สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองสำหรับทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์จากรักดำ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส มีดังนี้

1. สารบริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์

สารบริสุทธิ์ที่ใช้ทดสอบคือ friedelin มวลโมเลกุลเท่ากับ 428 กรัมต่อโมล ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากรักดำ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.วารี เนื่องจำนงค์ ปี พ.ศ. 2554

2. อุปกรณ์

2.1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri dish)

2.2 บีกเกอร์ (beaker)

2.3 กระบอกตวง (cylinder)

2.4 หลอดทดลอง (test tube)

2.5 ขวดแก้วรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

2.6 เครื่องชั่งดิจิตอล (OHAUS รุ่น ARD120, U.S.A.)

2.7 ตู้บ่ม (incubator) (EHRET รุ่น BK 4266, Germany) อุณหภูมิ 37 ^{o}C

2.8 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) (Tommy, U.S.A.)

2.9 ออโตปิเปต (automatic pipettes) ขนาด 20, 200 และ 1,000 µl (Gilson, USA)

2.10 Centrifuge tube ขนาด 15 ml และขนาด 1.5 ml (Corning, U.S.A.)

2.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

2.12 เครื่อง Centrifuge

2.13 conical tube ขนาด 15 ml

2.14 laminaflow (Astec รุ่น HLF 1200E, England)

2.15 Sterile spreader รูป L แบบแท่งแก้ว

2.16 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 (Whatman International, England)

2.17 กระดาษกรองขนาด 0.2 µm (Pall Corporation, U.S.A.)

2.18 สำลี

2.19 เข็มเขี่ย

337486

2. อุปกรณ์ (ต่อ)

2.20 ถุงพลาสติก

2.21 ถุงมือ

2.22 กระบอกฉีดยา

2.23 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.24 aluminium foil

2.25 loop เขี่ยเชื้อ

2.26 tip

3. สารเคมี

3.1 95 % ethanol

3.2 70 % ethanol

3.3 0.85 % NaCl

3.4 McFarland Standard No. 0.5

3.5 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Fisher Chemicals, England)

3.6 น้ำกลั่น

3.7 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.7.1 Nutrient agar (NA) (Merck, Germany)

3.7.2 Mueller Hinton broth (MHB) (Becton Dickinson and company, U.S.A.)

3.8 ยาปฏิชีวนะ

3.8.1 แอมพิซิลลิน (T.P. Drug Laboratories, Thailand)

3.8.2 เตตราซัยคลิน (Sigma-Aldrich, Germany)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่นำมาศึกษา เป็นแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้แก่ *E. coli* ATCC 25913, *A. baumannii* และ *P. aeruginosa*

2. การเตรียมสารละลาย (stock solution)

การเตรียมสารละลายของสารบริสุทธิ์ friedelin ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน (ภาคผนวก ค)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1 เตรียม Master stock ของสารบริสุทธิ์ friedelin ที่ความเข้มข้น 46,121.5 ไมโครโมลาร์ โดยผสมสารบริสุทธิ์ และ DMSO ลงใน conical tube ขนาด 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex แล้วกรองสารละลายด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นเตรียมสารละลายสารบริสุทธิ์ friedelin ที่ระดับความเข้มข้น 2048, 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ โดยเริ่มจากการเตรียม stock solution ที่ระดับความเข้มข้น 2048 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ออโตปิเปตดูดสารละลายของสารบริสุทธิ์ friedelin จาก Master stock ปริมาตร 44.40 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1,000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex ได้ความเข้มข้นของสารละลายสารบริสุทธิ์ friedelin เท่ากับ 2048 ไมโครโมลาร์ เป็น stock solution จากนั้นเตรียมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด (สำหรับเตรียมความเข้มข้น 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์) เจือจาง stock solution ความเข้มข้น 2048 ไมโครโมลาร์ ด้วยเทคนิค 2-fold dilution จนถึงระดับความเข้มข้น 64 ไมโครโมลาร์

2.2 เตรียม Master stock ของยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน ที่ความเข้มข้น 10^5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 10 ml โดยผสมยาปฏิชีวนะและน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้เข้ากันด้วย vortex แล้วกรองสารละลายด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้น 2048, 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ โดยเริ่มจากการเตรียม stock solution ที่ความเข้มข้น 2048 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ออโตปิเปตดูดสารละลายยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดจาก Master stock มาชนิดละ 20.48 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ชนิด แต่ละหลอดเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1,000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex ได้ความเข้มข้นของสารละลายยาปฏิชีวนะเท่ากับ 2048 ไมโครโมลาร์ เป็น stock solution จากนั้นเตรียมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด (สำหรับเตรียมความเข้มข้น 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์) จากนั้นเจือจาง stock solution ความเข้มข้น 2048 ไมโครโมลาร์ ด้วยเทคนิค 2-fold dilution จนถึงระดับความเข้มข้น 64 ไมโครโมลาร์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การหาค่า MIC โดยวิธี Broth dilution susceptibility test (CLSI, 2006)

3.1 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) ของสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะโดยวิธี Broth dilution susceptibility test (CLSI, 2006)

3.1.1 เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25913, *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง

3.1.2 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 4–5 โคโลนี มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–3 ชั่วโมง

3.1.3 เทียบความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25913, *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* โดยเทียบความขุ่นของเชื้อกับ McFarland No. 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) เจือจางด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 % เพื่อให้เชื้อเริ่มต้นแต่ละชนิดมีปริมาณใกล้เคียงกันมากที่สุด

3.1.4 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เทลงในหลอดทดลองขนาดกลาง ใช้ออโตปิเปตดูดเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 ที่เทียบความขุ่นแล้วในข้อ 3.1.3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหาร MHB ดังกล่าว จากนั้นใช้ออโตปิเปตดูดสารละลาย friedelin ความเข้มข้น 1024 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร MHB จากนั้นเขย่าส่วนผสมให้เข้ากันด้วย vortex บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–3 ชั่วโมง (น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุม)

