

# สมุนไพรมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ Extended-Spectrum $\beta$ -lactamase (ESBL)

พจมาน ผู้มีสัตย์\*, ชุติพร ออมสิน, ทศนีย์ ศรีวิเชียร, ประภาพร ยวงสาย, รุ่งตะวัน ส่องแสง

\*คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ 18/18 ถนนบางนา-ตราด กม. 18 ตำบลบางโจลง อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ 10540

## บทคัดย่อ

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) จำนวน 3 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากโรงพยาบาลนครปฐม จำนวน 2 สายพันธุ์ และโรงพยาบาลพระปกเกล้าจันทบุรี จำนวน 1 สายพันธุ์ โดยใช้วิธีการสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์ 2 วิธี ได้แก่ การใช้ตัวทำละลายคือ 80 เปอร์เซ็นต์เมทานอล และการคั้นสด ใช้สมุนไพรรวมทั้งสิ้น 11 ชนิดคือ มะกรูด เหนืออกปลาหมอบ ขลุ่ มังคุด แก่นฝาง พริกไทยดำ บอระเพ็ด ฟ้าทะลายโจร ขมิ้นชัน มะปราง และกระเทียม ทำการทดลองโดยวิธี Disc diffusion test พบว่าสารสกัดที่ได้จากกระเทียมมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ได้ดีที่สุดคือให้ขนาดของ inhibition zone อยู่ในช่วง 10.0 - 19.0 มิลลิเมตร ในขณะที่สารสกัดที่ได้จากการใช้ 80 เปอร์เซ็นต์เมทานอลพบว่าให้ขนาดของ inhibition zone ที่ไม่กว้างนักคืออยู่ในช่วง 7.0 - 12.5 มิลลิเมตร และส่วนใหญ่แล้วไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้

## บทนำ

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง พบครั้งแรกในเชื้อ *Klebsiella ozaenae* ในประเทศเยอรมัน จากนั้นก็พบกระจายไปทั่วโลก (Bradford, 2001) เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ในเชื้อหลายกลุ่มเช่น *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Capnocytophaga ochracea* เป็นต้น (Bradford, 2001; Naas et al, 1999; Rosenae, 2000) โดยเอนไซม์ ESBL สามารถทำลาย  $\beta$ -lactam ring ซึ่งเป็นโครงสร้างของยาในกลุ่ม penicillins นอกจากนี้ยังทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่มของ cephalosporins และ monobactams อีกด้วย (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006) จึงเป็นปัญหาต่อการรักษาเป็นอย่างมาก และเชื้อที่มีรายงานว่ามีการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้มากที่สุดคือ *K. pneumoniae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง มีแคปซูล โคโลนีเป็นมุกเข้ม ก่อโรคปอดบวม โดยเฉพาะโรคปอดบวมที่เกิดในโรงพยาบาล (hospital-acquired pneumonia) โดยเชื้อจะทำลายเนื้อเยื่อปอดทำให้เกิด

## อุปกรณ์และวิธีการ

### เชื้อตัวอย่าง

เชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 3 สายพันธุ์ จากโรงพยาบาลนครปฐม จำนวน 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ 1a และ 2a และจากโรงพยาบาลพระปกเกล้าจันทบุรีจำนวน 1 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ 1b

### ตัวอย่างสมุนไพร

ตัวอย่างสมุนไพรที่บดเป็นผงละเอียดจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ ขลุ่ บอระเพ็ด มะปราง มะกรูด แก่นฝาง พริกไทยดำ เหงือกปลาหมอ ฟ้าทะเลลายโจร ขมิ้นชัน และมังคุด และตัวอย่างสมุนไพรสดจำนวน 1 ชนิด ได้แก่ กระเทียม

1. การสกัดสมุนไพรด้วย 80% เมทานอล นำสมุนไพรแห้งที่บดเป็นผงได้แก่ ขลุ่ บอระเพ็ด มะปราง มะกรูด พริกไทยดำ เหงือกปลาหมอ ฟ้าทะเลลายโจร แก่นฝาง ขมิ้นชัน และมังคุด ชนิดละ 25 กรัมผสมกับ 80% เมทานอล ปริมาตร 85 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ละลายสารสกัดที่ได้ด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) จากนั้นกรองด้วย Millipore filter 0.2  $\mu$ m.

