การเสริมฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ friedelin จากรักดำ (*Diospyros curranii* Merr.) ร่วมกับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส

Synergistic Antibacterial Effect of Friedelin from *Diospyros curranii* Merr. and Ampicillin Against Some Opportunistic Gram-Negative Bacteria

ปณิดา ขัดสงคราม[1], วารี เนื่องจำนงค์[2], และ วิสาตรี คงเจริญสุนทร[1]*

Panida Khatsongkram[1], Waree Naengchomnong[2] and Wisatre Kongcharoensuntorn[1]*

[1]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[2]*ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารบริสุทธิ์ friedelin จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากรักดำ ผสมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส คือ *Escherichia coli* ATCC 25913, *Acinetobacter baumannii* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (FIC) ของสารบริสุทธิ์และยาปฏิชีวนะ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution susceptibility test ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ 50% (minimal inhibitory concentration: MIC_{50}) ของแอมพิซิลลิน และ friedelin มีค่าระหว่าง 256.00-512.00 µM และ 512.00-1024.00 µM ตามลำดับ ค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วมของ friedelin ร่วมกับแอมพิซิลลิน ต่อเชื้อทดสอบเท่ากับ 0.25-2.00 การวิเคราะห์ฤทธิ์ร่วมกันของสารทั้งสองชนิดเมื่อเทียบกับสารเพียงชนิดเดียว พบว่า friedelin ร่วมกับแอมพิซิลลิน มีประสิทธิภาพ เสริมฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25913 ได้ดีกว่าเชื้อทดสอบอื่น โดยมีค่า FIC เท่ากับ 0.25 ผลการศึกษาครั้งนี้พิสูจน์ให้เห็นว่า friedelin จากรากรักดำ สามารถเสริมฤทธิ์ร่วมกับแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อแกรมลบฉวยโอกาสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : แบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส / friedelin / การเสริมฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย / ดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม

*Corresponding author. E-mail : wisatre@buu.ac.th

Abstract

The objective of this research was to compare synergistic effect of friedelin that isolated from hexane extract from the root of *Diospyros curranii* Merr., and ampicillin. The tests were conducted against opportunistic Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* ATCC 25913, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. To determine value of fractional inhibitory concentration (FIC), the broth dilution susceptibility test was designed for detecting synergistic effect. The results were shown that MIC_{50} of ampicillin and friedelin against all bacterial isolates were 256.00 to 512.00 μM and 512.00 to 1024.00 μM, respectively. The FICs of friedelin mixed with ampicillin were 0.25 to 2.00. Compared to individual drug, friedelin mixed with ampicillin was shown the best synergistic effect against *E. coli* ATCC 25913 with the FIC of 0.25. The results obtained here indicated that friedelin, isolated from the root of *D. curranii*, had an effective synergistic effect with ampicillin against opportunistic Gram-negative bacteria.

Keywords : opportunistic Gram-negative bacteria / friedelin / synergistic antibacterial effect / fractional inhibitory concentration