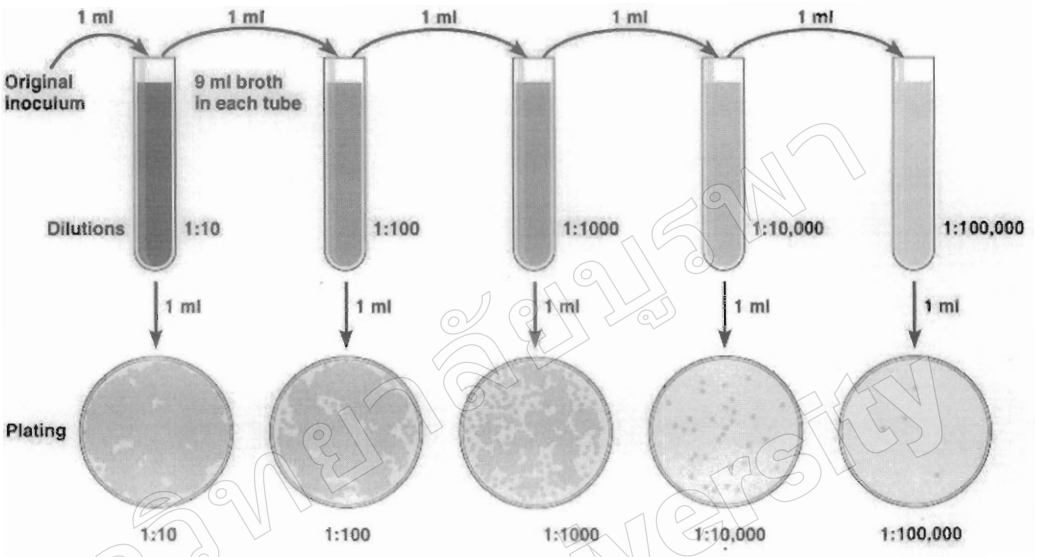
3.1.5 ทำการทดลองซ้ำข้อ 3.1.4 แต่เปลี่ยนเป็นเชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *A. baumannii* ที่เทียบความขุ่นแล้วในข้อ 3.1.3

3.1.6 ใช้ออโตปิเปตดูดน้ำเกลือปลอดเชื้อ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ใส่ใน Centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด ต่อหนึ่งความเข้มข้นในข้อ 3.1.4

3.1.7 นำเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 จากข้อ 3.1.4 มา dilution ในน้ำเกลือที่เตรียมไว้ด้วยเทคนิค 10-fold dilution จะได้เชื้อที่มีความเข้มข้น $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$ และ $1:10^{-5}$ ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 3-1)

3.1.8 เลือก Centrifuge tube ที่บรรจุเชื้อความเข้มข้น $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$, $1:10^{-5}$ ไมโครโมลาร์ มาทำการทดลองต่อ

3.1.9 ใช้ออโตปิเปตดูดเชื้อที่ความเข้มข้น $1:10^{-3}$ ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหาร NA ที่เตรียมไว้ แล้วใช้ Sterile spreader รูป L แบบแท่งแก้ว เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร NA แต่ละความเข้มข้นของเชื้อ ทำ 3 ซ้ำ



ภาพที่ 3-1 วิธีการนับโคโลนีของแบคทีเรียด้วยวิธี Serial dilutions (CLSI, 2006)

3.1.10 ทำจนครบทุกความเข้มข้นของเชื้อที่ dilution ไว้

3.1.11 สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ให้ทำเช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25913 เมื่อทำครบทุกเชื้อแล้ว รอให้แห้ง บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ)

3.1.12 นำจานเพาะเชื้อออกมานับจำนวนโคโลนีให้อยู่ประมาณ 1-200 โคโลนี นับทั้งหมด 3 ซ้ำ บันทึกผลและหาค่าเฉลี่ย

3.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) ของสารบริสุทธิ์ friedelin ผสมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน โดยวิธี Broth dilution susceptibility test (CLSI, 2006)

3.2.1 ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.1.1-3.1.3

3.2.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เทลงในหลอดทดลองขนาดกลาง ดูดเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 ที่เทียบความขุ่นแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหาร MHB ดังกล่าว จากนั้นใช้ออโตปิเปตดูดสารละลาย friedelin ความเข้มข้น 2048 ไมโครโมลาร์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลายแอมพิซิลลินความเข้มข้น 2048 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร MHB จากนั้นเขย่าส่วนผสมให้เข้ากันด้วย vortex ดังนั้น ในหลอดทดลองตอนนี้จึงมีอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร รวมกับเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 ที่เทียบ McFarland แล้ว 100 ไมโครลิตร สารละลาย friedelin ความเข้มข้น 2048 ไมโครโมลาร์ และสารละลายแอมพิซิลลินความเข้มข้น 2048 ไมโครโมลาร์ อีกอย่างละ 50 ไมโครลิตร บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2--3 ชั่วโมง (ทดสอบจนครบทุกคู่ความเข้มข้นของ friedelin กับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน โดยมีน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุม)

3.2.3 ใช้ออโตปิเปตดูดน้ำเกลือปลอดเชื้อ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ใส่ใน Centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด ต่อหนึ่งความเข้มข้น

3.2.4 นำเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 จากข้อ 3.2.2 มา dilution ในน้ำเกลือที่เตรียมไว้ด้วยเทคนิค 10-fold dilution จะได้เชื้อที่มีความเข้มข้น $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$ และ $1:10^{-5}$ ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

3.2.5 ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.1.8-3.1.9

3.2.6 ทำจนครบทุกความเข้มข้นของเชื้อที่ dilution ไว้ และทำจนครบทุกความเข้มข้นของ friedelin กับ แอมพิซิลลิน

3.2.7 สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ให้ทำเช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25913 เมื่อทำครบทุกเชื้อแล้ว รอให้แห้ง บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ)

3.2.8 นำจานเพาะเชื้อออกมานับจำนวนโคโลนีให้อยู่ประมาณ 1-200 โคโลนี นับทั้งหมด 3 ซ้ำ บันทึกผลและหาค่าเฉลี่ย

3.2.9 ทำซ้ำข้อ 3.2.1-3.2.8 แต่เปลี่ยนจากแอมพิซิลลินเป็นเตตราซัยคลิน

3.2.10 หาค่า CFU (Colony forming unit) ดังนี้

จำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง = A (Colony) × B (Dilution) × 10

โดยมีหน่วยเป็น CFU/ml

A หมายถึง ค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียบนจานอาหาร 3 จาน ที่ระดับการเจือจางเดียวกัน

B หมายถึง ส่วนกลับของระดับการเจือจาง

10 หมายถึง ค่า factor ของปริมาตรของความเข้มข้นของแบคทีเรียที่รอดชีวิตทั้งหมดต่อแบคทีเรียที่นำมานับจริง

4. การหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (fractional inhibitory concentration: FIC) (Mackay, Milne, & Gould, 2000)

นำค่า MIC ที่ได้จากข้อ 3.1 และ 3.2 มาคำนวณ FIC ดังนี้

FIC ของแอมพิซิลลิน = MIC ของแอมพิซิลลินที่ใช้ร่วมกับ friedelin / MIC ของแอมพิซิลลินอย่างเดียว

FIC ของเตตราซัยคลิน = MIC ของเตตราซัยคลินที่ใช้ร่วมกับ friedelin / MIC ของเตตราซัยคลินอย่างเดียว

การแปลผล FIC ≤ 0.5 คือ เสริมฤทธิ์กัน (syncrgy)

0.5 < FIC ≤ 4.0 คือ ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifference)

FIC > 4.0 คือ ฤทธิ์ต้านกัน (antagonism)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้โปรแกรมสถิติ SPSS 17 ออกแบบการทดสอบด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-Way ANOVA) หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ friedelin และความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ที่ความเข้มข้น 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ กับค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25913, *P. aeruginosa* และ *A. baumannii*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

A. baumannii และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี Broth dilution susceptibility test โดยอ่านผลจากค่าเฉลี่ยของการนับจำนวนโคโลนีที่รอดจากการถูกยับยั้ง ซึ่งเปรียบเทียบกับน้ำ ให้ผลดังตารางที่ 4-3 A, 4-3 B, 4-4 A, 4-4 B, 4-5 A และ 4-5 B

สำหรับเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 พบว่า friedelin มีประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของแอมพิซิลลิน ต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 256/512 µM มีค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (FIC) เท่ากับ 0.25 แสดงว่าเสริมฤทธิ์กัน (synergy) รองลงมาคือ การเสริมฤทธิ์ของ friedelin ร่วมกับเตตราซัยคลิน ต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 ซึ่งดีที่สุดที่ความเข้มข้น 256/1024 µM มีค่า FIC เท่ากับ 0.5 แสดงว่า friedelin เสริมฤทธิ์ร่วมกับเตตราซัยคลินเช่นเดียวกับเสริมฤทธิ์ร่วมกับแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 (ตารางที่ 4-3 A, 4-3 B, 4-7 และ 4-8) เมื่อพิจารณาจากกราฟเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด ร่วมกับการพิจารณาค่า Titer ซึ่งเป็นค่าสัดส่วนระหว่าง ค่า MIC ของ friedelin ต่อค่า MIC ของ friedelin เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ (ภาพที่ 4-4, 4-5 และตารางที่ 4-6) พบว่า friedelin มีประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์กับแอมพิซิลลินได้ดีขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของแอมพิซิลลินสูงในระดับ 128-1024 µM (ค่า Titer เท่ากับ 2 และ 4) ร่วมกับ friedelin สูงในระดับ 512-1024 µM เช่นเดียวกับการเสริมฤทธิ์ของ friedelin ร่วมกับ เตตราซัยคลิน ซึ่งมีประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ได้ดีขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของเตตราซัยคลินสูงในระดับ 128-1024 µM (ค่า Titer เท่ากับ 1) ร่วมกับ friedelin สูงในระดับ 512-1024 µM เช่นเดียวกัน

สำหรับเชื้อ *A. baumannii* พบว่า friedelin มีประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของแอมพิซิลลินต่อการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 512/1024 µM มีค่า FIC เท่ากับ 0.5 แสดงว่าเสริมฤทธิ์กัน (ตารางที่ 4-4 A และ 4-7) แต่ friedelin กลับไม่สามารถเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ซึ่งมีค่า FIC เท่ากับ 1 ($0.5 < FIC \leq 4.0$ หมายความว่าการใช้ friedelin ร่วมกับเตตราซัยคลิน มีฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้ friedelin หรือเตตราซัยคลินเพียงอย่างเดียว (indifference)) (ตารางที่ 4-4 B และ 4-8) แต่พบว่า friedelin มีประสิทธิภาพเสริมฤทธิ์กับแอมพิซิลลินเมื่อใช้ความเข้มข้นของแอมพิซิลลินในระดับที่สูงมากจึงจะยับยั้งเชื้อนี้ คือ 512-1024 µM ร่วมกับการใช้ friedelin 1024 µM (ค่า Titer เท่ากับ 2 และ 1) (ภาพที่ 4-6 และตารางที่ 4-6)

สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่า friedelin มีประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ต่อการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 256/512 µM มีค่า FIC เท่ากับ 0.5 แสดงว่า friedelin เสริมฤทธิ์กับแอมพิซิลลิน รองลงมาคือ การเสริมฤทธิ์ของ friedelin ร่วมกับ

เตตราซัยคลิน ต่อการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งดีที่สุดที่ความเข้มข้น 512/256 µM มีค่า FIC เท่ากับ 0.5 แสดงว่า friedelin เสริมฤทธิ์ร่วมกับเตตราซัยคลิน เช่นเดียวกับเสริมฤทธิ์ร่วมกับแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* (ตารางที่ 4-5 A, 4-5 B, 4-7 และ 4-8) เมื่อพิจารณาจากกราฟเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด (ภาพที่ 4-8, 4-9 และตารางที่ 4-6) พบว่า friedelin มีประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์กับแอมพิซิลลินได้ดีขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของแอมพิซิลลินสูงในระดับ 256-1024 µM (ค่า Titer เท่ากับ 2 และ 8) ร่วมกับ friedelin สูงในระดับ 512-1024 µM ส่วนการเสริมฤทธิ์ของ friedelin ร่วมกับเตตราซัยคลิน มีประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ได้ดีขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของเตตราซัยคลินสูงในระดับ 256-1024 µM ร่วมกับ friedelin ในระดับ 128-512 µM (ค่า Titer เท่ากับ 8, 4 และ 2)

จากการทดสอบฤทธิ์ของ friedelin ร่วมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25913, *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* พบว่า การเสริมฤทธิ์ของ friedelin ร่วมกับยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสสามชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน โดยเฉพาะการใช้ friedelin ร่วมกับแอมพิซิลลินจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดได้ดีกว่าการใช้ร่วมกับเตตราซัยคลิน โดยเฉพาะประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 ซึ่งดีที่สุดที่ความเข้มข้น 256/512 µM สามารถลดค่า MIC ของแอมพิซิลลินลง 4 เท่า จาก 1024 µM เป็น 256 µM (ตารางที่ 4-9)

