



วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.

KKU Veterinary Journal

ISSN 0858-2297



RESEARCH ARTICLE

A study of antimicrobial activity of *Oxystelma esculentum* R. Br. and *Paederia linearis* Hook. f. extracts against bacteria and yeasts

Arinee Chatchawanchonteera^{1*}, Jinda Wangboonskul², Peerapol Sukon¹, Weerapol Taweenan¹,
Chuchat Kamoller¹, Pimchanok Suwannathada¹, Prapan Kaenjumba¹, Serm Areesanit¹, Woraphanit Sonbanpai¹,
Areeya Pomcok¹, Supatsorn Panyaalert¹

¹Faculty of Veterinary Medicine, KhonKaen University, Thailand, 40002

²Faculty of Pharmacy, Thammasat University, Pathumthani, Thailand, 12120

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

Received 28 March 2020, Revised 24 June 2020 Accepted 3 August 2020, Published 15 October 2020

Abstract

Objective: To study antimicrobial activity of *Oxystelma esculentum* R. Br. and *Paederia linearis* Hook. f. extracts against bacteria and yeast, and determine their minimum inhibitory concentrations.

Materials and Methods: *Oxystelma esculentum* R. Br. and *Paederia linearis* Hook. f. were collected, dried and crushed into fine powdered. Then the powdered samples were extracted by 95% ethanol. After that, bacteria and yeast were isolated from animals and cultured on agar to test for the antimicrobial activity of *Oxystelma esculentum* R. Br. and *Paederia linearis* Hook. f. extracts against bacteria and yeasts by using broth microdilution method. Gentamicin and ketoconazole, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC25922 were also tested as controls.

Results: *Oxystelma esculentum* R. Br. showed highest antimicrobial activity against *S. aureus*, followed by *S. aureus* ATCC25923, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus hyicus*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* ATCC25922 with the minimal inhibitory concentrations (MICs) of 0.38, 6.07±68.32, 6.07±68.32, 9.63±50.33, 12.14±67.51, 17.14±66.45, 17.14±66.45, 34.30±60.01 and 48.50±51.44 µg/ml, respectively. From the result, *Oxystelma esculentum* R. Br., also exhibited higher antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* than *Candida albicans* with MICs of 6.06±12.25 and 34.29±17.15 µg/ml, respectively. For *Paederia linearis* Hook. f., it exhibited the highest antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC25923 and *S. aureus*; followed by *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. agalactiae*, *A. hydrophila*, *E. coli* ATCC25922, *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* with MICs of 0.88, 0.88, 1.05±0.45, 2.80±3.11, 8.90±15.84, 14.15, 28.31, 28.31, and 28.31 µg/ml, respectively. *Paederia linearis* Hook. f. also exhibited higher antifungal activity against *C. neoformans* than *C. albicans* with MICs of 22.46±24.52 and 35.66±53.59 µg/ml, respectively.

Conclusion: *Oxystelma esculentum* R. Br. and *Paederia linearis* Hook. f. could inhibit the growth of many types of bacteria, including *S. aureus*, *S. aureus* ATCC25923, *S. agalactiae*, *Klebsiella* spp, *S. hyicus*, *A. hydrophila*, *S. intermedius*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC25922 with various MIC values and could also inhibit the growth of fungi such as *C. albicans* and *C. neoformans*; and the antimicrobial activity between *Oxystelma esculentum* R. Br. and *Paederia linearis* Hook. f. were not statistically different ($p > 0.05$).

Keywords: Antibacterial activity, antifungal activity, *Oxystelma esculentum* R. Br., *Paederia linearis* Hook. f., Extract

การศึกษาผลการต้านจุลชีพของสารสกัดจากต้นกระพังโหม และต้นตดหมูตดหมาในการยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อยีสต์

อารินี ชัชวาลชลธีระ¹, จินดา หวังบุญสกุล², พิระพล สุขอ้วน¹, วีรพล ทวีนนท์¹, ชูชาติ กมลเลิศ¹, พิมพ์ชนก สุวรรณธาดา¹, ประพันธ์ แก่นจำปา¹, เสริม อาริสนิพ¹, วรพนิต สอนบ้านไผ่¹, อาริยา ปอมโคก¹, สุภัทสร ปัญญาเลิศ¹

