

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. สารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพร

จากตัวอย่างสมุนไพรไทยที่นำมาศึกษาทั้งหมด 38 ชนิด จากอำเภอเมืองและอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ได้แยกการสกัดสมุนไพรออกเป็น 2 ประเภทตามชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสาร คือ น้ำกลั่นและเอทานอล (ethanol 95%) สามารถสกัดสารสมุนไพรชนิดหยาบได้ทั้งหมด 56 สารสกัด โดยมีสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำ 18 สารสกัด และสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่สกัดด้วยเอทานอลทั้งหมด 38 สารสกัด ดังตารางที่ 3

โดยพบว่า ร้อยละของสารสกัดที่ได้ (% yield) จากสารสกัดหยาบด้วยน้ำและเอทานอลมีค่าตั้งแต่ 1.3-65.4 และ 0.3-65.4 ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดหยาบสมุนไพรที่มี % yield น้อยที่สุดและมากที่สุด คือ ชา (0.3) และสี่เสียดเทศ (65.4) ตามลำดับ ลักษณะของสารที่สกัดได้จะแตกต่างกันตามชนิดของสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นของหนืด สีดำ

ตารางที่ 3 ลักษณะของสารสกัดหยาบด้วยน้ำและเอทานอล และร้อยละของสารสกัดที่ได้จากสมุนไพร

ลำดับ	สมุนไพร	ส่วนของพืช	สกัดด้วยน้ำ		สกัดด้วยเอทานอล	
			ลักษณะ	ร้อยละ	ลักษณะ	ร้อยละ
1.	กระชาย <i>Boesenbergia pandurata</i> Schltr.	เหง้า	ND	ND	สีเหลือง หนืด	NC
2.	กระเทียม <i>Sandoricium nervosum</i> Car.	ราก	สีดำ หนืด	5.5	สีดำ หนืด	4.0
3.	ขมิ้นชัน <i>Curcuma longa</i> Linn	เหง้า	ND	ND	สีเหลือง หนืด	13.9
4.	ขมิ้นอ้อย <i>Curcuma zedoaria</i>	เหง้า	ND	ND	สีส้ม หนืด	9.6
5.	ขมิ้น <i>Pluchea indica</i> Less.	ใบ	ND	ND	สีเขียว หนืด	17.8
6.	ขี้เหล็ก <i>Walsura robusta</i> Roxb.	เนื้อไม้	สีดำ หนืด	23	สีดำ หนืด	1.7
7.	คนทีสอ <i>Fitex trifolia</i> Linn	ใบ	ND	ND	สีดำ แข็ง	NC
8.	จันทร์แดง <i>Dracaena loureiri</i> Gagnep.	แก่น	ND	ND	สีแดง หนืด	16.9
9.	ชะพลู <i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	ใบ	ND	ND	สีเขียว หนืด	1.7
10.	ชา <i>Camellia sinensis</i> (L.) O.Kuntze	ใบ	ND	ND	สีขาว แข็ง	0.3
11.	ชุมเห็ดเทศ (ชุมเห็ดใหญ่) <i>Cassia alata</i> Linn.	ลำต้น	สีดำ หนืด	4.2	สีดำ หนืด	5.6
12.	คึบปี้ <i>Piper retrofractum</i>	ผล	ND	ND	สีเหลือง แข็ง	7.0
13.	เดาร์ลีย์เปรียง <i>Derris scandens</i> Roxb.Benth	เถา	สีดำ หนืด	11.4	สีดำ หนืด	3.2
14.	ทับทิม <i>Punica granatum</i> Linn	เปลือกผล	สีดำ หนืด	8.0	สีดำ หนืด	13.0
15.	เทียนบ้าน <i>Impatiens balsamina</i> Linn	ใบ	ND	ND	สีดำ หนืด	5.2
16.	เนนทรี <i>Peltophorum pterocarpium</i> (DC.) Back. ex Heyne	เปลือกต้น	สีดำ หนืด	8.6	สีดำ หนืด	7.1
17.	น้ำนมราชสีห์เล็ก <i>Euphorbia thymifolia</i> Linn.	ทั้งต้น	ND	ND	สีเขียว หนืด	1.3
18.	เนระบูตี <i>Dryopteris sylvatica</i> O.Kze.	ลำต้น	สีดำ หนืด	4.5	สีดำ หนืด	4.5
19.	บัวบก <i>Centella asiatica</i> Urb.	ใบ	ND	ND	สีเขียว หนืด	6.0

