วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 28 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2566
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 28 (No.2) May – August 2023 บทความวิจัย

การเสริมฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรกับพืชสมุนไพร ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส

Synergistic Effect of *Andrographis paniculata* with Medicinal Plants to Inhibit the Growth of Opportunistic Bacteria

วิสาตรี คงเจริญสุนทร*, กนก กัวไวยกูล และ สุกัญญา ทองศรี

Wisatre Kongcharoensuntorn*, Kanok Kuawaiyakul and Sukanya Thongsri

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University

Received : 15 March 2022

Revised : 7 October 2022

Accepted : 24 October 2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ทำการสำรวจประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.Ex Nees) ที่ผสมกับสมุนไพรพื้นบ้าน 18 ชนิด การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญชองแบคทีเรีย พบว่าสมุนไพรพื้นบ้านทุกชนิดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* 25923 มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.625-80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่ายาอ๊อกซี่เตตตราซัยคลิน และแอมพิซิลลิน เมื่อนำฟ้าทะลายโจรมาผสมกับสมุนไพรหลายชนิดเพื่อเสริมฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่า ฟ้าทะลายโจรผสมกับฝาง มะระขี้นก มะปราง หรือดาวเรือง จะสามารถเสริมฤทธิ์กัน เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทุกสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าสมุนไพรที่นำมาผสมกับฟ้าทะลายโจรจะมีศักยภาพสูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (มีความไว 100%) และเมื่อนำคู่สมุนไพรที่ดีที่สุดคือ ฟ้าทะลายโจรผสมกับพลู หรือฟ้าทะลายโจรผสมกับฝาง มาทดสอบหาประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ด้วยวิธี Checkerboard assay พบว่าฟ้าทะลายโจรสามารถเสริมฤทธิ์กับพลู ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุด มีค่า FICI เท่ากับ 0.5 แต่เมื่อนำฟ้าทะลายโจรผสมกับฝาง จะต้านฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (FICI เท่ากับ 4.125) ดังนั้นงานวิจัยนี้เสนอแนะให้เห็นว่าฟ้าทะลายโจรสามารถเสริมฤทธิ์กับพลูเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

คำสำคัญ : สมุนไพรพื้นบ้าน ; การเสริมฤทธิ์ ; ฟ้าทะลายโจร ; แบคทีเรียฉวยโอกาส

Abstract

The research was screening therapeutic potentials of plant extracts of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.Ex Nees with eighteen medicinal plants. The results indicated that all medicinal plants had antibacterial activities against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* 25923 (MIC = 0.625-80 mg/mL). However, antibacterial activities of all medicinal plants were less than antibacterial activities of oxytetracycline and ampicillin. The synergism results of *A. paniculata* combined with several medicinal plants were revealed that *A. paniculata,* mixed with *Momordica charantia*, *Bouea macrophylla* or *Tagetes erecta*, showed the most effective synergy to inhibit the growth of tested bacteria. Moreover, the most antibacterial activities of therapeutic medicinal plants, mixed with *A. paniculate* were indicated against *P. aeruginosa* ATCC 27853 of which showed 100% susceptibility. Finally, *A. paniculata* mixed with *P. betle, and A. paniculata* mixed with *C. sappan*, shown the best synergy effect, were confirmed by Checkerboard assay. The synergistic results indicated that *A. paniculata,* mixed with *P. betle* showed the best synergistic effect against *S. aureus* ATCC 25923 of which FICIs was 0.5. However, there was an exceptionally antagonist of antibacterial activity when using *A. paniculata* mixed with *C. sappan* against *P. aeruginosa* ATCC 27853 (FICI= 4.125). This research suggests that *A. paniculate* has synergy effect when mixed with *P. betle* against bacteria.

Keywords : medicinal plants ; synergistic effect ; *Andrographis paniculata* ; opportunistic bacteria

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

บทนำ

โรคติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสในโรงพยาบาล เป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล เช่น การติดเชื้อ *Acinetobacter baumannii, Escherichia coli*, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ *P. aeruginosa* (Schroeder *et al.*, 2017; Nimer, 2022) หรือพบการติดเชื้อซ้ำซ้อนของแบคทีเรียฉวยโอกาสร่วมกับการติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 เมื่อผู้ป่วยต้องนอนรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน (Manna *et al.*, 2020) แบคทีเรียฉวยโอกาสเหล่านี้มักก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษา เพราะแพทย์ต้องเพิ่มปริมาณยาปฏิชีวนะและระยะเวลาในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา ทำให้การรักษาไม่ได้ผล แพทย์ต้องปรับวิธีรักษาโดยใช้ยาอนุพันธ์ที่สูงขึ้น ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงมาก และเพิ่มความเสี่ยงต่อโรคแทรกซ้อนตามมา แต่การค้นคว้าหายาต้านจุลชีพชนิดใหม่ต้องใช้เวลานาน ทำให้ขาดแคลนยาต้านจุลชีพ (Cheesman, *et al.*, 2017; Gupta & Birdi, 2017; Reygaert, 2018) ดังนั้นทางเลือกใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาส คือ การเลือกใช้วัตถุดิบที่มีในธรรมชาติ เช่น สารบริสุทธิ์หรือสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านที่มีประวัติการใช้รักษาโรคติดเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อนำมาปรับใช้ผสมกับยาปฏิชีวนะเพื่อลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะ ทำให้สามารถลดผลข้างเคียงของการใช้ยาปฏิชีวนะ และลดอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส (Septama and Panichayupakaranant, 2016; Subramani *et al.*, 2017)

