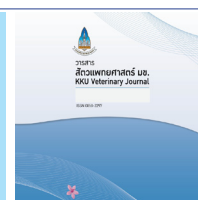




วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.

KKU Veterinary Journal

ISSN 0858-2297



RESEARCH ARTICLE

A study of antimicrobial activity of *Azadirachta indica* var. *siamensis* valetton leaf extract against pathogenic bacteria and yeasts

Arinee Chatchawanchonteera^{1*}, Geerasak Thiratanaboon¹, Tanakarn Nasri¹, Suwit Uopasai¹, Kochakorn Direksin¹, Prawit Butudom¹, Ranee Singh¹, Sarunporn Kraithong¹, Sirapob Phattararittgul¹, Suphachot Phikultipsakorn¹

¹Faculty of Veterinary Medicine, KhonKaen University, Thailand

*Corresponding author E-mail: arinee@kku.ac.th

Received 28 March 2020, Revised 24 June 2020 Accepted 31 July 2020, Published 5 October 2020

Abstract

Objective: To study antimicrobial activity and to determine the minimal bactericidal concentrations of *Azadirachta indica* var. *siamensis* valetton leaf extract against pathogenic bacteria and yeasts.

Materials and Methods: *Azadirachta indica* var. *siamensis* valetton leaf was collected and extracted by ethanol. Antimicrobial activities of the crude extract were tested using broth microdilution method with 5 replications against 25 samples of pathogenic bacteria which were isolated from animals and against 2 yeasts. The isolated bacteria were 4 Gram-positive bacteria: *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius* and 4 Gram-negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were also tested as the standard controls. The minimal bactericidal concentrations (MBC) of all bacteria and minimal fungicidal concentrations (MFC) of *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* were determined.

Results: The minimal bactericidal concentration (MBC) values of *Azadirachta indica* var. *siamensis* valetton leaf extract against *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *E. coli* and *Klebsiella* spp. were 7.81-31.25, 31.25-62.5, 31.25, 500, 125, 500, 1000, 250-1000 mg/ml respectively. For the yeasts, The minimal fungicidal concentration (MFC) values of *Azadirachta indica* var. *siamensis* valetton extracts against *C. neoformans* and *C. albicans* were 2000, 2000 mg/ml respectively.

Conclusion: Ethanol extract of *Azadirachta indica* var. *siamensis* valetton leaf had antibacterial activities against various types of pathogenic bacteria that were isolated from animals with different MBC values; and could also inhibit *C. neoformans* and *C. albicans* in vitro. In comparison, Gram positive bacteria group showed lower MBC values than Gram negative bacteria group.

Keywords: *Azadirachta indica* var. *siamensis* valetton, antimicrobial activity, animals, bacteria, yeast

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบสะเดา ในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรค

อารินี ชัชวาลชลธีระ^{1*}, จีระศักดิ์ ธีรธนบุรณ์¹, ธนากร นະศรี¹, สุวิทย์ อุปสัย¹, กชกร ดิเรกศิลป์¹, ประวิทย์ บุตรอุดม¹,
ราณี ชิงห์¹, ศรัณย์พร ไกรทอง¹, ศุภโชติ พิกุลทิพย์สาคร¹, สิริภพ ภัทรฤทธิกุล¹

¹คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

*ผู้ประพันธ์บรรณกิจ อีเมล: arinee@kku.ac.th

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์และฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากใบสะเดา รวมทั้งค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ของเชื้อแต่ละชนิด

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ เก็บตัวอย่างจากสัตว์ป่วย และนำมาเพาะแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค จากนั้นสกัดใบสะเดาด้วยเอทานอล แล้วนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อชนิดต่างๆ จำนวน 25 ตัวอย่างด้วยวิธี Broth microdilution method จากนั้นทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ที่สามารถฆ่าเชื้อของสารสกัดสะเดา (MBC, MFC) โดยเชื้อที่ใช้ทดสอบได้แก่เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด : *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *S. hyicus*, *Staphylococcus intermedius* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 4 ชนิด : *P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *E. coli*, *Klebsiella* spp. โดยมีเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 และยาเจนตามัยซินเป็นเชื้อและยาควบคุมมาตรฐาน และเชื้อราที่ใช้ศึกษาคือ *C. neoformans* และ *C. albicans* โดยมีคิโดโคนาโซลเป็นยาควบคุมมาตรฐาน

