งผลต่อความไวของเชื้อ *S. aureus* ต่อสาร lupinifolin ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่เรียกว่า *S. aureus* ทั้งชนิด MSSA และ MRSA ผ่านการรบกวนการทำงานของเซลล์เมมเบรนของเชื้อแบคทีเรีย (Yusook *et al.*, 2017; Yusook & Panvongsa, 2020) อย่างไรก็ตามค่า MIC ของสาร lupinifolin ในการต้านเชื้อ MRSA ในการศึกษานี้ (16 µg/mL) ก็การศึกษาของ (Yusook & Panvongsa, 2020) (8 µg/mL) จัดว่ามีความใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปในการทดลองทางจุลชีววิทยาว่า ค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบ microbroth dilution ในแต่ละครั้งอาจมีความแตกต่างกันได้ 1 ระดับความเข้มข้นหรือ 2 เท่าของความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (Cushnie & Lamb, 2011; Odds, 2003)

Osorio *et al.*, 2021 ได้รายงานว่า โครงสร้างทางเคมีของ prenylated flavonoids ที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้แก่ 1) การมี C2-C3 saturation หรือพันธะเดี่ยวระหว่าง C2-C3 ของ ring C ดังนั้น prenylated flavanones จึงมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่สูงกว่า prenylated flavones, 2) การมี hydroxyl group (-OH group ในตำแหน่ง C-5, 7 และ 4' และ 3) มี prenyl group ในตำแหน่ง C-6 หรือ C-8 ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของ lupinifolin มีลักษณะทั้ง 3 ข้อดังกล่าวข้างต้นคือ 1) เป็น prenylated flavanones (มี C2-C3 saturations), 2) มี hydroxyl group ในตำแหน่ง C-5 และ 4' และ 3) มี prenyl group ในตำแหน่ง C-8 ทั้งนี้ prenylated flavonoids มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic ที่มากกว่า flavonoids อื่นๆ จึงทำให้สามารถแทรกผ่านเซลล์เมมเบรนได้ และเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ดี คุณสมบัติความชอบไขมันของสาร lupinifolin มีความสัมพันธ์กับกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียผ่านการรบกวนการทำงานของเซลล์เมมเบรนหรือเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายเซลล์เมมเบรนของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้ง MRSA ดังกล่าวข้างต้น (Limswan *et al.*, 2018; Yusook *et al.*, 2017; Yusook & Panvongsa, 2020) การออกฤทธิ์ที่บริเวณเซลล์เมมเบรนอาจมีผลช่วยเพิ่มการนำยาด้านแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆที่มีเป้าหมายการออกฤทธิ์อยู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย (เช่น ยากลุ่ม protein synthesis inhibitors) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้มากขึ้น นอกจากนี้สาร lupinifolin ยังอาจสามารถเสริมฤทธิ์กับยาด้านแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้มากขึ้น นอกจากนี้สาร lupinifolin ยังอาจสามารถเสริมฤทธิ์กับยาด้านแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียผ่านการจัดขวางกลไกการดื้อยาต่างๆ



ของเชื้อแบคทีเรียอีกด้วย จากรายงานของ (Wagner *et al.*, 2009) ระบุว่าสารฟลูคาโวนอยด์กลุ่ม flavonoids สามารถเสริมฤทธิ์กับยาต้านแบคทีเรียผ่านหลายกลไก เช่น การเพิ่ม permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์, การยับยั้ง efflux pump, การยับยั้งเอนไซม์ของแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น ผลการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสาร lupinifolin สามารถเสริมฤทธิ์กับยา streptomycin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม aminoglycoside ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA ได้ผ่านกลไกการรบกวนการทำงานของเซลล์เมมเบรนหรือเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายเซลล์เมมเบรน และช่วยเพิ่มความสามารถในการนำยาในกลุ่ม aminoglycoside เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย จึงทำให้ยาในกลุ่ม aminoglycosides สามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีขึ้น (กรวิชญ์ ไชยวงษ์ และ ทศพลวงษ์, 2566) ซึ่งความสามารถในการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีนี้อาจมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่เพิ่มขึ้นด้วยซึ่งจะได้มีการอภิปรายต่อไป

ผลการทดสอบฤทธิ์ของยาในกลุ่ม protein synthesis inhibitors ได้แก่ tetracycline, streptomycin และ clindamycin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 32, >64 และ >16 ug/mL ตามลำดับ ตามเกณฑ์ของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ปี ค.ศ. 2018 ได้กำหนดว่าเชื้อ *S. aureus* จะมีความไว (susceptible) ต่อยา tetracycline และ clindamycin เมื่อมีค่า MIC  $\leq 4$  และ  $\leq 0.5$   $\mu\text{g/mL}$  (CLSI, 2018) แม้ในเกณฑ์ของ CLSI ปี ค.ศ. 2018 ไม่มีการระบุค่าความไวของเชื้อ *S. aureus* ต่อยา streptomycin แต่ได้มีการระบุค่าความไวของเชื้อ *S. aureus* ต่อยา gentamicin (ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม aminoglycosides เช่นเดียวกับยา streptomycin) ไว้ที่  $\leq 4$  ug/mL (CLSI, 2018) ดังนั้นเชื้อ MRSA สายพันธุ์ DMST 20645 ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จึงไม่ไวต่อยาในกลุ่ม protein synthesis inhibitors ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ tetracycline, clindamycin และ streptomycin สำหรับผลการทดลองฤทธิ์ของยาในกลุ่ม cell wall synthesis inhibitors ได้แก่ ampicillin, cloxacillin และ vancomycin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA ในการทดลองนี้พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 64, >128 และ 4  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ ตามเกณฑ์ของของ CLSI ปี ค.ศ. 2018 ได้กำหนดว่าเชื้อ *S. aureus* จะมีความไวต่อยา ampicillin (ยาในกลุ่ม penicillinase-labile penicillins) และ cloxacillin (ยาในกลุ่ม penicillinase-stable penicillins) เมื่อมีค่า MIC  $\leq 0.12$  และ  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ (CLSI, 2018) ดังนั้นเชื้อ MRSA สายพันธุ์ DMST 20645 ที่ใช้ในการทดสอบนี้จึงไม่ไวต่อยา ampicillin และ Cloxacillin สำหรับยา vancomycin ตามเกณฑ์ของ CLSI ปี ค.ศ. 2018 ได้กำหนดว่าเชื้อ *S. aureus* ตามเกณฑ์ของ CLSI ปี ค.ศ. 2018 ได้กำหนดว่าเชื้อ *S. aureus* จะมีความไว

(susceptible) ต่อยา vancomycin เมื่อมีค่า MIC  $\leq 2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  และเชื้อ *S. aureus* จะมีความไวแบบปานกลาง (intermediate) ต่อยา vancomycin เมื่อมีค่า MIC เท่ากับ 4–8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (CLSI, 2018) ดังนั้นเชื้อ MRSA สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จึงมีความไวแบบปานกลางต่อยา vancomycin ผลการทดสอบฤทธิ์ของยาต้านแบคทีเรียได้แก่ ampicillin, cloxacillin, tetracycline, streptomycin และ clindamycin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA สายพันธุ์ DMST 20645 ในการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานผลการศึกษาก่อนหน้านี้ (Rattanakit *et al.*, 2021, 2022 ;กรวิชญ์ ไชยวงษ์และ ทศพล วรรณศรี 2566) อย่างไรก็ตามค่า MIC ของยา vancomycin ในการต้านเชื้อ MRSA จากศึกษาครั้งนี้ (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีความแตกต่างไปเล็กน้อยจากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Rattanakit *et al.* (2021) และ Rattanakit *et al.* (2022) ที่ได้รายงานค่า MIC ของยา vancomycin ในการต้านเชื้อ MRSA ไว้ที่ 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  การทดลองนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA ของยา vancomycin ทั้งที่เป็นยาจาก lot เดียวกันกับการศึกษาของ Rattanakit *et al.* (2021) และ Rattanakit *et al.* (2022) และ lot ที่ได้มีการสั่งซื้อใหม่เพื่อยืนยันว่าผลการทดลองที่ได้เกิดจากการเสื่อมสภาพของยา vancomycin ใน lot เดิมที่เก็บไว้หรือไม่ ซึ่งผลการทดสอบยา vancomycin ทั้ง 2 lot ให้ผลของ MIC ต่อเชื้อ MRSA ที่ตรงกันคือ 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ดังนั้นฤทธิ์ของยา vancomycin ที่พบจึงไม่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของยาแต่อย่างใด และค่า MIC ที่ได้แตกต่างกันเพียง 1 ระดับความเข้มข้น ซึ่งยังคงเป็นความแตกต่างที่ยอมรับได้ทั่วไปในการทดลองทางจุลชีววิทยาดังกล่าวข้างต้น (Odds, 2003; Cushnie and Lamb, 2011) อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้เช่นกันว่าเชื้อ MRSA สายพันธุ์ DMST 20645 ที่ใช้ในการทดลองนี้มีความไวต่อยา vancomycin ที่ลดลง จึงต้องเพิ่มความระมัดระวังการใช้ยาต้านแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนของยาต้านแบคทีเรียโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ใน stock ของเชื้อ MRSA ที่ใช้ในการทดลอง ที่อาจส่งผลทำให้เชื้อมีวิวัฒนาการของการดื้อยาเกิดขึ้นได้ (Jahn *et al.*, 2017)

## 5.2 ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย MRSA

สาร lupinifolin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้แบบขึ้นกับความเข้มข้นของสาร (concentration-dependent inhibition) ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) ฤทธิ์ของสาร lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ยังขึ้นกับช่วงระยะเวลาของการทดสอบ (incubation time) อีกด้วย ผลการศึกษานี้พบว่าสาร lupinifolin มีความแรง (potency) ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่ลดลงเมื่อระยะเวลาของการทดสอบเพิ่มขึ้น

สาร lupinifolin มีความแรงสูงสุดในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ที่ 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) ของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเท่ากับ  $6.73 \pm 3.47 \mu\text{g/mL}$  (n=12) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า MIC ของสาร lupinifolin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA ( $16 \mu\text{g/mL}$ ) ที่ระยะเวลาการทดสอบที่เพิ่มขึ้น ค่า IC<sub>50</sub> ของสาร lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มมีค่าที่เพิ่มมากขึ้น (ซึ่งแสดงถึงความแรงในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่ลดลง) โดยที่เวลา 18 และ 24 ชั่วโมง ค่า IC<sub>50</sub> ของฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มการสร้างไบโอฟิล์มยังคงมีค่าที่ต่ำกว่าค่า MIC ( $11.33 \pm 4.31$  และ  $14.73 \pm 4.67 \mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ) แต่ที่เวลา 36 ชั่วโมงพบว่าค่า IC<sub>50</sub> ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มมีค่าที่สูงกว่าค่า MIC เล็กน้อย ( $18.96 \pm 6.22 \mu\text{g/mL}$ ) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสาร lupinifolin มีฤทธิ์ยับยั้งขั้นตอนในช่วงแรกของการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ดีที่สุด ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Pulbutr *et al.* (2020) ที่ได้รายงานว่าสาร lupinifolin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA ได้ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (6, 8, 12, 20 และ 24 ชั่วโมง) และมีค่า IC<sub>50</sub> ต่ำที่สุด ( $0.22 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ ) อยู่ที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมงของการทดสอบ ซึ่งแสดงว่าสาร lupinifolin มีฤทธิ์ที่ดีที่สุดในการยับยั้งขั้นตอนแรกของการสร้างไบโอฟิล์มคือการเข้ายึดเกาะบนพื้นผิว (surface attachment) ของเชื้อ *S.aureus* ทั้งชนิด MSSA และ MRSA จากการที่สาร lupinifolin ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่ช่วงเวลาอื่น ๆ ต่อมาของการทดสอบด้วย จึงเป็นไปได้ว่าการขัดขวางขั้นตอนแรกของการสร้างไบโอฟิล์มส่งผลทำให้กระบวนการสร้างไบโอฟิล์มในขั้นตอนอื่นๆ ถูกยับยั้งตามไปด้วยนั่นเอง อย่างไรก็ตามฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสาร lupinifolin ในช่วงเวลาของการทดสอบมีความแรงที่ลดลงตามระยะเวลาของการทดสอบที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการที่สาร lupinifolin ถูกเปลี่ยนแปลงสภาพโดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อแบคทีเรียหรือเกิดการสลายตัวด้วยปฏิกิริยาทางเคมีอื่นๆ จึงทำให้มีความแรงในการยับยั้งขั้นตอนแรกของการสร้างไบโอฟิล์มที่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถยึดเกาะบนพื้นผิวและเกิดการสร้างไบโอฟิล์มได้ หรืออาจเป็นไปได้ว่าสาร lupinifolin สามารถมีฤทธิ์ยับยั้งขั้นตอนอื่น ๆ ต่อมาของกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม (เช่น การเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียภายในไบโอฟิล์ม (bacterial cell proliferation), การผลิต extracellular matrix substance ที่เป็นองค์ประกอบของไบโอฟิล์ม, การสร้างไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (biofilm maturation) หรือการกระจายตัวของไบโอฟิล์ม (biofilm dispersal) เป็นต้น) ได้โดยตรงด้วยเช่นกัน แต่ฤทธิ์ของสาร lupinifolin ในการยับยั้งขั้นตอนเหล่านี้มีความแรงที่ต่ำกว่าฤทธิ์ยับยั้งขั้นตอนแรกของการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งสะท้อนจากค่า IC<sub>50</sub> ของ

สาร lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ณ ช่วงเวลาต่อมาของการทดสอบ (ที่เวลา 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) ที่สูงกว่าค่า  $IC_{50}$  ในช่วงแรก (ที่เวลา 10 ชั่วโมง) นั้นเอง แต่เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ไม่พบสาร lupinifolin ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียตั้งแต่เริ่มต้น (ที่เวลา 0 ชั่วโมง) จึงยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในช่วง 18, 24 และ 36 ชั่วโมง เป็นผลต่อเนื่องจากการยับยั้งขั้นตอนแรกในการเข้ายึดเกาะกับพื้นผิวที่ 10 ชั่วโมง หรือเป็นผลโดยตรงจากการรบกวนขั้นตอนต่อมาในกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม ดังนั้น เพื่อให้ข้อมูลชัดเจนมากยิ่งขึ้น ในอนาคตอาจทำการทดลองโดยปรับเปลี่ยนช่วงเวลาของการให้สาร lupinifolin เป็นการให้สารในช่วงเวลาก่อนที่จะเกิดขึ้นตอนต่อมาของการสร้างไบโอฟิล์ม อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการทดลองในลักษณะดังกล่าว คือ จำเป็นทราบช่วงเวลาของการสร้างในแต่ละขั้นตอนของการสร้างไบโอฟิล์มที่ชัดเจนแน่นอน ซึ่งช่วงเวลาของขั้นตอนต่างๆในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แต่ละสายพันธุ์อาจมีความแตกต่างกัน และระยะของการสร้างไบโอฟิล์มต่างๆ อาจมีการซ้อนเหลื่อมกันไม่ได้แยกกันอย่างเด็ดขาดชัดเจน อีกทั้งการเติมสารทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างที่เชื้อได้เริ่มมีการสร้างไบโอฟิล์มแล้วต้องทำด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากอาจส่งผลไปทำลายไบโอฟิล์มที่ได้มีการสร้างอยู่ก่อนแล้ว (performed biofilm) ได้

การทดลองครั้งนี้ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Tryptic Soy Broth (TSB) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้สำหรับทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย (biofilm formation assay) การทดลองครั้งนี้ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย MRSA ในการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม มีรายงานว่า การเติมน้ำตาลกลูโคส 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB สามารถช่วยส่งเสริมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ได้ (Lade *et al.*, 2019) ซึ่งการเติมน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีผลทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง และส่งเสริมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ (O'Neill *et al.*, 2008) ดังนั้นการติดเชื้อ *S. aureus* ในบริเวณของร่างกายที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย เช่น ผิวหนัง ช่องคลอด ทางเดินปัสสาวะ ปาก มีผลส่งเสริมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ (Weinrick *et al.*, 2004) โดยมีการศึกษาพบว่า น้ำตาลกลูโคสและ pH ที่ลดต่ำลง มีผลลดการแสดงออกของยีน accessory gene regulator (agr) ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (Vuong *et al.*, 2004)

