ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากสัตว์ของสารสกัดจากใบพลู (*Piper betle* Linn.)

Inhibition Effect of *Piper betle* Extract on Clinical Isolated *Pseudomonas aeruginosa* from Animals

อารินี ชัชวาลชลธีระ[1] วชิราภรณ์ กัมปนาวราวรรณ[1] โยธิน พันธ์ศรี[1] เจริญ ภูศรี[1]
กวีรัช พิมพ์ศิริ[1] อุมาพร ใหม่แก้ว[1] อุทิศ หลักแก้ว[1] ณัฐวุฒิ พรหมนิการ[1]
Arinee Chatchawanchonteera[1] Wachiraporn Kampanawarawan[1] Yotin Pansri[1] Charoen Poosri[1]
Kaweerat Pimsiri[1] Umaporn Maikaew[1] Utis Lakkaew[1] Nuttawoot Poemnikorn[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพลู (*Piper betle* Linn.) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากสัตว์จำนวน 8 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Disk diffusion susceptibility test โดยมีเจนตามัยซินและเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 เป็นตัวควบคุม พบว่า สารสกัดจากใบพลูสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 100-400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ *Escherichia coli* ที่ความเข้มข้น 50-400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนเจนตามัยซินให้ผลยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ที่ความเข้มข้น 50-800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

คำสำคัญ: สารสกัดจากใบพลู เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เจนตามัยซิน เชื้อ *E.coli*
Keywords: *Piper betle* Linn, *Pseudomonas aeruginosa*, gentamicin, *E.coli*

[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 *Piper betle* was extracted and tested in vitro to evaluate the inhibitory effect on 8 clinical isolated *Pseudomonas aeruginosa* by disk diffusion susceptibility test, together with gentamicin and *Escherichia coli* ATCC 25922 as controls. This study showed that *Piper betle* extract can inhibit all *Pseudomonas aeruginosa* isolates at concentration of 10-400 mg/ml and *Escherichia coli* at 50-400 mg/ml whereas gentamicin can inhibit both *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* at 50-800 μg/ml.

บทนำ

ใบพลู (*Piper betle* Linn.) เป็นสมุนไพรไทยที่มีผลต้านจุลชีพได้หลายชนิด เช่น เชื้อราก่อโรคผิวหนัง (นพมาศ และคณะ, 2547) หรือแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* (Jenie et al., 2001) โดยพบว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในพลูได้แก่ Cavicol, Cavibetol (Dutt, 1956; Nigam and Rurohit, 1962; Evans et al.,1984; Rimando et al., 1986) Carvacrol, Eugenol and Allilpyrocatechol ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม phenol (Jenie et al., 2001)

โรคติดเชื้อแบคทีเรียทางสัตวแพทย์ มีหลายชนิด เชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญตัวหนึ่ง ซึ่งมักจะดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่ง ขนาดกลาง สามารถก่อโรคโดยการสร้าง exotoxin, enterotoxin, endotoxin, proteases และ haemolysins เชื้อจะมี pili ใช้ยึดเกาะกับ endothelial cell และบางสายพันธุ์ยังมีแคปซูล ซึ่งเป็น antiphagocytic pyocin และ pigments แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพ สาเหตุโน้มนำการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ได้แก่ บาดแผล ภาวะอ่อนแอจากโรคมะเร็งหรือภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือการใช้ยาปฏิชีวนะระยะยาว โดยโรคที่เชื้อนี้ก่อในสัตว์พบได้หลายชนิด ได้แก่ เต้านมอักเสบ ข้ออักเสบ หูอักเสบ การติดเชื้อที่ตา กระเพาะปัสสาวะอักเสบ เยื่อบุหัวใจอักเสบและภาวะโลหิตเป็นพิษ เป็นต้น (Quinn et al., 1994)

P. aeruginosa เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั่วไปสูง (Chen et al., 1995; Muramatsu et al., 2003; Subrahmanyam, 2003) ในขณะที่การใช้ยาปฏิชีวนะก็มีผลต่อปัญหาการดื้อยา ปัญหาการตกค้างของยา รวมทั้งปัญหาในการเพิ่มต้นทุนการผลิตสัตว์ ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อของใบพลู เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่ง ซึ่งอาจทดแทนหรือลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะในปศุสัตว์ในอนาคต โดยเป็นการศึกษาวิจัยข้อมูลเบื้องต้น เพื่อนำไปสู่การศึกษาในระดับต่อไป

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมสารสกัดพลู

เตรียมใบพลูโดยล้าง ผึ่งให้แห้งแล้วหั่นละเอียดปริมาณ 1 ส่วน ต่อ 95% เอทธานอล 5 ส่วน (W/V) ใส่ในโถแก้ว เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์จากใบพลู ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นกรองเก็บสารสกัดโดยทำการสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้เข้มข้นโดยเครื่อง rotary evaporator (EYELA, Owl Scientific, Inc.) แล้วนำไปอบในตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง หรือจนสารสกัดมีลักษณะข้นเหนียว นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบ

การเตรียมเชื้อ

เตรียมเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกจากสัตว์ป่วยในโรงพยาบาลสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเป็นตัวอย่างจากสุนัข โค และสุกร จำนวน 3, 1, 4 ตัวอย่างตามลำดับ รวม 8 ตัวอย่าง ใน brain heart infusion broth ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน 0.5 Mcfarland (ปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml) จากนั้น ป้ายเชื้อแบบ 3 ทิศทางบน Mueller Hinton agar

ส่วนเชื้อมาตรฐาน *E.coli* ATCC 25922 มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เตรียมในลักษณะเดียวกัน

การเตรียมสารละลายพลูและยามาตรฐาน

ละลายสารสกัดพลู 0.8 กรัมด้วย 50% เอทธานอล 1 มล. ด้วย votex mixer จากนั้นเจือจาง 2 เท่าตามลำดับ จะได้ความเข้มข้นของสารละลายพลูเป็น 400, 200, 100, 50, 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

สำหรับยามาตรฐาน เจนตามัยซิน (gentamicin) เจือจางยาด้วย 4% เอทธานอล 2 เท่า ตามลำดับ ให้ได้ความเข้มข้น 800, 200, 50, 12.5, 3.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์

หยดยามาตรฐานและสารสกัดพลู ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบน sterile disc ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้ววาง disc ลงบนเชื้อที่เตรียมไว้ ความเข้มข้นละ 2 disc กรณี 4% และ 50% เอทธานอล ซึ่งเป็นตัวควบคุม วาง disc ลงบนจานเชื้อทันทีเมื่อเอทธานอลซึมลงในแผ่น disc หมด จากนั้นอบเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง

การอ่านผลและการวิเคราะห์ผล

อ่านผลการยับยั้งเชื้อจากบริเวณ clear zone ที่เกิดโดยวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางในหน่วยมิลลิเมตร บันทึกผล

วิเคราะห์ผลโดยสถิติเชิงพรรณนา และเปรียบเทียบขนาดของ clearzone โดยใช้ Random Effect Model วิธี ANOVA ในโปรแกรม SAS 6.12 Proc. Mixed เพื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดในสัตว์ต่างชนิดกัน โดยให้ผลจากแต่ละตัวอย่างเป็น random effect และ Paired t-test ในโปรแกรม SAS 6.12 Proc. Means เพื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดพลูกับเจนตามัยซิน

ผลการทดลอง

สารสกัดพลูมีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* ในโค สุนัข และสุกร โดยแสดง inhibition zone ตั้งแต่ความเข้มข้น 100-400 mg/ml

เจนตามัยซินมีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* ในโค สุนัข และสุกร โดยแสดง inhibition zone ตั้งแต่ความเข้มข้น 50-800 μg/ml

สารสกัดพลูและเจนตามัยซิน ให้ผลยับยั้งเชื้อ *E.coli* ตั้งแต่ความเข้มข้น 100-400 และ 50-800 mg/ml ตามลำดับ

ผลการยับยั้งของสารสกัดพลูต่อเชื้อ *P. aeruginosa* และ *E.coli* แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดัง Table 1 และ Table 2 ตามลำดับ

Table 1 Means± standard deviations of clear zone diameters against P. Aeruginosa.

Animal species	N	Concentration of *Piper betle* (mg/ml)			Concentration of gentamicin (μg/ml)		
		400	200	100	800	200	50
Bovine*	1	13.5	11.5	11.0	31.0	17.5	9.0
Canine	3	16.5±1.3	14.2±2.8	10.8±0.4	29.7±0.3	18.3±0.6	10.5±0.5
Porcine	4	15.6±0.8	11.1±0.6	9.7±0.8	25.4±2.0	12.8±4.9	11.4±1.3
Total	8	15.7±1.3[b]	12.3±2.2[c]	10.3±0.8[c]	27.7±2.8[a]	15.4±4.3[b]	10.8±1.2[c]

* Not the average.

a,b,c : different alphabets in the same row means significant difference ($p<0.01$)

Table 2 Clear zone diameter of *Piper betle* extract and gentamicin against *E.coli* ATCC 25922.

Clear zone diameter of Piper betle (mm.)					Clear zone diameter of gentamicin (mm.)					Control	
400 mg/ml	200 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	800 µg/ml	200 µg/ml	50 µg/ml	12.5 µg/ml	3.125 µg/ml	4% EtoH	50% EtoH
20.5±0.7	20±0	15.5±0.7	12±0	-	30±1.4	22±1.4	16±0	-	-	-	-

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพลูต่อเชื้อ *P. aereginosa* เพื่อเปรียบเทียบขนาด clear zone ของสารสกัดพลูและเจนตามัยซิน พบว่า สารละลายเจนตามัยซิน เข้มข้น 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ขนาด clear zone สูงที่สุด และสูงกว่าอันดับรองคือสารสกัดพลูเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ขนาด clear zone อันดับ 3 ที่ได้จากสารละลายเจนตามัยซิน เข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างจากขนาด clear zone ของสารสกัดพลูเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ($p>0.05$) ส่วนขนาด clear zone ของสารละลายเจนตามัยซิน เข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับสารสกัดพลูเข้มข้น 200 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่กลุ่มนี้มีขนาด clear zone ที่ต่ำกว่าสารสกัดพลูเข้มข้น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$)