ผลการศึกษา ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากใบสะเดามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดจากใบสะเดาต่อเชื้อ *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *P. aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *E. coli* และ *Klebsiella* spp. มีค่าเท่ากับ 7.81-31.25, 31.25-62.5, 31.25, 500, 125, 500, 1000, 250-1000 มก./มล. ตามลำดับ และผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MFC) ต่อการฆ่าเชื้อราของสารสกัดจากใบสะเดาต่อเชื้อ *C. neoformans* และ *C. albicans* มีค่า 2000 และ 2000 มก./มล. ตามลำดับ

สรุป สารสกัดจากใบสะเดาซึ่งสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและต่อต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดในการทดลองนี้ ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์โดยมีค่า MBC ที่ต่างกัน และในการเปรียบเทียบกับฐานนิยม พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกมีค่าต่ำกว่ากลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากใบสะเดายังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้แก่ *C. neoformans* และ *C. albicans* ได้อีกด้วย สะเดาจึงนับเป็นสมุนไพรที่น่าจะได้รับการศึกษาต่อยอด เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์และสัตวแพทย์ในอนาคต

คำสำคัญ: สะเดา, ฤทธิ์ต้านจุลชีพ, สัตว์, แบคทีเรีย, ยีสต์

บทนำ

สะเดา (*Azadirachta indica* var. *siamensis* valetton) เป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่พบได้ในประเทศไทย จัดอยู่ในแฟมิลี Meliaceae เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ ที่ออกฤทธิ์ เช่น Azadirachtin, Nimbolin, Nimbin, Nimbidin, Nimbidol, Salannin และ Quercetin แต่ยังไม่พบการศึกษาในเรื่องกลไกการออกฤทธิ์ของโมเลกุลของสารสกัด (Mohammad, 2016) จากการศึกษาพบว่าสามารถนำสารสกัดจากใบสะเดามาใช้ประโยชน์ได้มากมายในการป้องกันและรักษาโรค อาทิ ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด ด้านพยาธิ ด้านการอักเสบ ด้านการเกิดแผลหลุมและบวมอักเสบ (Sara et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากใบสะเดามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิดทั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรีย โดยได้มีการศึกษาในต่างประเทศจำนวนมาก (Zhang et al., 2010; Zhong et al., 2010; Elavarasu et al., 2012; Kumar and Navaratnam, 2013) แต่ในประเทศไทยยังไม่พบการศึกษาที่ชัดเจนกับเชื้อก่อโรคเหล่านี้ในสัตว์ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์จำนวนหนึ่งว่ามีฤทธิ์ยับยั้งหรือไม่ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้หรือไม่ รวมทั้งทดสอบหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ในหลอดทดลอง

ในปัจจุบันเนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่แพร่หลายและใช้เกินความจำเป็นหรือไม่ถูกวิธี นับว่าเป็นอันตรายต่อสุขภาพของคนและสัตว์อย่างมาก ในการใช้ยาปฏิชีวนะนอกจากมีข้อจำกัดในด้านผลข้างเคียงของยาต่อตัวสัตว์แล้ว บางครั้งสัตว์อาจมีสภาวะทางร่างกายที่ไม่เหมาะสมกับการใช้ยา และในบางรายก็ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพ นอกจากนี้พบปัญหาการดื้อยาและการตกค้างของยาปฏิชีวนะในอาหาร เช่น เนื้อสัตว์และปลา เป็นต้น (สรวนีและคณะ, 2561; Nuangmeket et al., 2018; Boonmar et al., 2008) ซึ่งมีผลอันตรายต่อคนซึ่งบริโภคอาหารเหล่านี้ได้ ดังนั้นจึงมีความพยายามพัฒนาและคิดค้นยาชนิดใหม่ หรือการใช้สารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านที่มีประสิทธิภาพการรักษาในระดับเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน แต่มีความปลอดภัยต่อร่างกายมากขึ้น ซึ่งสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพและได้มีการศึกษามากมีหลายชนิด (Jiwakanon et al., 2003; Soikum et al., 2005; Noppon et al., 2005; Jantornsani et al., 2005; Butasri et al., 2005; Chatchawanchonteera et al., 2003; Chatchawanchonteera et al., 2008; Preeti et al., 2015) แต่ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อเชื้อก่อโรคเหล่านี้จากสัตว์ของสารสกัดจากใบสะเดายังไม่พบรายงานการศึกษาที่ชัดเจนในประเทศไทย และยังไม่ทราบ