ขั้นตอนแรกของกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มคือการเข้ายึดเกาะบนพื้นผิว (Surface attachment หรือ adhesion) (Craft *et al.*, 2019) การยึดเกาะบนพื้นผิวส่วนมากเกิดบนพื้นผิวที่มีลักษณะหยาบ ไม่เรียบ หรือมีลักษณะไม่ชอบน้ำ (hydrophobic surface) การยึดเกาะของเชื้อ

แบคทีเรียบนพื้นผิวนั้นสามารถเกิดได้ทั้งบนพื้นผิวของสิ่งของ (abiotic surface) โดยเฉพาะบนวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ใส่ภายในร่างกาย (medical device) และบนพื้นผิวของเซลล์เนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆที่มีชีวิต (biotic surface) การเข้าจับของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวของวัสดุอุปกรณ์พบ่าเกิดขึ้นได้ผ่านการสร้าง electrostatic และ hydrophobic interaction (Kennedy & O’Gara, 2004) โดยที่ teichoic acid ซึ่งมีประจุลบบนเซลล์ของแบคทีเรียและ major autolysin (AltA) มีบทบาทในการเข้าจับบนพื้นผิวที่มีลักษณะเป็น polystyrene หรือแก้ว (Biswas *et al.*, 2006; Houston *et al.*, 2011) สำหรับการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรีย MRSA บนพื้นผิวของเซลล์จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของโปรตีนที่อยู่บนเซลล์แบคทีเรีย (surface protein) ซึ่งเกาะอยู่กับ peptidoglycan ของผนังเซลล์ surface protein เหล่านี้อาจเรียกว่า microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MRCRAMMs) surface protein เหล่านี้มีลักษณะเป็น LPXTG motif-containing protein ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงที่แตกต่างกันในการเข้าจับกับ host matrix components (เช่น fibronectin, fibrinogen, collagen และ cytokeratin เป็นต้น) (Moormeier and Bayles, 2017) ตัวอย่างของ LPXTG-containing surface proteins ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ Staphylococci มีหลายชนิด เช่น biofilm-associated protein (Bap), *S. aureus* surface protein G (SasG), Fibronectin binding proteins A (FnBPA) และ fibronectin binding protein B (FnBPB) เป็นต้น (O’Neill *et al.*, 2008) การเข้าเกาะจับ (anchor) ของ surface protein กับ peptidoglycan ของผนังเซลล์จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ sortase A ซึ่งเป็น extracellular transpeptidase enzyme ที่ encode โดยยีน *srtA* (McCarthy *et al.*, 2015) จึงอาจเรียก surface protein เหล่านี้ได้ว่า sortase-anchored protein เอนไซม์ sortase เร่งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อระหว่าง surface protein กับ penta-glycine cross-linker ที่เป็นองค์ประกอบของ peptidoglycan (Mazmanian *et al.*, 1999) การแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ sortase A มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ เชื้อ MRSA มีรายงานการศึกษาพบว่า การผ่าเหล่าของยีน *srtA* ส่งผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้แต่ไม่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA แต่อย่างใด (O’Neill *et al.*, 2008) สารฟลาโวนอยด์กลุ่ม flavonoids หลายชนิด ทั้ง flavones, flavonols, isoflavones รวมทั้ง flavanones ชนิด prenylated flavanones มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ sortase ได้ (Nitulescu *et al.*, 2021) จากการศึกษาของ (Oh *et al.*, 2011) พบว่าสารฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม prenylated flavanones จากรากของต้น *Sophora flavescens* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ sortase A จาก เชื้อ *S. aureus* ATCC 3538p ได้ โดยเฉพาะสาร kurarinol ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ 5-methoxyflavanone มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งเอนไซม์ sortase ได้โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 107  $\mu$ M และจัดว่ามีความแรงในการยับยั้งเอนไซม์ sortase A ที่ใกล้เคียงกับสาร p-hydroxymecuribenzoic acid (pHMB) ซึ่งเป็น positive control

(IC<sub>50</sub> เท่ากับ 130  $\mu$ M) (Oh *et al.*, 2011) สารอีกชนิดหนึ่งในกลุ่ม flavanones ที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ sortase A ได้คือสาร eriodictyol (3,4,5,7-tetrahydroxyflavanone) ซึ่งเป็นสารที่พบได้ในผลไม้ตระกูลส้ม (citrus fruit) โดยมีค่า IC<sub>50</sub> ในการยับยั้งเอนไซม์ sortase เท่ากับ 7.73  $\mu$ M สาร eriodictyol มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ sortase A แบบ reversible โดยการเข้าจับกับ active site ของ sortase A แบบ non-covalent binding การศึกษานี้ยังพบ ด้วยว่าสาร eriodictyol มีฤทธิ์ยับยั้งการเข้ายึดเกาะของแบคทีเรียกับ fibrinogen และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ อีกทั้งการศึกษาในสัตว์ทดลองยังพบด้วยว่าการให้สาร eriodictyol ขนาด 100 mg/kg ทุก 12 ชั่วโมง ด้วยการฉีดใต้ผิวหนัง ยังมีฤทธิ์ลดการติดเชื้อ MRSA ใน mouse pneumonia model ได้อีกด้วย โดยพบว่า สัตว์ทดลองที่ได้รับ eriodictyol มีจำนวนเชื้อ MRSA ในเนื้อเยื่อปอดที่ลดลง และจำนวนสัตว์ทดลองที่รอดชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wang *et al.*, 2021) การยับยั้งเอนไซม์ sortase A จึงเป็นหนึ่งในกลไกการออกฤทธิ์ที่นำไปสู่การยับยั้งการเข้ายึดเกาะของเซลล์แบคทีเรีย MRSA กับพื้นผิว ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม จากการศึกษาที่สาร lupinifolin มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ดีในระยะแรกของการสร้างไบโอฟิล์ม จึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาเพิ่มเติมว่าสาร lupinifolin จะมีฤทธิ์ในการยับยั้ง เอนไซม์ sortase A ได้ด้วยเช่นเดียวกับสารฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม prenylated flavonoids และ flavanones ที่มี รายงานก่อนหน้านี้หรือไม่ นอกจากนี้ sortase-anchored LPXTG surface proteins ไม่ได้มีบทบาทเพียงการเข้ายึดเกาะของเซลล์แบคทีเรีย (cell attachment) เท่านั้น แต่ยังมีบทบาทในขั้นตอนของการสะสมปริมาณไบโอฟิล์ม (accumulation phase) ของเชื้อ MRSA อีกด้วย โดยไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ส่วนใหญ่ ประกอบไปด้วย proteins แตกต่างจากไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA ที่มี polysaccharides เป็นส่วนประกอบหลัก (O'Gara *et al.*, 2007) ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์ sortase A จึงอาจส่งผลต่อขั้นตอนในระยะถัดมาของการสร้างไบโอฟิล์มได้ด้วยเช่นกัน

นอกจากการทำงานของเอนไซม์ sortase A และ surface protein แล้ว การเข้ายึดเกาะของเซลล์ แบคทีเรียบนพื้นผิวยังเกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีน major autolysin (Alt) ซึ่งทำหน้าที่เหนี่ยวนำ กระบวนการ cell lysis และส่งผลให้มีการปลดปล่อย extracellular DNA (eDNA) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญหนึ่งของไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA (Houston *et al.*, 2011; McCarthy *et al.*, 2015) โปรตีน autolysin มีการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ N-acetylmuramyl-L-alanine amidase และ endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase (Oshida *et al.*, 1995) การเติมเอนไซม์ DNAase I ที่มีฤทธิ์ทำลาย eDNA ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลยับยั้งการเข้ายึดเกาะ (primary attachment) และการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในโรงพยาบาล (hospital-acquired MRSA infections) แต่ไม่มีผลต่อไบโอฟิล์มที่สร้างสมบูรณ์แล้ว

ของเชื้อ MRSA แต่อย่างไรก็ตาม แสดงให้เห็นว่า eDNA เกี่ยวข้องกับการเข้ายึดเกาะ (attachment) ในช่วงแรกของการสร้างไบโอฟิล์ม (Houston *et al.*, 2011) มีรายงานการศึกษาพบว่าสาร myetenol เป็นสารพฤษเคมีในกลุ่ม terpenes มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ ผ่านการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ autolysin ลดการเกิด autolysis และส่งผลทำให้การปลดปล่อย eDNA ออกจากเซลล์ลดลง โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ แบคทีเรีย (Selvaraj *et al.*, 2019) เช่นเดียวกับฤทธิ์ของสารพฤษเคมีกลุ่ม saponins คือ camelliagenin ที่มีฤทธิ์ลดปริมาณของ eDNA และลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ได้ (Ye *et al.*, 2015) ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารพฤษเคมีกลุ่ม Flavonoids ต่อการทำงานของ autolysin และปริมาณ eDNA ในไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ยังมีอยู่อย่างจำกัด มีรายงานการศึกษาว่าสารสกัดจากพืช *Triumfetta welwitschii* ที่มีสารกลุ่ม flavonoids (ได้แก่ catechin และ luteolin derivative) เป็นองค์ประกอบ มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ และสามารถลดปริมาณของ eDNA ของไบโอฟิล์มได้ประมาณ 70% (Mombeshora *et al.*, 2021) จึงเป็นที่น่าสนใจว่าสาร lupinifolin จะสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มผ่านการ ยับยั้งการทำงานของ autolysin และ/หรือ eDNA ได้ด้วยเช่นเดียวกันหรือไม่

ระยะของการสร้างไบโอฟิล์มต่อมาหลังจากการเข้ายึดเกาะบนพื้นผิว เมื่อมีสารอาหารที่เพียงพอเซลล์ของแบคทีเรียจะเกิดการแบ่งเซลล์และมีการสะสมจำนวนของเซลล์เพิ่มขึ้นบนพื้นผิว ก่อนที่จะมีการสร้าง extracellular polymeric substance ที่ทำหน้าที่ในการเชื่อมต่อเซลล์เข้าด้วยกันทำให้ไบโอฟิล์มเกิดความแข็งแรงและสมบูรณ์ การเข้าจับกันระหว่างเซลล์อาศัยการทำงานของโปรตีนหลายชนิด รวมทั้งโปรตีนในกลุ่ม MSCRAMMs เช่น FnBPs, ClfB, SdrC proteins เป็นต้น ดังนั้น surface protein เหล่านี้จึงมีบทบาททั้งในขั้นตอนของการเข้ายึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิว (Moormeier *et al.*, 2017) สารกลุ่ม flavonoids ได้แก่ quercetin, myricetin และ scutellarein มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* หลายสายพันธุ์ได้ ผ่านการยับยั้งการสร้าง amyloid-like aggregates ซึ่งเกิดจากการเข้าจับกัน (aggregation) ของ Biofilm Associated Protein (Bap) ซึ่งเป็น surface protein ที่จำเป็นต่อการสร้างไบโอฟิล์ม การศึกษาในสัตว์ทดลองยังพบด้วยว่าการให้ quercetin และ myricetin สามารถลดจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่เกาะจับบนสายสวน (catheter) ที่ใส่เข้าสู่ร่างกายของสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย (Matilla-Cuenca *et al.*, 2020) จากการศึกษาของ (Tao *et al.*, 2021) ได้รายงานว่า สาร total flavonoids จากพืช *Potentilla kleiniana* สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA โดยมีผลยับยั้ง biofilm maturation ได้จากการลด surface hydrophobicity ลดการสร้าง

extracellular polymeric substance (EPS) และลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเข้าจับกันของเซลล์ (adhesion-related gene) ผลการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (optical density, OD) จาก crystal violet biofilm formation assay ในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งสะท้อนถึงปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการทดสอบคือ 10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมงในกลุ่มควบคุมของการทดสอบ พบว่า มีปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มจากเชื้อ MRSA เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาของการทดสอบ โดยมีค่าเฉลี่ยของ OD เท่ากับ  $0.13 \pm 0.02$ ,  $0.17 \pm 0.03$ ,  $0.25 \pm 0.07$  และ  $0.37 \pm 0.12$  ที่เวลา 10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมงตามลำดับ ดังนั้นในช่วงเวลา 18-36 ชั่วโมง จึงเป็นระยะของการเพิ่มจำนวน (growth) และการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (maturation) จากการที่สาร lupinifolin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ในช่วงเวลา 18-36 ชั่วโมงได้ด้วยดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าสาร lupinifolin มีผลรบกวนขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนของเซลล์และสะสมปริมาณไบโอฟิล์มของ เชื้อ MRSA ได้ ทั้งนี้ควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปว่าสาร lupinifolin มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในขั้นตอนนี้โดยมีผลรบกวนการทำงานของ surface protein หรือยับยั้งการสร้าง EPS หรือการปลดปล่อย eDNA เช่นเดียวกับสารกลุ่ม flavonoids ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ เช่นเดียวกันหรือไม่ขั้นตอนสุดท้ายของการสร้างไบโอฟิล์มคือการหลุดออกของไบโอฟิล์ม (biofilm dispersal) ขั้นตอนนี้เกิดจากการแสดงออกของ surfactant-like peptides ที่สำคัญต่อการคงสภาพรูปร่างของไบโอฟิล์ม เมื่อหลุดออกจากไบโอฟิล์มแล้ว แบคทีเรียสามารถที่จะไปเกาะบนพื้นผิวใหม่และสร้างไบโอฟิล์มใหม่ได้ต่อไป (Craft *et al.*, 2019) จากการที่ค่า OD จาก crystal violet biofilm formation assay ในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งสะท้อนถึงปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ที่เวลา 36 ชั่วโมง ยังคงมีค่าที่เพิ่มสูงกว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง แสดงว่าที่เวลา 36 ชั่วโมง ยังคงเป็นระยะของการเพิ่มจำนวน (growth) และการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (maturation) ของไบโอฟิล์ม โดยยังไม่เข้าสู่ระยะการหลุดออกของไบโอฟิล์ม ดังนั้นการศึกษาในอนาคตควรเพิ่มระยะเวลาของการทดลองเพื่อทดสอบว่าสาร lupinifolin สามารถส่งผลกระทบต่อ การหลุดออกของไบโอฟิล์มด้วยหรือไม่

ผลการทดสอบฤทธิ์ของยาในกลุ่ม protein synthesis inhibitors ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ tetracycline, streptomycin และ clindamycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA พบว่า มีเพียง ยา tetracycline เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทุก ช่วงเวลาของการทดสอบ ยา tetracycline มีความแรงสูงสุดในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ ( $IC_{50}$  เท่ากับ  $3.34 \pm 1.53 \mu\text{g/mL}$ ) แสดงให้เห็นว่ายา tetracycline มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งขั้นตอนแรก คือการเข้ายึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวเช่นเดียวกันกับฤทธิ์ของสาร lupinifolin อีกทั้งค่า  $IC_{50}$  ของยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในทุกช่วงเวลาของการทดสอบล้วนมีค่าที่ต่ำกว่า MIC ของยา tetracycline ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA ( $32 \mu\text{g/mL}$ ) อีกด้วย แสดงว่าฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ



ยา tetracycline สามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA มีรายงานการศึกษาว่ายาต้านแบคทีเรียหลายชนิดสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ แม้ในความเข้มข้นที่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียหรือความเข้มข้นที่ต่ำกว่า MIC (Dong et al., 2012; Henry-Stanley et al., 2014; Hoffman et al., 2005; Kaplan, 2011; Yang et al., 2017) อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของยาต้านแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ยังคงมีไม่มากนัก มีรายงานการศึกษาพบว่ายา azithromycin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ผ่านการยับยั้ง quorum-sensing และการยับยั้งการสร้าง mucoic biofilm matrix polysaccharide alginate (Favre-Bonté et al., 2003; Tateda et al., 2001) ยาต้านแบคทีเรียหลายชนิดเช่น kanamycin, enrofloxacin, lincomycin, colistin sulfate และ clarithromycin เป็นต้น ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ได้ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม เช่น *sarA*, *fnbA*, และ *IrgA* เป็นต้น (Yang et al., 2017)

