



รายงานการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ของฟลาโวนอยด์บางชนิด ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด  
ที่ื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทม

(Investigation of the effect of some flavonoids on some  $\beta$ -lactam  
antibiotics resistant bacteria)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ของฟลาโวนอยด์บางชนิด ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด  
ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทม  
(Investigation of the effect of some flavonoids on some  $\beta$ -lactam  
antibiotics resistant bacteria)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภค. ดร. เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวสุพัชรี ศิริวงศ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550-2552

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2555

**กิตติกรรมประกาศ**

การวิจัยเรื่องฤทธิ์ของฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ที่คือต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทม ในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2550-2552 ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณ คุณกาญจนา วงศ์คำขาวและ ดร.สมนึก ภู่งกระโทก ที่ช่วยการทำวิจัยในครั้งนี้ด้วยความทุ่มเท คุณจารุภรณ์ วิศาลสวัสดิ์ ที่ช่วยอนุเคราะห์ข้อมูลเชื้อที่คือยา รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรังสี และศาสตราจารย์ ดร. ไมตรี สุทธจิตต์ ที่กรุณาให้คำปรึกษากลุ่มแบคทีเรียวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่อนุเคราะห์เชื้อในการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อนุเคราะห์ทั้งอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยจนประสบความสำเร็จ



### บทคัดย่อภาษาไทย

การคือต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทมเป็นปัญหาของโลกในปัจจุบัน ปัจจุบันเชื้อในกลุ่มเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลิเอเซ และอีโคไล โดยปกติจะคือต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดและเป็นอันตรายต่อสุขภาพสำหรับผู้ป่วยที่นอนในโรงพยาบาลและบุคคลากรที่ให้การรักษา ฉะนั้นการค้นหายาปฏิชีวนะใหม่ๆและสารประกอบที่สามารถยับยั้งการคือต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทมจึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญและเร่งด่วนที่ต้องรีบดำเนินการ การศึกษาวิจัยครั้งนี้เราได้ทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารปฏิชีวนะของสารฟลาโวนอยด์ที่เกิดขึ้นในพืชที่มีในธรรมชาติ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้ออีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 ของอะมอกซิซิลลิน กาแลนจิน ลูทีโอลิน และเอพิเจนิน เท่ากับ >1,000, 500, 200 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลิเอเซ ดีเอ็มเอสที 21394 ของเซฟตาซิม และเอพิเจนิน เท่ากับ 100, และ 180 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลจากการทดสอบเชกเกอร์บอร์ด แสดงให้เห็นว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้ออีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 ของยาผสมกับฟลาโวนอยด์ ลดลงได้แก่ อะมอกซิซิลลิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับกาแลนจิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, อะมอกซิซิลลิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับลูทีโอลิน 90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ อะมอกซิซิลลิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับเอพิเจนิน 90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยิ่งไปกว่านั้นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลิเอเซ ดีเอ็มเอสที 21394 ของเซฟตาซิม ผสมกับเอพิเจนิน ลดลงเป็น 20 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการนับเชื้อที่ยังรอดชีวิตจากกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อพบว่า กราฟการเจริญของเชื้อ อีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 ถูกยับยั้งการเจริญเมื่อใส่สารผสมระหว่างอะมอกซิซิลลิน 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและกาแลนจิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, ลูทีโอลิน 90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและเอพิเจนิน 90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กราฟการเจริญเติบโตของเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลิเอเซ ดีเอ็มเอสที 21394 ก็ถูกยับยั้งให้อยู่ในระดับต่ำสุดในช่วงตั้งแต่ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป เมื่อได้รับสารผสมระหว่างเซฟตาซิม 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับลูทีโอลินหรือเอพิเจนิน 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนั้นแล้ว ผลการวิจัยจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนยังพบว่า สารผสมของเซฟตาซิม 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับลูทีโอลินหรือเอพิเจนิน 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้รูปลักษณ์ทางสัณฐานของเชื้อเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลิเอเซ ดีเอ็มเอสที 21394 ถูกทำให้เสียหายอย่างมาก ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ อีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 เมื่อได้รับยา ระหว่างอะมอกซิซิลลิน 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเอพิเจนิน 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายอย่างมาก รวมถึงการแยกออกของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกด้วย ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการที่เปปทิโดไกลแคนที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกได้รับความเสียหาย บางเซลล์ของแบคทีเรียสูญเสียไรโบโซมไปจากไซโทพลาสซึม เซลล์ของแบคทีเรียจำนวนมากมีขนาดยาวกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อทำการสกัดโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ อีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 ภายหลังได้รับยาอะมอกซิซิลลิน 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรผสมกับเอพิเจนิน 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และนำไปทดสอบกับเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าแบนท์ที่เกิดขึ้น มีความแตกต่างจากเซลล์ที่ไม่ได้รับยา โดยแบน

จากการศึกษานี้ สามารถสรุปได้ว่า กาแลนจิน ลูทีโอลิน และ เอพิจินิน มีศักยภาพที่จะยับยั้งเชื้อเชื้ออีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 ที่คือต่อยาอะมอกซิซิลลินเมื่อให้ร่วมกับยานี้ ในทำนองเดียวกันเชื้อเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลเอเซ ดีเอ็มเอสที 21394 ก็ถูกยับยั้งได้ดีจากการเสริมฤทธิ์กันของสารผสมระหว่างเซฟตาซิม กับลูทีโอลินหรือเอพิจินิน เมื่อถึงความปลอดภัยในการในการบริโภคพืชที่มีสารฟลาโวนอยด์ต่างๆ เหล่านี้อยู่แล้ว สารฟลาโวนอยด์เหล่านี้จะได้รับการวิจัยและพัฒนาผสมกับยาในกลุ่มเบตาแลคแทมในการยับยั้งเชื้อที่คือยาและคุณภาพชีวิตมนุษย์อยู่ในขณะนี้

### บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics is a global problem. Today strains of *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) are usually multiply resistant to many antibiotics and pose life-threatening risks to the hospitalised patients and their care givers. The search for new antibacterial agents and compounds that can reverse the resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics are research objectives of far reaching importance and urgently needed. In this study, we have examined the antibacterial action of naturally occurring flavonoids. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of amoxicillin, galangin, luteolin and apigenin alone against *E. coli* DMST 20662 were >1,000, 500, 200 and 150  $\mu\text{g/ml}$  respectively. The MICs of ceftazidime and apigenin against *E. cloacae* DMST 21394 were 100 and 180  $\mu\text{g/ml}$  respectively. The results of checkerboard assay showed that MICs of amoxicillin in combination with these flavonoids were reduced to amoxicillin 30  $\mu\text{g/ml}$  plus galangin 100  $\mu\text{g/ml}$ , amoxicillin 30  $\mu\text{g/ml}$  plus luteolin 90  $\mu\text{g/ml}$  and amoxicillin 20  $\mu\text{g/ml}$  plus apigenin 90  $\mu\text{g/ml}$  against this *E. coli* strain. In addition, the MICs of ceftazidime plus apigenin against *E. cloacae* strain were reduced to 20 plus 10  $\mu\text{g/ml}$  respectively. Viable counts showed that the killing curves of *E. coli* DMST 20662 cells by 20  $\mu\text{g/ml}$  amoxicillin were potentiated by galangin 100  $\mu\text{g/ml}$ , luteolin 90  $\mu\text{g/ml}$  and apigenin 90  $\mu\text{g/ml}$ . Ceftazidime 20  $\mu\text{g/ml}$  in combination with 10  $\mu\text{g/ml}$  of either apigenin or luteolin also reduced the CFU/ml of *E. cloacae* DMST 21394 to low levels ( $1 \times 10^3$  CFU/ml) over 6 h. Electronmicroscopy clearly showed that the combination of ceftazidime 10  $\mu\text{g/ml}$  with 10  $\mu\text{g/ml}$  of either luteolin or apigenin caused marked morphological damage for *E. cloacae* DMST 21394. Electronmicrographs of thin sections of log phase *E. coli* DMST 20662 grown for 4 h in the presence of amoxicillin 10  $\mu\text{g/ml}$  plus apigenin 20  $\mu\text{g/ml}$  indicated that the combination at these concentrations caused marked morphological damage to the cells. The damage included loosening or detachment of the outer membrane which may have resulted from damage to the peptidoglycan layer internal to the OM. Some of the bacteria exhibited electron-transparent areas devoid of ribosomes in the cytoplasm. Most of the treated bacteria were considerably larger and longer than the control bacteria. The OM-PG associated protein bands of *E. coli* DMST 20662 cells grown in a combination of amoxicillin 10  $\mu\text{g/ml}$  plus apigenin 20  $\mu\text{g/ml}$  showed further differences from those of the control cells. Several of the high MW protein bands were absent but darker bands of lower MW proteins were observed. These are similar darker bands to those from cells treated with either amoxicillin or apigenin alone. Synergism between amoxicillin and apigenin reduced the total number of cells present and the total amount of OM-PG associated proteins. This resulted in the absence of several of the medium and high MW proteins and the accumulation of low MW proteins. Enzyme assay indicated

that galangin had an inhibitory activity against  $\beta$ -lactamase I from *B. cereus*. Galangin had some activity and tectochrysin and 6-chloro-7-methylflavone showed greater activity against penicillinase type IV from *E. cloacae*, apigenin showed marked inhibitory activity but none of other flavonoids tested showed appreciable activity. These results indicated that in addition to the direct effect on cell structure and cell division, the resistance reversing activity of flavonoids against bacteria might also include inhibition of  $\beta$ -lactamase activity. The result of OM permeability showed that the effect of 10  $\mu\text{g/ml}$  amoxicillin and 20  $\mu\text{g/ml}$  apigenin against *E. coli* DMST 20662 altered the OM permeability when they were used alone and in combination. The effect of the amoxicillin plus apigenin would seem to be greater than either amoxicillin or apigenin when used singly against this organism. The effect of 10  $\mu\text{g/ml}$  amoxicillin and 20  $\mu\text{g/ml}$  apigenin on the cytoplasmic membrane, was investigated using the cytoplasmic enzyme  $\beta$ -galactosidase. The result showed that there was no increase in  $\beta$ -galactosidase activity with increasing time in the presence of amoxicillin, apigenin and amoxicillin plus apigenin. It can be concluded that it is unlikely that amoxicillin, apigenin and amoxicillin plus apigenin alter the permeability of the cytoplasmic membrane of *E. coli* DMST 20662.

From the study, it was concluded that galangin, luteolin and apigenin have the potential to reverse bacterial resistance to amoxicillin against *E. coli* DMST 20662. Apigenin and luteolin have synergistic effect with ceftazidime against *E. cloacae* DMST 21394. In view of their limited toxicity, These tested flavonoids offer for the development of a valuable adjunct to  $\beta$ -lactam treatments against otherwise resistant strains of currently almost untreatable microorganisms

สารบัญ

|   | หน้า |
|---|------|
| กิตติกรรมประกาศ .....                               | ก    |
| บทคัดย่อภาษาไทย .....                               | ข    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....                            | ค    |
| สารบัญ .....  | ง    |
| สารบัญตาราง .....                                   | จ    |
| สารบัญภาพ .....                                     | ฉ    |
| บทที่ 1 บทนำ  |      |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....              | 1    |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....                       | 3    |
| ขอบเขตของการวิจัย .....                             | 4    |
| ข้อตกลงเบื้องต้น.....                               | 4    |
| ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....                   | 5    |
| บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย                          |      |
| แหล่งที่มาของข้อมูล .....                           | 6    |
| วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูลและ วิธีวิเคราะห์ข้อมูล..... | 7    |
| บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล                        |      |
| ผลการวิจัย .....                                    | 12   |
| บทที่ 4 บทสรุป                                      |      |
| วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย.....                       | 41   |
| บรรณานุกรม .....                                    | 45   |
| ภาคผนวก .....                                       | 48   |
| ประวัติผู้วิจัย.....                                | 52   |



สารบัญตาราง

|  | หน้า |
|--|------|
| ตารางที่ 1 ตารางสรุปค่า MICs ของยา amoxicillin, ceftazidime และฟลาโวนอยด์<br>ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662 and <i>E. cloacae</i> DMST 21394.....   | 16   |
| ตารางที่ 2 ตารางสรุปค่า MICs ของยา ampicillin, ceftazidime<br>และ colxacillin และสารฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA, CREnC และ ASEnC.....   | 16   |
| ตารางที่ 3 แสดงผล FICs ที่ได้จากการทำ checkerboard ของ quercetin,<br>luteolin และ apigenin, kaempferol และ clavulanic acid เมื่อใช้ร่วมกับยา<br>amoxicillin ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662 .....  | 23   |
| ตารางที่ 4 แสดงผล FICs ที่ได้จากการทำ checkerboard ของ quercetin และ<br>clavulanic acid เมื่อใช้ร่วมกับยา amoxicillin ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662.....   | 23   |
| ตารางที่ 5 แสดงผล FICs ที่ได้จากการทำ checkerboard ของ quercetin, luteolin และ<br>apigenin เมื่อใช้ร่วมกับยา ceftazidime ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. cloacae</i> DMST 21394.....   | 24   |
| ตารางที่ 6 แสดงผล FICs ที่ได้จากการทำ checkerboard ของ quercetin, baicalein และ<br>clavulanic acid เมื่อใช้ร่วมกับยา ceftazidime ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ATCC 29213.....  | 24   |
| ตารางที่ 7 แสดงผล FICs ที่ได้จากการทำ checkerboard ของ quercetin,<br>baicalein และ clavulanic acid เมื่อใช้ร่วมกับยา methicillin, ampicillin, amoxicillin,<br>cloxacillin, penicillin G และ ceftazidime ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> DMST 20651 (MRSA).. | 25   |
| ตารางที่ 8 แสดงผลของ $\beta$ -galactosidase activity ของเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662<br>ภายหลังถูกทดสอบด้วย amoxicillin, apigenin และ amoxicillin + apeigenin .....   | 40   |
| ตารางที่ 9 $\beta$ -galactosidase activity ของเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662<br>ภายหลังถูกทดสอบด้วย amoxicillin, kaempferol และ amoxicillin + kaempferol .....  | 40   |

## สารบัญภาพ

|   | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 1 Suspension standard curve ของเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662.....  | 12   |
| รูปที่ 2 Suspension standard curve ของเชื้อ <i>E. cloacae</i> DMST 21394.....   | 13   |
| รูปที่ 3 Suspension standard curve ของเชื้อ MRSA.....   | 13   |
| รูปที่ 4 Suspension standard curve ของเชื้อ ASEnC.....  | 14   |
| รูปที่ 5 Suspension standard curve ของเชื้อ <i>E. coli</i> ATCC 25922 .....   | 14   |
| รูปที่ 6 Suspension standard curve ของเชื้อ <i>S. aureus</i> ATCC 29213 .....   | 15   |
| รูปที่ 7 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ<br>amoxicillin + apigenin ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662.....      | 17   |
| รูปที่ 8 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ<br>amoxicillin + luteolin ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662.....      | 17   |
| รูปที่ 9 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ<br>amoxicillin + quercetin ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662.....     | 18   |
| รูปที่ 10 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ<br>Ceftazidime + apigenin ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662.....     | 18   |
| รูปที่ 11 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ<br>ceftazidime + luteolin ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. cloacae</i> DMST 21394.....  | 19   |
| รูปที่ 12 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ<br>ceftazidime + quercetin ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. cloacae</i> DMST 21394..... | 19   |
| รูปที่ 13 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ ampicillin<br>+ apigenin, baicalein, luteolin ในการยับยั้งเชื้อ MRSA.....      | 20   |
| รูปที่ 14 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ cloxacillin<br>+ baicalein, luteolin ในการยับยั้งเชื้อ MRSA.....               | 20   |
| รูปที่ 15 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ<br>ceftazidime + quercetin, baicalein, luteolin ในการยับยั้งเชื้อ MRSA.....    | 21   |
| รูปที่ 16 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ<br>ampicillin + apigenin, luteolin ในการยับยั้งเชื้อ CREnC.....                | 21   |
| รูปที่ 17 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ cloxacillin<br>+ apigenin ในการยับยั้งเชื้อ CREnC.....                         | 22   |
| รูปที่ 18 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ ceftazidime + apigenin,<br>luteolin ในการยับยั้งเชื้อ CREnC.....               | 22   |

|  |    |
|--|----|
| รูปที่ 19 ผลการทำ viable count ของเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662 ภายหลังจากทดสอบกับยา amoxicillin, quercetin, luteolin, apigenin .....                  | 27 |
| รูปที่ 20 ผลการทำ viable count ของเชื้อ <i>E. cloacae</i> DMST 21394 ภายหลังจากทดสอบกับยา ceftazidime, luteolin, apigenin.....                           | 27 |
| รูปที่ 21 ผลการทำ viable count ของเชื้อ MRSA ภายหลังจากทดสอบกับยา cloxacillin, ampicillin, baicalein .....   | 28 |
| รูปที่ 22 ผลการทำ viable count ของเชื้อ MRSA ภายหลังจากทดสอบกับยา ceftazidime quercetin, baicalein .....   | 28 |
| รูปที่ 23 Ultrathin sections ในช่วง log phase ของเชื้อ <i>E. cloacae</i> DMST 21394 ภายหลังจากทดสอบกับ ceftazidime, luteolin และ apigenin.....           | 32 |
| รูปที่ 24 Ultrathin sections ในช่วง log phase ของเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662 ภายหลังจากทดสอบกับ amoxicillin, apigenin.....                           | 33 |
| รูปที่ 25 Ultrathin sections ในช่วง log phase ของเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662 ภายหลังจากทดสอบกับ amoxicillin, kaempferol.....                         | 33 |
| รูปที่ 26 Ultrathin sections ในช่วง log phase ของเชื้อ <i>S. aureus</i> DMST 20651 ภายหลังจากทดสอบกับ cloxacillin, ampicillin, baicalein, quercetin..... | 34 |
| รูปที่ 27 Ultrathin sections ในช่วง log phase ของเชื้อ <i>E. cloacae</i> DMST 21394 (CREnC) ภายหลังจากทดสอบกับ ceftazidime, luteolin, apigenin.....      | 34 |
| รูปที่ 28 SDS-PAGE แสดง outer membrane และ peptidoglycan associated protein ของเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662 หลังได้รับ amoxicillin, apigenin .....    | 36 |
| รูปที่ 29 ความสามารถของฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งเอนไซม์ $\beta$ -lactamase โดยการไป hydrolyze bezympenicillin .....   | 37 |
| รูปที่ 30 ความสามารถของฟลาโวนอยด์ในการยับยั้ง $\beta$ -lactamase โดยการไป hydrolyze bezympenicillin ที่ความเข้มข้นต่างๆของ apigenin.....                 | 38 |
| รูปที่ 31 Permeabilization ของเชื้อ <i>E. coli</i> DMST 20662 เมื่อถูกทดสอบด้วย amoxicillin และ apigenin .....   | 39 |

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

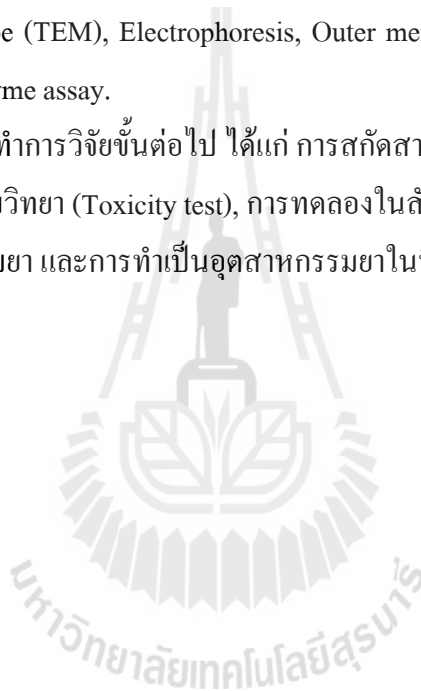
จากปัญหาสำคัญเรื่องสถานการณ์การดื้อยาของเชื้อในโรงพยาบาลทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศเกือบทั่วโลก ทีมวิจัยเราได้สำรวจที่โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาพบว่า มีเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam antibiotics ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่มีการใช้เป็นมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อปีในประเทศไทย ตัวอย่างของเชื้อที่ดื้อยาในโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาที่ทำการทดสอบความไวต่อยาในหน่วยจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก ได้แก่ เชื้อ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) มีการดื้อยาเกิน 70% ในหลายตึกผู้ป่วย และเชื้อที่ดื้อต่อยา Ceftazidime ซึ่งเป็นยาที่มีราคาแพงมาก และเป็นยาใหม่ ในกลุ่ม Cephalosporin (Third generation) ได้แก่ Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* (CREnC) มีอัตราการดื้อยานี้ถึง 100% ในหลายตึกผู้ป่วย นอกจากนี้เชื้อ *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) ยังดื้อต่อยา Amoxicillin, Piperacillin, Cefazolin, Cefoxitin, Ceftazidime, Cefoperazone/Sulbactam, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Co-trimoxazole, Gentamycin เป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูงมากในหลายตึกผู้ป่วย และเชื้อ Ceftazidime-resistant *Escherichia coli* มีอัตราการดื้อยานี้เกือบ 100% ในทุกตึกผู้ป่วย เชื้อ *E. coli* นี้ยังพบว่าดื้อต่อยา Amoxicillin, Piperacillin, Ceftazidime, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Co-trimoxazole, Gentamycin เป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูงมากในหลายตึกผู้ป่วย นอกจากนี้เชื้อ *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) พบว่าดื้อต่อยา Amoxicillin, Cloxacillin, Norfloxacin, Co-trimoxazole, Gentamycin, Erythromycin ในหลายตึกผู้ป่วยเป็นเปอร์เซ็นต์สูงมาก เชื้อ *Enterococcus faecium* (*En. faecium*) ที่ดื้อต่อยา Ampicillin, Piperacillin, Norfloxacin, Co-trimoxazole, Gentamycin เป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูงมากในหลายตึกผู้ป่วย และ *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ที่ดื้อต่อยา Ampicillin, Norfloxacin, Co-trimoxazole, Gentamycin มีอัตราการดื้อยาสูงชันมาก (รพ.มหาราชนครราชสีมา, 2007)

