

RESEARCH ARTICLE

Comparative Antibacterial Activity of Stem, Root Bark and Leaf Extracts of *Clausena harmandiana* against Bacteria Isolated from Canine Otitis Externa

Arinee Chatchawanchonteera^{1*}, Jinda Wangboonsakul², Chavi Yenjai³,
Thanapon Thongchua⁴, Phitchaya Saenubol⁴, Yadfon Phonthongchaisawat⁴, Peerapol Sukon⁵

Abstract

Objective—To compare antibacterial activity of stem, root bark and leaf extracts of *Clausena harmandiana* against bacteria isolated from canine otitis externa.

Materials and Methods—Dry ground stem, root bark and leaf of *Clausena harmandiana* were extracted by ethanol. The crude extracts were tested for antibacterial activities against 25 isolates of bacteria from canine otitis externa by microdilution broth method. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and gentamicin were also tested as experimental controls.

Results—The result showed that stem, root bark and leaf extracts of *Clausena harmandiana* had antibacterial activity against bacteria isolated from otitis externa in dogs such as *Klebsiella* spp. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. The stem extract of *Clausena harmandiana* had minimal bactericidal concentration (MBC) values of 55.56, 83.33, 6.94, 55.56 and 41.67 mg/ml, respectively; root bark extract had MBC values of 111.1, 97.22, 9.55, 69.44 and 41.67 mg/ml, respectively; and leaf extract had MBC values of 69.44, 55.56, 17.36, 41.67 and 27.78 mg/ml. against the above bacteria, respectively. In addition, MBC values of *Clausena harmandiana* extracts showed significant difference among leaf, stem and root bark ($P < 0.05$).

Conclusion—Stem, root bark and leaf extracts of *Clausena harmandiana* had antibacterial activity against the bacteria isolated from canine otitis externa. Leaf extract showed higher antibacterial efficiency than stem and root bark extracts.

KKU Vet J. 2013;23(1):110-118.

<http://vmj.kku.ac.th/>

Keywords: *Clausena harmandiana*; Antibacterial activity; Otitis externa; Dog

¹Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

²Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand 40002

³Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

⁴Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

⁵Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002.

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

การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่เรียกก่อโรคหูชั้นนอก อักเสบในสุนัข ของสารสกัดจากลำต้น เปลือกกราก และใบ ของต้นส่องฟ้าแดง

อารินี ชัชวาลชลธีระ^{1*}, จินดา หวังบุญสกุล², นวีเย็นใจ³,
ธนพร ทองเชื้อ⁴, พิษญา แสนอุบล⁴, หยาตฝน พลทรงชัยสวัสดิ์⁴, พีระพล สุขอ้วน⁵

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากส่วนลำต้น เปลือกกราก และใบของต้นส่องฟ้าแดง ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหูชั้นนอกอักเสบในสุนัข

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ สกัดสารจากส่วนลำต้น เปลือกกราก และใบของต้นส่องฟ้าแดงด้วยสารละลายเอทานอล นำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหูชั้นนอกอักเสบในสุนัข ได้แก่ เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp, *Escherichia coli* และ *Klebsiella* spp. รวม 25 ไอโซเลต ด้วยวิธี microdilution broth method เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimal bactericidal concentration, MBC) โดยมี *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เป็นเชื้อควบคุมมาตรฐาน และมียาเจนตามัยซินเป็นยาควบคุมมาตรฐาน

ผลการศึกษา สารสกัดจากส่วนของลำต้น เปลือกกราก และใบของต้นส่องฟ้าแดง มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหูชั้นนอกอักเสบในสุนัข ได้แก่ เชื้อ *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp. และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยส่วนของลำต้นมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) เท่ากับ 55.56, 83.33, 6.94, 55.56 และ 41.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเปลือกกราก มีค่า 111.1, 97.22, 9.55, 69.44 และ 41.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใบมีค่า 69.44, 55.56, 17.36, 41.67 และ 27.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียของส่วนลำต้น เปลือกกราก และใบ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยในภาพรวมพบว่า สารสกัดจากส่วนใบให้ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากส่วนลำต้นและเปลือกกราก ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว

ข้อสรุป สารสกัดจากลำต้น เปลือกกราก และใบของต้นส่องฟ้าแดง มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหูชั้นนอกอักเสบในสุนัขทั้ง 5 ชนิดที่ศึกษาและสารสกัดจากใบ มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากส่วนลำต้นและเปลือกกราก

คำสำคัญ: ต้นสอฟ้าแดง ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โรคหูชั้นนอกอักเสบ สุนัข

¹ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

²ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

³ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

⁴คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

⁵ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ E-mail: arinee@kku.ac.th

บทนำ

ช่องหูอักเสบในสุนัข (otitis externa) เกิดได้จากหลายสาเหตุ โดยมีปัจจัยโน้มนำ ได้แก่ โครงสร้างของหูผิดปกติ หรือเนื้อเยื่อในช่องหูผิดปกติและปัจจัยหลักได้แก่โรคปรสิต สิ่งแปลกปลอมที่ทำให้เกิดความระคายเคือง ความผิดปกติของต่อมสร้างเคอราติน โรคอโตอิมมูน มะเร็งหรือเนื้องอก และปัจจัยที่ส่งผลแน่นอน คือ การติดเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ จากการอักเสบของหูชั้นกลางและการเปลี่ยนแปลงของรอยโรค ส่งผลให้ความเป็นกรดและความชื้น ภายในช่องหูเปลี่ยนแปลงหรือปัจจัยที่มาจากความผิดปกติของระบบในร่างกาย เช่น ภูมิแพ้ การแพ้อาหาร เป็นต้น [1] สาเหตุทั้งหมดสามารถนำไปสู่การระคายเคืองในช่องหู และสร้างสารคัดหลั่งออกมามาก ทำให้การไหลเวียนของโลหิตลดลง สภาพแวดล้อมในช่องหูเปลี่ยนไปเหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมักพบเป็นแบคทีเรียแกรมลบและปล่อยสารพิษ เอ็นไซม์ หรือกรดไขมันออกมาทำให้เกิดการอักเสบมากขึ้น [2] สุนัขจะมีอาการคัน สันหับบวม มีสิ่งคัดหลั่งออกมากในช่องหู [3] วิธีการวินิจฉัยโรค โดยการป้ายเชื้อจากสิ่งคัดหลั่งจากหู ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อสาเหตุส่วนใหญ่คือ *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli*, *Pasteurella*, *Klebsiella* spp. และ *Enterobacter* [4] สำหรับการรักษาช่องหูอักเสบต้องทำความสะอาด เอาสิ่งคัดหลั่งออกก่อน เช็ดทำความสะอาดใบหูด้วยสารมีฤทธิ์เป็นกรด เช่น 2.5% lactic acid และ 0.1% salicylic acid เพื่อช่วยปรับความเป็นกรดภายในช่องหูไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย [3] หลังจากนั้นให้ยาปฏิชีวนะ โดยยาที่นิยมเลือกใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ เจนตามัยซิน นิโอมัยซิน คลอแรมเฟนิคอล เดดตราไซคลิน [5] อาจใช้ยากุ่มกลูโคคอร์ติคอย ร่วมด้วย ซึ่งการใช้ยาเหล่านี้อาจมีปัญหา เกิดผลข้างเคียงต่อสัตว์และเชื้อเหล่านี้มักพบปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะ ดังนั้นจึงมีแนวคิดทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียด้วยสมุนไพรไทย

