



ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและสารพฤกษเคมีของตำรับยาไทยพื้นบ้าน: ยาราชบุรุษ และยาเหลืองปิดสมุทร

Antibacterial Activities and Phytochemical of Traditional Thai Medicines: Ya That Bun Job and Ya Learng Pid Samud Formula

เขมิกา เคียงณฟ้า มานอก^{1*} ชารินันท์ แจงกลาง² กรรณิการ์ ขนานไต้³ และ มลิวรรณ เพียรจริง⁴

Khemika Kieng Na Fah Manok^{1*}, Charinan Jaengklang², Kannika Kanantai³ and
Maliwan Phianchring⁴

¹สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร 10600

²สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร 10600

³S&V Herbal Clinic เวชพงศ์โอสด กรุงเทพมหานคร 10160

⁴สบายใจ (สาขาโลตัสบางใหญ่ ชั้น 1) จังหวัดนนทบุรี 11130

¹Thai Traditional Pharmacy program, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok, 10600, Thailand

²Thai Traditional Medicine program, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok, 10600, Thailand

³S&V Herbal Clinic Vejpong-Osoth, Bangkok, 10160, Thailand

⁴Sabuyjai (Lotus Bangyai, 1st Floor), Nonthaburi, 11130, Thailand

บทคัดย่อ

ยาราชบุรุษและยาเหลืองปิดสมุทรเป็นตำรับยาไทยแผนโบราณที่ปรากฏในบัญชียาหลักแห่งชาติ (NLEM) มีการใช้รักษาอาการโรคท้องเสียแบบที่ไม่ติดเชื้อ ในงานวิจัยนี้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยใช้วิธี Disc diffusion method หาคความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ผ่านวิธี Broth microdilution method นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และสารแทนนินทั้งหมด โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี การสกัดสารในยาจากตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ น้ำกระสายยาจากเปลือกผลทับทิม และ 95% เอทานอล พบว่าสารสกัดเอทานอลจากยาเหลืองปิดสมุทรและสารสกัดน้ำกระสายยาจากยาราชบุรุษ แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสูงที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 3.91 - 31.25 และ 15.62 - 31.25 mg/ml ต่อเชื้อ *E. coli* ทุกสายพันธุ์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารสกัดเอทานอลจากยาราชบุรุษมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียสูงสุดต่อเชื้อ Enterococcal *E. coli* DMST 26453 (EAE) โดยมีค่า MBC เท่ากับ 31.25 mg/ml ในส่วนของการทดสอบสารพฤกษเคมี สารสกัดเอทานอลจากยาเหลืองปิดสมุทร แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่ 294.43 ± 1.77 mg GAE/mg และปริมาณแทนนินทั้งหมดสูงที่ 159.79 ± 7.29 mg TAE/mg ในขณะที่สารสกัดน้ำกระสายยาของยาราชบุรุษ แสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงเท่ากับ 13.43 ± 0.14 mg QE/mg และแทนนินทั้งหมดสูงที่ 182.52 ± 39.32 mg TAE/mg

*Corresponding Author, E-mail: suchada.ma@bsru.ac.th

ดังนั้นยาธาตุบรรจบและยาเหลืองปิดสมุทรสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้บางชนิดในตระกูล *E. coli* ที่ก่อโรคท้องเสียได้ ข้อมูลเหล่านี้สนับสนุนภูมิปัญญาการรักษาทางการแพทย์แผนไทย ซึ่งรักษาโรคท้องเสียโดยใช้สมุนไพรที่มีความเป็นกรดและมีรสฝาด ช่วยลดการหลั่งน้ำในท่อทางเดินอาหารซึ่งอาจมีการศึกษาทางพรีคลินิกต่อไปในอนาคต

ABSTRACT

Ya That Bun Job and Ya Learng Pid Samud formula are traditional Thai medicines listed in the National List of Essential Medicine (NLEM). They are used to treat the non-infection diarrhea in Thai folk medicine. In this research, we investigated their anti-bacterial activities using disc diffusion method and determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) through the broth microdilution method. Additionally, we compared the total phenolic, total flavonoid and total tannin using spectroscopies technique. Extraction was preformed with three solvents: water, kasaiya water from pomegranate peel and 95% ethanol. The results indicated that the ethanol extract from Ya Learng Pid Samud and the kasaiya water extract of Ya That Bun Job exhibited the highest anti-bacterial activities, with MIC values of 3.91 to 31.25 and 15.62 to 31.25 mg/ml against all *E. coli* strains, respectively. However, the ethanol extract from Ya That Bun Job showed the highest kill bactericidal activities, with MBC values of 31.25 mg/ml against Enterotoxigenic *E. coli* DMST 26453 (EAEC). In terms of phytochemical analysis, The ethanol extract of Ya Learng Pid Samud displayed a high total phenolic content (294.43 ± 1.77 mg GAE/mg) and total tannin content (159.79 ± 7.29 mg TAE/mg), while, kasaiya water extract of Ya That Bun Job showed a high total flavonoid content (13.43 ± 0.14 mg QE/mg) and total tannin content (182.52 ± 39.32 mg TAE/mg). These finding support the potential of Ya That Bun Job and Ya Learng Pid Samud formula to inhibit certain intestinal pathogenic bacteria within the *E. coli* family, Which are known to cause diarrhea. The study highlights the traditional Thai treatment of diarrhea using acidic and astringent herbal ingredients and suggests the need for further preclinical studies to validates these observations.

คำสำคัญ: ยาธาตุบรรจบ ยาเหลืองปิดสมุทร ฤทธิ์ต้านอาการท้องเสีย ท้องเสียแบบติดเชื้อ บัญชียาหลักแห่งชาติ

Keywords: Ya That Bun Job, Ya Learng Pid Samud, Anti-Diarrheal Activity, Infectious Diarrhea, Thailand National List of Essential Medicines

บทนำ

โรคท้องเสีย (Diarrhea) เป็นอีกหนึ่งโรคที่พบได้บ่อยในทุกช่วงอายุ เป็นกลุ่มอาการที่สามารถเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุซึ่งมักมีสาเหตุหลักที่สำคัญมาจากโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบทำให้เกิดอาการท้องเสียขึ้น ปกติอาการท้องเสียจะหายได้เองภายในเวลาไม่กี่วัน แต่ในบางกรณีอาการท้องเสียก็เป็นปัญหานำไปสู่ภาวะการขาดน้ำ (Dehydration) อย่างรุนแรงได้ (Fontaine, 1988; Snyder and Merson, 1982) และจากสถานการณ์ของโรคยังพบว่าการติดเชื้อโรคท้องเสียอย่างเฉียบพลันยังเป็นปัญหาทางด้านสุขภาพที่พบในทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศเขตร้อนและประเทศที่กำลังพัฒนา (Raju *et al.*, 2011) ซึ่งอาการของโรคท้องเสียจะขึ้นอยู่กับความถี่ ปริมาณ และความเหลวของอุจจาระที่เพิ่มขึ้น โดยมีการถ่ายเป็นน้ำมากกว่า 3 ครั้งต่อวัน หรือถ่ายเป็นเมือกมากกว่า 1 ครั้ง ในบางรายอาจมีอาการกระหายน้ำ อ่อนเพลีย มีไข้ ปวดท้อง และคลื่นไส้ร่วมด้วย (Donowitz *et al.*, 1995) ถึงแม้ว่าสาเหตุของโรคท้องเสียจะมีหลายสาเหตุ แต่สาเหตุการตายจากโรคท้องเสียทั่วโลกที่สำคัญนั้นเกิดจากการติดเชื้อจากแบคทีเรียหรือไวรัสในลำไส้ เช่น *Vibrio cholera* *Escherichia coli* ที่ไปกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง

สารพิษบางชนิดขึ้น ในขณะที่อีกจำพวกหนึ่ง เช่น *Shigella* *Salmonella* ไปทำลายเยื่อบุผนังลำไส้ เป็นต้น โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะไปทำให้ลำไส้มีการเคลื่อนไหวมากขึ้น เพิ่มการหลั่งและลดการดูดซึมของน้ำในท่อทางเดินอาหาร ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำและอิเล็กโทรไลต์โดยเฉพาะโซเดียมขึ้น (Ekarattanawong *et al.*, 2018) ซึ่งในปัจจุบันนี้มีการใช้ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) มากมายในการรักษาอาการท้องเสีย แต่ผลของการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานส่งผลต่อการดื้อยาของเชื้อบางชนิดมากขึ้น อีกทั้งยังมีผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์จากยา ดังนั้นการนำสมุนไพรมาใช้รักษาอาการของโรคท้องเสียซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติและมีความปลอดภัยส่งผลข้างเคียงน้อยกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ตัวอย่างพืชและสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคท้องเสียในไทย เช่น ทับทิม ฝรั่ง สีเสียดเหนือ มังคุด กล้วยน้ำว้า ฟ้ายะลวยโจร ยาเหลืองปิดสมุทร ยาธาตุบรรจบ เป็นต้น

