

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ของลูปินิฟอลินจากลำต้นชะเอมเหนือ

กมล อยู่สุข*

สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000

*ผู้รับผิดชอบบทความ: vetgetmoonlight@gmail.com

บทคัดย่อ

ปัจจุบัน การปนเปื้อนในอาหาร มีสาเหตุมาจากเชื้อโรคหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย ไวรัส และพยาธิต่าง ๆ เชื้อ *Bacillus cereus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบมีการปนเปื้อนในอาหารในอัตราสูง และพบบ่อย เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ ทำให้ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อมีอาการท้องเสียและอาเจียน การรักษาในปัจจุบัน จะใช้ยาด้านเชื้อ ซึ่งเป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นและนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมาก การคิดค้นยาชนิดใหม่ ที่สกัดได้จากพืชสมุนไพร จึงมีประโยชน์ในการลดปัญหานี้ ดังนั้น การศึกษานี้จึงได้ทำการสกัดหาสารลูปินิฟอลิน ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ จากลำต้นชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) โดยใช้วิธี Soxhlet extraction ด้วยเฮกเซน และวิธีตกผลึกเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารที่สกัดได้ เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *B. cereus* จากการวิจัยในครั้งนี้พบว่า สารลูปินิฟอลิน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ทำให้เกิด inhibition zone เมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion ทดสอบหาฤทธิ์การต้านเชื้อด้วยวิธี Microdilution method มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 8 และ 16 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สังเกตเห็นเซลล์แบคทีเรียมีลักษณะบวม มีการทำลายของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* ดังนั้น สารลูปินิฟอลิน ที่สกัดได้จากลำต้นชะเอมเหนือ น่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาด้านเชื้อแบคทีเรียได้ในอนาคต

คำสำคัญ : ลูปินิฟอลิน, ชะเอมเหนือ, บาซิลลัส ซีเลียส

Abstract

Antibacterial Activity Against *Bacillus cereus* of Lupinifolin from the Stem of *Derris reticulata* Craib.

Kamol Yusook*

Public health programme, Phetchabun Rajabhat university, Phetchabun 67000, Thailand

*Corresponding author: vetgetmoonlight@hotmail.com

Bacillus cereus is the bacterium commonly causes food poisoning in human. The contamination of *Bacillus cereus* in food has been found at a high rate. This study aimed to investigate the antibacterial effects of lupinifolin, a bioactive compound extracted from *Derris reticulata* against this pathogen. Lupinifolin showed the inhibitory effect in *B.cereus* growth both on MHB agar cultured-bacteria and Disc diffusion method different from ampicillin ($p < 0.05$). Furthermore, Microdilution method showed MIC and MBC of the pure compound were 8 and 16 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Under electron microscope, lupinifolin was found to be capable of destroying cell wall and swelling cell membrane of *Bacillus cereus*. In conclusion, the present results suggests that lupinifolin might exert its anti-*B.cereus* activity by altering the normal functions of cell wall and cell membrane. Thus, lupinifolin could be a potential compound for the development of antibacterial drugs in the future.

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

บทนำ

ปัจจุบันการปนเปื้อนในอาหาร มีสาเหตุมาจากเชื้อโรคหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย ไวรัส และพยาธิต่าง ๆ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Food poisoning) จากรายงานการเฝ้าระวังโรค สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ตั้งแต่ 1 มกราคม 2559 - 20 มิถุนายน 2559 พบผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษจากการรับประทานอาหารปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจำนวน 58,168 คน ทั่วประเทศ คิดเป็นอัตราป่วย 88.91 ต่อแสนประชากร เชื้อ *Bacillus cereus* เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่พบมีการปนเปื้อนอยู่ในอาหาร และเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ ทำให้ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อมีอาการท้องเสียและอาเจียน การ

รักษาในปัจจุบัน จะใช้ยาต้านจุลชีพ ซึ่งเป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นและนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการรักษาเป็นจำนวนมาก จากข้อมูลของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) พบว่าประเทศไทยมีการนำเข้าและผลิตยาปฏิชีวนะกว่า 20 % ของยาทั้งหมด หรือประมาณ 2 หมื่นล้านบาทต่อปี การคิดค้นยาชนิดใหม่ที่สกัดได้จากพืชสมุนไพร จึงเป็นวิถึทางหนึ่งของการพึ่งตนเอง และลดความสิ้นเปลืองทางเศรษฐกิจจากการนำเข้ายาจากต่างประเทศ

