นิพนธ์ต้นฉบับ
Original Article

การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ความเป็นพิษต่อเซลล์ และการเสริมฤทธิ์ของสำโรงร่วมกับโพลีมิคซินบี

วิสาตรี คงเจริญสุนทร วท.ม., Ph.D., พรพิมล บุตะเขียว วท.บ.***

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ความเป็นพิษ และการเสริมฤทธิ์กับโพลีมิคซินบีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาของส่วนสกัดเอทานอลจากเปลือกต้นสำโรง ผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่าส่วนสกัดจากเปลือกต้นสำโรงสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ในช่วงเวลาตั้งแต่ 4-24 ชั่วโมง และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุด (% inhibition = 73.01±16.68 %) ที่เวลา 24 ชั่วโมง การศึกษา Time kill assay แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้เปลือกต้นสำโรงความเข้มข้นเท่ากับ 1/2 MIC ผสมกับยาโพลีมิกซิน บี 1/2 MIC สามารถเสริมฤทธิ์กันเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* และ *Pseudomonas aeruginosa* และเปลือกสำโรงไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) แต่สามารถเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ เมื่อใช้ความเข้มข้น 31.25-1,000 µg/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

คำสำคัญ : สำโรง, ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม, เสริมฤทธิ์ของโพลีมิคซินบี, แมคโครฟาจ (RAW 264.7)

Antibiofilm activity, Cytotoxicity and Synergy of polymyxin B mixed with Sterculia foetida L.

Wisatre Kongcharoensuntorn M.Sc., Ph.D.*, Pondpimon Butakheiw B.Sc**

Abstract

This research was aimed to study antibiofilm activity, cytotoxicity and synergistic effect of ethanol extract from stem bark of *Sterculia foetida* L. in combination with polymyxin B against some drug resistant bacteria. As a result of screening antibiofilm activity, stem bark of Sterculia foetida were be able to inhibit biofilm formation of *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 at the times of 4-24 hours after inoculum. Also, Sterculia foetida showed the best anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 at 24 hours after inoculum and showed % inhibition as 73.0 1±1 6.68 %. Additionally, synergistic effect of *Sterculia foetida* in combination with polymyxin B was reported that using 1/2 MIC of *Sterculia foetida* mixed with 1/2 MIC of polymyxin B enhanced antibacterial activity against drug resistant *Acinetobacter*

* *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

** *นิสิตปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

* *Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University*

** *Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University*

Received : Sep 10, 2021 Revised : Jan 30, 2022 Accepted : Apr 29, 2022

baumannii and *Pseudomonas aeruginosa* by time kill assay. Finally, our discovery was indicated that stem bark of *Sterculia foetida* showed no toxicity against macrophage (RAW 264.7). However, Sterculia foetida significantly increased cell viability of macrophage when treated the macrophage with 31.25 - 1,000 µg/ml of *Sterculia foetida* extract ($p<0.01$).

Keywords : Sterculia foetida, antibiofilm activity, Synergy of polymyxin B, Macrophage (RAW 264.7)

บทนำ

ในปัจจุบันพบอุบัติการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนานของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล และพบอัตราการเสียชีวิตสูงมาก ได้แก่ การติดเชื้อ *Acinetobacter baumannii, Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาหลายขนาน โดยทั่วไปมักพบติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ และแผลผ่าตัด เชื้อกลุ่มนี้มีการพัฒนาการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา[1,2] และเริ่มพบการแพร่กระจายของเชื้อเหล่านี้เพิ่มมากขึ้นในโรงพยาบาล แพร่กระจายไปปนเปื้อนในเครื่องมือแพทย์ และกระจายไปสู่สิ่งแวดล้อม ทำให้เป็นไปได้ยากที่จะการควบคุมการระบาดของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในโรงพยาบาล ส่งผลให้เกิดการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาหลายขนานสูงมาก เช่น พบการติดเชื้อในหอผู้ป่วยแผนกอายุรกรรม เป็นต้น[3] ก่อให้เกิดความยากลำบากของแพทย์ในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษา เพราะต้องใช้ยาปฏิชีวนะหลายขนานร่วมกันรักษา หรือใช้ยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ที่มีราคาแพงในการรักษา ทำให้ต้องใช้ระยะเวลานานในการรักษาผู้ป่วย จึงเกิดโรคแทรกซ้อนตามมาจากภาวะภูมิคุ้มกันอ่อนแอ และผู้ป่วยต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอนุพันธ์ที่สูงขึ้น เช่น ยากลุ่มโพลีมิคซิน (เช่น colistin)[4] และในปัจจุบันเริ่มมีพบอุบัติการณ์การดื้อยาของยาโพลีมิกซิน[5] ซึ่งเป็นยาโบราณได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อดื้อยาหลายขนานในปัจจุบัน เพราะยังคงมีความไวต่อการใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา แต่ยาชนิดนี้มีพิษต่อไตสูง[5] ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการรักษาและการลดการเกิดอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย คือลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะลง หรือนำยาปฏิชีวนะที่ใช้ไม่ได้ผลกลับมาใช้ใหม่ เช่น แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน หรือการใช้ยาปฏิชีวนะรักษาร่วมกับสารสกัดจากสมุนไพร เพราะสมุนไพรมีการใช้มาอย่างต่อเนื่องและยาวนาน เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ มีแนวโน้มปลอดภัย ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์หลายชนิด ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียร่วมกันหลายกลไก[6] นอกจากนี้สมุนไพรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถลดการอักเสบในผู้ป่วยติดเชื้อ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ ทำให้สมุนไพรเป็นตัวเลือกที่ดี ที่อาจจะนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพหรือนำมาผสมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะ[6,7] ปัจจุบันมีงานศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำสมุนไพรมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมากมาย[8] เช่น Atrocarpin ผสมกับยาเตตราซัยคลิน แอมพิซิลลิน และนอร์ฟอกซาซิน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus, P. aeruginosa, E. coli*[9] งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษา ต้นสำโรง ซึ่งมีคุณสมบัติทางชีวภาพประการ เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ต้านอักเสบ ต้านมะเร็ง ควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulation) และที่สำคัญสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย[10]