Clausena harmandiana จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae ชื่อสามัญเรียกแตกต่างกันไปตามแต่ละพื้นที่ โดยทั่วไปเรียก “สอฟ้าแดง” เป็นไม้พุ่มสีเขียวขนาดเล็ก ลำต้นตรง สามารถพบได้ตลอดทั้งปี พบได้ทั่วไปตามทุ่งหญ้าป่าผลัดใบ และขึ้นได้ดีในดินร่วนถึงร่วนปนทราย จังหวัดที่พบได้แก่ขอนแก่น อุรธานี ร้อยเอ็ด เป็นต้น ประโยชน์ของสอฟ้าแดงยอดอ่อนของใบสามารถใช้เป็นอาหาร และเป็น

อาหารสัตว์ในธรรมชาติสำหรับทะเล่ของโค กระบือ และสัตว์ป่า ส่วนเปลือกรกนำมาใช้เป็นสมุนไพรบรรเทาอาการปวดท้อง [6] ปวดศีรษะ ลดไข้ [7] แสดงให้เห็นว่าส่วนประกอบในพืชชนิดนี้อาจจะมีสารบางอย่างที่สามารถยับยั้งความเจ็บปวดหรือการอักเสบได้ นอกจากนี้ฤทธิ์ของเปลือกรกต้นส้มฟ้าแดงยังสามารถต้านเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) [8] สารออกฤทธิ์คือ 5-hydroxydentatin [7] มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) ต้านเชื้อรา (*Candida albicans*) มีผล cytotoxicity สามารถต้านเซลล์มะเร็ง NCI – H187 [7,9] และสามารถช่วยลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้ [6] การสกัดสารจากเปลือกรก ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ทำให้สามารถทราบถึงสารตัวที่ออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อต่างๆ โดยสารประกอบหลักของพืชในวงศ์ Rutaceae คือ สารประกอบ coumarins และ cabazoles [7, 8, 10, 11] ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านเนื้องอก ต้านการอักเสบ ต้านไวรัส HIV ต้านการกลายพันธุ์และต้านออกซิเดชัน [6] จากการศึกษาท่อน้ำ พบว่า เปลือกรกของต้นส้มฟ้าแดงซึ่งสกัดด้วยเฮกเซน มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคช่องหู อักเสบในสุนัข [12] และการทดลองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากเปลือกรกต้นส้มฟ้าแดงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และเมทานอลต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคช่องหูอักเสบในสุนัข พบว่าการสกัดด้วยเมทานอล มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ดีกว่าเอทิลอะซิเตท และจากการทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบต้นส้มฟ้าแดงในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์พบว่า ใบของต้นส้มฟ้าแดงมีสารต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหูอักเสบในสุนัข ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter*, *Staphylococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila* [13] นอกจากนี้พืชที่อยู่ในวงศ์ Rutaceae เช่น ใบของ *Clausena heptaphylla* ซึ่งสกัดด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* และ *Salmonella paratyphi* [10] แสดงให้เห็นถึงผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แต่สำหรับส่วนลำต้นส้มฟ้าแดงยังไม่เคยมีการทดลองว่ามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้หรือไม่ ดังนั้น ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของส่วนลำต้นของต้นส้มฟ้าแดง และเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของส่วนลำต้น เปลือกรก และใบของต้นส้มฟ้าแดงจากต้นเดียวกัน โดยทำการทดลองในสภาวะเดียวกันและสกัดสารโดยวิธีเดียวกัน เพื่อจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับ ต้นส้มฟ้าแดงต่อไป และเพื่อเป็นการส่งเสริมการนำสมุนไพรไทยมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคในสัตว์ เพื่อลดปัญหาคือยาจากการใช้ยาปฏิชีวนะ รวมทั้งปัญหาผลข้างเคียงของยาปฏิชีวนะต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมสารสกัด

สกัดสารจากต้นส้มฟ้าแดงที่อบแห้งและบดละเอียดแล้วด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ โดยนำส่วน

