นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ของสมุนไพรไทยต่อการเกาะกลุ่มของ *Escherichia coli* O157: H7

สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ[1] ศิลาวรรณ วรรณมณี[1] และ ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย[2]

Abstract

Limsuwan, S., Vanmanee, S., and Voravuthikunchai, S.
Effect of Thai medicinal plant extracts on cell aggregation of *Escherichia coli* O157: H7.
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 2) : 545-554

Medicinal plants have been used for treating diarrhoea but the interference mechanisms are not clearly understood. One possible hypothesis is that of an effect on cell surface hydrophobicity of microbial cells. In this study, we examined cell aggregation affected by crude extracts of Thai medicinal plants on cell surface hydrophobicity of *Escherichia coli* strains by salt aggregation test. Correlation between minimal inhibitory concentration and cell aggregation was performed. Aqueous and ethanolic extracts of 8 medicinal plants including *Acacia catechu, Holarrhena antidysenterica, Peltophorum pterocarpum, Piper sarmentosum, Psidium guajava, Punica granatum, Quercus infectoria,* and *Tamarindus indica* were tested with *E. coli* O157: H7 and other *E. coli* strains isolated from human, porcine, and foods. Aqueous extracts of *Peltophorum pterocarpum, Psidium guajava,* and *Punica granatum* were highly effective against *E. coli* O157: H7 with the MIC values of 0.09 to 0.39, 0.19 to 0.78, and 0.09 to 1.56 mg/ml, respectively. Ethanolic extract of *Quercus infectoria* and *Punica granatum* demonstrated good MIC values of 0.09 to 0.78, and 0.19 to 0.78 mg/ml, respectively. It was established that aqueous extracts of *Punica granatum* and *Piper sarmentosum* at high concentration (25 mg/ml) enhanced cell aggregation of almost all *E. coli* strains while aqueous and ethanolic extracts of *Quercus infectoria* enhanced cell aggregation of some *E. coli* strains. Correlation between minimal inhibitory concentration and cell aggregation was not found in this study.

Key words : *Escherichia coli* O157: H7, medicinal plants, salt aggregation test, hydrophobicity

Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

[1]นักศึกษาหลักสูตร วท.บ. สาขาจุลชีววิทยา, [2]Ph.D. (Microbiology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail : bslimsuwan@yahoo.com

รับต้นฉบับ 2 พฤศจิกายน 2547 รับลงพิมพ์ 24 มกราคม 2548

บทคัดย่อ

สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ ศิลาวรรณ วรรณมณี และ ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย

ฤทธิ์ของสมุนไพรไทยต่อการรวมกลุ่มของ *Escherichia coli* O157: H7

ว.สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 2) : 545-554

กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคท้องเสียจากแบคทีเรียยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจนสมมุติฐานหนึ่งก็คือสมุนไพรมีผลต่อสภาวะ hydrophobicity ของเชื้อ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเกิดการรวมกลุ่ม (aggregation) ระหว่างสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรไทยกับเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี salt aggregation test และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory concentration) กับการรวมกลุ่มของแบคทีเรีย *Escherichia coli* O157: H7 รวมทั้งสายพันธุ์อื่น ๆ ที่แยกได้จากคน สุกร และอาหาร รวมทั้งหมด 15 สายพันธุ์ โดยใช้สารสกัดหยาบด้วยน้ำและ ethanol จากพืชสมุนไพรไทย 8 ชนิด ได้แก่ ชะพลู (*Piper sarmentosum*) ทับทิม (*Punica granatum*) นนทรี (*Peltophorum pterocarpum*) เบญกานี (*Quercus infectoria*) ฝรั่ง (*Psidium guajava*) มะขาม (*Tamarindus indica*) โมกหลวง (*Holarrhena antidysenterica*) และ สีเสียดเหนือ (*Acacia catechu*) พบว่าสารสกัดหยาบด้วยน้ำ 3 ชนิด ที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้ง *E. coli* O157: H7 ได้แก่ สารสกัดหยาบจากนนทรี ฝรั่งและทับทิม โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 0.39, 0.19 ถึง 0.78 และ 0.09 ถึง 1.56 มก./มล. ตามลำดับ สารสกัดหยาบด้วย ethanol ที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้ง *E. coli* O157: H7 ได้แก่ สารสกัดหยาบจากเบญกานีและทับทิม มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 0.78 และ 0.19 ถึง 0.78 มก./มล. ผลการศึกษา SAT พบว่าสารสกัดหยาบด้วยน้ำจากทับทิมและชะพลูที่ความเข้มข้น 25 มก./มล. มีผลไปเพิ่มการเกิดการรวมกลุ่มของ *E. coli* ได้ดีเกือบทุกสายพันธุ์ สารสกัดหยาบด้วยน้ำและ ethanol จากเบญกานีมีผลไปเพิ่มการเกิดการรวมกลุ่มของ *E. coli* ได้บางสายพันธุ์ การทดลองนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรกับการเกิดรวมกลุ่มของเซลล์

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) โดยเฉพาะ serotype O157: H7 (Wells *et al.*, 1995; Paton and Paton, 1998) เป็นสาเหตุของโรคท้องเสีย (Pai *et al.*, 1988) ลำไส้อักเสบที่มีอาการเลือดออกร่วม (haemorrhagic colitis) กลุ่มอาการไตบกพร่องเนื่องจากเม็ดเลือดแดงแตก (haemolytic-uremic syndrome, HUS) และภาวะเกร็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenic purpura, TTP) (Yoh *et al.*, 1997) โดย Verocytotoxin (VT) 1 และ VT 2 ที่ปล่อยจากเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการก่อโรค (Scotland *et al.*, 1985) แม้ว่าจะไม่มีรายงานการดื้อยามากนัก แต่มีรายงานจาก Yoh และคณะ (1999) พบว่าความเข้มข้นที่ระดับ subinhibitory ของยากลุ่ม macrolides มีผลกระตุ้นให้เชื้อปล่อย VT 1 และ VT 2 ซึ่งทำให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น

Vieira และคณะ (2001) นำสารสกัดหยาบจากใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคท้องร่วง พบว่าสามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Voravuthikunchai และคณะ (2004a) ได้ศึกษาสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรไทย 38 ชนิด พบว่ามีเพียง 8 ชนิด ได้แก่ *Acacia catechu, Holarrhena antidysenterica, Peltophorum pterocarpum, Psidium guajava, Punica granatum, Quercus infectoria, Uncaria gambir* และ *Walsura robusta* ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* O157: H7 และยังพบว่าสมุนไพรในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย Gram-negative อื่น ๆ ที่ก่อโรค อาทิเช่น *Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi* และ *Shigella sonnei* (Voravuthikunchai *et al.*, 2004b)

กลไกการยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียโดยสารสกัดจากสมุนไพรยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด กลไกที่สำคัญอย่างหนึ่งในการก่อโรคของแบคทีเรียในกลุ่ม Gram-negative ได้แก่ ความสามารถในการยึดเกาะกับ host cell ที่จำเพาะกัน โดยใช้ adhesin เช่น pili (Jallat *et al.*, 1994; Li and McLansborough, 1999; Bernett *et al.*, 2000; Takeuchi

et al., 2000; Gopal *et al.*, 2001) และแรงยึดเหนี่ยวที่ไม่จำเพาะ เช่น hydrophobic force (Gibbson, 1992) Turi และคณะ (1997) พบว่าสารสกัดจาก wild chamomile และ marigold ซึ่งไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแต่มีผลไปลด hydrophobicity จึงสามารถยับยั้งการรวมกลุ่มของ *E. coli* และ *Acinetobacter baumannii* ส่วนสารสกัดจาก bearberry และ St. John's wort ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อและทำให้ hydrophobicity ของเชื้อ 2 ชนิดนี้เพิ่มขึ้น จึงเพิ่มการเกิดการรวมกลุ่ม การที่สารสกัดจากสมุนไพรทำให้ hydrophobicity เพิ่มขึ้น ทำให้เชื้อเกิดการรวมกลุ่มกันได้เอง ซึ่งทำให้เชื้อถูกขับออกโดยกระบวนการของร่างกายได้ง่ายหรือทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายกำจัดเชื้อได้ง่ายขึ้น ในขณะเดียวกันเมื่อ hydrophobicity ของเชื้อลดลง อาจมีผลทำให้เชื้อเกาะติดกับผนังลำไส้ได้ไม่ดี เชื้อจึงถูกขับออกจากร่างกายได้ง่ายเช่นกัน นอกจากนี้การศึกษาของ Annuk และคณะ (1999) พบว่าสารสกัดจาก bearberry และ cowberry สามารถเพิ่ม hydrophobicity ของ *Helicobacter pylori* จึงทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเชื้อได้ดี

ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นโดยเฉพาะในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาที่ไม่มีมาตรการเข้มงวดในการใช้ยาปฏิชีวนะ ในประเทศที่เจริญแล้วที่มีศักยภาพในการคิดค้นตัวยาใหม่ ๆ และไม่ได้ให้ความสนใจศึกษาพืชสมุนไพรมากนัก ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของพืชสมุนไพรไทย เพื่อที่จะเป็นแนวทางใช้ในการพัฒนายาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เป็นการทดแทนยาปฏิชีวนะที่มีราคาแพงและลดปัญหาเชื้อดื้อยา

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรไทย 8 ชนิด ต่อ *E. coli* จำนวน 15 สายพันธุ์ และได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสมุนไพรกับ hydrophobicity โดยดูผลจากค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และการรวมกลุ่มของแบคทีเรีย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อแบคทีเรีย

Escherichia coli จำนวน 15 สายพันธุ์ ได้แก่ RIMD 0509952 O157: H7, RIMD 05091078 O157: H7, RIMD 05091083 O157: H7, RIMD 05091055 O26: H11, RIMD 05091556 O22 และ RIMD 05091056 O111: NM แยกได้จากคนญี่ปุ่นในการระบาดปี ค.ศ. 1997 โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Takeshi Honda, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University ประเทศญี่ปุ่น PSU 001 O157: H7, PSU 002 O157: H7 และ PSU 003 O157: H7 เป็นเชื้อที่แยกได้จากอาหาร สายพันธุ์ 238/1, 3198/3, 3732/3, 3738/1 และ 3740/1 แยกได้จากสุกร โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และ นพ.วิวิทย์ ศมศานติ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และใช้ ATCC 25922 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง

2. พืชสมุนไพร

คัดเลือกส่วนของสมุนไพรจากสมุนไพร 8 ชนิด ที่ใช้ในตำรับยาพื้นบ้านในการรักษาโรคท้องเสีย ได้แก่ ลำต้นแห้งของสีเสียดเหนือ (*Acacia catechu* (L. f.) Willd.) โมกหลวง (*Holarrhena antidysenterica* (L.) Wall. ex A. DC.) และนนทรี (*Peltophorum pterocarpum* (DC.) Backer ex K. Heyne) ชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) ฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) และมะขาม (*Tamarindus indica* L.) ใช้ใบสด ทับทิม (*Punica granatum* L.) ใช้เปลือกผลแห้ง เบญกานี (*Quercus infectoria* Oliv.) ใช้ปูด (gall) แห้ง ตัวอย่างพืช voucher specimens เก็บไว้ที่ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัช พฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

3. การเตรียมสารสกัด

บดสมุนไพรให้ละเอียดแล้วนำไปแช่น้ำ และ ethanol 95% นำสารละลายที่ได้มาระเหยแห้ง จากนั้นชั่งสารสกัดหยาบที่ระเหยแห้งแล้ว 0.25 กรัม ใส่ในขวดไร้เชื้อ เติม dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) 1 มล. ได้สารสกัดความเข้มข้น 250 มก./มล. เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองตรวจเช็คการปลอดเชื้อของสารสกัด ทำได้โดยนำ

ไปลาก (streak) บน nutrient agar (NA, Difco) แล้วนำไปบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง ถ้ามีเชื้อปนเปื้อน ในสารสกัดนำไปกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.45 มม. ที่ทนต่อ DMSO

4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration (MIC)) โดยวิธี agar microdilution (Lorian, 1998)

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA ที่ 35 °C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อลงใน Mueller Hinton broth (Difco) บ่มต่อที่ 35 °C เป็นเวลา 3 ถึง 8 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความเข้มข้นให้ได้ 0.5 McFarland ในน้ำเกลือ 0.85% ที่ปลอดเชื้อ เจือจางสารสกัดหยาบแบบลำดับสองด้วย DMSO ทั้งหมด 12 ความเข้มข้น โดยใช้สารสกัดความเข้มข้นเริ่มต้น 250 มก./มล. จากนั้นนำไปผสมกับ melted Mueller Hinton agar (Difco) ในอัตราส่วน 1:10 ใช้ micropipette ดูดขึ้นลงเพื่อให้อาหารกับสารสกัดเข้ากันดี จากนั้นนำไปหยดลงใน microtiter plate หากเกิดฟองอากาศ ใช้ปลายเข็มเขี่ยเชื้อที่ปราศจากเชื้อจิ้มให้ฟองแตก เนื่องจากฟองอากาศจะทำให้หน้าวุ้นเป็นโพรงและอ่านผลยาก จากนั้นปล่อยให้อาหารแข็ง ทำการถ่ายเชื้อ 1 μl ลงในแต่ละหลุม หลุมที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เชื้อไม่เจริญคือหลุมที่เป็นค่า MIC ทำซ้ำ 2 ครั้ง และอ่านค่าเฉลี่ย ในการทดลองนี้ใช้ใช้ยาปฏิชีวนะ ampicillin, ciprofloxacin และ gentamicin เป็นยามาตรฐานทดลองเปรียบเทียบ

