

ไปรดา เขยประทับ : ผลของสารสกัดหยาบจากหญ้าแห้วหมูและพริกขี้หนูต่อแบคทีเรียคือ  
ยาปฏิชีวนะ (EFFECT OF *CYPERUS ROTUNDUS* LINN. AND *CAPSICUM*  
*FRUTESCENS* LINN. CRUDE EXTRACTS ON ANTIBIOTIC RESISTANT  
BACTERIA) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ, 166 หน้า.

หญ้าแห้วหมู/พริกขี้หนู/เอเอ็มอาร์เอสเอ/ยาปฏิชีวนะ/เบตาแลคตามีส

รากและหัวของหญ้าแห้วหมู รวมถึงผลของพริกขี้หนูนั้นถูกสกัดโดยการสกัดแบบชอกเลต โดยใช้ เอทานอลเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ การทดสอบความไวของการต้านแบคทีเรียสำหรับ สารสกัดหยาบจากพริกขี้หนู (ซีเอฟอี) และ สารสกัดหยาบจากหญ้าแห้วหมู (ซีอาร์อี) ต่อเชื้อคือยาเมทิซิลลิน สแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส (เอเอ็มอาร์เอสเอ) และ เชื้อคือยาเซฟตาซิม อีโคไล (ซีอาร์อีซี) นั้นถูกทดสอบขั้นแรกโดยเทคนิคอาร์อาร์ดีดีพีวชัน และค่าความเข้มข้นยับยั้งต่ำสุด (เอ็มไอซี) โดยอาร์อาร์ดีดีพีวชันเทคนิค เช็คเกอร์บอร์ดเอสเอส ของสารผสมซีอาร์อีผสมแอมพิซิลลินแสดงการเสริมฤทธิ์กันในการต้านเชื้อเอเอ็มอาร์เอสเอ ในทางตรงกันข้ามสารผสมซีอาร์อีผสมอะมอกซิซิลลินสำหรับต้านเชื้อซีอาร์อีซีแสดงการไม่เสริมฤทธิ์กัน นอกจากนี้ ไทม์คิลลิงเอสเสงยังยืนยันการลดลงอย่างมากของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อเอเอ็มอาร์เอสเอ หลังจากใส่สารผสมด้วยค่าที่ต่ำกว่าครึ่งของเอ็มไอซี จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อเอเอ็มอาร์เอสเอที่ใส่สารผสมซีอาร์อี-แอมพิซิลลินที่ 24 ชั่วโมงนั้นลดลงอย่างมาก มากกว่า 2 ล็อก 10 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เทียบกับสารเดี่ยวที่ออกฤทธิ์มากที่สุด ยืนยันการเสริมฤทธิ์กันของสารผสม นอกจากนี้ การทดสอบหากกลไกเบื้องต้นของซีอาร์อีต้านเชื้อเอเอ็มอาร์เอสเอได้ถูกศึกษา การศึกษาการเลือกผ่านของเชื้อหุ้มไซโตพลาสซึมให้เห็นถึงการเลือกผ่านของเชื้อหุ้มไซโตพลาสซึมที่เพิ่มขึ้นในช่วงล็อกเฟส 2-6 ชั่วโมง จากผลการศึกษาด้วยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ทีอีเอ็ม) ความเสียหายของผนังเซลล์ที่รุนแรงที่สุดนั้นสามารถมองเห็นได้ในเชื้อเอเอ็มอาร์เอสเอที่ได้รับสารผสมซีอาร์อีผสมแอมพิซิลลินในช่วงกลางล็อกเฟสที่ 4 ชั่วโมง เบตาแลคตามีสเอนไซม์เอสเอสแสดงให้เห็นว่าเป็นซิลเพนนิซิลลินที่ผสมกับสารผสมของซีอาร์อีและแอมพิซิลลินเผยให้เห็นถึงการการทำลายเป็นซิลเพนนิซิลลินที่น้อยลงเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นี่เป็นหลักฐานสำคัญที่แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เบตาแลคตามีสของสารในซีอาร์อีซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่ยาปฏิชีวนะเบตาแลคตามีสในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ ซีอาร์อียังมีความสามารถในการต้านแบคทีเรียได้ด้วยตัวเองเช่นที่แสดงให้เห็นผ่านค่าเอ็มไอซี ผลการวิจัยนี้บ่งชี้ให้เห็นว่าซีอาร์อีไม่เพียงแต่มีสารยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์สำหรับการคือยาแต่ยังมีความสามารถในการยับยั้งกลไกการคือยาอื่น ๆ อีกด้วย จากข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า ซีอาร์อีไม่เพียงแต่มีสารยับยั้งเอนไซม์เบตาแลคตามีสซึ่งอาจเป็น