1. บทนำ

E. coli เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และเกิดท้องร่วงในผู้เดินทาง *Acinetobacter* มักแยกได้จากเลือด เสมหะ ผิวหนัง ของเหลวที่เยื่อหุ้มปอด และปัสสาวะ คนไข้ที่ติดเชื้อ *Acinetobacter* ในกระแสเลือด มักมาจากเครื่องมือสวนหลอดเลือด นอกจากนี้เชื้อดังกล่าวยังฉวยโอกาสก่อโรคในคนที่มีแผลไหม้หรือภูมิคุ้มกันบกพร่อง *Pseudomonas* sp. เป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันร่างกายผิดปกติ และเป็นสาเหตุให้มีการติดเชื้อในโรงพยาบาลเพิ่มขึ้น สายพันธุ์ของ *Acinetobacter* และ *Pseudomonas* มักดื้อต่อยาปฏิชีวนะ จึงเป็นปัญหาในการรักษา (นงลักษณ์, 2547; De Kievit et al., 2001; Horrevorts et al., 1995) ปัจจุบันมีการใช้ยาต้านจุลินทรีย์กันอย่างแพร่หลาย จนเชื้อมีการปรับตัวให้ดื้อต่อฤทธิ์ยาเพื่อความอยู่รอด จึงทำให้ไม่สามารถรักษาโรคติดเชื้อให้หายขาด นอกจากนี้สาเหตุอาจเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะไม่ครบจำนวน ไม่ถูกวิธี ทำให้ต้องคิดค้นใหม่ จึงต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงขึ้นในการรักษาโรค (Abd El-Kalek & Eman, 2012) ดังนั้นการนำสมุนไพรมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคติดเชื้อดื้อยา เนื่องจากสมุนไพรเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่ใช้ในชีวิตประจำวัน หาได้ง่าย ราคาถูก (Hemaiswarya et al., 2008) ดังนั้นการนำความรู้จากภูมิปัญญาแพทย์แผนไทยมาประยุกต์ใช้ร่วมกับขบวนการทางวิทยาศาสตร์เพื่อค้นหาศักยภาพของสมุนไพรในการใช้รักษาโรคติดเชื้อที่ดื้อยา จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งซึ่งจะช่วยให้การค้นคว้าวิจัยหายาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ ๆ ประสบความสำเร็จได้ง่ายขึ้น และช่วยให้การใช้พืชสมุนไพรเป็นยารักษาโรค เป็นที่ยอมรับของบุคคลทั่วไปทั้งในและต่างประเทศ

รักดำ (*Diospyros curranii* Merr.) พืชในวงศ์ Ebenaceae สกุล *Diospyros* เป็นไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่ม เปลือกมักเป็นสีดำ ใบเดี่ยว เรียงสลับ (เต็ม, 2544) พืชในสกุล *Diospyros* มีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจำนวนมาก ได้แก่ แคโรทีนอยด์ แทนนิน น้ำตาล ไฮโดรคาร์บอน ลิพิด อะโรมาติก ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ สเตียรอยด์ และแนฟโทควิโนน โดยพบ triterpenes (กลุ่มเทอร์พีนอยด์) มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของพืชทั้งหมดในสกุล *Diospyros* ซึ่งพบได้ในทุกส่วนของพืช แต่พบมากที่สุดในใบและแก่นไม้ ตามลำดับ triterpenes ที่พบใน *D. curranii* ได้แก่ Lupeol, Betulin และ Betulinic acid (Mallavadhani et al., 1998) มีรายงานว่า friedelin ที่สกัดจาก *Calophyllum brasiliense* จากทวีปอเมริกา มีฤทธิ์ต้านการเป็นพิษของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ PC3 และ U251 และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus, S. epidermidis* และ *Bacillus subtilis* (Reyes-Chilpa et al., 2004) friedelin จาก *Commiphora berryi* มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Kumari et al., 2011) friedelin จาก *Jatropha tanjorensis* สามารถยับยั้ง *B. cereus*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Aspergillus fumigatus* ได้ (Viswanathan et al., 2012) cholestanol, stigmasterol และ friedelin

จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากรักดำ (*D. curranii*) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25913, *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* (วิสาตรี และคณะ, 2556) งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดนำสารที่สกัดจากพืชมาเสริมฤทธิ์ร่วมกันหลายชนิดหรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ เพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาปฏิชีวนะ และลดอุบัติการณ์การดื้อยาของแบคทีเรีย

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารบริสุทธิ์ friedelin จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากรักดำ ผสมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส ด้วยวิธี Broth dilution susceptibility test เพื่อนำผลที่ได้จากการศึกษามาประกอบการพิจารณาในการนำสมุนไพรไทยมาพัฒนาใช้ควบคู่กับยาปฏิชีวนะ เพื่อรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อฉวยโอกาส และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานต่อยอดในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสมุนไพรชนิดนี้ต่อไป