5. การทดสอบการเกิดการเกาะกลุ่มโดย salt aggregation test (SAT) (ดัดแปลงจาก Turi *et al.*, 1997)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบน NA ที่ 35 °C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาปรับความเข้มข้นให้ได้ 5 McFarland โดยใช้ 0.04 M phosphate (Pp) buffer pH 6.8 ดูด ammonium sulfate (Sigma) แต่ละความเข้มข้น (0.1 M, 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M และ 5.0 M) ใส่ microtiter plate หลุมละ 50 μl แล้วดูดเชื้อ ปริมาตร 50 μl ใส่ลงในแต่ละหลุมที่มี 50 μl ของสารละลาย ammonium sulfate โดยในแต่ละความเข้มข้นของ ammonium sulfate ทำ 2 ซ้ำ เขย่าเบา ๆ 5 นาที นำไปบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นอ่านผลจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า แปลผลโดยอ่านจากค่า SAT titer คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ ammonium sulfate ที่ทำให้เชื้อเกิดการรวมกลุ่ม

6. SAT assay กับสารสกัด

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบน NA ที่ 35 °C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อมาปรับความเข้มข้นให้ได้ 5 McFarland โดยใช้ 0.04 M Pp buffer pH 6.8 ดูด ammonium sulfate แต่ละความเข้มข้น (0.1 M, 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M และ 5.0 M) ใส่ microtiter plate หลุมละ 50 μl จากนั้นนำเชื้อแต่ที่ปรับ McFarland แล้ว 9 ส่วน ผสมกับสารสกัด ชนิดละ 1 ส่วน (ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเท่ากับ 25 มก./มล. หรือที่ค่า MIC) ทิ้งไว้ 15 นาที ดูดเชื้อที่ได้ผสมกับสารสกัดปริมาตร 50 มล. ใส่ลงในแต่ละหลุมที่มี 50 **มล.** ของสารละลาย ammonium sulfate เขย่าเบา ๆ 5 นาที แล้วนำไปบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นอ่านผลจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า และแปลผลโดยอ่าน จากค่า SAT titer ทำการทดลอง 2 ซ้ำ High aggregative คือ เกิดการรวมกลุ่ม กับ 0.04 M Pp buffer pH 6.8 และ/หรือ ที่มี SAT titer 0.05 ถึง 0.25 Low aggregative คือ เกิดการรวมกลุ่มที่ค่า SAT titer อยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 1.5 Non aggregative คือ ไม่เกิดการรวมกลุ่ม ที่ความเข้มข้นของ ammonium sulfate เท่ากับ 1.5 M หรือมากกว่า

ผลการทดลอง และวิจารณ์

จาก Table 1 พบว่าสารสกัดหยาบที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ทั้ง 15 สายพันธุ์ได้ดีที่สุดคือสารสกัดหยาบจาก *Quercus infectoria* ด้วย ethanol โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 0.78 มก./มล. รองลงมาคือสารสกัดหยาบจาก *Peltophorum pterocarpum* ด้วยน้ำ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 1.56 มก./มล. เมื่อพิจารณาตามแหล่งที่มาของเชื้อ *E. coli* คือ สายพันธุ์ที่แยกจากคน อาหาร และสุกร สารสกัดหยาบด้วย ethanol จาก *Quercus infectoria* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทั้ง 3 กลุ่มได้ดีที่สุด โดย

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) of aqueous and ethanolic crude extracts of medicinal plants by agar microdilution method.

