ฤทธิ์ต้านเชื้อ METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*NEONOTHOPANUS NAMBI*)

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF LUMINESCENT MUSHROOM (*NEONOTHOPANUS NAMBI*) EXTRACTS AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA)

โดย

ฉัตร กรอบทอง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก
วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีการศึกษา 2560

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF LUMINESCENT MUSHROOM (*NEONOTHOPANUS NAMBI*) EXTRACTS AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA)

BY

CHAT KROBTHONG

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN ORIENTAL MEDICINE

COLLEGE OF ORIENTAL MEDICINE

GRADUATE SCHOOL, RANGSIT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2017

วิทยานิพนธ์เรื่อง

ฤทธิ์ต้านเชื้อ METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*NEONOTHOPANUS NAMBI*)

โดย

ฉัตร กรอบทอง

ได้รับการพิจารณาให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก

มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีการศึกษา 2560

----------	----------
ดร.จงกล สายสิงห์	ดร.ณัฐกาญจน์ แดงมณี
ประธานกรรมการสอบ	กรรมการ
----------	----------
ดร.สุกัลญา หลีแจ้	ดร.นันทพงศ์ ขำทอง
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ร.ต.หญิง ดร.วรรณี ศุขสาตร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
28 พฤษภาคม 2561

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Thesis entitled

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF LUMINESCENT MUSHROOM (*NEONOTHOPANUS NAMBI*) EXTRACTS AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA)

by

CHAT KROBTHONG

was submitted in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Master of Science in Oriental Medicine

Rangsit University
Academic Year 2017

Dr. Jongkon Saising	Dr. Nattakan Dangmanee
Examination Committee Chairperson	Member
Dr. Sukanlaya Leejae	Dr. Nanthaphong Khamthong
Member and Advisor	Member and Co-Advisor

Approved by Graduate School

(Asst.Prof.Plt.Off. Vannee Sooksatra, D.Eng.)
Dean of Graduate School
May 28, 2018

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต รหัสทุนวิจัย สวจ. 07/2559 และขอขอบคุณวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่สำหรับการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร.สุกัลญา หลีแจ้ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ ตลอดระยะเวลาการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งแนวทางการแก้ไขปัญหา ข้อบกพร่องต่าง ๆ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.นันทพงศ์ ขำทอง และอาจารย์อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ตลอดช่วงระยะเวลาในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.จงกล สายสิงห์ และ ดร.ณัฐกาญจน์ แดงมณี ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ บุคลากร และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณเทพ และคุณจุไรรัตน์ กรอบทอง บิดาและมารดาอันเป็นที่รักยิ่ง ที่ให้คำแนะนำ กำลังใจ และเป็นแบบอย่างที่ดีในการทำงาน จนทำให้สามารถผ่านพ้นทุกปัญหาและประสบความสำเร็จในการเรียนและการทำงาน

ท้ายที่สุดนี้ หากมีข้อบกพร่องประการใด ผู้เขียนต้องขออภัยในความผิดพลาดที่เกิดขึ้น และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจนำไปศึกษาและพัฒนาต่อไป

ฉัตร กรอบทอง

ผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

5607803 : MAJOR: ORIENT MEDICINE ; M.Sc. (ORIENT MEDICINE)

KEYWORDS : LUMINESCENT MUSHROOM, *NEONOTHOPANUS NAMBI*, METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

CHAT KROBTHONG: ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF LUMINESCENT MUSHROOM (*NEONOTHOPANUS NAMBI*) EXTRACTS AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA). THESIS ADVISOR: DR. SUKANLAYA LEEJAE., THESIS CO-ADVISOR: DR. NANTHAPHONG KHAMTHONG., 61 p.

The objective of this research was to study antibacterial activity of luminescent mushroom (*Neonothopanus nambi*) extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The weight of culture filtrate and mycelia extracted with dichloromethane were 128.78 mg/l and 1,040 mg, respectively. The result showed that culture filtrate extracted with dichloromethane possessed antibacterial activity against *S. aureus* ATCC 29213 and MRSA NPRC 001R-020R with MIC/MBC values of 2/2 and 4/4 µg/ml, respectively. In time-kill assay, it was found that the dichloromethane extract at concentrations of 8 and 16 µg/ml had bactericidal property at 1.5 hours and 1 hour, respectively. The result of cell lysis experiment showed that the culture filtrate dichloromethane extract at concentrations of 8-16 µg/ml had significant effect on cell lysis. The hemolytic activity of the extract at 256 µg/ml is 17% hemolysis which was more 128 time larger than MIC. Thus, it can be considered safe to use. In the whole blood killing assay study, we test the immune system's response to the bacteria after incubation with the extract. After incubation of the bacteria with the extracts at 0.5-2 µg/ml and test with volunteer blood, the growth of bacteria can be reduced. The result showed that the culture filtrate extract can cause bacteria to be killed by the immunity system. However, it's found that the extract tends to cause the permanent resistance to the extract, if it's used more than 21 days continuously.

Student's Signature ..... Thesis Advisor's Signature .....

Thesis Co-Advisor's Signature .....

5607803 : สาขาวิชาเอก: การแพทย์แผนตะวันออก; วท.ม. (การแพทย์แผนตะวันออก)

คำสำคัญ : เห็ดเรืองแสง, *NEONOTHOPANUS NAMBI*, METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

ฉัตร กรอบทอง: ฤทธิ์ต้านเชื้อ METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*NEONOTHOPANUS NAMBI*) (ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF LUMINESCENT MUSHROOM (*NEONOTHOPANUS NAMBI*) EXTRACTS AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA)) อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร.สุกัลญา หลีแจ้, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ดร.นันทพงศ์ ขำทอง, 61 หน้า.

งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) จากการศึกษาพบว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีน้ำหนักของสารสกัดเท่ากับ 128.78 mg/l และ 1,040 mg ตามลำดับ จากการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 และเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วย (NPRC 001R-020R) ได้ดีที่สุด โดยมีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC)/Minimum Bactericidal Concentration (MBC) เท่ากับ 2/2 และ 4/4 µg/ml ตามลำดับ จากการทดสอบ Time-Kill Assay พบว่า สารสกัดดังกล่าวที่ความเข้มข้น 4MIC (8 และ 16 µg/ml) สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R ที่เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของเซลล์แบคทีเรียพบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 8-16 µg/ml มีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 แตกได้เล็กน้อย จากการทดสอบผลของสารสกัดต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 128MIC (256 µg/ml) มีค่าร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงเพียง 17% จึงสามารถนำมาใช้ได้อย่างปลอดภัย ในการศึกษาผลของระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อหลังจากบ่มด้วยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงพบว่า เชื้อที่ผ่านการบ่มด้วยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น 0.5-2 µg/ml นั้น เมื่อนำมาบ่มกับเลือดของอาสาสมัครสามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ 0.5-1 log CFU/ml แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงสามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียถูกฆ่าด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ดียิ่งขึ้น แต่พบว่า สารสกัดจาก

ลายมือชื่อนักศึกษา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

น้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงมีแนวโน้มชักนำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อต่อสารสกัดแบบถาวรหากใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลาเกิน 21 วัน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ลายมือชื่อนักศึกษา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		**ก**
บทคัดย่อภาษาไทย		**ข**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		**ง**
สารบัญ		**จ**
สารบัญตาราง		**ซ**
สารบัญรูป		**ฌ**
บทที่ 1	**บทนำ**	**1**
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	3
	1.3 สมมติฐานการวิจัย	3
	1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย	3
	1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ	4
บทที่ 2	**ทบทวนวรรณกรรม**	**5**
	2.1 *Staphylococcus Aureus*	5
	2.2 ยาปฏิชีวนะ	9
	2.3 กลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย	14
	2.4 Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA)	16
	2.5 การแบ่งประเภทของเชื้อแบคทีเรียตามกลไกการดื้อยา	17
	2.6 เห็ดเรืองแสง (Luminescent Mushroom)	19
	2.7 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเห็ดเรืองแสง	20
บทที่ 3	**ระเบียบวิธีการวิจัย**	**24**
	3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	24
	3.2 การเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสง	26

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	3.3 การสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสง (Culture Filtrate)	26
	3.4 การสกัดสารออกฤทธ์จากเส้นใยของเห็ดเรืองแสง (Mycelium)	27
	3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงด้วยวิธี Broth Microdilution Method	27
	3.6 การศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา (Time-Kill Assay)	28
	3.7 การศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของเซลล์แบคทีเรีย (Bacteriolysis Assay)	29
	3.8 การศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ (Erythrocyte Haemolysis Assay)	30
	3.9 การศึกษาประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียหลังจากบ่มด้วยสารสกัดเห็ดเรืองแสง (Whole Blood Killing Assay)	31
	3.10 การศึกษาการดื้อต่อยาและสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงของเชื้อแบคทีเรีย (Stepwise Selection)	32
	3.11 การวิเคราะห์ข้อมูล	33
บทที่ 4	**ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย**	**34**
	4.1 ผลการสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสง	34
	4.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง	35
	4.3 ผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา (Time-Kill Assay)	39
	4.4 ผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของเซลล์แบคทีเรีย (Bacteriolysis Assay)	41
	4.5 ผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ (Erythrocyte Haemolysis Assay)	43
	4.6 ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียหลังจากบ่มด้วยสารสกัดเห็ดเรืองแสง (Whole Blood Killing Assay)	45

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	4.7 การดื้อต่อยาปฏิชีวนะและสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงของเชื้อแบคทีเรีย (Stepwise Selection)	47
บทที่ 5	**สรุปผลและข้อเสนอแนะ**	**50**
	5.1 สรุปผลการวิจัย	50
	5.2 ข้อเสนอแนะ	52
บรรณานุกรม		**53**
ประวัติผู้วิจัย		**61**

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค (Virulence Factor) ของเชื้อ *S. aureus*	8
4.1	น้ำหนักของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	35
4.2	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R	37
4.3	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ MRSA NPRC 002R-020R	38
4.4	แสดงค่า MIC และ MBC สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสง, Vancomycin, Oxacillin และ Penicillin G ต่อเชื้อ S. Aureus ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R	49

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

1.1 กรอบแนวคิดการวิจัย 4

2.1 ลักษณะเซลล์ของเชื้อ *Staphylococcus Aureus* จากการย้อมสีแกรม ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า 5

2.2 ลักษณะของเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus Nambi* ในสภาพแสงกลางวันและกลางคืน 20

2.3 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเห็ดเรืองแสง *N. Nambi* 23

4.1 ผล Time-Kill Assay ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 40

4.2 ผล Time-Kill Assay ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ MRSA NPRC 001R 41

4.3 สัดส่วนของค่าความขุ่นของเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 ที่บ่มด้วยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane 42

4.4 สัดส่วนของค่าความขุ่นของเชื้อ MRSA NPRC 001R ที่บ่มด้วยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane 43

4.5 ค่าร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์เมื่อบ่มกับสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane 45

4.6 ผลของระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อ S. Aureus ATCC 29213 หลังจากบ่มด้วยสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane 46

4.7 ผลของระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อ MRSA NPRC 001R หลังจากบ่มด้วยสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane 47

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการดื้อยาต้านเชื้อแบคทีเรียกำลังเป็นปัญหาที่สำคัญและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดปัญหาเหล่านี้คือ การใช้ยาต้านเชื้อแบคทีเรียอย่างไม่เหมาะสม ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียพัฒนาการดื้อต่อยาดังกล่าว (Crossley, Jefferson, Archer & Fowler, 2009) ซึ่งโดยทั่วไป เชื้อที่ดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียตัวใดตัวหนึ่งมักจะดื้อยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในประเภทเดียวกันหรือยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกัน ทำให้จำเป็นต้องเปลี่ยนไปใช้ยาต้านเชื้อแบคทีเรียประเภทอื่นหรือเป็นยาที่มีสูตรโครงสร้างแตกต่างกันออกไปในการทำลายเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ เช่น เชื้อ *Staphylococcus Aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา Methicillin (MRSA) และยากลุ่ม Penicillin-Resistant Penicillinase (β-Lactam) ทั้งหมด (กองโรงพยาบาลภูมิภาค, 2540; ประภาวดี ติษยาธิคม, สมใจ ไผ่สมบูรณ์, สุชาดา แซ่ซือ, และวชิราภรณ์ พร้าเพรียง, 2547) ซึ่งเชื้อ *S. Aureus* มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคที่สำคัญคือการติดเชื้อบริเวณผิวหนัง ทำให้เกิดการติดเชื้อชนิดเป็นฝีหนอง นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารพิษชนิด Enterotoxin ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษอีกด้วย (วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, ศราวุธ สุทธิรัตน์, และอิสยา จันทร์วิทยานุชิต, 2547)

เชื้อ MRSA เป็นเชื้อก่อโรคที่พบว่า เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่มีรายงานเพิ่มสูงขึ้น ส่วนใหญ่จะพบในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยที่มีแผลผ่าตัด แผลน้ำร้อนลวก แผลไฟไหม้ นอกจากนี้ยังพบว่าการใส่สายสวนปัสสาวะ การใช้เครื่องช่วยหายใจ การให้สารน้ำทางหลอดเลือดจะทำให้เกิดการติดเชื้อได้ง่ายขึ้น โดยมีการติดต่อของเชื้อจากผู้ป่วยหนึ่งไปยังผู้ป่วยอื่น ๆ หรือจากบุคลากรทางการแพทย์สู่ผู้ป่วยโดยการสัมผัสได้อีกด้วย (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, กรรณิการ์ แซ่เจีย, ปวีณา ก้องสนั่น, และมัณฑนา สงวนทรัพย์, 2546) โดยพบว่าเมื่อเชื้อ MRSA ถูกนำเข้ามาในโรงพยาบาลจะทำให้เชื้อดังกล่าวพัฒนากลายเป็นเชื้อประจำถิ่นในโรงพยาบาล ซึ่งทำให้ยากต่อการควบคุมและกำจัดให้หมดไป (Scudeller et al., 2000) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันมียา

ต้านจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถรักษาการติดเชื้อ MRSA ได้ เช่น Vancomycin, Linezolid และ Quinupristin-Dalfopristin (Tenover, Weigel, and Appelbaum, 2004) ซึ่งยาเหล่านี้ล้วนมีราคาแพง และยังมีความเป็นพิษสูง ซึ่งจะมีผลกระทบต่อไตและมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย ส่งผลให้เกิดภาวะเลือดจาง เกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวต่ำ เป็นต้น (Crossley et al., 2009) ดังนั้นการใช้ยาต้านจุลินทรีย์ในการรักษาการติดเชื้อ MRSA จึงมีความยากลำบากในการรักษา ทั้งในเรื่องงบประมาณในการรักษาและความเป็นพิษของยาที่ใช้ในการรักษา อาจทำให้ผู้ป่วยมีอันตรายถึงขั้นเสียชีวิต จึงจำเป็นต้องมีการค้นคว้าหายาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่เพื่อใช้ในการรักษาการติดเชื้อชนิดนี้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการนำพืชสมุนไพรมาทดสอบเพื่อหาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ MRSA

เห็ดเรืองแสงสายพันธุ์ *Neonothopanus Nambi* มีการค้นพบครั้งแรกในประเทศไทยในบริเวณเขตพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พื้นที่โคกภูตากา อำเภอเวียงเก่า จังหวัดขอนแก่น (วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, ศิวิลัย ศิริมังครารัตน์, วรรณดี บัญญัติรัชต, และสุรีย์พร บัวอาจ, 2551; Saksirirat et al., 2003) เห็ดเรืองแสงชนิดนี้จัดเป็นเห็ดพิษ มีลักษณะคล้ายเห็ดนางรม เป็นเห็ดที่อาศัยซากผุพังของพืชเป็นแหล่งอาหาร หรืออาจเจริญบนดินที่มีธาตุอาหารอยู่ข้างใต้ มีลักษณะการเจริญเป็นกลุ่ม ๆ ละ 4-5 ดอก (Bua-art, Saksirirat, Kanokmedhakul, Hiransalee, & Lekphrom, 2010) โดยในตอนกลางวันครีบก้านและดอกจะมีสีขาว แต่เมื่ออยู่ในสภาพที่แสงน้อยหรือในตอนกลางคืนดอกเห็ดจะเปล่งแสงได้ ซึ่งมีลักษณะเป็นแสงสีเขียวอมเหลือง (วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, สุรีย์พร บัวอาจ, สมเดช กนกเมธากุล, รัศมี เล็กพรหม, และวีระวัตร นามานุศาสตร์, 2552)

ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงการใช้ประโยชน์จากสารออกฤทธิ์ของเห็ดเรืองแสง *N. Nambi* ทั้งในด้านการเกษตรและทางการแพทย์ เช่น การศึกษาสารออกฤทธิ์ของเห็ดเรืองแสงต่อไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคที่เกิดในพืช (Bua-art et al., 2010; Bua-art, Saksirirat, Kanokmedhakul, Hiransalee, & Lekphrom, 2011) การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Plasmodium falciparum* และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของวัณโรค (Kanokmedhakul et al., 2012) แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งเชื้อ MRSA

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง *N. Nambi* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนายาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ และเป็นการเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทยให้ยั่งยืนต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1) เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อ MRSA ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง *N. Nambi*

2) เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง *N. Nambi* ต่อเชื้อ MRSA

