นิพนธ์ต้นฉบับ
Original Article

การเสริมฤทธิ์กันของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol จากไคร้ ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งแบคทีเรียฉวยโอกาส

วิสาตรี คงเจริญสุนทร วท.ม., Ph.D., วารี เนื่องจำนงค์ วท.ม., Ph.D.**, อัสนีดา สาแม วท.ม.****

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาสของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่ได้จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนจากลำต้นของไคร้ *(Glochidion daltonii)* ผลการวิจัยพบว่า Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Serratia marcescens* มีค่าระหว่าง 128-512 μM จากนั้นนำมาศึกษาการเสริมฤทธิ์ของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol กับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและเตตราซัยคลิน และศึกษาเวลาที่เหมาะสม (Time-Kill Assay) ผลการวิจัยการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ พบว่า Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol สามารถเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (FICI เท่ากับ 0.28) และมีฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินหรือเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 (FICI เท่ากันคือเท่ากับ 1.007) จากการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินที่ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 พบว่าสามารถเสริมฤทธิ์กันได้ดีในชั่วโมงที่ 8 เมื่อผสมยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน เท่ากับ 1/16 เท่าของ MIC ของยา ร่วมกับ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol เท่ากับ 1/16 เท่าของ MIC ของสารเมื่อใช้เพียงชนิดเดียว ผลการศึกษาครั้งนี้พิสูจน์ให้เห็นว่า Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol จากไคร้ สามารถเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสบางสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol, แบคทีเรียฉวยโอกาส, การเสริมฤทธิ์, แอมพิซิลินและเตตราซัยคลิน

Synergistic Antibacterial Effect of Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol from Glochidion daltonii (MÜll. Arg.) Kurz. and Antibiotics on Opportunistic Bacteria

Wisatre Kongcharoensuntorn M.Sc., Ph.D.*, Waree Naengchomnong M.Sc., Ph.D.**, Asanida Samae M.Sc.***

Abstract

The objectives of this research were to test antibacterial activity of Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol, isolated from hexane extract from the stem of *Glochidion daltonii* (MÜll. Arg.) Kurz. against some opportunistic bacteria. The screening test of antibacterial activity showed that Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol could inhibit the growth of *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. marcescens* by MICs of 128-512 μM. Moreover, synergistic

* *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*
** *รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*
*** *นิสิตปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

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

Received : Feb 20, 2019 Revised : March 4, 2019 Accepted : June 30, 2019

effect and time kill assay was tested using Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol mixed with antibiotics against bacteria. The result revealed that Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol mixed with tetracycline indicated the best synergistic effect against *P. aeruginosa* ATCC 27853 with the FICI of 0.28. Moreover, the results indicated the indifferent effects against *E. coli* ATCC 25922 when using Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol, mixed with ampicillin or tetracycline and the result indicated equal FICIs as 1.007. The synergistic time of Lup-20(29)-ene-3α, 23-diol mixed with tetracycline which killed *P. aeruginosa* ATCC 27853 was at 8th hour. The best concentration for killing *P. aeruginosa* ATCC 27853 was 1/16 MIC of MIC alone of tetracycline combined with 1/16 MIC of MIC alone of Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol. The obtained result in this research indicated that Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol had an effective synergistic effect when mixed with tetracycline, and indicated synergistic effect against some opportunistic bacteria.

Keywords : Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol, Opportunistic Bacteria, Synergistic effect, Ampicillin and tetracycline

