



รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต่อแบคทีเรียที่ดื้อยา
(Antibacterial activity of the pericarp of *Garcinia magostana* against
drug resistant bacteria)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต่อแบคทีเรียที่ดื้อยา (Antibacterial activity of the pericarp of *Garcinia magostana* against drug resistant bacteria)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภก. ดร. เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ

สาขาวิชาเภสัชวิทยา

สำนักกีฬาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นางศศิณีวัฒน์ พิทักษ์ทิม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551-2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต่อแบคทีเรียที่ดื้อยา ในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2551-2553 ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณ คุณไปรดา เชยประทับ คุณนงลักษณ์ อยู่แท้ กุล ที่ช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และคุณโยธิน ดีโรสง ที่ช่วยทั้งการทำวิจัยและวิเคราะห์ผลงานวิจัยในครั้งนี้ด้วยความทุ่มเท คุณอาทิตย์ แพงมา ที่ช่วยให้ความสะดวกและให้คำปรึกษาในเรื่องการทำ SDS-PAGE คุณอนุชิต เรืองวิทยานนท์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและให้คำปรึกษาการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อนุเคราะห์ทั้งอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยจนประสบผลสำเร็จ



บทคัดย่อภาษาไทย

ในปัจจุบันนี้ อุบัติการณ์คือยาแบบหลายชนิดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและฉวยโอกาสมีมากขึ้นเรื่อยๆ ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อชีวิตของผู้ป่วยและบุคลากรทางการแพทย์ในโรงพยาบาลที่จะมีโอกาสติดเชื้อ งานวิจัยที่จะหาสารต้านแบคทีเรียใหม่ๆ ที่ทำให้อาณานิคมเชื้อแบคทีเรียชนิดบีตาแลคแทมเหล่านี้ยากกลับมาใช้ได้เหมือนเดิมจึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญและความต้องการอย่างเร่งด่วน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด เมื่อใช้แบบเดี่ยวๆ และร่วมกับยาต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดบีตาแลคแทม ผลของมังคุดแก่ถูกนำมาสกัดและพิสูจน์เอกลักษณ์ การใช้เครื่องสกัดแบบชอกเลท ทำให้ได้สารสกัดหยาบไคคโลโรมีเทน สารสกัดย่อยที่ 3 และแอลฟา-แมงโกสทิน จากนั้นได้นำสารหลักไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเอนเอมอาร์ พบว่าได้แก่สารแอลฟา-แมงโกสทิน เมื่อเทียบกับเอกสารอ้างอิง ค่ายับยั้งต่ำสุดของสารสกัดหยาบไคคโลโรมีเทน สารสกัดย่อยที่ 3 แอลฟา-แมงโกสทิน และออกซาซิลลิน ต่อเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ซาโพรไฟติกัส ที่คือออกซาซิลลิน (โออาร์เอสเอส) มีค่า 50, 31, 8 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่ายับยั้งต่ำสุดของสารสกัดเหล่านี้เมื่อใช้เดี่ยวๆหรือผสมกับออกซาซิลลิน พบว่า เชื้ออี โคไลและอี โคไลเอเซที่คือต่อเซพตาซิม มีค่าคือต่อสารเหล่านี้ในทุกกลุ่มของสารที่ทดลอง ดังนั้นผลการทดสอบบ่งชี้ว่า สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดเหล่านี้ มีความแรงในการต้านเชื้อโออาร์เอสเอสเหนือกว่าออกซาซิลลินเดี่ยวๆ ผลการทำซอกเคอบอร์คบ่งชี้ว่า ค่าเอฟไอซี อินเดก ของสารสกัดหยาบไคคโลโรมีเทน สารสกัดย่อยที่ 3 และแอลฟา-แมงโกสทินเมื่อผสมกับออกซาซิลลิน ในการต้านเชื้อโออาร์เอสเอส มีผลเสริมฤทธิ์กันที่ค่า 0.25, 0.138, และ 0.375 ตามลำดับ กราฟยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เมื่อได้รับสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดเหล่านี้ผสมกับออกซาซิลลิน พบว่าการเจริญของเชื้อนี้ที่ 6-24 ชั่วโมงลดลงอย่างมาก ผลจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า สารสกัดเหล่านี้ รวมถึงแอลฟา-แมงโกสทิน เมื่อผสมกับออกซาซิลลิน ที่ค่าต่ำกว่าค่าการยับยั้งต่ำสุดต่อเชื้อนี้ พบว่า ทำให้เซลล์จำนวนมากขนาดเล็กกว่าเซลล์กลุ่มควบคุม รูปร่างเซลล์บิดเบี้ยวและเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหายในเซลล์จำนวนมาก นอกจากนั้นแล้ว การทดสอบการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นใน พบว่า ไม่ว่าจะใช้สารสกัดจากพืชนี้เดี่ยวๆหรือผสมกับออกซาซิลลิน ที่ค่าต่ำกว่าค่าการยับยั้งต่ำสุดต่อเชื้อนี้ ทำให้เพิ่มการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นใน นอกจากนั้นแล้ว การทดสอบเอสดีเอส-เพจ พบว่า สารผสมเหล่านี้เมื่อใช้เดี่ยวๆหรือผสมกับออกซาซิลลิน ทำให้เบนของโปรตีนที่หนักกว่าหายไป ในขณะที่พบเบนที่เบากว่าเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า ออกซาซิลลิน มีฤทธิ์ต้านเชื้อโออาร์เอสเอสน้อยมาก ในขณะที่สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดเหล่านี้ มีความแรงสูงกว่ายาเมื่อใช้เดี่ยวๆนี้มาก ยิ่งไปกว่านั้นส่วนผสมของสารสกัดเหล่านี้ โดยเฉพาะแอลฟา-แมงโกสทินและออกซาซิลลิน แสดงฤทธิ์เสริมกันในการต้านเชื้อนี้อย่างชัดเจน ดังนั้น การค้นพบนี้ เป็นเครื่องพิสูจน์ว่า สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดเหล่านี้ ออกฤทธิ์เสริมกับออกซาซิลลินเพื่อให้ออกซาซิลลินสามารถนำกลับมาใช้ใหม่กับเชื้อที่คือต่อยาคำนี้แล้ว

กล่าวโดยสรุป การเสริมฤทธิ์ที่เกิดขึ้น อาจมาจากสองกลไกของสารผสมเหล่านี้ กลไกแรก มาจากการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่สัมพันธ์กับเปปทิโดไกลแคนและเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย กลไกที่สอง มาจากการเพิ่มการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นใน สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดเหล่านี้มีความปลอดภัยสูงสำหรับการรักษา ด้วยเหตุนี้ อาจสามารถพัฒนาสารเหล่านี้ โดยนำมาผสมกับออกซาซิลลินในการต้านเชื้อโออาร์เอสเอส ซึ่งในปัจจุบันคือต่อยาในกลุ่มเพนิซิลลินแทบทุกตัว การทดสอบนี้กระทำในหลอดทดลอง ยังคงต้องทดสอบในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ต่อไป ถ้าเป็นไปได้ ระบุสารในเลือดและเนื้อเยื่อต้องสามารถอยู่ในระดับที่เสริมฤทธิ์กันได้



บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

In the recent years, incidence of multidrug resistance in pathogenic and opportunistic bacteria has been increasingly documented. These bacteria pose life-threatening risks to the hospitalized patients and their care givers. The search for novel antibacterial agents that can reverse the resistance to β -lactam antibiotics are research objectives of far reaching importance and urgently needed. Thus, the objective of this study was to investigate the activity of bioactive compounds from the pericarp extract of *Garcinia mangostana* L. (GML) against drug resistant bacteria, when use alone and in combination with β -lactams antibiotic. The mature GML fruits extraction and identification methods were accomplished. The CH_2Cl_2 crude extract, Fr₃ extract, and α -Mangostin were extracted by Soxhlet extraction. Then, the main compound structure is identified as α -mangostin using NMR compared with the reference. The MIC values of CH_2Cl_2 crude extract, Fr₃ extract, α -mangostin and oxacillin against clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* (ORSS) revealed 50, 31, 8 and 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. However, the MIC values of GML extracts either alone or in combination with oxacillin exhibited high resistant against both ceftazidime-resistant *E. coli* and ceftazidime-resistant *E. cloacae* strains in all treated compounds. So that, these results indicated that bioactive compounds from GML extract revealed a great deal higher potency against ORSS than oxacillin alone. The checkerboard results displayed that the FICs index of CH_2Cl_2 crude extract, Fr₃ and α -mangostin plus oxacillin revealed synergistic effects at 0.25, 0.138, and 0.375 respectively against ORSS strain. The killing curves proved that the combination of these GML extracts plus oxacillin caused a marked decrease of ORSS cells within 6 h and throughout 24 h periods. The TEM method exhibited that the effect of the combination of oxacillin plus these GML extract compounds including α -mangostin at sub-MIC value on ORSS revealed great deal smaller than the control cells, cell shape distortion and cell envelope damage in most of these cells. In addition, the OM and CM permeabilization results demonstrated that either bioactive compounds from this plant including α -mangostin alone or in combination with oxacillin at sub MIC value steady increased the OM and CM permeability of this strain. Besides, the SDS-PAGE results exhibited that there was an absence of protein bands at higher MW whereas appeared darker at lower MW of either bioactive compounds from this plant including α -mangostin alone or in combination with oxacillin at sub MIC value treated cells compared to control.

From these results, it can be concluded that the oxacillin had little activity against ORSS strain. Whereas, biochemical compounds of GML extracts showed rather higher potency than oxacillin alone against this strain. Moreover, the combination of oxacillin and these bioactive compounds, especially α -

mangostin, obviously showed great synergism activity against this strain. So, our findings provide evidence that these GML extract compounds have the synergistic effect with oxacillin to reverse bacterial resistance to oxacillin against this resistant strain.

To conclude, this activity may be involved two mechanisms of action by these GML extract compounds in combination with oxacillin. The first is on the bacterial membrane peptidoglycan associated protein synthesis inhibition. The second mode of action is steady increase OM and CM permeabilization. These GML extract compounds including α -mangostin have a sufficient margin of safety for therapeutic use. For this reason, these extract compounds offer for the development of a valuable adjunct to oxacillin against ORSS, which currently almost penicillins resistance. These in vitro results have to be still confirmed in an animal or in humans test. If possible, blood and tissue levels would be achievable to work synergistically.



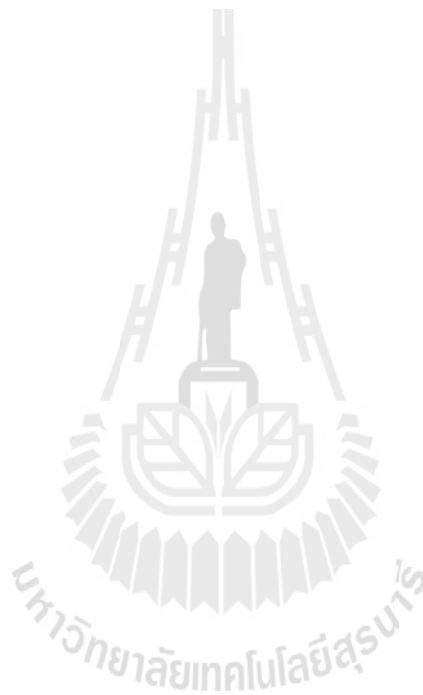
สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	5
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
เอกสารและผลงานที่เกี่ยวข้อง.....	6
แหล่งที่มาของข้อมูล	18
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	22
บทที่ 3 ผลการวิจัย	
คุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและผลผลิตจากสารสกัดจากเปลือกมังคุด ..	29
Bacterial suspensions viable absorption standard curve.....	33
MIC determination.....	36
Checkerboard determination.....	37
Killing curve determinations.....	41
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM).....	42
การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane permeability).....	50
การซึมผ่านเยื่อหุ้มไซโทพลาสติก (Cytoplasmic membrane (CM) permeability).....	51
Electrophoresis และ SDS-PAGE.....	52
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	
การวิเคราะห์และอภิปรายผลการวิจัย	54

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	56
บรรณานุกรม	57

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	
Output ที่ได้จากโครงการวิจัย	66
ประวัติผู้วิจัย	67



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตาราง 2.1 การถ่ายทอด genetic material ของแบคทีเรีย.....	15
ตาราง 3.1 The 300 MHz ¹ H NMR (acetone-d6) spectral data of α -mangostin.....	31
ตาราง 3.2 The 300 MHz ¹³ C NMR (acetone-d6), spectral data of α -mangostin.....	32
ตาราง 3.3 Minimum inhibitory concentration of the following β -lactams and bioactive compounds from the pericarp of GML extract against clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> , ceftazidime– resistant <i>E. coli</i> , ceftazidime –resistant <i>E. cloacae</i> , oxacillin-sensitive <i>S. aureus</i> and ceftazidime-sensitive <i>E. coli</i>	36
ตาราง 3.4 Summary the FICs for checkerboard assay of β -lactams used alone and in combination with bioactive compounds from the pericarp of GML extract against the drug resistant bacteria.....	38

สารบัญภาพ

รูปภาพ	หน้า
รูป 1.1 The <i>Garcinia mangostana</i> Linn tree, the appearance of mangosteen fruit, and the chemical structures of xanthones included in the pericarps.....	3
รูป 2.1 <i>Structure of bacterial cell</i>	9
รูป 2.2 Comparison of the thick cell wall of gram-positive bacteria with the comparatively thin cell wall of gram-negative bacteria.....	9
รูป 2.3 Common structure of penicillin and site of cleavage by penicillinase.....	11
รูป 2.4 Summary of antimicrobial agents that inhibit cell wall synthesis.....	12
รูป 2.5 <i>chemical structure and general properties of oxacillin</i>	13
รูป 2.6 <i>chemical structure and general properties of ceftazidime</i>	14
รูป 2.7 Bacterial conjugation.....	15
รูป 2.8 Mechanisms of antibiotic resistance.....	16
รูป 2.9 Bacteria transfer genetic material.....	17
รูป 3.1 HPLC chromatograms of standard α - mangostin obtained from Indofine chemical, Fr ₃ extract, CH ₂ Cl ₂ crude extract and α -mangostin extract.....	29
รูป 3.2 Structure of α -mangostin from NMR chromatogram.....	30
รูป 3.3 ¹ H NMR spectroscopic data of α -mangostin extracted.....	31
รูป 3.4 ¹³ C NMR spectroscopic data of α -mangostin extracted.....	33
รูป 3.5 Standard curves for suspensions of oxacillin-resistant <i>Staphylococcus saprophyticus</i> DMST 27055.....	34
รูป 3.6 Standard curves for suspensions of ceftazidime-resistant <i>Escherichia coli</i> DMST 19629.....	34
รูป 3.7 Standard curves for suspensions of ceftazidime-resistant <i>Enterobacter cloacae</i> DMST 21394.....	35
รูป 3.8 Standard curves for suspensions of oxacillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	35

รูป 3.9 Standard curves for suspensions of ceftazidime-sensitive <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	36
---	----

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปภาพ	หน้า
รูป 3.10 Isobologram constructed from checkerboard MIC data showing antibacterial combination of oxacillin plus CH ₂ Cl ₂ crude extract against clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> DMST 27055.....	39
รูป 3.11 Isobologram constructed from checkerboard MIC data showing antibacterial combination of oxacillin plus Fr ₃ extract against clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> DMST 27055.....	39
รูป 3.12 Isobologram constructed from checkerboard MIC data showing antibacterial combination of oxacillin plus α -mangostin against clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> DMST 27055.....	40
รูป 3.13 The effect of oxacillin combined with bioactive compounds from the pericarp of GML extract on the clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> DMST 27055.	41
รูป 3.14 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> grown for 4 h in Mueller–Hinton broth.....	42
รูป 3.15 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> grown for 4 h in Mueller–Hinton broth.....	43
รูป 3.16 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> grown for 4 h in Mueller–Hinton broth.....	44
รูป 3.17 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> grown for 4 h in Mueller–Hinton broth.....	45
รูป 3.18 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> grown for 4 h in Mueller–Hinton broth.....	46
รูป 3.19 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> grown for 4 h in Mueller–Hinton broth.....	47
รูป 3.20 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> grown for 4 h in Mueller–Hinton broth.....	48

รูป 3.21 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> grown for 4 h in Mueller–Hinton broth.....	49
รูป 3.22 Permeabilization of clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> by bioactive compounds from the pericarp of GML extract alone and in combination with oxacillin and lysis.....	50

สารบัญญภาพ (ต่อ)

รูปภาพ	หน้า
---------------	-------------

Figure 4.23 SDS-PAGE showing the bacterial membrane and peptidoglycan associated protein (BMPG) of clinical isolates of oxacillin-resistant <i>S. saprophyticus</i> DMST 27055.....	52
--	----



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

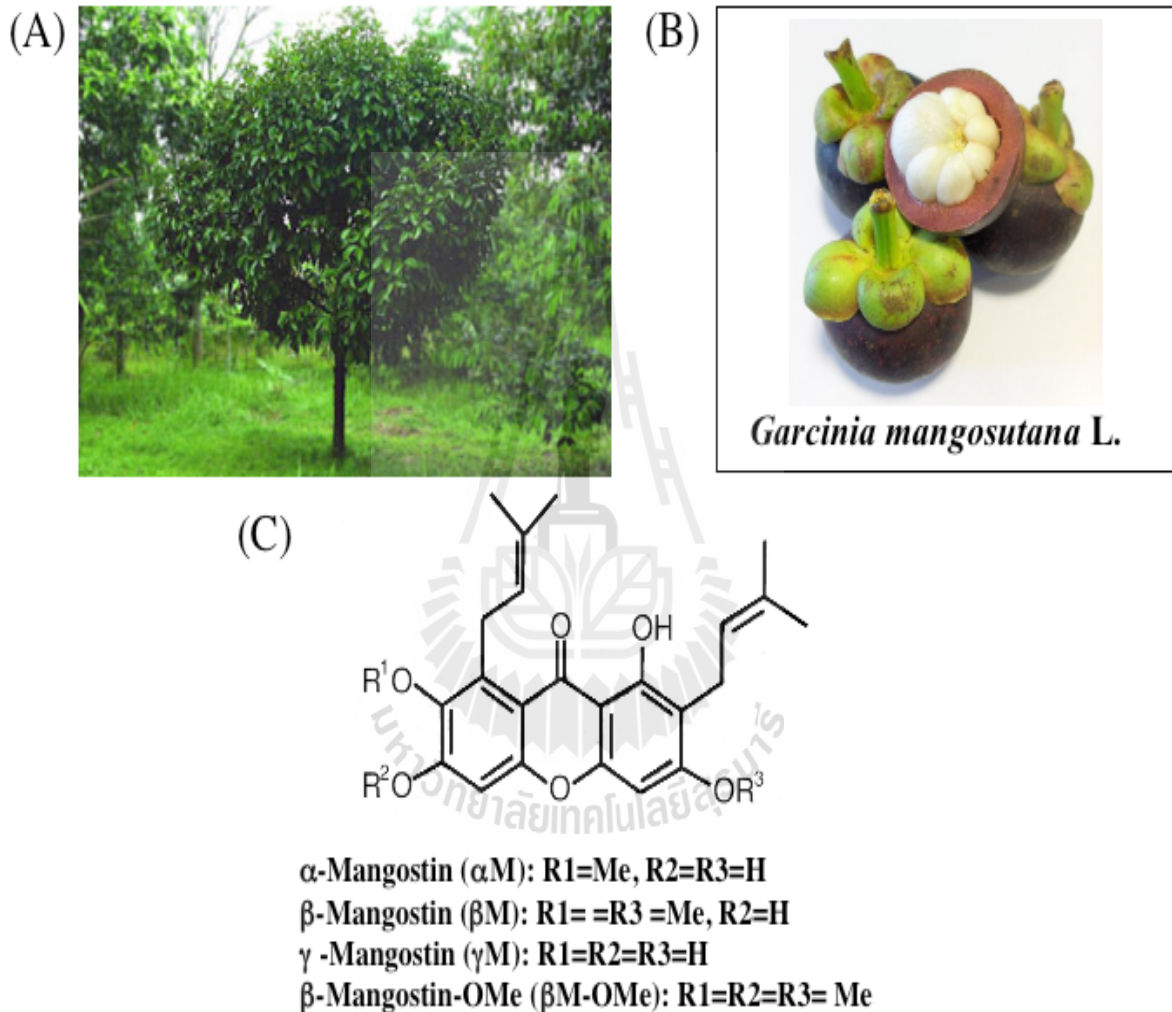
การเกิดขึ้นของการดื้อยาหลายขนานในแบคทีเรียก่อโรคได้เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการค้นหายาปฏิชีวนะ และหาวิธีการใหม่ๆ ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาเหล่านี้มีความจำเป็นอย่างเร่งด่วน ในปีที่ผ่านมาอุบัติการณ์ของการดื้อยาหลายขนานในแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียฉวยโอกาสได้มีรายงานว่าเพิ่มขึ้นอย่างมาก (Jones et al., 2004) แบคทีเรียดื้อยาหลายขนานเหล่านี้ได้สร้างปัญหาทางด้านคลินิกอย่างมาก โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เชื้อแบคทีเรียดื้อยาหลายขนานที่สำคัญที่สุดในระดับโลกได้แก่แบคทีเรียแกรมบวก (เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin, เชื้อ enterococci ที่ดื้อต่อยา vancomycin) และแบคทีเรียแกรมลบ (แบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่สร้างพลาสมิดที่ผลิตเอ็นไซม์บีตาแลคทาเมสชนิดขยาย (plasmid mediated extended spectrum β -lactamase (ES β L)) และอื่นๆ เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, เชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) (Medeiros, 1997; Sajduda et al., 1998) ประมาณร้อยละ 90-95 ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทั่วโลกมีการดื้อต่อยา penicillin (Casal et al., 2005) และส่วนใหญ่พบในประเทศแถบเอเชียร้อยละ 70-80 มีการติดเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่ดื้อต่อยา methicillin (Chambers, 2001) การดื้อยาของเชื้อกลุ่ม Staphylococcal ขยายไปยังยาปฏิชีวนะในกลุ่มบีตาแลคแทมอื่นๆ เช่น ยา methicillin ยา oxacillin และยา flucloxacillin ซึ่งเกิดขึ้นไม่นานหลังจากที่ได้นำยาปฏิชีวนะตัวแรกในกลุ่มนี้มาใช้รักษาและมีอุบัติการณ์การติดเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin (methicillin-resistant *S. aureus* ; MRSA) ในทางคลินิกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Bush, 2004) เชื้อกลุ่ม staphylococci มีแนวโน้มสูงที่จะสะสมยีนดื้อยาปฏิชีวนะและเชื้อ MRSA ส่วนใหญ่ในขณะนี้ได้ขยายการดื้อยาไปยังยาปฏิชีวนะขนานอื่นๆ (Firth, 2003) อีกทั้งรายงานเกี่ยวกับการติดเชื้อในกลุ่ม Enterococci ที่ดื้อต่อยา vancomycin (vancomycin-resistant Enterococci ; VRE) และติดเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลมีการเพิ่มขึ้นทั่วโลกในปลายสุดที่ผ่านมา (Emori and Gaynes, 1993; Leclercq and Courvalin, 1997; Moellering, 1998; Murry, 1997) และมีรายงานที่สำคัญจำนวนมากที่ได้ดำเนินการเพื่อควบคุมการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ VRE (Garner, 1996; Montecalvo et al., 1999; Nourse et al., 2000; Slaughter et al., 1996) และเชื้อ MRSA (Cookson, 1995; Cox et al., 1995; Kotilainen et al., 2001; Voss et al., 1994) เชื้อ *Escherichia coli* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime (Ceftazidime-resistant *E. coli*; CREsC) เชื้อ *Enterobacter cloacae* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime (ceftazidime-resistant *E. cloacae*; CREnC) รวมไปถึงเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลคแทม และเชื้อ MRSA เป็นปัญหาร้ายแรงสำหรับผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาลและผู้ให้การดูแล (Liu et al., 2000; Maharat Nakhonratchasima hospital, 2012; Mulligan et al., 1993)

เชื้อ MRSA เป็นจุลชีพที่พบบ่อยที่สุดของการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ แผลผ่าตัด ระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหารรวมทั้งเชื้อ *Escherichia coli* และเชื้อในกลุ่ม *Enterobacter* spp.