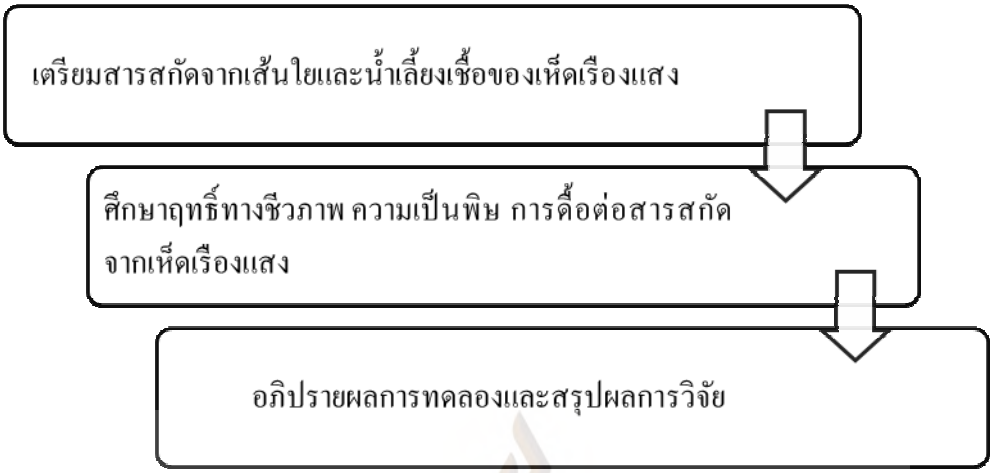
1.3 สมมติฐานการวิจัย

ในปัจจุบันปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียกำลังเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข ทางผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่า การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงสามารถเป็นแนวทางเพื่อนำมาพัฒนาต่อยอดในการผลิตยาต้านเชื้อดื้อยา เพื่อใช้ในอนาคตได้ จึงมีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียในด้านต่าง ๆ รวมทั้งการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง ซึ่งคาดว่าสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่ดี สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อได้ในระยะเวลาที่สั้น มีความเป็นพิษต่ำและไม่ก่อให้เกิดการดื้อต่อสารสกัด

1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*N. Nambi*) มีกรอบแนวคิดการวิจัยดังแสดงในรูปที่ 1.1

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 1.1 กรอบแนวคิดการวิจัย

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลอง สังเกตจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อเจริญในหลอดทดลอง (อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น)

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ สังเกตจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจมีค่าเท่ากับหรือมากกว่าค่า MIC

Broth Microdilution Test คือ การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะและสารสกัดต่าง ๆ ซึ่งการทดสอบจะทำให้ทราบถึงค่า MIC และ MBC ของยาและสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ โดยทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ซึ่งปริมาตรในการทดสอบไม่เกิน 2 ml

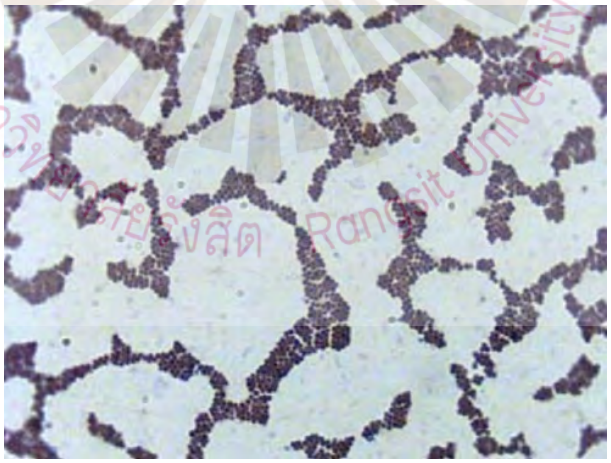
Time-Kill Assay คือ การศึกษาประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะและสารสกัดต่าง ๆ ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา โดยแสดงผลเป็นกราฟ Semilog ที่มีแกน x คือระยะเวลา แกน y คือจำนวน Viable Cells Count (log CFU/ml)

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 *Staphylococcus Aureus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-Positive Bacteria) รูปร่างกลม เซลล์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1.2 μm มีลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (รูปที่ 2.1) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative Anaerobe) แต่เจริญได้อย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ (Crossley et al., 2009) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 7-47°C แต่เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30-37°C ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีสีขาว-เหลือง ขอบเรียบ นูน มันวาว ลักษณะคล้ายเนย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 mm (Bremer, Fletcher, and Osporne, 2004)



รูปที่ 2.1 ลักษณะเซลล์ของเชื้อ *Staphylococcus Aureus* จากการย้อมสีแกรม ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า
ที่มา : นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552

S. Aureus เป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบอาศัยอยู่บริเวณผิวหนังและระบบทางเดินหายใจส่วนต้น โดยเฉพาะเยื่อบุภายในโพรงจมูกของมนุษย์ ในคนปกติเชื้อชนิดนี้อาจก่อให้เกิดโรคติดเชื้อที่ไม่รุนแรง เช่น ฝี หนอง และตุ่มพุพองต่างๆ แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียชนิดนี้จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาส และสามารถก่อโรครุนแรงในผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงต่างๆ เช่น ผู้ป่วยที่อยู่ในสภาวะที่ร่างกายอ่อนแอ หรืออยู่ในระยะพักฟื้น ดังนั้น *S. Aureus* จึงเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อยในโรงพยาบาล (Tortora, Funke, and Case, 2007) ซึ่งเชื้อ *S. Aureus* สามารถสร้างเอนไซม์ Coagulase และ Catalase ซึ่งมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Coagulase ซึ่งสามารถทำให้พลาสม่าเกิดการแข็งตัว โดยอาศัย Coagulase Reaching Factor (CRF) ซึ่งมีอยู่ในพลาสม่าของคนและสัตว์บางชนิด เป็นตัวกระตุ้นการสร้างไฟบรินและการแข็งตัวของพลาสม่า โดยมีบทบาทในการก่อโรค คือ ไฟบรินจะไปห่อหุ้มรอบแบคทีเรีย ทำให้เม็ดเลือดขาวไม่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ยังพบการสร้างเอนไซม์ Penicillinase หรือ β-Lactamase ออกฤทธิ์ทำลายยากลุ่ม Penicillins เช่น Ampicillin, Carbenicillin, Methicillin และ Amoxicillin เป็นต้น โดยเอนไซม์นี้สามารถทำลาย β-Lactam Ring ของยาดังกล่าวได้ (โสภณ คงสำราญ, 2524; Sneath, Mair, Sharpe, & Holt, 1986) โดยโรคที่เกิดจาก *S. Aureus* มีดังนี้

2.1.1 โรคติดเชื้อที่ผิวหนัง

การเกิดตุ่มหนองที่ผิวหนัง (Impetigo) มักเป็นตุ่มหนองตื้น ๆ อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม พบได้บ่อยบริเวณใบหน้า แขน ขา เมื่อตุ่มหนองแตกออก กลายเป็นรอยถลอกตื้น ๆ และถ้ามีการติดเชื้อที่ต่อมไขมันจะทำให้เกิดการอักเสบ มีการสะสมของเม็ดเลือดขาวที่ตายแล้ว รวมทั้งแบคทีเรียที่เม็ดเลือดขาวกินเข้าไป ทำให้เกิดฝี (Furuncle) และฝีฝักบัว (Carbuncles) บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ Epidermolytic Toxin ที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังหลุดลอกที่เรียกว่า Staphylococcal Scaled Skin Syndrome (Brewer et al., 2008)

2.1.2 โรคปอดบวม (Staphylococcal Pneumonia)

การติดเชื้อมักเกิดกับผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอ เช่น ผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ โรคหัด หรือคนที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มีโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อสูงกว่าคนปกติ อาการของโรคอาจเกิดขึ้นทันทีหลังติดเชื้อ จึงจัดว่าเป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่ทำให้มีอัตราการตายสูง โดยการติด

เชื้อจะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและเกิดฝีจำนวนมากที่บริเวณปอด (นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552)

2.1.3 การติดเชื้อที่กระดูก (Osteomyelitis) และข้อ (Pyoarthrosis)

การติดเชื้อที่กระดูกมักมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อในกระแสเลือด และเมื่อเชื้อเข้าไปอยู่ในส่วนของ diaphysis ของกระดูกยาว (Long Bone) จะทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงและมีการสะสมของหนองบริเวณผิวของกระดูก เกิดเป็นหนองใต้เยื่อหุ้มกระดูก ข้อต่อกระดูกที่มีหนองจากการติดเชื้อจะทำลายกระดูกอ่อนของข้อต่อและทำให้เกิดความพิการของข้อต่ออย่างถาวร (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544)

2.1.4 โรคที่เกิดจากสารพิษ (Toxin)

สารพิษที่สร้างจาก *S. Aureus* มีหลายชนิด เช่น Hemolysin เป็นโปรตีนที่ทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือด ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ โดยการที่เชื้อสร้าง Enterotoxin ที่มีคุณสมบัติในการทนความร้อน 100°C ได้นานถึง 30 นาที และสามารถทนต่อกรดในกระเพาะได้ ซึ่งทำให้ผู้ป่วยมีอาการอาเจียนและท้องร่วงอย่างรุนแรง บางสายพันธุ์ทำให้เกิดกลุ่มอาการ Toxic-Shock Syndrome โดยการสร้าง Toxic-Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) ทำให้มีไข้สูง คลื่นไส้ อาเจียน มีความดันโลหิตต่ำ มีผื่นแดงตามตัว การทำงานของไตล้มเหลวและเกิดอาการช็อคได้ (Brewer et al., 2008; Iwatsuki, Yamasaki, Morizane, & Oono, 2006) สำหรับปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค (Virulence Factor) ของเชื้อ *S. Aureus* ได้แสดงไว้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค (Virulence Factor) ของเชื้อ *S. Aureus*

ปัจจัย	หน้าที่
Capsule	ป้องกันกระบวนการฟาโกไซโทซิสของเม็ดเลือดขาว และช่วยในการเกาะติดกับอุปกรณ์ต่าง ๆ ทำให้แพร่ระบาดได้ง่าย
Coagulase	เปลี่ยนไฟบริโนเจนเป็นไฟบริน ทำให้เชื้อเกาะกลุ่มกัน และทำให้ไฟบรินมาล้อมรอบเชื้อ เพื่อป้องกันกระบวนการฟาโกไซโทซิส
Exfoliatin toxin (ET)	ทำให้เกิดการย่อยสลายของเซลล์ที่เกาะติดของชั้นหนังกำพร้า ทำให้เกิดโรคผิวหนังหลุดลอก staphylococcal scaled skin syndrome
Hyaluronidase	ย่อยกรดไฮยาลูโรนิกที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อ ทำให้เชื้อแพร่กระจายไปสู่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น
Hemolysin	เป็นโปรตีนที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง
Leucosidin	ทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยการทำให้เกิดรูที่ cytoplasmic membrane
Lipase	ย่อยสลายไขมันที่สะสมที่ผิวหนัง เพื่อการดำรงชีพและการบุกรุกของเชื้อเข้าสู่ผิวหนัง
Protease	ย่อยสลายคอลลาเจนและโปรตีนอื่น ๆ ในเนื้อเยื่อ
Protein A	จับกับ FC receptor ของแอนติบอดี้ และยับยั้งกระบวนการฟาโกไซโทซิส
Toxic shock syndrome toxin (TSST)	ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ มีอาการท้องร่วง อาเจียน ช็อค

ที่มา : นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544; Brown et al., 2005

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.2 ยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) เป็นสารที่เกิดจากกระบวนการ Metabolism ของเชื้อจุลินทรีย์ และมีผลในการยับยั้งเชื้อในลักษณะที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณยาที่ใช้ในการรักษาแต่ไม่เกิดพิษต่อเซลล์ของมนุษย์ ซึ่งยาปฏิชีวนะที่ได้มาจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ออกฤทธิ์แคบและไม่ทนต่อสภาวะความเป็นกรดภายในร่างกาย ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโครงสร้างของยาให้มีประสิทธิภาพในการรักษาที่ดียิ่งขึ้น โดยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยาด้วยวิธีการกึ่งสังเคราะห์ เนื่องจากยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการรักษาที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับกลไกการออกฤทธิ์ของยาชนิดต่าง ๆ โดยทั่วไปสามารถแบ่งกลุ่มของยาปฏิชีวนะตามกลไกการออกฤทธิ์ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ (กิตติศักดิ์ ศรีนภา และคณะ, 2551)

2.2.1 ยาปฏิชีวนะออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วย Peptidoglycans ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของโปรตีนและน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันเป็น Cross Link โดยใช้เอนไซม์ Transpeptidase ดังนั้นการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียจึงเป็นเป้าหมายหนึ่งในการคิดค้นยาและปรับปรุงยา เพื่อนำมารักษาอาการเจ็บป่วยที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ (วีรชัย พุทธวงศ์ และวรยา เส็งประชา, 2550) ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-Lactams และกลุ่มยับยั้งชีวสังเคราะห์ของ Peptidoglycan

2.2.1.1 ยาปฏิชีวนะ กลุ่ม β-Lactams เป็นยากลุ่มแรกที่นำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อ *S. Aureus* การออกฤทธิ์ของยามีผลในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ โครงสร้างหลักที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ของยาประกอบด้วยวงแหวน β-Lactam เชื่อมติดกับวงแหวนคาร์บอนขนาด 5 อะตอมหรือ 6 อะตอม (Fused Bicyclic Heterocyclic) ยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ที่มีความสำคัญต่อการนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อจาก *S. Aureus* ประกอบด้วยยากลุ่ม Penicillin และ Cephalosporin เช่น Penicillin G, Oxacillin และ ClOxacillin เป็นต้น

2.2.1.2 ยาปฏิชีวนะกลุ่มที่ยับยั้งชีวสังเคราะห์ของ Peptidoglycan ยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียเช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-Lactam แต่

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ต่างกันตรงบริเวณของการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด Cross Link ซึ่งประกอบด้วยยากลุ่ม Fosfomycin และ Glycopeptides เช่น Vancomycin และ Teicoplanin เป็นต้น

2.2.2 ยาปฏิชีวนะออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน

แบคทีเรียจัดเป็นเซลล์ชนิด Prokaryote มีไรโบโซมชนิด 70s ประกอบด้วย 2 Subunits คือ 30s และ 50s ซึ่งยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จะเข้าไปจับที่ Subunit ชนิด 30s หรือ 50s ซึ่งทำให้มีผลต่อการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ และการซ่อมแซมตัวเอง จึงส่งผลให้แบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำให้เชื้อแบคทีเรียตาย (กิตติศักดิ์ ศรีภา และคณะ, 2551) ซึ่งกลุ่มยาดังกล่าวประกอบด้วย

2.2.2.1 ยากลุ่ม Aminoglycosides เป็นกลุ่มยาที่สามารถละลายน้ำได้ดีและมีความเป็นขั้วสูง ยากลุ่มนี้จึงไม่สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทาน จึงใช้โดยวิธีการฉีดยาเข้าสู่กล้ามเนื้อ ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยเข้าไปจับกับไรโบโซมชนิด 30s ที่บริเวณ Peptidyl A ของ 16s rRNA และยับยั้งขั้นตอนเริ่มต้นของการสังเคราะห์โปรตีน และยังทำให้เกิดการสะสมของคอมเพล็กซ์ที่มีลักษณะผิดปกติ ส่งผลให้เกิดการแปลรหัสที่ผิดพลาดและสร้างโปรตีนที่มีลักษณะผิดปกติที่เรียกว่า Non-Sense Proteins จึงทำให้เชื้อไม่สามารถนำโปรตีนไปใช้ได้ และทำให้ยากลุ่มนี้มีผลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น Tobramycin, Neomycin และ Kanamycin เป็นต้น (Lemke, Williams, Roch, & Zito, 2008)

2.2.2.2 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolides จัดเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการใช้รักษาโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย โดยขอบเขตการออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้มีลักษณะคล้ายยากลุ่ม Penicillin ดังนั้นผู้ป่วยที่แพ้ยาในกลุ่ม Penicillin จึงสามารถใช้ยาในกลุ่มนี้ทดแทนได้ กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม Mocrolides มีผลไปรบกวนการระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย โดยตัวยาเข้าไปจับส่วนของนิวคลิโอไซด์ใน Domain V ของ 23s rRNA ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้จับกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ของ Macrocyclic Lactone Ring (Lemke et al., 2008) นอกจากนี้ตัวยายังเข้าไปจับกับเอนไซม์ Peptidyl Transferase ซึ่งมีความสำคัญต่อการสร้างสาย Peptide อีกทั้งยากลุ่ม Macrolides มีความจำเพาะเจาะจงต่อหน่วยย่อย 50s ไรโบโซมของ 70s ไรโบโซมมีผลไปยับยั้งบางส่วนของกระบวนการ Transferase โดยรบกวนการปล่อยของ tRNA จากบริเวณ P และอาจยับยั้งการครอบครองที่บริเวณ P ของ Peptidyl-tRNA จึงมีผลต่อการเกิด 70s ไรโบ

โซมที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงมีผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ Prokaryote ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น Erythromycin, Clarithromycin และ Azithromycin เป็นต้น (มาลิน จุลศิริ, 2532)

2.2.2.3 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracyclines เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้อย่างแพร่หลายเพราะเป็นกลุ่มยาที่ออกฤทธิ์ได้กว้างและครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบทั้งที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน (Oliva & Chopra, 1992) กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม Tetracyclines แสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย โดยจับกับ 30s ไรโบโซมและ mRNA เพื่อป้องกันไม่ให้ Aminoacyl-tRNA จับกับ mRNA ดังนั้น Ribosome complex จึงมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย (Speer, Shoemaker, and Salyers, 1992)

2.2.2.4 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Lincosamide เป็นกลุ่มยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกับยาในกลุ่ม Macrolides คือ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียในขั้นตอน Translocation โดยจับที่ 50s ไรโบโซมที่บริเวณ P ของ 23S rRNA (กิตติศักดิ์ ศรีภา และคณะ, 2551)

2.2.2.5 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Clindamycin มีกลไกในการออกฤทธิ์โดยการยับยั้ง Aminoacyl Translocation Reaction และยับยั้งการสร้าง Initiation Complex โดยยาเข้าจับที่ตำแหน่ง 50s ไรโบโซม โดยยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต่อเชื้อ Streptococci, Staphylococci, Pneumococci และแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนตัวอื่น ๆ ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แต่ฤทธิ์ของยาในกลุ่มนี้ไม่มีผลต่อเชื้อ Enterococci และแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ (Reyes et al., 2007)

2.2.2.6 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Chloramphenicol มีกลไกการออกฤทธิ์โดยตัวยาเข้าไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยเข้าจับกับ 50s ไรโบโซมและขั้นตอน Transpeptidation เป็นขั้นตอนการเชื่อม Peptide กับ Amino Acid บนบริเวณ A มีผลยับยั้งเอนไซม์ Peptidyl Transferase ส่งผลให้การสังเคราะห์โปรตีนทำได้ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นยาในกลุ่มนี้มีขอบเขตการออกฤทธิ์ที่กว้างและยังสามารถยับยั้งได้ดีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบทั้งชนิดที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ (Izard, 2001)