จากปัญหานี้เอง นับเป็นปัญหาสำคัญของจังหวัดนครราชสีมาและของประเทศ ที่ต้องสูญเสียเงินค่ารักษาพยาบาลไปกับการใช้ยาที่มีราคาแพงเหล่านี้ แต่ใช้ไม่ได้ผล เนื่องจากการดื้อยาของเชื้อ ทำให้คนไข้ต้องสูญเสียเงินเป็นจำนวนมาก และอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตจากการดื้อยาที่มากขึ้นของเชื้อเหล่านี้มาก ประเทศไทยของเราต้องสูญเสียเงินตราเข้ามาจากต่างประเทศเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อปี เพื่อที่จะหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถมาทดแทนยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam antibiotics ที่เชื้อเกิดการดื้อยาขึ้นแล้ว ผู้วิจัยจึงได้ทำการวิจัยเพื่อแก้ปัญหานี้ โดยได้รับทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานของอาจารย์รุ่นใหม่จาก สกว. และ สกอ. ผลการวิจัยพบว่า สารในกลุ่ม Flavonoids หลายชนิด ซึ่งบางชนิดสามารถสกัดได้จากพืชตระกูลข่าของไทย [*Alpinia galanga* (L) Willd, *Alpinia nigra* (Gaertn) Burt. และ *Alpinia officinarum* Hance.] สามารถมีฤทธิ์เสริมกับยาบางตัวในกลุ่ม  $\beta$ -lactam antibiotics ยับยั้งเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ *E. coli* และ *E. cloacae* ได้ในขนาดที่ใช้รักษา ซึ่งผู้วิจัยกำลังดำเนินการจด

ข้าพเจ้าจึงขอเสนอโครงการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ โครงการวิจัยพื้นฐานแบบมุ่งเป้า “สมุนไพร ยารักษาโรค สารเสริมสุขภาพและสารสำหรับการผลิตอาหารปลอดภัย” โดยการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ สาร Flavonoids ที่มีศักยภาพ ได้แก่ Galangin, Baicalein, Apigenin, Luteolin, Quercetin, Kaemferol ซึ่ง Galangin และ Quercetin สามารถสกัดได้จากพืชสมุนไพรไทยตระกูลข่า ดังกล่าวข้างต้น ต่อเชื้อแบคทีเรียที่คือยาในกลุ่ม antibacterial ซึ่งเป็นปัญหาของทั้งจังหวัดนครราชสีมา ของประเทศไทย และของโลกดังกล่าว โดยข้อเสนอโครงการเช่นนี้ไม่มีผู้ใดทำมาก่อนในประเทศไทย และข้าพเจ้ามีทีมงานและศักยภาพที่จะทำงานได้อย่างต่อเนื่อง จากเริ่มต้นจนถึงการจดสิทธิบัตร และพัฒนาสู่อุตสาหกรรมยาที่สามารถทดแทนยาในกลุ่ม antibacterial ที่มีราคาแพงมาก และเชื้อเกิดการดื้อยาขึ้นแล้ว เพื่อเป็นการผลิตยาตัวใหม่ภายในประเทศ ลดการนำเข้ายามูลค่าแพงเหล่านี้ โดยสาร flavonoids ดังกล่าว ซึ่งบางชนิดสามารถสกัดจากพืชสมุนไพรตระกูลข่าไม่น่าจะเป็นพิษต่อร่างกาย เนื่องจากข่าเป็นพืชที่มนุษย์ใช้บริโภคเป็นอาหารในชีวิตประจำวันอยู่แล้ว และเพื่อให้ประเทศไทยสามารถผลิตยาใหม่ๆได้และเป็นยาที่สามารถส่งออกต่างประเทศได้ในที่สุด

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร Flavonoids ต่างๆ ได้แก่ Baicalein, Apigenin, Luteolin, Quercetin, ต่อเชื้อต่างๆ ที่คือยาในโรงพยาบาล ได้แก่ *E. cloacae*, *E. coli* และ *S. aureus*
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร Flavonoids ต่างๆ ได้แก่ Baicalein, Apigenin, Luteolin, Quercetin, เมื่อให้ร่วมกับยาในกลุ่ม antibacterial ซึ่งได้แก่ยา Amoxycillin, Ceftazidime, ต่อเชื้อ *E. cloacae*, *E. coli* ที่คือยาในกลุ่ม antibacterial ดังกล่าว โดยวิธี Checkerboard assay และ Killing curve determination.
3. เพื่อหากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสาร Flavonoids ต่างๆ ได้แก่ Baicalein, Apigenin, Luteolin, Quercetin, ต่อเชื้อต่างๆ ที่คือยา antibacterial ดังกล่าวในโรงพยาบาลเมื่อให้เดี่ยวๆ และให้ร่วมกับยาในกลุ่ม antibacterial ตามข้อ 3.2 ที่เชื้อต่างๆ ในข้อ 3.1 คือต่อยานั้นๆ โดยวิธีการดู morphology ของเชื้อด้วย Transmission Electron Microscope (TEM), Electrophoresis, Outer membrane permeability, Cytoplasmic membrane permeability และ Enzyme assay.
4. เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นในการจะทำการวิจัยขั้นต่อไป ได้แก่ การสกัดสารฟลาโวนอยด์จากพืชสมุนไพรไทยตระกูลข่า, การทดสอบทางพิษวิทยา (Toxicity test), การทดลองในสัตว์เช่น หนู กระจ่าง ลิง ฯลฯ. การทดลองในคน, การพัฒนาเป็นตำรับยา และการทำเป็นอุตสาหกรรมยาในที่สุด



### ขอบเขตของการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรียที่คัดต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม  $\beta$ -lactam เช่น *E. cloacae*, *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขและกลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลมหาราช จังหวัดนครราชสีมา
2. นำสารฟลาโวนอยด์เช่น Baicalein, Apigenin, Luteolin, Quercetin, ซึ่งสารฟลาโวนอยด์ INDOFINE Chemical Company, USA หรือบริษัท Sigma-Aldrich, UK
3. ยา Amoxicillin, Ceftazidime, Ampicillin, Cloxacillin ได้จากบริษัทผู้แทนจำหน่ายภายในประเทศไทย เช่น บริษัท Sigma, Glaxo, Wellcome, Bristol- Myers.

### ข้อตกลงเบื้องต้น

1. นำสารฟลาโวนอยด์เช่น Baicalein, Apigenin, Luteolin, Quercetin มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่คัดต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม  $\beta$ -lactam เช่น *E. cloacae*, *E. coli* และ *S. aureus*
2. ทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของสารฟลาโวนอยด์กับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ตรวจสอบกลไกในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียคือยาของสารฟลาโวนอยด์เมื่อใช้เดี่ยวๆ และเมื่อถูกใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ โดยวิธีการดู morphology ของเชื้อด้วย Transmission Electron Microscope (TEM), Electrophoresis, Outer membrane permeability, Cytoplasmic membrane permeability และ Enzyme assay.

### ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ฤทธิ์ของสาร Flavonoids บางชนิดสามารถยับยั้งเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam antibiotics บางชนิด
2. มีการเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร สาร Flavonoids (Apigenin, Baicalein, Luteolin, Quercetin) เมื่อให้ร่วมกับยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam antibiotics ต่อเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam antibiotics
3. สามารถทราบกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสาร Flavonoids ชนิดที่ทดสอบแล้วมีประสิทธิภาพดีเมื่อให้เดี่ยวๆ และให้ร่วมกับยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam antibiotics ในการยับยั้งเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam antibiotics โดยวิธีการดู Morphology ของเชื้อด้วย Transmission Electron Microscope (TEM), Electrophoresis, Outer membrane permeability และ Cytoplasmic membrane permeability





## บทที่ 2

## วิธีดำเนินการวิจัย

## แหล่งที่มาของข้อมูล

1. เชื้อ Clinical isolates of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่คือต่อยา  $\beta$ -lactam 1 strain, Clinical isolates of *Enterobacter cloacae* (EnC) ที่คือต่อยา  $\beta$ -lactam 1 strain, Clinical isolates of *Escherichia coli* (EC) ที่คือต่อยา  $\beta$ -lactam 1 strain ที่คือต่อยา  $\beta$ -lactam 1 strain โดยเชื้อได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขและกลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลมหาราช จังหวัดนครราชสีมา
2. สาร Apigenin, Baicalein, Luteolin, Quercetin และ Kaemferol ได้จากบริษัท INDOFINE Chemical Company, USA หรือบริษัท Sigma-Aldrich, UK
3. ยา Amoxicillin, Ceftriazone, Penicillin, Ampicillin, Piperacillin, Cloxacillin, Vancomycin ได้จากบริษัทผู้แทนจำหน่ายภายในประเทศไทย เช่น บริษัท Sigma, Glaxo, Wellcome, Bristol-Myers.



## วิธีการเก็บรวบรวมและวิธีวิเคราะห์ข้อมูล

1. **Bacterial suspension standard curve; Bacterial suspension standard curve** จะทำสำหรับเชื้อ Clinical isolates of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Clinical isolates of EnC, Clinical isolates of EC
  - โดยแต่ละเชื้อ 1 loop มาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ cation-adjust Mueller-Hinton broth (CAMHB) สำหรับเชื้อ MRSA และในอาหาร Nutrient broth (NB) สำหรับเชื้ออื่นๆ
  - เชื้อแต่ละตัวถูกนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์แบคทีเรียถูกนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อทำการเก็บเซลล์ที่ 4000 r.p.m. เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.9% แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงสองรอบ รอบละ 4000 r.p.m. เป็นเวลา 5 นาที
  - เซลล์แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาละลายในน้ำเกลือ 0.9% 50 ml และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrometer ที่ค่าตั้งแต่ 0.05-0.25 ที่ค่าความยาวคลื่น 500 nm
  - นำเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสงแต่ละค่ามานับจำนวนโดยการทำให้เป็น viable count และนำผลที่ได้มาสร้างกราฟ standard curve
2. **Minimum Inhibitory Concentrations (MICs);** MICs ของยา แต่ละตัว ได้แก่ Amoxycillin, Ceftazidime, Ampicillin, Cloxacillin จะทำสำหรับเชื้อที่คือต่อยานั้นๆ โดยข้อมูลการคือยาของเชื้อแต่ละตัวได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ส่วน MICs ของสาร Apigenin, Baicalein, Luteolin, และ Quercetin จะทำสำหรับทุกเชื้อที่กล่าวมาทั้งหมด (Liu, Durham, & Richards, 2000);
  - เตรียมความเข้มข้นของแบคทีเรียที่เตรียมในน้ำเกลือ 0.9% ให้เท่ากับ  $1 \times 10^7$  cfu/ml โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐาน standard curve
  - นำเชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นเท่ากับ  $1 \times 10^7$  cfu/ml ปริมาตร 0.05 ml ในลงในหลอดที่บรรจุอาหารเหลว CAMHB 4.95 ml สำหรับเชื้อ MRSA และในอาหาร NB 4.95 ml สำหรับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ โดยในแต่ละหลอดอาหารมีการเติมฟลาโวนอยด์หรือยาปฏิชีวนะลงไปด้วย ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ  $5 \times 10^5$  cfu/ml หลอดอาหารที่เติมน้ำแทนฟลาโวนอยด์และยาปฏิชีวนะถูกใช้เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
  - ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อไม่ให้โตได้ให้ถือเป็นค่า MIC
3. **Checkerboard assay;** Checkerboard assay ของเชื้อแต่ละตัว จะเป็นการผสมระหว่างยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactams ที่เชื้อตัวนั้นๆ คือ และสาร Flavonoids ที่นำมาทดสอบทีละตัว จนครบทุกตัว (G. Eumkeb, 1999; Lorian, 1999);
  - เตรียมความเข้มข้นของแบคทีเรียที่เตรียมในน้ำเกลือ 0.9% ให้เท่ากับ  $1 \times 10^7$  cfu/ml โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐาน standard curve
  - นำเชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นเท่ากับ  $1 \times 10^7$  cfu/ml ปริมาตร 0.05 ml ในลงในหลอดที่บรรจุอาหารเหลว CAMHB 4.95 ml สำหรับเชื้อ MRSA และในอาหาร NB 4.95 ml สำหรับเชื้อแบคทีเรีย

- ค่า MICs ของสารผสมระหว่างฟลาโวนอยด์และยาปฏิชีวนะถูกนำมาทำเป็นกราฟ isobolograms และคำนวณหาค่า FIC

**4. Killing curve determinations (Viable counts);** จะดู Viable counts ของเชื้อ (ที่เวลา 1, 2, 3, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ) ที่ผลการทำ Checkerboard assay แล้วให้ผลว่ายาและสาร Flavonoids ตัวนั้นๆ มีฤทธิ์เสริมกันและยับยั้งเชื้อได้ โดยจะทำการสำหรับกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ใช้ยาเดี่ยวๆ กลุ่มที่ใช้สาร Flavonoids เดี่ยวๆ และกลุ่มที่ใช้ยาผสมกับ Flavonoids โดยทำกับเชื้อทุกตัว (R. M. Richards & Xing, 1993);

- นำเชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นของเซลล์  $5 \times 10^5$  cfu/ml มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมฟลาโวนอยด์หรือยาปฏิชีวนะเดี่ยวๆ และในอาหารที่เติมฟลาโวนอยด์และยาปฏิชีวนะรวมกัน ส่วนหลอดควบคุมใช้ solvent แทนฟลาโวนอยด์และยาปฏิชีวนะ จากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส
- หลังจากนั้นที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่บ่มไว้ปริมาตร 10 ul มาใส่ลงในหลอดที่บรรจุ MHB สำหรับ MRSA หรือ NB สำหรับเชื้ออื่นๆ ปริมาตร 90 ul ที่เติม 0.125% lecithin และ 3% (v/v) Tween 80 จากนั้น นำมาเกลี่ยลงในอาหารวุ้นและบ่มเชื้อไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น
- นำมาสร้างกราฟ

**5. Transmission Electronmicroscopy (TEM) method;** โดยจะเลือกเชื้อที่เป็นตัวแทน gram positive ได้แก่ MRSA และเชื้อที่เป็นตัวแทน gram negative ได้แก่ *E. coli* ชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งสาร Flavonoids ที่นำมาทดสอบ มีฤทธิ์เสริมกับยาที่เชื้อเกิดการคือยานั้นๆ นำมา treated ด้วย ยานั้นๆ เดี่ยวๆ สาร Flavonoids เดี่ยวๆ และสาร Flavonoids ผสมยานั้น โดยมี Control แล้วนำไปเตรียมเพื่อดู Morphology เบื้องต้น ด้วย TEM, ทำ Electrophoresis, Outer membrane permeability และ Cytoplasmic membrane permeability (R. M. Richards, Xing, Gregory, & Marshall, 1995);

- ฟลาโวนอยด์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และยาปฏิชีวนะที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเมื่อใช้ร่วมกับสารฟลาโวนอยด์ ถูกนำมาทดสอบกับเซลล์แบคทีเรียเพื่อนำมาตรวจวัดด้วยกล้อง TEM
- เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร MHB สำหรับ MRSA หรือ NB สำหรับเชื้ออื่นๆ จากนั้นนำไปแช่ใน water bath ด้วยความเร็ว 100 oscillation/min ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

- นำเชื้อมาถ่ายลงในอาหารหลอดใหม่ MHB สำหรับ MRSA หรือ NB สำหรับเชื้ออื่นๆ และเขย่าใน water bath ด้วยความเร็ว 100 oscillation/min ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้ได้เชื้อช่วง log phase
- จากนั้น ปรับความเข้มข้นเซลล์ในน้ำเกลือ 0.9% ให้ได้เท่ากับ  $5 \times 10^6$  cfu/ml
- นำเซลล์ที่มีความเข้มข้น  $5 \times 10^6$  cfu/ml ปริมาตร 40 ml มาใส่ในหลอดที่บรรจุอาหาร MHB สำหรับ MRSA, หรือ NB สำหรับเชื้ออื่นๆ เลี้ยงเชื้อปริมาตร 360 ml ที่บรรจุฟลาโวนอยด์หรือยาปฏิชีวนะเดี่ยวๆ และในอาหารที่เติมฟลาโวนอยด์และยาปฏิชีวนะรวมกัน และนำไปเขย่าใน water bath ด้วยความเร็ว 100 oscillation/min ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- เซลล์แบคทีเรียถูกเก็บเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้อง TEM

**6. Gel Electrophoresis;** เพื่อทดสอบผลของยาปฏิชีวนะและฟลาโวนอยด์ที่มีต่อ outer membrane และ peptidoglycan associated proteins ของเซลล์แบคทีเรีย (R. M. Richards & Xing, 1993);

- เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร MHB สำหรับ MRSA หรือ NB สำหรับเชื้ออื่นๆ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
- นำเชื้อที่ได้ปริมาตร 8 ml มาเลี้ยงในหลอดที่บรรจุอาหาร MHB สำหรับ MRSA, หรือ NB สำหรับเชื้ออื่นๆ ปริมาตร 192 ml จากนั้นนำมาเขย่าใน water bath ด้วยความเร็ว 100 oscillation/min ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้ได้เชื้อช่วง log phase
- นำเชื้อในช่วง log phase ปริมาตร 100 ml มาใส่ลงในหลอดอาหารที่บรรจุ MHB สำหรับ MRSA, หรือ NB สำหรับเชื้ออื่นๆ และเติมยาปฏิชีวนะ หรือฟลาโวนอยด์ลงไป หลอดที่ไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะและฟลาโวนอยด์ใช้เป็นกลุ่ม control จากนั้นนำมาเขย่าใน water bath ด้วยความเร็ว 100 oscillation/min ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- ทำการเก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 6000g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และล้างด้วย HEPES buffer (10 mM, pH 6.8) 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 10 ml
- ทำให้เซลล์แตกโดยการ sonication (3 x 60 s กับ 30 s cooling period ระหว่างแต่ละรอบ) ที่ 4 องศาเซลเซียส เซลล์ที่ไม่แตกถูกทิ้งไปโดยการ centrifuge ที่ 5000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- sodium N-lauroyl sarcosinate (Sarkosyl) 20% (W/V) ปริมาตร 1 ml ถูกเติมลงใน supernatant จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ส่วนของ supernatant ที่ใสแสดงให้เห็นถึงส่วนของ cytoplasmic membrane
- outer membrane และ peptidoglycan ถูกเก็บโดยการ centrifuge ที่ 40000g เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่เติม PMSF 2 ml/ml 2 รอบ
- น้ำหนักของ outer membrane (25 mg) และโปรตีนบน peptidoglycan ที่สกัดออกมาถูกนำมาละลายอีกครั้งใน น้ำกลั่นที่เติม 2 mg/ml PMSF และเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส (Markwell, 1978; R. M. E. Richards, & Xing, Z.J., 1996; Williams, 1991);

- Bovine serum albumin ถูกใช้เป็นโปรตีน มาตรฐาน ก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ให้ละลายโปรตีนที่สกัดออกมาด้วย buffer โปรตีนที่สกัดออกมาสามารถนำมาเก็บไว้ได้นานกว่า 2 เดือน

**7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);** ใช้ 5% stacking gel และ 15% separating gel

- อัตราส่วนของ OM-PG associated protein ที่สกัดได้ : buffer สำหรับการทดลองในขั้นที่ 1 50ul : 50ul และการทดลองในขั้นที่ 2 250ul : 50ul ถูกผสมเข้าด้วยกัน

- OM-PG associated protein ในแต่ละตัวอย่างถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย Coomassie Brilliant Blue staining (Voet, 1995). Sample buffer ประกอบด้วย 0.125 M Tris-hydrochloride buffer (pH 6.8), 0.04 M Na<sub>2</sub>EDTA, 4% (w/v) bromophenol blue และต้มเป็นเวลา 5 นาที

- OM-PG associated protein ที่สกัดได้ ถูกนำมาผสมกับ buffer (อัตราส่วน 1:1 และ 5:1 สำหรับการทดลองขั้นที่ 1 และ 2 ตามลำดับ) ถูกนำมา load ลงบน stacking gel

- electrophoresis ถูกใช้ที่ 8 mA สำหรับ stacking gel และ 15 mA สำหรับ separating gel เพื่อให้ได้ผลที่ดีที่สุด

- หลังจากนั้น นำ gel มาย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue 1 ชั่วโมง (Gersten, 1996). ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมา de-stain รอบแรกด้วย 45% (v/v) ethanol และ 10% (v/v) acetic acid และ de-stain รอบสุดท้ายด้วย 7% (v/v) acetic acid โดยโปรตีนที่ใช้เป็น standard มีน้ำหนักโมเลกุลดังนี้ myoglobi (17,200), carbonic anhydrase (30,000), ovalbumin (42,700), albumin (66,250) และ ovotransferrin (76,000-78,000) (Gersten, 1996; R. M. E. Richards, & Xing, Z.J., 1996).