ยาเหลืองปิดสมุทรและยาธาตุบรรจบเป็นยาสามัญประจำบ้านที่อยู่ในกลุ่มยาบรรเทาอาการท้องเสียในบัญชียาหลักแห่งชาติ (คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ, 2563) ใช้รักษาโรคท้องเสียชนิดที่ไม่ติดเชื้อ ตามตำราทางการแพทย์แผนไทยยาเหลืองปิดสมุทรประกอบด้วยสมุนไพร 13 ชนิด โดยที่สมุนไพรในตำรับยกเว้นสมุนไพรในวงศ์ *Dipterocarpaceae* และเรซินของ *Laccifera chinensis* Mahdihassan มีฤทธิ์เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารและต้านอาการท้องเสียได้ (Sireeratawong *et al.*, 2012) อีกทั้งองค์ประกอบของสมุนไพรบางชนิดในตำรับมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ด้วย โดยตำรับยาเหลืองปิดสมุทร 33% ประกอบด้วยมันชันเป็นตัวยาคัญหลัก มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Kamala, 2008) เช่นเดียวกับยาธาตุบรรจบที่ประกอบด้วยตัวยา 22 ชนิด ได้แก่ เนื้อมะขามไทยหนัก 16 กรัม โกงกางพร้าวหนัก 8 กรัม เหง้าชิง โกงกางมะม่วง โกงกางปลา โกงกางเชียง โกงกางสอ เทียนดำ เทียนขาว เทียนสัตตบุษย์ เทียนยาวพาดิน เทียนแดง ลูกจันทร์ ดอกจันทร์ ดอกกานพลู เปลือกสมุลแว้ง ลูกกระวาน ลูกผักชีลา ใบพิมเสนต้น ดอกติปิไล หัวเปราะหอม การบูร หนักสิ่งละ 4 กรัม โดยในตำรับ 15% ประกอบด้วยตัวยาเนื้อมะขามไทยเป็นหลัก ซึ่งออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกระเพาะอาหาร (Malekzadeh *et al.*, 2001) และฤทธิ์ควบคุมการเคลื่อนไหวของทางเดินอาหารได้ (Wannasiri *et al.*, 2015) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้จากสารสกัดยาเหลืองปิดสมุทรและยาธาตุบรรจบที่สกัดด้วยวิธีการต้มเดือดแบบโบราณ ตามกรรมวิธีทางการแพทย์แผนไทยเพื่อเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ 5 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) และ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เมื่อใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่างกัน ได้แก่ น้ำ น้ำกระสายยา (เปลือกผลทับทิมแทรก น้ำปูนใส) และ 95% เอทานอล

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างผงยา

ตัวอย่างผงยาธาตุบรรจบและยาเหลืองปิดสมุทรได้รับจากร้านยาแผนโบราณ จังหวัดกรุงเทพฯ ผลิตในช่วงเดือนสิงหาคม - ธันวาคม พ.ศ. 2564

2. การเตรียมสารสกัดน้ำกระสายยาจากเปลือกผลทับทิม

น้ำกระสายยาในที่นี้ ใช้สารสกัดเปลือกผลทับทิมต้มแทรกกับน้ำปูนใส ตามประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2563 โดยหมักปูนแดงกับน้ำเป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำส่วนใสของน้ำปูนมาใช้เป็นตัวทำละลาย ซึ่งผงเปลือกผลทับทิม 100 กรัม เติมน้ำปูนใส 3 ลิตร (สัดส่วนเปลือกผลทับทิม 1 ส่วน ต่อน้ำกระสายยา 30 ส่วน) ต้มเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น กรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบาง นำไปกรองด้วย Buchner funnel โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนใสที่กรองได้ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying technique) นำผงแห้งที่ได้ใส่ภาชนะเก็บที่ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

3. การสกัดตัวอย่างโดยวิธีการต้ม (Decoction)

ซึ่งตัวอย่างผงจากตำรับยาธาตุบรรจบและยาเหลืองปิดสมุทร 50 กรัม นำไปสกัดด้วยวิธีการต้มกับตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ 1) น้ำกลั่น 2) น้ำกระสายยา (ใช้ในปริมาณ 5 กรัม) และ 3) 95% เอทานอล ด้วยอัตราส่วน 1:20 ทำการต้มเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น กรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองด้วย Buchner funnel ใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนใสที่ได้ ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบหมุน และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง นำสารสกัดที่ได้แต่ละชนิดใส่ภาชนะ ซึ่งน้ำหนักและคำนวณร้อยละผลผลิต (% yield) ดังสมการ และเก็บสารสกัดที่ -20 °C เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ลำดับถัดไป โดยก่อนนำไปใช้งานทำการละลายสารสกัดแต่ละชนิดในตัวทำละลาย 50% เอทานอล

$$\text{ร้อยละผลผลิต (\% Yield w/w)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ (g)}}{\text{น้ำหนักของผงแห้งพืชตัวอย่าง (g)}} \times 100$$

4. การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงจาก Sithisarn *et al.* (2015) เตรียมสารละลายตัวอย่าง (stock solution) ที่ความเข้มข้น 500 – 1,000 µg/ml ละลายใน 50% เอทานอล จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง 25 µl ลงใน 96-well plate เติม Folin-Ciocalteu's reagent 25 µl เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 8 นาที นำมาเติมน้ำกลั่น 75 µl และหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 20% Na₂CO₃ ปริมาตร 100 µl ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง คำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วย mg gallic acid equivalent (GAE)/mg dry weight เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ที่ความเข้มข้นในช่วง 5 – 200 µg/ml

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content)

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยวิธี Aluminium chloride ดัดแปลงจาก Chewchinda *et al.* (2019) เตรียมสารละลายตัวอย่าง (stock solution) ที่ความเข้มข้น 1,000 – 10,000 µg/ml ละลายใน 50% เอทานอล จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง 100 µl ลงใน 96-well plate เติม 2% AlCl₃ reagent 100 µl เก็บไว้ในที่มืดในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในหน่วย mg quercetin equivalent (QE)/mg dry weight เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเคอร์เซติน (Quercetin) ที่ความเข้มข้นในช่วง 5 – 55 µg/ml

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารแทนนินทั้งหมด (Total tannin content)

การวิเคราะห์ปริมาณแทนนินทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงจาก Leite and Dourado (2013) และ Slingard and Singlaton (1977) เตรียมสารละลายตัวอย่าง (stock solution) ที่ความเข้มข้น 500 – 1,000 µg/ml ละลายใน 50% เอทานอล นำสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ 1.5 ml มาเติม Polyvinylpyrrolidone (PVPP) 100 mg จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent โดยทำเช่นเดียวกันกับวิธีการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในข้อ 4.1 แล้วคำนวณปริมาณแทนนินทั้งหมดในหน่วย mg tannin acid equivalent (TAE)/mg dry weight เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแทนนิก (Tannic acid) ที่ความเข้มข้นในช่วง 20 – 400 µg/ml

5. การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ (Antibacterial activities)

5.1 แบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ *Escherichia coli* DMST 4212 (*E. coli*) Enteraggregative *E. coli* DMST 26453 (EAEC) Enteroinvasive *E. coli* DMST 30545 (EIEC) Enteropathogenic *E. coli* DMST 20912 (EPEC) และ Enterotoxigenic *E. coli* DMST 20970 (ETEC) ได้รับความอนุเคราะห์และยืนยันสายพันธุ์จากแผนกเก็บเชื้อของสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

5.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดจาก stock ในข้อ 5.1 ประมาณ 4 – 5 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) 2 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเกลี่ยลงบนจาน petri dish ที่มีอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้เชื้อเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเก็บจาน petri dish ที่มีเชื้อดังกล่าวในอุณหภูมิ 15 °C ก่อนนำไปใช้ทดสอบในขั้นตอนถัดไป

5.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดตำรายาสมุนไพรและยาเหลืองปิดสมุทร ด้วยวิธี Disc diffusion method และ Broth microdilution method

5.3.1 Disc diffusion method เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ *E. coli* EAEC EIEC EPEC และ ETEC โดยเกลี่ยเชื้อที่เจริญเติบโตจากในจาน petri dish ที่เตรียมไว้ (ข้อ 5.2) ลงในอาหารเหลว MHB ปริมาตร 10 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้งานนำเชื้อไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 nm ปรับระดับความขุ่นให้มีค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance; OD₆₀₀) เท่ากับ 0.1 (จำนวนเซลล์ 10⁸ CFU/ml) หรือเท่ากับ 0.5 McFarland standard ก่อนใช้ทดสอบ นำจาน petri dish ที่มีอาหารแข็ง MHA มา จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อขูดแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ทำการปรับความขุ่นซึ่งมีเชื้อในปริมาณ 10⁸ CFU/ml มาทำการ swab ลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วจาน เตรียมแผ่นสารสกัดแต่ละชนิด โดยการเตรียมสารสกัดแต่ละชนิด ความเข้มข้นที่ 125 250 และ 500 µg/ml ละลายใน 50% เอทานอล กรองด้วย filter membrane จากนั้นหยดสารสกัดตำรายาสมุนไพรหรือยาเหลืองปิดสมุทร ซึ่งสกัดในแต่ละตัวทำละลายลงไปในแผ่น paper disc (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm) ปริมาตร 20 µl ทั้งไว้จนแห้ง หลังจากนั้นนำมาวางบนจาน petri dish ที่มีเชื้อ โดยมี negative control เป็นแผ่น paper disc ของตัวทำละลายที่ใช้ละลายสารสกัด และ positive control เป็นยา Norfloxacin (10 µg) และ Ampicillin (10 µg) จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ผลโดยสังเกตบริเวณใส (zone of inhibition) รอบแผ่นยา ถ้ามีบริเวณใสหมายถึงแผ่นยามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียนั้นในการทดสอบ นำมาวัดขนาดความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนที่ยับยั้งด้วย vernier caliper ในหน่วย mm ทำการทดลองอย่างต่ำ 3 ครั้ง ต่อเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด

5.3.2 Broth microdilution method การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Minimum growth inhibitory concentration; MIC) โดยวิธี Broth microdilution method ดังนี้ เติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MHB ลงใน 96-well plate 50 µl ทุก well หลังจากนั้นเติมสารสกัดตำรายาสมุนไพรหรือยาเหลืองปิดสมุทรซึ่งสกัดในแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 500 mg/ml ปริมาตร 50 µl ลงใน well ซ้ายสุดของแต่ละแถว แล้วเจือจางสารตัวอย่างลงใน well ถัดไปด้วยเทคนิค Serial 2-fold dilution จากนั้นนำมาเติมสารละลายของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด (ซึ่งเป็นเชื้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปรับเทียบความขุ่นกับ 0.5 McFarland (OD₆₀₀ = 0.1) แล้ว) ที่มีเชื้อในปริมาณ 10⁸ CFU/ml ปริมาตร 50 µl ลงในทุก well ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเติมสารละลาย Resazurin (0.1 mg/ml) ปริมาตร 20 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาอีก 2 ชั่วโมง สังเกตสีในแต่ละ well ที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่า บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุด

ของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่เริ่มสังเกตเห็นสารผสมเป็นสีน้ำตาลหรือสีของสารผสมคล้ายคลึงกับสีของสารสกัดใน well plate จากนั้นนำมาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum bactericidal concentration; MBC) โดยปิเปตสารผสมจาก well ที่ไม่มีที่การเจริญเติบโตของเชื้อจากการสังเกตด้วยตาเปล่าซึ่งให้สีน้ำตาลหรือสีของสารผสมคล้ายคลึงกับสีของสารสกัดมากที่สุด นำมา 10 μ l ไปทำการ drop plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MHA แล้วปล่อยให้แห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้ คือไม่มีโคโลนีของเชื้อขึ้นบนอาหาร MHA ทำการทดลองอย่างต่ำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) ต่อเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด เพื่อยืนยันผลการทดลอง

6. สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

การศึกษาค่าประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น แสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ SEM) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์สถิติสำเร็จรูป SPSS หาค่าความแตกต่างของข้อมูลในตารางเดียวกันโดยใช้ One-way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของชุดข้อมูลตารางเดียวกันเมื่อใช้ตัวทำละลายในการสกัดแตกต่างกันด้วย Duncan ขณะเดียวกันเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างสองตารางในตัวทำละลายเดียวกันด้วยสถิติ Independent T-test ที่ระดับนัยสำคัญ p -values < 0.05 และการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ แสดงข้อมูลในรูปแบบของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ SD)

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดตัวอย่างตำรับยาธาตุบรรจบและยาเหลืองปิดสมุทร

จากการสกัดตำรับยาธาตุบรรจบและยาเหลืองปิดสมุทรโดยวิธีการต้มเดือดในตัวทำละลายแต่ละชนิด พบว่า เมื่อสกัดด้วยน้ำกระสายยาที่ใช้สารละลายจากสารสกัดเปลือกผลทับทิมต้มแทรกกับน้ำปูนใส ตำรับยาธาตุบรรจบให้ร้อยละผลผลิตสูงสุดที่ 29.76 สารสกัดมีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาลแดงเข้ม ในขณะที่สารสกัดยาเหลืองปิดสมุทรให้ร้อยละผลผลิตสูงสุดที่ 23.12 สารสกัดมีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาลเข้ม แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดตำรับยาธาตุบรรจบและยาเหลืองปิดสมุทร

ตำรับ	ร้อยละผลผลิต (% Yield)		
	สารสกัดน้ำ	สารสกัดน้ำกระสายยา	สารสกัด 95% เอทานอล
ยาธาตุบรรจบ	19.24	29.76	24.14
ลักษณะทางกายภาพ	 ผงสีน้ำตาลอ่อน	 ผลึกสีน้ำตาลแดงเข้ม	 ของเหลวเหนียวสีน้ำตาล
ยาเหลืองปิดสมุทร	15.22	23.12	17.24
ลักษณะทางกายภาพ	 ผงสีน้ำตาลแดง	 ผลึกสีน้ำตาลเข้ม	 ผงสีเหลืองอมน้ำตาล

2. ผลการศึกษาค่าประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น

จากผลการศึกษาค่าประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น พบว่ายาธาตุบรรจบที่สกัดด้วยน้ำกระสายยาเปลือกผลทับทิมต้มแทรกกับน้ำปูนใส ให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและแทนนินทั้งหมดสูงสุดที่ 13.43 ± 0.14 mg QE/mg และ 182.52 ± 39.32 mg TAE/mg ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดน้ำของยาธาตุบรรจบให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดที่ 145.92 ± 9.77 mg GAE/mg ส่วนยาเหลืองปิดสมุทรที่สกัดด้วย 95% เอทานอลนั้น ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและแทนนินทั้งหมดสูงสุดที่ 294.43 ± 1.77 mg GAE/mg และ 159.79 ± 7.29 mg TAE/mg ตามลำดับ

ขณะเดียวกันสารสกัดน้ำกระสายยาเปลือกผลทับทิมต้มแทรกน้ำปูนใสของยาเหลืองปิดสมุทรให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดที่ 7.32 ± 0.21 mg QE/mg ในขณะที่สารสกัด 95% เอทานอล ไม่สามารถวัดปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดได้ แสดงผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฟีนอลิกทั้งหมด และแทนนินทั้งหมด ของสารสกัดตำรับยาธาตุบรรจบและยาเหลืองปิดสมุทร

ตัวทำ ละลาย ที่ใช้สกัด	Total flavonoid (mg QE/mg)		Total phenolic (mg GAE/mg)		Total tannin (mg TAE/mg)	
	ธาตุบรรจบ	เหลือง ปิดสมุทร	ธาตุบรรจบ	เหลือง ปิดสมุทร	ธาตุบรรจบ	เหลือง ปิดสมุทร
น้ำ	12.67 ± 0.18^{aA}	2.69 ± 0.38^{bB}	145.92 ± 9.77^{aA}	126.62 ± 1.65^{bA}	177.23 ± 4.61^{aA}	76.82 ± 5.38^{bB}
น้ำกระสายยา	13.43 ± 0.14^{aA}	7.32 ± 0.21^{aB}	$118.77 \pm 6.12^{a,bA}$	120.73 ± 3.49^{bA}	182.52 ± 39.32^{aA}	142.70 ± 2.98^{aA}
95% เอทานอล	5.10 ± 0.66^b	CND	86.50 ± 12.00^{bA}	294.43 ± 1.77^{aB}	151.41 ± 17.50^{aA}	159.79 ± 7.29^{aA}

หมายเหตุ สัญลักษณ์ a,b ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันคือความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบในตำรับเดียวกัน และสัญลักษณ์ A,B ที่แตกต่างกันคือความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตำรับยาธาตุบรรจบกับยาเหลืองปิดสมุทร โดยที่ CND คือ can not detectable

3. ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้

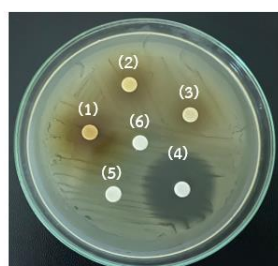
จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้เบื้องต้นด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่า สารสกัดน้ำจากยาธาตุบรรจบที่ความเข้มข้นสูงสุด 500 mg/ml สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย EAEC EIEC ETEC และ *E. coli* ให้โซนการยับยั้งในช่วง $6.12 \pm 0.02 - 7.95 \pm 2.53$ mm ในขณะที่สารสกัดชนิดอื่นๆ ของตำรับยาธาตุบรรจบและยาเหลืองปิดสมุทร ไม่พบโซนการยับยั้ง และยา Norfloxacin (ขนาด 10 µg/disc) ให้โซนการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด อยู่ในช่วง $19.59 \pm 1.31 - 26.83 \pm 2.04$ mm ในขณะที่ยา Ampicillin (ขนาด 10 µg/disc) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เฉพาะเชื้อ ETEC และ *E. coli* มีโซนการยับยั้งเฉลี่ยที่ 20.14 ± 1.68 และ 14.28 ± 1.68 mm ตามลำดับ ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 1

จากผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) โดยวิธี Broth microdilution method พบว่า ยาธาตุบรรจบที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ EAEC EPEC และ *E. coli* ได้เท่ากัน (MIC = 31.25 mg/ml) และสารสกัดยังสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย EAEC ได้ดีที่สุด (MBC = 31.25 mg/ml) รองลงมาคือเชื้อแบคทีเรีย EPEC และ *E. coli* ซึ่งให้ค่า MBC เท่ากับ 62.5 และ 125 mg/ml ตามลำดับ ขณะเดียวกันสารสกัดจากน้ำกระสายยาเปลือกผลทับทิมต้มแทรกน้ำปูนใส มีฤทธิ์ยับยั้ง (MIC = 31.25 mg/ml) และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (MBC = 125 mg/ml) ได้ไม่แตกต่างกับสารสกัดเอทานอล แต่ให้ผลการยับยั้งเชื้อ EIEC (MIC = 15.62 mg/ml) ได้สูงกว่าสารสกัดชนิดอื่นๆ ในขณะที่ผลการฆ่าเชื้อ EIEC ของทุกสารสกัดไม่แตกต่างกัน (MBC > 125 mg/ml) ส่วนในเชื้อแบคทีเรีย ETEC พบว่าสารสกัดน้ำและสารสกัดจากน้ำกระสายยาเปลือกผลทับทิมต้มแทรกน้ำปูนใสให้ผลการยับยั้งเชื้อได้เท่ากันที่ค่า MIC เท่ากับ 31.25 mg/ml ในขณะที่สารสกัดเอทานอลสามารถฆ่าเชื้อ ETEC ได้สูงกว่าสารสกัดชนิดอื่นที่ค่า MBC เท่ากับ 62.5 mg/ml ส่วนยาเหลืองปิดสมุทรที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 5 ชนิดได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดชนิดอื่นๆ โดยสามารถยับยั้งเชื้อ EAEC ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *E. coli* ให้ค่า MIC เท่ากับ 3.91 และ 15.62 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ EIEC EPEC และ ETEC สามารถยับยั้งได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 31.25 mg/ml โดยที่สารสกัดเอทานอลจากตำรับยาเหลืองปิดสมุทรสามารถฆ่าเชื้อทั้งหมดได้ที่ค่า MBC เท่ากับ 125 mg/ml ยกเว้นในเชื้อ EAEC ขณะเดียวกันสารสกัดจากน้ำกระสายยาเปลือกผล

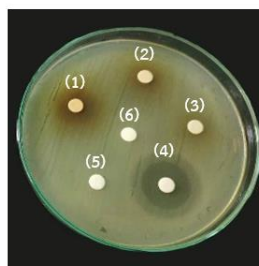
หับทิมดัมแทรกน้ำปูนใสมีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้เทียบเท่ากับสารสกัดเอทานอล ในขณะที่สารสกัดน้ำ (MBC = 125 mg/ml) จากตำรับยาเหลืองปิดสมุทรสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย EAEC ได้ดีกว่าสารสกัดเอทานอล ถึงแม้ว่าจะมีค่า MIC น้อยกว่าสารสกัดเอทานอลเพียงเล็กน้อย แสดงดังตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 3 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดของสารสกัดตำรับยาธาตุบรรจบและยาเหลืองปิดสมุทรในแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 500 mg/ml

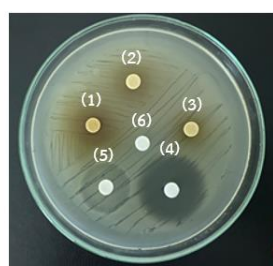
ยา	ตัวทำละลาย	โซนการยับยั้ง (mm)				
		EAEC	EIEC	EPEC	ETEC	<i>E. coli</i>
ธาตุบรรจบ	น้ำ	6.12 ± 0.02	6.28 ± 0.07	-	7.95 ± 2.53	6.43 ± 0.34
	น้ำกระสายยา	-	-	-	-	-
	เอทานอล	-	-	-	-	-
เหลืองปิดสมุทร	น้ำ	-	-	-	-	-
	น้ำกระสายยา	-	-	-	-	-
	เอทานอล	-	-	-	-	-
-	Blank	-	-	-	-	-
	Nor (10 µg/disc)	25.27 ± 2.02	19.59 ± 1.31	25.57 ± 1.73	26.07 ± 1.48	26.83 ± 2.04
	Amp (10 µg/disc)	-	-	-	20.14 ± 1.68	14.28 ± 1.68



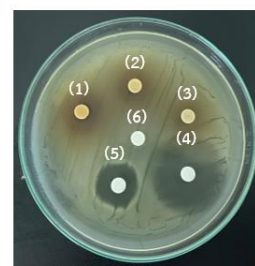
(A)



(B)



(C)



(D)

รูปที่ 1 โซนการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเชื้อ EAEC (A) เชื้อ EIEC (B) เชื้อ ETEC (C) และ เชื้อ *E. coli* (D) ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาธาตุบรรจบ โดยที่ (1) ความเข้มข้น 500 mg/ml (2) ความเข้มข้น 250 mg/ml (3) ความเข้มข้น 125 mg/ml (4) ยา Norfloxacin ความเข้มข้น 10 µg/disc (5) ยา Ampicillin ความเข้มข้น 10 µg/disc และ (6) สารละลาย blank 50% เอทานอล ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion method

ตารางที่ 4 ผลการยับยั้ง (MIC) และการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดตำรับยาธาตุบรรจบ

แบคทีเรีย ที่ใช้ทดสอบ	MIC (MBC) (mg/ml)		
	สารสกัด น้ำ	สารสกัด น้ำกระสายยา	สารสกัด 95% เอทานอล
Enteraggregative <i>E. coli</i>	31.25 (125)	31.25 (125)	31.25 (31.25)
Enteroinvasive <i>E. coli</i>	31.25 (>125)	15.62 (>125)	31.25 (>125)
Enteropathogenic <i>E. coli</i>	31.25 (>125)	31.25 (>125)	31.25 (62.5)
Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	31.25 (125)	31.25 (>125)	62.5 (62.5)
<i>Escherichia coli</i>	62.5 (125)	31.25 (125)	31.25 (125)

ตารางที่ 5 ผลการยับยั้ง (MIC) และการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดตำรับยาเหลืองปิดสมุทร

แบคทีเรีย ที่ใช้ทดสอบ	MIC (MBC) (mg/ml)		
	สารสกัด น้ำ	สารสกัด น้ำกระสายยา	สารสกัด 95% เอทานอล
Enteraggregative <i>E. coli</i>	7.81 (125)	62.5 (>125)	3.91 (>125)
Enteroinvasive <i>E. coli</i>	31.25 (>125)	31.25 (>125)	31.25 (125)
Enteropathogenic <i>E. coli</i>	31.25 (>125)	62.5 (>125)	31.25 (125)
Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	31.25 (>125)	62.5 (>125)	31.25 (125)
<i>Escherichia coli</i>	31.25 (125)	15.62 (125)	15.62 (125)

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการสกัดตำรับยาดังตารางที่ 1 การใช้ น้ำกระสายยาจากสารสกัดเปลือกผลทับทิมต้มแทรกกับน้ำปูนใสเป็นตัวทำละลายในการสกัดทั้ง 2 ตำรับ ด้วยวิธีต้มเดือดทางการแพทย์แผนไทย ให้ร้อยละผลผลิตสูงกว่าการใช้ตัวทำละลายอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากน้ำกระสายยามีส่วนผสมของน้ำปูนใสที่มีแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นองค์ประกอบ ทั้งยังมีค่าความเป็นกรด - ด่างค่อนข้างสูง (pH = 12.5 - 12.8) ดังนั้นเมื่อนำสารสกัดเปลือกผลทับทิมต้มแทรกกับน้ำปูนใส มาละลายน้ำจึงทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไฮดรอกไซด์ไอออน (OH⁻) ได้ และไปเกาะกับตัวยาสุมไพโรบางชนิดได้ดีในตำรับ จึงทำให้มี % yield สูงกว่าการใช้ตัวทำละลายอื่นๆ สอดคล้องกับการศึกษาการยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis* ที่พบว่าการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์มีผลต่อการยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้สูงที่สุด รองลงมาคือ การรวมกันระหว่างสารสกัดเทียนดำกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ที่อัตราส่วน 50:50 (Zakaria *et al.* 2021) โดยที่ยาธาตุบรรจบมีเทียนดำเป็นส่วนหนึ่งในองค์ประกอบของตำรับยานี้ ซึ่งตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ที่ใช้ในการสกัดเป็นตัวทำละลายที่มีช่วงค่อนข้างสูง ได้แก่ น้ำ น้ำกระสายยา (เปลือกผลทับทิมต้มแทรกกับน้ำปูนใส) และ 95% เอทานอล ตัวทำละลายน้ำเป็นตัวทำละลายที่ดี มีความปลอดภัย ความมีชีวสูง ซึ่งจะสามารถละลายสารในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แกลโลแทนนิน เอลาจิทแทนนินที่เป็นชนิด Hydrolysable tannins โมเลกุลเล็กได้ดี ตัวอย่างเช่น Gallic acid Catechin Gallo catechin Epicatechin Chebulic acid Chebulagic acid เป็นต้น สารประกอบดังกล่าวค่อนข้างละลายน้ำได้และสามารถสกัดได้ง่ายด้วยน้ำร้อน มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและถูกใช้เป็นยาสมุนไพร รวมถึงรักษาอาการท้องร่วง ในขณะที่เอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ที่มีศักยภาพในการปล่อยสารโพลีฟีนอลเข้าไปทำลายผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียได้ แต่มีชีวน้อยกว่าน้ำ (Dai and Mumper, 2010) โดยทั่วไปจึงมีการเติมน้ำลงในเอทานอลเพื่อเพิ่มชีว ดังนั้นการใช้เอทานอลผสมน้ำจะช่วยให้สามารถสกัดสารประกอบทั้งหมดที่ละลายได้ในตัวทำละลายทั้งสองมากขึ้น ทำให้สารสกัดมีฤทธิ์ทางชีวภาพดีขึ้น (Nair *et al.*, 2010; Bag *et al.*, 2013) ขณะที่ตัวทำละลายน้ำกระสายยาที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นสารละลายที่ได้จากสารสกัดเปลือกผลทับทิมต้มแทรกกับน้ำปูนใส เนื่องจากน้ำปูนใสมีแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Ca(OH)₂) เป็นองค์ประกอบ เมื่อละลายน้ำจะทำให้ไฮดรอกไซด์ไอออนแตกตัวได้ดี โดยที่สารประกอบกลุ่มฟีนอลิก เอลาจิทแทนนินบางชนิด เช่น Ellagic acid Punicalin Punicalagin จะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่เป็นด่างเล็กน้อย จึงทำให้สารกลุ่มนี้ออกมากับตัวทำละลายที่มีความเป็นด่างได้มากขึ้น

การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น พบว่า สารสกัดน้ำกระสายยาเปลือกผลทับทิมต้มแทรกกับน้ำปูนใสจากยาธาตุบรรจบให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและแทนนินทั้งหมดสูงสุดที่ 13.43 ± 0.14 mg QE/mg และ 182.52 ± 39.32 mg TAE/mg ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดน้ำจากยาธาตุบรรจบให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดที่ 145.92 ± 9.77 mg GAE/mg โดยที่สารสกัดน้ำและน้ำกระสายยาจากยาธาตุบรรจบให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกัน และการหาปริมาณแทนนินทั้งหมดของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ยีสต์สกัดเอทานอลจากยีสต์ธรรมชาติมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย EAEC ได้สูงที่สุด รองลงมาคือ EPEC ETEC และ *E. coli* โดยมีค่า MBC เท่ากับ 31.25 62.5 62.5 และ 125 mg/ml ตามลำดับ และการใช้ความเข้มข้นสูงสุดที่ 125 mg/ml ของสารสกัดทั้งหมดไม่สามารถฆ่าเชื้อ EIEC ได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าสารสกัดน้ำสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดในตระกูล *E. coli* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการก่อโรคท้องเสียได้เกือบเทียบเท่ากับสารสกัดเอทานอล (ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดในช่วง 31.25 – 62.50 mg/ml) และสารสกัดน้ำกระสายยาสามารถยับยั้งเชื้อ EIEC ได้ดีกว่า (MIC = 15.62 mg/ml) สารสกัดชนิดอื่นเล็กน้อย จะเห็นได้ว่าการสกัดด้วยเอทานอลให้ผลการยับยั้งและฆ่าเชื้อได้ดีที่สุดในยีสต์ธรรมชาติ แต่ตรวจพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฟีนอลิกทั้งหมด และแทนนินทั้งหมดน้อยกว่าการสกัดด้วยน้ำและน้ำกระสายยา ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มเซลล์เป็นชั้นของ Phospholipid bilayer ถึงสองชั้นด้วยกัน อีกทั้งบนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของ *E. coli* ยังประกอบไปด้วย Phospholipids Lipopolysaccharides Colanic acid Flagella และ Type I fimbriae เป็นเกราะป้องกันตนเอง ในขณะที่เซลล์แบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์เพียงชั้นเดียวและมีองค์ประกอบจำพวก Peptidoglycan และ Polysaccharide ในปริมาณมากกว่า (Wang *et al.*, 2021) จึงทำให้สารสกัดส่วนใหญ่ที่สามารถผ่านผนังเซลล์เพื่อไปทำลายโครงสร้างเชื้อได้ เป็นสารที่มีขั้วอยู่ในระดับกลางๆ เช่น เอทานอล ดังนั้นเมื่อทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียเข้าไปได้แล้วจึงปลดปล่อยสารสำคัญทำลายนิวเคลียสของแบคทีเรียเพื่อให้เซลล์ตาย สอดคล้องกับ Dai and Mumper (2010) ที่กล่าวว่าเอทานอลเป็นตัวทำลายอินทรีย์ที่มีศักยภาพในการปล่อยสารโพลีฟีนอลเข้าไปทำลายผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียได้ แต่มีขั้วน้อยกว่าน้ำ ในขณะที่น้ำหรือน้ำกระสายยาที่ตรวจพบสารประกอบทางพฤกษเคมีในปริมาณที่สูงกว่าเล็กน้อย อาจจะทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้น้อยกว่า ด้วยข้อจำกัดเรื่องความมีขั้วของตัวทำลายในการผ่านเข้าออกผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย จึงทำให้ปลดปล่อยสารสำคัญเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียได้น้อยกว่า การออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจึงน้อยกว่าสารสกัดเอทานอลในขณะที่มีปริมาณสารสำคัญมากกว่านั่นเอง อย่างไรก็ตามสอดคล้องกับ Eid *et al.* (2023) ที่ว่าเอนไซม์โพลีฟีนอลในสารสกัดน้ำอาจย่อยสลายโพลีฟีนอลบางชนิด ทำให้มีสมบัติทางชีวภาพบางอย่างของสารสกัดน้ำลดลงได้ โดยการศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของยีสต์ธรรมชาติทั้งหมดนี้สอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยีสต์ธรรมชาติที่พบว่า สารสกัดน้ำและเอทานอลจากยีสต์ธรรมชาติ ($EC_{50} = 7.22 \pm 0.72$ และ 13.52 ± 0.99 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากกว่าสารมาตรฐาน BHT ($EC_{50} = 14.55 \pm 0.69$ $\mu\text{g/ml}$) อีกทั้งสารสกัดน้ำจากขิง ($IC_{50} = 2.06 \pm 0.09$ $\mu\text{g/ml}$) ที่เป็นส่วนหนึ่งในองค์ประกอบของตำรับสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้สูงกว่ายา Indomethacin ($IC_{50} = 20.32$ $\mu\text{g/ml}$) ขณะที่สารสกัดเอทานอลจากตำรับยีสต์ธรรมชาติยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ในระดับปานกลาง ($IC_{50} = 27.48 \pm 1.25$ $\mu\text{g/ml}$) นอกจากนี้สารสกัดเอทานอลจากยีสต์ธรรมชาติยังเชื้อก่อโรคท้องเสียได้ 6 สายพันธุ์ คือ *Vibrio Parahaemolyticus* *Staphylococcus aureus* *Vibrio cholera* *Shigella dysenteriae* *Escherichia coli* และ *Salmonella typhi* มีค่า MIC เท่ากับ 0.625 1.25 2.5 2.5 5 และ 5 mg/ml ตามลำดับ (Jaiaree *et al.*, 2013) รวมถึงสอดคล้องกับการศึกษาของ วชิรินทร์ และคณะ (2559) ที่ใช้สารสกัดเอทานอลจากสมอไทยซึ่งเป็นตัวยาหลักในตำรับยีสต์ธรรมชาติสามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* *B. cereus* และ *E. coli* มีค่า MBC เท่ากับ 16 8 และ 16 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดเอทานอลจากขมิ้นชันที่เป็นตัวยาหลักในตำรับยาเหลืองปิดสมุทร สามารถฆ่าได้เพียงเชื้อ *S. aureus* มีค่า MBC เท่ากับ 4 mg/ml ขณะเดียวกันผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Suthon *et al.* (2013) ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร 8 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* *E. coli* *S. typhi* *S. typhimurium* *V. Parahaemolyticus* *V. Cholera* *S. dysenteriae* และ *P. aeruginosa* โดยเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดยีสต์ธรรมชาติกับสมอไทย ที่สกัดด้วยวิธีการต้มน้ำและแช่ด้วยเอทานอลนั้น พบว่าสารสกัดเอทานอลจากสมอไทยสามารถยับยั้งเชื้อได้ทุกชนิด ในขณะที่สารสกัดเอทานอลจากตำรับยีสต์ธรรมชาติสามารถยับยั้งเชื้อได้เพียง 6 ชนิด คือ *S. aureus* *E. coli* *S. typhi* *S. dysenteriae* *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ส่วนสารสกัดน้ำและกาก