2.2.2.7 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Streptogramin เป็นยาปฏิชีวนะที่ได้จากเชื้อ *Streptomyces* หลายสายพันธุ์ สารในกลุ่มดังกล่าวประกอบด้วยชนิด A (dalfopristin) และชนิด B (Quinupristin) ในอัตราส่วน 70:30 ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ Streptogramin A เข้าจับที่บริเวณ Complex ของเอนไซม์

Peptidyl Transferase จึงยับยั้งการจับของ Substrate ส่งผลให้เกิดการยับยั้งขั้นตอนการเพิ่มความยาวของสาย Peptide ในขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีน และการเข้าจับของ Streptogramin A ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง Conformation ของ 50s ไรโบโซม ส่วน Streptogramin B เข้าจับที่ตำแหน่ง 50s ไรโบโซม ดังนั้นการใช้ยาร่วมกันจึงช่วยเพิ่มฤทธิ์การฆ่าเชื้อได้ดียิ่งขึ้น เพราะ Streptogramin A ช่วยให้ Streptogramin B จับที่ 50s ไรโบโซมได้แน่นขึ้น (Beyer & Pepper, 1998)

2.2.2.8 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Oxazolidinone จัดเป็นยาปฏิชีวนะที่ได้จากการสังเคราะห์โดยตรงพัฒนาขึ้นเพื่อมุ่งเน้นการออกฤทธิ์ได้ดีต่อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น Staphylococci, Streptococci และ Enterococci รวมทั้งแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยตัวยาเข้าจับที่ตำแหน่ง P ของ 50s ไรโบโซม จึงมีผลรบกวนการจับของ f-Met-tRNA Initiator ดังนั้นการเริ่มต้นในการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์แบคทีเรียจึงถูกยับยั้ง (Patel et al., 2001)

2.2.3 ยาปฏิชีวนะออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์

หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยทั่วไปคือ การเป็น Osmotic Barrier ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้สารต่าง ๆ เข้าหรือออกจากเซลล์ง่ายเกินไป และคัดเลือกสารที่นำเข้าหรือออกจากเซลล์ กลุ่มยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ ยากลุ่ม Tryrocidins, Gramicidins และ Polymyxin เป็นต้น กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะดังกล่าวมีผลโดยตัวยาเข้าจับบริเวณส่วนนอกของเยื่อหุ้มเซลล์และแทรกเข้าไปในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติ สารต่าง ๆ จึงสามารถรั่วออกจากเซลล์และเกิดการดูดซึมของไอออนที่ผิดปกติ แบคทีเรียจึงไม่สามารถมีชีวิตรอดต่อไปได้ (มาลิน จุลศิริ, 2532)

2.2.3.1 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tyrocidin และ Gramicidin มีกลไกการออกฤทธิ์โดยการรบกวนกระบวนการ Oxidative Phosphorylation ทำให้พลังงานในตัวเซลล์แบคทีเรียถูกปล่อยออกมาน้อยลงและยาทั้ง 2 กลุ่มเข้าทำลาย Osmotic Barrier ของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูรั่ว ดังนั้นจึงทำให้ Cation ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของเซลล์แบคทีเรียเคลื่อนผ่านออกนอกเซลล์ (กิตติศักดิ์ ศรีนภา และคณะ, 2551)

2.2.3.2 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Polymyxins ยาในกลุ่มนี้มี 2 ชนิด คือ Polymycin B และ Colistin A ซึ่งยาทั้ง 2 ชนิด แสดงฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบได้ดี โดยตัวยาใช้ส่วนของประจุบวก

ในโมเลกุล (L-2,4-Diaminobutyric Acid; L-Dap) จับกับหมู่ฟอสเฟตของ Phospholipid ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย จึงทำให้การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติ (กิตติศักดิ์ ศรีนภา และคณะ, 2551)

2.2.4 ยาปฏิชีวนะออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ Nucleic Acid

กระบวนการสังเคราะห์ Nucleic Acid มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์โปรตีน เอนไซม์ และขั้นตอนการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่ง Nucleic Acid ที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตประกอบด้วย Deoxyribonucleic Acid (DNA) และ Ribonucleic Acid (RNA) กลุ่มยาต้านแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของกระบวนการ Metabolism ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Nucleic Acid ส่วนใหญ่เป็นยาต้านแบคทีเรียกึ่งสังเคราะห์ เช่น ยากลุ่ม Sulfonamide และ Quinolone เป็นต้น (มาลิน จุลศิริ, 2532)

2.2.4.1 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Sulfonamides ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ Nucleotide โดยตัวยายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DihyDropteroate Synthase เอนไซม์ดังกล่าวมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวจำเป็นต่อการสังเคราะห์สารในกลุ่ม Folate Coenzyme A ซึ่งเป็นสารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ DNA ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DihyDropteroate Synthase จึงเป็นการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (กิตติศักดิ์ ศรีนภา และคณะ, 2551)

2.2.4.2 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Quinolone เป็นกลุ่มยาต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี มีกลไกในการออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA Gyrase และ Topoisomerase-4 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์ DNA ของแบคทีเรีย ดังนั้นเมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด จึงส่งผลให้สาย DNA ไม่อยู่ในรูปร่างที่เหมาะสมจึงทำให้เชื้อแบคทีเรียตายในที่สุด (Shen, Kohlbrenner, Weigl, & Baranowski, 1989)

2.3 กลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย

การเพิ่มขึ้นของอุบัติการณ์จากแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมีปัจจัยมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตามคลินิก การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสมส่งผลให้เชื้อได้พัฒนาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่อง (Crossley et al., 2009) จากเชื้อที่เคยไวต่อยาปฏิชีวนะเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมทำให้มียีนส่วนที่กำหนดการดื้อยาเกิดขึ้น จึงทำให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะ สำหรับในแบคทีเรียยีนดื้อยาอาจปรากฏอยู่บนโครโมโซมหรือพลาสมิด ส่วนใหญ่มักเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงหรือเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์หรือโปรตีนบางชนิด กลไกการดื้อต่อยาที่พบได้บ่อยสามารถจำแนกได้เป็น 4 ประเภท (มาลิน จุลศิริ, 2532)

2.3.1 การทำลายฤทธิ์ของยาด้วยเอนไซม์

แบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์มายับยั้งหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยา มีผลทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ เนื่องจากยาไม่สามารถเข้าจับกับบริเวณยับยั้งเชื้อได้ ซึ่งพบว่าเป็นกลไกหลักที่สำคัญและพบบ่อยที่สุดในกลไกการดื้อยา เนื่องจากยาที่นิยมนำมาใช้ทางคลินิกเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-Lactams จึงทำให้พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิดดื้อต่อยากลุ่มนี้ เช่น *S. Aureus* ที่ดื้อต่อยา Penicillin หรือ Cephalosporins เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ β-Lactamase ที่สามารถย่อยสลายส่วนวงแหวนของ β-Lactam ของยา ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ Penicilloic Acid และ Cephalosporoic Acid ที่ไม่สามารถต้านเชื้อได้ (พรรณพิศ สุวรรณกุล, ชุษณา สวนกระต่าย, และธีรพงษ์ ตัณฑวิเชียร, 2549)

2.3.2 การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา

กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะประเภทนี้เกิดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมีการเปลี่ยนแปลงลำดับที่สำคัญของยีนที่เกี่ยวข้องกับตำแหน่งที่ใช้ในการสร้างเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาจึงทำให้ยาสามารถจับกับเป้าหมายได้ลดลง เชื้อแบคทีเรียจึงไม่ถูกยับยั้งด้วยยาปฏิชีวนะชนิดนั้น ๆ (พรรณพิศ สุวรรณกุล และคณะ, 2549) เช่น การดื้อต่อยากลุ่ม β-Lactams โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ PBP (Penicillin Binding Proteins) ที่ก่อให้เกิดการดื้อยากลุ่ม Penicillinase-Resistant Penicillin, Cephalosporins, Monobactams และ Carbapenems ของเชื้อ *S. Aureus* โดยเรียกสายพันธุ์ดังกล่าวว่า MRSA ลักษณะการดื้อยานี้เป็นผลมาจากการได้รับยีน *mecA*

โดยทำหน้าที่สร้าง PBP ชนิดพิเศษ คือ PBP2a ซึ่งจับกับยาในกลุ่ม β-Lactam ได้ไม่ดีเชื้อจึงไม่ถูกยับยั้ง (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549)

2.3.3 การลดการผ่านสารเข้าสู่เซลล์

ยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยจำเป็นต้องมีระดับความเข้มข้นของยาในบริเวณเป้าหมายสูงพอที่จะออกฤทธิ์และมีผลต่อการเจริญของเชื้อได้ ดังนั้นการขัดขวางไม่ให้ยาจากภายนอกเซลล์เข้ามาภายในเซลล์ย่อมทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ จากกลไกการดื้อยาดังกล่าวพบเชื้อดื้อยาหลายชนิดแสดงการลดการผ่านของยาเข้าเซลล์โดยอาศัยกลไกต่าง ๆ เช่น เชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยา Cycloserine พบว่ามีการสูญเสียของ Alanine Transport System ที่เกี่ยวข้องกับการส่งผ่านยาเข้าสู่เซลล์ เชื้อบางชนิดที่ดื้อต่อยา Tetracycline พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของ Porins ซึ่งเป็นโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ จึงทำให้ยาผ่านเข้ามาได้ลดลง (พรรณพิศ สุวรรณกุล และคณะ, 2549)

2.3.4 การเพิ่มปริมาณการผลิตสารและเอนไซม์เพื่อแข่งกับปริมาณยา

ยาปฏิชีวนะบางชนิดมีสูตรโครงสร้างคล้ายสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม ทำให้เกิดการแย่งจับเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ หากเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสารดังกล่าวเพื่อแข่งกับปริมาณยา จะสามารถแย่งจับเอนไซม์กลับคืนมาเพื่อดำเนินการเมตาบอลิซึมต่อไปได้ เช่น การเพิ่มระดับของ *p*-Aminobenzoic Acid ส่งผลให้เชื้อสามารถดื้อยาในกลุ่ม Sulfonamides ขณะเดียวกันหากมีการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ชนิดที่ถูกขัดขวางการทำงานด้วยยาปฏิชีวนะ เชื้อจึงดื้อต่อยาที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ถึงแม้ว่าเอนไซม์บางส่วนจะถูดขัดขวางแต่ยังมีเอนไซม์ส่วนที่เหลือยังคงทำหน้าที่ต่อไปได้ เช่น การเพิ่มเอนไซม์ DihyDropteroate Synthetase มีผลทำให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่ม Sulfonamides และการเพิ่ม Dihydrofolate Reductase มีผลทำให้เชื้อดื้อต่อยา Trimethoprim (พรรณพิศ สุวรรณกุล และคณะ, 2549)

จากกลไกการดื้อยาที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า เชื้อแต่ละชนิดมีวิธีการดื้อยาชนิดเดียวกันในกลไกที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและยีนที่บงการการดื้อยาว่าเป็นยีนบนโครโมโซมหรือพลาสมิด (มาลิน จุลศิริ, 2532)

2.4 Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA)

ในปี ค.ศ. 1961 มีรายงานการพบเชื้อ *S. Aureus* ที่ดื้อต่อยา Methicillin (MRSA) (ศศิธร ลิขิตนุกูล, ชิษณุ พันธุ์เจริญ, สถาพร ธิติวิเชียรเลิศ, นลินี อัศวโภคี, และยุพิน ศุพุทธมงคล, 2543) ซึ่งเชื้อ MRSA ไม่สามารถรักษาให้หายได้ด้วยยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *Staphylococcus* ทั่วไปได้ (อะเคื้อ อุณหเลขกะ, 2548) โดยทั่วไปสามารถพบได้ที่ผิวหนังและเยื่อบุของร่างกาย เช่น ในโพรงจมูกของคนทั่วไป ซึ่งจะพบเชื้อในภาวะที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Colonization) พบได้ประมาณร้อยละ 30-40 ของประชากรทั่วไป (เพชรไสว ลิ้มตระกูล, 2541) แต่หากเกิดความผิดปกติกับร่างกาย เช่น มีบาดแผลบริเวณผิวหนัง หรือคนที่ฉีดสารเสพติดเข้าสู่ร่างกายทางหลอดเลือดโดยไม่ได้ทำความสะอาดผิวหนัง จะทำให้เชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายและก่อให้เกิดโรคตามมาได้ เช่น ผิวหนังอักเสบฝี หนอง ปอดอักเสบ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น (อะเคื้อ อุณหเลขกะ, 2548) ซึ่งการติดเชื้อ MRSA มักพบในผู้ป่วยที่นอนพักรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นระยะเวลานาน โดยเฉพาะผู้ป่วยหนัก ผู้ป่วยสูงอายุ ผู้ป่วยที่มีแผลกดทับ ผู้ป่วยที่ต้องให้ยาทางหลอดเลือดและการคลุกคลีกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MRSA แล้วยังพบอีกว่านอกจากก่อโรคในโรงพยาบาลแล้วยังพบการแพร่กระจายของเชื้อ MRSA จากโรงพยาบาลสู่ชุมชมอีกด้วย (กองโรงพยาบาลภูมิภาค, 2540)

โดยทั่วไป *S. Aureus* สายพันธุ์ปกติจะสร้าง PBP 4 ชนิด โดยมีหน้าที่หลักในการเชื่อมพันธะเพปไทด์ (Cross-link) ของโมเลกุล D-Alanyl-D-Alanine Residue กับ *N*-Acetylmuramic Acid เพื่อสร้าง Peptidoglycan ที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ ดังนั้นยากลุ่ม β-Lactam ซึ่งมีกลไกในการเข้าทำลายโดยจับกับบริเวณ Active Site ของ PBPs และส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เชื้อมีผนังเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ ซึ่งทำให้เชื้อไม่สามารถอยู่รอดได้ แต่เชื้อ MRSA มีการพัฒนากลไกในการสร้าง PBP2a ซึ่ง PBP2a มีคุณสมบัติในการทำให้ Active Site เปลี่ยนไปจึงทำให้ยากลุ่ม β-Lactam เข้าจับไม่ได้ ดังนั้นการใช้ยากลุ่ม β-Lactam เช่น Penicillin หรือ Penicillin กึ่งสังเคราะห์ (Semisynthetic Penicillin) เช่น Oxacillin และ Methicillin จึงไม่ได้ผลกับเชื้อกลุ่ม MRSA (Hartman & Tomasz, 1984)

2.5 การแบ่งประเภทของเชื้อแบคทีเรียตามกลไกการดื้อยา

2.5.1 True Methicillin-Resistant *S. Aureus* (“True” MRSA)

“True” MRSA เป็นเชื้อที่พบว่า ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายขนานโดยเฉพาะยากลุ่ม Penicillinase-Resistant Penicillin เช่น Methicillim, Oxacillin, ClOxacillin, DiclOxacillin และ Nafcillin รวมทั้งดื้อต่อยากลุ่ม Macrolide และ Chloramphenicol อีกด้วย ซึ่งกลไกการดื้อยาของเชื้อชนิดนี้เกิดจากผนังเซลล์สร้าง PBP ผิดปกติ เรียกว่า PBP2a โดยมียีน *mecA* เป็นยีนควบคุมในการสร้าง ซึ่ง PBP ทำหน้าที่เกี่ยวกับปฏิกิริยา Transpeptidation และ Carboxypeptidation โดยมีความสำคัญต่อการเกิด Cross Link ของ Peptidoglycan Back Bone ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้น PBP2a จึงทำหน้าที่แทน PBP แต่ PBP2a จับกับ β-Lactam ได้ไม่ดี ยาจึงออกฤทธิ์ได้ไม่มีประสิทธิภาพ แบคทีเรียจึงไม่ถูกยับยั้ง (ศศิธร ลิขิตนุกูล และคณะ, 2543)

2.5.2 Borderline Oxacillin-Resistant *S. Aureus* (BORSA)

ปรากฏการณ์การดื้อยาครั้งแรกของเชื้อ BORSA มีลักษณะที่แสดงออกแบบ Non-heterogeneous มีระดับค่า minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของยา Oxacillin น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 μg/ml ต่อมาพบว่าเชื้อชนิดนี้มีการดื้อต่อยา Oxacillin เพิ่มมากขึ้น โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 2-8 μg/ml ซึ่งสายพันธุ์ BORSA ต่างจาก “True” MRSA เนื่องจากสายพันธุ์ BORSA ไม่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะข้ามกลุ่ม (Nelson et al., 2006) ซึ่งกลไกการดื้อยาของเชื้อ BORSA เกิดจากเชื้อสังเคราะห์เอนไซม์ β-Lactamase มากเกินไป (hyperproducing β-Lactam) ทำให้เอนไซม์ดังกล่าวย่อยสลายบางส่วนของยากลุ่ม Penicillinase-Resistant Penicillin และ Cephalosporins จึงทำให้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้

2.5.3 Modified-Resistant *S. Aureus* (MODSA)

MODSA จัดอยู่ในกลุ่ม borderline Resistant เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ยีน *mecA* เกิดความบกพร่องและมีการเปลี่ยนแปลงหรือเพิ่มจำนวนของ PBP ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ PBP2a ทำให้กลไกการดื้อยาต่างจากสายพันธุ์ BORSA จากความบกพร่องของยีน *mecA* ส่งผลให้มีการสร้าง PBP4 เพิ่มขึ้น

ร่วมกับการมี PBP1 และ PBP2 ลดลง จึงทำให้การจับของ β-Lactam ต่อ PBP ลดลง (Crossley et al., 2009)

2.5.4 Methicillin-Aminoglycoside-Resistant *S. Aureus* (MARSA)

MARSA จัดเป็นเชื้อ *S. Aureus* สายพันธุ์ที่สามารถดื้อต่อยา Methicillin และ Aminoglycoside เชื้อชนิดนี้มีการพัฒนาการดื้อยาสูงกว่าเชื้อ MRSA เนื่องจากสายพันธุ์ MARSA สามารถผลิตเอนไซม์ Aminoglycoside-Modifying ชนิด Bifunctional Enzyme ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ Aminoglycoside 6'-Adenylyl Transferase (AAC(6')) และ Aminoglycoside 2'-Phosphotransferase (APH(2')) เอนไซม์ดังกล่าวมีผลในการเร่งปฏิกิริยา *N*-Acetylation และ *O*-Phosphorylation จึงมีผลต่อการดื้อยากลุ่ม Aminoglycoside โดยเฉพาะ Gentamicin และ Amikacin (Crossley et al., 2009)

2.5.6 Vancomycin-Intermediate-Resistant *S. Aureus* (VISA)

ในปี พ.ศ. 2539 มีรายงานการดื้อยา Vancomycin ของเชื้อ MRSA ที่มีความไวปานกลาง (MIC 8-16 μg/ml) โดยมีการตรวจพบเชื้อ VISA เป็นครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่นในผู้ป่วยโรคปอดบวมที่ติดเชื้อ MRSA กลไกการดื้อยาของเชื้อ VISA เกิดจากการหนาตัวของผนังเซลล์ร่วมกับการลดจำนวนของ Peptidoglycan Cross-Linking จึงส่งผลให้มี D-Alanyl-D-Alamide Side Chains เหลืออยู่มาก ซึ่ง D-Alanyl-D-Alamide Side Chains จะไปจับกับ Vancomycin ภายนอกเยื่อบุเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย จึงสามารถป้องกัน Vancomycin เข้ามาภายในเซลล์ได้ (ประภาวดี ติษยาธิคม และคณะ, 2547)

2.5.7 Vancomycin-Resistant *S. Aureus* (VRSA)

ในปี พ.ศ. 2545 มีการตรวจพบเชื้อ *S. Aureus* ที่สามารถต้านยา Vancomycin ได้ในระดับสูง (MIC ≥ 16 μg/ml) โดยมีการพบเชื้อ VRSA ในผู้ป่วยที่โรงพยาบาลประเทศสหรัฐอเมริกา (Appelbaum, 2007) ซึ่งกลไกการดื้อยาของเชื้อ VRSA เกิดจากเชื้อชนิดนี้มียีน *Van* ซึ่งได้รับการถ่ายทอดจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *Enterococcus* spp. ซึ่งสามารถต้านยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดรวมทั้ง Vancomycin ด้วย ซึ่งกลุ่มยีน *Van* มีทั้งหมด 5 ชนิด คือ *VanA*, *VanB*, *VanC*, *VanD* และ *VanE* โดยยีน *VanA* ที่พบในเชื้อ VRSA เป็นสาเหตุสำคัญต่อการดื้อยา Vancomycin เนื่องจากยีน *VanA*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เปลี่ยนแปลง Precursor ของโครงสร้างผนังเซลล์ จาก D-Alanyl-D-Alamide Residue เป็น D-Alanine-D-Lactate ทำให้ยา Vancomycin ไม่สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายได้ (Tenover, 2006)

2.6 เห็ดเรืองแสง (Luminescent Mushroom)

เห็ดเรืองแสง คือ เห็ดที่สามารถเรืองแสงหรือเปล่งแสงได้ในที่มืด ซึ่งแสงที่เรืองออกมาอาจเป็นสีเขียวอมฟ้า หรือสีเขียวอมเหลืองตามแต่ชนิดของเห็ด ซึ่งสาเหตุที่เห็ดเรืองแสงนั้น เพื่อดึงดูดแมลงที่หากินในเวลากลางคืนให้เข้ามากัดกินดอกเห็ด เพื่อช่วยในการแพร่กระจายสปอร์ออกไปได้ไกลมากยิ่งขึ้น (Sivinski, 1981) เห็ดเรืองแสงเป็นเห็ดที่ขึ้นอยู่ในพื้นที่เฉพาะ เช่น พื้นที่ที่มีความชื้นสูง มีหมอกและหยาดน้ำกลางอากาศ มีอาหารที่เหมาะสม อากาศถ่ายเทได้ดี มีแสงในเวลากลางวันที่ไม่ร้อนจนเกินไป (สาธิต ไทยทัตกุล, 2561) เห็ดเรืองแสงส่วนใหญ่เป็นเห็ดที่อาศัยซากผุพังของพืชเป็นแหล่งอาหาร อาจเกิดอยู่ตามกิ่งไผ่ กิ่งหวาย ต้นปาล์ม กิ่งหมาก ท่อนไม้ที่เริ่มถูกย่อยสลาย หรือบางครั้งเกิดขึ้นบนดินที่มีธาตุอาหารอยู่ใต้ดิน ในพื้นที่ที่พบเห็ดมักจะมีความชื้นสูง และอุณหภูมิการเกิดดอกมักไม่เกิน 28°C หรือ 82.4°F (Kirchmair, Poder, and Huber, 1999; Kirchmair, Poder, Huber, & Miller, 2002)

การศึกษาเห็ดเรืองแสงในประเทศไทยนั้น มีจุดเริ่มต้นจากการศึกษาความหลากชนิดในเขตบริเวณพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พื้นที่โคกภูตากา อำเภอเวียงเก่า จังหวัดขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2545 โดยมีการค้นพบเห็ดเรืองแสง *N. Nambi* Speg. ซึ่งมีลักษณะคล้ายเห็ดนางรม แต่จัดเป็นเห็ดพิษ มักพบในที่ที่มีความชื้นสูง โดยเห็ดเรืองแสงชนิดนี้จะขึ้นเป็นกลุ่ม ๆ ละ 4-5 ดอก บนรากไม้หรือกิ่งไม้ที่ตายแล้ว โดยในเวลากลางวันก้านครีบและดอกจะมีสีขาว แต่ในเวลากลางคืนโดยเฉพาะในคืนเดือนมืดดอกของเห็ดชนิดนี้จะสามารถเปล่งแสงได้ ซึ่งมีแสงสีเขียวอมเหลือง (รูปที่ 2.2) และได้แยกเชื้อเห็ดบริสุทธิ์จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท KKU1 (วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, จิรยุทย์ คำขจร, และนิวัฒ เสนาะเมือง, 2547) และ KKU2 (วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และคณะ, 2552) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดเรืองแสง *N. Nambi มีดอกสีขาว* เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-6 cm ไม่มีวงแหวนใต้หมวกดอกมีลักษณะเป็นครีบสีขาว สปอร์มีลักษณะรูปไข่ เรียบ ไม่มีลาย ขนาด 2.5-3.0 x 5.0-7.5 µm

รูปที่ 2.2 ลักษณะของเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus Nambi*
ในสภาพแสงกลางวัน (ซ้าย) และกลางคืน (ขวา)
ที่มา : วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และคณะ, 2552

2.7 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเห็ดเรืองแสง

รุ้งรวิน หนูกรอบ, สิริกร อินทร์งาม, และสุธีกานต์ ศักดาพิศิษฏ์ (2560) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของ Aurisin A ต่อเชื้อ MRSA ด้วยวิธี Broth Microdilution พบว่า สารสกัด Ethyl Acetate จากน้ำเลี้ยงเชื้อ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วย MEthanol โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 8-16 µg/ml และ 64-256 µg/ml ตามลำดับ ส่วนสาร Aurisin A ที่เป็นสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเห็ดเรืองแสงนั้นมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียใกล้เคียงกับยา Vancomycin โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 2-4 µg/ml

สุกัญญา ผิวดำ, ปาอีซะ เจะหลง, และสุนิสา เกื้อชาติ (2558) ได้ทำการศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้นและฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. Epidermidis* ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงด้วยวิธี TLC Autobiography Assay พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. Epidermidis* โดยเกิด Clear Zone ตามการเคลื่อนที่ของสาร และการศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้นพบว่ามีสาร 3 กลุ่ม ได้แก่ Flavonoid, Saponin และ Tannin

เหมือนฝัน ซื่อตรง, ฐานิกา กระจ่างฉาย, และรัตนาภรณ์ เทพธวัช (2557) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคที่เรีย *S. Epidermidis* ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง พบว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดจากเส้นใย โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 4-16 µg/ml

และพบว่าสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase ในเชื้อ *S. Epidermidis*

ดลฤทัย ไกรลมสม, อมิตา แมหะ, และนัซรีน ตาเละ (2560) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสาร Aurisin A ต่อเชื้อ *S. Epidermidis* โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. Epidermidis* ATCC 35984 และ *S. Epidermidis* NPRC 011-019 ด้วยวิธี Broth Microdilution พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Ethyl Acetate และ Aurisin A มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าสารสกัดจากเส้นใย โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 2-8 µg/ml ส่วนสารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วย MEthanol มีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 128-512 µg/ml

ชนนาถ เจริญบุญญาฤทธิ์, รัฎพร พรมแก้ว, และอมลรดาณี สุวีระ (2557) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ด้วยวิธี Broth Microdilution พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Hexane มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 256 µg/ml และมีค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC) เท่ากับ 512 µg/ml สำหรับสารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วย Hexane, Dichloromethane และ Ethyl Acetate มีค่า MIC และ MBC มากกว่า 1,024 µg/ml

วันเพ็ญ นิจศรีวงษ์ และสุภศจี แฟงรัก (2557) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้ง *Microsporum Gypseum* MU-SH4 ด้วยวิธี Broth Microdilution พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *M. Gypseum* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ Hexane และ Ethyl Acetate ตามลำดับ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 8, 16 และ 64 µg/ml ตามลำดับ และมีค่า Minimal Fungicidal Concentration (MFC) $\geq$ 1,024 µg/ml ซึ่งจากการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อราก่อโรคได้

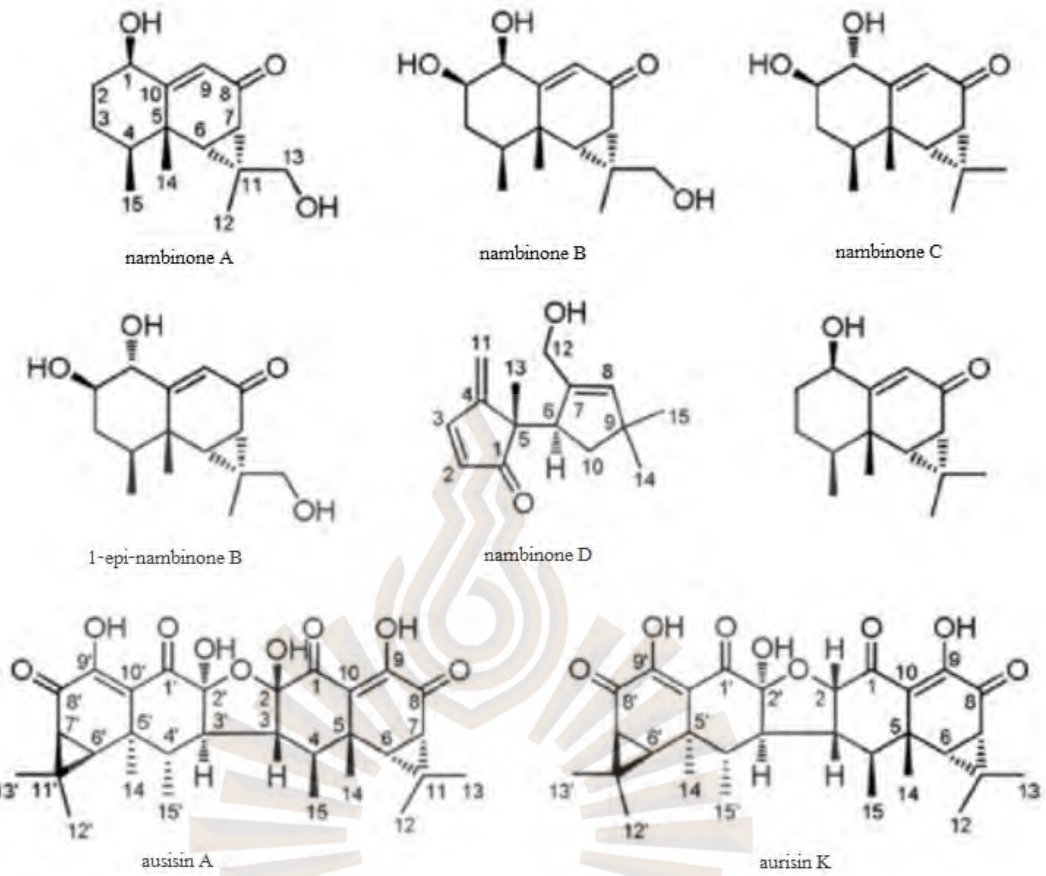
สุกัลญา หลีแจ้, ธีรทัศน์ สุดสาย, นันทพงศ์ ขำทอง, และอัมพรรัตน์ ประไพวงศ์ (2558) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง โดยทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย Ethyl Acetate แล้วสกัดเส้นใยด้วย Ethanol แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษในหนูขาวสายพันธุ์ Swiss Albino โดยให้สารสกัดแบบครั้งเดียวในปริมาณ 0.5-2.0 g/kg ของน้ำหนักตัว พบว่าสาร

สกัดจากเห็ดเรืองแสงไม่มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง และสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองจำนวน 2 ชนิด คือ Aurisin A และ Axinysone B

อาริยา ช่วยอินทร์ และพีรวัฒน์ ชัยวันดี (2559) พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Ethyl Acetate จากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงสามารถฆ่าไรไข่ปลาได้ดีที่สุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีค่า 50% Lethal Concentration (LC_{50}) เท่ากับ 0.45% (w/v) สารสกัดหยาบ Hexane จากเส้นใยของเห็ดเรืองแสงสามารถฆ่าไรไข่ปลาได้ดีที่สุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.88% (w/v) และน้ำเลี้ยงเชื้อจากเห็ดเรืองแสงที่ไม่ผ่านการสกัด สามารถฆ่าเชื้อไรไข่ปลาได้ 33.08% เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชัฏติกา พวงงาม, วรัญญา แก้วมาก, และอัญชลี เปิดชั้น (2558) ศึกษาความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อเซลล์มะเร็งชนิด MCF-7, HeLa และ Colo25 ด้วยวิธี MTT Assay พบว่าสารสกัดหยาบมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด โดยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane และ Ethyl Acetate มีความเป็นพิษสูงสุดในเซลล์มะเร็งชนิด MCF-7 และ Colo25 ซึ่งมีค่า 50% Inhibitory Concentration (IC_{50}) เท่ากับ 1.30 และ 0.02 µg/ml ตามลำดับ ส่วนสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วย Dichloromethane มีความเป็นพิษสูงสุดในเซลล์มะเร็งชนิด HeLa ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.72 µg/ml จากการศึกษาทำให้ทราบว่าสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงมีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์มะเร็ง

Kanokmedhakul et al. (2012) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง โดยได้ทำการแยกสารบริสุทธิ์ได้ 7 ชนิด (รูปที่ 2.3) ได้แก่ Nambinone A, Nambinone B, Nambinone C, 1-*epi*-Nambinone B, Nambinone D, aurisin A และ aurisin K และได้นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสามารถต้านเชื้อมาลาเรียได้ดีและสามารถต้านเชื้อวัณโรคได้ดีปานกลาง และพบว่าสารบริสุทธิ์จากเห็ดเรืองแสงมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอีกด้วย



รูปที่ 2.3 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเห็ดเรืองแสง *N. Nambi*

ที่มา : Kanokmedhakul et al., 2012

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

การศึกษาวิจัย เรื่อง ฤทธิ์ต้านเชื้อ Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus Nambi*) มีวิธีดำเนินการทดลองตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1.1 Dichloromethane

3.1.1.2 DimEthyl Sulfoxide (DMSO)

3.1.1.3 Distilled Water

3.1.1.4 Ethanol

3.1.1.5 Ethyl Acetate

3.1.1.6 Hexane

3.1.1.7 MEthanol

3.1.1.8 Oxacillin

3.1.1.9 Penicillin G

3.1.1.10 Resazurin

3.1.1.11 Sodium Chloride

3.1.1.12 Vancomycin

3.1.1.13 0.5 McFarland Standard

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.2.1 Analytical Balance

3.1.2.2 Autoclave

3.1.2.3 Beaker

3.1.2.4 Centrifuge

3.1.2.5 Cylinder

3.1.2.6 EDTA Tube

3.1.2.7 Erlenmeyer Flask

3.1.2.8 Filter Paper

3.1.2.9 Hot Air Oven

3.1.2.10 Hot Plate

3.1.2.11 Incubator

3.1.2.12 Inoculating Loop and Needle

3.1.2.13 Microcentrifuge Tube

3.1.2.14 Micropipette

3.1.2.15 MicroPlate Reader

3.1.2.16 Microtiter Plate

3.1.2.17 Multi Channel Pipette

3.1.2.18 Petri Dish

3.1.2.19 Rotary Evaporator

3.1.2.20 Round Bottom Flask

3.1.2.21 Spectrophotometer

3.1.2.22 Suction Pump

3.1.2.23 Test Tube

3.1.2.24 Ultrasonic Bath

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.3.1 Mueller-Hinton Broth (MHB)

3.1.3.2 Potato Dextrose Agar (PDA)

3.1.3.3 Potato Dextrose Broth (PDB)

3.1.3.4 Tryptic Soy Broth (TSB)

3.2 การเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสง

แบ่งเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่เจริญบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ให้มีขนาดเท่า ๆ กันจำนวน 3 ชิ้น นำเส้นใยที่ได้เขี่ยลงในขวดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB) ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว จากนั้นนำขวดอาหารที่บรรจุเชื้อแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 วัน โดยนำออกมาโดนแสงวันละ 2 ชั่วโมง ทุก ๆ วัน

3.3 การสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสง (Culture Filtrate)

นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงมากรองแยกเส้นใย (Mycelium) และน้ำเลี้ยงเชื้อ (Culture Filtrate) ด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาสกัดด้วย Hexane ในอัตราส่วน น้ำเลี้ยงเชื้อ : Hexane (1:1.5) โดยเก็บสารสกัดที่อยู่ในชั้นของ Hexane ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator แล้วบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ (Hexane Extract) จากนั้นนำชั้น Aqueous ที่ผ่านการสกัดด้วย Hexane มาสกัดต่อด้วย Dichloromethane ในอัตราส่วน Aqueous : Dichloromethane (1:1.5) โดยเก็บสารสกัดที่อยู่ในชั้นของ Dichloromethane ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator แล้วบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ (Dichloromethane Extract) แล้วจึงนำชั้น Aqeous ที่ผ่านการสกัดด้วย Dichloromethane มาสกัดต่อด้วย Ethyl Acetate ในอัตราส่วน Aqueous : Ethyl Acetate (1:1.5) โดยเก็บสารสกัดที่อยู่ในชั้นของ Ethyl Acetate ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator แล้วบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ (Ethyl Acetate Extract) เก็บสารสกัดดังกล่าวที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.4 การสกัดสารออกฤทธิ์จากเส้นใยของเห็ดเรืองแสง (Mycelium)