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	สมุนไพร	ส่วนของพืช	สกัดด้วยน้ำ		สกัดด้วยเอทานอล	
			ลักษณะ	ร้อยละ	ลักษณะ	ร้อยละ
20.	เบญจกานี <i>Quercus infectoria</i> Olivier	gall	สีน้ำตาลเข้ม	24.1	สีน้ำตาลเข้ม	18.5
21.	ผักชี <i>Coriandrum sativum</i> Linn.	ผล	สีน้ำตาลเข้ม	2.0	สีน้ำตาลเข้ม	4.0
22.	ฝรั่ง <i>Psidium guajava</i>	ใบ	สีเขียวเข้ม	2.8	สีเขียวเข้ม	8.0
23.	พญาสัตบรรณ <i>Alstonia scholaris</i> Linn.R.br.	เนื้อไม้	สีน้ำตาลเข้ม	1.3	สีน้ำตาลเข้ม	NC
24.	พริกไทยดำ <i>Piper nigrum</i> Linn.	ผล	ND	ND	สีเหลืองเข้ม	4.2
25.	พลู <i>Piper betle</i>	ใบ	ND	ND	สีเขียวเข้ม	12.4
26.	พิลังกาสง <i>Ardisia colorata</i> Roxb.	ผล	สีน้ำตาลเข้ม	5.1	สีน้ำตาลเข้ม	4.4
27.	ฟ้าทะลายโจร <i>Andrographis paniculata</i> Wall.ExNees	ใบ	ND	ND	สีน้ำตาลเข้ม	NC
28.	มะขาม <i>Tamarindus indica</i> Linn	ใบ	สีน้ำตาลเข้ม	37.1	สีน้ำตาลเข้ม	4.8
29.	มะระ <i>Momordica charantia</i> Linn.	เถา	สีน้ำตาลเข้ม	10.6	สีน้ำตาลเข้ม	3.0
30.	มังคุด <i>Garcinia mangostana</i> Linn.	เปลือกผล	ND	ND	สีน้ำตาลเข้ม	5.3
31.	โมกมัน <i>Wrightia tomentosa</i>	ลำต้น	ND	ND	สีน้ำตาลเข้ม	3.9
32.	โมกหลวง <i>Holarrhena antidysenterica</i> Wall.	เปลือกต้น	สีน้ำตาลเข้ม	2.6	สีน้ำตาลเข้ม	2.1
33.	ราชดำ <i>Brucea javanica</i> Merr.	เมล็ด	สีน้ำตาลเข้ม	6.8	สีน้ำตาลเข้ม	6.8
34.	สมอไทย <i>Terminalia chebula</i> Retz	ผล	สีน้ำตาลเข้ม	8.0	สีน้ำตาลเข้ม	8.2
35.	สีเสียดเทศ <i>Uncaria gambir</i> Hunter Roxb.	ใบ กิ่ง	สีน้ำตาลเข้ม	65.4	สีน้ำตาลเข้ม	65.4
36.	สีเสียดเหนือ <i>Acacia catechu</i> Willd.	แก่น	สีน้ำตาลเข้ม	6.0	สีน้ำตาลเข้ม	5.6
37.	เสียด <i>Adhatoda vasica</i>	ใบ	ND	ND	สีเขียวเข้ม	NC
38.	หนาด <i>Bhumea balsamifera</i> DC.	ใบ	ND	ND	สีเขียวเข้ม	8.9

NC = Not calculated

ND = Not done

2. ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านแบคทีเรียมาตรฐานโดยวิธี Disc Diffusion

การทดสอบความไวต่อยาต้านแบคทีเรียมาตรฐานได้ผลดังตารางที่ 4 พบว่า *E. coli* ATCC 25922 จะไวต่อยาทุกชนิดที่ทดสอบได้แก่ amikacin, ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, gentamicin, kanamycin, norfloxacin และ tetracycline EPEC จะไวต่อยา amikacin, ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, gentamicin, kanamycin และ norfloxacin แต่คือยา tetracycline ส่วนเชื้อในกลุ่ม EHEC ทั้ง 6 สายพันธุ์จะไวต่อยาเหมือนกันทั้งหมด 5 ชนิด คือ amikacin, cephalothin, chloramphenicol, gentamicin, และ norfloxacin แต่จะแตกต่างกัน คือ EHEC O157:H7 RIMD 0509952 ไวต่อยา kanamycin และ tetracycline ไวปานกลางต่อ ampicillin EHEC O157:H7 RIMD 05091078 จะไวต่อยา 3 ชนิด คือ ampicillin, kanamycin และ tetracycline EHEC O157:H7 RIMD 05091083 ไวต่อยา 2 ชนิด คือ ampicillin และ kanamycin แต่คือยา tetracycline EHEC O26:H11 RIMD 05091055 จะไวต่อยา 2 ชนิด คือ kanamycin และ tetracycline แต่คือยา ampicillin EHEC O11:NM RIMD 05091056 จะคือต่อยา 3 ชนิด คือ ampicillin, kanamycin และ tetracycline ส่วน EHEC O22 RIMD 05091556 จะไวต่อยา kanamycin และ tetracycline แต่จะไวปานกลางต่อยา ampicillin

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดจากสมุนไพรโดยวิธี Disc Diffusion

3.1 สารสกัดหยาบด้วยน้ำ

สารสกัดหยาบด้วยน้ำ 18 ชนิด ได้แก่ กระเทียม ขุมเห็ดเทศ เถาวัลย์เปรียง ทับทิม นนทรี เนระพูสี บัวบก เบญจกานี ผักชีฝรั่ง พญาสัตบรรณ พิลังกาสา มะขาม มะระ ราชดัด สมอไทย สีเสียดเทศและสีเสียดเหนือ เมื่อนำแผ่น disc ที่มีสารสกัดที่ละลายในน้ำกลั่นความเข้มข้น 5 mg/disc ทั้งแบบแผ่นเปียกและแผ่นแห้งมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ผลดังตารางที่ 5 พบว่า สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ EHEC ได้ทั้ง 6 สายพันธุ์มี 5 ชนิด ได้แก่ ทับทิม นนทรี เบญจกานี ฝรั่งและสีเสียดเหนือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดจากแผ่นเปียกมีค่าอยู่ในช่วง 7-11 mm ซึ่งมีขนาดเท่ากับ inhibition zone ที่เกิดจากแผ่นแห้งซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง

7-11 mm เช่นกัน สารสกัดที่ยับยั้ง EPEC ได้มี 6 ชนิด ได้แก่ ทับทิม นนทรี เบญจกานี ฝรั่ง สีสีเสียดเทศและสีเสียดเหนือ สำหรับ *E. coli* ATCC 25922 พบว่า ไม่มีสารสกัดหยาบด้วยน้ำชนิดใดที่สามารถยับยั้งได้เลย ส่วน control disc ซึ่งบรรจุตัวทำละลาย คือ น้ำกลั่นแบบแผ่นเปียกและแผ่นแห้งไม่ทำให้เกิด inhibition zone

3.2 สารสกัดหยาบด้วยเอทานอล

สารสกัดหยาบรวม 38 ชนิด ซึ่งสกัดโดยใช้เอทานอล ได้แก่ กระจ่าง กระชวย กระท้อน ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ขลุ่ ขี้ไต้ย คนทีสอ จันทน์แดง ชะพลู ชา ชุมเห็ดเทศ คีปลี เถวัลย์เปรียง ทับทิม เทียนบ้าน นนทรี น้ำมันราชสีห์เล็ก เนระพูสี บัวบก เบญจกานี ผักชี ฝรั่ง พญาสัตบรรณ พริกไทยอ่อน พลู พิลังกาสา ฟ้าทะลายโจร มะขาม มะระ มังคุด โมกมัน โมกหลวง ราชคัค สมอไทย สีสีเสียดเทศ สีสีเสียดเหนือ เสนียดและหนาด เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion โดยนำแผ่น disc ที่มีสารสกัดที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 5 mg/disc ทั้งแบบแผ่นเปียกและแผ่นแห้ง มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ผลดังตารางที่ 5 พบว่า สารสกัดส่วนใหญ่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ EHEC ได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ มี 8 ชนิด ได้แก่ ขี้ไต้ย ทับทิม นนทรี เบญจกานี ฝรั่ง โมกหลวง สีสีเสียดเทศและสีเสียดเหนือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดจากแผ่นเปียกมีค่าอยู่ในช่วง 7-12 mm มีขนาดใกล้เคียงกับ inhibition zone ที่เกิดจากแผ่นแห้งซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 7-15 mm สารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ได้มี 5 ชนิด ได้แก่ เบญจกานี ฝรั่ง โมกหลวง สีสีเสียดเทศและสีเสียดเหนือ สารสกัดส่วนใหญ่แสดงฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบบแผ่นเปียกและแผ่นแห้ง มีเพียงฝรั่งแบบแผ่นเปียกเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ ยกเว้นต่อเชื้อ EPEC ที่ฝรั่งทั้งแผ่นเปียกและแผ่นแห้งสามารถยับยั้งเชื้อได้ ส่วนสารสกัดอื่นที่ยับยั้ง EPEC ได้นั้น ได้แก่ ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ขี้ไต้ย จันทน์แดง ทับทิม เทียนบ้าน นนทรี เบญจกานี ฝรั่ง มังคุด โมกหลวง สีสีเสียดเทศ สีสีเสียดเหนือและขลุ่ ซึ่งสารสกัดขลุ่จะยับยั้งเชื้อได้เมื่อใช้แผ่นเปียกเท่านั้น ส่วน control disc ที่บรรจุตัวทำละลาย DMSO ทั้งแบบแผ่นเปียกและแผ่นแห้งไม่ทำให้เกิด inhibition zone

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความไวของ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ ต่อยาต้านแบคทีเรียมาตรฐานโดยวิธี Disc Diffusion

ขนาดจาน	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)										
	O157:H7 0509952	O157:H7 05091078	O157:H7 05091083	O26:H11 05091055	O111:NM 05091056	O22 05091556	EC 25922	EPEC			
amikacin (30 µg)	22.40 S	21.70 S	22.65 S	22.25 S	22.90 S	21.35 S	23.15 S	23.00 S			
ampicillin (10 µg)	13.05 I	15.50 S	14.95 S	9.90 R	0 R	13.90 I	17.35 S	16.65 S			
cephalothin (30 µg)	22.90 S	22.20 S	21.00 S	19.85 S	18.75 S	19.60 S	19.60 S	35.40 S			
chloramphenicol (30 µg)	22.00 S	21.45 S	22.45 S	23.10 S	23.85 S	24.85 S	23.85 S	25.20 S			
gentamicin (10 µg)	22.80 S	22.40 S	22.05 S	21.75 S	22.45 S	23.00 S	23.05 S	27.25 S			
kanamycin (10 µg)	22.00 S	21.85 S	22.70 S	21.30 S	0 R	22.70 S	21.75 S	23.45 S			
merfloxacin (10 µg)	26.60 S	26.75 S	36.85 S	38.45 S	32.95 S	31.10 S	31.95 S	25.15 S			
tetracycline (30 µg)	22.50 S	21.15 S	0 R	21.85 S	0 R	21.40 S	22.60 S	8.45 R			