ในทางตรงข้ามยา streptomycin ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ของเชื้อ MRSA อีกทั้งยังมีแนวโน้มเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้ในหลายช่วงเวลาของการทดสอบด้วย สำหรับผลของ ยา clindamycin พบว่าที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ ยา clindamycin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (0.25-16 µg/mL) ซึ่งล้วนเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า MIC ของยา clindamycin ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA (MIC >16 µg/mL) อย่างไรก็ตามที่เวลา 18, 24 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบพบว่ายา clindamycin กลับมีแนวโน้มเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์ม โดยเฉพาะที่เวลา 36 ชั่วโมงพบว่ามีฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็นที่น่าสังเกตว่ายา clindamycin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเฉพาะในช่วงระยะแรก (ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ) แต่กลับมีแนวโน้มในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มในระยะต่อมา ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่ายา clindamycin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC มีผลยับยั้งการ ทำงานของปัจจัยที่จำเป็นต่อการเข้ายึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียบนพื้นผิวได้ชั่วคราว แต่เซลล์แบคทีเรียยังคงสามารถเข้ายึดเกาะบนพื้นผิวและเกิดการสร้างไบโอฟิล์มได้ในระยะเวลาต่อมา ฤทธิ์เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มคาดว่าเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด (stress response) ของเชื้อแบคทีเรียในสภาวะที่ได้รับยาต้านแบคทีเรียที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า MIC ซึ่งเป็นการปรับตัวเพื่อเพิ่มโอกาสในการอยู่รอดของแบคทีเรีย (Poole, 2012) ) มีรายงานการศึกษาพบว่า ยา streptomycin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด bacterial stress ของเชื้อ *S. aureus* โดยทำให้เซลล์แบคทีเรียมีความชอบไขมัน (hydrophobicity) เพิ่มมากขึ้นและมีการลดลงของประจุบริเวณ cell surface ซึ่งลักษณะเหล่านี้ช่วย

ส่งเสริมการเข้ายึดเกาะบนพื้นผิวและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ แบคทีเรียได้ นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของปัจจัยที่ส่งเสริมการสร้างไบโอฟิล์ม เช่น extracellular matrix binding protein ที่บริเวณ cell surface ของแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นอีกด้วย (Kumar and Ting., 2016)

เชื้อแบคทีเรีย MRSA ที่ได้รับยา clindamycin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง มีการแสดงออก ของยีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มที่เพิ่มขึ้น เช่น *atla*, *lrgA*, *fnb* และ *fnbB* เป็นต้น และยังมีผลในการเพิ่มปริมาณของ eDNA ที่เป็นองค์ประกอบหลักของไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ด้วย (Schilcher *et al.*, 2016) นอกจากนี้ยา clindamycin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC มีฤทธิ์เหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อ MRSA ได้ โดยทำให้มีลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่ไม่เป็นทรงกลม มีการบวมของเซลล์ และมีความหนาของผนังเซลล์ ที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้เชื้อมีความทนทานต่อสภาวะต่าง ๆ ได้มากขึ้น (Schilcher *et al.*, 2016; Wecke *et al.*, 1990)

ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายาด้านแบคทีเรียในกลุ่ม protein synthesis inhibitors บางชนิดได้แก่ streptomycin และ clindamycin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด stress response และ เพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ ในขณะที่ยา tetracycline ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC มีฤทธิ์ยับยั้งการ สร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA แม้ว่ายา tetracycline, streptomycin และ clindamycin เป็นยาด้านแบคทีเรีย ในกลุ่ม protein synthesis inhibitors เช่นเดียวกัน แต่ยาทั้ง 3 ชนิด มีเป้าหมายการออกฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่แตกต่างกัน จึงอาจเป็นไปได้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันนี้อาจส่งผลต่อการควบคุมปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างกัน จึงส่งผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มได้แตกต่างกัน ออกไป

การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 8 µg/mL (1/2MIC) ร่วมกับยากกลุ่ม protein synthesis inhibitors ได้แก่ tetracycline, streptomycin หรือ clindamycin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) โดยภาพรวมพบว่าฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างกัน และมีแนวโน้มที่จะมีฤทธิ์ที่สูงกว่าที่เวลา 24 และ/หรือ 36 ชั่วโมงของการทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาด้านแบคทีเรียกลุ่ม protein synthesis inhibitors ในการยับยั้งการ สร้างไบโอฟิล์มเกิดขึ้นได้ดีในระยะแรกของการสร้างไบโอฟิล์มเช่นเดียวกับฤทธิ์ของสาร lupinifolin เมื่อให้เพียงชนิดเดียว จากการที่สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 8 µg/mL มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติได้ที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมงของการทดสอบได้แม้ให้เพียงชนิดเดียว ดังนั้น ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นจากการให้สาร lupinifolin (8 µg/mL) ร่วมกับยา tetracycline, streptomycin หรือ clindamycin จึงคาดว่าเป็นผลจากฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่

ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ในขณะที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญ จากการทดสอบทางสถิติ ดังนั้นฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นเมื่อให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับ ยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม protein synthesis inhibitors จึงเป็นผลที่เกิดจากฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรีย ผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา tetracycline, streptomycin หรือ clindamycin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA พบว่าสาร lupinifolin สามารถเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) กับยา streptomycin ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ได้ โดยจากการทดสอบ time-kill assay พบว่าการให้สาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ร่วมกับยา streptomycin (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) มีผลทำให้จำนวนโคโลนีของ เชื้อ MRSA ลดลงได้มากกว่า การให้สาร lupinifolin หรือยา streptomycin เพียงอย่างเดียว  $\geq 2 \log_{10} \text{CFU}/\text{mL}$

(กรวิชญ์ ไชยวงษ์และทศพล วรรรงค์, 2566) ดังนั้นฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของการให้สาร lupinifolin ร่วมกับยา streptomycin จึงคาดว่าเป็นผลจากการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบ checkerboard assay พบว่าสาร lupinifolin ไม่มีผลเสริมฤทธิ์กับยา tetracycline หรือ clindamycin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA แต่อย่างใด โดยมีค่า fractional inhibitory index (FICI) เท่ากับ 1.0078 และ  $< 1.0156$  ตามลำดับ (กรวิชญ์ ไชยวงษ์และทศพล วรรรงค์, 2566) ดังนั้นฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นเมื่อให้สาร lupinifolin ร่วมกับยา tetracycline หรือ clindamycin จึงคาดว่าเป็นผล โดยตรงต่อกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม โดยไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งควรมีการศึกษา เพิ่มเติมถึงกลไกในการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสาร lupinifolin และยาในกลุ่ม protein synthesis inhibitors ในการ ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ต่อไป

กลไกการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสาร lupinifolin และยา streptomycin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อ MRSA ซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การเสริมฤทธิ์กันระหว่าง สาร lupinifolin และยา streptomycin อาจมีสาเหตุจากการที่สาร lupinifolin ออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของ เซลล์เมมเบรนของเชื้อ MRSA (Yusook & Panvongsa, 2020) จึงส่งผลทำให้ยา streptomycin สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์เพื่อไปออกฤทธิ์ได้เพิ่มขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามเนื่องจากสาร lupinifolin สามารถเสริมฤทธิ์ในการต้านเชื้อ MRSA กับยา streptomycin เท่านั้นโดยไม่พบการเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย MRSA ระหว่างสาร lupinifolin กับยา tetracycline หรือ clindamycin ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์โดยการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนเช่นกัน ดังนั้น จึงคาดว่ายังมีกลไกอื่นที่จำเพาะและเกี่ยวข้องกับการเสริมฤทธิ์ของสาร lupinifolin และ ยา streptomycin กลไกหลักของการ ตือ ยาก กลุ่ม aminoglycosides ที่สำคัญ คือ

การสร้างเอนไซม์กลุ่ม aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) ได้แก่ aminoglycoside acetyltransferase (AACs), aminoglycoside phosphotransferase (APHs) และ aminoglycoside nucleotidyltransferase (ANTs) (Mahdiyoun *et al.*, 2016; Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022; Yadegar *et al.*, 2009) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลง โครงสร้างทางเคมีของยาในกลุ่ม aminoglycosides ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ การยับยั้งเอนไซม์ AMEs จึงอาจเป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์หนึ่งที่สามารถทำให้ยาในกลุ่ม aminoglycosides สามารถกลับมามีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ได้อีกครั้ง รายงานการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารพฤกษเคมีในการยับยั้งเอนไซม์ AMEs ยังคงมีอยู่จำกัด การศึกษาของ (Suga *et al.*, 2012) พบว่าสาร aranzosin จากเชื้อรา *Gymnascella aurantiaca* มีฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ AMEs ของเชื้อ MRSA ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides ได้ และทำให้เชื้อ MRSA กลับมามีความไวต่อยา arbekacin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม aminoglycosides ได้อีกครั้ง ปัจจุบันยังไม่พบงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AMEs ของสารพฤกษเคมีกลุ่ม flavonoids จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาเพิ่มเติมว่าสาร lupinifolin จะสามารถเสริมฤทธิ์กับยาในกลุ่ม aminoglycosides ผ่านกลไกการยับยั้งเอนไซม์ AMEs ด้วยหรือไม่

ฤทธิ์ของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้นต่ำลงคือ 4 และ 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1/4MIC และ 1/8MIC ตามลำดับ) เมื่อให้เป็นสารเดี่ยวต่อการสร้างไบโอฟิล์ม ขึ้นกับระยะเวลาของการทดสอบ โดยพบว่าสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ที่เวลา 10 ชั่วโมง แต่มีแนวโน้มในการเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์ม ได้ที่ช่วงเวลาอื่น ๆ ต่อมาของการทดสอบ ดังนั้นฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เกิดขึ้นเพียงชั่วคราวเท่านั้น ในขณะที่สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มแม้ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ และยังมีแนวโน้มเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มที่เวลา 18, 24 และ 36 ชั่วโมงด้วย ดังนั้นระดับความเข้มข้นของสาร lupinifolin จึงมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยหากระดับความเข้มข้นของสารต่างถึงระดับ 1/4MIC และ 1/8MIC อาจส่งผลเสียที่ทำให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA เพิ่มขึ้นได้ ผลการให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4 และ 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา กลุ่ม protein synthesis inhibitors ได้แก่ tetracycline, streptomycin และ clindamycin โดยภาพรวมพบว่าการให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้นดังกล่าวร่วมกับยา tetracycline มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้หลาย ช่วงเวลาของการทดสอบมากที่สุด และสามารถต้านฤทธิ์เหนี่ยวนำการสร้างไบโอฟิล์มของสาร lupinifolin (ที่ความเข้มข้น 4 และ 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เมื่อให้เป็นสารเดี่ยวได้ โดยการให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา tetracycline ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) สามารถทำให้เกิดฤทธิ์ต้านการสร้างไบโอฟิล์มได้ในทุกช่วงเวลาทดสอบตั้งแต่ 10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง ในขณะที่การให้ร่วมกับยา streptomycin

และ clindamycin ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่าคือมีฤทธิ์ถึงที่ 24 และ 18 ชั่วโมงตามลำดับ จากการที่ยาในกลุ่ม protein synthesis inhibitors ทั้ง 3 ชนิดมีผลทำให้เกิดฤทธิ์ที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่ายาแต่ละชนิดอาจมีกลไกการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างกันออกไป และฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มขึ้นกับความเข้มข้นของทั้งสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรีย กลุ่ม protein synthesis inhibitors โดยระดับความเข้มข้นของสารที่ไม่เหมาะสมจะส่งผลเสียให้เชื้อ MRSA สร้างไบโอฟิล์มเพิ่มมากขึ้นได้

ยา tetracycline ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้เมื่อให้เป็นยาเดี่ยว และยังมีฤทธิ์ร่วมกับกับสาร lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่ดีที่สุดในกลุ่มของยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม protein synthesis inhibitors ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ อย่างไรก็ตามฤทธิ์ร่วมกันดังกล่าวไม่เกี่ยวข้องกับการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย MRSA ดังที่ได้อภิปรายข้างต้น จากการที่ยา tetracycline สามารถถูกกำจัดออกจากเซลล์ของแบคทีเรีย MRSA ผ่านการทำงานของ membrane protein ซึ่งทำหน้าที่เป็น efflux pump เช่น TetK, Tet38 เป็นต้น (Chen and Hooper, 2018; Dashtbani-Roozbehani and Brown, 2021) การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน tet38 มีผลลดฤทธิ์ของยา tetracycline ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* โดยมีผลทำให้ค่า MIC เพิ่มขึ้นถึง 32 เท่า (Truong-Bolduc *et al.*, 2005, Truong-Bolduc *et al.*, 2014) และเชื้อ MRSA ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน tet38 (tet38 mutant) ยังมีความไวต่อยา tetracycline ที่เพิ่มขึ้น 2 เท่า จากการทดสอบ in vivo subcutaneous abscess model ในหนูถีบจักรอีกด้วย (Chen and Hooper, 2018) มีรายงานว่าสารพฤกษเคมีกลุ่ม flavonoids หลายชนิดได้แก่ chalcones, flavan3-ols, flavones, flavonols, flavonolignans, isoflavones รวมทั้ง flavanones มีฤทธิ์ยับยั้ง efflux pump ของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดได้ ผ่านกลไกการออกฤทธิ์ที่หลากหลายเช่น 1) การยับยั้ง gene expression ของ efflux pump ผ่านการยับยั้งการทำงานของ transcriptional regulators, 2) การรบกวนขั้นตอนของการประกอบ โครงสร้าง (assembly) ของ efflux pump จากการยับยั้ง protein-protein interfaces, 3) การยับยั้งแหล่งพลังงานของ efflux pump จากการลด ATP supply, 4) ยับยั้งปฏิกิริยา phosphorylation ที่จำเป็นต่อการทำงานของ efflux pump, 5) การอุดกั้น channel ที่เป็นช่องทางในการกำจัดยาของ efflux pump โดยตรง, 6) ยับยั้งการเข้าจับของยาต้านแบคทีเรียกับ binding site ของ efflux pump ทั้งการยับยั้งแบบ competitive inhibition จากการแย่ง substrate ในการเข้าจับกับ binding site บน efflux pump และการยับยั้งแบบ noncompetitive

inhibition จากการเข้าจับกับ efflux pump และเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (conformational change) ของ efflux pump เป็นต้น (Waditzer & Bucar, 2021) ตัวอย่างของ สารกลุ่ม flavonoids ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง efflux pump ซึ่งทำหน้าที่กำจัดยา tetracycline ออกจากเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เช่น สาร (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ซึ่งเป็นสาร flavonoids หลักที่พบในชาเขียวที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC มีผลทำให้เชื้อ *S. aureus* ชนิดที่มีการแสดงออกของ TetK efflux pump มีการตอบสนองต่อยา tetracycline ได้จากการที่สาร EGCG มีฤทธิ์ยับยั้ง efflux pump (Roccaro *et al.*, 2004) สาร baicalein (5, 6, 7-trihydroxyflavone) ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC คือ 25 µg/mL (1/4MIC) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ tetK และเพิ่มความไวของเชื้อแบคทีเรีย MRSA ในการตอบสนองต่อยา tetracycline ได้ (Fujita *et al.*, 2005) และจากการศึกษา molecular docking ของ (Osorio *et al.*, 2021) รายงานว่าสาร prenylated flavanones (compound 11) สามารถเข้าจับกับ ATP-binding cassette (multidrug ABC transporter Sav1866) จากเชื้อ *S. aureus* และมีแนวโน้มที่จะสามารถยับยั้งการทำงานของ efflux pump ได้ แม้ว่าสาร lupinifolin ไม่มีการเสริมฤทธิ์กับยา tetracycline ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA จากการทดสอบ checkerboard assay (กรวิชญ์ ไชยวงษ์ และ ทศพล วรรณรงค์, 2566) อย่างไรก็ตามสาร lupinifolin และยา tetracycline ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC สามารถเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ โดยการให้สารร่วมกันสามารถทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่สูงกว่าการให้เพียงสาร lupinifolin เดี่ยว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตัวอย่างเช่น ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin (8 µg/mL) และยา tetracycline (4, 8 และ 16 µg/mL) ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบ เป็นต้น) จากการที่สาร lupinifolin เป็น prenylated flavanone ที่ออกฤทธิ์บริเวณเซลล์เมมเบรนของเชื้อ MRSA จึงเป็นไปได้ว่าสาร lupinifolin อาจมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ efflux pump บริเวณเซลล์เมมเบรนและทำให้ยา tetracycline ถูกกำจัดออกจากเซลล์ของแบคทีเรียได้ลดลง จึงทำให้มีระดับยาภายในเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้นและออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้เพิ่มมากขึ้น จึงพบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสาร lupinifolin และยา tetracycline ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้แต่ระดับยาที่เพิ่มขึ้นนี้อาจยังไม่สูงมากพอที่จะทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากการทดลองที่พบว่าฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มสามารถเกิดขึ้นได้แม้ในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า MIC จึงควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ของสาร lupinifolin ต่อการทำงานของ efflux pump เช่น TetK หรือ Tet38 protein และ/หรือการแสดงออกของยีน tetK และ tet38 ของเชื้อ MRSA ต่อไป การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง efflux pump ของสารกลุ่ม flavonoids ทำได้ด้วยหลายวิธีการ (Prasch and

