ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาสบางสายพันธุ์ของสารสกัดเมทานอลจากรางจืด

The Antimicrobial Activity of a Methanol Extract from *Thunbergia laurifolia* (L.) Against some Opportunistic Gram Negative Bacteria

วิสาตรี คงเจริญสุนทร* และปิยรัตน์ พิมพ์สวัสดิ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
Wisatre Kongcharoensuntorn* and Piyarat Pimsawas
Department of Biological Science, Burapha University

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn) ด้วยเมทานอลเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับยาปฏิชีวนะ คือแอมพิซิลิน (ampicillin) และเตตราซัยคลิน (tetracycline) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาส 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25913, *Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii* และ *Serratia marcescens* ทำการวัดผลจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี agar diffusion susceptibility test ซึ่งพบว่า สารสกัดจากรางจืดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มฉวยโอกาสทุกชนิดที่นำมาทดสอบ โดยมีผลยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด ที่ค่า MIC เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมามีผลต่อการเจริญของ *K. pneumoniae, S. marcescens*, and *P. mirabilis* (ที่ค่า MIC เท่ากับ 40 mg/ml) และมีผลต่อ *E.coli* ATCC25913 และ *A. baumannii* น้อยที่สุด (ที่ค่า MIC เท่ากับ 80 mg/ml) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับยาปฏิชีวนะ พบว่าสารสกัดรางจืดด้วยเมทานอลมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสบางสายพันธุ์ได้ในระดับที่ต่ำกว่าแอมพิซิลินและเตตราซัยคลินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากรางจืดสามารถใช้เป็นยาต้านจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติ

คำสำคัญ : รางจืด ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาส *Escherichia coli* ATCC25913 *Klebsiella pneumoniae Proteus mirabilis*

***Corresponding author.** wisatrek@yahoo.com, wisatrek@hotmail.com

Abtract

This research was aimed to study the antimicrobial activity of a methanol extract from *Thunbergia laurifolia* (L.) against 6 strains of opportunistic gram negative bacteria: *Escherichia coli* ATCC25913, *Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii* and *Serratia marcescens*. The experiments were tested by agar diffusion susceptibility test and evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MICs) of the extracts. The efficacy of antimicrobial activity of the extracts was also compared with two antibiotics, ampicillin and tetracycline. The results showed that various dilutions of methanol extract from *T. laurifolia* (L.) could inhibit the growth of all bacterial strains tested with statistical significance ($P \leq 0.05$). The most efficacy of antimicrobial activity was shown by the MIC of *P. aeruginosa* (10 mg/ml) followed by the MICs of *K. pneumoniae, S. marcescens,* and *P. mirabilis* (40 mg/ml). The least antimicrobial activity was *E. coli* ATCC25913 and *A. baumannii* (80 mg/ml). However, the efficacy of เมทานอล extract from *T. laurifolia* (L.) was less than the efficacy of both antibiotics, ampicillin and tetracycline with statistical significance ($P \leq 0.05$). From this study we can concluded that the methanol extract of *T. laurifolia* (L.) can be a source of natural antimicrobial agent.

Keywords : *Thunbergia laurifolia* (L.), antimicrobial activity, *Escherichia coli* ATCC25913, *Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis*

บทนำ

แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาสก่อโรคมีความสำคัญทางการแพทย์ โดยสามารถก่อโรคในร่างกายที่อ่อนแอได้หลายระบบ เช่น ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบหมุนเวียนโลหิต ระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อที่บาดแผล เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ไขกระดูกอักเสบ การติดเชื้อจากการใช้เครื่องช่วยหายใจและ การสอดใส่เครื่องมือแพทย์ ปอดบวม (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547) เป็นต้น ระบาดวิทยาของการติดเชื้อแบคทีเรียในโรงพยาบาลของผู้ป่วย พบว่า มีการติดเชื้อในโรงพยาบาลเพิ่มขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมีความไวต่อยาปฏิชีวนะเปลี่ยนแปลงไปตามกาลเวลา โดยแบคทีเรียก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อน และเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาเป็นจำนวนมาก(ทวีวงศ์ ตันตราชีวธร, นิรมล วิทิตภัทรภาคย์ และอุราภรณ์ ภูมิศานติพงศ์, 2550)

รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.) เป็นสมุนไพรไทยที่มีประวัติว่าใช้ถอนพิษต่างๆ เช่น พิษจากสัตว์ เห็ดพิษ สารพิษ (สารเบื่อหนู สารกำจัดแมลง) (ชะลอ อุทกภาชน์, 2519, Pramyothin *et al*., 2005) ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติและสารสำคัญที่พบในรางจืดมากขึ้น โดยมีรายงานว่าสารสำคัญที่พบได้แก่ สารในกลุ่ม Flavonoid (Thongsaard & Marsden, 2002) Steroid และ Glucoside (Kanchanapoom, Kasai, & Yamasaki, 2002) ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าวมีอนุพันธ์ของสารแตกต่างกันไปในแต่ละส่วนของรางจืด ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากรางจืดที่มีรายงาน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์และถอนพิษ (Ratchadaporn *et al*., 2007) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Tecuasophon & Nimnoi, 2003) ต้านแบคทีเรีย (Khunkitti *et al*., 2003; Kanchanapoom *et al*., 2002; Silpasuwon, 1979) ต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ทัยป์ 2 (Rattanakiat, 2002) ต้านการอักเสบ (ผการัตน์ ตั้งเชื่อนขันธ์ และละออง พรหมเอาะ, 1997) ลดความดันโลหิต (Ruangyuttikarn, 1980) ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Aritajat, Wutteerapol, & Saenphet, 2004) มีผลต่อสมองในการเปลี่ยนแปลงระดับสารสื่อประสาท (Zhang, 2004) การนำรางจืดมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียฉวยโอกาส เป็นภูมิปัญญาโบราณที่ทรงคุณค่า ที่สมุนไพรหลายชนิดเราใช้เป็นอาหารประจำวันอยู่แล้ว

การศึกษาครั้งนี้จะทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดรางจืดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาสก่อโรคบางสายพันธุ์ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC25913, *Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการนำสมุนไพรมาใช้ในการพัฒนาเป็นยารักษาโรค เพื่อช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะแผนปัจจุบันที่เชื้อมีการดื้อยามากขึ้น

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วิธีเตรียมพืชสมุนไพร

นำรางจืดที่ประกอบด้วยส่วนใบ เถา ลำต้น และราก มาล้างให้สะอาด นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นให้เป็นผงละเอียด เก็บไว้ในที่แห้งปราศจากแสงและความชื้น

2. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร (crude extract)

2.1 ชั่งผงสมุนไพรจำนวน 500 กรัม ละลายใน เมทานอล: น้ำ (อัตราส่วน 80:20) ปริมาตร 1500 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 วันให้ตกตะกอนทำการกรองสมุนไพรด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

2.2 นำสมุนไพรที่กรองแล้วไปทำให้แห้งโดยเครื่อง evaporator ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วนำสารสกัดที่ได้ (crude extract) ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมสารละลาย ของสารสกัดรางจืดและยาปฏิชีวนะ

ชั่งสารสกัด 0.8 กรัม ใส่ใน Conical tube ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารสกัดไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (stock solution) จากนั้นเตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้น 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเจือจางสมุนไพรจาก stock solution ทีละสองเท่า เก็บที่มืดอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทดสอบในขั้นต่อไป ส่วนยาปฏิชีวนะเพื่อนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพคือแอมพิซิลินและเตตราซัยคลิน ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ นำมาเตรียมและเจือจางเช่นเดียวกับสารสกัดรางจืด โดยเตรียมความเข้มข้นตั้งแต่ 80-0.078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. ขั้นตอนดำเนินการทดลอง