ยาต้านเชื้อแบคทีเรียจากพืชเป็นแหล่งที่น่าสนใจของการรักษาใหม่ๆ เช่น ข่าถูกสกัดสารออกฤทธิ์ที่มีชื่อ galangin ออกฤทธิ์เสริมกับยา penicillin ในการยับยั้งเชื้อ MRSA (Eumkeb et al., 2010) พืชหลายชนิดได้รับความสนใจในฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านการรักษา มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) (GML) อยู่ในวงศ์ Guttiferae ซึ่งเป็นต้นไม้ในเขตร้อนที่เขียวชอุ่มตลอดปี มังคุดมีต้นกำเนิดอยู่ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย พม่า ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย ศรีลังกาและไทย (Morton, 1987) มังคุด (รูป 1.1A) เป็นที่รู้จักกันทั่วไปในประเทศไทยว่าเป็น “ราชินีของผลไม้” ซึ่งมันเป็นที่นิยมมากเนื่องจากมีรสชาติอร่อย ทั้งนี้เปลือกของมันคุดหนา 6-10 มิลลิเมตร สีม่วงเข้มหรือสีแดง (รูปที่ 1.1B) ซึ่งได้ถูกนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในการรักษาอาการท้องร่วง การอักเสบและรักษาแผล (Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992; Peres et al., 2000; Suksamrarn et al., 2006) ผลมังคุดเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสาร phenolic compound เช่น สาร Xanthones สาร condensed tannin และ anthocyanins (Akao et al., 2008; Fu et al., 2007; Jung et al., 2006; Mahabusarakam et al., 1987)

อนุพันธ์ของ xanthone เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สำคัญที่มีอยู่ในผลของ *G. mangostana* (Ji et al., 2007; Mahabusarakam et al., 1987) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Sakagami et al., 2005; Suksamrarn et al., 2003) ต้านเชื้อรา (Gopalakrishnan et al., 1997) ต้านการอักเสบ (Nakatani et al., 2004) ต้านอนุมูลอิสระ (Jung et al., 2006; Yu et al., 2007) ต้านปรสิต (Mahabusarakam et al., 2006) และเป็นพืชต่อเซลล์มะเร็ง (Matsumoto et al., 2005; Suksamrarn et al., 2006)

อนุพันธ์ของ xanthone ที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักจากเปลือกมังคุด ได้แก่ α - และ γ -mangostin (รูป 1.1C) (Chairungrilerd et al., 1996a; b; Chairungrilerd et al., 1996c; Jinsart et al., 1992; Matsumoto et al., 2005; Suksamrarn et al., 2006) การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ α -mangostin ได้รับการยืนยันว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งกับ histamine H1 receptor antagonist (Chairungrilerd et al., 1996a; Iikubo et al., 2002) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่สามารถต้านเชื้อ *Helicobacter pylori* มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ยับยั้งความเสียหายจากสภาวะความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) (Iikubo et al., 2002) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ MRSA (Chomnawang et al., 2009; Iinuma et al., 1996) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเล็กน้อย (Chairungrilerd et al., 1996a) และยับยั้งการสร้าง alveolar duct ในหนู และยับยั้งสารก่อมะเร็งที่ชักนำให้เกิด crypt foci ที่ผิดปกติในแบบจำลองการเกิดมะเร็งในลำไส้ระยะสั้น (Jung et al., 2006; Nabandith et al., 2004) สำหรับ



รูป 1.1 The *Garcinia mangostana* Linn tree (A), the appearance of mangosteen fruit (B), and the chemical structures of xanthenes included in the pericarps (C). ที่มา : Akao et al. (2008)

โรงพยาบาลมหาราชธานีเป็นโรงพยาบาลที่ใหญ่ที่สุดในจังหวัดนครราชสีมา ตั้งอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งพบปัญหาของเชื้อแบคทีเรียคือยาอยู่ในระดับสูงในหลาย ๆ ส่วนของโรงพยาบาลแห่งนี้และโรงพยาบาลอื่น ๆ ในประเทศไทยและทั่วโลก (Jungthirpanich et al., 2000; Kusum and Dejsirilert, 2003; Maharat Nakhonratchasima hospital, 2012)

อย่างไรก็ตามยังไม่มียานที่ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากมังคุดต่อแบคทีเรียที่ยาบางสายพันธุ์ เช่น เชื้อ *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*) เชื้อ *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) และเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) วัตถุประสงค์ของงานวิจัยชิ้นนี้คือการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต้านเชื้อแบคทีเรียที่ยาเมื่อใช้เดี่ยวๆและใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่ม บีตา-แลคแทม ดังนั้นการพัฒนายาต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่มใหม่อาจจะได้รับการพัฒนา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ α -mangostin หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต่อแบคทีเรียที่ยาเมื่อใช้เดี่ยวๆ
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ α -mangostin หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต่อแบคทีเรียที่ยาเมื่อใช้ร่วมกับยาต้านเชื้อแบคทีเรีย
3. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของ α -mangostin หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต่อแบคทีเรียที่ยาเมื่อใช้เดี่ยวๆและใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy :TEM) ศึกษาการซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นในของเซลล์แบคทีเรีย และวิธี electrophoresis

ขอบเขตของการวิจัย

1. ผลมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) ที่ซื้อมาจากตลาดท้องถิ่นในนครราชสีมา ประเทศไทย เปลือกของผลมังคุดจะถูกนำมาสกัดและแยกสาร α -mangostin หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ด้วยวิธีการที่มีการปรับเปลี่ยนจากเอกสารอ้างอิงเล็กน้อย
2. เชื้อ *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*) เชื้อ *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) และเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) ซึ่งทั้งหมดเป็นเชื้อที่ได้แยกจากคลินิก โดยได้รับมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย และ American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. ยา Oxacillin และยา ceftazidime สั่งซื้อมาจาก Sigma, Bristol-Myers
4. การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของ α -mangostin หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ และยาปฏิชีวนะด้วยวิธี checkerboard assay ที่มีค่า MIC ต่ำสุดจะถูกเลือกนำมาศึกษาต่อไป เช่น การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable count) กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน การซึมผ่านของเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นใน และ electrophoresis

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้รับความรู้ทางวิทยาศาสตร์เพิ่มเติมเกี่ยวกับการเสริมฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของสารผสมระหว่างยา oxacillin และ α -mangostin หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด และยาปฏิชีวนะในการต้านแบคทีเรียคือยา
2. ทราบความรู้ใหม่ๆ จากการศึกษาต่อเพิ่มเติม เช่น กลไกการออกฤทธิ์ของ α -mangostin หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต้านแบคทีเรียคือยาในสัตว์และมนุษย์
3. ผลจากการศึกษานี้ อาจจะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาสูตรผสมขนานใหม่เพื่อต้านเชื้อแบคทีเรียคือยา
4. ผลของการศึกษาจะเป็นประโยชน์กับแพทย์และผู้ป่วยโดยการนำยาสูตรผสมขนานใหม่ไปใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียคือยาที่เป็นอันตราย



บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

เอกสารและผลงานที่เกี่ยวข้อง

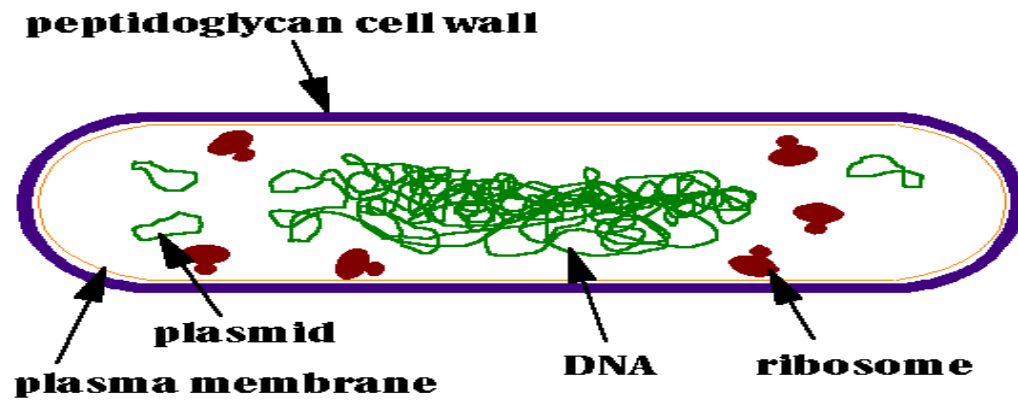
มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) (GML) อยู่ในวงศ์ Guttiferae ผลไม้ชนิดนี้มักจะรับประทานเป็นของหวาน อีกทั้งยังสามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น น้ำมังคุด แยม เยลลี่ และน้ำตาล เมล็ดของมันสามารถรับประทานได้หลังจากการต้มหรือย่าง อย่างไรก็ตามเปลือกมังคุดมีสารออกฤทธิ์และมีฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยาที่หลากหลาย

สารออกฤทธิ์ทางชีววิทยาที่ได้มีรายงานในมังคุด ได้แก่ α - mangostin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม xanthone ชนิดแรกที่สกัดได้จากผลมังคุด (Schmid, 1855) นอกจากนี้ยังพบอนุพันธ์ของ xanthone อื่นๆ เช่น สาร β - mangostin สาร γ -mangostin สาร gartanin สาร garcinone E สาร 1,5-dihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-3-methoxy สาร 1,7-dihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-3-methoxyxanthone สาร mangostinone (รูป 1.1C) (Asai et al., 1995) และสาร garcinone B (Suksamrarn et al., 2003) เปลือกมังคุดได้ถูกนำมาใช้เป็นยาต้านการอักเสบ ยา ผดผามาน และใช้ในการรักษาโรคท้องร่วง อีกทั้งยังมีรายงานว่าสาร α -mangostin สาร γ -mangostin และสาร mangostanol มีฤทธิ์ในการยับยั้ง cAMP phosphodiesterase (Chairungsrilerd et al., 1996a; b; Chairungsrilerd et al., 1996c) นอกจากนี้สารสกัดจากเปลือกมังคุดได้ถูกนำมาใช้ในทางแพทย์แผนโบราณในประเทศไทยสำหรับรักษาบาดแผล ท้องร่วง และการติดเชื้อที่ผิวหนัง (Nakatani et al., 2002) มังคุดยังได้ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในการรักษาการอักเสบ ท้องร่วง และแผล (Harbbome and Baxter, 1993; Lu et al., 1998)

สำหรับความสำคัญและการใช้ α -mangostin ในปัจจุบันประชากรในหลายๆ ประเทศได้มีการนำเปลือกของมังคุด (*Garcinia mangostana*) มาใช้ในแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาการปวดท้อง ท้องร่วง โรคบิด ผดผดติดเชื้อและแผลเรื้อรัง (Chopra et al., 1956; Pedraza-Chaverri et al., 2008) นอกจากนี้ยังได้มีราย คุ่มสมบัติต่างๆ ของ α -mangostin ได้แก่ α -mangostin สามารถลดออกซิเดชันของไขมันไม่ดีในเลือด (low density lipoprotein: LDL) ที่ถูกชักนำโดย copper และ peroxy radical (Williams et al., 1995) อีกทั้งยังพบว่า α -mangostin ป้องกันการลดลงการใช้ α -tocphenol ที่ถูกชักนำโดย LDL oxidation (Mahabusarakam et al., 2000) เช่นเดียวกับ Jung et al. (2006) ได้แสดงให้เห็นว่า xanthone ชนิดต่างๆ ที่ได้สกัดจากเปลือกของมังคุดหนึ่งในนั้นคือ α -mangostin ซึ่งสามารถกำจัด peroxy nitrite anion นอกจากนี้ xanthones ที่ได้ แยกจากเปลือกผล เปลือกหุ้มเมล็ดและเมล็ดของมังคุด เช่น α - และ β -mangostin และ garcinone B มีฤทธิ์ ในการยับยั้งเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) (Suksamrarn et al., 2003) ในขณะเดียวกัน Lin et al. (1996) พบว่าอนุพันธ์ของ xanthone มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในมนุษย์และสารบางชนิดในกลุ่ม xanthone มี ฤทธิ์ในในการต้านการอักเสบอย่างมาก นอกจากนี้ Iinuma et al. (1996) ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผล ของมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ดังนั้นฤทธิ์ในการต้านเชื้อที่รุนแรงในหลอด ทดลองของอนุพันธ์ของ xanthone สามารถต้าน *S. aureus* ที่คือต่อยา methicillin (MRSA) และไวต่อยา

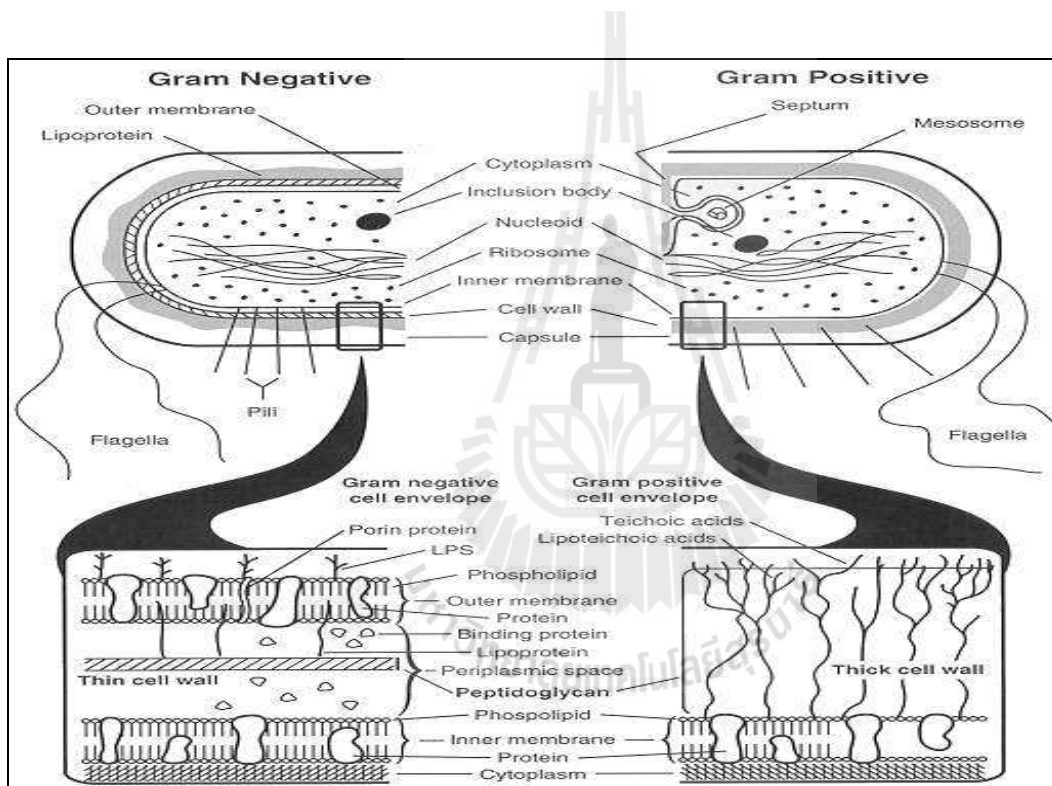
ปัจจุบันวิธีทั่วไปที่ได้มีการพัฒนาเพื่อที่จะได้สารออกฤทธิ์จากมังคุดให้บริสุทธิ์โดยทั่วไปจะใช้ ซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโตกราฟี Chairungsrilerd et al. (1996a; b); Chairungsrilerd et al. (1996c) ได้สกัดจากเปลือกสดของมังคุดด้วย *n*-butanol และทำให้สารสกัดดังกล่าวบริสุทธิ์โดยใช้ซิลิกาเจล คอลัมน์โดยการ elute ด้วย CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -MeOH (9:1) CH_2Cl_2 -MeOH (4:1) และ CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) ตามลำดับ fraction ที่ค่อนข้างมีขี้้นน้อยจะให้สารที่เรียกว่าสาร α -mangostin สาร γ -mangostin และสาร gartanin เป็นต้น ซึ่งได้มีการระบุเอกลักษณ์ของสารในมังคุดด้วย mass spectrometry, infrared spectrometry, ^1H และ ^{13}C NMR สเปกตรัม สำหรับการทำให้ fraction ที่มีขี้้นบริสุทธิ์สามารถทำได้โดยใช้ reverse phase HPLC โดยใช้ MeOH เป็นตัว elute ซึ่งจะให้สาร mangostanol นอกจากนี้ Govindachari et al. (1971) ได้ใช้ซิลิกาเจล คอลัมน์ เพื่อทำให้สารออกฤทธิ์จากส่วนต่างๆของมังคุดบริสุทธิ์ด้วยการ elute ด้วยสารชนิดต่างๆ ตัวอย่างเช่นผลไม้สุกบางส่วนจะถูกแยกด้วย ซิลิกา เจล โครมาโตกราฟี และ elute ด้วย benzene ครั้งแรก elute โดยใช้ 200 มล. จะไม่ได้สารอะไร ต่อไปเพิ่มปริมาณเป็น 250 มล. จะได้ β -mangostin และใช้ 300 มล. จะได้สาร mangostin เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sakagami et al. (2005) ได้สกัดและแยกสาร α - และ β -mangostin จากเปลือกลำต้นของมังคุดซึ่งจะถูกทำให้แห้ง บดเป็นผง และสกัดด้วย hexane, methylene chloride และ methanol ตามลำดับ จากนั้นนำไปแยกโดยใช้ ซิลิกา เจล คอลัมน์ โครมาโตกราฟีโดยใช้ hexane, methylene chloride และ methanol เป็นตัวทำละลาย สารสกัดด้วย hexane และสารสกัดด้วย methylene chloride จะได้สารประกอบที่สำคัญ 2 ชนิด คือ α - และ β -mangostin ซึ่งจะมีสีเหลือง ขณะเดียวกัน Chi et al. (2002) ได้อธิบายวิธีการแยกสารจากเปลือกมังคุดโดยการทำให้แห้งที่ 60°C ในเตาอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3 กิโลกรัมของเปลือกแห้งถูกนำมาสกัดด้วยเอทานอล (25 ลิตร) ที่อุณหภูมิ 50

โครงสร้างหลักที่สำคัญของแบคทีเรีย ได้แก่ 1) เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (cytoplasmic or inner membrane) เป็นส่วนประกอบที่พบทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน ฟอสโฟลิพิด และคาร์โบไฮเดรต (รูป 2.1) ซึ่งทำหน้าที่เป็น osmotic barrier และสังเคราะห์ผนังเซลล์ร่วมไปถึงเป็นที่ฝังตัวของโครโมโซม หน้าที่ที่สำคัญอื่น เช่น เป็นเยื่อเลือกผ่านยอมให้สารบางชนิดผ่านเข้าออกเท่านั้น การทำงานของไซโตโครม ช่วยในการขนส่งสาร และสร้างแรงในการขับเคลื่อนที่ของโปรตรอน (proton motive force) 2) Periplasm เป็นช่องว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มชั้นในของแบคทีเรียแกรมลบ และผนังเซลล์อยู่ในส่วนนี้ periplasm ประกอบด้วยเอ็นไซม์ที่สลายโมเลกุลขนาดใหญ่ ทำลายยาปฏิชีวนะ และโปรตีนที่ช่วยในการขนส่งสารเข้าออกเซลล์ 3) ผนังเซลล์มีโครงสร้างคล้ายใยแมงมุมซึ่งบางครั้งเรียกว่า murein sacculus ที่ประกอบไปด้วย peptidoglycan, teichoic acid และ lipoteichoic acid หน้าที่ของผนังเซลล์นั้นจะช่วยให้เซลล์คงรูปและช่วยควบคุมแรงดันออสโมติกในสิ่งที่ สำหรับการเปรียบเทียบความหนาของผนังเซลล์ระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์ (ชั้น peptidoglycan) หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ (รูป 2.2) 4) เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกซึ่งจะมีเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น ในเยื่อหุ้มชั้นนอกจะมี porins และ โปรตีนที่คุณสมบัติคล้าย porins ซึ่งจะทำหน้าที่ยอมให้บางโมเลกุลหรือจำกัดบางโมเลกุลในการผ่านเข้า-ออก ผนังเซลล์และ periplasm ทั้งนี้องค์ประกอบที่สำคัญต่อทางคลินิกมากของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกที่มีโมเลกุลคล้ายกับฟอสโฟลิพิดที่เรียกว่า lipopolysaccharide (LPS) (Walker, 1999)



รูป 2.1 Structure of bacterial cell.

ที่มา : <http://www.microbeworld.org/img/aboutmicro/bacteria/bactdiag.gif>.



รูป 2.2 Comparison of the thick cell wall of gram-positive bacteria with the comparatively thin cell wall of gram-negative bacteria. Note the complexity of the gram-negative cell envelope (outer membrane, its hydrophobic lipoprotein anchor; periplasmic space).

ที่มา : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.figgrp.294>.

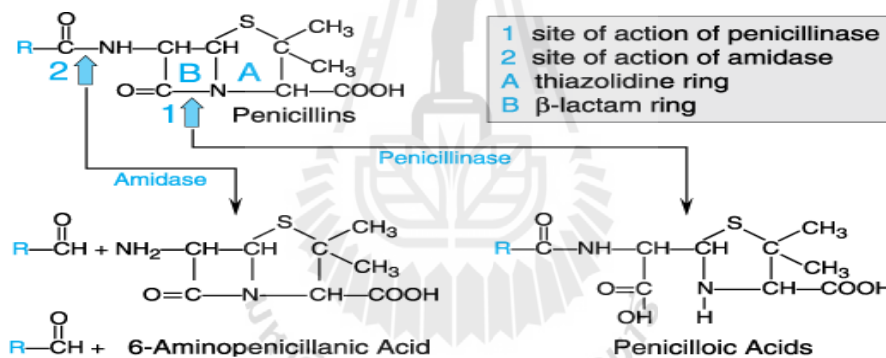
การวิจัยครั้งนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพของ α -mangostin หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อแบคทีเรียคือยาซึ่งแบคทีเรียที่ศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วย เชื้อ *S. saprophyticus* เชื้อ *E. cloacae* และเชื้อ *E. coli*

เชื้อ *S. saprophyticus* เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Staphylococcaceae และจัดเป็น coagulase-negative *Staphylococcus* ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะซึ่งเชื้อได้คือต่อยาปฏิชีวนะ novobiocin เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อทางเดินปัสสาวะซึ่งทำให้เกิด hemagglutination ได้โดยตรง สำหรับ adhesion ของเชื้อ *S. saprophyticus* จะมีโครงสร้าง lactosamine เชื้อชนิดนี้จะสร้างเอ็นไซม์ที่สามารถทำงานได้นอกเซลล์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ การติดเชื้อชนิดนี้พบได้น้อยในผู้ที่สุขภาพดีแต่จะพบได้บ่อยในสัตว์และซากสัตว์ อย่างไรก็ตามเชื้อ *S. saprophyticus* เป็นสาเหตุการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะร้อยละ 10-20 มักพบในเพศหญิงอายุระหว่าง 17-27 ปี ซึ่งเป็นสาเหตุอันดับสองของการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ ขณะเดียวกันเชื้อชนิดนี้อาจจะอาศัยอยู่ในระบบทางเดินปัสสาวะและกระเพาะปัสสาวะ สำหรับอาการของการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ที่พบจะมีอาการรู้สึกปวดแสบขณะขับปัสสาวะ ปัสสาวะบ่อยกว่าปกติ มีปัสสาวะหลงเหลือหลังจากปัสสาวะเสร็จ กระเพาะปัสสาวะอ่อนแรง รู้สึกท้องป่องร่วมกับปวดลิ้นค้ำยมีด โคนบาดบริเวณท้องส่วนล่างรอบๆ บริเวณกระเพาะปัสสาวะและรังไข่ และรู้สึกปวดลิ้นค้ำยมีด โคนบาดในขณะที่มีเพศสัมพันธ์ (Shimeld and Rodgers, 1999) นอกจากนี้การติดเชื้อ *S. saprophyticus* โดยทั่วไปสามารถรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะยังใช้ได้ผล ยกเว้น nalidixic acid สำหรับยา quinolones โดยทั่วไปจะถูกนำมาใช้รักษาการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *S. saprophyticus* (Shimeld and Rodgers, 1999) และพบว่าคือต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม penicillins เช่น ยา oxacillin (Maharat Nakhonratchasima hospital, 2012)

เชื้อ *E. cloacae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจนและใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. cloacae* คือ 30-37 องศาเซลเซียส เชื้อชนิดนี้กระจายอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติและสามารถพบได้ในดิน ผลิตภัณฑ์นม น้ำ และสิ่งปฏิกูล และอาจจะมีอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ได้เช่นเดียวกัน โดยปกติเชื้อชนิดนี้จะไม่ก่อโรคในคนที่มีสุขภาพดีแต่เป็นสาเหตุที่สำคัญของการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือผู้ป่วยที่ร่างกายอ่อนแอ เชื้อ *E. cloacae* เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อบริเวณแผลไฟไหม้ แผลติดเชื้อและการติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ และบางครั้งอาจทำให้เกิดติดเชื้อในกระแสเลือดและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ สำหรับการคือต่อยาปฏิชีวนะนั้นพบว่าคือต่อยา ampicillin และยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่หนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่สองและรุ่นที่สามารถยังสามารรถใช้รักษาการติดเชื้อ *E. cloacae* ได้ผล (Shimeld and Rodgers, 1999)

เชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจนและใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส เชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของลำไส้ส่วนล่างของสัตว์อุ่น โดยปกติเชื้อชนิดนี้จะเข้าอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของเด็กทารกภายใน 40 ชั่วโมงหลังคลอดซึ่งจะมาพร้อมกับอาหารหรือน้ำหรือมาพร้อมกับคนที่สัมผัสกับเด็ก โดยจะไปเกาะที่เยื่อเมือกของผนังลำไส้ใหญ่โดยปกติแล้วเชื้อ *E. coli* จะไม่ก่อโรคแต่ถ้าได้รับปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้เชื้อชนิดนี้ก่อโรคจะทำให้เกิดลำไส้อักเสบ การติดเชื้อทางเดิน

การศึกษาค้นคว้าทดสอบประสิทธิภาพของ α -mangostin หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อแบคทีเรียคือยาเมื่อใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลคแทม เช่น ยา oxacillin และยา ceftazidime เนื่องจากยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลคแทมเป็นยาต้านจุลชีพที่มีประโยชน์ และถูกนำมาใช้บ่อยซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่มนี้จะยับยั้งการสังเคราะห์ peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Laurence et al., 2006) โครงสร้างพื้นฐานของยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลคแทม ประกอบด้วย 5-membered thiazolidine ring เชื่อมติดกับ β -lactam ring (รูป 2.3) ชนิดต่างๆ ของยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้จะถูกกำหนดโดย side chain (R-group) (Tenover, 2006)



รูป 2.3 Common structure of penicillin and site of cleavage by penicillinase

ที่มา : <http://www.accessmedicine.com>

ยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลคแทมประกอบไปด้วย 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ ยากลุ่ม penicillin ยากลุ่ม cephalosporins ยากลุ่ม carbapenems และยากลุ่ม monobactams สำหรับการศึกษาค้นคว้านี้ได้ใช้ยา oxacillin และยา ceftazidime ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม penicillins และกลุ่ม cephalosporins ตามลำดับ

ยากลุ่ม penicillin เป็นยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพครอบคลุมมากที่สุดและมีความเป็นพิษน้อยที่สุดชนิดหนึ่ง อาการไม่พึงประสงค์ที่สำคัญที่เกิดจากการใช้ยากลุ่ม penicillins คือ hypersensitivity ยาต่างๆ ที่ถูกจัดในกลุ่มนี้จะมีความแตกต่างกันที่ side chain ที่ได้เกาะกับ 6-aminopenicillanic acid residue อย่างไรก็ตาม ลักษณะของ side chain ที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อความสามารถในการออกฤทธิ์ของยาที่ครอบคลุมเชื้อต่างๆ ความคงทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร และความไวต่อการถูกทำลายจากเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น (beta-lactamase) รูป 2.4 แสดงกลุ่มของยาที่ส่งผลต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์ (Harvey et al., 2009) ยา oxacillin

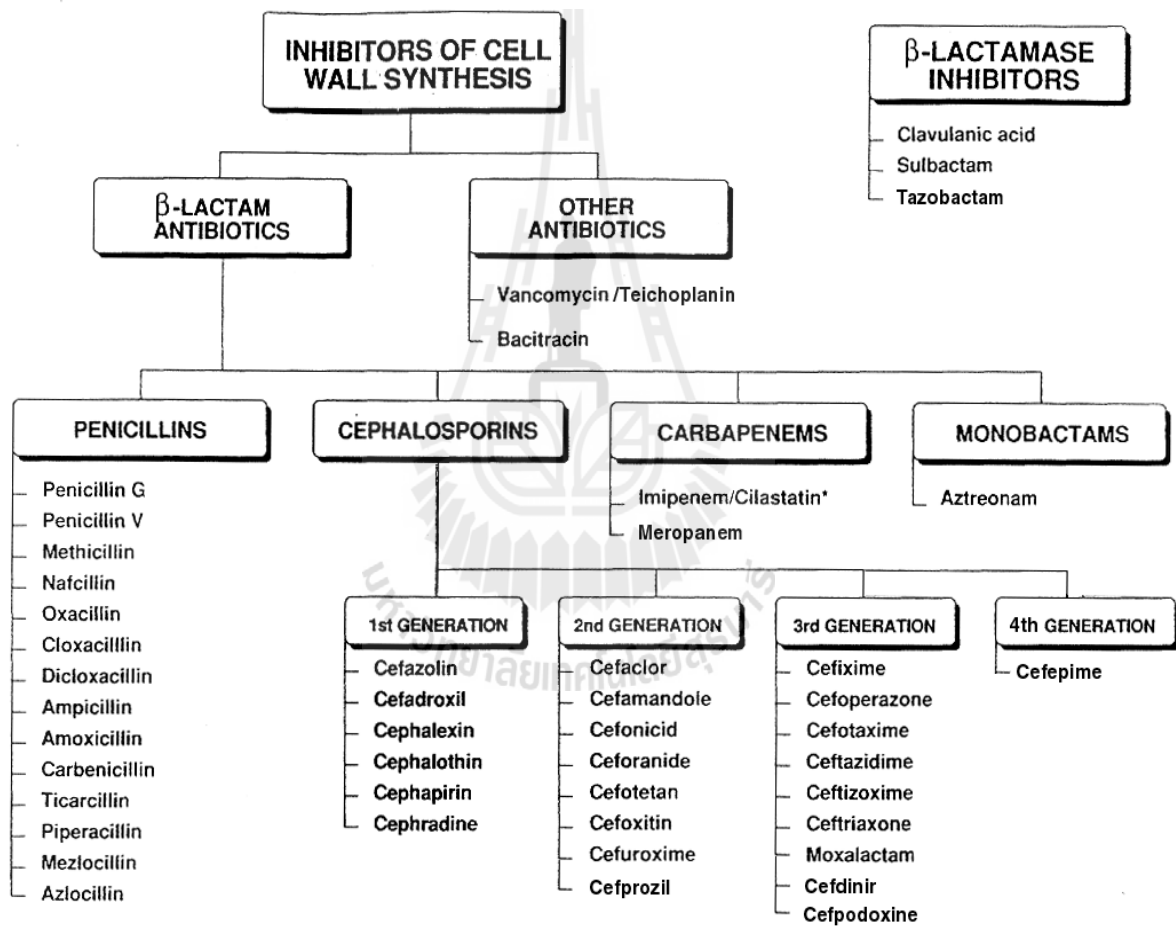
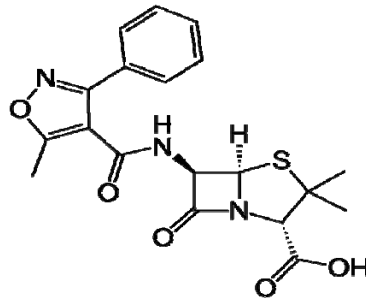