ต้นสำโรง (*Sterculia foetida L.*) คือพืชวงศ์ Malvaceae เป็นไม้ยืนต้นผลัดใบขนาดใหญ่ ที่พบแถบภาคอีสาน เหนือ ใต้ และภาคตะวันออก มีสรรพคุณช่วยละลายเสมหะ แก้บิด ช่วยขับปัสสาวะ แก้โรคปวดข้อ และสมานแผลในกระเพาะและลำไส้[11] พบสารประกอบทางเคมี ได้แก่ flavonoid, saponin, alkaloid, tannin, triterpene และsteroid[12] รายงานการวิจัยต่าง ๆ พบว่าเปลือกสำโรงมีฤทธิ์ยับยั้ง *Bacillus subtilis, Streptococcus mitis, Staphylococcus aureus, Shigella flexneri, Salmonella typhi* และ *Klebsiella pneumoniae* เป็นต้น นอกจากนี้สำโรงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และสามารถฆ่าเซลล์มะเร็ง osteosarcoma[13] จากข้อมูลดังกล่าว จึงแสดงให้เห็นว่าต้นสำโรงนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งอาจจะนำมาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ[10]

ไบโอฟิล์ม (biofilm) คือกลไกการรวมกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญ เพื่อเข้าติดเชื้อในร่างกายผู้ป่วย แบคทีเรียจะเจริญเติบโตและเกาะติดพื้นผิวที่มีความชื้นสูง จากนั้นจะผลิตสารพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นเมทริกซ์ ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันอันตรายต่อเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ภายในไบโอฟิล์ม เพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มากพอ ก่อนจะเข้าติดเชื้อเซลล์เจ้าบ้าน (host)[14] ดังนั้นด่านแรกของการลดอุบัติการณ์การติดเชื้อแบคทีเรียคือการลดการสร้างไบโอฟิล์ม ลดการเกาะติดผิวเครื่องมือแพทย์ เพื่อป้องกันการติดเชื้อสู่เซลล์เจ้าบ้าน ก่อนจะลุกลามไปสู่เนื้อเยื่อ อวัยวะ และกระแสเลือด[14]

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution assay

ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเปลือกต้นสำโรง และการเสริมฤทธิ์ของเปลือกต้นสำโรงร่วมกับยาโพลีมิกซิน บี ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา ตลอดจนศึกษาความเป็นพิษของเปลือกต้นสำโรง

วิธีการศึกษาและวัสดุอุปกรณ์

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานคือ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาปฏิชีวนะ (รหัส 1-375/04-2017) และ *A. baumannii* ดื้อยาโพลีมิกซิน บี อะมิโนกลัยโคไซด์ บีต้า แล็คแทม คาบาพีเนม และควิโนโลน ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี

การเตรียมส่วนสกัดจากเปลือกต้นสำโรง

เก็บเปลือกต้นสำโรง จากบริเวณชุมชนในเขตอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี และนำต้นสำโรงมายืนยันสายพันธุ์ โดย ดร.เบญจวรรณ ชิวปรีชา (นักพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี) ตั้งชื่อรหัสพรรณไม้อ้างอิง คือ ScBuu-MS01 จากนั้นนำเปลือกต้นสำโรงจำนวน 2 กิโลกรัม มาอบให้แห้ง บดให้เป็นผงละเอียด จากนั้นนำมาสกัดด้วยเอทานอล โดยนำผงเปลือกต้นสำโรงมาแช่ใน 80 % เอทานอล ด้วยสัดส่วนของเปลือกสำโรงต่อตัวทำละลายเท่ากับ 3:1 ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 3 วัน จากนั้นน้ำที่สกัดได้จากเปลือกต้นสำโรงไปทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 55oC คำนวณปริมาณส่วนสกัด (crude extract) ได้เท่ากับ 97.09 กรัม คิดเป็น 4.22% จากนั้นเตรียมความเข้มข้นของส่วนสกัดเปลือกต้นสำโรงให้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบด้วยวิธี Broth dilution assay[15] เริ่มต้น นำเชื้อทดสอบมาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 ให้มีปริมาณ 1 x 10^8 CFU/ml จากนั้นเตรียมส่วนสกัดสำโรง 80 mg/ml ปริมาตร 100 µl มาเจือจางด้วย MHB 100 µl เพื่อให้มีความเข้มข้นลดลงที่ละสองเท่า (0.625-80 mg/ml) แล้วจึงนำสารที่เจือจางปริมาตร 100 µl มาผสมกับเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ปริมาตร 100 µl (ปริมาณ 1 x 10^8 CFU/ml) จากนั้นนำส่วนสกัดสำโรงในแต่ละ treatment ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และแต่ละ treatment ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ โดยเทียบกับยาแอมพิซิลลิน เตตราซัยคลิน และโพลีมิกซินบี จากนั้นวัดความขุ่นของเชื้อด้วย ที่ OD 610 ด้วย microplate reader (VersaMax, U.S.A.) บันทึกผลเพื่อหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกาะติดผิว (Antibiofilm activity test)

ทดสอบโดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Awolola และคณะ[16] โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ด้วยอาหาร Nutrient Broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปปรับความขุ่นด้วย McFaland 0.5 (1.5 x 10^8 CFU/ml) จากนั้นใส่ส่วนสกัดจากเปลือกต้นสำโรง ความเข้มข้นเท่ากับ 1XMIC และ 2XMIC ปริมาตร 500 µl แล้วเติมเซลล์แบคทีเรียที่ปรับความขุ่นเท่ากับ McFaland 0.5 ปริมาตร 500 µl ในถาดหลุมชนิด 6 หลุม (microtiter plate) จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ NB 500 µl ลงในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4. 8, 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทดสอบนำแบคทีเรียทุกชุดการทดสอบมาตรึงเซลล์แบคทีเรียที่เกาะยึดผิวก้นหลุมหลอดทดลอง (cell fixing) ด้วยการดูดน้ำส่วนใสที่ไม่มีเซลล์แขวนลอยของเชื้อออก 1000 µl แล้วล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่เกาะก้นหลุม 2 ครั้งด้วย Phosphate buffer saline (PBS) ตรึงเซลล์แบคทีเรียด้วย Methanol ปริมาตร 200 µl เพื่อให้โปรตีนของเชื้อแบคทีเรียตรึงอยู่บนผิวก้นหลุมในถาดหลุม จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่เกาะติดผิวมาย้อมสีด้วย 0.01 % crystal violet ปริมาตร 40 µl ทิ้งไว้ 3-5 นาที แล้วเติม 33 % glacial acetic acid ปริมาตร 40 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยาและฆ่าเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำแบคทีเรียที่ย้อมสีแล้วไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (O.D 600) บันทึกค่า O.D. โดยทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุมได้แก่ เชื้อแบคทีเรียใน NB เป็น negative control และยาอ๊อกซีเตตราซัยคลิน เป็น positive control ทุกการทดสอบจะทำการทดสอบ 3 ครั้ง จากนั้น นำค่า O.D. มาคำนวณค่า % การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ดังสมการที่ 1

$$(\%)\ \text{inhibition} = (OD_{\text{negative control}} - OD_{\text{sample}})/(OD_{\text{negative control}} \times 100 \quad (1)$$

OD Sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ

OD Negative Control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสำโรงร่วมกับยาปฏิชีวนะ (Time–Kill Assay)

คือศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยการเตรียมเชื้อแบคทีเรียความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland No. 0.5 (1.5 X10^8 CFU/ml) ปริมาตร 100 µl เติม MHB ปริมาตร 2800 µl เติมสารทดสอบ และยาปฏิชีวนะความเข้มข้นที่เหมาะสม อย่างละ 100 µl แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วนำสาร

ทดสอบทั้งหมด ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 oC บ่มตามเวลาที่กำหนด คือ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารทดสอบที่ผสมแบคทีเรีย ออกมานับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตปริมาตร 100 µl โดยการเจือจาง 10-fold dilution ด้วย PBS จากนั้นนำเชื้อที่เจือจางไปเลี้ยงในอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมานับจำนวนโคโลนี แต่ละการทดสอบจะทำสามซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับ สารชุดควบคุมคือ น้ำกลั่นและยาโพลีมิคซินบี นำจำนวนแบคทีเรียไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและค่า log10 ของจำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/ml) จากนั้นนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ (The effectiveness antibacterial activity; EAA = ร้อยละของแบคทีเรียที่ลดลงจากเวลาเริ่มต้น)[17] คำนวณดังสมการที่ 2

$$EAA\ \% = \frac{N_0 - N_E}{N_0} \times 100 \qquad (2)$$

N_0 คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/ml) ของกลุ่มควบคุม

N_E คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/ml) ของกลุ่มทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษของสำโรง (cytotoxicity test)

คือการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage RAW 264.7) ด้วยวิธี Tetrazolium dye methylthiotetrazole (MTT) assay)[18] โดยทำการเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ และ แยกนับจำนวนเซลล์ด้วย Hemocytometer แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถาดหลุมชนิด 96 หลุม (96 well plates) โดยให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $2.5x10^4$ เซลล์ต่อหลุม เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ คือ Completed DMEM ปริมาตร 200 µl นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะในถาดหลุม จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก แล้วเติมสารทดสอบที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 200 µl นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงในสภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการทดสอบด้วยวิธี MTT โดยทำการล้างเซลล์ด้วย PBS pH 7.3 หลังจากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.25 mg/ml ปริมาตร 200 µl นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย MTT ออกจนหมดและเติม DMSO ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (OD 570) ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณหาร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด (% Cell viability) เช่นเดียวกับสมการที่ 3

$$\%\ \text{Cell viability} = [(OD_{Sample} - OD_{Blank}) / (OD_{Control} - OD_{Blank})] \times 100 \qquad (3)$$

OD Sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ

OD Control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab V.17 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียที่ ทดสอบ (Log CFU/ml) และ ค่า OD ของการดูดกลืนคลื่นแสง ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทิศทางเดียว (one way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างกันของข้อมูลด้วยด้วยแฟคเทอเรียลในแผนแบบสุ่มในบล๊อคสมบูรณ์ (Factorial Experiment in a Randomized Complete Block Design)