เมื่อเปรียบเทียบขนาด clear zone ที่ได้จากตัวอย่างในสุนัข และสุกรที่สารละลายแต่ละความเข้มข้น พบว่า ขนาด clear zone ของสัตว์ 2 ชนิดนี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.009$) เมื่อใช้สารละลายเจนตามัยซิน เข้มข้น 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่านั้น การใช้สารละลายสกัดพลูหรือเจนตามัยซินที่ความเข้มข้นอื่นไม่มีผลต่อขนาด clear zone ในสุนัขและสุกร

สรุป และวิจารณ์

โดยสรุป ตามขนาด clear zone สามารถเป็น 3 กลุ่ม ที่แตกต่างกันทางสถิติ โดยกลุ่มแรกได้แก่เจนตามัยซิน 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กลุ่มที่ 2 ได้แก่ พลู 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเจนตามัยซิน 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มที่ 3 ได้แก่เจนตามัยซิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พลู 200 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นั่นคือ สารสกัดพลูเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพด้อยกว่าเจนตามัยซิน 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากสารละลาย เจนตามัยซิน 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตามมาตรฐานของ The National Committee on Clinical Laboratory Standard for Susceptibility Test (NCCLS, 1993) ได้กำหนดมาตรฐานของยาเจนตามัยซิน ต่อ *E.coli* ATCC 25922 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/disc (เส้นผ่าศูนย์กลาง disc 6 มิลลิเมตร) จะเกิด clear zone กว้าง 19-26 มิลลิเมตร พบว่า สอดคล้องกับการทดลองนี้ ซึ่ง clear zone ที่เกิดมีความเข้มข้นที่ 4-16 ไมโครกรัม /disc

ขนาด clear zone มากกว่าหรือเท่ากับ 15 มิลลิเมตร เป็นระดับที่ยอมรับว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีความไวต่อยาเจนตามัยซิน 10 μg/disc (เส้นผ่าศูนย์กลาง disc 6 มิลลิเมตร) (NCCLS, 1993) ซึ่งถ้าใช้เกณฑ์นี้ เชื้อ *P. aeruginosa* มีความไวต่อ สารสกัดพลู ที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งหากมีการศึกษาในระดับต่อไป เช่น การนำไปทดลองใช้บนตัวสัตว์โดยตรง ในอนาคตอาจสามารถนำสารสกัดพลูไปประยุกต์ใช้รักษาโรคในสัตว์ที่เกิดจากการติดเชื้อ *P. aeruginosa* แทนยาปฏิชีวนะได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.ขวัญเกศ กนิษฐานนท์ ที่กรุณาช่วยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ผศ.ดร.สาธร พรตระกูลพิพัฒน์ และ ผศ.เจษฎา จิวากานนท์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาอนุเคราะห์ยาเจนตามัยซิน ภาควิชาพยาธิชีววิทยา และภาควิชาเภสัชวิทยา ที่อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

นพมาศ ตระการรังสี อารินี ชัชวาลชลธีระ วัชรี คุณกิตติ. 2547. การพัฒนาพลูครีมเพื่อใช้ในการรักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อราซึ่งติดต่อสู่กันระหว่างคนและสัตว์ การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. หน้า 441-448.

Chen, H.Y., Yuan, M., Ibrahim-Elmagboul, I.B. and Livermore, D.M. 1995. National survey of susceptibility to antimicrobials amongst clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 35(4): 521-534.

Dutt, S. 1956. The India "pan" and its essential oil. Indian Soap J. 12 : 275-282.

Evans, P.H., Brower, W.S. and Flunk, E.J. 1984. Identification of fungicidal and hematocidal components in the leaves of *Piper betle* (Piperaceae). J. Agr. Food Chem. 32(6): 1254-1256.

Jenie, B.S.L., Andrawulan, N., Puspitasari-Nienaber, N.L. and Nuraida, L. 2001. Antimicrobial activity of *Piper betle* Linn. extract towards foodborne pathogens and food spoilage microorganisms. IFT Annual Meeting - New Orleans, Louisiana. 6th June 2001.

Muramatsu, H., Horii, T., Morita, M., Hashimoto, H., Kanno, T. and Maekawa, M. 2003. Effect of basic amino acids on susceptibility to carbapenems in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Int. J. Med. Microbiol. 293: 191-197.

NCCLS. 1993 . Performance Standard for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Approve stand M2-a5. NCCLS. Villanova, Pa. 126 p.

Nigam, S.S. and Rurohit, R.M. 1962. Chemical examination of the essential oil of the leave of the *Piper betle*. Peichstoffe Aromen. 12: 185-190.

Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Mosby-Year Book. Europe Limited. London, England. pp. 237-242.

Rimando, A.M., Han, B.H., Park, J.H. and Cantoria, M.C. 1986. Study of constituents of Philipin *Piper betle* leaves. Arch pharm Res. 9(2): 93-97.

Subrahmanyam, M., Hemmady. A.R. and Pawar, S.G. 2003. The sensitivity to honey of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. Annals of Burns and Fire Disasters. 16(2): 1-4.