บทนำ

แบคทีเรียฉวยโอกาสจัดเป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ แต่มักก่อให้เกิดโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง และเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (hospital-acquired infection หรือ nomocomial infection) เช่น *Psudomonas aeruginosa, Serratia marcescens* และ *Acinetobacter baumannii* ที่มักก่อโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ และการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น ปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ ได้แก่ บาดแผลผ่าตัด การใส่สายสวนหรือเครื่องมือแพทย์เข้าสู่ร่างกาย และการพักรักษาตัวในโรงพยาบาลในระยะเวลายาวนาน[1,2] พบอุบัติการณ์การติดเชื้อสูง เช่น ในปี พ.ศ. 2553 พบการติดเชื้อในโรงพยาบาล 268,628 ครั้ง และพบการติดเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยาที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต 38,481 ราย[3] นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสเหล่านี้มักมีการพัฒนาการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพของยาที่ใช้รักษาลดน้อยลง หรือต้องเพิ่มปริมาณยาเพื่อใช้รักษา จากปัญหาเหล่านี้จึงจำเป็นต้องพัฒนายาชนิดใหม่ หรือหาทางเลือกใหม่เพื่อรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาส และมีนักวิจัยมากมายทำการคิดค้นหาสารจากธรรมชาติหรือจากสมุนไพรที่ใช้มาแต่โบราณ และมีประวัติการใช้ที่ปลอดภัย และไม่ได้เป็นสารสังเคราะห์ เพื่อมาใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้ใช้[4,5] ซึ่งมีงานวิจัยมากมายที่นำสารสกัดจากสมุนไพรมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เช่น Oleanolic acid ร่วมกับยาปฏิชีวนะคานามัยซิน ยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii*[6] ยาปฏิชีวนะแวนโคมัยซินร่วมกับ Ursolic acid สามารถยับยั้งการเจริญของ *Stapphylococcus aureus*[7] เป็นต้น ซึ่งการนำสารบริสุทธิ์ที่ได้จากพืชมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะอาจจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษาลง

ไคร้ *(Glochidion daltonii)* เป็นพืชวงศ์ Euphorbiaceae พบสารพฤกษเคมี ได้แก่ สารกลุ่มแทนนิน ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ อัลคาลอยด์ และสารกลุ่ม Lupane คือ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol[8] สารพฤกษเคมีจากไคร้บางชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น *P. aeruginosa,* MRSA, *E. coli, Aspergillus fumigates* และ *Candida albicans* (MIC 7.81, 3.9, 0.24, 3.9 และ 0.98 µg/ml ตามลำดับ)[9] และบางรายงานการวิจัยพบว่า Lupane มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli, P. aeruginosa, Bacillus cereus, S. aureus, Salmonella paratyphi, Salmonella typhi, และ Klebsiella pneumoniae* เป็นต้น และพบว่าสารบริสุทธิ์ในไคร้หลายชนิดมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียเทียบเท่ากับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน[10] นอกจากนี้สารบริสุทธิ์จากไคร้ เช่น Glochidone และ Lupeol มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดและเซลล์มะเร็งปอด[11] หรือ Lupeol ที่พบจากส่วนลำต้นของ *Allanblackia monticola* สามารถลดอาการอักเสบ[12] และที่สำคัญ Lupeol จากมะเดื่อ *(Ficus pseudopalma blanco)* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[13] นอกจากนี้ Lupane จากมะเดื่ออุทุมพร *(Ficus racemose)* สามารถต้านอนุมูลอิสระ มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 4.5-5.8 µg/mL[14] เป็นต้น จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารกลุ่ม Lupane นี้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านมะเร็ง ลดการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการนำ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol มาศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระ เพราะอาจจะช่วยลดการติดเชื้อจุลินทรีย์และการใช้ยาปฏิชีวนะให้น้อยลง เพราะธรรมชาติของการติดเชื้อแบคทีเรียจะทำให้เซลล์ร่างกายเครียด ทำให้เนื้อเยื่อถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ และทำให้เม็ดเลือดขาวทำงานผิดปกติ ดังนั้นการลดอนุมูลอิสระร่วมกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย อาจจะช่วยลดการทำลายเนื้อเยื่อที่อักเสบและทำให้เม็ดเลือดขาวทำงานปกติ เพิ่มประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะ ก็จะส่งผลให้การรักษาผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น[2,4] นอกจากนี้งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol

มาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะเพื่อช่วยเสริมฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาส

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ที่ได้จากต้นไคร้ และศึกษาการเสริมฤทธิ์ของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาส ซึ่งผลการศึกษานี้อาจเป็นแนวทางในการนำสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรมาใช้แทนยาปฏิชีวนะ และเพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ส่งผลให้สามารถลดการนำเข้ายาปฏิชีวนะจากต่างประเทศ เพิ่มมูลค่าให้สมุนไพรไทย และพิสูจน์ให้เห็นว่าสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรสามารถเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้