4.1 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากรางจืดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration) โดยวิธี agar diffusion susceptibility test โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มฉวยโอกาส 6 ชนิด คือ *E. coli* ATCC25913, *K. pneumoniaeee, P. mirabilis, P. aeruginosa., A .baumannii* และ *S. marcescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 4-5 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 (1.5 x 10^8 CFU/ml) โดยปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่า McFarland No. 0.5 ด้วย sterile sodium chloride 0.85% เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดละ 19 มิลลิลิตร มาผสมกับแบคทีเรียที่ปรับเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อให้อาหารแข็ง จากนั้นทำการเจาะหลุมในอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร เพื่อใส่สารทดสอบ นำสารสกัดรางจืดที่ความเข้มข้น 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หยอดลงในหลุมที่เจาะไว้ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ในการทดลองนี้ใช้ DMSO เมทานอล และน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุม แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการทดลองวิธี Agar diffusion susceptibility test ของสมุนไพรเทียบกับยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแต่ละชนิด จำนวน 3 ซ้ำ

4.2 วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone) เป็นเซนติเมตร นำไปบันทึกผลการทดลองและหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วนำมาหาค่า MIC และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบ Random Completely Block Design (RCBD) ด้วยวิธีของ Duncan โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS version 11

4.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.1 แต่หยอดยาปฏิชีวนะคือแอมพิซิลินและเตตราซัยคลินที่เจือจางด้วยระดับความเข้มข้น 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 และ 0.078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนหลุมละ 40 ไมโครลิตร ใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ) แล้วทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้งเป็นเซนติเมตร และค่า MIC เพื่อเปรียบเทียบกับผลของสารสกัดรางจืด

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลจากรางจืด ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบก่อโรค ฉวยโอกาสก่อโรค 6 ชนิด พบว่าสารสกัดจากรางจืดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทุกชนิดที่นำมาทดสอบและพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน (ตารางที่ 1 และ 2) โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ *K. pneumoniae, S. marcescens* และ *P. mirabilis* ซึ่งมีค่า MIC คือ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* และ *E. coli* ATCC 25913 ได้น้อยที่สุด คือมีค่า MIC เท่ากับ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่าสารสกัดรางจืดด้วยเมทานอล มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดรางจืดต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดด้วยวิธีของ Duncan พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด ส่วนสารควบคุมที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่ DMSO เมทานอล และน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ พบว่าไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดที่นำมาทดสอบ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลจากรางจืดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาส 6 ชนิด ด้วยวิธี agar diffusion susceptibility test

แบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางของการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดจากรางจืด (ซม. ± standard error)														
	80 (มก./มล.)	40 (มก./มล.)	20 (มก./มล.)	10 (มก./มล.)	5 (มก./มล.)	2.5 (มก./มล.)	1.25 (มก./มล.)	0.625 (มก./มล.)	0.312 (มก./มล.)	0.156 (มก./มล.)	0.078 (มก./มล.)	control			ค่า MIC (มก./มล.)
												D	M	H	
E. coli ATCC 25913	0.77±0.1	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	80
K. pneumoniae	1.10±0.1	0.73±0.1	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	40
P. mirabilis	0.85±0.1	0.72±0.0	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	40
P. aeruginosa	0.88±0.0	0.83±0.0	0.80±0.0	0.68±0.0	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	10
A. baumannii	0.85±0.1	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	80
S. marcescens	1.03±0.2	0.73±0.1	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	40