2. วิธีการ

2.1 การเตรียมสารละลาย friedelin และยาแอมพิซิลลิน

เตรียม master stock ของ friedelin (มวลโมเลกุลเท่ากับ 428.00) ที่ความเข้มข้น 46,121.50 µM ในตัวทำละลาย DMSO จากนั้นเตรียม stock solution ที่ความเข้มข้น 2048.00 µM และเจือจาง stock solution โดยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ด้วยเทคนิค two-fold dilution เพื่อเตรียมสารละลาย friedelin ความเข้มข้น 1024.00, 512.00, 256.00, 128.00 และ 64.00 µM ส่วน master stock ของแอมพิซิลลิน (Merck, Germany) (มวลโมเลกุลเท่ากับ 371.40) เตรียมที่ความเข้มข้น 10^5 µM ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นเตรียม stock solution ที่ความเข้มข้น 2048.00 µM (760.62 µg/ml) และเจือจาง stock solution โดยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทำให้ได้แอมพิซิลลินความเข้มข้น 1024.00, 512.00, 256.00, 128.00 และ 64.00 µM (380.31, 190.16, 95.08, 47.54 และ 23.77 µg/ml ตามลำดับ)

2.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ 50% (MIC_{50}) ของ friedelin และ MIC_{50} ของแอมพิซิลลิน โดยวิธี Broth dilution susceptibility test (CLSI, 2006)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25913, *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ จำนวน 4-5 โคโลนี มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 2.00 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเทียบความขุ่นของเชื้อกับ McFarland No. 0.5 (เพื่อให้เชื้อมีปริมาณ 1.5 × 10^8 CFU/ml) เจือจางด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 % ผสมเชื้อที่เทียบความขุ่นแล้วปริมาตร 100.00 µl กับ MHB ปริมาตร 3.00 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง และเติม friedelin ความเข้มข้น 1024.00 µM ปริมาตร 100.00 µl เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันด้วย vortex นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยมีน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุม ทำการทดลองซ้ำจนครบทุกความเข้มข้น (64.00-1024.00 µM) สำหรับแอมพิซิลลินให้ทำการทดลองในทำนองเดียวกันกับ friedelin จากนั้นนับโคโลนีของแบคทีเรียด้วยวิธี serial dilutions โดยเจือจางสารที่ผสมเชื้อด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 % ให้มีความเข้มข้น 1:10^{-1}, 1:10^{-2}, 1:10^{-3}, 1:10^{-4} และ 1:10^{-5} µM นำหลอดที่มีความเข้มข้น 1:10^{-3}, 1:10^{-4} และ 1:10^{-5} µM อย่างละ 100.00 µl ใส่บนอาหาร NA ใช้ sterile spreader เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร แต่ละความเข้มข้นของเชื้อทำการทดสอบ 3 ซ้ำ รอให้แห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี แล้วหาค่าจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่างในหน่วย colony forming unit ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) ดังนี้

จำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง = A (Colony) × B (Dilution) × 10 หน่วยเป็น CFU/ml

A คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียบนจานอาหาร 3 จาน ที่ระดับการเจือจางเดียวกัน, B คือ ส่วนกลับของระดับการเจือจาง, 10 คือ ค่า factor ของปริมาตรของความเข้มข้นของแบคทีเรียที่รอดชีวิตทั้งหมดต่อแบคทีเรียที่นำมานับจริง