ว่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์ในประเทศไทยกับต่างประเทศมีการตอบสนองที่เหมือนกันหรือแตกต่างกันหรือไม่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของใบสะเดา (*Azadirachta indica* var. *siamensis* valetton) ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ ได้แก่ *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *P. aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *E. coli* และ *Klebsiella* spp. โดยมีเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุมมาตรฐานในการทดลอง รวมทั้งฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อยีสต์ 2 ชนิด ได้แก่ *C. neoformans* และ *C. albicans*

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างและการเพาะแยกเชื้อ

เก็บตัวอย่างจากเคสที่ส่งตรวจทางคลินิก ได้แก่ ได้แก่ otitis ในสุนัข mastitis ในโคนม dermatitis ในสุกร โรคติดเชื้อ *Aeromonas* ในปลา เป็นต้น โดยนำมาเพาะแยกชนิดเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Conventional microbiological method (Carter et al, 1994) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ เริ่มจากการลงตัวอย่างบน Blood agar, McConkey agar อบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง จากนั้นแยกชนิดเชื้อจากลักษณะโคโลนี ลักษณะของเซลล์ การย้อมสีแกรม คุณสมบัติต่อ Oxidase test, Catalase test จากนั้นพิสูจน์ชนิดเชื้อด้วยการใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีอื่นๆ แล้วแต่นิดเชื้อเช่น CAMP test, 6.5% NaCl, Aesculin hydrolysis, Purple agar, O-F test, Coagulase test, Urease test, Indole, TSI, Citrate, Lysine decarboxylase, EMB agar เป็นต้น แล้วจึงอ่านผลอีกครั้งหลังจากอบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเชื้อที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอการทดสอบ

การเตรียมเชื้อ

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์แต่ละชนิดบน Blood agar จำนวน 25 ตัวอย่าง เป็น แบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius* และ แบคทีเรียแกรมลบ 4 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *E. coli* และ *Klebsiella* spp. นอกจากนี้ใช้เชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 เป็นเชื้อควบคุมมาตรฐาน บ่มเชื้อไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่เพาะได้ลงใน Mueller-Hinton Broth บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เตรียมสารละลายเชื้อ โดยให้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland นำเชื้อที่เตรียมได้มาเจือจางด้วยน้ำเกลือในอัตราส่วน 1:100 จะได้สารละลาย

แบคทีเรียและยีสต์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^6 CFU/ml เพื่อนำไปใช้ทดสอบหาค่า Minimal bactericidal concentrations (MBC) Minimal fungicidal concentrations (MFC) ต่อไป (NCCLS, 2000; Jiwakanon et al., 2003; Chatchawanchoteera et al., 2008)

สำหรับเชื้อยีสต์ มีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่ใช้ SDB แทน Mueller-Hinton Broth และ SDA แทน Standard plate count agar

การเตรียมสารสกัดจากใบสะเดา

แหล่งที่มาของสะเดา การเก็บตัวอย่างสมุนไพร เก็บที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น และนำส่วนของใบมาใช้ในการสกัด ซึ่งการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเภสัชพฤกษศาสตร์ใช้วิธีเก็บตัวอย่างพืชสด จำแนกชนิดของพืชตามวิธีทางพฤกษอนุกรมวิธาน โดยการสังเกตจากลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันทางมหภาค เช่น ลักษณะดอก ใบ ลำต้นที่แตกต่างกัน เป็นต้น

