

ฤทธิ์ต้านจุลชีพของส่วนสกัดของพืชไทยต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

กาวนา พนมเขต *, สุรศักดิ์ แว่นรัมย์, ธัญญการย์ ศรีวรรณาศ

บทคัดย่อ

B. pseudomallei เป็นเชื้อสาเหตุของโรคmelioidosis ปัจจุบันมีรายงานพบว่าเชื้อมีความไวต่อยาต้านจุลชีพลดลงโดยเฉพาะยา ceftazidime การศึกษาวิจัยถึงความเป็นไปได้ในพืชที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียยังเป็นที่น่าสนใจในอนาคต วัตถุประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้ เพื่อทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดหยาบของพืช 6 ชนิด ได้แก่ ไบกระโดน (*Barringtonia acutangula* (L.) Gaertn) ผักเสี้ยน (*Cleome gynandra* Linn.) บวบเหลี่ยม (*Luffa acutangula* (Linn.) Roxb.) ผักแขยง (*Limnophila geoffrayi* Bonati) บัวบก (*Centella asiatica* (L.) Urban) และชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb) ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ H1038, A2, G207, และที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยนำส่วนสกัดหยาบมาทดสอบด้วยวิธี standard disc diffusion assay และ broth dilution method โดยใช้ เมทานอล เอทิลอะซิเตทและน้ำเป็นตัวทำละลาย ส่วนสกัดหยาบเมทานอลของไบกระโดนแสดงฤทธิ์ต้านต่อเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ และมีค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration หรือ MIC) 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ส่วนสกัดหยาบจากพืชอื่น ๆ ไม่พบฤทธิ์ต้านต่อเชื้อ *B. pseudomallei*

คำสำคัญ: *B. pseudomallei* , ฤทธิ์ต้านต่อจุลชีพ, ส่วนสกัดพืช

วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
85 ถนนสถลมารค อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190
*ผู้รับผิดชอบบทความ



Antimicrobial activity of extracts of Thai plant to *Burkholderia pseudomallei*

Pawana Panomket *, Surasak Wanram, Thunyakarn Srivoramas

Abstract

Recent reports of a reduced susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*), the causative agent of melioidosis, to antibiotics, especially ceftazidime, have indicated a need for further research into the effective antimicrobial activity of plants. The aim of this study was to test the antimicrobial activity of 6 plant extracts, *Barringtonia acutangula* (L.) Gaertn, *Cleome gynandra* Linn., *Luffa acutangula* (Linn.) Roxb., *Limnophila geoffrayi* Bonati, *Centella asiatica* (L.) Urban, and *Piper sarmentosum* Roxb. to *B. pseudomallei* H1038, A2, G207, and from clinical specimen. Crude extracts were tested for their antimicrobial activity by the standard disc diffusion assay and broth dilution method. Methanol, ethyl acetate, and water were used as solvent for extraction. The methanolic extract of *Barringtonia acutangula* (L.) Gaertn showed the best antimicrobial results against 4 strains of *B. pseudomallei* with minimum inhibitory concentration (MIC) of 4 mg/ml. Other plant extracts did not have any antimicrobial effects on this organism.

Keywords: *B. pseudomallei*, Antimicrobial activity, Plant extract

College of Medicine and Public Health, Ubon-Ratchathani University
85 Sathollamark Rd. Warin Chamrap District, Ubon Ratchathani Province 34190, Thailand
*Corresponding author: (e-mail: panomketp@yahoo.com)