เปลือกกรากมาจำนวน 103.4 กรัม ส่วนลำต้น 96.9 กรัม และใบ 78.1 กรัม แช่ใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ 150 มิลลิลิตร วางบนเครื่องปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ไมครอน แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นละลายด้วย methyl alcohol และ dichloromethane ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วใส่สารในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร ทำการสกัดเช่นนี้ 4 ครั้ง แล้วตั้งไว้ในเครื่องดูดความชื้นเพื่อให้สารละลายระเหยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้สารสกัดหยาบ นำเก็บในตู้เย็น 5-8 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 5 ไอโซเลต *Staphylococcus aureus* จำนวน 5 ไอโซเลต *Proteus* spp. จำนวน 5 ไอโซเลต *Escherichia coli* จำนวน 5 ไอโซเลต และ *Klebsiella* spp. จำนวน 5 ไอโซเลตซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหูอักเสบในสุนัข และ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถูกเพาะใน blood agar นาน 24 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนิของเชื้อมา 3-5 โคโลนิ เพื่อเตรียมเชื้อแบคทีเรียใน Mueller-Hinton Broth (Difco, Becton Dickinson, USA) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2-4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland เจือจางด้วยน้ำเกลือ 1:100 จะได้สารละลายแบคทีเรียเข้มข้นประมาณ 1×10^6 CFU/ml

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

การทดลองทำตามมาตรฐานของ NCCLS โดยการชั่งสารสกัดหยาบ 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง ละลายโดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 3 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านหัวกรอง 0.45 ไมโครเมตร จะได้สารละลายของเปลือกกราก ลำต้น และใบส่องฟ้าแดงเพื่อนำมาทดสอบต่อไป เติมน้ำ Mueller Hinton Broth 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1-11 หลุมที่ 12 เติมน้ำ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ 50 ไมโครลิตร เติมน้ำในหลุมแรกของไมโครเพลท แล้วเจือจางให้ความเข้มข้นลดลง 2 เท่าตามลำดับด้วย Mueller Hinton Broth จนถึงหลุมที่ 10 โดยมีหลุมที่ 11 และ 12 เป็นหลุมควบคุมผลบวกและลบ ตามลำดับ

สำหรับยาปฏิชีวนะเงินตามัยซิน (Sigma® SIGMA-ALDRICH, USA) เจือจางเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร ในการทดลองกับ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ 250 ไมโครลิตร ในการทดลองกับ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ใส่หลุมละ 50 ไมโครลิตร ในหลุมที่ 1 ถึง 11 โดยมีหลุมที่ 12 เป็นหลุมควบคุม แล้วอบไมโครเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การอ่านผล

สังเกตความสามารถในการยับยั้งเชื้อด้วยตาเปล่าโดยดูจากความขุ่น หลุมที่ใสถือว่าเป็นฤทธิ์สามารถยับยั้งเชื้อได้ นำสารละลายจากหลุมที่ใส ไปเพาะเชื้อใน Standard plate count agar (Difco,

Becton Dickinson, USA) 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เพื่อยืนยันผล บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายจาก Standard plate count agar ที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญเป็นค่า MBC

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

การทดลองจากตัวอย่างทั้งหมด 25 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกข้อมูล เป็นระดับของความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ และทำการตรวจสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วย Kolmogorov-Smirnov test พบว่าข้อมูลมีการแจกแจงไม่เป็นปกติ จึงเลือกใช้สถิติแบบไม่อิงพารามิเตอร์ (Mann-Whitney test หรือ Kruskal-Wallis test ขึ้นกับจำนวนกลุ่มตัวอย่าง) โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ และใช้โปรแกรม SPSS version 17.0 สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการศึกษา

ผลต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากสมุนไพรสองฟ้าแดงในการยับยั้งเชื้อก่อโรคช่องหูส่วนนอกอักเสบในสุนัข จำนวน 25 ตัวอย่าง โดยวิธี Microdilution broth method พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* โดยมี *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เป็นเชื้อควบคุมมาตรฐาน และยาเจนตามัยซินเป็นยาควบคุมมาตรฐานการทดลอง ผลการทดลองแสดงผลเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) โดยผลการทดลองแสดงใน **Table 1**

ผลการทดสอบตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่พบในโรคช่องหูชั้นนอกอักเสบในสุนัข จำนวน 5 ชนิด กับ สารสกัดจากสมุนไพรสองฟ้าแดง พบว่าส่วนลำต้นของต้นสองฟ้าแดงมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหูชั้นนอกอักเสบในสุนัข นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากส่วนของลำต้น เปลือกกราก

Table 1. Median (Mean \pm SD) of MBC Values of *Clausena harmandiana* Extracts Against Bacteria Isolated from Otitis Externa in Dogs

Bacteria	MBC values of <i>Clausena harmandiana</i> (mg/ml)		
	Stem	Root bark	Leaf
<i>Klebsiella</i> spp.	55.56(62.5 \pm 20.83) ^{a,A}	111.1(111.11 \pm 19.64) ^{a,B}	69.44(66.67 \pm 11.62) ^{a,A}
<i>Escherichia coli</i>	83.33(72.57 \pm 21.56) ^a	97.22(88.89 \pm 28.80) ^{a,b}	55.56(55.56 \pm 13.89) ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.94(9.85 \pm 6.96) ^b	9.55(20.31 \pm 18.05) ^c	17.36(17.19 \pm 9.11) ^b
<i>Proteus</i> spp.	55.56(50.00 \pm 7.61) ^{a,A}	69.44(61.80 \pm 11.09) ^{b,A}	41.67(38.89 \pm 3.81) ^{c,B}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^{a,b}	41.67(42.02 \pm 16.21) ^a	41.67(39.59 \pm 9.82) ^c	27.78(31.95 \pm 6.21) ^c
Total	47.52(47.40 \pm 26.29) ^{A,B}	63.80(64.34 \pm 37.59) ^A	41.67(42.05 \pm 19.84) ^B

^{A,B}Within the same row, different capital letter superscripts indicate a significant difference.

^{a,b,c}Within the same column, different lower-case letter superscripts indicate a significant difference.

และใบของต้นส่่งฟ้าแดง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรครูขุ่นนอกอักษในสุนัข ได้แก่ *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp. และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยส่วนของลำต้นมีค่ามัธยฐานของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้เท่ากับ 55.56, 83.33, 6.94, 55.56 และ 41.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนของเปลือกกราก มีค่า 111.1, 97.22, 9.55, 69.44 และ 41.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และส่วนของใบมีค่า 69.44, 55.56, 17.36, 41.67 และ 27.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียของส่วนใบและราก กรณีเชื้อ *Staphylococcus aureus* มีความไวต่อฤทธิ์ของสารสกัดมากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น และพบว่า *Klebsiella* spp. และ *Escherichia coli* มีความไวน้อยกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น และเมื่อเปรียบเทียบ สารสกัดจากส่วนลำต้น ใบ และราก พบว่า *Staphylococcus aureus* มีความไวต่อฤทธิ์ของสารสกัด มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น โดยสรุป ทั้งสารสกัดจากลำต้น เปลือกกราก และใบ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรครูขุ่นนอกอักษในสุนัขทั้ง 5 ชนิด โดยสารสกัดจากใบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าราก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จาก **Table 2** เมื่อนำสารสกัดของต้นส่่งฟ้าแดงมาเปรียบเทียบ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียใน (MBC) กับยาเจนตามัยซิน พบว่า เชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 มีค่า MBC น้อยกว่าค่า มัธยฐานของทั้ง 3 ส่วนของสารสกัดจากต้นส่่งฟ้าแดง 43 เท่า และกรณีเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 มีค่า MBC น้อยกว่าสารสกัดจากสมุนไพรส่่งฟ้าแดง 3 เท่า

วิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากลำต้นของต้นส่่งฟ้าแดง มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรครูขุ่นนอกอักษในสุนัข ได้แก่ เชื้อ *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp. และ *Pseudomonas aeruginosa* เช่นเดียวกับสารสกัดจากเปลือกกราก [12] และสารสกัดจากใบต้นส่่งฟ้าแดง [13] นอกจากนี้ผลเปรียบเทียบจากการทดลองนี้พบว่า ทั้งสารสกัดจากลำต้น เปลือกกราก และใบ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรครูขุ่นนอกอักษในสุนัขทั้ง 5 ชนิด โดยสารสกัดจากส่วนลำต้นและใบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าเปลือกกราก อย่างมีนัย

Table 2. Median (Mean \pm SD) of MBC Values of *Clausena harmandiana* and Gentamicin

Bacteria	MBC values(mg/ml)	
	<i>Clausena harmandiana</i>	Gentamicin
<i>Escheriahia coli</i> ATCC25922	83.33(97.22 \pm 55.12) ^a	1.95(3.25 \pm 4.66) ^b
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	5.21(9.11 \pm 8.88) ^a	1.56(1.52 \pm 0.74) ^b

^{a,b} Within the same row, different lower-case letter superscripts indicate a significant difference.

สำคัญทางสถิติ และพบว่าสารสกัดจากต้นสอ่งฟ้าแดงทั้งสามส่วนมีผลดีต่อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ เนื่องจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* มีความไวต่อสารสกัดมากกว่า *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella spp.* โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา คือการศึกษาการสกัดเปลือกกรากสอ่งฟ้าแดงด้วยเฮกเซน [12] และการศึกษาผลต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบต้นสอ่งฟ้าแดงที่สกัดด้วยเอทานอล [13]

อย่างไรก็ดีสารสกัดที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นสารสกัดหยาบซึ่งมีข้อมูลว่าสารออกฤทธิ์ในพืชชนิดนี้ คือ coumarins และ cabazoles [8-11] โดยมีกลไกในการยับยั้ง Protein kinase C และ Topoisomerase II ซึ่ง Topoisomerase II เป็นเอ็นไซม์ที่ควบคุมการสร้าง DNA [14] จากผลการทดลองนี้ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกกราก ลำต้น และใบต้นสอ่งฟ้าแดงมาก เนื่องจากสารสกัดมิได้เป็นสารสกัดบริสุทธิ์เหมือนเจนตามัยซิน แต่เป็นเพียงสารสกัดหยาบ ดังนั้นหากมีงบประมาณเพียงพอ ควรใช้วิธีการสกัดสารโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี [6,8,11] จะทำให้ได้สารออกฤทธิ์ที่บริสุทธิ์และเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ เช่น เจนตามัยซินต่อไปอย่างไรก็ดีในอนาคตหากมีการนำสมุนไพรสอ่งฟ้าแดงไปประยุกต์ใช้ อาจปรับระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากสารบริสุทธิ์ เพื่อให้สารสกัดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากส่วนลำต้นของต้นสอ่งฟ้าแดงว่ามีฤทธิ์เช่นเดียวกับเปลือกกรากและใบหรือไม่ ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนการศึกษานี้จึงเป็นการรายงานผลครั้งแรกที่พบว่าสารสกัดจากส่วนลำต้นของต้นสอ่งฟ้าแดงมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคหูอักเสบในสุนัขเช่นเดียวกับเปลือกกรากและใบ และเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในด้านแบคทีเรียของสารสกัดจากส่วนลำต้น เปลือกกรากและ ใบ สารสกัดจากส่วนของลำต้นและใบ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าเปลือกกรากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ดีจากการศึกษาของ Thongthoom et al. [9] สามารถแยกพบสารจากเปลือกกรากที่มีผล cytotoxicity ต่อเซลล์มะเร็งชนิด NCI-H187 ด้วย นอกจากนี้สอ่งฟ้าแดงยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ด้านเนื้องอก ด้านการอักเสบ ด้านไวรัส HIV ด้านการกลายพันธุ์และต้านออกซิเดชัน [6] ดังนั้นต้นสอ่งฟ้าแดงจึงเป็นสมุนไพรไทยที่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับต่อไป และจากการศึกษานี้สามารถเป็นแนวทางการเลือกใช้สารสกัดจากเปลือกกราก ลำต้น และใบ ของต้นสอ่งฟ้าแดงในการนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาโรคอื่นๆทั้งในคนและในสัตว์ต่อไป และเป็นแนวทางในการพัฒนาปรับปรุงเพื่อเพิ่มทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียโดยการใช้สมุนไพรไทยนอกจากการใช้ยาปฏิชีวนะในทางคลินิกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวอุไรวรรณ ส่งเสียง นักศึกษาปริญญาเอก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย

ขอนแก่น ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและให้คำแนะนำในการสกัดสาร หัวหน้าภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่อนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการในการทดลอง และขอขอบคุณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นและทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนทุนวิจัยในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. Ninkovic G, Dullo V, Saunder NC. Microbiology of otitis externa in the secondary care in United Kingdom and antimicrobial sensitivity. *Auris Nasus Larynx*. 2008;35:480-484.
2. Kiss G, Radvanyi Sz, Szigeti G. New combination for therapy of canine otitis externa I. microbiology of otitis externa. *J Small Anim Pract*. 1997;38:51-56.
3. Cole KL, Kwochka WK, Kawalski JJ, Hillier A, Hoshaw W, Stacy L. Evaluation of an ear cleanser for the treatment of infection otitis externa in dog. *Vet Ther*. 2003;4:12-23.
4. Hariharan H, Coles M, Poole D, Lund L, Page R. Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Can Vet J*. 2006;47:253-255.
5. Rycroft AK, Saben HS. A clinical study of otitis externa in the dog. *Can Vet J*. 1977;18:64-70.
6. Noipha K, Thongthoom T, Songsiang U, Boonyarat C, Yenjai C. Carbazoles and coumarins from *Clausena harmandiana* stimulate glucose uptake in L6 myotubes. *Diab Res Clin Pract*. 2010;90: 61-71.
7. Thongthoom T, Yenjai C, and Phaosiri C. Biologocal activities of carbazoles and coumarins from the roots of *Clausena haemandiana*. *Pure and Applied Chemistry International Conference*. 2009; 401-403.
8. Yenjai C, Sripontan S, Sriprajun P, Kittakoop P, Jintasirikul A, Tanticharoen M. Coumarins and carbazoles with antiplasmodial activity from *Clausena harmandiana*. *Planta Med*. 2000;66:277-279.
9. Thongthoom T, Yenjai C, Phaosiri C. Cytotoxicity of carbazoles and new derivatives from *Clausena harmandiana* against NCI-H187 cancer cells. *National Graduate Research Conference*. CGAU and Khon Kaen University. 2009; Feb:12-13.
10. Soharab MH, Mazid MA, Rahman E, Hasan CM, Rashid MA. Antibacterial activity of *Clausena heptaphylla*. *Fitoterapia*. 2001;72:547-549.
11. Maneerat W, Ritthiwigrom T, Cheenpracha S, Prawat U, Laphookhieo S. Clausenawallinines A and B, two dimeric carbazole alkaloids from the root of *Clausena wallichii*. *Tetrahedron Lett*. 2011 ;52:3303-3305.
12. Chatchawanchonteera A, Keeratikulapas P, Mungmai N, Chitsanoor S, Boottasri A, Kaenchumpa P, et al. Antimicrobial activity of *Clausena harmandiana* extract against bacteria isolated from dogs with otitis externa. *KKU Vet J*. 2009;19:48-55.
13. Chatchawanchonteera A, Wangboonsakul J, Supakit T, Benjamaparinayakul M, Numkang L. Antibacterial activity of *Clausena harmandiana* leaf extract against pathogenic bacteria isolated from animals. *KKU Vet J*. 2011;21:61-68.
14. Yoshida K, Yamaguchi T, Shinagawa H, Taira N, Nakayama KI, Mikil Y. Protein Kinase C activates topoisomerase II to induce apoptotic cell death in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*. 2006;45:3414-3431.