โรคอาหารเป็นพิษ มีสาเหตุมาจากปัจจัยหลายอย่าง อาจเกิดจากมีการปนเปื้อนสารพิษหรือเชื้อโรคในอาหาร *B. cereus* เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่เป็นสาเหตุของโรคนี้^[1,2] ส่วนใหญ่พบได้ในอาหารประเภท

หมักดอง โดยจะทำให้ผู้ที่ได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย เกิดอาการอาเจียนและท้องเสีย อาการอาเจียนเกิดจากการได้รับสารพิษชนิดที่มีความคงทนเป็นกรด - ด่าง สูง ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น มักปรากฏอาการภายหลังจากบริโภคอาหารที่มีสารพิษเข้าไป 30 นาทีถึง 6 ชั่วโมงต่อมาจะถ่ายอุจจาระเหลว โดยทั่วไปอาการจะทุเลาลงภายใน 24 ชั่วโมง

B. cereus เป็นแบคทีเรียที่พบในดิน มีลักษณะและรูปร่าง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง (rod) เจริญได้ดีทั้งในสภาพมีและไม่มีออกซิเจน ส่วนใหญ่การปนเปื้อนมักเกิดจากมีสปอร์ปนเปื้อนลงไปในอาหารที่ได้รับการปรุงไม่เหมาะสม เมื่อสปอร์เจริญเป็น Vegetative cell จะสร้างสารพิษ (Enterotoxin) และทำให้เกิดโรคเมื่อบริโภคอาหารนั้นเข้าไป ปริมาณที่ก่อโรคได้คือ มากกว่า 10^6 เซลล์ต่อกรัม อาหาร นอกจากดินแล้วยังพบเชื้อได้ใน สิ่งแวดล้อมอื่น ได้แก่ อากาศ ฝุ่น สาร Enterotoxin เป็นสารพิษประเภทโปรตีน ที่ถูกสร้างโดยจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กตอนล่าง มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เยื่อบุผนังลำไส้ ส่วนใหญ่เป็นสารพิษที่ขับออกมาโดยแบคทีเรียที่ไปทำให้เกิดรูพรุนในเซลล์เมมเบรน มีผลทำให้เซลล์ตายหลังจากเซลล์บุผนังลำไส้เล็กตาย ของเหลวต่าง ๆ จึงไหลออกมา ทำให้เกิดอาการท้องร่วง ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สร้าง Enterotoxin ได้แก่ *E. coli* 0157:H7, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Rota virus* และ *Yersinia enterocolitica* สารพิษที่สร้างโดย *B. cereus* มีสองชนิด คือ ชนิดที่ทำให้ท้องร่วง (Diarrhea toxin) ซึ่งเป็น Enterotoxin และชนิดที่ทำให้อาเจียน (Emetic toxin)

ชะเอมเหนื่อ (*Derris reticulata* Craib.) หรือ อ้อยสามสวน เป็นพืชที่ให้สารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์

เทอร์ปีนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน และสารประกอบฟีนอลิก เป็นไม้เลื้อย สรรพคุณทางแพทย์แผนไทย ใช้แก้ไอและขับเสมหะ พบได้ทุกภาคของประเทศไทย สารที่เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ คือ สารฟลาโวนอยด์ที่มีชื่อว่า ลูบินฟอลิน^[3] ซึ่งมีอยู่ในส่วนของลำต้นในปริมาณร้อยละ 0.55 เป็นที่ทราบกันแพร่หลายว่า สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์สำคัญหลายอย่าง เช่น ด้านเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ และด้านการอักเสบ^[4] ดังนั้น หากสารที่เป็นส่วนประกอบหลักในชะเอมเหนื่อมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคอาหารเป็นพิษ จะเป็นข้อมูลสนับสนุนให้มีในการพัฒนาพืชสมุนไพรที่ทำได้ง่ายตามท้องถิ่น มาเป็นยารักษาโรคทดแทนการใช้ยาที่ผลิตจากสารเคมี ซึ่งเป็นวิธีทางหนึ่งของการพึ่งตนเอง และลดความสิ้นเปลืองทางเศรษฐกิจจากการนำเข้ายาจากต่างประเทศ

การรักษาโรคด้วยพืชสมุนไพร เป็นภูมิปัญญาของชาวบ้านทั่วทุกท้องถิ่น โดยเฉพาะในประเทศไทยมีพืชสมุนไพรหลายชนิดทั้งที่ทำได้ทั่วไปตามบ้านและหาได้ยาก เพราะอาจอยู่ในป่าลึก แต่มีคุณประโยชน์มหาศาลทางด้านการแพทย์แผนไทย ชะเอมเหนื่อ (*Derris reticulata* Craib.) เป็นพืชที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส แบคทีเรีย และมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด^[5] สารที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในพืชเหล่านี้ ส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มฟลาโวนอยด์ อย่างไรก็ตาม การตรวจหาสารที่เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในพืชสมุนไพรเป็นสิ่งสำคัญ ที่นำไปสู่การพัฒนาและวิจัยเพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ ทำให้มีการยอมรับและเพิ่มความปลอดภัยต่อผู้ใช้อย่างมากขึ้น ดังนั้น การวิจัยนี้ จึงทำการศึกษาสารลูบินฟอลิน ที่สกัดได้จากลำต้นชะเอมเหนื่อ เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. Cereus* สาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ

ที่พบได้บ่อยในปัจจุบัน ผลของการศึกษาสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียได้ในอนาคตต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. การเตรียมตัวอย่างลำต้นชะเอมเหนือ

นำลำต้นของชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) จากป่าสมุนไพโร จังหวัดปราจีนบุรี ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปอบใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ลำต้นที่อบแล้วเก็บไว้ในที่แห้งไม่มีความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลอง

2. การทดสอบความบริสุทธิ์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารลูปินิฟอลิน

ลำต้นชะเอมเหนือที่ตัดเป็นชิ้นเล็กจำนวน 60 กรัม นำมาสกัดด้วยเฮกเซน โดยใช้ Soxhlet extractor หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้นำมาล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง นำส่วนที่เป็นชั้นของเฮกเซนแยกออกมาแล้วทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Crystallization หลังจากนั้นทดสอบความบริสุทธิ์ของสารเบื้องต้นด้วยวิธี Thin layer chromatography บนแผ่น Silica gel G₆₀ F₂₅₄ อะลูมิเนียม โดยใช้ Dichloromethane: Methanol ในอัตราส่วน 95:5^[6] และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารลูปินิฟอลินเหมือนกับการศึกษาของ กมล อยู่สุขและคณะ^[7]

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

3.1 วิธี Disc diffusion

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคือ *Bacillus cereus* (TISTR 687) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Mueller-Hinton Broth (MHB) บ่มเชื้อให้เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง^[8] แล้วนำมาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85 % NaCl เทียบความขุ่นกับ 0.5 McFarland เพื่อให้ได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 108 cfu/ml หลังจากนั้น ป้ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Agar (MHA) วางแผ่นกระดาษกรอง What man No.1 ขนาด 6 มิลลิเมตร ที่มีสารลูปินิฟอลิน จำนวน 25, 50, และ 75 µg/disc ตามลำดับ วิธีการเตรียม disc ให้มีลูปินิฟอลินปริมาณดังกล่าว ทำได้โดยละลายสารลูปินิฟอลิน 2 mg/ml ด้วย 0.1 N NaOH แล้วปิเปตลงบนแผ่น disc ทันทึปริมาณ 12.5, 25 และ 37.5 µl ตามลำดับ ใช้ 0.1 N NaOH และยาปฏิชีวนะ Ampicillin เป็น Vehicle control และ Positive control ตามลำดับ นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้อบเพาะเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาด inhibition zones รอบแผ่นกระดาษ กรองแล้วบันทึกผล ทำการทดลอง 3 ครั้ง

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

ทำการทดสอบด้วยวิธี Microdilution method ในหลุมเพาะเลี้ยงเชื้อ 96 well plate^[9] ละลายสารลูปินิฟอลิน ใน 0.1 N NaOH แล้วเติมลงในหลุมเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ให้มีความเข้มข้นของสารลูปินิฟอลินตั้งแต่ 0.25 - 512 µg/ml ด้วยวิธี two-fold serial dilutions หลังจากนั้นเติมเชื้อ *Bacillus cereus* ให้มีจำนวนเชื้อสุดท้ายในหลุมทดลองเท่ากับ 5×10⁵ cfu/ml การทดลองด้วยวิธีนี้ใช้ยาปฏิชีวนะ Ampicillin, 0.1 N NaOH และหลุมที่ไม่ใส่สารลูปินิฟอลิน เป็น positive, vehicle control และ negative control ตามลำดับ นำหลุมเพาะเลี้ยงเชื้อ 96 well plate ไป บ่มในตู้อบ

เพาะเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย หรือ ไม่เกิดความขุ่น วิเคราะห์ค่า MBC ด้วยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อจากหลุมที่ไม่เกิดความขุ่นไปเพาะเลี้ยงเชื้อบน MHA แล้วนำไปป้อนในตู้อบเพาะเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่เห็นเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโต จะเป็นค่า MBC การทดลองทุกวิธีจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน หรือ Transmission electron microscope (TEM) มีประโยชน์ในการศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อแบคทีเรียแบบตัดขวาง สามารถมองเห็นองค์ประกอบที่เปลี่ยนแปลง หลังได้รับสารลูปีนฟอลิน ได้แก่ cell wall, cell membrane และลักษณะโครงสร้างภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย^[10] ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบกับสารตัวอย่างแล้วจะล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer (PBS, pH 7.2) ทำการ fixed ตัวอย่างด้วย 0.25% glutaraldehyde ล้างด้วย 0.1 M PBS อีกครั้ง แล้ว fixed ด้วย 1% osmium tetroxide หลังจากนั้น dehydrate ด้วย acetone จากความเข้มข้น 20% -100% นำตัวอย่างไปแทนที่ด้วย Spurr's resin เพื่อเก็บตัวอย่างให้อยู่ในแท่งพลาสติก นำไปตัด section ด้วยเครื่อง ultramicrotome ให้ตัวอย่างอยู่บนแผ่น copper grids ย้อมสีด้วย 2% uranyl acetate และ lead citrate แล้วตรวจตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพื่อดู

ลักษณะของเซลล์แบคทีเรีย

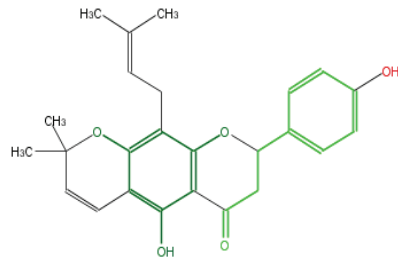
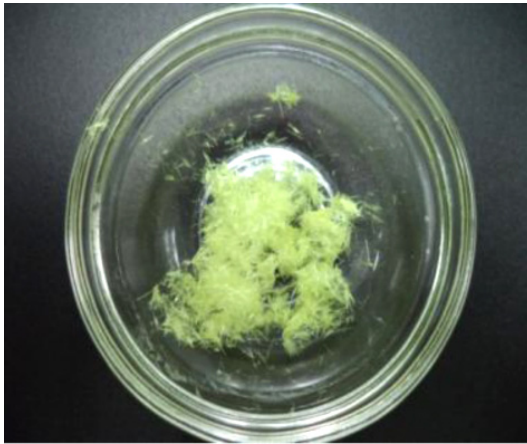
ผลการศึกษา

จากการสกัดลำต้นชะเอมเหนือ เพื่อหาสารลูปีนฟอลิน ด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย และวิธีการ Crystallization จะได้ผลึกสีเหลืองรูปเข็ม (รูปที่ 1) ปริมาณ 250 มิลลิกรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 0.4 ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของสารชนิดนี้ ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้น ด้วยวิธี TLC (รูปที่ 2) และได้ศึกษาข้อมูลผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารลูปีนฟอลิน ดังตารางที่ 1

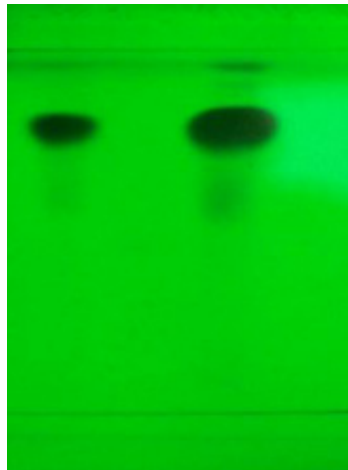
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Disc diffusion วัดค่า inhibition zone ได้ผลดังตารางที่ 2 พบว่า สารลูปีนฟอลิน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* โดยมีขนาด inhibition zone ที่ 50 µg/disc เท่ากับ Ampicillin และที่ 75 µg/disc มีขนาดใหญ่กว่า

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อด้วยวิธี Microdilution method ได้ค่า MIC เท่ากับ 8 µg/ml และ ค่า MBC เป็น 16 µg/ml ตามลำดับดังตารางที่ 3

ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ดังรูปที่ 3 พบว่า เซลล์ของ *B. cereus* ที่เติมสารลูปีนฟอลิน มีลักษณะเปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับเซลล์แบคทีเรียปกติที่ไม่ได้เติมสารสกัด โดยลักษณะที่สังเกตเห็น มีรูปร่างบวม และบางเซลล์จะติดสีเข้ม ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่เยื่อหุ้มเซลล์ และผนังเซลล์ถูกทำลาย



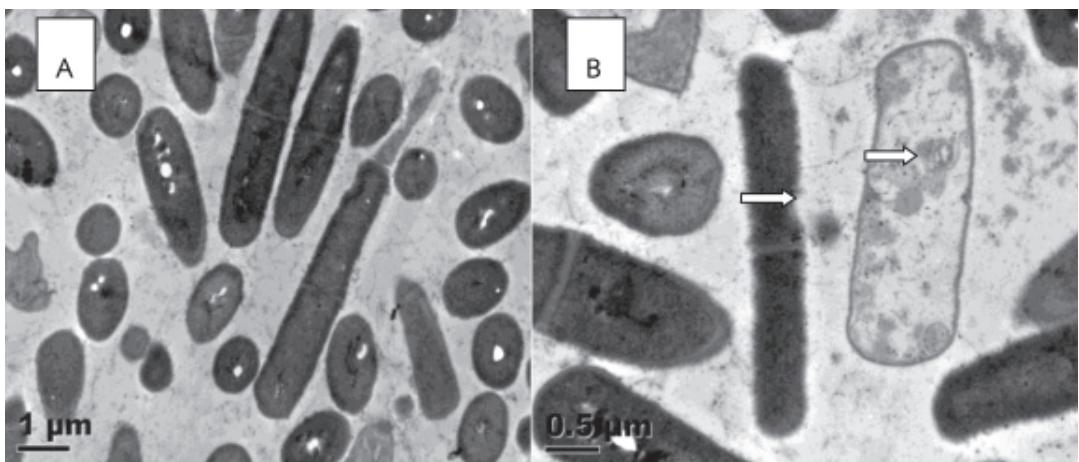
รูปที่ 1 ผลึกสีเหลืองรูปเข็ม และรูปโครงสร้างทางเคมี ของสารลูปีนิฟอลิน



Lupinifolin

Rf = 0.85

รูปที่ 2 ผล TLC โครมาโตแกรม Silica gel G₆₀ F₂₅₄ อะลูมิเนียม ดูภายใต้แสง UV



รูปที่ 3 เชื้อ *B. cereus* ก่อนเติมสารสกัด (A: Control) หลังจากเติมสารลูปีนิฟอลิน มีลักษณะบวม และเซลล์แตกที่เรียกว่าขนาดเล็กลง (B)

ตารางที่ 1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารลูปีโนลีน

Position	Yellow needle-shaped compound ^a		Lupinifolin ^b	
	δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm)
4	196.68		196.84	
7	159.75		160.13	
8a	159.53		159.44	
5	157.50		156.48	
4'	156.56		156.09	
3'''	130.99		131.11	
1'	129.62		130.60	
2'/6'	127.56	7.32 (d, 8.4)	127.66	7.31 (d, 8.4)
3''	125.91	5.50 (d, 10.0)	126.02	5.52 (d, 10.1)
2'''	122.56	5.14 (dd, 7.2,7.2)	122.40	5.16 (dd, 7.2,7.2)
4''	115.67	6.64 (d, 10.0)	115.53	6.64 (d, 10.1)
3'/5'	115.67	6.87 (d, 8.4)	115.53	6.89 (d, 8.4)
8	108.59		108.73	
6	102.70		102.79	
4a	102.69		102.61	
2	78.80	5.34 (dd, 12.8,2.8)	78.47	5.33(dd, 12.6,3.0)
2''	78.05		78.20	
CDCl ₃	77.37			
CDCl ₃	77.11			
CDCl ₃	76.86			
3	43.23	3.04 (dd,17.6,12.8) 2.80 (dd,17.6,3.0)	42.97	3.06(dd,17.1,12.6) 2.81 (dd,17.1,3.0)
6''	28.39	1.45 (s)	28.25	1.46 (s)
5''	28.29	1.44 (s)	28.33	1.45 (s)
4'''	25.80	1.65 (s)	25.78	1.66 (s)
1'''	21.47	3.21 (d, 7.2)	21.42	3.22 (d, 7.2)
5'''	25.80	1.65 (s)	25.78	1.66 (s)
5-OH	12.24 (s)		12.24 (s)	

^a Recorded in CDCl₃ at 500 MHz for ¹H-NMR and 125 MHz for ¹³C-NMR^b Recorded in CDCl₃ at 300 MHz for ¹H-NMR and 75.6 MHz for ¹³C-NMR, cited in (Mahidol et al., 1997)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Disc diffusion

แบคทีเรีย	Diameter of inhibitions zone (mm)			
	Lupinifolin (μg)		Ampicillin (μg)	
	25	50	75	10
<i>B. cereus</i>	10 ± 1.1	13 ± 0.6	25 ± 0.6	13 ± 0.6

(n=3, $\pm$ SD)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย (MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC)

แบคทีเรีย	Lupinifolin		Ampicillin	
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>B.cereus</i>	8	16	8	16

(n=3)

อภิปรายผล

การสกัดหาสารลูปีนิฟอลิน จากลำต้นชะเอมเหนือ (*D. reticulata* Craib.)^[11] พบว่า สารที่สกัดได้มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลือง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารชนิดนี้ สอดคล้องกับการสกัดหาสารลูปีนิฟอลินในลำต้นชะเอม *Myriopteron extensum* (Wight) K. Schum. ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* เช่นกัน^[12] ในการศึกษาที่ผ่านมา สารลูปีนิฟอลิน จัดเป็นสารประเภทฟลาโวนอยด์ในกลุ่มฟลาโวนอน ซึ่งพบมากในพืชสมุนไพร และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เมื่อนำสารชนิดนี้ มาทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ผลการวิจัย พบว่า ลูปีนิฟอลินสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยทำให้เกิด inhibition zones บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB เมื่อเปรียบเทียบกับยา Ampicillin พบว่า แผ่น disc ที่มีปริมาณลูปีนิฟอลิน 50 $\mu\text{g/disc}$ เกิด inhibition zone เท่ากับ Ampicillin

10 $\mu\text{g/disc}$ ในขณะที่แผ่น disc ที่มีปริมาณลูปีนิฟอลิน 25 $\mu\text{g/disc}$ เกิด inhibition zone น้อยกว่า ซึ่งเหมือนกับการศึกษาฤทธิ์ของลูปีนิฟอลินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจาก *Eriosema chinense*^[13] หลังจากนั้น ทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี microdilution method ได้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 8 และ 16 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยในพืช *Albizia myriophylla*^[14] เมื่อเปรียบเทียบกับยา Ampicillin พบว่า ค่าดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า เซลล์แบคทีเรีย ที่เติมสารสกัดลูปีนิฟอลิน มีลักษณะบวม (1.3 - 1.5 ไมครอน) และสังเกตเห็นการถูกทำลายบริเวณ cell wall หรืออาจทำลายที่ cytoplasmic membrane^[15] เมื่อเทียบกับเซลล์แบคทีเรียในกลุ่มควบคุม (0.7 - 1.0 ไมครอน)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาหาโอกาสการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียที่เฉพาะเจาะจงของสารสกัดชนิดนี้ ยังต้องมีการศึกษาวิจัยในอนาคต เพื่อพัฒนาในการคิดค้นยาต้านเชื้อชนิดใหม่ต่อไป