อย่างไรก็ตาม ควรมีการพิจารณาเลือกใช้การเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง friedelin และยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยบางชนิดควรใช้ friedelin ร่วมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน จะให้ผลการเสริมฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่า ส่วนเชื้อ *A. baumannii* ควรเลือกใช้แต่ friedelin เพียงอย่างเดียวในการยับยั้งการเจริญ (ตารางที่ 4-9)

ตารางที่ 4-1 เปรียบเทียบการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ friedelin จากรากรักดำ และยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25913. *A. baumannii* และ *P. aeruginosa*

สาร	ชนิดของแบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรีย (โคโลนี x10^6 ± S.D.) ที่รอดจากการถูกยับยั้งด้วยสารบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (CFU/ml)						ค่า MIC
		64 (µM)	128 (µM)	256 (µM)	512 (µM)	1024 (µM)	H_2O	(µM)
friedelin	*E. coli* ATCC 25913	197.33±4.51	153.33±5.86	113.67±5.03	57.33±1.53	32.00±3.46	204.00±3 61	512
	A. baumannii	203.33±5.51	181.67±7.51	88.00±3.61	85.00±4.58	66.00±4.00	278.67±4.51	256
	P. aeruginosa	11.47±0.51	9.30±0.46	7.73±0.57	4.87±0.76	1.00±0.20	18.83±0.50	1024
แอมพิซิลลิน	*E. coli* ATCC 25913	182.33±4.04	162.00±3.00	142.33±4.16	117.00±4.00	68.00±6.56	204.00±3.61	1024
	A. baumannii	250.00±6.24	152.00±6.56	114.00±7.00	135.00±9.54	72.33±7.57	278.67±4.51	1024
	P. aeruginosa	11.70±0.46	8.83±0.40	5.60±0.26	1.20±0.20	1.07±0.12	18.83±0.50	512
เตตราซัยคลิน	*E. coli* ATCC 25913	156.00±5.57	112.67±4.62	102.33±4.73	43.00±4.58	29.67±4.16	204.00±3.61	512
	A. baumannii	226±8.19	176.00±4.58	118.33±4.51	98.33±6.51	46.67±4.51	278.67±4.51	1024
	P. aeruginosa	9.67±0.47	7.63±0.42	5.03±0.35	3.90±0.36	1.33±0.25	18.83±0.50	1024

ตารางที่ 4-2 เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารบริสุทธิ์ friedelin จากรากรักดำ และยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25913, *A. baumannii* และ *P. aeruginosa*

สาร	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (μM)		
	***E. coli* ATCC 25913**	***A. baumannii***	***P. aeruginosa***
friedelin	512	256	1024
แอมพิซิลลิน	1024	1024	512
เตตราซัยคลิน	512	1024	1024

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-3 A เปรียบเทียบการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25913

ความเข้มข้นของแอมพิซิลลิน (µM)	จำนวนแบคทีเรีย (โคโลนีx10^5 ± S.D.) ที่รอดจากการถูกยับยั้งด้วยสารบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (CFU/ml)						ค่า MIC (µM)
	ความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ friedelin (µM)						
	64	128	256	512	1024	H_2O	
64	40.45±1.43	39.45±1.40	33.50±2.12	26.47±2.29	21.03±1 12		
128	39.85±1.64	38.40±1.51	28.13±1.81	22.38±2.83	19.28±1.37		
256	39.15±1.38	37.42±2.49	23.73±2.68	13.63±2.14	14.05±2.11	40.57±0.55	256/512
512	38.60±2.07	32.38±1.50	27.63±2.22	18.30±2.33	13 32±2.41		
1024	38.83±2.31	20.45±1.60	21.18±3.36	18.80±2.38	11.92±1.41		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-3 B เปรียบเทียบการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25913

ความเข้มข้นของเตตราซัยคลิน (μM)	จำนวนแบคทีเรีย (โคโลนีx10^6 + S.D) ที่รอดจากการถูกยับยั้งด้วยสารบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (CFU/ml)						ค่า MIC (μM)
	ความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ friedelin (μM)						
	64	128	256	512	1024	H_2O	
64	401.83±10.89	315.33±12.21	270.83±15.05	227.50±23.22	166.00±23.06	420.67±12.9	256/1024
128	365.17±25.82	311.17±24.55	266.83±20.32	201.33±15.77	77.00±15.17		
256	342.17±20.43	268.83±20.68	264.50±19.41	197.83±29.42	48.50±13.22		
512	297.83±22.73	256.17±25.93	259.17±29.27	144.33±25.65	44.00±8.10		
1024	250.33±29.35	232.50±26.07	207.33±17.48	111.17±8.98	24.83±4.79		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-4 A เปรียบเทียบการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii*

ความเข้มข้นของแอมพิซิลลิน (μM)	จำนวนแบคทีเรีย (โคโลนีx10^6 ± S.D.) ที่รอดจากการถูกยับยั้งด้วยสารบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (CFU/ml)						ค่า MIC (μM)
	ความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ friedelin (μM)						
	64	128	256	512	1024	H_2O	
64	38.13±1.16	36.23±2.70	32.87±2.06	31.70±1.95	27.32±1.64	36.58±2.07	512/1024
128	34.92±2.30	31.90±1.65	29.00±1.61	27.92±2.13	25.83±2.89		
256	33.68±2.93	32.87±2.75	25.68±3.33	31.27±2.98	25.60±2.97		
512	35.62±3.19	28.73±1.71	31.73±1.82	29.62±2.33	20.55±1.38		
1024	31.78±2.34	32.72±1.33	27.12±1.38	23.82±2.64	21.00±2.10		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-4 B เปรียบเทียบการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii*

ความเข้มข้นของเตตราซัยคลิน (μM)	จำนวนแบคทีเรีย (โคโลนีx10^6 ± S.D.) ที่รอดจากการถูกยับยั้งด้วยสารบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (CFU/ml) ความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ friedelin (μM)						ค่า MIC (μM)
	64	128	256	512	1024	H_2O	
64	40.53±1.25	20.57±3.16	22.60±2.08	32.80±2.78	29.13±2.31	40.17±1.05	1024/1024
128	40.48±2.53	27.32±2.55	32.60±2.93	30.90±2.93	28.92±2.31		
256	39.23±2.93	28.75±1.97	20.18±2.45	30.08±2.47	24.50±1.13		
512	38.43±1.61	27.55±2.84	29.38±2.62	25.62±1.84	22 72±1.20		
1024	31.18±2.22	26.48±1.79	25.30±2.64	22.87±1.24	20.07±2.45		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-5 A เปรียบเทียบการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa*