**8. Enzyme assays;** ใช้วิเคราะห์ความสามารถในการ hydrolyze ยา benzylpenicillin โดยใช้เอ็นไซม์  $\beta$ -lactamase ที่ได้จากเชื้อ *B. cereus* และ *E. cloacae*

- ฟลาโวนอยด์ถูกบ่มไว้ด้วยกันกับเอ็นไซม์ใน 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเติมสารตั้งต้น และ methanol : acetic acid (100:1) ถูกใช้เป็นตัว stop reaction และ HPLC ถูกใช้เป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์โดยใช้ acetonitrile/acetate เป็น mobile phase (Reading, 1983)

**9. Outer Membrane (OM) permeability;** ใช้เพื่อตรวจวัดความสามารถของฟลาโวนอยด์และยา

ปฏิชีวนะที่มีผลต่อ OM permeability;

- เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร MHB สำหรับ MRSA หรือ NB สำหรับเชื้ออื่นๆ ปริมาตร 100 ml จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

- นำเชื้อที่ได้ปริมาตร 2 ml มาเลี้ยงในหลอดที่บรรจุอาหาร MHB สำหรับ MRSA หรือ NB สำหรับเชื้ออื่นๆ ปริมาตร 98 ml จากนั้นนำมาเขย่าใน water bath ด้วยความเร็ว 100 oscillation/min ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้ได้เชื้อช่วง log phase

- นำเชื้อปริมาตร 10 ml ในช่วง log phase มาเลี้ยงในหลอดที่บรรจุอาหาร MHB สำหรับ MRS หรือ NB สำหรับเชื้ออื่นๆ ปริมาตร 90 ml ซึ่งมีการเติมยาปฏิชีวนะและสารฟลาโวนอยด์ลงไป

- เก็บเซลล์โดยนำไป centrifuge ที่ 4000 r.p.m. เป็นเวลา 10 นาที และล้างออกด้วยน้ำเกลือ 0.9% ปริมาตร 10 ml 2 ครั้ง
- นำเซลล์มาละลายใน sodium phosphate buffer และปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงหรือ OD ที่ 500 nm ให้เท่ากับ 0.1 ถึง 0.2
- เติม TTX-100 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 300 ug/ml หลอดที่ไม่มีเติม TTX-100 ให้เป็นกลุ่ม control
- วัดการลดลงของค่า OD ในช่วงเวลา 0, 30, 60, 90, 120 นาที ตามลำดับ (Marri, 1996)

**10. Cytoplasmic Membrane permeability;** ขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์เหมือนกับ การเตรียมตัวอย่างการทำ OM permeability จนถึงขั้นตอนของการเติมยาปฏิชีวนะและสารฟลาโวนอยด์และนำไปบ่ม ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5 ชั่วโมง เชื้อปริมาณ 0.5 ml ถูกนำออกมาเจือจางด้วย buffer (0.06 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.04M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.01M KCL, 0.001M  $\text{MgSO}_4$ , และ 0.05M  $\beta$ -mercaptoethanol pH 7.0) จากนั้นวัดการทำงานของเอนไซม์ betagalactosidase โดยใช้ ONPG (Marri, 1996; Miller, 1972);

- เซลล์ที่ถูกเจือจางด้วย buffer ถูกนำมาวัดค่า OD ที่ 600 nm. จากนั้นเติม ONPG (4 mg/ml) ปริมาตร 0.2 ml และเขย่า 2-3 วินาที จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส กลุ่ม positive control ใช้ toluene 50 ul/ml (Jackson, 1965; Miller, 1972)
- ทำการ stop reaction โดยการเติม 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ปริมาตร 1 ml สังเกตการณ์เปลี่ยนสี
- วัดค่า OD ที่ 420 และ 550 nm. ของแต่ละหลอด

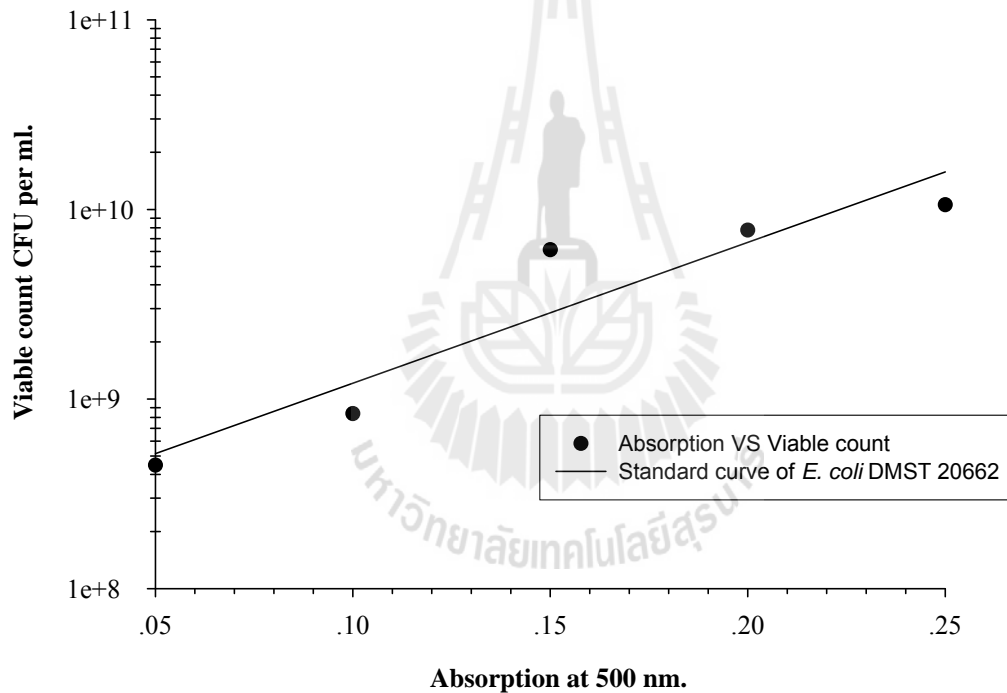
### บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### ผลการวิจัย

##### 1. Bacterial suspensions viable count absorption standard curve

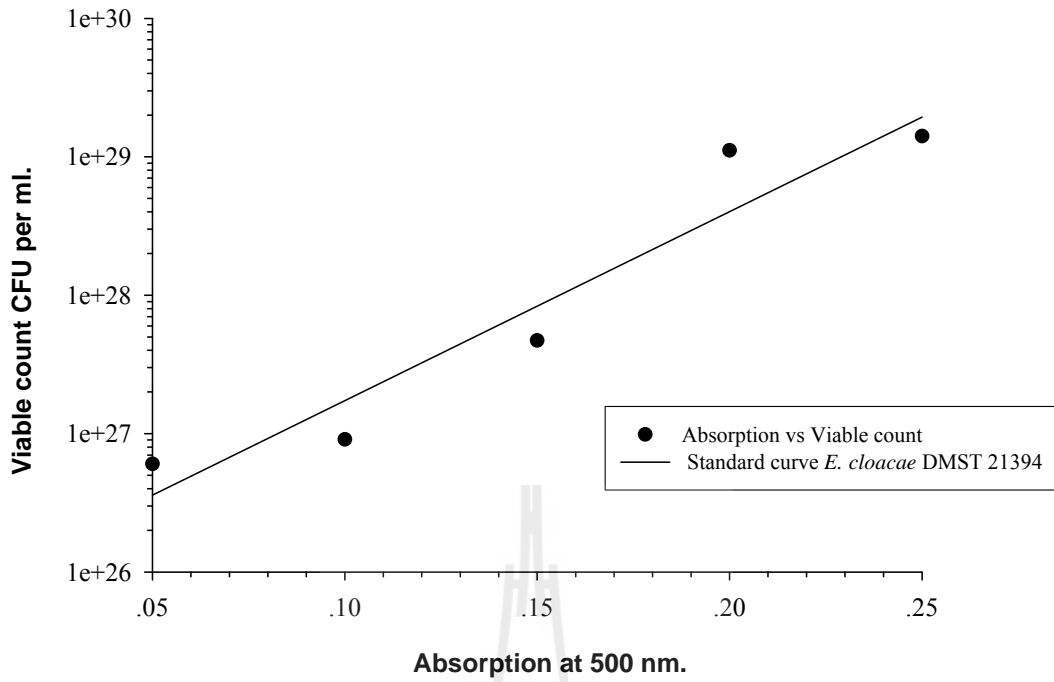
ผลการทำ Bacterial suspension viable count absorption standard curve ของเชื้อดื้อยา *E. coli* DMST 20662, MRSA และ *E. cloacae* DMST 21394 และเชื้อที่ไวต่อยา ASeNC, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 แสดงดังรูปที่ 1 ถึง 6 ตามลำดับ

#### Absorption of bacterial suspension viable count standard curve of amoxicillin - resistant *E. coli* DMST 20662



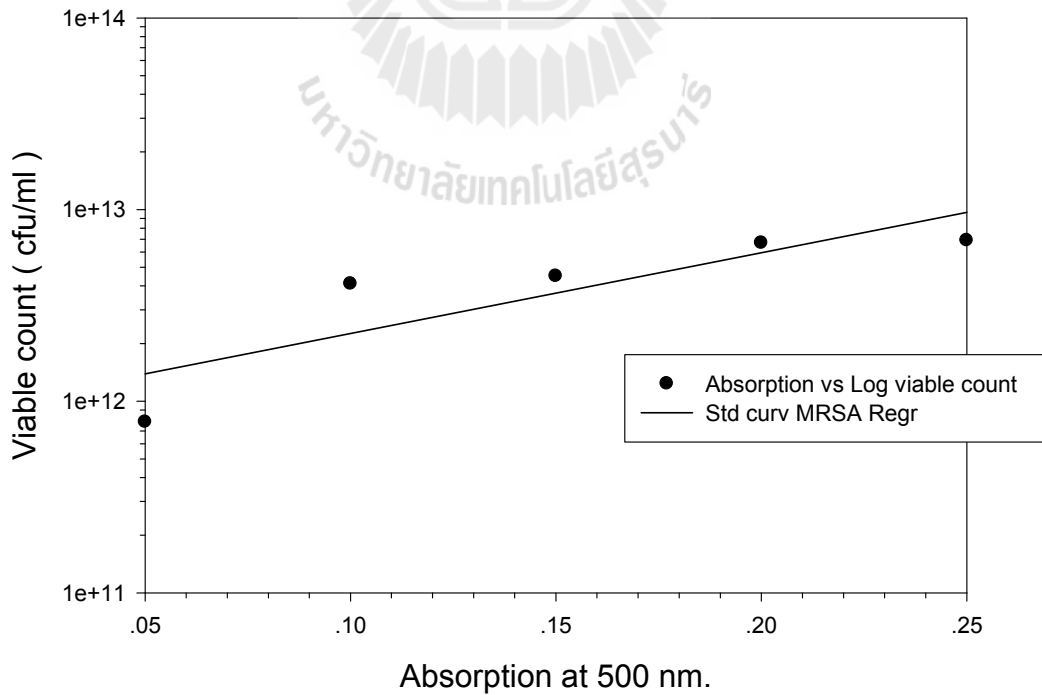
รูปที่ 1 Suspension standard curve ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662

**Absorption of bacterial suspension viable count standard curve of Ceftazidime - resistant *E. cloacae* DMST 21394**



รูปที่ 2 Suspension standard curve ของเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394

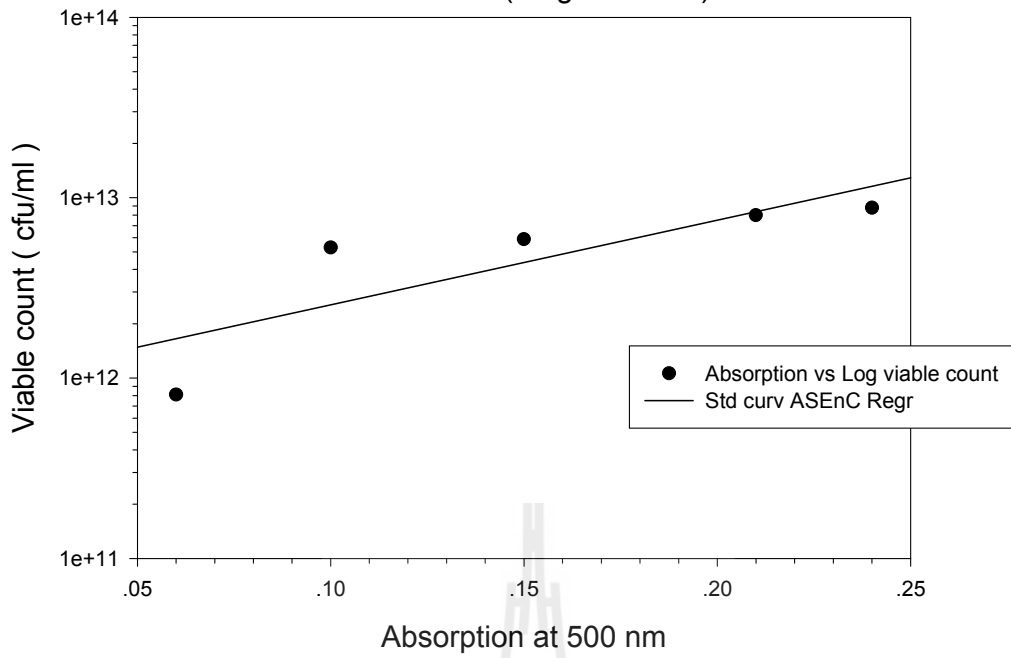
**Absorption of bacterial suspension viable count standard curve of MRSA**



รูปที่ 3 Suspension standard curve ของเชื้อ MRSA

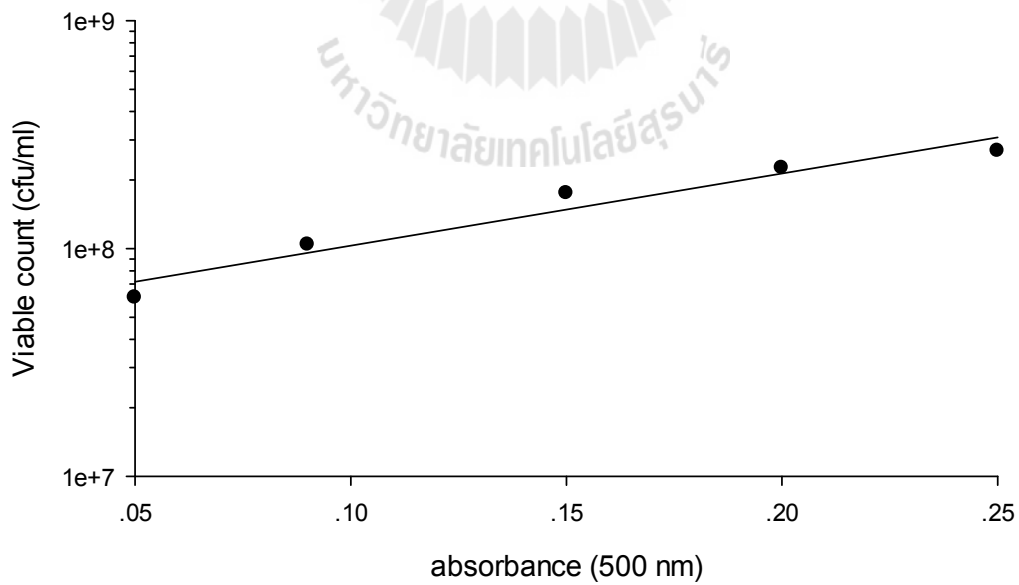


Absorption of bacterial suspension viable count standard curve of ASEnC(drug-sensitive)

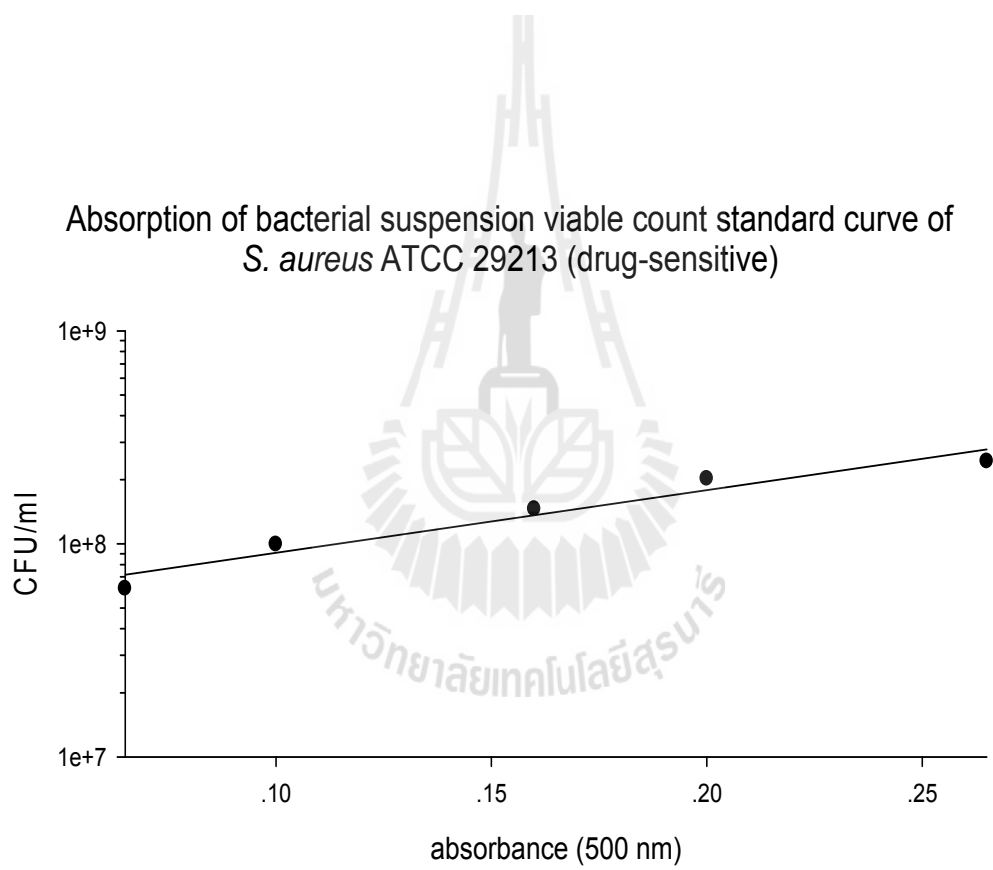


รูปที่ 4 Suspension standard curve ของเชื้อ ASEnC

Absorption of bacterial suspension viable count standard curve of *E. coli* ATCC 25922 (drug-sensitive)



รูปที่ 5 Suspension standard curve ของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922



รูปที่ 6 Suspension standard curve ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213

## 2. MICs determination

ตารางที่ 1 ตารางสรุปค่า MICs ของยา amoxicillin, ceftazidime และสารฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* DMST 20662 and *E. cloacae* DMST 21394

|                              | Amoxicillin | Ceftazidime | Baicalein | Quercetin | Luteolin | Apigenin |
|------------------------------|-------------|-------------|-----------|-----------|----------|----------|
| <i>E. coli</i> DMST 20662    | > 1000      | -           | 170       | 120       | 200      | 150      |
| <i>E. cloacae</i> DMST 21394 | -           | 100         | 320       | 90        | 130      | 180      |

ตารางที่ 2 ตารางสรุปค่า MICs ของยา ampicillin, ceftazidime และ cloxacillin และสารฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA, CREnC และ ASEnC

|       | ampicillin | ceftazidime | cloxacillin | baicalein | apigenin | luteolin | quercetin |
|-------|------------|-------------|-------------|-----------|----------|----------|-----------|
| MRSA  | 100        | 50          | >1000       | >400      | >400     | >400     | >400      |
| CREnC | >1000      | >1000       | >1000       | >400      | >400     | >400     | >400      |
| ASEnC | 6          | 10          | 80          | >400      | >400     | >400     | >400      |

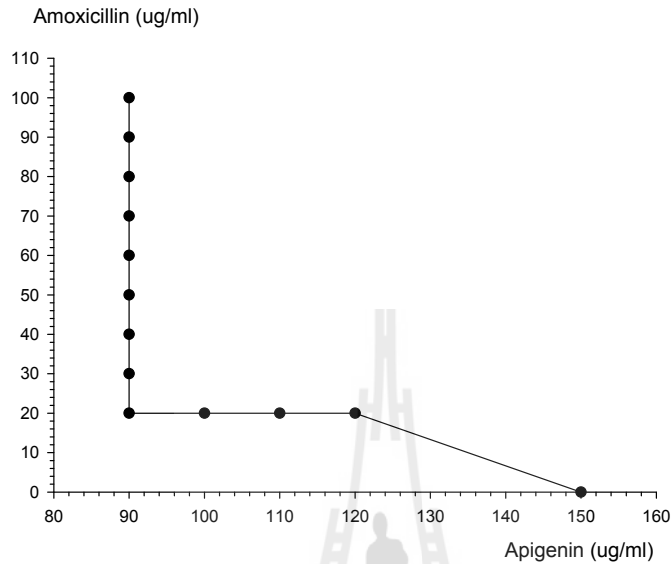
ผลการทำ MICs ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 และ *E. cloacae* DMST 21394 ที่ผ่านการทดสอบด้วยฟลาโวนอยด์และยาปฏิชีวนะแสดงดังตารางที่ 1 ค่า MICs ของ baicalein, quercetin, luteolin และ apigenin สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* DMST 20662 ได้ที่ MICs เท่ากับ 170, 120, 200 และ 150 ug/ml ตามลำดับ แต่ เมื่อทดสอบกับ amoxicillin พบว่าเชื้อคือต่อยา ซึ่งได้ค่า MICs ของยา amoxicillin >1000 ug/ml ส่วนเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 สามารถคือต่อยา ceftazidime ที่ MICs 100 ug/ml และ MICs ของ baicalein, quercetin, luteolin และ apigenin สามารถยับยั้งเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 ได้ที่ MICs เท่ากับ 320, 90, 130 และ 180 ตามลำดับ

ผลการทำ MICs ของเชื้อ MRSA, CREnC และ ASEnC ที่ผ่านการทดสอบด้วยฟลาโวนอยด์และยาปฏิชีวนะแสดงดังตารางที่ 2 เชื้อที่ผ่านการทดสอบด้วยฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (baicalein, apigenin, luteolin and quercetin) ไม่พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ MRSA, CREnC and ASEnC ที่ MICs > 400 ug/ml และพบว่าเชื้อ CREnC สามารถคือต่อการทดสอบด้วยยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam (ampicillin, cloxacillin and ceftazidime) ที่ MICs >1,000 ug/ml ส่วนเชื้อ MRSA สามารถคือต่อยา ceftazidime, ampicillin และ cloxacillin MICs of 50, 100 and > 1,000 ug/ml ตามลำดับและเชื้อ ASEnC พบว่าคือต่อยา ceftazidime and cloxacillin เช่นกัน แต่พบว่า ASEnC ไวต่อยา ampicillin

### 3. Checkerboard determinations

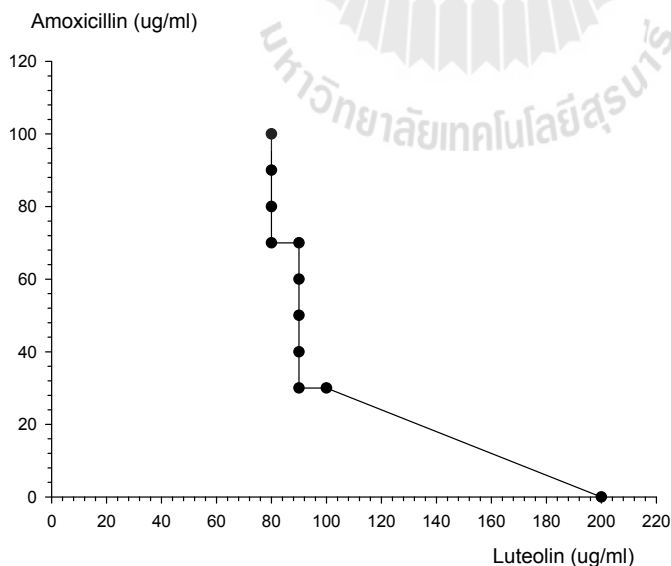
Isobolograms ที่ได้จากการทำ checkerboard MIC แสดงดังรูปที่ 7 ถึง 18 และตารางสรุปผลการทำ isobolograms แสดงดังตารางที่ 3 ถึง 7

