

สารสกัดเหกเซนของกระชายดำเสริมฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้ง เชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ดื้อยาเมธิซิลลิน

บุญเลี้ยง สุพิมพ์^{1*}, ปิยะพงษ์ ชุมศรี¹, อรทัย ปานเพชร¹

¹ สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย

* ติดต่อผู้พิมพ์ : สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย

อำเภอเมือง จังหวัดเลย 42000 โทร 086-8657541 โทรสาร 042-835238 e-mail: bunliang_sp@yahoo.com

บทคัดย่อ

สารสกัดเหกเซนของกระชายดำเสริมฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ดื้อยาเมธิซิลลิน
บุญเลี้ยง สุพิมพ์^{1*}, ปิยะพงษ์ ชุมศรี¹, อรทัย ปานเพชร¹

ว. เกษตรศาสตร์อีสาน 2559; 12(2) : 57-67

รับบทความ : 13 ตุลาคม 2558

ตอบรับ : 8 สิงหาคม 2559

สารสกัดจากเหง้ากระชายดำมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น เชื้อรา เชื้อยีสต์ และเชื้อแบคทีเรีย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเหกเซนของกระชายดำและยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) วัสดุและวิธีการทดลอง: ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA ของสารสกัดเหกเซนและยาปฏิชีวนะด้วยวิธี agar dilution และ ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA เมื่อใช้สารสกัดเหกเซนร่วมกับยาปฏิชีวนะด้วยวิธี checkerboard dilution โดยทำการทดลองในเชื้อ MRSA จำนวน 20 ไอโซเลต และวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีหาค่าความถี่ และคำนวณค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ ค่า Fractional inhibitory concentration index (FICI) ผลการศึกษาวิจัย: สารสกัดเหกเซนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA 10 ไอโซเลต ซึ่งมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 1000 – 2000 µg/ml ในขณะที่ยาเพนิซิลลินมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.125 – >256 µg/ml การศึกษาสรุปได้ว่าเชื้อทุกไอโซเลตดื้อยาเพนิซิลลิน ส่วนยาแวนโคมัยซิน มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.25 – 2 µg/ml สรุปได้ว่าเชื้อส่วนใหญ่ไวต่อยาแวนโคมัยซิน ยกเว้นเพียง 1 ไอโซเลต (MRSA 5 - 333) ที่ดื้อมีค่า MIC เท่ากับ 4 µg/ml การศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดเหกเซนกับยาแวนโคมัยซินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA พบว่า ให้ผลยับยั้ง MRSA แบบเสริมฤทธิ์กัน จำนวน 4 ไอโซเลต (ค่า FICI = 0.5) และไม่มีผลต่อฤทธิ์ของยาแวนโคมัยซิน ในเชื้อ 6 ไอโซเลต (ค่า FICI = 1) ส่วนการศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดเหกเซนกับยาเพนิซิลลิน พบว่า ให้ผลยับยั้ง MRSA แบบเสริมฤทธิ์กันทุกไอโซเลต (ค่า FICI ≤ 0.5) สรุปผลการวิจัย: สารสกัดเหกเซนของกระชายดำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA และเสริมฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ ดังนั้นผลการศึกษานี้สามารถนำไปสู่การพัฒนากลยุทธ์ในการนำสารจากธรรมชาติมาใช้ร่วมกันกับยาปฏิชีวนะสมัยใหม่เพื่อเพิ่มฤทธิ์ในการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA ต่อไป

คำสำคัญ: สารสกัดเหกเซน, กระชายดำ, *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ดื้อยาเมธิซิลลิน, ยาปฏิชีวนะ

Synergistic effect of hexane extract of *Kaempferia parviflora* on antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Bunliang Suphim^{1*}, Piyapong Choomseer¹, Orathai Panpetch¹

¹ Lecturer, Department of Public Health, Loei Rajabhat University, Muang District, Loei, 42000 Thailand

*Corresponding author: Tel: 086-8657541 Fax: 042-835238 e-mail: bunliang_sp@yahoo.com

Abstract

Synergistic effect of hexane extract of *Kaempferia parviflora* on antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Bunliang Suphim^{1*}, Piyapong Choomseer¹, Orathai Panpetch¹