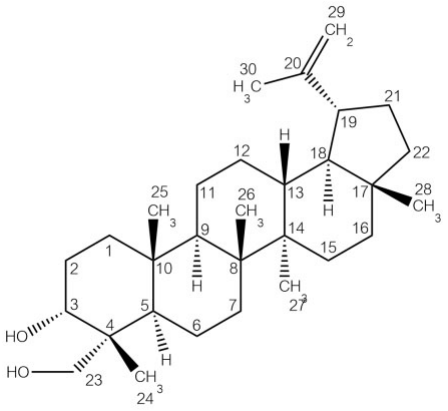
วิธีการศึกษาและวัสดุอุปกรณ์

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาปฏิชีวนะ (รหัส 1-375/04-2013) ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลชลบุรี แบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกชนิดอื่น ๆ เช่น *E. coli* ATCC 25922, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. marcescens* และ *S. aureus* ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สูตรโครงสร้างของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol

Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol แยกได้จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของลำต้นไคร้ (*Glochidion daltonii* (MÜll. Arg.) Kurz.) (รหัสพรรณไม้ BKF147874) ที่เก็บมาจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 1[8]



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของ Lup-20(29-)-ene-3α, 23-diol

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้นที่เหมาะสม เช่น 1-10 µg/mL ในเมทานอล ผสมกับสารละลาย DPPH radical ในเมทานอลความเข้มข้น 0.2 mM เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm (ทดสอบ 3 ซ้ำ) ใช้สาร Butylated hydroxytoluene (BHT) เป็นสารควบคุม จากนั้นทำการคำนวณ % radical scavenging และคำนวณหาค่า IC_{50} จากผลการทดลองที่ได้โดยคำนวณหา % radical scavenging ดังวิธีของ Mokbel and Hashinaga[15]

1.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP นำสารตัวอย่างความเข้มข้น 100 ppm ในเอทานอล มาผสมกับ FRAP reagent 300 mM เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm (ทดสอบ 3 ซ้ำ) เปรียบเทียบกับ BHT คำนวณค่าดูดกลืนแสงตามวิธีของ Mokbel and Hashinaga[15]

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Agar Diffusion Susceptibility Test

นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบ คือ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. marcescens*, *S. aureus* และ MRSA มาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 (1.5 x 10^8 CFU/ml) ปริมาตร 1 mL ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA, Becton Dickinson, USA) 19 mL เทใส่จานเพาะเชื้อ จากนั้นเจาะหลุมในอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 cm เพื่อใส่สารทดสอบคือ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ที่มีความเข้มข้นลดลงสองเท่า คือ 2-2048 µM ตามลำดับ หยอดลงในหลุมที่เจาะไว้ปริมาตร 40 µL ในการทดลองนี้ใช้ Dimethyl sulfoxide (DMSO) และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตรเท่ากันเป็นชุดควบคุม แล้วนำ MHA ที่ผสมเชื้อและสารทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการทดสอบกับ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน (2-2048 µM) จากนั้นนำผลการทดสอบมาวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้ง (Inhibition zone) เป็นเซนติเมตร นำไปบันทึกผลการทดลอง และหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแล้วนำมาหาค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ หรือ MIC[16]

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ร่วมกับยาปฏิชีวนะ (Synergistic effect)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย ทำเช่นเดียวกับการทดลองหา

ค่า MIC แต่เติม Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (2-2048 µM) ที่ผสมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน ปริมาตรอย่างละ 20 µL โดยวางแผนการผสม Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol กับยาปฏิชีวนะด้วย Checkerboard assay[17] โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และ DMSO เพื่อเป็นชุดตัวควบคุม จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองและหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วนำมาหาค่า MIC Combination และดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม Fractional Inhibitory Concentration Indices (FICI)

ค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index) คือ ค่าประสิทธิภาพร่วมเมื่อใช้ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ร่วมกับยาปฏิชีวนะแปลผลทดสอบดังตารางที่ 1[17]