S = susceptible (ไวต่อยา)

I = intermediate susceptible (ไวปานกลาง)

R = resistant (ดื้อยา)

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับ	สารพิษ (5 mg/disc)	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)																			
		O157:H7 0509952		O157:H7 05091078		O157:H7 05091083		O26:H11 05091055		O111:NM 05091056		O22 05091556		EC ATCC 25922		EPEC					
		H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH				
11.	ซมเบ็ดขม	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
12.	คิงกี	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-		
13.	แกว้คัสโรว์	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
14.	ก้านตะ	7	8	7	8	7	7	8	8	7	7	8	8	7	8	7	8	7	8		
15.	ถั่วคั่ว	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-		
16.	เบอรี่	8	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
17.	น้ำมะขามเทศ	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-		
18.	เบอรี่สี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
19.	ข้าว	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-		
20.	เบอรี่	10	11	10	12	11	12	10	11	11	12	10	11	12	10	12	10	12	10		
21.	คิงกี	8	11	9	12	8	14	9	12	9	15	8	11	16	19	19	19	19	19		

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับ	สมุนไพร (5 mg/disc)	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)																	
		O157:H7 0509952		O157:H7 05091078		O157:H7 05091083		O26:H11 05091055		O111:NM 05091056		O22 05091556		EC ATCC 25922		EPEC			
		H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH		
33.	วอลคัต	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
34.	สมอไทย	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
35.	ถั่วลิสงคอก	-	7	-	8	-	7	-	8	-	9	-	8	-	7	11	15	15	
36.	ถั่วลิสงคอกแห้ง	9	8	10	9	10	9	10	10	10	11	10	11	10	10	ND	10	29	31
37.	สะบือต	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
38.	ใบเตย	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
	H ₂ O/DMSO control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* = disc ปรากฏผล

- = disc ปรากฏผล

- = no inhibition zone

ND = not done

4. ผลการทดสอบหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) โดยวิธี Agar Dilution

4.1 ยาด้านแบคทีเรีย

ยาด้านแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อแบคทีเรียมี 3 ชนิด ได้แก่ ampicillin, ciprofloxacin และ gentamicin โดยเชื้อ EPEC ทดสอบกับยา ciprofloxacin เชื้อ EHEC 6 สายพันธุ์ทดสอบกับยา ciprofloxacin และ gentamicin เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ EHEC O157:H7 RIMD 0509952 ทดสอบกับยา ampicillin ได้ผลดังตารางที่ 6 พบว่า EHEC O157:H7 RIMD 0509952 ไวต่อยา ampicillin, ciprofloxacin และ gentamicin เชื้อ EHEC อีก 5 สายพันธุ์ไวต่อยา ciprofloxacin และ gentamicin ส่วนเชื้อ EPEC และ *E. coli* ATCC 25922 จะไวต่อยา ciprofloxacin และ ampicillin ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ค่า MIC ของยาด้านแบคทีเรียต่อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ โดยวิธี Agar Dilution

ยาด้านแบคทีเรีย	MIC (µg/ml)							
	O157:H7 0509952	O157:H7 05091078	O157:H7 05091083	O26:H11 05091055	O111:NM 05091056	O22 05091556	EPEC	EC
ampicillin	6.25 S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.25 S
ciprofloxacin	0.016 S	0.016 S	0.016 S	0.016 S	0.016 S	0.016 S	0.031 S	ND
gentamicin	0.25 S	0.25 S	0.25 S	0.25 S	0.25 S	0.25 S	ND	ND

ND = not done

S = susceptible (ไวต่อยา)

I = intermediate susceptible (ไวปานกลาง).

R = resistant (ดื้อยา)

4.2 สารสกัดหยาบจากสมุนไพรด้วยน้ำ

นำสารสกัดหยาบด้วยน้ำที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดวงใสเมื่อทดสอบโดยวิธี disc diffusion มาหาค่า MIC และ MBC โดยวิธี agar dilution พบว่า สารสกัดหยาบด้วยน้ำของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ทับทิม นนทรี เบญจกานี ฝรั่งและสี่เสียดเหนือ สามารถยับยั้ง EHEC ทั้ง 6 สายพันธุ์ และ EPEC ได้ โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.01-1.56 และ 0.39-3.12 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

4.3 สารสกัดหยาบจากสมุนไพรด้วยเอทานอล

นำสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดวงใสเมื่อทดสอบโดยวิธี disc diffusion มาหาค่า MIC และ MBC โดยวิธี agar dilution พบว่า สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของสมุนไพรทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ ขี้ไต้ ทับทิม นนทรี เบญจกานี ฝรั่ง โมกหลวง สี่เสียดเทศและสี่เสียดเหนือ สามารถยับยั้ง EHEC ทั้ง 6 สายพันธุ์ และ EPEC ได้ โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.04-12.5 และ 0.39->25 mg/ml ตามลำดับ *E. coli* ATCC 25922 ถูกยับยั้งได้ด้วยสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ขี้ไต้ เบญจกานี โมกหลวง สี่เสียดเทศและสี่เสียดเหนือ โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.02-3.12 และ 0.39->25 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