IJPS, 2016; 12(2) : 57-67

Received : 13 October 2015

Accepted : 8 August 2016

The extracts from rhizome of *Kaempferia parviflora* have been found to possess antimicrobial activities such as antifungal and antibacterial activities. The study was aimed to investigate the antibacterial activity of the hexane extract and antibiotics against various methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Materials and Methods:** The antibacterial activity of hexane extract and antibiotics were assessed by agar dilution method. The combinations of hexane extract with antibiotics (penicillin and vancomycin) were assessed for antibacterial effect by checkerboard dilution method in 20 isolates of MRSA. The data were analyzed for minimum inhibitory concentration (MIC) and fractional inhibitory concentration index (FICI). **Results:** Our results showed that hexane extract inhibited 10 isolates of MRSA with MICs of 1,000 – 2,000 µg/ml. The MICs of penicillin against 20 isolates of MRSA ranged from 0.125 – >256 µg/ml, suggesting that all of isolates are resistant to penicillin. The MICs of vancomycin against 19 isolates of MRSA ranged from 0.25 – 2 µg/ml, indicating that most of the isolates are sensitive to vancomycin, except one isolate showing resistance to vancomycin (MRSA 5-333) with MIC of 4 µg/ml. The combinations of hexane extract with vancomycin showed synergistic effect against MRSA 4 isolates (FICI = 0.5) and no effect on 6 isolates of (FICI = 1). The combinations of hexane extract with penicillin showed synergistic effect to all MRSA isolates (FICI ≤ 0.5). **Conclusion:** Hexane extract of *K. parviflora* enhanced the activity of antibiotics against MRSA. The study provides a strategy in utilizing compounds from natural source in combination with modern antibiotic agents to enhance antibacterial activity in the treatment of MRSA infection.

Keywords: hexane extract, *Kaempferia parviflora*, methicillin-resistant *S. aureus*, antibiotic agents

บทนำ

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่อยู่ใน family Micrococcaceae ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ เชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อบนผิวหนัง กระดูก และกระแสเลือด ได้แก่ รุขุมขนอักเสบ ฝี หนอง การติดเชื้อหลังการผ่าตัด กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ สมอองอักเสบ ปอดบวม (Schito, 2006) นอกจากนี้เชื้อยังสามารถสร้างสารพิษที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน (Plata *et al.*, 2009) โดยจะตรวจพบ *S. aureus* ได้จากการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infections) และในชุมชนทั่วไป ปัจจุบันเชื้อ *S. aureus* มีอุบัติการณ์การดื้อยาเพิ่มมากขึ้น โดยตรวจพบ *S. aureus* สายพันธุ์ที่มีการดื้อยาครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2548 จากการตรวจแผล ติดเชื้อไฟไหม้จากผู้ป่วยในประเทศอังกฤษโดยพบว่าเชื้อดื้อยาซัลโฟนาไมด์ (sulphonamide) ได้ และเมื่อเปลี่ยนไปใช้ยาในกลุ่ม beta-lactam ได้แก่ เพนนิซิลลิน ต่อมาในปี พ.ศ. 2489 ได้ตรวจพบว่าเชื้อสามารถดื้อยาเพนนิซิลลินได้ร้อยละ 6 จากในโรงพยาบาลของประเทศอังกฤษ และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 50 ในปี พ.ศ. 2491 (Barber and Rozwadowska-Dowzenko, 1948) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย ได้รวบรวมเชื้อตามแบบแผนความไวของเชื้อแบคทีเรียจากโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป จำนวนมากกว่า 30 แห่ง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 – 2548 ได้พบเชื้อ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) มีความชุกร้อยละ 35 ในปี พ.ศ. 2543 และความชุกค่อนข้างคงที่ในระหว่างร้อยละ 30 – 35 ในช่วง 5 ปี (Aswapokee, 2008; Ziglam and Nathwani, 2003) จากปัญหาการดื้อยาเพนนิซิลลินที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องได้พัฒนายาปฏิชีวนะใหม่หลายชนิดคือ เตตราซัยคลิน (tetracycline) อิริโทรมัยซิน (erythromycin) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) และสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) โดยในระยะแรกยาใหม่เหล่านี้สามารถใช้รักษาอาการติดเชื้ออย่างได้ผล แต่ต่อมาพบว่าเชื้อเกิดการดื้อยาอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ได้มีรายงานการกลายพันธุ์จาก MRSA เป็นสายพันธุ์ใหม่ คือ vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA) และ vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA) เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาแวนโคมัยซิน ซึ่งแวนโคมัยซินเป็น ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ MRSA ที่มีความรุนแรงและยาปฏิชีวนะอื่นๆ ใช้รักษาไม่ได้ผล ดังนั้น MRSA, VISA และ VRSA จึงเป็นปัญหาโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่มีความสำคัญ (Siriwong and Chukeatirote, 2009)

กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) เป็นพืชวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งเป็นยาสมุนไพรในการรักษาอาการเจ็บป่วยต่างๆ (Sawasdee *et al.*, 2009) มีรายงานว่าสารสกัดจากกระชายดำมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Panthong *et al.*, 1989; Sae-wong *et al.*, 2009), ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Kummee *et al.*, 2008; Yenjai *et al.*, 2004; Yenjai *et al.*, 2007) รักษาแผลและยับยั้งการหลังกรดในกระเพาะอาหาร (Rujjanawate *et al.*, 2005), ฤทธิ์ต้านการแพ้ (Tewtrakul and Subhadhirasakul, 2007; Tewtrakul *et al.*, 2008), ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Kusirisin *et al.*, 2009) เป็นต้น ได้มีการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดกระชายดำในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดกระชายดำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น สารสกัดเอทานอลของกระชายดำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum* โดยให้ค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เท่ากับ 62.5, 125 and 250 mg/ml ตามลำดับ (Kummee *et al.*, 2008) สารสำคัญที่พบในสารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนของกระชายดำได้แก่ สาร 5,7,4'-trimethoxyflavone และ 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย โดยให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.7 และ 4.1 µg/ml เมื่อเทียบกับยามาตรฐานคลอโรควิน ส่วนสาร 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone และ 5,7,4'-trimethoxyflavone สามารถยับยั้ง *Candida albicans* โดยให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 39.71 และ 17.63 µg/mL เมื่อเทียบกับยามาตรฐาน แอมโฟเทอริซิน บี และนอกจากนี้สารทั้งสองชนิดยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Mycobacterium* ซึ่งให้ค่า MIC เท่ากับ 200 และ 50 µg/mL ตามลำดับ (Yenjai, 2004; Yenjai, 2007) ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงเน้นไปที่ผลของสารสกัดกระชายดำในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยาเมธิซิลลิน และฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดกระชายดำและยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยาเมธิซิลลิน

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

Nutrient agar (NM018, India) Mueller Hinton broth และ Mueller Hinton agar (Himedia, India) ยาปฏิชีวนะทั้งหมดได้จาก ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สมุนไพร

ใช้เหง้ากระชายดำที่มีสีม่วงเข้ม อายุ 8 – 9 เดือน เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนธันวาคม ถึง มกราคม จากอำเภอคำชะอี จังหวัดเลย

การเตรียมสารสกัดจากกระชายดำ

นำเหง้ากระชายดำสด ล้างให้สะอาด หั่นเป็นแว่น อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดให้ละเอียด จากนั้นชั่งกระชายดำแห้งที่บดละเอียด 1.63 กิโลกรัม แช่ในเอทเธอร์ ปริมาตร 8 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วกรองเอากากออกด้วยกระดาษกรอง นำส่วนใสเก็บไว้ ส่วนกากที่เหลือนำไปแช่ในเอทเธอร์ 8 ลิตรอีกเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วกรองเอากากออกด้วยกระดาษกรอง นำส่วนใสที่ได้ครั้งที่ 2 รวมกับครั้งที่ 1 แล้วนำไประเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator (BUCHI® Rotavapor R – 124)) ที่อุณหภูมิ 69 องศาเซลเซียส สำหรับระเหยตัวทำละลายเอทเธอร์ออกให้สารแห้งเก็บสารใส่ขวด แก้วสีชาปิดสนิท ปิดฉลากชื่อสมุนไพร วันที่เตรียม เก็บในตู้เย็น อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส วิธีการสกัดนี้ได้ปรับปรุงมาจาก Dowrote (Dowrote, 2010)