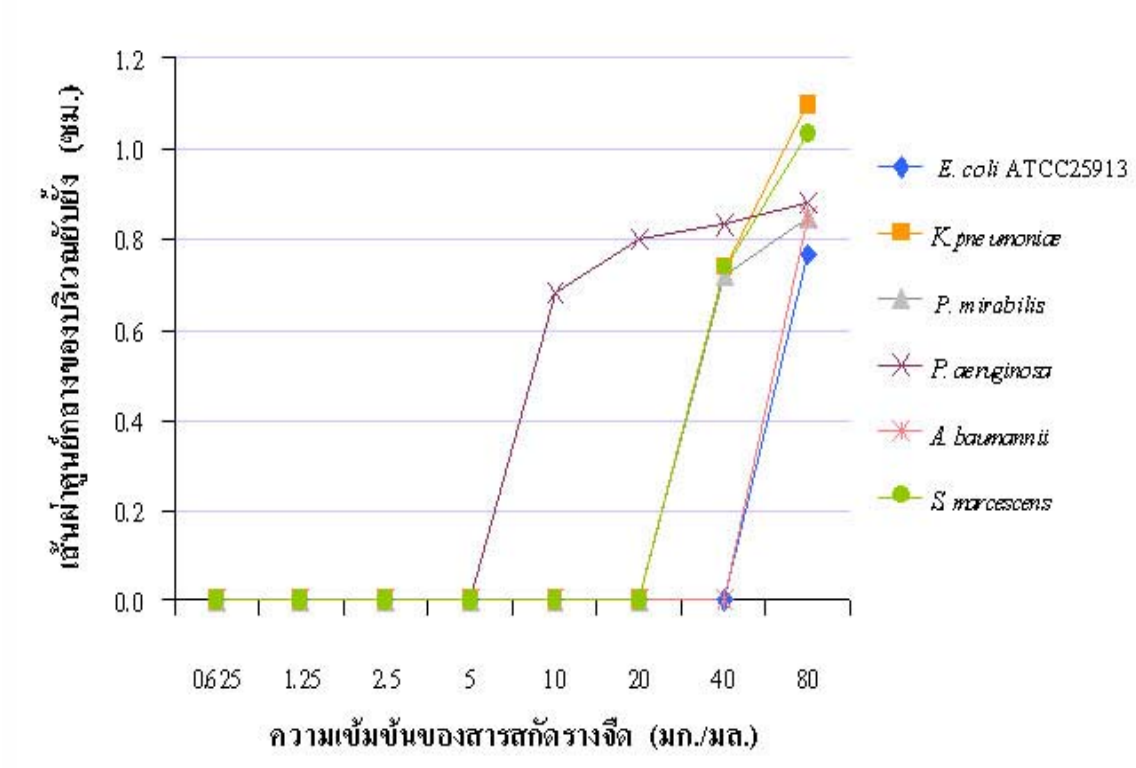
หมายเหตุ ND คือ ไม่ได้ทำการทดสอบต่อ - หมายถึงเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร อักษรย่อ H หมายถึง H_2O, D หมายถึง เมทานอล

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบฤทธิ์ของยาแอมพิซิลินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาส 6 ชนิด โดยวิธี agar diffusion susceptibility test