ตารางที่ 1 การแปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI

ค่า FICI	การแปลผล
FICI ≤ 0.5	เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic)
0.5 < FICI < 1	เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partially synergistic)
FICI = 1	มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (Additive)
1 < FICI ≤ 4	ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent)
FICI > 4	ต้านฤทธิ์กัน (Antagonistic)

การศึกษาผลของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ผสมยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบต่อหน่วยเวลา (Time-Kill Curve Assay)

นำเชื้อแบคทีเรียมาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 ($1.5x10^8$ CFU/ml) ปริมาตร 100 µL เติมในอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 2.8 mL และเติม Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol และยาปฏิชีวนะรวม 100 µL (ปริมาตรรวมเท่ากับ 3 mL) การศึกษา Growth curve นี้จะใช้ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ปริมาตร 50 µL ผสมสารทดสอบ 50 µL จากนั้นผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำมาทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใส่เชื้อแบคทีเรียกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หรือชุดที่ผสมแบคทีเรียกับ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol หรือยาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียว จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37˚C เก็บตัวอย่างเชื้อในชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 และ 48 ตามลำดับ เพื่อมานับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิต โดยการเจือจางตัวอย่างเชื้อให้มีจำนวนลดลง 10 เท่า (Serial Dilution 1:10) ด้วย NaCl 0.85 % (sterile 0.85 normal saline) จากนั้นนำเชื้อที่เจือจางแล้วมา Spread Plate บนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิต นำจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและค่า log10 จำนวนเซลล์ (CFU/ml) แล้วนำมาหาค่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (The effectiveness antibacterial activity; EAA)[18]

$$\% \text{ EAA} = \frac{N_0 - N_S}{N_0} X100$$

EAA = ประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

N_0 = จำนวนแบคทีเรียของชุดควบคุม (log10 CFU/ml)

N_S = จำนวนแบคทีเรียของชุดทดลอง (log10 CFU/ml)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab V.17 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของสารทดสอบ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol กับค่าเฉลี่ยของ Inhibition Zone ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทิศทางเดียว (one way ANOVA) และวิเคราะห์ประสิทธิภาพ การออกฤทธิ์ร่วมกันของสารทดสอบและยาปฏิชีวนะด้วยแฟคเทอเรียลในแผนแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (Factorial Experiment in a Randomized Complete Block Design)

ผลการศึกษา

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol พบว่า ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH เพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามความเข้มข้นของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol โดยมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH อยู่ในช่วง 35.30-37.98 % (ในช่วงความเข้มข้น 0.3125-10 µg/mL) และสามารถกำจัดอนุมูล DPPH สูงสุด เท่ากับ

37.98 % ที่ความเข้มข้นของสารทดสอบเท่ากับ 5 µg/mL และพบว่า Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ให้ค่ากำจัดอนุมูลต่ำกว่าสารมาตรฐาน (BHT มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0023 mg/mL) และเมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol พบว่า สามารถรีดิวซ์ไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) ได้เล็กน้อย โดยมีค่า FRAP value เท่ากับ 0.78 ± 0.31 มิลลิกรัมของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของสารทดสอบ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารทดสอบ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลที่ต่ำกว่าสารมาตรฐานคือ BHT (15.43 มิลลิกรัมของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของ BHT)

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Agar Diffusion Susceptibility Test

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาสเบื้องต้นของสารทดสอบ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol พบว่า Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบคือ *S. marcescens* ได้ดีที่สุด (MIC เท่ากับ 128 µM) ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดีรองลงมา (MIC เท่ากับ 512 µM) แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ และพบว่า Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกคือ *S. aureus* และ MRSA แสดงดังตารางที่ 2 และจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้ง (Inhibition zone) ของแบคทีเรียฉวยโอกาสทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าความเข้มข้นของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol สูงขึ้น ให้ค่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้งสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p - value < 0.05) (ไม่ได้แสดงผล)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสทั้ง 6 สายพันธุ์

กลุ่มแบคทีเรีย	ค่า MIC (µM)			
	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol	ยา แอมพิซิลลิน	ยาเตตราซัยคลิน
แกรมลบ	*E. coli* ATCC 25922	512	32	16
	P. aeruginosa ATCC 27853	512	64	64
	P. aeruginosa สายพันธุ์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ	>2048	>2048	>2048
	S. marcescens	128	64	64
แกรมบวก	*S. aureus*	>2048	64	64
	MRSA	>2048	64	64

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. marcescens* ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ไปทดสอบการเสริมฤทธิ์ และผลการออกฤทธิ์แสดงให้เห็นว่าสารทดสอบ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol สามารถเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินได้ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 มีค่า FICI = 0.28 (ตารางที่ 3) แต่เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ (ไม่สามารถนำมาหาค่า MIC Combination แสดงดัง

ตารางที่ 2) และยังแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ร่วมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน หรือใช้ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน เพื่อยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 จะแสดงผลที่ไม่แตกต่างจากการใช้ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol หรือยาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียว (แสดงค่า FICI เท่ากันคือ 1.007) และ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินจะแสดงผลไม่แตกต่างกับการใช้ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol หรือยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินเพียงชนิดเดียวในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *S. marcescens* (แสดงค่า FICI = 2.125) (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามพบการต้านฤทธิ์กันของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol กับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* (ค่า FICI = 4.125) และพบข้อสังเกตจากการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol สามารถลดปริมาณการใช้ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ให้ลดลง 1/16 ถึง 1/128 เท่าของค่า MIC เดิมของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol (ตารางที่ 4) แต่ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol กลับไม่ได้ช่วยลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol กับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส

สายพันธุ์แบคทีเรีย	Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol + ยาแอมพิซิลลิน		Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol + ยาเตตราซัยคลิน	
	ค่า FICI	แปลผล	ค่า FICI	แปลผล
E. coli ATCC 25922	1.007	ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว	1.007	ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว
P. aeruginosa ATCC 27853	-	-	0.28	เสริมฤทธิ์กัน
S. marcescens	4.125	ต้านฤทธิ์กัน	2.125	ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol จากไคร้ และยาปฏิชีวนะเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะชนิดเดียว

ยาปฏิชีวนะ	MIC_{Co}/MIC_{alone}	
	Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol	ยาปฏิชีวนะ
E. coli ATCC 25922		
แอมพิซิลลิน	4/152	32/32
เตตราซัยคลิน	4/152	16/16
P. aeruginosa ATCC 27853แอมพิซิลลิน	-	-
เตตราซัยคลิน	16/152	16/64
S. marcescens		
แอมพิซิลลิน	16/128	256/64
เตตราซัยคลิน	16/128	128/64

MIC_{co} หมายถึง ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารทดสอบกับยาปฏิชีวนะ

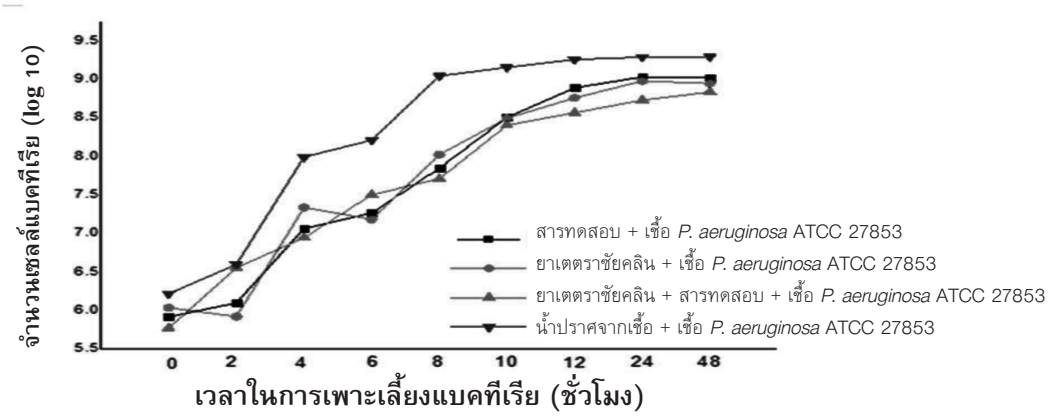
MIC_{alone} หมายถึง ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ของสารทดสอบ

