ประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของ 3-ACETYL ALEURITOLIC ACID จากต้นดีหมี (*Cleidion spiciflorum* (Burm. f.) Merr.) และยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด

พรนภา ขาวประเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤศจิกายน 2561
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ นายนภา ขาวประเสริฐ นักศึกษาหลักสูตรนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาสรี ทองเจริญสุนทร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. วารี เมืองจำนงค์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทนา จิรถาวร)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาสรี ทองเจริญสุนทร)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วารี เมืองจำนงค์)

.....กรรมการ

(ดร.พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

คณะวิทยาศาสตร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 15 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทั้งนี้เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาตรี คงเจริญสุนทร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และ รองศาสตราจารย์ ดร.วารี เนื่องจำนงค์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาคำแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนช่วยแก้ปัญหา ข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนด้วยดีเสมอมาจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา จิรถาวร ประธานกรรมการพิจารณาวิทยานิพนธ์ จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้คำชี้แนะทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณโรงพยาบาลชลบุรี และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยเหลือให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย เจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยา รวมทั้งภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ เพื่อน ๆ ทุกคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อนร่วมทำงานวิจัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คอยเป็นกำลังใจ กำลังกายและกำลังทุนทรัพย์ที่สำคัญตลอดมาในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้จนสำเร็จไปได้ด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่ บุพการี อาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ทำให้ผู้วิจัยเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนถึงบัดนี้

พรนภา ขาวประเสริฐ

57920942: สาขาวิชา: ชีววิทยาศึกษา; วท.ม. (ชีววิทยาศึกษา)
คำสำคัญ: 3-ACETYL ALEURITOLIC ACID/ ดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม/ ค่าความเข้มข้นต่ำสุด/ การเสริมฤทธิ์

พรนภา ขาวประเสริฐ: ประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของ 3-ACETYL ALEURITOLIC ACID จากต้นดีหมี (*Cleidion spiciflorum* (Burm. f.) Merr.) และยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด (SYNERGISTIC EFFECT OF 3-ACETYL ALEURITOLIC ACID FROM *Cleidion spiciflorum* (Burm. f.) Merr. AND ANTIBIOTICS TO INHIBIT THE GROWTH OF SOME OPPORTUNISTIC BACTERIA) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิสาตรี คงเจริญสุนทร, Ph.D., วารี เนื่องจำนง, Ph.D. 85 หน้า ปี พ.ศ. 2561.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจฤทธิ์ต้านแบคทีเรียฉวยโอกาสของ 3-acetyl aleuritolic acid ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส 10 สายพันธุ์ จากดีหมี (*Cleidion spiciflorum* (Burm. f.) Merr.) และศึกษาการเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดโดยวิธี Agar diffusion susceptibility และหาค่าดัชนีวัดประสิทธิภาพร่วม (FICI) และศึกษาเวลาที่เหมาะ (Time-kill curve Assay) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ผลการวิจัยพบว่า 3-acetyl aleuritolic acid มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งเชื้อ *Acinetobacter baumannii Escherichia coli* ATCC25922 *Proteus mirabilis* และ *Serratia marcescens* (ค่า MIC อยู่ระหว่าง 128-256 ไมโครโมลลาร์) จากนั้นนำเชื้อที่ได้ผลมาทดสอบ การทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกัน พบว่า สาร 3-acetyl aleuritolic acid สามารถเสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลินการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. mirabilis* (FICI เท่ากับ 0.38) และนอกจากนี้พบว่า 3-acetyl aleuritolic acid สามารถเสริมฤทธิ์ร่วมกันบางส่วนกับยาเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC25922 ค่า (FICI เท่ากับ 0.53) และจากการศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาส พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ได้ดีเมื่อผสม ยาแอมพิซิลลิน เท่ากับ 1/8 เท่าของ MIC ยา ร่วมกับ 3-acetyl aleuritolic acid เท่ากับ 1/16 เท่าของ MIC ของสาร และสามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC25922 ได้ดีเมื่อผสมยาเตตราซัยคลินเท่ากับของ ¼ เท่าของ MIC ของยา ร่วมกับ 3-acetyl aleuritolic acid เท่ากับ 1/16 เท่าของ MIC ของสาร และเวลาที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. mirabilis* และ *E. coli* ATCC25922 ได้ดีที่สุดคือในชั่วโมงที่ 4-8 เมื่อผสมผลการศึกษาในครั้งนี้พิสูจน์ให้เห็นว่าสาร 3-acetyl aleuritolic acid ที่สกัดจากต้นดีหมีเสริมฤทธิ์ร่วมกับกับแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

57920942: MAJOR: BIOLOGY EDUCATION; M.Sc. (BIOLOGY EDUCATION)
KEYWORDS: 3-ACETYL ALEURITOLIC ACID/ FRACTIONAL INHIBITORY CONCENTRATION INDEX/ MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION/ SYNERGISTIC

PORNNAPA KAWPRASEAT: SYNERGISTIC EFFECT OF 3-ACETYL ALEURITOLIC ACID FROM *Cleidion spiciflorum* (BURM. F.) MERR. AND ANTIBIOTICS TO INHIBIT THE GROWTH OF SOME OPPORTUNISTIC BACTERIA. ADVISORY COMMITTEE: WISATRE KONGCHAROENSUNTORN, Ph.D., WAREE NAENGCHOMNONG, Ph.D. 85 P. 2018.

The objective of this research was to screening antibacterial activity of 3-acetyl aleuritolic acid from Dhemee (*Cleidion spiciflorum* (Burm. f.) Merr.) against ten species of opportunistic bacteria. Then, synergistic effect of 3-acetyl aleuritolic acid, combined to ampicillin and tetracycline was studied againsy some bacteria by using the agar diffusion susceptibility test. Next, FICI were determined for synergistic effect, and the time kill analysis was conducted against some bacteria. The results were shown that 3-acetyl aleuritolic acid exhibited antibacterial activity against *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ATCC25922, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens*, by 128-256 μM MICs. In the next study, the good results of antibacterial activity were studied by synergistic effect. The synergistic results indicated that 3-acetyl aleuritolic acid, combined to ampicillin, exhibited synergistic effects against *P. mirabilis* (FICI = 0.38). Alo, 3-acetyl aleuritolic acid, combined to tetracycline, exhibited partially synergistic effects against *E. coli* ATCC 25913 (FICI 0.53). Finally, the time kill analyse were tested to find the best time of which inhibited the growth of some opportunistic bacteria. The results indicated that concentration, mostly dccreased the number of *P. mirabilis* was using 1/8 MIC of MIC alone of ampicillin and 1/16 MIC of MIC alone of 3-acetyl aleuritolic acid. Moreover, the concentration, mostly dccreased the number of *E. coli* ATCC25922 was using ¼ MIC of MIC alone of tetracycline and 1/16 MIC of MIC alone of 3-acetyl aleuritolic acid. The specific time, mostly decrease the number of both *P. mirabilis* and *E. coli* ATCC25922 were at 4-8 hours after inculation. Finally, all results obtained in this research indicated that 3-acetyl aleuritolic acid pure compound form *Cleidion spiciflorum* had an effective synergism effect when combined to both ampicillin and tetracycline and indicted synergistic effect against some opportunistic bacteria.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

สมมติฐานของการวิจัย 3

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 4

สถานที่ปฏิบัติการทดลองงานวิจัย 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

รายละเอียดเกี่ยวกับสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา 5

รายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา 8

รายละเอียดเกี่ยวกับยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการศึกษา 11

รายงานวิจัยการเสริมฤทธิ์ของสารกลุ่ม Terpene leupane และ Flavoniods กับยาปฏิชีวนะ 14

3 วิธีดำเนินการวิจัย 16

อุปกรณ์และสารเคมี 16

วิธีการทดลอง 17

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 22

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

4 ผลการดำเนินงานวิจัย 23

การสำรวจฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสเบื้องต้นของ 3-acetyl aleuritolic acid ด้วยวิธี Agar diffusion susceptibility test 23

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี Agar diffusion susceptibility 34

การศึกษาผลของเวลาในการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ผสมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินและแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบต่อหน่วยเวลา (Time-kill curve assay) 47

5 อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 54

อภิปรายผลการวิจัย 54

ข้อเสนอแนะ 56

บรรณานุกรม 57

ภาคผนวก 61

ภาคผนวก ก 62

ภาคผนวก ข 73

ภาคผนวก ค 76

ภาคผนวก ง 79

ภาคผนวก จ 82

ประวัติย่อของผู้วิจัย 85

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3-1 การแปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI 20

4-1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดโดย วิธี Agar diffusion susceptibility test 25

4-2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดโดยวิธี Agar diffusion susceptibility test 26

4-3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดวิธี Agar diffusion susceptibility test 27

4-4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ยาแอมพิซิลลิน ยาและเตตราซัยคลินยาแอมพิซิลลินในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดวิธี Agar diffusion susceptibility test 28

4-5 เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ 31

4-6A การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา 38

4-6B การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา 39

4-7A การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli ATCC25922* 40

4-7B การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli ATCC25922* 41

4-8A การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* 42

4-8B การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* 43

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4-9 การแปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI 44

4-10 ค่า FICI ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แกรมลบบางสายพันธุ์ 45

4-11 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมระหว่าง 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลินและยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แบคทีเรีย แกรมลบฉวยโอกาสบางสายพันธุ์ 46

4-12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันของ 3-acetyl aleuritolic acid และยาปฏิชีวนะเปรียบเทียบกับเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะชนิดเดียว 47

ก-1 จำนวนข้อมูลของแบคทีเรียและความเข้มข้นของการออกฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดออกแบบสถิติด้วยวิธีแผนแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Minitab version 17 63

ก-2 วิเคราะห์ความแปรปรวนของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด แบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Minitab version 17 ... 64

ก-3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ด้วยวิธี Tukey 65

ก-4 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ด้วยวิธี Tukey 66

ก-5 วิเคราะห์ความแปรปรวนของยาเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ออกแบบสถิติด้วยวิธีแผนแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Minitab version 17 67

ก-6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ด้วยวิธี Tukey 68

ก-7 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ด้วยวิธี Tukey 69

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ก-8 วิเคราะห์ความแปรปรวนของยาแอมพิซิลลินความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ออกแบบสถิติด้วยวิธีแผนแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Minitab version 17 70

ก-9 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ด้วยวิธี Tukey 71

ก-10 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ด้วยวิธี Tukey 72

ข-1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมในการยับยั้งการเจริญของ *E.coli ATCC25922* ต่อหน่วยเวลา (Time-kill curve assay) ณ จุดเวลาที่ดีที่สุดของการยับยั้ง 74

ข-2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมในการยับยั้งการเจริญของ *P.mirabilis* (Time-kill curve assay) ต่อหน่วยเวลา ณ จุดเวลาที่ดีที่สุดของการยับยั้ง 75

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 ลักษณะของต้นดีหมี 5

2-2 โครงสร้างของ 3-acetyl aleuritolic acid 7

3-1 Checkerboard method 19

4-1 เปรียบเทียบฤทธิ์ของของ 3-acetyl aleuritolic acid กับแบคทีเรียแกรมลบ ฉวยโอกาส 32

4-2 เปรียบเทียบฤทธิ์ของยาแอมพิซิลลินกับแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส 33

4-3 เปรียบเทียบฤทธิ์ของยาเตตราซัยคลินกับแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส 34

4-4 ผลของสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อ *E. coli ATCC25922* ต่อหน่วยเวลา 49

4-5 ผลของสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อ *P. mirabili* ต่อหน่วยเวลา 50

4-6A เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli ATCC25922* ต่อหน่วยเวลา 51

4-6B เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis* ต่อหน่วยเวลา 52

จ-1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมใน การยับยั้งการเจริญของ *E.coli ATCC25922* ต่อหน่วยเวลา (Time-kill curve assay) ณ จุดเวลาที่ดีที่สุดของการยับยั้ง 83

จ-2 การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาปฏิชีวนะ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 84

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสที่มักก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25913, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus* และ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) แบคทีเรียเหล่านี้เป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานโรคต่ำและหากต้องนอนพักรักษาตัวในโรงพยาบาลอาจทำให้เกิดภาวะโรคแทรกซ้อนจากการติดเชื้อในตำแหน่งสำคัญต่าง ๆ เช่น ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ และแผลผ่าตัด นอกจากนี้เชื้อดังกล่าวสามารถปรับตัวดื้อยาปฏิชีวนะ ดังรายงานอุบัติการณ์การดื้อยา เช่น เชื้อที่สามารถพัฒนาการดื้อยาที่เรียกว่า Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) ดื้อยาในกลุ่ม Cephaloporin มีการพัฒนาเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Multidrug-resistant (MDR) ดื้อยาในกลุ่ม Amikacin, Ciprofloxacin และ Ceftazidime และเชื้อในกลุ่ม MRSA ที่ดื้อยากลุ่ม Methicillin (นิตยา อินทราวัฒนา และมุฑิตา วนาภรณ์, 2558) จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาในปัจจุบันใช้ไม่ได้ผล และมักเกิดผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ จึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่ต้องพัฒนาตัวยาตัวใหม่เสมออาจส่งผลให้เสียเวลาเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ทางเลือกใหม่ที่สำคัญคือการนำสมุนไพร หรือหาสารต้านแบคทีเรียจากสมุนไพร เพราะมีประวัติการใช้มาอย่างยาวนาน และมีความปลอดภัยสูง ดังรายงาน Chung, Navaratnam and Chung (2011) พบว่า Pentacyclic triterpenoids มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การสังเคราะห์ Macromolecular ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก และได้ทำการศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันของ Pentacyclic triterpenoids กับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* พบว่า สารให้การเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งต้นดีหมีเป็นพืชที่เริ่มมีผู้ศึกษาวิจัยด้านองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย และเนื่องจากต้นดีหมีอาจจะมีสารกลุ่ม Triterpenoids ที่สามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในทำนองเดียวกับสกัดสารจากลำต้น ใบและราก ของต้นน้ำนมราชสีห์ ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับต้นดีหมี พบสารกลุ่ม triterpenoids และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* (Ragasa & Cornelio, 2013) ดังนั้น ดีหมีอาจเป็นทางเลือกใหม่มาแก้ปัญหาแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำสารบริสุทธิ์ที่ได้จากต้นดีหมีมาผสมกับยาปฏิชีวนะเพื่อแก้ปัญหาแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เพื่อลดปริมาณและผลข้างเคียงของการใช้ยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้เพื่อเพิ่ม

คุณค่าของการนำดีหมีมาใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

ต้นดีหมี (*Cleidion spiciflorum*) จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae (วงศ์เปล้า) จัดเป็นไม้ยืนต้นสูงประมาณ 20 เมตร เปลือกต้นดูบางเรียบหรือหยาบเล็กน้อยสีเทาหรือสีน้ำตาล ใบเดี่ยว เรียงสลับรูปวงรีพบได้ในป่าดิบแล้ง ป่าผลัดใบ หรือขึ้นปนกับพวกไผ่ ดีหมีเป็นพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายในภาคกลาง มีประวัติใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยาโบราณของไทย และมีสรรพคุณทางยาดังนี้คือ น้ำต้มจากเปลือกดื่มเป็นยาแก้ปวดท้อง น้ำต้มจากใบมีพิษอาจทำให้สตรีมีครรภ์แท้งบุตร เมล็ดใช้กินเป็นยาระบาย (ก่องกานดา ชยามฤตม, 2548; Sanseera et al., 2012) การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบของต้นดีหมีพบว่า มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านสารอนุมูลอิสระ และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียคือ เชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* สารสำคัญที่พบในดีหมี ได้ 3-acetyl aleuritolic acid คือสารกลุ่ม triterpenoid (Naengchomnong et al., 2006) สารกลุ่ม Triterpenes ที่ได้จากรากน้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta*) ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับดีหมี มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* (Ragasa & Cornelio, 2013; Sanseera et al., 2012) มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย ที่สกัดจากใบของดีหมี พบว่า มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านออกซิเดชัน และพบสารกลุ่ม Triterpenoids มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *P.aeruginosa* มีค่า MIC เท่ากับ 12.50 mg/mL และ 25.00 mg/mL ตามลำดับโดยวิธี Agar diffusion method (Sanseera et al., 2012)

นอกจากนี้ดีหมียังมีสรรพคุณของการต้านอนุมูลอิสระ ดังรายงานการวิจัยพบว่า betulinic acid-3-trans-caffeat แยกได้จากส่วนสกัดของ *Acacia ataxacantha* มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน IC_{50} (เท่ากับ 3.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (Amoussa et al., 2016) และพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากเมทานอลจากน้ำนมราชสีห์ซึ่งเป็นพิชวงค์เดียวกับต้นดีหมี ด้วยวิธี DPPH ซึ่งสารสกัดจากใบมี DPPH สูงสุด เท่ากับ 72.96 ±0. 78% (Basma1 et al., 2011) ดังนั้นคุณสมบัติของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ควบคู่กับการเป็นสารต้านแบคทีเรีย อาจจะทำให้การรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสให้ได้ผลดียิ่งขึ้น เพราะการลดปริมาณอนุมูลอิสระลง ส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยวิกฤตจากโรคเรื้อรังต่าง ๆ มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Dhama et al., 2014)

การศึกษาในครั้งนี้ได้นำสารบริสุทธิ์จากต้นดีหมีคือ 3-acetyl aleuritolic acid มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อพิสูจน์ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระจากสารบริสุทธิ์เพื่อพัฒนาหรือนำไปใช้ควบคู่กับยาปฏิชีวนะ งานวิจัยนี้อาจเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการยับยั้งกลไกดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งอาจจะช่วยลดอุบัติการณ์ดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งเป็นการวิจัยในการพัฒนา 3-acetyl aleuritolic acid จากต้นดีหมี เพื่อเป็นยารักษา

โรคจากการติดเชื้อฉวยโอกาสต่อไปในอนาคต หรือนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปของยารักษาโรค อาหารเสริมและเครื่องสำอาง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ 3-acetyl aleuritolic acid กับแอมพิซิลลิน (Ampicillin) และเตตราซัยคลิน (Tetracycline) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง 3-acetyl aleuritolic acid กับแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย
3. เพื่อศึกษา Time-kill curve Assay ของเชื้อแบคทีเรีย

สมมติฐานของการวิจัย

1. 3-acetyl aleuritolic acid จาก *C. spiciflorum* และยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย
2. ศึกษาประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง 3-acetyl aleuritolic acid กับแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินโดยหาความเข้มข้นของ 3-acetyl aleuritolic acid และยาปฏิชีวนะที่น้อยที่สุด เมื่อใช้ร่วมกันที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Agar diffusion susceptibility test
3. ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารบริสุทธิ์จากต้นดีหมี (*C. spiciflorum*) (3-acetyl aleuritolic acid) โดยศึกษาจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC)
2. ทราบถึงการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง 3-acetyl aleuritolic acid กับแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย
3. ผลจาก Time-kill curve เพื่อได้เวลาฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด

ขอบเขตของการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาทั้งหมด 10 เชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa, P. aeruginosa* (ดื้อยา), *A. baumannii*, *A. baumannii* (ดื้อยา), *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *S. aureus* และ MRSA
2. สารบริสุทธิ์ที่ได้จากต้นดีหมี (*C. spiciflorum*) คือ 3-acetyl aleuritolic acid
3. ยาปฏิชีวนะที่ใช้ คือ แอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน
4. หาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (Minimum inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี Agar diffusion susceptibility test
5. หาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง 3-acetyl aleuritolic acid กับแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย
6. หาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Time-kill curve Assay

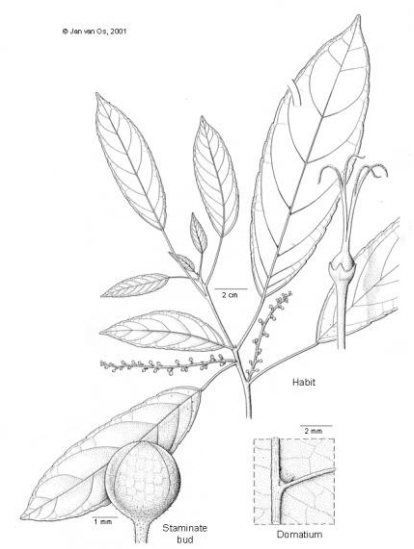
สถานที่ปฏิบัติการทดลองงานวิจัย

ห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุลและสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รายละเอียดเกี่ยวกับสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์



ภาพที่ 2-1 ลักษณะของต้นดีหมี

ที่มา: www.nationaalherbarium.nl/Euphorbs/images/C/Cleijava-habit.gif

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cleidion spiciflorum (Burm. f.)* Merr.