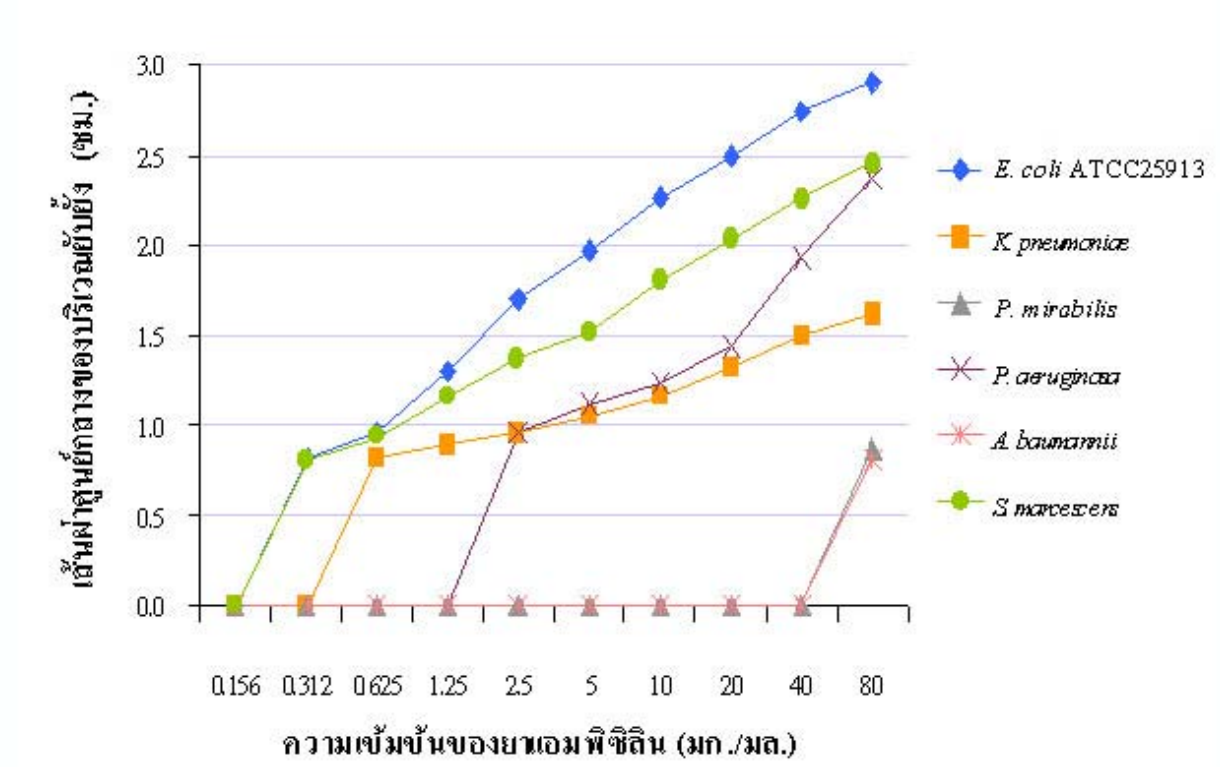
แบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางของการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของยาแอมพิซิลิน (ซม. ± standard error)													
	80 (มก./มล.)	40 (มก./มล.)	20 (มก./มล.)	10 (มก./มล.)	5 (มก./มล.)	2.5 (มก./มล.)	1.25 (มก./มล.)	0.625 (มก./มล.)	0.312 (มก./มล.)	0.156 (มก./มล.)	0.078 (มก./มล.)	control		
												D	M	H
E. coli ATCC 25913	22.9±0.1	2.73±0.05	2.5±0.08	2.27±0.1	1.97±0.05	1.7±0.0	1.3±0.0	0.97±0.05	0.82±0.13	-	-	-	-	-
K. pneumoniae	1.62±0.03	1.5±0.0	1.32±0.03	1.17±0.08	1.05±0.05	0.97±0.05	0.88±0.02	0.82±0.02	-	-	-	-	-	-
P. mirabilis	0.87±0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. aeruginosa	2.37±0.05	1.93±0.05	1.43±0.05	1.12±0.02	0.97±0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A. baumannii	0.80±0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. marcescens	2.45±0.15	2.25±0.11	2.03±0.12	1.8±0.08	1.52±0.06	1.37±0.1	1.17±0.05	0.93±0.1	0.80±0.11	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึงเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร อักษรย่อ H หมายถึง H_2O, D หมายถึง DMSO, M หมายถึง เมทานอล