ความเข้มข้นของแอมพิซิลลิน (μM)	จำนวนแบคทีเรีย (โคโลนีx10^6 ± S.D.) ที่รอดจากการถูกยับยั้งด้วยสารบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (CFU/ml) ความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ friedelin (μM)						ค่า MIC (μM)
	64	128	256	512	1024	H_2O	
64	1.63±0.19	1.41±0.13	1.15±0.13	1.27±0.21	1.60±0.09	1.69±1.76	256/512
128	1.25±0.17	1.15±0.05	0.99±0.12	1.46±0.26	1.29±0.23		
256	0.74±0.15	0.60±0.08	0.42±0.05	0.22±0.04	0.39±0.04		
512	1.53±0.09	0.46±0.08	1.32±0.21	1.31±0.25	0.86±0.12		
1024	0.85±0.11	0.44±0.08	0.72±0.11	0.60±0.10	0.20±0.04		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-5 B **เปรียบเทียบการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ** *P. aeruginosa*

ความเข้มข้นของเตตราซัยคลิน (μM)	จำนวนแบคทีเรีย (โคโลนีx10^6 + S.D.) ที่รอดจากการถูกยับยั้งด้วยสารบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (CFU/ml) ความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ friedelin (μM)						ค่า MIC (μM)
	64	128	256	512	1024	H_2O	
64	3.86±0.07	3.36±0.29	3.42±0.21	3.95±0.08	2.55±0.05		
128	3.60±0.39	3.13±0.26	3.04±0.16	2.69±0.12	2.24±0.38		
256	3.01±0.20	1.46±0.28	2.06±0.08	2.19±0.25	2.08±0.27	4.66±0.19	512/256
512	3.16±0.22	2.82±0.18	1.21±0.27	2.78±0.17	2.37±0.25		
1024	3.20±0.12	3.03±0.22	1.95±0.26	1.22±0.07	2.19±0.43		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-6 เปรียบเทียบค่า Titer ของการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสทั้งสามชนิด ระหว่างการใช้ friedelin เพียงอย่างเดียวกับการใช้ friedelin ร่วมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน

ชนิดของแบคทีเรีย	ค่า MIC ของ friedelin (μM)	ค่า MIC และ ค่า Titer	ค่า MIC ของ friedelin เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ และค่า Titer									
			ความเข้มข้นของแอมพิซิลลิน (μM)					ความเข้มข้นของเตตราซัยคลิน (μM)				
			1024	512	256	128	64	1024	512	256	128	64
E. coli ATCC 25913	512	MIC	128	128	256	256	512	512	512	512	512	1024
		Titer	4	4	2	2	1	1	1	1	1	0.5
A. baumannii	256	MIC	256	128	256	256	1024	1024	128	256	128	128
		Titer	1	2	1	1	0.25	0.25	2	1	2	2
P. aeruginosa	1024	MIC	128	128	512	>1024	>1024	512	256	128	1024	1024
		Titer	8	8	2	<1	<1	2	4	8	1	1

Titer คือ ค่าสัดส่วนระหว่าง ค่า MIC ของ friedelin ต่อค่า MIC ของ friedelin เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ

ค่า Titer มากกว่า 1 คือ เสริมฤทธิ์

ค่า Titer น้อยกว่า 1 คือ ต้านฤทธิ์

ค่า Titer เท่ากับ 1 คือ ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้แยกกัน

ตารางที่ 4-7 เปรียบเทียบค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (FIC) ของแอมพิซิลลิน

แบคทีเรีย	MIC แอมพิซิลลิน ที่ใช้ร่วมกับ friedelin (μM)	MIC แอมพิซิลลิน อย่างเดียว (μM)	FIC ของ แอมพิซิลลิน	การแปลผล
E. coli ATCC 25913	256	1024	0.25	เสริมฤทธิ์กัน
A. baumannii	512	1024	0.5	เสริมฤทธิ์กัน
P. aeruginosa	256	512	0.5	เสริมฤทธิ์กัน

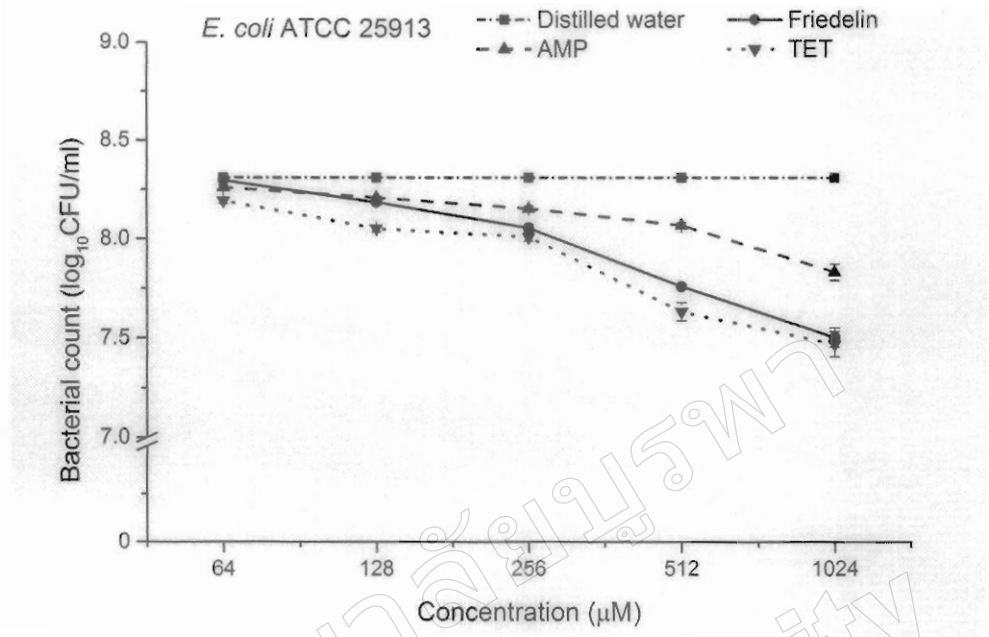
ตารางที่ 4-8 เปรียบเทียบค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (FIC) ของเตตราซัยคลิน