¹คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

²คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

ผู้ประพันธ์บทความวิจัย อีเมล: arinee@kku.ac.th

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากต้นกระพังโหม และต้นตดหมูตดหมา ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา รวมถึงหาความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้

วัสดุ อุปกรณ์ และ วิธีการ นำต้นกระพังโหม และ ต้นตดหมูตดหมาที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียดแล้ว มาสกัดให้ได้สารสกัดจากต้นกระพังโหม และ ต้นตดหมูตดหมาด้วย 95% เอทานอล จากนั้นนำสารสกัดจากต้นกระพังโหมและต้นตดหมูตดหมามาใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสัตว์ป่วยและเชื้อยีสต์ ด้วยวิธี Broth microdilution method โดยมียาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน (Gentamicin), ยาต้านเชื้อราคีโตโคนาโซล (Ketoconazole) และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 เป็นยาและเชื้อควบคุมผลการทดลอง

ผลการศึกษา กระพังโหม (*Oxystelma esculentum* R. Br.) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *S. aureus* ATCC25923, *S. agalactiae*, *Klebsiella* spp., *S. hyicus*, *A. hydrophila*, *S. intermedius*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC25922 โดยมีค่าเฉลี่ย MIC คือ 0.38, 6.07±68.32, 6.07±68.32, 9.63±50.33, 12.14±67.51, 17.14±66.45, 17.14±66.45, 34.30±60.01, 48.50±51.44 มก./มล.ตามลำดับ และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารสกัดกระพังโหม พบว่า กระพังโหม (*Oxystelma esculentum* R. Br.) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. neoformans* ได้ดีกว่า *C. albicans* โดยมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อคือ 6.06±12.25 and 34.29±17.15 มก./มล. ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดตดหมูตดหมาพบว่าตดหมูตดหมา (*Paederia linearis* Hook. f.) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC25923 และ *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. agalactiae*, *A. hydrophila*, *E. coli* ATCC25922, *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* โดยมีค่าเฉลี่ย MIC คือ 0.88, 0.88, 1.05±0.45, 2.80±3.11, 8.90±15.84, 14.15, 28.31, 28.31, 28.31 มก./มล. และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารสกัดตดหมูตดหมา พบว่าตดหมูตดหมา มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. neoformans* ได้ดีกว่า *C. albicans* โดยมีค่าเฉลี่ย MIC คือ 22.46±24.52 and 35.66±53.59 มก./มล. ตามลำดับ

สรุป กระพังโหม (*Oxystelma esculentum* R. Br.) และตดหมูตดหมา (*Paederia linearis* Hook. f.) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Klebsiella* spp., *S. hyicus*, *A. hydrophila*, *S. intermedius*, *P. aeruginosa* โดยมีค่า MIC ต่างๆกัน และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้แก่ *C. albicans* และ *C. neoformans* ทั้งนี้พบว่า กระพังโหมและตดหมูตดหมามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่นำมาทดสอบไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย, ฤทธิ์ต้านเชื้อรา, ตดหมูตดหมา, กระพังโหม, สารสกัด

บทนำ

กระพังโหม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oxystelma esculentum* R. Br. จัดอยู่ในวงศ์ Asclepiadaceae เป็นพืชที่พบได้ในที่ราบ และ ที่ราบลุ่ม ชอบขึ้นตามดินทราย พืชขึ้นตามพุ่มไม้บริเวณใกล้แหล่งน้ำ พบได้ในประเทศอินเดียโดยเฉพาะทางตอนใต้ของอินเดีย (Savitha et al., 2015) ปากีสถาน ศรีลังกา พม่า อินโดนีเซีย รวมไปถึงประเทศจีน จากการศึกษาพบว่าสามารถนำสารสกัดจากต้นกระพังโหมมาใช้ประโยชน์ได้มากมายในการป้องกันและรักษาโรค อาทิ ด้านเนื้องอก (Durairaj et al., 2009) ด้านมะเร็ง ด้านอนุมูลอิสระ ขับปัสสาวะ ยาระบาย รักษาแผลหูดในกระเพาะอาหาร (Savitha et al., 2014; Pandya and Anand, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากต้นกระพังโหมมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยพบว่าสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อรา (Savitha et al., 2016) และจากงานวิจัยหนึ่งพบว่ากระพังโหมมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค ได้แก่ *E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumonia*, และมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่ก่อโรคเช่น *C. albicans*, *C. neoformans* (Pandya and Anand, 2011; Rekha, 2013) *Aspergillus niger*, *Mucor* sp. (Devi and Yogananth, 2016)