#### *E. coli* DMST 20662

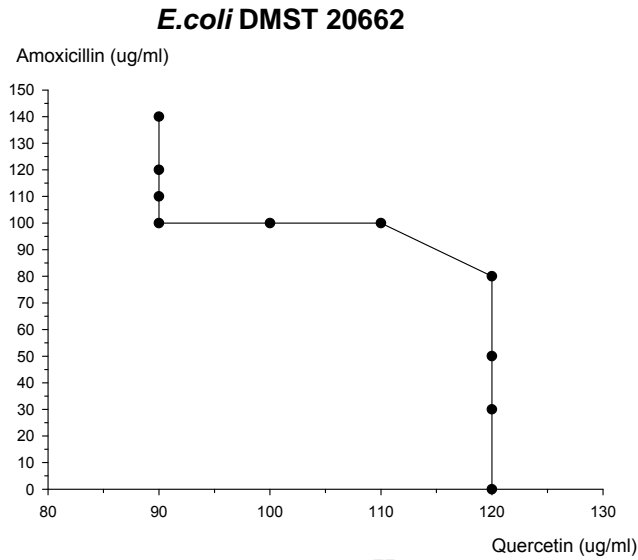


รูปที่ 7 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ amoxicillin ( $\mu\text{g/ml}$ ) + apigenin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* DMST 20662

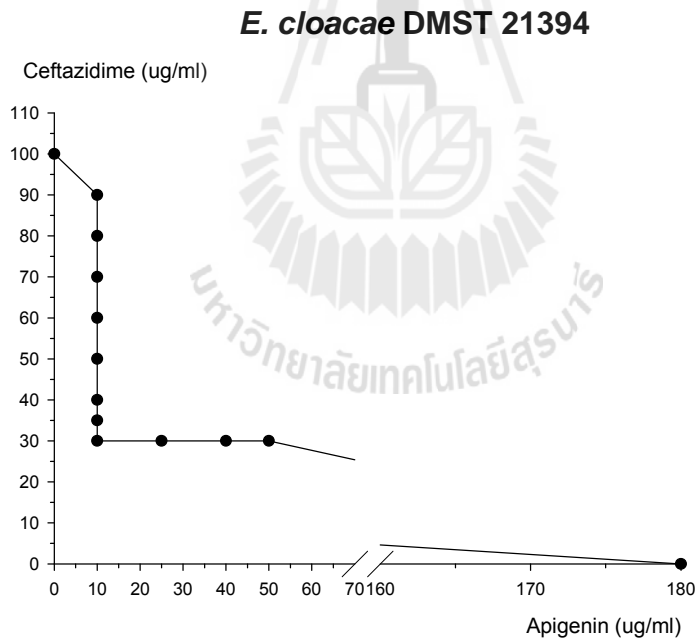
#### *E. coli* DMST 20662



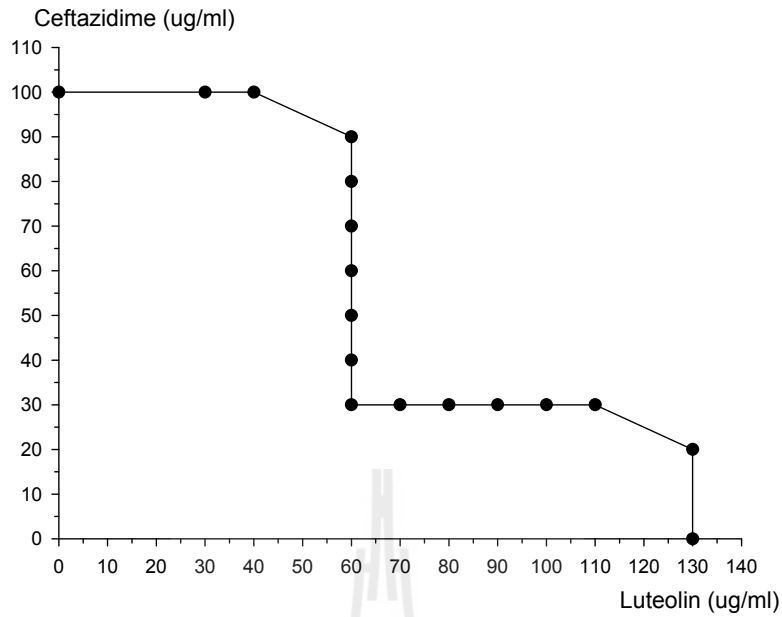
รูปที่ 8 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ amoxicillin ( $\mu\text{g/ml}$ ) + luteolin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* DMST 20662



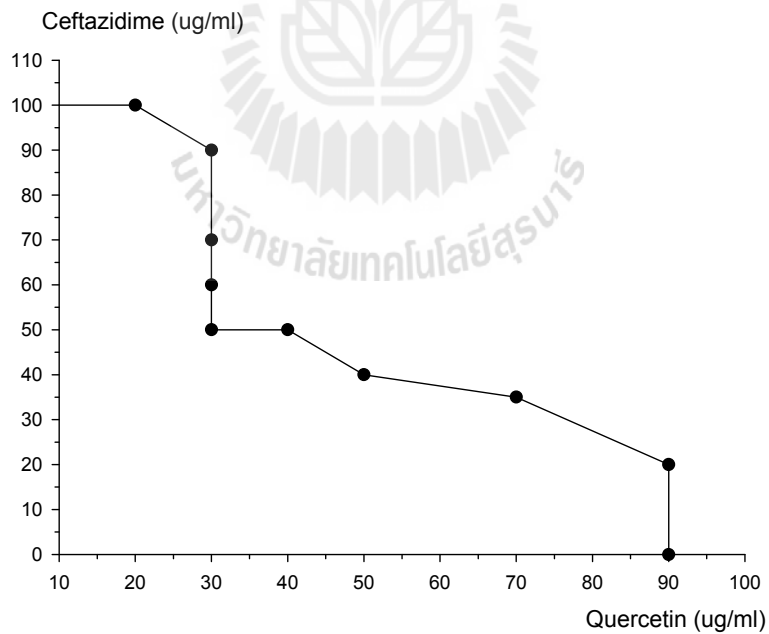
รูปที่ 9 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ amoxicillin ( $\mu\text{g/ml}$ ) + quercetin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* DMST 20662



รูปที่ 10 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ ceftazidime ( $\mu\text{g/ml}$ ) + apigenin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ในการยับยั้งเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394

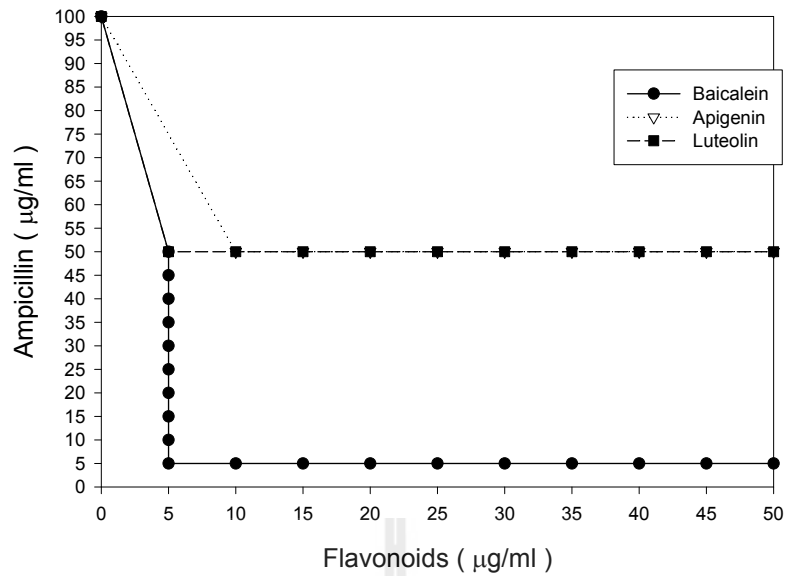
***E. cloacae* DMST 21394**

รูปที่ 11 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ ceftazidime ( $\mu\text{g/ml}$ ) + luteolin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ในการยับยั้งเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394

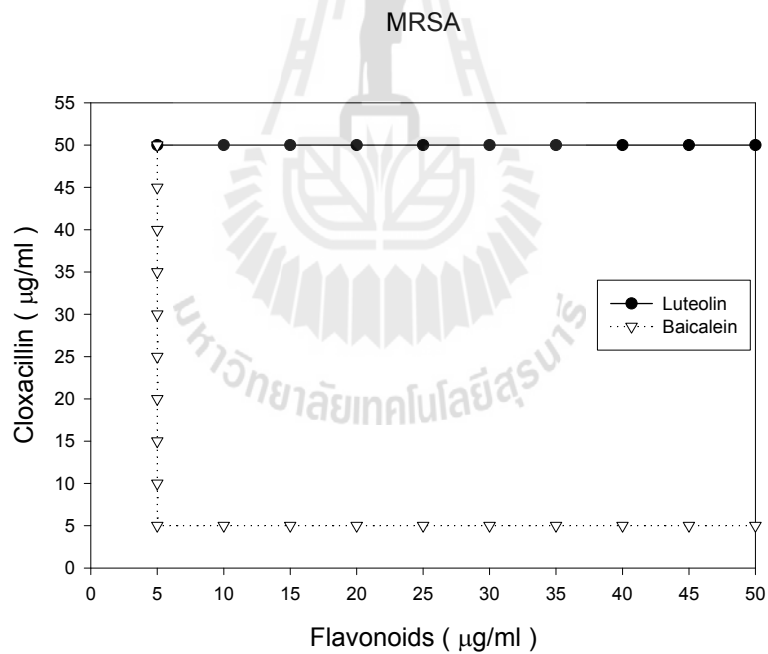
***E. cloacae* DMST 21394**

รูปที่ 12 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ ceftazidime ( $\mu\text{g/ml}$ ) + quercetin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ในการยับยั้งเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394

20  
MRSA

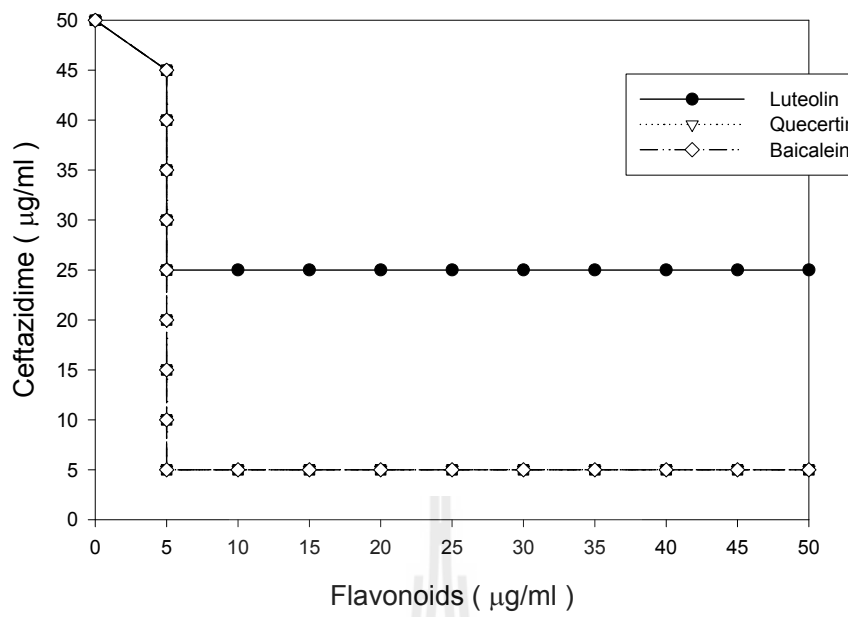


รูปที่ 13 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ ampicillin (µg/ml) + apigenin (µg/ml), ampicillin (µg/ml) + baicalein (µg/ml), ampicillin (µg/ml) + luteolin (µg/ml) ในการยับยั้งเชื้อ MRSA

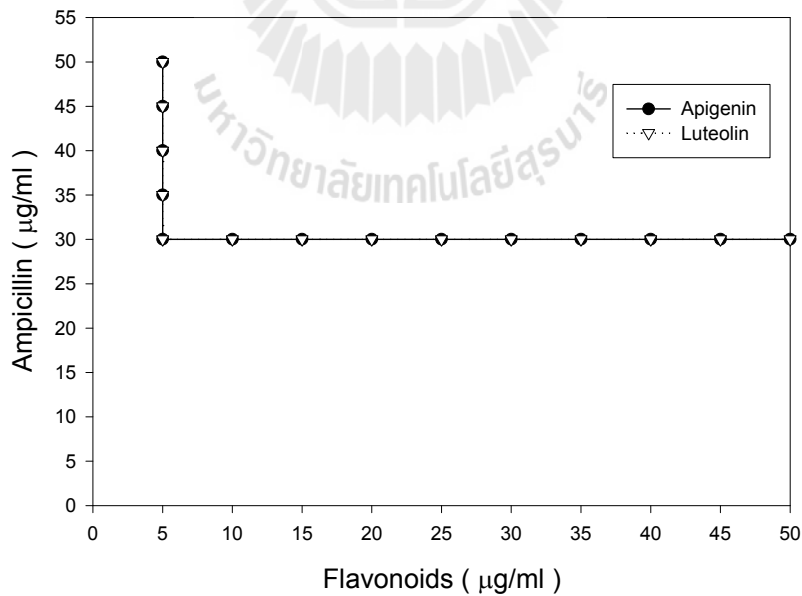


รูปที่ 14 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ cloxacillin (µg/ml) + baicalein (µg/ml), cloxacillin (µg/ml) + luteolin (µg/ml) ในการยับยั้งเชื้อ MRSA

## MRSA

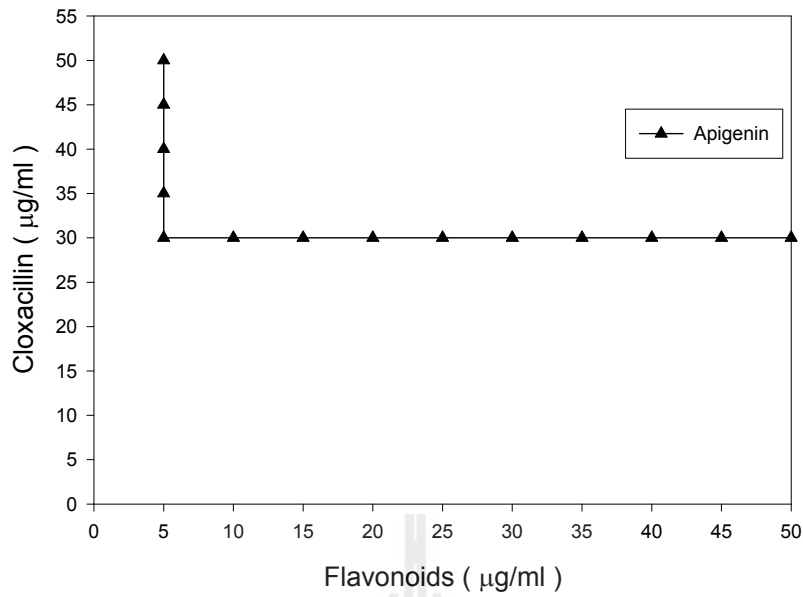


รูปที่ 15 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ ceftazidime ( $\mu\text{g/ml}$ ) + quercetin ( $\mu\text{g/ml}$ ), ceftazidime ( $\mu\text{g/ml}$ ) + baicalein ( $\mu\text{g/ml}$ ), ceftazidime ( $\mu\text{g/ml}$ ) + luteolin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ในการยับยั้งเชื้อ MRSA

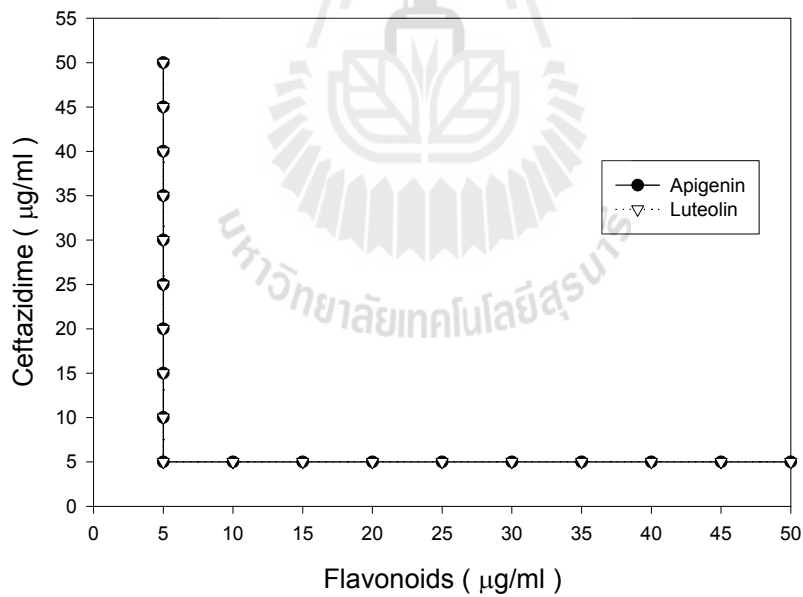


รูปที่ 16 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ ampicillin ( $\mu\text{g/ml}$ ) + apigenin ( $\mu\text{g/ml}$ ), ampicillin ( $\mu\text{g/ml}$ ) + luteolin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ในการยับยั้งเชื้อ CREnC





รูปที่ 17 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ cloxacillin (µg/ml) + apigenin (µg/ml) ในการยับยั้งเชื้อ CREnC



รูปที่ 18 แสดง Isobologram จากการทำ checkerboard ของ ceftazidime (µg/ml) + apigenin (µg/ml), ceftazidime (µg/ml) + luteolin (µg/ml) ในการยับยั้งเชื้อ CREnC

กราฟ isobologram ที่ได้จากการทำ checkerboard MIC แสดงผลการเสริมฤทธิ์กันระหว่างฟลาโวนอยด์กับยาปฏิชีวนะในกลุ่ม  $\beta$ -lactam ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli*, MRSA และ CREnC

ตารางที่ 3 แสดงผล FICs ที่ได้จากการทำ checkerboard ของ quercetin, luteolin และ apigenin, kaempferol และ clavulanic acid เมื่อใช้ร่วมกับยา amoxicillin ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* DMST 20662

| Antibacterial combination | <i>E. coli</i> DMST 20662 |          |       |                           |
|---------------------------|---------------------------|----------|-------|---------------------------|
|                           | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )  | MIC(A+B) | FIC   | Type of interaction       |
| Quercetin                 | 120                       | 90       | <0.85 | Synergy or no interaction |
| Amoxicillin               | >1000                     | 100      |       |                           |
| Luteolin                  | 200                       | 90       | <0.47 | Synergy                   |
| Amoxicillin               | >1000                     | 30       |       |                           |
| Apigenin                  | 150                       | 90       | <0.62 | Synergy or no interaction |
| Amoxicillin               | >1000                     | 20       |       |                           |
| Kaempferol                | 500                       | 40       | <0.09 | Synergy                   |
| Amoxicillin               | >1000                     | 10       |       |                           |
| Clavulanic acid           | >128                      | >128     | 2.0   | no interaction            |
| Amoxicillin               | >1000                     | >1000    |       |                           |

ตารางที่ 4 แสดงผล FICs ที่ได้จากการทำ checkerboard ของ quercetin และ clavulanic acid เมื่อใช้ร่วมกับยา amoxicillin ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* DMST 20662

| Antibacterial combination | <i>E. coli</i> DMST 25922 |          |      |                     |
|---------------------------|---------------------------|----------|------|---------------------|
|                           | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )  | MIC(A+B) | FIC  | Type of interaction |
| Quercetin                 | 100                       | N/D      | N/D  | N/D                 |
| Amoxicillin               | 4                         | N/D      |      |                     |
| Clavulanic acid           | 6                         | 0.2      | 0.15 | Synergy             |
| Amoxicillin               | 4                         | 0.6      |      |                     |

ตารางที่ 5 แสดงผล FICs ที่ได้จากการทำ checkerboard ของ quercetin, luteolin และ apigenin เมื่อใช้ร่วมกับยา ceftazidime ในการยับยั้งเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394

| Antibacterial combination | <i>E. cloacae</i> DMST 21394 |          |       |                     |
|---------------------------|------------------------------|----------|-------|---------------------|
|                           | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )     | MIC(A+B) | FIC   | Type of interaction |
| Quercetin                 | 90                           | 30       | <0.83 | no interaction      |
| Ceftazidime               | 100                          | 50       |       |                     |
| Luteolin                  | 130                          | 60       | 0.76  | No interaction      |
| Ceftazidime               | 100                          | 30       |       |                     |
| Apigenin                  | 180                          | 20       | 0.36  | Synergy             |
| Ceftazidime               | 100                          | 20       |       |                     |

ตารางที่ 6 แสดงผล FICs ที่ได้จากการทำ checkerboard ของ quercetin, baicalein และ clavulanic acid เมื่อใช้ร่วมกับยา ceftazidime ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213

| Antibacterial combination | <i>S. aureus</i> ATCC 29213 |          |     |                     |
|---------------------------|-----------------------------|----------|-----|---------------------|
|                           | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )    | MIC(A+B) | FIC | Type of interaction |
| Quercetin                 | >200                        | N/D      | N/D | N/D                 |
| ceftazidime               | 0.12                        | N/D      | N/D | N/D                 |
| baicalein                 | >300                        | N/D      | N/D | N/D                 |
| ceftazidime               | 0.12                        | N/D      | N/D | N/D                 |
| Clavulanic acid           | 4                           | N/D      | N/D | N/D                 |
| ceftazidime               | 0.12                        | N/D      |     |                     |

ตารางที่ 7 แสดงผล FICs ที่ได้จากการทำ checkerboard ของ quercetin, baicalein และ clavulanic acid เมื่อใช้ร่วมกับยา methicillin, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, penicillin G และ ceftazidime ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 20651 (MRSA)

| Antibacterial combination | <i>S. aureus</i> 20651 (MRSA) |          |       |                     |
|---------------------------|-------------------------------|----------|-------|---------------------|
|                           | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )      | MIC(A+B) | FIC   | Type of interaction |
| <b>Methicillin</b>        | >1000                         | -        | -     |                     |
| Quercetin                 | >400                          | 20+5     | <0.03 | Synergy             |
| Baicalein                 | >400                          | 20+15    | <0.06 | Synergy             |
| <b>Ampicillin</b>         | >1000                         | -        | -     |                     |
| Quercetin                 | >400                          | 15+5     | <0.03 | Synergy             |
| Baicalein                 | >400                          | 15+10    | <0.05 | Synergy             |
| <b>Amoxicillin</b>        | 250                           | -        | -     |                     |
| Quercetin                 | >400                          | 10+5     | <0.05 | Synergy             |
| Baicalein                 | >400                          | 10+10    | <0.07 | Synergy             |
| Clavulanic acid           | >128                          | 250+>128 | 2     | No interaction      |
| <b>Cloxacillin</b>        | >1000                         | -        | -     |                     |
| Quercetin                 | >400                          | 10+5     | <0.02 | Synergy             |
| Baicalein                 | >400                          | 10+5     | <0.02 | Synergy             |
| <b>Penicillin G</b>       | 250                           | -        | -     |                     |
| Quercetin                 | >400                          | 10+5     | <0.05 | Synergy             |
| Baicalein                 | >400                          | 10+15    | <0.08 | Synergy             |
| <b>Ceftazidime</b>        | 50                            | -        | -     |                     |
| Quercetin                 | >400                          | 5+5      | <0.11 | Synergy             |
| Baicalein                 | >400                          | 5+5      | <0.11 | Synergy             |
| Clavulanic acid           | >128                          | 50+>128  | 2     | No interaction      |

