

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระเทียม (*Allium sativum*) ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus hyicus* และ *Pseudomonas aeruginosa*

Inhibitory Effect of Garlic Extract (*Allium sativum*) against *Staphylococcus hyicus* and *Pseudomonas aeruginosa*

อารินี ชัชวาลชลธีระ¹ จริยา ทังทอง¹ มนูญชยา ทิพย์คำมี¹ วราวุฒิ เจริญรื่น¹

Arinee Chatchawanchonteera¹ Jariya Tungtong¹ Mananchaya Tipkammee¹ Warawoot Charoenruan¹

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเทียม (*Allium sativum*) amoxicillin และ tetracyclin ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus hyicus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ก่อโรคในสัตว์ด้วยวิธี broth dilution technique โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 และเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 พบว่า สารสกัดกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. hyicus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *S. aureus* ได้ โดยมีค่า MIC 10.03 ± 6.56 , 183.33 ± 79.39 , 28.65 ± 9.92 , 34.38 ± 0 ตามลำดับ ซึ่งค่า MIC ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ยกเว้นค่า MIC ของ *P. aeruginosa* ที่สูงกว่าเชื้ออื่น อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$).

คำสำคัญ: สารสกัดกระเทียม เชื้อ *Staphylococcus hyicus* เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

Keywords: garlic extract, *Staphylococcus hyicus*, *Pseudomonas aeruginosa*

¹ ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

Abstract

In this study garlic (*Allium sativum*) extract, amoxicillin and tetracyclin were tested in vitro to evaluate the inhibitory effect on *Staphylococcus hyicus* and *Pseudomonas aeruginosa* by broth dilution technique, compared with *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *E.coli* ATCC 25922. The result showed that garlic extract can inhibit both *S. hyicus* and *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *E.coli* with MIC value of 10.03 ± 6.56 , 183.33 ± 79.39 , 28.65 ± 9.92 , 34.38 ± 0 respectively. The MIC value were not significantly different except *P. aeruginosa* which show significantly higher MIC value than other bacteria ($p < 0.05$).

บทนำ

กระเทียม (*Allium sativum*) เป็นพืชสมุนไพรสกุล *Allium* ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้ล้มลุกเนื้ออ่อนอยู่ใต้ดิน (วิทย์, 2531) มีสรรพคุณคือเป็น antimicrobial, antithrombotic, antitumor, hypolipidaemic antiarthritic, hypoglycemic, antioxidant agent นอกจากนี้ยังใช้รักษาและป้องกันโรคของระบบหัวใจและหลอดเลือด (Ali et al., 2000; Thomsan and Ali, 2003)

กระเทียมมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ทั้งแบคทีเรียไวรัส เชื้อรา และโปรโตซัว (Lun et al., 1994; Ankri and Mirelman, 1999; Fan and Chen, 1999) พบว่า สารสำคัญในกระเทียมบดสดคือ allicin (Ankri and Mirelman, 1999) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ thiol groups ของเอนไซม์ต่างๆ เช่น alcohol dehydrogenase, thioredoxin reductase, RNA polymerase มีผลยับยั้งการสร้างโปรตีนกรดนิวคลีอิก การสร้างไขมันและการเจริญเติบโตของเชื้อ (Adetumbi et al., 1986)

ในทางสัตวแพทย์โรคติดเชื้อในสัตว์หลายโรค เกิดจากแบคทีเรีย เช่น โรค exudative epidermitis หรือโรคหนังกำพร้าอักเสบเยิ้ม หรือเรียกว่า greasy pig disease เกิดจากเชื้อ *Staphylococcus hyicus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม โรคนี้จะทำให้ผิวหนังทั่วร่างกายเกิดการอักเสบชนิดมีสิ่งคัดหลั่งพวกไขมันออกมาเป็นจำนวนมาก ส่วนใหญ่พบในลูกสุกรตุนม และพบโรคทั่วไปในโลก โดยการเกิดของโรคไม่ขึ้นกับฤดูกาล การป่วยจากโรคนี้ อาจมีผลให้เชื้อตาขาวอักเสบ มองไม่เห็นและอาจตายได้กรณีโรครุนแรงเฉียบพลัน (กิจจา, 2530)