ตดหมุดตดหมา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Paederia linearis* Hook. f. อยู่ในวงศ์ Rubiaceae (Baanlaesuan, 2016) มีชื่ออื่นๆ เช่น ตดหมุดตดหมา (ภาคกลาง ตาก) ต่ายานตัวผู้ (นครราชสีมา) พังโหม (ภาคกลาง) ย่านพาโหม (ภาคใต้) หญ้าตดหมา (ภาคเหนือ) (Medthai, 2017) พบได้หลายจังหวัดในประเทศไทย เช่น นครสวรรค์ หนองคาย ขอนแก่น นครราชสีมา อุบลราชธานี ประจวบคีรีขันธ์ และพบทั่วไปในเขตภาคกลางในประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบในประเทศเพื่อนบ้านของไทย ได้แก่ พม่า ลาว กัมพูชา และเวียดนามจากการศึกษาพบว่าส่วนรากของต้นตดหมุดตดหมา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Pharita and Angkana, 2018) ด้านมะเร็ง (Sudta et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์แก้ปวด แก้อักเสบ แก้ท้องเสีย แก้ไอ และมีผลต้านเนื้องอก แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคในสัตว์นั้นยังไม่พบงานวิจัยที่สามารถยืนยันได้แน่ชัด แต่พบว่ามียุทธียับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ที่สร้างความเสียหายในพืชหลายชนิด (Yaowapa, 2011)

เนื่องจากกระพังโหมและตดหมุดตดหมา มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายคลึงกันมาก และการเรียกชื่อในแต่ละท้องถิ่นที่มีการเรียกตดหมุดตดหมาว่า พังโหม (บางท้องถิ่นภาคกลาง)

และย่านพาโหม (ภาคใต้) จึงอาจทำให้เกิดความสับสนและนำสมุนไพรทั้งสองชนิดมาใช้แทนกัน ซึ่งอาจทำให้สูตรตำรับยาสมุนไพรเกิดความผิดพลาดไปจากสูตรตำรับเดิม (Jinda et al., 2017) ทั้งนี้โรคต่างๆ ในคนและสัตว์ อาจเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา เป็นต้น โดยแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ ในสัตว์ อาทิ เชื้อ *Aeromonas* spp. ในปลา เชื้อ *Mycoplasma hyopneumoniae* ในสุกร เชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นหนึ่งในเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคเต้านมอักเสบในโค เป็นต้น นอกจากนี้ เชื้อรา อาทิ *C. neoformans* และ *C. albicans* ก่อโรคในคนและในสัตว์ด้วยเช่นกัน ซึ่งในการรักษาต้องใช้ยาปฏิชีวนะหลายตัวในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียและเชื้อรา แต่การใช้ยาปฏิชีวนะในปัจจุบันนั้นมีการใช้อย่างพร่ำเพรื่อและเกินความจำเป็นซึ่งผลไม่พึงประสงค์ที่ตามมานั้นมีมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลข้างเคียงและปัญหาการดื้อยา ดังนั้นการใช้พืชสมุนไพรในการต้านเชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ช่วยลดผลเสียจากการใช้ยาปฏิชีวนะ แต่เนื่องจากยังไม่พบงานวิจัยว่า ตดหมุดตดหมาและกระพังโหม สามารถมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางสัตวแพทย์ รวมทั้งผลต้านเชื้อราที่สำคัญในคนและสัตว์ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อของต้นกระพังโหมและต้นตดหมุดตดหมา ต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราว่าสามารถยับยั้งได้หรือไม่ รวมทั้งความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อได้ในหลอดทดลอง