ชื่อพ้อง *Cleidion javanicum* Blume

ชื่อวงศ์ EUPHORBIACEAE

ชื่อท้องถิ่น เซยกะชู้ จ๊ามะไฟ มะดีหมี (เหนือ) ดินหมี ดีหมี (ลำปาง) กาดาวกระจาย(ประจวบคีรีขันธ์) กาไล กำไล (สุราษฎร์ธานี) คัดไล (ระนอง)

1. องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ

ดีหมี (*C. spiciflorum* (Burm. f.) Merr.) เป็นไม้ยืนต้น ขนาดเล็กไม่ผลัดใบ สูงประมาณ 15 เมตร ลำต้นแตกกิ่งก้านสาขาทึบ เปลือกลำต้นบางผิวเกลี้ยง สีน้ำตาลอมเทา ใบเดี่ยวเรียงสลับ ก้านใบยาว 3-10 เซนติเมตร แผ่นใบรูปไข่ขนาดกว้าง 3-8 เซนติเมตร ยาว 10-25 เซนติเมตร

ปลายใบแหลม ขอบใบหยักคล้ายฟันเลื่อย ผิวใบบาง ไม่มีขน ด้านล่างของใบมีขนละเอียดเป็นกระจุกเล็ก ๆ ระหว่างรอยต่อของเส้นใบเส้นใบข้างละ 5-7 คู่ ดอก เป็นดอกไม่สมบูรณ์เพศ และอยู่คนละต้นดอกเพศผู้เป็นช่อยาวคล้ายสายลูกปัดห้อยลง ยาวประมาณ 25 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงแยกจากกัน มีประมาณ 3-4 กลีบ ไม่มีกลีบดอก เกสรเพศผู้ 30-80 อัน เรียงตัวเป็นรูปทรงกลมบนฐานรูปกรวยก้านเกสรไม่ติดกัน ดอกเพศเมียเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นคู่ ออกจากซอกใบ กลีบเลี้ยง 5 กลีบ รูปสามเหลี่ยมปลายแหลม ไม่มีกลีบดอก ดอกบานเต็มที่กว้าง 2-3 มิลลิเมตร ก้านเกสรเพศเมียอยู่กลางดอก 2-3 อัน ผลเป็นแบบแห้งและแตก ค่อนข้างกลมขนาด 1.5-3 เซนติเมตร แบ่งเป็นพูส่วนใหญ่เป็น 2 พู เปลือกผลค่อนข้างหนาเมื่อแก่มีสีน้ำตาลอมแดงถึงน้ำตาลเข้ม เมล็ดกลมเกลี้ยง มี 1-3 เมล็ดต่อผล เมื่อแก่มีสีขาว ระยะเวลาการออกดอกและผล ช่วงเดือน กุมภาพันธ์-เมษายน แหล่งที่พบป่าดิบแล้งและป่าใกล้ลำธาร (เอื้อมพร วีสมหมาย และปณิธาน แก้วดวงเทียน, 2552) การขยายพันธุ์ในธรรมชาติของต้นดีหมีใช้เมล็ด การปลูกใช้เมล็ดหรือกิ่งตอน พบได้ในป่าชั้นล่างจนถึงที่ระดับสูงถึง 1,200 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ในต่างประเทศพบในอินเดีย ศรีลังกา พม่า ทั่วเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากมาเลเซียถึงนิวกินีพบได้ทั่วไปในป่าดิบแล้ง ป่าผลัดใบ ขึ้นปนกับพวกไผ่ ในประเทศไทยพบที่ภาคเหนือ จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง สุโขทัย ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดเลย ขอนแก่น ภาคกลาง จังหวัดสระบุรี กรุงเทพฯ ภาคตะวันออกเฉียงใต้ จังหวัดสระแก้ว จันทบุรี ตราด ภาคตะวันตกเฉียงใต้ จังหวัดกาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ภาคใต้ จังหวัดพัทลุง เขตการแพร่กระจายพันธุ์ในอินเดีย จีน ตอนใต้เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และภูมิภาคมาเลเซีย (ก่องกานดา ชยามฤต, 2548)

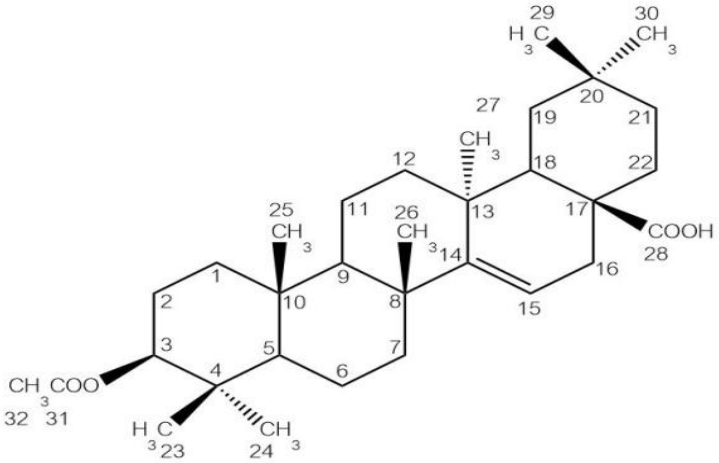
การใช้ประโยชน์ภายในประเทศของชาวเขาหลายเผ่า ใช้ราก และลำต้นสับให้ละเอียดต้มน้ำดื่มเพื่อแก้อาการไข้มาลาเรีย เปลือกไม้หรือแก่นไม้ใช้ต้มดื่มเป็นยาขับเหงื่อ แก้กระหายน้ำ ดับพิษไข้ ปวดศีรษะ ปวดท้อง เมล็ดใช้เป็นยาระบาย น้ำต้มจากใบมีความเป็นพิษเมื่อดื่มปริมาณมาก อาจทำให้สตรีมีครรภ์แท้งบุตรได้ และมีการใช้ประโยชน์ในต่างประเทศ เช่น ประเทศฟิลิปปินส์ ใช้น้ำต้มจากเปลือกลำต้นดื่มเป็นยาแก้ปวดท้อง ใช้เมล็ดเป็นยาแก้อาการผิดปกติของท้องและลำไส้ ในหมู่เกาะโซโลมอนใช้น้ำต้มจากเปลือกของลำต้นอาบให้เด็กอ่อนแก้โรคหิด เมล็ดเคี้ยวกินแก้ไข้หวัด แต่ต้องระวังความเป็นพิษ มีการปลูกเป็นไม้บังร่มทั้งในนิวกินีและหมู่เกาะโซโลมอน ซึ่งใช้ลำต้นเป็นไม้ค้ำพืชจำพวกกลอย มันเสา ตลอดจนใช้เป็นไม้ฟืน (สุธรรม อารีกุล, 2552)

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติและสารสำคัญที่พบในต้นดีหมี (*C. spiciflorum*) Naengchomnong et al. (2006) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากต้นดีหมี ได้แก่ clerodane polyoxygenated spiciflorin, columbin, scopoletin, กรด 3,3 4-*O*-trimethylellagic acetylaleuritolic acid, triterpenes, และฟีนอล Mathabe et al. (2008) ได้สกัดสารจากเปลือกของ *Spirostachys*

africana Sond. ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับต้นดีหมีพบสารประกอบกลุ่ม Triterpenoids คือ 3-acetyl aleuritolic acid และ Lupeol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียคือ *S. aureus*, *Salmonella typh*y, *Vibrio cholera*, *E. coli* และ *Shigella dysentery* มีค่า MIC เท่ากับ 50 g/ml นอกจากนี้ Noundou et al. (2016) ได้ศึกษาสารสกัดหยาบจากใบและต้น *Alchorne acordifolia* มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย และยังรายงานการพบสารบริสุทธิ์จากสารสกัดเมทานอลของลำต้น จำนวน 7 ชนิด ดังนี้ methyl-3, 4, 5-trihydroxy benzoate, friedelane-3-one-28-al, stigmasta-4, 22-dien-3-one, 3-*O*-acetyl-aleuritolicacid, 3-*O*-acetyl-erythrodiol และ Friedelin ซึ่งสารทั้ง 7 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย และที่ยับยั้งได้ดีที่สุดคือ *S. saprophyticus* มีค่า MIC เท่ากับ 2 mg/ml

2. สูตรโครงสร้าง

จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H ^{13}C NMR และจุดหลอมเหลวของสารบริสุทธิ์กับ 3-acetyl aleuritolic acid จากเอกสารอ้างอิง (Viswanadh et al., 2006; Prabowo et al., 2013) พบว่า มีค่าเท่ากันทุกประการ) สารบริสุทธิ์ที่ได้จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของรากดีหมีคือ 3-acetyl aleuritolic acid ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 2-2



ภาพที่ 2-2 โครงสร้างของ 3-acetyl aleuritolic acid

3. ฤทธิ์การต้านการอักเสบ

Pounikar et al. (2013) สารสกัดเฮกเซนในส่วนต่าง ๆ ของ *Euphorbia hirta* พบสาร Triterpenes เป็นองค์ประกอบหลัก คือ β-amyrin, 24 methylene cycloartenol และ β-Sitosterol มีฤทธิ์ต้านการอักเสบของหูชั้นในของหนู

4. ฤทธิ์การต้านมะเร็ง

วรัญญา เผือกฟัก, พันสรวง อุดมพุทธิเมฆากุล, วิลาศ พุ่มพิมล และณรงค์ นันทะเสน (2558) ได้ศึกษาสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลแอซีเทต และเมทานอล จากกิ่งของต้นฝ่ายน้ำซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับต้นดีหมี เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง พบว่า สารสกัดเอทิลแอซีเทต มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมมีค่า ED_{50} เท่ากับ 10.07 μg/mL จากนั้นจึงนำสาร สกัดหยาบเอทิลแอซีเทตมาแยกสารด้วยวิธีโครมาโทกราฟี และวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีพบสารใหม่ประเภทไตรเทอร์พีนอยด์ คือ Thorelerpenoid

5. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

Amoussa et al. (2016) ที่พบว่า Betulinic acid-3-trans-caffeat ซึ่งเป็นกลุ่ม triterpenoids ที่แยกได้จากส่วนสกัดของ *Acacia ataxacantha* มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Abu Arra Basma1 et al. (2011) ได้ศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณสารฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากเมทานอล ใบ ลำต้น ดอกไม้และรากของน้ำนมราชสีห์ด้วยวิธี DPPH และ สารสกัดจากใบมี DPPH สูงสุด เท่ากับ 72.96 ±0.78% ใช้สารมาตรฐาน BHT เท่ากับ 75.13 ±0. 75% โดยมีค่า IC_{50} ของใบ ดอก ราก ลำต้น และสารมาตรฐาน (BHT) เท่ากับ 0.803, 0.972, 0.989, 1.358 และ 0.794 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

รายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งสั้นขนาดเล็ก ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เป็นพวกที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต พบทั่วไปในดินและน้ำ เชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยาเป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลที่พบบ่อย และเป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อจากโรงพยาบาล ซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศไทย โดยมีรายงานว่าเชื้อดังกล่าวเป็นสาเหตุของโรคหลอดปัสสาวะอักเสบ (Urethritis) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ โลหิตเป็นพิษและการติดเชื้อที่บาดแผล จะทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล คนไข้ที่มีแผลไหม้หรือภูมิคุ้มกันบกพร่อง เชื้อนี้จะฉวยโอกาสก่อโรคได้ และสายพันธุ์ของเชื้อกลุ่มนี้มักดื้อต่อยาปฏิชีวนะจึงเป็นปัญหาในการรักษาโรค (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544)

Escherichia coli

มักพบเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ มีแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติคือลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ เป็นแบคทีเรียแกรมลบท่อนตรง การก่อโรคของ *E. coli* การติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ จัดเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อครั้งแรกในระบบทางเดินปัสสาวะของเพศหญิงเมื่อเข้าสู่วัยรุ่นโดยพบมากประมาณ 90% ของการติดเชื้ออาการที่บ่อยปัสสาวะเจ็บปวดหรือลำบาก การทำ

ให้เกิดโรคในไต นอกจากนี้ยังพบว่า ก่อให้เกิดโรคท้องเสียเชื้อ *E. coli* เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Selective media เช่น MacConkey agar โคโลนีจะมีสีชมพูแดง เนื่องจากสามารถหมักน้ำตาลแลคโตส และเกิดกรดซึ่งจะทำให้สีของอินดิเคเตอร์ในอาหารเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม แบคทีเรียบางสายพันธุ์ไม่สามารถหมักและย่อยน้ำตาลแลคโตสได้ ซึ่งให้ลักษณะโคโลนีที่ไม่มีสี (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2552)

Pseudomonas aeruginosa

ลักษณะทั่วไปเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนทรงกลม เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะของผู้ป่วยที่นอนในโรงพยาบาล และใส่สายสวนปัสสาวะไว้ซึ่งเชื้อเจริญได้ดีในทุกสภาวะ แม้แต่ในน้ำยาที่ฆ่าเชื้อที่เจือจาง มีการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียมักก่อโรคในผู้ที่มีภูมิต้านทานต่ำ หรือแม้แต่ผิวหนังที่ฉีกขาด ผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก มีชีวิตอิสระในดิน น้ำ น้ำทะเล เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี การก่อโรคและอาการเมื่อเชื้อ *P.aeruginosa* เข้าสู่ร่างกายจะเข้าไปเจริญเติบโตในเนื้อเยื่อสามารถสร้าง Exotoxin และเอนไซม์หลายชนิด เช่น Hemolysin, Lecithinase, Protease และ Lipase เป็นต้น การติดเชื้อที่พบบ่อยคือใน ผู้ที่เป็นแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ส่วนโรคแทรกซ้อน ได้แก่ โรคปอดบวม โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ฝี หูอักเสบ ตาอักเสบ (จินตนา อาจสันเที๊ยะ, 2549)

Klebsiella pneumoniae

ลักษณะทั่วไปเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งขนาดใหญ่ มีแคปซูลล้อมรอบเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารทั่วไป ลักษณะโคโลนีมักเป็นมูกเนื่องจากเชื้อสร้างแคปซูลเป็นชั้นหนาเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่สำคัญ ได้แก่ โรคปอดบวม ซึ่งมักพบในพวกที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ที่ติดสุราเรื้อรัง ผู้ป่วยโรคเบาหวาน และผู้ป่วยโรคทางเดินหายใจเรื้อรัง สามารถก่อโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร ติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (พบในทารก) การติดเชื้อของบาดแผล (รวมถึงแผลผ่าตัด) การติดเชื้อในกระแสเลือด ผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานานพบว่า *K. pneumonia* จะอาศัยอยู่ในทางเดินอาหารในปริมาณสูงขึ้นและเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อโรคในโรงพยาบาล ปัจจัยสำคัญของการก่อโรคคือแคปซูลเป็นชั้นหนาช่วยให้สามารถต้านขบวนการจับกินของเม็ดเลือดขาว รวมถึงมีฤทธิ์ต้านกระบวนการ Opsonization ในการทำงานของแอนติบอดีและระบบคอมพลีเมนต์ชั้นแคปซูลประกอบด้วยแอนติเจนเค ซึ่งสามารถใช้จำแนกเชื้อออกได้มากกว่า 70 Serotype (ภัทรชัย กีรติสิน, 2552)

Proteus mirabilis

พบอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมรวมถึงในลำไส้คน และสัตว์เชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว เชื้อ *P. Mirabilis* มักพบเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ปัจจัยก่อโรคที่สำคัญคือ เอนไซม์ Urease ซึ่งออกฤทธิ์สลายสารยูเรีย ให้เป็นแอมโมเนียทำให้มีความเป็นด่างเพิ่มขึ้นและเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุทางเดินปัสสาวะ รวมถึงกระตุ้นให้เกิดนิ่วได้ นอกจากนี้ยังอาจพบก่อให้เกิดการติดเชื้อของบาดแผล และการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ รวมถึงอาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการก่อโรคข้ออักเสบชนิด Rheumatoid arthritis ปัจจัยอื่นที่อาจเกี่ยวข้องในการก่อโรค เช่น แฟลกเจลลา โปรตีนในชั้นผนังเซลล์ สาร Polysaccharide ในชั้นแคปซูล และสาร Hemolysin เชื้อไม่สามารถสลายน้ำตาล Lactose เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบน MacConkey agar เชื้อเคลื่อนที่ได้รวดเร็ว จึงมักเห็นการเจริญแผ่กระจายไปทั่วผิวหน้าของอาหารวุ้นเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Swarming motility ทำให้รบกวนการเจริญของเชื้อชนิดอื่นบนอาหารเพาะเชื้อและแยกเชื้อออกจากกันได้ยาก เชื้อ *P. mirabilis* ให้ผลลบในการทดสอบการสลายยูเรีย, Methyl red ให้ผลลบในการทดสอบ indole เชื้อ *P. mirabilis* ไวต่อยา Ampicillin (ภัทรชัย กีรติสิน, 2552)

Staphylococcus aureus

โรคติดเชื้อ *S. aureus* ลักษณะสำคัญคือ เกิดการอักเสบเป็นหนอง หรือมักทำให้เกิดฝีหนอง โดยเฉพาะในบริเวณผิวหนังและชั้นเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง เอนไซม์ Coagulase กระตุ้นให้เปลี่ยนเส้นใย Fibrinogen เป็น Fibrin ทำให้เกิดการสร้างผนังขึ้นล้อมรอบรอยโรคเกิดเป็นก้อนฝี ซึ่งภายในประกอบด้วยเนื้อเยื่อเน่าตายรวมตัวกลายเป็นหนองเชื้อจากรอยโรคอาจแพร่กระจายเข้าสู่เลือดไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ทำให้สามารถก่อโรคติดเชื้อตามระบบต่าง ๆ ได้ เช่น ระบบไหลเวียนเลือด ระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหาร โรคติดเชื้อในกระดูกและข้อเป็น (ภัทรชัย กีรติสิน, 2552) ทางการแพทย์ พบว่า เชื้อ *S. aureus* มีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น และมีการวิวัฒนาการสายพันธุ์ทำให้มีคุณสมบัติในการต้านยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด โดยชนิดที่สำคัญได้แก่ Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) ซึ่งทำให้เกิดอาการติดเชื้อรุนแรง รักษาหายได้ยาก เนื่องจากการดื้อยาทำให้มีอัตราเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูง *S. aureus* (นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552)

Serratia marcescens

สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม แต่มักอาศัยแบบ Colonization อยู่ในทางเดินปัสสาวะและทางเดินหายใจ เชื้อมีการดื้อยาต้านแบคทีเรียในอัตราสูง รวมถึงยาในกลุ่มเพนิซิลินที่อาจสามารถเลือกใช้ได้เช่นยาในกลุ่ม Extended-spectrum cephalosporins, Carbapenems, Aminoglycosides และ Fluoroquinolones เชื้อ *S. marcescens* มักพบก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาสโดยเฉพาะการติดเชื้อในโรงพยาบาล ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น โรคปอดบวม โรคติดเชื้อใน

ระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ การติดเชื้อของผิวหนังหรือบาดแผล รวมถึงแผลผ่าตัด และการติดเชื้อในกระแสเลือด การแพร่เชื้อสามารถเกิดจากคนสู่คน หรืออาจเกิดจากการสัมผัสเครื่องมือแพทย์ที่ปนเปื้อน เช่น สายสวนปัสสาวะและเส้นเลือด รวมถึงอาจปนเปื้อนอยู่ในน้ำยาฆ่าเชื้อในโรงพยาบาลได้ (ภัทรชัย กีรติสิน, 2552)

รายละเอียดเกี่ยวกับยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการศึกษา

แอมพิซิลลิน

แอมพิซิลลินเป็นยากึ่งสังเคราะห์ในกลุ่ม Broad-spectrum penicillin ของยาเพนิซิลลิน ซึ่งเป็นกลุ่มยาที่มีประสิทธิภาพสูง และมีความเป็นพิษต่อร่างกายน้อย มีโครงสร้างเหมือนกัน แต่แตกต่างกันในส่วนของ Side chain ของยาที่ทำให้เกิดการยับยั้งเชื้อได้มากขึ้น โดยนอกจากจะสามารถออกฤทธิ์ในการทำลายกลุ่มที่ไวต่อเพนิซิลลิน และแบคทีเรียแกรมบวกแล้ว ยังสามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบได้ด้วย แต่ก็สามารถถูกลบล้างฤทธิ์ด้วยเอนไซม์ Beta-lactamase ยาออกฤทธิ์โดยการเข้าจับตัว และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาย Peptidoglycan คือ Carboxypeptidase และ Transpeptidase การออกฤทธิ์ของยามีผลเฉพาะต่อเซลล์ในระยะแบ่งตัวที่จำเป็นต้องมีการสร้างผนังเซลล์ ส่งผลให้เกิดการยังยั้งการสร้างผนังเซลล์ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด จัดเป็นยาในกลุ่มออกฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย (Bactericidal)
(ภัทรชัย กีรติสิน, 2552)

เตตราซัยคลิน

เตตราซัยคลิน สกัดได้จากเชื้อ *Streptomyces* เป็นยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์โปรคาริโอต โดยจะจับกับไรโบโซมบริเวณ 30s subunit (โครงสร้างของไรโบโซมจะเป็น 70s ประกอบด้วย 30s และ 50s subunit) และจะขัดขวางการเข้าเกาะของ tRNA บริเวณไรโบโซม ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนต่อเนื่องหยุดลง จัดเป็นการออกฤทธิ์แบบยับยั้ง (Bacteriostatic) สามารถเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ ทำให้เกิดการสะสมในเซลล์ แต่ไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์สัตว์จึงจัดได้ว่ามี Selective toxicity สูง เตตราซัยคลินจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อกลุ่ม ไมโครพลาสมา คลามิเดีย และริกเก็ตเซียตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ เช่น Doxycycline ซึ่งจะมีครึ่งชีวิตของยาค่อนข้างยาว ยา Glycylcycline (เป็นอนุพันธุ์ ของยาเตตราซัยคลินแบบกึ่งสังเคราะห์) ซึ่งจะมีฤทธิ์กว้างและสามารถยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดที่ดื้อยาเตตราซัยคลินได้ การดื้อยาเตตราซัยคลินส่วนใหญ่เป็นผลจากการได้รับยีนดื้อยาบนพลาสมิดจากภายนอก ทำให้การสะสมยาในเซลล์แบคทีเรียลดลง ซึ่งเกิดได้ทั้งจากการนำเข้ายาที่ลดลง หรือการขับออกที่เพิ่มขึ้น พบว่า ในปัจจุบันมีการดื้อยาเตตราซัยคลิน

เพิ่มสูงขึ้นการใช้ยาในระยะที่ร่างกายอยู่ในระหว่างพัฒนาการของกระดูกและฟัน สามารถทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของกระดูกและฟันมีสีเหลือง (ตามสีของยา) อย่างถาวรได้ ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ยาในกลุ่มนี้ในเด็ก หญิงตั้งครรภ์ และหญิงให้นมบุตร (ภัทรชัย กีรติสิน, 2552)

ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ความเข้มข้นต่ำสุดยับยั้งยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) หมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพหรือตัวแทนที่เป็นแบคทีเรีย (ป้องกันการเจริญเติบโตที่มองเห็นได้ของแบคทีเรีย) MICs ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพของสารต่าง ๆ โดยการวัดผลของการลดความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ/สารต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในช่วงเวลาที่กำหนดไว้ในเรื่องของของการยับยั้งการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ การประเมินเหล่านี้อาจมีประโยชน์มากในช่วง R & D ของผลิตภัณฑ์เพื่อกำหนดความเข้มข้นที่เหมาะสมในผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายเนื่องจากความเข้มข้นของยาที่จำเป็นในการสร้างผลเป็นปกติหลายร้อยถึงหลายพันครั้งน้อยกว่าความเข้มข้นที่พบในปริมาณที่เสร็จสิ้นจากความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารจะถูกเชื้อด้วยเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงและวัดผลโดยใช้อาหารที่เป็นอาหารแข็งหรือการเจือจางของอาหารเหลวเพื่อตรวจสอบว่าได้ตั้งค่าจุดสิ้นสุดของ MIC ไว้ที่ใด โดยทั่วไปจะดำเนินการโดยใช้สิ่งมีชีวิตที่มีส่วนช่วยในกระบวนการติดเชื้อที่ให้การรักษาด้วยเคมีบำบัดด้วยยาปฏิชีวนะ คือ แบคทีเรีย ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* และ *Enterobacter species*) เชื้อโรค ESKAPE ถือเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (ที่เกี่ยวข้องกับโรงพยาบาล) และเป็นที่รู้จักว่ามีความทนทานต่อผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย สิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น แบคทีเรียแอโรบิกหรือแบคทีเรียที่ยับยั้งหรือยีสต์หรือเชื้อราที่เป็นเส้นใยไม่ว่าจะเป็นคนเดียวหรือหลายชุดก็ได้ FDA Tentative Final Monograph (TFM-section 333.470, page 31444) ยังมีการใช้ในการทดสอบเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตที่จะใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เช่น น้ำยาฆ่าเชื้อโรคต่าง ๆ, น้ำยาล้างมือของบุคลากรทางการแพทย์การเตรียมผิวของผู้ป่วยก่อนผ่าตัด (Goins, 2017)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชวงศ์ Euphorbiaceae

Sevda et al. (2013) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากพืชวงศ์ Euphorbia เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบดังนี้ *Staphylococcus aureus* COWAN 1, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Proteus vulgaris* FMC 1, *Klebsiella pneumonia* FMC 5, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Candida albicans* FMC 17, *Candida glabrata* ATCC

66032, *Epidermophyton* sp. และ *Trichophyton* sp. ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากพืช Euphorbia ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ผ่านการทดสอบในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ค่า MIC ของสารสกัดถูกกำหนดเป็น 31,2-1000 μg

วรัญญา เผือกฟัก และคณะ (2558) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลแอซีเทตและเมทานอลจากกิ่งของต้นฝายน้ำซึ่งเก็บจากจังหวัดอุบลราชธานี พบว่าสารสกัดขั้นเอทิลแอซีเทตมีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมและหลังจากแยกสารสกัดหยาบเอทิลแอซีเทตพบสารใหม่ประเภทไตรเทอร์พีนอยด์คือ thorelerpenoid

ชัยวัฒน์ ลิ้มลิขิตอักษร, สุริยนต์ โพธิบัณฑิต และสุพร พลพันธ์ (ม.ป.ป.) ได้ศึกษาภูมิปัญญาการใช้ประโยชน์พืชพรรณของชาวกะหร่างบ้านโป่งลึกบางกลอย อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน ผลการสำรวจในเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม พ.ศ. 2552 สำรวจพบการใช้ประโยชน์ของชาวกะหร่าง ต้นดีหมี ใช้เป็นสมุนไพรกลุ่มที่รักษาโรคไข้มาเลเรียไข้หวัดอาการหนาวสั่น ถอนพิษไข้

Chaudhary et al. (2011) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดเมทานอล และเอทานอล จากใบของต้น *Sapium sebiferum* จากการศึกษาพบว่า สามารถมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยพืชชนิดนี้มีลักษณะเด่นคือ สามารถใช้รักษาโรคท้องร่วงได้

Chung et al. (2011) ได้ศึกษาสารเกี่ยวกับสารกลุ่ม Triterpenoid มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และการสังเคราะห์ Macromilecular ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

2. องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านจุลชีพ

Patel and Patel (2013) ได้ศึกษาส่วนของ กิ่งอ่อน ใบ และช่อดอกของต้นน้ำนมราชสีห์ที่ถูกสกัดด้วยน้ำ, น้ำมัน, อะซีโตนและเมทานอล จากนั้นมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียพบว่าสารสกัดจากน้ำมัน มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบ ที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบคือ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* และ *K. Pneumoniae* โดยวิธีการ disc diffusion method

Ragasa and Cornelio (2013) ได้สกัดสารจากลำต้น ใบ และรากต้นน้ำนมราชสีห์ (*Hirta Euphorbia*) พบสาร triterpenes และสารอื่น ๆ ที่เป็นพิษ และเมื่อนำสารดังกล่าวไปทดสอบพบว่า มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *P. aeruginosa* และ *S. aureus*

Sanseera et al. (2012) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยจากใบของต้นดีหมี และวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ได้มา โดยวิธีของ

GC- (FID) และ GC-MS เป็นน้ำมันรวมทั้งหมด 92.60% จากนั้นนำทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่า ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ค่า MIC เท่ากับ 25.00 mg/mL และ 12.50 mg/mL โดยวิธี Agar diffusion method

รายงานวิจัยการเสริมฤทธิ์ของสารกลุ่ม Terpene leupane และ Flavoniods กับยาปฏิชีวนะ

บุญเลี้ยง สุพิมพ์, ปิยะพงษ์ ชุมศรี และอรทัย ปานเพชร (2559) ได้ศึกษาสารสกัดกระชายดำ เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Methicillin-resistant โดยใช้วิธี Checkerboard dilution ใช้เชื้อทดสอบจำนวน 10 ไอโซเลท มาทดสอบร่วมกับยาปฏิชีวนะ ผลการศึกษาวิจัย พบว่า สารสกัดสามารถเสริมฤทธิ์ (Synergism) ของยาแวนโคมัยซิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA จำนวน 4 ไอโซเลท (ค่า FICI = 0.5) และไม่มีผลต่อฤทธิ์ของยาแวนโคมัยซินในเชื้อ 6 ไอโซเลทโดยไม่พบฤทธิ์ต้านกันระหว่างสารสกัดกระชายดำ และยาแวนโคมัยซินส่วนการทดสอบผลร่วมกับยาเพนิซิลลิน พบว่า สารสกัดกระชายดำสามารถเสริมฤทธิ์ของยาเพนิซิลลินในเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท

Wang et al. (2016) ได้ศึกษาสารสกัดที่แยกได้จาก ต้นพญาสัตบรรณ พบสาร Triterpenoids pentacyclic มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และพบว่า มีผลเสริมฤทธิ์กันเมื่อใช้ร่วมกับแอมพิซิลินและเตตราซัยคลินกับเชื้อ *Bacillus cereus* และ *S. aureus*

Pereira et al. (2014) ได้ศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างยาปฏิชีวนะ และสารสกัดจากน้ำมันหอมระเหยจาก *Eucalyptus globules* ว่ามีฤทธิ์ของการต้านเชื้อแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กัน

Dey et al. (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของส่วนสกัดเมทานอลจากผลทับทิม (PGME) กับยาปฏิชีวนะพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ 19 สายพันธุ์จาก 49 สายพันธุ์โดยค่า FIC อยู่ในช่วง 0.125-0.5 ซึ่งพบว่า PGME เป็นสารกลุ่ม โพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบสำคัญในการยับยั้งการขับนอกเซลล์ของแบคทีเรีย

Chung et al. (2011) ได้ทำการศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันของ Pentacyclic triterpenoids กับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* พบว่า สารให้การเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และพบว่า Triterpenoids มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอการสังเคราะห์ Macromolecular ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก

Wagner and Merzenich (2009) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ร่วมกันของ Eugenol ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของกานพลู กับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน เพนนิซิลลิน ออกซาลิน เตตราซัยคลิน และแอมฟินิคอลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* *P.vulguris* และ *P. aeruginosa* เพราะ Eugenol ร่วมกับยาปฏิชีวนะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียเกิดความเสียหายโดยการออกฤทธิ์ร่วมกันของยาปฏิชีวนะมีเป้าหมายที่แตกต่างกันแอมพิซิลลิน จึงมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนเตตราซัยคลินมีผลต่อไรโบโซมเมื่อเกิดการเสริมฤทธิ์กันจะทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของเป้าหมายเช่นเดียวกับเป้าหมายที่ยาปฏิชีวนะออกฤทธิ์ (Wagner & Merzenich, 2009)

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือ

1.1 หลอดทดลอง (Test tube)

1.2 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)

1.3 กระบอกตวง (Cylinder)

1.4 บีกเกอร์ (Beaker)

1.5 เครื่องชั่ง

1.6 กระบอกฉีดยา

1.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.8 ออโตปิเปต (Automatic pipettes) (Gilson, U.S.A.)

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

1.10 ตู้บ่ม (Incubator) (EHRET รุ่น BK 4266, Germany)

1.11 ที่เจาะวุ้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร (Cork borer)

1.12 Lamina flow (Astec รุ่น HLF 1200, England)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Mueller-Hinton Agar (MHA) (Becton Dickinson and Company, USA)

2.2 Mueller-Hinton Broth (MHB) (Becton Dickinson and Company, USA)

2.3 Nutrient Agar (NA) (Merck, Germany)

2.4 Nutrient Broth (NB) (Merck, Germany)

3. สารเคมี

3.1 95% ethanol

3.2 70% ethanol

3.3 0.85% NaCl

3.4 McFarland No.05 ($1.5X10^{8}$CFU/ml)

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

4. ยาปฏิชีวนะ

4.1 Ampicillin Powder (Sigma-Aldrich, Germany)

4.2 Tetracycline Powder (Sigma-Aldrich, Germany)

5. แบคทีเรียที่นำมาศึกษา

จุลินทรีย์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา คือ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *S. aureus* และ MRSA และ *A. baumannii* (ดื้อยา) ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ได้แก่ Amikacin Ciprofloxacin Sulperrazon Piperacillin Tazobactam Ceftriaxone Ceftazidime Imipenem Cefpirome Meropenem Cefepime Piperacillin แต่ตอบสนองต่อยา Gentamicin และ *P. aeruginosa* (ดื้อยา) ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (รหัส 1-375/04-2013) ซึ่งเชื้อทั้งสองชนิดนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี

6. สารบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์ (3-acetyl aleuritolic acid) จากต้นดีหมี (*C. spiciflorum*) ได้รับความอนุเคราะห์จากรศ. ดร.วารี เนื่องจำนงค์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ Naengchomnong et al. (2006) ซึ่งได้เก็บต้นดีหมีมาจากจังหวัดเชียงราย โดยเจ้าหน้าที่กรมป่าไม้นำเฉพาะส่วนรากที่บดละเอียด สกัดด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง นำไประเหยเอาตัวทำละลายออก จากนั้นทำให้สารสกัดแห้ง ด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลตามลำดับ และนำส่วนสกัดหยาบจากเฮกเซนมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี และวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่อง Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR spectroscopy)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารละลาย (stock solution)

1.1 เตรียม Master stock ของ 3-acetyl aleuritolic acid ชั่ง 3-acetyl aleuritolic acid 0.34098 กรัม มีมวลโมเลกุล 498 กรัมต่อโมล ละลายใน DMSO 20 มิลลิลิตร เตรียมความเข้มข้น 68,500 ไมโครโมลาร์ จากนั้นเตรียม Stock solution ที่ความเข้มข้น 4096 ไมโครโมลาร์ และเจือจาง Stock solution โดยใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ด้วยเทคนิค Two-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้น 2048, 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

1.2 เตรียม Master stock ของแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน มวลโมเลกุลของแอมพิซิลลิน คือ 371.40 และเตตราซัยคลิน คือ 444.435 ชั่งแอมพิซิลลิน 0.3714 และ

เตตราซัยคลิน 0.4444 กรัม เตรียมความเข้มข้น 1 โมลาร์ ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียม Stock solution ที่ความเข้มข้น 4096 ไมโครโมลาร์ และเจือจาง Stock solution โดยใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้แอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน ที่ความเข้มข้น 2048, 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

2. ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Minimal inhibitory concentration (MIC) ของ 3-acetyl aleuritolic acid ด้วยวิธี Agar diffusion susceptibility test (CLSI, 2006)

2.1 เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922*, P. aeruginosa, A. baumannii, P. mirabilis, K. Pneumoniae* และ *S. marcescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ส่วน *S. aureus* และ MRSA เลี้ยงใน NA ผสมเกลือ (NaCl) 0.2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 4-5 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเทียบความขุ่นของเชื้อกับ McFarland No. 0.5 ($1.5X10^8$CFU/ml) ในน้ำเกลือ (0.85% NaCl)

2.3 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ปริมาตร 19 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เติมเชื้อที่ใช้ทดสอบหลอดละ 1,000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA เทลงในจานเพาะเชื้อ ใช้ cork borer เจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ

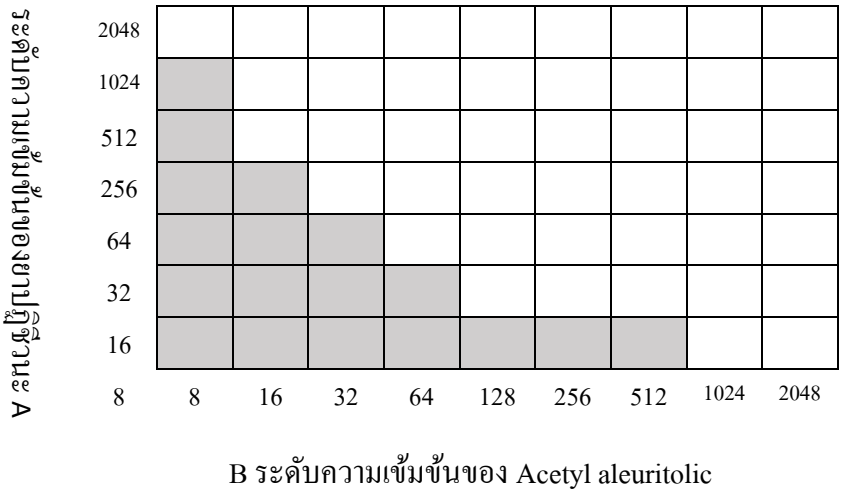
2.4 เติม 3-acetyl aleuritolic acid ที่ความเข้มข้น (4096, 2048, 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ และสารควบคุม (Control) ได้แก่ DMSO และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หยอดลงในหลุมที่เจาะไว้ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และทำการทดสอบเทียบกับยาปฏิชีวนะด้วยวิธีเดียวกัน แต่เปลี่ยนจาก 3-acetyl aleuritolic acid เป็นแอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับ 3-acetyl aleuritolic acid แล้ววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้ง (Inhibition zone) ซึ่งหลุมที่วัดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 0.6 เซนติเมตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

2.5 นำเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้งที่วัดได้จากข้อ 4 นำไปคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแล้วนำมาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC)

3. การศึกษาประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันของ 3-acetyl aleuritolic acid ผสมยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี Agar diffusion susceptibility

ทำการทดลองในทำนองเดียวกับข้อ 2.1-2.4 จากนั้นนำ 3-acetyl aleuritolic acid ที่ระดับความเข้มข้น 4096 ไมโครโมลาร์ ผสมกับยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 4096, 2048, 1024, 512,

256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ มาอย่างละ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและหยดลงในหลุมปริมาตร 40 ไมโครลิตร จากนั้นทำเช่นเดียวกับสาร 3-acetyl aleuritolic acid ที่ระดับความเข้มข้น 2048 ไมโครโมลาร์ ผสมกับยาปฏิชีวนะเช่นเดียวกัน สำหรับชุดควบคุม (Control) ได้แก่ น้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ, สารละลาย DMSO โดยออกแบบการทดสอบ ด้วย checkerboard assay (Padalia & Chanda, 2015) (ดังภาพที่ 3-1) แล้วรอให้แห้ง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้ง (Inhibitor Zone) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ



ภาพที่ 3-1 Checkerboard method (Padalia & Chanda, 2015)

4. ประเมินประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid และยาปฏิชีวนะ ด้วยดัชนีชี้วัดที่เรียกว่า Fractional inhibitory concentration index (FICI) ดังสูตรค่า FICI = FIC (A) + FIC (B)

= [A] / MIC (A) + [B] / MIC (B)

[A] คือ ค่า MIC ของสาร A ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

[B] คือ ค่า MIC ของสาร B ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

MIC (A) คือ ค่า MIC ของสาร A

MIC (B) คือ ค่า MIC ของสาร B

ตารางที่ 3-1 การแปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI (Padalia & Chanda, 2015)

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

5. การศึกษาผลของ 3-acetyl aleuritolic acid ผสมยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบต่อหน่วยเวลา (Time-Kill Curve Assay) (CLSI, 2006)