บทนำ

โรคเมลิออยโดสิสเป็นโรคที่พบได้บ่อยในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนเหนือของออสเตรเลีย สำหรับประเทศไทยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และพบเป็นสาเหตุการตายของโรคติดเชื้อที่มาจากชุมชนมากถึงร้อยละ 50^(1,2) เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งชื่อ *Burkholderia pseudomallei* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ พบได้ในดิน น้ำ ทำให้พบโรคนี้น่ามากในชาวนา สามารถก่อให้เกิดโรคโดยอาศัยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม เข้าสู่ร่างกายผ่านทางบาดแผล และการหายใจ ปัจจัยก่อความรุนแรงของเชื้อ *B. pseudomallei* มีความแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ เช่น quorum sensing, type III secretion system, capsular polysaccharide, และ flagella⁽³⁻⁵⁾ ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเชื้อก่อให้เกิดโรคได้ทั้งการตอบสนองที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) และการตอบสนองที่เกิดขึ้นภายหลัง (adaptive immunity) โดยสามารถก่อโรคในคนได้ทุกระบบ โดยมักเกิดเป็นฝีตามอวัยวะต่างๆ และมีอาการคล้ายกับหลายๆโรค ลักษณะอาการแสดงทางคลินิกของโรคมีหลายแบบ ตั้งแต่แบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน เรื้อรัง และไม่มีอาการแสดง⁽¹⁻²⁾ การวินิจฉัยโดยอาศัยอาการแสดงทางคลินิกของผู้ป่วยทำได้ยาก การซักประวัติผู้ป่วยที่มาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประกอบอาชีพชาวนา มีโรคประจำตัวบางอย่าง เช่น เบาหวาน ธาลัสซีเมีย จะต้องคิดถึงโรคนี้เสมอ ประกอบกับผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งทำได้โดยการเพาะเชื้อ ซึ่งถือเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ต้องรอผลการตรวจอย่างน้อย 2-3 วันจึงจะทราบผล ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยโรคให้รวดเร็วมากขึ้น เช่น indirect hemagglutination (IHA) อย่างไรก็ตามวิธีนี้เหมาะสำหรับใช้ตรวจในพื้นที่ที่ไม่ใช่แหล่งระบาด (non-endemic) เนื่องจากมีผลบวกปลอมมาก ในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาด (endemic) ใช้การตรวจด้วย latex agglutination⁽²⁾ โดยใช้ monoclonal antibody ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง การรักษาปัจจุบันยังใช้ยาต้านจุลชีพเป็นหลัก เชื้อ *B. pseudomallei* ก็มีรายงานดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น ยากลุ่มเซฟาโลสปอริน (cephalosporin) ตั้งแต่รุ่นหนึ่งถึงรุ่นสอง (first-second gen-

eration) ยากลุ่มแมโครไลด์ (macrolides) และยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside)⁽⁶⁾ ซึ่งยาที่นิยมใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสคือยา ceftazidime⁽⁷⁾ อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีรายงานการดื้อยาของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อยา ceftazidime มากขึ้น นอกจากนี้ ceftazidime ยังเป็นยาที่มีราคาแพงและผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่มีรายได้น้อย และการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานในการรักษากรณีที่ผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อเรื้อรัง อาจนำมาสู่การดื้อยาและต้องเปลี่ยนไปใช้ยากลุ่มอื่นทำให้มีค่ารักษาที่สูงขึ้น ปัจจุบันมีการศึกษาถึงฤทธิ์ของสมุนไพรและผักไทยที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียจำนวนมาก พบว่ามีสมุนไพรไทยและผักหลายชนิดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เช่น สารสกัดจากบัวบกที่สกัดด้วยเอทานอล น้ำร้อนและแอลกอฮอล์ มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* กระโดนเมื่อนำมาสกัดด้วยเมทานอล สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้เช่นกัน⁽⁸⁾ แต่อย่างไรก็ตามทั้งสมุนไพรและผักเหล่านี้ก็ยังไม่พบว่ามีการศึกษาในเชื้อ *B. pseudomallei* การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมุนไพรและผักพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. pseudomallei* ในหลอดทดลอง

วัสดุและวิธีการศึกษา

แบคทีเรีย

ใช้เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ H1038, A2 ซึ่งแยกได้จากเลือดผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดและมีภาวะช็อกกร่วมด้วยจากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์⁽⁹⁾ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ G207 ซึ่งแยกได้จากเสมหะ⁽⁹⁾ และ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากเลือดผู้ป่วยโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 1 ตัวอย่าง (isolate) ทุกสายพันธุ์ไวต่อยา ceftazidime

ตัวอย่างผักพื้นบ้านและสมุนไพร

ผักพื้นบ้านและสมุนไพรที่นำมาใช้ทดสอบฤทธิ์ต้าน *B. pseudomallei* ในครั้งนี้ เก็บเกี่ยวระหว่างเดือนเมษายน ถึงเดือน มิถุนายน 2553 จากเขตพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ดและขอนแก่น ดังแสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลเกี่ยวกับผักพื้นบ้านและสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อท้องถิ่น (Local name)	ชื่อทางวิทยาศาสตร์ (Scientific name)	วงศ์ (Family)	ส่วนที่ใช้
กระโดน	<i>Barringtonia acutangula</i> (L.) Gaertn	Barringtoniaceae	ใบ
ผักเสี้ยน	<i>Cleome gynandra</i> Linn.	Capparidaceae	ทั้งต้น
บวบเหลี่ยม	<i>Luffa acutangula</i> (Linn.) Roxb.	Cuphorbiaceae	ยอดอ่อนและผลสด
ผักแขยง	<i>Limnophila geoffrayi</i> Bonati	Scrophlariaceae	ทั้งต้น
บัวบก	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	Umbeliferae (Apiaceae)	ใบ
ชะพลู	<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	Piperraceae	ใบ