2.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ 50% (MIC_{50}) ของ friedelin ผสมกับแอมพิซิลลิน โดยวิธี Broth dilution susceptibility test (CLSI, 2006)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2 แต่ในขั้นตอนการผสมสารลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 3.00 ml และเชื้อที่เทียบความขุ่นแล้ว 100.00 µl ให้เปลี่ยนปริมาตรของสารละลาย friedelin เป็น 50.00 µl ผสมกับแอมพิซิลลิน ปริมาตร 50.00 µl วางแผนการทดลองแบบ checkerboard assay (Orhan et al., 2005) คือ ทำการทดสอบกับ friedelin และแอมพิซิลลินจนครบทุกคู่ความเข้มข้น (64.00-1024.00 µM) จากนั้นหาค่าจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่างในหน่วย CFU/ml เช่นเดียวกัน

2.4 การหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (fractional inhibitory concentration: FIC) (Mackay et al., 2000)

นำค่า MIC_{50} ที่ได้จากข้อ 2.2 และ 2.3 มาคำนวณ FIC ของแอมพิซิลลิน ดังนี้

FIC ของแอมพิซิลลิน = MIC_{50} ของแอมพิซิลลินที่ใช้ร่วมกับ friedelin / MIC_{50} ของแอมพิซิลลินอย่างเดียว

แปลผล FIC ≤ 0.50 คือ เสริมฤทธิ์กัน (synergy), 0.50 < FIC ≤ 4.00 คือ ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifference), FIC > 4.00 คือ ฤทธิ์ต้านกัน (antagonism)

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้โปรแกรมสถิติ SPSS 17 ออกแบบการทดสอบด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-Way ANOVA) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ friedelin และความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้น 1024.00, 512.00, 256.00, 128.00 และ 64.00 µM กับค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25913, *P. aeruginosa* และ *A. baumannii*

3. ผลและอภิปราย

การศึกษาประสิทธิภาพของ friedelin จากรากรักดำ หรือยาแอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส 3 ชนิด ได้แก่ *E. coli* ATCC 25913, *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* ให้ผลดังตารางที่ 1 และ 2 พบว่า friedelin และแอมพิซิลลิน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสทั้ง 3 ชนิดได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีระดับนัยสำคัญทางสถิติ โดยแอมพิซิลลินมีค่า MIC_{50} ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* เท่ากับ 128.00 µM และมีค่า MIC_{50} ต่อเชื้อ *A. baumannii* และ *E. coli* ATCC 25913 เท่ากัน คือ 1024.00 µM ส่วน friedelin มีค่า MIC_{50} ต่อเชื้อ *P. aeruginosa*, *A. baumannii* และ *E. coli* ATCC 25913 เท่ากับ 128.00, 256.00 และ 512.00 µM ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่พบว่า friedelin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli* และ *K. pneumoniae* (Reyes-Chilpa et al., 2004; Viswanathan et al., 2012; Yasunaka et al., 2005)

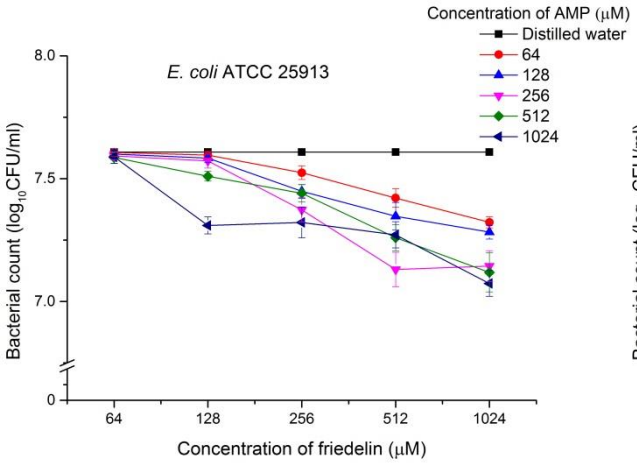
ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ของ friedelin และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25913, *A. baumannii* และ *P. aeruginosa*