5.1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA หรือ NA ผสมเกลือ NaCl 2% แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.2 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 4-5 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเทียบความขุ่นของเชื้อกับ McFarland No. 0.5 ($1.5X10^8$ CFU/ml) ในน้ำเกลือ (0.85 % NaCl) นำเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลาย 3-acetyl aleuritolic acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลายแอมพิซิลลิน หรือเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร MHB ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำการทดสอบทั้งหมดมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control) 3 แบบ ได้แก่การเติมเชื้อ (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร), การเติมเชื้อ (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ผสม 3-acetyl aleuritolic acid (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) และการเติมเชื้อ (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ผสมกับยาปฏิชีวนะ (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร)

5.3 ทำการเก็บตัวอย่างคือน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากข้อที่ 4.2 ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อนำมานับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิต โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมา เจือจางด้วยวิธี Serial dilution ในน้ำเกลือ (0.85 % NaCl) เขย่าให้เข้ากัน จนได้สารแขวนลอยของเชื้อที่ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} จากนั้นนำเชื้อแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตรมา Spread plate บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เกิดขึ้นและบันทึกผล นำข้อมูลทั้งหมดไปสร้างกราฟความสัมพันธ์

ระหว่างจำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml) ต่อเวลา

5.4 หาค่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญ (The effectiveness antibacterial activity; EAA) คำนวณจากสูตร (Sedlarik , Galya, Sedlarikova, Valasek, & Saha, 2010)

$$EAA\ \% = \frac{N_0 - N_E \times 100}{N_0}$$

N_0 คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/mL) ของกลุ่มควบคุม

N_E คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/mL) ของกลุ่มทดลอง

6. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยเทคนิคการกำจัดอนุมูล DPPH˙ หรือ 2,2-diphenyl-1-picryl¬hydrazyl radical (Mokbel & Hashinaga, 2005)

การวิเคราะห์ด้วยวิธีการกำจัดอนุมูล DPPH˙ หรือ 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical เตรียมสารละลาย DPPH˙ radical ในเมทานอลความเข้มข้น ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในสารละลายที่ต้องการทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดและอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กำจัดอนุมูลอิสระ สร้างกราฟเของเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH กับความเข้มข้นแล้วหาค่า IC_{50} จากกราฟ และหาค่า IC_{50} ของBHT (Butylated hydroxyl toluene) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานในทำนองเดียวกัน 3.2.7 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

การวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power) การเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสมสารละลาย Acetate buffer pH 3.6, TPTZ-HCl และ Ferric chloride hexahydrate อัตราส่วน 10:1:1 จะได้เป็นสารละลาย FRAP จากนั้น นำสารละลายที่ต้องการทดสอบปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP นี้ปริมาตร 270 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าในหน่วยมิลลิกรัมของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของสารบริสุทธิ์ (mg $FeSO_4$/g sample) จากกราฟมาตรฐาน ของสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต โดยใช้ BHT เป็นสารมาตรฐานเช่นเดียวกับวิธี DPPH แล้วนำค่าที่ได้ไปประเมินค่าทางสถิติต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของส่วนสกัดต่อ clear zone เชื้อแบคทีเรียก่อโรค และฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียโดยใช้ Single factor analysis of variance วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ RBCD จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±sd) ความแตกต่างของข้อมูลถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Tukey โดยใช้โปรแกรม Minitab เวอร์ชัน 17.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 4
ผลการดำเนินงานวิจัย

การสำรวจฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสเบื้องต้นของ 3-acetyl aleuritolic acid ด้วยวิธี Agar diffusion susceptibility test

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสาร 3-acetyl aleuritolic acid สกัดจากต้นดีหมีจำนวน 10 สายพันธุ์ แสดงดังตารางmuj 4-1 และตารางที่ 4-4 พบว่า สาร 3-acetyl aleuritolic acid มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis S. marcescens A. baumannii* ดื้อยาและไม่ดื้อยาได้ดีที่สุด (ค่า MIC เท่ากับ 128 ไมโครโมลาร์) รองลงมาคือ *E. coli* ATCC25922 (ค่า MIC เท่ากับ 256 ไมโครโมลาร์และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ชนิดไม่ดื้อยาและดื้อยา *K. pneumoniae S. aureus* MRSA และเมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่ใช้ในการทดสอบคือน้ำและ DMSO พบว่า ตัวควบคุมไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ และเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า สาร 3-a cetyl aleuritolic acid สกัดจากต้นดีหมี สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้ง 10 สายพันธุ์ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ ยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน พบว่า ยาเตตราซัยคลิน ให้ผลการยั้บยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสทั้งชนิดดื้อยาและไม่ดื้อยาบางชนิดได้ดีกว่ายาแอมพิซิลลินและสาร 3-acetyl aleuritolic acid (ตารางที่ 4-1, 4-2, 4-3 และ 4-4) ผลการต้านแบคทีเรียของยาเตตตราซัยคลิน พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC25922 ได้ดีที่สุด (ค่า MIC เท่ากับ 16 ไมโครลิตร) และไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ชนิดดื้อยาได้(ตารางที่ 4-2) ส่วนยาแอมพิซิลลินพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ATCC25922 และ *A. baumannii* ชนิดไม่ดื้อยา ได้ดีที่สุด (ค่า MIC เท่ากับ 32 ไมโครลิตร)และไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ชนิดดื้อยา *P. aeruginosa* ชนิดดื้อยา *K. pneumoniae* ได้ (ตารางที่ 4-3 และ 4-4) แสดงผลการของยับยั้งเชื้อฉวยโอกาสทั้ง 10 สายพันธุ์ พบว่า ยาปฏิชีวนะมาตรฐานยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ฉวยโอกาสบางชนิดทั้ง 10 สายพันธุ์ได้อย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร 3-acetyl aleuritolic acid และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่แบคทีเรียถูกยับยั้ง พบว่า ความเข้มข้นสาร 3-acetyl aleuritolic acid สูงขึ้น ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่แบคทีเรียถูกยับยั้งมากยิ่งขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์

ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ยาแอมพิซลิลิน และเตตราซัยคลินกับแบคเทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสทุกชนิดพบว่า ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่แบคทีเรียถูกยับยั้งมากยิ่งขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้น (ตั้งแต่ 32-2048) (แสดงดังภาพที่ 4-1-4-3)

จากการศึกษานี้ทำให้ได้ข้อมูลคือ 3-acetyl aleuritolic acid สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแกรมลบบางชนิดเท่านั้น และมีประสิทธิภาพต่ำกว่ายาปฏิชีวนะ

ตารางที่ 4-1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดโดยวิธี Agar diffusion susceptibility test

แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารบริสุทธิ์ และยาปฏิชีวนะ (เซนติเมตร)±SD								ค่า MIC (µM)
	2048 (µM)	1024 (µM)	512 (µM)	256 (µM)	128 (µM)	64 (µM)	น้ำกลั่น	DMSO	
A. baumannii ไม่ดื้อยา	0.95±0.13^{A}	0.93±0.12^{A}	0.87±0.06^{A}	0.87±0.06^{A}	0.80±0.00^{A}	n	N	n	**128**
A. baumannii ดื้อยา	0.90±0.00^{A}	0.93±0.06^{A}	0.90±0.10^{A}	0.90±0.10^{A}	0.90±0.10^{A}	n	N	n	**128**
E. coli ATCC25922	1.23±0.19^{A}	1.25±0.22^{A}	1.02±0.03^{A}	0.90±0.00^{A}	n	n	N	n	**256**
P. aeruginosa ไม่ดื้อยา	n	n	n	n	n	n	N	n	-
P. aeruginosa ดื้อยา	n	n	n	n	n	n	N	n	-
S. marcescens	1.00±0.00^{A}	1.00±0.00^{A}	1.00±0.00^{A}	0.8±0.00^{A}	0.8±0.00^{A}	n	N	n	**128**
K. pneumoniae	n	n	n	n	n	n	N	n	-
P. mirabilis	0.98±0.11^{A}	1.00±0.00^{A}	0.95±0.07^{A}	0.85±0.07^{A}	0.85±0.07^{A}	n	N	n	**128**
S. aureus	n	n	n	n	n	n	N	n	-
MRSA	n	n	n	n	n	n	N	n	-

หมายเหตุ n คือ ไม่เกิด Clear zone

* ^{A} เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดโดยวิธี Agar diffusion susceptibility test

แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของยาปฏิชีวนะ (เซนติเมตร) ±SD										ค่าMIC (µM)
	2048 (µM)	1024 (µM)	512 (µM)	256 (µM)	128 (µM)	64 (µM)	32 (µM)	16 (µM)	น้ำกลั่น	DMSO	
A. baumannii ไม่ดื้อยา	3.00±0.00^{A}	2.80±0.17^{B}	2.23±0.06^{C}	2.07±0.03^{D}	1.77±0.08^{D}	1.60±0.10^{D}	n	n	n	n	**64**
A. baumannii ดื้อยา	3.60±0.17^{A}	3.40±0.00^{B}	2.77±0.12^{C}	2.40±0.10^{D}	1.97±0.06^{D}	1.70±0.17^{D}	0.93±0.06^{E}	n	n	n	**32**
E. coli ATCC25922	3.20±0.00^{A}	2.97±0.06^{B}	2.63±0.06^{C}	2.10±0.10^{D}	1.70±0.00^{D}	1.40±0.17^{D}	1.20±0.00^{E}	1.10±0.10^{E}	n	n	**16**
P. aeruginosa ไม่ดื้อยา	2.67±0.20^{A}	1.98±0.64^{B}	1.78±0.38^{C}	1.33±0.29^{D}	1.57±0.12^{D}	1.38±0.03^{D}	n	n	n	n	**64**
P. aeruginosa ดื้อยา	N	n	n	n	n	N	n	n	n	n	-
S. marcescens	2.73±0.10^{A}	2.22±0.14^{B}	1.77±0.21^{C}	1.67±0.38^{D}	1.42±0.25^{D}	1.22±0.08^{D}	n	n	n	n	**64**
K. pneumoniae	3.40±0.17^{A}	3.40±0.52^{B}	2.93±0.23^{C}	2.37±0.12^{D}	2.15±0.09^{D}	1.57±0.12^{D}	n	n	n	n	**64**
P. mirabilis	1.45±0.05^{A}	1.40±0.09^{B}	0.98±0.03^{C}	0.93±0.06^{D}	0.82±0.08^{D}	0.85±0.00^{D}	n	n	n	n	**64**
S. aureus	2.91±0.09^{A}	2.78±0.03^{B}	2.57±0.28^{C}	2.43±0.13^{D}	2.21±0.15^{D}	1.93±0.12^{D}	n	n	n	n	64
MRSA	3.00±0.00^{A}	2.75±0.00^{B}	2.90±0.00^{C}	2.50±0.00^{D}	2.50±0.00^{D}	2.33±0.21^{D}	n	n	n	n	64

หมายเหตุ n คือไม่เกิด clear zone

* $^{A-E}$ เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดวิธี Agar diffusion susceptibility test

แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของยาปฏิชีวนะ(เซนติเมตร) ±SD										ค่า MIC (µM)
	2048 (µM)	1024 (µM)	512 (µM)	256 (µM)	128 (µM)	64 (µM)	32 (µM)	16 (µM)	น้ำกลั่น	DMSO	
A. baumannii ไม่ดื้อยา	2.20±0.10^{A}	1.92±0.03^{A}	1.65±0.17^{A}	1.10±0.05^{A}	0.92±0.03^{A}	0.85±0.05^{A}	0.83±0.03^{B}	n	n	n	**32**
A. baumannii ดื้อยา	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	**-**
E. coli ATCC25922	2.27±0.15^{A}	2.33±0.06^{A}	1.97±0.06^{A}	1.83±0.06^{A}	1.67±0.06^{A}	1.30±0.00^{A}	1.00±0.00^{B}	n	n	n	**32**
P. aeruginosa ไม่ดื้อยา	2.35±1.85^{A}	1.85±0.00^{A}	1.45±0.00^{A}	1.35±0.00^{A}	1.35±0.00^{A}	1.50±0.00^{A}	n	n	n	n	**64**
P. aeruginosa ดื้อยา	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	-
S. marcescens	3.37±0.06^{A}	3.10±0.00^{A}	2.90±0.00^{A}	2.03±0.06^{A}	1.42±0.14^{A}	1.07±0.12^{A}	n	n	n	n	**64**
K. pneumoniae	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	**-**
P. mirabilis	3.00±0.00^{A}	2.67±0.06^{A}	2.50±0.00^{A}	2.30±0.00^{A}	1.90±0.00^{A}	1.10±0.20^{A}	n	n	n	n	**64**
S. aureus	3.40±0.00^{A}	3.00±0.00^{A}	3.00±0.00^{A}	2.83±0.03^{A}	2.75±0.00^{A}	2.62±0.13^{A}	n	n	n	n	**64**
MRSA	3.20±0.00^{A}	3.10±0.00^{A}	2.90±0.00^{A}	3.00±0.00^{A}	2.30±0.00^{A}	2.87±0.25^{A}	n	n	n	n	**64**

หมายเหตุ n คือ ไม่เกิด clear zone

* $^{A-D}$ เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ยาแอมพิซิลลิน ยาและเตตราซัยคลินยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดวิธี Agar diffusion susceptibility test

แบคทีเรีย		เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารบริสุทธิ์ และยาปฏิชีวนะ (เซนติเมตร) ±SD										
		2048 (µM)	**1024 (µM)**	**512 (µM)**	**256 (µM)**	**128 (µM)**	**64 (µM)**	**32 (µM)**	**16 (µM)**	**น้ำกลั่น**	**DMSO**	**ค่าMIC (µM)**
A. baumannii ไม่ดื้อยา	3-acetyl aleuritolic acid	0.95±0.13^{A}	0.93±0.12^{A}	0.87±0.06^{A}	0.87±0.06^{A}	0.80±0.00^{A}	N	n	n	n	n	**128**
	แอมพิซิลลิน	2.20±0.10^{A}	1.92±0.03^{A}	1.65±0.17^{A}	1.10±0.05^{A}	0.92±0.03^{A}	0.85±0.05^{A}	0.83±0.03^{B}	n	n	n	**32**
	เตตราซัยคลิน	3.00±0.00^{A}	2.80±0.17^{B}	2.23±0.06^{C}	2.07±0.03^{D}	1.77±0.08^{D}	1.60±0.10^{D}	n	n	n	n	**64**
A. baumannii ดื้อยา	3-acetyl aleuritolic acid	0.90±0.00^{A}	0.93±0.06^{A}	0.90±0.10^{A}	0.90±0.10^{A}	0.90±0.10^{A}	N	n	n	n	n	**128**
	แอมพิซิลลิน	n	n	n	n	n	N	n	n	n	n	**-**
	เตตราซัยคลิน	3.60±0.17^{A}	3.40±0.00^{B}	2.77±0.12^{C}	2.40±0.10^{D}	1.97±0.06^{D}	1.70±0.17^{D}	0.93±0.06^{E}	n	n	n	**32**
E. coli ATCC25922	3-acetyl aleuritolic acid	1.23±0.19^{A}	1.25±0.22^{A}	1.02±0.03^{A}	0.90±0.00^{A}	n	N	n	n	n	n	**256**
	แอมพิซิลลิน	2.27±0.15^{A}	2.33±0.06^{A}	1.97±0.06^{A}	1.83±0.06^{A}	1.67±0.06^{A}	1.30±0.00^{A}	1.00±0.00^{B}	n	n	n	**32**
	เตตราซัยคลิน	3.20±0.00^{A}	2.97±0.06^{B}	2.63±0.06^{C}	2.10±0.10^{D}	1.70±0.00^{D}	1.40±0.17^{D}	1.20±0.00^{E}	1.10±0.10^{E}	n	n	**16**
P. aeruginosa ไม่ดื้อยา	3-acetyl aleuritolic acid	n	n	n	n	n	N	n	n	n	n	**-**
	แอมพิซิลลิน	2.35±1.85^{A}	1.85±0.00^{A}	1.45±0.00^{A}	1.35±0.00^{A}	1.35±0.00^{A}	1.50±0.00^{A}	n	n	n	n	**64**
	เตตราซัยคลิน	2.67±0.20^{A}	1.98±0.64^{B}	1.78±0.38^{C}	1.33±0.29^{D}	1.57±0.12^{D}	1.38±0.03^{D}	n	n	n	n	**64**

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

แบคทีเรีย		เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารบริสุทธิ์ และยาปฏิชีวนะ (เซนติเมตร) ±SD										
		2048 (µM)	**1024 (µM)**	**512 (µM)**	**256 (µM)**	**128 (µM)**	**64 (µM)**	**32 (µM)**	**16 (µM)**	**น้ำกลั่น**	**DMSO**	**ค่าMIC (µM)**
P. aeruginosa คื้อยา	3-acetyl aleuritolic acid	n	n	n	n	N	n	n	n	n	n	-
	แอมพิซิลลิน	n	n	n	n	N	n	n	n	n	n	-
	เตตราซัยคลิน	n	n	n	n	N	n	n	n	n	n	-
S. marcescens	3-acetyl aleuritolic acid	1.00±0.00^{A}	1.00±0.00^{A}	1.00±0.00^{A}	0.8±0.00^{A}	0.8±0.00^{A}	n	n	n	n	n	**128**
	แอมพิซิลลิน	3.37±0.06^{A}	3.10±0.00^{A}	2.90±0.00^{A}	2.03±0.06^{A}	1.42±0.14^{A}	1.07±0.12^{A}	n	n	n	n	**64**
	เตตราซัยคลิน	2.73±0.10^{A}	2.22±0.14^{B}	1.77±0.21^{C}	1.67±0.38^{D}	1.42±0.25^{D}	1.22±0.08^{D}	n	n	n	n	**64**
K. pneumonia	3-acetyl aleuritolic acid	n	n	n	n	N	n	n	n	n	n	-
	แอมพิซิลลิน	n	n	n	n	N	n	n	n	n	n	-
	เตตราซัยคลิน	3.40±0.17^{A}	3.40±0.52^{B}	2.93±0.23^{C}	2.37±0.12^{D}	2.15±0.09^{D}	1.57±0.12^{D}	n	n	n	n	**64**
P. mirabilis	3-acetyl aleuritolic acid	0.98±0.11^{A}	1.00±0.00^{A}	0.95±0.00^{A}	0.85±0.07^{A}	0.85±0.07^{A}	n	n	n	n	n	**128**
	แอมพิซิลลิน	3.00±0.00^{A}	2.67±0.06^{A}	2.50±0.00^{A}	2.30±0.00^{A}	1.90±0.00^{A}	1.10±0.20^{A}	n	n	n	n	**64**
	เตตราซัยคลิน	1.45±0.05^{A}	1.40±0.09^{B}	0.98±0.03^{C}	0.93±0.06^{D}	0.82±0.08^{D}	0.85±0.00^{D}	n	n	n	n	**64**