Figure 2.4 Summary of antimicrobial agents that inhibit cell wall synthesis (Harvey et al., 2009)

คุณสมบัติทั่วไปของยา oxacillin



Molecular formular: $C_{19}H_{19}N_3O_5S$

Molecular mass: 401.436 g/mol

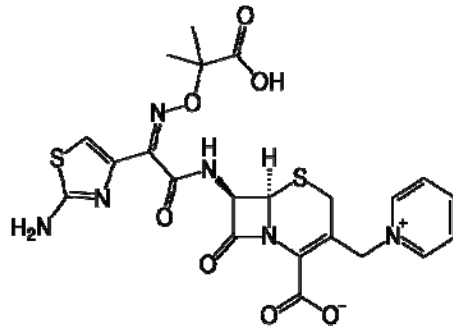
Solubility: Soluble in water and methanol

Appearance: Fine white crystalline powder

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Oxacillin>)

รูป 2.5 chemical structure and general properties of oxacillin

ยาในกลุ่ม *cephalosporins* มีคุณสมบัติคล้ายกับยาในกลุ่ม *penicillins* แต่มีความคงทนต่อเอ็นไซม์บีตาแลคแทมเมสได้หลายชนิดมากกว่า และออกฤทธิ์ครอบคลุมมากกว่ากลุ่ม *penicillins* อย่างไรก็ตามเชื้อ *E. coli* และสายพันธุ์ *Klebsiella* จะมีการแสดงออกของเอ็นไซม์ *extended spectrum β-lactamases* ที่สามารถทำลายยาในกลุ่ม *cephalosporins* ซึ่งกำลังกลายเป็นปัญหาในปัจจุบัน นอกจากนี้ยาในกลุ่ม *cephalosporins* ไม่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *enterococci* และ *L. monocytogenes* (Katzung, 2006) ยา *ceftazidime* ถูกจัดอยู่ในยาในกลุ่ม *cephalosporins* รุ่นที่ 3 ซึ่งเป็นยาที่สังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์กว้าง ยาชนิดนี้ให้โดยการฉีด ยา *Ceftazidime* จะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (*bactericidal activity*) โดยการยับยั้งเอ็นไซม์ที่มีหน้าที่ในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ซึ่งครอบคลุมแบคทีเรียแกรมลบรวมไปถึงสายพันธุ์ที่คือต่อยา *gentamicin* และกลุ่ม *aminoglycosides* ชนิดอื่นๆ นอกจากนั้นยา *ceftazidime* สามารถต้านแบคทีเรียแกรมบวก ยาชนิดนี้มีความคงทนต่อเอ็นไซม์ *β-lactamase* เป็นอย่างมากซึ่งเอ็นไซม์ดังกล่าวถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกทำให้สามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่คือต่อยา *ampicillin* และยาในกลุ่ม *cephalosporins* อื่นๆ ขณะเดียวกันยา *ceftazidime* สามารถต้านเชื้อ *Pseudomonas* และเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ซึ่งการออกฤทธิ์ของยาชนิดนี้ในการต้านเชื้อ *Pseudomonas* เป็นคุณลักษณะของยา *ceftazidime* ที่แตกต่างจากยาในกลุ่ม *cephalosporins* ชนิดอื่นๆ ยา *ceftazidime* มีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียโดยการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์โดยการจับกับ *penicillin-binding proteins (PBPs)* (Brunton et al., 2010) สำหรับโครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติทั่วไปของยา *ceftazidime* แสดงในรูป 2.6



Molecular formular: $C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$

Molecular mass: 546.58 g/mol

Solubility: Soluble in water

Appearance: white or almost white powder

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Ceftazidime>)

รูป 2.6 chemical structure and general properties of ceftazidime

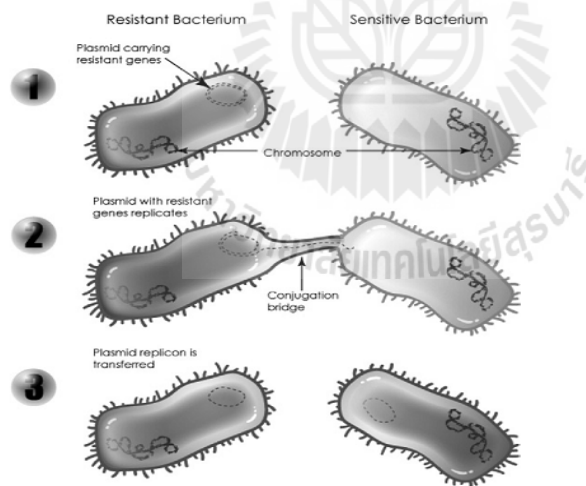
แม้ว่าที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียทุกชนิดประกอบด้วย penicillin-binding proteins (PBPs) แต่อย่างไรก็ตามยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลคแทมไม่สามารถฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกชนิดเพราะแบคทีเรียมีกลไกที่หลากหลายที่ทำให้ดื้อต่อยาเหล่านั้นซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยภายในเซลล์ของจุลชีพเพราะมีโครงสร้าง PBPs ที่เป็นเป้าหมายของยาเหล่านั้นแตกต่างกัน นอกจากนั้นสายพันธุ์ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะอาจจะทำให้เกิดการดื้อยาจากการพัฒนาของ PBPs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งจะทำให้การจับกับยาปฏิชีวนะลดลง การเปลี่ยนแปลงของ PBPs ร่วมกับการจับกับยาปฏิชีวนะลดลงจะได้รับยื่น PBP ระหว่างชนิดของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ขณะที่ 4 ใน 5 ของ PBPs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงของเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* จะมีการจับกับยาปฏิชีวนะลดลงซึ่งเป็นผลของการรวมกันของยีนระหว่างสายพันธุ์ (Brunton et al., 2010)

แบคทีเรียมีการป้องกันตนเองจากภายในตัวเองต่อยาปฏิชีวนะ โดยหน้าที่หรือโครงสร้างทางชีวเคมีที่อาจทำให้ไม่ตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ ขณะเดียวกันแบคทีเรียสามารถดื้อต่อยา 1 ใน 2 ทาง การดื้อยาขั้นแรกเกิดขึ้น โดยการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติซึ่งเหตุการณ์นี้เกิดขึ้นน้อยและการดื้อยาอาจจะถูกถ่ายทอดไปยังลูกหลาน อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ดังนั้นลูกหลานของแบคทีเรียที่ดื้อยาจะได้รับการถ่ายทอดยีนดื้อยา สำหรับการดื้อยาขั้นที่สองจะต้องถ่ายทอดสารพันธุกรรมระหว่างแบคทีเรียชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันผ่านกระบวนการ transduction, transformation และ conjugation (ตาราง 2.1) เนื่องจากแบคทีเรียมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศซึ่งมันจะมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมโดยการสร้าง conjugation bridge จากแบคทีเรียชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน (รูป 2.7) สำหรับสารพันธุกรรมจะอยู่ในพลาสมิด หรือ transporans และอาจมีการถ่ายทอดยีนที่ทำให้ดื้อต่อยาหลายขนานหรือยีนที่ทำให้ดื้อ

ตาราง 2.1 การถ่ายทอด genetic material ของแบคทีเรีย

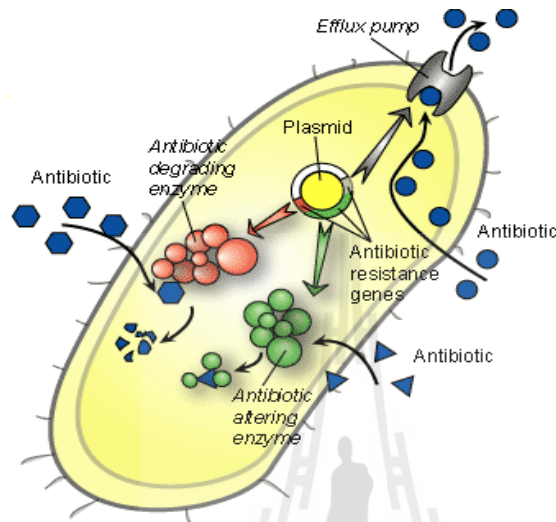
การถ่ายทอด genetic material ของแบคทีเรีย	
Transduction	ไวรัสเป็นตัวพา genetic material จากแบคทีเรียตัวหนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกตัวหนึ่ง
Transformation	แบคทีเรียได้รับ genetic material จากการกินแบคทีเรียที่ตายแล้ว
Conjugation (most common)	แบคทีเรียแลกเปลี่ยนและถ่ายทอด genetic material ผ่านทาง plasmid

ที่มา : Roe (2008)



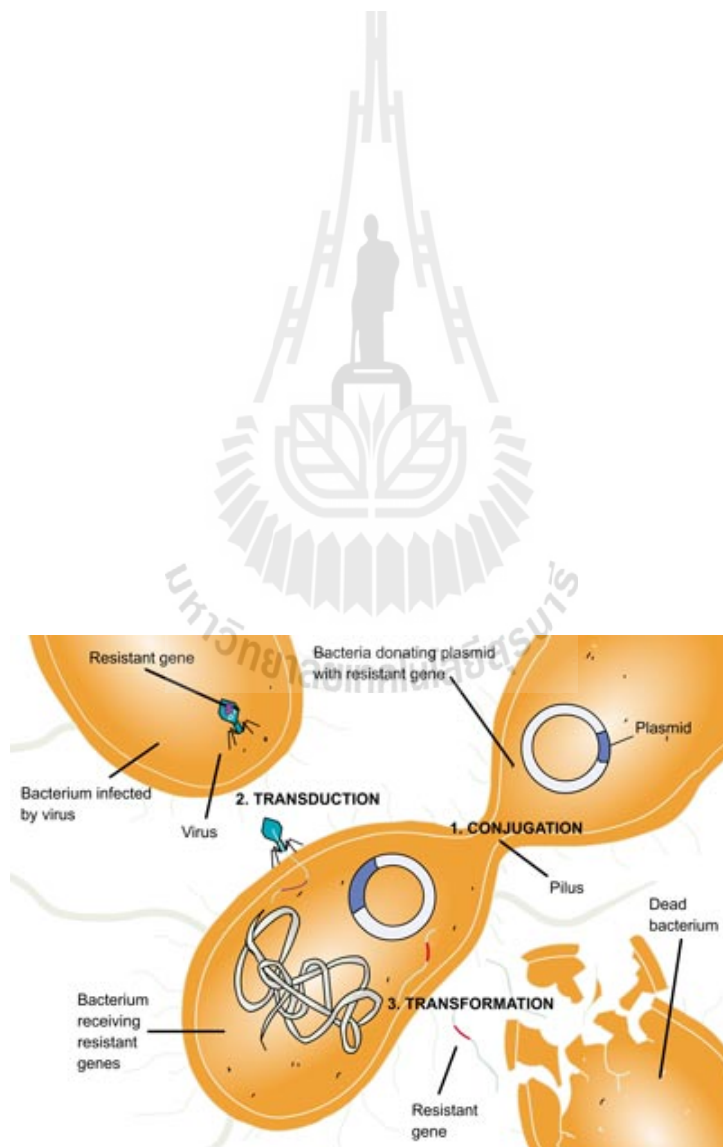
รูป 2.7 Bacterial conjugation. (Roe, 2008)

เมื่อยาปฏิชีวนะเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ยาจะต้องไปจับเป้าหมายที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่เฉพาะเจาะจงซึ่งจะไปรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรมของแบคทีเรียสามารถต่อสู้กับยาปฏิชีวนะได้หลากหลายรูปแบบ (รูป 2.8) ยีนเหล่านั้นอาจจะสร้างเอ็นไซม์ที่ทำลายยาหรือปรับเปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีของยาทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้



รูป 2.8 Mechanisms of antibiotic resistance (Roe, 2008).

การดื้อยาของแบคทีเรียอาจเกิดขึ้นผ่านกลไกต่างๆ 9 กลไก ดังนี้ 1) แบคทีเรียมีการเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ ขึ้นมาทำลายยา เช่น เอ็นไซม์ β -lactamases ซึ่งเอ็นไซม์ชนิดนี้เป็นสาเหตุหลักของการดื้อยาของแบคทีเรียต่อยากลุ่ม penicillins และยากลุ่ม cephalosporins การตรวจสอบเอ็นไซม์ดังกล่าวทำได้โดยการศึกษาลำดับยีนหรือการเรียงสายโปรตีน (Livermore and Brown, 2001) 2) การตัดแปลงไรโบโซมโดยการเติมหมู่เมทิลเพื่อให้อาปฏิชีวนะไม่สามารถจับกับไรโบโซมได้ (Tenover, 2006) 3) การตัดแปลงโปรตีน เช่น ยาปฏิชีวนะที่มีเป้าหมายที่ DNA gyrase การกลายพันธุ์ของ DNA แบคทีเรียอาจจะทำให้การทำงานของ gyrase เปลี่ยนไปและทำให้แบคทีเรียไม่จำเพาะต่อยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ Penicillin-binding protein (PBPs) ที่เกิดขึ้นในผนังเซลล์ของแบคทีเรียและมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์ peptidoglycan โดยปกติ PBPs จะจับกับยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลคแทมได้เป็นอย่างดีแต่ในเชื้อ MRSA การจับกับยาปฏิชีวนะจะลดลงส่งผลให้เกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะซึ่งเชื้อ MRSA จะมียีน *mecA* ที่เกี่ยวข้องกับการจับของ PBP หรือที่เรียกว่า PBP2a (Tenover, 2006) 4) Metabolic resistance เช่น ยากลุ่ม sulfonamides จะออกฤทธิ์ขัดขวางเอ็นไซม์ที่มีหน้าที่ในการสร้างกรดโฟลิก การดื้อยาในกลุ่มนี้เกิดขึ้นได้โดยเปลี่ยนแปลงเอ็นไซม์ด้วยตัวมันเองเพื่อป้องกันการจับของยา sulfonamide ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (Tenover, 2006) 5) แบคทีเรียมีการสร้างปั๊มเพื่อเอายาปฏิชีวนะออกนอกเซลล์ (Efflux pumps) ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญอย่างมากในการดื้อยาของแบคทีเรียเพราะว่าปั๊มจะจดจำสารต่างๆ ได้หลากหลาย ขณะเดียวกันพบกลไกเหล่านี้ในแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญ และกลไกนี้จะเกิดขึ้นร่วมกับกลไกการดื้อยาอื่นได้เช่นกัน (Moreira et al., 2004) ตัวอย่างเช่น เชื้อ



រូប 2.9 Bacteria transfer genetic material (<http://www.wiley.com/college/>)

แหล่งที่มาของข้อมูล

1. พืชที่ศึกษา

ผลมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) ซึ่งมาจากตลาดท้องถิ่นในจังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยได้รับการรับรองจากหอพันธุ์ไม้ กรมอุทยานสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เปลือกของผลมังคุดที่เจริญเติบโตเต็มที่ได้ออกสกัดเพื่อเอาสาร α -mangostin หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ วิธีการสกัดและการระบุเอกลักษณ์ของสารได้อธิบายไว้ในบทนี้.

2. แบคทีเรียที่ศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วย เชื้อ *Staphylococcus saprophyticus* DMST 27055 (*S. saprophyticus*) เชื้อ *Enterobacter cloacae* DMST 21394 (*E. cloacae*) เชื้อ *Escherichia coli* DMST 19629 เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (*S. aureus*) และเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*) เชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อที่แยกจากทางคลินิก การศึกษานี้ได้รับเชื้อดังกล่าวมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย และ American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับการเตรียมและเก็บรักษา stock culture ซึ่งเตรียมโดยการเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในหลอดที่มีอาหาร nutrient agar และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อแบคทีเรียทุกตัวจะเตรียมและต่อเชื้อใหม่ ทุกๆ 3-4 สัปดาห์ (Eumkeb, 1999)

3. ยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลคแทมที่ศึกษา

*β*1 oxacillin และ *β*1 ceftazidime ได้รับมาจาก Sigma, Bristol-Myers

4. อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในการศึกษานี้ประกอบด้วย Nutrient agar, Mueller-Hinton broth และ Mueller-Hinton agar ซึ่งอาหารดังกล่าวได้สั่งซื้อมาจากบริษัท Oxiod นอกจากนี้สารเคมีที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวมาตรฐาน เช่น α -mangostin ได้สั่งซื้อมาจากบริษัท Indofine chemical company (The flavonoid Company, ประเทศสหรัฐอเมริกา) สูตรโดยประมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีดังนี้

4.1 Nutrient agar

การศึกษานี้ได้ใช้ HiMedia[®] nutrient agar เพื่อใช้เตรียม stock culture และใช้เพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียเพื่อนำจำนวนเซลล์ สำหรับสูตรของ Nutrient agar มีดังนี้

	กรัม/ลิตร
Peptic digest of animal tissue	5.0
โซเดียมคลอไรด์	5.0
สารสกัดจากเนื้อวัว	1.5
สารสกัดจากยีสต์	1.5

วุ้น 1.5

pH (ที่อุณหภูมิ 25°C) 7.4 ± 0.2

4.2 Mueller-Hinton broth (MHB)

การศึกษานี้ได้ใช้ Difco® Mueller-Hintin broth เพื่อใช้ในการทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะซึ่งมีส่วนผสม ดังนี้

	กรัม/ลิตร
<i>Beef infusion solids</i>	4.0
<i>Casien hydrolysate</i>	17.5
<i>Soluble starch</i>	1.5
pH 7.4 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 37 ± 0.2 °C	

Mueller-Hinton ได้ถูกปรับประจุบวกที่มีความเข้มข้นของไอออนที่มีประจุบวกสอง (divalent cations) ได้แก่ Ca^{2+} 20 มิลลิกรัม/ลิตร และ Mg^{2+} 10 มิลลิกรัม/ลิตร

4.3 Mueller-Hinton agar

การศึกษานี้ได้ใช้ Difco® Mueller-Hintin agar เพื่อใช้ในการทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะซึ่งมีส่วนผสม ดังนี้

	กรัม/ลิตร
วุ้น	17.0
<i>Beef heart infusion</i>	2
<i>Casien acid hydrolysate</i>	17.5
<i>Soluble starch</i>	1.5
pH 7.3 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 ± 0.2 °C	

5. สารเคมี

สารเคมีทั้งที่ใช้ในการศึกษานี้ส่วนใหญ่เป็นสารที่มีคุณภาพระดับการใช้ในห้องปฏิบัติการ (lab grade)

เอทานอลบริสุทธิ์	Lab grade
เฮกเซน	Lab grade
ไดคลอโรมีเทน	Lab grade
อะซิโตน	Lab grade
เอทิลอะซิเตท	Lab grade
ซิลิกา เจล	

Merck silica gel 60 Art. 7734 (70-230 mesh ASTM) ถูกนำมาใช้เป็นตัวดูดซับสำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟีปกติ

Merck silica gel 60 G Art. 7731 และ 60 GF₂₅₄ Art. 7730 ถูกนำมาใช้เป็นตัวดูดซับ
สำหรับ preparative TLC.

Merck TLC aluminum sheet, silica gel 60 F254 precoated ขนาด 20 ซม. x 20
ซม. และความหนา 0.2 มม. ถูกนำมาใช้ในการระงับเอกลักษณ์ของ fractions

Dimethylsulfoxide (DMSO)	AR grade
Disodium tetraborate	Lab grade
Sodium chloride	AR grade
Sodium phosphate	Lab grade
Sodium hydroxide	Lab grade
95% Ethanol	Lab grade
Ammonium acetate	AR grade
Acetonitrile	Lab grade
Albumin	AR grade
Lecithin	Lab grade
Tween 80	Lab grade
Paraformaldehyde	Lab grade
Glutaraldehyde	Lab grade
Osmium tetroxide	Lab grade
Methanol	Lab grade
Araldite	Lab grade
Agarose	Lab grade
Uranyl acetate	Lab grade
Lead acetate	Lab grade
HEPES buffer	Lab grade
Phosphate	Lab grade
PMSF	Lab grade
Triton X-100	Lab grade
Ceftazidime	AR grade
Oxacillin	AR grade
α -mangostin	AR grade

6. เครื่องมือในการศึกษา

อุปกรณ์

Rotary evaporator	Buchi
Heating bath: Büchi heating bath B-490	
Rotavapor: Büchi rotavapor R-200	
Controller: Büchi vacuum controller V-800	
UV-Cabinet II	Camag
NMR Spectrometer INOVA 300	Varian
Soxhlet apparatus	Buchi
Mixer (Model 5000)	Buchi
Hot air oven (Memmert-600)	
Column chromatography	
filter paper	
Tank of TLC analysis	
Spectronic 21	Milton Roy
Labofuge	400R Heraeus
Autoclave	Yamato
Laminar air flow	Woerden
Hot air oven	Shellab
Shaking incubator	Heto
Hot plate	VELP scientifica
Refrigerated Incubator	VELP scientifica
Ultramicrotome	JEM
Micropipettors (2-20 μL)	Witeg
Micropipettors (100-1000 μL)	Witeg
Centrifuge tubes	Pyrex
Spectraphysics	Agilent

Experimental glassware

บีกเกอร์ (ขนาด 50, 100, 250, 500, 1000 มล.)

ไบนเปตต์ (1, 5, 10 ไมโครลิตร)

กระบอกตวง (10, 20 ไมโครลิตร)

จานเพาะเชื้อ และหลอดทดลอง

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. การสกัดสารจากเปลือกมังคุด

เปลือกของมังคุดถูกทำให้แห้งโดยใช้เตาอบและทำให้เป็นผงโดยใช้เครื่องปั่นหลังจากนั้นนำไปสกัดโดยใช้เครื่อง Soxhlet extractor โดยใช้ Hexane, acetone, dichloromethane และ ethanol เป็นตัวทำละลาย (1 กก. ของผงเปลือกมังคุดแห้ง/ตัวทำละลาย 3000 มล. ต่อการสกัด 1 ครั้ง) อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการสกัดถูกตั้งไว้ที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้ถูกทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) จะทำให้ได้สารสีน้ำตาลเหนียวข้นกึ่งแข็งสำหรับเอทานอล (262 กรัม) และอะซีโตน (130 กรัม) และผงสีเหลืองสำหรับ n-hexane (84 กรัม) และ dichloromethane (106 กรัม) สารสกัดหยาบที่ได้ถูกนำไปแยกสารออกฤทธิ์โดยใช้คอลัมน์ โครมาโตกราฟี และโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography: TLC)

2. การแยกสารออกฤทธิ์จากเปลือกมังคุด

ขั้นตอนสำหรับการแยกสารออกฤทธิ์จากเปลือกมังคุดโดยอ้างอิงและปรับเปลี่ยนเล็กน้อยตามขั้นตอนของ Chairungsrilerd et al. (1996a); 1996b;1996c), Sakagami et al. (2005) และ Chi et al. (2002) สารสกัดหยาบจาก dichloromethane ถูกนำไปแยกต่อโดยซิลิกา เจล คอลัมน์ โครมาโตกราฟี จะได้ทั้งหมด 11 fractions โดย elute ด้วย acetate:hexane ตามอัตราส่วนดังนี้ 10:90, 20:80, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 และ 100:0 ตามลำดับ โดยเก็บ 1000 มิลลิลิตรของแต่ละ fractions และทำให้เข้มข้นขึ้นหลังจากนั้นนำไปแยกโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (ขนาด 2x5 ซม.² และใช้ acetate:hexane ในอัตราส่วน 1:1 เป็นสารละลายตัวนำพา) สำหรับ fraction 3 ถูกยืนยันโดยใช้ HPLC และทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วย โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Hexane:acetone ในอัตราส่วน 2:1) จะทำให้ได้สารออกฤทธิ์หลักซึ่งมีผลึกสีเหลือง สารที่ได้นี้ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางด้วย dichloromethane:hexane ในอัตราส่วน 50:50 โดยทำภายใต้แสงยูวีและนำไปยืนยันทางโครงสร้างต่อด้วย NMR ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ขณะเดียวกันนำไปเปรียบเทียบโครงสร้างกับการศึกษาที่ได้มีรายงานก่อนหน้านี้

3. การเตรียมสารและเตรียมเชื้อที่ทดสอบ

การเตรียมสารละลายของยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบโดยการละลายยา oxacillin และยา ceftazidime ในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile water) (1 มก./มล.)