ในประเทศไทยมีประวัติการใช้สมุนไพรพื้นบ้านมาใช้ในการรักษาโรคมายาวนาน แต่ยังขาดการตรวจสอบทางวิทยาศาสตร์ และในปัจจุบันโลกกำลังสนใจการใช้สมุนไพรในการพัฒนาเป็นยาเพื่อรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย หรือลดความรุนแรงของโรคติดเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากพืชสมุนไพรสามารถหาได้ง่าย ราคาถูก มีความเป็นพิษต่ำ มีประวัติการใช้มายาวนาน และมีการนำมาผสมร่วมกับยาปฏิชีวนะ ก็จะยิ่งเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดในสมุนไพร (Cheesman *et al.*, 2017; Gupta & Birdi, 2017) สมุนไพรในประเทศไทย มีหลากหลายชนิดที่พบรายงานการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย และการโรคติดเชื้อไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คือ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) สามารถฆ่าเชื้อไวรัสก่อโรค COVID19 (Enmozhi *et al.*, 2020; Sang-iamsuntorn *et al.*, 2020) เพราะพบสารประกอบ Andrographolide ที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนเอส ที่ใช้เกาะยึดผิวเซลล์ของเซลล์ของไวรัส SARS-COV-2 (M protein) (Enmozhi *et al.*, 2020) สาร andrographolide ที่สกัดได้จากฟ้าทะลายโจรส่งเสริมการกลืนกินของเม็ดเลือดขาวในหนูที่ติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Wen *et al.*, 2014) และยังพบรายงานวิจัยของฟ้าทะลายโจรที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus epidermidis* เป็นต้น (Zhang *et al.*, 2020) นอกจากนี้ฟ้าทะลายโจร ยังมีสรรพคุณยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และต้านอนุมูลอิสระ และลดการอักเสบ (Jayakumar *et al.*, 2013; Anurag *et al.*, 2017) และในปัจจุบันมีการนำฟ้าทะลายโจรมามีการใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อรักษาโรค COVID19 ซึ่งได้รับการบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2556 (Medical Device Control Division, Food and Drug Administration, 2013) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำฟ้าทะลายโจรมาเป็นส่วนผสมหลักร่วมกับสมุนไพรพื้นบ้านชนิดอื่น ๆ เพื่อเพิ่มศักยภาพของฟ้าทะลายโจรให้สามารถรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกับการลดผลแทรกซ้อนของการใช้ยาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียว เป็นต้น ด้วยฤทธิ์ของพืชสมุนไพรต่างๆ รวมกัน อาจจะสามารถช่วยกัน

ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกลไกที่แตกต่างกัน ดังการพัฒนานำฟ้าทะลายโจรมาปรับสูตรผสมกับสมุนไพรพื้นบ้าน ให้เป็นยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพ อาจจะช่วยทดแทน หรือช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะ และลดผลข้างเคียงของการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน ยกตัวอย่างสมุนไพรไทยชนิดอื่นๆ ที่มีสรรพคุณรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ โสน (*Sesbania javaica* Miq) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* (Anantaworasakul, 2017; Gandhi *et al.*, 2017) ฝาง (*Caesalpinia sappan* Linn.) ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* (Selvam *et al.*, 2012) พลู ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* and *S. aureus* (Hoque *et al.*, 2011; Mickymarry, 2019)

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อสำรวจฤทธิ์ของส่วนสกัดเอทานอลจากฟ้าทะลายโจรเมื่อนำมาผสมกับสมุนไพรพื้นบ้านชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของฟ้าทะลายโจรเมื่อนำมาผสมกับสมุนไพรพื้นบ้าน กับเมื่อนำมาผสมกับยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี Checkerboard assay ผลวิจัยที่ได้อาจจะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำสมุนไพรพื้นบ้าน มาพัฒนาเป็นยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียทดแทนยาปฏิชีวนะ

วิธีดำเนินการวิจัย

แบคทีเรียทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสที่นำมาศึกษาได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา)

สมุนไพรที่นำมาทดสอบ

สมุนไพรจำนวน 19 ชนิดเก็บตัวอย่างในช่วงปี 2560-2564 จากแหล่งต่างๆ ในจังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา และนครราชสีมา เป็นต้น และได้ทำการระบุสายพันธุ์โดย ดร. เบญจวรรณ ชีวปรีชา นักพฤกษศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยชั่งสมุนไพร 500 g นำมาสกัดด้วยตัวทำลาะลายชนิดต่างๆ (ดังตารางที่ 1) จำนวน 1500 mL จากนั้นนำไปประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator โดยปรับปรุงจาก วิธีของ Mishra, *et al*. (2013)

Table 1 Lists of sources and parts of 19 medicinal plants extracted by some solvents.

Common Name	Scientific Name	Source	Solvent extraction	Part tested
False Lime	*Suregada multiflora* (A. Juss) Baill.	Sri Thong Pharmacy Chonburi	methanol	Bark, Leaf
Rough Bindweed	*Smilax* spp.	Sri Thong Pharmacy Chonburi	methanol	Tuber
Jun-Par	*Dracaena loureiroi* Gagnep.	Sri Thong Pharmacy Chonburi	methanol	Heartwood
Nutmeg	*Myristica fragrans* Houtt.	Sri Thong Pharmacy Chonburi	methanol	Heartwood
Candle bush	*Senna alata (L.)* Roxb.	Sri Thong pharmacy Chonburi	methanol	Leaf and Flower
Snake jasmine	*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz	Sri Thong Pharmacy Chonburi	methanol	Peel, Stem and Leaf
Sappan Wood	*Caesalpinia sappan* L.	Sri Thong Pharmacy Chonburi	methanol	Heartwood
Chebulic myrobalan	*Terminalia chebula* Retz.	Sri Thong Pharmacy Chonburi	methanol	Fruit
Old World Diamond-Flower	*Oldenlandia corymbosa* L.	Sri Thong Pharmacy Chonburi	methanol	Stem
Siamese tree Senna	*Cassia sumatrana* DC.	Muang Chachoengsao	ethanol	Leaf
African Marigold	*Tagetes erecta* L.	Ongkharak Nakhon Nayok	methanol	Flower
Betel Vine	*Piper betle* Linn.	Dan Khun Thot Nakhon Ratchasima	methanol	Leaf
Green Chiretta	*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.	Sriracha Chonburi	ethanol	Leaf

Common Name	Scientific Name	Source	Solvent extraction	Part tested
Horse-radish Tree	*Moringa oleifera* Lam.	Banbueng Chonburi	methanol	Leaf
Bitter melon	*Momordica charantia*	Banbueng Chonburi	methanol	Fruit
Mango plum	*Bouea macrophylla* Griffith.	Sri Thong Pharmacy Chonburi	methanol	Fruit
Sesbania pea	*Sesbania javanica* Miq.	Ongkharak Nakhon Nayok	ethanol	Flower
Shikakai	*Acacia concinna* (Willd.) DC.	Banbueng Chonburi	methanol	Leaf and Fruit
Java Olive	*Sterculia foetida* L.	Sri Thong Pharmacy Chonburi	ethanol	Bark

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Microdilution susceptibility test

ทดสอบโดยวิธีของ Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017 (CLSI, 2017) เริ่มต้นจากการเติมสมุนไพร (80 mg/mL) ปริมาตร 100 µL ใส่ใน microplate 96 well จากนั้นเจือจางสมุนไพร เพื่อให้ความเข้มข้นลดลงทีละสองเท่า (0.625-80 mg/mL) ด้วย Mueller-Hinton Broth (MHB) 100 µL แล้วเติมแบคทีเรียทดสอบเท่ากับ McFarland Standard No.0.5 ปริมาณ 1 x10^8 CFU/mL ปริมาตร 100 µL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเชื้อแบคทีเรียมาวัดความขุ่นด้วย microplate reader (VersaMax, U.S.A.) ด้วยความยาวคลื่นแสงที่ 610 nm บันทึกผลค่า Optical density (O. D.) (การทดสอบใช้เปรียบเทียบกับ negative control คือ เมทานอล เอทานอล และ น้ำกลั่น positive control คือ ยาอ๊อกซี่เตตตราซัยคลิน และแอมพิซิลลิน และนำไปหาค่าความเข้มข้นของสมุนไพรที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibition Concentration = MIC) การทดสอบกับสมุนไพรซ้ำ 3 ครั้ง โดยนำผลการทดสอบมาเปรียบเทียบกับค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ

การสำรวจการเสริมฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรร่วมกับสมุนไพรด้วยวิธี Disk diffusion susceptibility test

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร MHB จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ McFarland Standard No.0.5 (1.5X10^8 CFU/mL) ด้วย 0.85% NaCl จากนั้นเติมแบคทีเรีย ปริมาตร 1 mL ผสมกับ Mueller-Hinton Agar (MHA) ปริมาตร 19 mL รอให้ MHA แข็งตัว จึงเจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 cm จากนั้นผสมฟ้าทะลายโจร (160 mg/mL) กับสมุนไพรชนิดต่างๆ (80 mg/mL) อย่างละ 20 µL ในปริมาตรรวม 40 µL แล้วหยอดในหลุมของ MHA ที่เจาะเตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม ให้วัดขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone) ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (การทดสอบใช้เปรียบเทียบกับ positive control คือ ยาอ๊อกซี่เตตตราซัยคลิน และแอมพิซิลลิน (80 mg/mL) บันทึกผลการทดลอง และนำค่า clear zone ไปหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน นำค่า clear zone ไปหาค่าสัมประสิทธิ์ของการยับยั้งการเจริญของสมุนไพร (Fraction of inhibition = FI) ดังสมการที่ 1 และ แปลผลดังนี้ FI > 1 เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic) FI = 1 ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent) FI < 1 ต้านฤทธิ์กัน (Antagonistic) (Bonjar, 2004)

FI = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้งด้วยสมุนไพรผสมที่นำมาทดสอบ/
ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้งของฟ้าทะลายโจ (1)

จากนั้นประเมินค่าดัชนีความไวของแบคทีเรีย (%) (Bacterial Susceptibility Index; BSI) หมายถึงชนิดของสมุนไพรที่ผสมกับฟ้าทะลายโจรแล้วออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจรเพียงชนิดเดียว โดยแปลผลค่า BSI ดังนี้ 0% (resistance) หมายถึง ไม่พบสมุนไพรที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย, 100% (susceptibility) หมายถึง พบสมุนไพรทุกชนิด ที่ยับยั้งเชื้อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Bonjar, 2004) ดังสมการที่ 2

$$\text{BSI} = \frac{\mathbf{100\ x}\ \text{จำนวนชนิดของสมุนไพรที่แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย}}{\text{จำนวนสมุนไพรที่นำมาทดสอบทั้งหมด}} \qquad (2)$$

<u>การเสริมฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรร่วมกับสมุนไพร (Synergistic effect assay)</u>

ใช้การทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Microdilution susceptibility test) โดยออกแบบการทดสอบด้วยวิธี Checkerboard assay (Chung *et al.*, 2011) เตรียมฟ้าทะลายโจร ความเข้มข้น 0.625-80 mg/mL ปริมาตรอย่างละ 50 µL ผสมกับสมุนไพร หรือยาปฏิชีวนะ ความเข้มข้น 0.625-80 mg/mL อย่างละ 50 µL เมื่อผสมเรียบร้อยแล้ว หยอดใส่ใน microplate 96 well ปริมาตร 100 µL จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรีย 1 x 10^8 CFU/mL ปริมาตร 100 µL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความยาวคลื่นแสงที่ 610 nm เพื่อวัดความขุ่นของแบคทีเรีย(O. D.) แล้วนำมาหาค่า MIC ของ synergistic effect (MIC_{co}) หมายถึงค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสมุนไพร หรือของยาปฏิชีวนะเมื่อผสมกับฟ้าทะลายโจรที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย, MIC_M ค่าความเข้มข้นของสมุนไพรเพียงชนิดเดียว หรือของยาปฏิชีวนะที่น้อยที่สุดเพียงชนิดเดียวที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย) จากนั้นนำไปคำนวณค่า FIC คือสัดส่วนของ MIC_{co}/ MIC_M และหาค่า ดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI = $FIC_{\text{สมุนไพร1}}$+ $FIC_{\text{สมุนไพร2/ยาปฏิชีวนะ}}$) โดย $FIC_{\text{สมุนไพร1}}$ หมายถึงค่าดัชนีประสิทธิภาพร่วมของฟ้าทะลายโจร เมื่อนำมาผสมกับสมุนไพรชนิดที่ 1, $FIC_{\text{สมุนไพร2/ยาปฏิชีวนะ}}$ หมายถึงค่าดัชนีประสิทธิภาพร่วมของฟ้าทะลายโจร เมื่อนำมาผสมกับสมุนไพรชนิดที่ 2 หรือยาปฏิชีวนะ และแปลผลการทดสอบแปลผลทดสอบดังตารางที่ 2

Table 2 Measurement of Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) (Chung *et al.*, 2011)

FICI	Interpretations
FICI ≤ 0.5	Synergistic
0.5 < FICI < 1	Partially synergistic
FICI = 1	Additive
1 < FICI ≤ 4	Indifferent
FICI > 4	Antagonistic

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองทั้งหมดจะทำสามซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของ inhibition zone และค่า O. D. วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) ของชุดข้อมูล จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan’s multiple range test โดยใช้โปรแกรม Minitab version 17 (Minitab Pty Ltd, Sydney NSW, Australia) ที่ระดับนัยสำคัญ P □0.05

ผลการวิจัย

การสำรวจสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Broth microdilution susceptibility test

ผลสำรวจฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสมุนไพรพื้นบ้าน 19 ชนิด ด้วยวิธี Broth dilution test แสดงดังตารางที่ 3 โดยพบว่า ส่วนสกัดของสมุนไพรทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.625-80 mg/mL และแสดงให้เห็นว่าฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานทั้งสามสายพันธุ์ แต่พบว่ามะรุมมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน ส่วนดาวเรืองสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เพียงสายพันธุ์เดียว (MIC = 5 mg/mL) และพบว่าฟ้าทะลายโจร (MIC = 80 mg/mL) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ต่ำกว่าดาวเรือง จันทร์แดง จันทน์เทศ ฝาง มะปราง หญ้าลิ้นงูขาว สำโรง เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกับยาปฏิชีวนะ พบว่า ยาแอมพิซิลลิน และยาอ๊อกซี่เตตราซัยคลิน มีประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าสมุนไพรทุกชนิดที่นำมาทดสอบ โดยแอมพิซิลลินและยาอ๊อกซี่เตตราซัยคลิน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุด (ค่า MIC เท่ากันคือเท่ากับ 0.001 mg/mL)

การสำรวจการเสริมฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรร่วมกับสมุนไพรด้วยวิธี Disk diffusion susceptibility test

ผลสำรวจการเสริมฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรร่วมกับกับสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ด้วยอัตราส่วนฟ้าทะลายโจร (80 mg/mL) กับสมุนไพร (40 mg/mL) (สัดส่วน 2 : 1 ซึ่งเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดที่แสดงค่าเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียดีที่สุดในการทดสอบการสำรวจเสริมฤทธิ์เบื้องต้น) แสดงดังตารางที่ 4 โดยพบว่า ฟ้าทะลายโจรผสมกับฝาง ยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดีที่สุด (เส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 2.53 ± 0.06 cm) รองลงมาคือฟ้าทะลายโจรผสมกับ

สมอไทย ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีที่สุด (เส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1.70 ± 0.64 cm) ฟ้าทะลายโจรผสมกับพลูยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด (เส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 2.53 ± 0.06 cm) รองลงมาคือฟ้าทะลายโจรผสมกับสมอไทย ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีที่สุด (เส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1.70 ± 0.64 cm) ฟ้าทะลายโจรผสมกับพลูยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุด (เส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1.23 ± 0.62 cm) เมื่อนำมาทดสอบทางสถิติพบว่า ฟ้าทะลายโจร ความเข้มข้น 80 mg/mL ผสมกับสมุนไพรความเข้มข้น 40 mg/mL สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสามชนิดได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำฟ้าทะลายโจรมาผสมกับสมุนไพร 18 ชนิด มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ต่ำกว่ายาแอมพิซิลลิน หรือยาอ๊อกซี่เตตราซัยคลินเพียงชนิดเดียว

<u>การหาประสิทธิภาพของฟ้าทะลายโจรเมื่อผสมกับสมุนไพรชนิดต่างๆ</u>

การหาประสิทธิภาพของฟ้าทะลายโจรเมื่อผสมกับสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แสดงผลด้วยค่า Fraction of inhibition (FI) (แสดงในตารางที่ 5) ผลการวิจัยเมื่อผสมฟ้าทะลายโจรกับสมุนไพรอื่นๆ จะพบสมุนไพร 8 ชนิด (ฝาง, สมอไทย, หญ้าลิ้นงูขาว, ขันทองพยาบาท, มะระขี้นก, มะปราง, พลู และดาวเรือง) ที่สามารถเสริมฤทธิ์กับฟ้าทะลายโจรเพื่อยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 (FI อยู่ระหว่าง 1.20 ± 0.90 - 2.77 ± 0.14 (มากกว่า 1) พบสมุนไพร 6 ชนิด (ฝาง, หญ้าลิ้นงูขาว, มะระขี้นก, มะปราง, พลู และดาวเรือง) ที่สามารถเสริมฤทธิ์กับฟ้าทะลายโจร เพื่อยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (FI อยู่ระหว่าง 1.00 ± 0.00- 2.53 ± 0.06) และพบสมุนไพร 9 ชนิด (ฝาง, จันทน์เทศ, ส้มป่อย, มะระขี้นก, มะปราง, ขี้เหล็ก, พลู, สำโรง และดาวเรือง) ที่เสริมฤทธิ์กับฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 (FI อยู่ระหว่าง 1.28 ± 0.01 - 1.97 ± 0.08) นอกจากนี้ยังพบว่าคู่สมุนไพร 2 คู่ ที่ดีที่สุดที่ผสมกันแล้วสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ คือ ฟ้าทะลายโจรผสมกับฝาง ฟ้าทะลายโจรผสมกับพลู (clear zone อยู่ระหว่าง 1.00 ± 0.50^{AB} - 2.53 ± 0.06^{A}) แต่เมื่อนำมาผสมกันยังคงออกฤทธิ์น้อยกว่าฤทธิ์ของเมื่อใช้เพียงชนิดเดียว (clear zone = 3.10 ± 1.76^{B} - 4.07 ± 0.12^{A}) อย่างไรก็ตามเมื่อนำฟ้าทะลายโจรมาผสมกับแอมพิซิลลิน ไม่พบการเสริมฤทธิ์ (ไม่มีค่า clear zone) (จึงไม่ได้แสดงผลการวิจัย) นอกจากนี้ยังพบสมุนไพรที่ต้านฤทธิ์กับฟ้าทะลายโจร คือ ฟ้าทะลายโจรผสมกับโสน รองลงมาคือ ฟ้าทะลายโจรผสมกับสมอไทย ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (FI =0.53 ± 0.46, FI = 0.67 ± 0.58 ตามลำดับ) และฟ้าทะลายโจรผสมกับขันทองพยาบาท จะต้านฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 (FI = 0.85 ± 0.74) นอกจากนี้ยังพบสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ ชุมเห็ดเทศ หรือจันทน์แดง หรือส้มป่อยผสมกับฟ้าทะลายโจรจะต้านฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 (FI เท่ากันคือเท่ากับ 0.87 ± 0.75) และพบสมุนไพรมากที่สุด 12 ที่ต้านฤทธิ์กับฟ้าทะลายโจร ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853

Table 3 Comparison of antibacterial activities of some medicinal plants against *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. aureus* ATCC 25923