แบคทีเรีย	MIC เตตราซัยคลิน ที่ใช้ร่วมกับ friedelin (μM)	MIC เตตราซัยคลิน อย่างเดียว (μM)	FIC ของ เตตราซัยคลิน	การแปลผล
E. coli ATCC 25913	256	512	0.5	เสริมฤทธิ์กัน
A. baumannii	1024	1024	1.0	ฤทธิ์ไม่แตกต่างจาก การใช้สารตัวเดียว
P. aeruginosa	512	1024	0.5	เสริมฤทธิ์กัน

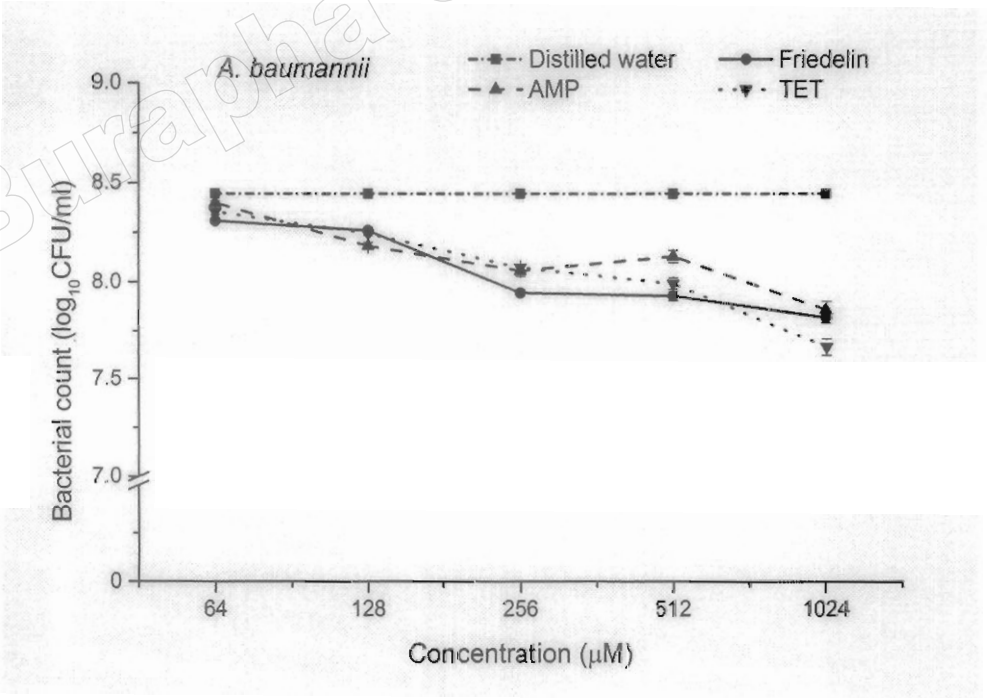
ตารางที่ 4-9 เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารบริสุทธิ์ friedelin ยาปฏิชีวนะ และการใช้ร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25913, *A. baumannii* และ *P. aeruginosa*

สาร	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย		
	***E. coli* ATCC 25913**	***A. baumannii***	***P. aeruginosa***
friedelin	512	256	1024
แอมพิซิลลิน	1024	1024	512
เตตราซัยคลิน	512	1024	1024
แอมพิซิลลิน + friedelin	256/512	512/1024	256/512
เตตราซัยคลิน + friedelin	256/1024	1024/1024	512/256

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

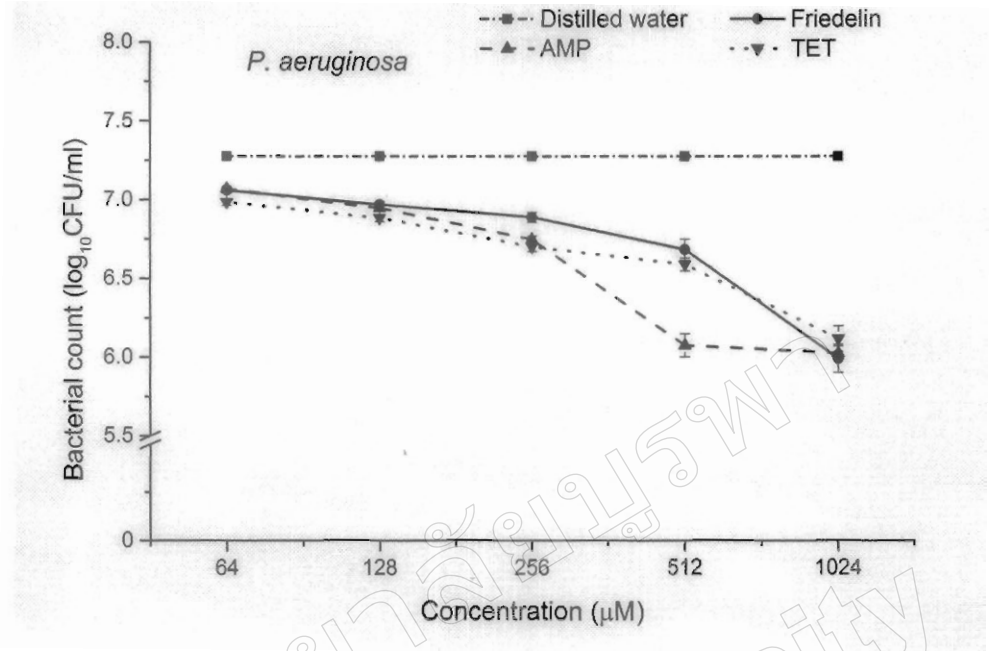


ภาพที่ 4-1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ friedelin แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25913