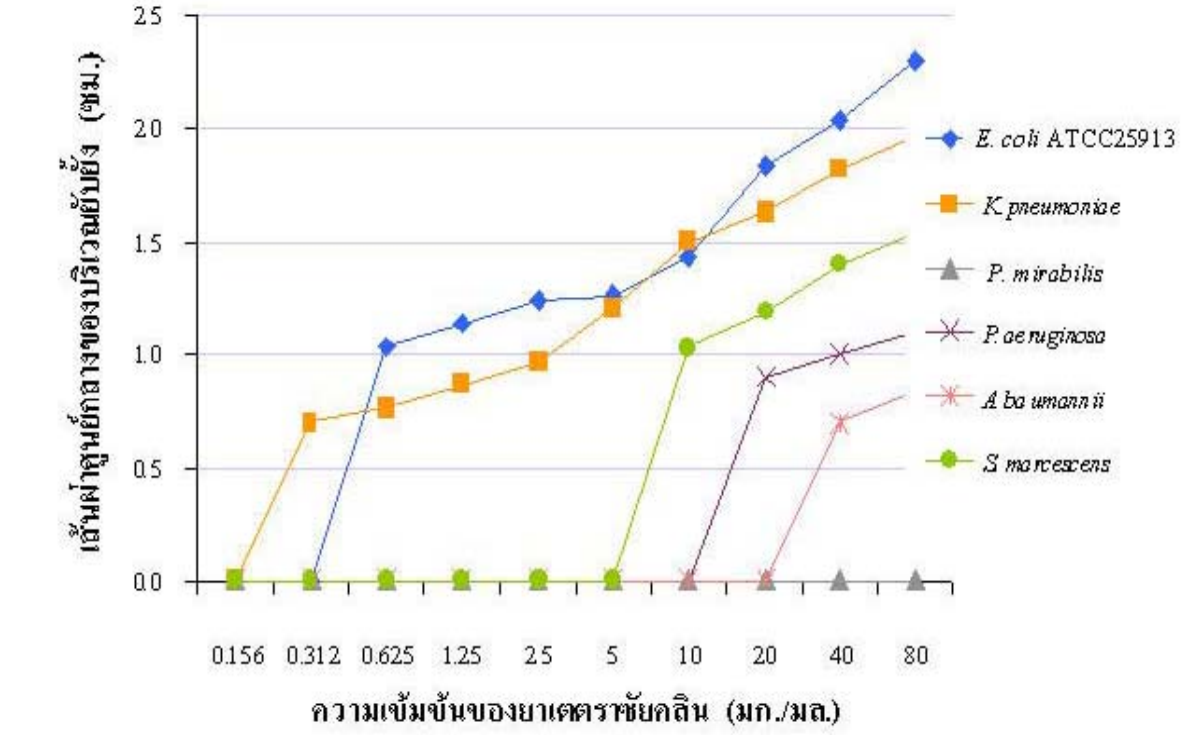
ผลการทดลองข้างต้น พบว่ารูปแบบการตอบสนองของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาสทั้ง 6 ชนิด ต่อสารสกัดรางจืดคล้ายคลึงกัน คือเมื่อให้สารสกัดรางจืดความเข้มข้นสูงขึ้นจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีขึ้นดังภาพที่ 1 แต่ความไวของเชื้อต่อสารสกัดรางจืดยังต่ำกว่ายาแอมพิซิลินและเตตราซัยคลิน (ภาพที่ 1-3) กล่าวคือ ต้องใช้สารสกัดรางจืดขนาดมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาสได้ดี (แอมพิซิลินและเตตราซัยคลินใช้ขนาดมากกว่า 0.312 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกับยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดดังกล่าว พบว่าการตอบสนองของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ต่อยาปฏิชีวนะดีกว่าสารสกัดรางจืด กล่าวคือ แอมพิซิลินและยาเตตราซัยคลิน สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. marcescens, E. coli* ATCC25913 และ *K. pneumoniae* ได้ดีกว่าสารสกัดรางจืด คือ มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.312-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2-4) ยกเว้นการยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis* พบว่าสารสกัดรางจืดสามารถยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าแอมพิซิลิน (มีค่า MIC 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีกว่ายาเตตราซัยคลิน (มีค่า MIC 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนเชื้อ *A. baumannii* สามารถยับยั้งได้ใกล้เคียงกับยาแอมพิซิลิน (มีค่า MIC เท่ากันที่ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาส 6 ชนิดกับสารสกัดเมทานอลจากรางจืดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ วัดค่าจากเส้นผ่าศูนย์กลาง ด้วยวิธี Agar diffusion susceptibility test



ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาส 6 ชนิดกับยาแอมพิซิลินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ วัดค่าจากเส้นผ่าศูนย์กลาง ด้วยวิธี Agar diffusion susceptibility test



ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาส 6 ชนิดด้วยเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ วัดค่าจากเส้นผ่าศูนย์กลาง ด้วยวิธี Agar diffusion susceptibility test

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบฤทธิ์ของยาเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาส 6 ชนิดโดยวิธี agar diffusion susceptibility test

แบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางของการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของยาเตตราซัยคลิน (ซม. ± standard error)													
	80 (มก./มล.)	40 (มก./มล.)	20 (มก./มล.)	10 (มก./มล.)	5 (มก./มล.)	2.5 (มก./มล.)	1.25 (มก./มล.)	0.625 (มก./มล.)	0.312 (มก./มล.)	0.156 (มก./มล.)	0.078 (มก./มล.)	control		
												D	M	H
***E. coli* ATCC 25913**	2.3±0.0	2.03±0.05	1.83±0.05	1.43±0.05	1.27±0.06	1.2±0.05	1.13±0.05	1.03±0.05	-	-	-	-	-	-
K. pneumoniae	1.97±0.06	1.82±0.1	1.63±0.12	1.50±0.1	0.97±0.05	0.97±0.05	0.87±0.02	0.76±0.02	0.7±0.0	-	-	-	-	-
P. mirabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. aeruginosa	1.1±0.0	1.0±0.0	0.9±0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A. baumannii	0.83±0.05	0.7±0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. marcescens	1.3±0.05	1.4±0.0	1.18±0.13	1.03±0.09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึงเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร อักษรย่อ H หมายถึง H_2O, D หมายถึง DMSO, M หมายถึง เมทานอล

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบฤทธิ์ของยาเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาส 6 ชนิดโดยวิธี agar diffusion susceptibility test

แบคทีเรีย	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย MIC (มก./มล.)		
	ชนิดของสารที่ใช้ทดสอบ		
	รางจืด	แอมพิซิลิน	เตตราซัยคลิน
***E. coli* ATCC 25913**	80	0.312	0.625
K. pneumoniae	40	0.625	0.312
P. mirabilis	40	80	>80
P. aeruginosa	10	5	20
A. baumannii	80	80	40
S. marcescens	40	0.312	10

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบ และขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้ง พบว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นทั้งของสารสกัดรางจืดด้วยเมทานอล ยาแอมพิซิลินและเตตราซัยคลิน ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้งจะเพิ่มขึ้นด้วย (ภาพที่ 1-3) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดรางจืดกับยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Duncan พบว่าสารสกัดรางจืดมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาสบางสายพันธุ์ได้ในระดับที่ต่ำกว่ายาปฏิชีวนะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากรางจืดมีฤทธิ์ ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสบางสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสอดคล้องกับการทดลองของ Silpasuwon (1979) ซึ่งพบว่ารางจืดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E. coli, K. pneumoniae* และ *S. marcescens* อธิบายภาพที่สี่

สารออกฤทธิ์จากรางจืดที่ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ อาจจะเป็นสารกลุ่ม flavonoid glycoside, iridoid glucosides และ steroid มีกล่าวอ้างอิงไว้ในรายงานว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ (Khunkitti *et al*., 2003; Kanchanapoom *et al*., 2002) ดังนั้นควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาสในรางจืดเป็นสารประกอบชนิดใดและใช้กลไกใดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดเมทานอลจากรางจืดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาส 6 ชนิดที่นำมาทดสอบคือ *E. coli* ATCC25913, *K. pneumoniae, P. mirabilis, P. aeruginosa, S. marcescens* และ *A. baumannii* พบว่าสารสกัดจากรางจืดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบฉวยโอกาสทุกชนิดที่นำมาทดสอบ โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 10-80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และเตตราซัยคลิน สารสกัดเมทานอลจากรางจืดยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิดยกเว้นเชื้อ *P. mirabilis* และ *P. aeruginosa* ต่ำกว่ายาปฏิชีวนะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