หลังจากแช่ด้วยเอทานอลของสมอไทย สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* *S. dysenteriae* และ *V. parahaemolyticus* ได้ ในขณะที่สารสกัดชิ้นน้ำและกากหลังจากการแช่ด้วยเอทานอลของตำรับยาธาตุบรรจบ สามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อ *S. aureus* ซึ่งผลการศึกษาค้างนี้สนับสนุนการใช้ตำรับยาธาตุบรรจบ และสมอไทยในการรักษาอาการท้องเสียตามองค์ความรู้แบบดั้งเดิม นอกจากนี้การศึกษาของ Chusri *et al.* (2014) ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของตำรับยาธาตุบรรจบต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 7 ชนิด แบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยาหลายชนิด และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของตำรับ พบว่าสารสกัดเอทานอลของตำรับยาธาตุบรรจบ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) สายพันธุ์ NPRC R003 125 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31 $\mu\text{g/ml}$ ได้ดีที่สุด การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ มีค่า IC_{50} มากกว่า 50 $\mu\text{g/ml}$ (ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารมาตรฐาน Ellipticine มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.8 $\mu\text{g/ml}$) แสดงว่าตำรับยาธาตุบรรจบมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้และไม่เกิดพิษต่อเซลล์

ส่วนสารสกัดยาเหลืองปิดสมุทรที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและแทนนินทั้งหมดสูงสุดที่ 294.43 ± 1.77 mg GAE/mg และ 159.79 ± 7.29 mg TAE/mg ตามลำดับ ขณะเดียวกันสารสกัดน้ำกระสายยาเปลือกผลทับทิมต้มแทรกน้ำปูนใสของยาเหลืองปิดสมุทร ให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดที่ 7.32 ± 0.21 mg QE/mg ในผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการใช้น้ำและน้ำกระสายยาในการสกัดให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกัน ขณะที่สารสกัดทั้ง 2 มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และสารสกัดน้ำกระสายยากับเอทานอลมีปริมาณแทนนินทั้งหมดไม่แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าการสกัดด้วยเอทานอลให้ผลการยับยั้งและฆ่าเชื้อได้ดีที่สุดในยาเหลืองปิดสมุทร ยกเว้นในเชื้อ EAEC ที่สารสกัดน้ำสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย EAEC ได้ดีกว่า (ใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 125 mg/ml) ในขณะที่สารสกัดเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย EAEC ได้สูงสุดแต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ และสารสกัดน้ำกระสายยาสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (ใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 15.62 และ 125 mg/ml ตามลำดับ) ได้เทียบเท่ากับสารสกัดเอทานอล สอดคล้องกับผลการศึกษาในหนูแรชสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดอาการท้องเสียด้วยน้ำมันละหุ่ง พบว่า ยาเหลืองปิดสมุทร ขนาด 1000 2000 4000 mg/kg สามารถลดปริมาณอุจจาระได้มากกว่า 50% ($p < 0.05$) โดยปริมาณอุจจาระเท่ากับ 1.05 0.7 และ 0.59 g ตามลำดับ ในขณะที่ยามาตรฐาน Atropine sulfate ขนาด 0.5 mg/kg ให้ปริมาณอุจจาระน้อยกว่าเท่ากับ 0.28 g (Sireeratawong *et al.*, 2012) อีกทั้งยังสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเอทานอลจากยาเหลืองปิดสมุทร ซึ่งทำการทดสอบในเชื้อ 20 ชนิด พบว่า ยาเหลืองปิดสมุทรสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดได้อยู่ในระดับดี คือ เชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 และเชื้อ methicillin resistant *S. aureus* R005 (MRSA NPRC R005) ซึ่งเป็นเชื้อดื้อยาทำให้เกิดการติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร ลำไส้อักเสบ อาหารเป็นพิษ มีค่า MIC <16 และ 31 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (Chusri *et al.*, 2014) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sincharoenpokai *et al.* (2009) ที่ทดสอบสารสกัดเอทานอลจากขมิ้นชันซึ่งเป็นด้วยหลักในตำรับยาเหลืองปิดสมุทรสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ *B. Cereus* *V. Cholera* *B. Subtilis* *S. aureus* และ *V. parahaemolyticus* ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อเกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร ลำไส้อักเสบ อาหารเป็นพิษ มีค่า MIC เท่ากับ 3.91 15.63 15.63 31.25 และ 31.25 ppt ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่าโซนการยับยั้งของทั้ง 2 ตำรับค่อนข้างเห็นโซนเพียงเล็กน้อย ดังรูปที่ 1 โดยจะเห็นได้ว่ามีเพียงสารสกัดน้ำจากยาธาตุบรรจบที่ความเข้มข้นสูงสุด 500 mg/ml ที่พบโซนการยับยั้งมากกว่าสารสกัดน้ำกระสายยา และเอทานอล ซึ่งไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งตำรับยาธาตุบรรจบมีตัวยาสสมอไทยเป็นตัวยาลหลัก ตัวยารองคือโกฐก้านพร้าว และส่วนประกอบอื่นๆ มีรายงานว่าสมอไทยมีสารสำคัญคือ Gallic acid Ethyl Gallate และสารกลุ่ม Tannin (Pfundstein *et al.*, 2010) ที่สามารถยับยั้งจุลชีพได้ดีหากสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว อีกทั้งตัวทำละลายน้ำยังสามารถละลายสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กๆ ได้ดี เช่น Gallic acid ดังนั้นการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำจึงดึงสาร

จำพวกนี้ลงมาในการสกัดได้มาก ในขณะที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบที่มีโครงสร้างผนังเซลล์ซับซ้อน ประกอบไปด้วย Peptidoglycan เพียง 5 – 20 % แต่มี Lipopolysaccharide ที่เพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์ได้มากกว่า รวมถึงมีช่องพอริน (porin) ที่ไม่ยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ผ่านเข้าออก จึงทำให้สารสำคัญบางชนิดเข้าไปทำลายผนังเซลล์และนิวเคลียสไม่ได้ (Tortora *et al.*, 2001; Matu and van Staden, 2003) ทั้งนี้การทดสอบแบบ Disc diffusion เป็นการทดสอบเบื้องต้นโดยอาศัยหลักการแพร่จากกระดาศกรองไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อสารแพร่ออกไปมากขึ้นความเข้มข้นของสารก็จะลดลงตามระยะทางการแพร่ ดังนั้นบริเวณที่อยู่ใกล้แผ่น disc จะมีความเข้มข้นมากที่สุด จึงเห็นเป็นโซนใสรอบบริเวณนี้ในสารสกัดน้ำมากกว่าเนื่องจากสารที่มีโมเลกุลเล็กสามารถละลายลงมาได้ดีกว่า อีกทั้งในตำรับประกอบด้วยตัวยาสมุนไพรจำนวนมากถึง 22 ชนิด และยังเป็นสารในกลุ่มของแทนนินและฟีนอลิกจึงทำให้มีตะกอนของสารสำคัญ ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่แพร่บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีแต่ไม่สามารถผ่านช่องพอรินเข้าไปทำลายเชื้อจนหมดได้ ดังนั้นสารสกัดน้ำกระสายยาและเอทานอลจึงเห็นเพียงโซนการแพร่กระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อของสารสกัดได้มากกว่าโซนการยับยั้ง เป็นผลมาจากข้อจำกัดเรื่องสมบัติของความมีขั้ว (polarity) เมื่อตัวทำละลายต่างชนิดกัน