การควบคุมคุณภาพของสารสกัด

เพื่อควบคุมคุณภาพของสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทเธอร์ว่ามีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ในกลุ่มเดียวกันเสมอ จึงได้ตรวจสอบคุณภาพของสารสกัดโดยชั่งสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเอทเธอร์ 0.2 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลายเอทเธอร์ 3 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากันจนใสเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปเข้าเครื่อง UV-VIS Recording Spectrophotometer (SHIMADZU UV-1604) วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 – 800 นาโนเมตร (Chattiranan et al., 2013; Indranupakorn, 2004) วิธีการนี้เป็นการยืนยันว่าในการสกัดสารสกัดจากกระชายดำด้วยเอทเธอร์ จะได้สารกลุ่ม

เดิมเสมอ ผู้วิจัย จึงใช้วิธีการนี้ในการควบคุมการสกัดสารสกัดกระชายดำด้วยเอทเธอร์

เชื้อที่ใช้ทดสอบ

เชื้อที่ใช้ในการวิจัย คือ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จำนวน 20 ไอโซเลท โดยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจาก หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิธีเตรียมเชื้อสำหรับการทดลอง

ในการทดลองใช้เชื้อประมาณ 1×10^8 CFU/ml (0.5 McFarland) โดยเตรียมเชื้อตามวิธี direct colony suspension (Medical Technology Laboratory, 2008) มีวิธีการดังนี้ เพาะเชื้อ MRSA บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง เชื้อเชื้อ MRSA 4 – 5 โคโลนี ลงใน sterile 0.85% normal saline เขย่าให้เชื้อกระจายตัว วัดความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standards (1×10^8 CFU/ml) ถ้าความขุ่นของเชื้อไม่เท่ากับ 0.5 McFarland standards ให้เจือจางเชื้อโดยใช้ sterile 0.85% normal saline

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ เพนิซิลลิน และ แวนมัยซิน โดยวิธี agar dilution (Hausler et al., 1991)

โดยการเตรียม Mueller-Hinton agar (MHA) ผสมยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน หรือแวนโคมัยซิน โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของยา เพนิซิลลิน เท่ากับ 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, และ 0.125 µg/ml และ แวนโคมัยซิน เท่ากับ 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, และ 0.125 µg/ml ตามวิธีของ (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009) และเตรียม Control plate ซึ่งได้แก่ MHA ที่ไม่ผสมยาปฏิชีวนะ จากนั้นเพาะ เชื้อทดสอบแบบจุด (1×10^8 CFU/ml) ปริมาตร 10 µl (Thathaisong and Sangnual, 2011) จำนวน 5 จุดต่อจานเพาะเชื้อ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ นำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง อ่านผลความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด (MIC) ของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ)

การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารสกัดกระชายดำ โดยวิธี agar dilution (Hausler *et al.*, 1991)

โดยการเตรียม MHA ที่ผสมสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเฮกเซน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, และ 15.62 µg/ml (Kummee, 2008) และเตรียม Control plate ซึ่งประกอบด้วย Positive control plate (MHA ผสมเฮกเซน) และ Negative control plate (MHA ที่ไม่ผสมสารสกัดกระชายดำ) จากนั้นเพาะเชื้อทดสอบแบบจุด (1×10^8 CFU/ml) ปริมาตร 10 µl (Thathaisong and Sangnual, 2011) จำนวน 5 จุดต่อจานเพาะเชื้อ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ นำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง อ่านผลความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด (MIC) ของสารสกัดกระชายดำ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดกระชายดำรวมกับยาปฏิชีวนะโดยวิธี Checkerboard dilution (Climo *et al.*, 1999; Spoorthi *et al.*, 2011)

เจือจางความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน หรือ แวนโคมัยซิน ให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MIC 8 เท่า และเปิดยาปฏิชีวนะปริมาตร 100 µl ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB 1.7 มิลลิลิตร แล้วเติมสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเฮกเซนที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MIC 8 เท่า ความเข้มข้นละ 100 µl จากนั้นเติมเชื้อทดสอบ 100 µl ปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา (1×10^8 CFU/ml) 18 – 24 ชั่วโมง อ่านผลความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด (MIC) ของยาและสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเฮกเซนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ได้ และประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดในการเสริมฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ ด้วยดัชนีชี้วัดคือ fractional inhibitory concentration index (FICI)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ จำนวนและนำค่ามาคำนวณหาค่า MIC และประเมินประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำด้วยเฮกเซนและยาปฏิชีวนะด้วยดัชนีชี้วัดที่เรียกว่า fractional inhibitory concentration index (FICI) ดังสูตร

$$\begin{aligned} \text{FICI} &= \text{FICI A} + \text{FICI B} \\ &= [\text{A}]/\text{MIC (A)} + [\text{B}]/\text{MIC (B)} \end{aligned}$$