ชั่งน้ำหนักของเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่ผ่านการกรองแยกน้ำเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงตัดเส้นใยเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วสกัดด้วย MEthanol ด้วยวิธีการหมัก (Maceration) จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 3 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator บันทึกน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ (MEthanol Extract) จากนั้นนำสารที่สกัดด้วย MEthanol มาละลายด้วย 90% MEthanol ปริมาตร 100 ml ทำการสกัดด้วย Hexane ในอัตราส่วน สารสกัด : Hexane (1:1.5) โดยเก็บสารสกัดที่อยู่ในชั้นของ Hexane ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator แล้วบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ (Hexane Extract) นำชั้น Aqueous MEthanol ไประเหยเอา MEthanol ออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator จากนั้นนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml แล้วจึงนำมาสกัดต่อด้วย Dichloromethane ในอัตราส่วน สารสกัด : Dichloromethane (1:1.5) โดยเก็บสารสกัดที่อยู่ในชั้นของ Dichloromethane ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator แล้วบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ (Dichloromethane Extract) แล้วจึงนำชั้น Aqueous ที่ผ่านการสกัดด้วย Dichloromethane มาสกัดต่อด้วย Ethyl Acetate ในอัตราส่วน สารสกัด : Ethyl Acetate (1:1.5) โดยเก็บสารสกัดที่อยู่ในชั้นของ Ethyl Acetate ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator แล้วบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ (Ethyl Acetate Extract) จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ดเรืองแสงที่ได้ไปทดสอบทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียต่อไป

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงด้วยวิธี Broth Microdilution Method

3.5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคือ *S. Aureus* ATCC 29213 และเชื้อ MRSA NPRC 001R-020R จำนวน 20 Isolate โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อโคโลนีเดี่ยว (Single Colony) ประมาณ 3-5 Colony เพื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller-Hinton Broth (MHB) เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อด้วย Normal Saline Solution (NSS) ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ

0.5 McFarland Standard (มีเชื้อประมาณ $1.5x10^8$ CFU/ml) ปรับเชื้อ 0.5 McFarland Standard โดยใช้ MHB ให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ $1x10^6$ CFU/ml

3.5.2 การเจือจางสารสกัดและยาที่ใช้ในการทดสอบ

เจือจางสารสกัดด้วย 1% DimEthyl Sulphoxide (DMSO) และเจือจางยา Vancomycin ด้วยน้ำกลั่น (Distilled Water; DW) แบบลำดับสอง (Serial Two-Fold Dilution) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 10-1,280 µg/ml และ 1.25-160 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ

3.5.3 การทดสอบ

เติมเชื้อ ($1x10^6$ CFU/ml) ปริมาตร 100 µl ใน Well ที่มีสารสกัด 20 µl และ MHB 80 µl นำ Plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นใส่ 1% Resazurin ปริมาตร 10 µl ลงใน 96-Well Plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) โดยอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดใน Well ที่สี Resazurin ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ไม่มีเชื้อเจริญ) ปิเปตตัวอย่างจาก Well ที่ไม่มีเชื้อเจริญ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) โดยอ่านค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ไม่มีเชื้อเจริญบนอาหาร TSA

3.6 การศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา (Time-Kill Assay)

3.6.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคือ *S. Aureus* ATCC 29213 และเชื้อ MRSA NPRC 001R โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียดังแสดงในการทดลอง 3.5.1

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.6.2 การเจือจางสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

เจือจางสารสกัดด้วย 1% DMSO แบบ Serial Two-Fold Dilution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1/4MIC-4MIC และใช้ 1% DMSO เป็น Negative Control

3.6.3 การทดสอบ

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1,000 µl อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 800 µl และสารสกัดปริมาตร 200 µl ใส่ลงหลอดทดลอง โดยในชุดควบคุมจะใช้ 1% DMSO ปริมาตร 200 µl แทนสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง นำมาเจือจางแบบลำดับสิบ (Serial Two-Fold Dilution) ด้วย NSS แล้วนับจำนวนเชื้อโดยวิธี Drop Plate โดยหยดเชื้อที่เจือจางแล้ว 10 µl บนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น เพื่อนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต

3.7 การศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของเซลล์แบคทีเรีย (Bacteriolysis Assay)

3.7.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคือ *S. Aureus* ATCC 29213 และเชื้อ MRSA NPRC 001R โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียให้มีจำนวนเท่ากับ $1.5x10^{8}$ CFU/ml ดังแสดงในการทดลอง 3.5.1

3.7.2 การเจือจางสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

เจือจางสารสกัดด้วย 1% DMSO แบบ Serial Two-Fold Dilution ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ MIC-8MIC

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.7.3 การทดสอบ

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบปริมาตร 10.8 ml และสารสกัดปริมาตร 1.2 ml ใส่ลงหลอดทดลอง โดยใช้ 1% DMSO เป็น Negative Control บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวัดความขุ่นของเชื้อที่ OD_{620} nm เพื่อคำนวณค่าสัดส่วนการแตกของเซลล์แบคทีเรีย

$$\text{ค่าสัดส่วนการแตกของเซลล์แบคทีเรีย} = \frac{\text{ค่า OD ช่วงเวลาต่าง ๆ}}{\text{ค่า OD ช่วงเวลาเริ่มต้น}}$$

3.8 การศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ (Erythrocyte Haemolysis Assay)

3.8.1 การเตรียมตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดสอบ

เก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง นำมาปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำส่วนเม็ดเลือดแดงมาล้างด้วย NSS จำนวน 3 ครั้ง แล้วเจือจางจนมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่ากับ 2.5 x 10^8 cell/ml ด้วย NSS

3.8.2 การเจือจางสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

เจือจางสารสกัดด้วย 1% DMSO แบบ Serial Two-Fold Dilution ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ MIC-128MIC

3.8.3 การทดสอบ

นำเม็ดเลือดแดงและสารสกัดใส่ในหลอดทดลอง โดยใช้ DW และ NSS เป็น Positive และ Negative Control ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำส่วน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ใสมาเจือจางแบบ Serial Ten-Fold Dilution ด้วย NSS แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{550} nm เพื่อคำนวนร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง

$$\text{ร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง} = \frac{\text{ค่า OD ชุดทดสอบ}}{\text{ค่า OD ชุดควบคุม}} \times 100$$

3.9 การศึกษาประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียหลังจากบ่มด้วยสารสกัดเห็ดเรืองแสง (Whole Blood Killing Assay)

3.9.1 การเตรียมตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดสอบ

เก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรงและควรทำการทดลองหลังจากเก็บตัวอย่างเลือดไม่เกิน 4 ชั่วโมง

3.9.2 การเจือจางสารสกัดและยาที่ใช้ในการทดสอบ

เจือจางสารสกัดด้วย 1% DMSO แบบ Serial Two-Fold Dilution ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ ¼ MIC-MIC

3.9.3 การทดสอบ

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1,000 µl อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 800 µl และสารสกัดปริมาตร 200 µl ใส่ลงหลอดทดลองตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ต้องการทดสอบ โดย Negative Control ใช้ 1% DMSO แทนสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลอง ปรับความขุ่นของเชื้อด้วย NSS ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard นำตัวอย่างเลือดปริมาตร 190 µl และเชื้อปริมาตร 10 µl ใส่ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาเจือจางแบบ Serial Ten-Fold Dilution ด้วย NSS แล้วนับจำนวนเชื้อโดยวิธี Drop Plate โดยหยดเชื้อที่เจือจางแล้ว 10 µl บนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น เพื่อนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.10 การศึกษาการดื้อต่อยาและสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงของเชื้อแบคทีเรีย (Stepwise Selection)

3.10.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคือ *S. Aureus* ATCC 29213 และเชื้อ MRSA NPRC 001R โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียดังแสดงในการทดลอง 3.5.1

3.10.2 การเจือจางสารสกัดและยาที่ใช้ในการทดสอบ

เจือจางสารสกัดด้วย 1% DMSO และเจือจางยา Vancomycin, Oxacillin และ Penicillin G ด้วย DW แบบ Serial Two-Fold Dilution ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1/4MIC-16MIC

3.10.3 การทดสอบ

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1,000 µl อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 800 µl และสารสกัดปริมาตร 200 µl ใส่ลงหลอดทดลอง โดย Positive Control ของเชื้อ MRSA NPRC 001R ใช้ยา Vancomycin แทนสารสกัด และ Positive Control ของเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 ใช้ยา Vancomycin, Oxacillin และ Penicillin G แทนสารสกัด และ Negative Control ของเชื้อทั้งสองชนิดใช้ 1% DMSO แทนสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นเดิมซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อจากรอบสุดท้ายที่ทดสอบปริมาตร 1,000 µl ใส่ลงในหลอดใหม่เพิ่มความเข้มข้นของยาและสารสกัดสองเท่าของความเข้มข้นเริ่มต้น โดยในแต่ละความเข้มข้นทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง จนถึงความเข้มข้นที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ จากนั้นปั่นแยกเชื้อแบคทีเรียแล้วนำมาทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ในอาหาร MHB ที่ปราศจากยา เชื้อ และสารสกัด ปั่นแยกตัวเชื้อแล้วนำมาทดสอบค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี Broth Microdilution เพื่อประเมินผลการดื้อของเชื้อแบคทีเรียต่อยาและสารสกัด

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.11 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิตินั้น ข้อมูลทั้งหมดจะถูกระบุในรูปแบบของค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (Standard Error of Mean, S.E.M.)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสง

จากการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงด้วยวิธี Liquid-Liquid Extraction โดยใช้ตัวทำละลาย Hexane, Dichloromethane และ Ethyl Acetate ซึ่งเป็นการสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์โดยเรียงลำดับความมีขั้วจากตัวทำละลายไม่มีขั้วจนถึงตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้น ซึ่งทำให้ได้ส่วนสกัดที่มีขั้วตามขั้วของตัวทำละลายซึ่งมีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, สุภนิดา บัวบาน, ประภัสสร รักถาวร, และณิชากรม เจริญกุล, 2549) พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีน้ำหนักของสารสกัดเท่ากับ 128.78 mg/l ซึ่ง Dichloromethane เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางมีคุณสมบัติในการทำละลายได้ทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางจะมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับส่วนที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูง (Panomket, Wanrum, and Srivoramas, 2011) ส่วนสารสกัด Ethyl Acetate มีน้ำหนักของสารสกัดเท่ากับ 94.24 mg/l และสารสกัด Hexane มีน้ำหนักของสารสกัดน้อยที่สุดซึ่งมีน้ำหนักของสารสกัดเท่ากับ 14.46 mg/l ส่วนสารสกัดจากเส้นใยของเห็ดเรืองแสงพบว่า สารสกัด Dichloromethane มีน้ำหนักของสารสกัดมากที่สุด โดยมีน้ำหนักของสารสกัดเท่ากับ 1,040 mg สารสกัด Hexane มีน้ำหนักของสารสกัดเท่ากับ 340 mg และสารสกัด Ethyl Acetate มีน้ำหนักของสารสกัดน้อยที่สุด ซึ่งมีน้ำหนักของสารสกัดเท่ากับ 130 mg ดังแสดงในตารางที่ 4.1

จากรายงานการวิจัยของเหมือนฝัน ซื่อตรง และคณะ (2557) ซึ่งทำการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงด้วยตัวทำละลาย Hexane, Dichloromethane, Ethyl Acetate ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันพบว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางมีน้ำหนักและ %Yeild ของสารสกัดมากที่สุด และรายงานการวิจัยของ ชนนาถ เจริญบุญญาฤทธิ์ และคณะ (2557) ซึ่งทำการสกัดสารจากน้ำเลี้ยง

เชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกันนั้นให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกัน คือ สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีน้ำหนักและ %yeild ของสารสกัดมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด		
	Hexane	**Dichloromethane**	**Ethyl Acetate**
สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ	14.46 mg/l	128.78 mg/l	94.24 mg/l
สารสกัดจากเส้นใย	340 mg	1,040 mg	130 mg

4.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Hexane, Dichloromethane และ Ethyl Acetate ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R-020R โดยวิธี Broth Microdilution โดยใช้ยา Vancomycin เป็น Positive Control พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 2 µg/ml และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA NPRC 001R ได้ดี โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 4-8 µg/ml ส่วนสารสกัด Ethyl Acetate พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 8-32 µg/ml ในขณะที่สารสกัดจากเส้นใยของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 4-8 µg/ml สารสกัด Ethyl Acetate มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ปานกลางมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 32-64 µg/ml และสารสกัด Hexane ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ (MIC และ MBC > 128 µg/ml) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

นอกจากนี้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA NPRC 002R-020R ได้ดี โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 4 µg/ml ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ส่วนยา Vancomycin ซึ่งเป็นชุดควบคุมในการทดสอบพบว่ามีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อทั้ง 20 สายพันธุ์เท่ากับ 1 µg/ml ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI ซึ่งผลจากการทดสอบฤทธิ์

ต้านเชื้อแบคที่เรียแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งต่อเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีที่สุด เนื่องจาก Dichloromethane เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง จึงทำให้สารสกัดจากตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดจากตัวทำละลายที่มีขั้วสูง (Panomket et al., 2011)

จากรายงานการวิจัยของ รุ้งรวิน หนูกรอบ และคณะ (2560) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสาร aurisin A ต่อเชื้อ MRSA ด้วยวิธี Broth Microdilution พบว่าสารสกัด Ethyl Acetate จากน้ำเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วย MEthanol โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 8-16 µg/ml และ 64-256 µg/ml ตามลำดับ ส่วนสาร Aurisin A ที่เป็นสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเห็ดเรืองแสงนั้นมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียใกล้เคียงกับยา Vancomycin โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 2-4 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการวิจัยของ Hong et al. (2016) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA ของสารสกัดจากเห็ด *Phellinus Baumii* ที่สกัดด้วย Ethyl Acetate พบว่ามีค่า MIC ต่อเชื้อ MRSA และ *S. Aureus* ATCC 29213 เท่ากับ 512 µg/ml และมีค่า MBC มากกว่า 2,048 µg/ml และเมื่อใช้สารสกัดดังกล่าวร่วมกับยากลุ่ม β-Lactam พบว่า ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดมีค่าลดลง 128 เท่า (0.5-4 µg/ml) แต่มีค่า MIC ลดลงเล็กน้อยเมื่อใช้ร่วมกับยา Antibiotic ในกลุ่มอื่น ๆ (32-256 µg/ml) และจากรายงานการวิจัยของ Alves, Ferreira, Martins, and Pintado (2012) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดป่าจำนวน 13 สายพันธุ์ (สกัดด้วย MEthanol และน้ำ ที่อัตราส่วน 80:20) ต่อเชื้อ *S. Aureus* และ MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล พบว่าสารสกัดที่มีผลในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดคือ สารสกัดจากเห็ด *Fistulina Hepatica*, *Russula Delica* (MIC = 10 mg/ml) และสารสกัดที่มีฤทธิ์รองลงมาคือสารสกัดจากเห็ด *Mycena rosea*, *Sarcodon imbricatus* และ *Tricoloma Portentosum* (MIC = 20 mg/ml) ซึ่งจากการทดลองดังกล่าวพบว่าค่า MIC ของสารสกัดจากเห็ดมีค่าสูงกว่าค่า MIC ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ที่มีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. Aureus* และ MRSA อยู่ในช่วง 2-4 µg/ml ซึ่งความแตกต่างของค่า MIC นั้นอาจเกิดจากสายพันธุ์ของเห็ดที่นำมาศึกษาและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่มีขั้วแตกต่างกัน ซึ่งอาจทำให้ได้ปริมาณและประเภทของสารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันอีกด้วย

นอกจากนี้สารสกัดจากสมุนไพรไทยหลายชนิดได้มีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA จากรายงานวิจัยของ พรเทพ เต็มรังษี (2554) พบว่าสารสกัดจากแก่นฝาง เปลือกมังคุด และเหง้าขมิ้นชัน

ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Ethanol มีค่า MIC ต่อเชื้อ MRSA อยู่ในช่วง 0.625-5 mg/ml และเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการวิจัยของ ภาวิณี อุ่นกอง (2554) ที่ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. Aureus* ด้วยสารสกัดจากกระทือป่า ขิงแม่โขง และว่านริดสีดวง ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Ethyl Acetate พบว่ามีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 500-2,000 µg/ml ซึ่งเป็นค่า MIC และ MBC ที่สูงกว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงของเห็ดเรืองแสง ซึ่งสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ดีกว่า

จากรายงานวิจัยของ Pankey and Sabath (2004) พบว่าการพิจารณาว่าสารต้านแบคทีเรียชนิดใดมีฤทธิ์ในการยับยั้ง (Bacteriostatic) หรือฆ่า (Bactericidal) นั้น สามารถพิจารณาจากความแตกต่างระหว่างค่า MIC และ MBC ของสารชนิดนั้น หากมีความแตกต่างมากกว่า 4 เท่า สารชนิดนั้นจะออกฤทธิ์ในการยับยั้ง แต่หากมีความแตกต่างน้อยกว่า 4 เท่า สารชนิดนั้นจะออกฤทธิ์ในการฆ่าและทำลายเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีความแตกต่างของค่า MIC และ MBC น้อยกว่า 4 เท่า จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R-020R

ตารางที่ 4.2 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC29213 และ MRSA NPRC 001R

สารสกัด	**MIC/MBC (µg/ml)**	
	***S. Aureus* ATCC 29213**	**MRSA NPRC 001R**
สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ		
Hexane	2/2	8/8
Dichloromethane	2/2	4/4
Ethyl Acetate	8/8	16/32
สารสกัดจากเส้นใย		
Hexane	>128/>128	>128/>128
Dichloromethane	4/8	8/8
Ethyl Acetate	32/32	32/64
ยา Vancomycin	1/1	1/1

ตารางที่ 4.3 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ MRSA NPRC 002R-020R