หมายเหตุ * $^{A-D}$ เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

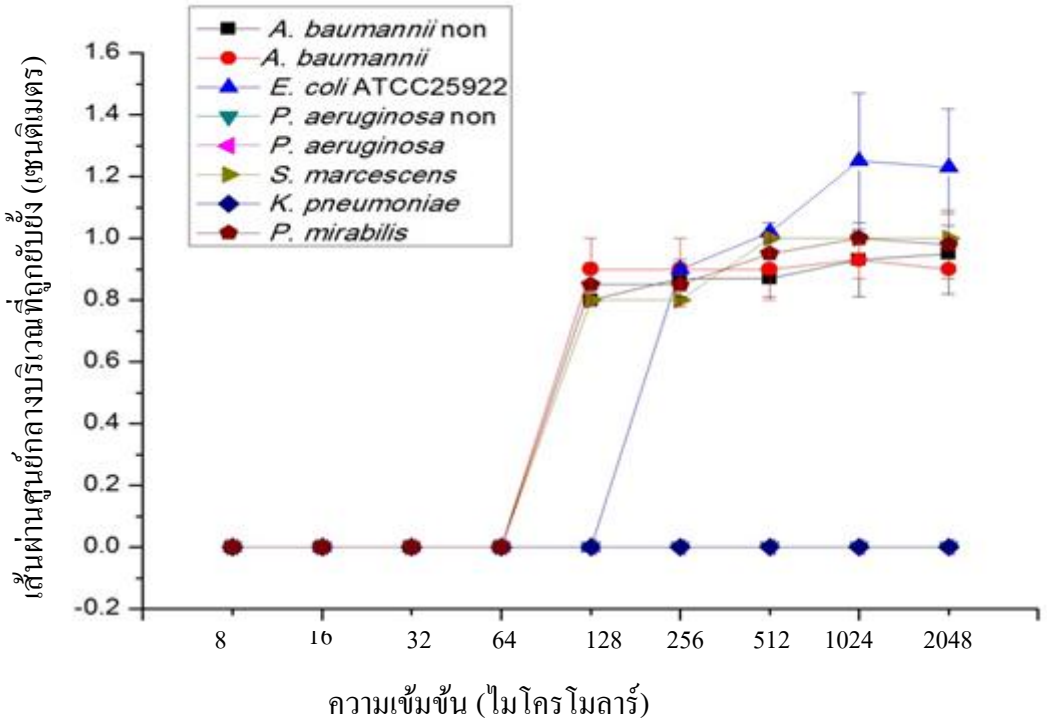
แบคทีเรีย		เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารบริสุทธิ์ และยาปฏิชีวนะ (เซนติเมตร) ±SD										
		2048 (µM)	**1024 (µM)**	**512 (µM)**	**256 (µM)**	**128 (µM)**	**64 (µM)**	**32 (µM)**	**16 (µM)**	**น้ำกลั่น**	**DMSO**	**ค่าMIC (µM)**
S. aureus	3-acetyl aleuritolic acid	N	n	n	n	n	n	n	n	n	n	-
	แอมพิซิลลิน	3.40±0.00^{A}	3.00±0.00^{A}	3.00±0.00^{A}	2.83±0.03^{A}	2.75±0.00^{A}	2.62±0.13^{A}	n	n	n	n	**64**
	เตตราซัยคลิน	2.91±0.09^{A}	2.78±0.03^{B}	2.57±0.28^{C}	2.43±0.13^{D}	2.21±0.15^{D}	1.93±0.12^{D}	n	n	n	n	64
MRSA	3-acetyl aleuritolic acid	N	n	n	n	n	n	n	n	n	n	-
	แอมพิซิลลิน	3.20±0.00^{A}	3.10±0.00^{A}	2.90±0.00^{A}	3.00±0.00^{A}	2.30±0.00^{A}	2.87±0.25^{A}	n	n	n	n	**64**
	เตตราซัยคลิน	3.00±0.00^{A}	2.75±0.00^{B}	2.90±0.00^{C}	2.50±0.00^{D}	2.50±0.00^{D}	2.33±0.21^{D}	n	n	n	n	64

หมายเหตุ n คือ ไม่เกิด clear zone

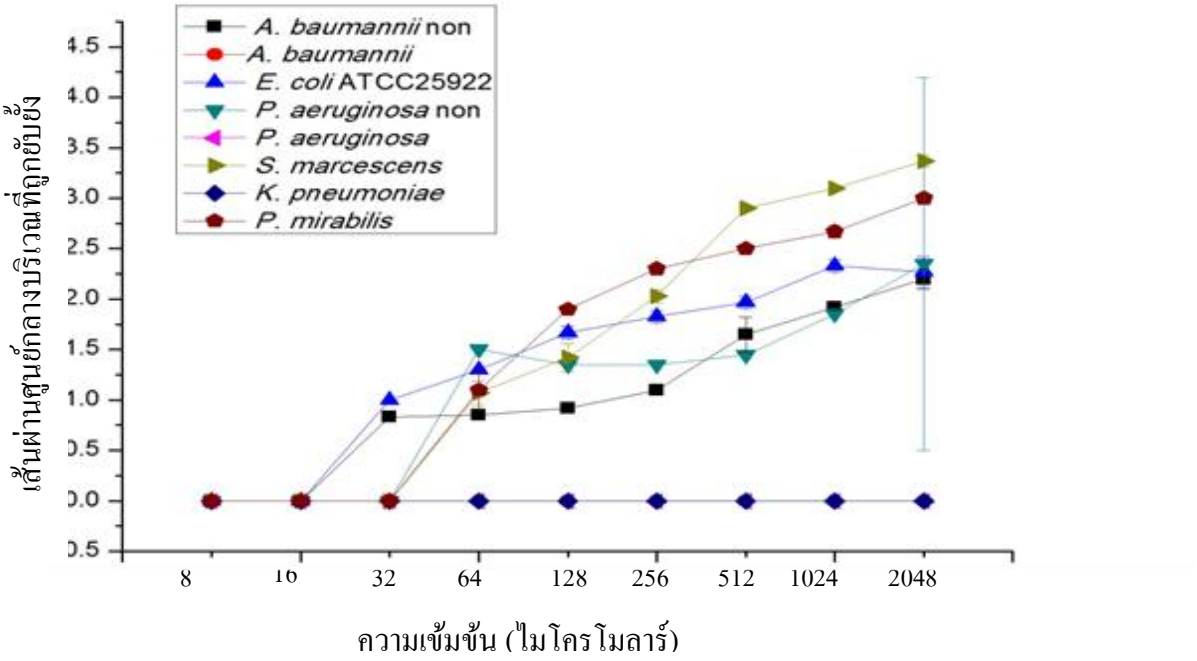
* $^{A-D}$ เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-5 เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ

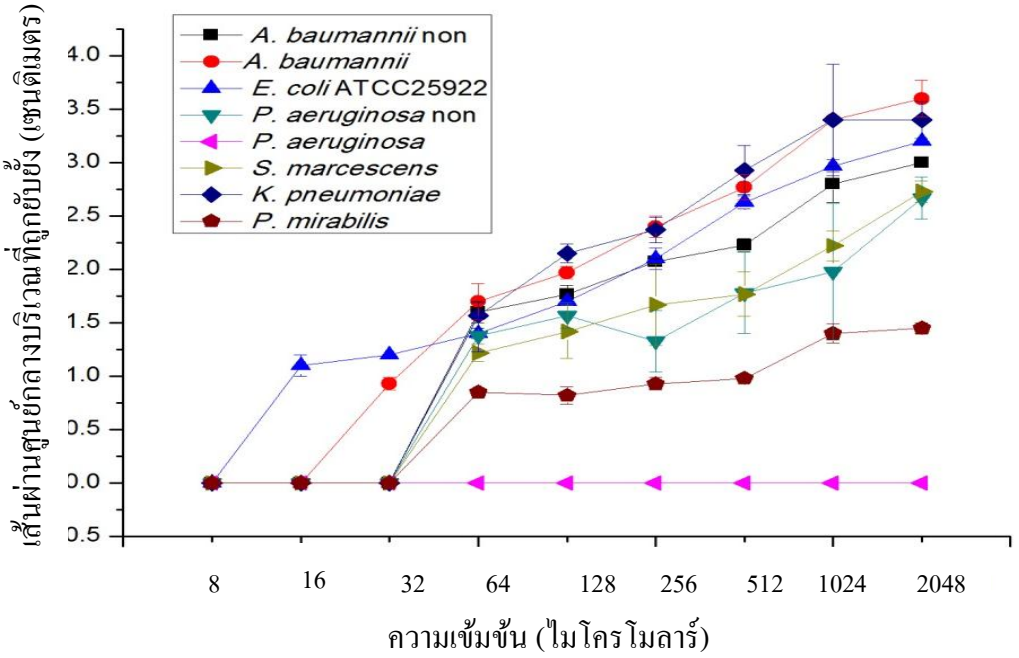
แบคทีเรีย	**ค่า MIC (ไมโครโมลาร์)**		
	สาร 3-acetyl aleuritolic acid	**แอมพิซิลลิน**	**เตตราซัยคลิน**
A. baumannii ไม่ดื้อยา	128	32	64
A. baumannii ดื้อยา	128	-	32
E. coli ATCC25922	256	32	16
P. aeruginosa ไม่ดื้อยา	-	64	64
P. aeruginosa ดื้อยา	-	-	-
S. marcescens	128	64	64
K.pneumoniae	-	-	64
P.mirabilis	128	64	64
S.aureus	-	64	64
MRSA	-	64	64



ภาพที่ 4-1 เปรียบเทียบฤทธิ์ของของ 3-acetyl aleuritolic acid กับแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส



ภาพที่ 4-2 เปรียบเทียบฤทธิ์ของยาแอมพิซิลลินกับแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส



ภาพที่ 4-3 เปรียบเทียบฤทธิ์ของยาเตตราซัยคลินกับแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี Agar diffusion susceptibility

ในการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ได้เลือกศึกษาเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มักก่อปัญหาดื้อยาในโรงพยบาล และ และพบว่า ผลการสำรวจฤทธิ์ให้ผล จึงนำมาทดสอบการเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะในลำดับต่อไป ได้แก่ *A. baumannii* ดื้อยา *E. coli* ATCC25922 และ *P. mirabilis* เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานต่อยอดในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของมันต่อไป

จากการศึกษาการเสริมฤทธิ์สาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลินและยาเตตาซัยคลิน พบว่า ผลการทดลองการเสริมฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งเชื้อได้เพียง 2 สายพันธุ์คือ *E. coli* ATCC25922และ *P. mirabilis* โดยพบว่า มีฤทธิ์ไม่ต่างจากการใช้สารตัวเดียว และให้ผลเสริมฤทธิ์กันตามลำดับ และพบว่า ผลการทดลองการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้ง 3 สายพันธุ์คือ *A. baumannii* ดื้อยา *E. coli* ATCC25922 และ *P. mirabilis* โดยงานวิจัยพบว่า

ให้ผล ไม่ต่างจากการใช้สารตัวเดียว เสริมฤทธิ์กันบางส่วนและไม่ต่างจากการใช้สารตัวเดียว ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ผลการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา

จากการทดสอบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร 3-acetyl aleuritolic acid และยาแอมพิซิลลิน พบว่า ไม่สามารถสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* ดื้อยาได้ (แสดงในตารางที่ 4-6A) และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* ดื้อยา โดยใช้ยาเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นต่ำสุด 64 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสาร 3-acetyl aleuritolic acid ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 32 ไมโครโมลาร์ (ค่าMIC ของยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียวเท่ากับ 64 ไมโครโมลาร์และค่าMIC ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid เพียงอย่างเดียวเท่ากับ 128 ไมโครโมลาร์) (แสดงในตารางที่4-6B) แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้สาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii ดื้อยา* แสดงว่ามีฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent) (FICI ที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 2.25) และไม่ให้ผลการเสริมฤทธิ์เมื่อทดสอบกับแอมพิซิลลิน (แสดงในตารางที่ 4-11)

ผลการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับกับยาปฏิชีวนะ ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922

3-acetyl aleuritolic acid เมื่อใช้ร่วมกับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินสามารถ ยับยั้งเชื้อยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922 โดยพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC25922 เมื่อใช้ยาแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้นต่ำสุด 32 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสาร 3-acetyl aleuritolic acid ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 32 ไมโครโมลาร์ (แสดงในตารางที่ 4-7A) (ค่าMIC ของแอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียวเท่ากับ 32 ไมโครโมลาร์และค่าMIC ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid เพียงอย่างเดียวเท่ากับ 256 ไมโครโมลาร์) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent) และให้ค่า FICI ที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 1.13 (แสดงในตารางที่ 4-9) และเมื่อผสม 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC25922 ได้ดียิ่งขึ้นโดยใช้ยาเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นต่ำสุด 8 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสาร 3-acetyl aleuritolic acid ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 8 ไมโครโมลาร์ (ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียวเท่ากับ 16 ไมโครโมลาร์และค่า MIC ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid เพียงอย่างเดียวเท่ากับ 256 ไมโครโมลาร์) (แสดงในตารางที่ 4-7 B) แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้สาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน แสดงว่ามีการเสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้ง *E. coli* ATCC25922 ค่า FICI มีค่าเท่ากับ 0.53

(แสดงในตารางที่ 4-11)

ผลการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับกับยาปฏิชีวนะ ในการยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis*

3-acetyl aleuritolic acid เมื่อใช้ร่วมกับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินสามารถ ยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis* โดยจากการทดสอบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร 3-acetyl aleuritolic acid และยาแอมพิซิลลิน พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* เมื่อใช้ยาแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้นต่ำสุด 16 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสาร 3-acetyl aleuritolic acid ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 16 ไมโครโมลาร์ (ค่า MIC ของยาแอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียวเท่ากับ 64 ไมโครโมลาร์ และค่า MIC ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid เพียงอย่างเดียวเท่ากับ 128 ไมโครโมลาร์) (แสดงในตารางที่ 4-8 A) แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้สาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. mirabilis* ประสิทธิภาพของยาแอมพิซิลลินเพิ่มขึ้น ค่า FICI ที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 0.38 แสดงว่า มีการเสริมฤทธิ์กัน และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* โดยใช้ยาเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นต่ำสุด 64 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสาร 3-acetyl aleuritolic acid ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 16 ไมโครโมลาร์ (แสดงในตารางที่ 4-8 B) (ค่า MIC ของเตตราซัยคลินเพียงอย่างเดียวเท่ากับ 64 ไมโครโมลาร์ และค่า MIC ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid เพียงอย่างเดียวเท่ากับ 128ไมโครโมลาร์) แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้สาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน มีฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. mirabilis* ค่า FICI ที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 1.13 (แสดงในตารางที่ 4-11)

จากการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาปฏิชีวนะพบว่าสาร 3-acetyl aleuritolic acid สามารถเสริมฤทธิ์เตตราซัยคลินและแอมพิซิลลินในการต้านเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา *E. coli* ATCC25922 และ *P. mirabilis* จากผลการศึกษานี้ทำให้ทราบว่า 3-acetyl aleuritolic acid สามารถลดการใช้ยาแอมพิซิลลิน ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อทดสอบกับเชื้อ *P. mirabilis* โดยสามารถลดปริมาณการใช้ยาแอมพิซิลลินมากกว่า 1/2 เท่า จากการใช้ยาแอมพิซิลลินเพียงชนิดเดียว (ตารางที่ 4-12)

จากผลการศึกษานี้ทำให้ทราบว่า 3-acetyl aleuritolic acid สามารถลดการใช้ยาเตตราซัยคลิน ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อทดสอบกับเชื้อ *E. coli* ATCC25922 โดยสามารถลดปริมาณการใช้ยาเตตราซัยคลินมากกว่า 1/4 เท่า จากการใช้ยาเตตราซัยคลินเพียงชนิดเดียว (ตารางที่ 4-12) นอกจากนี้ยังพบว่า 3-acetyl aleuritolic acid เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะสองชนิดแล้ว สามารถจะลด

ปริมาณการใช้ 3-acetyl aleuritolic acid ให้น้อยลงยิ่งขึ้น คือใช้ลดลงกว่าการใช้สาร 3-acetyl aleuritolic acid เพียงชนิดเดียว ประมาณ 8-32 เท่าของค่า MIC ของสาร (ตารางที่ 4-12)

ตารางที่ 4-6A การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา

ความเข้มข้นของยาแอมพิซิลลิน (ไมโครโมลาร์)	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid และยาปฏิชีวนะ (เซนติเมตร)											ค่า MIC (ไมโครโมลาร์)
	ความเข้มข้นของ 3-acetyl aleuritolic acid (ไมโครโมลาร์)											
	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	น้ำกลั่น	DMSO	
32	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
64	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
128	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
256	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
512	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
1024	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
2048	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
4096	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	

หมายเหตุ n คือ ไม่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

FIC ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน / ค่า MICของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียว

= n

FIC ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน / ค่า MICของสาร 3-acetyl aleuritolic acid เพียงอย่างเดียว

= n

ตารางที่ 4-6B การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา

ความเข้มข้นของยาเตตราซัยคลิน (ไมโครโมลาร์)	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid และยาปฏิชีวนะ (เซนติเมตร)										
	ความเข้มข้นของ 3-acetyl aleuritolic acid (ไมโครโมลาร์)										
	16	32	64	128	256	512	1024	2048	น้ำกลั่น	DMSO	ค่า MIC (ไมโครโมลาร์)
16	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
32	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
64	n	0.85±0.07	0.85±0.07	0.90± 0.00	0.95±0.07	0.85±0.07	0.80±0.00	0.90±0.00	n	n	
128	1.00±0.00	0.90±0.00	0.90±0.00	0.85±0.07	1.10±0.00	1.10±0.14	1.10±0.00	1.00±0.00	n	n	64/32
256	1.20±0.00	1.40±0.00	1.35±0.07	1.25±0.07	1.20±0.00	1.20±0.00	1.20±0.00	1.23±0.04	n	n	
512	1.48±0.03	1.40±0.00	1.45±0.07	1.50±0.00	1.53±0.04	1.50±0.10	1.5±0.07	1.50±0.07	n	n	
1024	1.98±0.30	2.08±0.10	1.88±0.20	1.98±0.10	1.95±0.10	2.03±0.03	1.98±0.03	2.03±0.10	n	n	
2048	2.23±0.03	2.25±0.06	2.40±0.10	2.53±0.03	2.33±0.03	2.23±0.10	2.65±0.07	2.75±0.07	n	n	

หมายเหตุ n คือ ไม่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

FIC ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียว

= 64/ 32 = 2

FIC ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ ค่า MIC ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid เพียงอย่างเดียว

= 32/ 128 = 0.25

FICI = FIC ของยาปฏิชีวนะ + FIC ของสารบริสุทธิ์ = 2 + 0.25 = 2.25

ตารางที่ 4-7A การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC25922

ความเข้มข้นของยาแอมพิซิลลิน (ไมโครโมลาร์)	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid และยาปฏิชีวนะ (เซนติเมตร)											
	ความเข้มข้นของ 3-acetyl aleuritolic acid (ไมโครโมลาร์)											
	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	น้ำกลั่น	DMSO	ค่า MIC ไมโครโมลาร์)
16	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
32	n	n	0.93±0.06	0.93±0.06	0.97±0.06	0.97±0.06	0.90±0.00	1.00±0.00	0.97±0.06	n	n	
64	1.1±0.00	1.2±0.00	1.2±0.00	1.1±0.00	1.2±0.00	1.2±0.00	1.25±0.07	1.15±0.07	1.10±0.00	n	n	
128	1.75±0.07	1.9±0.14	1.9±0.14	0.9±0.00	0.9±0.00	0.9±0.00	0.95±0.07	0.93±0.04	0.98±0.04	n	n	32/32
256	2.05±0.07	1.95±0.07	2.00±0.00	1.15±0.14	1.2±0.21	1.3±0.14	1.325±0.04	1.35±0.07	1.3±0.07	n	n	
512	2.2±0.00	2.15±0.07	2.15±0.07	1.65±0.07	1.8±0.00	1.78±0.11	1.9±0.00	1.9±0.00	2±0.00	n	n	
1024	2.68±0.11	2.55±0.07	2.55±0.07	2.23±0.11	2.26±0.04	2.23±0.11	2.13±0.04	2.2±0.07	2.28±0.04	n	n	
2048	2.95±0.04	2.88±0.18	2.85±0.07	3±0.00	2.95±0.07	3±0.00	3±0.00	3.03±0.04	3.05±0.07	n	n	

หมายเหตุ n คือ ไม่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

FIC ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ ค่า MICของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียว

= 32/ 32 = 1

FIC ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ ค่า MICของสาร 3-acetyl aleuritolic acid เพียงอย่างเดียว

= 32/ 256 = 0.13

FICI = FIC ของยาปฏิชีวนะ + FIC ของสารบริสุทธิ์ = 1+0.13 = 1.13

ตารางที่ 4-7B การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC25922

ความเข้มข้นของยาเตตราซัยคลิน (ไมโครโมลาร์)	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid และยาปฏิชีวนะ (เซนติเมตร)											
	ความเข้มข้นของ 3-acetyl aleuritolic acid (ไมโครโมลาร์)											
	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	น้ำกลั่น	DMSO	ค่าMIC (โครโมลาร์)
8	0.85±0.00	0.85±0.07	0.85±0.07	0.90±0.00	0.90±0.00	0.90±0.00	0.90±0.00	0.90±0.00	0.85±0.07	n	n	
16	1.05±0.07	1.05±0.07	1.10±0.00	1.15±0.07	1.10±0.14	1.15±0.07	1.10±0.00	1.15±0.07	1.05±0.07	n	n	
32	1.63±0.06	1.60±0.00	1.67±0.11	1.88±0.06	1.80±0.00	1.88±0.03	1.83±0.03	1.83±0.03	1.87±0.03	n	n	
64	1.68±0.03	1.77±0.15	1.97±0.06	2.15±0.05	2.07±0.12	2.08±0.08	2.11±0.08	2.05±0.05	2.07±0.08	n	n	
128	2.20±0.17	2.37±0.06	2.3±0.00	3.00±0.00	2.85±0.00	2.90±0.00	2.97±0.06	2.82±0.18	2.77±0.12	n	n	8/8
256	2.30±0.00	2.47±0.03	2.5±0.00	2.78±0.16	2.68±0.16	2.67±0.16	2.65±0.00	2.67±0.06	2.53±0.06	n	n	
512	3.00±0.00	3.08±0.03	3.08±0.03	3.12±0.08	3.07±0.06	3.20±0.05	3.17±0.08	3.10±0.06	3.10±0.05	n	n	
1024	3.28±0.03	3.37±0.05	3.3±0.00	3.55±0.05	3.58±0.03	3.63±0.12	3.53±0.10	3.57±0.06	3.50±0.10	n	n	
2048	3.43±0.06	3.57±0.03	3.57±0.06	3.93±0.12	3.97±0.06	4.03±0.32	3.63±0.10	3.73±0.12	3.68±0.10	n	n	