โรคติดเชื้อแบคทีเรียอื่นที่พบในสัตว์เช่น โรคติดเชื้อที่เกิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* ได้แก่ otitis externa, cystitis, endocarditis, dermatitis, conjunctivitis, wound infections เป็นต้น (Quinn et al., 1994) *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่ง ที่มักจะมีฤทธิ์คือยาสูง พบว่า กระเทียมสามารถรักษาโรคติดเชื้อจาก *P. aeruginosa* ได้ (Shyh-ming and Mei-chin, 2001; Tasao and Yin, 2001)

เนื่องจากกระเทียมมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้หลายชนิด และเป็นสมุนไพรที่หาง่าย ราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีต้นทุนที่แพงกว่า เนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้งยังต้อง

คำนึงถึงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น และปัญหาการดื้อยา ปัญหาटक้างที่ตามมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกระเทียมสดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปใช้สัตว์ และเป็นการสนับสนุนการใช้สมุนไพรพื้นบ้านแทนหรือลดการใช้ยาปฏิชีวนะในประเทศไทย

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมสารสกัดกระเทียม

สูตรการเตรียมและวิธีการสกัดกระเทียม ใช้ตามวิธีการของ อารินี และคณะ (2546) ซึ่งปรับจากสูตรของ อติศร (2542) โดยการนำกระเทียมที่ปอกเปลือกแล้ว มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ซึ่งให้ได้น้ำหนัก 30 กรัม และนำไปบดในโถร้งบดยาให้ละเอียด โดยใช้อัตราส่วนกระเทียมต่อน้ำกลั่น 1 กรัม : 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองหยาบด้วยผ้าขาวบาง หลายๆ ชั้น นำน้ำกระเทียมที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45 และ 0.2 ไมโครเมตร ตามลำดับ โดยทุกขั้นตอนปฏิบัติด้วยวิธีปลอดเชื้อ สารสกัดที่ได้มีความเข้มข้น 550 µg/ml จากนั้น เก็บสารสกัดที่ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 และ *E. coli* ATCC25922 ซึ่งได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และ *S. hyicus*, *P. aeruginosa* ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างสัตว์ป่วยของโรงพยาบาลสัตว์ ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Brain Heart Infusion Broth (BHI) ให้ได้ความขุ่นของเชื้อเท่ากับ สารละลายมาตรฐาน 0.5 McFarland แล้วเจือจางในอัตราส่วน 1:100 ด้วยน้ำเกลือให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1×10^6 (CFU/ml)

วิธีการทดสอบ

เตรียมสารสกัดกระเทียม ยา amoxicillin, tetracyclin โดยเจือจาง 2 เท่า ตามลำดับ โดยวิธี broth dilution method ในหลอดทดลอง โดยมีหลอดสุดท้ายเป็นหลอดควบคุม จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เตรียมไว้จนครบทุกหลอด เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านผลใน 24 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมเริ่มต้นที่ 550 µg/ml และยา amoxicillin, tetracyclin เริ่มต้นที่ 4.945, 4.87 µg/ml ตามลำดับ และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การอ่านผลการทดลอง

การอ่านผล อ่านโดยให้ระดับความขุ่นเทียบกับหลอดควบคุมโดย

0 = สารละลายใส

1 = ขุ่นเล็กน้อย น้อยกว่า 50% ของหลอดควบคุม

2 = ชุ่มเท่ากับ 50% ของหลอดควบคุม

3 = ชุ่มมากกว่า 50% ของหลอดควบคุม

4 = ชุ่มเท่ากับหลอดควบคุม

ในการอ่านผล ใช้เกณฑ์ +1 เป็นเกณฑ์บอกถึงการถูกยับยั้งของเชื้อ และใช้ BHI เป็นหลอดควบคุม

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ดูผลของฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดกระเทียมต่อเชื้อ *S. hyicus* และ *P. aeruginosa* แสดงเป็นค่า MIC และใช้การวิเคราะห์ทางสถิติวิธี ANOVA และ Duncan Multiple Range test เพื่อเปรียบเทียบค่า MIC ของเชื้อแต่ละชนิดที่ได้จากสารละลายเดียวกัน

ผลการทดลอง

สารสกัดกระเทียม ยาปฏิชีวนะ amoxicillin และ tetracyclin มีผลยับยั้งเชื้อต่างๆ เมื่อเทียบกับหลอดควบคุม โดยผลการยับยั้งรายงานเป็นค่า MIC (minimal inhibitory concentration) และ MBC (minimal bactericidal concentration) \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Mean \pm standard deviation MIC and MBC value of garlic extract, amoxicillin and tetracyclin against the bacteria.