- หมายถึง ไม่สามารถหาสัดส่วนได้ เนื่องจากไม่มีค่า MIC

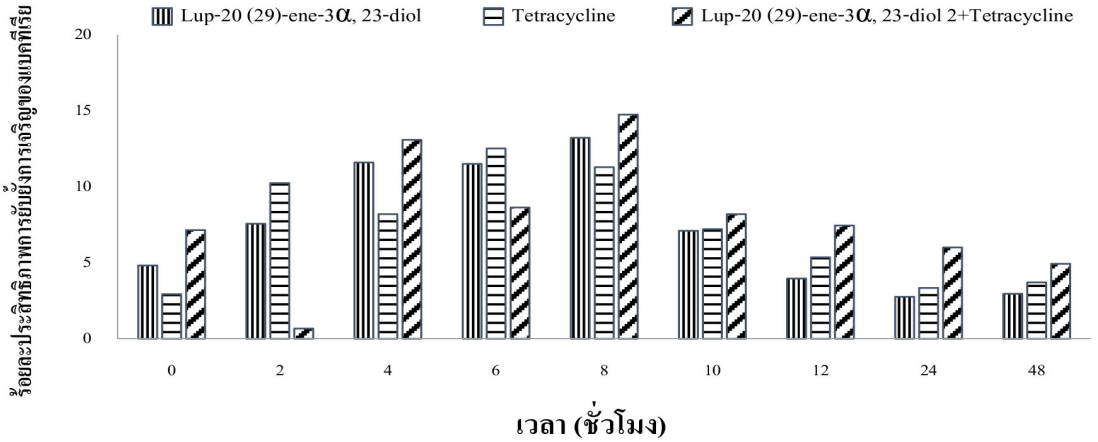
การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเมื่อใช้ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินต่อหน่วยเวลา

สารทดสอบ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol และยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน เสริมฤทธิ์กันได้ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol และยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดมาผสมกัน เพื่อหาจุดเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol และเตตราซัยคลิน ยังคงออกฤทธิ์ร่วมกันได้ดีที่สุด ทั้งนี้เพื่อลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งได้เลือกใช้ยาเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น 4 μM (1/16 เท่าของ MIC ของยา) ผสมกับ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ที่ความเข้มข้น 32 μM (1/16 เท่าของ MIC ของสาร) ในการทดสอบของเตตราซัยคลินและ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol

ผลการทดสอบพบว่าเมื่อใช้ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน พบว่าสารทดสอบนี้ไม่ได้ช่วยลดระยะในการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินให้เร็วยิ่งขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด ที่ชั่วโมงที่ 8) (ภาพที่ 2) และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในชั่วโมงที่ 2 และ 6 แต่เมื่อใช้ร่วมกันแล้วสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และสามารถยับยั้งการเจริญได้ดีขึ้นไปเรื่อย ๆ และยับยั้งได้ดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินเพียงชนิดเดียวในช่วงเริ่มต้นของระยะ log phase (ชั่วโมงที่ 4-48) (ภาพที่ 2-3) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันต่ำกว่า 50% (ภาพที่ 3) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่า Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol สามารถเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน



ภาพที่ 2 ผลของสาร Lup 20 (29)-ene-3α, 23-diol จากไคร้ ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ต่อหน่วยเวลา



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบร้อยละของประสิทธิภาพของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ATCC 27853

วิจารณ์

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสาร Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol จากไคร้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่าสารมาตรฐาน คือ BHT ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของ Lupane ชนิดอื่น ๆ เช่น Lupeol จากมะเดื่อ *(Ficus pseudopalma blanco)*[13] และสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Lupane จากมะเดื่ออุทุมพร *(Ficus racemose)* (ค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 4.5-5.8 µg/mL) แต่ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol จากไคร้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่า[14] อย่างไรก็ตามแม้จะมีฤทธิ์ที่น้อยกว่าแต่อาจจะช่วยให้ลดความรุนแรงของการอักเสบในขณะติดเชื้อแบคทีเรียได้