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วิธีการทดสอบดัดแปลงจากวิธีของอารินีและคณะ (Arinee et al., 2010; Arinee et al., 2011) และ NCCLS (NCCLS, 2000)

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างและเพาะแยกเชื้อ

การเก็บตัวอย่างสมุนไพร เก็บส่วนของลำต้นและใบมาใช้ในการสกัด แหล่งที่เก็บ เก็บจากพื้นที่ ในเขต อ. เมือง จ. ขอนแก่น ได้แก่

ชื่อสมุนไพร แหล่งที่เก็บตัวอย่าง

ต้นกระพังโหม ถนนรอบเมืองขอนแก่น.เมืองเก่า จ.ขอนแก่น
หมู่บ้านโนนเรือง ตำบลบ้านค้อ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น
ถนนรอบเมือง หมู่บ้านหนองแสงโคกน้อยตำบลพระลับ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น
ถนนมะลิวัลย์ ตำบลบ้านเป็ด อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

ต้นตอหมู บริเวณสะพานขาว ภายในเขตมหาวิทยาลัย
ตดหมา ขอนแก่น

ถนนเลียบเมืองขอนแก่น ตำบลศิลา อำเภอเมือง
จังหวัดขอนแก่น

หมู่บ้านดอนบม หมู่ที่ 6 ตำบลเมืองเก่า อำเภอ
เมือง จังหวัด

หมู่บ้านโนนเรือง ตำบลบ้านค้อ อำเภอเมือง
จังหวัดขอนแก่น

ส่วนที่นำมาใช้ในการสกัด: ลำต้น และใบ

การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเภสัชพฤกษศาสตร์: การวินิจฉัย
เอกลักษณ์ของต้นกระพังโหม (*Oxystelma esculentum* R. Br.)
และต้นตอหมูตดหมา (*Paederia linearis* Hook. f.) จากองค์
ประกอบทางเคมี โดยใช้ HPLC แล้วพิจารณาจากรูปแบบของ
chromatograms ตรวจหาพีคที่มี retention time เดียวกัน ทั้งที่
ความยาวคลื่น 254 และ 320 นาโนเมตรแล้วยืนยันด้วยลักษณะ
ของ spectrum ประกอบกัน

การเก็บตัวอย่างและเพาะแยกเชื้อ

เก็บตัวอย่างจากเคสที่ส่งตรวจทางคลินิก ได้แก่ ได้แก่
otitis ในสุนัข, mastitis ในโคนม, dermatitis ในสุกร, โรคติดเชื้อ
Aeromonas ในปลา เป็นต้นนำมาเพาะแยกชนิดเชื้อแบคทีเรีย
โดยวิธี Conventional microbiological method (Carter et
al, 1994) โดยมีวิธีการดังนี้ เริ่มจากการลงตัวอย่างบน Blood
agar, McConkey agar อบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24-
48 ชั่วโมง จากนั้นแยกชนิดเชื้อจากลักษณะโคโลนีลักษณะของ
เซลล์ การย้อมสีแกรม คุณสมบัติ ต่อ Oxidase test, Catalase
test จากนั้นพิสูจน์ชนิดเชื้อด้วยการใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีอื่นๆ
แล้วแต่ชนิดเชื้อเช่น CAMP test, 6.5% NaCl, Aesculin hydro-
lysis, 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 องศาเซลเซียสเพื่อรอการ
ทดสอบ

การเตรียมสารสกัด

เก็บต้นกระพังโหมและต้นตอหมูตดหมา นำไปล้างให้
สะอาดและนำไปตากให้แห้ง แล้วนำไปเข้าตูบที่อุณหภูมิ 50
องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน นำต้นที่อบแห้งแล้วไปปั่นให้เป็นผง
ด้วยเครื่องปั่น นำผงจากต้นกระพังโหมและต้นตอหมูตดหมา มาส
กัดด้วย 95% ethanol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรอง
และนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จนได้สารสกัด

หยาบตามต้องการ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบ
ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

การเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบมาซึ่งน้ำหนักใส่ในหลอดทดลอง เดิม
ethyl alcohol ลงไปในหลอดทดลอง โดยสารสกัดหยาบ 1 กรัม
จะใช้ ethyl alcohol 3 มิลลิลิตร นำไปไว้ในตูบที่อุณหภูมิ 55
องศาเซลเซียส ประมาณ 5-10 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น
สารละลาย ดูดสารสกัด แล้วกรองด้วยหัวกรองขนาดรูกรอง 0.45
ไมโครเมตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่เพาะแยกได้ทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่
S. aureus, *S. aureus* ATCC 25923, *S. agalactiae*, *Klebsi-
ella* spp., *S. hyicus*, *A. hydrophila*, *S. intermedius*, *P. ae-
ruginosa*, *E. coli* ATCC 25922 ชนิดละ 1 ไร่เลทโดยเพาะบน
blood agar บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
นำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะได้ เพาะลงบน Mueller – Hinton broth
บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง เตรียมสารละลาย
เชื้อโดยปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland นำเชื้อที่เตรียม
ได้มาเจือจางด้วยน้ำเกลือในอัตราส่วน 1 : 100 จะได้สารละลาย
แบคทีเรียที่มีความเข้มข้น ประมาณ 1×10^6 CFU/ml

การเตรียมสารสกัดจากต้นกระพังโหมและต้นตอหมูตดหมา

ละลายสารสกัดจากต้นกระพังโหมและต้นตอหมูตด
หมา แล้วกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน ดูดสารสกัดจาก
ต้นกระพังโหมและต้นตอหมูตดหมา 50 ไมโครลิตร ลงในหลอด
แรกของไมโครเพลทแล้วเจือจางสองเท่าตามลำดับจนถึงหลอดที่
10 ส่วนหลอดที่ 11 และ 12 เป็นหลอดควบคุมผลบวกและผลลบ
เดิมเชื้อหลอดละ 50 ไมโครลิตร บ่มไมโครเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส
นาน 18-24 ชั่วโมงในการทดลองได้มีการทำการทดลองควบคุม
สารสื่อเทียบกับสารสื่อที่ไม่มีสารสมุนไพร พร้อมทั้งยาควบคุม
และเชื้อควบคุมประกอบไปด้วยทุกครั้ง ดังนั้น ก่อนการอ่านผลต้อง
ดูผลจากกลุ่มควบคุมก่อนทุกครั้ง

การอ่านผล

อ่านผลหลอดที่เชื้อไม่เจริญ บันทึกเป็นค่าความเข้มข้น
ต่ำสุดที่ยับยั้งได้ เพาะเชื้อบน standard plate count agar โดย
เริ่มจากหลอดที่ 1 จนถึงหลอดที่ 12 บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน
18-24 ชั่วโมง บันทึกผลของความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญ
บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ซ้ำ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

การเตรียมเชื้อรา

เตรียมเชื้อราที่เพาะบน Sabouraud dextrose agar อายุ 1 – 2 วัน ใน Sabouraud dextrose broth ให้ได้ความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน 0.5 McFarland นำเชื้อที่เตรียมได้มาเจือจางใน normal saline solution ในอัตราส่วน 1 : 100 จะได้สารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้น ประมาณ 1×10^6 CFU/ml

การเตรียมสารสกัดจากต้นกระพังโหมและต้นตดหมูตดหมา

ละลายสารสกัดจากต้นกระพังโหมและต้นตดหมูตดหมา แล้วกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน ดูดสารสกัดจากต้นกระพังโหมและต้นตดหมูตดหมา 50 ไมครอลิตร ลงในหลอดแรกของไมโครเพลทแล้วเจือจางสองเท่าตามลำดับจนถึงหลอดที่ 10 ส่วนหลอดที่ 11 และ 12 เป็นหลอดควบคุมผลบวกและผลลบ จากนั้นเติมเชื้อราหลอดละ 50 ไมครอลิตร ป่มไมโครเพลทที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง

การอ่านผล

อ่านผลหลอดที่เชื้อไม่เจริญ บันทึกเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งได้ จากนั้นเพาะเชื้อบน Sabouraud dextrose agar โดยเริ่มหลอดที่ 1 จนถึงหลอดที่ 12 ป่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 48-72 ชั่วโมง บันทึกผลของความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 2 - 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้สถิติแบบพรรณนา (Descriptive analysis) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อระหว่างกระพังโหมและตดหมูตดหมาด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Non parametric test โดยใช้ Mann-Whitney U test