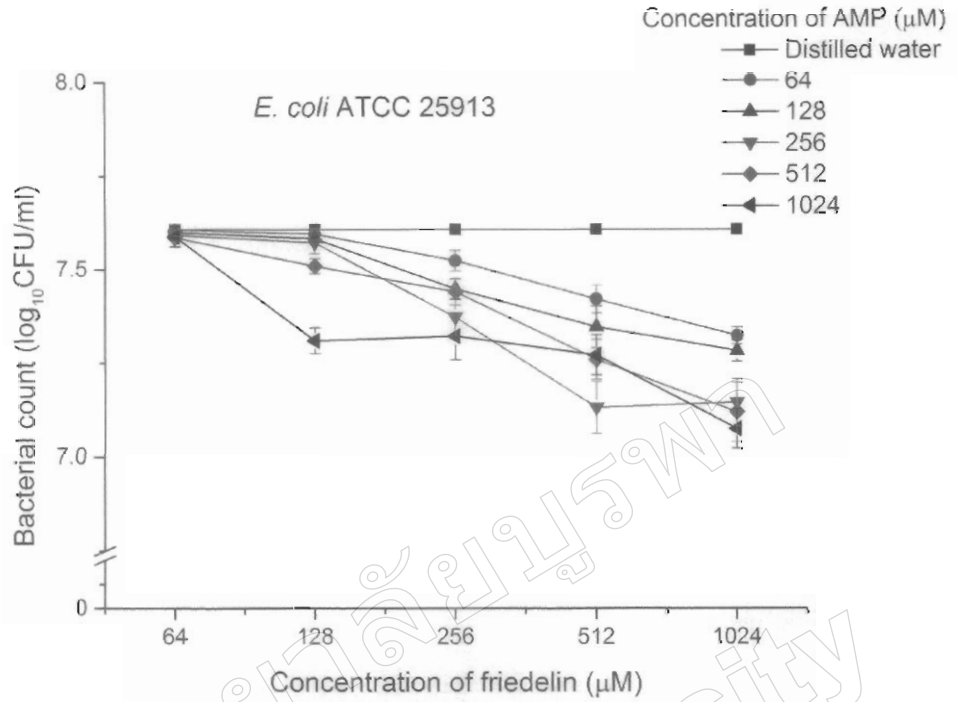
ภาพที่ 4-2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ friedelin แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

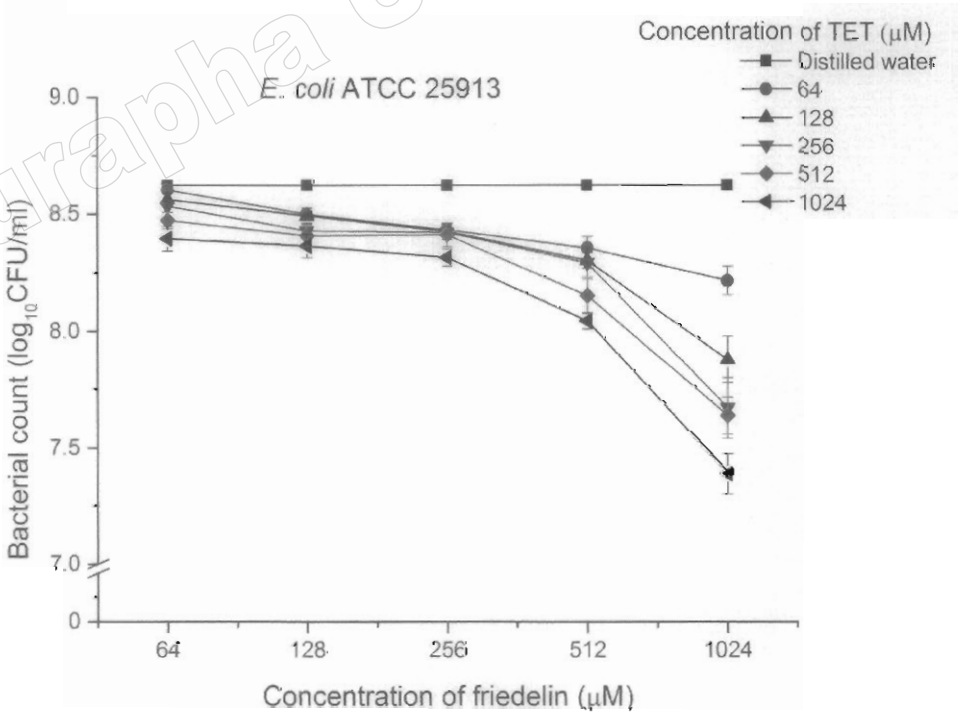


ภาพที่ 4-3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ friedelin แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