FICI A คือ ค่าดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นของสาร A ในการยับยั้งเชื้อ

FICI B คือ ค่าดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นของสาร B ในการยับยั้งเชื้อ

[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

การแปลผล

$\text{FICI} \leq 0.5$ = เสริมฤทธิ์กัน (synergism), $0.5 < \text{FICI} \leq 4.0$ = ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifference), $\text{FICI} > 4.0$ = ฤทธิ์ต้านกัน (antagonism) (Lorian, 2005)

ผลการศึกษาวิจัย

1. ค่า MIC ของสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเฮกเซนต่อการยับยั้งเชื้อ MRSA

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบกระชายดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA จำนวน 20 ไอโซเลท โดยวิธี agar dilution ใช้สารสกัดหยาบกระชายดำ ที่มีความเข้มข้น ตั้งแต่ 15.62 – 2,000 µg/ml ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดหยาบกระชายดำ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ได้ 10 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 5-456, 5-183, 5-163, 5-184, 5-254, 5-30, 5-490, 5-85, 5-104 และ 5-272 โดยให้ค่า MIC ระหว่าง 1,000 – 2,000 µg/ml (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า MIC ของสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเหกเซนและยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA

MRSA isolates	MIC (μg/ml)		
	Hexane extract	Penicillin*	Vancomycin**
5-456	1,000	0.25	0.25
5-183	1,000	16	1
5-163	1,000	16	0.25
5-184	2,000	0.25	0.5
5-254	2,000	0.25	0.25
5-30	2,000	0.25	0.5
5-490	2,000	>256	0.5
5-85	2,000	4	0.5
5-104	2,000	0.25	0.25
5-272	2,000	0.25	0.5
5-260	>2,000	>256	0.25
5-283	>2,000	0.25	0.25
5-151	>2,000	0.25	0.25
5-253	>2,000	>256	0.5
5-333	>2,000	>256	4
5-549	>2,000	0.5	0.5
5-328	>2,000	0.5	0.5
5-522	>2,000	4	2
5-489	>2,000	128	2
5-129	>2,000	>256	1

* European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) define susceptibility as ≤ 0.12 μg/ml (EUCAST, 2015)

** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) define susceptibility as ≤ 2 μg/ml (EUCAST, 2015)

2. ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้งเชื้อ MRSA

การศึกษาฤทธิ์ของยาแวนโคมัยซิน ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA จำนวน 20 ไอโซเลท โดยใช้วิธี agar dilution โดยใช้ยาแวนโคมัยซิน ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.125 – 256 μg/ml โดยเชื้อที่ไวต่อยาแวนโคมัยซิน ต้องมีค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 μg/ml (EUCAST, 2015) ผลการวิจัยพบว่า เชื้อ MRSA ส่วนใหญ่ไวต่อยาแวนโคมัยซิน ให้ค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.25 – 2 μg/ml โดยมีเพียง 1 ไอโซเลท ที่ดื้อต่อยาแวน

โคมัยซิน คือ MRSA 5-333 ให้ค่า MIC เท่ากับ 4 μg/ml (ตารางที่ 1)

การศึกษาฤทธิ์ของยาเพนิซิลลิน ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA จำนวน 20 ไอโซเลท โดยใช้วิธี agar dilution โดยใช้ยาเพนิซิลลิน ที่มีความเข้มข้น 0.125 – 256 μg/ml โดยเชื้อที่ไวต่อยาเพนิซิลลิน ต้องมีค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.12 μg/ml (EUCAST, 2015) ผลการวิจัยพบว่า เชื้อ MRSA ส่วนใหญ่ดื้อต่อยาเพนิซิลลิน ให้ค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.25 ถึง >256 μg/ml (ตารางที่ 1)

3.ฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเฮกเซนกับยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้งเชื้อ MRSA

การศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเฮกเซน โดยใช้วิธี Checkerboard dilution ใช้เชื้อทดสอบจำนวน 10 ไอโซเลท ที่ไวต่อสารสกัดเฮกเซน มาทดสอบร่วมกับยาปฏิชีวนะ ผลการศึกษาวินิจฉัยพบว่า สารสกัดเฮกเซนสามารถเสริมฤทธิ์ (synergism) ของยาแวนโคมัยซิน ในการยับยั้งการ

เจริญของเชื้อ MRSA จำนวน 4 ไอโซเลท (ค่า FICI = 0.5) ได้แก่ ไอโซเลท 5-183, 5-254, 5-30 และ 5-104 และไม่มีผลต่อฤทธิ์ของยาแวนโคมัยซิน ในเชื้อ 6 ไอโซเลท โดยไม่พบฤทธิ์ต้านกันระหว่างสารสกัดกระชายดำและยาแวนโคมัยซิน (ตารางที่ 2) ส่วนการทดสอบผลร่วมกับยาเพนิซิลลิน พบว่าสารสกัดกระชายดำ สามารถเสริมฤทธิ์ของยาเพนิซิลลิน ในเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลทได้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ค่า FICI ของยาแวนโคมัยซินเมื่อให้ร่วมกับสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเฮกเซนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA

MRSA strains	Agents	MIC (µg/ml)		FICI	Outcome
		Alone	Hexane extract + VAN		
5-456	Hexane extract	1,000	500	1	Indifference
	Vancomycin	0.25	0.125		
5-183	Hexane extract	1,000	250	0.5	Synergy
	Vancomycin	1	0.25		
5-163	Hexane extract	1,000	500	1	Indifference
	Vancomycin	0.25	0.125		
5-184	Hexane extract	2,000	1,000	1	Indifference
	Vancomycin	0.5	0.25		
5-254	Hexane extract	2,000	500	0.5	Synergy
	Vancomycin	0.25	0.0625		
5-30	Hexane extract	2,000	500	0.5	Indifference
	Vancomycin	0.5	0.125		
5-490	Hexane extract	2,000	1,000	1	Indifference
	Vancomycin	0.5	0.25		
5-85	Hexane extract	2,000	1,000	1	Indifference
	Vancomycin	0.5	0.25		
5-104	Hexane extract	2,000	1,000	0.5	Synergy
	Vancomycin	0.25	0.0625		
5-272	Hexane extract	2,000	1,000	1	Indifference
	Vancomycin	0.5	0.25		

FICI ≤ 0.5, synergy; FICI > 0.5 to 4.0, indifference; FICI > 4.0 antagonism (Lorian, 2005)

ตารางที่ 3 ค่า FICI ของยาเพนิซิลลินเมื่อให้ร่วมกับสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเหกเซนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA

MRSA strains	Agents	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		FICI	Outcome
		alone	Hexane extract + PEN		
5-456	Hexane extract	1,000	125	0.249	Synergy
	Penicillin	0.25	0.031		
5-183	Hexane extract	1,000	31.25	0.0625	Synergy
	Penicillin	16	0.5		
5-163	Hexane extract	1,000	15.62	0.031	Synergy
	Penicillin	16	0.25		
5-184	Hexane extract	2,000	125	0.125	Synergy
	Penicillin	0.25	0.156		
5-254	Hexane extract	2,000	250	0.249	Synergy
	Penicillin	0.25	0.031		
5-30	Hexane extract	2,000	62.50	0.047	Synergy
	Penicillin	0.25	0.0039		
5-490	Hexane extract	2,000	62.50	0.063	Synergy
	Penicillin	256	8		
5-85	Hexane extract	2,000	62.50	0.063	Synergy
	Penicillin	8	0.25		
5-104	Hexane extract	2,000	250	0.249	Synergy
	Penicillin	0.25	0.031		
5-272	Hexane extract	2,000	125	0.125	Synergy
	Penicillin	0.5	0.031		

FICI $\leq$ 0.5, synergy; FICI > 0.5 to 4.0, indifference; FICI > 4.0 antagonism (Lorian, 2005)

อภิปรายผลและสรุปผลวิจัย

ผลการทดสอบความไวของสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเหกเซนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA พบว่า สารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเหกเซนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ได้จำนวน 10 ไอโซเลท ให้ค่า MIC อยู่ระหว่าง 1,000 – 2,000 $\mu\text{g/ml}$ สอดคล้องกับการศึกษาของ Kummee *et al.* (2008) ได้ทดสอบความไวของสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคผิวหนังได้ 3 สปีชีส์ คือ *Trichophyton*

rubrum *T. mentagrophytes* และ *Microsporum gypseum* มีค่า MIC 62.5, 125 และ 250 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนี้สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 9 ชนิดที่สกัดได้จากกระชายดำเมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า 5,7,4'-trimethoxyflavone และ 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย คือ *Plasmodium falciparum* โดยให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.70 $\mu\text{g/ml}$ และ 4.06 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และ 3, 5, 7, 4'-tetramethoxyflavone และ 5, 7, 4'-

trimethoxyflavone สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 39.71 $\mu\text{g/ml}$ และ 17.63 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และพบว่า 3, 5, 7, 4'-tetramethoxyflavone และ 5, 7, 4'-trimethoxyflavone ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Mycobacterium* ได้เล็กน้อย โดยให้ค่า MIC 200 $\mu\text{g/ml}$ และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (Yenjai, 2004)

การศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเฮกเซนกับยาแวนคอมัยซิน และ เพนิซิลลิน พบว่าสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยเฮกเซนให้ผลเสริมฤทธิ์ยาแวนคอมัยซินต่อการยับยั้งเชื้อ MRSA จำนวน 4 ไอโซเลท และไม่มีผลต่อฤทธิ์ของยาแวนคอมัยซินในการยับยั้งเชื้อ MRSA จำนวน 6 ไอโซเลท โดยสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วย เฮกเซนสามารถเสริมฤทธิ์ของยาเพนิซิลลิน ต่อการยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ทุกไอโซเลท สอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ของเคอร์คูมินเป็นสารที่สกัดได้จากขมิ้น ซึ่งเป็นพืชตระกูลขิง (*Zingiberaceae*) เช่นเดียวกับกระชายดำในการเสริมฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้งเชื้อ MRSA โดยวิธี broth microdilution และ Checkerboard test ผลการศึกษาพบว่า เคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ให้ค่า MIC อยู่ระหว่าง 125 – 250 $\mu\text{g/ml}$ และเมื่อทดสอบฤทธิ์ของเคอร์คูมินร่วมกับยาปฏิชีวนะ ได้แก่ ยาออกซาลิซิลิน, แอมพิซิลลิน, ไซโปรฟลอกซาซิน และ นอร์ฟลอกซาซิน พบว่าเคอร์คูมินสามารถลดค่า MIC ของยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้งเชื้อ MRSA ต่อยาทั้ง 4 ชนิด (Mun *et al.*, 2013) และการศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดจากพืชสวนครัว เช่น ข่า และ กระชาย กับยาอะม็อกซิซิลิน ต่อการยับยั้งเชื้อ amoxicillin-resistant *Escherichia coli* (AREC) พบว่า ค่า MIC ของยาอะม็อกซิซิลิน และสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดจาก ข่า และกระชาย มีค่าอยู่ระหว่าง 500 ถึง >1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ร่วมกัน พบว่า สารฟลาโวนอยด์สามารถเสริมฤทธิ์ของยาอะม็อกซิซิลิน ต่อการยับยั้งเชื้อ AREC โดยออกฤทธิ์ทำลายโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ (Cytoplasmic membrane) โดยยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้ และยับยั้ง ribosome synthesis นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์ยังสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ penicillinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ทำลายโครงสร้าง beta-lactam ของยาปฏิชีวนะได้ ทำให้เชื้อ AREC ไวต่อยาอะม็อกซิซิลินเพิ่มมากขึ้น (Eumkeb *et al.*, 2012)

การศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการปรับเปลี่ยนความไวของเชื้อ *S. aureus* ต่อยาปฏิชีวนะ พบว่า

สารสกัดกระชายดำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยาเมธิซิลิน ได้ และเมื่อทดสอบร่วมกับยาปฏิชีวนะ ได้แก่ ยาแวนคอมัยซิน และเพนิซิลลิน พบว่าส่วนใหญ่มีฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์กัน ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้อาจสามารถนำไปสู่การพัฒนากลยุทธ์ ในการนำสารจากธรรมชาติมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้าน MRSA ในสารสกัดกระชายดำที่ผลิตเป็นการค้า เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำเอาสมุนไพรไปพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนสนับสนุนการวิจัยของบุคลากรมหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ประจำปี 2555 ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยและหน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* เพื่อใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้

References

- Aswapokee N. New Therapeutic Options for Resistant Gram-Positive Infections Siriraj Scientific Congress. Siriraj Hospital: 2008.
- Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* 1948; 2(6530): 641-644.
- Chattiranan S, Sabaijai W, Niyomthai S. Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of *Clerodendrum disparifolium* Leaves. *KKU Sci J* 2013; 41(3): 723 - 730.
- Climo MW, Patron RL, Archer GL. Combinations of vancomycin and beta-lactams are synergistic against staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7): 1747-1753.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved standard M2-A10. 10th ed. Wayne, PA.: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

- Dowrote N. The effects of *Kaempferia parviflora* and *Hibiscus sabdariffa* extracts on arterial blood pressure and renal functions in rats. [Master of Science in Physiology.]. Songkla: Prince of Songkla University; 2010.
- EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control as recommended by EUCAST, Version 5.0. [http://www.eucast.org](http://www.eucast.org;); 2015.
- Eumkeb G, Siri Wong S, Phitaktim S, Rojtinnakorn N, Sakdarat S. Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 2012; 112(1): 55-64.
- Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD. Manual of clinical microbiology. 10th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1991.
- Indranupakorn R. Identification, extraction and separation of active constituents of herb. Bangkok: chulalongkorn University; 2004.
- Kummee S, Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. Antimicrobial activity of the ethanol extract and compounds from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *Songklanakarin J Sci Technol* 2008; 30 (4): 463 - 466.
- Kusirisin W, Srichairatanakool S, Lerttrakarnnon P, et al. Antioxidative activity, polyphenolic content and anti-glycation effect of some Thai medicinal plants traditionally used in diabetic patients. *Med Chem* 2009; 5(2): 139-147.
- Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
- Medical Technology Laboratory. Direct colony suspension method (DCS). Thammasat University Hospital; 2008.
- Mun SH, Joung DK, Kim YS, et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine* 2013; 20(8-9): 714-718.
- Panthong A, Tassaneeyakul W, Kanjanapothi D, Tantiwachwuttikul P, Reutrakul V. Anti-inflammatory activity of 5,7-dimethoxyflavone. *Planta Med* 1989; 55(2): 133-136.
- Plata K, Rosato AE, Wegrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim Pol* 2009; 56(4): 597-612.
- Rujjanawate C, Kanjanapothi D, Amornlerdpison D, Pojanagaroon S. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *J Ethnopharmacol* 2005; 102(1): 120-122.
- Sae-wong C, Tansakul P, Tewtrakul S. Anti-inflammatory mechanism of *Kaempferia parviflora* in murine macrophage cells (RAW 264.7) and in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 2009; 124(3): 576-580.
- Sawasdee P, Sabphon C, Sitthiwongwanit D, Kokpol U. Anticholinesterase activity of 7-methoxyflavones isolated from *Kaempferia parviflora*. *Phytother Res* 2009; 23(12): 1792-1794.
- Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 Suppl 1(3-8).
- Sirikhansaeng P, Vichitphan K, Vichitphan S. The flavonoid content and antibacterial activity of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker in Krachai-Dum herbal wine. 13th International Biotechnology Symposium & Exhibition (IBS-2008) Dalian China Biotechnology for the Sustainability of Human Society 2008. p. S746
- Siriwong N, Chukeatirote E. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and controlling. *Songkla Med J* 2009; 27(4): 347 - 358.

- Spoorthi NJ, Vishwanatha T, Reena V, et al. Antibiotic synergy test: checkerboard method on multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International research journal of pharmacy* 2011; 2(12): 196 - 198.
- Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. Anti-allergic activity of some selected plants in the Zingiberaceae family. *J Ethnopharmacol* 2007; 109(3): 535-538.
- Tewtrakul S, Subhadhirasakul S, Kummee S. Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. *J Ethnopharmacol* 2008; 116(1): 191-193.
- Thathaisong U, Sangnual S. Synergistic Effect of Alpha-Mangostin and Gentamicin against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from King Narai Hospital. *Burapha Sci J* 2011; 16(2): 89 - 96.
- Yenjai C, Prasanphen K, Daodee S, Wongpanich V, Kittakoop P. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia* 2004; 75(1): 89-92.
- Yenjai C, Sutthanut K, Sripanidkulchai B, et al. Further studies of bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *KKU Sci J* 2007; 35(1): 37 - 41.
- Ziglam H, Nathwani D. New therapeutic agents for resistant Gram-positive infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2003; 1(4): 655-665.