สารละลาย (10% dimethylsulfoxide ในน้ำ) ของสารสกัดหยาบ และ/หรือ α -mangostin หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ (สารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 , สารสกัด fraction 3 และ α -mangostin) จากเปลือกมังคุดเดี่ยวๆ หรือผสมกับยาปฏิชีวนะที่นำมาศึกษาได้เตรียมด้วยวิธี doubling dilution ด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อปรับความเข้มข้นให้ได้ตามที่ต้องการ

นำแบคทีเรียที่ศึกษาไปเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth 100 มล. เป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนที่ตกตะกอน (pellets) มาล้างด้วยน้ำเกลือ หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งและ suspend เซลล์อีกครั้งด้วย

4. Bacterial suspension standard curve

ในการทำ bacterial suspension standard curve มีขั้นตอน ดังนี้

แบคทีเรียแต่ละชนิดถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร Mueller-hinton broth 100 มล. นำเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเซลล์แบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบ/นาที และนำส่วนที่ตกตะกอนไปล้างสองครั้ง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เซลล์แขวนลอยโดยใช้ 0.9 % NaCl 50 มล. และทำให้เซลล์แบคทีเรียเจือจางแล้วนำไปวัดค่า O.D. โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ในช่วงการดูดกลืนแสง (Absorbance) อยู่ระหว่าง 0.05-0.25 ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร การนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของแต่ละช่วงการดูดกลืนแสงโดยใช้ Overdried agar plate counting method และทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (Eumkeb, 1999; Richards et al., 1993)

5. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MICs)

Broth dilution method ถูกนำมาใช้เมื่อต้องการทดสอบแบคทีเรียจำนวนไม่มาก หรือเมื่อต้องการหาค่า MIC ที่แม่นยำ การทำให้ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะลดลงครึ่งหนึ่ง (two-fold dilution) ถูกนำมาใช้เพื่อเตรียมปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและปริมาณเชื้อที่เหมาะสม (โดยทั่วไป 100,000 เซลล์/แบคทีเรีย) ใส่ลงไปในแต่ละหลอด หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับจุดสุดท้ายที่นำมาพิจารณาเป็น MICs ของยานั้นคือจุดที่ไม่เห็นความขุ่น สำหรับหลอดที่ไม่มีเชื้อ กล่าวคือ มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับยาปฏิชีวนะและมีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเดียวถูกนำมาใช้เป็นหลอดควบคุมที่ปลอดเชื้อ ขณะเดียวกันหลอดที่มีเชื้อแบคทีเรียแต่ไม่มียาปฏิชีวนะถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้การมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียในกรณีที่มีการอ่านจุดที่ไม่มีความขุ่นผิดพลาด (Greenwood, 2000)

การหาค่า MICs โดยใช้วิธี agar dilution นั้นเริ่ม โดยการเจือเชื้อจาก stock culture แล้วเพาะเลี้ยงไปยัง Mueller Hinton broth และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเตรียม bacterial suspension โดยปรับความหนาแน่นของเซลล์ด้วยน้ำเกลือ (0.9 % NaCl) ให้ได้ประมาณ 1×10^8 CFU/mL โดยใช้การค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับ bacterial suspension standard curve หลังจากนั้นนำเชื้อที่ได้ปรับความเข้มข้นแล้ว 0.1 มล. ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่ทดสอบใส่ลงไปในทั้ง 3 หลอดที่มี 0.90 มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Mueller-Hinton broth) รวมกับยาปฏิชีวนะที่ได้ปรับความเข้มข้นเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 1×10^7 CFU/mL หลอดที่มีอาหารแต่ไม่มียาปฏิชีวนะถูกนำมาใช้เป็นหลอดควบคุมของแบคทีเรียที่ทดสอบ นำเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงปริมาณ 2 ไมโครลิตรหยดลงบนผิวของวุ้น โดยใช้ replicator ที่มีขนาด 3 มม (mm) pins ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้ายของเชือบนวุ้นจะมีประมาณ 10^4 CFU/จุด หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37

6. Checkerboard determination

การใช้ยาด้านจุลชีพร่วมกันมากกว่า 1 ชนิดได้ถูกเลือกมาใช้ด้วยเหตุผลหลายประการ เช่น ลดความเป็นพิษของยาโดยลดขนาดยาของยาด้านจุลชีพลง 2 ตัวหรือมากกว่าและมีการเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์แต่ไม่ก่อให้เกิดพิษ หรือลดการพัฒนาการคือต่อยา 1 ตัว (Swan and Manivannan, 2002) การใช้วิธี checkerboard เป็นวิธีที่ค่อนข้างง่ายในการทำและใช้เวลาทดสอบเพียงแค่ 24 ชั่วโมงเท่านั้น การเจือจางยาด้านจุลชีพอาจจะใช้เข้มข้นที่ทดสอบต่ำกว่าระดับที่ไม่สามารถทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์ (Eumkeb, 1999; Lorian, 1999)

วิธี checkerboard ในการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกันได้ทำตามวิธีของ Sabath (1967) และมีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อย (Eumkeb, 1999) ยาด้านจุลชีพ "A" และยาด้านจุลชีพ "B" ถูกทำให้เจือจางลง $\frac{1}{2}$ ของ MICs ของมัน วิธี checkerboard ได้ทำโดยใช้ agar dilution method ซึ่งกล่าวดังต่อไปนี้

แบคทีเรียที่นำมาทดสอบถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับ bacterial suspension ด้วยน้ำเกลือ (0.9 % NaCl) ให้ได้ประมาณ 1×10^8 CFU/mL โดยใช้การคำนวณการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับ bacterial suspension standard curve หลังจากนั้นนำเชื้อที่ได้ปรับความเข้มข้นแล้ว 0.1 มล. ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่ทดสอบใส่ลงไปในทั้ง 3 หลอดที่มี 0.90 มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Mueller-Hinton broth) และรวมกับยาปฏิชีวนะที่ได้ปรับความเข้มข้นเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อประมาณ 1×10^7 CFU/mL หลอดที่ไม่มียาปฏิชีวนะถูกนำมาใช้เป็นหลอดควบคุมของแบคทีเรียที่ทดสอบ นำเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงปริมาณ 2 ไมโครลิตรหยดลงบนผิวของวุ้นโดยใช้ replicator ที่มีขนาด 3 มม (mm) pins ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อบนวุ้นจะมีประมาณ 10^4 CFU/จุด หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง หากค่า MICs ของการใช้ยาด้านแบคทีเรียแต่ละตัวและสร้างกราฟ isobolograms สำหรับการคำนวณหาดัชนี FIC สำหรับการรวมกันของด้านแบคทีเรียแต่ละตัวสามารถคำนวณได้ตามสมการดังต่อไปนี้

$$FIC = \frac{\text{Conc. of A in MIC of A+B}}{\text{MIC of A alone}} + \frac{\text{Conc. of B in MIC of A+B}}{\text{MIC of B alone}}$$

FIC (A+B) ≤ 0.5	เสริมฤทธิ์กัน
FIC (A+B) $> 0.5-4.0$	ไม่มีปฏิกริยาระหว่างยา
FIC (A+B) > 4.0	ต้านฤทธิ์กัน

(Johnson et al., 2004; Odds, 2003)

7. Killing curve determinations

การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพื่อทำเป็น killing curve ได้ทำตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ (Richards et al., 1993) และมีการดัดแปลงเล็กน้อย (Eumkeb, 1999) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 100 มล. จากนั้นให้เชื้อแบคทีเรียคือยาปริมาณ 5×10^6 CFU/mL สัมผัสกับยาต้านแบคทีเรียทั้งใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น $\frac{1}{4}$ ของ MICs ของสารสกัดหยาบจาก CH_2Cl_2 , fraction 3, และ α -mangostin (สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุด) อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อคือ 37 องศาเซลเซียส หลังจากสัมผัสสารเป็นเวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ต่อมานำเชื้อที่สัมผัสยาปฏิชีวนะแต่ละช่วงเวลาไปเลี้ยงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Mueller-Hinton agar จำนวน 4 จานต่อหนึ่งช่วงเวลาและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโต ค่าที่ต่ำสุดที่สามารถนับได้คือ 10^3 CFU/mL เซลล์และความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใกล้เคียงกันถูกนำมาใช้เป็น positive control (Iain et al. 2000)

8. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electronmicroscopy; TEM)

การเตรียมเซลล์

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ สารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin ต่อโครงสร้างเซลล์ของเชื้อ oxacillin-resistant *S. saprophyticus* โดยได้ทำตามขั้นตอนดังต่อไปนี้ เชื้อ *S. saprophyticus* ในอาหาร Mueller-Hinton broth ถูกนำไปบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเชื้อที่บ่ม 2.0 มล. ไปเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มล. ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth 98 มล. แล้วนำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบสั่น (water bath shaking) ที่อัตราการแกว่ง 100 ครั้ง/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 0.9% NaCl หลังจากนั้นนำเชื้อที่มีความเข้มข้น 5×10^7 CFU/mL ปริมาณ 10 มล. ใน 0.9 % NaCl ไปเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ซึ่งแต่ละขวดจะมีอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-hinton broth และยาต้านแบคทีเรียรวมกัน 90 มล. โดยความเข้มข้นของยาต้านแบคทีเรียที่ใช้คือ $\frac{1}{4}$ MICs ของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3, α -mangostin และยาปฏิชีวนะจะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แบคทีเรียประมาณ 5×10^6 CFU/mL สำหรับขวดที่มีเชื้อ *S. saprophyticus* ใน Mueller-hinton broth 90 มล. โดยไม่มียาต้านแบคทีเรียถูกนำมาใช้เป็นตัวควบคุม สำหรับขวดที่เพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างสารออกฤทธิ์จากเปลือกมังคุดสกัดรวมกับยาปฏิชีวนะและขวดควบคุมถูกนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบสั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและอัตราการแกว่ง 100 ครั้ง/นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Richards and Xing, 1994; Richards et al., 1993)

เชื้อ *S. saprophyticus* ที่ได้เพาะเลี้ยงถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและเทส่วน supernate ที่ หลังจากนั้นตรึง (fix) ส่วนที่เป็น pellets ด้วย glutaraldehyde 8% v/v ใน phosphate buffer 0.1 M (pH 7.2) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปตรึงต่อใน glutaraldehyde 4% v/v ใน phosphate buffer 0.1 M (pH 7.2) เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากล้างใน buffer แล้ว suspend แบคทีเรียใน osmium tetroxide (OsO_4)

9. การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม

9.1 การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane permeability)

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุด (สารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin) เมื่อใช้เดี่ยวและใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกในการควบคุมการซึมผ่านของสารซึ่งขั้นตอนในการทดสอบมีดังต่อไปนี้

นำเซลล์แบคทีเรียไปเพาะเลี้ยงในอาหาร MHB 100 มล. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยง 10 มล. ไปใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร MHB 90 มล. หลังจากนั้นนำไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบสั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและอัตราการแกว่ง 100 ครั้ง/นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ (5×10^6 CFU/mL) ปริมาณ 10 มล. ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ซึ่งแต่ละหลอดประกอบด้วย 90 มล. ของอาหาร MHB ร่วมกับ สารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 หรือ α -mangostin หรือเมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น $\frac{1}{4}$ MICs ของแต่ละตัวจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 5×10^5 CFU/mL ขวดควบคุมจะมีเฉพาะอาหาร MHB 90 มล. โดยไม่มียาปฏิชีวนะ นำขวดทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบสั่น (Eumkeb, 1999; Richards et al., 1993) หลังจากนั้นเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยล้างเซลล์ 2 ครั้งใน 0.9% NaCl 10 มล. แล้ว resuspend ใน sodium phosphate buffer และปรับให้ได้ช่วงดูดกลืนแสง 0.1-0.2 ที่ 500 นาโนเมตร เติม Triton X-100 (TTX-100) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มล. ลงไปในแต่ละหลอด สำหรับหลอดที่ไม่ได้เติม TTX-100 ใช้เป็นหลอดควบคุม (Eumkeb, 1999)

9.2 การซึมผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic membrane permeability)

การซึมผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมถูกทดสอบการวัดความสามารถของสารสกัดที่มีต่อ CM ทำให้เห็นการทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase ในแบคทีเรียโดยใช้ ortho-nitrophenylgalactoside (ONPG) เป็น substrate สำหรับขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างถูกเตรียมเช่นเดียวกับการทดสอบการซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอก หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้เพาะเลี้ยง 0.5 มล. ย้ายจากแต่ละขวดที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ตัวอย่างดังกล่าวจะถูกทำให้เจือจางเป็น 1.0 มล. ด้วย buffer สำหรับการทำงานของเอนไซม์ถูกวัดโดยใช้ ONPG (Marri, 1996; Miller, 1972; Shimeld and Rodgers, 1999) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ความหนาแน่นของเซลล์ที่ได้ถูกเจือจางใน buffer ถูกวัดโดยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และใส่ ONPG (4 มก./มล.) ปริมาณ 0.2 มล. ลงไปในแต่ละหลอดและเขย่าสักครู่ หลังจากนั้นนำแต่ละหลอดไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาถูกวัดโดยใช้นาฬิกาจับเวลาและหยุดการเกิดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย 1 M Na_2CO_3 ปริมาณ 0.5 มล. หลังจากที่มีสีเหลืองเกิดขึ้น การดูดกลืนแสงของแต่ละหลอดถูกวัดที่ 420 นาโนเมตร ขณะเดียวกันใช้ Toluene 50 ไมโครลิตร/มล. เป็นตัวควบคุม (Eumkeb, 1999)

10. Electrophoresis

10.1 การสกัดโปรตีนที่สัมพันธ์กับ peptidoglycan ของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุด (สารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin) เมื่อใช้เดี่ยวและใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และโปรตีนที่สัมพันธ์กับ peptidoglycan (Bacterial membrane and peptidoglycan associated protein; BMPG) ซึ่งมีขั้นตอนในการทดสอบดังนี้

เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. saprophyticus* ในอาหาร MHB 100 มล. และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อปริมาณ 8.0 มล. ไปเพาะเลี้ยงต่อในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร MHB 192 มล. แล้วนำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบสั่นที่มีอัตราการแกว่ง 100 ครั้ง/นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเชื้อที่ทดสอบ (5×10^6 CFU/mL) ปริมาณ 100 มล. ไปเพาะเลี้ยงต่อในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร MHB และความเข้มข้น $\frac{1}{4}$ MICs ของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3, α -mangostin หรือ ยาปฏิชีวนะรวมกัน 100 มล. สำหรับขวดที่มีอาหาร MHB 100 มล. โดยไม่มียาต้านแบคทีเรียถูกนำมาใช้เป็นตัวควบคุม หลังจากนั้นนำแต่ละขวดไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบสั่นที่มีอัตราการแกว่ง 100 ครั้ง/นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดถูกนำมาทดสอบเมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะที่ $\frac{1}{4}$ MIC ในการต้านเชื้อ *S. saprophyticus* ที่ได้แยกจากคลินิก (Eumkeb, 1999; Richards and Xing, 1994; Richards et al., 1993)

เก็บเซลล์แบคทีเรียที่ได้เพาะเลี้ยงดังกล่าว 20 มล. และนำไปปั่นเหวี่ยง (6,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) และล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย N-2-hydroxyethyl piperazine-N-ethanesulphonic acid (HEPES) buffer (10 mM, pH 6.8) จากนั้น resuspend เซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่น 10 มล. และทำให้เซลล์แตกโดยการ sonication (3 x 60s with 30s cooling period between each burst) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เซลล์ที่ไม่แตกจะถูกเอาออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและเอาส่วนที่ตกตะกอน (pellet) ทิ้ง

นำเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียและ peptidoglycan ออกมาโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 40,000 g เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ก่อบรรด้วย phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF) 2 มก./มล. จากนั้นนำ BMPG ที่น้ำหนักเท่ากันที่สกัดได้จากจาก *S. saprophyticus* ไป resuspend ในน้ำกลั่นที่มี PMSF

Bovine serum albumin (จาก Sigma) ถูกนำมาใช้เป็น โปรตีนมาตรฐาน สำหรับโปรตีนที่สกัดได้จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส และทำให้เจือจางอีกครั้งใน buffer ก่อนที่จะมาแยกโปรตีนด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โปรตีนที่สกัดได้จะถูกเก็บไว้นานกว่า 2 เดือนภายใต้สภาวะดังกล่าว (Eumkeb, 1999)

10.2 SDS-PAGE

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ถูกนำมาใช้ในระบบเจลที่มี stacking gel 4 % และมี separating gel 15% สำหรับ BMPG ที่สกัดได้จะถูกผสมกับ sample buffer ที่มี Tris-HCL buffer 0.125 M, pH 6.8, 0.04 M Na₂EDTA (Sigma), 4% (w/v) SDS, 10% (w/v) β -mercaptoethanol 20% (v/v) glycerol and 0.1% (w/v) bromophenol blue (Sigma) และต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที ขณะเดียวกันการทำ Electrophoresis จะทำที่ 8 mA/เจล สำหรับ stacking gel และ 15 mA/เจล สำหรับ separating gel เพื่อเพิ่มความคมชัดบริเวณ subtyping areas ที่สำคัญของเจล หลังจากทำ electrophoresis จะย้อม separating gel ด้วย Coomassie Brilliant Blue เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องและผสมให้เข้ากันเบาๆ หลังจากนั้นเริ่มต้นการถอดสีที่ย้อม (destaining) ด้วย ethanol 45% และสารละลาย acetic acid 10% (v/v) ตามด้วยการถอดสีสุดท้ายด้วย สารละลาย acetic acid 7% สำหรับโปรตีนมาตรฐานที่ถูกนำมาใช้เป็น molecular mass makers ได้แก่ myoglobin (17,200), carbonic anhydrase (30,000), ovalbumin (42,700), albumin (66,250) and ovotransferrin (76,000-78,000) (Eumkeb, 1999)

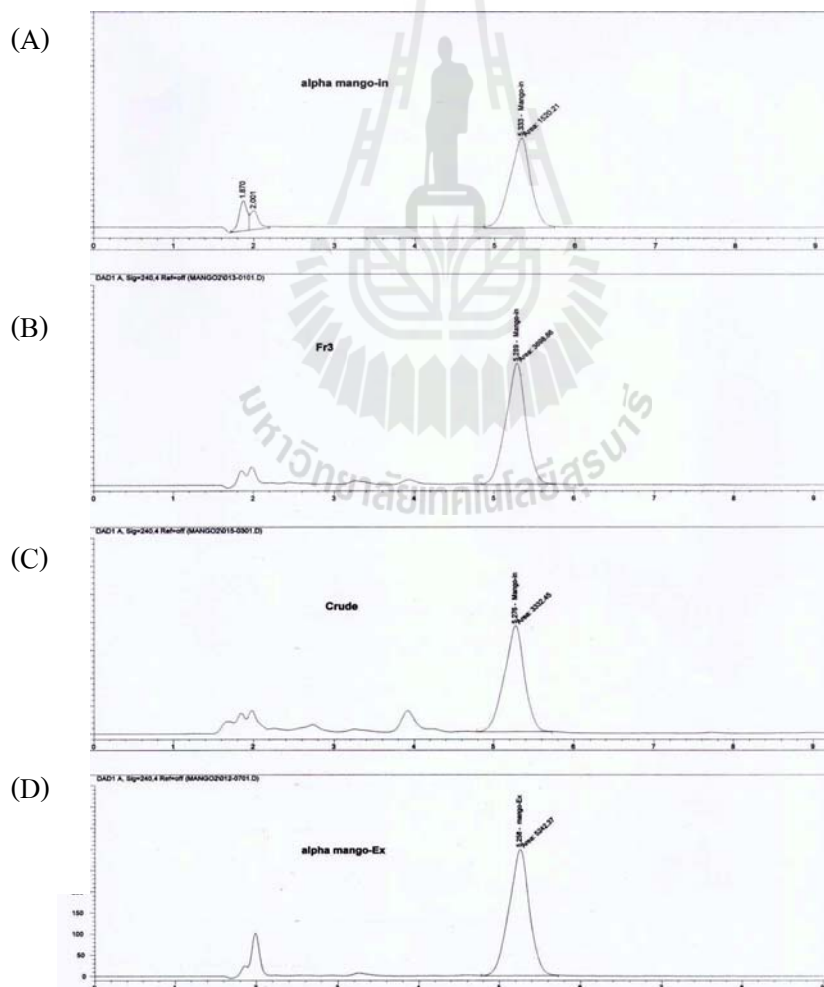
บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 คุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและผลผลิตจากสารสกัดจากเปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.)

เครื่องสกัด Soxhlet extractor ถูกเลือกมาใช้เพื่อที่จะสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกของ *G. mangostana* Linn สำหรับเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน อะซีโตน และเอทานอล ถูกนำมาใช้เป็นสารสกัด เนื่องจากมีความปลอดภัยและความสามารถในการละลายสารที่อิสระ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพที่ดีของตัวทำละลายดังกล่าวในการทำละลายเซลล์ของพืชซึ่งทำให้ได้สารที่อยู่ภายในเซลล์จำนวนมาก ความบริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin ถูกวิเคราะห์โดยใช้ HPLC และระบุโครงสร้างของสาร โดยใช้ NMR spectra และเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมา

3.1.1 การระบุเอกลักษณ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่ในสารสกัดจากเปลือกมังคุดโดยใช้ HPLC



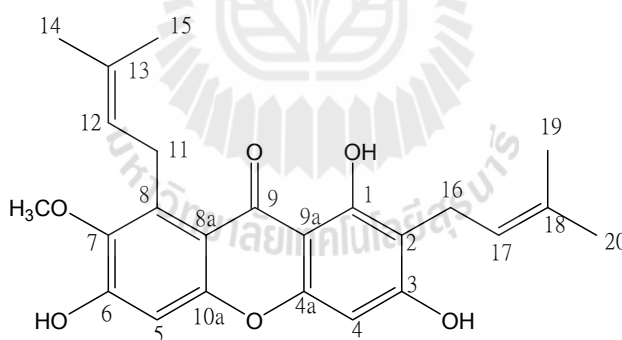
รูป 3.1 HPLC chromatograms of standard α -mangostin obtained from Indofine chemical (A), Fr₃ extract (B), CH_2Cl_2 crude extract (C) and α -mangostin extract (D)

การใช้ HPLC ร่วมกับ *gradient elution* ได้ถูกนำมาใช้เพื่อระบุชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุด สารผสมกรดฟอร์มิก 0.2 % ใน *acetonitrile* จะให้การแยกด้วยโครมาโตกราฟีที่เหมาะสมที่สุดในการแยก α -mangostin และสารอื่นๆ ในสารสกัด (รูป 3.1) ความยาวคลื่นที่ 240 นาโนเมตรถูกนำมาใช้ในการวัดทั้งหมดเนื่องจากเป็นช่วงที่สามารถดูดกลืนได้มากที่สุด สำหรับ HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin ที่ได้สกัดแสดงรูปแบบที่คล้ายกันกับ peak หลักของ α -mangostin ที่ retention time 5.333 นาที (รูป 3.1 A) 5.289 นาที (รูป 3.1 B) 5.267 นาที (รูป 3.1 C) และ 5.258 นาที (รูป 3.1 D) ตามลำดับเอกลักษณ์ของ peak ของ α -mangostin ในโครมาโตแกรมได้ยืนยันด้วย α -mangostin มาตรฐานที่ได้รับมาจาก Indofine chemical company (รูป 3.1 A)

การใช้ HPLC สามารถถูกนำมาใช้ในการหาปริมาณของ α -mangostin ในสารสกัดจากมังคุด (Yodhnu et al., 2009) นอกจากนี้ HPLC ยังสามารถพิสูจน์ความแม่นยำ ความเฉพาะเจาะจง ความไว และความถูกต้องในการทดสอบหาปริมาณของสารสกัดและผลิตภัณฑ์จากเปลือกมังคุด (Pohtitirat, 2008)

3.1.2 การทำให้เห็นโครงสร้างที่ชัดเจนของ α -mangostin โดยใช้ NMR

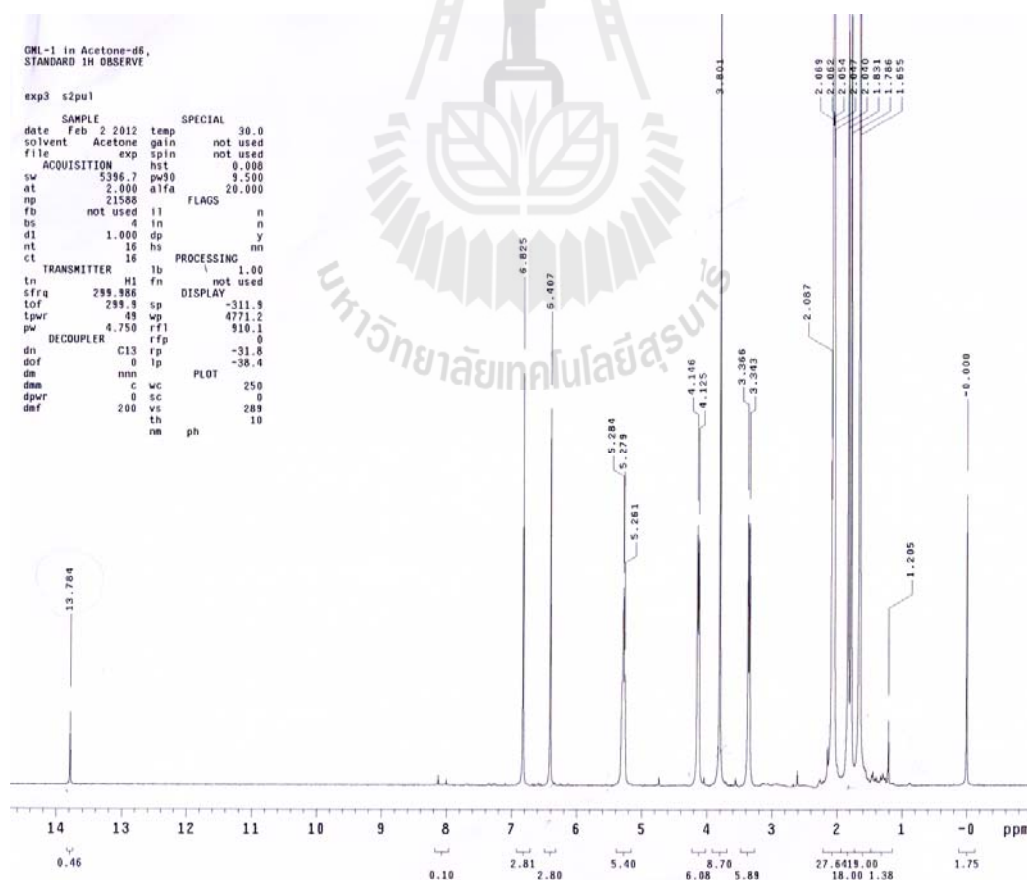
สาร α -mangostin มีลักษณะเป็นวงสี่เหลี่ยมถูกจัดอยู่ในกลุ่ม xanthone โครงสร้างประกอบด้วยพันธะคู่ 2 อันซึ่งไวต่อการเติมไฮโดรเจน มี 1 methoxyl group และ 3 hydroxyl group ซึ่งได้แสดงในรูป 3.2 ตาราง 3.1 และ 3.2 แสดงข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของ α -mangostin ที่ได้สกัดเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมา (Ee et al., 2006)



รูป 3.2 Structure of α -mangostin from NMR chromatogram reported by Ee et al. (2006)

ตาราง 3.1 The 300 MHz ^1H NMR (acetone- d_6) spectral data of α -mangostin

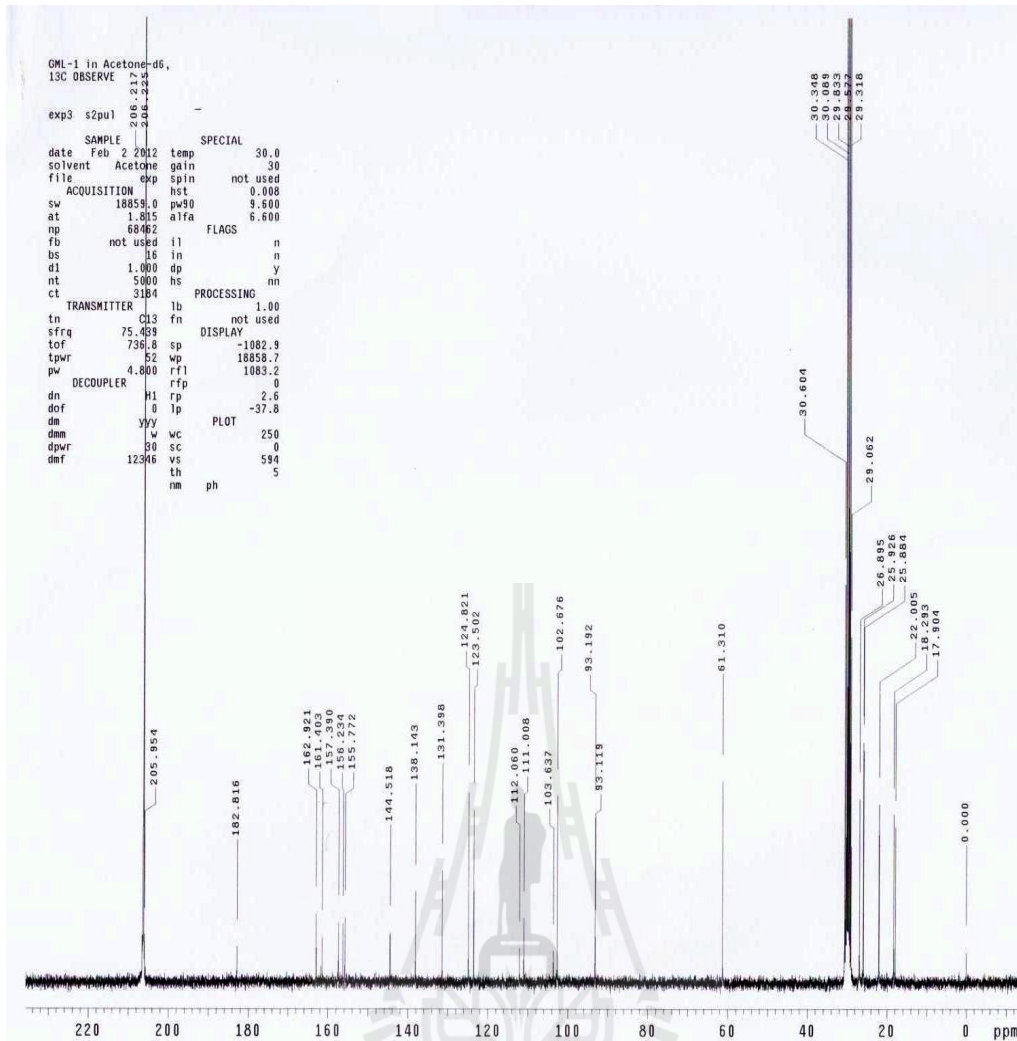
Chemical Shift (δ , ppm)	Assignment	Chemical Shift (δ , ppm) from reference (Ee <i>et al</i> , 2006)
13.78	singlet, OH-1	13.72
6.82	singlet, H-5	6.72
6.40	singlet, H-4	6.25
5.27	triplet, H-12, H-17	5.26
4.13	doublet, H-11	4.10
3.80	singlet, 7-OMe	3.78
3.35	doublet, H-16	3.37
2.07	singlet, H-20	1.83
2.05	singlet, H-15	1.82
1.81	singlet, H-14	1.71
1.65	singlet, H-19	1.68



รูป 3.3 ^1H NMR spectroscopic data of α -mangostin extracted

ตาราง 3.2 The 300 MHz ^{13}C NMR (acetone-d₆), spectral data of α -mangostin

Chemical Shift (δ , ppm)	Assignment	Chemical Shift (δ , ppm) from reference (Ee <i>et al</i> , 2006)
182.81	C-9	181.8
162.92	C-3	161.6
161.40	C-1	160.2
157.39	C-6	155.4
156.23	C-10a	155.2
155.65	C-4a	154.8
144.51	C-7	142.7
138.14	C-8	137.2
131.39	C-13	131.7
124.82	C-17	123.4
123.50	C-12	122.1
112.06	C-8a	111.7
111.00	C-2	109.7
103.63	C-9a	103.1
102.67	C-5	101.6
93.15	C-4	92.4
61.31	7-OCH ₃	61.2
26.89	C-11	26.3
25.92	C-14	25.7
25.88	C-19	20.7
22.00	C-16	21.3
18.29	C-20	18.1
17.90	C-15	17.7



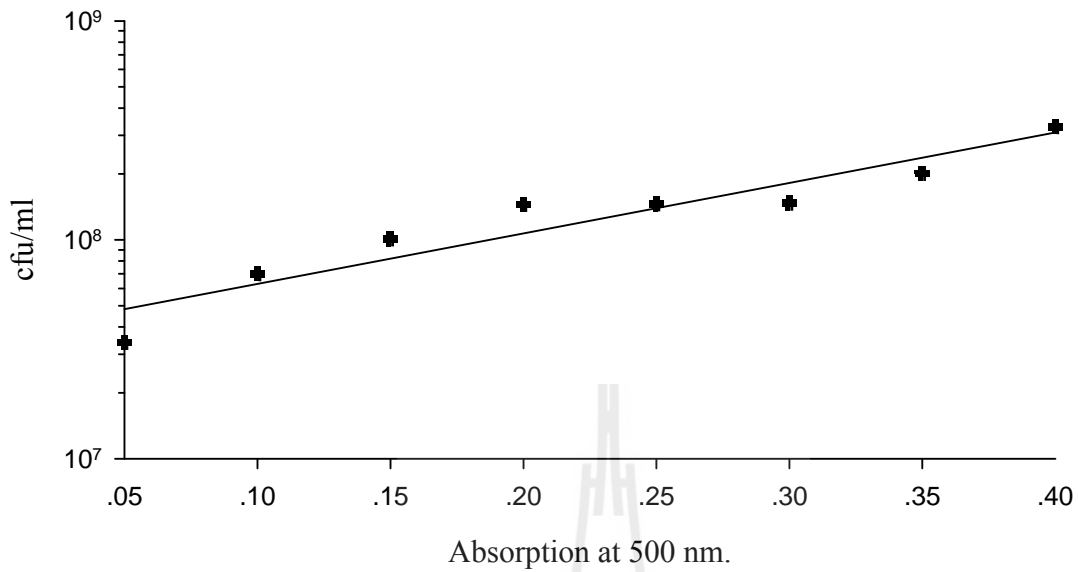
รูป 3.4 ^{13}C NMR spectroscopic data of α -mangostin extracted

3.2 Bacterial suspensions viable absorption standard curve

ผลการศึกษา bacterial suspension viable count standard curve สำหรับเชื้อ *Staphylococcus saprophyticus* DMST 27055 ที่คือต่อยา oxacillin (oxacillin-resistant *S. saprophyticus*; ORSS) เชื้อ *Escherichia coli* DMST 19629 ที่คือต่อยา ceftazidime (ceftazidime-resistant *E. coli*; CREC) เชื้อ *Enterobacter cloacae* DMST 21394 ที่คือต่อยา ceftazidime (ceftazidime-resistant *E. cloacae*; CREnC) เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATTC 29213 ที่ไวต่อยา oxacillin (oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; OSSA) และเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ที่ไวต่อยา ceftazidime (CSEC) ได้แสดงในรูป 3.5 ถึง รูป 3.9

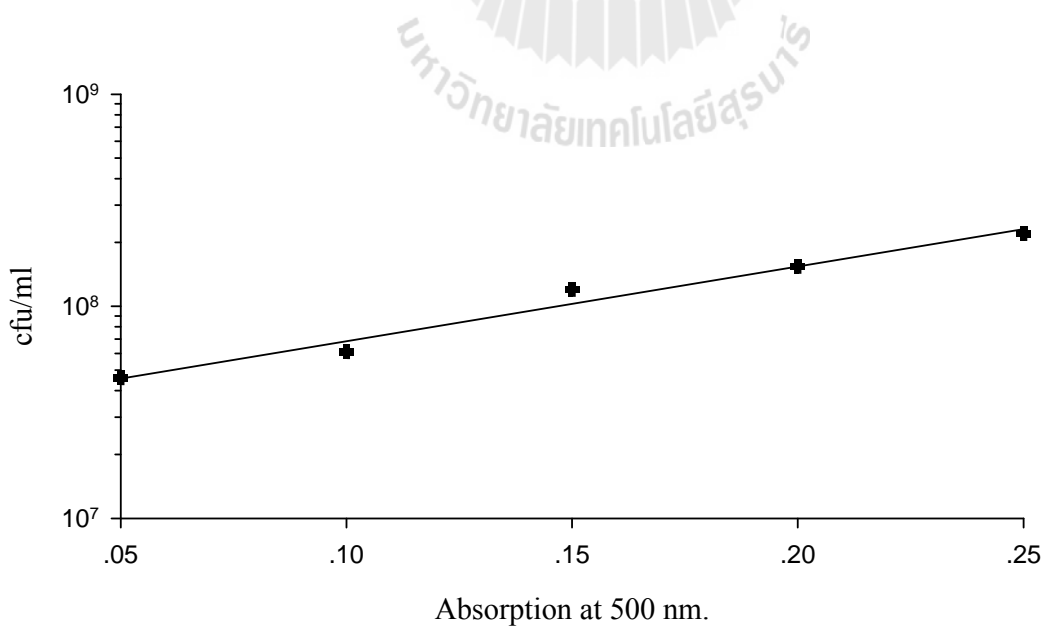
รูป 3.5 ถึงรูป 3.9 ซึ่งให้เห็นว่าเชื้อ ORSS, CREC, CREnC, OSSA และ CSEC ที่ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 CFU/mL มีค่าการดูดกลืนแสงดังนี้ 0.19, 0.15, 0.14, 0.12 และ 0.10 ตามลำดับ วิธีดังกล่าวนี้ได้ทำเพื่อนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่แน่นอน

Absorption of bacterial suspension viable count
standard curve of *S. saprophyticus* DMST 27055



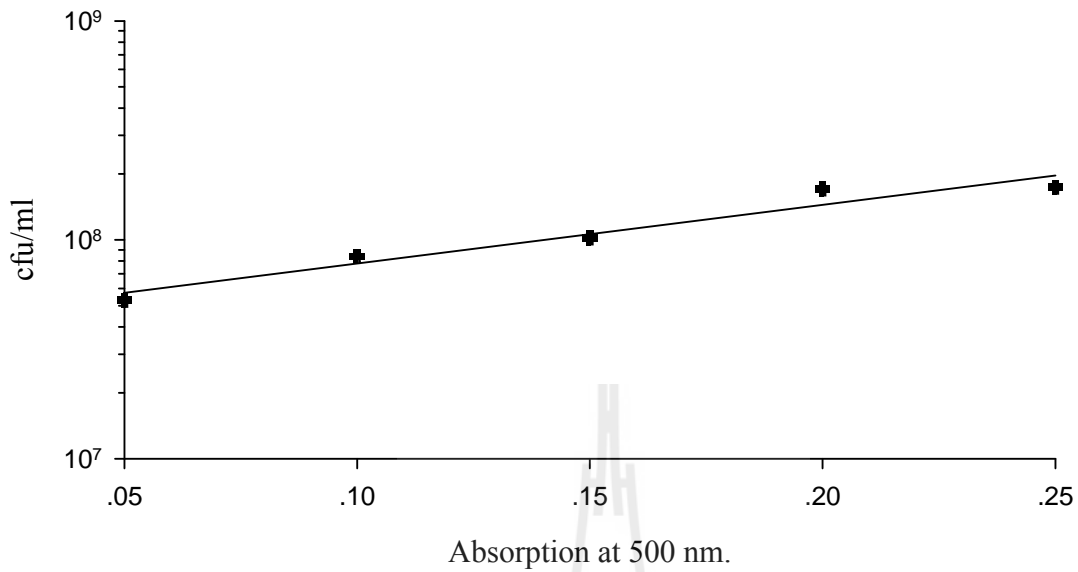
รูป 3.5 Standard curves for suspensions of oxacillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* DMST 27055

Absorption of bacterial suspension viable count
standard curve of *E. coli* DMST19629



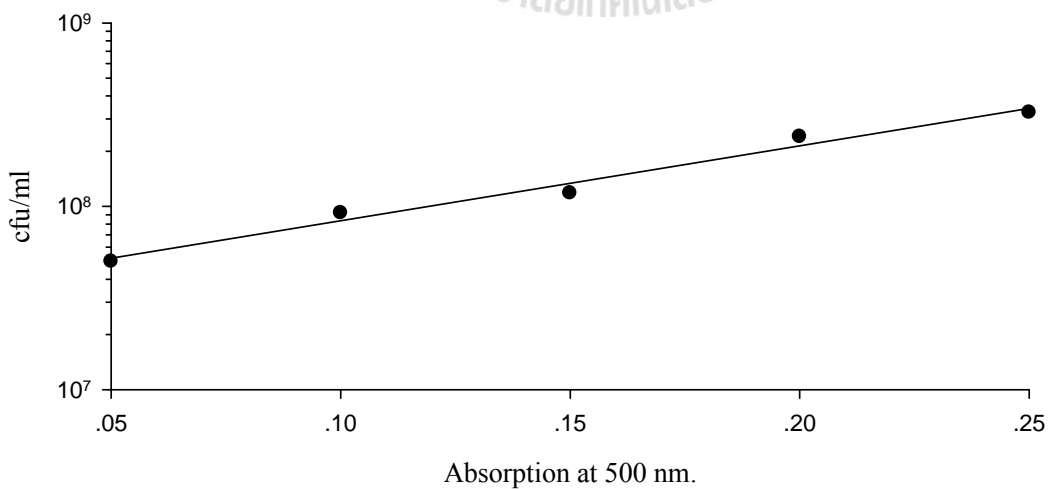
รูป 3.6 Standard curves for suspensions of ceftazidime-resistant *Escherichia coli* DMST 19629

Absorption of bacterial suspension viable count
standard curve of *E. cloacae* DMST 21394



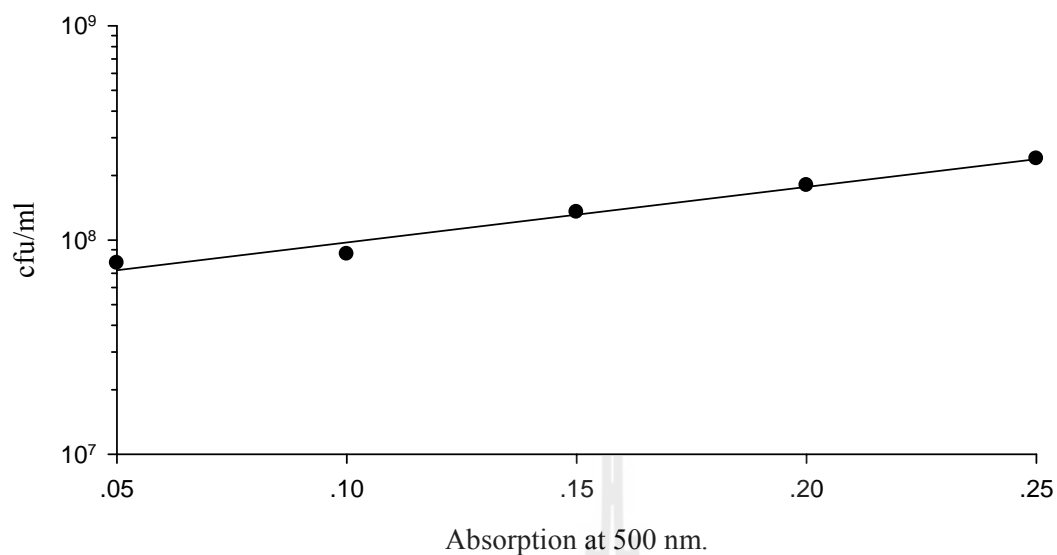
រូប 3.7 Standard curves for suspensions of ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* DMST 21394

Absorption of bacterial suspension viable count
standard curve of *S.aureus* ATCC 29213



រូប 3.8 Standard curves for suspensions of oxacillin-sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Absorption of bacterial suspension viable count
standard curve of *E.coli* ATCC 25922



รูป 3.9 Standard curves for suspensions of ceftazidime-sensitive *Escherichia coli* ATCC 25922

3.3 MIC determination

ตาราง 3.3 Minimum inhibitory concentration of the following β -lactams and bioactive compounds from the pericarp of GML extract against clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus*, ceftazidime-resistant *E. coli*, ceftazidime-resistant *E. cloacae*, oxacillin-sensitive *S. aureus* and ceftazidime-sensitive *E. coli* determined by agar dilution method

Bioactive compounds ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptibility (MIC)					
	<i>S. saprophyticus</i> DMST 27055	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (sensitive strain)	<i>E. coli</i> DMST 19629	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (sensitive strain)	<i>E. cloacae</i> DMST 21394	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (sensitive strain)
Crude extract (CH ₂ Cl ₂)	50	20	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
Fr ₃	31	7	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
α -mangostin	8	4	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
Ceftazidime	-	-	>1,024	8	>1,024	8
Oxacillin	128	2	-	-	-	-

ผลดังกล่าวได้แสดงให้เห็นว่าค่า MIC ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุด และยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบในการต้านเชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin ที่ได้แยกทางคลินิก เชื้อ *E. coli* ที่คือต่อยา ceftazidime เชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime เชื้อ *S. aureus* ที่ไวต่อยา oxacillin และ เชื้อ *E. coli* ที่ไวต่อยา ceftazidime ซึ่งทดสอบโดยวิธี Agar dilution

ยา Oxacillin เดียวๆ มีฤทธิ์เชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin (ORSS) ที่ได้แยกทางคลินิก และเชื้อ *S. aureus* ที่ไวต่อยา oxacillin (OSSA) ที่แยกทางคลินิกโดยมีค่า MICs เท่ากับ 128 และ 2 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ สำหรับ MIC ของยา oxacillin ด้านเชื้อ OSSA แสดงให้เห็นว่าเชื้อยังไวต่อยาดังกล่าว (Clinical Laboratory Standards Institute, 2013) ยา ceftazidime เดียวๆ มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* ที่คือต่อยา ceftazidime เชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime และเชื้อ เชื้อ *E. coli* ที่ไวต่อยา ceftazidime ที่ได้แยกทางคลินิกพบว่ามีค่า MICs >1024, >1024 และ 8 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน MIC ของยา ceftazidime ด้านเชื้อ CSEC พิสูจน์แล้วว่าเชื้อยังไวต่อยาดังกล่าว (Clinical Laboratory Standards Institute, 2013)

ค่า MIC ของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin ด้านเชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin (ORSS) ที่ได้แยกทางคลินิก คือ 50, 31 และ 8 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในขณะที่ค่า MIC ของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin ด้านเชื้อ *E. coli* ที่คือต่อยา ceftazidime ที่ได้แยกทางคลินิกมีค่าอยู่ที่ >10,000, >10,000 และ >1,024 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (ซึ่งมีค่าเท่ากับ MICs ต่อเชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime และ *E. coli* ที่ไวต่อยา ceftazidime)

ผลที่ได้ดังกล่าวบ่งชี้ให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุด (α -mangostin) มีฤทธิ์ต้านเชื้อ ORSS สูงกว่ายา oxacillin เดียวๆ แม้ว่ายา ceftazidime และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดไม่ได้ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาทดสอบ ซึ่งผลดังกล่าวไม่สอดคล้องกับจากการศึกษาของ Iikubo et al. (2002) ที่พบว่าสารสกัดนี้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้านเชื้อ *Helicobacter pylori* ซึ่งเชื้อดังกล่าวเป็นแบคทีเรียแกรมลบ อย่างไรก็ตามผลที่ได้เหล่านั้นสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Iinuma et al. (1996) และ Chomnawang et al. (2009) ที่พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ MRSA, *Staphylococcus epidermidis* และ *Propionibacterium strains*.

โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมลบคือยาซึ่งพบมากในยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลคแทม ซึ่งเหตุผลนั้นน่าจะเป็นผลมาจากความแตกต่างทางโครงสร้างของผนังเซลล์ระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยที่แบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างหลายชั้นและมีความซับซ้อน เยื่อหุ้มชั้นนอกทำหน้าที่ป้องกันสารต่างๆ จากสิ่งแวดล้อมรวมทั้งยาปฏิชีวนะ (Eumkeb and Richards, 2004)

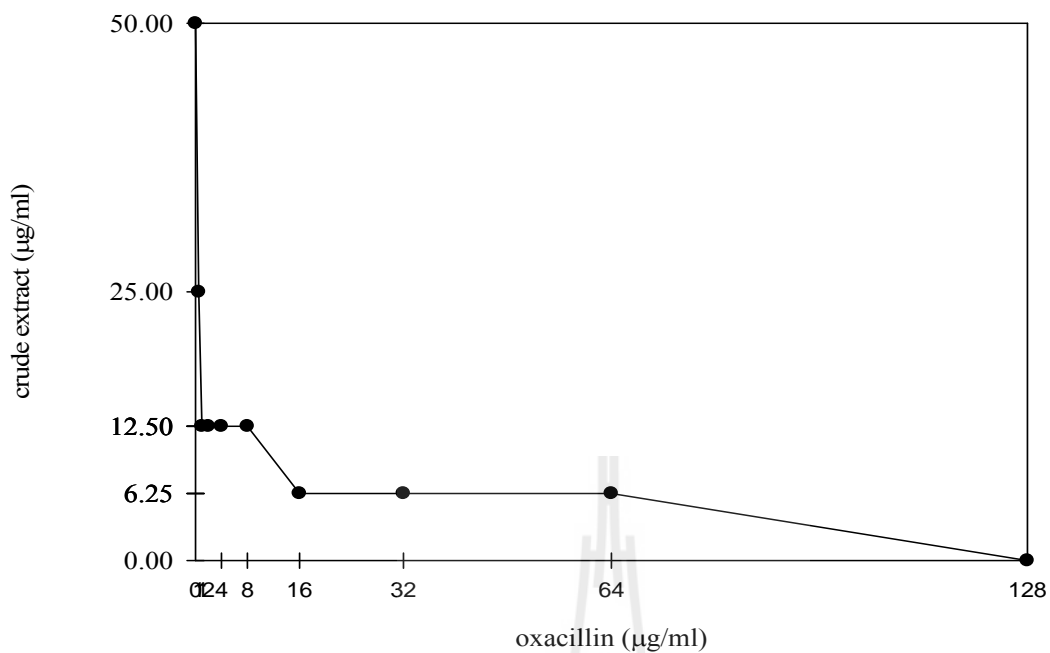
3.4 Checkerboard determination

เหตุผลที่สนับสนุนการใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกันเพื่อที่จะลดการคือยา ลดความเป็นพิษที่สัมพันธ์กับขนาดยา และลดการติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด (Lorian, 1999) ที่ผ่านมานักวิจัยได้รายงานการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากพืชและใช้ร่วมกันกับยาปฏิชีวนะสามารถต้านทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Darwish et al., 2002; Liu et al., 2000) สำหรับเชื้อ *S. saprophyticus* DMST 27055 ที่คือต่อยา oxacillin (ORSS) ที่ได้แยกทางคลินิกได้เลือกมาทดสอบในการศึกษานี้ โดยสารสกัดหยาบ fraction 3 และ α -mangostin ถูกผสม

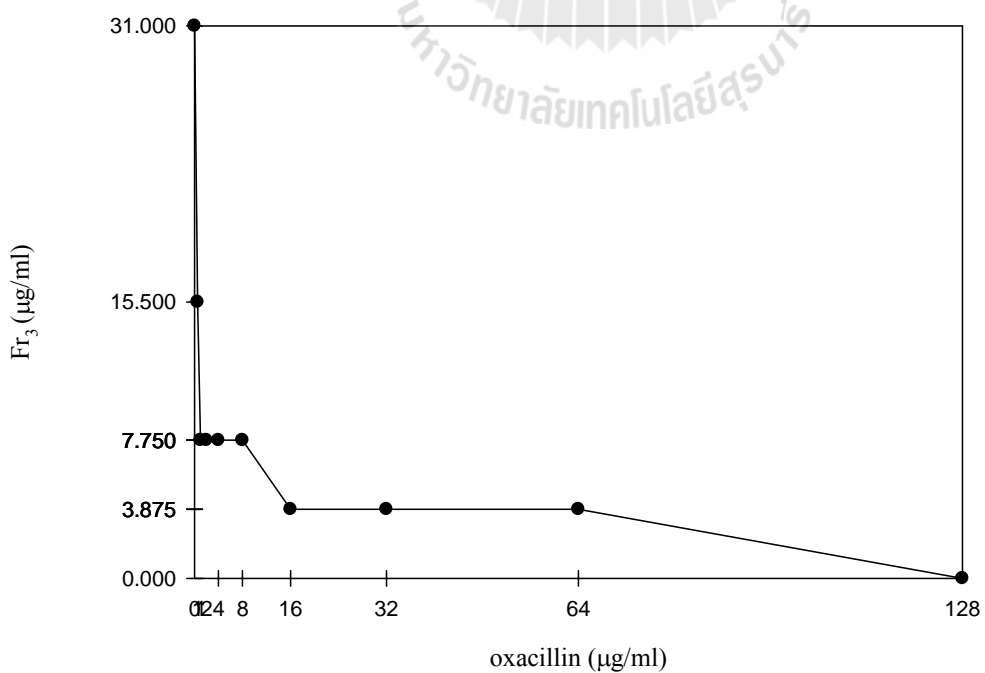
ตาราง 3.4 Summary the FICs for checkerboard assay of β -lactams used alone and in combination with bioactive compounds from the pericarp of GML extract against the drug resistant bacteria

Test bacteria	Combination of agents	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC (A+B)	FIC index value	FIC index
<i>S. saprophyticus</i> DMST 27055	Oxacillin	128	16	0.25	synergism
	Crude extract	50	6.25		
	Oxacillin	128	16	0.138	synergism
	Fr ₃	31	3.875		
<i>E. coli</i> DMST 19629	Oxacillin	128	16	0.375	synergism
	α -mangostin	8	2		
	Ceftazidime	>1,024	>1,024	>2	no interaction or antagonism
	Crude extract	>10,000	>10,000		
<i>E. coli</i> DMST 19629	Ceftazidime	>1,024	>1,024	>2	no interaction or antagonism
	Fr ₃	>10,000	>10,000		
	Ceftazidime	>1,024	>1,024	>2	no interaction or antagonism
	α -mangostin	>1,024	>1,024		
<i>E. cloacae</i> DMST 21394	Ceftazidime	>1,024	>1,024	>2	no interaction or antagonism
	Crude extract	>10,000	>10,000		
	Ceftazidime	>1,024	>1,024	>2	no interaction or antagonism
	Fr ₃	>10,000	>10,000		
<i>E. cloacae</i> DMST 21394	Ceftazidime α -mangostin	>1,024	>1,024	>2	no interaction or antagonism
		>1,024	>1,024		