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาพบว่าผลการต้านจุลชีพของสารสกัดจากกระพังโหมและตดหมูตดหมาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *S. hyicus*, *S. intermedius*, *Klebsiella* spp., *S. galactiae*, *P. aeruginosa*, *A. hydrophila* และ *S. aureus* และเชื้อรา 2 ชนิด ได้แก่ *C. albicans*, *C. neoformans* โดยมี *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 และเจเนตามัยซินเป็นเชื้อและยาควบคุมมาตรฐานในการทดสอบ

ผลการทดลองแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) ของสารสกัดจากกระพังโหมและตดหมูตดหมาต่อเชื้อแบคทีเรียต่างๆ และผลควบคุมของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 ต่อยาเจเนตามัยซินและ

สารสกัดกระพังโหมและตดหมูตดหมา ดังแสดงใน Table 1

และผลการทดลองแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย MIC และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (MFC) ของสารสกัดจากกระพังโหมและตดหมูตดหมาต่อเชื้อราต่างๆรวมถึงผลควบคุมของเชื้อ *C. neoformans* และ *C. albicans* ต่อยาคีโตโคนาโซล และสารสกัดกระพังโหมและตดหมูตดหมา ดังแสดงใน Table 2

ผลของการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากกระพังโหมและตดหมูตดหมา ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% โดยทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *S. hyicus*, *S. intermedius*, *Klebsiella* spp., *S. agalactiae*, *P. aeruginosa*, *A. hydrophila* และ *S. aureus* โดยมี *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุมมาตรฐานในการทดสอบและเชื้อรา 2 ชนิด ได้แก่ *C. albicans*, *C. neoformans* ด้วยวิธี Broth microdilution method โดยมียาปฏิชีวนะเจเนตามัยซินและยาต้านเชื้อราคีโตโคนาโซล เป็นยาควบคุมผลการทดลองทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดกระพังโหม โดยจากตารางที่ 1 พบว่ากระพังโหม (*Oxystelma esculentum* R. Br.) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *S. aureus* ATCC 25923, *S. agalactiae*, *Klebsiella* spp., *S. hyicus*, *A. hydrophila*, *S. intermedius*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC 25922 โดยมีค่าเฉลี่ย MIC คือ 0.38, 6.07 ± 68.32 , 6.07 ± 68.32 , 9.63 ± 50.33 , 12.14 ± 67.51 , 17.14 ± 66.45 , 17.14 ± 66.45 , 34.30 ± 60.01 , 48.50 ± 51.44 มก./มล.ตามลำดับ (Table 1) และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารสกัดกระพังโหม โดยจาก Table 2 พบว่ากระพังโหมมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. Neoformans* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *C. albicans* โดยมีค่าเฉลี่ย MIC คือ 6.06 ± 12.25 and 34.29 ± 17.15 มก./มล.ตามลำดับ (Table 2) เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดตดหมูตดหมา โดยจากตารางที่ 1 พบว่าตดหมูตดหมา มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ได้ดีที่สุด (Table 1) รองลงมาคือ *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. agalactiae*, *A. hydrophila*, *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* โดยมีค่าเฉลี่ย MIC คือ 0.88, 0.88, 1.05 ± 0.45 , 2.80 ± 3.11 , 8.90 ± 15.84 , 14.15, 28.31, 28.31, 28.31 มก./มล. (Table 1) และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารสกัดตดหมูตดหมา โดยจากตารางที่ 2 พบว่าตดหมูตดหมา มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. neoformans* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *C. albicans* โดยมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MIC คือ 22.46 ± 24.52 and 35.66 ± 53.59 มก./มล.ตามลำดับ (Table 2)

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of *Oxystelma esculentum* R. Br. extract and *Paederia linearis* Hook. f. extract against bacteria.

Bacteria	<i>Oxystelma esculentum</i> R. Br. Extract <i>Paederia linearis</i> Hook. f. Extract					
	Gentamicin					
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	0.49±0.23	0.98±1.48	6.07±68.32	34.29±60.02	0.88	5.01±2.04
<i>Staphylococcus hyicus</i>			12.14±67.51	97	1.05±0.45	1.77±1.35
<i>Staphylococcus intermedius</i>			17.14±66.45	24.25±64.30	2.80±3.11	10.01±5.00
<i>Staphylococcus aureus</i>			0.38	0.38	0.88	7.08
<i>Streptococcus agalactiae</i>			6.07±68.32	34.29±60.02	8.90±15.84	28.31
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.78	1.24±1.35	48.50±51.44	68.59±120.03	28.31	56.62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			34.30±60.01	48.50±51.44	28.31	35.67±16.34
<i>Aeromonas hydrophila</i>			17.14±66.45	24.25±64.30	14.15	14.15
<i>Klebsiella</i> spp.			9.63±50.33	68.59±34.29	28.31	56.62

Table 2. Minimal inhibition concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) values of *Oxystelma esculentum* R. Br. and *Paederia linearis* Hook. f. extract against yeasts.

Fungi	Ketoconazole		<i>Oxystelma esculentum</i> R. Br. Extract		<i>Paederia linearis</i> Hook. f. Extract	
	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)	MIC (mg/ml)	MFC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MFC (mg/ml)
<i>Candida albicans</i>	3.12±2.71	3.94±5.77	34.29±17.15	122.21±56.00	35.66±53.59	452.95
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1.86±2.50	7.43±3.13	6.06±12.25	61.11±28.00	22.46±24.52	113.23

วิจารณ์

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดจากต้นกระพังโหมและตดหมูตดหมา พบว่าสมุนไพรทั้งสองชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้หลายชนิด และพบว่าฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของกระพังโหมและตดหมูตดหมาไม่ต่างกัน ($P>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยฉบับหนึ่งที่ศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดจากใบกระพังโหมด้วยวิธี Disc diffusion method ที่พบว่าสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อรา (Savitha and Balamurugan, 2016) และสอดคล้องกับงานวิจัยอีกฉบับหนึ่งที่พบว่าสารสกัดจากต้นกระพังโหมสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านเชื้อราที่ก่อโรค (Devi and Yogananth, 2016) และจากผลการทดลองพบว่าตดหมูตดหมามีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. Neoformans* และ *C.albicans* ได้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่

พบว่าตดหมูตดหมามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา (Pharitaand Angkana, 2018) นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานถึงความเป็นพิษของสารสกัดดังกล่าว นับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้สมุนไพรแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้แต่เนื่องจากสารสกัดที่ได้มีปริมาณน้อยและจำนวนเชื้อแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบควรมีปริมาณมากขึ้นเพื่อสามารถนำมาวิเคราะห์ได้แม่นยำยิ่งขึ้น เพื่อประโยชน์ของข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้ให้ได้เต็มประสิทธิภาพต่อไป

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นของสมุนไพรต่อเชื้อที่ก่อโรคที่สำคัญในสัตว์ว่ามีผลในการยับยั้งเชื้อหรือไม่ และที่ความเข้มข้นสารเท่าใด ในรูปของ Crude extract ไม่ใช่สารบริสุทธิ์ ไม่ได้แยกชนิดสาร จึงยากที่จะอธิบายกลไกของสมุนไพร ซึ่งในการแยกเป็นสารบริสุทธิ์ ต้องใช้งบวิจัยสูง จึงไม่สามารถดำเนินการได้ ดังนั้นการศึกษาในลำดับต่อไป ควรแยกสารบริสุทธิ์ในสมุนไพรว่ามีกี่ชนิด ซึ่ง สมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้ประกอบด้วยสารทั้งชนิดมีขี้ผึ้งและไม่มีขี้ผึ้งแตกต่างกันจึงส่งผลให้ผลการทดลองมี

ความแตกต่างบ้าง อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ในทางสถิติ ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนกรณีแบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อสมุนไพรมากกว่าแกรมลบ อาจเนื่องมาจากส่วนประกอบของชั้นไขมันของผนังเซลล์ซึ่งมีความแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบ

สรุป

สมุนไพรไทยกระพังโหมและตดหมูตดหมาซึ่งสกัดโดยเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่ก่อโรคในสัตว์โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ของแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกระพังโหมกับตดหมูตดหมา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสมุนไพรไทยกระพังโหมและตดหมูตดหมาต่อเชื้อ *C. neoformans* และ *C. albicans* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในคนและสัตว์ด้วยเช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผศ.ดร.จรีรัตน์ เอี่ยมสะอาดคณะสัตวแพทยศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยา พร้อมคำแนะนำในการใช้เครื่อง Rotary evaporator ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการในการทดลอง และคณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Arinee C, Kamolchai T, Jeerasak T, Monchai D, Fanan S. 2010. Efficacy of Thai medicinal plants against *Candida albicans*. 48 th KU Conference, 246-251.
- Arinee C, Jinda W, Thepinthitiya S, Morakod B, Lalitwadee N. 2011. Antibacterial activity of *Clausena harmandiana* leaf extract against pathogenic bacteria isolated from animals. KKU Vet J 21(1), 61-68.
- Baanlaesuan. 2016. *Paederia linearis* Hook. f. root. (online) Available: <http://book.baanlaesuan.com/plant-library/paederia-linearis/>
- Devi MK, Yogananth N. 2016. In vitro antimicrobial activity of crude and chromatographic fractions of *Oxystelma esculentum* (L.F) R. Br. exSchltes. Int J Adv Res Biol Sci 3(12), 183-187.
- Durairaj A, Shok KV, Thamil SM, Upal KG, Malaya. 2009. Antineoplastic and antioxidant activities of *Oxystelma esculentum* on Swiss albino mice bearing Ehrlich's ascites carcinoma. Pharm Biol 47(3), 195-202.
- Jinda W, Suppachai T, Tararat N. 2017. Identification of some medicinal plants by HPLC technique. Thammasart University.
- Medthai. 2017. *Paederia linearis* Hook. f. root. (online) Available: <https://medthai.com/%E0%B8%95%E0%B8%94%E0%B8%AB%E0%B8%A1%E0%B8%B9%E0%B8%95%E0%B8%94%E0%B8%AB%E0%B8%A1%E0%B8%B2/>
- 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.
- Pandya DJ, Anand S. 2011. A Complete review on *Oxystelma esculentum* R. Br. Pharmacogsy Journal. 3(19), 87-90.
- Pandya DJ, Anand S. 2011. Anti-ulcer potential of *Oxystelma esculentum*. Int J Green Pharm 5(1), 65-68.
- Pharita S, Angkana C. 2018. *Paederia linearis* Hook. f. root: chemical compositions, antioxidant activity and its effect on physico-chemical properties of RD6 glutinous rice flour. Khon Kaen Agr J 46 (1), 438-444.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing. Spain. 648p.
- Rekha S, Vidyasagar GM. 2013. Anti-Candida Activity of Medicinal Plants. Int J Pharm PharmSci 5(4), 9-16.
- Savitha G, Balamurugan S. 2014. Pharmacognostical studies on *Oxystelma esculentum* (L.F) R.Br. exSchltes, a medicinal plant. Int Lett Nat Sci 22(14), 51-57.
- Savitha G, Balamurugan S. 2015. Free radical scavenging, GC-MS and FT-IR analyses of different solvent extract of leaf, stem and root of *Oxystelma esculentum* R. Br. Life Sci Arch 1(5), 350-357.
- Savitha G, Balamurugan S. 2016. Preliminary phytochemical and antimicrobial activities of different solvent leaf extracts of *Oxystelma esculentum* R. Br. J Chem Pharm Res 8(1), 447-451.
- Sudta P, Sabyjai C, Wanirat K. 2013. Phytochemical analysis, in vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Paederia linearis* Hook. F. Root. The Sci J of Phetchaburi Rajabhat University 10(1), 5-18.
- Yaowapa A. 2011. Antifungal activity of plant extract against *Colletotrichum gloeosporioides*: anthracnose disease of *Asparagus officinaris*. Kasetsart University. (online) Available: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.lib.kps.ku.ac.th/Special-Project/Agricultural_Biotechnology/2554/Bs/YaowapaAr/YaowapaArAll.pdf