2. การสกัดสมุนไพรด้วยวิธีคั้นสด สมุนไพรที่ใช้วิธีการสกัดได้แก่ กระเทียม โดยนำกระเทียมมาปอกเปลือก ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นแช่ใน 70% แอลกอฮอล์นาน 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออีกครั้ง นำไปปั่นให้ละเอียด จากนั้นนำไปคั้นเอาน้ำออกมาให้มากที่สุด

ในปัจจุบันสมุนไพรไทยหลายชนิดได้ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพเช่น พริกไทยดำ ขมิ้นชัน มะนาว เป็นต้น ซึ่งสมุนไพรต่างๆ เหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ได้เช่น *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Candida albicans* เป็นต้น (วิสาตรี คงเจริญสุนทร และคณะ 2005) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจนำสมุนไพรมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากผู้ป่วย ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นและเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการใช้สมุนไพรเพื่อที่จะนำมาช่วยในการรักษาโรคติดเชื้อที่ยากต่อการรักษาด้วยยาแผนปัจจุบัน

### 3. การเตรียมแผ่นยาสมุนไพร คูดสารสกัด

จากสมุนไพรที่สกัดโดย 80% เมทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 3 mg/disc และคูดสารสกัดสดจากกระเทียม ปริมาตร 30 µl/disc ลงบน sterile paper disc ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง

### การทดสอบความสามารถของสมุนไพรในการยับยั้ง *K. pneumoniae* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ ESBL

ปรับความขุ่นของเชื้อ *K. pneumoniae* โดยใช้ McFarland Standard No. 0.5 จากนั้น streak เชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller - Hinton Agar (MHA) โดยใช้ sterile cotton swab วางแผ่นยาที่มีสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA โดยทำแบบ duplicate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นในหน่วยมิลลิเมตร

ตารางที่ 1. การยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ของสมุนไพรที่สกัดด้วย 80% เมทานอลและวิธีคั้นสด (สายพันธุ์ 1a และ 2a เชื้อจากโรงพยาบาลนครปฐม และสายพันธุ์ 1b เชื้อจากโรงพยาบาลพระปกเกล้าจันทบุรี)

สมุนไพร	Inhibition zone (mm ± SD)		
	สายพันธุ์ 1a	สายพันธุ์ 2a	สายพันธุ์ 1b
1.ขมิ้น	-	-	8.5 ± 0.6
2.ขมิ้นชัน	-	-	-
3.มะกรูด	-	-	8.0 ± 0
4.มะปราง	-	-	-
5.ฟ้าทะลายโจร	7.0 ± 0	-	-
6.บอระเพ็ด	-	-	8.0 ± 1.7
7.มังคุด	-	-	-
8.แก่นฝาง	12.5 ± 0.7	-	-
9.พริกไทยดำ	-	-	7.8 ± 0.96
10.เหงือกปลาหมอ	-	-	-
11.กระเทียม (ใช้วิธีการคั้นสด)	19.0 ± 0	10.0 ± 1.4	16.5 ± 2.1

### ผลการทดลอง

เมื่อนำสมุนไพรทั้ง 11 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ ESBL พบว่าสมุนไพรที่สกัดด้วย 80% เมทานอล ให้ขนาดของ inhibition zone ที่ไม่กว้างนัก แต่ส่วนใหญ่แล้วจะไม่ให้ inhibition zone ยกเว้นแก่นฝางที่ให้ inhibition zone กว้างที่สุดขนาด 12.5 ± 0.7 มิลลิเมตร จากเชื้อที่ได้จากโรงพยาบาลนครปฐมสายพันธุ์ 1a ขณะเดียวกันสารสกัดสดที่ได้จากกระเทียมให้ขนาดของ inhibition zone ที่กว้างคือ 19.0 ± 0, 10.0 ± 1.4 และ 16.5 ± 2.1 มิลลิเมตร จากเชื้อที่ได้จากโรงพยาบาลนครปฐมจำนวน 2 สายพันธุ์ และโรงพยาบาลพระปกเกล้าจันทบุรีจำนวน 1 สายพันธุ์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