ผลการศึกษา

การศึกษาฤทธิ์ยังยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ผลการยับยั้งการเจริญของส่วนสกัดเอทานอลจากเปลือกลำต้นสำโรง แสดงดังตารางที่ 1 การทดสอบพบว่า ส่วนสกัดจากเปลือกต้นสำโรง ยาอ๊อกซีเตตราซัยคลิน และยาโพลีมิคซินบี สามารถยับยั้งแบคทีเรียการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ดื้อยา และ *S. aureus* ATCC 25923 ที่ทำการทดสอบ แสดงค่า MIC 10-80 mg/ml แต่แอมพิซิลลินไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* ดื้อยา

ตารางที่ 1 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของส่วนสกัดจากเปลือกต้นสำโรงและยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาส ด้วยวิธี Broth dilution assay

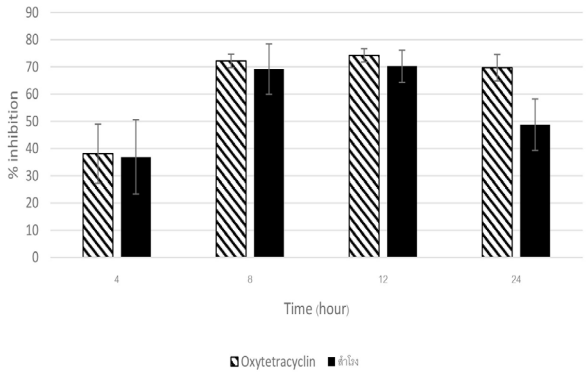
แบคทีเรีย	ค่า MIC (mg/ml)			
	สารทดสอบ			
	ส่วนสกัดจากเปลือกต้นสำโรง	อ๊อกซีเตตราซัยคลิน	แอมพิซิลลิน	โพลีมิกซิน บี
A. baumannii ดื้อยา	-	10	-	0.0391
E. coli ATCC 25922	40	0.3125	0.3125	nd
P. aeruginosa ดื้อยา	80	2.5	-	0.0391
S. aureus ATCC 25923	80	10	10	nd

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบค่า MIC, nd หมายถึงไม่ได้ทดสอบ

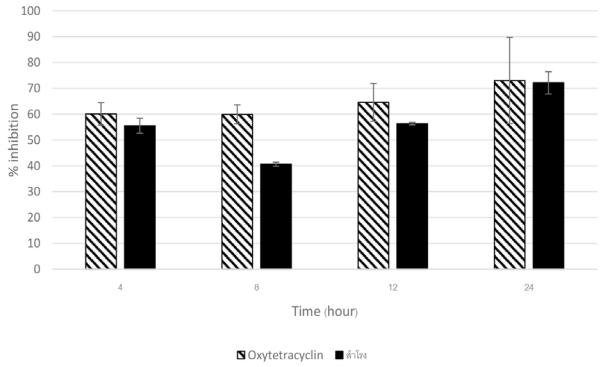
การศึกษาการยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์

ผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 และ P. aeruginosa

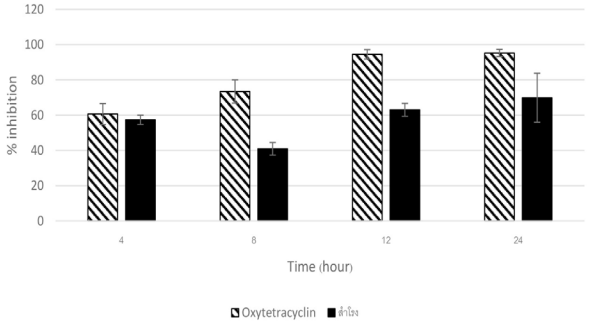
ดื้อยา ที่เวลา 4, 8, 12 ละ 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของเปลือกสำโรง (2MIC, 1MIC, 1MIC ตามลำดับ) และยาอ๊อกซีเตตตราซัยคลิน (64MIC, 16MIC, 4MIC ตามลำดับ) คือเท่ากับ 80 mg/ml แสดงดังภาพที่ 1-3 พบว่าส่วนสกัดจากเปลือกต้นสำโรงสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อทั้งสามชนิดนี้ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และพบว่าส่วนสกัดจากเปลือกต้นสำโรงสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 24 (% inhibition เท่ากับ 73.01 ± 16.68) (ภาพที่ 2) รองลงมาคือ *E. coli* ATCC 25922 (% inhibition เท่ากับ 70.22 ± 5.90 ในชั่วโมงที่ 12) (ภาพที่ 1) และ *P. aeruginosa* ดื้อยา (% inhibition เท่ากับ 69.86 ± 13.90 ในชั่วโมงที่ 24) (ภาพที่ 3) ตามลำดับ แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเปลือกต้นสำโรงต่ำกว่าของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของยาอ๊อกซีเตตราซัยคลิน (% inhibition เท่ากับ 59.92 ± 3.69 - 95.26 ± 2.06 ในช่วงเวลา 8-24 ชั่วโมง) (ภาพที่ 1-3)



ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบของส่วนสกัดจากเปลือกต้นสำโรง (80 mg/ml) กับยาอ๊อกซีเตตราซัยคลิน (80 mg/ml) ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922



ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบของส่วนสกัดจากเปลือกต้นสำโรง (80 mg/ml) กับยาอ๊อกซีเตตราซัยคลิน (80 mg/ml) ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923



ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบของส่วนสกัดจากเปลือกต้นสำโรง (80 mg/ml) กับยาอ๊อกซีเตตราซัยคลิน (80 mg/ml) ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ดื้อยา