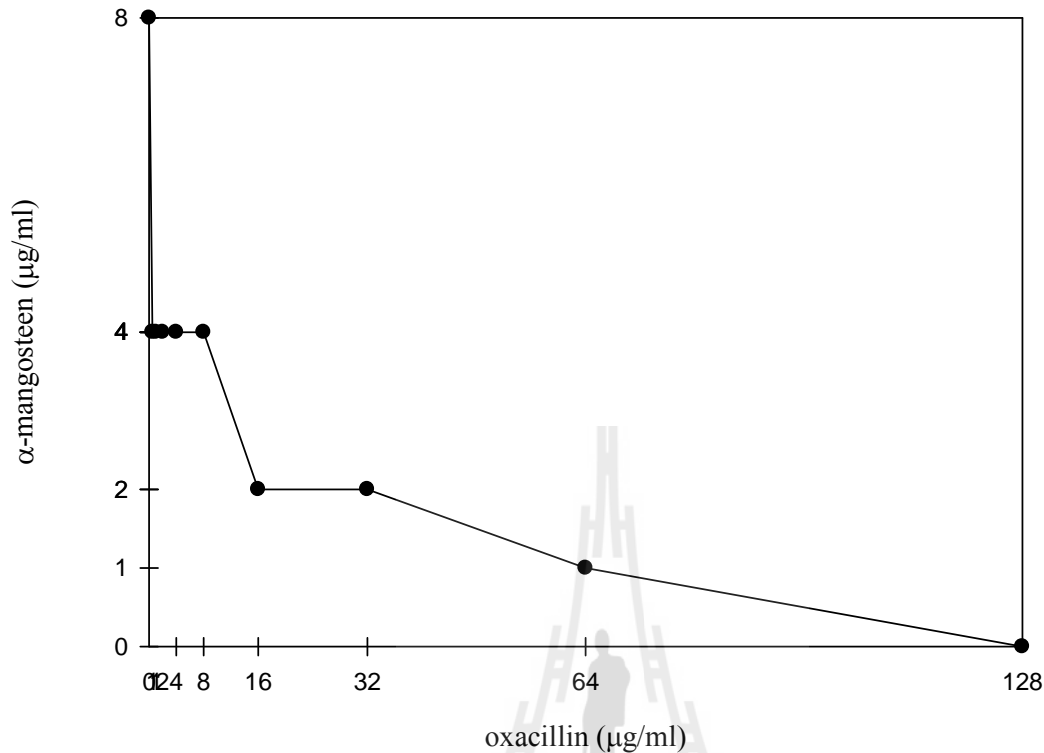
ผลการทดสอบ checkerboard ได้แสดงในตารางที่ 3.4 ซึ่งการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดและยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบเพื่อต้านเชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin (ORSS) เชื้อ *E. coli* ที่คือต่อยา ceftazidime และ เชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime สำหรับค่า FIC (Fractional inhibitory concentration) ของการรวมกันของยาแต่ละชนิดจะถูกคำนวณตามที่ได้อธิบายไว้ในบทที่ 2



รูป 3.10 Isobologram constructed from checkerboard MIC data showing antibacterial combination of oxacillin plus CH_2Cl_2 crude extract against clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* DMST 27055



รูป 3.11 Isobologram constructed from checkerboard MIC data showing antibacterial combination of oxacillin plus Fr₃ extract against clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* DMST 27055



รูป 3.12 Isobologram constructed from checkerboard MIC data showing antibacterial combination of oxacillin plus α -mangostin against clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* DMST 27055

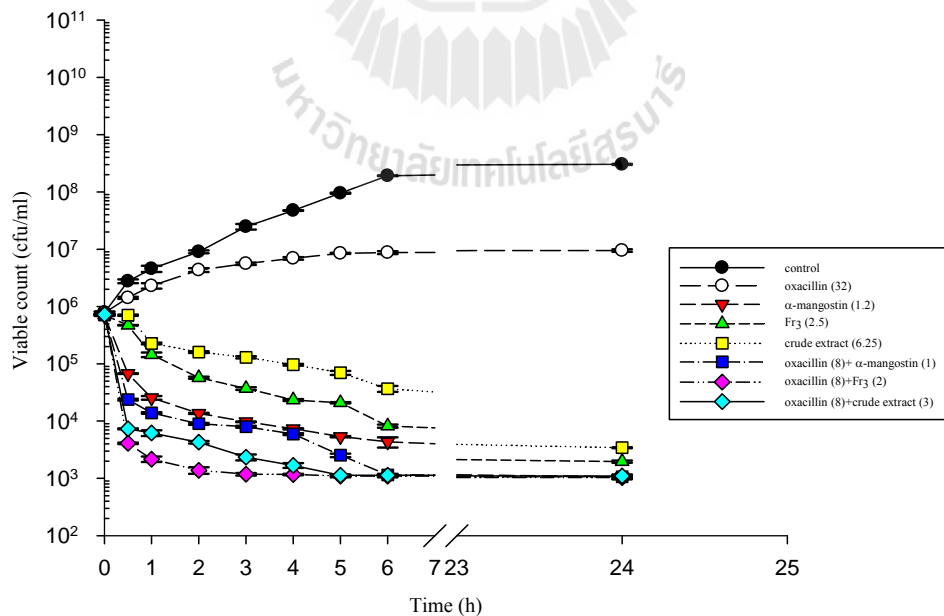
รูป 3.10 ถึงรูป 3.12 ได้แสดงให้เห็นการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างสารผสมของสารสกัดจากเปลือกมังคุดและยา oxacillin ต้านเชื้อ *S. saprophyticus* DMST 27055 ที่คือต่อยา oxacillin (ORSS) ที่ได้แยกทางคลินิก ($FIC \leq 0.5$) (Johnson et al., 2004; Odds, 2003) ค่า MICs ของสารสกัดหายา fraction 3 และ α -mangostin เมื่อผสมกับยา oxacillin ลดจาก 50, 31 และ 8 $\mu\text{g/mL}$ เป็น 6.25 (1/8 MIC), 3.875 (1/8 MIC) และ 2 $\mu\text{g/mL}$ (1/4) ตามลำดับ สำหรับยา oxacillin ลดจาก 128 $\mu\text{g/mL}$ เป็น 16 $\mu\text{g/mL}$

การทดสอบด้วยวิธี checkerboard ได้แสดง FICs index ของสารสกัดหายา CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin ผสมกับยา oxacillins พบการออกฤทธิ์เสริมกันที่ 0.25, 0.138 และ 0.375 ตามลำดับ ในการต้านเชื้อ ORSS โดยปกติผลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงการเสริมฤทธิ์อยู่ในระดับสูงเมื่อค่าต่ำกว่า 0.5 ซึ่งเป็นค่าที่ได้รับยอมรับกันอย่างกว้างขวางว่าสามารถบ่งบอกถึงการเสริมฤทธิ์ระหว่างยาต้านแบคทีเรีย 2 ตัว (Johnson et al., 2004; Odds, 2003) ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาที่พบการเสริมฤทธิ์ระหว่าง α -mangostin ผสมกับยา gentamicin (GM) ต้านเชื้อ Enterococci ที่คือต่อยา vancomycin (VRE) และ α -mangostin ผสมกับ vancomycin hydrochloride (VCM) ต้านเชื้อ MRSA (Sakagami et al., 2005) นอกจากนั้นผลการศึกษาที่ได้ยังสอดคล้องกับ Eumkeb et al. (2010) ที่พบว่าสารผสม ceftazidime 5

3.5 Killing curve determinations

Killing curve ของแบคทีเรียที่เป็นผลมาจากสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin เมื่อใช้เดี่ยวๆ และผสมกับยา oxacillins ด้านเชื้อ *S. saprophyticus* DMST 27055 ที่คือต่อยา oxacillin (ORSS) ที่ได้แยกทางคลินิก ผลการศึกษาได้แสดงในรูป 3.13 พบว่ากลุ่มควบคุมไม่มีการลดจำนวนของแบคทีเรียลง อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่าสารผสมระหว่างสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 (3.125 μ g/mL) ร่วมกับยา oxacillin (8 μ g/mL), fraction 3 (1.94 μ g/mL) ร่วมกับยา oxacillin (8 μ g/mL) และ α -mangostin (1 μ g/mL) ร่วมกับยา oxacillin (8 μ g/mL) ทำให้จำนวนเชื้อ ORSS ลดลงจาก 5×10^5 CFU/mL เป็น 10^3 CFU/mL ภายใน 6 ชั่วโมงจนกระทั่ง 24 ชั่วโมง (Eumkeb et al., 2010)

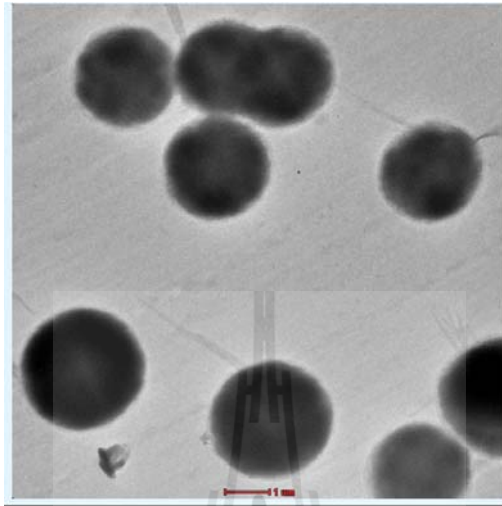
ผลที่ได้ดังกล่าวจะเป็นหลักฐานยืนยันว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุด (สารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin) เมื่อใช้ร่วมกับยา oxacillin ทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์ด้านเชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin ที่ได้แยกทางคลินิก อย่างไรก็ตามผลที่ได้จาก killing curve สามารถใช้ยืนยันผลจาก checkerboard assay ที่บอกการเสริมฤทธิ์ระหว่างสารสกัดจากเปลือกมังคุดและยาปฏิชีวนะ



รูป 3.13 The effect of oxacillin combined with bioactive compounds from the pericarp of GML extract on the clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* DMST 27055. The values plotted are the means of 3 observations, and the vertical bars indicate the standard errors of the means

3.6 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

การศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าสารผสมระหว่างยา oxacillin และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดทำให้ ultrastructure ของเชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin ที่ได้แยกทางคลินิกเกิดความเสียหาย (รูป 3.14-3.21)



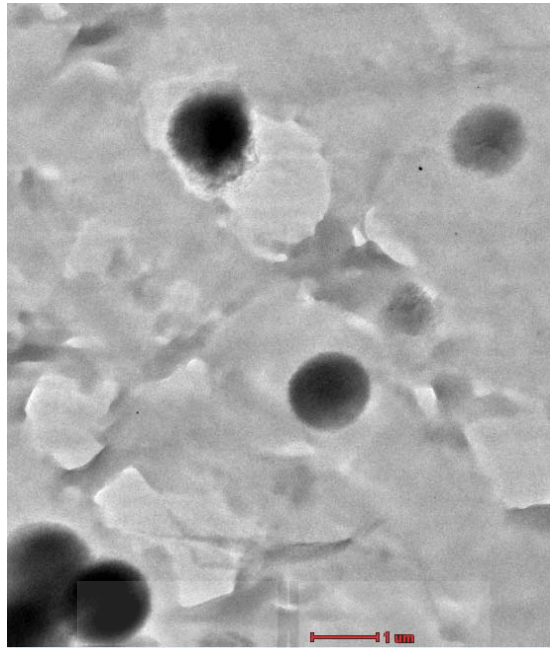
(a)



(b)

รูป 3.14 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* grown for 4 h in Mueller–Hinton broth: (a), (b), control (no antibacterial agent). x4,000, bar = 1 μm (a); x15,000, bar = 500 nm (b)

รูป 3.14 แสดงลักษณะเซลล์ใน log phase ปกติของเชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin (ORSS) ที่ได้แยกทางคลินิก ผลปรากฏว่าสามารถแยกผนังเซลล์และเยื่อหุ้มไซโทพลาสมิกได้ชัดเจน



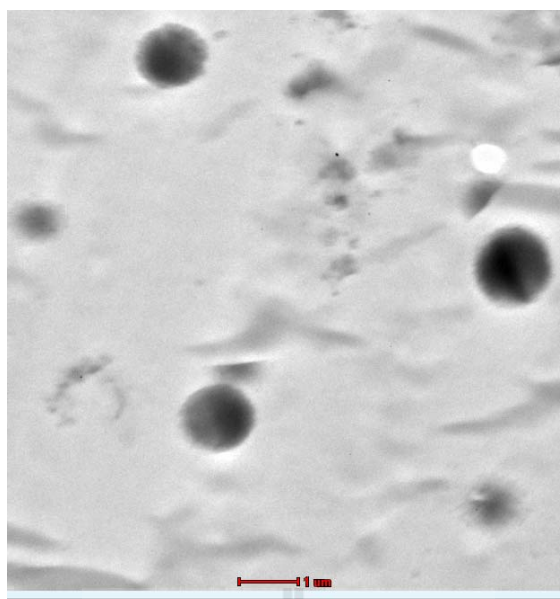
(a)



(b)

รูป 3.15 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* grown for 4 h in Mueller-Hinton broth: (a), (b), oxacillin (32 $\mu\text{g/mL}$). x4,000, bar = 1 μm (a); x19,500, bar = 200 nm (b)

รูป 3.15 แสดงผลของยา oxacillin 32 $\mu\text{g/mL}$ ต่อเชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin ที่ได้แยกทางคลินิกซึ่งผลพบว่ายา oxacillin ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ ORSS และขนาดของเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับยามีนขนาดลดลงเล็กน้อย



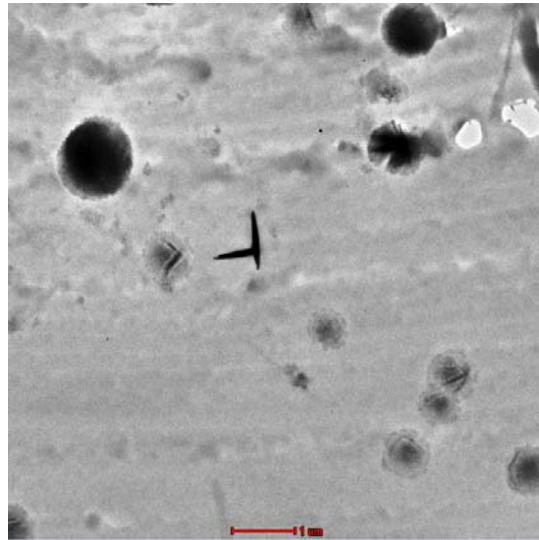
(a)



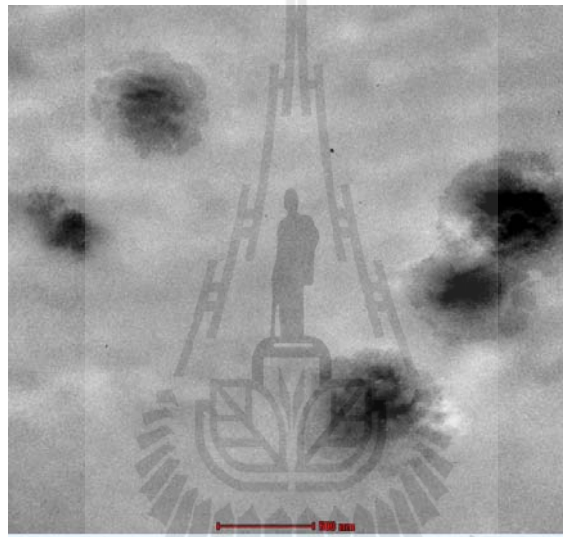
(b)

รูป 3.16 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* grown for 4 h in Mueller–Hinton broth: (a), (b), crude extract (6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). $\times 4,000$, bar = 1 μm (a); $\times 29,000$, bar = 200 nm (b)

รูป 3.16 แสดง micrograph ของเชื้อ *S. saprophyticus* ที่ดื้อต่อยา oxacillin ที่ได้แยกทางคลินิก ใน *log phase* หลังจากที่เชื้อได้รับสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ พบว่าขนาดของเซลล์ค่อนข้างเล็กกว่าเซลล์ปกติและเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียดังกล่าวได้รับความเสียหาย



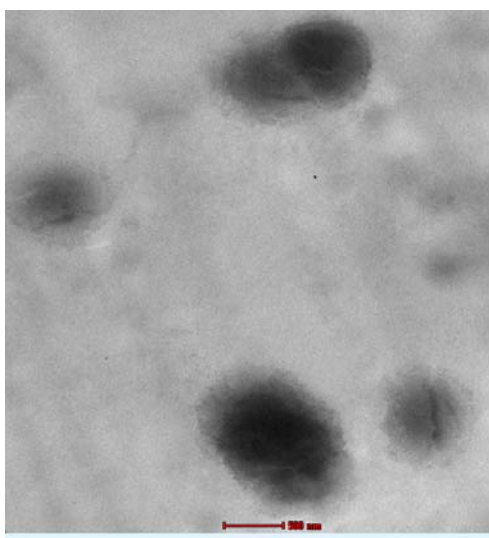
(a)



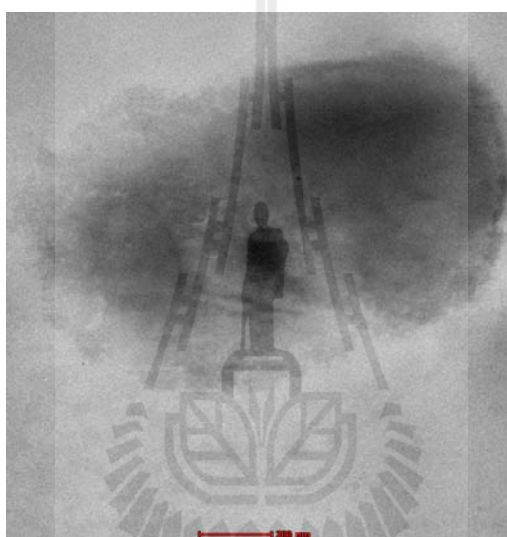
(b)

รูป 3.17 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* grown for 4 h in Mueller–Hinton broth: (a), (b), Fr₃ (2.50 µg/mL). x5,000, bar = 1 µm (a); x15,000, bar = 500 nm (b)

รูป 3.17 แสดง micrograph ของเชื้อ *S. saprophyticus* ที่ดื้อต่อยา oxacillin ที่ได้แยกทางคลินิก ใน log phase หลังจากได้รับ fraction 3 ของสารสกัดจากเปลือกมังคุดปริมาณ 2.50 µg/mL เซลล์แบคทีเรียที่ได้รับสารดังกล่าวมีขนาดเล็กลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม นอกจากนั้นเชื้อหุ้มเซลล์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ได้รับความเสียหายเช่นกัน



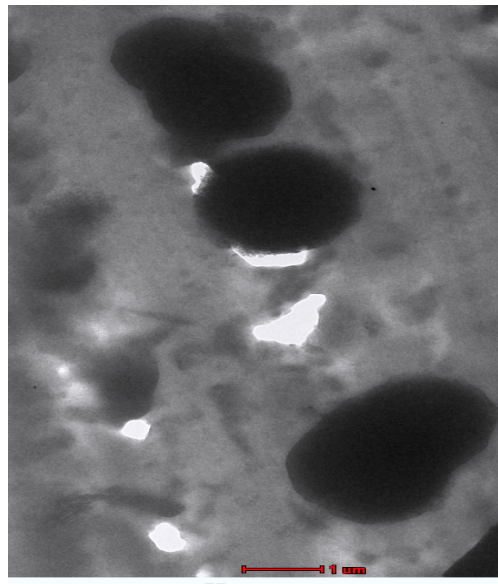
(a)



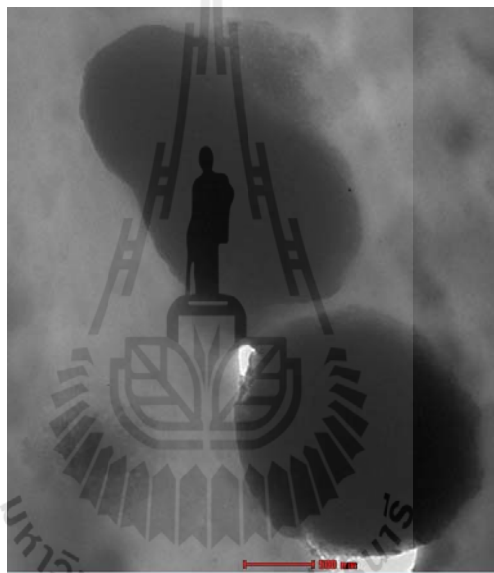
(b)

รูป 3.18 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* grown for 4 h in Mueller–Hinton broth: (a), (b), α -mangostin (1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). x9,900, bar = 500 nm (a); x29,000, bar = 200 nm (b)

รูป 3.18 แสดง micrograph ของเชื้อ *S. saprophyticus* ที่ดื้อต่อยา oxacillin ที่ได้แยกทางคลินิก ใน log phase หลังจากได้รับ α -mangostin ปริมาณ 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ปรากฏว่าเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวส่วนใหญ่มีขนาดเล็กกว่าเซลล์ควบคุมอย่างมากและมีรูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปรวมไปถึงเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย



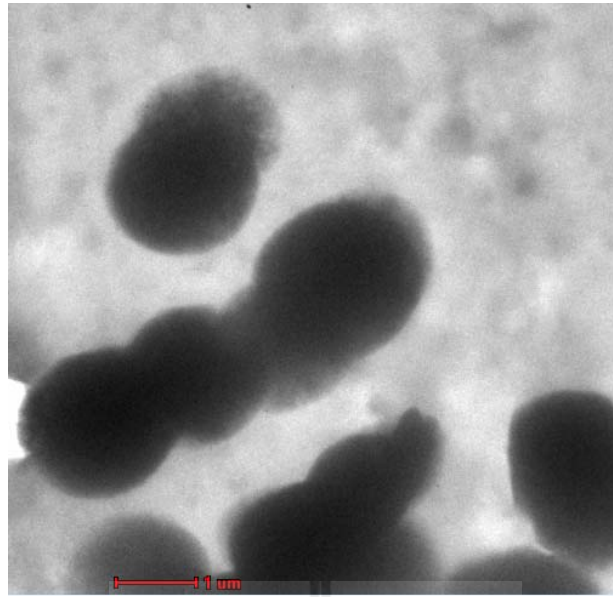
(a)



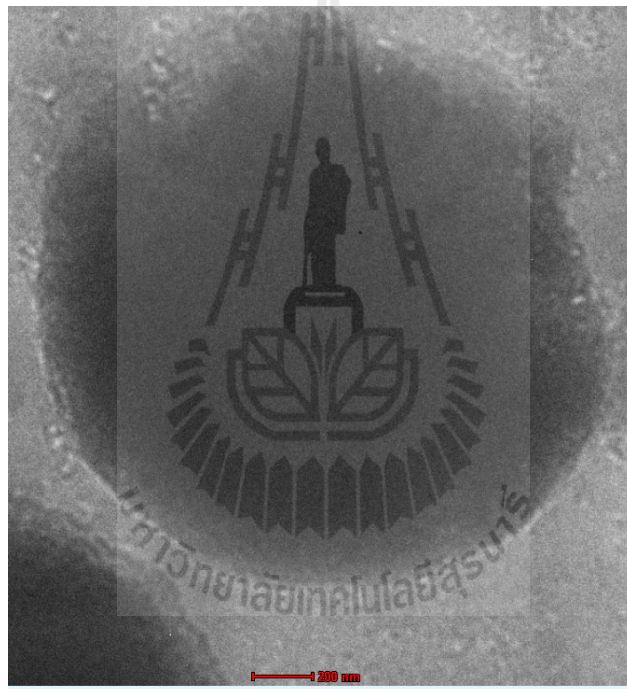
(b)

รูป 3.19 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* grown for 4 h in Mueller–Hinton broth: (a), (b), oxacillin (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) plus crude extract (3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$). x4,000, bar = 1 μm (a); x9,900, bar = 500 nm (b)

รูป 3.19 แสดงผลของสารผสมระหว่างยา oxacillin 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ต่อเชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin ที่ได้แยกทางคลินิก ผลปรากฏว่าเซลล์ดังกล่าวส่วนใหญ่มีขนาดค่อนข้างเล็กกว่าเซลล์ควบคุม รูปร่างของบางเซลล์ที่ได้รับสารผสมมีการบิดเบี้ยวและเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย



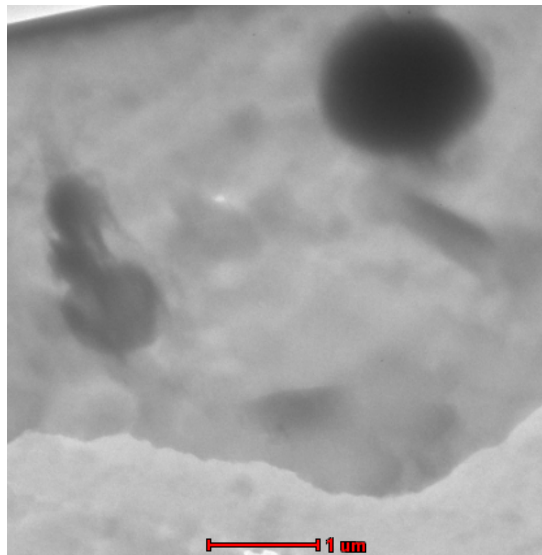
(a)



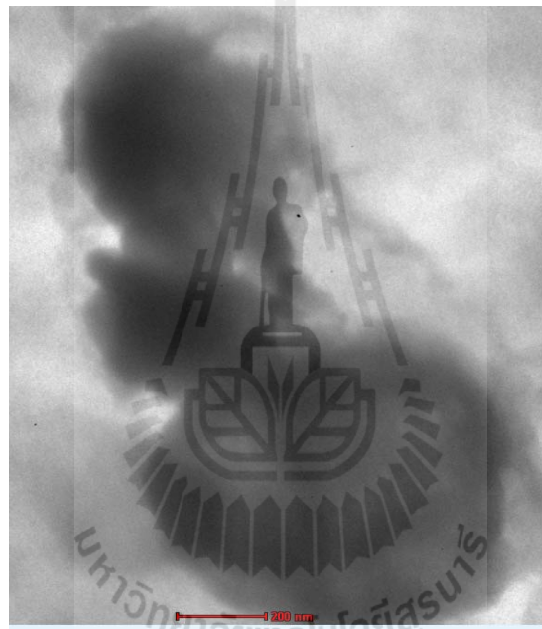
(b)

รูป 3.20 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* grown for 4 h in Mueller–Hinton broth: (a), (b), oxacillin (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) plus Fr₃ (1.938 $\mu\text{g}/\text{mL}$). x4,000, bar = 1 μm (a); x19,500, bar = 200 nm (b)

รูป 3.20 แสดงผลของสารผสมระหว่างยา oxacillin 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสารสกัด fraction 3 จากเปลือกมังคุด 1.938 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ต่อเชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin ที่ได้แยกทางคลินิก ผลที่ได้พบว่าเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับสารดังกล่าวส่วนใหญ่มีลักษณะรูปร่างบิดเบี้ยวและเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย



(a)