	Antimicrobial activity, MIC (mg/mL)		
Bacteria / plants	*E. coli* ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*S. aureus* ATCC 25923
S multiflora	40	80	40
Smilax spp.	80	80	80
D. loureiroi	20	20	40
M. fragrans	20	20	20
S. alata	40	40	20
R. nasutus	80	80	40
C. sappan	40	20	10
T. chebula	40	80	1.25
O. corymbosa	40	40	40
C. sumatrana	80	80	40
T. erecta	-	-	5
P. betle	40	80	40
A. paniculata	80	80	80
M. oleifera	0.625	0.625	10
M. charantia	80	80	40
B. macrophylla	40	40	40
S. javanica	40	80	40
A. concinna	80	80	40
S. foetida	40	40	80
A. paniculata	80	80	80
Oxytetracycline	0.0097	0.078	0.001
Ampicillin	0.078	10	0.001
methanol	-	-	-
ethanol	-	-	-
H_2O	-	-	-

– , had no MIC

Table 4 Antibacterial activity of 80 mg/mL *A. paniculata* in combination with 40 mg/mL medicinal plants

plants mixed with *A. paniculata*	Inhibition zone (cm)		
	E. coli ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*S. aureus* ATCC 25923
C. sappan	1.27±0.64^{AB}	2.53±0.06^{A}	1.00±0.50^{AB}
M. fragrans	-	0.97±0.06^{BCDE}	0.83±0.42^{BC}
R. nasutus	-	0.83±0.06^{BCDE}	-
T. chebula	1.70±0.85^{A}	1.00±0.58^{DE}	-
O. corymbosa	0.87±0.44^{BC}	1.47±0.06^{B}	-
Smilax spp.	-	0.97±0.06^{BCDE}	-
S multiflora	0.83±0.42^{BC}	0.87±0.06^{CDE}	0.80±0.46^{C}
S. alata	0.80±0.46^{CD}	0.87±0.06^{CDE}	-
D. loureiroi	0.80±0.46^{CD}	0.90±0.00^{CDE}	-
A. concinna	0.53±0.46^{CD}	0.87±0.06^{CDE}	0.80±0.40^{BC}
M. oleifera	-	0.77±0.06^{DE}	-
M. charantia	0.77±0.39^{BC}	1.13±0.12^{BCD}	1.07±0.54^{AB}
B. macrophylla	1.03±0.52^{BC}	1.10±0.10^{BCD}	1.13±0.57^{AB}
C. sumatrana	-	0.80±0.00^{DE}	0.80±0.40^{BC}
S. javanica	-	0.53±0.46^{E}	-
P. betle	0.80±0.40^{BC}	1.37±0.12^{BC}	1.23±0.62^{A}
S. foetida	-	0.83±0.06^{CDE}	0.80±0.40^{BC}
T. erecta	1.10±0.55^{ABC}	1.00±0.00^{BCDE}	1.00±0.50^{AB}
Oxytetracycline *	4.07±0.12^{A}	3.07±0.06^{A}	3.10±1.76^{B}
Ampicillin*	3.77±0.06^{A}	1.93±0.06^{B}	4.17±2.39^{A}
A. paniculata *	1.06±0.03^{B}	0.95±0.05^{B}	1.13±0.03^{A}
methanol	-	-	-
ethanol	-	-	-
H_2O	-	-	-

-, no clear zone; ***** , not combined with any medicinal plants

$^{A-E}$ mean values in the same column differ significantly ($P < 0.05$)

<u>ประเมินค่าดัชนีความไวของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของฟ้าทะลายโจรเมื่อผสมกับสมุนไพร</u>

จากการทดลองในภาพที่ 1 พบว่าสมุนไพรทั้งหมดมีความไว (Bacterial Susceptibility Index; BSI) ต่อการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดีที่สุด มีค่า BSI เท่ากับ 100% (19/19 ชนิด ที่แสดงค่า clear zone ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ) สมุนไพรมีความไวรองลงมาเพื่อยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 มีค่า BSI เท่ากับ 57.89% (11/19 ชนิด) และสมุนไพรมีความไวที่น้อยที่สุด เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 มีค่า BSI เท่ากับ 52.63% (10/19 ชนิด) ตามลำดับ แสดงดังดังภาพที่ 1

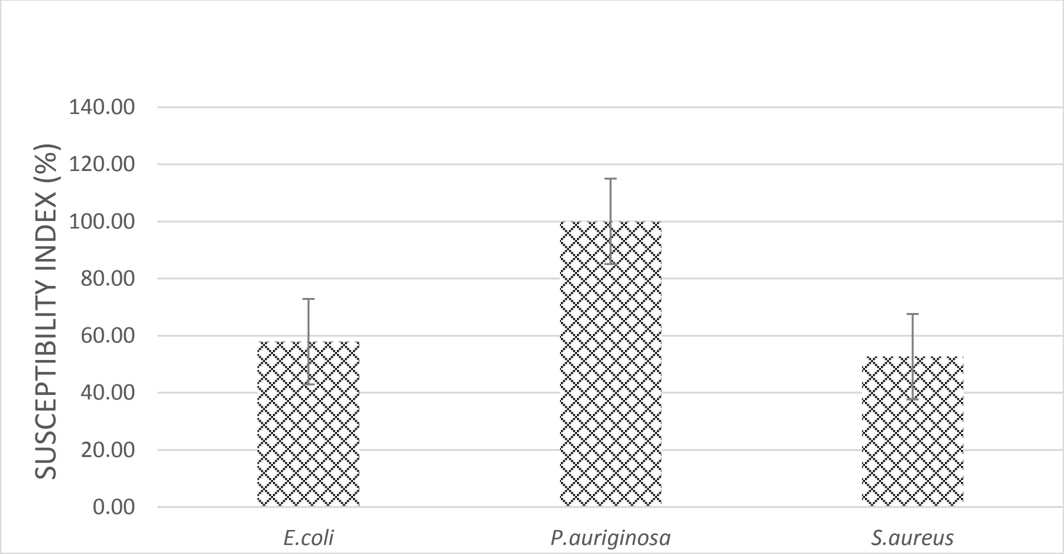

Figure 1 Bacterial Susceptibility Index of some medicinal plants mixed with *A. paniculata.*