สาร	ชนิดแบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรีย (โคโลนีx10^6±S.D.) ที่รอดจากการถูกยับยั้งด้วยสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (CFU/ml)						ค่า MIC_{50}
		1024.00 (µM)	512.00 (µM)	256.00 (µM)	128.00 (µM)	64.00 (µM)	H_2O	(µM)
friedelin	*E. coli* ATCC 25913	32.00±3.46	57.33±1.53	113.67±5.03	153.33±5.86	197.33±4.51	204.00±3.61	512.00
	A. baumannii	66.00±4.00	85.00±4.58	88.00±3.61	181.67±7.51	203.33±5.51	278.67±4.51	256.00
	P. aeruginosa	1.00±0.20	4.87±0.76	7.73±0.57	9.30±0.46	11.47±0.51	18.83±0.50	128.00
แอมพิซิลลิน	*E. coli* ATCC 25913	68.00±6.56	117.00±4.00	142.33±4.16	162.00±3.00	182.33±4.04	204.00±3.61	1024.00
	A. baumannii	72.33±7.57	135.00±9.54	114.00±7.00	152.00±6.56	250.00±6.24	278.67±4.51	1024.00
	P. aeruginosa	1.07±0.12	1.20±0.20	5.60±0.26	8.83±0.40	11.70±0.46	18.83±0.50	128.00

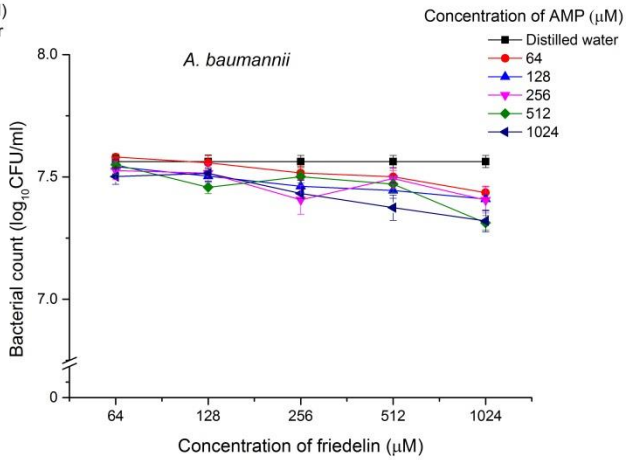
ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของ friedelin และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบบางสายพันธุ์

สาร	ความเข้มข้นต่ำสุดของสาร (µM) ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ 50%		
	E. coli ATCC 25913	*A. baumannii*	*P. aeruginosa*
friedelin	512.00	256.00	128.00
แอมพิซิลลิน	1024.00	1024.00	128.00

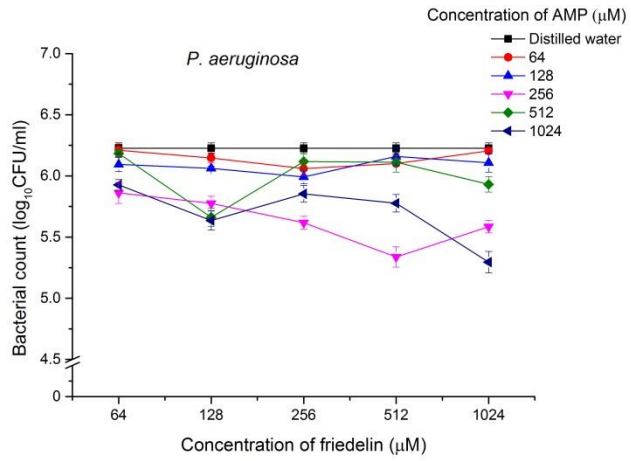
การศึกษาประสิทธิภาพของ friedelin จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากรักดำ ผสมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส 3 ชนิด ให้ผลดังภาพที่ 1, 2 และ 3 พบว่า friedelin มีประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์กับแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 ได้ดีกว่าเชื้อทดสอบอื่น เมื่อใช้แอมพิซิลลินความเข้มข้น 256.00 µM (95.08 µg/ml) คู่กับ friedelin ความเข้มข้น 512.00 µM (ภาพที่ 1) โดยให้ค่า FIC เท่ากับ 0.25 แสดงว่าเสริมฤทธิ์กัน ประสิทธิภาพรองลงมา คือ การยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* พบว่า เมื่อใช้แอมพิซิลลินความเข้มข้น 512.00 µM (190.16 µg/ml) คู่กับ friedelin ความเข้มข้น 1024.00 µM (ภาพที่ 2) ให้ค่า FIC เท่ากับ 0.50 แสดงว่าเสริมฤทธิ์เช่นเดียวกัน ส่วนเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่า เมื่อใช้แอมพิซิลลินความเข้มข้น 256.00 µM คู่กับ friedelin ความเข้มข้น 512.00 µM (ภาพที่ 3) ให้ค่า FIC เท่ากับ 2.00 แสดงว่าการใช้ friedelin ร่วมกับแอมพิซิลลิน มีฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้ friedelin หรือ แอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียว (indifference)