## อภิปรายและสรุปผล

สารต่างๆ ที่มีอยู่ในสมุนไพรแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้แตกต่างกัน การที่จะนำสารเหล่านี้มาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื่อนั้นจะต้องมีการสกัดเอาสารนั้นออกมา โดยที่ยังคงความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพได้ ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดสมุนไพร 2 วิธีคือ การใช้ 80% เมทานอลเป็นตัวทำละลาย สมุนไพรที่ใช้วิธีนี้ในการสกัดได้แก่ กลุ่ม บอระเพ็ด มะปราง มะกรูด พริกไทยดำ เหงือกปลาหมอ ฟ้าทะลายโจร แก่นฝาง ขมิ้นชัน และมังคุด สำหรับอีกวิธีคือการคั้นสด ใช้สำหรับสารสกัดที่ได้จากกระเทียม ซึ่งมีสารที่สำคัญคือ อัลลิซิน (allicin) มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *Streptococcus pneumonia*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* (Saeed and Tarig, 2006; Astal, 2004; Iwalogan et al, 2004) โดยสารนี้เป็นกรดอะมิโนที่พบได้ในรูปของน้ำมันกระเทียม ไม่มีสี สารอัลลิซินสลายตัวเมื่อถูกความร้อน ดังนั้นวิธีการคั้นสดจึงทำให้ยังคงสภาพของสารอัลลิซิน โดยสารอัลลิซินจะออกมาก็ต่อเมื่อมีการคั้นหรือบดละเอียดซึ่งเป็นการกระตุ้นเอนไซม์อัลลิเนส (allinase) ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโนอัลลิิน (alliin) เป็นอัลลิซิน (Astal, 2004) นอกจากนี้ในกระเทียมยังประกอบไปด้วยสารประกอบซัลเฟอร์อย่างน้อย 33 ชนิด กรดอะมิโน 17 ชนิด และสารซีลีเนียม (selenium) สารประกอบต่างๆ เหล่านี้ในกระเทียมส่งผลให้เกิดฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพได้ และยังสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งบางชนิดได้อีกด้วย (Milner, 2001; Ip, 1996)

ผลการทดลองพบว่าสมุนไพรที่สกัดโดยใช้ 80% เมทานอล ส่วนใหญ่แล้วไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ได้ มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่สามารถยับยั้งได้ ได้แก่ กลุ่ม มะกรูด ฟ้าทะลายโจร บอระเพ็ด พริกไทยดำ และ แก่นฝางซึ่งเป็นสมุนไพรที่ให้ inhibition zone กว้างที่สุด ( $12.5 \pm 0.7$  มิลลิเมตร) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีสมุนไพรส่วนใหญ่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้ ([http://www.scisoc.or.th/stt/32/sec\\_b/paper/stt32\\_B4\\_B0153.pdf](http://www.scisoc.or.th/stt/32/sec_b/paper/stt32_B4_B0153.pdf)) อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของตัวเชื้อเองที่สร้างแคลซูลทำให้เชื้อมากขึ้นสำหรับสารสกัดจากแก่นฝางนั้นพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารเช่น *Shigella* spp., *Vibrio cholera* และ *V. parahaemolyticus* ได้ (<http://www.scisoc.or.th/stt/28/web/content/J10/J02.htm>; Gritsanapan and Chulasiri, 1983) อีกทั้งยังสามารถยับยั้งเชื้อ Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) ได้อีกด้วย (Kim et al., 2004)