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตำรับยาธาตุบรรจบและยาเหลืองปิดสมุทร พบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด แทนนินทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ของยาเหลืองปิดสมุทรมีปริมาณน้อยกว่ายาธาตุบรรจบ และผลการทดสอบ Disc diffusion agar test ให้ผลที่สอดคล้องกัน ในขณะที่เมื่อทดสอบ MIC/MBC กลับให้ผลการยับยั้งและการฆ่าเชื้อที่ต่ำกว่ายาธาตุบรรจบ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะตำรับยาเหลืองปิดสมุทรมีตัวยาบางอย่าง เช่น สีเสียดเทศ สีเสียดไทย ใบทับทิม กล้วยดิบ มีกลุ่มสารหลักคือแทนนินที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย ในขณะที่ขมิ้นชันเป็นตัวยาหลักและขมิ้นอ้อยมีสารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารได้หลายชนิด (Sincharoenpokai *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังมีน้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบซึ่งสารบางตัวในน้ำมันหอมระเหยอาจเสริมฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ดังนั้นนอกจากสารทั้ง 3 กลุ่มที่ทำการทดสอบแล้วยังมีสารสำคัญกลุ่มอื่นอีกในตำรับที่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* ได้ จึงทำให้การทดสอบ MIC/MBC มีผลการยับยั้งและการฆ่าเชื้อได้มากกว่ายาธาตุบรรจบในบางสารสกัด เช่น สารอัลลิซิน (Allicin) ที่เป็นสารกลุ่ม Organosulfur เกิดจาก Allin ในกระเทียมเมื่อผ่านการแปรรูป Allinase จะถูกปลดปล่อยออกมาจากภายในแวคิวโอลของเซลล์และอาศัยน้ำเป็นกลไกในการทำปฏิกิริยาได้เป็น Allicin ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ในงานวิจัยของ Lawal *et al.* (2016) พบว่าสารสกัดน้ำจากหัวกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 120 mg/ml ในขณะเดียวกัน Tijjani *et al.* (2017) ได้ศึกษาสารสกัดหยาบจากกระเทียมด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และน้ำ จากการทดสอบด้วยวิธี Well diffusion method หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* พบว่าสารสกัดหยาบจากกระเทียมสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ โดยสารสกัดเอทานอลจากกระเทียมมีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 200 mg/ml ในขณะที่ค่า MBC ของสารสกัดจากกระเทียมที่สกัดด้วยน้ำอยู่ที่ 300 mg/ml ในขณะที่ยานวิจัยของ Chusri *et al.* (2014) พบว่าสารสกัด 95% เอทานอลที่หมักไว้เป็นเวลา 7 วัน สามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ได้ มีค่า MIC เท่ากับ 1,000 µg/ml และจากการทดสอบพิษเคมีในหลอดทดลองพบว่ามีสารกลุ่ม Alkaloid Triterpenoid Condensed tannin และ Hydrolysable tannin เป็นองค์ประกอบซึ่งตัวยานี้ในตำรับบางชนิดนอกจากสารแทนนินที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแล้ว สารแอลคาลอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์บางตัวในตำรับอาจเสริมฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เช่นกัน

ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของยาทั้ง 2 ตำรับ เมื่อสารสกัดผ่านเข้าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็น Phospholipid bilayer ทั้งสองชั้นเข้าไปได้แล้ว โดยที่สารสกัดเอทานอลจะผ่านเข้าไปยังผนังเซลล์ได้ง่ายกว่าเนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยกว่าน้ำ หลังจากนั้นจะปลดปล่อยสารสำคัญจำพวกกลุ่มฟีนอลิก แทนนิน หรือฟลาโวนอยด์ ที่ออกฤทธิ์ไปทำลายโครงสร้างนิวเคลียสและ DNA ของแบคทีเรีย เพื่อให้เซลล์ตายหรือยับยั้งการหลั่งสารพิษได้ข้างลง โดยจะทำให้

แบคทีเรีย EAEC ไม่สามารถจับกับเยื่อบุลำไส้เล็กเพื่อสร้างสารไบโอฟิล์มในการปล่อยสารพิษ Enterotoxins และ Cytotoxins จำพวก ShET1 Pic EAST1 Pet ได้ เช่นเดียวกับ *E. coli* ที่หลังสารพิษ Stx ทำให้เกิดอาการท้องเสีย ขณะที่เชื้อ ETEC จะผลิตสารพิษภายในร่างกาย 2 ชนิด คือ heat-labile (LT) และ heat-stable (ST) โดยการกระตุ้น Adenylyl และ Guanylate cyclase ทำให้ระดับ cAMP และ cGMP สูงขึ้น เกิดการหลั่งน้ำและอิเล็กโทรไลต์ในเซลล์เพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อสารสกัดตำรับยาเข้าไปทำลายโครงสร้างเซลล์ของแบคทีเรียจึงทำให้ ETEC หลังสารพิษได้น้อยลง ระดับ cAMP และ cGMP ในเซลล์จึงลดลง ทำให้อัตราการสูญเสียน้ำและอิเล็กโทรไลต์ลดต่ำลง ขณะที่เชื้อ EPEC จะยึดติดกับ Enterocytes ของลำไส้เล็ก แล้วทำลายเยื่อบุลำไส้โดยหลังสาร Enterotoxin ให้เกิดแผลและการอักเสบเกิดเป็นอาการท้องเสียตามมา ส่วนกลไกการเกิดท้องเสียของเชื้อ EIEC เชื้อจะเจาะผนังเยื่อบุลำไส้เล็กแล้วเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วมีการสร้าง Actin ในการเคลื่อนที่บุกรุกไปยังเซลล์ข้างเคียงทำให้เกิดการอักเสบกลายเป็นมูกมีเลือดปน ดังนั้นจะเห็นได้ว่ามีเพียงสารสกัดเอทานอลจากยาทั้ง 2 ตำรับที่สามารถฆ่าเชื้อ EPEC และ EIEC ได้ โดยยาธาตุนครจับให้ค่า MBC เท่ากับ 62.5 mg/ml ในเชื้อ EPEC ในขณะที่เชื้อ EIEC ต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 125 mg/ml ถึงจะฆ่าเชื้อได้ ส่วนยาเหลืองปิดสมุทรให้ค่า MBC เท่ากับ 125 mg/ml ในเชื้อทั้งสองชนิด ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเชื้อ EIEC ค่อยข้างฆ่าหรือทำลายได้ยาก เนื่องจากเมื่อเชื้อยึดติดกับเซลล์แล้วจะมีการแบ่งตัวเองเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้มีการอักเสบและทำลายเซลล์ข้างเคียงอีกด้วย โดยหากสารสกัดสามารถผ่านผนังเซลล์และปลดปล่อยสารทำลายนิวเคลียสแบคทีเรียได้จะทำให้อัตราการเจาะยึดติดกับเซลล์และการถูกทำลายลดน้อยลง (Kaper *et al.*, 2004) ซึ่งในปัจจุบันการดื้อต่อยาปฏิชีวนะพบได้บ่อยในแบคทีเรียกลุ่ม *E. coli* ทำให้มีผลต่อการรักษาส่งผลให้อาการของโรคเพิ่มขึ้น โดยยา Norfloxacin เป็นยาในกลุ่ม Fluoroquinolone ใช้ในการรักษาการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและโรคอุจจาระร่วงจากการติดเชื้อ มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยจะไปยับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase (Topoisomerase II) และ Topoisomerase IV ของเชื้อแบคทีเรีย โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะเกี่ยวข้องกับการเจริญและการเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อเกิดการจำลองตัวของ DNA (DNA replication) เอนไซม์ดังกล่าวจะทำหน้าที่คลายเกลียว และมีการสังเคราะห์ DNA ของแบคทีเรียขึ้นใหม่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเชื้อขึ้น ดังนั้นเมื่อรับประทานยาปฏิชีวนะหรือตำรับยาเหลืองปิดสมุทรและยาธาตุนครจะทำให้เกิดการยับยั้งการสร้าง DNA ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้และตายในที่สุด (Drlica and Zhao, 1997) จะเห็นว่าการทดสอบด้วย Disc diffusion test ยา Norfloxacin มีโซนการยับยั้งในเชื้อ EIEC ต่ำกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น อาจเป็นผลต่อการดื้อยาในเชื้อชนิดนี้ ในขณะที่ Ampicillin เป็นยาในกลุ่ม β -lactams หรือกลุ่มเพนิซิลิน จากรายงานของ Abbasi *et al.* (2020) พบว่า การติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารและนอกทางเดินอาหารจะดื้อยาในกลุ่ม Ampicillin โดยแบคทีเรีย EAEC และ EIEC มีอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Ampicillin เป็น 100% ในขณะที่เชื้อ EPEC และ ETEC มีอัตราการดื้อต่อยา Ampicillin เท่ากับ 88.8 และ 83.3 % ตามลำดับ และจากผล Disc diffusion test ของงานวิจัยก็ไม่พบโซนการยับยั้งในเชื้อ EAEC EIEC และ EPEC ของยา Ampicillin เช่นกัน รวมไปถึงสารสกัดตำรับยาทั้ง 2 ในตัวทำลายบางชนิดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ต่ำ ทั้งนี้มีผลมาจากการดื้อยาของเชื้อ โดยเชื้อแบคทีเรียจะมีกลไกการใช้พลังงาน ATP นำยาหรือสารสกัดเข้าเซลล์และมีการขับยาออกนอกเซลล์โดย Efflux pump เป็นการลดความเข้มข้นของยาในเซลล์ลงทำให้ยาไม่สามารถเข้าไปถึงเป้าหมายและทำลายเชื้อจนหมดได้ หรือในอีกกรณีหนึ่งเกิดจากแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างยาหรือย่อยยาได้เอง จึงทำให้ยาหมดฤทธิ์ในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในขณะที่แบคทีเรียบางชนิดจะมีผนังเซลล์หนามีก่อป้องกันไม่ให้ยาเข้าไปภายในเซลล์ได้จึงเกิดเชื้อดื้อยาขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงเป็นผลให้มีการวิจัยเพื่อหาทางเลือกหรือการใช้สมุนไพรสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อเพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะลง

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากตำรับยาธาตุบรรจบและยาเหลืองปิดสมุทรสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้บางชนิดในตระกูล *E. coli* ที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียได้ โดยสารสกัดเอทานอลให้ผลการฆ่าเชื้อได้ดีที่สุดทั้ง 2 ตำรับ มีค่า MBC ต่ำกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ขณะเดียวกันสารสกัดน้ำกระสายยาเปลือกผลทับทิมต้มน้ำปูนใสสามารถใช้ละลายตำรับยาธาตุบรรจบและยาเหลืองปิดสมุทร ก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการใช้ยับยั้งแบคทีเรีย EIEC และฆ่าเชื้อ *E. coli* แทนการใช้สารสกัดเอทานอล ซึ่งการใช้น้ำกระสายยาดังกล่าวเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในทางการรักษาด้วยตำรับยาสมุนไพรเพราะเป็นตัวทำละลายที่มีความปลอดภัยมากกว่าเอทานอลในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ ดังนั้นการใช้ตำรับยาสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติในการรักษาอาการท้องเสียจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้จึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในอนาคต โดยจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการสนับสนุนการใช้ตำรับยาแผนไทยในการรักษาอาการท้องเสียด้วยวิธีทางการแพทย์แผนไทยตามองค์ความรู้แบบดั้งเดิม

เอกสารอ้างอิง

- คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ. (2563). ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2563 ประกาศ ณ วันที่ 28 กันยายน พ.ศ. 2563. แหล่งข้อมูล: https://ndi.fda.moph.go.th/ndi_news_detail/index/204. ค้นเมื่อวันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2565.
- วัชรินทร์ รัชชีภาณุรัตน์, พัชร กัมมการเจษฎากุล และอิสยา จันทรวิธานุชิต. (2559).ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus*. วารสาร มฉก.วิชาการ 19(38): 35 - 48.
- Abbasi, E., Mondanizadeh, M., van Belkum, A. and Ghaznavi-Rad, E. (2020). Multi-drug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in pediatric patients with gastroenteritis from central Iran. Infection and drug resistance 13: 1387 - 1396. doi: 10.2147/IDR.S247732.
- Bag, A., Bhattacharyya, S.K., Pal, N.K. and Chattopadhyay, R.R. (2013). Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits. Pharmaceutical Biology. 51: 1515 - 1520. doi: 10.3109/13880209.2013.799709.
- Chewchinda, S., Kongkiatpaiboon, S. and Sithisarn, P. (2019). Evaluation of Antioxidant Activities, Total Phenolic and Total Flavonoid Contents of Aqueous Extracts of Leaf, Stem, and Root of *Aerva lanata*. Chiang Mai University Journal of Natural Sciences 18(3): 345 - 357.
- Chusri, S., Sinvaraphan, N., Chaipak, P., Luxsanuwong, A. and Voravuthikunchai, S.P. (2014). Evaluation of antibacterial activity, phytochemical constituents and cytotoxicity effects of Thai household ancient remedies. Journal of Alternative and Complementary Medicine 20(12): 909 - 918.
- Dai, J. and Mumper, R.J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 15: 7313 - 7352. doi: 10.3390/molecules15107313.
- Donowitz, M., Kokke, F.T. and Saidi, R. (1995). Evaluation of Patients with Chronic Diarrhea. The New England Journal of Medicine 332(11): 725 - 729.
- Drlica, K. and Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61(3): 377 - 392.

- Eid, O., Elkady, W.M., Ezzat, S., El Sayed, A. and Abdelsattar, E. (2023). Comprehensive overview: The effect of using different solvents for barley extraction with its anti-inflammatory and antioxidant activity. *Chemistry & biodiversity* 20(3) e202200935. doi: 10.1002/cbdv.202200935.
- Ekarattanawong, S., Sookprasert, N., Boonruab, J. and Bhamarapavati, K. (2018). Medical plants treatment for diarrhea: from basic science to Thai traditional clinical application. *Journal of Medicine and Health Sciences* 25(1): 126 - 138.
- Fontaine, O. (1988). Bacterial diarrhea and treatment. *Lancet* 1(8596): 1234 - 1235.
- Jaiarree, N., Itharat, A., Suthon, P. and Panthong, S. (2013). Anti-inflammatory, anti-bacterial and antioxidant activities of Thai medicinal plants for diarrheal treatment. *Planta Medica* 79(13): 47.
- Kamala, K. (2008). Traditional Indian spices and their health significance. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 17(Suppl1): 265 - 268.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. and Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 2: 123 - 140. doi: 10.1038/nrmicro818.
- Lawal, B., Shittu, O.K., Oibiokpa, F.I., Mohammed, H., Umar, S.I. and Haruna, G.M. (2016). Antimicrobial evaluation, acute and sub-acute toxicity studies of *Allium sativum*. *Journal of Acute Disease* 5(4): 296 - 301.
- Leite, L. and Dourado, L. (2013). Laboratory activities, science education and problem-solving skills. *Procedia-Social and Behavioral Sciences* 106: 1677 - 1686.
- Malekzadeh, F., Ehsanifar, H., Shahamat, M., Levin, M. and Colwell, R.R. (2001). Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18(1): 85 - 88.
- Matu, E.N. and van Staden, J. (2003). Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *Journal of Ethnopharmacol* 87: 35 - 41.
- Nair, V., Singh, S. and Gupta, Y.K. (2010). Anti-arthritis and disease modifying activity of *Terminalia chebula* Retz. in experimental models. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62: 1801 - 1806. doi: 10.1111/j.2042-7158.2010.01193.x.
- Pfundstein B., El Desouky, S.K., Hull, W.E., Haubner, R., Erben, G. and Owen, R.W. (2010). Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. *Phytochemistry* 71(10): 1132 - 1148. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.03.018.
- Raju, B., Ballal, M. and Bariry, I. (2011). Novel treatment approach towards emerging multidrug resistant enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) causing acute/persistent diarrhea using medical plant extracts. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical* 2(1): 15 - 23.
- Sincharoenpokai, P., Lawhavinit, O., Sunthornandh, P., Kongkathip, N., Sutthiprabha, S. and Kongkathip, B. (2009). Inhibitory effects of Turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts on some human and animal pathogenic bacteria. In: *Proceedings of 47th Kasetsart University Annual Conference: Science*, Kasetsart University, Bangkok. 244 - 253.

- Sireeratawong, S., Khonsung, P., Nanna, U., Vannasiri, S., Lertprasertsuke, N., Singhalak, T., Soonthornchareonnon, N. and Jaijoy, K. (2012). Anti-diarrheal activity and toxicity of Learnng Pid Samud recipe. African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines 9(4): 519 - 529.
- Sithisarn, P., Rojsanga, P., Sithisarn, P. and Kongkiatpaiboon, S. (2015). Antioxidant activity and antibacterial effects on clinical isolated *Streptococcus suis* and *Staphylococcus intermedius* of extracts from several parts of *Cladogynos orientalis* and their phytochemical screenings. Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine 2015: 1 - 9. doi: 10.1155/2015/908242.
- Slingkard, K. and Singlaton, V.L. (1977). Totalphenal analysis: Automation and comparison with manual method. American Journal of Enology and Viticulture 28: 49 - 55.
- Snyder, J.D. and Merson, M.H. (1982). The magnitude of the global problem of acute diarrhea disease: A review of active surveillance of data. Bulletin of the World Health Organization 60(4): 605 - 613.
- Suthon, P., Panthong, S., Jaiarree, N. and Itharat, A. (2013). Quality control and comparison of antibacterial activity of extracts from Thatbunjob and *Terminalia chebula* Retz. Journal of Traditional Thai Medical Research 1(1): 47 - 55.
- Tijjani, A., Musa, D.D., Aliyu, Y. (2017). Antibacterial Activity of Garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus* and *Escherihia coli*. International Journal of Current Science and Studies 1(1): 46 - 49.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. (2001). Microbiology: An introduction. San Francisco: Benjamin Cummings.
- Wang, J., Ma, W. and Wang, X. (2021). Insights into the structure of *Escherichia coli* outer membrane as the target for engineering microbial cell factories. Microbial Cell Factories 20(73): 1 - 17. doi: 10.1186/s12934-021-01565-8.
- Wannasiri, S., Jaijoy, K., Chiranthanut, N., Soonthornchareonnon, N. and Sireeratawong, S. (2015). Effect of Tri-sa-maw recipe on gastrointestinal regulation and motility. Journal of the Medical Association of Thailand 98(Suppl.2): S1 - S7.
- Zakaria, M.N., Putri1, Y.S., Rahaju, A., Fatmawati, S. and Cahyanto, A. (2021). Inhibitory effect of calcium hydroxide combined with *Nigella sativa* against *Enterococcus faecalis*. Dental Journal 54(4): 181-185.