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง friedelin และแอมพิซิลลิน ในการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25913



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง friedelin และแอมพิซิลลิน ในการยับยั้ง *A. baumannii*



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง friedelin และแอมพิซิลลิน ในการยับยั้ง *P. aeruginosa*

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า friedelin จะเสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนั้น ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยาแอมพิซิลลิน และ friedelin เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดมีกลไกการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะแตกต่างกัน เช่น *P. aeruginosa* มีโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ซับซ้อน ทำให้เกิดการจำกัดการผ่านของยาปฏิชีวนะเข้าไปในเซลล์ (Nikaido, 1989) ในกรณีที่เสริมฤทธิ์กัน อาจเป็นเพราะ friedelin ช่วยเสริมกลไกการทำงานของแอมพิซิลลินในการรบกวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ คือ อาจเข้าจับกับเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างเพปทิโดไกลแคนบนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้ผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ เซลล์แตกง่าย (Bayles, 2000) หรือ friedelin ช่วยเสริมฤทธิ์กับแอมพิซิลลิน ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม β-lactams โดยอาจมีกลไกแบบเดียวกับยา tazabactam ที่ถูกพัฒนาขึ้นมาให้เป็น β-lactamase inhibitor ซึ่งถูกนำไปใช้ร่วมกับ piperacillin เพื่อเสริมฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ β-lactamase สามารถยับยั้งเชื้อกลุ่มแอโรบิก แอนแอโรบิกแบคทีเรีย และแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Pseudomonas* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp. (Gin et al., 2007; Mohanty et al., 2005) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hemaiswarya et al. (2008) ที่พบว่าสารสกัดจากพืชอาจทำงานร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactams ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-lactamase ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น หรือ friedelin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ และแอมพิซิลลินซึ่งเป็นยาในกลุ่มย่อยเพนิซิลลิน อาจเสริมกลไกกันคล้ายกับ pentacyclic triterpenoids (α-amyrin, betulinic acid และ betulinaldehyde) เมื่อใช้ร่วมกับเมธิซิลลิน ทำให้สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยาเมธิซิลลิน (Chung et al., 2011) นอกจากนี้ การวิจัยยังแสดงให้เห็นการลดปริมาณการใช้ยาแอมพิซิลลิน และเพิ่มการใช้ friedelin เพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ที่อาจดื้อยาแอมพิซิลลินในการทดลองนี้ เนื่องจากมีค่า MIC สูงกว่าค่า MIC cut-off ของแอมพิซิลลิน (8.00 μg/ml) (EUCAST, 2013)