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่า Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อบางสายพันธุ์ คือ *E. coli* ATCC 25922, *S. marcescens* และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ให้ค่า MIC ที่ต่ำกว่า (56.6-226.3 µg/mL) และให้ผลการยับยั้งที่ต่ำกว่า Lupane ที่สกัดได้จากผลของ *Acokanthera oppositifolia* ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa*, MRSA และ *E. coli* (MIC เท่ากับ 7.81, 3.9 และ 0.24 µg/mL)[9] และที่สำคัญคือ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 แต่ยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ เช่น อาจจะยับยั้งการคลายเกลียว DNA ของแบคทีเรีย[19] หรือทำให้ DNA ของแบคทีเรียแตกหัก หรือยับยั้งการสังเคราะห์ Macromolecular ของแบคทีเรีย[20] ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป

สาร Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol สามารถเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินได้ดีกว่าการเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และสามารถเสริมฤทธิ์เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (ค่า FICI เท่ากับ 0.28) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลสูงมาก และมีอัตราการดื้อยาสูงเช่นกัน อาจเป็นเพราะสาร Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ส่งเสริมให้ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น เช่น เสริมฤทธิ์กันทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียมีความไวในการตอบสนองต่อยามากขึ้น[11] หรือเสริมฤทธิ์กันเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ง่ายต่อการนำเข้ายา หรือช่วยนำพายาเตตราซัยคลินเข้าเซลล์แบคทีเรีย หรือยับยั้งการสร้างเอนไซม์ทำลายยาปฏิชีวนะที่แบคทีเรียสร้างขึ้น[18] หรือเสริมฤทธิ์กันไปขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์และยับยั้งการสังเคราะห์ DNA[20] อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าสาร Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ต้านฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ซึ่งอาจเกิดจากสาร Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol เข้าไปล้างฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย[1]

จากการศึกษา Time-kill Curve assay ของ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน กลับพบว่า การใช้ร่วมกับสาร Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ไม่ได้ช่วยลดระยะเวลาการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน แต่ไปช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดีขึ้น และสาร Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ทำให้การออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ยาวนานขึ้น ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4-48 (ให้ค่า EAA สูงขึ้น) และพบข้อสังเกตคือในชั่วโมงที่ 2 และ 6 การออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินร่วมกับ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol กลับทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญต่ำลง อาจเป็นเพราะเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 กำลังอยู่ในระยะที่ปรับตัวเพื่อดื้อต่อยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อนี้ลดต่ำลงและไม่คงที่

การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสาร Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol กับยาปฏิชีวนะในครั้งนี้อาจจะเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารกลุ่ม Lupane โดยการนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้มาใช้ในการศึกษาเชิงโมเลกุลขณะที่แบคทีเรียยังมีชีวิตอยู่ เช่น สาร Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol อาจจะส่งเสริมการนำพายาปฏิชีวนะเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้น (ด้วยเทคนิค Flow cytometry) การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสาร Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol สามารถเสริมฤทธิ์การทำงานของยาปฏิชีวนะ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสได้ในอนาคต และสารกลุ่ม Lupane อาจจะช่วยลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะ เพื่อลดผลข้างเคียงของการใช้ยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามในการเลือกใช้สาร Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ในปริมาณที่สูงอาจต้องคำนึงถึงความเป็นพิษเช่นกัน

ดังนั้นผลที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการนำสารบริสุทธิ์ที่ได้จากสมุนไพรมาใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียร่วมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาจจะช่วยรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสให้เห็นผลได้เร็วยิ่งขึ้น และอาจจะช่วยลดอุบัติการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเป็นเวลายาวนาน และเป็นการศึกษาเบื้องต้น เพื่อนำไปสู่การนำสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะในอนาคต ทั้งนี้อาจช่วยลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศที่มีราคาแพง หรืออาจนำสาร Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol ไปใช้เป็นส่วนผสมในเวชสำอางหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร อีกทั้งยังเป็นการส่งเสริมการอนุรักษ์คุณค่าของสมุนไพรไทยอีกทางหนึ่ง

