Thesis Title	Phytochemical Composition and Activity of Extracts from Seed Coat of *Dimocarpus longan* Lour. Against *Burkholderia pseudomallei*
Author	Mr. Dech Amorntipayawong
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Advisory Commitee	Dr. Anusorn Boonthum — Chairperson Assoc. Prof. Prasit Tharavichitkul — Member

ABSTRACT

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis in humans and animals. Severe melioidosis, which causes high mortality and a high relapse rate, requires treatment with drug combinations for a long period of time. At present, strains of *B. pseudomallei* have become increasingly resistant to currently used drug treatment. Furthermore, there are no drugs that act against latent organism. It has been proposed that antibacterial compounds from plants may inhibit bacteria by a different mechanism than that presently used from antibiotics, and they may have a clinical value in the treatment of resistant microbial strains. In Thai traditional medicine, *Dimocarpus longan* Lour. seeds have been used to treat pustule, wound and chronic abscesses. Since cutaneous or subcutaneous abscess is a clinical feature of melioidosis, this study investigated whether the longan seeds could be a source of antibacterial agent against *B. pseudomallei*. Initially, ethanolic extracts were prepared from the whole seed (DLE-1), seed coat (DLE-2) and seed core (DLE-3), and their activities against *B. pseudomallei* were tested on Mueller-Hinton agar (MHA) and acetate agar (AA) by the agar cup diffusion method.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The result showed that DLE-1 and DLE-2 possessed antibacterial activity when the assay was conducted on AA, the medium with limiting carbon source. Due to the ease of dissolving DLE-2 in water, it was chosen to assay for the minimal inhibitory concentration (MIC), killing effect in acetate medium and interaction with trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMZ). Lastly, it was submitted to phytochemical screening by thin layer chromatography (TLC). The MIC of 54 *B. pseudomallei* isolates was determined by the agar dilution method on MHA and AA. The MIC value was found to be 25 mg/ml when the assay was carried out on MHA, and it ranged from 6.25 to12.5 mg/ml when AA was used instead of MHA. The time-kill-curve assay was also performed to examine bactericidal activity and the killing rate of the seed coat extract. When 50 mg/ml (4 folds of MIC) of the seed coat extract were tested on acetate broth, 99% of *B. pseudomallei* cells were killed within 6 hours and completely killed within 24 hours. Moreover, the extract was synergistic with TMP-SMZ, as tested by the double disc diffusion method on MHA. This synergistic activity was detected in 51 of 54 (94%) isolates of *B. pseudomallei.* In contrast, the antagonistic effect on DLE-2 and TMP-SMZ was found in *E. coli* ATCC 25922 and *S aureus* ATCC 25923. After dissolving in water and keeping in a refrigerator, the activity of DLE-2 was unlikely to decrease for up to 12 months. In addition, DLE-2 was found to inhibit the growth of other bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter anitratus*, *Salmonella enteritidis*, and *Proteus mirabilis*. For phytochemical screening, TLC analysis showed the presence of coumarins and flavonoids, whereas alkaloids, glycosides and saponins were not detected.

In conclusion, the ethanolic extract of the longan seed coat was likely to have a bactericidal activity against *B. pseudomallei* in medium, with limiting carbon source. Interestingly, the seed coat extract was synergistic with co-trimoxazole, the drug used in conventional four-drug therapy. In fact, this study is the first scientific investigation on the bioactivity of the longan seed coat. It is possible that the longan seed coat provides potential for the development of a new antibacterial agent for the treatment of melioidosis in animals as well as humans.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	องค์ประกอบด้านพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดลำไย
ผู้เขียน	นายเดช อมรทิพย์วงศ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อ. ดร. อนุสรณ์ บุญธรรม ประธานกรรมการ รศ. ประสิทธิ์ ธราวิจิตรกุล กรรมการ

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei เป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดสิสที่พบได้ทั้งในคนและสัตว์ ก่อให้เกิดอัตราตายสูง และมีปัญหาการกลับมาเป็นโรคซ้ำได้ การรักษาต้องใช้ยาต้านแบคทีเรียร่วมกันหลายขนาน และใช้ระยะเวลาในการรักษาที่ยาวนาน ปัจจุบันมีรายงานการดื้อยาเพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันไม่มียาที่ใช้กำจัดเชื้อในระยะแฝง มีข้อเสนอแนะว่าสารต้านแบคทีเรียจากพืชอาจมีกลไกการต้านเชื้อต่างจากกลไกที่พบในยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ ตำรายาสมุนไพรไทยกล่าวถึงการนำเมล็ดลำไยซึ่งเผาจนเป็นเถ้าไปใช้รักษาแผลเรื้อรังและแผลมีหนอง เนื่องจากแผลฝีหนองเป็นอาการแสดงรูปแบบหนึ่งของโรคเมลิออยโดสิส การศึกษานี้จึงตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *B. pseudomallei* จากเมล็ดลำไย ในเบื้องต้น ผู้ศึกษาได้ใช้เอทิลแอลกอฮอล์สกัดสารจากเมล็ดลำไยทั้งหมด เฉพาะส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดลำไย และเฉพาะส่วนแกนของเมล็ดลำไยที่ได้เอาส่วนเปลือกออก สารสกัดที่ได้ให้ชื่อว่า DLE-1, DLE-2 และ DLE-3 ตามลำดับ เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. pseudomallei* ของสารสกัดทั้งสามด้วยวิธี agar cup diffusion พบว่า DLE-1 และ DLE-2 มีฤทธิ์ต้านเชื้อที่เจริญบนอาหาร acetate agar ซึ่งมีเพียง acetate เท่านั้นทำหน้าที่เป็นแหล่งของคาร์บอนให้แบคทีเรีย นอกจากมีฤทธิ์ต้าน *B. pseudomallei* DLE-2 ยังละลายน้ำได้ดี ในขณะที่ DLE-1 และ DLE-3 ไม่ละลายน้ำ ดังนั้น จึงเลือกศึกษาฤทธิ์ของ DLE-2 โดยตรวจหาความเข้มข้นต่ำสุดของ DLE-2 ในการยับยั้งการเจริญ (Minimal inhibitory

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

concentration, MIC) ของเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 54 สายพันธุ์ ในอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) และ Acetate agar (AA) โดยวิธี agar dilution พบว่า ค่า MIC ของสารสกัดเป็น 25 และ 6.25 - 12.5 mg/ml ตามลำดับ จากนั้นจึงศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดลำไยต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ในสภาวะที่มีแหล่งของคาร์บอนจำกัดโดยวิธี time-kill-curve ในอาหาร acetate พบว่าที่ความเข้มข้น 50 mg/ml (4 เท่าของ MIC) DLE-2 มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อได้ร้อยละ 99 และ ร้อยละ 100 ในเวลา 6 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อทดสอบการเสริมฤทธิ์และการต้านฤทธิ์ระหว่างสารสกัดจากเปลือกเมล็ดลำไยกับยา trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMZ) โดยวิธี double disc diffusion พบว่า ให้การเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 51 สายพันธุ์ จากเชื้อที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด 54 สายพันธุ์ แต่พบการต้านฤทธิ์เมื่อทดสอบกับเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 การศึกษาความคงตัวของฤทธิ์สารสกัดจากเปลือกเมล็ดลำไยซึ่งเก็บอยู่ในรูปสารละลายที่ 4 °C เป็นเวลา 12 เดือน โดยวิธี agar disc diffusion พบว่าสารสกัดยังมีฤทธิ์อยู่เช่นเดิม นอกจากนี้ สารสกัดจากเปลือกเมล็ดลำไยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้อีก เช่น *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter anitratus, Salmonella enteritidis* และ *Proteus mirabilis* เป็นต้น สำหรับการตรวจหาองค์ประกอบด้านพฤกษเคมีของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดลำไย โดยวิธี thin layer chromatography (TLC) พบว่าประกอบด้วยสาร flavonoids และ courmarins แต่ตรวจไม่พบสารกลุ่ม alkaloid, glycosides และ saponins

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ โดยสรุป แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดลำไยมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* ในอาหารซึ่งมีแหล่งของคาร์บอนที่จำกัด ที่น่าสนใจคือให้ผลเสริมฤทธิ์กับยา co-trimoxazole ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาโรคเมลิออยโดสิส การศึกษานี้เป็นรายงานทางวิทยาศาสตร์ครั้งแรก ที่แสดงถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของเปลือกเมล็ดลำไย จึงเป็นไปได้ที่จะนำไปพัฒนาตรวจหาสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าว เพื่อใช้เสริมกับยาที่ใช้รักษาโรคเมลิออยโดสิสในสัตว์ ซึ่งถ้ามีประสิทธิภาพและปลอดภัยอาจนำมาใช้ในคนต่อไปได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved