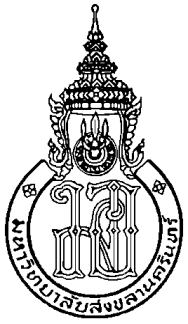

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

กลไกการออกฤทธิ์ของตำรับยาสมุนไพร THR-SK010 ต่อเชื้อ Staphylococci ที่แยกได้จากโรคเต้านมโคอักเสบ

Antibacterial mechanisms of a traditional Thai herbal recipe (THR-SK010) against Staphylococci isolated from bovine mastitis

คณะผู้วิจัย

ผศ.ดร. ศศิธร ชูศรี	คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ดร. สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ	คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ดร. เกศริน มณีนูน	คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก

เงินรายได้มหาวิทยาลัย/กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภทโครงการวิจัยประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2555 รหัสโครงการ TTM5406785

ABSTRACT

Concerns about antibiotic residues in milk and emergence of bacterial resistance necessitate exploration of alternative therapeutic strategies to antibiotics for treatment of mastitis. The study was carried out to investigate the antibacterial activity of ethanol extracts *Ya-Sa-Marn-Phlae* (THR-SK010), its herbal components including *Curcuma longa* Linn., *Areca catechu* Linn., *Oryza sativa* Linn., and *Garcinia mangostana* Linn., as well as their representative chemical constituents including catechin, alpha-mangostin, and curcumin against *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis cows. Additionally, testing the susceptibility of the pathogen to antibiotics as well as mechanisms of action of the agents on the representative clinical isolates were evaluated. Most of tested isolates obtained from mastitis were resistant to penicillin and ceftazidime. The extracts of *Ya-Sa-Marn-Phlae*, *Garcinia mangostana* Linn., and alpha-mangostin exhibited remarkable antibacterial effects against all tested staphylococcal isolates. At 4MIC, the agents additionally caused lysis, as determined by measurement of the optical density at 620 nm. Loss of 260-nm-absorbing materials also occurred after treatment with the extracts of *Ya-Sa-Marn-Phlae*, *Garcinia mangostana* Linn., and alpha-mangostin at 4MIC. The anti-staphylococcal effects were confirmed with both scanning and transmission electron microscopes. Moreover, *Ya-Sa-Marn-Phlae*, *Garcinia mangostana* Linn., and *Curcuma longa* Linn. extracts inhibit biofilm formation of coagulase-positive staphylococci (BCPS) 31 as well as *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984. The current study indicated that *Ya-Sa-Marn-Phlae* had strong antibacterial activities and anti-biofilm abilities against staphylococci isolated from bovine mastitis similar to that of *Garcinia mangostana* Linn., alpha-mangostin, and *Curcuma longa* Linn.

ABSTRACT

ปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมที่นำมาบริโภคและการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมโคอักเสบ ส่งผลให้ปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงพืชสมุนไพรและสารสกัดจากธรรมชาติ ซึ่งสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคเต้านมโคอักเสบเพื่อลดปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของตำรับยาสมานแผล (THR-SK010) เปรียบเทียบกับสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ ได้แก่ ขมิ้น หมาก ข้าวสาร และมังคุด รวมทั้ง สารองค์ประกอบทางเคมี curcumin, catechin, และ alpha-mangostin ต่อการต้านการเจริญเติบโตของ staphylococci ที่แยกได้จากโรคเต้านมโคอักเสบจำนวน 14 สายพันธุ์ และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ใช้เป็นสายพันธุ์มาตรฐานในการศึกษาครั้งนี้ จากการศึกษา พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม staphylococci มีการดื้อต่อยา penicillin และ ceftazidime มากที่สุด ผลจากการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution method เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentrations; MIC) พบว่าสารสกัดเอทานอลของตำรับยาสมานแผลและมังคุด มีประสิทธิภาพที่ดี เมื่อเปรียบเทียบกับสารที่ใช้ในการทดสอบชนิดอื่นๆ เมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรที่ส่งผลให้เกิดการรั่วและการแตกของเซลล์ของแบคทีเรีย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 620 nm ตามลำดับ พบว่า สารสกัดเอทานอลของตำรับยาสมานแผล มังคุด และสารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin มีผลทั้งทำให้เกิดการรั่วของสาร (ภายในไซโทพลาซึม) และการแตกของเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ coagulase-negative staphylococci (BCNS) 18 ภายในระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงยืนยันผลการทดสอบโดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ ด้วยภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) นอกจากนี้ยังมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัด ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าสารสกัดเอทานอลของตำรับยาสมานแผล มังคุด และขมิ้น มีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ coagulase-positive staphylococci (BCPS) 31 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 จากผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงสรุปผลได้ว่า สารสกัดเอทานอลของตำรับยาสมานแผล มีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย ซึ่งสมุนไพรเดี่ยวในตำรับและสารประกอบทางเคมีที่ทำหน้าที่หลักในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย คือ มังคุด และสารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin ในขณะที่สารสกัดเอทานอลของขมิ้นอาจมีหน้าที่หลักในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep and sincere gratitude to my mentor, Prof. Dr. Supayang Voravuthikunchai for her wide knowledge, thoughtfulness supervision, and endless stimulation have been of great value for me.

I am also deeply indebted to my colleagues, Dr. Surasak Limsuwan and Dr. Katesarin Maneenoon for their kindly collaboration, comments, and suggestion in this research and in the preparation of this document as well as Miss Sirirat Tongrod at Bacteriology Research Laboratory, Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University for all their hard works. My special application is expressed my friends at Natural Product Research Center, Faculty of Science, Prince of Songkla University for their friendship, helps, and supports.

This work was supported by Grants for General Researchers, The Annual Income Budget of Prince of Songkla University (TTM5406785; 2013-2015)

Sasitorn Chusri

December 2015

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
รายการตาราง	(2)
รายการรูป	(3)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(6)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	38
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ	39
อุปกรณ์	40
วิธีการ	41
3. ผลการทดลอง	48
4. วิจารณ์	84
5. สรุป	89
เอกสารอ้างอิง	90
ภาคผนวก	102

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	Prevalence of mastitis pathogens in different countries	10
2.	The most common family of medicinal plants in health care of animals in different countries	15
3.	Antibacterial activity of medicinal plants against bovine mastitis pathogens	25
4.	Pharmacological activities of pure constituents of *Garcinia mangostana* Linn.	30
5.	Pharmacological activities of pure constituents of *Curcuma longa* Linn.	35
6.	Susceptibility of bovine mastitis isolated coagulase-positive and negative staphylococci to 16 antibiotics	49
7.	Minimum inhibitory concentrations (MICs) of ethanol extracts of *Ya-Sa-Marn-Phlae*, its herbal components and active constituents against bovine mastitis isolated coagulase-positive staphylococci (BCPS) and coagulase-negative staphylococci (BCNS)	52
8.	Biofilm forming ability of different isolates of bovine mastitis isolated *Staphylococcus* spp.	81

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	Factors influencing the incidence of bovine mastitis	6
2.	Medicinal components of Thai traditional herbal recipe, *Ya-Sa-Marn-Phlea*	37
3.	Time-kill assay of *Ya-Sa-Marn-Phlae* against BCNS 18, BCPS 31, and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 at concentrations of 1/2MIC, MIC, 2MIC, and 4MIC	55
4.	Time-kill assay of *Garcinia mangostana* Linn. against BCNS 18, BCPS 31, and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 at concentrations of 1/2MIC, MIC, 2MIC, and 4MIC	56
5.	Time-kill assay of *Curcuma longa* Linn. against BCNS 18, BCPS 31, and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 at concentrations of 1/2MIC, MIC, 2MIC, and 4MIC	57
6.	Time-kill assay of *Areca catechu* Linn. against BCNS 18, BCPS 31, and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 at concentrations of 1/2MIC, MIC, 2MIC, and 4MIC	58
7.	Time-kill assay of curcumin against BCNS 18, BCPS 31, and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 at concentrations of 1/2MIC, MIC, 2MIC, and 4MIC	59
8.	Time-kill assay of alpha-mangostin against BCNS 18, BCPS 31, and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 at concentrations of 1/2MIC, MIC, 2MIC, and 4MIC	60
9.	$OD_{260\ nm}$ of the cell materials released from BCNS 18 after treated with 4MIC, 2MIC, and MIC of *Ya-Sa-Marn-Phlae*, *Garcinia mangostana* Linn., *Curcuma longa* Linn., *Areca catechu* Linn., and its chemical constituents curcumin, alpha-mangostin for 0, 2, and 4 h lysozyme was used as control.	63

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
10.	$OD_{260\ nm}$ of the cell materials released from BCPS 31 after treated with 4MIC, 2MIC, and MIC of *Ya-Sa-Marn-Phlae*, *Garcinia mangostana* Linn., *Curcuma longa* Linn., *Areca catechu* Linn., and its chemical constituents curcumin, alpha-mangostin for 0, 2, and 4 h lysozyme was used as control.	64
11.	$OD_{260\ nm}$ of the cell materials released from *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 after treated with 4MIC, 2MIC, and MIC of *Ya-Sa-Marn-Phlae*, *Garcinia mangostana* Linn., *Curcuma longa* Linn., *Areca catechu* Linn., and its chemical constituents curcumin, alpha-mangostin for 0, 2, and 4 h lysozyme was used as control.	65
12.	$OD_{620\ nm}$ of suspensions of BCNS 18 treated with 4MIC, 2MIC, and MIC of *Ya-Sa-Marn-Phlae*, *Garcinia mangostana* Linn., *Curcuma longa* Linn., *Areca catechu* Linn., and its chemical constituents curcumin, alpha-mangostin for 0, 2, and 4 h lysozyme was used as control.	68
13.	$OD_{620\ nm}$ of suspensions of BCPS 31 treated with 4MIC, 2MIC, and MIC of *Ya-Sa-Marn-Phlae*, *Garcinia mangostana* Linn., *Curcuma longa* Linn., *Areca catechu* Linn., and its chemical constituents curcumin, alpha-mangostin for 0, 2, and 4 h lysozyme was used as control.	69
14.	$OD_{620\ nm}$ of suspensions of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 treated with 4MIC, 2MIC, and MIC of *Ya-Sa-Marn-Phlae*, *Garcinia mangostana* Linn., *Curcuma longa* Linn., *Areca catechu* Linn., and its chemical constituents curcumin, alpha-mangostin for 0, 2, and 4 h lysozyme was used as control.	70
15.	Scanning electron micrographs of BCNS 18 after treated with 4MIC of *Ya-Sa-Marn-Phlae*, *Garcinia mangostana* Linn., *Areca catechu* Linn., *Curcuma longa* Linn., and its chemical constituents curcumin, alpha-mangostin. BCNS 18 was growth in tryptic soy broth (TSB) used as a control.	73

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16.	Transmission electron micrographs of BCNS 18 after treated with 4MIC of *Ya-Sa-Marn-Phlae*, *Garcinia mangostana* Linn., *Areca catechu* Linn., *Curcuma longa* Linn., and its chemical constituents curcumin, alpha-mangostin. BCNS 18 was growth in tryptic soy broth (TSB) used as a control.	77
17.	Effect of different concentrations of *Ya-Sa-Marn-Phlae*, *Garcinia mangostana* Linn., *Curcuma longa* Linn., *Areca catechu* Linn., *Oryza sativa* Linn., curcumin, and alpha-mangostin on the bacterial growth and biofilm inhibition of BCPS 31 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984	82

ตัวย่อและสัญลักษณ์

CFU	=	colony forming unit
°C	=	degree celsius
DMSO	=	dimethylsulfoxide
g	=	gram
h	=	hour
µg	=	microgram
µl	=	microliter
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
OD	=	optical density
%	=	percent