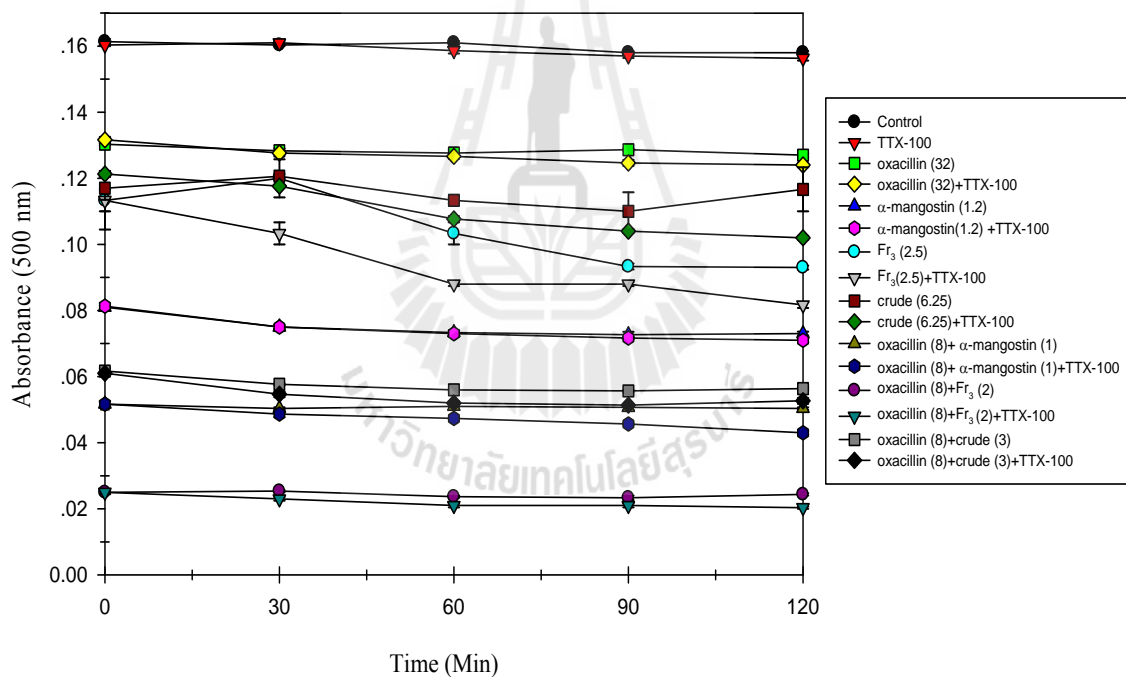
(b)

รูป 3.21 Ultrathin sections of log phase of clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* grown for 4 h in Mueller–Hinton broth: (a), (b), oxacillin (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) plus α -mangostin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). x5,000, bar = 1 μm (a); x29,000, bar = 200 nm (b)

รูป 3.21 แสดงผลของสารผสมระหว่างยา oxacillin 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ α -mangostin จากสารสกัดจากเปลือกมังคุด 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ต่อเชื้อ *S. saprophyticus* ที่ดื้อต่อยา oxacillin ที่ได้แยกทางคลินิก ขนาดของเซลล์ดังกล่าวหลังได้รับสารผสมพบว่ามีขนาดเล็กกว่าเซลล์ควบคุมอย่างชัดเจน นอกจากนี้รูปร่างของเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหายอย่างเห็นได้ชัด

ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Eumkeb et al. (2010) ที่พบว่ากล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าสารผสมระหว่าง galangin และยา ceftazidime ทำให้ ultrastructure ของเชื้อ MRSA ได้รับความเสียหาย นอกจากนี้ผลดังกล่าวยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Onnmetta-aree et al. (2006) ที่ได้แสดงผลจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านอย่างชัดเจนว่าสารสกัดจากข่า (galangal) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นในของเชื้อ *S. aureus* ได้รับความเสียหาย จากผลที่ได้ดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่ายา oxacillin มีฤทธิ์เพียงเล็กน้อยในการต้านเชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin ที่ได้แยกทางคลินิก ขณะที่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีประสิทธิภาพสูงกว่ายา oxacillin ในการต้านเชื้อ ORSS ยิ่งไปกว่านั้นสารผสมระหว่างยา oxacillin และสารสกัดจากเปลือกมังคุดได้แสดงการออกฤทธิ์เสริมกันอย่างมากในการต้านเชื้อ ORSS ซึ่งได้แสดงในรูป 3.21

3.7 การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane permeability)



รูป 3.22 Permeabilization of clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* by bioactive compounds from the pericarp of GML extract alone and in combination with oxacillin and lysis caused by subsequent treatment with 300 µg/ml TTX-100. The bars represent the standard deviations of 3 replicates

รูป 3.22 แสดงการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin ที่ได้แยกทางคลินิกหลังได้รับยา oxacillin, สารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin ที่ความเข้มข้น 32 µg/mL, 6.25 µg/mL, 2.50 µg/mL และ 1.2 µg/mL ตามลำดับ เมื่อใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกันระหว่างยา

ผลจากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุด (สารสกัด หนายาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin) และยา oxacillin ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านเยื่อหุ้ม ชั้นนอกของเชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin ที่ได้แยกทางคลินิก เมื่อใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกันตาม ความเข้มข้นที่กล่าวไว้ข้างต้น สำหรับ Triton X-100 ถูกนำมาใช้เป็น permeabilizing probe ซึ่งผลที่ได้จาก การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งพบว่า *D,L-1-Acetoxychavicol acetate* ทำให้เยื่อหุ้ม ชั้นนอกของ *S. aureus* เสียหาย (Oonmetta-aree et al., 2006) นอกจากนี้สารผสมระหว่างสารสกัดจากข่า กับยา amoxicillin และระหว่าง luteolin กับ amoxicillin หรือระหว่าง apigenin กับ ceftazidime ทำให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงการซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกของเชื้อ *E. coli* ที่คือต่อยา amoxicillin หรือเชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime ตามลำดับ (Eumkeb and Chukrathok, 2013; Eumkeb et al., 2012a; Eumkeb et al., 2012b) ผล ดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกของเชื้อ ORSS เกิดจากทั้งสารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดเมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยา oxacillin ซึ่งกลไกนี้เป็นหนึ่งกลไกที่ สำคัญจากหลายๆ กลไกการออกฤทธิ์ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์

3.8 การซึมผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic membrane (CM) permeability)

การออกฤทธิ์ของ oxacillin และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดเมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกันต่อการซึมผ่านของเยื่อไซโตพลาสซึมของเชื้อ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin (ORSS) ที่ได้แยกทางคลินิกได้ทดสอบโดยใช้ cytoplasmic enzyme β -galactosidase ผลการศึกษาพบว่าไม่มีการ เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase ภายใน 0-3 ชั่วโมงหลังได้รับสารต้านแบคทีเรียเหล่านั้นเดี่ยวๆ หรือร่วมกัน ขณะที่พบการทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase ในช่วง 4-5 ชั่วโมง ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า สารต้านแบคทีเรียที่นำมาศึกษาน่าจะสามารถเพิ่มการซึมผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของเชื้อ ORSS หลังจก ได้รับสาร 4 ชั่วโมง ในทำนองเดียวกันผลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาที่ *D,L-1-Acetoxychavicol acetate* ส่งผลให้เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของเชื้อ *S. aureus* ได้รับความเสียหายและทำให้เกิด วิกฤตของเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมทำให้มีการปล่อยส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์รวมไปถึงกรดนิวคลีอิก ซึ่งสามารถวัดได้ที่ 260 นาโนเมตร (Oonmetta-aree et al., 2006) เช่นเดียวกับสารผสมระหว่าง luteolin กับ amoxicillin หรือ apigenin กับ ceftazidime ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของ เชื้อ *E. coli* ที่คือต่อยา amoxicillin หรือเชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime ตามลำดับ (Eumkeb and Chukrathok, 2013; Eumkeb et al., 2012b) ผลที่ได้ดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่าเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมมี คุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่านอย่างมาก จะยอมให้โมเลกุลที่เฉพาะเจาะจงและช่วยขับของเสียออกนอกเซลล์ โครงสร้างทั่วไปของเยื่อหุ้มชีวภาพเป็น phospholipid bilayer โพรตีนหลักของเยื่อหุ้มเซลล์โดยปกติแล้วจะ มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) อยู่ที่ผิวด้านนอกเพื่อให้สัมพันธ์กับสายกรดไขมันแบบไม่มีขั้ว (non-polar amino acid chain) ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Brock, 1997; Tropp, 1997)

3.9 Electrophoresis

ผลการทดสอบ SDS-PAGE ได้แสดงในรูป 3.23

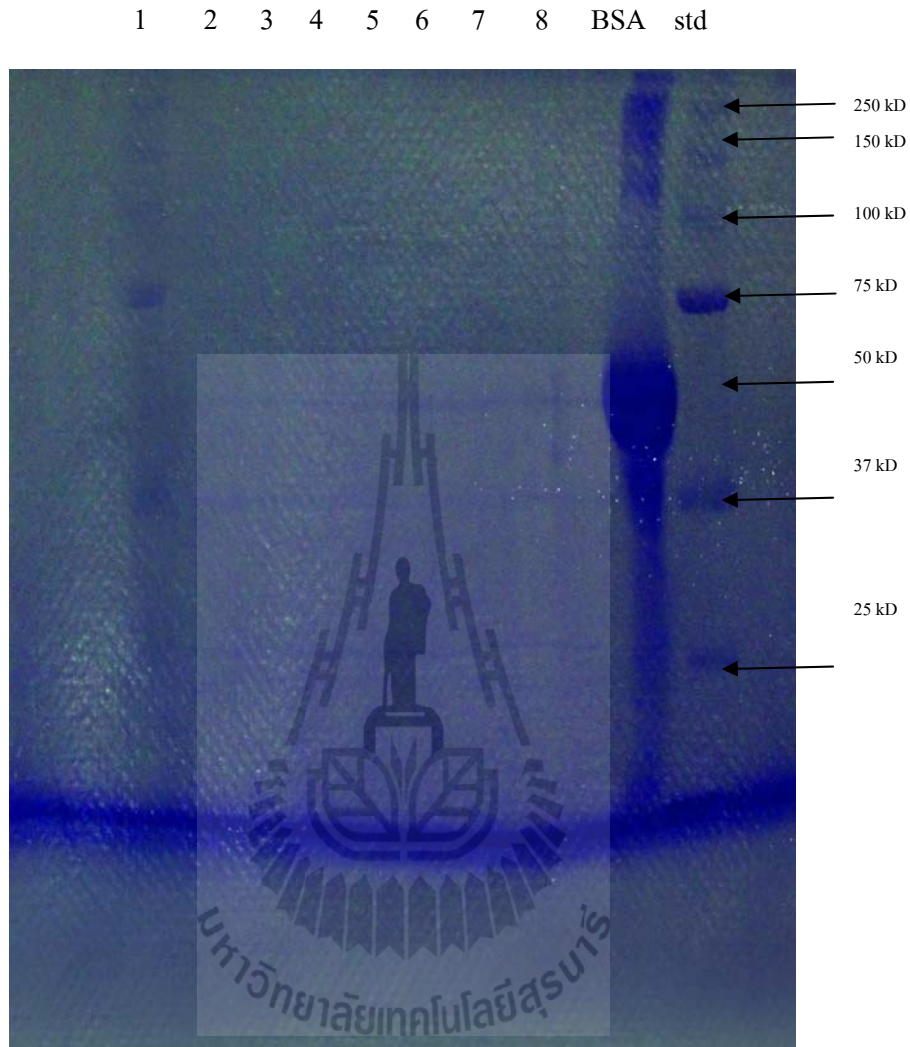


Figure 4.23 SDS-PAGE showing the bacterial membrane and peptidoglycan associated protein (BMPG) of clinical isolates of oxacillin-resistant *S. saprophyticus* DMST 27055 grown in the absence of drug (control; lane 1), oxacillin 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 2), α -mangostin 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 3), Fr_3 2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 4), crude extract 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 5), oxacillin 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ plus α -mangostin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 6), oxacillin 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ plus Fr_3 1.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 7), oxacillin 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ plus crude extract 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 8), BSA; standard Bovine serum and std; molecular weight marker proteins (kDa)

รูป 4.23 แสดงผลของ SDS-PAGE ซึ่งได้แสดง BMPG ของ *S. saprophyticus* ที่คือต่อยา oxacillin (ORSS) ที่ได้แยกทางคลินิก ที่ได้เลี้ยงในอาหารที่ไม่มียา (ควบคุม ; เลน 1) และมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดและยาปฏิชีวนะ ; ยา oxacillin เดี่ยวๆ 32 $\mu\text{g/mL}$ (เลน 2), α -mangostin เดี่ยวๆ 1.2 $\mu\text{g/mL}$ (เลน 3) , fraction 3 เดี่ยวๆ 2.50 $\mu\text{g/mL}$ (เลน 4) , สารสกัดหยาบ เดี่ยวๆ 6.25 $\mu\text{g/mL}$ (เลน 5) , ยา oxacillin 8 $\mu\text{g/mL}$ ผสมกับ α -mangostin 1 $\mu\text{g/mL}$ (เลน 6) , ยา oxacillin 8 $\mu\text{g/mL}$ ผสมกับ fraction3 1.94 $\mu\text{g/mL}$ (เลน 7) และ ยา oxacillin 8 $\mu\text{g/mL}$ ผสมกับสารสกัดหยาบ 3.125 $\mu\text{g/mL}$ (เลน 8) สำหรับ Bovine serum albumin ถูกนำมาใช้เป็น โปรตีนมาตรฐาน และ kDa เป็นหน่วยน้ำหนักโมเลกุลของ marker protein

แถบ (bands) โปรตีนที่สัมพันธ์กับ BMPG ของเชื้อ ORSS หลังจากรักษาด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดได้แสดงในรูป 3.23 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแถบของโปรตีนขนาดหยาบที่น้ำหนักโมเลกุล 75, 100 และ 250 kDa ในเลนที่ 2 ถึง 8 ของเซลล์ที่ได้รับสาร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (เลน 1) ในทางตรงข้ามแถบโปรตีนของเซลล์ที่ได้รับสารต้านแบคทีเรียมีความเข้มมากกว่ากลุ่มควบคุมที่น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa ทั้งนี้ผลที่ได้ดังกล่าวสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงของเซลล์ที่ได้รับสารต้านแบคทีเรียจะถูกยับยั้งการสังเคราะห์หรือเกิดการฉีกขาดจึงทำให้พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเบา ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกมังคุดสามารถรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนที่สัมพันธ์กับ BMPG



บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์และอภิปรายผลการวิจัย

การเกิดขึ้นการดื้อยาหลายขนานของแบคทีเรียก่อโรคได้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการค้นหายาปฏิชีวนะใหม่ๆ และวิธีการใหม่ๆ ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วน การดื้อยาของเชื้อกลุ่ม *Staphylococcal* ได้ดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam หลายขนาน เช่น ยา methicillin ยา oxacillin และยา flucloxacillin ซึ่งพบหลังจากที่เริ่มนำยาในกลุ่มนี้มาใช้ไม่นานและอุบัติการณ์ของเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin (MRSA) ได้เพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Bush, 2004) แหล่งที่น่าสนใจของการหายารักษาตัวใหม่ คือ ยาต้านแบคทีเรียที่มาจากพืช เช่น ข่าซึ่งได้ถูกสกัดเอาสารออกฤทธิ์ที่ชื่อว่า galangin ซึ่งมีการเสริมฤทธิ์กับยา penicillin ในการยับยั้งเชื้อ MRSA (Eumkeb et al., 2010) สาร α -และ γ -mangostin เป็นสารกลุ่ม xanthone และเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักที่พบในเปลือกผลมังคุด สำหรับการออกฤทธิ์ของ α -mangostin ได้มีการยืนยันว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านจุลชีพต้านเชื้อ MRSA และ *Helicobacter pylori* (Chomnawang et al., 2009; Iikubo et al., 2002; Iinuma et al., 1996) อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยใดศึกษาการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต้านแบคทีเรียดื้อยา เช่น เชื้อ *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*) เชื้อ *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) และเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุด (สารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin) เมื่อใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลคแทมต้านเชื้อแบคทีเรียดื้อยาเหล่านั้น

ผลมังคุดที่เติบโตเต็มที่ (*Garcinia mangostna* L.) ได้เก็บมาจากจังหวัดนครราชสีมา แล้วนำมาสกัดและตรวจสอบเอกลักษณ์สำหรับสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin ถูกสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet ขณะเดียวกัน HPLC chromatograms ของสารสกัดดังกล่าวได้แสดงรูปแบบที่คล้ายกันและมี peak หลักของ α -mangostin ที่ retention time ประมาณ 5.33 นาที จากนั้นตรวจสอบเพื่อยืนยันสาร α -mangostin โดยใช้ NMR เปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่าน นอกจากนี้ยังได้ศึกษา bacterial suspension standard curve เพื่อบ่งชี้จำนวนที่แท้จริงของแบคทีเรีย ค่า MIC ของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3, α -mangostin และ oxacillin ต้านเชื้อ *S. saprophyticus* ที่ดื้อต่อยา oxacillin (ORSS) ที่ได้แยกทางคลินิก มีค่า 50, 31, 8 และ 128 μ g/mL ตามลำดับ แม้ว่าค่า MIC ของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3, α -mangostin และยา ceftazidime ต้านเชื้อทั้งสอง *E. coli* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime และ เชื้อ *E. cloacae* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime มีค่าเท่ากันคือ $> 10,000$, $> 10,000$, $> 1,024$ และ > 1024 μ g/mL ตามลำดับ ดังนั้นผลที่ได้ดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ ORSS สูงกว่ายา oxacillin เดี่ยวๆ อีกทั้งยังชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *E. cloacae* มีการดื้อต่อยา ceftazidime และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดสูง ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลของ Iinuma et al. (1996) และ Chomnawang et al. (2009) ที่พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ MRSA, *Staphylococcus epidermidis*

ผลของ checkerboard ได้แสดงให้เห็นว่าค่า MICs ของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin เมื่อผสมกับยา oxacillin ลดจาก 50, 31 และ 8 $\mu\text{g/mL}$ เป็น 6.25 (1/8 MIC), 3.875 (1/8 MIC) และ 2 $\mu\text{g/mL}$ (1/4) ตามลำดับ สำหรับยา oxacillin ลดจาก 128 $\mu\text{g/mL}$ เป็น 16 $\mu\text{g/mL}$ ในการต้านเชื้อ ORSS ขณะที่ FIC index ของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin ผสมกับยา oxacillin ต้านเชื้อ ORSS มีค่า 0.25, 0.138 และ 0.375 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสริมฤทธิ์กัน อย่างไรก็ตามผลที่ได้ดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาที่พบการเสริมฤทธิ์ระหว่าง α -mangostin ผสมกับยา gentamicin (GM) ต้านเชื้อ Enterococci ที่คือต่อยา vancomycin (VRE) และ α -mangostin ผสมกับ vancomycin hydrochloride (VCM) ต้านเชื้อ MRSA (Sakagami et al., 2005) ผลที่ได้ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสกัดจากเปลือกมังคุดไม่เพียงแต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ ORSS แต่ยังสามารถทำให้แบคทีเรียคือยากลายเป็นไวต่อยาปฏิชีวนะ (Eumkeb et al., 2010)

Killing curve ได้พิสูจน์ให้เห็นว่าสารผสมระหว่างสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 (3.125 $\mu\text{g/mL}$) กับยา oxacillin (8 $\mu\text{g/mL}$), fraction 3 (1.94 $\mu\text{g/mL}$) รวมกับยา oxacillin (8 $\mu\text{g/mL}$) และ α -mangostin (1 $\mu\text{g/mL}$) รวมกับยา oxacillin (8 $\mu\text{g/mL}$) ทำให้จำนวนเชื้อ ORSS ลดลงจาก 5×10^5 CFU/mL เป็น 10^3 CFU/mL ภายใน 6 ชั่วโมงจนกระทั่ง 24 ชั่วโมง ผลที่ได้ดังกล่าวสามารถอนุมานได้ว่าสารผสมระหว่างสารสกัดจากเปลือกมังคุดกับยา oxacillin มีการออกฤทธิ์เสริมกันต้านเชื้อที่ศึกษา อย่างไรก็ตามผลที่ได้จาก killing curve สามารถยืนยันผลจาก checkerboard assay ที่บอกการเสริมฤทธิ์ระหว่างสารสกัดจากเปลือกมังคุดและยาปฏิชีวนะ

นอกจากนั้นผลจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านได้แสดงให้เห็นการออกฤทธิ์ของสารผสมระหว่างยา oxacillin กับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุด เช่น α -mangostin ที่ sub-MIC ต่อเชื้อ ORSS แสดงให้เห็นขนาดของเซลล์เล็กกว่าเซลล์ควบคุมอย่างชัดเจน อีกทั้งยังพบว่าเซลล์มีรูปร่างบิดเบี้ยวและเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Eumkeb et al. (2010) ที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าสารผสมระหว่าง galangin และยา ceftazidime ทำให้เกิดความเสียหายต่อ ultrastructure ของเซลล์ MRSA ผลที่ได้นี้สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าทั้งสารสกัดจากเปลือกมังคุดเดี่ยวๆ หรือผสมกับยา oxacillin อาจจะมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ซึ่งนำไปสู่รูปร่างของเซลล์ผิดปกติและเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย

ผลจากการทดสอบการซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุด (สารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 , fraction 3 และ α -mangostin) เมื่อใช้เดี่ยวๆหรือใช้ร่วมกับยา oxacillin ส่งผลให้เกิดการซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกของเชื้อ ORSS เพิ่มขึ้นซ้ำๆ ผลที่ได้ดังกล่าวสอดคล้องกับ

ในทางเดียวกันผลการศึกษาศึกษาการซึมผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมพบว่าไม่มีการเพิ่มการทำงานของเอ็นไซม์ β -galactosidase ภายใน 0-3 ชั่วโมงหลังได้รับสารต้านแบคทีเรียเหล่านั้นเดี่ยวๆ หรือรวมกัน ขณะที่พบการทำงานของเอ็นไซม์ β -galactosidase ในช่วง 4-5 ชั่วโมง ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าสารต้านแบคทีเรียที่นำมาศึกษาสามารถเพิ่มการซึมผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของเชื้อ ORSS หลังจากได้รับสาร 4 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้ดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาที่ *D,L-1-Acetoxychavicol acetate* ส่งผลให้เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของเชื้อ *S. aureus* ได้รับความเสียหายและทำให้เกิดลักษณะของเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (*Oonmetta-aree et al., 2006*) ผลที่ได้ดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่าเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมมีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่านอย่างมากจะยอมให้โมเลกุลที่เฉพาะเจาะจงและช่วยขับของเสียออกนอกเซลล์ โครงสร้างทั่วไปของเยื่อหุ้มชีวภาพเป็น *phospholipid bilayer* ซึ่งจะทำให้สารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ศึกษาเมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยา *oxacillin* จะใช้เวลานานในการทะลุผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของเชื้อแบคทีเรียที่คื้อยานี้

นอกจากนั้นผลจากการทดสอบด้วย SDS-PAGE พบว่ามีการขาดหายของแถบของโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 75, 100 และ 250 kDa ในเลนที่ 2 ถึง 8 ของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากเปลือกมังคุดเดี่ยวๆ หรือผสมกับยา *oxacillin* ที่ความเข้มข้น *sub-MIC* เปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม (เลน 1) ขณะที่แถบโปรตีน *BMPG* ของเซลล์ที่ได้รับสารต้านแบคทีเรียพบแถบเข้มมากกว่าเซลล์ควบคุมที่น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa ทั้งนี้ผลที่ได้ดังกล่าวสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงของเซลล์ที่ได้รับสารต้านแบคทีเรียจะถูกยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือเกิดการฉีกขาดจึงทำให้พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเบา ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกมังคุดสามารถรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนที่สัมพันธ์กับ *BMPG*

ผลที่ได้ดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่ายา *oxacillin* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ ORSS เพียงเล็กน้อย ขณะที่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ค่อนข้างสูงกว่ายา *oxacillin* เดี่ยวๆ ในการต้านเชื้อ ORSS ยิ่งไปกว่านั้นสารผสมระหว่างยา *oxacillin* และสารสกัดจากเปลือกมังคุดโดยเฉพาะอย่างยิ่ง α -*mangostin* ซึ่งมีฤทธิ์เสริมกันอย่างมากในการต้านเชื้อ ORSS ดังนั้นผลจากการศึกษานี้สามารถเป็นหลักฐานยืนยันได้ว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีการเสริมฤทธิ์กับยา *oxacillin* ในการต้านเชื้อ ORSS

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การออกฤทธิ์ของสารผสมระหว่างสารสกัดจากเปลือกมังคุดกับยา *oxacillin* อาจมีกลไกการออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับ 2 กลไก 1) ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่สัมพันธ์กับ *BMPG* 2) เพิ่มการซึมผ่านของเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม สำหรับสารสกัดจากเปลือกมังคุด เช่น α -*mangostin* มีความปลอดภัยเพียงพอสำหรับการนำไปใช้รักษา ดังนั้นสารสกัดดังกล่าวควรที่จะได้รับการพัฒนาเสริมกับยา *oxacillin* เพื่อต้านเชื้อ ORSS ซึ่งในปัจจุบันเชื่อดังกล่าวคือต่ออายุกลุ่ม *penicillin* เกือบทุกตัว อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการศึกษาในหลอดทดลองครั้งนี้จะต้องได้รับการทดสอบยืนยันในสัตว์ทดลองหรือในมนุษย์

บรรณานุกรม

- Akao Y, Nakagawa Y, Iinuma M and Nozawa Y (2008) Anti-cancer effects of xanthenes from pericarps of mangosteen. *Journal of Molecular Sciences* 9:355-370.
- Asai F, Tosa H, Tanaka T and Iinuma M (1995) A xanthone from pericarps of *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* 39:943-944.
- Brock TD, Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (1997) *Cell biology*, Prentice-Hall Internal Inc, USA.
- Brunton LL, Chabner BA and Knollmann BC (2010) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill Professional, USA.
- Bush K (2004) Why it is important to continue antibacterial drug discovery, in *ASM News* pp 282–287.
- Casal M, Vaquero M, Rinder H, Tortoli E, Grosset J, Rusch-Gerdes S, Gutierrez J and Jarlier V (2005) *Microbial Drug Resistance*.
- Chairungsrilerd N, Furukawa K, Ohta T, Nozoe S and Ohizumi Y (1996a) Histaminergic and serotonergic receptor blocking substances from the medicinal plant *Garcinia mangostana*. *Planta Medica* 62:471-472.
- Chairungsrilerd N, Furukawa K, Ohta T, Nozoe S and Ohizumi Y (1996b) Pharmacological properties of alpha-mangostin, a novel histamine H1 receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology* 314:351-356.
- Chairungsrilerd N, Furukawa K, Tadano T, Kisara K and Ohizumi Y (1998) Effect of gamma-mangostin through the inhibition of 5-hydroxy-tryptamine_{2A} receptors in 5-fluoro-alpha-methyltryptamine-induced head-twitch responses of mice. *British Journal of Pharmacology* 123:855-862.
- Chairungsrilerd N, Takeuchi K, Ohizumi Y, Nozoe S and Ohta T (1996c) Mangostanol, a phenyl xanthone from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* 43:1099-1102.
- Chambers HF (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infectious Diseases* 7:178-182.
- Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS and Gritsanapan W (2005) Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* 101:330-333.
- Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS and Gritsanapan W (2007) Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnes*. *Fitoterapia* 78:401-408.
- Chomnawang MT, Surassmo S, Wongsariya K and Bunyapraphatsara N (2009) Antibacterial activity of Thai medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* 80:102-104.

- Chopra RN, Nayar SL and Chopra IC (1956) Comparison of the thick cell wall of gram-positive bacteria with the comparatively thin cell wall of gram-negative bacteria, *The National Institute of Science Communication and Information resources, New Delhi (India)*.
- Clinical Laboratory Standards Institute (2013) Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, in *CLSI document M7-A7, Seventh Edition (Matthew AW, Franklin, R.C., William, A.C., Micheal, N.D., George, M.E., David W.H. Janet, F.H., Mary, J.F., Jana, M.S., Donal, E.L., Danie, J.S., Fred, C.T., John, D.T., Melvin, P.W., & Barbara, L.Z. ed) pp 14-34, Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, Pennsylvania*.
- Cookson B (1995) Aspects of the epidemiology of MRSA in Europe. *Journal Chemotherapy* 7 93-98.
- Cox RA, Conquest C, Mallaghan C and Marples RR (1995) A major outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* caused by a new phage-type (EMRSA-16). *Journal of Hospital Infection* 29:87-106.
- Darwish RM, Aburjai T, Al-Khalil S and Mahafzah A (2002) Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 79:359-364.
- Ee GC, Daud S, Taufiq-Yap YH, Ismail NH and Rahmani M (2006) Xanthones from *Garcinia mangostana* (Guttiferae). *Natural Product Research* 20:1067-1073.
- Emori TG and Gaynes RP (1993) An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Reviews* 6:428-442.
- Eumkeb G (1999) Investigation of the effect of antifolates on *Escherichia coli* 1810, *The Robert Gordon University, United Kingdom*.
- Eumkeb G and Chukrathok S (2013) Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Phytomedicine* 20:262-269.
- Eumkeb G and Richards RME (2004) Reversing β -Lactam Antibiotic Resistance in Gram-positive bacteria by Some Flavonoids. *Suranaree J Sci Technol* 11:143-150.
- Eumkeb G, Sakdarat S and Siriwong S (2010) Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine* 18:40-45.
- Eumkeb G, Siriwong S, Phitaktim S, Rojtinnakorn N and Sakdarat S (2012a) Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*. *Journal of applied microbiology* 112:55-64.

- Eumkeb G, Siritwong S and Thumanu K (2012b) Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 117:247-253.
- Farnsworth NR and Bunyapraphatsara N (1992) *Thai Medicinal Plants*, Prachachon Co., Ltd., Bangkok.
- Firth N (2003) *Multiple Drug Resistant Bacteria*, Horizon Scientific, Wymondham.
- Fu C, Loo AE, Chia FP and Huang D (2007) Oligomeric proanthocyanidins from mangosteen pericarps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:7689-7694.
- Garner JS (1996) Hospital infection control practices advisory committee. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 17:53-80.
- Gopalakrishnan G, Banumathi B and Suresh G (1997) Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. *Journal of Natural Product* 60:519-524.
- Govindachari TR, Kalyanaraman PS, Muthukumaraswamy N and Pai BR (1971) Xanthenes of *Garcinia mangostana* Linn. *Tetrahedron* 27:3919-3926.
- Greenwood D (2000) *Antimicrobial Chemotherapy*, Oxford University Press, New York.
- Harborne JB and Baxter H (1993) *Phytochemical dictionary. A Handbook of bioactive compounds from plants*, Taylor and Francis, London.
- Harvey RA, Finkel R, Cubeddu LX and Clark MA (2009) *Pharmacology*, Lippincott Williams & Wilkins, New York.
- Iikubo K, Ishikawa Y, Ando N, Umezawa K and Nishiyama S (2002) The first direct synthesis of α -mangostin, a potent inhibitor of the acidic sphingomyelinase. *Tetrahedron Letters* 43:291-293.
- Inuma M, Tosa H, Tanaka T, Asai F, Kobayashi Y, Shimano R and Miyauchi K (1996) Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 48:861-865.
- Isogai E, Isogai H, Hirose K, Hayashi S and Oguma K (2001) In vivo synergy between green tea extract and levofloxacin against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection. *Current Microbiology* 42:248-251.
- Ji X, Avula B and Khan IA (2007) Quantitative and qualitative determination of six xanthenes in *Garcinia mangostana* L. by LC-PDA and LC-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43:1270-1276.
- Jinsart W, Ternai B, Buddhasukh D and Polya GM (1992) Inhibition of wheat embryo calcium-dependent protein kinase and other kinases by mangostin and gamma-mangostin. *Phytochemistry* 31:3711-3713.

- Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR and Rex JH (2004) Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 48:693-715.
- Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowsky JA, Sahm DF and Wenzel RP (2004) Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit--a European and North American Surveillance study (2000-2002). *Annals Clinical Microbiology and Antimicrobiology* 3:14.
- Jung HA, Su BN, Keller WJ, Mehta RG and Kinghorn AD (2006) Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:2077-2082.
- Jungthirpanich J, Tungsathapornpong A and Chaumrattanakul CC (2000) Urinary Tract infection in Thai children. *Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents* 18:103-107.
- Katzung BG ed (2006) *Basic & Clinical Pharmacology*, McGraw-Hill, New York.
- Kotilainen P, Routamaa M, Peltonen R, Evesti P, Eerola E, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J and Rossi T (2001) Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a health center ward and associated nursing home. *Archives of Internal Medicine* 161:859-863.
- Kusum M and Dejsirilert S (2003) Antimicrobial resistance surveillance of urinary tract infections in Thailand, 1993-2000. *Journal of Health Science* 12:206-214.
- Lambert PA (2005) Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57:1471-1485.
- Leclercq R and Courvalin P (1997) Resistance to glycopeptides in Enterococci. *Clinical Infectious Diseases* 24:545-556.
- Lin CN, Liou SJ, Lee TH, Chuang YC and Won SJ (1996) Xanthone derivatives as potential anti-cancer drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48:539-544.
- Liu IX, Durham DG and Richards RM (2000) Baicalin synergy with beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other beta-lactam-resistant strains of *S. aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52:361-366.
- Livermore DM and Brown DF (2001) Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 48 **Suppl 1**:59-64.
- Lorian V (1999) *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Williams&Wilkins., New York.
- Lu ZX, Hasmeda M, Mahabusarakam W, Ternai B, Ternai PC and Polya GM (1998) Inhibition of eukaryote protein kinases and of a cyclic nucleotide-binding phosphatase by prenylated xanthenes. *Chemico-Biological Interactions* 114:121-140.
- Mahabusarakam W, Kuaha K, Wilairat P and Taylor WC (2006) Prenylated xanthenes as potential antiplasmodial substances. *Planta Medica* 72:912-916.

- Mahabusarakam W, Proudfoot J, Taylor W and Croft K (2000) Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthenes derived from mangostin. *Free Radical Research* 33:643-659.
- Mahabusarakam W, Wiriyaichitra P and Taylor WC (1987) Chemical Constituents of *Garcinia mangostana*. *Journal of Natural Products* 50:474-478.
- Maharat Nakhonratchasima hospital (2012) Microbiology Report: Antibiotic Resistance Profile and Prevalence of Isolated Organisms by Site, Department of Clinical Pathology, Maharat Nakhon Ratchasima hospital, Nakhon Ratchasima, Thailand.
- Marri L, Dallai, R. and Marchini, D. (1996) The Novel Antibacterial Peptide Ceratotoxin A Alters Permeability of the Inner and Outer Membrane of *Escherichia coli* K-12. *Current microbiology* 33:40-43.
- Matsumoto K, Akao Y, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Inuma M and Nozawa Y (2005) Xanthenes induce cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer DLD-1 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13:6064-6069.
- McGaw LJ, Jager AK and van Staden J (2000) Antibacterial, anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 72:247-263.
- Medeiros AA (1997) Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases* 24 Suppl 1:S19-45.
- Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- Moellering RC (1998) Vancomycin-resistant Enterococci. *Clinical Infectious Diseases* 26:1196-1199.
- Montecalvo MA, Jarvis WR, Uman J, Shay DK, Petrullo C, Rodney K, Gedris C, Horowitz HW and Wormser GP (1999) Infection-control measures reduce transmission of vancomycin-resistant enterococci in an endemic setting. *Annals of Internal Medicine* 131:269-272.
- Moreira MAS, Souza ECd and Moraes CAD (2004) Multidrug efflux systems in Gram-negative bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 35:19-28.
- Morton J (1987) Mangosteen: *Garcinia mangostana* L., in *Fruits in warm climates* (Julia F ed) pp 301–304, Morton, Miami FL.
- Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS, Standiford HC, John JF, Korvick JA, Kauffman CA and Yu VL (1993) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *The American Journal of Medicine* 94:313-328.
- Murry B (1997) Vancomycin-resistant Enterococci. *American Journal of Medicine* 101:284-293.
- Nabandith V, Suzui M, Morioka T, Kaneshiro T, Kinjo T, Matsumoto K, Akao Y, Inuma M and Yoshimi N (2004) Inhibitory effects of crude alpha-mangostin, a xanthone derivative, on two different

- categories of colon preneoplastic lesions induced by 1, 2-dimethylhydrazine in the rat. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 5:433-438.
- Nakatani K, Nakahata N, Arakawa T, Yasuda H and Ohizumi Y (2002) Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E2 synthesis by gamma-mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. *Biochemical Pharmacology* 63:73-79.
- Nakatani K, Yamakuni T, Kondo N, Arakawa T, Oosawa K, Shimura S, Inoue H and Ohizumi Y (2004) gamma-Mangostin inhibits inhibitor-kappaB kinase activity and decreases lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 gene expression in C6 rat glioma cells. *Molecular Pharmacology* 66:667-674.
- Nourse C, Byrne C, Murphy H, Kaufmann ME, Clarke A and Butler K (2000) Eradication of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from a paediatric oncology unit and prevalence of colonization in hospitalized and community-based children. *Epidemiology and Infection* 124:53-59.
- Odds FC (2003) Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:1.
- Oonmetta-aree J, Suzuki T, Gasaluck P and Eumkeb G (2006) Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT - Food Science and Technology* 39:1214-1220.
- Pedraza-Chaverri J, Cardenas-Rodriguez N, Orozco-Ibarra M and Perez-Rojas JM (2008) Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology* 46:3227-3239.
- Peres V, Nagem TJ and de Oliveira FF (2000) Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. *Phytochemistry* 55:683-710.
- Pothitirat WaWG (2008) Quantitative analysis of total mangostins in *Garcinia mangostana* fruit rind. *journal of health research* 22:161-166.
- Richards EM and Xing DK (1994) Separation and quantification of murein and precursors from *Enterobacter cloacae* after treatment with trimethoprim and sulphadiazine. *J Pharm Pharmacol* 46:690-696.
- Richards RM, Xing JZ, Gregory DW and Marshall D (1993) An electronmicroscope study of the effect of sulphadiazine and trimethoprim on *Enterobacter cloacae*. *Journal of Medical Microbiology* 38:64-68.
- Roe VA (2008) Antibiotic resistance: a guide for effective prescribing in women's health. *Journal Midwifery Womens Health* 53:216-226.
- Sabath LD (1967) Synergy of antibacterial substances by apparently known mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 7:210-217.

- Sajduda A, Dziadek J, Dela A, Zalewska-Schonhaler N, Zwolska Z and McFadden J (1998) DNA fingerprinting as an indicator of active transmission of multidrug-resistant tuberculosis in Poland. *International Journal of Infectious Diseases* 3:12-17.
- Sakagami Y, Iinuma M, Piyasena KG and Dharmaratne HR (2005) Antibacterial activity of alpha-mangostin against vancomycin resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. *Phytomedicine* 12:203-208.
- Schmid W (1855) Ueber das Mangostin. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 93:83-88.
- Shimeld LA and Rodgers AT (1999) *Essentials of diagnostic microbiology*, Delmar publishers, New York.
- Slaughter S, Hayden MK, Nathan C, Hu TC, Rice T, Van Voorhis J, Matushek M, Franklin C and Weinstein RA (1996) A comparison of the effect of universal use of gloves and gowns with that of glove use alone on acquisition of vancomycin-resistant enterococci in a medical intensive care unit. *Annals of Internal Medicine* 125:448-456.
- Suksamrarn S, Komutiban O, Ratananukul P, Chimnoi N, Lartpornmatulee N and Suksamrarn A (2006) Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruit of *Garcinia mangostana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (tokyo)* 54:301-305.
- Suksamrarn S, Suwannapoch N, Phakhodee W, Thanuhiranlert J, Ratananukul P, Chimnoi N and Suksamrarn A (2003) Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* 51:857-859.
- Sundaram BM, Gopalakrishnan C, Subramanian S, Shankaranarayanan D and Kameswaran L (1983) Antimicrobial activities of *Garcinia mangostana*. *Planta Medica* 48:59-60.
- Tenover FC (2006) Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am J Med* 119:S3-S10.
- Tosa H, Iinuma M, Tanaka T, Nozaki H, Ikeda S, Tsutsui K, Tsutsui K, Yamada M and Fujimori S (1997) Inhibitory activity of xanthone derivatives isolated from some guttiferaceous plants against DNA topoisomerases I and II. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 45:418-420.
- Tropp BE (1997) *Biochemistry concepts and applications* Brook/Cole Publishing company USA.
- Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, Rosdahl VT and Braveny I (1994) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology* 13:50-55.
- Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F and Hooper DC (2003) Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:2242-2248.
- Williams P, Ongsakul M, Proudfoot J, Croft K and Beilin L (1995) Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. *Free Radiation Research* 23:175-184.

Yodhnu S, Sirikatitham A and Wattanapiromsakul C (2009) Validation of LC for the determination of alpha-mangostin in mangosteen peel extract: a tool for quality assessment of Garcinia mangostana L. Journal of Chromatographic Science 47:185-189.

Yu L, Zhao M, Yang B, Zhao Q and Jiang Y (2007) Phenolics from hull of Garcinia mangostana fruit and their antioxidant activities. Food Chemistry 104:176-181.



ภาคผนวก



Output ที่ได้จากโครงการ

Conference Proceedings:

Griangsak Eumkeb, Nichayanan Chaisena, Nitaya Rojtinnakorn, Supatcharee Siriwong, Aphai Duangkham. (2008). P14 Reversing β -Lactam Antibiotic Resistant Bacteria with Flavonoids. In : *Proceeding of 30th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting. 27-28 March 2008. Thai Journal of Pharmacology. Vol 29: No I: 117-126. Bangkok: Ruen Kaew Press.*

Griangsak Eumkeb, Sineewan Phitaktim, Yothin Teethaisong, 2013. *Antibacterial activity of alpha-mangostin from the pericarp extract of Garcinia mangostana L. against drug resistant bacteria* In: Soothisri R, ed. *Proceedings of the 100 Years of Pharmaceutical Science; New century for research, 2013. Pharmaceutical Science Faculty, Chulalongkorn University: Chula Publisher (is accepted).*

Conference Abstracts:

Eumkeb, G., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Siriwong, S., Duangkham, A., Naknarong, W., Wisansawat, J. (2009). *Flavonoids synergy with β -lactam antibiotics against β -lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, Abstract Book (Poster presentation, PS-BIO-B24). 15-17 October 2009, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education: p. 105.*

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. **Name and Rank:** *Assistant Professor Dr. Griangsak Eumkeb*
2. **Department / School:** *School of Biology, Institute of Science*
3. **University:** *Suranaree University of Technology*
4. **Degree:**

Degree	Field	Date Awarded	Institute / Country
Ph.D.	Pharmacology	1999	The Robert Gordon University, United Kingdom
B.Sc.	Pharmacy	1989	Chulalongkorn University, Thailand

5. Experiences:

5.1 Administration Experience:

Period	Position	Institution / Firm
2004-present	Assistant Professor	Institute of Science, Suranaree University of Technology (SUT)
2002-2005	Assistant Center for Scientific and Suranaree University of Technology	Director of Center for Scientific and Technology equipment, Technology equipment
1999-2002	Lecturer	School of Pharmacology, Inst. of Science, SUT.
1989-1994	Pharmacist	MaharatNakhonRatchasima Hospital, Thailand

6. Current Professional Field Registration:

Pharmacology and toxicology, Medicinal plant, Clinical Pharmacy

7. Members:

1. *Thai society of toxicology*
2. *Thai society of pharmacist*
3. *Thai pharmacy council*
4. *The alumni association of Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.*

8. Research Grants Awarded:

2011- The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program Advisorships (1 Grant): The Thailand Research Fund, Thailand

2006-2008: Research Career Development Grant (Metheevijai): The Thailand Research Fund, Thailand

2003-2004: Research Grant for New Scholar : The Thailand Research Fund-Commission on Higher Education

2004-2011: Research Grants (9 Grants): National Research Council of Thailand/Institute of Research and Development, Suranaree University of Technology, Thailand

2011: The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program Advisorships (1 Grants): The Thailand Research Fund, Thailand

9. Award :

2013 : Outstanding alumnus, Nonkipittakom school, Burirum, Thailand

2011 : Renowned deed in athletics leader, Suranaree University of Technology

2010 : Renowned deed in athletics manager, Suranaree University of Technology

2008 : Outstanding alumnus, Nonkipittakom school, Burirum, Thailand

1994-1999: The Royal Thai Government Scholarship, MUA, to study Ph.D. in U.K. for 4 years.

1985-1988: Boonrod - Brewery Scholarship for 4 years, Chulalongkorn University,

1983-1984: Bangkok-Bank Scholarship for 2 years, Mahidol University

10. Scientific Publications :

Referred articles:

Richards, R.M.E., **Eumkeb, G.** and Marshall, D. (1997). *Is the ultrastructural damage caused by subinhibitory concentrations of trimethoprim and sulphadiazine part of their normal mechanism of action?* *Microbios*, 92, 183 - 197.

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2005). *Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria.* *Acta Horticulturae. Vol 4: 678: 171-178.*

Jirawan Oonmetta-aree, Tomoko Suzuki, Piyawan Gasaluck and **Griangsak Eumkeb.** (2006). *Antimicrobial Properties and Action of Galangal (Alpinia galanga Linn.) on Staphylococcus aureus.* *LWT Food Science and Technology.* 39: 1214-1220.

(IF 2012 = 2.546)

Punopas, K., **Eumkeb, G.**, Chitsomboon, B. and Nakkiew, P. (2004). *The study of antibacterial activity of some medicinal plant in Lamiaceae family.* *Suranaree J. Sci. Technol.* 11:52-59.

Eumkeb, G. and Richards R.M.E. (2004). *Reversing β -Lactam Antibiotic Resistance in Gram-positive bacteria by Some Flavonoids.* *Suranaree J. Sci. Technol.* 11:143-150.

Eumkeb, G., Sakdarat, S and Siriwong, S. (2010). *"Reversing [beta]-lactam antibiotic resistance of Staphylococcus aureus with galangin from Alpinia officinarum Hance and synergism with ceftazidime."* *Phytomedicine* 18(1): 40-45.

(Impact Factor 2012 =2.972)

Eumkeb, G. and Duangkham A. (2011). *"Subacute Toxicity Test of Galangin and ceftazidime in Mice."* *Thai Journal of Toxicology* 26(1): 5-13.

Eumkeb, G., Siriwong, S., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Sakdarat, S. (2012). "Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*." *J. Appl. Microbiol.* 112, 55-64.

(Impact Factor 2012 = 2.196)

Munglue, P., Eumkep, G., Wray, S., Kupittayanant, S. (2013). *The Effects of Watermelon (Citrullus lanatus) Extracts and L-Citrulline on Rat Uterine Contractility. Reproductive Sciences. is accepted.*

(Impact Factor 2012 = 2.064)

Eumkeb, G., Siriwong, S., Thumanu, K., 2012. Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 117, 247-253.

(Impact Factor 2012 = 3.11)

Eumkeb, G. and Chukrathok, S. (2013) Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*.

Phytomedicine 20:262-269.

(Impact Factor 2012 = 2.972).

Patent

The combination of flavonoids and drugs against Staphylococcus aureus and Enterobacter cloacae : patent asking no: 0601001839 , 2006

Conference Proceedings:

Griangsak Eumkeb, Nichayanan Chaisena, Nitaya Rojtinnakorn, Supatcharee Siriwong, Aphai Duangkham. (2008). P14 Reversing β -Lactam Antibiotic Resistant Bacteria with Flavonoids. In : *Proceeding of 30th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting. 27-28 March 2008. Thai Journal of Pharmacology. Vol 29: No I: 117-126. Bangkok: Ruen Kaew Press.*

Siriwong S, Thumanu K, **Eumkeb G.** (2010). Using FT-IR microspectroscopy to investigate biochemical change of drugs-resistance *Escherichia coli* treated with amoxicillin and apigenin. In: *Proceeding of the 36th Congress on Science and Technology of Thailand (STT36). Abstract Book (Oral presentation, B2_0051/pp70.)* 26-28 October 2010, Bangkok, Thailand: Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Thailand.

Munghue, P., **Eumkep, G.**, Wray, S., Kupittayanant, S., (2012). Uterine Relaxant Effects of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Extracts. , in: *The Physiology Society, (Ed.), Physiology 2012. The Physiology Society, Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, EH3 8EE, United Kingdom.*, 27, pp. PC364.

Siriwong, S., **Eumkeb, G.**, 2012. Synergistic effect of penicillin with apigenin and kaempferol against Penicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, in: *Manosroi, A., Manosroi, J. (Ed.), NATPRO 4, Natural Products for Health and Beauty, The Fourth International Conference on Natural Products for Health and Beauty. Sangreeya Publishing Co., Chiang Mai, Thailand, pp. 368-372.*

Naknarong, W., **Eumkeb, G.**, 2012. The effects of Red Kwao Kru (*Butea superba* Roxb.) extract on reproductive system of male mice, in: *Manosroi, A., Manosroi, J. (Ed.), NATPRO 4, Natural Products for Health and Beauty, The Fourth International Conference on Natural Products for Health and Beauty. Sangreeya Publishing Co, Chiang Mai, Thailand, pp. 193-197.*

Research reports:

Eumkeb,G. and Jinakoon, N. (2003). *The study of medicinal plants and supplement food for health of community in NakhonRatchasima province*

Conference Abstracts:

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2003). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. In *The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plant for Human Welfare (WOCMAP III) From Biodiversity through Science and Technology,*

Trade and Industry to Sustainable Use, Abstracts Book (Poster presentation, PP04 -59, pp. 450).
3-7 February 2003, Chiangmai, Thailand : Chiangmai University

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2004). *Reversing beta-lactam antibiotic resistance in Gram positive Bacteria with some flavonoids.* In :*The 20th FAPA Congress 2004 : Emerging Science and Profession in Pharmacy , Abstracts Book (Oral presentation, PP-O-01, pp. 160).* 30 Nov – 3 Dec 2004, Bangkok, Thailand : *The Pharmaceutical Association of Thailand under Royal Patronage, Bangkok.*

Eumkeb, G. (2005). *Investigation of the effect of Some Flavonoids on some β - lactam antibiotics resistant bacteria.* In :*The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, Abstracts Book (Poster presentation, MRG168/p225, pp. 214.).* 14-16 January 2005, Kanchanaburee, Thailand : *The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.*

Eumkeb, G. (2005). *Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta - lactam antibiotics resistant bacteria.* In :*The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, Abstract Book (Oral presentation, 13-R1-S1-MRG4680168/p227, pp. 1).* 13-15 October 2005, Petchaburi, Thailand : *The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.*

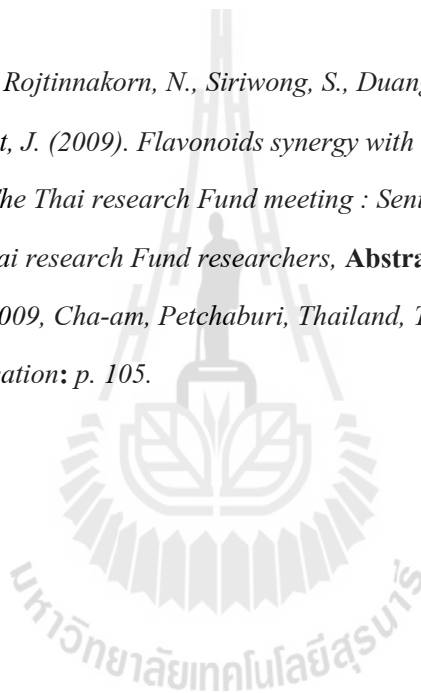
Eumkeb, G. Chukratok. S., Suttajit. M. and Ruangrungsi. N. (2005). *Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta-lactam antibiotics resistant bacteria.* In :*The 1st International Conference on Natural products for Health and Beauty; From local wisdom to global marketplace. Abstract Book (Oral presentation, O4-1/p232, pp. 124).* 17-21 October 2005, Mahasarakham, Thailand : *Mahasarakham University, and the higher education commission, Thailand.*

Eumkeb, G., Wongkamsound, K (2007). *Flavonoids synergy with beta-lactam antibiotics against beta-lactam-resistant bacteria.* In :*The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers 7th, Abstract Book (Poster presentation,*

P-PHY-B06-RSA4980004 /p26 , pp. 26). 11-13 October 2007, Pattaya, Chonburee,Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok

Eumkeb, G., Wongkamsound, K. (2008). *Flavonoids synergy with β -lactam antibiotics against β -lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, Abstract Book (Poster presentation, PS-BIO-E20). 16-18 October 2008, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education: p. 144.*

Eumkeb, G., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Siriwong, S., Duangkham, A., Naknarong, W., Wisansawat, J. (2009). *Flavonoids synergy with β -lactam antibiotics against β -lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, Abstract Book (Poster presentation, PS-BIO-B24). 15-17 October 2009, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education: p. 105.*



ผลงานตีพิมพ์ทางหนังสือพิมพ์และสื่ออินเทอร์เน็ต (บางส่วน)

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ พัฒนาสารสกัด"ข่า"สู่ยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย วันที่ 14 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ วิจัยพบ"ข่า"ยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ผู้จัดการออนไลน์ วันที่ 15 มกราคม 2548 เวลา
12:39 น. <http://www.manager.co.th/>

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ เร่งวิจัย"ข่า"เป็นยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ต้านเชื้อหนองคื้อยาหนังสือพิมพ์บ้านเมือง
ประจำวันจันทร์ที่ 17 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ "ข่า"สยบเชื้อคื้อยา เติ่งวิจัยสูตรใหม่ ผสมสารสมุนไพร หนังสือพิมพ์กรุงเทพ
ธุรกิจ ประจำวันอังคารที่ 18 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ วิจัย"ข่า"ทำยาปราบเชื้อแบคทีเรียจอมคื้อ หนังสือพิมพ์ผู้จัดการรายวัน
ประจำวันศุกร์ที่ 21 มกราคม 2548 หน้า 43.

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ พัฒนาสารสกัดจาก"ข่า"แทนยาปฏิชีวนะสมัยใหม่ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้
เกิดหนอง หนังสือพิมพ์สยามรัฐ ประจำวันศุกร์ที่ 28 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ สารสกัด"ข่า"ส่วนผสมยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ต้านเชื้อหนองคื้อยา หนังสือพิมพ์
โพสต์ทูเดย์ ประจำวันอาทิตย์ที่ 13 กุมภาพันธ์ 2548 หน้า B5.

ประวัตินักวิจัย

Name	Mrs. Sineewan Phitaktim
Date of Birth	March 19, 1974
Place of Birth	Udonthani, Thailand
Education	
1993-1997	B.Ed. (General Science), Udonthani Rajabhat Institute , Udonthani, Thailand
1998-2001	M.Ed. (Science Education), Mahasarakham University, Mahasarakham, Thailand

Publication

1. Eumkeb, G., Siriwong, S., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., and Sakdarat, S. (2011). Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**. 55-64 : 112.