เอกสารอ้างอิง

ชะลอ อุทกภาชน์. (2519). ยาสมุนไพรกับโรคในประเทศเขตร้อนและวิธีการบำบัดรักษากรุงเทพฯ: แพร่พิทยาอินเตอร์-เนชั่นแนล.

ทวีวงศ์ ตันตราชีวธร, นิรมล วิทิตภัทรภาคย์ และอุราภรณ์ ภูมิศานติพงศ์. (2550). ระบาดวิทยาการติดเชื้อแบคทีเรียในโรงพยาบาลของผู้ป่วยเด็กที่วิทยาลัยแพทย์ศาสตร์กรุงเทพมหานคร และวชิรพยาบาล. *จดหมายเหตุทางการแพทย์ แพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, 90*(2), 258-265.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2547). แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

ผการัตน์ ตั้งเขื่อนขันธ์ และละออง พรหมเอาะ. (2540). การตั้งตำรับครีมสมุนไพรของสารสกัดจากใบรางจืดเพื่อใช้ต้านการอักเสบ. ปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต, คณะเภสัชศาสตร์,มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Aritajat, S., Wutteerapol, s., & Saenphet, K. (2004). Anti-diabetic effect of Thunbergia laurifolia Linn. aqueous extract. *Southeast Asian Journal of tropical Medicine & Public Health, 35*(2), 53-58.

Kanchanapoom, T., Kasai, R., & Yamasaki, K. (2002). Iridoid glucosides from *Thunbergia laurifolia. Phytochemistry, 60*, 769 -771.

Khunkitti, W., Taweechaisupapong, S., Aromdee, A., & Pese, M. (2003). Antimicrobial activity of *Thunbergia laurifolia* Crude extract. *The 3rd world congress on medicinal plant and aromatic plants for human welfare, 3-7 Feb 2003, Chiang Mai, Thailand.*

Pramyothin, P., Chirdchupunsare, H., Rungsipipat, A., and Chaichantipyuth, C. (2005). Hepatoprotective activity of *Thunbergia laurifolia* Linn extract in rat treated with ethanol : in vitro and in vivo studies. *Journal of Ethnopharmacology, 102*, 408-411.

Ratchadaporn Oonsivilai, Crystal Cheng, Joshua Bomser, Mario G. Ferruzzi, Suwayd Ningsanond. (2007). Photochemical profiling and phase II enzyme-inducing properties of *Thunbergia laurifolia* Lindl. (RC) extracts. *Journal of Ethnopharmacology, 114* (3), 3, 300-306d.

Rattanakiat, S. (2002). Anti-Herpes Simplex Virus Type 2 Activity of Some Thai Medicinal Plant Extracts. Thesis of Master's Degree, Microbiology, Chulalongkorn University.

Ruangyuttikarn, W. (1980). The Pharmacological Studies of Rang Jert leaves. Thesis of Master's Degree, Pharmacology, Chiang Mai University.

Silpasuwan, S. (1979). Studies of the effects of some medicinal plants on growth of some bacteria in the family Enterobacteriaceae. Thesis of Master's Degree, ChiangMai University.

Tecuasophon, S., & Nimnoi, S. (2003). Antioxidant activity of herbal tea. Project, Pharmacy, Mahidol University.

Thongsaard, W., & Marsden, C. A. (2002). A herbal medicine used in the treatment of addiction mimics the action of amphetamine on in vitro rat striatal dopamine release. *Neuroscience Letters, 329*, 129-132.

Zhang, Z. J. (2004). Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sciences, 75*(14), 1659-1699.