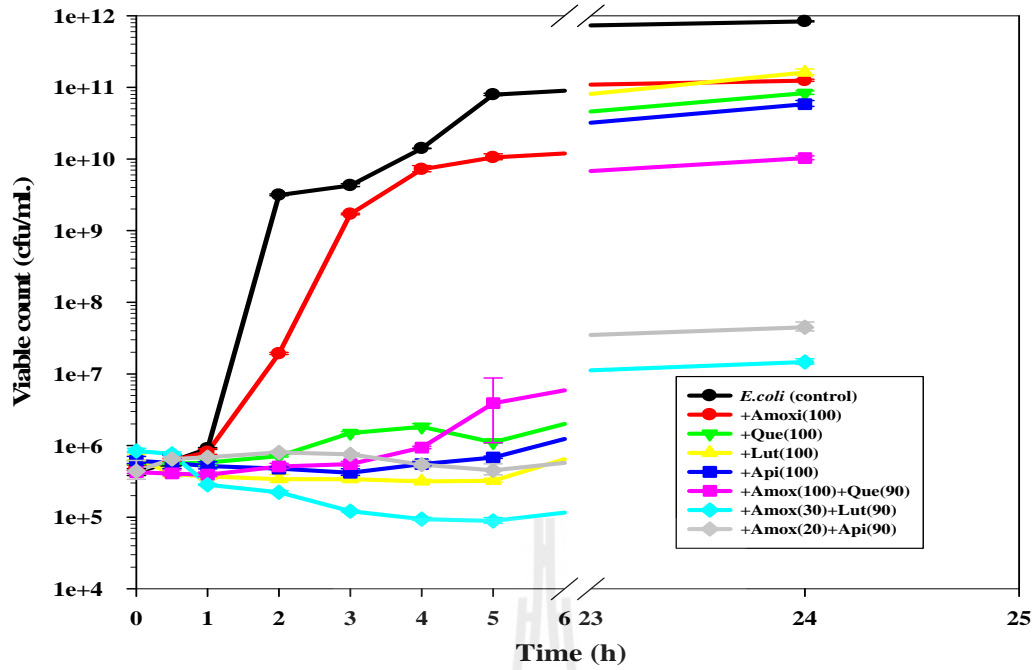
#### 4. Viable counts

***E. coli* DMST 20662:** เมื่อนำเชื้อ *E. coli* DMST 20662 ในช่วง log phase มาทดสอบด้วย Amoxicillin 100 µg/ml เดี่ยวๆพบว่าเชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก  $5 \times 10^5$  cfu/ml ในช่วง 5 ชั่วโมง. กลุ่มที่ทดสอบด้วย quercetin, luteolin and apigenin at 100 µg/ml พบว่าที่ 2 ถึง 5 ชั่วโมง เชื้อมีปริมาณลดลง และลดลงอย่างชัดเจนในช่วง 5 ถึง 24 ชั่วโมง มากไปกว่านั้นแล้วเมื่อถูกนำมาทดสอบด้วยสารผสมระหว่าง amoxicillin 30 µg/ml กับ amoxicillin 100 µg/ml กับ quercetin 90 µg/ml, amoxicillin 30 µg/ml กับ luteolin 90 µg/ml, amoxicillin 20 µg/ml กับ apigenin 90 µg/ml ทำให้ปริมาณเชื้อลดลงในช่วง 2 ถึง 5 ชั่วโมง และลดลงเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนตั้งแต่ 5 ถึง 24 ชั่วโมง (รูปที่ 19)

***E. cloacae* DMST 21394 :** จากรูปที่ 20 เชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 ที่  $5 \times 10^5$  cfu/ml ในช่วง log phase เมื่อถูกทดสอบด้วย ceftazidime 20 µg/ml, apigenin 10 µg/ml หรือ luteolin 10 µg/ml ในช่วง 5 ชั่วโมงแรก มีจำนวนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control อย่างไรก็ตามเมื่อใช้สารผสมระหว่าง ceftazidime 20 µg/ml กับ apigenin 10 µg/ml, ceftazidime 20 µg/ml กับ luteolin 10 µg/ml ลดลงอย่างชัดเจนในช่วง 2 ถึง 4 ชั่วโมง และลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจาก 4 ชั่วโมงถึง 24 ชั่วโมง

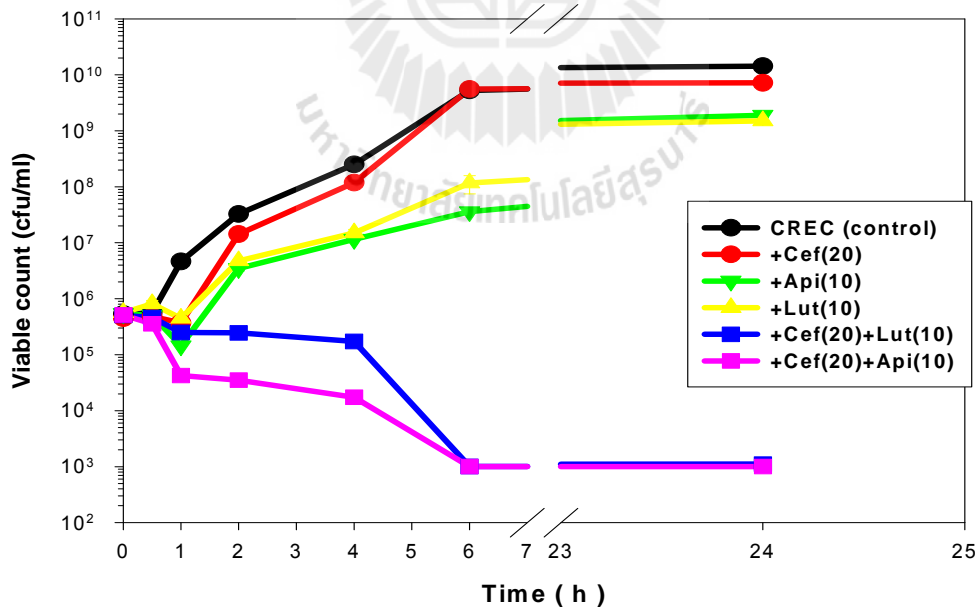
**MRSA :** ผลการทำ killing curve ของเชื้อ MRSA ที่ถูกทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะเดี่ยวๆ และยาปฏิชีวนะใช้ร่วมกับฟลาโวนอยด์ แสดงดังรูปที่ 21 และ 22 กลุ่ม control ของ MRSA พบว่าเซลล์ไม่มีการลดจำนวนลงเมื่อทำการนับจำนวนโคโลนี รูปที่ 21 แสดง ampicillin, cloxacillin และ baicalein ที่ 50 µg/ml เมื่อใช้เดี่ยวๆ พบว่ามีผลต่อการเจริญของเชื้อเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่ม control และ baicalein ที่ 10 µg/ml เมื่อถูกใช้ร่วมกับ ampicillin ที่ 10 µg/ml หรือ cloxacillin ที่ 10 µg/ml สามารถลดการเจริญของเชื้อไปที่  $5 \times 10^2$  cfu/ml สำหรับ MRSA ที่ 6 ชั่วโมง และลดลงต่ำกว่าค่าต่ำสุดที่  $10^3$  cfu/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง รูปที่ 22 แสดงการนับจำนวนเชื้อ MRSA มีจำนวนลดลงเมื่อถูกทดสอบด้วย ceftazidime 30 µg/ml, quercetin (50 µg/ml) หรือ baicalein (50 µg/ml) เดี่ยวๆ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ในระหว่างช่วงเวลาที่ 6 ถึง 24 ชั่วโมง และเมื่อใช้สารผสมระหว่าง Ceftazidime (10 µg/ml) และ baicalein (10 µg/ml) หรือ quercetin (20 µg/ml) ที่เวลามากกว่า 6 ชั่วโมง สามารถลดจำนวนเชื้อลงไปที่  $5 \times 10^2$  cfu/ml และที่ 24 ชั่วโมง เชื้อก็ไม่สามารถกลับมาโตได้อีก

Viable count of *E. coli* DMST 20662 plus amoxicillin and selected flavonoids

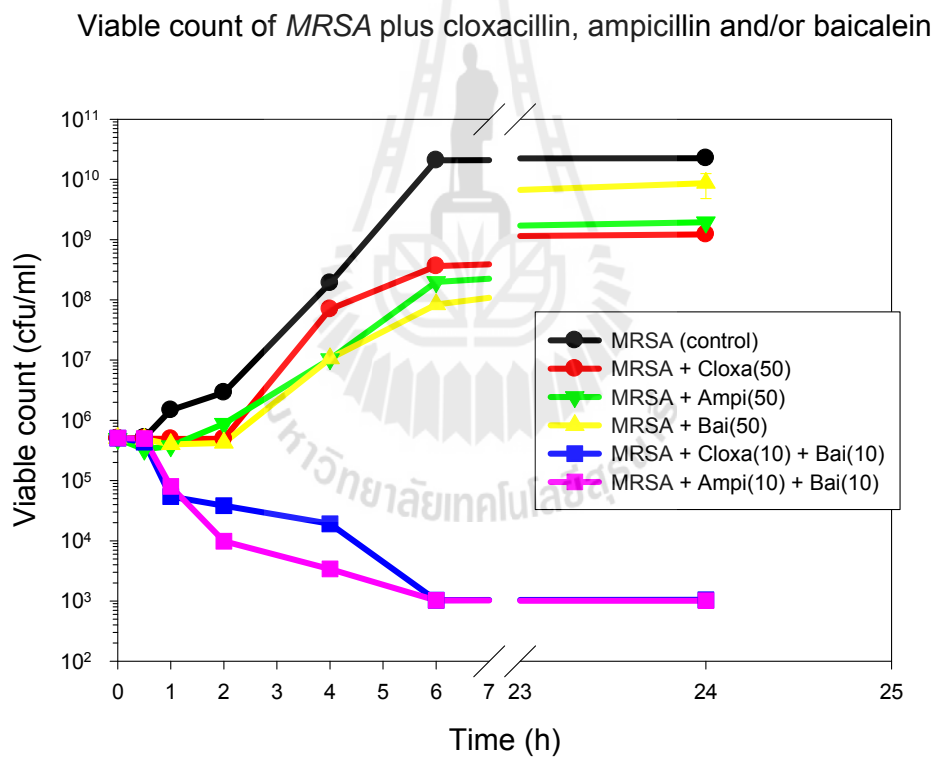


รูปที่ 19 ผลการทำ viable count ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 ภายหลังจากทดสอบกับยา amoxicillin, quercetin, luteolin, apigenin เดี่ยวๆ และเมื่อใช้ฟลาโวนอยด์ร่วมกับยา amoxicillin

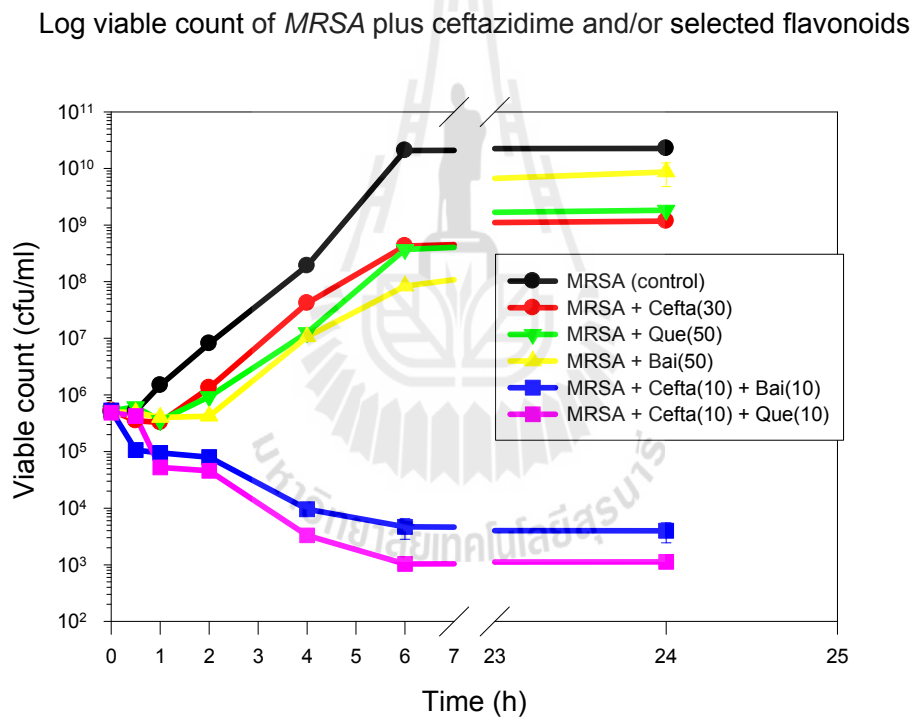
Viable count of *E. cloacae* DMST 21394 plus ceftazidime and/or selected flavonoids



รูปที่ 20 ผลการทำ viable count ของเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 ภายหลังจากทดสอบกับยา ceftazidime, luteolin, apigenin เดี่ยวๆ และเมื่อใช้ฟลาโวนอยด์ร่วมกับยา ceftazidime



รูปที่ 21 ผลการทำ viable count ของเชื้อ *MRSA* ภายหลังจากทดสอบกับยา cloxacillin, ampicillin, baicalein เดี่ยวๆ และเมื่อใช้ฟลาโวนอยด์ร่วมกับยา cloxacillin และ ampicillin



รูปที่ 22 ผลการทำ viable count ของเชื้อ *MRSA* ภายหลังจากทดสอบกับยา ceftazidime, quercetin, baicalein เดี่ยวๆ และเมื่อใช้ฟลาโวนอยด์ร่วมกับยา ceftazidime



## 5. Transmission Electronmicroscopy (TEM) method

รูปที่ 23a แสดงภาพเซลล์ของ *E. cloacae* DMST 21394 ในช่วง log phase ที่มีรูปร่างปกติ จากรูปแสดง outer membrane และ cytoplasmic membrane สามารถถูกสร้างขึ้นได้และสามารถเห็น ribosomes จำนวนมากใน cytoplasm

รูปที่ 23b แสดงภาพเซลล์ในช่วง log phase ของเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 หลังจากทดสอบด้วย ceftazidime 20 µg/ml จากภาพแสดงช่องว่างขนาดใหญ่เกิดขึ้นระหว่าง outer membrane และ cytoplasmic membrane

รูปที่ 23c แสดงผลของเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 หลังจากทดสอบด้วยสารผสมระหว่าง ceftazidime 10 µg/ml และ luteolin 10 µg/ml จากภาพ แสดงรูปร่างของเซลล์ที่ผิดปกติและผนังเซลล์ที่ถูกทำลาย ทำให้ organelles ต่างๆในเซลล์สูญหายไป และเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะผนังเซลล์ผิดปกติและเซลล์แตก

รูปที่ 23d แสดงลักษณะเซลล์ในช่วง log phase ของเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 หลังจากทดสอบด้วยสารผสมระหว่าง ceftazidime 10 µg/ml และ apigenin 10 µg/ml อย่างน้อยที่สุด 1/3 ของเซลล์เหล่านี้แสดงการแยกออกของผนังเซลล์และ plasma membrane และส่วนใหญ่ตรวจพบการผิดปกติของผนังเซลล์

รูปที่ 24a แสดงภาพเซลล์ปกติในช่วง log phase ของ *E. coli* DMST 20662 ซึ่งผนังเซลล์และ cytoplasmic membrane สามารถถูกสร้างขึ้นได้ และแสดง ribosome บริเวณใกล้ cytoplasmic membrane จำนวนมากกว่าตรงกลางเซลล์

รูปที่ 24b แสดงภาพเซลล์ในช่วง log phase ของ *E. coli* DMST 20662 หลังทดสอบด้วย amoxicillin 10 µg/ml พบว่าบางเซลล์มีช่องว่างขนาดใหญ่เกิดขึ้นระหว่าง cytoplasmic membrane และ outer membrane และพบว่า 1/3 ของเซลล์ มีจำนวน ribosome ภายใน cytoplasm น้อยมาก

รูปที่ 24c แสดงภาพเซลล์ในช่วง log phase ของ *E. coli* DMST 20662 หลังทดสอบด้วย agenin 20 µg/ml จากภาพ แสดงลักษณะเซลล์ขนาดใหญ่และยาวเมื่อเทียบกับกลุ่ม control และน้อยกว่า 50% ของ *E. coli* DMST 20662 พบว่าเซลล์เกิดรูซึ่งให้ผลคล้ายกับกลุ่มที่ถูกทดสอบด้วย amoxicillin มากไปกว่านั้นพบว่ามีการแยกกันเป็นส่วนๆของ outer membrane ออกจาก cytoplasmic membrane แต่เซลล์ไม่ได้มีการแตกออก

รูปที่ 24d แสดงผลของการทดสอบด้วยสารผสมระหว่าง amoxicillin 10 µg/ml และ apigenin 20 µg/ml ในเชื้อ *E. coli* DMST 20662 เซลล์ส่วนใหญ่แสดงการถูกทำลาย

รูปที่ 25a-c แสดงภาพเชื้อ *E. coli* DMST 20662 ภายหลังจากทดสอบด้วย amoxicillin และ ฟลาโวนอยด์เดี่ยวๆ พบว่า ผนังเซลล์และ cytoplasmic membrane ถูกสร้างขึ้นเป็นปกติ และปริมาณ ribosome มีปริมาณมากอยู่ใน cytoplasm เทียบกับกลุ่ม control

รูปที่ 25d แสดงภาพเชื้อ *E. coli* DMST 20662 เมื่อถูกทดสอบด้วยสารผสมระหว่าง amoxicillin 8 µg/ml และ kaempferol 30 µg/ml พบว่าเกิดช่องว่างขึ้นระหว่าง outer membrane และ cytoplasmic membrane อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของผนังเซลล์และ cytoplasmic membrane ถูกทำลายและมีการสูญเสียบางองค์ประกอบภายในเซลล์

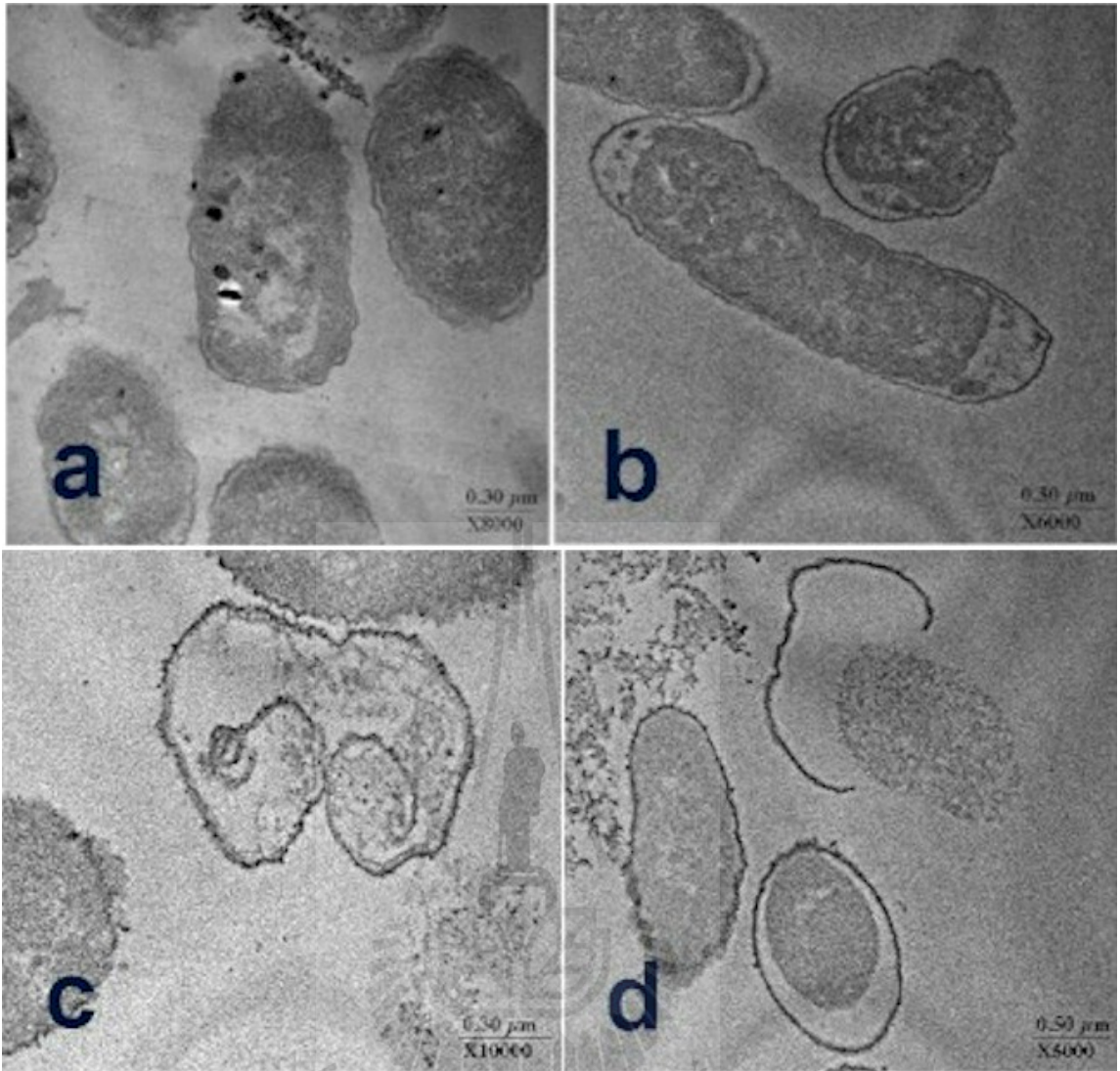
รูปที่ 26a-b แสดงภาพเซลล์ปกติในช่วง log phase ของเชื้อ MRSA ผนังเซลล์และ cytoplasmic membrane สามารถถูกสร้างขึ้นได้ และพบ ribosome จำนวนมากใน cytoplasm แต่ภายหลังจากที่ทดสอบด้วย cloxacillin 20  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าเซลล์บางเซลล์มีขนาดใหญ่กว่ากลุ่ม control

รูปที่ 26c แสดงภาพเซลล์ MRSA ที่ถูกทดสอบด้วย ampicillin 20  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าบางเซลล์เกิดช่องว่างขนาดใหญ่ระหว่าง cytoplasmic membrane และผนังเซลล์

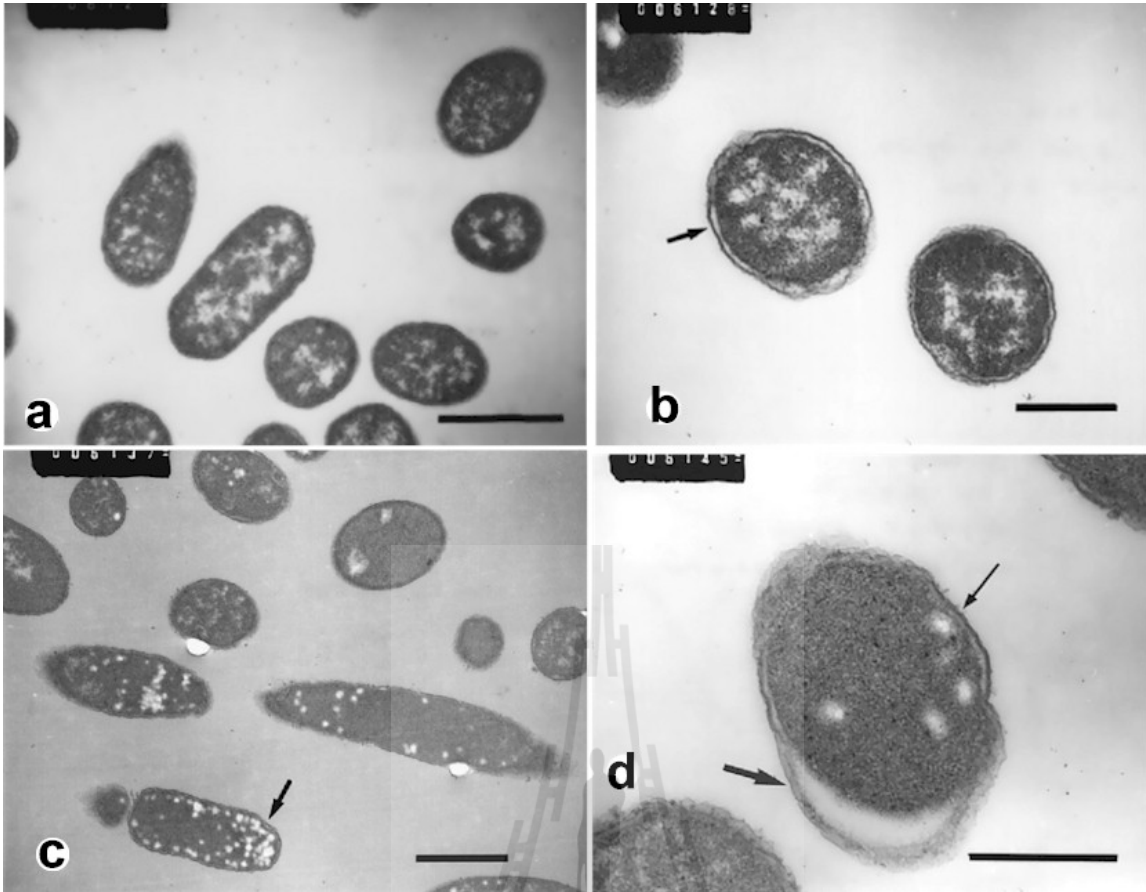
รูปที่ 26d, 26e, 26f, 26g เมื่อใช้สารผสมระหว่าง baicalein 10  $\mu\text{g/ml}$  กับ ampicillin หรือ cloxacillin ที่ 10  $\mu\text{g/ml}$  ทดสอบกับเชื้อ MRSA พบว่าจำนวน ribosome ใน cytoplasm มีปริมาณลดลง และเซลล์ส่วนใหญ่มีการสูญเสียองค์ประกอบภายใน cytoplasm เช่น ribosomes และ chromosomes ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลักษณะโครงสร้างของเซลล์ถูกทำลายไปเช่น ผนังเซลล์และรูปร่างของเซลล์ และบางเซลล์มีการแตกออก ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อใช้สารผสมระหว่าง ceftazidime 10  $\mu\text{g/ml}$  และ baicalein หรือ quercetin 10  $\mu\text{g/ml}$  สามารถทำให้โครงสร้างภายในเซลล์ MRSA ถูกทำลายเช่น ผนังเซลล์ และ ribosome และการสูญเสียองค์ประกอบภายใน cytoplasm ด้วย

รูปที่ 27a-b แสดงภาพเซลล์ปกติในช่วง log phase ของเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 (CREnC) พบว่า outer membrane และ cytoplasmic membrane สามารถถูกสร้างขึ้นได้ และพบ ribosome จำนวนมากใน cytoplasm ภายหลังจากถูกทดสอบด้วย ceftazidime 20  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าเซลล์มีการเกิดช่องว่างระหว่าง outer membrane และ cytoplasmic membrane

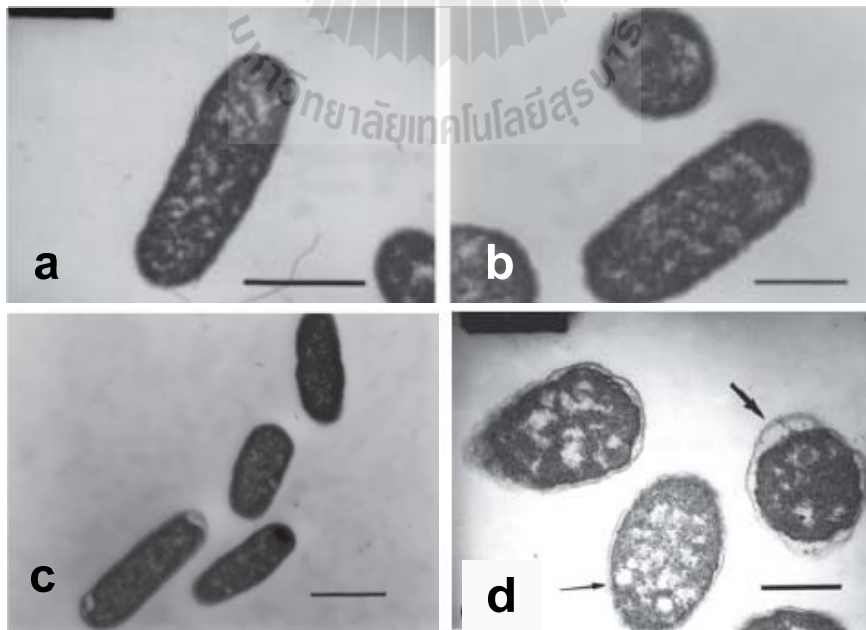
รูปที่ 27c-d แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้สารผสมระหว่าง ceftazidime 10  $\mu\text{g/ml}$  และ luteolin หรือ apigenin 10  $\mu\text{g/ml}$  สามารถทำลายเชื้อ CREnC ได้ ซึ่งเซลล์จำนวนมากแสดงให้เห็นถึงโครงสร้างที่ถูกทำลาย เช่น ผนังเซลล์และรูปร่างของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีการสูญเสียองค์ประกอบภายในเซลล์จำนวนมาก และพบเซลล์จำนวนมากที่มีการแตกออกและผนังเซลล์ผิดรูปร่างไป เชื้อ CREnC ภายหลังจากถูกทดสอบด้วยสารผสมระหว่าง ceftazidime 10  $\mu\text{g/ml}$  และ apigenin 10  $\mu\text{g/ml}$  พบว่า ผนังเซลล์เกิดการแยกออกจาก plasma membrane นอกจากนี้ยังพบผนังเซลล์ผิดรูปร่างด้วย



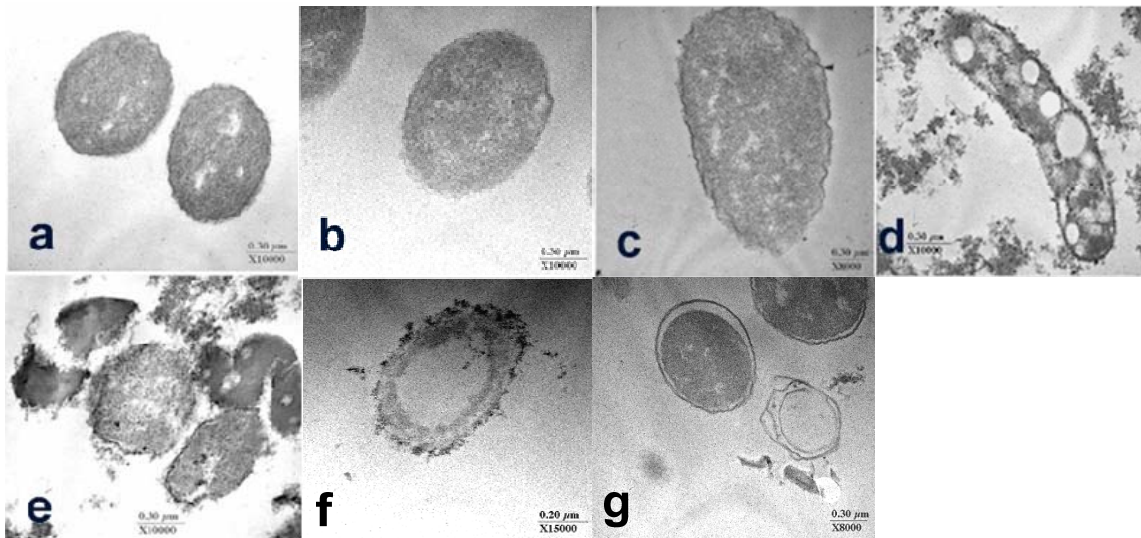
รูปที่ 23 Ultrathin sections ในช่วง log phase ของเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 จากรูปประกอบด้วย: a, control; b, 20 µg/ml ceftazidime; c, 10 µg/ml ceftazidime + 10 µg/ml luteolin; d, 10 µg/ml ceftazidime + 10 µg/ml apigenin



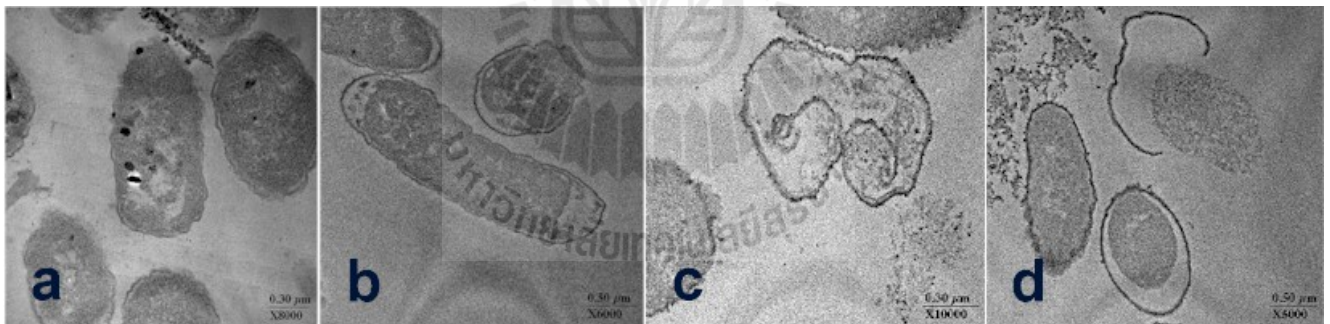
รูปที่ 24 Ultrathin sections ในช่วง log phase ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 จากรูปประกอบด้วย: a, control; b, 10 µg/ml amoxicillin; c, 20 µg/ml apigenin; d, 10 µg/ml amoxicillin + 20 µg/ml apigenin



รูปที่ 25 Ultrathin sections ในช่วง log phase ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 จากรูปประกอบด้วย: a, control; b, 200 µg/ml amoxicillin; c, 100 µg/ml kaempferol; d, 8 µg/ml amoxicillin + 30 µg/ml kaempferol



รูปที่ 26 Ultrathin sections ในช่วง log phase ของเชื้อ *S. aureus* DMST 20651 (MRSA) จากรูปประกอบด้วย: a, drug-free (control); b, 20 µg/ml cloxacillin; c, 20 µg/ml ampicillin; d, 10 µg/ml cloxacillin + 10 µg/ml baicalein; e, 10 µg/ml ampicillin + 10 µg/ml baicalein; f, 10 µg/ml ceftazidime plus 10 µg/ml baicalein; g, 10 µg/ml ceftazidime + 10 µg/ml quercetin



รูปที่ 27 Ultrathin sections ในช่วง log phase ของเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 (CREnC) จากรูปประกอบด้วย: a, drug-free (control); b, 20 µg/ml ceftazidime; c, 10 µg/ml ceftazidime plus 10 µg/ml luteolin; d, 10 µg/ml ceftazidime plus 10 µg/ml apigenin.

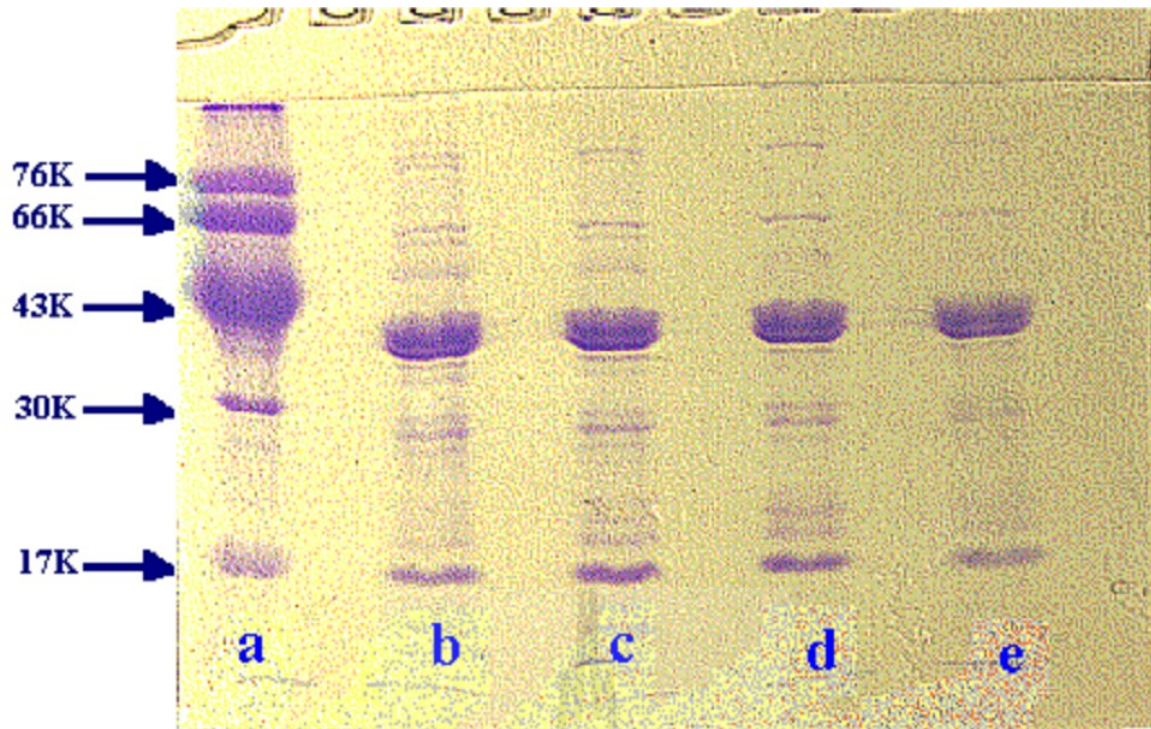
## 6. Gel Electrophoresis

รูปที่ 28 แถว 'a' แสดงแถบของโปรตีน marker จากภาพแสดงให้เห็น MW ของโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับตัวมาตรฐาน (Guttman, 1994; Tropp, 1997; Voet, 1995) ผลจากการทำ SDS-PAGE ของ OM-PG associated proteins ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 ที่ถูกทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะหรือ ฟลาโวนอยด์ แสดงดังรูปที่ 28 แถว 'b' OM-PG associated protein ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 ในกลุ่ม control แสดงแถบของโปรตีนจาก น้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ ที่ตำแหน่ง MW 14.9 kDa ถึง น้ำหนักโมเลกุลสูงๆ ที่ตำแหน่ง MW 95.8 kDa แถบของโปรตีนหลักๆ ถูกพบในตำแหน่ง MW 37.6 kDa

แถบของ OM-PG associated protein ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 หลังจากถูกทดสอบด้วย amoxicillin 10  $\mu\text{g/ml}$  แสดงดังรูปที่ 28 แถว 'c' แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปรากฏของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ ที่ตำแหน่ง MW 95.8 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่ามีการแสดงแถบของโปรตีนชัดเจนที่ตำแหน่ง MW 14.9, 17.5, 19.2 และ 20.9 kDa แสดงให้เห็นว่า amoxicillin สามารถไปรบกวนการสร้างโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ และคล้ายกับว่ามีการรวบรวมโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการปรากฏแถบสีจางๆ ในตำแหน่ง MW 32.2, 47.6 และ 88.3 kDa และแถบที่บางๆ ในตำแหน่ง MW 37.6 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนกับกลุ่ม control

เมื่อทำการสกัด OM-PG associated protein ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 หลังถูกทดสอบด้วย apigenin 20  $\mu\text{g/ml}$  แสดงดังรูปที่ 28 แถว 'd' พบว่า ไม่มีการปรากฏของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ ที่ตำแหน่ง MW 47.6 และ 95.8 kDa แถบสีจางๆ ของโปรตีนปรากฏที่ตำแหน่ง MW 32.2 kDa, 55.3, 77.1 และ 88.3 kDa แต่ในทางตรงกันข้าม แถบสีเข้มของโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำถูกพบที่ตำแหน่ง MW 14.9, 17.5, 19.2 และ 20.9 kDa ซึ่งให้ผลที่คล้ายกับผลของเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วย amoxicillin ซึ่งให้แถบสีเข้มในตำแหน่งโปรตีนที่แสดงน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ และคล้ายกับว่าโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีการรวมกัน และไม่พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ

แถบ OM-PG associated protein ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 หลังถูกทดสอบด้วยสารผสมระหว่าง amoxicillin 10  $\mu\text{g/ml}$  และ apigenin 20  $\mu\text{g/ml}$  แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control แถบของโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ ส่วนมากไม่ถูกพบที่ตำแหน่ง MW 47.6, 77.1 และ 95.8 kDa มากไปกว่านั้น แถบสีจางๆ ของทั้งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลปานกลาง และโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลสูง ถูกพบที่ตำแหน่ง MW 32.2, 34.1, 36.1, 55.3, 82.3 และ 88.3 kDa และแถบสีเข้มที่แสดงตำแหน่งโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ ถูกพบที่ตำแหน่ง MW 14.9, 17.5, 19.2 และ 20.9 kDa ซึ่งให้ผลที่คล้ายกับเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วย amoxicillin เดี่ยวๆ หรือ apigenin เดี่ยวๆ การเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารผสมของ amoxicillin และ apigenin สามารถไปลดจำนวนเซลล์ทั้งหมด แสดงดังรูปที่ 25 และลดจำนวน OM-PG associated proteins แต่อย่างไรก็ตาม มีการเสริมฤทธิ์กันระหว่าง amoxicillin และ apigenin ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงจำนวนของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆกัน ซึ่งผลครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปรากฏของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลปานกลางและน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีการรวมกันของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ

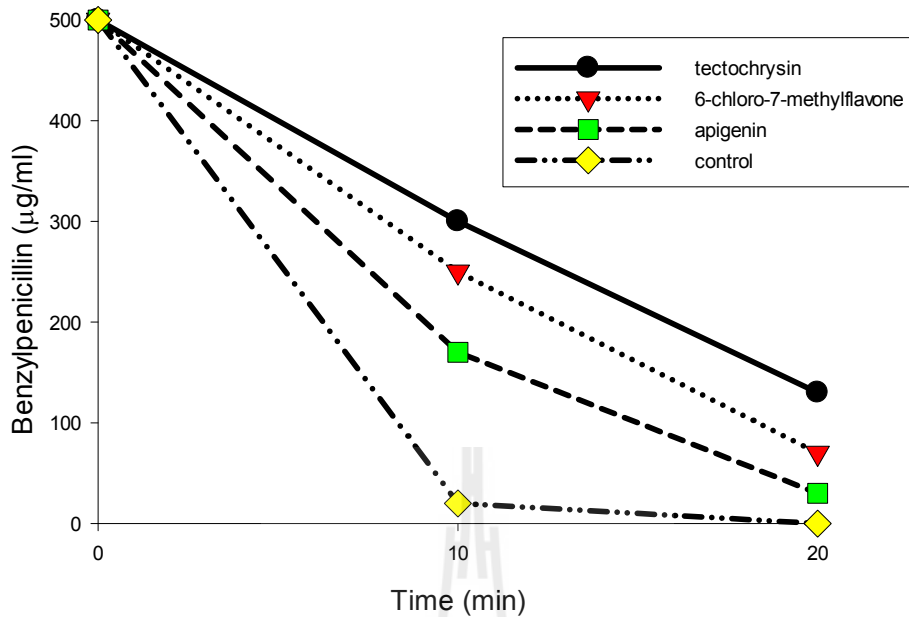


รูปที่ 28 SDS-PAGE แสดง outer membrane และ peptidoglycan associated protein ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 กลุ่ม control (lane b); 10  $\mu\text{g/ml}$  amoxicillin (lane c); 20  $\mu\text{g/ml}$  apigenin (lane d); 10  $\mu\text{g/ml}$  amoxicillin + 20  $\mu\text{g/ml}$  apigenin (lane e); marker proteins (kDa) (lane a)



## 7. Enzyme assay

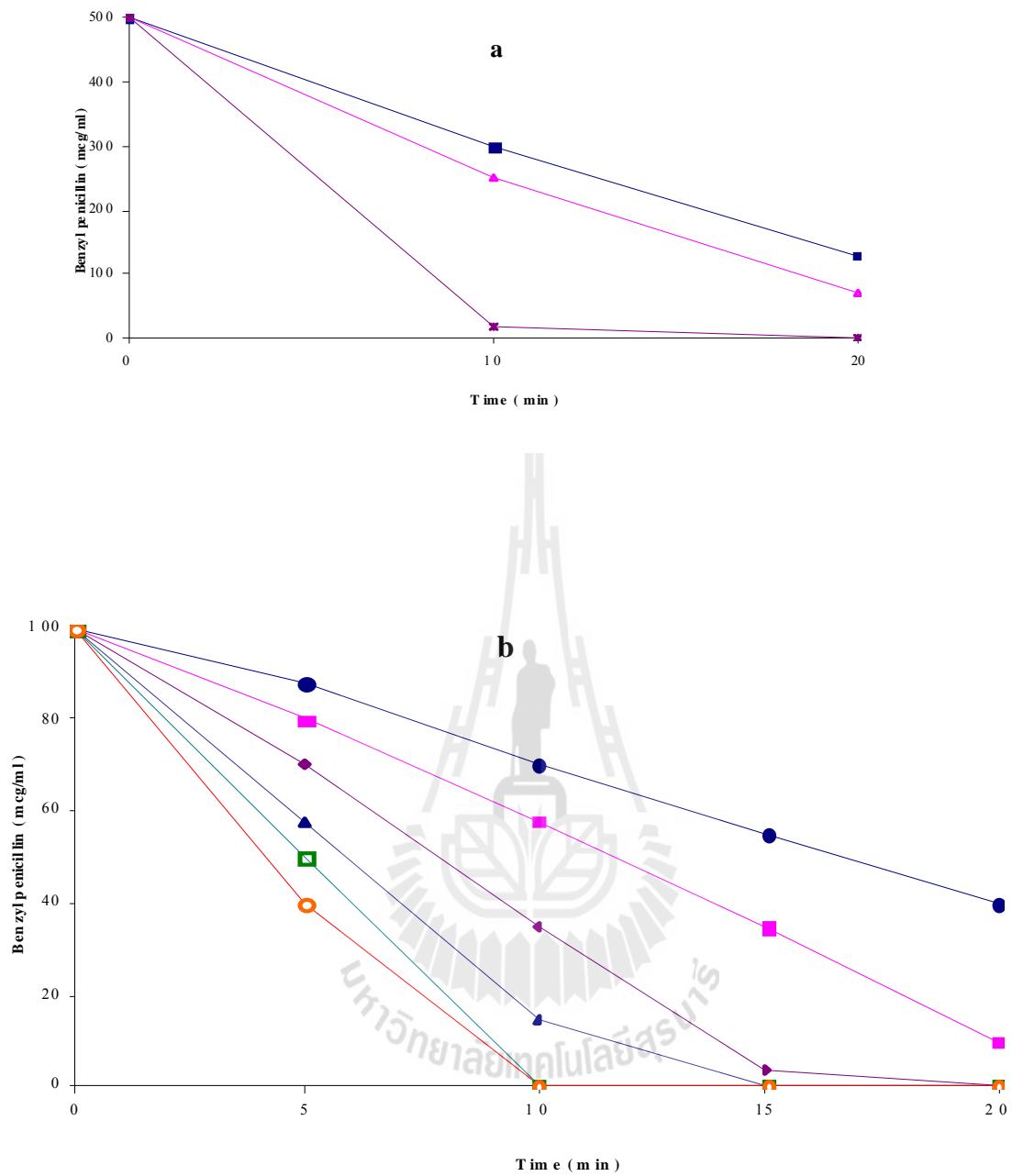
a



รูปที่ 29 ความสามารถของฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ที่ได้จาก *B. cereus* โดยการไป hydrolyze bezympenicillin

ความสามารถของฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์  $\beta$ -lactamases มีความแตกต่างกันอย่างมาก รูปที่ 29 แสดงภาพ 6-chloro-7-methylflavone ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ penicillinase type IV จากเชื้อ *E. cloacae* แต่ฟลาโวนอยด์ตัวอื่นไม่พบความสามารถในการยับยั้งที่สามารถประเมินค่าได้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่านอกจากฟลาโวนอยด์จะไปมีผลต่อโครงสร้างเซลล์และมีผลต่อการแบ่งเซลล์แล้ว การทำให้เชื้อเกิดการคือยาแบบผันกลับของฟลาโวนอยด์อาจมาจากการไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์  $\beta$ -lactamase





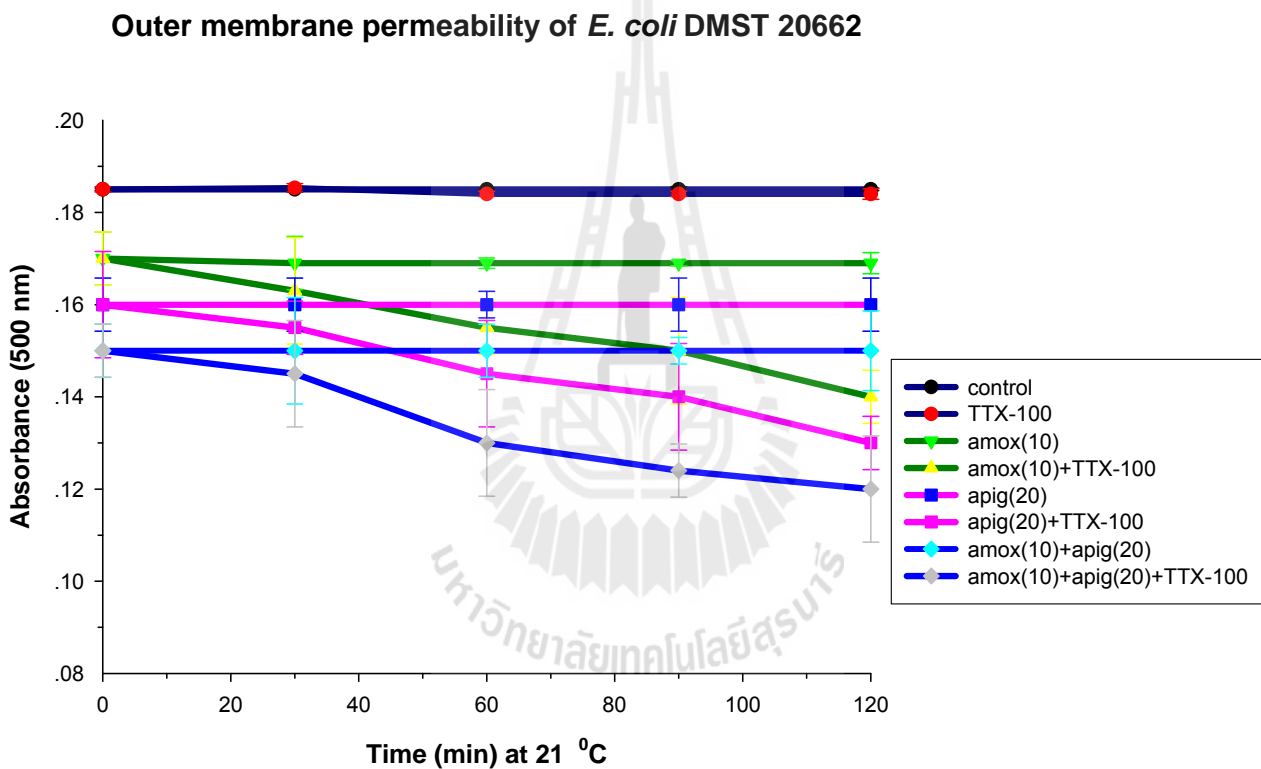
รูปที่ 30 ความสามารถของฟลาโวนอยด์ในการยับยั้ง  $\beta$ -lactamase โดยการไป hydrolyze bezympenicillin. a.  $\beta$ -lactamase ที่ได้จาก *B. cereus*. สัญลักษณ์แสดงฟลาโวนอยด์ที่ 200  $\mu\text{g/ml}$ ; \*, control (without flavonoids);  $\Delta$ , 6-chloro-7- methylflavone;  $\blacksquare$ , tectochrysin. b.  $\beta$ -lactamase ที่ได้จาก *E. cloacae* สัญลักษณ์แสดงความเข้มข้นของ apigenin ( $\mu\text{g/ml}$ ); O, control (without apigenin);  $\square$ , 20;  $\blacktriangle$ , 40;  $\blacklozenge$ , 60;  $\blacksquare$ , 80;  $\bullet$ , 100.

ความสามารถของฟลาโวนอยด์ในการยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์  $\beta$ -lactamases แสดงดังรูปที่ 30 พบว่า apigenin สามารถยับยั้งการทำงานของ penicillinase type IV ได้ แสดงให้เห็นว่านอกจากฟลาโวนอยด์จะมีผลโดยตรงต่อโครงสร้างของเซลล์และการแบ่งเซลล์แล้ว อาจช่วยยับยั้งการคือยาแบบผันกลับของเชื้อด้วย โดยสามารถไปออกฤทธิ์ต่อการทำงานของ  $\beta$ -lactamases

## 8. Outer Membrane (OM) permeability

### ผลการทดสอบด้วย Triton X-100 ในเชื้อ *E. coli*

ผลของ amoxicillin และ apigenin ต่อ outer membrane ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 เมื่อใช้ Triton X-100 (TTX-100) เป็น permeabilizing probe แสดงดังรูปที่ 31



รูปที่ 31 Permeabilization ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 เมื่อถูกทดสอบด้วย 10  $\mu$ g/ml amoxicillin, 20  $\mu$ g/ml apigenin เดี่ยวๆ และเมื่อถูกใช้ร่วมกัน

### 9. Cytoplasmic Membrane (OM) permeability

ตารางที่ 8 แสดงผลของ  $\beta$ -galactosidase activity ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 ภายหลังจากทดสอบด้วย amoxicillin, apigenin และ amoxicillin + apigenin

| Time | Control | amox | Apig | Amox<br>+apig | Positive control<br>Toluene 50 $\mu$ l/ml<br>$A_{420}$ | $A_{420}$ | $A_{550}$ |
|------|---------|------|------|---------------|--|-----------|-----------|
| 0h   | Neg     | Neg  | Neg  | Neg           | +  | -         | -         |
| 1h   | Neg     | Neg  | Neg  | Neg           | +  | -         | -         |
| 2h   | Neg     | Neg  | Neg  | Neg           | +  | -         | -         |
| 3h   | Neg     | Neg  | Neg  | Neg           | +  | -         | -         |
| 4h   | Neg     | Neg  | Neg  | Neg           | +  | -         | -         |
| 5h   | Neg     | Neg  | Neg  | Neg           | +  | -         | -         |

Neg = No evidence of activity.  $A_{420}$  = absorption at 420 nm.

ตารางที่ 9  $\beta$ -galactosidase activity ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 ภายหลังจากทดสอบด้วย amoxicillin, kaempferol และ amoxicillin + kaempferol

| Time | Control | amox | kaemp | Amox<br>+kaemp | Positive control<br>Toluene 50 $\mu$ l/ml<br>$A_{420}$ | $A_{420}$ | $A_{550}$ |
|------|---------|------|-------|----------------|--|-----------|-----------|
| 0h   | Neg     | Neg  | Neg   | Neg            | +  | -         | -         |
| 1h   | Neg     | Neg  | Neg   | Neg            | +  | -         | -         |
| 2h   | Neg     | Neg  | Neg   | Neg            | +  | -         | -         |
| 3h   | Neg     | Neg  | Neg   | Neg            | +  | -         | -         |
| 4h   | Neg     | Neg  | Neg   | Neg            | +  | -         | -         |
| 5h   | Neg     | Neg  | Neg   | Neg            | +  | -         | -         |

Neg = No evidence of activity.  $A_{420}$  = absorption at 420 nm.

## บทที่ 4

### วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

เชื้อ *E. coli* DMST 20662 และ *E. cloacae* DMST 21394 ซึ่งต่อต้าน ampicillin ( $MIC > 1000 \text{ ug/ml}$ ) และ ceftazidime ( $MIC > 1000 \text{ ug/ml}$ ) ตามลำดับ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่ใช้ทดสอบไม่แสดงผลต้านเชื้อทั้ง 2 ชนิด เมื่อถูกใช้เดี่ยวๆ อย่างไรก็ตามการทดสอบพบว่าการเสริมฤทธิ์ของสารผสมระหว่างยาปฏิชีวนะในกลุ่ม  $\beta$ -lactam กับสารฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* DMST 20662 และ *E. cloacae* DMST 21394 ในการทำ checkerboard ให้ผลค่า FIC indexes เท่ากับ  $< 0.47$ ,  $< 0.62$  เมื่อใช้สารผสมระหว่าง amoxicillin 30  $\text{ug/ml}$  และ luteolin 90  $\text{ug/ml}$ , amoxicillin 20  $\text{ug/ml}$  และ apigenin 90  $\text{ug/ml}$  ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* DMST 20662 ยิ่งไปกว่านั้น เชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 ซึ่งให้ค่า MIC ของยา ceftazidime เท่ากับ 100  $\text{ug/ml}$  ซึ่งแสดงว่าเชื้อมีการดื้อยา แต่เมื่อใช้ร่วมกับ apigenin 20  $\text{ug/ml}$  หรือ luteolin 60  $\text{ug/ml}$  ทำให้เชื้อมีการดื้อยาแบบผันกลับและให้ค่า MICs ของยา ceftazidime ลดลงเป็น 20 และ 30  $\text{ug/ml}$  ตามลำดับ

จากผลการทำ checkerboard และ viable count ของเชื้อ MRSA ให้ผลที่สอดคล้องกับ lain (2000) ซึ่งให้ผลว่า baicalin สามารถที่จะทำให้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม  $\beta$ -lactam มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ MRSA ได้อีก นอกจากนี้ยังให้ผลที่สอดคล้องกับ Sato (2004) โดยพบว่า 6,7 dihydroxyflavone เสริมฤทธิ์กับ ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม  $\beta$ -lactam ในการยับยั้ง MRSA จาก 8 เท่า ถึง 32,000 เท่า ยิ่งไปกว่านั้น ฟลาโวนยังสามารถเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะในกลุ่ม  $\beta$ -lactam ได้อีกหลากหลายในการยับยั้ง MRSA (Sato, 2004)

การทำ Viable count แสดงให้เห็นว่า killing curve ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 เมื่อทดสอบกับ amoxicillin 30  $\text{ug/ml}$  ถูกทำให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดย luteolin 90  $\text{ug/ml}$  และ amoxicillin 20  $\text{ug/ml}$  ก็ให้ผลเสริมฤทธิ์กับ apigenin 90  $\text{ug/ml}$  ในช่วง 2 ชั่วโมงแรก และตลอดจนถึง 24 ชั่วโมง เมื่อใช้สารผสมระหว่าง ceftazidime 20  $\text{ug/ml}$  และ luteolin หรือ apigenin 10  $\text{ug/ml}$  ก็ให้ผลในการลดจำนวนเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 จนถึงระดับต่ำสุดที่  $1 \times 10^3 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลามากกว่า 6 ชั่วโมง และจากการทดลองให้ผลที่สอดคล้องกับ ซึ่ง 6,7 dihydroxyflavone ให้ผลเสริมฤทธิ์กับยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam ในการยับยั้งเชื้อ MRSA จาก 8 เท่า เป็น 32,000 เท่า นอกจากนี้สารในกลุ่ม flavone ยังสามารถเสริมฤทธิ์กับยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ (Sato, 2004)

ผลจากการทำ TEM พบว่า เมื่อใช้สารผสมระหว่าง ceftazidime 10  $\text{ug/ml}$  และ luteolin หรือ apigenin 10  $\text{ug/ml}$  ทำให้โครงสร้างของเซลล์ *E. cloacae* DMST 21394 ถูกทำลาย โดยเซลล์จำนวนมากแสดงให้เห็นถึงผนังเซลล์และรูปร่างของเซลล์ถูกทำลายและสามารถมองผ่าน cytoplasm ได้เนื่องจากมีการสูญเสียองค์ประกอบภายใน และนอกจากนี้พบว่ามีการแตกออกของเซลล์และผนังเซลล์ผิดรูปร่างไป รูปร่างของ *E. cloacae* DMST 21394 ในช่วง log phase ภายหลังจากทดสอบด้วยสารผสมระหว่าง ceftazidime 10  $\text{ug/ml}$  และ apigenin 10  $\text{ug/ml}$  แสดงให้เห็นถึงการแยกออกของผนังเซลล์และ plasma membrane และการผิดรูปร่างของผนังเซลล์ก็ถูกพบทั่วไปด้วย ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทำการตัดชิ้นส่วนบางๆของเซลล์ *E. coli* DMST

ผลจากการทำ TEM ของเชื้อ MRSA พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับ Eumkeb and Richards (2005) (G. Eumkeb, Richards, R.M.E., 2005) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฟลาโวนอยด์ไม่เพียงแต่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่คือต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม  $\beta$ -lactam-resistant staphylococci แต่ยังสามารถทำให้ยาปฏิชีวนะในชั้นแรกๆถูกนำกลับมาใช้ในการยับยั้งเชื้อได้อีก ซึ่งฟลาโวนอยด์อาจจะมีกลไกในการออกฤทธิ์ดังนี้ โดยข้อแรกไปมีผลต่อผนังเซลล์และการสร้าง septum ในช่วงของการแบ่งเซลล์ ซึ่งคล้ายกับว่าจะไปมีผลต่อการสร้างโปรตีนซึ่งประกอบด้วย penicillin-binding proteins ด้วย ข้อสองกลไกการทำงานของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม  $\beta$ -lactam จะต้องผ่านการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์  $\beta$ -lactamase ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ดังนั้นฟลาโวนอยด์จึงไปยับยั้งการผลิตและการหลั่ง  $\beta$ -lactamase (Yam, 1998). สารที่ไปยับยั้ง  $\beta$ -lactamase จะออกฤทธิ์คล้าย clavulanic acid ที่มีความสำคัญต่อการทำลายเชื้อที่คือต่อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam ซึ่งสารเหล่านี้จะทำงานคล้ายกับยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam โดยมีการแชร์โครงสร้างหลักๆเพื่อจับกับ  $\beta$ -lactamase (Coulton, 1994). การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า clavulanate สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ  $\beta$ -lactamase และได้ทำการเพิ่มความเข้มข้นของ clavulanate เพื่อติดตามผลการสร้าง  $\beta$ -lactamase (Stapleton, 1995; Tzouveleakis, 1997). ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารที่สามารถไปยับยั้งการทำงานของ  $\beta$ -lactamase ได้ก็น่าจะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่เหมือนกับยาปฏิชีวนะในกลุ่ม  $\beta$ -lactam ด้วย และการทดลองก่อนหน้านี้นี้พบว่าเมื่อใช้ฟลาโวนอยด์โดยปราศจากยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam สามารถทำให้แบคทีเรียเกิดการคือยาแบบถอยกลับทำให้เชื้อคือยาได้ลดลง โดยผ่านกลไกหลายกลไกเนื่องจากโครงสร้างฟลาโวนอยด์ไม่เหมือนกับสารที่มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้าง  $\beta$ -lactamase ซึ่งยาปฏิชีวนะในกลุ่ม  $\beta$ -lactam แบบดั้งเดิมไม่เหมือนฟลาโวนอยด์ โดยไม่สามารถทำให้เชื้อ MRSA มีการคือยาแบบถอยกลับได้

ผลจากการทำ enzyme assay แสดงให้เห็นว่า ไม่เพียงแต่จะไปมีผลโดยตรงต่อโครงสร้างเซลล์และการแบ่งเซลล์แล้ว ฟลาโวนอยด์อาจไปมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของ  $\beta$ -lactamase ทำให้เชื้อมีการคือยาลดลง

แถบที่แสดง OM-PG associated protein ของ เชื้อ *E. coli* DMST 20662 ที่ทดสอบด้วยสารผสมระหว่าง amoxicillin 10 ug/ml และ apigenin 20 ug/ml ให้ผลที่แตกต่างจากกลุ่ม control โดยโปรตีนส่วนใหญ่ที่เป็นโปรตีนโมเลกุลสูงๆ ไม่ถูกพบ การเสริมฤทธิ์กันของสารผสมระหว่าง amoxicillin และ apigenin ไปลดจำนวนเซลล์ทั้งหมด และลดจำนวน OM-PG associated protein แต่อย่างไรก็ตาม การเสริมฤทธิ์ระหว่าง amoxicillin และ apigenin สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำหนักรวมของโปรตีน ซึ่งผลจากการไม่ปรากฏโปรตีนน้ำหนักรวมสูงและน้ำหนักรวมปานกลาง และการรวมกันของโปรตีนน้ำหนักรวมต่ำ ให้ผลที่สอดคล้องกับ Eumkeb (1999) (G. Eumkeb, 1999) โดยเมื่อสกัด OM-PG associated protein พบว่าแถบของ OM-PG associated protein ภายหลังทดสอบด้วย  $\frac{1}{2}$  MIC ของ  $\rho$ ABA พบว่าไม่มีการปรากฏของโปรตีนน้ำหนักรวมต่ำๆ และเห็นแถบสีจางๆและบางของโปรตีนที่มีน้ำหนักรวมต่ำๆถึงน้ำหนักรวมปานกลาง PABA ซึ่งเป็นกรดอ่อนๆ เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูงๆ อาจไปมีผลโดยตรงต่อ peptidoglycan ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักรวมต่ำๆ ซึ่งเป็นผลโดยตรงจากการทำงานของ antifolate ใน  $\rho$ ABA

รูปที่ 31 แสดงผลของ amoxicillin 10 ug/ml และ apigenin 20 ug/ml ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* DMST 20662 โดยไปเปลี่ยนความสามารถในการเลือกผ่านของ OM เมื่อถูกทดสอบด้วยสารเดี่ยวๆหรือใช้ร่วมกัน แต่ผลจากการใช้เดี่ยวๆให้ผลน้อยกว่าการใช้สารผสม การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ctxA ไปเปลี่ยน outer และ inner membrane ของเชื้อ *E. coli* K-12 (Marri, 1996) เมื่อใช้ Triton X-100 เป็น permeabilizing probe

ผลจากการใช้สารผสมระหว่าง amoxicillin 10 ug/ml และ apigenin 20 ug/ml ต่อ cytoplasmic membrane โดยตรวจวัดจากเอ็นไซม์  $\beta$ -galactosidase ซึ่งผลแสดงดังตารางที่ 4 แสดงการเพิ่มขึ้นของ  $\beta$ -galactosidase เมื่อเวลาในการทดสอบด้วย amoxicillin, apigenin และสารผสมระหว่าง amoxicillin และ apigenin เพิ่มขึ้น ซึ่งผลนั้นก็อาจสรุปได้ว่า amoxicillin, apigenin และสารผสมระหว่าง amoxicillin และ apigenin ไปเปลี่ยนแปลงการเลือกผ่านของ cytoplasmic membrane ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 ซึ่งผลนี้สามารถอธิบายได้ว่า cytoplasmic membrane มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่านที่มีความจำเพาะสูง และเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของการ metabolite สารภายในเซลล์และการจับของเสียของเซลล์ โครงสร้างทั่วไปของ membrane เป็น phospholipid bilayer โปรตีนหลายๆที่อยู่ในเยื่อหุ้มมีความเป็น hydrophobic สูงเนื่องจากภายนอกเป็นตำแหน่งของโปรตีนเชื่อมกับสาย fatty acid ซึ่งมีความเป็น non-polar สูง (Brock, 1994; Tropp, 1997) การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าโปรตีนของเชื้อ *E. coli* ที่ถูกละลายด้วย Sarkosyl ถูกจำแนก ระหว่างทดสอบด้วย sarkosyl พบ  $Mg^{2+}$  เป็นบางส่วนซึ่งเป็นการป้องกัน cytoplasmic membrane จากการไม่ละลายใน sarkosyl (Filip, 1973) outer membrane เป็นตำแหน่งที่มีโปรตีนพื้นฐานอยู่จำนวนมากและถูกจำแนกโดยใช้โปรตีนโครงสร้างหลักๆที่มีน้ำหนักรวมประมาณ 44 kDa (Schnaitmann, 1971)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฟลาโวนอยด์ไม่เพียงแต่มีผลในการยับยั้ง *E. coli* DMST 20662 แต่ยังสามารทำให้เชื้อมีการคืบขยายแบบผันกลับได้เมื่อถูกใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ซึ่งกลไกของฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งเชื้อประกอบด้วย 2 กลไก กลไกแรกไปมีผลต่อความสมบูรณ์ของผนังเซลล์และการสร้าง septum ระหว่างการแบ่งเซลล์ ซึ่งประกอบด้วยไปมีผลต่อการสร้างโปรตีนและมีผลต่อ penicillin-

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า luteolin และ apigenin มีความสามารถในการทำให้แบคทีเรียดื้อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam มีการดื้อยาแบบผันกลับในเชื้อ *E. coli* DMST 20662 และ luteolin และ apigenin มีการเสริมฤทธิ์กับยา ceftazidime ในการยับยั้งเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 นอกจากนี้ baicalein และ quercetin มีความสามารถในการทำให้เชื้อ MRSA มีการดื้อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam ลดลง ซึ่งฟลาโวนอยด์เหล่านี้เป็นทางเลือกในการพัฒนายาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น มิเช่นนั้นจะไม่สามารถรักษาเชื้อดื้อยาที่ทำให้เกิดโรคในปัจจุบัน

## บรรณานุกรม

- Brock, T. D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (1994). Cell Biology. In T. D. Brock (Ed.), *Biology of Microorganism. 7th ed.* (pp. 51-66). New Jersey: Prentice-Hall International Inc.,
- Coulton, S., François, I., Ellis, G.P., Luscombe, D.K. (1994). 6 [beta]-Lactamases: Targets for Drug Design. In G. P. Ellis, Luscombe, D.K. (Ed.), *Progress in Medicinal Chemistry* (Vol. Volume 31, pp. 297-349). London: Elsevier.
- Eumkeb, G. (1999). *Investigation of the effect of antifolates on Escherichia coli 1810.*, The Robert Gordon University, Aberdeen.
- Eumkeb, G., Richards, R.M.E., (2005). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. *WOCMAP III*, pp. 171-178.
- Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J.L. and Earhart, C.F. (1973). Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium lauryl sarcosinate. *Journal of bacteriology*, 115, 717-722.
- Gersten, D. M. (1996). *Gel Electrophoresis: Proteins, essential techniques*. UK: John Wiley & Sons.
- Guttman, A. a. N., J. . (1994). Comparison of the separation of proteins by Sodium Docecyl Sufate-Gel Electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 221, 285-289.
- Jackson, R. W., & Demoss, J.A. (1965). Effects of toluene on *Escherichia coli*. . *Journal of bacteriology*, 90, 1420-1425.
- Liu, I. X., Durham, D. G., & Richards, R. M. E. (2000). Baicalin synergy with  $\beta$ -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other  $\beta$ -lactam-resistant strains of *S. aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(3), 361-366.
- Lorian, V. (1999). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. (4 ed.). New York: Williams&Wilkins.
- Markwell, M. A., Hass. S.M., Bieber, L.L. and Tolbert, N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 87, 206-210.
- Marri, L., Dallai, R. and Marchini, D. (1996). The Novel Antibacterial Peptide Ceratotoxin A Alters Permeability of the Inner and Outer Membrane of *Escherichia coli* K-12. *Current microbiology*, 33, 40-43.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Reading, C., & Farmer, T., . (1983). *Antibiotics: Assessment of Antimicrobial Activity and Resistance*. London.: Academic Press.



- Richards, R. M., & Xing, D. K. (1993). In vitro evaluation of the antimicrobial activities of selected lozenges. *J Pharm Sci*, 82(12), 1218-1220.
- Richards, R. M., Xing, J. Z., Gregory, D. W., & Marshall, D. (1995). Mechanism of sulphadiazine enhancement of trimethoprim activity against sulphadiazine-resistant *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother*, 36(4), 607-618.
- Richards, R. M. E., & Xing, Z.J. (1996). Determination of peptidoglycan-associated protein in *Escherichia coli* NCIB 8545 by capillary zone electrophoresis. *Journal of chromatography. A*, 000, 1-6.
- Richards, R. M. E., Taylor, R. B., & Xing, J. Z. (1993). Investigations of the correlation between bacterial uptakes of trimethoprim and sulphadiazine with antibacterial activities against *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Pharmaceutics*, 92(1-3), 237-241.
- Richards, R. M. E., Xing, D.K.L., & King, T.P. . (1993). Effects on cell morphology of growing *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* and *Staphylococcus aureus* in subinhibitory concentrations of para-aminobenzoic acid. *Microbios*, 73, 105-111.
- Sato, Y., Shibata, H., Arakaki, N., & Higuti, T. (2004). 6,7-Dihydroxyflavone dramatically intensifies the susceptibility of methicillin-resistant or -sensitive *Staphylococcus aureus* to beta-lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1357-1360.
- Schnaitmann, C. A. (1971). Solubilisation of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *Journal of bacteriology*, 108, 545-552.
- Stapleton, P., Wu, P.J., King, A., Shannon, K., French, G., & Phillips, I. (1995). Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(11), 2478-2483.
- Tropp, B. E. (1997). *Biochemistry Concepts and Applications*. USA: Brooks/Cole Publishing Company.
- Tzouveleakis, L. S., Zissis, N. P., Gazouli, M., Tzelepi, E., Legakis, N. J. (1997). In vitro comparative assessment of [beta]-lactamase inhibitors and their penicillin combinations against selected enterobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 8(3), 193-197.
- Voet, D., & Voet, J.G. (1995). *Biochemistry* (2 nd ed.). USA: John Wiley & Sons.
- Williams, P., & Gledhill, L. . (1991). Fractionation of bacterial cells and isolation of membranes and macromolecules. In S. P. Denyer, & Hugo, W.B. (Ed.), *Mechanisms of action of chemical biocides: their study and exploitation*. (pp. (87-104). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Yam, T. S., Miller, T.H., & Shah, S. (1998). The effect of a component of tea (*Camellia sinesis*) on methicillin resistance, PBP2' synthesis, and beta-lactamases production in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 42, 211-216.

Zhu, Z. (1995). *Investigation of mechanism of synergism of Trimethoprim and Sulphonamides against bacteria having different resistant patterns*. The Robert Gordon University, Aberdeen.





## Output ที่ได้จากโครงการ

### Referred articles:

**Eumkeb, G.** and Richards, R.M.E. (2005). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. *Acta Horticulturae*. Vol 4: 678: 171-178.

Jirawan Oonmetta-aree, Tomoko Suzuki, Piyawan Gasaluck and **Griangsak Eumkeb.** (2006). Antimicrobial Properties and Action of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT Food Science and Technology*. 39: 1214-1220.

**(IF 2011 = 2.545)**

**Eumkeb, G.** and Richards R.M.E. (2004). Reversing  $\beta$ - Lactam Antibiotic Resistance in Gram- positive bacteria by Some Flavonoids. *Suranaree J. Sci. Technol.* 11:143-150.

**Eumkeb, G.,** Sakdarat, S and Siriwong, S. (2010). "Reversing [beta]-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime." *Phytomedicine* 18(1): 40-45.

**(Impact Factor 2011 = 3.268)**

**Eumkeb, G.** and Duangkham A. (2011). "Subacute Toxicity Test of Galangin and ceftazidime in Mice." *Thai Journal of Toxicology* 26(1): 5-13.

**Eumkeb, G.,** Siriwong, S., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Sakdarat, S. (2012). "Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*." *J. Appl. Microbiol.* 112, 55-64.

**(Impact Factor 2011 = 2.337)**

### Patent

The combination of flavonoids and drugs against *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacae* : patent asking no: 0601001839 , 2006

**Conference Proceedings:**

**Griangsak Eumkeb**, Nichayanan Chaisena, Nitaya Rojtinnakorn, Supatcharee Siriwong, Aphai Duangkham. (2008). P14 Reversing  $\beta$ -Lactam Antibiotic Resistant Bacteria with Flavonoids. In : Proceeding of 30th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting. 27-28 March 2008. *Thai Journal of Pharmacology*. Vol 29: No I: 117-126. Bangkok: Ruen Kaew Press.

Siriwong S, Thumanu K, **Eumkeb G.** (2010). Using FT-IR microspectroscopy to investigate biochemical change of drugs-resistance *Escherichia coli* treated with amoxicillin and apigenin. In: Proceeding of the 36<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand (STT36). Abstract Book (Oral presentation, B2\_0051/pp70.) 26-28 October 2010, Bangkok, Thailand: Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Thailand.

**Research reports:****Conference Abstracts:**

**Eumkeb, G.** and Richards, R.M.E. (2003). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. In The 3<sup>rd</sup> World Congress on Medicinal and Aromatic Plant for Human Welfare (WOCMAP III) From Biodiversity through Science and Technology, Trade and Industry to Sustainable Use, **Abstracts Book** ( Poster presentation, PP04 -59, pp. 450 ). 3-7 February 2003, Chiangmai, Thailand : Chiangmai University

**Eumkeb, G.** and Richards, R.M.E. (2004). Reversing beta-lactam antibiotic resistance in Gram positive Bacteria with some flavonoids. In :The 20<sup>th</sup> FAPA Congress 2004 : Emerging Science and Profession in Pharmacy , **Abstracts Book** (Oral presentation, PP-O-01, pp. 160). 30 Nov – 3 Dec 2004, Bangkok, Thailand : The Pharmaceutical Association of Thailand under Royal Patronage, Bangkok.

**Eumkeb, G.** (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some  $\beta$  - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstracts Book** (Poster presentation, MRG168/p225, pp. 214.). 14-16 January 2005, Kanchanaburee, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.

**Eumkeb, G.** (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Oral presentation, 13-R1-S1-MRG4680168/p227, pp. 1). 13-15 October 2005, Petchaburi, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.

**Eumkeb, G.** Chukratok. S., Suttajit. M. and Ruangrunsi. N. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The 1st International Conference on Natural products for Health and Beauty; From local wisdom to global marketplace. **Abstract Book** (Oral presentation, O4-1/p232, pp. 124). 17-21 October 2005, Mahasarakham, Thailand : Mahasarakham University, and the higher education commission, Thailand.

**Eumkeb, G.,** Wongkamsound, K (2007). Flavonoids synergy with beta-lactam antibiotics against beta-lactam-resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers **7th, Abstract Book** ( Poster presentation, P-PHY-B06-RSA4980004 /p26 , pp. 26. ). 11-13 October 2007, Pattaya, Chonburee,Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok

**Eumkeb, G.,** Wongkamsound, K. (2008). Flavonoids synergy with  $\beta$ -lactam antibiotics against  $\beta$ -lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Poster presentation, PS-BIO-E20). 16-18 October 2008, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education: p. 144.

**Eumkeb, G.,** Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Siriwong, S., Duangkham, A., Naknarong, W., Wisansawat, J. (2009). Flavonoids synergy with  $\beta$ -lactam antibiotics against  $\beta$ -lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Poster presentation, PS-BIO-B24). 15-17 October 2009, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education: p. 105.

## ประวัตินักวิจัย

1. **Name and Rank:** Assistant Professor Dr. Griangsak Eumkeb
2. **Department / School:** School of Biology, Institute of Science
3. **University:** Suranaree University of Technology
4. **Degree:**

| Degree | Field        | Date Awarded | Institute / Country                          |
|--------|--------------|--------------|--|
| Ph.D.  | Pharmacology | 1999         | The Robert Gordon University, United Kingdom |
| B.Sc.  | Pharmacy     | 1989         | Chulalongkorn University, Thailand           |

### 5. Experiences:

#### 5.1 Administration Experience:

| Period       | Position  | Institution / Firm  |
|--------------|---|---|
| 2004-present | Assistant Professor   | Institute of Science, Suranaree University of Technology (SUT)                      |
| 2002-2005    | Assistant<br>Center for Scientific and Suranaree University of Technology | Director of Center for Scientific and Technology equipment,<br>Technology equipment |
| 1999-2002    | Lecturer  | School of Biology, Inst. of Science, SUT.   |
| 1989-1994    | Pharmacist  | MaharatNakhonRatchasima Hospital, Thailand  |

### 6. Current Professional Field Registration:

Pharmacology and toxicology, Medicinal plant, Clinical Pharmacy

### 7. Members:

1. Thai society of toxicology
2. Thai society of pharmacist
3. Thai pharmacy council
4. The alumni association of Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

## 8. Research Grants Awarded:

2011- The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program Advisorships (1 **Grant**): The Thailand Research Fund, Thailand

2006-2008: Research Career Development Grant (**Metheevijai**): The Thailand Research Fund, Thailand

2003-2004: Research Grant for New Scholar : The Thailand Research Fund-Commission on Higher Education

2004-2011: Research Grants (9 **Grants**): National Research Council of Thailand/Institute of Research and Development, Suranaree University of Technology, Thailand

2011: The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program Advisorships (1 **Grants**): The Thailand Research Fund, Thailand

## 9. Award :

2011 : Renowned deed in athletics leader, Suranaree University of Technology

2010 : Renowned deed in athletics manager, Suranaree University of Technology

2008 : Outstanding alumnus, Nonkipittakom school, Buriram, Thailand

1994-1999: The Royal Thai Government Scholarship, MUA, to study Ph.D. in U.K. for 4 years.

1985-1988: Boonrod - Brewery Scholarship for 4 years, Chulalongkorn University,

1983-1984: Bangkok-Bank Scholarship for 2 years, Mahidol University

## 10. Scientific Publications :

### Referred articles:

Richards, R.M.E., **Eumkeb, G.** and Marshall, D. (1997). Is the ultrastructural damage caused by subinhibitory concentrations of trimethoprim and sulphadiazine part of their normal mechanism of action? *Microbios*, 92, 183 - 197.

**Eumkeb, G.** and Richards, R.M.E. (2005). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. *Acta Horticulturae*. Vol 4: 678: 171-178.

Jirawan Oonmetta-aree, Tomoko Suzuki, Piyawan Gasaluck and **Griangsak Eumkeb.** (2006). Antimicrobial Properties and Action of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT Food Science and Technology*. 39: 1214-1220.

(IF 2011 = 2.545)



Punopas, K., **Eumkeb, G.**, Chitsomboon, B. and Nakkiew, P. (2004). The study of antibacterial activity of some medicinal plant in Lamiaceae family. *Suranaree J. Sci. Technol.* 11:52-59.

**Eumkeb, G.** and Richards R.M.E. (2004). Reversing  $\beta$ -Lactam Antibiotic Resistance in Gram- positive bacteria by Some Flavonoids. *Suranaree J. Sci. Technol.* 11:143-150.

**Eumkeb, G.**, Sakdarat, S and Siriwong, S. (2010). "Reversing [beta]-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime." *Phytomedicine* **18**(1): 40-45.

**(Impact Factor 2011 = 3.268)**

**Eumkeb, G.** and Duangkham A. (2011). "Subacute Toxicity Test of Galangin and ceftazidime in Mice." *Thai Journal of Toxicology* **26**(1): 5-13.

Eumkeb, G., Siriwong, S., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Sakdarat, S. (2012). "Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*." *J. Appl. Microbiol.* 112, 55-64.

**(Impact Factor 2011 = 2.337)**

Munglue, P., Eumkep, G., Wray, S., Kupittayanant, S., 2012. The Effects of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Extracts and L-Citrulline on Rat Uterine Contractility. *Reproductive Sciences*. is accepted.

**(Impact Factor 2011 = 2.444)**

**Eumkeb, G.**, Siriwong, S., Thumanu, K., 2012. Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. is accepted.

**(Impact Factor 2011 = 2.814)**

#### Patent

The combination of flavonoids and drugs against *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacae* : patent asking no: 0601001839 , 2006

#### Conference Proceedings:

**Griangsak Eumkeb**, Nichayanan Chaisena, Nitaya Rojtinnakorn, Supatcharee Siriwong, Aphai Duangkham. (2008). P14 Reversing  $\beta$ -Lactam Antibiotic Resistant Bacteria with Flavonoids. In : Proceeding of 30th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting, 27-28 March 2008. *Thai Journal of Pharmacology*. Vol 29: No I: 117-126. Bangkok: Ruen Kaew Press.

Siriwong S, Thumanu K, **Eumkeb G.** (2010). Using FT-IR microspectroscopy to investigate biochemical change of drugs-resistance *Escherichia coli* treated with amoxicillin and apigenin. In: Proceeding of the 36<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand (STT36). Abstract Book (Oral presentation, B2\_0051/pp70.) 26-28 October 2010, Bangkok, Thailand: Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Thailand.

#### **Research reports:**

**Eumkeb,G.** and Jinakoon, N. (2003). The study of medicinal plants and supplement food for health of community in NakhonRatchasima province

#### **Conference Abstracts:**

**Eumkeb, G.** and Richards, R.M.E. (2003). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. In The 3<sup>rd</sup> World Congress on Medicinal and Aromatic Plant for Human Welfare (WOCMAP III) From Biodiversity through Science and Technology, Trade and Industry to Sustainable Use, **Abstracts Book** ( Poster presentation, PP04 -59, pp. 450 ). 3-7 February 2003, Chiangmai, Thailand : Chiangmai University

**Eumkeb, G.** and Richards, R.M.E. (2004). Reversing beta-lactam antibiotic resistance in Gram positive Bacteria with some flavonoids. In :The 20<sup>th</sup> FAPA Congress 2004 : Emerging Science and Profession in Pharmacy , **Abstracts Book** (Oral presentation, PP-O-01, pp. 160). 30 Nov – 3 Dec 2004, Bangkok, Thailand : The Pharmaceutical Association of Thailand under Royal Patronage, Bangkok.

**Eumkeb, G.** (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some  $\beta$  - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstracts Book** (Poster presentation, MRG168/p225, pp. 214.). 14-16 January 2005, Kanchanaburee, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.

**Eumkeb, G.** (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Oral presentation, 13-R1-S1-

MRG4680168/p227, pp. 1). 13-15 October 2005, Petchaburi, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.

**Eumkeb, G.** Chukratok. S., Suttajit. M. and Ruangrungsi. N. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The 1st International Conference on Natural products for Health and Beauty; From local wisdom to global marketplace. **Abstract Book** (Oral presentation, O4-1/p232, pp. 124). 17-21 October 2005, Mahasarakham, Thailand : Mahasarakham University, and the higher education commission, Thailand.

**Eumkeb, G.,** Wongkamsound, K (2007). Flavonoids synergy with beta-lactam antibiotics against beta-lactam-resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers **7th, Abstract Book** ( Poster presentation, P-PHY-B06-RSA4980004 /p26 , pp. 26. ). 11-13 October 2007, Pattaya, Chonburee, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok

**Eumkeb, G.,** Wongkamsound, K. (2008). Flavonoids synergy with  $\beta$ -lactam antibiotics against  $\beta$ -lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Poster presentation, PS-BIO-E20). 16-18 October 2008, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education: p. 144.

**Eumkeb, G.,** Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Siriwong, S., Duangkham, A., Naknarong, W., Wisansawat, J. (2009). Flavonoids synergy with  $\beta$ -lactam antibiotics against  $\beta$ -lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Poster presentation, PS-BIO-B24). 15-17 October 2009, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education: p. 105.

## ประวัตินักวิจัย

1. Name and Rank: Ms. Supatcharee Siriwong
2. Department / School: School of Biology, Institute of Science
3. University: Suranaree University of Technology
4. Degree: B.Sc. Microbiology 2005 Ubon Ratchathani University
5. Scientific Publications:

## Referred articles:

- EUMKEB, G., SAKDARAT, S. AND SIRIWONG, S. 2010. Reversing beta-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine*, 18, 40-5.
- EUMKEB, G., SIRIWONG, S., PHITAKTIM, S., ROJTINNAKORN, N. AND SAKDARAT, S. 2011. Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 55-64.

## Conference Proceeding:

- Griangsak Eumkeb, Nichayanan Chaisena, Nitaya Rojtinnakorn, Supatcharee Siriwong, Aphai Duangkham. (2008). P14 Reversing  $\beta$ -Lactam Antibiotic Resistant Bacteria with Flavonoids. In : Proceeding of 30th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting. 27-28 March 2008. *Thai Journal of Pharmacology*. Vol 29: No I: 117-126. Bangkok: Ruen Kaew Press.
- SIRIWONG, S., THUMANU, K., AND EUMKEB, G. 2010. Using FT-IR microspectroscopy to investigate biochemical change of drugs-resistance *Escherichia coli* treated with amoxicillin and apigenin. In: Proceeding of the 36<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand (STT36). Abstract Book (Oral presentation, B2\_0051/pp70.) 26-28 October 2010, Bangkok, Thailand: Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Thailand.

## Conference abstract:

- THUMANU, K., SIRIWONG, S. AND EUMKEB, G. 2009. ATR-FTIR Spectroscopic investigation of MRSA ampicillin-resistant and *E.coli* amoxicillin-resistant. Agricultural Biotechnology International Conference 2009 (ABIC 2009).