ข้อสรุป

สารลูปีโนลีน ที่สกัดได้จากลำต้นชะเอมเหนือ มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* โดยทำให้เกิดความผิดปกติของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ น่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ที่ผลิตได้จากสารสกัดสมุนไพรลำต้นชะเอมเหนือ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่จัดสรรทุนสนับสนุนงานวิจัยประเภทงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ให้ความรู้และอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการด้านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เอกสารอ้างอิง

1. Bureau of General Communicable Diseases. Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand. 2014. (in Thai)
2. Ananchaipattana C, Hosotani Y, Kawasaki S, Pongsawat S, Latiful BM, Isobe S, Inatsu Y. Prevalence of foodborne pathogens in retailed foods in Thailand. Foodborne Pathog Dis. 2012;9(9):835-40.
3. Mahidol CH, Prawat H, Ruchirawat S, Lihkitwitayawuid K, Lin L-Z, Cordell GA. Prenylated flavanones from *Derris reticulata*. Phytochemistry. 1997;45(4):825-9.
4. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents. 2005;26(5):343-56.
5. Kumkrai P, Kamonwannasit S, Chudapongse N. Cytoprotective and anti-diabetic effects of *Derris reticulata* aqueous extract. J Physiol Biochem. 2014; 70(3):675-84.
6. Wisetsutthichai S, Techamahamaneerat S, Junyaprasert V, Soonthornchareonnon N. Gel preparation development from *Derris reticulata* Craib. extract as an anti-herpes simplex drug. Thai Journal of Phytopharmacy. 2005;12:11-22. (in Thai)
7. Yusook K, Weeranantanapan O, Hua Y, Kumkrai P, Chudapongse N. Lupinifolin from *Derris reticulata* possesses bactericidal activity on *Staphylococcus aureus* by disrupting bacterial cell membrane. J Nat Med. 2017;(71):357-66.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard. Clinical and Laboratory Standards Institute document M07-A8. 2012;16-8.
9. Joycharat N, Thammavong S, Limsuwan S, Homlaead S, Voravuthikunchai SP, Yingyongnarongkul BE, et al. Antibacterial substances from *Albizia myriophylla* wood against cariogenic *Streptococcus mutans*. Arch Pharm Res. 2013;36(6):723-30.
10. Ghosh S, Indukuri K, Bondalapati S, Saikia AK, Rangan L. Unveiling the mode of action of antibacterial labdane diterpenes from *Alpinia nigra* (Gaertn.) B. L. Burtt seeds. Eur J Med Chem. 2013;66:101-5.
11. Chansuwan S, Palanuvej CH, Ruangrunsi N. Pharmacognostic Specification and Lupinifolin Content of *Derris reticulata* stem Wood. Conference proceedings the 8th Thailand-Japan International Academic Conference 2016.
12. Soonthornchareonnon N, Ubonopas L, Kaewsuwan S, Wuttiudomlert M. Lupinifolin, a bioactive flavanone from *Myriopterion extensum* (Wight) K. Schum. stem. Thai Journal of Phytopharmacy. 2004;11(2):19-27.
13. Prasad SK, Laloo D, Kumar M, Hemalatha S. Anti-diarrhoeal evaluation of root extract, its bioactive fraction, and lupinifolin isolated from *Eriosema chinense*. Planta Med. 2013;79(17):1620-7.
14. Joycharat N, Boonma C, Thammavong S, Yingyongnarongkul BE, Limsuwan S, Voravuthikunchai SP. Chemical constituents and biological activities of *Albizia myriophylla* wood. Pharm Biol. 2016; 54(1):62-73.
15. Panda SK. Screening methods in the study of antimicrobial properties of medicinal plants. Int J Biotech and Res. 2012;1-35.