สรุปผลการศึกษา

สาร Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ 3 สายพันธุ์ คือ *E. coli* ATCC 25922, *S. marcescens* และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และเมื่อนำ Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol มาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ พบว่า Lup-20 (29)-ene-3α, 23-diol สามารถเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินได้ดีกว่าการใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และให้ผลดีที่สุดในการเสริมฤทธิ์เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และผลการเสริมฤทธิ์นี้ได้ช่วยยืดระยะเวลาของการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน และเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งได้ดีขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ให้การสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์ และคณิตศาสตร์ (สควค.) ภาควิชาชีววิทยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำวิจัย ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สารบริสุทธิ์ และโรงพยาบาลศูนย์ชลบุรี จังหวัดชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา

เอกสารอ้างอิง

1. ภัทรชัย กีรติสิน. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : หจก. วี. เจ. พริ้นติ้ง ; 2552.
2. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspectives in Medicinal Chemistry 2014 ; 6 : 25-64.
3. ภาณุมาศ ภูมาศ, วิษณุ ธรรมลิขิตกุล, ภูษิต ประคองสาย, ตวงรัตน์ โพธะ, อาธร ริ้วไพบูรณ์, สุพลลิมวัฒนานนท์. ผลกระทบด้านสุขภาพและเศรษฐศาสตร์จากการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย: การศึกษาเบื้องต้น. วารสารวิจัยระบบสาธารณสุข 2555 ; 6 : 352-60.
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. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Phytonutrients andnutraceuticals in vegetables and their multidimensional medicinal and health benefits for humans and their companion animals: a review. International Journal of Biological Sciences 2014 ; 14 : 1-19.
6. Wang CM, Chen HT, Wu ZY, Jhan YL, Shyu CL, Chou CH. Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids Isolated from Alstonia scholaris. Molecules 2015 ; 21 : 1-11.
7. Hamza M, Nadir M, Mehmood, Farooq A. In vitro effectiveness of triterpenoids and their synergistic effect with antibiotics against Staphylococcus aureus strains. Indian Journal of Phamacology 2016; 48 : 1-5.
8. คีตาภัสร์ ก้อนทอง, วารี เนื่องจำนงค์. องค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของลำต้น Glochidion daltonii. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ฉบับพิเศษ การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 6 2557: 390-8.
9. El Sayed MA, Ezzat MS, Sabry MO. A new antibacterial lupene ester from the seeds of Acokanthera oppositifolia Lam. Natural Product Research 2016; 30 : 2813-8.
10. Siddique HR, Saleem M. Beneficial health effects of lupeol triterpene : a review of preclinical studies. Life Science 2011 ; 88 : 285-93.
11. Sakkrom P, Pompimon W, Meepowpan P, Nuntasaen N, Loetchutinat C. The effect of Phyllanthus taxodiifolius Beille extracts and its triterpenoinds studying on cellular energetic stage of cancer cells. American Journal of Pharmacology and Toxicology 2010 ; 5 : 139-44.
12. Nguemfo EL, Dimo T, Dongmo AB, Azebaze AGB, Alaoui K, Asongalem AE, et al. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of some isolated constituents from the stem bark of Allanblackia monticola Staner L.C (Guttiferae). Inflammopharmacology 2009 ; 17 : 37-41.
13. Santiago LA, Mayor ABR. Lupeol : an antioxidant triterpene in Ficus psuedopalma Blanco (Moraceae). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2014; 4 : 109-18.
14. Jain R, Rawat S, Jain SC. Phytochemicals and antioxidant evolution of Ficus racemosa root bark. Journal of Pharmacy Research 2013 ; 6 : 615-9.

15. Mokbel MS, Hashinaga F. Antibacterial and antioxidant activities of banana (Musa, AAA cv. Cavandish) fruits peel. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 2005 ; 1 : 125-31.
16. Clinical & Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. Document M100-S16. Wayne, PA: CLSI; 2006.
17. Padalia H, Chand S. Antimicrobial efficacy of different solvent extracts of Tagetes erecta L. flower, alone and in combination with antibiotics. Applied Microbiology: Open Access 2015 ; 1 : 1-10.
18. 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.
19. Gallo MBC, Sarachine MJ. Biological activities of lupeol. International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science 2009 ; 3 : 46-66.
20. Chung PY, Navaratnam P, Chung LY. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antimicrobial against Staphylococcus aureus strains. Annals of clinical Microbiology and Antimicrobials 2011 ; 10 : 1-6.