

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของตำรับยาปิดสมุทรน้อย (THF-GI003)

ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วง

**Evaluation of antibacterial activity of Thai herbal formulation**

**Pit Samut Noi (THF-GI003) against diarrhoea-causing bacteria**

คณะนักวิจัย

ดร.สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ

ดร.จنگล สายสิงห์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก งบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2558-2559 รหัสโครงการ TTM580884S

ชื่องานวิจัย	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของตำรับยาปิดสมุทรรน้อย (THF-GI003) ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วง
หัวหน้าโครงการวิจัย	ดร. สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ คณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของตำรับยาปิดสมุทรรน้อย (THF-GI003) ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วงและผลต่อปัจจัยก่อโรคที่รุนแรง รวมทั้งทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง ซึ่งสมุนไพรรวมในตำรับยาประกอบด้วย เปลือกลูกทับทิม (*Punica granatum* L.) ปรุงเบญจกานี (*Quercus infectoria* G. Olivier) ผลดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl.) และเมล็ดเทียนดำ (*Nigella sativa* L.) ผลการศึกษาด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วงทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ โดยมีค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 7.0-18.5 มม. จากการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ด้วยวิธี broth microdilution พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดีที่สุดในค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 15.63-62.5 µg/ml และ 250-1000 µg/ml ตามลำดับ และจากการศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาด้วยวิธี time-kill study ไม่พบการมีชีวิตรอดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* 5268 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 ภายในชั่วโมงที่ 8 และ 12 ตามลำดับ การศึกษาผลของสารสกัดจากตำรับยาต่อการทำลายโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย โดยทดสอบกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 พบว่า สารสกัดที่ไม่มีผลทำให้เกิดการแตกของเซลล์ (cell lysis) หรือทำให้เกิดการรั่วของไซโทพลาสซึมออกนอกเซลล์ (cell leakage) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง biofilm พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 31.25-62.5 µg/ml สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus aureus* W81 ได้ดีที่สุดในค่าเท่ากับ 78.2-81.5% โดยไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้สารสกัดจากตำรับยายังแสดงฤทธิ์ anti-quorum sensing โดยสารสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.125 mg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง violacein โดยเชื้อ *Chromobacterium violaceum* DMST 21761 ได้เท่ากับ 24.04% และ 33.72% ตามลำดับ และยังพบว่าสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการ swarming ของเชื้อ *Escherichia coli* O157: H7 ได้ 74.98% และ 52.65% ตามลำดับ การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูทดลองพบว่า

น้ำนักตัวเจลลี่ต่อตัวของสัตว์ทดลอง น้ำนักอวัยวะสัมผัส ค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิก ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม การตรวจวิเคราะห์โลหะหนักในตำรับยาตาม Thai herbal pharmacopoeia ไม่พบการปนเปื้อนของแคดเมียม ตะกั่ว และสารหนูเกินกว่าที่กำหนด ผลการศึกษานี้อาจใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนการใช้ตำรับยาในการรักษาโรค และอาจใช้เป็นแนวทางในการพิจารณาเรื่องความปลอดภัยของการใช้ตำรับยาและการบริหารยาให้กับผู้ป่วย

**Project Title** Evaluation of antibacterial activity of Thai herbal formulation Pit Samut Noi (THF-GI003) against diarrhoea-causing bacteria

**Principle Investigator** Dr. Surasak Limsuwan  
Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University

### Abstract

The objectives of this study were to determine the antibacterial activity and effect on some bacterial virulence factors of Thai herbal formulation Pit Samut Noi (THF-GI003) against diarrhoea-causing bacteria. The *in vivo* acute toxicity in Wistar rat was also evaluated. The herbal formulation consists of three medicinal plants including *Quercus infectoria* G. Olivier (nutgall), *Piper retrofractum* Vahl. (fruit), and *Nigella sativa* L. (seed). By disc diffusion method, the ethanol extract of herbal formulation displayed antibacterial activity on all test bacterial pathogens with the zone of inhibition ranging from 7.0-18.5 mm. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) were investigated by broth microdilution method. The ethanol extract of herbal formula demonstrated the best MIC and MBC values on *Vibrio parahaemolyticus* with the range of 15.63-62.5 µg/ml and 250-1000 µg/ml, respectively. By time kill study, the viable cell of *V. parahaemolyticus* 5268 and *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 treated with the ethanol extract of herbal formula was not detected after 8 and 12 h, respectively. The treated *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 cells with this extract demonstrated no lysis and leakage through the bacterial membrane was not significantly observed. Anti-biofilm formation assay revealed that the ethanol extract of herbal formula at 31.25-62.5 µg/ml inhibited biofilm formation by *Staphylococcus aureus* W81 by 78.2-81.5%, without affecting the bacterial growth. In addition, this extract exhibited anti-quorum sensing activity using *Chromobacterium violaceum* DMST 21761 as biomonitor strain. The violacein production by *C. violaceum* DMST 21761 was inhibited by 24.04%-33.72% after treatment with the extract at concentration 0.125-0.25 µg/ml. Moreover, the water and ethanol extract of herbal formula at 1000 µg/ml reduced swarming motility of *Escherichia coli* O157: H7 by 74.98% and 52.65%, respectively. In the acute toxicity study, there were no significant adverse effects on body weights, organ weights, blood chemistry and

hematology parameters. The contamination of heavy metals in herbal formulation determined according to Thai herbal pharmacopoeia found that there was no contaminate of cadmium and lead except for arsenic. However, the concentration of arsenic in the herbal formula was lower than the break point indicated by Thai herbal pharmacopoeia. The results from this study may be used as a guideline for considering the safety of the herbal formulation and drug administration. Further research is warranted to explore the long term toxicity.