กมล อยู่สุข : กลไกการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของลูปินิฟอลินที่สกัดได้จากลำต้นชะเอมเหนือต่อเชื้อสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส (MECHANISM OF ACTION UNDERLYING THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LUPINIFOLIN, A FLAVONOID EXTRACTED FROM THE STEM OF *DERRIS RETICULATA* CRAIB., AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*). อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.นวลน้อย จูฑะพงษ์, 80 หน้า.

ในการศึกษาวิจัยนี้ ได้ทำการสกัดสารลูปินิฟอลิน ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างในกลุ่ม prenylated flavonoid จากลำต้นชะเอมเหนือ (*Derris reticulata*) โดยได้ทำการตรวจความถูกต้องจาก NMR สเปกตรัมและตรวจยืนยันด้วยการวิเคราะห์มวลสาร (Mass spectrometry) สารละลายลูปินิฟอลินถูกเตรียมด้วยการละลายใน 0.1 N NaOH และเจือจางต่อทันทีในอาหารเลี้ยงเชื้อ Müller-Hinton เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย จากผลการทดสอบที่ได้พบว่า แบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารลูปินิฟอลินมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ จากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 4 สายพันธุ์ พบว่า *Staphylococcus aureus* มีความไวมากที่สุด และจากการทดสอบด้วยวิธี two-fold microdilution พบว่า สารลูปินิฟอลินออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) เท่ากับ 8 และ 16 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวมีความแรงน้อยกว่า เมื่อเทียบกับ ampicillin อย่างไรก็ตาม จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับผลในการออกฤทธิ์ แสดงให้เห็นว่า ลูปินิฟอลินออกฤทธิ์ได้เร็วกว่า ampicillin โดยฤทธิ์ที่เร็วกว่าของลูปินิฟอลินนี้ สามารถยืนยันได้โดยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และเพื่อตรวจหากลไกการออกฤทธิ์ของลูปินิฟอลิน กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านถูกนำมาใช้เพื่อสังเกตโครงสร้างขนาดเล็กภายในเซลล์แบคทีเรีย *S. aureus* ภาพถ่ายที่ได้แสดงให้เห็นว่า ลูปินิฟอลินทำให้เกิดการฉีกขาดของเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ เนื่องจากการออกฤทธิ์ที่รวดเร็วดังกล่าวนี้ชี้แนะว่า ลูปินิฟอลินน่าจะออกฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง สมมติฐานนี้ได้รับการพิสูจน์ยืนยันด้วยวิธี Flow cytometry โดยใช้สี $DiOC_2$ เป็นสารบ่งชี้ในการทดสอบ ผลการศึกษาพบว่า อัตราส่วนของสีแดง/สีเขียว ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับสาร carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone ซึ่งเป็นที่ทราบกันทั่วไปว่ามีฤทธิ์เป็น protonophore ที่มีฤทธิ์ทำลายโดยตรงต่อเยื่อหุ้มเซลล์ จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า ลูปินิฟอลินมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* โดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์

นอกจากนี้ ยังได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของลูปินิฟอลินในเม็ดเลือดแดงและเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 พบว่า ลูปินิฟอลินที่ค่าความเข้มข้นเท่ากับ MIC และ MBC ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์ HepG2 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผลการทดลองที่ได้การศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่า ลูปินิฟอลินมีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาปรีคลินิก ลายมือชื่อนักศึกษา__________

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา__________

KAMOL YUSOOK : MECHANISM OF ACTION UNDERLYING THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LUPINIFOLIN, A FLAVONOID EXTRACTED FROM THE STEM OF *DERRIS RETICULATA* CRAIB., AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NUANNOI CHUDAPONGSE, Ph.D. 80 PP.

DERRIS RETICULATA CRAIB./*LUPINIFOLIN*/*STAPHYLOCOCCUS AUREUS*/ANTIMICROBIAL/CELL MEMBRANE DISRUPTION

In this study, lupinifolin, a prenylated flavonoid, was isolated from *Derris reticulata* stem, identified by NMR spectra and confirmed with mass spectrometry. Lupinifolin was freshly prepared by solubilizing in 0.1 N NaOH and immediately diluted in Müller-Hinton broth for testing antibacterial activity. The data showed that Gram-positive bacteria were more susceptible to lupinifolin than Gram-negative bacteria. Of four strains of Gram-positive bacteria tested, *Staphylococcus aureus* was the most susceptible strain. Using the two-fold microdilution method, it was found that lupinifolin possessed antimicrobial activity against *S. aureus* with minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of 8 and 16 μg/ml, respectively, which was less potent than ampicillin. However, from the time-effect relationship, it was shown that lupinifolin had faster onset than ampicillin. The faster onset of lupinifolin was confirmed by scanning electron microscopy. To investigate the mechanism of action of lupinifolin, transmission electron microscopy (TEM) was performed to observe the ultrastructure of *S. aureus*. The TEM images showed that lupinifolin ruptured the bacterial cell membrane and cell wall. Due to its

fast onset, it is suggested that the action of lupinifolin is likely to be the direct disruption of the cell membrane. This hypothesis was substantiated by the data from flow cytometry using $DiOC_2$ as an indicator. The result showed that the red/green ratio which indicated bacterial membrane integrity was significantly decreased, similar to the known protonophore carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone. It is concluded that lupinifolin inhibits the growth of *S. aureus* by damaging the bacterial cytoplasmic membrane.

In addition, cytotoxicity of lupinifolin was evaluated in red blood cells (RBCs) and HepG2 cells. It was found that at MIC and MBC of lupinifolin did not produce significant toxicity on RBCs and HepG2 cell viability ($p < 0.05$). The data obtained from this study suggested that lupinifolin may have the potential to be used as antibacterial agent.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Preclinic　　　Student's Signature ____________

Academic Year 2016　　　Advisor's Signature ____________