PRAIRADDA CHEYPRATUB : EFFECT OF *CYPERUS ROTUNDUS* LINN.  
AND *CAPSICUM FRUTESCENS* LINN. CRUDE EXTRACTS ON  
ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA. THESIS ADVISOR :  
ASSOC. PROF. GRAINGSAK EUMKEB, Ph.D. 166 PP.

*C. ROTUNDUS/C. FRUTESCENS/MRSA/ANTIBIOTIC/ $\beta$ -LACTAMASE*

The *C. rotundus* rhizomes and tubers including *C. frutescens* fruits were Soxhlet extracted with ethanol to get crude extracts. The antibacterial susceptibility test for *C. frutescens* crude extract (CFE) and *C. rotundus* crude extract (CRE) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and ceftazidime-resistant *Escherichia coli* (CREC) were primary screening by agar disc diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) by the agar dilution. The checkerboard assay of the combination of CRE plus ampicillin exhibited synergistic activity against MRSA. In contrast, the combination of CRE with amoxicillin against CREC showed no interaction. Furthermore, Time killing assay was confirmed a dramatic reduction in the viable count of MRSA after treated with the sub-MIC of this combination. The viable cell count of the CRE-ampicillin treated MRSA at 24 h was dramatically reduced greater than  $2\log_{10}$  cfu/ml in comparison to the most active single agent confirming synergistic activity. Moreover, the investigation of elementary mechanisms of action for CRE against MRSA was performed. The study on the cytoplasmic membrane (CM) permeability revealed the increased CM permeability in log phase 2-6 h. According to transmission electronmicroscopy (TEM) result, the most virulent cell wall damage was viewed in the treatment of MRSA with CRE

plus ampicillin in the mid-log phase, 4 h. The  $\beta$ -lactamase enzyme assay demonstrated that the benzylpenicillin treated with the combination of CRE plus ampicillin appeared the less amount of benzylpenicillin hydrolyzation as compared to control. This is the strongest evidence for the presence of the  $\beta$ -lactamase inhibitor in CRE that could enhance the  $\beta$ -lactam antibiotic to damage the bacterial cell wall. Furthermore, CRE also had the antibacterial effect of its own to against MRSA as shown in MIC determination. This indicated that CRE not only contained the inhibitor to destroy enzyme for antibiotic resistance, but also possessed the ability to disrupt other mechanisms of antibiotic resistance. Take-in all data together, CRE not only contained a  $\beta$ -lactamase inhibitor, which may either be with or without  $\beta$ -lactam structure, but also possessed the ability to conquer the  $\beta$ -lactam antibiotic-resistant bacteria by other mechanisms which must be further investigated. Therefore, CRE exerts its antiresistant activity through multiple mechanisms. Because of this, it can be employed for the potential treatment of MRSA, which almost resistant to practically  $\beta$ -lactam antibiotics. In conclusion, the combination of CRE and ampicillin drug demonstrated the potential to be a novel adjuvant phytopharmaceuticals for ampicillin to treat MRSA and to be considered for development of new natural  $\beta$ -lactamase inhibitor which may either be with or without  $\beta$ -lactam structure. Obviously, this is the first report demonstrating the preliminary mechanisms of actions of CRE on MRSA.

School of Preclinic

Academic Year 2014

Student's Signature P. Cheyprattuls

Advisor's Signature G. Eumkeab.