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	**MIC/MBC (µg/ml)**	
	สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ	**Vancomycin**
S. Aureus ATCC 29213	2/2	1/1
MRSA NPRC 002R	4/4	1/1
MRSA NPRC 003R	4/4	1/1
MRSA NPRC 004R	4/4	1/1
MRSA NPRC 005R	4/4	1/1
MRSA NPRC 006R	4/4	1/1
MRSA NPRC 007R	4/4	1/1
MRSA NPRC 008R	4/4	1/1
MRSA NPRC 009R	4/4	1/1
MRSA NPRC 010R	4/4	1/1
MRSA NPRC 011R	4/4	1/1
MRSA NPRC 012R	4/4	1/1
MRSA NPRC 013R	4/4	1/1
MRSA NPRC 014R	4/4	1/1
MRSA NPRC 015R	4/4	1/1
MRSA NPRC 016R	4/4	1/1
MRSA NPRC 017R	4/4	1/1
MRSA NPRC 018R	4/4	1/1
MRSA NPRC 019R	4/4	1/1
MRSA NPRC 020R	4/4	1/1

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

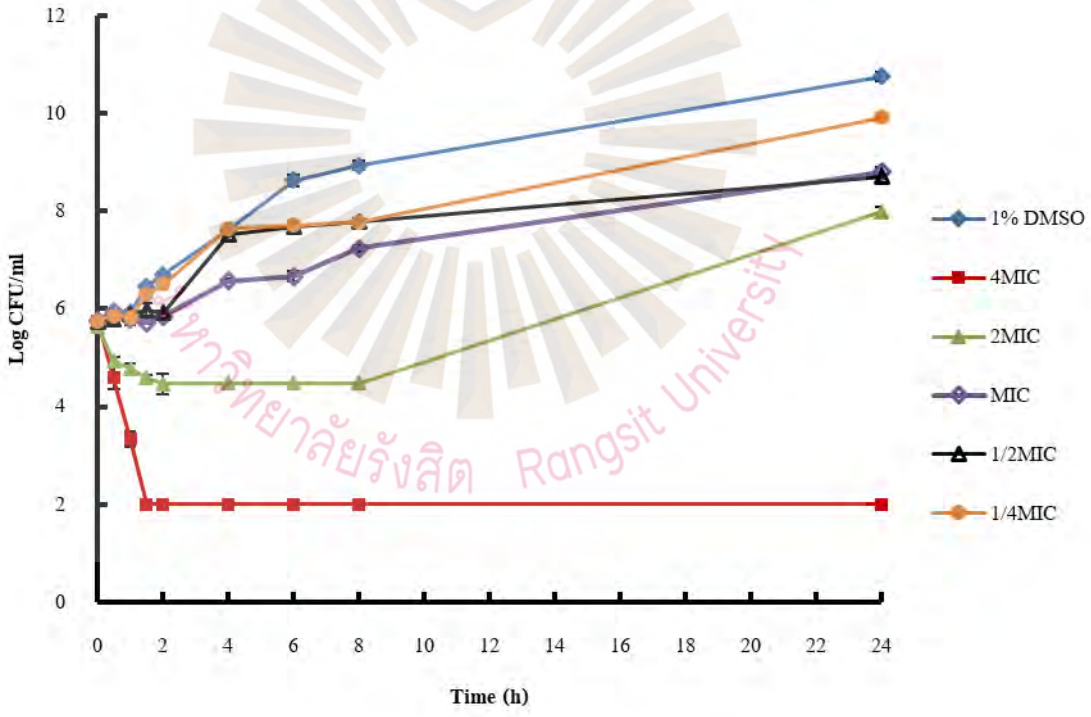
4.3 ผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา (Time-Kill Assay)

จากการทดสอบ Time-Kill Assay ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 4MIC (8 µg/ml) สามารถลดจำนวนเชื้อลงมากกว่า 1 log CFU/ml เมื่อทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลาเพียง 30 นาที และสามารถฆ่าเชื้อได้ที่เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที และไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อในช่วงเวลาถัดไป ส่วนสารสกัดที่ความเข้มข้น 2MIC (4 µg/ml) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ที่เวลา 2 ชั่วโมง และพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้น MIC (2 µg/ml), 1/2MIC (1 µg/ml) และ 1/4MIC (0.5 µg/ml) พบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในทุกช่วงเวลาเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 4.1) เมื่อทดสอบสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อเชื้อ MRSA NPRC 001R พบว่าสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น 4MIC (16 µg/ml) สามารถลดจำนวนเชื้อลงมากกว่า 2 log CFU/ml เมื่อทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลาเพียง 30 นาที และสามารถฆ่าเชื้อได้ที่เวลา 1 ชั่วโมง และไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อในช่วงเวลาถัดไป ส่วนสารสกัดที่ความเข้มข้น 2MIC (8 µg/ml) สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ 2 log CFU/ml เมื่อทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลาเพียง 30 นาที แต่เมื่อเวลาผ่านไปเชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น MIC (4 µg/ml), 1/2MIC (2 µg/ml) และ 1/4MIC (1 µg/ml) พบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในทุกช่วงเวลาเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 4.2)

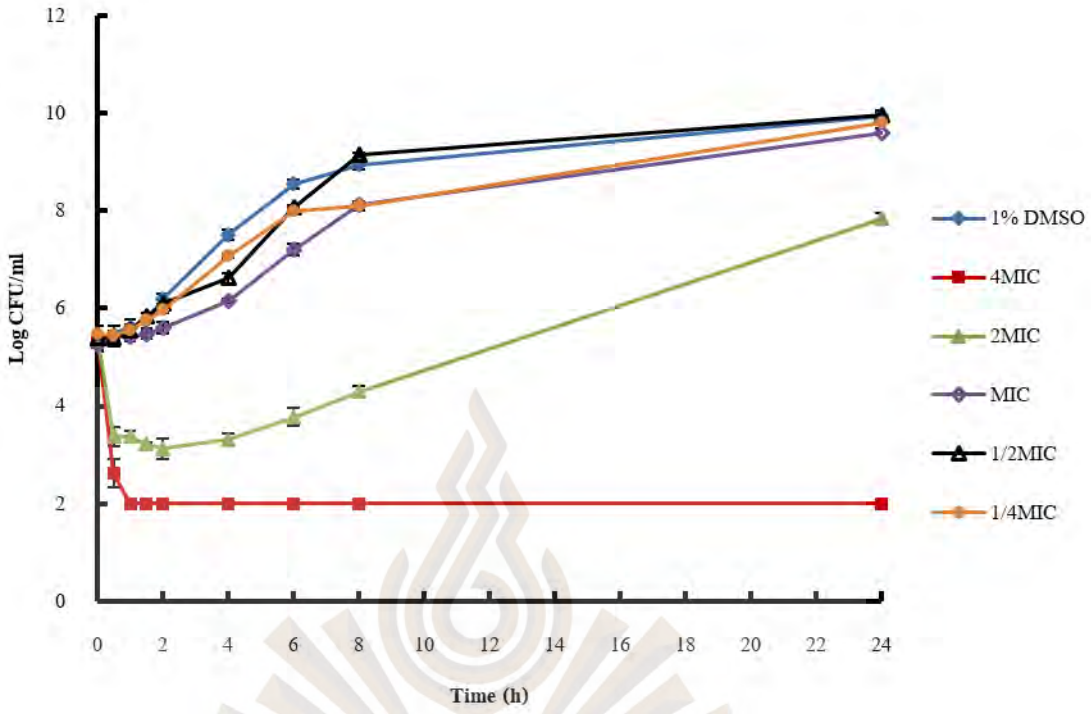
จากรายงานการวิจัยของ Hong et al. (2016) พบว่าสารสกัดจากเห็ด *Phellinus Baumii* ที่สกัดด้วย Ethyl Acetate ที่ความเข้มข้น 1/2MIC (256 µg/ml) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ได้ที่เวลา 4 ชั่วโมง แต่หลังจาก 8 ชั่วโมง เชื้อกลับเพิ่มจำนวนขึ้น และเมื่อนำสารสกัดทดสอบร่วมกับยา Oxacillin และ Cefazolin พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ที่เวลา 4 ชั่วโมง และไม่พบการกลับมาเพิ่มจำนวนของเชื้ออีกเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และสามารถลดจำนวนเชื้อได้ต่ำกว่าการใช้สารสกัดเพียงชนิดเดียว 2 log CFU/ml และจากรายงานการวิจัยของ Matijašević et al. (2016) พบว่าสารสกัดจากเห็ด *Coriolus Versilocor* ที่สกัดด้วย MEthanol ที่ความเข้มข้น 2MIC (5 mg/ml) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Aureus* ได้ที่เวลา 3 ชั่วโมง และสามารถฆ่าเชื้อได้ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจากรายงานการวิจัยดังกล่าว พบว่า สารสกัดจากเห็ด *Phellinus Baumii* มีฤทธิ์ในการยับยั้งแต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อ MRSA ได้ แม้จะใช้ความเข้มข้นที่สูงก็ตาม ส่วนสารสกัดจากเห็ด *Coriolus Versilocor* สามารถฆ่าเชื้อได้ที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่ยังคงใช้ความเข้มข้นในการทดสอบที่สูง

เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสง ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำและสามารถฆ่าเชื้อได้ในเวลา 1-2 ชั่วโมง โดยไม่ทำให้เชื้อกลับมาเจริญอีก

จากการทดสอบพบว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ โดยสามารถลดจำนวนเซลล์ของเชื้อจนเหลือน้อยกว่า 3 log CFU/ml ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานในการทำลายเชื้อได้ 99.9% (Dever, Jorgensen, and Barbour, 1992) ซึ่งการศึกษา Time-Kill curve มีประโยชน์ในการกำหนดความเข้มข้นของสารสกัดในผลิตภัณฑ์ กำหนดขนาดยา (dose) และระยะห่างในการให้ยา (dose interval) นอกจากนี้การศึกษาช่วงเวลาที่สามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้ของสารสกัด เป็นแนวทางหนึ่งในการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของยาหรือสารสกัด (ปวีณา สนธิสมบัติ, 2550) เพื่อให้มีฤทธิ์กว้างพอในการยับยั้งเชื้อบางชนิดที่พบอัตราการดื้อยาสูง



รูปที่ 4.1 ผล Time-Kill Assay ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethaneต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213



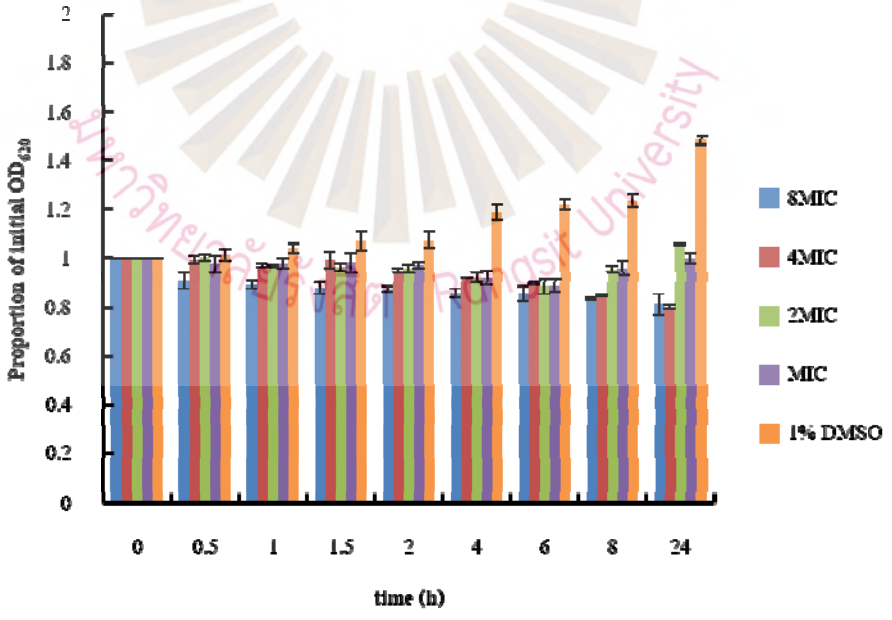
รูปที่ 4.2 ผล Time-Kill Assay ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ MRSA NPRC 001R

4.4 ผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของเซลล์แบคทีเรีย (Bacteriolysis Assay)

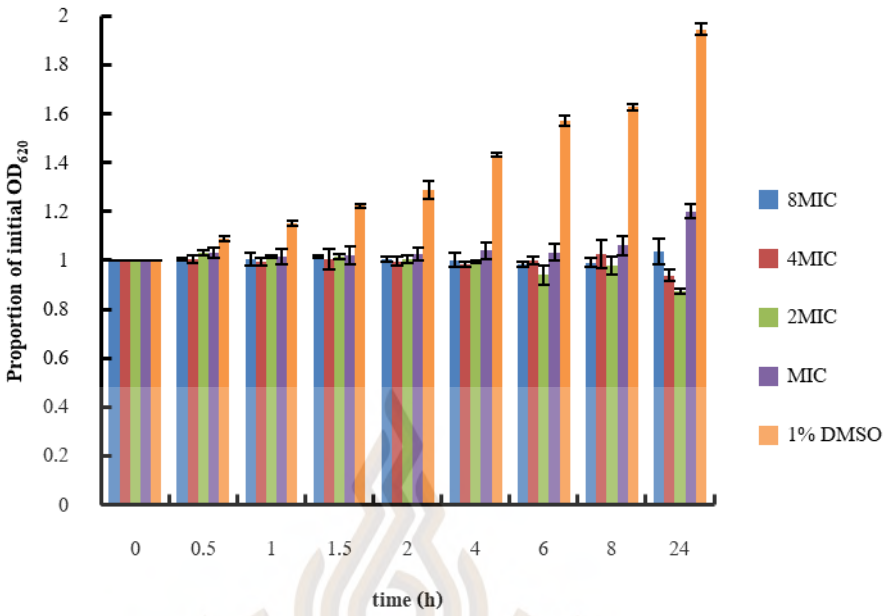
จากการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของเซลล์แบคทีเรียด้วยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 พบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง ความขุ่นของเชื้อที่บ่มด้วยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น 8MIC (16 µg/ml) และ 4MIC (8 µg/ml) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของเซลล์แบคทีเรียได้เล็กน้อย (ค่าความขุ่นลดลง 0.2 เท่า) และที่ความเข้มข้น 2MIC (4 µg/ml) และ MIC (2 µg/ml) ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์แบคทีเรียแตกได้ (ค่าความขุ่นไม่ลดลง) ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และเมื่อทดสอบกับเชื้อ MRSA NPRC 001R พบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง ค่าความขุ่นของเชื้อที่บ่มด้วยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น MIC-8MIC (4-32 µg/ml) มีค่าไม่แตกต่างจากช่วงเวลาเริ่มต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดดังกล่าวไม่มีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (รูปที่ 4.4)

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น 8-16 µg/ml อาจมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกได้เล็กน้อย อย่างไรก็ตามหากต้องการยืนยันผลการทดสอบควรมีการทดสอบด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) เพื่อใช้ในการยืนยันผลการทดสอบให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

จากรายงานวิจัยของ Chusri and Voravuthikunchai (2011) พบว่าสารสกัดจากเบญกานี (*Quercus infectoria* G. Olivier) ที่สกัดด้วย Ethanol และ Ethyl Acetate ที่ความเข้มข้น MIC-4MIC (0.1-2 mg/ml) ไม่มีฤทธิ์ในการทำให้เซลล์ของเชื้อ MRSA แตก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแม้สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย แต่อาจไม่ทำให้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแตก และจากงานวิจัยของ Leejae, Taylor, and Voravuthikunchai (2013) พบว่าสาร Rhodomyrtone ที่สกัดได้จากใบโทะ (*Rhodomyrtus Tomentosa*) ที่ความเข้มข้น MIC-4MIC (0.5-2 µg/ml) ไม่มีฤทธิ์ในการทำให้เซลล์ของเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 แตก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแม้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีในความเข้มข้นต่ำ ก็อาจไม่มีฤทธิ์ในการทำให้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแตก ซึ่งอาจเกิดจากกลไกการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันออกไป



รูปที่ 4.3 สัดส่วนของค่าความขุ่นของเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 ที่บ่มด้วยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane



รูปที่ 4.4 สัดส่วนของค่าความขุ่นของเชื้อ MRSA NPRC 001R ที่บ่มด้วยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane

4.5 ผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ (Erythrocyte Haemolysis Assay)

การทดสอบผลของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ เป็นการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำมาใช้โดยไม่ก่อให้เกิดอันตราย ผลการทดลองพบว่าค่าร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสง กล่าวคือสารสกัดที่ความเข้มข้นสูงมีผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกได้สูง โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือ 128MIC (256 µg/ml) พบว่ามีค่าร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 17% ส่วนความเข้มข้น 64MIC-MIC มีค่าร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงน้อยกว่า 15% ส่วน DW และ NSS ที่ใช้เป็น Positive และ Negative Control นั้น มีค่าร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่ากับ 100% และ 1.06% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.5

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ที่ความเข้มข้น 256 µg/ml มีค่าร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่ากับ 17% ซึ่งมีความเข้มข้น

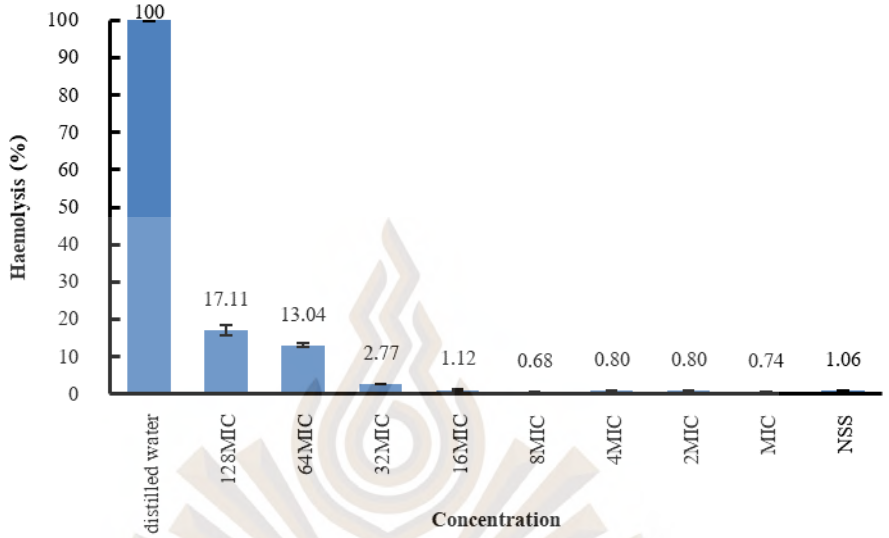
มากกว่าค่า MIC ถึง 128 เท่า และจากรายงานของ Ishnava and Shah (2014) พบว่าสารสกัดที่มีค่าร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ 50% (HC_{50}) มากกว่าค่า MIC ของสารสกัดเกิน 5 เท่านั้น สามารถนำมาใช้ในมนุษย์ได้อย่างปลอดภัย ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้

จากรายงานวิจัยของ Zohra and Fawzia (2014) ที่ทำการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการแตกของเซลเม็ดเลือดแดงของมนุษย์โดยใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพร 9 ชนิด (*Moretta canescens*, *Tamarix Aphylla*, *Calotropis Procera*, *Paronychia Chlorothyrsa*, *Paromychia Argentea*, *Thymelaea Hitsuta*, *Haloxylon Scoparium*, *Arthrophytum Schmittianum* และ *Daphne gnidium*) ซึ่งสกัดด้วย MEthanol พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 50, 100, 250 และ 500 µg/ml มีค่าร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงอยู่ในระดับที่ต่ำ (0-7%) ยกเว้นสารสกัดจาก *Moretta canescens* ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml มีค่าร้อยละการแตกของเซลลเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 14.80% แต่ที่ความเข้มข้น 50-250 µg/ml นั้น มีค่าร้อยละการแตกของเซลลเม็ดเลือดแดงน้อยกว่า 7% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหากนำไปใช้ในความเข้มข้นที่เหมาะสมจะสามารถลดความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ และจากรายงานวิจัยของ Kumar, Karthik, and Bhaskara (2011) ซึ่งศึกษาผลของสารสกัดจากใบของพืชสมุนไพรในประเทศอินเดีย 3 ชนิด (*Aerva lanata* Linn., *Calotropis Gigantean* Linn. และ *Elaeocarpus Ganitrus* Roxb) ซึ่งสกัดด้วยน้ำ ต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ พบว่า สารสกัดจากพืชทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 125-1,000 µg/ml มีค่าร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงในระดับที่ต่ำ (0.1-5%) และเมื่อนำสารสกัดทั้งสามชนิดมาทดสอบร่วมกันพบว่ามีค่าร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงต่ำกว่าการใช้สารสกัดเพียงชนิดเดียว

จากรายงานความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงพบว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Ethyl Acetate และ MEthanol เมื่อนำไปทดสอบกับหนูขาวสายพันธุ์ Swiss Albino นั้น โดยให้สารสกัดปริมาณ 0.5-2.0 g/kg ของน้ำหนักตัว ไม่พบความเป็นพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง (สุกัลญา หลีแจ้ และคณะ, 2558) และยังพบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Ethyl Acetate และสารสกัดจากเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย MEthanol ไม่มีความเป็นพิษต่อไรทะเล เนื่องจากมีค่า LC_{50} เท่ากับ 1,748 µg/ml ซึ่งมีค่าสอดคล้องกับค่ามาตรฐาน (สุกัลญา หลีแจ้ และคณะ, 2559) และจากรายงานการวิจัยของ สุรีย์พร บัวอาจและคณะ (2560) ซึ่งทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร aurisin A ต่อหนูแรทสายพันธุ์ Wistar พบว่า สารสกัดที่ขนาด 5-2,000 mg/kg ไม่ทำให้หนูตาย และไม่แสดงอาการเป็นพิษหลังจากได้รับสาร 24 ชั่วโมง และเมื่อสังเกตอาการต่อเนื่อง 14 วัน ไม่พบหนูทดลองตาย ซึ่งจากรายงานการวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสาร

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สกัดจากเห็ดเรืองแสงมีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์และสัตว์ทดลองอยู่ในระดับต่ำมาก จึงสามารถนำมาใช้ได้อย่างปลอดภัย



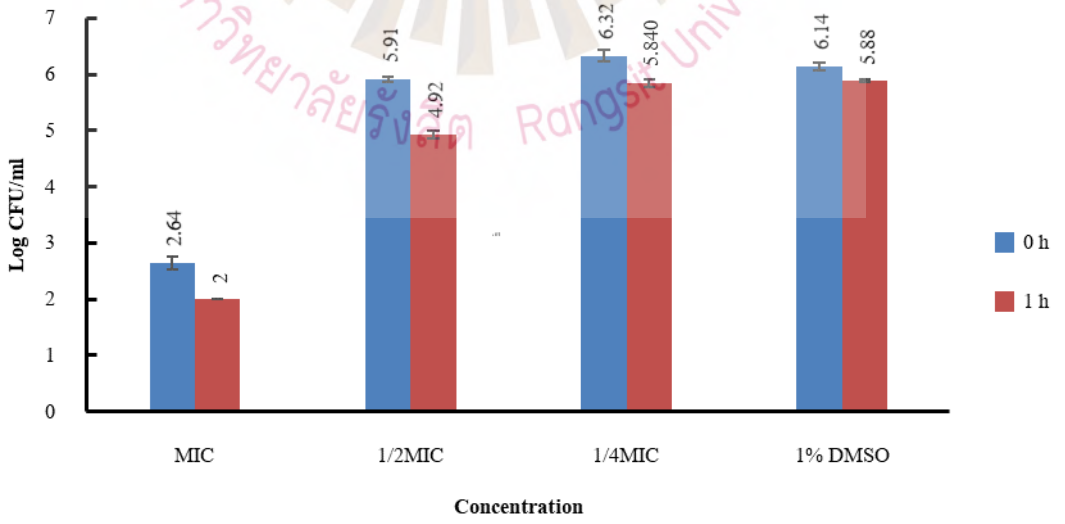
รูปที่ 4.5 ค่าร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์เมื่อบ่มกับสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane

4.6 ผลของระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียหลังจากบ่มด้วยสารสกัดเห็ดเรืองแสง (Whole Blood Killing Assay)

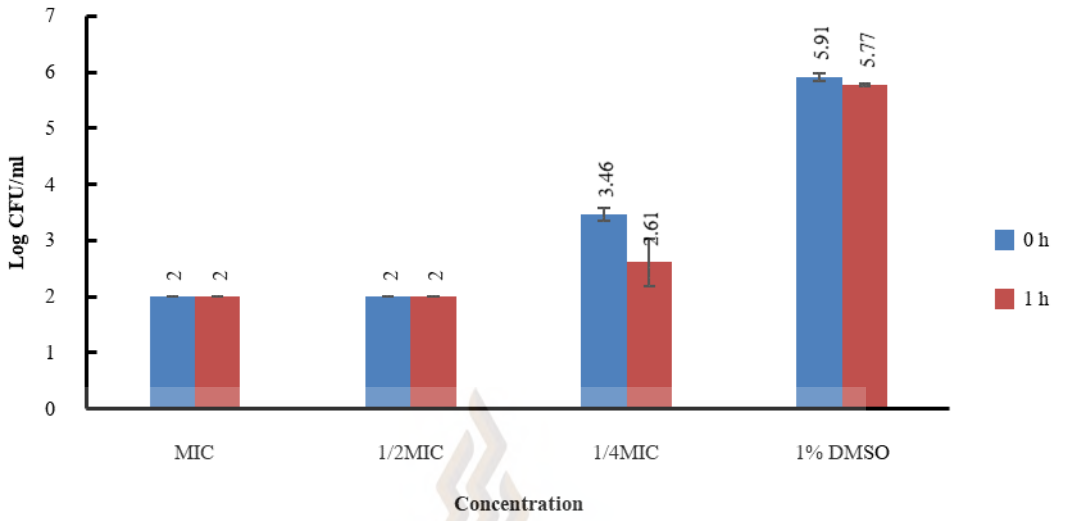
จากการทดสอบประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียหลังจากบ่มด้วยสารสกัดเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane โดยนำเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 ที่บ่มกับสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น MIC (2 µg/ml), 1/2MIC (1 µg/ml) และ 1/4MIC (0.5 µg/ml) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นแยกเชื้อ แล้วจึงนำมาบ่มกับเลือดของอาสาสมัครเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเชื้อที่บ่มด้วยสารสกัดตามความเข้มข้น MIC (2 µg/ml), 1/2MIC (1 µg/ml) และ 1/4MIC (0.5µg/ml) มีจำนวนลดลง 0.5-1 log CFU/ml เมื่อเทียบกับจำนวนเชื้อเริ่มต้น (รูปที่ 4.6) และสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/4MIC (1 µg/ml) สามารถลดจำนวนเชื้อ MRSA NPRC 001R ลงได้ 0.8 log CFU/ml โดย Negative Control (1% DMSO) มีจำนวนเชื้อลดลง 0.1 log CFU/ml ในขณะที่ความเข้มข้น MIC (4 µg/ml)และ 1/2MIC (2 µg/ml) ไม่มีเชื้อเจริญในช่วงเวลาเริ่มต้น (รูปที่ 4.7)

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบคุณสมบัติในการเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ซึ่งพบว่าเชื้อที่ผ่านการบ่มด้วยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงนั้น เมื่อนำมาทดสอบกับเลือดของอาสาสมัครสามารถลดจำนวนเชื้อลงได้มากกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการบ่มกับสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงสามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียถูกฆ่าด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่ายกายได้ดียิ่งขึ้น

จากรายงานการวิจัยของ Yaseen et al. (2017) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์การเพิ่มประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันของร่างกายของสารสกัดหยาบจากสมุนไพร 23 ชนิด ในประเทศคอสตาริก้า ต่อเชื้อ *S. Aureus* Newman พบว่าสารสกัดหยาบจากสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากเปลือกของ *Byrsonima Crassifolia* สารสกัดจากเถาของ *Mandevilla Veraguasensis* และสารสกัดจากเปลือกของ *Verbesina Oerstediana* ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml มีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่ายกายได้ดียิ่งขึ้นในช่วงเวลาที่ 90 และ 120 นาที และจากรายงานการวิจัยของ Sakoulas et al. (2014) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของภูมิคุ้มกันของร่างกายของยา Nafcillin ต่อเชื้อ MRSA D592, D712 และ Sanger 252 พบว่า เมื่อบ่มเชื้อแบคทีเรียร่วมกับเลือดของอาสาสมัครและยา Nafcillin ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml มีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่ายกายได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้



รูปที่ 4.6 ผลของระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 หลังจากบ่มด้วยสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane



รูปที่ 4.7 ผลของระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อ MRSA NPRC 001R หลังจากบ่มด้วยสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane

4.7 การดื้อต่อยาปฏิชีวนะและสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงของเชื้อแบคทีเรีย (Stepwise Selection)

จากการศึกษาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ของเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R ด้วยวิธี Stepwise Selection โดยค่า MIC/MBC เริ่มต้นของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R เท่ากับ 2/2 µg/ml และ 4/4 µg/ml ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1/4MIC ซ้ำ 3 ครั้ง และเพิ่มความเข้มข้น 2 เท่า จนมีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 16MIC เมื่อนำมาทดสอบค่า MIC/MBC พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงมีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R เพิ่มขึ้น 2 เท่าจากค่าเริ่มต้นคือ 4 µg/ml และ 8 µg/ml ตามลำดับ และมีค่า MBC เพิ่มขึ้น 4 เท่าจากค่าเริ่มต้นคือ 8 µg/ml และ 16 µg/ml ตามลำดับ จากนั้นปั่นแยกเชื้อแบคทีเรียแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารสกัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วจึงนำมาทดสอบค่า MIC/MBC พบว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงมีค่า MIC/MBC ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R เพิ่มขึ้น 2 เท่า คือ 8/16 µg/ml และ 16/16 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงมีแนวโน้มชักนำให้เกิดการดื้อต่อสารสกัดแบบถาวร หากนำไปใช้ติดต่อกันเกิน 21 วัน

จากการทดสอบกับยามาตรฐานที่ใช้เป็น Positive Control ในการทดสอบ ได้แก่ ยา Vancomycin, Oxacillin และ Penicillin G พบว่า เมื่อทดสอบยา Oxacillin และ Penicillin G ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐาน มีค่า MIC/MBC เริ่มต้นเท่ากับ 0.12/1 µg/ml และ 0.015/0.015 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1/4MIC ซ้ำ 3 ครั้ง และเพิ่มความเข้มข้น 2 เท่า จนมีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 16MIC พบว่า ค่า MIC/MBC ของยาทั้งสองชนิดมีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ 4/>4 µg/ml และ 0.06/0.12 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการดื้อต่อยาทั้ง 2 ชนิดของเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และเมื่อทดสอบยา Vancomycin ต่อเชื่อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R พบว่า มีค่า MIC/MBC เริ่มต้นเท่ากับ 1/1 µg/ml ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1/4MIC ซ้ำ 3 ครั้ง และเพิ่มความเข้มข้น 2 เท่าจนมีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 16MIC พบว่าค่า MIC/MBC ของยา Vancomycin ต่อเชื้อ *S.Aureus* ATCC 29213 ไม่มีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า MIC/MBC ต่อเชื้อ MRSA NPRC 001R เพิ่มขึ้น 2 เท่า คือ 2/2 µg/ml จากนั้นปั่นแยกเชื้อแบคทีเรียแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากยาซ้ำ 3 ครั้ง แล้วจึงนำมาทดสอบค่า MIC/MBC พบว่าค่า MIC/MBC ของยา Vancomycin ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R ไม่เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดนั้น ไวต่อยา Vancomycin และไม่มีแนวโน้มในการดื้อต่อยา

Leejae et al. (2013) การศึกษาการดื้อต่อยาและสาร Rhodomyrtone ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และเชื้อ EMRSA-16 พบว่า สาร Rhodomyrtone มีค่า MIC/MBC เริ่มต้นต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ EMRSA-16 เท่ากับ 1/1 µg/ml และ 0.5/0.5 µg/ml ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด 2 เท่า จำนวน 45 ครั้ง พบว่าค่า MIC/MBC ของสาร Rhodomyrtone ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ EMRSA-16 มีค่าเพิ่มขึ้น 2-4 เท่า จากค่าเริ่มต้น และเมื่อน้ำเชื้อมาปั่นแยกและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากสารสกัดซ้ำ 3 ครั้งแล้วนำมาทดสอบค่า MIC/MBC พบว่าค่า MIC/MBC ของสาร Rhodomyrtone ต่อเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่าลดลงเหลือ 1-2 µg/ml ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความไวต่อสารสกัดของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์และไม่แสดงแนวโน้มการดื้อต่อสารสกัดของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า MIC และ MBC สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสง, Vancomycin, Oxacillin และ Penicillin G ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R

ตัวอย่างที่ทดสอบ	MIC/MBC (µg/ml) ก่อนการทดสอบ		MIC/MBC (µg/ml) หลังการทดสอบ		MIC/MBC (µg/ml) หลังการทดสอบ 3 วัน	
	***S. Aureus* ATCC 29213**	**MRSA NPRC 001R**	***S. Aureus* ATCC 29213**	**MRSA NPRC 001R**	***S. Aureus* ATCC 29213**	**MRSA NPRC 001R**
สารสกัด	2/2	4/4	4/8	8/16	8/16	16/16
Vancomycin	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2
Oxacillin	0.125/1	-	4/>4	-	4/>4	-
Penicillin G	0.015/0.015	-	0.062/0.125	-	0.062/0.125	-

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ Hexane, Dichlomethane และ EthylAcetate พบว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีน้ำหนักของสารสกัดมากที่สุด โดยมีน้ำหนักของสารสกัดเท่ากับ 128.78 mg/l และ 1,040 mg ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R ด้วยวิธี Broth Microdilution พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R-020R ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC/MBC เท่ากับ 2/2 µg/ml และ 4/4 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างของค่า MIC/MBC น้อยกว่า 4 เท่า จึงแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ

การศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อหน่วยเวลาด้วยวิธี Time-Kill Assay พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ที่ความเข้มข้น 8 µg/ml สามารถฆ่าเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 ได้ที่เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที และที่ความเข้มข้น 16 µg/ml สามารถฆ่าเชื้อ MRSA NPRC 001R ได้ที่เวลา 1 ชั่วโมง

การศึกษาผลของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของเซลล์แบคทีเรีย พบว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น 8-16 µg/ml มีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์ของเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 แตกได้เล็กน้อย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 128MIC-MIC (256-2 µg/ml) มีค่าร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงน้อยกว่า 17% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงมีค่าร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ 50% (HC_{50}) มากกว่าค่า MIC ของสารสกัดเกิน 5 เท่า จึงสามารถนำมาใช้ได้อย่างปลอดภัย

การศึกษาประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียหลังจากบ่มด้วยสารสกัดเห็ดเรืองแสง พบว่าเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 ที่ผ่านการบ่มด้วยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น 0.5-2 µg/ml เมื่อนำมาบ่มกับเลือดของอาสาสมัครนั้น มีจำนวนเชื้อลดลง 0.5-1 log CFU/ml เมื่อเทียบกับจำนวนเชื้อเริ่มต้น และเชื้อ MRSA NPRC 001R ที่ผ่านการบ่มด้วยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น 1 µg/ml เมื่อนำมาบ่มกับเลือดของอาสาสมัครนั้น มีจำนวนเชื้อลดลง 0.8 log CFU/ml เมื่อเทียบกับจำนวนเชื้อเริ่มต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงสามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียถูกฆ่าด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ดียิ่งขึ้น

การศึกษาการดื้อต่อยาและสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงของเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงมีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาเพิ่มขึ้น 2 เท่าจากค่าเริ่มต้นคือ 4 µg/ml และ 8 µg/ml ตามลำดับ และมีค่า MBC เพิ่มขึ้น 4 เท่าจากค่าเริ่มต้น คือ 8 µg/ml และ 16 µg/ml ตามลำดับ และหลังจากปั่นแยกเชื้อแบคทีเรียแล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสง พบว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงมีค่า MIC/MBC ต่อเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R เพิ่มขึ้น 2 เท่า คือ 8/16 µg/ml และ 16/16 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงมีแนวโน้มชักนำให้เกิดการดื้อต่อสารสกัดแบบถาวร หากนำไปใช้ติดต่อกันเกิน 21 วัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. Aureus* ATCC 29213 และ MRSA NPRC 001R อยู่ในเกณฑ์ที่ดี จึงควรทดสอบเพิ่มเติมเพื่อแยกสารบริสุทธิ์ที่สามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

5.2.2 ควรมีการส่งเสริมและต่อยอดงานวิจัยโดยการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงและสารบริสุทธิ์ในด้านต่าง ๆ เพื่อพัฒนาเป็นยาที่ใช้ในการรักษาอาการติดเชื้อจากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่ดีและมีผลข้างเคียงต่ำเพื่อเป็นทางเลือกให้แก่ผู้ที่สนใจต่อไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม

กิตติศักดิ์ ศรีนภา, คนาวรรณ พจนาคม, จิรภรณ์ อังวิทยาธร, เฉลิมเกียรติ สงคราม, ชนกพรห์ม สุคนธ์พันธุ์, พรชัย โรขน์สิทธิศักดิ์, . . . โอภา วัชระคุปต์. (2551). *เคมีของยา*. นนทบุรี: พี.เอส.พริ้นท์.

กองโรงพยาบาลภูมิภาค. (2540). *คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรีย*. นนทบุรี: กองโรงพยาบาลภูมิภาค.

ชนนาถ เจริญบุญญาฤทธิ์, รัฏพร พรมแก้ว, และอมลรดาณี สุวีระ. (2557). *การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด จากเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi) ต่อการยับยั้งเชื้อ Escherichia coli* (Unpublished Senior Project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

ชัฏติกา พวงงาม, วรัญญา แก้วมาก, และอัญชลี เปิดชั้น. (2558). *การตรวจสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากเห็ดเรืองแสงต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7, HeLa และ Colo 205* (Unpublished Senior Project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

ดลฤทัย ไกรลมสม, อมิตา แมหะ, และนัซรีน ตาเละ. (2560). *การศึกษาการดื้อต่อสาร aurisin A ของเชื้อ Staphylococcus epidermidis ที่แยกจากสิว* (Unpublished Senior Project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2544). *แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค*. กรุงเทพฯ: โนเบิ้ล พริ้น.

นิติพงษ์ ศิริวงศ์, และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์. (2552). การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus* และแนวทางการควบคุม. *สงขลานครินทร์เวชสาร*, *27*(4), 347-358.

ประภาวดี ติษยาธิคม, สมใจ ไผ่สมบูรณ์, สุชาดา แซ่ซือ, และวชิราภาณ์ พร้าเพรียง. (2561). ข้อมูล *Staphylococcus aureus* ดื้อยา จากศูนย์ฝาจแห่งชาติช่วงเดือนมกราคม-เดือนกันยายน 2546. สถาบันวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สืบค้นจาก http://narst.dmsc.moph.go.th/another/file/S%20aureus.htm.

ปวีณา สนธิสมบัติ. (2550). *สรุปการประชุมวิชาการ: Advances in pharmacotherapeutics and pharmacy practices 2007*. กรุงเทพฯ: สมาคมเภสัชกรรมโรงพยาบาล.

พรเทพ เต็มรังสี. (2554). *ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อที่แยกจากแผลติดเชื้อ* (Unpublished Master' s thesis). มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.

พรรณพิศ สุวรรณกุล, ชุษณา สวนกระต่าย, และธีรพงษ์ ตัณฑวิเชียร. (2549). *An update on infectious diseases*. กรุงเทพฯ: สตรีท พริ้นติ้ง.

บรรณานุกรม (ต่อ)

เพชรไสว ลิ้มตระกูล. (2541). บทบาทพยาบาลในการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *วารสารคณะพยาบาลศาสตร์,21*(3), 13-16.

ภัทรชัย กีรติสิน. (2549). *ตำราวิทยาศาสตร์แบคทีเรียการแพทย์*. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์ศิริราช พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

ภาวิณี อุ่นกอง. (2554). *ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของส่วนสกัดจากพืชในวงศ์ขิงข่าในการต้าน Staphylococcus aureus สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาและสายพันธุ์ที่ไวต่อยาเมทิซิลลิน* (Unpublished Master' s thesis). มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

มาลิน จุลศิริ. (2532). *ยาต้านจุลชีพ: ความรู้พื้นฐานและประยุกต์*. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

รุ้งรวิน หนูกรอบ, สิริกร อินทร์งาม, และสุธีกานต์ ศักดาพิศิษฎ์. (2560). *การศึกษาฤทธิ์ของ aurisin A ต่อเชื้อ methicillin-resistant Staphylococcus aureus ที่แยกได้จากผู้ป่วย* (Unpublished Senior Project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, ศราวุธ สุทธิรัตน์, และอิสยา จันทร์วิทยานุชิต. (2547). *แบคทีเรียก่อโรค: แกรมบวกแอโรบส์*. สมุทรปราการ: มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.

วันเพ็ญ นิจศรีวงษ์, และสุภศจี แฟงรัก. (2557). *การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi) ต่อการยับยั้ง Microsporum gypseum MU-SH4 ที่แยกได้จากผู้ป่วย* (Unpublished Senior Project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

วีรชัย พุทธวงศ์, และวรยา เส็งประชา. (2550). *เคมีทางยา (Medical Chemistry)*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, จิรยุทย์ คำขจร, และนิวัฒ เสนาะเมือง. (2547, มกราคม). *การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน internal transcribes spacer region (ITS) จาก rRNA gene ของเห็ดเรืองแสง*. การสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2547, 26-27 มกราคม 2547, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, ศิวิลัย ศิริมังคารัตน์, วรรณดี บัญญัติรัชต, และสุรีย์พร บัวอาจ. (2551). *ความหลากชนิดและแนวทางการใช้ประโยชน์ของเห็ดราขนาดใหญ่ในเขตอนุรักษ์พันธุกรรมพืชจังหวัดขอนแก่นและชัยภูมิ*. (Unpublished Master' s thesis). มหาวิทยาลัยขอนแก่น: ขอนแก่น.

บรรณานุกรม (ต่อ)

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, สุรีย์พร บัวอาจ, สมเดช กนกเมธากุล, รัศมี เล็กพรหม, และวีระวัตร นามานุ-ศาสตร์. (2552). การใช้ประโยชน์จากเห็ดเรืองแสง. *วารสารเห็ดไทย, 4*(3), 87-100.

ศศิธร ลิขิตนุกูล, ชิษณุ พันธุ์เจริญ, สถาพร ธิติวิเชียรเลิศ, นลินี อัศวโภคี, และยุพิน ศุพุทธมงคล. (2543). *โรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นใหม่และโรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นอีก*. กรุงเทพฯ: โฮลิสติก พับลิชชิ่ง.

สาธิต ไทยทัตกุล. (2561). *เห็ดเรืองแสงเห็ดพิษที่เปล่งประกายยามราตรี*. สืบค้นจาก http://www.thaiagro.com/article/mushroom/47060106.html.

สุกัญญา ผิวดำ, ปาอีซะ เจะหลง, และสุนิสา เกื้อชาติ. (2558). *การตรวจสอบพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านเชื้อ Staphylococcus epidermidis ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi)* (Unpublished Senior Project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

สุกัลญา หลีแจ้, ธีรทัศน์ สุดสาย, นันทพงศ์ ขำทอง, และอัมพรรัตน์ ประไพวงศ์. (2558). *การศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi)*. สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต.

สุกัลญา หลีแจ้, สุกัญญา ผิวดำ, ปาอีซะ เจะหลง, สุนิสา เกื้อชาติ, รุ่งฤทัย นาวิชัย, พรฑิชา ฉิมเฉิด, . . . อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์. (2559, เมษายน). *การตรวจสอบทางพฤกษเคมีและความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อไรทะเลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi)*. การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2559, ปทุมธานี.

สุรีย์พร บัวอาจ, ยุรวรรณ อนันตมณี, ปรัชญา เอกฐิน, จรรยามณี โชติ, อัศศิริ กลางสวัสดิ์, สุพัตรา ชาวกงจักร, . . . วีรศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ (2560, กุมภาพันธ์). *การศึกษาข้อมูลพิษวิทยาเบื้องต้นของสาร aurisin A จากเห็ดเรืองแสง Neonothopanus nimbi ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar และไส้เดือนดิน*. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55, กรุงเทพฯ.

โสภณ คงสำราญ. (2524). *แบคทีเรียทางการแพทย์*. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล. มหาวิทยาลัยมหิดล.

เหมือนฝัน ซื่อตรง, ฐานิกา กระจ่างฉาย, และรัตนาภรณ์ เทพธวัช. (2557). *การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ Staphylococcus epidermidis ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi)* (Unpublished Master' s thesis). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

บรรณานุกรม (ต่อ)

อะเคื้อ อุณหเลขกะ. (2548). *การเฝ้าระวังและการสอบสวนการระบาดของการติดเชื้อในโรงพยาบาล*. เชียงใหม่: มิ่งเมือง.

อาริยา ช่วยอินทร์, และพีรวัฒน์ ชัยวันดี. (2559). *การศึกษาฤทธิ์ฆ่าไรของสารสกัดหยาบและน้ำเลี้ยงเชื้อจากเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi) ต่อไรไข่ปลา (Luciaphorus perniciosus)* (Unpublished Senior Project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, กรรณิการ์ แซ่เจีย, ปวีณา ก้องสนั่น, และมัณฑนา สงวนทรัพย์. (2546). *การศึกษา proteinone, lipase และ DNase activity ของเชื้อ methaicillin-resistant Staphylococcus aureus.* สมุทรปราการ: มหาวิยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.

อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, สุภนิดา บัวบาน, ประภัสสร รักถาวร, และณิชากรม เจริญกุล. (2549). *การสกัดแยกสารและน้ำมันหอมระเหยจากพืชขั้นพื้นฐาน*. พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพฯ: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Alves, M. J., Ferreira, I. C., Martins, A., & Pintado, M. (2012). Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. *Journal of Applied Microbiology, 113*(2), 466-475.

Appelbaum, P. C. (2007). Reduced glycopeptides susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcusaureus* (MRSA). *International Journal of Antimicrobial Agents, 30*(5), 398-408.

Beyer, D., & Pepper, K. (1998). The streptogramin antibiotics: Update on their mechanism of action. *Expert Opinion on Investing Drugs*. *7*(4), 591-599.

Bremer, P. J., Fletcher, G. C., & Osporne, C. (2004). *Staphylococcus aureus. New Zealand Institute for Crop & Food Research*, *4704*, 1-6.

Brewer, J. D., Hundley, M. D., Meve A., Hargreaves, J., Mcevoy, M. T., & Pittelkow, M. R. (2008). Staphylococcal scalded skin syndrome and toxic shock syndrome after tooth extraction. *Journal of the American Academy of Dermatology, 59*(2), 342-346.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม (ต่อ)

Brown, D. F., Edward, D. I., Hawkey, P. M., Morrison, D., Ridgway, G. L., Towner, K. J., & Wren, M. W. (2005). Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, *56*(6), 1000-1018.

Bua-art, S., Saksirirat, W., Kanokmedhakul, S., Hiransalee, A., & Lekphrom, R. (2010). Extraction of bioactive compound from luminescent mushroom (*Neonothopanus nambi*) and its effect on root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Asia-Pacific Journal of Science and Technology, 15*(8), 726-737.

Bua-art, S., Saksirirat, W., Kanokmedhakul, S., Hiransalee, A., & Lekphrom, R. (2011). Effect of bioactive compound from luminescent mushroom (*Neonothopanus nambi* Speg.) on root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* Chitwood) and non-target organisms. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology, 16*(4), 331-341.

Chusri, S., & Voravuthikunchai, S. P. (2011). Damage of staphylococcal cytoplasmic membrane by *Quercus infectoria* G. Olivier and its components. *Letters in Applied Microbiology, 52*(6), 565-572.

Crossley, K. B., Jefferson, K. K., Archer, G. L., & Fowler Jr, V. G. (2009). *Staphylococci in human disease* (2nd ed.). United States of America: John Wiley & Sons.

Dever, L. L., Jorgensen, J. H. & Barbour, A. G. (1992). *In vitro* activity of vancomycin against the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology, 30*(10), 2692-2697.

Hartman, B. J., & Tomasz, A. (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, *158*(2), 513-516.

Hong, S. B., Rhee, M. H., Yun, B. S., Lim, Y. H., Song, H. G. & Shin, K. S. (2016). Synergistic anti-bacterial effects of *Phellinus baumii* ethyl acetate extracts and β-lactam antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Laboratory Medicine, 36*(2), 111-116.

Ishnava, K. B., & Shah, P. P. (2014). Anticariogenic and hemolytic activity of selected seed protein extracts *In vitro* conditions. *Journal of Dentistry (Tehran), 11*(5), 576-586.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม (ต่อ)

Iwatsuki, K., Yamasaki, O., Morizane, S. & Oono, T. (2006). Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. *Journal of Dermatological Science, 42*(3), 203-214.

Izard, T. (2001). Structural basis for chloramphenicol tolerance in *Streptomyces venezuelae* by chloramphenicol phosphotransferase activity. *Protein Science*. *10*(8), 1508-1513.

Kanokmedhakul, S., Lekphrom, R., Kanokmdhakul, K., Hahnvajanawong, C., Bua-art. S., Saksirirat, W., . . . Kongsaeree, P. (2012). Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi. Tetrahedron, 68*(39), 8216-8266.

Kirchmair, M., Poder, R., & Huber, C. G. (1999). Identification of illudins in *Omphalotus nidiformis* and *Omphalotus olivascens* var. *indigo* by column liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 832*(1-2), 247-252.

Kirchmair, M., Poder, R., Huber, C. G., & Miller, O. K. (2002). Chematoxonomical and morphological observation in the genus *Omphalotus* (Omphalotaceae). *Personia, 17*(4), 583-600.

Kumar, G., Karthik, L., & Bhaskara Rao, K. V. (2011). Haemolytic activity of Indian medicinal plants toward human erythrocytes: an in vitro study. *Elixir International Journal, 40*, 5534-5537.

Leejae, S., Taylor, P. W., & Voravuthikunchai, S. P. (2013). Antibacterial mechanisms of rhodomyrtone against important hospital-acquired antibiotic-resistant pathogenic bacteria. *Journal of Medical Microbiology, 62*, 78-85.

Lemke, T. L., Williams, D. A., Roch, V. F., & Zito, S. W. (2008). *Principle of medicinal chemistry* (6th ed.). United States of America: Lippicot Williams & Wilkins.

Matijašević, D., Pantić, M., Rašković, B., Pavlović, V., Duvnjak, D., Sknepnek, A., & Nikšić, M. (2016). The antibacterial activity of *Coriolus versicolor* methanol extract and its effect on ultrastructural changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis*. *Frontiers in Microbiology,* 7, 1226.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม (ต่อ)

Nelson, L., Cockram, C. S., Lui, G., Lam, R., Lam, E., Lai, R., & Margaret, L. (2006). Community case of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Emerging Infectious Diseases, 12*(2), 172-174

Oliva, B., & Chopra, I. (1992). Tet determinants provide poor protection against some tetracycline: Further evidence for division of tetracyclines into two classes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 36*(4), 876-878.

Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases, 38*(6), 864-870.

Panomket, P., Wanrum, S., & Srivoramas, T. (2011). Antimicrobial activity of extracts of Thai plant to *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Medical Technology and Physical Therapy, 23*(2), 151-158.

Patel, U., Yan, Y. P., Hobb, F. W., Kaczmarczyk, J., Slee, A. M., Pompliano, D. L., . . . Bobkova, E. V. (2001). Oxazolidinones mechanisms of action: Inhibition of the first peptide bond formation. *Journal of Biological Chemistry, 276*(40), 37199-37205.

Reyes, J., Hidalgo, M., Diaz, L., Rincon, S., Moreno, J., Vanegas, N., . . . Arias, C. A. (2007). Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombian Fospitals: A countrywide surveillance. *Journal of Infection Diseases, 11*(4), 329-336.

Sakoulas, G., Okumura, C. Y., Thienphrapa, W., Olson, J., Nonejuie, P., Dam, Q., . . . Nizet, V. (2014). Nafcillin enhances innate immune-mediated killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Molecular Medicine, 92*(2), 139-149.

Saksirirat, W., Sanoamuang, N., Thomma, K., Kamkajorn, J., Komain, S., & Saepaisan, S. (2003). A new record of luminescent mushroom (*Omphalotus* sp.) in Thailand and studies on its cultivation and application. Pp.251-257 in: Proceeding of Medicinal Mushroom & Biodiversity and Bioactive compound. BIOTEC, PEACH pattaya, Chon Buri, Thailand.

Scudeller, L., Leoncini, O., Boni, S., Navarra, A., Rezzani, A., & Verdirosi, S. (2000). MRSA carriage: the relationship between community and healthcare setting. A study in an Italian Hospital. *Journal of Hospital Infection, 46*(3), 222-229.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม (ต่อ)

Shen, L. L., Kohlbrenner, W. E., Weigl, D., & Baranowski, J. (1989). Mechanism of quinolone inhibition of DNA Gyrase. *Journal of Biological Chemistry, 265*(5), 2973-2978.

Sivinski, J. (1981). Arthropods attracted to luminescent fungi. *Psyche, 88*, 383-390.

Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 2.* The Wilkins. Baltimore.

Speer, B. S., Shoemaker, N. B., & Salyers A. A. (1992). Bacterial resistance to tetracycline: Mechanism, transfer and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews, 5*(4), 387-399.

Tenover, F. C. (2006). Mechanism of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Medicine*, *119*(6), 3-10.

Tenover, F. C., Weigel, L. M., & Appelbaum, P. C. (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Journal of Antimicrobial Agents Chemotherapy, 48*(1), 275-280.

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Microbiology an Introduction* (9th ed). San Francisco: Benjamin Cumming.

Yaseen, R., Branitzki-Heinemann, K., Moubasher, H., Setzer, W. N., Naim, H. Y., & von Köckritz-Blickwede, M. (2017). *In vitro* testing of crude natural plant extracts from Costa Rica for their ability to boost innate immune cells against *Staphylococcus aureus*. *Biomedicines, 5*(3), 40.

Zohra, M., & Fawzia, A. (2014). Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. *International Journal of Pharma Sciences and Research, 5*(8), 495-500.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	ฉัตร กรอบทอง
วัน เดือน ปีเกิด	6 เมษายน 2531
สถานที่เกิด	จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์, 2553 มหาวิทยาลัยรังสิต ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการแพทย์แผนตะวันออก, 2560
ที่อยู่ปัจจุบัน	37/1 หมู่ที่ 2 ตำบลท่าดินแดง อำเภอผักไห่ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13120

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University