4. บทสรุป

friedelin จากรากรักดำสามารถเสริมฤทธิ์ร่วมกับแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25913 ได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (FIC) เท่ากับ 0.25 รองลงมาคือ *A. baumannii* มีค่า FIC เท่ากับ 0.50 ส่วน *P. aeruginosa* พบว่าการใช้ friedelin ร่วมกับแอมพิซิลลิน มีฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้ friedelin หรือแอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม ควรมีการทดสอบความเป็นพิษและงานวิจัยด้านความปลอดภัยของ friedelin ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือวิจัย ภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ และสุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณโครงการ สควค. จาก สสวท. และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2547). *แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค* (พิมพ์ครั้งที่ 3 ปรับปรุงแก้ไข). กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

วิสาตรี คงเจริญศุนทร, วารี เนื่องจำนงค์ และ พนิดา อภิบาล. (2556). ฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์จากรักดำ (*Diospyros curranii*) ในการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, *41*(3), 731-743.

เต็ม สมิตินันทน์. (2544). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย* (พิมพ์ครั้งที่ 2). ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

Abd El-Kalek, H.H. and Eman, A.M. (2012). Synergistic Effect of Certain Medicinal Plants and Amoxicillin Against Some Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Pharmaceutical Applications*, *3*(3), 387-398.

Bayles, K.W. (2000). The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Microbiology, 8*(6), 274-278.

Chung, P.Y., Navaratnam, P. and Chung, L.Y. (2011). Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics Against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *10*, 1-6.

Clinical, & standard Institute. (2006). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement*. Document M100-S16. Wayne, PA: CLSI.

De Kievit, T.R., Parkins, M.D., Gillis, R.J., Srikumar, R., Ceri, H., Poole, K., et al. (2001). Multidrug Efflux Pumps: Expression Patterns and Contribution to Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45*(6), 1761–1770.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2013). *Cut-off values recommended by the EU Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance (EURL-AR)*. Retrieved from http://www.eurl-ar.eu/201-resources.htm#cutoff

Gin, A., Dilay, L., Karlowsky, J.A., Walkty, A., Rubinstein, E. and Zhanel, G.G. (2007). Piperacillin-tazobactam: a beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination. *Expert Rev Anti Infect Ther*, *5*(3), 365-383.

Horrevorts, A., Bergman, K., Kollee, L., Breuker, I., Tjernberg, I. and Dijkshoorn, L. (1995). Clinical and epidermiological investigations of *Acinetobacter* genomospecies 3 in a neonatal intensive care unit. *J. Clin Microbiol*., *33*, 1567-1572.

Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K. and Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, *15*(8), 639-652.

Kumari, R., Meyyappan, A., Selvamani, P., Mukherjee, J. and Jaisankar, P. (2011). Lipoxygenase inhibitory activity of crude bark extracts and isolated compounds from *Commiphora berryi*. *Journal of Ethnopharmacology*, *138*, 256-259.

Mackay, M.L., Milne, K. and Gould, I.M. (2000). Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *Int. J. Antimicrob. Agents*, *15*(2), 125-129.

Mallavadhani, U.V., Panda, A.K. and Rao, Y.R. (1998). Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros*. *Phytochemistry*, *49*(4), 901–951.

Mohanty, S., Singhal, R., Sood, S., Dhawan, B., Das, B.K. and Kapil, A. (2005). Comparative *in vitro* activity of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against Gram negative bacteria. *Indian J Med Res*, *122*, 425-428.

Nikaido, H. (1989). Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. *33*(11),1831-1836.

Orhan, G., Bayram, A., Zer, Y. and Balci, I. (2005). Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. *J. Clin Microbiol*., *43*(1), 140-143.

Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muniz, E., Apan, T.R., Amekraz, B., Aumelas, A., Jankowski, C.K., et al. (2004). Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences*, *75*, 1635-1647.

Viswanathan, M.B., Ananthi, .J.D.J. and Kumar, P.S. (2012). Antimicrobial activity of bioactive compounds and leaf extracts in *Jatropha tanjorensis*. *Fitoterapia*, *83*, 1153–1159.

Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Perez, L., Lopez-Villafranco, E., et al. (2005). Antimycobacterial activity of extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *Journal of Ethnopharmacology*, *97*, 293-299.