4.4 สารสกัดแยกส่วนจากเบญจกานีด้วยเอทานอล

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเบญจกานีด้วยเอทานอลที่มีค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 mg/ml และมีฤทธิ์ต้าน *E.coli* ทุกสายพันธุ์มาสกัดสารสกัดแยกส่วนโดยวิธี preparative TLC สามารถสกัดสารสกัดแยกส่วนได้ 6 fractions แต่สารเฉพาะ fraction ที่มีสารปริมาณมาก คือ fraction A, fraction B และ fraction C มาทดสอบหาค่า MIC และ MBC โดยวิธี agar dilution ทำการเจือจางสารแบบลำดับสองให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.38-780 µg/ml ได้ผลดังตารางที่ 8 พบว่า สารสกัดแยกส่วนทั้ง 3 fractions สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ EHEC O157:H7 RIMD 0509952, EHEC O157:H7 RIMD 05091078, EHEC O157:H7 RIMD 05091083, EHEC O26:H11 RIMD 05091055, EHEC O111:NM RIMD 05091056 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ ซึ่งมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 1.5-100 และ >780 µg/ml ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดขยายจากสมุนไพรด้วยน้ำและเอทานอลต่อ *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยวิธี Agar Dilution

ลำดับ	สมุนไพร	ค่า MIC และ MBC (mg/ml)																
		O157:H7 0509052		O157:H7 05091078		O157:H7 05091083		O26:H11 05091055		O111:NM 05091056		O22:05091556		EPEC		EC ATCC 25922		
		H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	
1.	ขี้ด้าย	ND	0.19	ND	1.56	ND	0.19	ND	0.39	ND	0.19	ND	0.39	ND	0.78	ND	0.78	3.12
2.	ทับทิม	0.19	0.39	ND	12.5	ND	0.39	0.78	12.5	ND	0.39	0.78	12.5	ND	0.39	0.02	0.78	>25
3.	ใบหรี	0.19	3.12	0.19	3.12	0.19	3.12	0.39	6.25	0.19	3.12	0.19	3.12	0.19	3.12	0.39	0.04	ND
4.	ปอญกานี	0.09	>25	0.09	>25	0.09	>25	0.09	>25	0.09	>25	0.09	>25	0.09	>25	0.01	3.12	ND
5.	ฝรั่ง	0.78	0.78	0.78	0.78	3.12	0.78	1.56	0.78	0.78	1.56	1.56	0.78	1.56	0.39	0.39	0.39	0.39
6.	ใบกาดวง	ND	1.56	ND	3.12	ND	3.12	ND	3.12	ND	3.12	ND	3.12	ND	0.09	1.56	1.56	ND
7.	ลิเลียดเทศ	ND	1.56	ND	6.25	ND	1.56	ND	6.25	ND	1.56	ND	6.25	ND	0.09	1.56	1.56	0.02
8.	สีเสียดใบโต	0.19	0.19	0.78	0.39	0.19	0.19	0.78	0.39	0.19	0.19	0.19	0.39	0.19	1.56	1.56	0.39	0.09
		3.12	1.56	3.12	1.56	3.12	1.56	3.12	1.56	3.12	1.56	3.12	1.56	3.12	0.78	1.56	0.78	1.56

* = MIC

† = MBC

ND = ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากไม่ทำให้เกิด inhibition zone เมื่อทดสอบโดยวิธี disc diffusion

สารสกัดแยกส่วน fraction A มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด คือ ให้ค่า MIC ต่ำสุด รองลงมา คือ สารสกัดแยกส่วน fraction B และ fraction C ตามลำดับ โดยเชื้อสายพันธุ์ที่มีความไวต่อสารสกัดแยกส่วนทั้ง 3 fractions มากที่สุด คือ EHEC O157:H7 RIMD 05091083 ให้ผลเช่นเดียวกับ *E. coli* ATCC 25922 ที่เป็นเชื้อควบคุม

ตารางที่ 8 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดแยกส่วนจากเบญจกานีด้วยเอทานอลต่อ *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยวิธี Agar Dilution

สารสกัดแยกส่วน	MIC และ MBC (µg/ml)					
	O157:H7 0509952	O157:H7 05091078	O157:H7 05091083	O26:H11 05091055	O111:NM 05091056	EC 25922
fraction A	100* >780 [†]	50 >780	1.5 >780	50 >780	50 >780	1.5 >780
fraction B	100 >780	100 >780	6 >780	100 >780	100 >780	6 >780
fraction C	100 >780	100 >780	12 >780	100 >780	100 >780	12 >780

* = MIC

[†] = MBC

5. ผลการวิเคราะห์ระดับของ Verocytotoxin โดยวิธี Reversed-Passive Latex Agglutination (RPLA) Assay

5.1 ผลการทดสอบค่า VT titer ของเชื้อ EHEC O157:H7 RIMD 0509952

เชื้อ EHEC O157:H7 RIMD 0509952 เมื่อนำมาทดสอบหาค่า VT titer ทั้ง 2 ชนิด คือ VT 1 titer และ VT 2 titer โดยใช้ RPLA test kit พบว่า เชื้อมีค่า VT 1 titer เท่ากับ 1:32 และ VT 2 titer เท่ากับ 1:4 (ตารางที่ 9)

5.2 ผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรต่อค่า VT titer ของเชื้อ EHEC O157:H7 RIMD 0509952

นำสารสกัดสมุนไพรชนิดที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเมื่อทดสอบโดยวิธี agar dilution ที่มีค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 mg/ml มาทดสอบผลต่อค่า VT titer ของเชื้อ EHEC โดยวิธี RPLA assay ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 10 MIC, MIC และ 1/10 MIC ได้ผลดังตารางที่ 9 พบว่า สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีที่สุดทั้ง 2 ชนิด ที่นำมาทดสอบ คือ ทับทิมและเบญจกานีทั้งสกัดด้วยน้ำและเอทานอลมีผลต่อการผลิต VT ของเชื้อ EHEC โดยค่า VT 1 titer ของทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1:8-1:32 สำหรับ VT 2 titer มีค่าน้อยกว่า 1:2 ทุกระดับความเข้มข้น

สารสกัดหยาบจากทับทิมที่สกัดด้วยน้ำที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10 MIC และ MIC จะให้ค่า VT 1 titer เท่ากับ 1:8 และ 1:16 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าทับทิมที่สกัดด้วยเอทานอล (1:16 และ 1:32 ตามลำดับ) แต่ VT 1 titer ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1/10 MIC จะมีค่าเท่ากัน คือ 1:32 และเท่ากับ control ที่ไม่มีสารสกัดด้วย ส่วนสารสกัดหยาบจากเบญจกานีที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลจะมีค่า VT 1 titer เท่ากัน ทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัด โดยมีค่า VT 1 titer เท่ากับ 1:16 และ VT 2 titer มีค่าน้อยกว่า 1:2 ทุกระดับความเข้มข้น

ตารางที่ 9 ผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรต่อค่า VT titer ของ EHEC O157:H7 RIMD 0509952

สมุนไพร		ระดับความเข้มข้น	VT titer	
			VT 1 titer	VT 2 titer
ทับทิม	สกัดด้วยน้ำ	1/10 MIC	1:32	<1:2
		MIC	1:16	<1:2
		10MIC	1:8	<1:2
	สกัดด้วยเอทานอล	1/10 MIC	1:32	<1:2
		MIC	1:32	<1:2
		10MIC	1:16	<1:2
เบญจกานี	สกัดด้วยน้ำ	1/10 MIC	1:16	<1:2
		MIC	1:16	<1:2
		10MIC	1:16	<1:2
	สกัดด้วยเอทานอล	1/10 MIC	1:16	<1:2
		MIC	1:16	<1:2
		10MIC	1:16	<1:2
EHEC O157:H7 0509952			1:32	1:4

5.3 ผลของสารสกัดแยกส่วนจากเบญจกานีที่สกัดด้วยเอทานอลต่อค่า VT titer ของเชื้อ EHEC O157:H7 RIMD 0509952

สารสกัดหยาบจากเบญจกานีด้วยเอทานอลที่มีค่า VT titer ต่ำที่สุดนำมาสกัดให้ได้สารสกัดแยกส่วนโดยวิธี preparative TLC สามารถสกัดสารสกัดแยกส่วนได้ 6 fractions และนำเฉพาะสารใน fraction ที่มีปริมาณมาก คือ fraction A, fraction B และ fraction C มาทดสอบหาค่า VT titer ของเชื้อ EHEC O157:H7 RIMD 0509952 โดยวิธี RPLA assay ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 10 MIC, MIC และ 1/10 MIC ผลดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1/10 MIC ของสารสกัดแยกส่วนทั้ง 3 fractions เชื้อ EHEC มีค่า VT 1 titer เท่ากับ 1:32 ซึ่งเท่ากับชุดควบคุม แต่ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ MIC มีค่า VT 1 titer น้อยกว่า 1:2 ส่วนที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10 MIC ของสาร fraction A และ fraction B มีค่า VT 1 titer เท่ากับ 1:8 และ 1:16 ตามลำดับ แต่สาร fraction C

มีค่า VT 1 titer น้อยกว่า 1:2 สำหรับ VT 2 titer นั้นมีค่า VT 2 titer น้อยกว่า 1:2 ทุกระดับ ความเข้มข้นของสารสกัดแยกส่วน

ตารางที่ 10 ผลของสารสกัดแยกส่วนจากเบญจกานีด้วยเอทานอลต่อค่า VT titer ของ EHEC O157:H7 RIMD 0509952

สารสกัดบริสุทธิ์	ระดับความเข้มข้น	VT titer	
		VT 1 titer	VT 2 titer
fraction A	1/10 MIC	1:32	<1:2
	MIC	<1:2	<1:2
	10 MIC	1:8	<1:2
fraction B	1/10 MIC	1:32	<1:2
	MIC	<1:2	<1:2
	10 MIC	1:16	<1:2
fraction C	1/10 MIC	1:32	<1:2
	MIC	<1:2	<1:2
	10 MIC	<1:2	<1:2
EHEC O157:H7 0509952		1:32	1:4

6. ผลการทดสอบสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อ Cell Surface Hydrophobicity ของ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ โดยวิธี Salt Aggregation Test

6.1 ค่า SAT titer และ SAT aggregative group ของ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ การทดสอบหาค่า SAT titer ของ *E. coli* แต่ละสายพันธุ์ได้ผลดังตารางที่ 11 (ช่อง C₁₂₀) โดยเชื้อ EHEC O157:H7 RIMD 0509952 มีค่า SAT titer 0.5 M แปลผลได้ว่าเป็นกลุ่ม low aggregative เชื้อ EHEC O157:H7 RIMD 05091078 และ EHEC O22 RIMD 05091556 มีค่า SAT titer 0.75 M แปลผลได้ว่าเป็นกลุ่ม low aggregative เชื้อ EHEC O111:NM RIMD 05091056 มีค่า SAT titer 1.5 M แปลผลได้ว่าเป็นกลุ่ม low aggregative เชื้อ EHEC O157:H7 RIMD 05091083 และ EHEC O26:H11 RIMD 05091055 มีค่า SAT titer มากกว่า 1.5 M แปลผลได้ว่า

เป็นกลุ่ม nonaggregative และเชื้อ EPEC มีค่า SAT titer 0.05 M แปลผลได้ว่าเป็นกลุ่ม high aggregative

สำหรับเชื้อควบคุม คือ *E. coli* ATCC 25922 มีค่า SAT titer 0.05 M จัดเป็น high aggregative

6.2 ผลของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรต่อค่า SAT titer และ SAT aggregative group ของ *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ

ในการทดสอบของสารสกัดหยาบสมุนไพร 8 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เมื่อทดสอบโดยวิธี agar dilution ต่อค่า SAT titer ของแบคทีเรีย ซึ่งผลการทดสอบที่ความเข้มข้นเท่ากับ MIC และ 1/2 MIC โดยสมุนไพร 8 ชนิดที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ขี้ไต้ ทับทิม นนทรี เบญจกานี ฝรั่ง โมกหลวง สีเสียดเทศและสีเสียดเหนือทั้งสกัดด้วยน้ำและเอทานอล พบว่า สมุนไพรที่ทดสอบกับแบคทีเรียแล้วมีค่า SAT titer มากกว่า 1.5 M โดยทำให้เกิด nonaggregation ทั้งที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ MIC และ 1/2 MIC โดยเป็นสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำ 4 ชนิด ได้แก่ ทับทิม เบญจกานี ฝรั่ง และสีเสียดเหนือ เป็นสมุนไพรที่สกัดด้วยเอทานอล 7 ชนิด ได้แก่ ขี้ไต้ ทับทิม เบญจกานี ฝรั่ง โมกหลวง สีเสียดเทศและสีเสียดเหนือ (ตารางที่ 11) มีเพียงนนทรีเท่านั้นที่สามารถทำให้เชื้อเกิด aggregation ผลดังแสดงในตารางที่ 12

เมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบนนทรีด้วยน้ำ ซึ่งใช้น้ำเป็นตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ MIC และ 1/2 MIC ของเชื้อ EHEC ทั้ง 6 สายพันธุ์ รวมทั้ง EPEC และ *E. coli* ATCC 25922 ให้ผลเหมือนกัน คือ เชื้อมีค่า SAT titer มากกว่า 1.5 M แปลผลได้ว่าทำให้เกิด nonaggregation (ตารางที่ 12 ช่อง H₂O) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในน้ำกลั่น (ตารางที่ 12 ช่อง C_{H2O} และตาราง ค ภาคผนวก) พบว่า มีเชื้อ EHEC 2 สายพันธุ์ (O157:H7 RIMD 05091083 และ O26:H11 RIMD 05091055) ที่ยังคงมี SAT aggregative group คงเดิม อีก 4 สายพันธุ์มีค่า SAT titer เปลี่ยนแปลงทำให้ SAT aggregative group เปลี่ยนแปลงด้วย ได้แก่ EHEC O157:H7 RIMD 0509952, EHEC O157:H7 RIMD 05091078, EHEC O111:NM RIMD 05091056 และ EHEC O22 RIMD 05091556 เปลี่ยนจาก low aggregative เป็น nonaggregative ซึ่งเป็นการลด hydrophobicity สำหรับ EPEC และ *E. coli* ATCC

25922 พบว่า สารสกัดหยาบนนทรีด้วยน้ำทำให้เปลี่ยนจากเดิมที่เป็น high aggregative มาเป็น nonaggregative ซึ่งเป็นการลด hydrophobicity ผลการทดสอบนี้เป็นไปในทำนองเดียวกันกับสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำทุกตัวที่นำมาทดสอบ

เมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบนนทรีด้วยเอทานอล ซึ่งใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย จึงทดสอบผลของ DMSO ต่อค่า SAT titer ด้วยพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ MIC และ 1/2 MIC เชื้อ EHEC ทั้ง 6 สายพันธุ์ รวมทั้ง EPEC และ *E. coli* ATCC 25922 ให้ผลเหมือนกัน คือ เชื้อมีค่า SAT titer มากกว่า 1.5 M แปรผลได้ว่าเกิด nonaggregation (ตารางที่ 12 ช่อง C_{DMSO}) แสดงว่า DMSO มีผลทำให้ cell surface hydrophobicity ของเชื้อส่วนใหญ่ลดลง ดังนั้นในการทดสอบผลของสารสกัดหยาบ นนทรีด้วยเอทานอลจึงเปรียบเทียบค่า SAT titer กับชุดควบคุม DMSO พบว่า ที่ระดับ ความเข้มข้นเท่ากับ MIC สารสกัดหยาบนนทรีด้วยเอทานอลมีแนวโน้มทำให้ hydrophobicity ของเชื้อเพิ่มขึ้น โดยที่ EHEC ทั้ง 6 สายพันธุ์มีค่า SAT titer เปลี่ยนแปลง ทำให้ SAT aggregative group เปลี่ยนแปลงด้วย ซึ่งเชื้อ EHEC 5 สาย พันธุ์เปลี่ยนจาก nonaggregative เป็น high aggregative และ EHEC อีก 1 สายพันธุ์ คือ EHEC O111 :NM RIMD 05091056 เปลี่ยนจาก nonaggregative เป็น low aggregative ซึ่งเป็นการเพิ่ม hydrophobicity (ตารางที่ 12 และตาราง จ ภาคผนวก) ส่วนเชื้อ EPEC และ *E. coli* ATCC 25922 ยังคงมี SAT aggregative group คงเดิม คือ nonaggregative