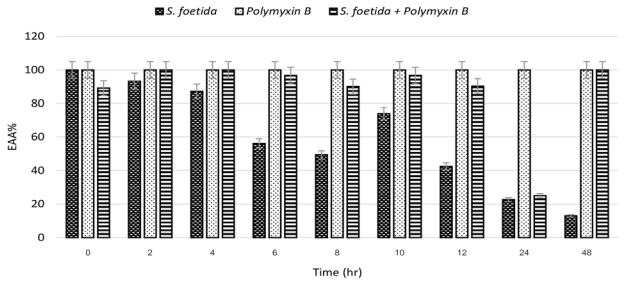
การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสำโรงร่วมกับยาโพลีมิกซินบี ด้วยวิธี Time kill assay

ปัจจุบันพบอุบัติการณ์การติดเชื้อและอัตราการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* สูงมาก เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ งานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาการใช้เปลือกต้นสำโรงควบคู่กับยา ยาโพลีมิกซินบี ซึ่งเป็นยาเพียงชนิดเดียวที่ยังสามารถใช้รักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียดื้อยาหลายขนานโดยนำส่วนสกัดเอทานอลจากเปลือกลำต้นสำโรงผสมกับยาโพลีมิกซิน บี เพื่อติดตาม growth curve ของแบคทีเรีย และผลการวิจัยพบว่าเปลือกลำต้นสำโรงเมื่อใช้ความเข้มข้น ½ MIC ผสมกับยาโพลีมิกซินบี เท่ากับ ½ MIC (ค่าMIC ของยาโพลีมิกซินบี คือ 0.38 mg/ml) สามารถเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาโพลีมิกซิน บี ในการยับยั้ง A. baumannii ดื้อยาได้ดีเทียบเท่ากับการใช้ยาโพลีมิกซิน บี เพียงชนิดเดียว โดยยับยั้งได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 2 และ 4 (ช่วงต้นของ log phase) (EAA เท่ากับ 100%) (แสดงดังภาพที่ 4) แต่เปลือกลำต้นสำโรงเมื่อผสมกับยาโพลีมิกซินบี จะมีประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ P. aeruginosa ดื้อยา ได้น้อยกว่าการใช้ยาโพลีมิกซินบี เพียงชนิดเดียว โดยออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 4 และ 6 (EAA > 60%) และการใช้ยาโพลีมิกซินบี เพียงชนิดเดียว และออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยแสดงค่า EAA สูงกว่าการใช้ร่วมกับเปลือกลำต้นสำโรง (EAA เท่ากับ 100% ในชั่วโมงที่ 2-24) (แสดงดังภาพที่ 5) แต่อย่างไรก็ตามส่วนสกัดเปลือกลำต้นสำโรง เพียงชนิดเดียวก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ได้ในช่วง 2-4 ชั่วโมง (ช่วงต้น log phase, EAA มากกว่า 80%) (แสดงดังภาพที่ 4 และ 5)

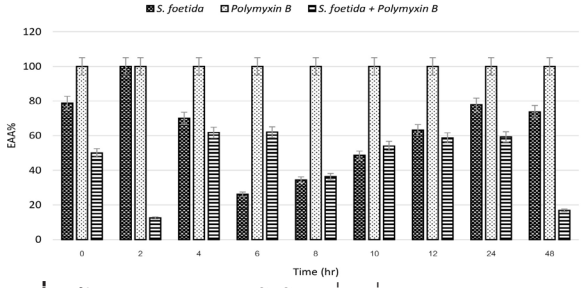
การทดสอบความเป็นพิษของสำโรง

การทดสอบความเป็นพิษของเปลือกต้นสำโรงกับเซลล์แมคโครฟาจ macrophage (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT assay

ผลการทดสอบ พบจำนวนเซลล์แมคโครฟาจเพิ่มขึ้น เมื่อใช้เปลือกต้นสำโรง ความเข้มข้น

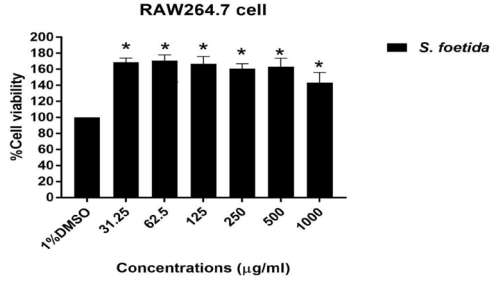


ภาพที่ 4 ร้อยละของจำนวนโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงของส่วนสกัดเอทานอลจากเปลือกลำต้นสำโรง (40 mg/ml) ร่วมกับโพลีมิกซิน บี (1/2MIC = 0.019 mg/ml) ในการยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* ดื้อยา ต่อหน่วยเวลา



ภาพที่ 5 ร้อยละของจำนวนโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงของส่วนสกัดเอทานอลจากเปลือกลำต้นสำโรง (1/2MIC = 40 mg/ml) ร่วมกับโพลีมิกซิน บี (1/2MIC = 0.019 mg/ml) ในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ดื้อยา ต่อหน่วยเวลา

31.25-1000 µg/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์แมคโครฟาจ ที่ไม่เติมเปลือกต้นสำโรง โดยการทดลองพบว่าแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของเปลือกต้นสำโรงที่ใช้ทดสอบ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ และเปลือกต้นสำโรงสามารถเพิ่มการแบ่งเซลล์ของแมคโครฟาจเพิ่มขึ้น 60-65% (% cell proliferation) ภายในเวลา 24 ชั่งโมง เมื่อใช้ความเข้มข้น 31.25-500 µg/ml



ภาพที่ 6 ร้อยละของจำนวนเซลล์แมคโครฟาจ macrophage (RAW 264.7) ที่มีชีวิตรอด เมื่อเติมส่วนสกัดเปลือกต้นสำโรงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (31.25-1000 µg/ml)

วิจารณ์

การสำรวจฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่า ส่วนสกัดจากเปลือกสำโรงสมารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ยกเว้น *A. baumannii* (คือค่า MIC อยู่ระหว่าง 10-80 mg/ml) และเปลือกต้นสำโรงมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียน้อยกว่ายาอ๊อกซีเตตรา-ซัยคลิน แต่ยาแอมพิซิลินไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเหล่านี้ และงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแต่ต้องใช้ยาโพลีมิกซิน บี ความเข้มข้นที่สูงมาก เท่ากับ 0.0391 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงสามารถยับยั้งการเจริญของทั้ง *A. baumannii ดื้อยา* และ *P. aeruginosa* ดื้อยา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่ทดสอบ เริ่มมีแนวโน้มจะดื้อต่อยาโพลีมิกซินบี (ค่า MIC ≥ 4 µg/ml ถือเป็นระดับที่เชื้อดื้อต่อยาโคลิสติน ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับยาโพลีมิกซิน บี) งานวิจัยนี้แสดงผลสอดคล้องกับการใช้ส่วนสกัดเปลือกสำโรงสกัดด้วยเฮกเซนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Shigella flexneri, Salmonella Typhi, Klebsiella pneumoniae*[10,19] และสอดคล้องกับผลการวิจัยของส่วนสกัดจากใบสำโรง ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae , Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* (ค่า MIC 56.6-226.3 µg/mL)[20] แต่การวิจัยครั้งนี้ใช้เปลือกต้นสำโรงที่สกัดด้วยเอทานอล และแสดงค่า MIC ที่สูงกว่า (40-80 mg/ml) เนื่องจากในใบมีองค์ประกอบของ flavone, flavonol, flavonoid, phenolic acid, triterpene เช่น stercufoetin A ในปริมาณมาก จึงอาจจะเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าเปลือกต้นสำโรง[20,21] และยังสนับสนุนงานวิจัยที่นำสารสกัดจากเมล็ดสำโรงมาทดสอบ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* (แสดงค่า inhibition zone เท่ากับ 20.2 ± 0.577 mm) *S .aureus* (แสดงค่า inhibition zone เท่ากับ18.80 ± 0.333 mm)[13] งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าชนิดและปริมาณสารบริสุทธิ์ ที่แตกต่างกันในส่วนประกอบของพืช มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้แตกต่างกัน และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเปลือกสำโรงซึ่งพบสาร flavonoid ในปริมาณมากอาจจะมีฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทำให้การซึมผ่านสารอีเล็คโทรไลท์ผิดปกติ หรืออาจจะมีผลไปยับยั้งการเกาะติดผิว ทำให้ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย[22]

การสำรวจเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าเปลือกสำโรงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบที่นำมาศึกษา ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเปลือกสำโรงสามารถยับยั้งการเกาะติดผิวของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 และ *P. aeruginosa* ดื้อยา อย่าง

มีประสิทธิภาพ แต่ต้องใช้ความเข้มข้นของเปลือกสำโรงในปริมาณมากเท่ากับ ½ MIC – 1MIC จึงจะสามารถยับยั้งการสร้างไบโอ-ฟิล์มได้มากกว่า 50% ในเวลา 8-24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามแม้ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดนี้จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่ายาออกซี่เตตราซัยคลิน แต่ถ้านำเปลือกต้นสำโรงมาผสมกับยาเตตรา-ซัยคลิน ก็สามารถจะช่วยลดปริมาณการใช้เตตราซัยคลินให้น้อยลง (ใช้ MIC ที่ต่ำกว่าเดิม คือ 0.156 -1.25 mg/ml) ซึ่งอาจจะไปช่วยลดความเป็นพิษต่อตับและไต หรือช่วยลดอุบัติการณ์การดื้อยาของผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย งานวิจัยนี้สอดคล้องกับการใช้สารสกัดจากเมล็ดกัญชา (*Cannabis sativa L.*) เมื่อใช้ความเข้มข้น 0.5 mg/ml-1 mg/ml สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* แต่งานวิจัยนี้ต้องใช้เปลือกต้นสำโรงในปริมาณสูงมาก คือ 80 mg/ml จึงจะสามารถยับยั้งการเกาะติดผิวของเชื้อ *S. aureus*[24] และนอกจากนี้ยังสนับสนุนงานวิจัยของสารสกัดจากใบแค *Sesbania grandiflora* ปริมาณ 40 µg สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ S. aureus[25] และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ resveratrol (10–50 µg /ml) สามารถยับยั้งกาสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli*[26]

ผู้วิจัยทำการศึกษา Time-kill assay ซึ่งได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อผสมเปลือกลำต้นสำโรงกับโพลีมิกซินบี โดยลดปริมาณลง เท่ากับ 1/2 MIC สามารถการยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* ดื้อยา ได้ดีเทียบเท่ากับการใช้ยาโพลีมิกซินบีเพียงอย่างเดียว เมื่อใช้ในช่วงต้น log phase แต่มีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ดื้อยา เปลือกลำต้นสำโรงสามารถยับยั้งเชื้อดื้อยาได้ดีที่สุดในบางช่วงเวลาคือตั้งแต่ 4 ถึง 6 ชั่วโมงเท่านั้น ดังนั้นอาจจะสามารถนำเปลือกลำต้นสำโรงมาผสมร่วมกับยาโพลีมิกซินบี แต่ต้องปรับปริมาณยาโพลีมิกซินบี และส่วนสกัดเอทานอลจากเปลือกลำต้นสำโรงอย่างเหมาะสมในการใช้ และควรต้องทดสอบความเป็นพิษ กับสัตว์ทดลองก่อนนำไปประยุกต์ใช้จริง การทดสอบนี้สนับสนุนงานวิจัยของ Boonyanugomol โดยพบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก *Zingiber cassumunar* ความเข้มข้น 7-9.24 mg/ml เมื่อผสมกับยากลุ่ม aminoglycosides, tetracycline และ fluoroquinolone สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา *S. aureus*[27] ดังนั้นการศึกษา time- kill assay ของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาทั้งสองสายพันธุ์ อาจจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาสมุนไพรชนิดอื่นมาทดแทนยาในกลุ่มโพลีมิกซิน บี เพื่อลดผลข้างเคียงและความเป็นพิษต่อไตของโพลีมิกซิน บี ในอนาคต

ผลการทดสอบความเป็นพิษของเปลือกต้นสำโรง แสดงให้เห็นว่าเปลือกต้นสำโรงที่สกัดด้วยเอทา-นอล ไม่ได้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบ แต่กลับไปส่งเสริมการแบ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ (RAW 264.7) ซึ่งแสดงผลแตกต่างกับวิจัยของการใช้สารสกัดเอทานอลจากเมล็ดของสำโรงที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง MG-63 osteosarcoma cell แสดงระดับความเป็นพิษ IC_{50} = 163 µg/ml[13] แต่การศึกษาครั้งนี้ใช้เปลือกต้นสำโรงที่สกัดด้วยเอทานอล กลับแสดงระดับความเป็นพิษต่ำกว่า คือค่า IC_{50} มากกว่า 500 µg/ml) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ส่วนประกอบของต้นสำโรงที่แตกต่างกัน อาจจะแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษที่แตกต่างกัน เช่น เปลือก ใบ หรือเมล็ด จะแสดงความเป็นพิษที่แตกต่างกัน ในงานวิจัยนี้ใช้เปลือกของสำโรงที่สกัดด้วยเอทานอล แล้วมีแนวโน้มที่จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ซึ่งอาจจะเกิดจากสารบริสุทธิ์บางชนิดในสำโรง เช่น flavonoid และ phenolic acid อาจจะไปมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) เช่นเดียวกับสาร engeletin และ astilbin จากผลของ *Smilax corbularia* มีระดับความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) คือ IC_{50} >100 µg/ml[28] และแสดงผลการวิจัยที่แตกต่างจากงานวิจัยของการใช้ส่วนสกัดจากใบของสำโรงที่สกัดด้วยเฮกเซน สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งเต้านม 4T1 cell แสดงค่า IC50 of 34.65 µg/ml[29] ซึ่งปกติ RAW 264.7 มักถูกใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาการต้านการอักเสบ หรือลดการหลั่งของไซโต-ไคน์ต่าง ๆ ดังนั้นการใช้เปลือกสำโรงอาจจะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ควบคู่กับการยับยั้งการเจริญและการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้จะทำการยืนยันผลของเปลือกต้นสำโรงต่อการต้านการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจในลำดับต่อไป นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากสำโรงจะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของการนำสารสกัดจากสำโรงมาใช้จริง เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการวิจัยในห้องปฏิบัติการ (in vitro test) ได้ใช้ปริมาณของสารสกัดเปลือกสำโรงมาใช้ยับยั้งการเจริญและการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย ในปริมาณสูงมาก (40-80 mg/ml) จึงควรจะนำความเข้มข้นระดับนี้ไปทดสอบความเป็นพิษกับสัตว์ทดลอง ถึงแม้เปลือกสำโรงปริมาณที่ต่ำนี้จะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ (31.25-1000 µg /ml)

ดังนั้นงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสำโรงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ สามารถลดการสร้างไบโอฟิลม์ของแบคทีเรีย สามารถเสริมฤทธิ์กับยาโพลีมิกซินบีในการยับยั้งแบคทีเรียดื้อย และการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น ใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียแทนสารเคมีที่เป็นอันตราย เช่น ไทรโคซาน หรือเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณานำเปลือกต้นสำโรงมาเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคที่ติดเชื้อ

จากแบคทีเรียดื้อยา เพื่อลดปริมาณการใช้ยปฏิชีวนะ และลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะ แต่ควรมีการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ให้สัมพันธ์กับความเป็นพิษ และความปลอดภัยของสารสกัดในสัตว์ทดลองก่อนนำมาใช้ในการรักษาจริง

สรุป

ส่วนสกัดเอทานอลจากเปลือกต้นสำโรง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 และ *P. aeruginosa* ดื้อยา และสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ดังกล่าวได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำส่วนสกัดเปลือกต้นสำโรงมาผสมกับยาโพลีมิกซินบี สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดื้อยาคือ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* ในช่วงต้น log phase และพบว่าส่วนสกัดเปลือกสำโรงมีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) IC_{50}>500 µg/ml

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีววิทยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำวิจัย โรงพยาบาลศูนย์ชลบุรี จังหวัดชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา และภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