Bucar, 2015; Tegos *et al.*, 2021) วิธีการที่มีการใช้อย่างแพร่หลายได้แก่ 1) การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของยาที่เป็น efflux pump substrates (susceptibility test) เมื่อให้ร่วมกับ flavonoids โดยหาก flavonoids นั้นมีฤทธิ์เป็น efflux pump inhibitor จะทำให้ยาต้านแบคทีเรียที่เป็น efflux pump substrate มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น นั่นคือมีค่า MIC ที่ลดลงและ 2) การวัดปริมาณสาร fluorescent dye ที่มีคุณสมบัติเป็น efflux pump substrate (เช่น ethidium bromide (EtBr), Nile red หรือ 1,2-dinaphthylamine เป็นต้น) เมื่อให้ fluorescent dye นี้ร่วมกับ flavonoids ที่มีฤทธิ์เป็น efflux pump inhibitors จะทำให้มีปริมาณของ fluorescent dye ที่เพิ่มสูงขึ้นภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้งนี้ควรทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง efflux pump ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่มีการแสดงออก ของ efflux pump (deleted mutants) หรือแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของ efflux pump ที่มาก ผิดปกติ (overexpressing mutants) ด้วย เพื่อยืนยันผลการทดสอบ

ผลการทดสอบฤทธิ์ของยากลุ่ม cell wall synthesis inhibitors ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ ได้แก่ ampicillin, cloxacillin และ vancomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA พบว่ามีเพียงยา ampicillin เท่านั้น ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้แบบ concentration-dependent inhibition ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) ค่า  $IC_{50}$  ของสาร ampicillin มีค่าต่ำที่สุดที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $21.88 \pm 16.08$   $\mu\text{g/mL}$  ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าค่า MIC ของยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA (64  $\mu\text{g/mL}$ ) ฤทธิ์ของยา ampicillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มมีความแรงที่ลดลงที่เวลา 18, 24 และ 36 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีค่า  $IC_{50}$  ที่สูงกว่าค่า MIC ยา ampicillin ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทดสอบ (2  $\mu\text{g/mL}$ ) ยังมีแนวโน้มเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์มได้ที่เวลา 18, 24 และ 36 ชั่วโมงอีกด้วย แสดงให้เห็นว่ายา ampicillin มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งขั้นตอนแรกในการเข้ายึดเกาะบนพื้นผิวได้ เช่นเดียวกับฤทธิ์ของสาร lupinifolin และยา tetracycline ซึ่งเป็นสารทดสอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้เมื่อให้เป็นสารเดี่ยวในการศึกษาคั้งนี้ อย่างไรก็ตามยา ampicillin มีความแรงในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่ต่ำกว่าสาร lupinifolin และยา tetracycline ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ โดยสามารถเรียงลำดับความแรงของสารจากสูงไปต่ำได้แก่ ยา tetracycline > สาร lupinifolin > ยา ampicillin ในขณะที่ยา cloxacillin ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ เชื้อ MRSA อีกทั้งที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบ ยา cloxacillin ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (2-128  $\mu\text{g/mL}$ ) ซึ่งล้วนเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า MIC ยังมีฤทธิ์เหนี่ยวนำการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติอีกด้วย ผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่

รายงานถึงฤทธิ์เหนี่ยวนาการ สร้างไบโอฟิล์มของยา cloxacillin เช่นกัน (Kaplan *et al.*, 2012; Rattanakit *et al.*, 2022) จากการศึกษาของ (Kaplan *et al.*, 2012) พบว่ายา cloxacillin และ methicillin ซึ่งเป็นยากลุ่ม  $\beta$ -lactamase resistant penicillins ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MIC สามารถเหนี่ยวนาการสร้างไบโอฟิล์มได้ผ่านการเพิ่มการปลดปล่อย eDNA ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA และไม่พบฤทธิ์เหนี่ยวนาการสร้างไบโอฟิล์มของ ยาในเชื้อ MRSA สายพันธุ์ที่ไม่มีการแสดงออกของ autolysin ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเป็นต่อการปลดปล่อย eDNA และการเข้ายึดเกาะบนพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นการใช้ยากลุ่ม  $\beta$ -lactam antibiotics ในขนาดที่ไม่เหมาะสม สามารถส่งผลเสียในการเหนี่ยวนาการสร้างไบโอฟิล์มซึ่งจะทำให้การจัดการโรคติดเชื้อ MRSA มีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น สำหรับผลของยา vancomycin พบว่ามีเพียงยา vancomycin ที่ความเข้มข้นเท่ากับ MIC (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ซึ่งเป็นผลจากการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ส่วนยา vancomycin 15 ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC (<4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม และมีแนวโน้มเพิ่มการสร้างไบโอฟิล์ม ได้เช่นกัน โดยเฉพาะที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบที่ยามีฤทธิ์เหนี่ยวนาการสร้างไบโอฟิล์มได้ ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบว่ายา vancomycin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC สามารถเหนี่ยวนาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากแผลไฟไหม้เรื้อรังของผู้ป่วยได้ จากการเพิ่มปลดปล่อย membrane vesicle โดยมีปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ membrane vesicle เพิ่มขึ้น และเซลล์แบคทีเรียมีความชอบไขมัน (hydrophobicity) เพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้เซลล์แบคทีเรียมีความสามารถในการยึดเกาะบนพื้นผิวได้มากขึ้น (He *et al.*, 2017)

การให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา ampicillin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ทุก ความเข้มข้นที่ทดสอบพบว่าฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทุกเวลา ที่ทดสอบ (10, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง) อีกทั้งฤทธิ์ที่เกิดขึ้นนี้ยังสูงกว่าฤทธิ์ของสาร lupinifolin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) เพียง ชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย แสดงว่าการให้สารร่วมกันดังกล่าวทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์ต้านการสร้างไบโอฟิล์มเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อลดความเข้มข้นของสาร lupinifolin ลงเหลือ 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  พบว่าฤทธิ์ร่วมกันในการ ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มลดลงอย่างเห็นได้ชัด และไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเมื่อลดความเข้มข้นของสาร lupinifolin ลงเหลือเพียง 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เป็นที่น่าสนใจว่าการให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา vancomycin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ โดยมีฤทธิ์ที่ดีที่สุดที่เวลา 10 ชั่วโมงของการ



ทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร lupinifolin สามารถต้านฤทธิ์เหนี่ยวนำการสร้างไบโอฟิล์มของยา vancomycin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC เมื่อให้เป็นสารเดี่ยวได้ ฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มนี้พบได้เช่นกันเมื่อให้สาร lupinifolin ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร่วมกับยา cloxacillin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร lupinifolin สามารถต้านฤทธิ์เหนี่ยวนำการสร้างไบโอฟิล์มของยา cloxacillin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC เมื่อให้เป็นสารเดี่ยวได้เช่นเดียวกัน โดย พบฤทธิ์นี้ได้เป็นเวลา 10, 18 และ 24 ชั่วโมง แต่ไม่พบเป็นเวลา 36 ชั่วโมง แสดงว่าฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา cloxacillin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นไม่สามารถคงอยู่ได้ตลอดระยะเวลาของการสร้างไบโอฟิล์ม เมื่อลดความเข้มข้นของสาร lupinifolin ลงเหลือ 4 และ 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีผลทำให้ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยา cloxacillin หรือ vancomycin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มลดลงอย่างชัดเจน โดยยังคง พบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้เฉพาะที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ สำหรับการให้สาร lupinifolin และยา cloxacillin และไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มสำหรับการให้สาร lupinifolin ร่วมกับยา vancomycin ไม่ว่า ณ จุดเวลาใดของการทดสอบ ดังนั้นความเข้มข้นของสาร lupinifolin จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของการให้สารร่วมกัน จากการศึกษาของ (Rattanakit *et al.*, 2021) ได้รายงานว่าการให้สาร lupinifolin ร่วมกับยา ampicillin หรือ cloxacillin มีค่า FICI จากการทดสอบ checkerboard assay อย่างไร (FICI เท่ากับ 0.75) จึงคาดว่าฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม cell wall synthesis inhibitors เกิดจากผลโดยตรงของสารต่อกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม และไม่เกี่ยวข้องกับการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังนั้นโดยภาพรวมฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม cell wall synthesis inhibitors ขึ้นกับระดับความเข้มข้นของสาร lupinifolin และมีฤทธิ์ดีที่สุดในช่วงขั้นตอนแรกในการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิว ซึ่งควรต้องมีการศึกษาถึงกลไก การออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของการให้สาร lupinifolin ร่วมกับยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม cell wall synthesis inhibitors ว่ามีความเกี่ยวข้องกับการใดในขั้นตอนของการสร้างไบโอฟิล์ม

ปัจจุบันรายงานการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ร่วมกันของสารพฤษเคมีและยาต้านจุลชีพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะเชื้อ MRSA ยังคงมีอยู่อย่างจำกัด สาร thymol ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ได้ โดยมีผลลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มหลายชนิดได้แก่ *fnA*, *fnB*, *icaA*, *icaD* และ *hla*

นอกจากนี้ thymol ยังสามารถ เสริมฤทธิ์กับ rifampicin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อแบคทีเรียภายในไบโอฟิล์มที่สร้างขึ้นแล้ว (preformed biofilm) ได้ (Valliammai *et al.*, 2020)

สาร myricetin ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีกลุ่ม flavonoids ชนิด flavonols สามารถเสริมฤทธิ์ กับยา miconazole ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อรา *Candida albicans* ได้การให้ myricetin (80 µg/mL) ร่วมกับยา miconazole สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่าการให้ ยา miconazole (0.0625 - 8 µg/mL) เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่คาร์บอนของ การยับยั้งไบโอฟิล์มสูงที่ ประมาณ 94 - 99% (Mo *et al.*, 2020) สาร epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavonoids ชนิด catechins ที่ความเข้มข้น 0.3 µg/mL สามารถ เสริมฤทธิ์กับสารกลุ่ม cationic peptides คือ KR-12-a5 (0.6 µg/mL) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ อยู่ในรูปแบบไบโอฟิล์มได้ โดยสามารถเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ชนิดที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในคลองรากฟัน (endodontic infection) ได้แก่ *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii* และ *Fusobacterium nucleatum* ได้ (Caiiffa *et al.*, 2021) สารกลุ่ม antimicrobial cationic peptides (AMPs) ได้แก่ indolicidin, cecropin (1-7)-melittin A (2-9) amide (CAMA) และ nisin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC (1/10MIC) สามารถเสริมฤทธิ์กับยา ต้านแบคทีเรียหลาย ชนิด ได้แก่ daptomycin, linezolid, teicoplanin, ciprofloxacin และ azithromycin ในการต้านไบโอฟิล์มของ เชื้อ MRSA ได้ โดยมีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มประมาณ 40-50% และยับยั้งการเข้ายึดเกาะบนพื้นผิวได้ถึง ประมาณ 70-80% ทั้งนี้สารกลุ่ม AMPs ออกฤทธิ์ ต่อเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย โดยทำให้เกิด ion-permeable channel และเพิ่ม cytoplasmic membrane permeability (Mataraci and Dosler, 2012) จากการที่สาร lupinifolin ออกฤทธิ์ รบกวนการทำงานของเซลล์เมมเบรนได้เช่นกัน และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสาร lupinifolin เกิดขึ้นได้ดีที่สุดในระยะแรกของการสร้างไบโอฟิล์ม (ที่เวลา 10 ชั่วโมงของการทดสอบ) ซึ่งเป็นขั้นตอนของการเข้ายึดเกาะบนพื้นผิว ดังนั้นคาดว่าความสามารถในการออกฤทธิ์ทำลายหรือ รบกวนการทำงานของเซลล์เมมเบรนเป็นคุณสมบัติสำคัญของสาร lupinifolin ที่สามารถส่งเสริมให้ เกิดการเสริมฤทธิ์กับยาต้านแบคทีเรียในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA โดยส่งผลยับยั้ง การเข้ายึดเกาะบนพื้นผิวเป็นหลัก

โดยสรุปผลการทดลองครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสาร lupinifolin ในการยับยั้ง การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA เมื่อให้เป็นสารเดี่ยว และสาร lupinifolin ยังสามารถเสริม ประสิทธิภาพของยาต้านแบคทีเรีย กลุ่ม protein synthesis inhibitors และกลุ่ม cell wall synthesis inhibitors ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ของเชื้อ MRSA ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวของสาร lupinifolin เกิดขึ้นได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC การใช้สารที่ความเข้มข้นต่ำซึ่งยังไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการ เจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียมีข้อดีคือลดความเสี่ยงของพัฒนาการดื้อยาของเชื้อจากการเกิด

selective pressure (Craft *et al.*, 2019) การพัฒนาสาร lupinifolin เพื่อเป็นสารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของยาต้านแบคทีเรีย (antibacterial enhancer) ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มซึ่งเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค (virulence factor) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA ที่มีความน่าสนใจ อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ทั้งการศึกษาในหลอดทดลองที่สภาวะที่มีความคล้ายคลึงกับบริเวณของร่างกายที่มีการติดเชื้อ เช่น การศึกษาใน flow chamber system ที่มีการไหลของของเหลว (Sutipornpalangkul *et al.*, 2021) การศึกษาในสัตว์ทดลองที่เป็นแบบจำลองของการติดเชื้อ รวมทั้งการศึกษาทางคลินิก โดยเฉพาะการศึกษาด้านเภสัชจลนศาสตร์และความปลอดภัยระยะยาวในร่างกายมนุษย์

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้สามารถทราบถึงประสิทธิภาพการใช้ lupinifolin เมื่อให้เป็นสารเดี่ยว และเมื่อให้ร่วมกับยาต้านแบคทีเรีย และซึ่งทั้งหมดนี้ยังไม่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ อีกทั้งความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของการยับยั้งไบโอฟิล์มเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโต และมีฤทธิ์ดีที่สุดในช่วงขั้นตอนแรกในการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิว ซึ่งควรต้องมีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของการให้สาร lupinifolin ร่วมกับยาต้านแบคทีเรีย ว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการใดในขั้นตอนของการสร้างไบโอฟิล์ม

### 5.3 ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

- 1) ควรทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยอาจทำการทดสอบฤทธิ์ต่อการทำงานของเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ตัวอย่างเช่น ฤทธิ์ต่อการทำงานของเอนไซม์ sortase หรือ ฤทธิ์ต่อการสร้างและปลดปล่อย eDNA เป็นต้น
- 2) ควรทำการศึกษาฤทธิ์ของ lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ในสภาวะที่คล้ายกับสภาวะในร่างกายของมนุษย์ เช่นในสภาวะที่มีการไหลของของเหลว พื้นผิวที่ใช้ในการทดสอบใกล้เคียงกับสภาวะพื้นผิวในร่างกายของมนุษย์
- 3) ควรทำการศึกษาฤทธิ์ของ lupinifolin ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่อยู่ภายในไบโอฟิล์ม โดยการวัดการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ (viability assay) โดยการใช้วิธีการศึกษา เช่น MTT assay, resazurin assay เป็นต้น

- 4) ควรทำการศึกษาด้านเภสัชจลนศาสตร์ และความปลอดภัยในการใช้ระยะยาวในร่างกายมนุษย์
- 5) ควรทำการศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin กับยาต้านแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม โดยอาจเป็นยาต้านแบคทีเรียที่มีกลไกการออกฤทธิ์อื่นๆ นอกเหนือจากการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน หรือยาต้านแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่เป็นทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย MRSA



## บรรณานุกรม

กรวิชัย ไชยวงษ์ และ ทศพล วรรณรงค์. (2566).ฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin และยาต้านแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*. การศึกษาอิสระ หลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ขวัญชนก แจ่มอำพร, แสงตะวัน คำนวนอินทร์ และ อนุรักษ์ แทนสันเทียะ. (2566). ฤทธิ์ของสาร lupinifolin ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). การศึกษาอิสระ หลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการและบูรณาการงานด้านการต่อต้านจุลชีพ. ภูมิทัศน์ของสถานการณ์และการจัดการต่อต้านจุลชีพในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนดดีไซน์; 2558:135  
ประสาทร บิริสุทธิ, (2551). การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ, *เอกสาร*

*ประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มข ครั้งที่ 9 “สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้,”* 91-101.