<u>หมายเหตุ</u> n คือ ไม่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

FIC ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน / ค่า MICของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียว

= 8/ 16 = 0.5

FIC ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ ค่า MICของสาร 3-acetyl aleuritolic acid เพียงอย่างเดียว

= 8/ 256 = 0.03

FICI = FIC ของยาปฏิชีวนะ + FIC ของสารบริสุทธิ์ = 0.5+0.03 = 0.53

ตารางที่ 4-8A การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis*

ความเข้มข้นของยาแอมพิซิลลิน (ไมโครโมลาร์)	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid และยาปฏิชีวนะ(เซนติเมตร)										
	ความเข้มข้นของ 3-acetyl aleuritolic acid (ไมโครโมลาร์)										
	16	32	64	128	256	512	1024	2048	น้ำกลั่น	DMSO	ค่า MIC (ไมโครโมลาร์)
16	0.83 ± 0.06	0.83 ± 0.06	0.83 ± 0.06	0.90 ± 0.00	0.90 ± 0.00	0.87 ± 0.06	0.87 ± 0.06	0.90 ± 0.00	n	n	
32	1.00 ± 0.00	1.03 ± 0.06	1.07 ± 0.06	1.07 ± 0.06	1.03 ± 0.06	1.00 ± 0.00	1.03 ± 0.06	1.00 ± 0.00	n	n	
64	1.43 ± 0.06	1.53 ± 0.06	1.53 ± 0.06	1.50 ± 0.10	1.53 ± 0.15	1.63 ± 0.06	1.57 ± 0.06	1.62 ± 0.06	n	n	
128	1.80 ± 0.00	2.00 ± 0.10	2.00 ± 0.00	1.97 ± 0.06	2.17 ± 0.12	2.13 ± 0.06	2.07 ± 0.06	2.03 ± 0.06	n	n	16/16
256	2.43 ± 0.06	2.43 ± 0.06	2.47 ± 0.12	2.47 ± 0.06	2.40 ± 0.10	2.43 ± 0.06	2.47±0.06	2.47 ± 0.15	n	n	
512	2.60 ± 0.1	2.60 ± 0.10	2.65 ± 0.21	2.60 ± 0.14	2.88 ± 0.11	2.70 ± 0.10	2.58 ± 0.10	2.55 ± 0.07	n	n	
1024	2.93 ± 0.04	2.78 ± 0.18	2.88 ± 0.04	2.85 ± 0.21	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	2.98 ± 0.04	2.95 ± 0.00	n	n	
2048	3.45 ± 0.09	3.43 ± 0.06	3.50 ± 0.00	3.48 ± 0.03	3.70 ± 0.00	3.70 ± 0.00	3.60 ± 0.00	3.67 ± 0.06	n	n	

<u>หมายเหตุ</u> n คือ ไม่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

FIC ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน / ค่า MICของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียว

= 16/ 64 = 0.25

FIC ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน / ค่า MICของสาร 3-acetyl aleuritolic acid เพียงอย่างเดียว

= 16/ 128 = 0.13

FIC I = FIC ของยาปฏิชีวนะ + FIC ของสารบริสุทธิ์ = 0.25+0.13 = 0.38

ตารางที่ 4-8B การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis*

ความเข้มข้นของเตตราซัยคลิน (ไมโครโมลาร์)	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid และยาปฏิชีวนะ (เซนติเมตร)										
	ความเข้มข้นของ 3-acetyl aleuritolic acid (ไมโครโมลาร์)										
	16	32	64	128	256	512	1024	2048	น้ำกลั่น	DMSO	ค่า MIC (ไมโครโมลาร์)
16	n	N	n	n	n	n	n	n	n	n	
32	n	N	n	n	n	n	n	n	n	n	
64	0.70 ± 0.07	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.75 ± 0.07	0.75 ± 0.07	n	n	
128	0.80 ± 0.00	0.80 ± 0.00	0.80 ± 0.00	0.80 ± 0.00	0.80 ± 0.00	0.80 ± 0.00	0.80 ± 0.00	0.80 ± 0.00	n	n	64/16
256	0.95 ± 0.07	0.95 ± 0.07	0.95 ± 0.07	0.93 ± 0.04	0.95 ± 0.07	0.90 ± 0.00	0.93 ± 0.04	0.93 ± 0.04	n	n	
512	1.00 ± 0.07	1.05 ± 0.14	1.05 ± 0.00	1.05 ± 0.00	1.08 ± 0.04	1.03 ± 0.11	1.08 ± 0.04	0.98 ± 0.04	n	n	
1024	1.03 ± 0.04	1.03 ± 0.04	1.08 ± 0.04	1.03 ± 0.04	1.05 ± 0.07	1.03 ± 0.11	1.00 ± 0.00	1.05 ± 0.07	n	n	
2048	1.20 ± 0.00	1.30 ± 0.07	1.20 ± 0.00	1.20 ± 0.00	1.30 ± 0.07	1.20 ± 0.00	1.30 ± 0.07	1.30 ± 0.00	n	n	

หมายเหตุ n คือ ไม่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

FIC ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ ค่า MICของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียว

= 64/ 64 = 1

FIC ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ ค่า MICของสาร 3-acetyl aleuritolic acid เพียงอย่างเดียว

= 16/ 128 = 0.13

FICI = FIC ของยาปฏิชีวนะ + FIC ของสารบริสุทธิ์ = 1+0.13 = 1.13

ตารางที่ 4-9 ค่า FICI ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบบางสายพันธุ์

แบคทีเรีย	**MIC alone แอมพิซิลลิน**	**MIC combination แอมพิซิลลิน + 3-acetyl aleuritolic acid**	**MIC alone 3-acetyl aleuritolic acid**	**MIC combination 3-acetyl aleuritolic acid + แอมพิซิลลิน**	**FIC 3-acetyl aleuritolic acid**	**FIC แอมพิซิลลิน**	**FICI**	**แปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม**
A. baumannii ดื้อยา	n	n	n	n	n	n	-	-
E. coli ATCC25922	32	32	256	32	0.13	1	1.13	ไม่ต่างจากการใช้สารตัวเดียว
P. mirabilis	64	16	128	16	0.13	0.25	0.38	เสริมฤทธิ์กัน

ตารางที่ 4-10 ค่า FICI ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบบางสายพันธุ์

แบคทีเรีย	MIC alone ยาเตตราซัยคลิน	MIC combination ยาเตตราซัยคลิน + 3-acetyl aleuritolic acid	MIC alone 3-acetyl aleuritolic acid	MIC combination 3-acetyl aleuritolic acid + ยาเตตราซัยคลิน	FIC 3-acetyl aleuritolic acid	FIC ยาเตตราซัยคลิน	FICI	แปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม
A. baumannii ดื้อยา	32	64	128	32	0.25	**2**	**2.25**	ไม่ต่างจากการใช้สารตัวเดียว
E. coli ATCC25922	16	8	256	8	0.03	0.5	0.53	เสริมฤทธิ์กันบางส่วน
P. mirabilis	64	16	128	16	0.13	0.25	0.38	ไม่ต่างจากการใช้สารตัวเดียว

ตารางที่ 4-11 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมระหว่าง 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลินและยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสบางสายพันธุ์

แบคทีเรีย	**ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาปฏิชีวนะ**			
	สาร 3-acetyl aleuritolic acid +ยาแอมพิซิลลิน		**สาร 3-acetyl aleuritolic acid** +ยาเตตราซัยคลิน	
	ค่า FICI	แปลผล	ค่า FICI	แปลผล
A. baumannii ดื้อยา	-	-	2.25	ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว
E. coli ATCC 25922	1.13	ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว	0.53	เสริมฤทธิ์กันบางส่วน
P. mirabilis	0.38	เสริมฤทธิ์กัน	1.13	ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว

ตารางที่ 4-12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันของ 3-acetyl aleuritolic acid และยาปฏิชีวนะเปรียบเทียบกับเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะชนิดเดียว

ยาปฏิชีวนะ	MIC_{Co}/ MIC_{alone}	
	3-acetyl aleuritolic acid	ยาปฏิชีวนะ
A. baumannii ดื้อยา		
แอมพิซิลลิน	-	-
เตตราซัยคลิน	32/128	64/32
E. coli ATCC 25922		
แอมพิซิลลิน	32/256	32/32
เตตราซัยคลิน	8/256	8/16
P. mirabilis		
แอมพิซิลลิน	16/128	16/64
เตตราซัยคลิน	16/128	64/64

- หมายถึง ไม่สามารถหาสัดส่วนได้ เนื่องจากไม่มีค่า MIC

การศึกษาผลของเวลาในการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ผสมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินและแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบต่อหน่วยเวลา (Time-kill curve assay)

จากการศึกษาการเสริมฤทธิ์สาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลินและยาเตตาซัยคลิน พบว่า สาร 3-acetyl aleuritolic acid เสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis* และผลการทดลองการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน ให้การเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อ *E.coli* ATCC25922 จึงได้นำเชื้อทั้งสองชนิดมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียต่อหน่วยเวลาดังรายละเอียดต่อไปนี้

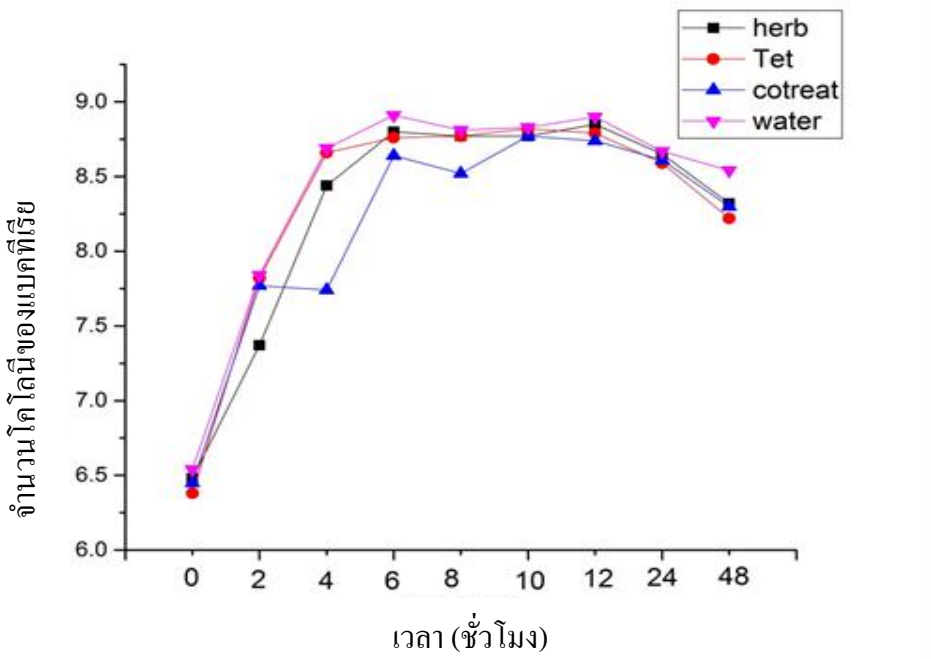
ผลของสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922 ต่อหน่วยเวลา

เมื่อใช้สารสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น 8 ไมโครโมลาร์ เท่ากัน *E. coli* ATCC25922 (มีค่าเท่ากับ 1/4 เท่าของยาเตตราซัยคลินและ 1/16 เท่าของ 3-acetyl aleuritolic acid) เพื่อลดปริมาณการใช้ยาและสาร 3-acetyl aleuritolic acid ให้น้อย

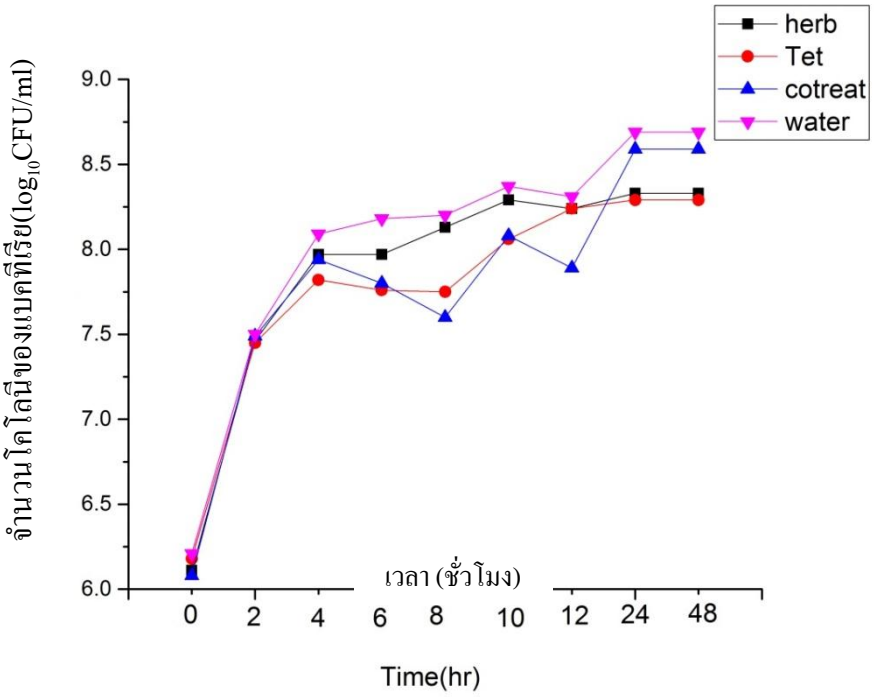
ที่สุดแต่ยังสามารถเสริมฤทธิ์กันได้อยู่ ผลการทดสอบพบว่า เมื่อใช้สารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 4 กล่าวคือ จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียลดลงจากเวลาเริ่มต้นร้อยละ 10.93 ของการยับยั้ง แสดงว่าสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ผสมกับยาเตตราซัยคลินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC25922 ในช่วงต้นของระยะ log phase (ชั่วโมงที่ 2-8) ดังภาพที่ 4

ผลของสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis* ต่อหน่วยเวลา

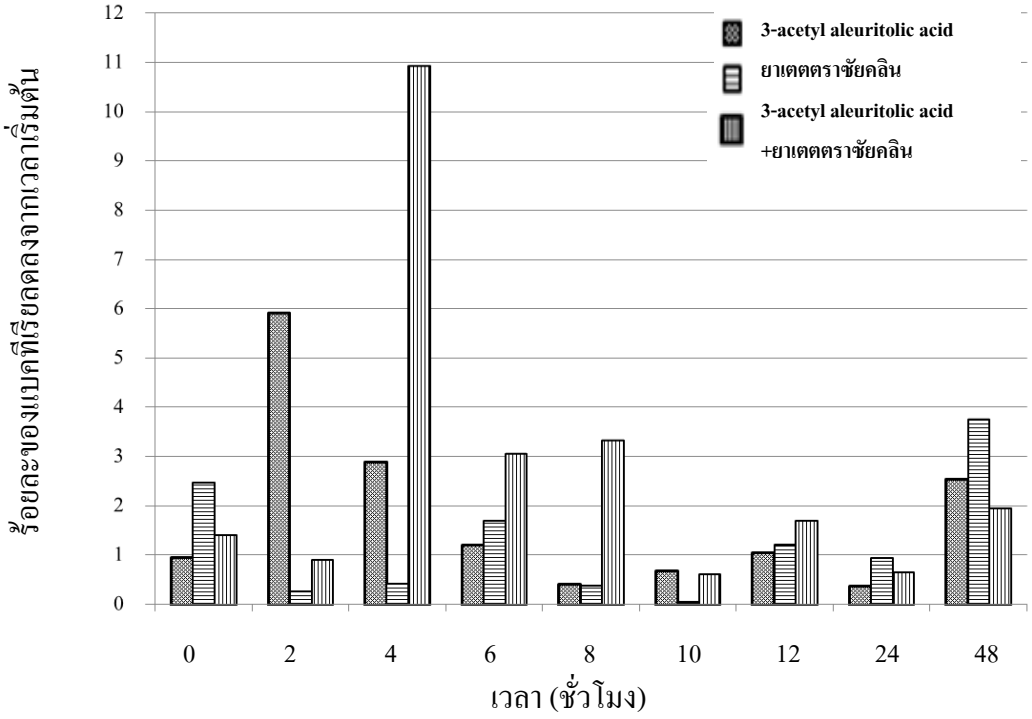
เมื่อใช้สารสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้น 8 ไมโครโมลาร์ เท่ากัน (มีค่าเท่ากับ 1/2 เท่าของยาแอมพิซิลลินและ 1/32 เท่าของ 3-acetyl aleuritolic acid) เพื่อลดปริมาณการใช้ยาและสาร 3-acetyl aleuritolic acid ให้น้อยที่สุดแต่ยังสามารถเสริมฤทธิ์กันได้อยู่ เช่นเดียวกับหลักการทดสอบกับ *E. coli* ATCC25922 ผลการทดสอบพบว่า ยาแอมพิซิลลินสามารถยับยั้งเชื้อได้ในชั่วโมงที่ 8 โดย มีจำนวนโคโลนีลดลงจากเวลาเริ่มต้นร้อยละ 5.50 เมื่อใช้สารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาแอมพิซิลลิน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 8 กล่าวคือจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียลดลงจากเวลาเริ่มต้นร้อยละ 7.36 ของการยับยั้ง แสดงว่าสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ผสมกับยาเตตราซัยคลินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *E.coli*



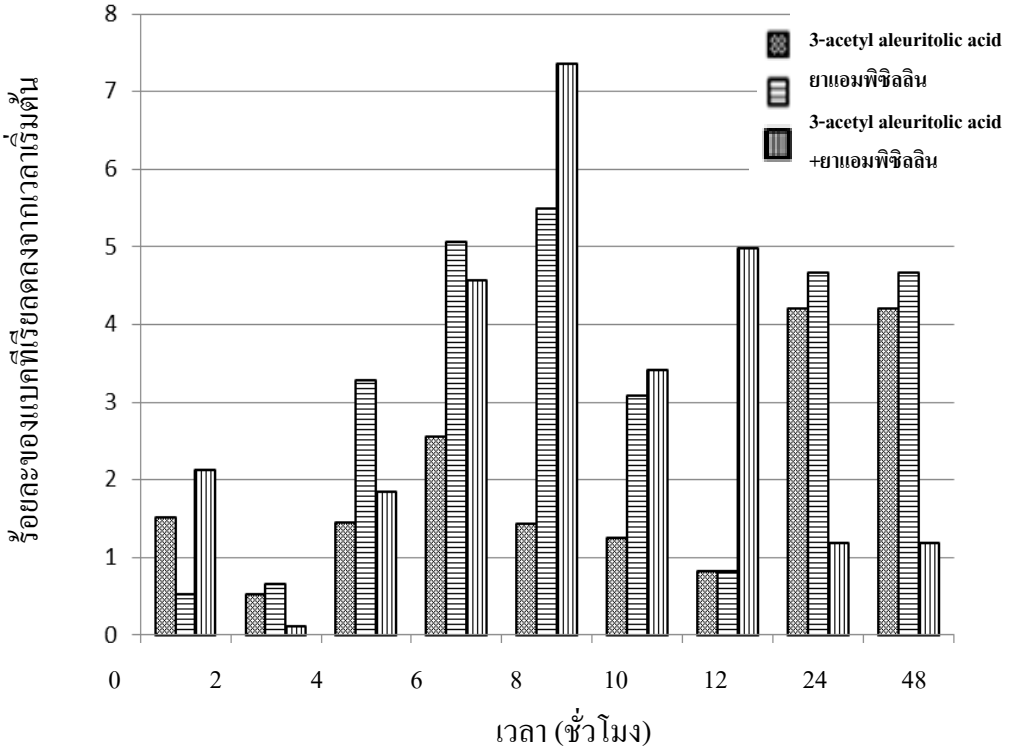
ภาพที่ 4-4 ผลของสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922 ต่อหน่วยเวลา



ภาพที่ 4-5 ผลของสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อ *P. mirabili* ต่อหน่วยเวลา



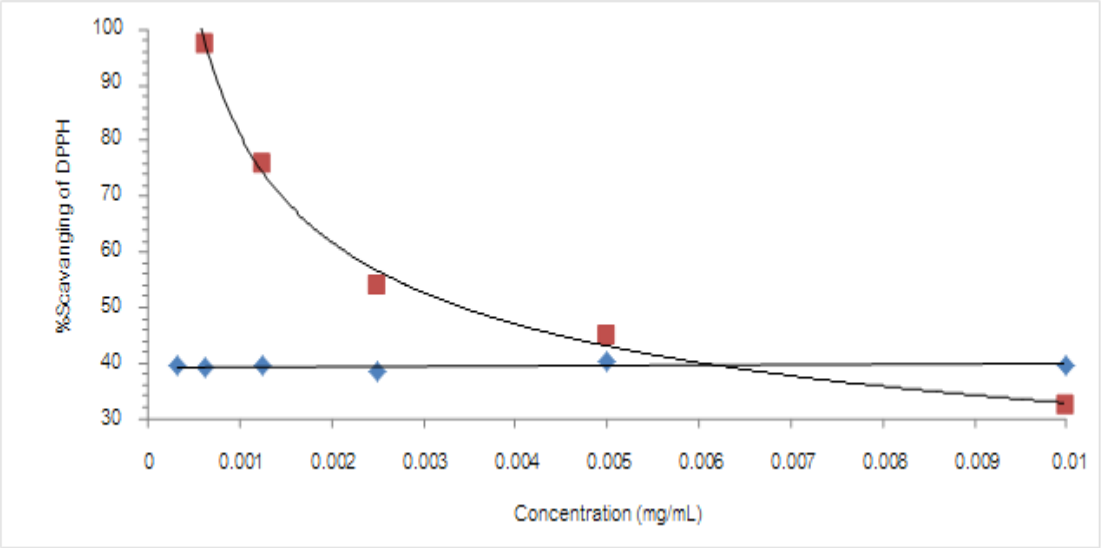
ภาพที่ 4-6A เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922 ต่อหน่วยเวลา



ภาพที่ 4-6B เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis* ต่อหน่วยเวลา

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในวิธีการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารบริสุทธิ์ (3-acetyl aleuritolic acid) พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดอนุมูล DPPH 39.19-40.24 เปอร์เซ็นต์ในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.0003125 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยกำจัดอนุมูล DPPH สูงสุดเท่ากับ 40.24 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำกว่า BHT ที่เป็นค่ามาตรฐาน (BHT มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0023 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ภาพที่ 4-6 และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วย วิธี FRAP assay พบว่า 3-acetyl aleuritolic acid ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์จากดีหมีสามารถรีดิวซ์ไอออนโลหะได้คือเท่ากับ 0.75 ± 0.15^{a} มิลลิกรัมสมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของสารบริสุทธิ์ (a แสดงถึง ความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)) ซึ่งต้านออกซิเดชันได้น้อยกว่า BHT (BHT มีค่า 15.43 มิลลิกรัมของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของ BHT)



ภาพที่ 4-7 ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารบริสุทธิ์ และสารมาตรฐาน (BHT)

บทที่ 5
อภิปรายผล และข้อเสนอะแนะ

ผลการสำรวจฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดด้วยวิธีวิธี Agar diffusion susceptibility test พบว่า มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis S. marcescens A. baumannii* ดื้อยาและไม่ดื้อยาได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang et al. (2015) เนื่องจากสาร 3-acetyl aleuritolic acid คือ สารกลุ่ม triterpenoids pentacyclic เช่นเดียวกับสารพบจากต้นพญาสัตบรรณ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แต่งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมกับแบคทีเรียฉวยโอกาสแกรมลบและแบคทีเรียที่ดื้อยา ได้แก่ *E. coli* ATCC25922 *P. mirabilis S. marcescens A. baumannii* ดื้อยา และพบข้อสังเกตุว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* ได้ดีในขณะที่ยาแอมพิซิลลินไม่สามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า 3-acetyl aleuritolic acid จากรากดีหมีสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และให้ผลการทดสอบทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ค่า MIC 63.7-127.5 ug/ml ซึ่งได้ผลดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบของต้นดีหมีที่สามารถต้านแบคทีเรีย *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ค่า MIC เท่ากับ 25.00 mg/mL และ 12.50 mg/mL (Sanseera et al., 2012) ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า 3-acetyl aleuritolic acid ก็คือ สารกลุ่มเดียวกับ Triterpenoids จึงอาจจะมีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์ DNA และการสังเคราะห์โมเลกุล ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย จึงมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ (Chung et al., 2011) งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า 3-acetyl aleuritolic acid ซึ่งเป็นสารกลุ่ม triterpenes เช่นกันกับสาร Triterpenoids ที่แยกได้จาก *Acacia ataxacantha* จึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Amoussa et al., 2016) แต่ 3-acetyl aleuritolic acid มีประสิทธิภาพต่ำกว่า เพราะให้ผลต้านอนุมูลอิสระไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์จากดีหมีร่วมกับการต้านแบคทีเรียอาจจะไปช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการต้านเชื้อเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสให้ดียิ่งขึ้น เพราะการลดปริมาณอนุมูลอิสระลงจะส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียทำงานได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Amoussa et al., 2016; Oskoueian et al., 2011; Dhama et al., 2014)

สาร 3-acetyl aleuritolic acid เสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบคือ *P. mirabilis* (ค่า FICI เท่ากับ 0.38 แสดงว่า มีการเสริมฤทธิ์กัน) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang et al. (2016) ที่พบว่า สาร oleanolic acid (สารกลุ่ม pentacyclic

triterpeniod) มีผลเสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซลลินและเตตราซัยคลินในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus* และ *S. aureus* แต่ยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งอาจจะเป็นผลจากไปช่วยยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์โดยจับกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พันธะเปบไทด์ในชั้นเปบทิโดไกลแคน บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบทำให้การสร้างผนังเซลล์เกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์เซลล์แบคทีเรียอาจแตกได้ง่าย (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, 2533; Wagner & Merzenich, 2009) นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังเห็นผลเสริมฤทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid และยาแอมพิซลลินและเตตราซัยคลิน ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบนอกเหนือจากยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เพราะให้ผลการเสริมฤทธิ์เช่นเดียวกับ Wang et al. (2016) ที่ได้ศึกษาสาร Triterpenoids pentacyclic มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเมื่อใช้ร่วมกับแอมพิซิลินและเตตราซัยคลินต่อเชื้อ *Bacillus cereus* และ *S. aureus* และใกล้เคียงกับการศึกษาของ Chung et al. (2011) ที่ใช้ Pentacyclic triterpenoid ผสมกับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน เสริมฤทธิ์กัน เพราะ Triterpenoids อาจไปมีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอการสังเคราะห์ Macromolecular ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ยังพบข้อสังเกตุคือเมื่อผสม 3-acetyl aleuritolic acid กับยาเตตราซัยคลิน พบว่า สามารถเสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC25922 อาจจะเป็นเพราะสาร 3-acetyl aleuritolic acid มีกลไกในการยับยั้งแบคทีเรียคล้ายกัยเตตราซัยคลิน คือไปยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีน (Ettayebi et al., 2000) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hemaiswarya and Doble (2009) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ร่วมกันของ Eugenol จากกานพลู กับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน เพนนิซิลลิน ออกซาลิน เตตราซัยคลิน และแอมฟินิคอลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli P.vulguris และ P. aeruginosa* เพราะ Eugenol เสริมฤทธ์กับยาปฏิชีวนะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียเกิดความเสียหาย เพราะเสริมฤทธิ์ของยาแอมพิซิลลิน จึงมีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ และเสริมฤทธิ์กับเตตราซัยคลินจับกับไรโบโซมขัดขวางการสร้างโปรตีน (Wagner & Merzenich, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่า ยาปฏิชีวนะสองชนิดสามารถจะลดปริมาณการใช้ 3-acetyl aleuritolic acid ให้น้อยลงยิ่งขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าการผสมของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาอาจได้สารใหม่ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หรือเพิ่มการทำงานของ 3-acetyl aleuritolic acid ได้ดียิ่งขึ้น และงานวิจัยนี้ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบของ Wang (2016) สารกลุ่ม Triterpene สามารถเสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus, S. aureus*

จากการศึกษาฤทธิ์ของ 3-acetyl ale3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคที่เรียฉวยโอกาสสายพันธุ์ *P. mirabilis* และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *E. coli* ATCC25922 ต่อหน่วยเวลา พบว่า สารบริสุทธิ์สามารถช่วย

ยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินได้เล็กน้อย และสามารถส่งเสริมให้ยาแอมพิซิลลินเตตราซัยตลินให้ทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลักคือสารบริสุทธิ์เพิ่มการนำยาให้สามารถซึมเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียแกรมลบได้ดียิ่งขึ้น งานวิจัยนี้ทำให้ทราบการปรับลดความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่จะใช้รักษาการติดเชื้อให้น้อยลง ½ MIC ถึง ¼ MIC ของค่า MIC ของยาทั้งสองชนิดที่ใช้เพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wagner and Merzenich (2009) นอกจากการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแล้วงานวิจัยนี้ได้นำเสนอผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับงานวิจัยของ Amoussa et al. (2016) ที่พบว่า Betulinic acid-3-*trans*-caffeat ซึ่งเป็นกลุ่ม triterpenoids ที่แยกได้จากส่วนสกัดของ *Acacia ataxacantha* มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต้านออกซิเดชันได้ดีกว่า 3-acetyl aleuritolic acid จากดีหมี ดังนั้นจะเห็นได้ว่านอกจาก 3-acetyl aleuritolic acid จะมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และเสริมฤทธิ์การทำงานยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินแล้วยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของยาต้านจุลินทรีย์ เพราะจะช่วยลดอนุมูลอิสระที่ไปทำลายเนื้อเยื่ออักเสบระหว่างยาปฏิชีวนะออกฤทธิ์ (Dhama et al., 2014)

ดังนั้นผลการศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันในครั้งนี้จะช่วยเพิ่มการออกฤทธิ์และเพิ่มประสิทธิภาพของยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis* และ *E. coli* ATCC25922 และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งประโยชน์จากการวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปใช้เพื่อเป็นแนวในการแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียฉวยโอกาสและลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียอาจนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปของยารักษาโรค อาหารเสริมและเครื่องสำอาง หรือการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังชั่นของสูตรโครงสร้างบางส่วน อาจไปช่วยรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียดื้อยาและลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด นอกจากนี้ยังต้องนำไปศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในลำดับถัดไป

ข้อเสนอแนะ

1. ในการวิจัยครั้งต่อไปควรศึกษาสารประกอบทางเคมีของดีหมีให้ครอบคลุมมากขึ้นเพื่อเป็นประโยชน์ในการวิจัยครั้งต่อไป

2. ควรนำผลจากการทดลองไปศึกษาต่อถึงความเป็นพิษต่อมนุษย์เพื่อนำไปเป็นประโยชน์ในอนาคต

บรรณานุกรม

ก่องกานดา ชยามฤต. (2548). *พืชมีประโยชน์วงศ์เปล้า*. กรุงเทพฯ: ประชาชน.

จินตนา อาจสันเที๊ยะ. (2549). *จุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยาสำหรับพยาบาล* .กรุงเทพฯ: บางกอกบล็อก.

ชัยวัฒน์ ลิ้มลิขิตอักษร, สุริยนต์ โพธิบัณฑิต และสุพร พลพันธ์. (ม.ป.ป.). *โครงการศึกษาภูมิปัญญาการใช้ประโยชน์พืชพรรณของชาวกะหร่างบ้านโป่งลึก-บางกลอยอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน*. เข้าถึงได้จาก ortal.dnp.go.th/DNP/FileSystem/download?uuid=2d0de126-c182-4baf-bca3

นิตยา อินทราวัฒนา และมุฑิตา วนาภรณ์. (2558). โรคดื้อยาในโรงพยาบาลและสถานการณ์การดื้อยา. *วารสารการแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ*, *22*, 81-92.

นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์. (2552). การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus* และแนวทางการควบคุม. *สงขลานครินทร์เวชสาร, 27*(4), 348-358.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2544). *แบคทีเรียที่เกี่ยวกับโรค* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: Nobel print.

บุญเลี้ยง สุพิมพ์, ปิยะพงษ์ ชุมศรี และอรทัย ปานเพชร. (2559). สารสกัดเฮกเซนของกระชายดำเสริมฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ดื้อยาเมธิซิลลิน. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 12*(2), 57-67.

ภัทรชัย กีรติสิน. (2552). *ตำราแบคทีเรียการแพทย์* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: วี.เจ.พริ้นติ้ง.

วรัญญา เผือกฟัก, พันสรวง อุดมพุทธิเมฆากุล, วิลาศ พุ่มพิมล และณรงค์ นันทะเสน. (2558). การศึกษาทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งจากกิ่งของต้นฝ่ายน้ำ. ใน *การประชุมวิชาการ ระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย 2558* (หน้า 149-155). พิษณุโลก: สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.

สุธรรม อารีกุล. (2552). *องค์ความรู้เรื่องพืชป่าที่ใช้ประโยชน์ทางภาคเหนือของประเทศไทย เล่ม 1*. เชียงใหม่: มูลนิธิโครงการหลวง.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2552). *การจำแนกแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน: วงศ์เอนโทโรแบคทีเรียซีอี*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เอื้อมพร วีสมหมาย และปณิธาน แก้วดวงเทียน. (2552). *ไม้ป่ายืนต้นของไทย1* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ เอชเอ็น กรุ๊ป จำกัด.

Amoussa, A. M. O., Lagnika, L., Bourjot, M., Vonthron-Senecheau, C., & Sanni, A. (2016). Triterpenoids from Acacia ataxacantha DC: Antimicrobial and antioxidant activities. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine, 16*, 284.

Basma, A. A., Zakaria, Z., Latha, L. Y., & Sasidharan, S. (2011). Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta L. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 4*(5), 386-390.

Chaudhary, H. J., Zeb, A., Bano, A., Rasul, F., Munis, M. F. H., Fahad, S., & Naseem, W. (2011). Antimicrobial activities of *Sapium sebiferum L.* belonging to family Euphorbiaceae. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(24), 5916-5919.

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

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

Dhama, K., Tiwari, R., Chakraborty, S., Saminathan, M., Kumar, A., Karthik, K., Wani, M. Y., Amarpal, S. V., & Rahal, A. (2014). Evidence based antibacterial potentials of medicinal plants and herbs countering bacterial pathogens especially in the era of emerging resistance: an integrated update. *International Journal of Pharmacology*, *10*(1), 1-43.

Ettayebi, K. E., Yamani, J., & Rossi-Hassani, B. (2000). Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Let, 1*, 183-191.

Goins, M. (2017). *Minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) Evaluations as R&D tools.* Retrieved from https://www.qlaboratories.com

Hemaiswarya, S., & Doble M. (2009). Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine, 16*(11), 997-1005.

Kirbag, S., Erecevit, P., Zengin, F., & Guvenc, A. N. (2013). Antimicrobial Activities of Some *Euphorbia* Species. *Afr J Tradit Complement Altern Med, 10*(5), 305-310.

Mathabe, M. C., Hussein, A. A., Nikolova, R. V., Basson, A. E., Meyer, J. J. M., & Lall, N. (2008). Antibacterial activities and cytotoxicity of terpenoids isolated from *Spirostachys africana*. *Journal of Ethnopharmacology*, *116,* 194-197.

Naengchomnong, W., Pinho, P. M., Kijjoa, A., Sawangwong, P., Gonzalez, M. J., Silva, A. M. S., Eaton, G., & Herz, W. (2006). Clerodanes and other constituents of *Cleidion spiciflorum. Phytochemistry*, *67*, 1029-1033.

Noundou, X. S., Krause R. W. M., Vuuren, S. F. V., Ndinteh, T. D., & Olivier, D. K. (2016). Antibacterial effects of *Alchornea cordifolia* (Schumach. and Thonn.) Müll. Arg extracts and compounds on gastrointestinal, skin, respiratory andurinary tract pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, *179*, 76-82.

Padalia, H., & Chanda, S. (2015). Antimicrobial efficacy of different solvent extracts of *Tagetes erecta* L. flower, alone and in combination with antibiotics. *Applied Microbiology: Open Access, 1*(1), 1-10.

Patel, N. B., & Patel K. C. (2013). Antibacterial activity of *Euphorbia hirta* L.ethanomedicinal plant against gram negative UTI pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, *3*, 24-29.

Pereira, V., Dias, C., Vasconcelos, M. C., Rosa, E., & Saavedra, M. J. (2014). Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Industrial Crops and Products*, *52*, 1-7.

Pounikar, Y., Jain, P., Khurana, N., Patil, S., Omray, L. K., & Gajbhiye, A. (2013). Medicinal importance of *Euphorbia hirta* Linn. *Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP), 2*(3), 241-246.

Prabowo, W. C., Wirasutisna, K. R., & Insanu, M. (2013). Isolation and characterization of 3-acetyl aleuritolic acid and scopoletin from stem bark of *Aleurites moluccana* (L.) Willd. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *5*(3), 851-853.

Ragasa, C. Y., & Cornelio, K. B. (2013). Triterpenes form *Euphorbia hirta* and their cytotoxicity. *Chines Journal of Natural Medicines*, *11*(5), 528-533.

Sanseera, D., Niwatananun, W., Liawruangrath, B., Liawruangrath, S., & Baramee, A., & Pyne, S. G. (2012). Chemical composition and biological activities of the essential oil from leaves of *Cleidion javanicum* Bl. *Journal of Essential Oil Bearing Plants, 15*(2), 186-194.

Sedlarik, V., Galya, T., Sedlarikova, J., Valasek, P., & Saha, P. (2010). The effect of preparation temperature on the mechanical and antibacterial properties of poly (vinyl alcohol)/ silver nitrate films. *Polymer Degradation and Stability, 95*, 399-404.

Sevda, K., Pınar, E., Fikriye, Z., & Nilay, G. A. (2013). Antimicrobial Activities of Some *Euphorbia* Species. *Afr J Tradit Complement Altern Med, 10*(5), 305-309.

Viswanadh, G. S., Atchuta, R. P., Laatsch, H., & Maskey, R. (2006). Chemical constituents of the heartwood and barks of *Homonoia riparia. Journal of Tropical Medicinal Plants*, *7*(2), 267-273.

Wang, C. M., Chen, H. T., Wu, Z. Y., Jhan, Y. L., Shyu, C. L., & Chou, C. H. (2016). Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstonia scholaris*. *Molecules*, *21*, 1-11.

Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of Phytopharmaceuticals. *Phytomedicine, 16*(2-3), 97-110.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-1 จำนวนข้อมูลของแบคทีเรียและความเข้มข้นของการออกฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดออกแบบสถิติด้วยวิธีแผนแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Minitab version 17

	Value Label	**N**
ความเข้มข้น		
1	16	3
2	32	3
3	64	3
4	128	3
5	256	3
6	512	3
7	1024	3
8	2048	3
เชื้อแบคทีเรีย		
1	*E. coli* ATCC 25922	
2	*K. pneumoni*ae	
3	*A. baumannii* ดื้อยา	
4	*A. baumannii* ไม่ดื้อยา	
5	*S. marcescens*	
6	*P. aeruginosa* ไม่ดื้อยา	
7	*P. aeruginosa* ดื้อยา	
8	*s. aureus*	
9	*P. mirabilis*	
10	MRSA	

ตารางภาคผนวก ก-2 วิเคราะห์ความแปรปรวนของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด แบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Minitab version 17

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	P-Value
3-acetyl aleuritolic acid	1.909	5	.382	6.54	.000
เชื้อแบคทีเรีย	8.505	9	.945	16.18	.000
Error	2.628	45	.058		
Total	13.042	59			

a. R Squared = 79.58% (Adjusted R Squared = 73.58%)

ทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับอิทธิพลของ 3-acetyl aleuritolic acid ที่ใช้ทดสอบ

สมมติฐานที่ทดสอบ

H_0: สาร 3-acetyl aleuritolic acid ทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อการทดลอง

H_a: สาร 3-acetyl aleuritolic acid บางความเข้มข้นทำให้ผลการทดลองแตกต่างกัน

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ได้ค่า p-value = 0.000 ซึ่งน้อยกว่าที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงปฏิเสธสมมติฐานหลัก แสดงว่า มีสาร 3-acetyl aleuritolic acid บางความเข้มข้นยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ด้วยวิธี Tukey

3-acetyl aleuritolic acid	N	Subset (Mean)	
		1	2
1024	3	0.511^{A}	
2048	3	0.506^{A}	
512	3	0.474^{A}	
256	3	0.432^{A}	
128	3	0.335^{A}	
64	3		-0.000^{B}

* $^{A-B}$ เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

จากตารางแสดงผลการทดสอบเปรียบเทียบด้วยวิธี Tukey ให้ผลการวิเคราะห์ที่เหมือนกันโดยพบว่า 3-acetyl aleuritolic acid สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1024 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ก-4 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ด้วยวิธี Tukey

Bacteria	N	Subset (Mean)	
		1	2
P. mirabilis	6	0.771667^{A}	
S. marcescens	6	0.766667^{A}	
A. baumannii ดื้อยา	6	0.755000^{A}	
A. baumannii ไม่ดื้อยา	6	0.736667^{A}	
E. coli ATCC 25922	6	0.733333^{A}	
MRSA	6		0.000000^{B}
P. aeruginosa ไม่ดื้อยา	6		0.000000^{B}
s. aureus	6		-0.000000^{B}
P. aeruginosa ดื้อยา	6		-0.000000^{B}
K. pneumoniae	6		-0.000000^{B}

* $^{A-B}$ เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

จากตารางแสดงผลการทดสอบเปรียบเทียบด้วยวิธี Tukey ให้ผลการวิเคราะห์ที่เหมือนกันโดยพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ยับยั้งได้ดีที่สุด คือเชื้อ *P. mirabilis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ก-5 วิเคราะห์ความแปรปรวนของยาเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ออกแบบสถิติด้วยวิธีแผนแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Minitab version 17

Source	Type III Amp of Squares	df	Mean Square	F-Value	P-Value
ยาเตตราซัยคลิน	59.55	7	8.5066	40.18	.000
เชื้อแบคทีเรีย	32.41	9	3.6013	17.01	.000
Error	13.34	63	0.2117		
Total	105.30	79			

a. R Squared = 87.33% (Adjusted R Squared = 84.11%)

ทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับอิทธิพลของยาเตตราซัยคลินที่ใช้ทดสอบ

สมมติฐานที่ทดสอบ

H_0: ยาเตตราซัยคลินทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อการทดลอง

H_a: ยาเตตราซัยคลินบางความเข้มข้นทำให้ผลการทดลองแตกต่างกัน

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ได้ค่า p-value = 0.000 ซึ่งน้อยกว่าที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงปฏิเสธสมมติฐานหลัก แสดงว่ามียาเตตราซัยคลินบางความเข้มข้นยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ด้วยวิธี Tukey

เตตราซัยคลิน	N	Subset (Mean)				
		1	2	3	4	5
2048	10	2.596^{A}				
1024	10		2.370^{B}			
512	10			2.056^{C}		
256	10				1.780^{D}	
128	10				1.611^{D}	
64	10				1.398^{D}	
32	10					0.213^{E}
16	10					0.110^{E}

* $^{A-E}$ เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

จากตารางแสดงผลการทดสอบเปรียบเทียบด้วยวิธี Tukey ให้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันโดยพบว่า ยาเตตราซัยคลินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 2048 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ก-7 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ด้วยวิธี Tukey

Bacteria	N	Subset (Mean)			
		1	2	3	4
A. baumannii ดื้อยา	6	2.09625[A]			
E. coli ATCC 25922	6		2.03750[B]		
MRSA	6		1.99750[B]		
K. pneumoniae	6		1.97750[B]		
s. aureus	6		1.85375[B]		
A. baumannii ไม่ดื้อยา	6		1.68375[B]		
S. marcescens	6			137875[C]	
P. aeruginosa ไม่ดื้อยา	6			1.33875[C]	
P. mirabilis	6			0.80375[C]	
P. aeruginosa ดื้อยา	6				0.00000[D]

* [A - D] เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

จากตารางแสดงผลการทดสอบเปรียบเทียบด้วยวิธี Tukey ให้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน โดยพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ยับยั้งได้ดีที่สุด คือเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ก-8 วิเคราะห์ความแปรปรวนของยาแอมพิซิลลินความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ออกแบบสถิติด้วยวิธีแผนแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Minitab version 17

Source	Type III Amp of Squares	df	Mean Square	F-Value	P-Value
แอมพิซิลลิน	36.63	7	5.2326	13.45	.000
เชื้อแบคทีเรีย	54.84	9	6.0931	15.67	.000
Error	24.50	63	.3889		
Total	115.97	79			

a. R Squared = 78.87% (Adjusted R Squared = 73.51%)

ทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับอิทธิพลของยาแอมพิซิลลินที่ใช้ทดสอบ

สมมติฐานที่ทดสอบ

H_0: ยาแอมพิซิลลินทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อการทดลอง

H_a: ยาแอมพิซิลลินบางความเข้มข้นทำให้ผลการทดลองแตกต่างกัน

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ได้ค่า p-value = 0.000 ซึ่งน้อยกว่าที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงปฏิเสธสมมติฐานหลัก แสดงว่ามียาแอมพิซิลลินบางความเข้มข้นยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-9 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด ด้วยวิธี Tukey

แอมพิซิลลิน	N	Subset (Mean)	
		1	2
2048	10	1.979^{A}	
1024	10	1.797^{A}	
512	10	1.637^{A}	
256	10	1.391^{A}	
128	10	1.231^{A}	
64	10	1.131^{A}	
32	10		0.183^{B}
16	10		-0.000^{B}

* $^{A-B}$ เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

จากตารางแสดงผลการทดสอบเปรียบเทียบด้วยวิธี Tukey ให้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันโดยพบว่า ยาแอมพิซิลลินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 2048 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-10 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดด้วยวิธี Tukey

Bacteria	N	Subset (Mean)	
		1	2
s. aureus	6	2.20000^{A}	
MRSA	6	2.17125^{A}	
S. marcescens	6	1.73125^{A}	
P. mirabilis	6	1.68375^{A}	
E. coli ATCC 25922	6	1.48000^{A}	
P. aeruginosa ไม่ดื้อยา	6	1.23125^{A}	
A. baumannii ไม่ดื้อยา	6	1.18375^{A}	
P. aeruginosa ดื้อยา	6		0.00000^{B}
K. pneumoniae	6		0.00000^{B}
A. baumannii ดื้อยา	6		-0.00000^{B}

* $^{A-B}$ เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

จากตารางแสดงผลการทดสอบเปรียบเทียบด้วยวิธี Tukey ให้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันโดยพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ยับยั้งได้ดีที่สุด คือเชื้อ *s. aureus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาคผนวก ข

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา (Time-kill curve assay)

ตารางภาคผนวก ข-1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมในการยับยั้งการเจริญของ *E.coli* ATCC25922 ต่อหน่วยเวลา (Ttime-kill curve assay) ณ จุดเวลาที่ดีที่สุดของการยับยั้ง

ชั่วโมง	ร้อยละจำนวนโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้น			
	3-acetyl aleuritolic acid	**เตตราซันคลิน**	**3-acetyl aleuritolic acid + เตตราซันคลิน**	**น้ำ**
0	0.96 ± 0.00	2.49±0.75	1.43± 0.33	0.00±0.00
2	5.93 ±1.33	0.28±0.16	0.93± 0.19	0.00±0.00
4	2.91±0.08	0.43±0.09	10.93± 0.13	0.00±0.00
6	1.22±0.14	1.72±1.18	3.07± 0.64	0.00±0.00
8	0.43±0.40	0.39±0.00	3.34 ±0.12	0.00±0.00
10	0.70±0.00	0.07±0.00	0.63± 0.20	0.00±0.00
12	1.07±0.07	1.24±0.66	1.72 ±0.04	0.00±0.00
24	0.39±0.05	0.96±0.16	0.67± 0.17	0.00±0.00
48	2.56±0.19	3.76±1.56	1.96± 0.27	0.00±0.00

หมายเหตุ * หมายถึง ค่า EAA ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ณ จุดเวลาที่ฆ่าเชื้อได้มากที่สุด

ตารางภาคผนวก ข-2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมในการยับยั้งการเจริญของ *P.mirabilis* (Time-kill curve assay) ต่อหน่วยเวลา ณ จุดเวลาที่ดีที่สุดของการยับยั้ง

ชั่วโมง	ร้อยละจำนวนโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้น			
	3-acetyl aleuritolic acid	**แอมพิซิลลิน**	**3-acetyl aleuritolic acid + แอมพิซิลลิน**	**น้ำ**
0	1.52±0.00	0.52 ±0.00	2.13 ±0.87	0.00±0.00
2	0.52±0.29	0.65± 0.25	0.12± 0.00	0.00±0.00
4	1.45±0.56	3.28 ±0.73	1.85 ±0.56	0.00±0.00
6	2.55±0.56	5.07 ±0.56	4.57 ±1.73	0.00±0.00
8	1.43 ±0.77	5.50 ±0.45	7.36± 2.11	0.00±0.00
10	1.25±0.52	3.09± 1.47	3.42 ±0.00	0.00±0.00
12	0.83±0.14	0.83± 0.14	4.98± 1.09	0.00±0.00
24	4.21± 0.59	4.67± 0.12	1.19 ±0.52	0.00±0.00
48	4.21 ±0.59	4.67± 0.12	1.19± 0.52	0.00±0.00

ภาคผนวก ค

สูตรอาหารและสารเคมี

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient broth (NB)

Nutrient broth (NB)	8	กรัม
น้ำ	1000	มิลลิลิตร

2. Nutrient agar (NA) + NaCl

Nutrient broth (NB)	8	กรัม
น้ำ	1000	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

3. Nutrient broth + NaCl

Nutrient broth (NB)	8	กรัม
น้ำ	1000	มิลลิลิตร
NaCl	20	กรัม

4. Nutrient agar (NA) + NaCl

Nutrient broth (NB)	8	กรัม
น้ำ	1000	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม
NaCl	20	กรัม

5. Mueller Hinton broth (MHB)

MHB	22	กรัม
น้ำ	1000	มิลลิลิตร

6. Mueller Hinton agar (MHA)

MHB	22	กรัม
น้ำ	1000	มิลลิลิตร
Agar	20	กรัม

การเตรียมสารละลาย (Stock solution)

1. วิธีเตรียม Master stock ของสารบริสุทธิ์

เตรียม Master stock ของ 3-acetyl aleuritolic acid ชั่ง 3-acetyl aleuritolic acid 0.34098 กรัม มีมวลโมเลกุล 498 กรัมต่อโมล เติมสารละลาย DMSO 20 มิลลิลิตร หยด Methanol 2 หยด เป็นตัวทำละลาย เตรียมความเข้มข้น 68,500 ไมโครโมลาร์ จากนั้นกรองโดยใช้กระดาษขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Pall corporation, U.S.A.) จากนั้นเตรียม stock solution ที่ความเข้มข้น 4096 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ Master stock ของ 3-acetyl aleuritolic acid 119.59 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 880.41 ไมโครลิตร และเจือจาง stock solution โดยใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ด้วยเทคนิค two-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้น 2048, 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

2. วิธีเตรียม Master stock ของยาปฏิชีวนะ

เตรียม Master stock ของแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (มวลโมเลกุลของแอมพิซิลลิน คือ 371.40 และเตตราซัยคลิน คือ 444.435) โดยชั่งยาแอมพิซิลลิน 0.3714 กรัม และเตตราซัยคลิน 0.4444 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เตรียมยาที่ระดับความเข้มข้น 4096 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ Master stock ของยา 40.96 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากให้ได้ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร จะได้ Stock ของยาที่ความเข้มข้น 4096 ไมโครโมลาร์ จากนั้นทำการเจือจางลดลงทีละ 2 เท่า ให้ได้สารละลายที่ความเข้มข้น 64 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

ภาคผนวก ง

เปลี่ยนหน่วยหน่วยไมโครโมลาร์ (μM) เป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μg/ml)
และข้อมูลเชื้อ *E. coli* ATCC 25922

สาร 3-acetyl aleuritolic acid

หน่วยไมโครโมลาร์	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µM	**µg/ml**
4096	2039.808
2048	1019.904
1024	509.952
512	254.976
256	127.488
128	63.744
64	31.872
32	15.936
16	7.968
8	3.984

ยาแอมพิซิลลิน

หน่วยไมโครโมลาร์	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µM	**µg/ml**
4096	1521.254
2048	760.6272
1024	380.3136
512	190.1568
256	95.0784
128	47.5392
64	23.7696
32	11.8848
16	5.9424
8	2.9712

ยาเตตราซัยคลิน

หน่วยไมโครโมลาร์	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µM	**µg/ml**
4096	1820.406
2048	910.2029
1024	455.1014
512	227.5507
256	113.7754
128	56.88768
64	28.44384
32	14.22192
16	7.11096
8	3.55548

ข้อมูลเบื้องต้น *E. coli* ATCC 25922

1. Medium 18: Trypticase Soy Agar/Broth
2. Growth Conditions

   Temperature: 37°C

   Atmosphere: Aerobic
3. คุณสมบัติทางชีวเคมี

   ผลเป็นบวกสำหรับการเคลื่อนไหว, แลคโตส, กลูโคส, ไซโลส และ ONPG
4. QR range (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

   Ampicillin = 2-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

   การทดสอบงานวิจัยนี้ให้ผลทดสอบเท่ากับ 11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

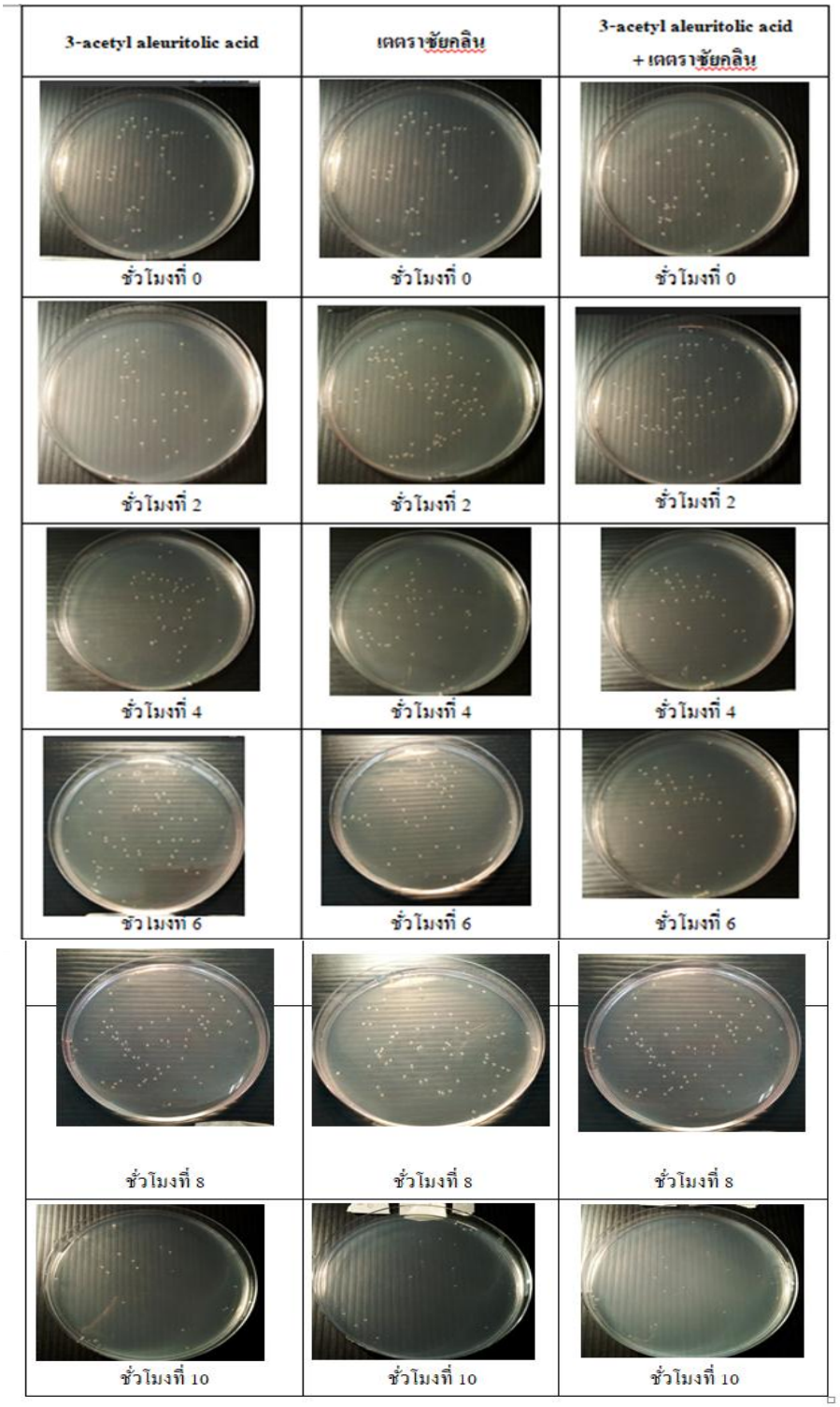
   Tetracycline = 0.25-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

   การทดสอบงานวิจัยนี้ให้ผลทดสอบเท่ากับ 7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

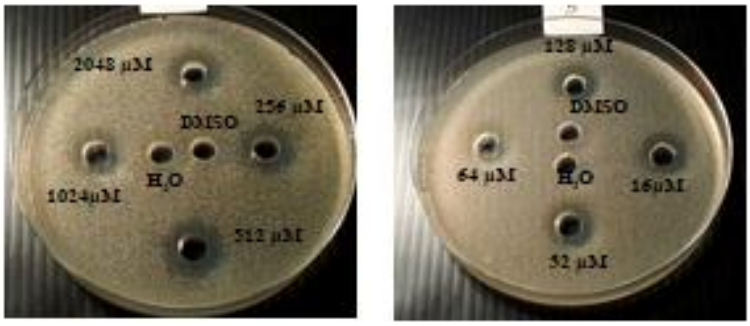
   ผลการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้คลาดเคลื่อนเล็กน้อย

ภาคผนวก จ

ภาพผลการทดลอง

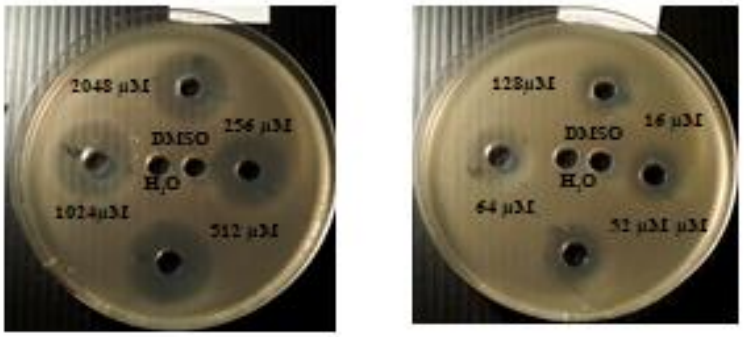


ภาพภาคผนวก จ-1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมในการยับยั้งการเจริญของ *E.coli* ATCC25922 ต่อหน่วยเวลา (Time-kill curve assay) ณ จุดเวลาที่ดีที่สุดของการยับยั้ง



A B

Inhibition zone ประสิทธิภาพร่วมของสารสกัดจากข้อคลีน (1024 µM) กับสารบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 (A คือความเข้มข้น 2048, 1024, 512 และ 256, B คือความเข้มข้น 128, 64, 32 และ 16 µM



A B

Inhibition zone ประสิทธิภาพร่วมของผลผลิตซิลิคลิน (1024 µM) กับสารบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อเชื้อ *P. mirabilis* (A คือความเข้มข้น 2048, 1024, 512 และ 256, B คือความเข้มข้น 128, 64, 32 และ 16 µM)

ภาพภาคผนวก จ-2 การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย