



ฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์จากรักดำ (*Diospyros curranii*)
ในการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส

The Antibacterial Activity of some Pure Compounds from
Diospyros curranii Against some Opportunistic Gram-negative Bacteria

วิสาตรี คงเจริญสุนทร^{1*} วารี เนื่องจำนงค์² และ พนิดา อภิบาล¹

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ของ cholestanol stigmasterol และ friedelin ซึ่งเป็นสารสกัดที่ได้จากรักดำ (*Diospyros curranii*) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Ebenaceae ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส คือ *E. coli* ATCC 25913, *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* เปรียบเทียบกับเตตราไซคลินและแอมพิซิลลิน โดยวิธี Broth dilution susceptibility test และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibition concentration: MIC) ผลการทดลองพบว่า stigmasterol สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้บางชนิด โดยให้ค่า MIC ต่ำสุดที่ 128 ไมโครโมล friedelin สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25913, *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* มีค่า MIC เท่ากับ 512 256 และ 1024 ไมโครโมล ตามลำดับ cholestanol สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *P. aeruginosa* มีค่า MIC เท่ากับ 2048 ไมโครโมล แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* และ *E. coli* ATCC 25913 (MIC มากกว่า 2048 ไมโครโมล) เมื่อเปรียบเทียบสารบริสุทธิ์ทั้งสามชนิด จากรักดำกับยาปฏิชีวนะ พบว่า friedelin มีประสิทธิภาพสูงที่สุด รองลงมาคือ stigmasterol มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเตตราไซคลิน และ cholestanol มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับแอมพิซิลลิน นอกจากนี้ยังพบว่าสารบริสุทธิ์จากรักดำที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

¹Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chon-Buri, Thailand

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chon-Buri, Thailand

*Corresponding Author, E-mail: wisatrek@yahoo.com, wisatre@buu.ac.th

ABSTRACT

This research was aimed to study effect of cholestanol, stigmasterol and friedelin, derived from the root of *Diospyros curranii* (Ebenaceae), and compare anti-bacterial activity with two antibiotics; ampicillin and tetracycline against some gram negative opportunistic bacteria. The antibacterial activity of all bioactive compounds were tested against *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ATCC 25913 and *Pseudomonas aeruginosa*. To determine value of Minimal Inhibitory concentration (MIC), the broth dilution susceptibility test was designed to test all pure compounds. The results were indicated that some pure compounds of *D. curranii* could inhibit the growth of some opportunistic bacteria with the best MICs of 128 μ M for stigmasterol. Friedelin could inhibit the growth of *E. coli* ATCC 25913, *A. baumannii* and *P. aeruginosa* with the MIC of 512 256 and 1024 μ M friedelin, respectively. Cholestanol could inhibit the growth of *P. aeruginosa* with the MIC of 2048 μ M, but could not inhibit *A. baumannii* and *E. coli* ATCC 25913 (MIC more than 2048 μ M). When compared antibacterial activity of the compounds to ampicillin and tetracycline, friedelin gave the best antibacterial activity, followed by antibacterial activity of stigmasterol that had antibacterial activity closed to tetracycline. Cholestanol gave antibacterial activity as well as antibacterial activity of ampicillin. In conclusion, some pure compounds from *D. curranii* could inhibit the growth of bacteria by the different concentrations that correlated to a number of opportunistic bacteria with statistic significance ($p \leq 0.05$).

คำสำคัญ: รักดำ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบคทีเรียฉวยโอกาส MIC

Keywords: Root of *Diospyros curranii*, Antibacterial activity of opportunistic bacteria, MIC

บทนำ

A. baumannii, *E. coli* และ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาล ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อของคนไข้ในโรงพยาบาลที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ การติดเชื้อเกิดขึ้นเมื่อมีการใช้เครื่องมือทางการแพทย์เพื่อตรวจหรือรักษา เช่น คนที่มีแผลเปื่อยอักเสบ แผลไฟไหม้ โดยที่เชื้อจะเพิ่มจำนวนอยู่ในน้ำหรือที่มีความชื้นตามเครื่องมือหรือเครื่องช่วยหายใจ (Tortora et al., 2007) ซึ่งการติดเชื้อจากแบคทีเรียเหล่านี้ถือเป็นปัญหาที่สำคัญระดับประเทศ เพราะ

ก่อให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ เช่น ดื้อต่อยากลุ่มเพนิซิลลิน แอมพิซิลลิน โพลีมิกซิน สเตรปโตมัยซิน เตตราไซคลิน เป็นต้น และมักพบผลข้างเคียงจากการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น ผู้ป่วยเกิดการแพ้ยา ระบบร่างกายเสียสมดุล เนื่องจากยาปฏิชีวนะเข้าไปทำลายเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ นอกจากนี้การรับประทานยาปฏิชีวนะไม่ครบขนาด หรือใช้บ่อยติดต่อกันเป็นเวลานาน ก็อาจทำให้เชื้อแบคทีเรียดื้อยาจากปัญหาเหล่านี้ทำให้เราต้องพัฒนายาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ เพื่อทดแทนยาตัวเก่าที่รักษาไม่ได้ผล ซึ่งทำให้

ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มขึ้น สูญเสียรายได้ จำนวนมหาศาลในระดับชาติ (นงลักษณ์, 2548)

รักดำ (*Diospyros curranii*) เป็นพืช สมุนไพรไทยที่อยู่ในวงศ์ Ebenaceae (วงศ์ไม้ตะโก) เป็นไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่ม เนื้อไม้แกร่งและมีสีดำ เป็น แหล่งสะสมของอัลคาลอยด์ พืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน ได้แก่ มะพลับ (*D. areolata*) พลับดวง (*D. bejoudii*) จัน (*D. decandra*) พลับจีน (*D. kaki*) มะเกลือ (*D. mollis*) อีน (*D. pubicalyx*) เป็นต้น (สมภพ, 2539; ประภัสสร และคณะ, 2532; Mallavadhani et al., 1998) สารบริสุทธิ์ ที่ได้จากรักดำเป็นสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoids) กลุ่มสเตียรอยด์ (steroids) กลุ่ม แนฟโทควิโนน (naphthoquinones) กลุ่มเบนโซไพแรน (benzopyrones) กลุ่มแนฟทาลีน (naphthalene) กลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และกลุ่มแทนนิน (tannin) โดยพบกลุ่มเทอร์พีนอยด์ มากกว่า 90 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มากมาย (Mallavadhani et al., 1997; Veberic et al., 2009) แคทีคอล (catechol) ที่ได้จากรากของ มะพลับจีน (*D. kaki* Thunb) ยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรบิก ที่แยกได้จากลำไส้ใหญ่ (Jeong et al., 2009) สารสกัดจาก *Euclea natalensis* มีคุณสมบัติในการต้านการติดเชื้อของ แบคทีเรียและมีผลต่อการดื้อยาของเชื้อก่อโรควัณโรค (Bapela et al., 2007; Lall and Meyer, 2001; Kooy et al., 2006; Kuete et al., 2009) สารกลุ่ม เทอร์พีนอยด์ของพืชวงศ์ *Diospyros* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ แบคทีเรีย (Mallavadhani et al., 1997) สารบริสุทธิ์ ที่ได้จากรากรักดำจากใบ ผล รากและแก่นไม้ของ มะพลับมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น สามารถต้านอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรียและสามารถยับยั้งการเจริญของมะเร็งลำไส้

ใหญ่ได้ (Bei et al., 2005; Fan et al., 2006; Park et al., 2006; Jeong et al., 2009; Matsushita et al., 2010) สารสกัดจาก *D. crassiflora* ซึ่งมีฤทธิ์ต้าน จุลินทรีย์และยีสต์ (Tangmouo et al., 2006) สาร สกัดจากลำต้นของ *D. variegata* สามารถระงับความ เจ็บปวด ลดไข้ และลดการอักเสบในหนู (Trongsakul et al., 2003) cholestanol มีคุณสมบัติในการยับยั้ง การเพิ่มจำนวนของไวรัส รวมถึงสามารถลดไขมันใน หลอดเลือด (Lundin et al., 2011; Miettinen et al., 1989) stigmasterol มีฤทธิ์ช่วยยับยั้งการทำงานของ ต่อมไทรอยด์ในผู้ป่วยไทรอยด์ ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดความเข้มข้นของ cholesterol ในหลอดเลือด และ เป็นตัวยับยั้งกระบวนการเป็นพิษต่อตับ (Batta et al., 2005; Panda et al., 2008) friedelin มีฤทธิ์ยับยั้ง การเจริญเซลล์มะเร็ง ยับยั้งกระบวนการลอกรหัส พันธุกรรมของเชื้อ HIV-1 และสามารถยับยั้งเชื้อ แบคทีเรียชนิด *Staphylococcus aureus*, *S. epidemidis* และ *Bacillus subtilis* (Adeniyi et al., 2003; Reyes-Chilpa et al., 2004; Yasunaka et al., 2005) อย่างไรก็ตามยังมีรายงานความเป็นพิษของ สารกลุ่ม diosquinone จากพืชวงศ์ *Diospyros* (Adeniyi et al., 2003)

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของ สารบริสุทธิ์ที่ได้จากรากรักดำ ได้แก่ cholestanol stigmasterol และ friedelin ในการยับยั้งการเจริญ เชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางสายพันธุ์โดยวิธี Broth dilution susceptibility test และเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพของสารบริสุทธิ์ cholestanol stigmasterol และ friedelin กับยาปฏิชีวนะ พร้อมทั้ง ทาค่าความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์และยาปฏิชีวนะที่ น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียฉวย โอกาส minimum inhibitory concentration (MIC)

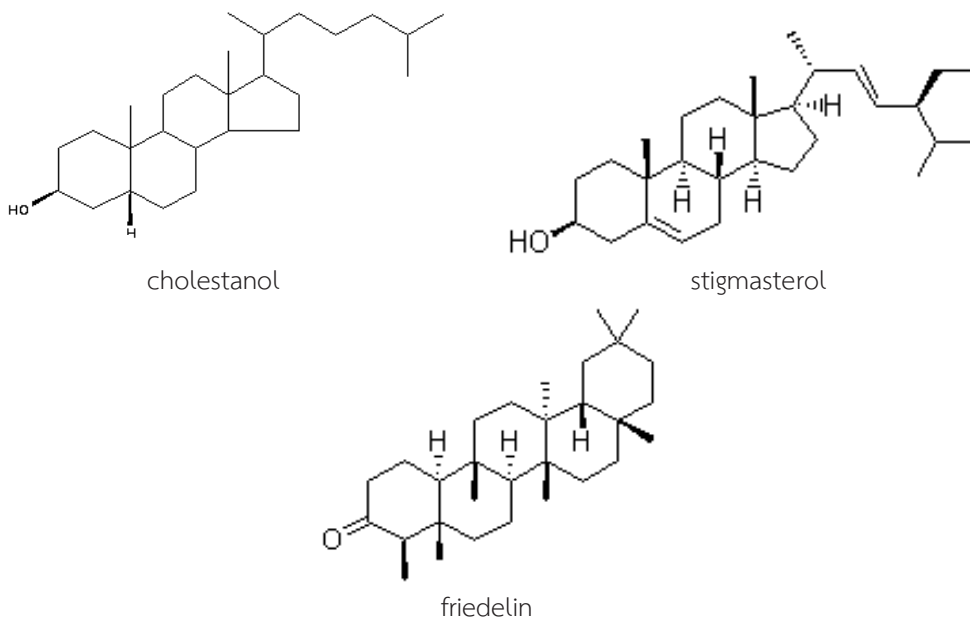
ผลการวิจัยที่ได้นี้อาจเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากสมุนไพรไทย มาพัฒนาเป็นตัวยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในอนาคต หรือสามารถนำสารบริสุทธิ์เหล่านี้มาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะที่รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสที่ไม่ได้ผล หรือสามารถนำไปใช้ควบคู่กับยาปฏิชีวนะเพื่อลดผลข้างเคียงของการใช้ยาปฏิชีวนะ และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานต่อยอดในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรชนิดนี้ต่อไป

การทดลอง

1. การสกัดสารและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร

นำส่วนรากของรักดำแห้งที่เก็บจากจังหวัดอุดรธานีมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง น้ำหนัก 4.5 กิโลกรัม มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน แล้วนำส่วนสกัดที่แยกได้ไประเหยออกด้วยเครื่องระเหย

แบบหมุน ได้ส่วนสกัดหยาบ 13.5 กรัม มาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วยวิธี gradient elution โดยเริ่มต้นจากเฮกเซน 100% เพิ่มความเข้มข้นเรื่อยๆ จนถึง 100% เอทิลอะซิเตท แล้วตามด้วยเมทานอล เป็นลำดับสุดท้าย ได้ 10 fraction นำ fraction ที่ 3 มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลาย 5% EtOAc : Hexane ได้ cholestanol โดยเปรียบเทียบข้อมูล¹H และ ¹³C Nakajima et al. (2002) นำ fraction ที่ 4 มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลาย 10% EtOAc : Hexane ได้ stigmasterol โดยเปรียบเทียบข้อมูล¹H และ ¹³C กับ Kover and Forgo (2004) และนำ fraction ที่ 5 มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลาย 20% EtOAc : Hexane ได้ friedelin โดยเปรียบเทียบข้อมูล¹H และ ¹³C กับ Shashi and Asish (1994) สารบริสุทธิ์มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ cholestanol, stigmasterol และ friedelin

2. การเตรียมสารละลาย (stock solution) ของสารบริสุทธิ์และยาปฏิชีวนะ

เตรียมสารละลาย master stock ของ cholestanol, stigmasterol และ friedelin ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 388 414 และ 428 ดาลตันตามลำดับ ความเข้มข้น 2048 ไมโครโมล จากนั้นเจือจางสารละลาย master stock 2048 ไมโครโมล ด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ โดยเติม master stock ที่เข้มข้น 2048 ไมโครโมล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1024 ไมโครโมล จากนั้นนำสารละลายความเข้มข้น 1024 ไมโครโมล มาทำให้เจือจางลงทีละสองเท่า ด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ ในทำนองเดียวกันจนได้ความเข้มข้น 512 256 128 และ 64 ไมโครโมล ตามลำดับ

เตรียม master stock ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินที่มีมวลโมเลกุล 371.40 และ 444.435 ตามลำดับเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วเจือจางสารละลายยาปฏิชีวนะให้มีความเข้มข้นลดลงทีละสองเท่าด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนได้ความเข้มข้น 2048 1024 512 256 128 และ 64 ไมโครโมล การเจือจางสารละลายยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน จาก master stock 2048 ไมโครโมล ทำโดย เติมสารละลายยาปฏิชีวนะเข้มข้น 2048 ไมโครโมล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 500 ไมโครลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 1024 ไมโครโมล จากนั้นเจือจางสารละลายยา

ปฏิชีวนะด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อในทำนองเดียวกันจนได้เข้มข้นเป็น 512 256 128 และ 64 ไมโครโมล ตามลำดับ

3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย minimal inhibitory concentration (MIC) ของสารบริสุทธิ์ cholestanol, stigmasterol และ friedelin โดยวิธี Broth dilution susceptibility test (Clinical and Standard Institute, 2006)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* E. coli ATCC 25913 และ *P. aeruginosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วนำไปปัมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อมาทดสอบจำนวน 4-5 โคโลนี มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth: MHB (Becton Dickenson and Company, U.S.A.) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปัมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii*, *E. coli* ATCC 25913 และ *P. aeruginosa* โดยเปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อเท่ากับ MacFarland 0.5 (เพื่อให้เชื้อมีปริมาณ 1.5×10^8 CFU/ml) เตรียมเชื้อที่เทียบความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii*, *E. coli* ATCC 25913 และ *P. aeruginosa* กับ MacFarland 0.5 จำนวน 100 ไมโครโมล มาใส่ในอาหาร MHB 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติม cholestanol ความเข้มข้น 2048 ไมโครโมล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร MHB หลอดเดิม แล้วนำไปปัมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำจนครบทุกความเข้มข้น จากนั้นเปลี่ยนตัวอย่างจาก cholestanol เป็น stigmasterol และ friedelin แล้วทำการทดลองในทำนองเดียวกันจนครบทุกความ

เข้มข้น นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่รอดชีวิตด้วยการนำสารทดสอบที่ผสมเข้ามาเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้น $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$ และ $1:10^{-5}$ ไมโครโมล เอทาลอดที่มีความเข้มข้น $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$ และ $1:10^{-5}$ ไมโครโมล มานับจำนวนแบคทีเรีย แล้วดูจุดเชื้อที่เจือจางแล้วทุกความเข้มข้น จำนวน 100 ไมโครลิตร มาใส่ในอาหาร NA (nutrient agar, Merck, Germany) ที่เตรียมไว้โดยใช้ sterile spreader กลี่ยเชื้อแบคทีเรียให้ทั่วผิวน้ำของอาหาร NA จากนั้นนำแบคทีเรียไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NA มานับจำนวนโคโลนีที่มีอยู่ประมาณ 1-200 โคโลนี แล้วหาค่าจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง ในหน่วย colony forming unit ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) ดังนี้

จำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง = $A (\text{colony}) \times B (\text{dilution}) \times 10$ หน่วยเป็น colony forming unit ต่อมิลลิลิตร: CFU/ml

A = ค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียบนจานอาหาร 3 จาน ที่ระดับการเจือจางเดียวกัน

B = ส่วนกลับของระดับการเจือจาง

10 = ส่วนกลับของปริมาตรของเชื้อ 100 ไมโครลิตรที่ดูมาใส่ลงในจานเพาะเชื้อ

4. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้โปรแกรมสถิติ SPSS 16 ออกแบบการทดสอบด้วยแผนแบบสุ่มสมบูรณ์และการวิเคราะห์ (CRD: complete randomized designs and the

analysis) หาความสัมพันธ์ระหว่าง cholestanol, stigmasterol และ friedelin ที่ความเข้มข้น 2048 1024 512 256 128 และ 64 ไมโครโมล กับค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรีย *A. baumannii* *E. coli* ATCC 25913 และ *P. aeruginosa*

ผลการทดลอง

จากการทดลองหาประสิทธิภาพของ cholestanol stigmasterol และ friedelin จากการค้าเปรียบเทียบกับน้ำ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Broth dilution susceptibility test โดยการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่รอดชีวิต ดังในตารางที่ 1 และ 2 พบว่า friedelin สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดคือ *A. baumannii* *E. coli* ATCC 25913 และ *P. aeruginosa* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 512 256 และ 1024 ไมโครโมล ตามลำดับ cholestanol สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *P. aeruginosa* มีค่า MIC เท่ากับ 2048 ไมโครโมล แต่สาร cholestanol ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* และ *E. coli* ATCC 25913 ได้ (ค่า MIC มากกว่า 2048 ไมโครโมล) และ stigmasterol สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุดมีค่า MIC เท่ากับ 128 ไมโครโมล แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *A. baumannii* และ *E. coli* ATCC 25913 ดังตารางที่ 1 และ 2 และรูปที่ 2-4

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิดจากรากรักดำ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 2513, *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* ที่ระดับความเข้มข้นคือ 1.5×10^8 CFU/ml

สารบริสุทธิ์	ชนิดของแบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรีย (โคโลนี \pm S.D.) ที่รอดจากการฆ่าด้วยสารบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (10^8 CFU/ml)							ค่า MIC (μ M)
		2048 (μ M)	1024 (μ M)	512 (μ M)	256 (μ M)	128 (μ M)	64 (μ M)	H ₂ O	
cholestanol	<i>E. coli</i> ATCC 25913	200 \pm 2	253 \pm 2	314 \pm 2	372 \pm 2	409 \pm 2	464 \pm 2	500 \pm 3	>2048
	<i>A. baumannii</i>	89 \pm 1	123 \pm 5.77	162 \pm 2.65	193 \pm 4.36	239 \pm 1	271 \pm 1	663 \pm 2.8	>2048
	<i>P. aeruginosa</i>	0 \pm 1	9 \pm 1	60 \pm 0	198.3 \pm 0.47	209 \pm 1	212 \pm 1	224 \pm 2.31	2048
stigmasterol	<i>E. coli</i> ATCC 25913	159 \pm 5.13	180 \pm 4	248 \pm 3	296 \pm 3	371 \pm 3	437 \pm 3	500 \pm 3	>2048
	<i>A. baumannii</i>	43 \pm 3	95.67 \pm 0.58	124 \pm 1.73	152 \pm 3.22	205 \pm 0.58	214 \pm 0.58	633 \pm 2.8	>2048
	<i>P. aeruginosa</i>	52 \pm 2.51	74 \pm 3.21	132.67 \pm 1.15	164.67 \pm 2.08	187 \pm 2.31	201 \pm 2.31	224 \pm 2.31	1024
friedelin	<i>E. coli</i> ATCC 25913	33 \pm 4.35	64 \pm 2	87 \pm 1	132 \pm 3.61	180 \pm 3.05	216 \pm 3	500 \pm 3	512
	<i>A. baumannii</i>	26 \pm 2	55 \pm 5.86	72 \pm 2.8	157 \pm 1	201 \pm 4.0	232 \pm 2.8	633 \pm 2.8	256
	<i>P. aeruginosa</i>	15 \pm 0	55.67 \pm 2.51	96.33 \pm 2.51	145.33 \pm 2.1	194 \pm 3	210.3 \pm 2.1	224 \pm 2.31	2048
แอมพิซิลิน	<i>E. coli</i> ATCC 25913	96.66 \pm 2.87	145 \pm 1.67	232 \pm 2.47	257 \pm 2.47	289 \pm 2.47	314 \pm 2.43	500 \pm 3	>2048
	<i>A. baumannii</i>	93.33 \pm 3.51	201 \pm 2.51	299 \pm 2.51	399 \pm 2.51	484 \pm 2.51	609 \pm 2.51	633 \pm 2.8	>2048
	<i>P. aeruginosa</i>	31.3 \pm 1.52	40 \pm 3.61	55 \pm 1.15	66.67 \pm 3.78	200 \pm 1.52	213 \pm 1.58	224 \pm 2.3	256
เตตราซัยคลิน	<i>E. coli</i> ATCC 25913	37 \pm 5.57	55 \pm 2.65	75 \pm 1	111 \pm 2.08	201 \pm 3.7	242 \pm 1	500 \pm 3	512
	<i>A. baumannii</i>	75 \pm 3.05	207 \pm 1	301 \pm 1	412 \pm 1	518 \pm 1	627 \pm 1	633 \pm 2.8	1024
	<i>P. aeruginosa</i>	12 \pm 1.73	85 \pm 3	153 \pm 6.24	201 \pm 3	208 \pm 4.67	217 \pm 1.73	224 \pm 2.31	2048

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารบริสุทธิ์ทั้งสามชนิดและยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

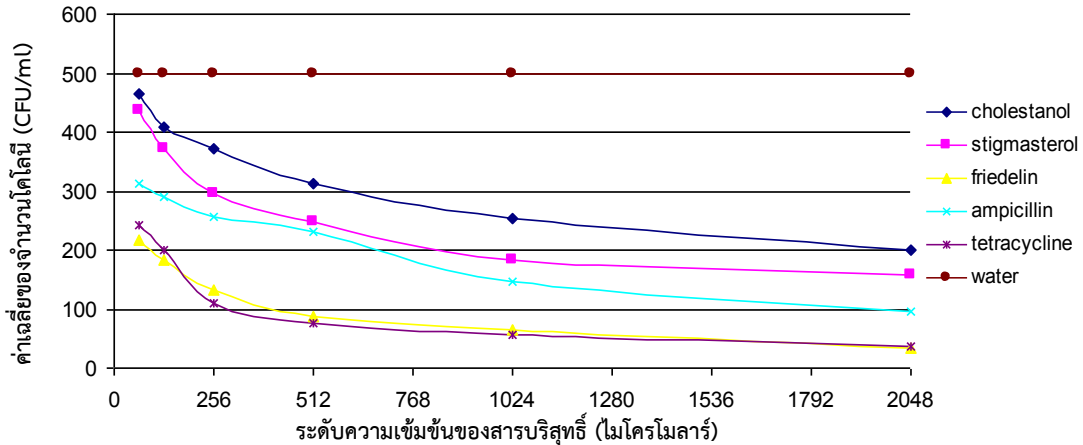
สารบริสุทธิ์	แบคทีเรีย		
	<i>E. coli</i> ATCC 25913	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>
cholestanol	>2048 (μ M)	>2048 (μ M)	2048 (μ M)
stigmasterol	>2048 (μ M)	>2048 (μ M)	128 (μ M)
friedelin	512 (μ M)	256 (μ M)	1024 (μ M)
แอมพิซิลิน	>2048 (μ M)	>2048 (μ M)	256 (μ M)
เตตราซัยคลิน	512 (μ M)	1024(μ M)	2048 (μ M)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ พบว่าแอมพิซิลินสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุดในค่า MIC เท่ากับ 256 ไมโครโมล แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *A. baumannii* และ *E. coli* ATCC 25913 โดยมีค่า MIC มากกว่า 2048 ไมโครโมล ส่วนเตตราซัยคลินสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25913

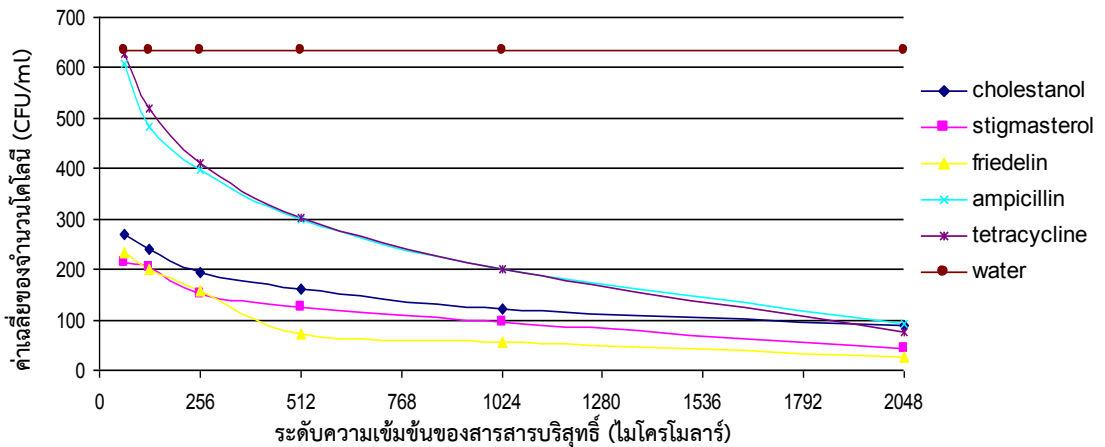
โดยมีค่า MIC เท่ากับ 512 ไมโครโมล สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1024 ไมโครโมล และสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* ได้น้อยที่สุดในค่า MIC เท่ากับ 2048 ไมโครโมล แสดงดังตารางที่ 1 และ 2 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารบริสุทธิ์ทั้งสามชนิดคือ cholestanol, stigmasterol และ friedelin

กับยาปฏิชีวนะ พบว่าสาร friedelin มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือดีกว่ายาแอมพิซิลลินและเตตราไซคลินในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *A. baumannii*, *E. coli* ATCC 25913 และ *P. aeruginosa* รูปที่ 2-4 รองลงมาคือสาร stigmasterol มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับยา

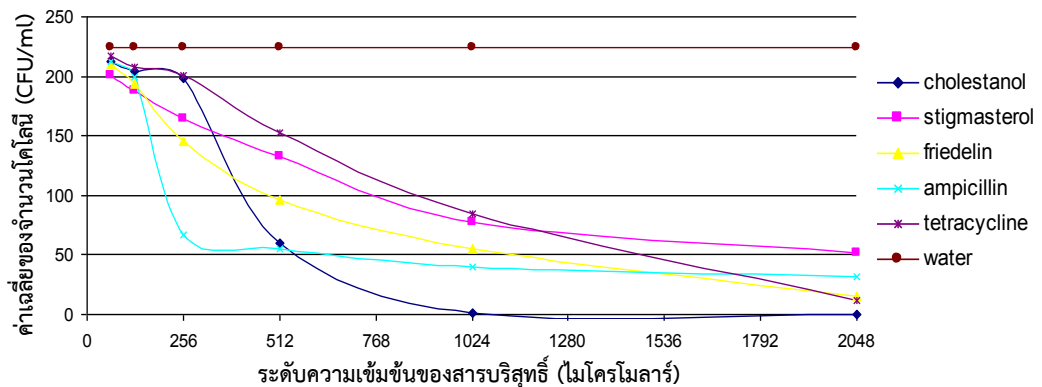
เตตราไซคลินในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* และ cholestanol มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* ดังตารางที่ 1 และ 2 และรูปที่ 2-4



รูปที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ cholestanol, stigmasterol, friedelin, ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ cholestanol, stigmasterol, friedelin, ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *A. baumannii* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ cholestanol, stigmasterol, friedelin, ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย พบว่า friedelin ยับยั้งการเจริญเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 ได้ดีที่สุด มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับยาเตตราไซคลินในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 รองลงมาคือ stigmasterol ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับยาแอมพิซิลลิน และพบว่า cholestanol สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 ได้น้อยที่สุด (รูปที่ 2-4) พบว่า friedelin ยับยั้งการเจริญเชื้อ *A. baumannii* ได้ดีที่สุด (รูปที่ 2-4) friedelin ยังสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดได้ดีที่สุด รองลงมาคือ stigmasterol และ cholestanol เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารบริสุทธิ์ทั้งหมดกับแอมพิซิลลินและเตตราไซคลิน (ตารางที่ 1 และ 2) พบว่า cholestanol ยับยั้งการเจริญเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ friedelin ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับแอมพิซิลลิน และ stigmasterol ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้น้อยที่สุด ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเตตราไซคลิน (รูปที่ 2-4)

เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติพบว่า cholestanol, stigmasterol และ friedelin และยาปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อ

แบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่รอดจากการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียกับระดับความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ทั้งสามชนิดพบว่า เมื่อระดับความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์สูงขึ้นค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่รอดจากการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียก็จะมิต่ำลง ดังรูปที่ 2-4 และยังพบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์มากขึ้น อาจจะสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้อย่างทุกชนิด แต่ที่ cholestanol ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *E. coli* ATCC 25913 เพราะความเข้มข้นที่เริ่มต้นทดสอบอาจจะน้อยไป จึงไม่เพียงพอในการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ อาจจะต้องเพิ่มความเข้มข้นให้สูงกว่า 2048 ไมโครโมล (ตารางที่ 1-2 และรูปที่ 2-4) อย่างไรก็ตาม ควรมีการเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ต่อไป

สรุปและวิจารณ์ผล

การศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส (*A. baumannii*, *E. coli* ATCC 25913

และ *P. aeruginosa*) ได้บางชนิด โดย friedelin มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิด stigmasterol และ cholestanol มีประสิทธิภาพรองลงมา โดย friedelin สามารถยับยั้ง *A. baumannii* และ *E. coli* ATCC 25913 ได้ดีกว่าแอมพิซิลลิน เมื่อเปรียบเทียบสารบริสุทธิ์ทั้งสามชนิดจากรักดำกับยาปฏิชีวนะ พบว่า friedelin มีประสิทธิภาพดีสุด รองลงมาคือ stigmasterol มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับแอมพิซิลลิน และ cholestanol มีประสิทธิภาพต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด

cholestanol และ stigmasterol เป็นสารบริสุทธิ์ที่อยู่ในกลุ่มสเตียรอยด์และ friedelin เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มไตรเทอร์พีน cholestanol นอกจากจะมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเชื้อจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ อาจไปรบกวนกระบวนการถ่ายรหัสของ DNA และยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และโปรตีน (Ettayebi et al., 2000) หรืออาจจะไปรบกวนสมดุลของการผ่านเข้าออกของสาร (Lundin et al., 2011; Zai-Chang et al., 2005) นอกจากนี้อาจมีฤทธิ์ในการลดไขมันในหลอดเลือดของมนุษย์ (Lundin et al., 2011; Miettinen et al., 1989) stigmasterol ที่แยกจากลำต้นของทองกวาว (*Butea monosperma*) มีฤทธิ์ช่วยยับยั้งโรคไทรอยด์ และโรคภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (Panda et al., 2008) friedelin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็ง และสามารถยับยั้งเชื้อการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* *S. epidermidis* *B. subtilis* และ *E. coli* (Reyes-Chilpa et al., 2004; Yasunaka et al., 2005) นอกจากนี้ไตรเทอร์พีนจากใบของมะพลับ (*D. kaki*) ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการรักษาโรคต่าง ๆ รวมทั้ง ใช้เป็นส่วนผสมในตำรับยาสมุนไพรจีน และไตรเทอร์พีนจากเปลือกลำต้นของ *D. decandra* มี

ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Nareeboon et al., 2006; Fan et al., 2006) จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้นับพบว่า friedelin สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *A. baumannii* *E. coli* และ *P. aeruginosa* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *E. coli* ส่วน cholestanol และ stigmasterol สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *P. aeruginosa*

จากการนำสารบริสุทธิ์ จากรักดำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมลบ ฉวยโอกาส สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยับยั้งการเจริญแบคทีเรียกลุ่มฉวยโอกาสสายพันธุ์อื่น ๆ รวมทั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยาต่อไป นอกจากนี้ควรศึกษาเปรียบเทียบกลไกการทำงานของสารบริสุทธิ์ทั้งสามชนิดจากรักดำกับยาปฏิชีวนะต้นแบบ เช่น แอมพิซิลลิน และเตตราไซคลิน เพื่อหากลไกการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียต่อไปในอนาคต และควรทำการศึกษาในระดับเชิงโมเลกุลโดยติดตามฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์เหล่านี้เข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่ และตรวจสอบผลของสารบริสุทธิ์เหล่านี้ต่อออร์แกเนลล์ต่างๆของแบคทีเรีย นอกจากนี้อาจนำสารบริสุทธิ์ทั้งสามชนิดจากรักดำไปพัฒนาใช้แทนหรือควบคู่กับยาปฏิชีวนะที่ใช้ไม่ได้ผลในปัจจุบัน ซึ่งอาจจะเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส ในอนาคต อีกทั้งยังเป็นการลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะที่เป็นอันตรายต่อเซลล์มนุษย์ และมีผลข้างเคียงมาเป็นเวลานาน อย่างไรก็ตามควรทดสอบความเป็นพิษ และความปลอดภัยของการใช้สารบริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้จริงในการรักษาโรค

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ดำเนินการวิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2555 รหัสข้อเสนอโครงการคือ 2555A10802008 งานวิจัยชิ้นนี้ไม่อาจประสบความสำเร็จได้ถ้าขาดหน่วยงานสนับสนุน ได้แก่ ภาควิชาเคมี ภาควิชาชีววิทยาและภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือสารเคมี และเชื้อแบคทีเรียในการทำวิจัย จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

- ประภัสสร จุลกะรัตน์. (2532). ตำราเภสัชวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: เรือนแก้วการพิมพ์.
- สมภพ ประธานธูราภิรักษ์. (2539). อนุกรมวิธานพืชสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โอ.เอส. พรินติ้ง เฮาส์.
- Adeniyi, B.A., Robert, M.F., Chai, H. and Fong, H.H.S. (2003). In vitro cytotoxicity activity of diosquinone, a naphthoquinone epoxide. *Phytotherapy Research* 17(3): 282-284.
- Bapela, J.M., Kuete, V., Toit, E.D., Meyer, J.J.M. and Lall, N. (2007). Fertilization-induced changes in growth parameters and antimycobacterial activity of *Euclea natalensis* (Ebenaceae). *South African Journal of Botany* 74: 244-250.
- Batta, A.K., Xu, G., Honda, A., Miyazaki, T. and Salen, G. (2005). Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat. *Metabolism Clinical and Experimental* 55: 292-299.
- Bei, W., Peng, W., Ma, Y. and Xu, A. (2005). Flavonoids from the leaves of *Diospyros kaki* reduce hydrogen peroxide induced injury of NG108-15 cells. *Life Sciences* 76(17): 1975-1988.
- Clinical and standard Institute. (2006). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. Document M100-S16. Wayne, PA: CLSI.
- Ettayebi, K., Yamani, J. E. and Rossi-Hassani, B. D. (2000). Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* 183: 191-195.
- Fan, J. and He, C. (2006). Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 950-956.
- Forgo, P. and Kover, K. E. (2004). Gradient enhanced selective experiments in the ^1H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. *Steroids* 69: 43-50.
- Jeong, E.Y., Jeon, J.H., Lee, C.H. and Lee, H.S. (2009). Antimicrobial activity of catechol isolated from *Diospyros kaki*. Thunb roots. *Food Chemistry* 115: 1006-1010.
- Kooy, F.V.D., Meyer, J.J.M. and Lall, N. (2006). Antimycobacterial activity and possible mode of action of newly isolated neodiospyrin and other naphthoquinones from *Euclea natalensis*. *South African Journal of Botany* 72: 349-352.
- Kuete, V., Tangmouo, J.G., Meyer, J.J.M. and Lall, N. (2009). *Diospyrone*, *crassiflorone* and *plumbagin* three antimicrobial and anticonorrhoeal naphthoquinones from two *Diospyros* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34: 322-325.
- Lall, N. and Meyer, J.J.M. (2001). Inhibition of drug-sensitive and drug-resistant strains of

- Mycobacterium tuberculosis* by diospyrin, isolated from *Euclea natalensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 78: 213–216.
- Lundin, A., Bergstrom, T., Andrighetti-Frohner, C.R., Bendrioua, L., Ferro, V. and Trybala, E. (2011). Potent anti-respiratory syncytial virus activity of a cholestanol-sulfated tetrasaccharide conjugate. *Antiviral Research* 93(1): 101-109.
- Mallavadhani, U.V., Panda, A.K. and Rao, Y.R. (1998). Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros*. *Phytochemistry* 49(4): 901–951.
- Matsushita, Y., Jang, I.C., Imai T., Fukushima, K., Lee, J.M., Park, H.R. and Lee, S.C. (2010). Antioxidant and cytotoxic activities of naphthalene derivatives from *Diospyros kaki*. *The Japan Wood Research Society* 57: 161-165.
- Miettinen, T.A., Tilvis, R.S. and Kesaniemi, Y.A. (1989). Serum cholestanol and plant sterol levels in relation to cholesterol metabolism in Middle-Aged men. *Metabolism* 36(2): 136-140.
- Nakajima, N., Fujioka, S., Tanaka, T, Takatsuto, S. and Yoshida, S. (2002). Biosynthesis of cholestanol in higher plants. *Phytochemistry* 60 (3): 275-279.
- Nareeboon, P., Kraus, W., Beifuss, U., Conrad, J., Klaiber, I. and Sutthivaiyakit, S. (2006). Novel 2, 4-nor-, 2, 4-nor-2, 3-seco-, and 3, 2, 4-dinor-2, 4-seco-ursane triterpenes from *Diospyros decandra* evidences forming a biosynthetic transformations. *Tetrahedron* 62(23): 5519-5526.
- Panda, S., Jafri, M., Kar, A. and Meheta, B.K. (2008). Thyroid inhibits, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*. *Fitoterapia* 80:123-126.
- Park, Y., Jung, S., Kang, S., Delgado-Licon, E., Ayala, A.L.M., Tapia, M.S., Martin-Belloso, O., Trakhtenberg, S. and Gorinstein, S. (2005). Drying of persimmons (*Diospyros kaki L.*) and the following changes in the studied bioactive compounds and the total radical scavenging activities. *LWT* 39: 748-755.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muniz, E., Apan, T.R., Amekraz, B., Aumelas, A., Jankowski, C.K. and Vazquez-Torres, M. (2004). Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences* 75: 1635-1647.
- Shashi B.M. and Asish, P. K. (1994). ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient fractures. *Phytochemistry* 37(6): 1517-1575.
- Tangmouo, J., Meli, A.L., Komguem, J., Kuete, V., Nguonou, F.N., Lontsi, D., Beng, V.P., Choudhary, M. I. and Sondengum, B.L. (2006). Crassiflorone, a new naphthoquinone from *Diospyros crassiflora* (Hien). *Tetrahedron Letters* 47: 3067-3070.
- Tangmouo, J.G., Ho, R., Lannang, A.M., Komguem, J., Lontsi, A.T., Lontsi, D. and Hostettmann, K. (2009). Norbergenin derivatives from the stem bark of *Diospyros sanza-minika* (Ebenaceae) and their radical scavenging activity. *Phytochemistry Letters* 2: 192–195.
- Trongsakul, S., Panthong, A., Kanjanapothi, D. and Taesotikul, T. (2003). The analgesic antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. *Journal of Ethnopharmacol* 85(2-3): 221–225.

- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2007). Microbiology, and introduction 9th eds, San Francisco: U.S.A. Benjamin cumming.
- Veberic, R., Jurhar, J., Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F. and Schmitzer, V. (2009). Comparative study of primary and secondary metabolites in 11 cultivars of persimmon fruit (*Diospyros kaki L.*). Food Chemistry 119: 477-483.
- Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Perez, L., Lopez-Villafranco, E., Muniz, E.E., Aguilar, A. and Reyes-Chilpa, R. (2005). Antimycobacterial activity of extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. Journal of Ethnopharmacology 97: 293-299.
- Zai-Chang, Y., Bo-Chu, W., Xiao-Sheng, Y., Qiang, W. and Liang, R. (2005). The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of *Staphylococcus aureus*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 41: 79-81.