[https://vet.kku.ac.th/semi9\\_2551/011-%BB%C3%D0%CA%BE%C3-%E9%D291-101\\_new.pdf](https://vet.kku.ac.th/semi9_2551/011-%BB%C3%D0%CA%BE%C3-%E9%D291-101_new.pdf)

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2552). ย่อเภสัชกรรมไทยและสรรพคุณสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ศิลป์สยามบรรณกิจและการพิมพ์ จำกัด.

อุทยานธรรมชาติวิทยาสิริรุกขชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ไซเอมเหนือ [อินเทอร์เน็ต]. 2553 [เข้าถึงเมื่อ 14 กรกฎาคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: [https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/siri/index.php?page=search\\_detail&medicinal\\_id=13](https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/siri/index.php?page=search_detail&medicinal_id=13)

Bakasatae, N., Kunworarath, N., Takahashi Yupanqui, C., Voravuthikunchai, S. P., & Joycharat, N. (2018). Bioactive components, antioxidant, and anti-inflammatory activities of the wood of *Albizia myriophylla*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(4), 444-450. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.05.010>

Beauduy, C. E., & Winston, L. G. (2022). Beta Lactam & Other Cell Wall & Membrane Active Antibiotics. 2022.

Biswas, R., Voggu, L., Simon, U. K., Hentschel, P., Thumm, G., & Götz, F. (2006). Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiology Letters*, 259(2), 260-268. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00281.x>

- Boonbumrung, K. (2018). Biofilm: Impact on Public Health. 46(2).
- Caiaffa, K. S., dos Santos, V. R., Abuna, G. F., Santos-Filho, N. A., Cilli, E. M., Sakai, V. T., Cintra, L. T. A., & Duque, C. (2021). Cytocompatibility and Synergy of EGCG and Cationic Peptides Against Bacteria Related to Endodontic Infections, in Planktonic and Biofilm Conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(6), 1808–1819. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09830-3>
- Cervantes-García, E., García-Gonzalez, R., Reyes-Torres, A., Resendiz-Albor, A. A., & Salazar-Schettino, P. M. (2015). *Staphylococcus aureus* small colony variants in diabetic foot infections. *Diabetic Foot and Ankle*, 6(December). <https://doi.org/10.3402/dfa.v6.26431>
- Chen, C., & Hooper, D. C. (2018). Effect of *Staphylococcus aureus* Tet38 native efflux pump on in vivo response to tetracycline in a murine subcutaneous abscess model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(3), 720–723. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx432>
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547–569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Chivapat, S., Chavalittumrong, P., Attawish, A., & Soonthornchareonnon, N. (2009). Toxicity Study of Lupinifolin from Stem of *Derris reticulata* Craib. *Medicinal Plant Research*, 7(2–3), 147–155.
- Craft, K. M., Nguyen, J. M., Berg, L. J., & Townsend, S. D. (2019). Methicillin-resistant: *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *MedChemComm*, 10(8), 1231–1241. <https://doi.org/10.1039/c9md00044e>
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2011). Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1–3), 243–248. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.014>
- Daod, N., Utarapichat, B., & Niyasom, C. (2015). Adhesin Genes and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Isolated from Community , Livestock and Hospital Settings in. 831–838.

- Dashtbani-Roozbehani, A., & Brown, M. H. (2021). Efflux pump mediated antimicrobial resistance by staphylococci in health-related environments: Challenges and the quest for inhibition. *Antibiotics*, 10(12).  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10121502>
- Dong, L., Tong, Z., Linghu, D., Lin, Y., Tao, R., Liu, J., Tian, Y., & Ni, L. (2012). Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(5), 390–395. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.009>
- Favre-Bonté, S., Köhler, T., & Van Delden, C. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: Role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 598–604.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkg397>
- Fujita, M., Shiota, S., Kuroda, T., Hatano, T., Yoshida, T., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2005). Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and  $\beta$ -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Immunology*, 49(4), 391–396. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03732.x>
- He, X., Yuan, F., Lu, F., Yin, Y., & Cao, J. (2017). Vancomycin-induced biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is associated with the secretion of membrane vesicles. *Microbial Pathogenesis*, 110, 225–231.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.004>
- Henry-Stanley, M. J., Hess, D. J., & Wells, C. L. (2014). Aminoglycoside inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm formation is nutrient dependent. *Journal of Medical Microbiology*, 63(PART 6), 861–869.  
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.068130-0>
- Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A., & Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436(7054), 1171–1175. <https://doi.org/10.1038/nature03912>
- Houston, P., Rowe, S. E., Pozzi, C., Waters, E. M., & O'Gara, J. P. (2011). Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated

- Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infection and Immunity*, 79(3), 1153–1165. <https://doi.org/10.1128/IAI.00364-10>
- Hulankova, R. (2022). The Influence of Liquid Medium Choice in Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils against Pathogenic Bacteria. *Antibiotics*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020150>
- Issarachot, P., Sangkaew, W., Sianglum, W., Saeloh, D., Limsuwan, S., Voravuthikunchai, S. P., & Joycharat, N. (2019).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory, antibacterial, and antioxidant activities of natural substances from the wood of *Derris reticulata* Craib. *Natural Product Research*, 35(17), 2858–2865. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1678610>
- Jahn, L. J., Munck, C., Ellabaan, M. M. H., & Sommer, M. O. A. (2017). Adaptive laboratory evolution of antibiotic resistance using different selection regimes lead to similar phenotypes and genotypes. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00816>
- Johnson, S. (2014). The effect of media selection on the fatty acid composition and membrane characteristics of *Staphylococcus aureus*. *ProQuest Dissertations and Theses*, 30.
- Joycharat, N., Boonma, C., Thammavong, S., Yingyongnarongkul, B. E., Limsuwan, S., & Voravuthikunchai, S. P. (2016). Chemical constituents and biological activities of *Albizia myriophylla* wood. *Pharmaceutical Biology*, 54(1), 62–73. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1014920>
- Joycharat, N., Issarachote, P., Sontimuang, C., & Voravuthikunchai, S. P. (2018). Alpha-glucosidase inhibitory activity of ethanol extract, fractions and purified compounds from the wood of *Albizia myriophylla*. *Natural Product Research*, 32(11), 1291–1294. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1333990>
- Joycharat, N., Thammavong, S., Limsuwan, S., Homlaead, S., Voravuthikunchai, S. P., Yingyongnarongkul, B. E., Dej-Adisai, S., & Subhadhirasakul, S. (2013). Antibacterial substances from *Albizia myriophylla* wood against cariogenic *Streptococcus mutans*. *Archives of Pharmacal Research*, 36(6), 723–730. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0085-7>



- Kaplan, J. B. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *International Journal of Artificial Organs*, 34(9), 737–751. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000027>
- Kaplan, J. B., Izano, E. A., Gopal, P., Karwacki, M. T., Kim, S., Bose, J. L., Bayles, K. W., & Horswill, A. R. (2012). Low levels of  $\beta$ -Lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *MBio*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00198-12>
- Kennedy, C. A., & O’Gara, J. P. (2004). Contribution of culture media and chemical properties of polystyrene tissue culture plates to biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 53(11), 1171–1173. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45764-0>
- Kumar, R., Gupta, Y. K., Singh, S., & Arunraja, S. (2016). *Picrorhiza kurroa* Inhibits Experimental Arthritis Through Inhibition of Pro-inflammatory Cytokines, Angiogenesis and MMPs. *Phytotherapy Research*, 30(1), 112–119. <https://doi.org/10.1002/ptr.5509>
- Lade, H., Park, J. H., Chung, S. H., Kim, I. H., Kim, J. M., Joo, H. S., & Kim, J. S. (2019). Biofilm formation by *staphylococcus aureus* clinical isolates is differentially affected by glucose and sodium chloride supplemented culture media. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/jcm8111853>
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 1–103.
- Laoprasobwittaya, K. (2017). Rational use of medicines. *ภาควิชาการเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*, 1.
- Limsuwan, S., Moosigapong, K., Jarukitsakul, S., Joycharat, N., Chusri, S., Jaisamut, P., & Voravuthikunchai, S. P. (2018). Lupinifolin from *Albizia myriophylla* wood: A study on its antibacterial mechanisms against cariogenic *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, 93(June 2017), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.10.013>
- Mahdiyoun, S. M., Kazemian, H., Ahanjan, M., Houri, H., & Goudarzi, M. (2016). Frequency of aminoglycoside-resistance genes in methicillin-resistant *staphylococcus*

- aureus* (MRSA) isolates from hospitalized patients. Jundishapur Journal of Microbiology, 9(8). <https://doi.org/10.5812/jjm.35052>
- Mahidol, C., Prawat, H., Ruchirawat, S., Lihkitwitayawuid, K., Lin, L. Z., & Cordell, G. A. (1997). Prenylated flavanones from *Derris reticulata*. Phytochemistry, 45(4), 825–829. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00001-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00001-0)
- Mataraci, E., & Dosler, S. (2012). In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56(12), 6366–6371. <https://doi.org/10.1128/AAC.01180-12>
- Matilla-Cuenca, L., Gil, C., Cuesta, S., Rapún-Araiz, B., Žiemytė, M., Mira, A., Lasa, I., & Valle, J. (2020). Antibiofilm activity of flavonoids on staphylococcal biofilms through targeting BAP amyloids. Scientific Reports, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75929-2>
- Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H., & Schneewind, O. (1999). *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. Science, 285(5428), 760–763. <https://doi.org/10.1126/science.285.5428.760>
- McCarthy, H., Rudkin, J. K., Black, N. S., Gallagher, L., O'Neill, E., & O'Gara, J. P. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *staphylococcus aureus*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 5(January), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00001>
- Mlynarczyk-Bonikowska, B., Kowalewski, C., Krolak-Ulinska, A., & Marusza, W. (2022). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. International Journal of Molecular Sciences, 23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158088>
- Mombeshora, M., Chi, G. F., & Mukanganyama, S. (2021). Antibiofilm Activity of Extract and a Compound Isolated from *Triumfetta welwitschii* against *Pseudomonas aeruginosa*. Biochemistry Research International, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9946183>
- Moormeier DE, B. K. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. Mol Microbiol. The Laryngoscope, 2, 2–31.

- Nitulescu, G., Margina, D., Zanfirescu, A., Olaru, O. T., & Nitulescu, G. M. (2021). Targeting bacterial sortases in search of anti-virulence therapies with low risk of resistance development. *Pharmaceuticals*, 14(5).  
<https://doi.org/10.3390/ph14050415>
- O’Gara, J. P. (2007). *ica* and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(2), 179–188. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>
- O’Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D. A., Loughman, A., Foster, T. J., & O’Gara, J. P. (2008). A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 3835–3850. <https://doi.org/10.1128/JB.00167-08>
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 1.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
- Oh, I., Yang, W. Y., Chung, S. C., Kim, T. Y., Oh, K. B., & Shin, J. (2011). In vitro sortase A inhibitory and antimicrobial activity of flavonoids isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *Archives of Pharmacal Research*, 34(2), 217–222.  
<https://doi.org/10.1007/s12272-011-0206-0>
- Oshida, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Hong, Y. M., Suginaka, H., & Tomasz, A. (1995). A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase domain: Cloning, sequence analysis, and characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(1), 285–289.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.285>
- Osorio, M., Carvajal, M., Vergara, A., Butassi, E., Zacchino, S., Mascayano, C., Montoya, M., Mejías, S., Martín, M. C. S., & Vásquez-Martínez, Y. (2021). Prenylated flavonoids with potential antimicrobial activity: Synthesis, biological activity, and in silico study. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11).  
<https://doi.org/10.3390/ijms22115472>
- P. Tegos, G., Haynes, M., Jacob Strouse, J., Md. T. Khan, M., G. Bologna, C., I. Oprea, T., &

- A. Sklar, L. (2012). Microbial Efflux Pump Inhibition: Tactics and Strategies. *Current Pharmaceutical Design*, 17(13), 1291–1302.  
<https://doi.org/10.2174/138161211795703726>
- Poole, K. (2012). Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(9), 2069–2089.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dks196>
- Prasch, S., & Bucar, F. (2015). Plant derived inhibitors of bacterial efflux pumps: an update. *Phytochemistry Reviews*, 14(6), 961–974.  
<https://doi.org/10.1007/s11101-015-9436-y>
- Prawat, H., Mahidol, C., & Ruchirawat, S. (2000). Reinvestigation of *Derris reticulata*. *Pharmaceutical Biology*, 38(SUPPL.), 63–67.  
<https://doi.org/10.1076/phbi.38.6.63.5960>
- Pulbutr, P., Thongrak, K., Thitprapai, A., Rattanakiat, S., Mudjupa, C., & Jaruchotikamon, A. (2020). Inhibitory Actions of Lupinifolin Isolated from *Derris reticulata* Stem against Carbohydrate-Digesting Enzymes. *Pharmacognosy Research*, 12(4), 404–408. <https://doi.org/10.4103/pr.pr>
- Que, Y. A., & Moreillon, P. (2011). Infective endocarditis. *Nature Reviews Cardiology*, 8(6), 322–336. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.43>
- Rattanakiat, S., Kaewchang, K., Thongsang, S., Jaruchotikamol, A., & Pulbutr, P. (2021). Synergistic activity of lupinifolin in combinations with antibiotics against *staphylococcus aureus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 24(6), 656–662.  
<https://doi.org/10.3923/pjbs.2021.656.662>
- Rattanakiat, S., Taensantia, A., Jaemamporn, K., Khamnuanin, S., Mudjupa, C., Jaruchotikamol, A., & Pulbutr, P. (2022). Antibiofilm Formation Activity of Lupinifolin Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 25(11), 961–970.  
<https://doi.org/10.3923/pjbs.2022.961.970>
- Roccaro, A. S., Blanco, A. R., Giuliano, F., Rusciano, D., & Enea, V. (2004). Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrobial Agents and*

- Chemotherapy, 48(6), 1968–1973. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.1968-1973.2004>
- Schilcher, K., Andreoni, F., Haunreiter, V. D., Seidl, K., Hasse, B., & Zinkernagel, A. S. (2016). Modulation of *Staphylococcus aureus* biofilm matrix by subinhibitory concentrations of clindamycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 5957–5967. <https://doi.org/10.1128/AAC.00463-16>
- Selvaraj, A., Jayasree, T., Valliammai, A., & Pandian, S. K. (2019). Myrtenol Attenuates MRSA Biofilm and Virulence by Suppressing sarA Expression Dynamism. *Frontiers in Microbiology*, 10(September), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02027>
- Sianglum, W., Muangngam, K., Joycharat, N., & Voravuthikunchai, S. P. (2019). Mechanism of action and biofilm inhibitory activity of lupinifolin against multidrug-resistant enterococcal clinical isolates. *Microbial Drug Resistance*, 25(10), 1391–1400. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0391>
- Soonthornchareonnon, N., Ubonopas, L., Kaewsuwan, S., & Wuttiudomlert, M. (2004). Lupinifolin , a bioactive flavanone from *Myriopteron extensum* (Wight) K. Schum. stem. *Thai Journal of Phytopharmacy*, 11(2), 19–28.
- Sriaudtha, P. (2006). skin and soft tissue infections, SSTIs. 1–20.
- Suga, T., Ishii, T., Iwatsuki, M., Yamamoto, T., Nonaka, K., Masuma, R., Matsui, H., Hanaki, H., O'mura, S., & Shiomi, K. (2012). Aranorosin circumvents arbekacin-resistance in MRSA by inhibiting the bifunctional enzyme AAC(6')/APH(2). *Journal of Antibiotics*, 65(10), 527–529. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.53>
- Sutipornpalangkul, W., Nishitani, K., & Schwarz, E. M. (2021). Quantitative flow chamber system for evaluating in vitro biofilms and the kinetics of *S. aureus* biofilm formation in human plasma media. *BMC Microbiology*, 21(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02379-9>
- Tao, J., Yan, S., Zhou, C., Liu, Q., Zhu, H., & Wen, Z. (2021). Total flavonoids from *Potentilla kleiniana* Wight et Arn inhibits biofilm formation and virulence factors production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Ethnopharmacology*, 279(June), 114383. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114383>

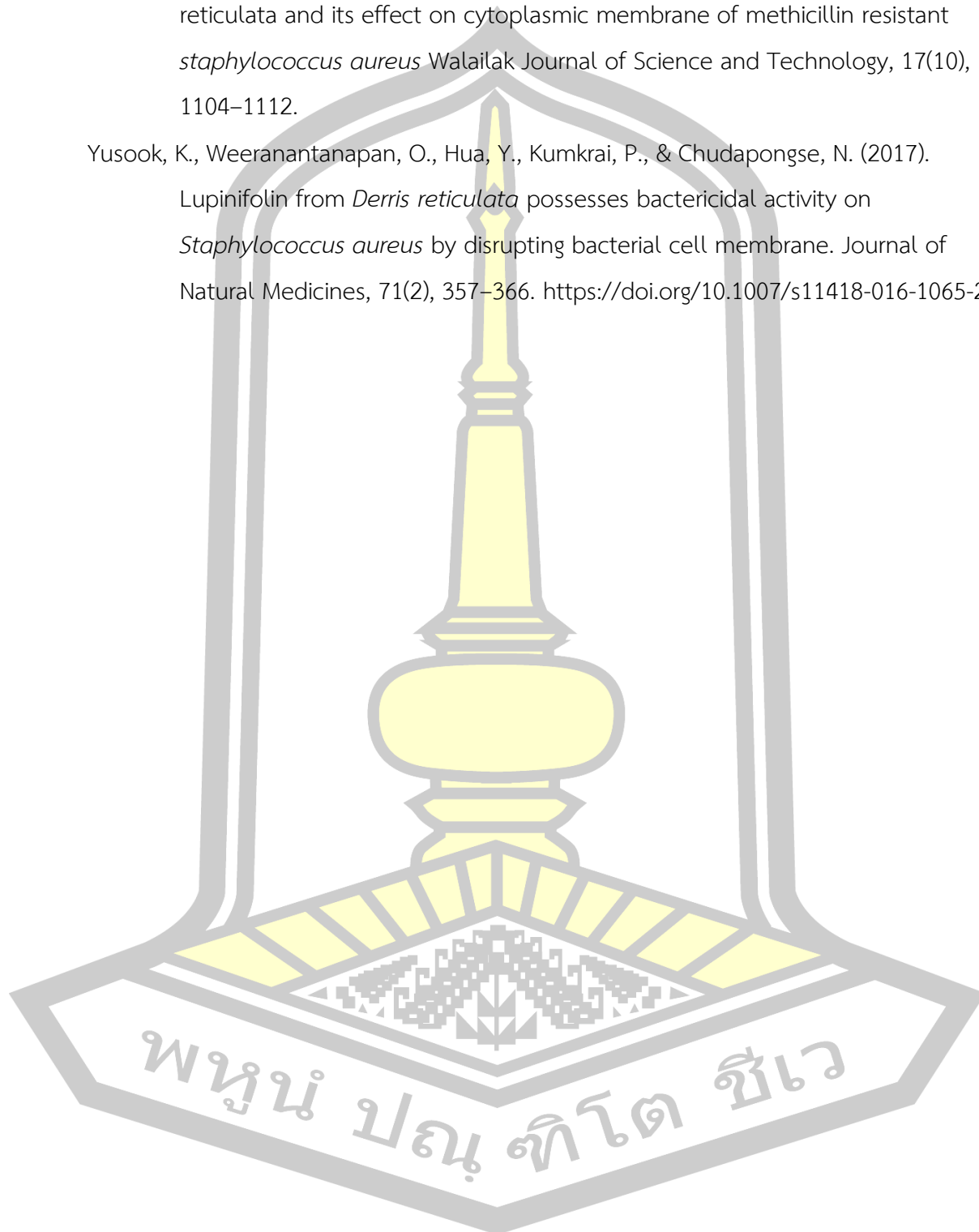
- Tateda, K., Comte, R., Pechere, J. C., Köhler, T., Yamaguchi, K., & Van Delden, C. (2001). Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), 1930–1933. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1930-1933.2001>
- Tewtrakul, S., Cheenpracha, S., & Karalai, C. (2009). Nitric oxide inhibitory principles from *Derris trifoliata* stems. *Phytomedicine*, 16(6–7), 568–572. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.015>
- Truong-Bolduc, Q. C., Dunman, P. M., Strahilevitz, J., Projan, S. J., & Hooper, D. C. (2005). MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 187(7), 2395–2405. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2395-2405.2005>
- Truong-Bolduc, Q. C., Villet, R. A., Estabrooks, Z. A., & Hooper, D. C. (2014). Native efflux pumps contribute resistance to antimicrobials of skin and the ability of *staphylococcus aureus* to colonize skin. *Journal of Infectious Diseases*, 209(9), 1485–1493. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit660>
- Valliammai, A., Selvaraj, A., Yuvashree, U., Aravindraja, C., & Karutha Pandian, S. (2020). sarA-Dependent Antibiofilm Activity of Thymol Enhances the Antibacterial Efficacy of Rifampicin Against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 11(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01744>
- Van de Vel, E., Sampers, I., & Raes, K. (2019). A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3), 357–378. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1371112>
- Vuong, C., Kocianova, S., Yao, Y., Carmody, A. B., & Otto, M. (2004). Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. *Journal of Infectious Diseases*, 190(8), 1498–1505. <https://doi.org/10.1086/424487>
- Waditzer, M., & Bucar, F. (2021). Flavonoids as inhibitors of bacterial efflux pumps. *Molecules*, 26(22). <https://doi.org/10.3390/molecules26226904>
- Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2–3), 97–110.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>

- Wang, L., Li, Q., Li, J., Jing, S., Jin, Y., Yang, L., Yu, H., Wang, D., Wang, T., & Wang, L. (2021). Eridictyol as a Potential Candidate Inhibitor of Sortase A Protects Mice From Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*-Induced Pneumonia. *Frontiers in Microbiology*, 12(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.635710>
- Wecke, J., Johannsen, L., & Giesbrecht, P. (1990). Reduction of wall degradability of clindamycin-treated staphylococci within macrophages. *Infection and Immunity*, 58(1), 197–204. <https://doi.org/10.1128/iai.58.1.197-204.1990>
- Weinrick, B., Dunman, P. M., McAleese, F., Murphy, E., Projan, S. J., Fang, Y., & Novick, R. P. (2004). Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 186(24), 8407–8423. <https://doi.org/10.1128/JB.186.24.8407-8423.2004>
- Wisetsutthichai, S., Techamahamaneerat, S., Junyaprasert, V., & Soonthornchareonnon, N. (2005). Gel preparation development from *Derris reticulata* Craib. extract as anti-herpes simplex drug. *Thai Journal of Phytopharmacy*, 12(2), 11–22. [http://www.medplant.mahidol.ac.th/publish/journal/ebooks/j12\(2\)11-22.pdf](http://www.medplant.mahidol.ac.th/publish/journal/ebooks/j12(2)11-22.pdf)
- Yadegar, A., Sattari, M., Mozafari, N. A., & Goudarzi, G. R. (2009). Prevalence of the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes and methicillin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 15(2), 109–113. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0897>
- Yang, B., Lei, Z., Zhao, Y., Ahmed, S., Wang, C., Zhang, S., Fu, S., Cao, J., & Qiu, Y. (2017). Combination susceptibility testing of common antimicrobials in vitro and the effects of Sub-MIC of antimicrobials on *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02125>
- Ye, Y., Yang, Q., Fang, F., & Li, Y. (2015). The camelliagenin from defatted seeds of *Camellia oleifera* as antibiotic substitute to treat chicken against infection of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0529-z>

Yusook, K., & Panvongsa, P. (2020). Antibacterial activity of lupinifolin from *derris reticulata* and its effect on cytoplasmic membrane of methicillin resistant *staphylococcus aureus* Walailak Journal of Science and Technology, 17(10), 1104–1112.

Yusook, K., Weeranantanapan, O., Hua, Y., Kumkrai, P., & Chudapongse, N. (2017). Lupinifolin from *Derris reticulata* possesses bactericidal activity on *Staphylococcus aureus* by disrupting bacterial cell membrane. Journal of Natural Medicines, 71(2), 357–366. <https://doi.org/10.1007/s11418-016-1065-2>



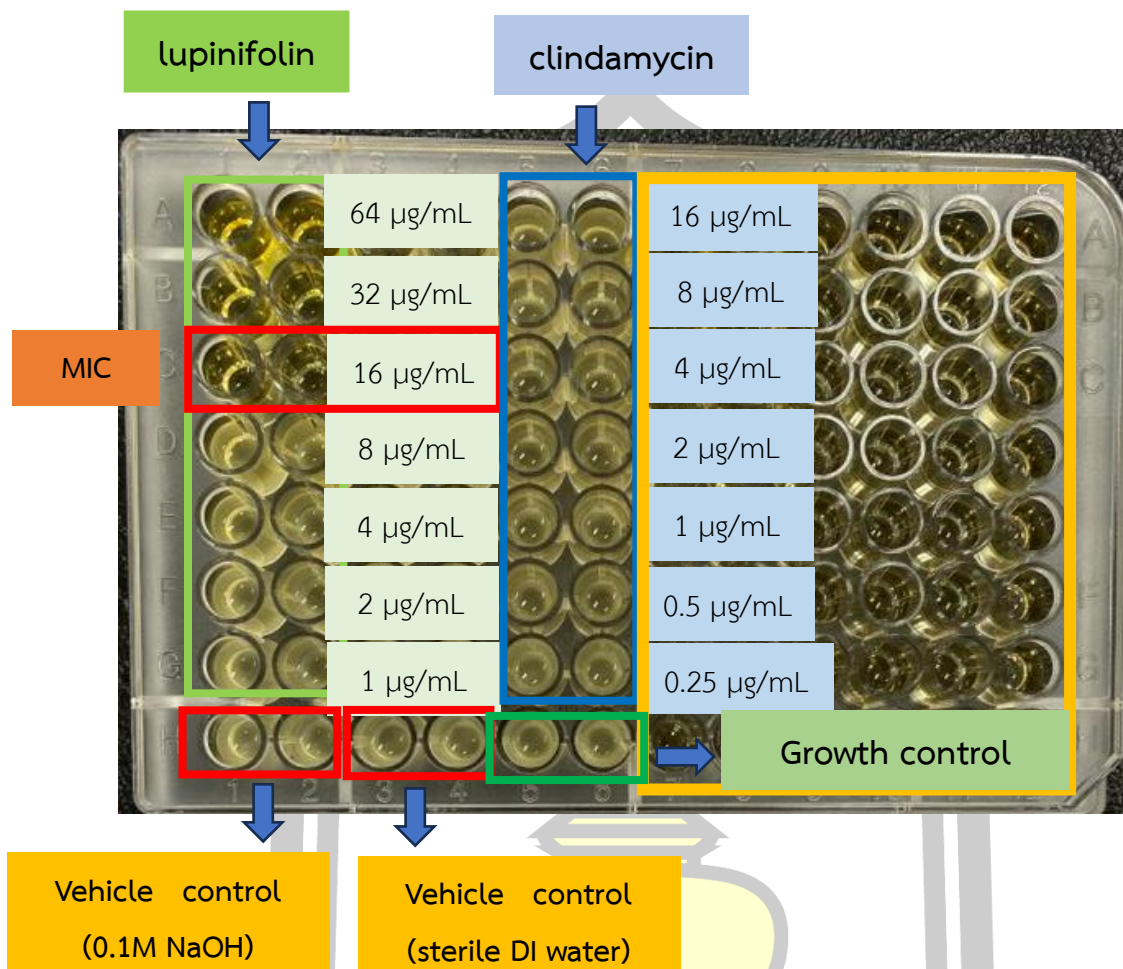




ภาคผนวก ก

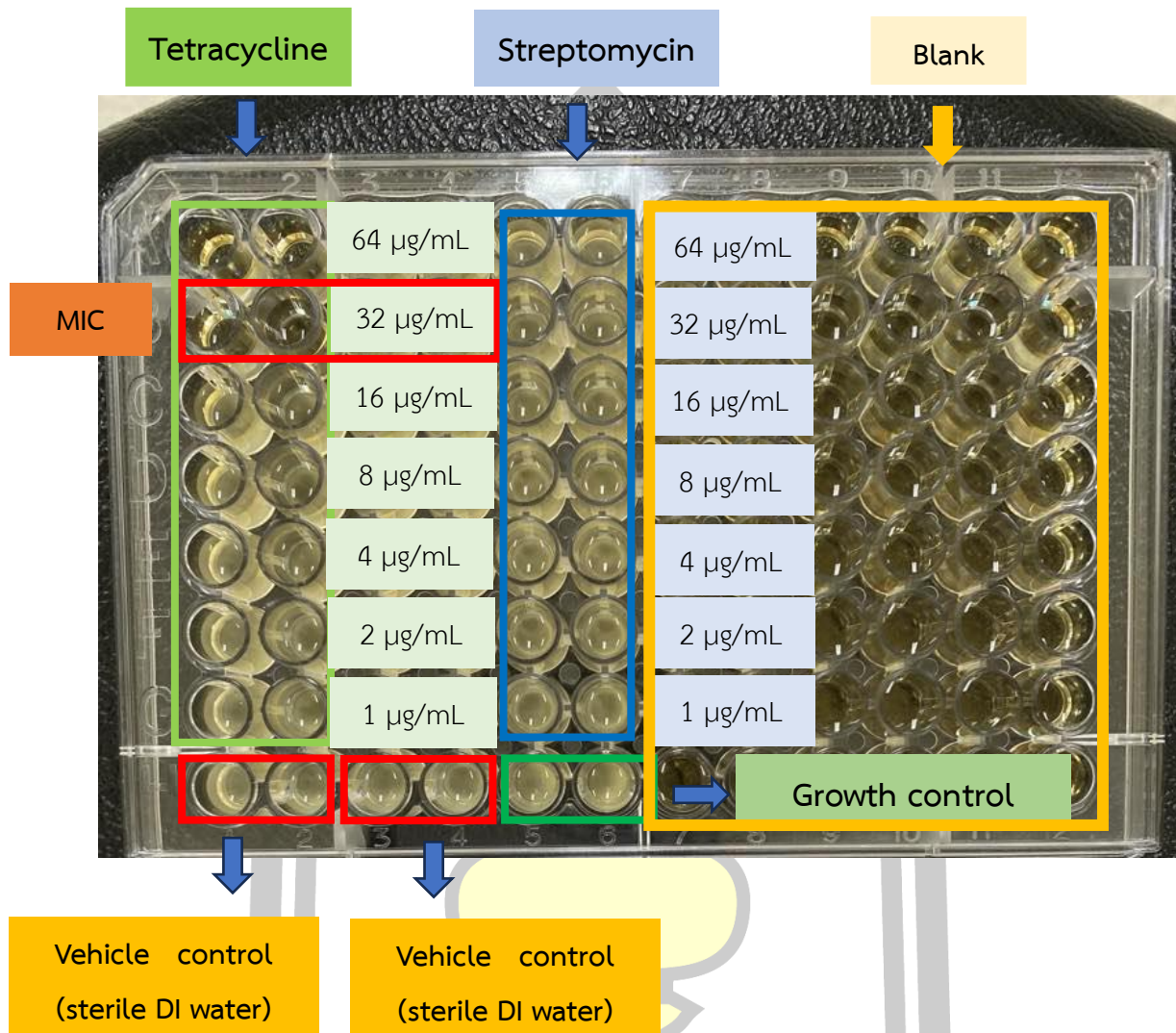
ภาพตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย MRSA ของสาร lupinifolin, ยาต้านแบคทีเรีย  
กลุ่ม protein synthesis inhibitor และยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม cell wall synthesis  
inhibitors