ความกว้างของ inhibition zone ของสมุนไพรแต่ละชนิดต่อเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันมาก ตัวอย่างเช่นในกรณีของแก่นฝางให้ inhibition zone กับเชื้อที่ได้จากโรงพยาบาลนครปฐมสายพันธุ์ 1a แต่ไม่ให้ inhibition zone กับเชื้อที่ได้จากโรงพยาบาลนครปฐมสายพันธุ์ 2a และจากโรงพยาบาลพระปกเกล้าจันทบุรีสายพันธุ์ 1b อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของตัวเชื้อในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อที่ทำให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อต่อสมุนไพรแต่ละชนิดให้ผลแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามหากมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อในการทดลองให้มากขึ้นอาจจะทำให้เห็นผลชัดเจนยิ่งขึ้น

การทดลองนี้เป็นการทดลองเบื้องต้นในการหาชนิดของสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อที่มีการคือ

## เอกสารอ้างอิง

- วิสาตรี คงเจริญสุนทร, นิพนธ์ ชมโอสถ, จิรัชฌา จินดามล, จิราภรณ์ อารยะศิลป์ประชร, ปราณิ ชะรัศม์ย์, สุริวัลย์ อุ๋นอารมณ์ และ อารยา พิทยประเสริฐกุล. (2005). การสำรวจและทดสอบหาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ. **31<sup>st</sup> Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology.**
- อิสยา จันทรวิทยานุชิต, วัชรินทร์ รังษิภาณุรัตน์, พรทิพย์ พึ่งม่วง, สมหญิง งามอรุณเลิศ และ พจมาน ผู้มีสัตย์. (2548). การวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Astal, Z.E. (2004). The inhibitory action of aqueous garlic extract on the growth of certain pathogenic bacteria. **Eur Food Res Technol.** 218:460-464.
- Bradford, P.A. (2001). Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev.** 14:933-951.
- Clinical and Laboratory Standards Institutes. (2006). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests (9<sup>th</sup> ed.). Approved Standard M2-A9. **Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.**
- Gritsanapan, W., and Chulasiri, M. (1983). A preliminary study of antidiarrheal plants: I, antibacterial activity. **Mahidol Univ. J. Pharm. Sci.** 10:119-122.
- Ip, C., Lisk, D.J and Thompson H.J. (1996). Selenium-enriched garlic inhibits the early stage but not the late stage of mammary carcinogenesis. **Carcinogenesis.** 17(9): 1979 -82.
- Iwalokun, B.A, Ogunledun, D.O., Ogbolu, D.O., Bamrio, S.B., and Jimi-Omojola, J. (2004). In Vitro Antimicrobial Properties of Aqueous Garlic Extract Against Multidrug-Resistant Bacteria and Candida species from Nigeria. **Journal of Medicinal Food.** 7(3): 327-333.
- Kim, K.J., Yu, H.H., Jeong S., Cha, J.D., Kim, S.M., and You, Y.O. (2004). Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology.** 91 (1): 81-87.
- Milner, J.A. (2001). Supplement: Recent Advances on the Nutritional Effects Associated with the use of Garlic as a supplement. A

- Historical Perspective on Garlic and Cancer. **Journal of Nutrition.** 131:1027S-1031S.
- Naas, T., Phillippon, L., Poirel, L., Ronco, E., and Nordmann, P. (1999). An SHV derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** 43:1281-4.
- Rosenau, A., Cattier, B., Gousset, N., Harrian, P., Phillippon, A., Quentin, R., et al. (2000). Capnocytophaga ochracea: characterization of a plasmid encoded expanded-spectrum TEM-17 beta-lactamase in the phylum Flavobacter-Bacteroides. **Antimicrobial Agents Chemother.** 44: 760-762.
- Saeed, S., and Tariq, P. (2006). Effects of Some Seasonal Vegetables and Fruits on the Growth of Bacteria. **Pakistan Journal of Biological Sciences.** 9 (8): 1547-1551.
- [http://www.scisoc.or.th/stt/32/sec\\_b/paper/stt32\\_B4\\_B0153.pdf](http://www.scisoc.or.th/stt/32/sec_b/paper/stt32_B4_B0153.pdf).
- [http://www.scisoc.or.th/stt/28/web/content/J\\_10/J02.htm](http://www.scisoc.or.th/stt/28/web/content/J_10/J02.htm).