วิธีการเก็บใบของต้นสะเดาโดยเลือกเฉพาะใบที่มีความสมบูรณ์ นำไปล้างให้สะอาดและนำไปตากให้แห้ง จากนั้นนำไปที่ตากแห้งแล้ว เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำใบไม้ที่อบแห้งแล้วไปปั่นให้เป็นผงด้วยเครื่องปั่น จากนั้นชั่งผงใบสะเดา 50 กรัม สกัดด้วย 95% Ethanol 250 มิลลิลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยสกัดซ้ำ 2-3 ครั้ง และนำมากรองด้วยกระดาษกรองและทำให้เข้มข้นขึ้นโดยเครื่อง Rotary evaporator จากนั้นทำให้แห้งโดยการอบ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดจากใบสะเดาด้วยวิธี Broth microdilution method เพื่อหาค่า MIC, MBC ตามมาตรฐานของ NCCLS (NCCLS, 2000) โดยมีรายละเอียดดังนี้

ละลายสารสกัดจากใบของต้นสะเดาด้วยเอทานอล แล้วกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นเตรียมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 2000 มก./มล. ใน Mueller-Hinton Broth จนถึงความเข้มข้น 3.91 มก./มล. จากนั้นดูดสารสกัดจากใบสะเดา 50 μ l ลงในหลุมแรกของไมโครเพลทแล้วเจือจาง 2 เท่าตามลำดับจนถึงหลุมที่ 10 ส่วนหลุมที่ 11 และ 12 เป็นหลุมควบคุมผลบวกและลบ จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดหลุมละ 50 μ l นำไมโครเพลทไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล โดยเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดทำการทดสอบ 3-5 ซ้ำ มียาเจนตามัยซินเป็นยาควบคุมผล และเชื้อมาตรฐานเป็นเชื้อควบคุมทุกครั้งในการทดลอง รวมทั้งมีกลุ่มควบคุมสาร

สื่อประกอบการอ่านผลทุกครั้ง

สำหรับเชื้อยีสต์ วิธีเตรียมและวิธีทดสอบเช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่ใช้ SDB แทน Mueller-Hinton Broth ใช้ SDA แทน Standard plate count agar ใช้ยาซีโดโคนาโซลแทนเจนตามัยซิน และใช้เวลาในการทดสอบก่อนการอ่านผล 2-3 วัน

การอ่านผล

อ่านผลหลุมที่เชื้อไม่เจริญ บันทึกเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ (MIC) จากนั้นเพาะเชื้อบน Standard plate count agar จากหลุมที่เชื้อไม่เจริญ บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (MBC) โดยทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ซ้ำ และในการอ่านผลจะเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมก่อนทุกครั้ง

สำหรับเชื้อยีสต์ใช้เวลาในการทดสอบก่อนการอ่านผล 48-72 ชั่วโมงโดยมียาซีโดโคนาโซลเป็นยาควบคุมผลในการทดลอง บันทึกผลความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (MFC)

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) โดยใช้ฐานนิยม (mode)

ผลการศึกษา

ผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจากใบสะเดา (*Azadirachta indica* var. *siamensis* valetton) มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสัตว์ทุกชนิดในการทดลองนี้ โดยผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดจากใบสะเดาต่อเชื้อ *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *E. coli* และ *Klebsiella* spp. มีค่าเท่ากับ 7.81-31.25, 31.25-62.5, 31.25, 500, 125, 500, 1000, 250-1000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 1)

นอกจากนี้พบว่า สารสกัดจากใบสะเดา (*Azadirachta indica* var. *siamensis* valetton) มีฤทธิ์ต้านเชื้อราในการทดลองนี้ โดยผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดต่อการฆ่าเชื้อรา (MFC) ของสารสกัดจากใบสะเดาต่อเชื้อ *C. neoformans* และ *C. albicans* มีค่าเท่ากับ 2,000 และ 2,000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 2)

วิจารณ์

ในการทดลองนี้พบว่าสารสกัดหยาบใบสะเดาซึ่งสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสัตว์หลาย

Table 1. Minimal bactericidal concentrations (MBC) of *Azadirachta indica* var. *siamensis* valetton leaf extract against each pathogenic bacteria isolated from animals.