พหุณฺ ปณฺ ทิโต ชีเว



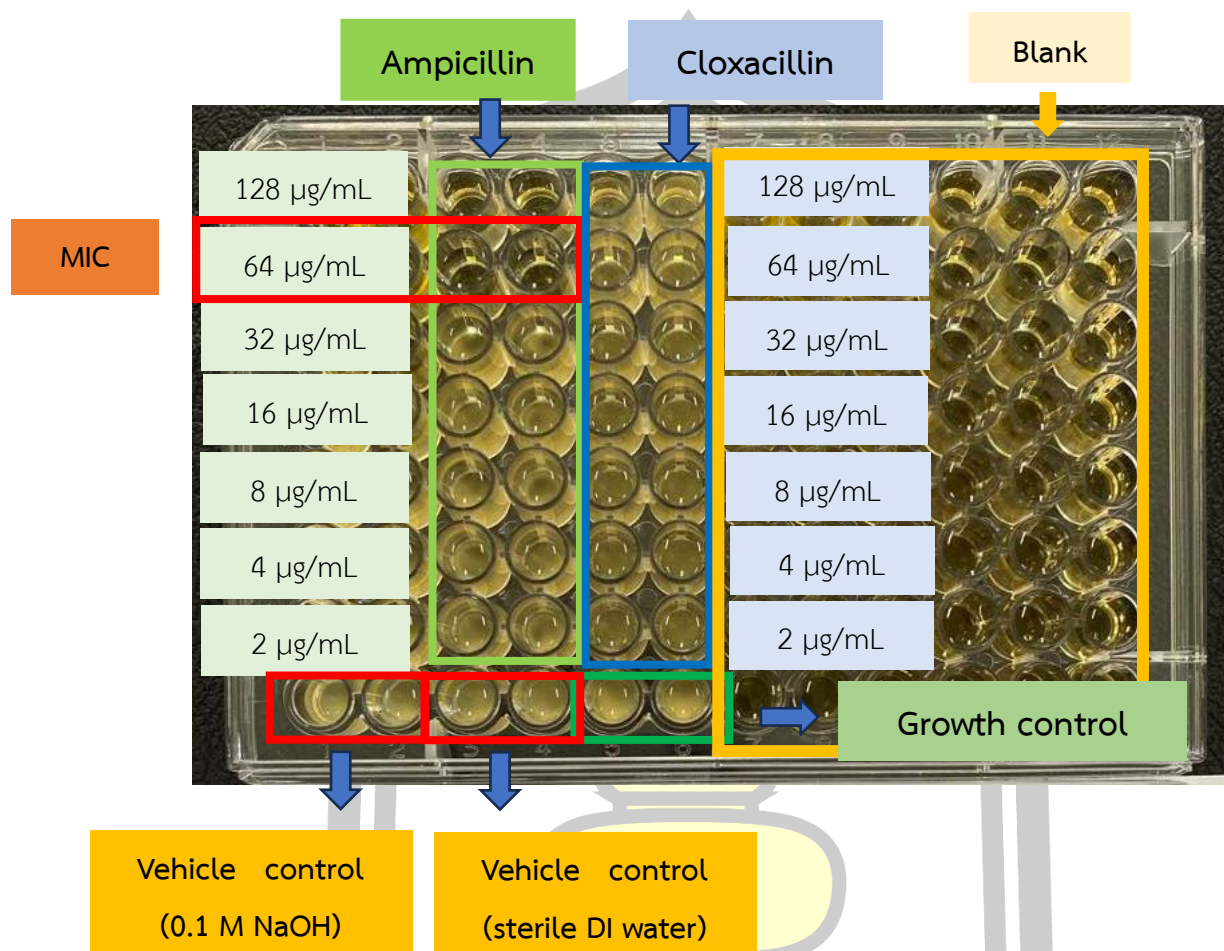
ภาพประกอบที่ 1 ภาพตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย MRSA ของสาร lupinifolin และยา clindamycin ที่เวลาที่ 24 ชั่วโมง

พหุ ประถม ชาติ โตะ ชีวะ



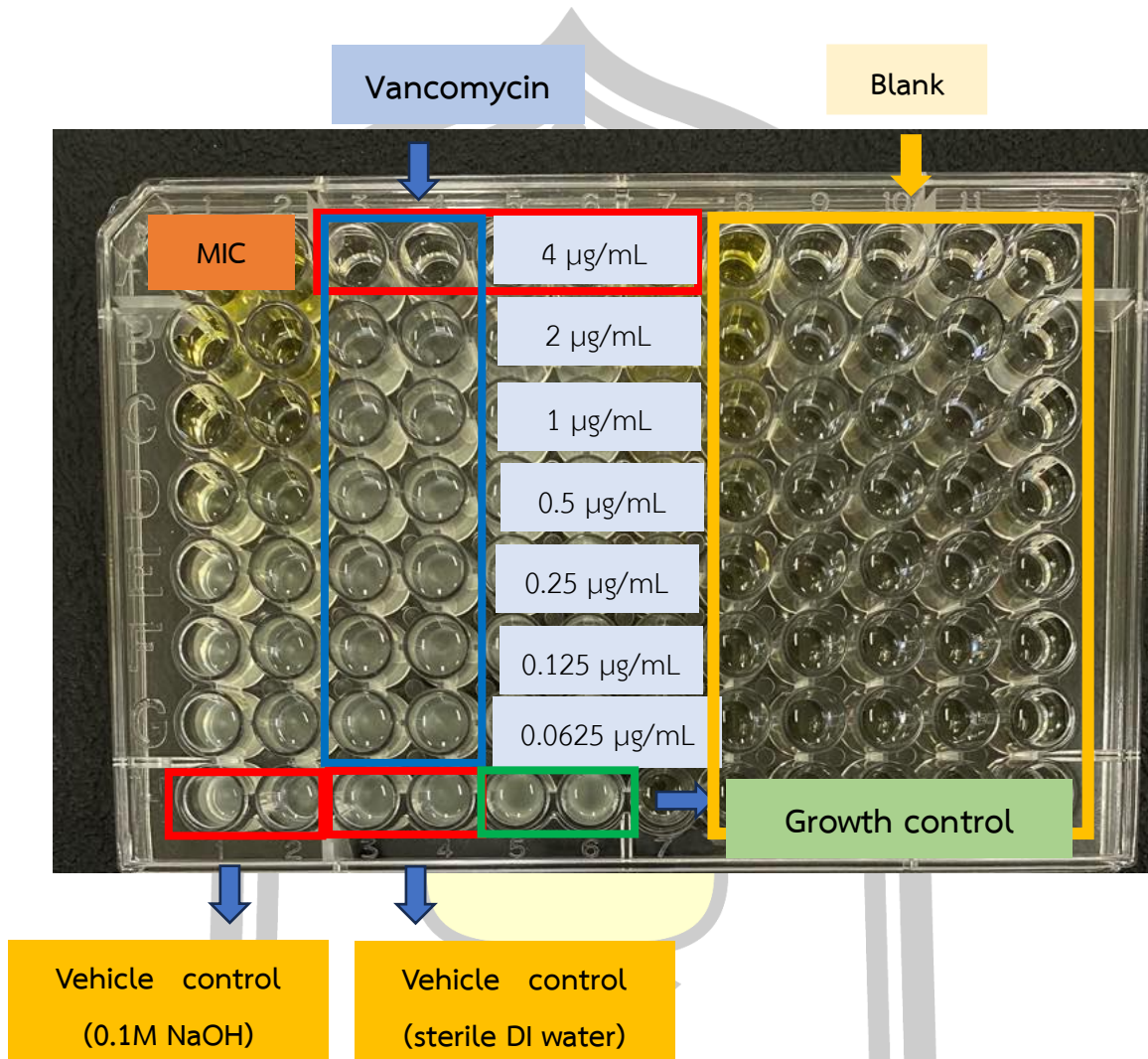
ภาพประกอบที่ 2 ภาพตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย MRSA ของยา tetracycline และยา streptomycin ที่เวลาที่ 24 ชั่วโมง

พหุ ประถม ศึกษาศาสตร์



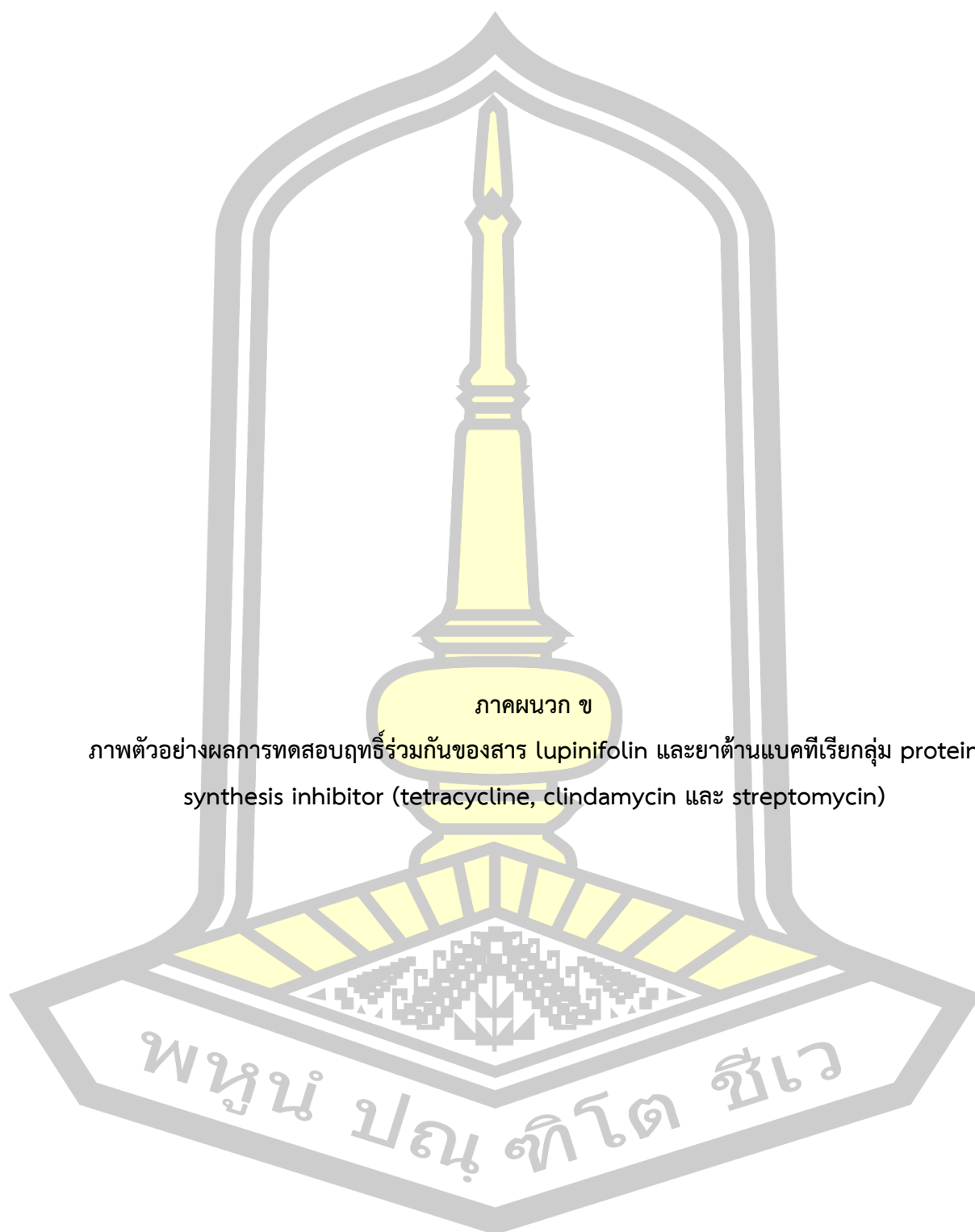
ภาพประกอบที่ 3 ภาพตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย MRSA ของยา ampicillin และยา cloxacillin ที่เวลาที่ 24 ชั่วโมง

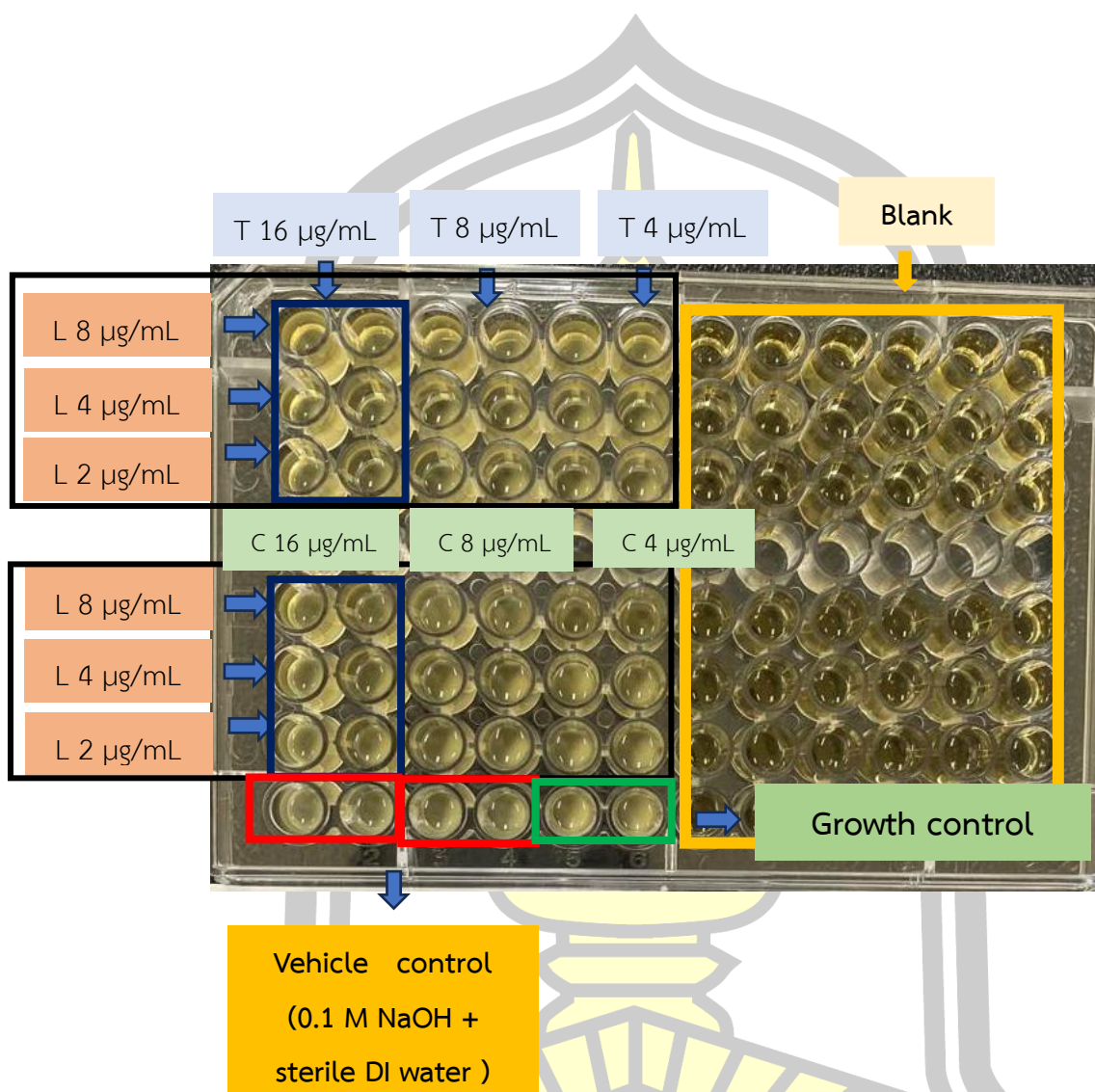
พหุ ประถม ศึกษาศาสตร์



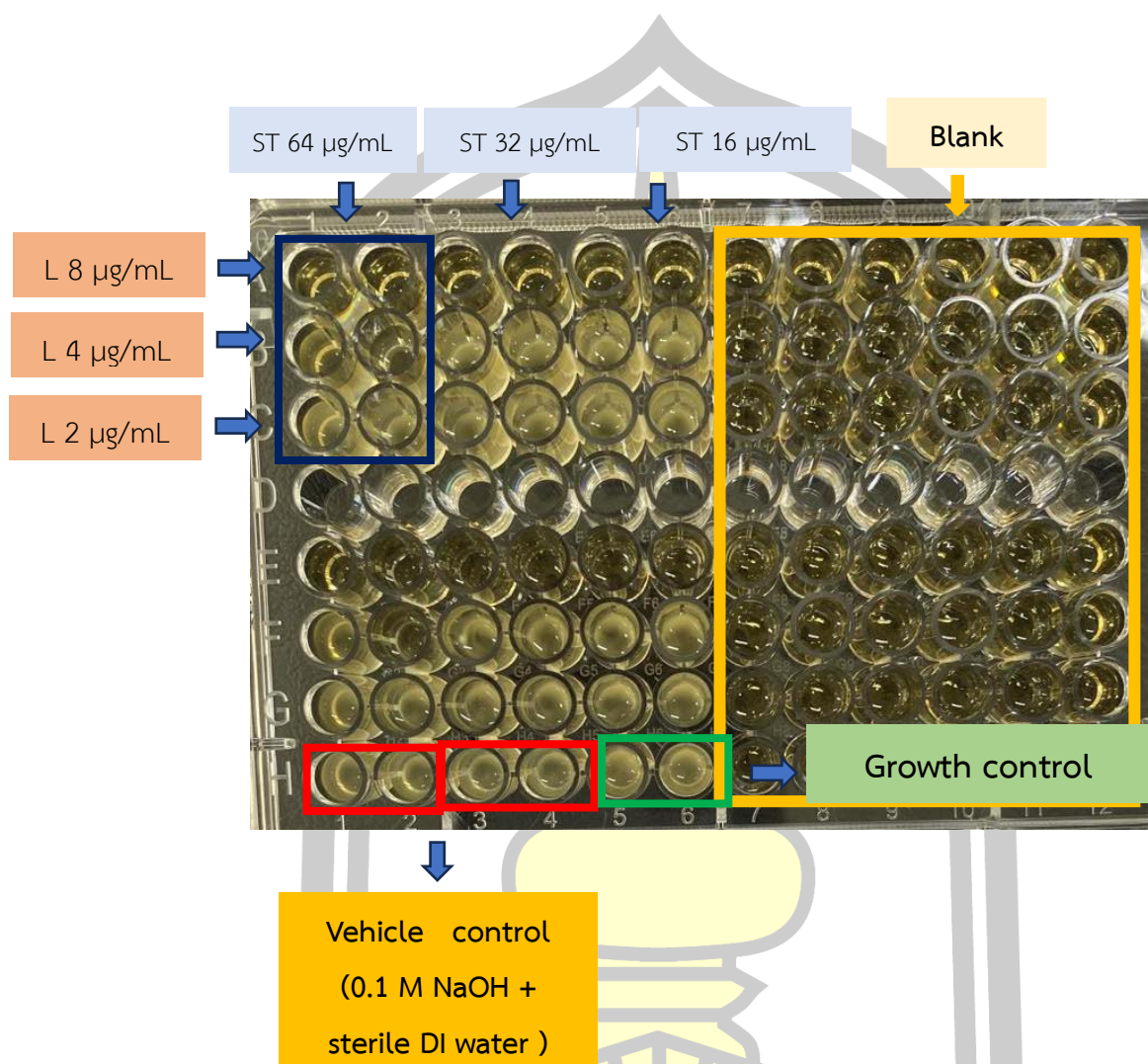
ภาพประกอบที่ 4 ภาพตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย MRSA ของยา vancomycin ที่เวลาที่ 24 ชั่วโมง

พหุบัน ปณุ ทิโต ชีเว



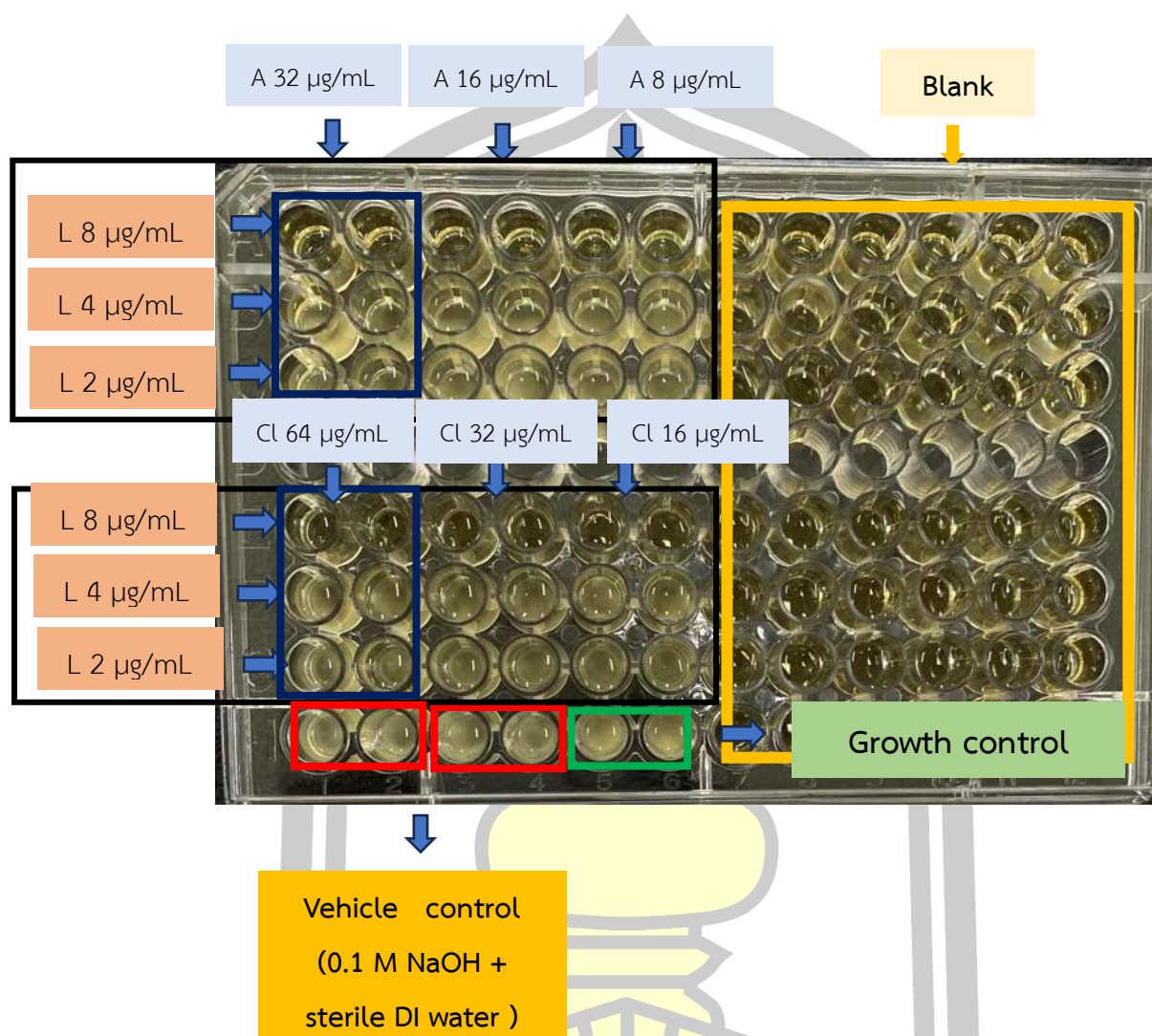


ภาพประกอบที่ 5 ภาพตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ได้แก่ 8, 4 และ 2  $\mu\text{g/mL}$  และยาต้านแบคทีเรีย tetracycline ที่ความเข้มข้น 16, 8 และ 4  $\mu\text{g/mL}$  (กรอบภาพด้านบน) และยาต้านแบคทีเรีย clindamycin ที่ความเข้มข้น 16, 8 และ 4  $\mu\text{g/mL}$  (กรอบภาพด้านล่าง) ในการต้านแบคทีเรีย MRSA เวลาที่ 24 ชั่วโมง  
หมายเหตุ L = lupinifolin, T = tetracycline และ C = clindamycin

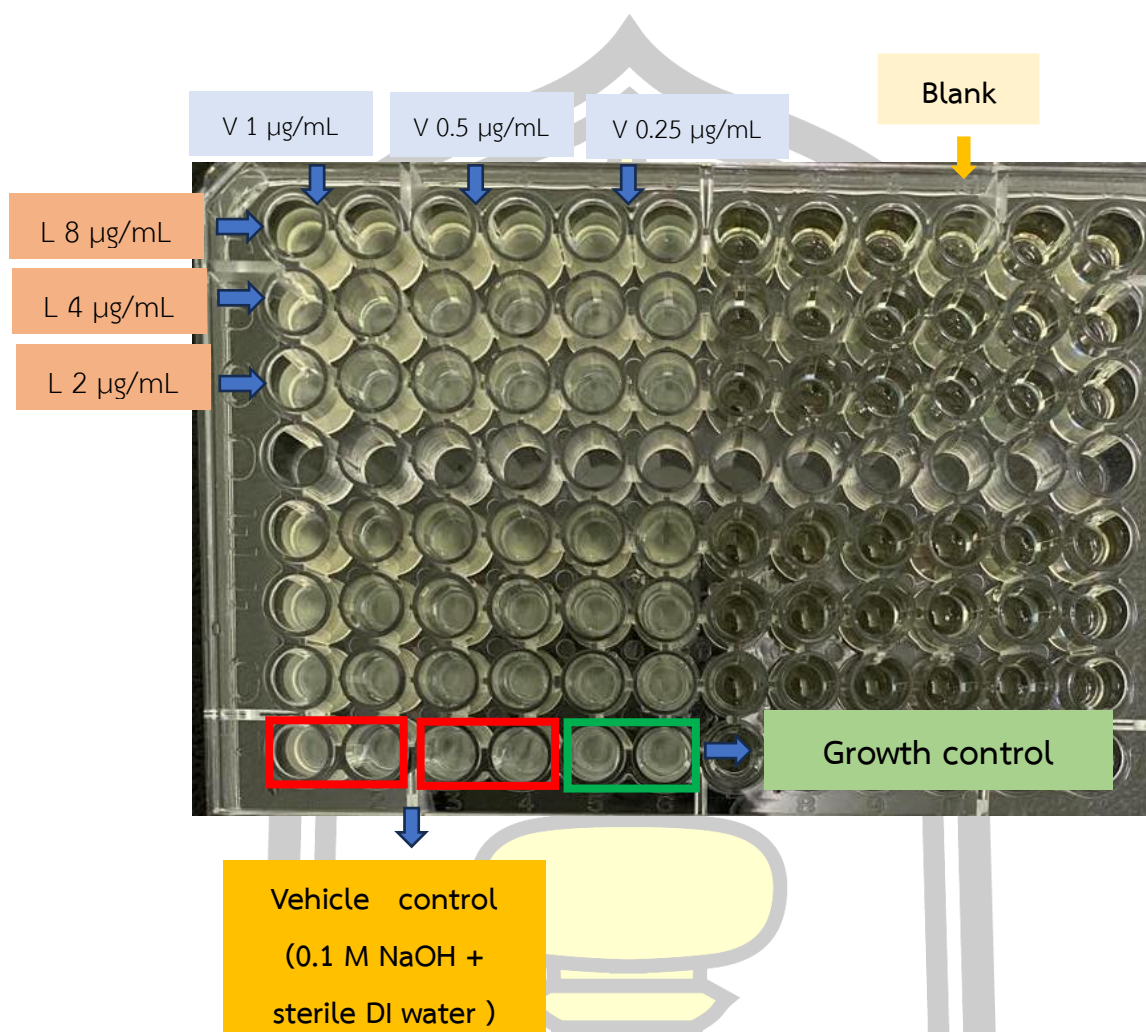


ภาพประกอบที่ 6 ภาพตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ได้แก่ 8,4 และ 2 µg/mL และยาต้านแบคทีเรีย streptomycin ที่ความเข้มข้น 64, 32 และ 16 µg/mL ในการต้านแบคทีเรีย MRSA เวลาที่ 24 ชั่วโมง  
หมายเหตุ L = lupinifolin และ st = streptomycin





ภาพประกอบที่ 7 ภาพตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ได้แก่ 8, 4 และ 2 µg/mL และยาต้านแบคทีเรีย ampicillin ที่ความเข้มข้น 32, 16 และ 8 µg/mL (ภาพด้านบน) และยาต้านแบคทีเรีย cloxacillin ที่ความเข้มข้น 64, 32 และ 16 µg/mL (ภาพด้านล่าง) ในการต้านแบคทีเรีย MRSA เวลาที่ 24 ชั่วโมง  
หมายเหตุ L = lupinifolin, A = ampicillin และ CL = cloxacillin



ภาพประกอบที่ 8 ภาพตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร lupinifolin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ได้แก่ 8, 4 และ 2  $\mu\text{g/mL}$  และยาต้านแบคทีเรีย vancomycin ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.25  $\mu\text{g/mL}$  ในการต้านแบคทีเรีย MRSA เวลาที่ 24 ชั่วโมง  
 หมายเหตุ L = lupinifolin และ V = vancomycin

พจนานุกรม ปณฺ ทั โท ชีเว

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวปาริชาติ แขวงเมือง
วันเกิด	วันที่ 16 มิถุนายน พ.ศ. 2541
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 24 หมู่ 7 บ้านหลุบ ตำบลหลุบ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ รหัสไปรษณีย์ 46000
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	แพทย์แผนไทย
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงพยาบาลนามน เลขที่ 183 หมู่ 7 ตำบลนามน อำเภอนามน จังหวัด กาฬสินธุ์ รหัสไปรษณีย์ 46230
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2563 ปริญญาการแพทย์แผนไทยบัณฑิต (พท.บ.) สาขาวิชา การแพทย์แผนไทย วิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุข กาญจนาภิเษก พ.ศ. 2566 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาสมุนไพร และการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	-
ผลงานวิจัย	-

พจนัน ปณฺ ทิโต ชีเว