Table 5 Fraction of inhibitions of *A. paniculata* in combination with some medicinal plants against three bacteria

plants mixed with *A. paniculata*	Fraction of inhibitions					
	E. coli ATCC 25922	Interpretations	*P. aeruginosa* ATCC 27853	Interpretations	*S. aureus* ATCC 25923	Interpretations
C. sappan	2.07 ± 0.11	Synergistic	2.53 ± 0.06*	Synergistic	1.60 ± 0.01	Synergistic
M. fragrans	-	non	0.97 ± 0.06	Antagonistic	1.33 ± 0.09	Synergistic
R. nasutus	-	non	0.83 ± 0.06	Antagonistic	-	non
T. chebula	2.77 ± 0.14*	Synergistic	0.67 ± 0.58	Antagonistic	-	non
O. corymbosa	1.41 ± 0.11	Synergistic	1.47 ± 0.06	Synergistic	-	non
D. loureiroi	-	non	0.97 ± 0.06	Antagonistic	-	non
S multiflora	1.36 ± 0.10	Synergistic	0.87 ± 0.06	Antagonistic	0.85 ± 0.74	Antagonistic
S. alata	0.87 ± 0.75	Antagonistic	0.87 ± 0.06	Antagonistic	-	non
D. loureiroi	0.87 ± 0.75	Antagonistic	0.90 ± 0.00	Antagonistic	-	non
A. concinna	0.87 ± 0.75	Antagonistic	0.87 ± 0.06	Antagonistic	1.28 ± 0.01	Synergistic
M. oleifera	-	non	0.77 ± 0.06	Antagonistic		non
M. charantia	1.25 ± 0.09	Synergistic	1.13 ± 0.12	Synergistic	1.70 ± 0.08	Synergistic
B. macrophylla	1.20 ± 0.90	Synergistic	1.10 ± 0.10	Synergistic	1.81 ± 0.08*	Synergistic
C. sumatrana	-	non	0.80 ± 0.00	Antagonistic	1.28 ± 0.01	Synergistic
S. javanica	-	non	0.53 ± 0.46	Antagonistic	-	non
P. betle	1.30 ± 0.01	Synergistic	1.37 ± 0.12	Synergistic	1.97 ± 0.08	Synergistic
S. foetida	-	non	0.83 ± 0.06	Antagonistic	1.28 ± 0.01	Synergistic
T. erecta	1.79 ± 0.02	Synergistic	1.00 ± 0.00	Synergistic	1.60 ± 0.01	Synergistic

-, no clear zone; non, could not determine Fraction of inhibition

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรเมื่อนำมาผสมกับฝางและพลู

ผลการสำรวจการออกฤทธิ์ร่วมของฟ้าทะลายโจรเมื่อผสมกับสมุนไพร 18 ชนิด พบว่าคู่สมุนไพรที่ออกฤทธิ์ดีที่สุด คือ ฟ้าทะลายโจรผสมกับฝางและฟ้าทะลายโจรผสมกับพลู จึงนำมายืนยันผลการเสริมฤทธิ์ด้วย Checkerboard assay เพื่อหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วมกัน (Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI)) ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์ พบว่าฟ้าทะลายโจรผสมกับพลูจะเสริมฤทธิ์กันได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจรผสมกับฝาง อย่างไรก็ตามการเสริมฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรผสมกับพลูหรือผสมกับฝาง ยังคงมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการเสริมฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรผสมกับยาอ๊อกซี่เตตราซัยคลิน และเมื่อนำฟ้าทะลายโจรผสมกับพลูจะแสดงผลเสริมฤทธิ์กันดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 ดังแสดงในตารางที่ 6 และแสดงให้เห็นว่าฟ้าทะลายโจรผสมกับยาอ๊อกซี่เตตราซัยคลิน สามารถเสริมฤทธิ์กันบางส่วน เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* 27853 และการนำสมุนไพรบางอย่างผสมกัน อาจจะทำให้เกิดการต้านฤทธิ์กัน เช่น การนำฟ้าทะลายโจรผสมกับฝางจะต้านฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 อย่างไรก็ตามเมื่อนำฟ้าทะลายโจรผสมกับแอมพิซิลลินไม่เกิดผลการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ เพราะไม่สามารถหาค่า FICI ได้ (จึงไม่ได้แสดงค่าในตารางที่ 6)

Table 6 Fractional Inhibitory Concentration Index of *A. paniculata* mixed with *P. Betle or C. sappan*

Bacteria	Synergistic effect					
	A. paniculata + P. betle		*A. paniculata + C. sappan*		*A. paniculata* + Oxytetracycline	
	FICI	Interpretations	FICI	Interpretations	FICI	Interpretations
E. coli ATCC 25922	2.5	Indifferent	-	-	0.53	Partially synergistic
P. aeruginosa ATCC 27853	1.125	Indifferent	4.125	Antagonistic	0.62	Partially synergistic
S. aureus ATCC 25923	0.5	synergistic	1.031	Indifferent	2	Indifferent

วิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีแนวคิดที่จะนำส่วนสกัดฟ้าทะลายโจรมาผสมกับสมุนไพรพื้นบ้านของไทยชนิดต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียฉวยโอกาส เพราะฟ้าทะลายโจรสามารถส่งเสริมให้ macrophage เกิด phagocytosis ได้ดีขึ้น (Wen *et al.*, 2014) จึงเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้น ทำให้สามารถ

ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส SARS-COV-2 และลดโอกาสของการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียฉวยโอกาส จึงอาจจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพกันในการรักษาโรคติดเชื้อซ้ำซ้อนและติดเชื้อร่วมกันจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรียฉวยโอกาส เช่น *E. coli, P. aeruginosa* และ *S. aureus* (Jayakumar *et al*., 2013; Wen *et al.,* 2014; Enmozhi *et al*., 2020) ผลการสำรวจการเสริมฤทธิ์ร่วมกันของส่วนสกัดจากฟ้าทะลายโจรกับสมุนไพรพื้นบ้านแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ฟ้าทะลายโจรปริมาณสูง (เท่ากับ 80 mg/mL ในการทดสอบ คือสัดส่วน 2:1) ร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่น (40 mg/mL) จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* ATCC 25923 ซึ่งมีงานวิจัยที่ใช้ส่วนสกัดฟ้าทะลายโจรปริมาณน้อยกว่าคือ 31.5 mg/mL และ 2.0 mg/mL สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ตามลำดับ (Mishra *et al.,* 2013) และได้แสดงให้เห็นว่าฟ้าทะลายโจร สามารถเสริมฤทธิ์กับสมุนไพรทุกชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* ATCC 25923 ซึ่งอาจจะเกิดจากสาร andrographolide ที่พบมากในฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Jayakumar *et al*., 2013; Zhang *et al*., 2020) หรือการนำสมุนไพรชนิดต่างๆ ที่มีส่วนประกอบของสารกลุ่มฟีโนลิค เช่น ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ เทอร์พีน และแทนนิน และใช้ในสัดส่วนที่เหมาะสมก็จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้น (Cheesman *et al*., 2017) นอกจากนี้สารกลุ่ม phenolic, flavonoid และ tannin ที่อาจจะพบในฟ้าทะลายโจร อาจจะไปออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่คล้ายคลึงกันกับฤทธิ์ของยาอ๊อกซี่เตตราซัยคลิน (Subramani *et al.,* 2017; Maisetta *et al*., 2019; Zhang *et al*., 2020; Hossain *et al*., 2021) ทำให้ช่วยกันส่งเสริมการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียหลายกลไกพร้อมกัน เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Eumkeb and Chukrathok (2013) พบว่า apigenin และ naringenin เสริมฤทธิ์กับยา ceftazidine ยับยั้งการเจริญของ *Enterobacter cloacae* ดื้อยา หรือสารกลุ่มไฮดรอกซี่ของฟีโนลิค มีคุณสมบัติทำลายผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Subramani *et al*., 2017; Mickymarry *et al.,* 2019)

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำฟ้าทะลายโจรมาผสมกับฝาง มะระขี้นก มะปราง และดาวเรือง จะเป็นคู่สมุนไพรที่ดีที่สุด ที่สามารถยับยั้งเชื้อทั้งสามชนิด โดยพบว่ามีประสิทธิภาพดีที่สุดเมื่อเทียบกับยาอ๊อกซี่เตตราซัยคลิน อาจจะเกิดจากสารประกอบต่างๆ ที่พบใน ฝาง มะระขี้นก มะปราง ดาวเรือง พลู เช่น ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ เทอร์พีน และแทนนินในปริมาณมาก ยิ่งส่งเสริมกันและกันในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Subramani *et al.,* 2017; Maisetta *et al*., 2019; Mickymarry, 2019) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำมะรุม โสน สำโรง ชุมเห็ดเทศ จันทน์แดง เมื่อผสมกับฟ้าทะลายโจรแล้ว อาจจะไปลดประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 อาจจะเกิดจากสารออกฤทธิ์บางชนิดอาจจะไปหักล้างฤทธิ์กันเอง ข้อสังเกตุเมื่อนำฟ้าทะลายโจรมาผสมกับสมุนไพรต่างๆ จะต้านฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้มากที่สุด อาจจะเป็นเพราะ *P. aeruginosa* และเชื้อทุกตัวที่นำมาทดสอบอาจจะมีกลไกปรับตัวดื้อยา เช่น สามารถขับยาหรือสารประกอบสำคัญจากสมุนไพรออกนอกเซลล์แบคทีเรีย จึงเกิดการล้างฤทธิ์กัน (Reygaert, 2018) หรืออาจจะเกิดจากสมุนไพรแต่ละชนิดต้านฤทธิ์กันเองในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อทุกตัวที่นำมาทดสอบมีกลไกปรับตัวดื้อยา เช่น สามารถขับยาหรือสารประกอบสำคัญจากสมุนไพรออกนอกเซลล์แบคทีเรีย จึงเกิดการล้างฤทธิ์กันเอง (Reygaert, 2018)

งานวิจัยแสดงให้เห็นว่าคู่สมุนไพรที่มีศักยภาพที่จะผสมร่วมกันดีที่สุด คือ ฟ้าทะลายโจรกับฝาง และฟ้าทะลายโจรกับพลู เมื่อนำมาใช้ในสัดส่วนที่เหมาะสมก็จะสามารถใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถยืนยันผลการทดสอบได้ด้วยวิธี Checkerboard assay ผลการวิจัยได้พิสูจน์ให้เห็นว่าฟ้าทะลายโจรผสมกับพลู สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ โดยเมื่อนำฟ้าทะลายโจร ความเข้มข้นเท่ากับ 20 mg/mL (1/4 MIC) ผสมกับพลูเท่ากับ 10 mg/mL (1/4MIC) จะเสริมฤทธิ์กันยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด (ไม่ได้แสดงผลการวิจัย) อาจจะเกิดจากสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และฟีโนลิคในปริมาณที่พอเหมาะ เช่น กรด gallic acid ผสมกับกรด Ferulic acid อาจไปรบกวนการขนส่งสารอิเล็คโตรไลท์เข้าออกของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Borges *et al*., 2013) เช่นเดียวกับสารกลุ่มฟีโนลิคและฟลาโวนอยด์ที่พบในฝาง สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa, S. pyogens* และ *P. acne* (Madhubala *et al*., 2018) ฟ้าทะลายโจรเสริมฤทธิ์กับพลูได้ดี เพราะสารหลายชนิดจากพลู เช่น eugenol estragole methlyeugnol hydroxycatechol หรือ monoterpene มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย โดยอาจจะไปยับยั้งการขับยาออกนอกเซลล์ของแบคทีเรียโดย (efflux pump) (Kaveti *et al*., 2011) ดังนั้นการนำพลูมาผสมกับฟ้าทะลายโจร ก็อาจจะช่วยเสริมฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์บางชนิดเช่น ฟลาโวนอยด์ ฟีโนลิค และเทอร์พีน เพื่อยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม และยับยั้งการขับยาออกนอกเซลล์ของแบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้น (Jayakumar *et al*., 2013; Zhang *et al*., 2020) นอกจากนี้พบรายงานสนับสนุนของพลูเพียงชนิดเดียวก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *P. aeruginosa* (Kaveti *et al*., 2011) เป็นต้น อย่างไรก็ตามคงต้องนำมาพิสูจน์หากลไกการออกฤทธิ์ต่อไป

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าฟ้าทะลายโจรผสมกับพลู สามารถเสริมฤทธิ์กันยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 ดังนั้นการจะใช้สมุนไพรหลายชนิดร่วมกันเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต้องคำนึงถึงสัดส่วนที่เหมาะสมของสมุนไพรแต่ละชนิดเมื่อจะนำมาผสมกัน ซึ่งจะต้องทำการพิสูจน์สมมติฐานนี้ต่อไป ในอนาคตอาจจะสามารถนำสมุนไพรมาผสมกัน เพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ ก็อาจจะช่วยลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาปฏิชีวนะ และเป็นทางเลือกใหม่ ในการหาสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และเพิ่มมูลค่าของสมุนไพร อย่างไรก็ตามควรนำสมุนไพรเหล่านี้ไปทดสอบความเป็นพิษ และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสมุนไพรให้มากยิ่งขึ้น

สรุปผลการวิจัย

ฟ้าทะลายโจรเมื่อนำมาผสมกับสมุนไพร 18 ชนิด ส่วนใหญ่จะมีแนวโน้มเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* ATCC 25923 และเมื่อนำฟ้าทะลายโจรผสมกับสมุนไพรชนิดต่างๆ ก็ยังคงมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดีที่สุด (ค่า BSI เท่ากับ 100%) และคู่สมุนไพรที่มีศักยภาพดีที่สุดในการเสริมฤทธิ์ คือ การนำฟ้าทะลายโจรมาผสมกับพลู แต่การเสริมฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรกับพลู ยังคงมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้ฟ้าทะลายโจรผสมกับยาอ๊อกซี่เตตราซัยคลิน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณการสนับสนุน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลับบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ทำวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Bonjar, G.H.S. (2004). New Approaches in Screening for Antibacterial in Plants. *Asian Journal of Plant Sciences, 3*, 55-60.

Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M.J. & Simões, M. (2013). Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, *19*(4), doi.org/10.1089/mdr.2012.0244.

Chung, P.Y., Navaratnam, P. & Chung, L.Y. (2011). Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococus aureus* stains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *10*(25), 1-6.

Cheesman, M.J., Ilanko, A., Blonk, B. & Cock, I.E. (2017). Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacognosy Reviews*, *11*(22), 57-72.

CLSI. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

Enmozhi, S. K., Raja, K., Sebastine, I. & Josephc, J. (2020). Andrographolide as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease: an in-silico approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. doi.org/10.1080/07391102.2020.1760136.

Eumkeb, G. & Chukrathok S. (2013). Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidine and apigenin combination against ceftazidine-resistant *Enterobacter cloacae*. *Pytomedidcine 20*, 262–269.

Gandhi, A.D., Vizhi, D.K., Lavanya, K., Kalpana, V.N., Rajeswari, V.D. & Babujanarthanam, R. (2017). *In vitro* anti-biofilm and anti-bacterial activity of *Sesbania grandiflora* extract against *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry and Biophysics Reports, 12*, 193-197.

Gupta, P.D. & Birdi, T.J. (2017). Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, *8*(4), 266-275.

Hoque, M.M., Rattila, S., Shishir, M.A., Bari, M., Inatsu, Y. & Kawamoto, S. (2011). Antibacterial activity of ethanol extract of betel leaf (*Piper betle* L.) against some food borne pathogens. *Bangladesh Journal of Microbiology, 28*(2), 58-63.

Hossain, S. *et al.* (2021). *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees: An Updated Review of Phytochemistry, Antimicrobial Pharmacology, and Clinical Safety and Efficacy. *Life (Basel)*, *11*(4), 348. doi.org/10.3390/life11040348.

Jayakumar, J., Hsieh, C.Y., Lee, J.J. & Sheu, J.R. (2013). Experimental and clinical pharmacology of *Andrographis paniculata* and its major bioactive phytoconstituent andrographolide. *Evidence Based Complement Alternative Medicine*, 846740. doi.org/10.1155/2013/846740.

Kaveti, B., Tan, L., Sarnnia, Kuan, T.S. & Baig, S. (2011). Antibacterial Activity of *Piper betel* Leaves. *International Journal of Pharmacy Teaching & Practices, 2*(3), 129-132.

Madhubala, S., Poongothai. M. & Kumar, M.E. (2018). Antibacterial and anti-acne activity of *Caesalpinia sappan* L. and *Cinnamomum verum* J. Presl - A comparison. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, *5*(4), 118-122.

Manna, S., Baindara, P. & Mandal, S.M. (2020). Molecular pathogenesis of secondary bacterial infection associated to viral infections including SARS-CoV-2. *Journal of Infection and Public Health*, *13*(10), 1397-1404.

Medical Device Control Division. (2013). Food and Drug Administration (FDA). Thailand Natural list of essential medicines (NLEM). Food and drug administration Thailand: Nonthaburi. (in Thai).

Mishra, P.K., Singh, R.K., Gupta, A., Chaturvedi, A., Pandey, R., Tiwari, S.P. & Mohapatra, T.M. (2013). Antibacterial activity of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall ex Nees leaves against clinical pathogens. *Journal of pharmacy research, 7*(5), 459-462.

Mickymarry, S. (2019). Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogen. *Antibiotics*, *8*(4), 257. doi.org/10.3390/antibiotics8040257.

Navaratnam, P. & Chung, L.Y. (2011). Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococus aureus* stains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *10*(25), 1-6.

Nimer, N.A. (2022). Nosocomial Infection and Antibiotic-Resistant Threat in the Middle East. *Infection and Drug Resistance*,*15*, 631–639. doi.org/10.2147/IDR.S351755.

Reygaert, W.C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, *4*(3), 482-501. doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482.

Sang-iamsuntorn, K., Suksatu, A., Pewkliang, Y., Thongsri, P., Kanjanasirirat, P., Manopwisedjaroen, S. & Hongeng, S. (2020). Anti-SARS-CoV-2 activity of *Andrographis paniculata* extract and its major component Andrographolide in human lung epithelial cells and cytotoxicity evaluation in major organ cell representatives. *Journal of Natural Products*, *84*(4), 1261-1270.

Schroeder, M., Brooks, B.D. & Brooks, A.E. (2017). The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. *Gene*, *8*(39), 3-23.

Selvam, G.G., Karthik, S., Mathivanan, K., Baskaran, R., Karthikeyan, M., Gopi, M., Govindasamy, C. & Srinivasan, R. (2012). In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *2*(1), s136-139.

Septama, A.W. & Panichayupakaranant, P. (2016). Synergistic effect of artocarpin on antibacterial activity of some antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. *Pharmaceutical Biology*, *54*(4), 686-91.

Subramani, R., Narayanasamy, M. & Feussner, K.D. (2017). Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens, *7*(3), 172. doi.org/10.1007/s13205-017-0848-9.

Wen, L., Xia, N., Chen, X., Li, Y., Hong, Y., Liu, Y. & Wang, Z. (2014). Activity of antibacterial, antiviral, anti-inflammatory in compounds andrographolide salt. *European Journal of Pharmacology*, *740*, 421-427.

Zhang, L., Bao, M., Liu, B., Zhao, H., Zhang, Y., Ji, X., Zhao, N., Zhang, C., He, X., Yi, J., Tan, Y., Li, L. & Lu, C. (2020). Effect of Andrographolide and Its analogs on bacterial infection: A Review. *Pharmacology*, *105*, 123–134. doi.org/10.1159/000503410.