Bacteria	No. of isolates	MBC (mg/ml)
<i>Streptococcus</i> spp.	5	7.81-31.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	31.25-62.5
<i>Staphylococcus hyicus</i>	1	31.25
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	125
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	500
<i>E. coli</i>	1	1000
<i>Klebsiella</i> spp.	4	250-1000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1	62.5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	1000

Table 2. Minimal fungicidal concentrations (MFC) of *Azadirachta indica* var. *siamensis* valetton leaf extract against fungi.

Fungi	No. of isolates	MFC (mg/ml)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	2000
<i>Candida albicans</i>	1	2000

ชนิดทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius* และ แบคทีเรียแกรมลบ 4 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *E. coli* และ *Klebsiella* spp. ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Maleki et al. (2018) ที่พบว่าสารสกัดหยาบใบสะเดาซึ่งสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งที่เป็นเชื้อมาตรฐาน ได้แก่ *S. aureus* ATCC 6538, *E. faecalis* ATCC 1394, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 25922 และเชื้อตัวอย่างจากผู้ป่วย รวมทั้งการสกัดด้วยเมทานอลและเอธิลอะซีเตทก็ให้ผลเช่นกัน ต่างกันที่การทดลองนี้เป็นเชื้อที่แยกจากตัวอย่างจากสัตว์ป่วย

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) แต่ละชนิดของสารสกัดจากใบสะเดา เป็นดังนี้ *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *P. aeruginosa*, *A.*

hydrophila, *E. coli*, *Klebsiella* spp. มีค่าเท่ากับ 7.81-31.25, 31.25-62.5, 31.25, 500, 125, 500, 1000, 250-1000 มก. / มล. ตามลำดับ ดังนั้น สารสกัดจากใบสะเดาซึ่งสกัดด้วยเอทานอล 95 % พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่เป็นเชื้อที่ก่อโรคในสัตว์ รวมทั้งสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. neoformans* และ *C. albicans* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Shrivastava and Kshma, 2014) นอกจากนี้ในการเปรียบเทียบด้วยฐานนิยม พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกยกเว้น *S. intermedius* มีค่าน้อยกว่ากลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ โดยมีความแตกต่างกันค่อนข้างสูงระหว่างค่า MBC ของแบคทีเรียแกรมบวกกับแกรมลบ กรณีแบคทีเรียแกรมบวกมีความไวมากกว่าอาจเนื่องมาจากส่วนประกอบของชั้นไขมันของผนังเซลล์ซึ่งมีความแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้ความแตกต่างทางพิษเคมีของสารสมุนไพรก็มีความสำคัญ เนื่องจากส่วนประกอบในสมุนไพรประกอบด้วยสารหลายชนิด ทั้งชนิดมีขั้วและไม่มีขั้ว ส่ง

ผลให้ผลการทดลองมีความแตกต่างได้ ในการทดลองนี้พบว่า สารสกัดสะเดาซึ่งสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสัตว์หลายชนิด ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรีย แกรมบวก 4 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius* และ แบคทีเรีย แกรมลบ 4 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *E. coli* และ *Klebsiella* spp. เนื่องจากมีผู้ให้สมุนไพรรักษาในทางสัตวแพทย์ค่อนข้างแพร่หลาย ดังนั้น การทดลองนี้จึงเป็นการศึกษาเบื้องต้นของสมุนไพรรักษาเชื้อที่ก่อโรคสำคัญในสัตว์ว่ามีผลในการยับยั้งเชื้อหรือไม่และที่ความเข้มข้นสารเท่าใด ในรูปของสารสกัดหยาบ ไม่ได้แยกชนิดสารในสารสกัดหยาบให้เป็นสารบริสุทธิ์ ซึ่งในการแยกเป็นสารบริสุทธิ์ ต้องใช้งบวิจัยสูงมาก จึงควรเตรียมโครงการวิจัยเพื่อศึกษาแยกชนิดของสารบริสุทธิ์ในสะเดาและศึกษากลไกในลำดับต่อไป

นอกจากฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียหลายชนิดแล้ว สารสกัดจากใบสะเดายังมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส โดยในงานวิจัยหนึ่งพบว่าสารประกอบ Pectic arabinogalactan ในสารสกัดจากใบสะเดาซึ่งสกัดด้วยเอทานอล สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อยในเซลล์ไตเพาะเลี้ยงของหนูแฮมสเตอร์ (BHK-21) ได้ (Ishrat et al., 2016) งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งในหนูไม่พบว่ามีผลจากใบสะเดาที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษที่ 30-120 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเด็กไวรัสได้โดยหนูไม่พบไม่แสดงอาการทางคลินิกของเชื้อไวรัสออกมา (Parida et al., 2002) นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของใบสะเดา โดยพบว่าสารสกัดจากใบสะเดาซึ่งสกัดด้วยเมทานอลและเอทานอลสามารถสร้างโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aspergillus flavus*, *Alternaria solani* และ *Cladosporium* spp. ได้ โดยพบว่ายังมีความเข้มข้นมากก็ยังมีโซนยับยั้งมากขึ้น (Shrivastava and Kshma, 2014) นอกจากนี้สะเดายังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Jagadeesh et al., 2014) มีผล antioxidant effect และ anticarcinogenic activity (Kumar and Navaratnam, 2013)

สรุป

สะเดานอกจากมีฤทธิ์ไวรัส ต้านแบคทีเรีย ต้านปรสิต ต้านการอักเสบและมีฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ (Kumar and Navaratnam, 2013) ต้านเชื้อราสายหลายชนิด (Shrivastava and Kshma, 2014) แล้ว ในการทดลองนี้พบว่าสารสกัดจากใบสะเดาซึ่งสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสัตว์หลายชนิดทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius* และ แบคทีเรียแกรมลบ 4 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *E. coli* และ *Klebsiella* spp. โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้แก่ *C. neoformans* และ *C. albicans* ได้อีกด้วย

จะเห็นได้ว่า ใบสะเดาเป็นสมุนไพรรักษาที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้หลายชนิดทั้งเชื้อทางการแพทย์และสัตวแพทย์ และมีสรรพคุณในการรักษาโรคหลายโรค ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาขยายผลในการต้านจุลชีพ รวมทั้งการวิจัยเพิ่มเติมในประเด็นต่างๆ รวมถึงการเตรียมเป็นยาในรูปแบบต่างๆ และผลการใช้รักษาในคนและในสัตว์ เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำสมุนไพรรักษาสมุนไพรให้ประโยชน์ในอนาคตทั้งวงการแพทย์และสัตวแพทย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. จีรรัตน์ เขียมสะอาด คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยา พร้อมคำแนะนำในการใช้เครื่อง Rotary evaporator ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการในการทดลอง และคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Boonmar S, Markvichitr K, Chaunchom S, Chanda C, Bangtrakulnonth A, Pomrunangwong S, Yamamoto S, Suzuki D, Kozawa K, Kimura H, Morita Y. 2008. Salmonella prevalence in slaughtered buffaloes and pigs and antimicrobial susceptibility of isolates in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. J Vet Med Sci 70(12), 1345–1348.
- Buttasri A, Chatchawanchonteera A, Papirom P, Kampanawarawan W. 2005. Study of antibacterial property of garlic extract against *Aeromonas hydrophila* isolated from fish. KKU Vet J 15(1), 1-5.
- Chatchawanchonteera A, Trakranrungsie N, Ownthum R, Prapakorn L, Luangsie S. 2003. Garlic and onion: their inhibition effect on *Candida albicans*. KKU Vet J 13(2), 16-23.
- Chatchawanchonteera A, Wangboonskul J, Trongwanishnam K, Buttasri A, Borisutpeth P, Sriyamat M, Nampakdee N, Laohawat W. 2008. Antimicrobial activity of guava leaf and garlic extracts against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* spp. isolated from infected fish. KKU Vet J 18, 46-53.
- Elavarasu S, Abinaya P, Elanchezhian S, Thangakumaran VK, Naziya B. 2012. Evaluation of anti-plaque microbial activity of *Azadirachta indica* (neem oil) *in vitro*: A pilot study. J Pharm Bioallied Sci 4(Suppl 2), S394–396.