สำหรับการทดสอบที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1/2 MIC นั้น พบว่า สารสกัดนนทรี ด้วยเอทานอลมีแนวโน้มทำให้ hydrophobicity ของเชื้อ EHEC เพิ่มขึ้นเช่นกัน ยกเว้น EHEC 1 สายพันธุ์ คือ EHEC O157:H7 RIMD 0509952 มี SAT aggregative group คงเดิม ในทำนองเดียวกันกับเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ EPEC ที่ยังคงมี SAT aggregative group คงเดิม

ตารางที่ II SAT titer และ SAT aggregative group ของ *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ และผลของสารสกัดหยาบสมุนไพรด้วยน้ำ 4 ชนิดและเอทานอล 7 ชนิดต่อค่า SAT titer และ SAT aggregative group ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ MIC และ 1/2 MIC

แบคทีเรีย	ระดับความเข้มข้นเท่ากับ MIC						ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1/2 MIC					
	SAT titer			SAT aggregative group			SAT titer			SAT aggregative group		
	C _{TITER}	H ₂ O	C _{DMSO}	EtOH	C _{TITER}	H ₂ O	C _{DMSO}	EtOH	C _{TITER}	H ₂ O	C _{DMSO}	EtOH
EHEC O157:H7 0509052	0.5				I				0.5			
EHEC O157:H7 05091078	0.75							0.75				
EHEC O157:H7 05091083	>1.5				N			>1.5				
EHEC O26:H11 05091055		>1.5		>1.5	N							
EHEC O111:NM 05091056	1.5				L			1.5				N
EHEC O22 05091556	0.75							0.75				L
EPEC	0.05							0.05				II
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.25				II			0.25				

A = autoaggregation (เกิดการเกาะกลุ่มในทงคุม control, SAT titer = 0 M),

II = high aggregative (มี SAT titer 0.05-0.25 M),

I = low aggregative (มี SAT titer 0.5-1.5 M),

N = nonaggregative (ไม่เกิดการเกาะกลุ่มที่ (NH₄)₂SO₄ 1.5 M, SAT titer >1.5 M)

H₂O = สารสกัดหยาบสมุนไพรด้วยน้ำ 4 ชนิด ได้แก่ ทับทิม ทับทิม ทับทิม ฝรั่งและพืชชนิดเหนือ

C_{TITER} = ชุดความเข้มข้นเท่ากัน

EtOH = สารสกัดหยาบสมุนไพรด้วยเอทานอล 7 ชนิด ได้แก่ ทับทิม ทับทิม ทับทิม ฝรั่ง ใบกวาง มีสีดอกและสีเปลือกถั่ว

C_{DMSO} = ชุดควบคุม DMSO

ตารางที่ 12 ผลของสารสกัดขบวนการหมักด้วยน้ำและเอทานอลต่อค่า SAT titer และ SAT aggregative group ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ MIC และ 1/2 MIC

แบคทีเรีย	ระดับความเข้มข้นเท่ากับ MIC						ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1/2 MIC							
	SAT titer			SAT aggregative group			SAT titer			SAT aggregative group				
	H ₂ O	C _{DMSO}	EtOH	H ₂ O	C _{DMSO}	EtOH	H ₂ O	C _{DMSO}	EtOH	C ₁₂₀	H ₂ O	C _{DMSO}	EtOH	
EHEC O157:H7 0509952	0.5		0.05					0.5						
	0.75		0.25					0.75		L				
EHEC O157:H7 05091078						II								
	>1.5		0.05					>1.5		N				
EHEC O26:H11 05091055														
	1.5		0.5			L		1.5						
EHEC O22:05091556	0.75		0.05					0.75		L				
	0.05		>1.5			II		0.05						
E. coli ATCC 25922	0.25		>1.5			N		0.25						

A = autoaggregation (เกิดการเกาะกลุ่มในควบคุม control, SAT titer = 0 M),

II = high aggregative (มี SAT titer 0.05-0.25 M),

L = low aggregative (มี SAT titer 0.5-1.5 M),

N = nonaggregative (ไม่เกิดการเกาะกลุ่มที่ (NH₄)₂SO₄ 1.5 M, SAT titer >1.5 M)

H₂O = สารสกัดขบวนการหมักด้วยน้ำ

C_{DMSO} = ชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่น

EtOH = สารสกัดขบวนการหมักด้วยเอทานอล

C₁₂₀ = ชุดควบคุม DMSO