การสกัดส่วนสกัดหยาบ

เก็บตัวอย่างพืชมาอย่างละ 5 กิโลกรัม นำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น อบแห้งใน hot air oven (Contherm, Hutt City, New Zealand Contherm Scientific Ltd.) ที่อุณหภูมิประมาณ 60 °ซ จนพืชแห้งกรอบ ทำการบดให้ละเอียดเป็นผง จากนั้นนำผงพืชแห้งที่บดแล้ว มาสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ เอทิลอะซิเตท (Poole, England, VWR International Ltd.) และเมทานอล (Carlo Erba, Rodano, Carlo Erba Reagenti SpA) ด้วยการแช่เป็นเวลา 7 วัน และกวนทุก ๆ 8 ชั่วโมง โดยใช้ผงพืชแห้ง 250 g ต่อตัวทำละลาย 1,000 ml จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดไประเหยเอาตัวทำละลายออกจนแห้งโดยเครื่อง Rotary evaporator (EYALA, Japan, Sithiporn Associates Co., Ltd.) ซึ่งน้ำหนัก และเก็บในขวดสีชาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสำหรับผงพืชแห้งที่สกัดด้วยน้ำกลั่น สกัดโดยวิธีการต้มที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วกรองเอากากมาต้มซ้ำอีก 2 ครั้ง นำส่วนใสทั้ง 3 ครั้ง มารวมกัน และทำให้เป็นผงแห้ง ด้วยเครื่อง lyophilizer (Dura-stop μ P, United State, Science Engineer International. Co. Ltd.) ซึ่งน้ำหนัก และเก็บในขวดสีชาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

Disc diffusion assay ⁽¹⁰⁾

นำส่วนสกัดหยาบที่ได้ในรูปผงแห้ง และนำมาละลายด้วยตัวทำละลายเดิมให้ได้ ความเข้มข้น ดังนี้ ส่วนสกัดหยาบจากใบกระโดน ผลบวบเหลี่ยม และผักเสี้ยน 100 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตร, ผักแขยง ใบบัวบกและใบชะพลู 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยอดบวบเหลี่ยม 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกรองด้วย Millipore filter (Satorins, Minisart [®]) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร แล้วหยดส่วนสกัด 50 ไมโครลิตร โดย หยดครั้งละ 25 ไมโครลิตร ลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ปล่อยให้แห้ง ในตู้ปลอดเชื้อ (Dwyer Mark II, Michigan, DW Yer Instruments, Inc.) ประมาณ 10 นาทีและหยดอีก 25 ไมโครลิตร และปล่อยให้แห้ง 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ในตู้ปลอดเชื้อ โดยเตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง เตรียมเชื้อที่นำมาทดสอบโดยเลี้ยงใน Ashdown's agar และเลือก 1 โคโลนี เลี้ยงใน Trypticase soy broth (Criterion, Santa Maria, USA, Hardy Diagnostics) แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ตู้บ่มเพาะเชื้อ 37 °ซ 24 ชั่วโมง และเชยด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นเตรียมเชื้อให้เป็น mid-log phase โดยดูดเชื้อ 1 ml ลงใน TSB 50 ml และนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ 37°ซ และเชยด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อ และป้ายลงบนอาหาร Muller Hinton agar (Hardy Diagnostics) จากนั้นนำ paper disc ที่เตรียมไว้มาวาง จานละ 4 paper disc โดยใช้ตัวทำละลายเป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) และใช้ ceftazidime 30 μ g/disc (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK, Oxoid Ltd.) เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) นำไปบ่ม 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และอ่านผลทุก ๆ 24 ชั่วโมง โดยวัดขนาดบริเวณโซนใสรอบๆ paper disc (inhibition zone)

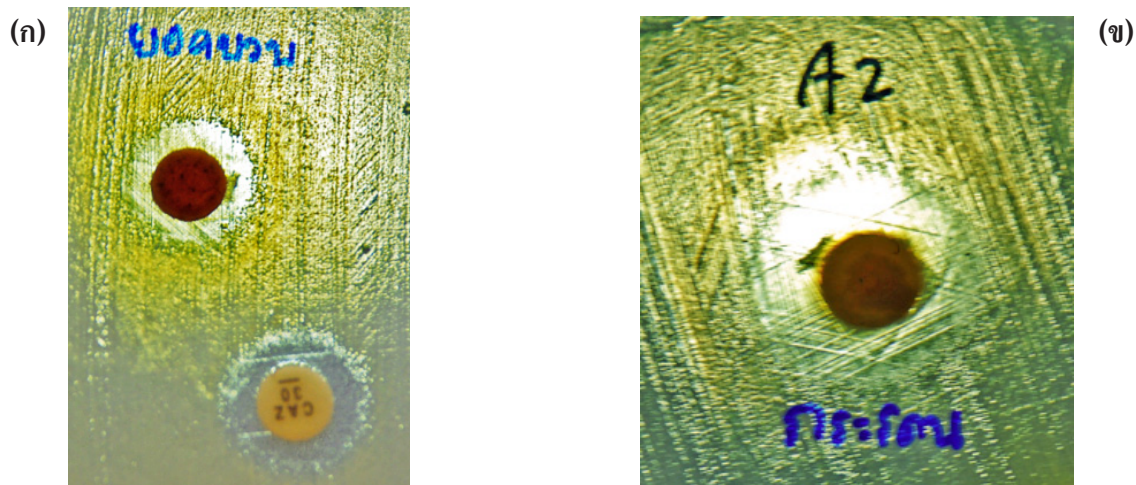
Broth dilution test

ส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพจากการทดสอบด้วย Disc diffusion assay ถูกนำมาทดสอบเพื่อหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC) โดยวิธี Broth dilution method ดังนี้ นำสารสกัดหยาบที่ได้ในรูปผงแห้งมาละลายด้วยตัวทำละลายเดิมให้ได้ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำ two-fold serial dilution โดยเจือจางใน Muller Hinton Broth (Hardy Diagnostics) เตรียมเชื้อที่นำมาทดสอบโดยเลี้ยงใน Ashdown's agar และเลือก 1 โคโลนี เลี้ยงใน Trypticase soy broth (Hardy Diagnostics) แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ตู้บ่มเพาะเชื้อ 37 °ซ 24 ชั่วโมง และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นเตรียมเชื้อให้เป็น mid-log phase โดยดูดเชื้อ 1 ml ลงใน TSB 50 ml และนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ 37 °ซ และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland No. 0.5 เติมน้ำลงในหลอดทดสอบหลอดละ 10 µl ให้มีเชื้อประมาณ 1×10^5 CFU/ml โดยมีหลอดควบคุมผลบวก เป็นหลอดที่มีเฉพาะ MHB และแบคทีเรีย และหลอดควบคุมที่มี MHB ตัวทำละลาย และแบคทีเรีย ส่วนหลอดควบคุมผลลบ ใช้ยา ceftazidime ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแบคทีเรีย นำไปบ่มเพาะ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตความขุ่นของเชื้อที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอดเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมผลบวก แล้วรายงานค่า MIC จากนั้นหาค่า MBC โดยนำหลอดที่ไม่มีความขุ่นของเชื้อมาดูดด้วยปิเปต ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดและเกลี่ย

ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Muller Hinton agar ด้วยแท่งแก้วอนำไปบ่มเพาะ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านค่า MBC ถ้าส่วนสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้จะไม่พบการเจริญของเชื้อ *B. pseudomallei* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว

ผลการศึกษา

ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้าน *B. pseudomallei* ของส่วนสกัดหยาบด้วยเมทานอล เอทิลอะซิเตท และน้ำ ของผักพื้นบ้าน 6 ชนิด ได้แก่ กระโดน ผักแว่น บวบเหลี่ยม ผักแขยง บัวบก และ สะพลู ผลการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion assay (รูปที่ 1) พบว่า ใบกระโดน และยอดบวบ ที่สกัดด้วยเมทานอลเท่านั้นที่พบฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. pseudomallei* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทำการทดสอบ (ตารางที่ 2) ในขณะที่ส่วนสกัดหยาบจากน้ำ และเอทิลอะซิเตท ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. pseudomallei* ส่วนผักแขยง ผักแว่น บัวบก และ สะพลู ในส่วนสกัดหยาบในเมทานอล เอทิลอะซิเตทและน้ำ ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. pseudomallei* นอกจากนี้ ตัวทำละลายคือเมทานอล เอทิลอะซิเตทและน้ำ ไม่มีผลต่อเชื้อเมื่อนำมาทดสอบหาค่า MIC พบว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์มีค่า MIC และ MBC ต่อส่วนสกัดหยาบจากกระโดนที่สกัดด้วยเมทานอล เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อทั้งหมดมีค่า MIC และ MBC ต่อส่วนสกัดหยาบของยอดบวบด้วยเมทานอล เท่ากับ 64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับ *B. pseudomallei* ทั้ง 4 สายพันธุ์ให้ค่า MIC และ MBC ต่อยา ceftazidime เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และหลอดควบคุมผลบวกที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อและเมทานอลพบเชื้อสามารถเจริญได้



รูปที่ 1 ผลการทดสอบ Disc diffusion assay ของ *B. pseudomallei* A2 กับสารสกัดจากเมทานอลของยอดบวบ (ก) และ กระโดน (ข)

ตารางที่ 2ฤทธิ์ต้านจุลชีพของส่วนสกัดหยาบจากเมทานอลของผักและสมุนไพร ทดสอบโดยวิธี Disc diffusion assay

วัสดุจากพืช	ความเข้มข้น (mg/disc)	สายพันธุ์ <i>B. pseudomallei</i> และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนที่ยับยั้ง (mm)			
		H1038	A2	G207	CS
กระโดน	5.0	15	18	16	18
ผักเสี้ยน	5.0	NC	NC	NC	NC
บวบเหลี่ยม (ยอด)	2.0	12	11	14	9
บวบเหลี่ยม (ผล)	5.0	8	7	6	7
ผักแขยง	2.5	NC	NC	NC	NC
บัวบก	2.5	NC	NC	NC	NC
ชะพลู	2.5	NC	NC	NC	NC
Ceftazidime	30 (μ g/disc)	17	13	16	16
เมทานอล	50 μ L	NC	NC	NC	NC

หมายเหตุ: NC = No clear zone, H1038 = *B. pseudomallei* สายพันธุ์ H1038, A2 = *B. pseudomallei* สายพันธุ์ A2, G207 = *B. pseudomallei* สายพันธุ์ G207, CS = *B. pseudomallei* จาก Clinical specimen

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

เนื่องจากปัจจุบันเริ่มมีการรายงานเชื้อดื้อยามากขึ้น โดยเฉพาะการดื้อต่อยา ceftazidime ของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องหาสารทดแทนยาปฏิชีวนะทางเลือกหนึ่งที่ดีและเป็นที่ยอมรับว่าปลอดภัย คือ การใช้ผักและสมุนไพรซึ่งหาได้ง่ายตามท้องถิ่นและเป็นการเพิ่มคุณค่าของผักและสมุนไพร การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำผักและสมุนไพรที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นมาสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตท เมทานอลและน้ำ มาทดสอบกับเชื้อ *B. pseudomallei* จากการศึกษาพบว่า ส่วนสกัดหยาบเมทานอลของกระโดนและยอดบวบ แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. pseudomallei* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทำการทดสอบ โดยพบว่า ส่วนสกัดหยาบของใบกระโดน ให้ผลการทดสอบต่อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี Disc diffusion assay ไม่แตกต่างจากยา ceftazidime ขนาด 30 µg/disc และทุกสายพันธุ์มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ยา ceftazidime มีค่า MIC และ MBC เพียง 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนยอดบวบ มีค่า MIC 64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของปจาร์ยี และคณะ ซึ่งพบว่าส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากใบกระโดน มีฤทธิ์ต้านต่อ *P. aeruginosa* โดยวัดขนาด inhibition zone ได้ 10.6 มิลลิเมตร และมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ พบว่าส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทของผักพื้นบ้าน เช่น กระโดน ผักเลี่ยน บวบเหลี่ยม และผักแขยง มีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, และ *Salmonella* serotype Typhimurium⁽⁸⁾ แต่การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ส่วนสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทและน้ำ ทั้งใบกระโดนและบวบ รวมทั้งส่วนสกัดหยาบ เมทานอล เอทิลอะซิเตท และน้ำ จากผักและสมุนไพรอื่นๆ เช่น ผักเลี่ยน ผักแขยง บัวบก และชะพลู ไม่พบฤทธิ์ต้าน *B. pseudomallei* ทุกสายพันธุ์ เช่นกัน

ถึงแม้ว่าความรุนแรงของเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้ง 4 สายพันธุ์จะมีความแตกต่างกัน⁽⁹⁾ แต่ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เชื้อทั้ง 4 ตัวอย่างไวต่อยา ceftazidime และให้ค่า MIC และ MBC เท่ากัน ในการศึกษาค้นคว้าต่อไปควรเลือกเชื้อที่ใช้ทดสอบที่มีความหลากหลายรวมถึงสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา ceftazidime ผลจากการศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นว่าเมทานอล สามารถสกัด

สารสำคัญซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ดีกว่า เอทิลอะซิเตทและน้ำ ทั้งนี้เนื่องจากเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วออกฤทธิ์ได้ดี เนื่องจากเป็นแอลกอฮอล์ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำละลายได้กว้างทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว และยังใช้ทำลายเอนไซม์ในพืชได้⁽¹¹⁾ และยังพบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายไม่มีขั้วจะมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีขั้ว⁽¹¹⁾ จากการศึกษาวิจัยแสดงให้เห็นว่าในใบกระโดนที่สกัดหยาบด้วยเมทานอล น่าจะมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านต่อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. serotype Typhimurium*⁽⁸⁾ และในการศึกษานี้พบว่ามีฤทธิ์ต้านต่อ *B. pseudomallei* อย่างไรก็ดีเนื่องจากเป็นการสกัดอย่างหยาบทำให้สารสกัดที่ได้เป็น crude extract ฤทธิ์ต้านต่อเชื้อ *B. pseudomallei* อาจเกิดจากปฏิกิริยาการเสริมฤทธิ์กันของสาร ดังนั้นควรทำการศึกษาเพื่อหาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อไป

ส่วนสกัดหยาบที่ได้จากยอดบวบ บัวบก ชะพลู และผักแขยงมีปริมาณน้อยทำให้ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบต่ำกว่า 5 mg/disc จึงอาจมีผลต่อการทดสอบ ดังนั้นควรทำการทดสอบซ้ำอีกครั้งโดยเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของส่วนสกัดหยาบ แต่อย่างไรก็ตามยา ceftazidime ที่ใช้ในการทดสอบ มีตัวยา 30 µg/disc ดังนั้นส่วนสกัดหยาบที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นตั้งแต่ 2,000 -5,000 µg/disc น่าจะมีปริมาณมากพอที่จะทำให้เห็นฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ในการสนับสนุนทุนวิจัย ประจำปี 2553 ศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิส คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่สนับสนุนอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Chawagul W, White NJ, Dance DA, Wattanagoon Y, Naigowit P, Davis TM, et al. Melioidosis: a major course of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. J Infect Dis 1989; 159: 890-9.

2. White NJ. Melioidosis. *Lancet* 2003; 361: 1715-22.
3. Ulrich RL, Deshazer D, Brueggemann EE, Hines HB, Oyston PC, Jeddloh JA. Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *J Med Microbiol* 2004; 53: 1053-64.
4. Warawa J, Woods DE. Type III secretion system cluster 3 is required for maximal virulence of *Burkholderia pseudomallei* in a hamster infection model. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 242: 101-8.
5. Brett PJ, Woods DE. Pathogenesis of and immunity to melioidosis. *Acta Trop* 2000; 74: 201-10.
6. Cheng AC, Currie BJ. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 383-416.
7. Chaowagul W. Recent advance in treatment of severe melioidosis. *Acta Trop* 2000; 74: 133-7.
8. Tongngok P, Kaenkum K. Antimicrobial activity of ortheastern medicinal plants in Thailand. *IJPS* 2005; 1: 40-6.
9. Taweechaisupapong S, Kaewpa C, Arunyanart C, Kanla P, Homchumpa P, Proungvitaya T, et al. Virulence of *Burkholderia pseudomallei* does not correlate with biofilm formation. *Microbial Pathog* 2005; 39: 77-85.
10. Jorgensen J, Turnidge J, Washington J. Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH., Es. *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. Washington DC: ASM Press, 1999; 1526-43.
11. นันทวัน บุญยะประกัศร. การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดพืช. ใน: วันดี กฤษณพันธ์ (ผู้รวบรวม); ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เล่มที่ 1, ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2536; 116-29.