- Ishrat I, Imran A, Muhammad A, Aqeel J, Neelma M, Rasheeda B. 2016. In vitro evaluation of antiviral activity of leaf extracts of *Azadirachta indica*, *Moringa oleifera*, and *Morus alba* against the foot and mouth disease virus on BHK-21 cell line. *ScienceAsia* 42, 392–396.
- Jagadeesh K, Srinivas K, Shreenivas,PR. 2014. Anti inflammatory effect of *Azadirachta Indica* (Neem) in albino rats-an experimental study. *IOSR J Pharm.* 4(1), 34-38.
- Jiwakanon J, Papirom P, Worarach A, Jiwakanon N. 2003. An assessment of antimicrobial efficacy of garlic extract constituents against selected pathogenic bacteria in poultry and pigs. *KKU Vet J* 13(2), 24-37.
- Jantarasanit W, Angkititrakul S, Noimay P, Rattanaporn W. 2005. Effect of guajava Linn.leaf crude extract on inhibition of *Salmonella enteritidis* in native cross breed chicken. *KKU Vet J* 15(1), 41-46.
- Kumar VS, Navaratnam V. 2013. Neem (*Azadirachta indica*): Pre-history to contemporary medicinal uses to humankind. *Asian Pac J Trop Biomed* 3(7), 505–514.
- Maleki L, Sadeghian-Rizi T, Ghannadian M, Hossein Sanati M, Shafizadegan S, Sadeghi-Aliabadi H. 2018. Antibacterial activity of *Azadirachta indica* leaf extracts against some pathogenic standards and clinical bacterial isolates. *Avicenna J Clin Microb Infec* 5(1), e12987.
- Mohammad A. 2016. Therapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. *Evid Based Complementary Altern Med.* p. 1-11.
- Nuangmek A, Rojanasthien S, Chotinun S, Yamsakul P, Tadee P, Thamlikitkul V, Nattasit T, Patchanee P. 2018. Antimicrobial resistance in ESBL-producing *Escherichia coli* Isolated from layer and pig farms in Thailand. *Acta Sci Vet* 46, 1538.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved Standard- Fifth Edition. NCCLS document M7- A5 (ISBN 1-56238-394-9). NCCLS, 940 West Vally Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898, USA.
- Noppon B, Sangmaneedet S, Chanlun S. 2005. Effect of galangal powder mixed diets on lesion scores of caecal coccidiosis In broilers. *KKU Vet J* 15(1), 41-46.
- Parida M, Upadhyay C, Pandya G, Jana M. 2002. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. *J Ethnopharmacol* 79, 273-278.
- Preeti M, Mehta K, Manisha T, Shakkarpude J, Jain, 2015. A Evaluation efficacy of herbal preparations for the treatment of canine mange. *Sch J Agric Vet Sci* 2(4), 282-284.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing. Spain. 648p.
- Sara JB, Marelle GB, Gerrit MA, Joop VL. Arnold VH, Marcel D. 2004. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *J Ethnopharmacol* 94(1), 25–41.
- Shrivastava DK, Kshma S. 2014. Antifungal activity of leaf extract of neem (*Azadirachta Indica* Linn.) *Int J Curr Microbiol App Sci* 3(5), 305-308.
- Soikum C, Leungtongkum P, Rattanaporn W. 2005. The study of *Stemona Tuberosa* extracts for control the fly larvae. *KKU Vet J* 15(1), 47-53.
- Zhang YQ, Xu J, Yin ZQ, Jia RY, Lu Y, Yang F. 2010. Isolation and identification of the antibacterial active compound from petroleum ether extract of neem oil. *Fitoterapia* 81(7), 747–750.
- Zhong P, Yu Q, Zhong Y, Jiao X, Ren Y, Yang L. 2010. Antibacterial activity of 9-octadecanoic acid-hexadecanoic acid-tetrahydrofuran-3,4-diyl ester from neem oil. *Agr Sci China* 9(8), 1236–1240.