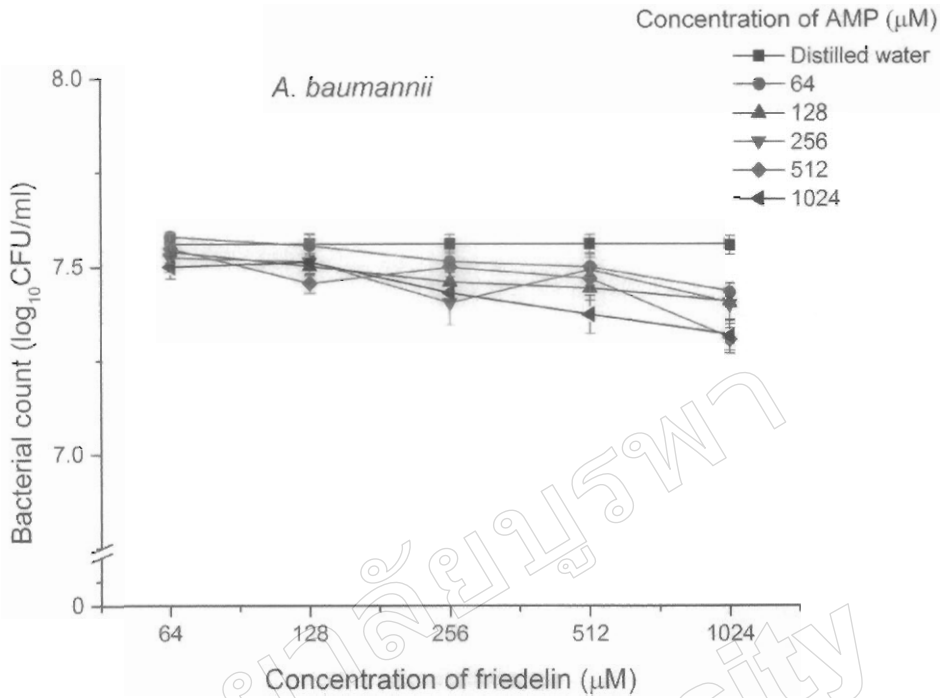


ภาพที่ 4-4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25913

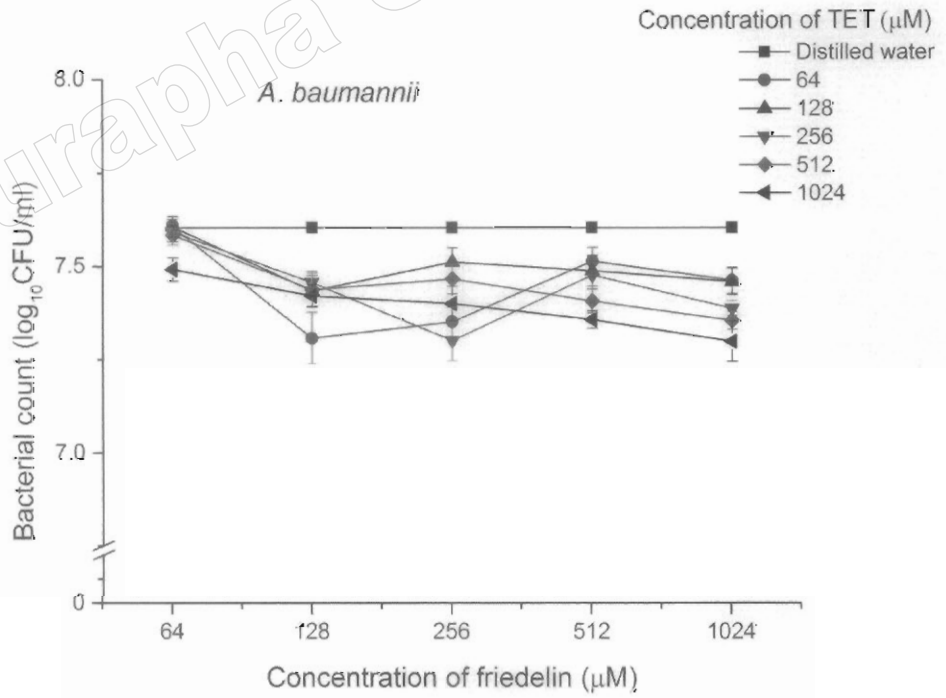


ภาพที่ 4-5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25913

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

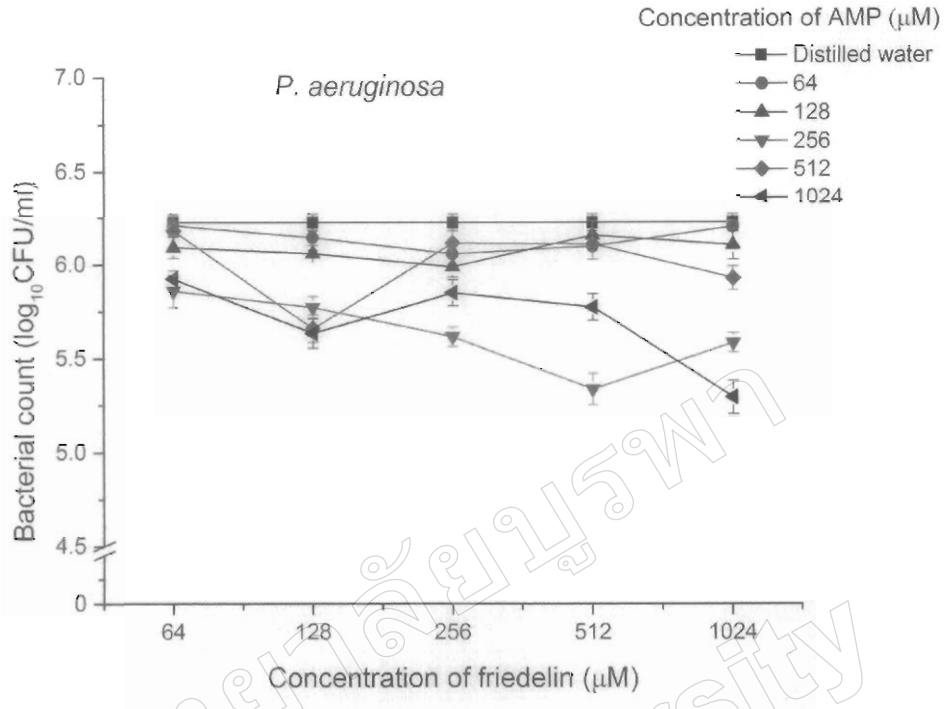


ภาพที่ 4-6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii*

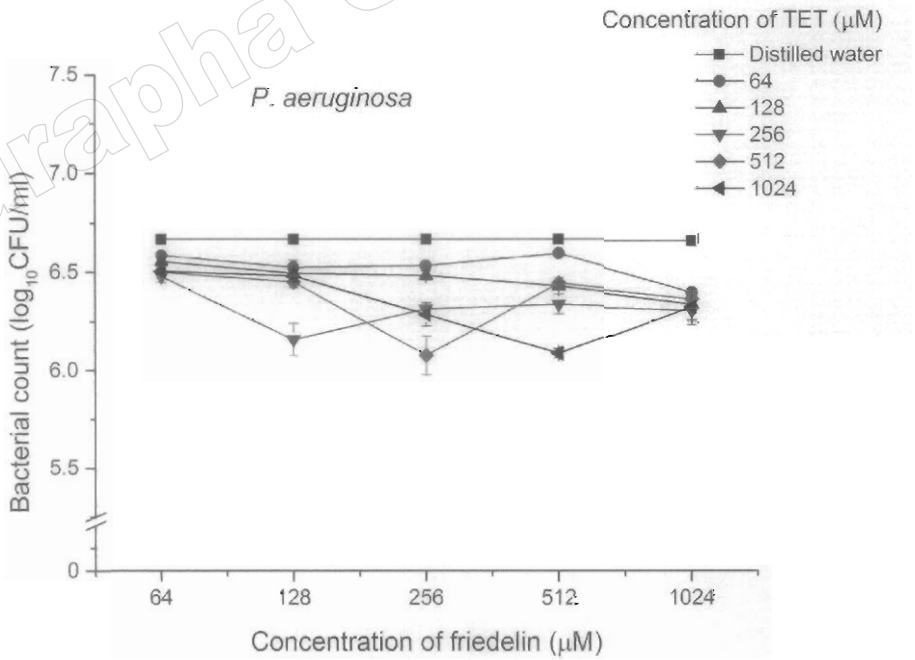


ภาพที่ 4-7 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-8 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa*



ภาพที่ 4-9 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารบริสุทธิ์ friedelin และยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University