Agents	Bacteria	N	MIC \pm SD (μ g/ml)	MBC \pm SD (μ g/ml)
Garlic extract	<i>Staphylococcus aureus</i>	3	34.38 \pm 0.00 ^b	550 \pm 0.00
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	3	10.03 \pm 6.56 ^b	> 550 \pm 0.00
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	183.33 \pm 79.39 ^a	366.67 \pm 158.77
	<i>Escherichia coli</i>	3	28.65 \pm 9.92 ^b	183.33 \pm 9.39
Amoxicillin	<i>Staphylococcus aureus</i>	3	0.10 \pm 0.04 ^b	> 4.95 \pm 8.43
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	3	0.01 \pm 0.01 ^c	> 4.95 \pm 8.43
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	> 4.95 *	> 4.95 \pm 8.43
	<i>Escherichia coli</i>	3	0.31 \pm 0.00 ^a	0.62 \pm 1.05
Tetracyclin	<i>Staphylococcus aureus</i>	3	0.01 \pm 0.01 ^c	> 4.87 \pm 8.43
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	3	2.03 \pm 0.70 ^a	> 4.87 \pm 8.43
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	0.81 \pm 0.35 ^b	1.62 \pm 0.70
	<i>Escherichia coli</i>	3	0.04 \pm 0.03 ^c	> 4.87 \pm 8.43

Different alphabets of the same agent mean significant difference

* was not included in the analysis

สรุป และวิจารณ์

สารสกัดกระเทียม มีผลยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* และ *S. hyicus* โดยมีค่า MIC ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* สอดคล้องกับ Gile (2000), Adeleye and Opiah (2003) และ Shyh-ming and Mei-Chin (2001) ซึ่งพบว่า สารสกัดกระเทียมให้ผลยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* ได้

สารสกัดกระเทียมให้ผลค่า MIC ต่อ *E. coli* ใกล้เคียงกับการทดลองของ Mei-Chin et al. (2002) ซึ่งมีค่า MIC $44 \pm 40 \mu\text{g/ml}$ และสอดคล้องกับการทดลองของ Kumar and Berwal (1998) ซึ่งพบว่า *E. coli* มีความไวสูงสุดต่อสารสกัดกระเทียม เมื่อเทียบกับ *S. aureus*, *S. typhi* และ *L. monocytogenes* กลไกการออกฤทธิ์ของกระเทียมในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพเนื่องจากกระเทียมประกอบด้วยสาร allicin ((+)-S-allyl-L-cysteine sulfoxide) ซึ่งเป็นสารประกอบกำมะถันหลัก allicin ถูก hydrolyzed เป็น sulfenate, pyruvate และ ammonia โดย allicinase และ sulfenate 2 โมล จะได้เป็น allicin (diallyl thiosulfenate) ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารต้านแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านเนื้องอก (Naganawa et al., 1996)

ในการนำไปใช้เนื่องจากสารสกัดกระเทียมให้ผลยับยั้งในหลอดทดลองต่อเชื้อ *S. hyicus* และ *P. aeruginosa* รวมทั้งแบคทีเรียอีกหลายชนิด ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์ ในลำดับต่อไปจึงควรศึกษาผลยับยั้งโดยตรงที่ตัวสัตว์ โดยการนำค่า MIC, MBC ที่ได้จากการทดลองไปปรับใช้ในการรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อจุลชีพในสัตว์แทนการใช้ยาปฏิชีวนะในขนาด เช่นกรณี โรคหนังกำพร้าอักเสบเย็บในสุกรหรือกรณีโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในสัตว์หลายโรค และในสัตว์แต่ละชนิด เพราะถ้าเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ สมุนไพรอาจช่วยแก้ปัญหาที่เกิดจากยาปฏิชีวนะ เช่น ผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น ปัญหาการดื้อยา และปัญหาขาดค้างที่ตามมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังเป็นการลดการนำเข้ายาปฏิชีวนะจากต่างประเทศและเป็นการสนับสนุนการใช้สมุนไพรพื้นบ้าน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.ขวัญเกศ กนิษฐานนท์ ที่กรุณาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ผศ.ดร.สาทร พรตระกูลพิพัฒน์ และ ผศ.เจษฎา จิวากานนท์ ที่กรุณาอนุเคราะห์ยา Tetracyclin และยา Amoxicillin นางสาวชัชวราภรณ์ กัมปนาทวารวรรณ นางอรุณี บุตรตราสี และหัวหน้าภาควิชาพยาธิชีววิทยา ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการภาควิชาพยาธิชีววิทยา

เอกสารอ้างอิง

- กิจจา อุไรรงค์. 2530. แนวทางการวินิจฉัย รักษา และควบคุมโรคสุกร. โครงการตำรา สโมสรนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 348 หน้า.
- วิทย์ เทียงบุรณธรรม. 2531. พจนานุกรมสมุนไพร. โรงพิมพ์ไอบีเดียสโตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 33-36.
- อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2542. ผลของน้ำสกัดกระเทียมต่อการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก สำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อและเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่พบมากในແหน่ม (ในหลอดทดลอง). อาหาร. 2: 107-115.
- อารินี ชัชวาลชลธีระ นพมาศ ตระการรังสี รวมพร โอนธรรม ละอองทิพย์ ประภาพร สุทธิอาภา หลวงศรี. 2546. ผลการสารสกัดกระเทียมและหอมหัวใหญ่ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans*. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มช. 13(2): 16-23.
- Adeleye, I.A. and Opiah, L. 2003. Antimicrobial activity of local cough mixtures on upper respiratory tract bacterial pathogen. West Indian Med. J. 52(3): 188-190.
- Adetumbi, M., Javor, G.T. and Lau, B.H. 1986. *Allium sativum* (garlic) inhibits lipid synthesis by *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 30(3): 499-501.
- Ali, M., Thomsan, M. and Afzal, M. 2000. Garlic and onion : their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. Prostaglandins Leukot Essent. Fatty Acids. 62(2): 55-73.
- Ankri, S. and Mirelman, D. 1999. Antimicrobial activity properties of allicin from garlic. Microbes Infect. 1(2): 125-129.
- Fan, J.J. and Chen, J.H. 1999. Inhibition of aflatoxin-producing fungi by Welsh onion extracts. J. Food Prot. 62(4): 414-417.
- Gile, K.E. 2000. An antibacterial assay of aqueous extract of garlic against anaerobic/microaerophilic and aerobic bacteria. Microb Ecol Health dis. 12(2): 81-84.
- Kumar M. and Berwal, J.S. 1998. Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). J. Appl Microbiol. 84(2): 213-215.
- Lun, Z.R., Burri, C., Menzinger, M. and Kaminsky, R. 1994. Antiparasitic activity of diallyl trisulfide (Dasuansu) on human and animal pathogenic protozoa (*Trypanosoma sp.* *Entamoeba histolytica* and *Giarchlia lamblia*) in vitro. Ann Soc Belg Med Trop. 74(1): 51-59.
- Mei-chin Y., Hui-ching, C. and Shyh-Ming, T. 2002. Inhibitory effects of aqueous garlic extract, garlic oil and four diallyl sulphides against four enteric pathogens. J Food Drug Anal. 10(2): 120-126.

- Naganawa, R., Iwata, N., Ishikawa, K., Fukuda H., Fujino, T. and Suzuki A. 1996. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. Appl. Environ. Microbiol. 62(11): 4238-4242.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K. and Carter, G.R. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing. Spain. pp. 237-242.
- Shyh-ming, T. and Mei-chin, Y. 2001. In vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. 47: 665-670.
- Tasao, S.M. and Yin, M.C. 2001. In vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella Pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. 47(5): 665-670.
- Thomson, M. and Ali, M. 2003. Garlic [*Allium sativum*] : A review of its potential use as an anticancer agent. Curr Cancer Drug Target. 53(1): 67-81.