เอกสารอ้างอิง

1. Schroeder M, Brooks BD, Brooks AE. The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. Gene 2017;8(39):3-23.
2. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS Microbiology 2018;26(4):482-501.
3. Kumar S, Singh B. An overview of mechanisms and emergence of antimicrobial drug resistance. Advances in Animal and Veterinary Sciences 2013; 1(2S):7-14.
4. Dhama K, Chakraborty S, Mahima, Wani MY, Verma AK, Deb R, et al. Novel and emerging therapies safeguarding health of humans and their companion animals: a review. Pakistan Journal of Biological Sciences 2013;16:101-11.
5. Qureshi ZA, Hittle LE, O'Hara J A, Rivera JI, Syed A, Shields RK, et al. Colistin-resistant Acinetobacter baumannii beyond carbapenem resistance. Clinical Infectious Disease 2015;60(9):1295-303.
6. Subramani R , Narayanasamy M , Feussner KD Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. Biotechnology 2017;7(3):172. doi: 10.1007/s13205-017-0848-9.
7. Cowan MM. Perspective on plant products as antimicrobials agents: a review. Phamacolodia 2013;4(7):469-548.
8. Cheesman MJ, Ilanko A, Blonk B, Cock IE. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? Pharmacognosy Reviews 2017;11(22):57-72.
9. Septama AW, Panichayupakaranant P. Synergistic effect of artocarpin on antibacterial activity of some antibiotics against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, and Escherichia coli. Pharmaceutical Biology 2016;54(4):686-91.
10. Khatoon A, Mohapatra A, Satapathy KB. Studies on in vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of Sterculia foetida L. bark. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2016;7(7):2990-5.
11. El-Sherei MM, Ragheb AY, Kassem MES, Marzouk MM, Mosharrafa SA, Saleh NAM. Phytochemistry, biological activities and economical uses of the genus Sterculia and the related genera: a review. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2016;6:492-501.

12. Shamsundar SG, Paramjyothi S. Preliminary pharmacognostical and phytochemical investigation on Sterculia foetida Linn. Seeds. African Journal of Biotechnology 2010;9(13):1987-9.
13. Jafri A, Bano S, Rais J, Khan F, Shivnath N, Sharma AK. Phytochemical screening of Sterculia foetida seed extract for anti-oxidant, anti-microbial activity, and detection of apoptosis through reactive oxygen species (ROS) generation, mitochondrial membrane potential (MMP) decrease, and nuclear fragmentation in human osteosarcoma cells. Journal of Histotechnology 2019;42(2): 68-79.
14. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim H. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future Medicinal Chemistry 2015;7(4):493-512.
15. Clinical & Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. Wayne, PA: CLSI; 2017.
16. Awolola GV, Koorbanally NA, Chenia H, Shode FO, Baijnath H. Antibacterial and antibioflim activity of flavonoids and triterpenes isolated from the extracts of Ficus Sansibarica WARB. SUBSP. Sansibarica (Moraceae) extract. Material and Methods Collection of plant material 2014;11(3): 124-31.
17. Sedlarik V, Galya T, Sedlarikova J, Valasek P, Saha P. The effect of preparationtemperature on the mechanical and antibacterial properties of poly (vinyl alcohol) silver nitrate films. Polymer Degradation and Stability 2010;95:399-404.
18. Shappell NW. Ergovaline toxicity on Caco-2 cells as assessed by MTT, alamar Blue, and DNA assays. In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal 2003;39(7):329-35.
19. El-Sherei M, Ragheb AY, Kassem MES, Marzouk MM, Mosharrafa SA, Saleh NAM. Phytochemistry, biological activities and economical uses of the genus Sterculia and the related genera: a review. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2016;6: 492-501.
20. Vital PG, Velasco RN, Demigillo JM, Rivera WL. Antimicrobial activity, cytotoxicity, and phytochemical screening of Ficus septica Burm and Sterculia foetida L. leaf extracts. Journal of Medicinal Plants Research 2010;4:58-63.
21. Kim N, Pham T, Nguyen TD, Doan TDC, Ha TD, Tran NMA, et al. Stercufoetin A, new oleanane-type triterpenoid from the leaves of Sterculia foetida L. Natural product Research 2021;35(7):1226-31.
22. Gupta PD, Birdi TJ. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine 2017;8:266-75.
23. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sin TH. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future Medicinal Chemistry 2015;7(4):493-512.
24. Frassinetti S, Gabriele M, Moccia E, Longo V, Gioia DD. Staphylococcus aureus and growth effects on probiotic Lactobacillus spp. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 2020;124:109149.
25. Gandhi AD, Vizhi DK, Lavanya K, Kalpana VN, Rajeswari VD, Babujanarthanam R. In vitro anti-biofilm and anti-bacterial activity of Sesbania grandiflora extract against Staphylococus aureus. Biochemistry and Biophysics Report 2017;12:193-7.
26. Lee JH, Kim JG, Raorane CJ, Ryu SY, Shim JJ, Lee J.. The anti-biofilm and anti-virulence activities of trans-resveratrol and oxyresveratrol against uropathogenic Escherichia coli. The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research 2019;35(7):758-67.

27. Boonyanugomol W, Kraisriwattana K, Rukseree K, Boonsam K, Narachai P. In vitro synergistic anti-bacterial activity of the essential oil from Zingiber cassumunar Roxb against extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii strains. Journal of Infection and Public Health 2017;10(5):586-92.
28. Ruangnoo S , Jaiaree N, Makchuchit S, Panthong S, Thongdeeying P, Itharat A. An in vitro inhibitory effect on RAW 264.7 cells by anti-inflammatory compounds from Smilax corbularia Kunth. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology 2012; 30(4):268-74.
29. Rollando R, Warsito W, Masruri M, Widodo W. Sterculia foetida Leaf fraction against matrix met-alloproteinase-9 Protein and 4T1 breast cancer cells: In-vitro and In-Silico Studies. Tropical Journal of Natural Product Research 2021;5(1):113-21.