E. coli strains	MIC (mg/ml)							
	Acacia catechu	*Holarrhena antidysenterica*	*Peltophorum pterocarpum*	*Piper sarmentosum*	*Psidium guajava*	*Punica granatum*	*Quercus infectoria*	*Tamarindus indica*
RIMD 0509952 O157: H7	1.15* 0.97$^{\tau}$	1.56 >25.00	0.09 25.00	25.00 3.12	0.78 3.13	0.09 0.78	1.56 0.78	12.50 12.50
RIMD 05091078 O157: H7	1.56 0.78	25.00 6.25	0.39 0.39	12.50 6.25	0.19 1.56	1.56 0.19	0.78 0.09	12.50 >25.00
RIMD 05091083 O157: H7	3.13 0.78	25.00 6.25	0.39 1.56	12.50 0.39	0.39 0.78	0.09 0.19	25.00 0.78	1.56 25.00
RIMD 05091056 O111: NM	6.25 3.13	6.25 >25.00	0.09 0.39	25.00 3.13	0.78 3.13	0.78 0.39	1.56 0.78	12.50 12.50
RIMD 05091556 O22	3.13 0.78	12.50 6.25	1.56 6.25	12.50 6.25	1.56 1.56	0.39 0.19	25.00 0.78	6.25 >25.00
RIMD 05091055 O26: H11	6.25 3.13	1.56 >25.00	0.09 25.00	25.00 3.13	6.25 12.50	0.78 1.56	1.56 0.78	12.50 12.50
238/1	1.56 0.78	>25.00 6.25	1.56 25.00	12.50 6.25	3.13 6.25	>25.00 6.25	25.00 0.78	6.25 25.00
3198/3	0.39 0.19	>25.00 1.56	1.56 1.56	12.50 12.50	0.19 1.56	1.56 1.56	25.00 0.78	0.78 >25.00
3732/3	1.56 1.56	25.00 12.50	0.78 0.78	12.50 >25.00	1.56 6.25	3.13 3.13	25.00 0.78	12.50 >25.00
3738/1	3.13 1.56	25.00 12.50	1.56 1.56	12.50 >25.00	1.56 6.25	6.25 3.13	25.00 0.78	12.50 >25.00
3740/1	1.56 3.13	25.00 12.50	0.78 25.00	12.50 >25.00	0.39 6.25	3.13 3.13	3.13 0.78	12.50 >25.00
PSU 001 O157: H7	0.78 0.78	25.00 6.25	0.19 0.09	6.25 12.50	0.05 1.56	0.19 0.39	0.78 0.39	12.50 25.00
PSU 002 O157: H7	3.13 1.56	>25.00 6.25	0.78 3.13	12.50 6.25	1.56 6.25	>25.00 12.50	25.00 0.78	12.50 >25.00
PSU 003 O157: H7	3.13 1.56	>25.00 6.25	1.56 3.13	12.50 12.50	1.56 6.25	>25.00 3.13	12.50 0.78	12.50 >25.00
ATCC 25922	3.13 0.78	>25.00 6.25	1.56 3.13	12.50 6.25	3.13 6.25	>25.00 3.13	25.00 0.78	6.25 25.00

*** = Aqueous extracts, $^{\tau}$ = Ethanolic extracts.**

มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 0.78, 0.78 และ 0.39 ถึง 0.78 มก./มล. ตามลำดับ รองลงมาได้แก่สารสกัดหยาบจาก *Peltophorum pterocarpum* ด้วยน้ำ มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 1.56, 0.78 ถึง 1.56 และ 0.19 ถึง 1.56 มก./มล. ตามลำดับ หากพิจารณาเฉพาะ *E. coli* O157: H7 พบว่ามีสารสกัดหยาบด้วยน้ำ 3 ชนิดที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้ง *E. coli* O157: H7 ได้แก่ สารสกัดหยาบจาก *Peltophorum pterocarpum, Psidium guajava* และ *Punica granatum* โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 0.39, 0.19 ถึง 0.78 และ 0.09 ถึง 1.56 มก./มล. ตามลำดับ และสารสกัดหยาบด้วย ethanol 2 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดี ได้แก่ สารสกัดหยาบจาก *Quercus infectoria* และ *Punica granatum* มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 0.78 และ 0.19 ถึง 0.78 มก./มล.

E. coli เกือบทุกสายพันธุ์ไม่เกิดการรวมกลุ่มกับ ammonium sulfate แปลผล SAT titer ได้เป็น non aggregative ยกเว้น *E. coli* ATCC 25922 ที่เกิดการรวมกลุ่มกับ ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 0.75 และ 1.5 M แปลผล SAT titer ได้เป็น low aggregative (Table 2) สารสกัดหยาบด้วยน้ำและ ethanol ที่ความเข้มข้น 25 มก./มล. จากสมุนไพรเกือบทุกชนิดเกิดการรวมกลุ่มกับ ammonium sulfate ส่วนใหญ่แปลผล SAT titer ได้เป็น high aggregative ยกเว้น *Piper sarmentosum* และ *Punica granatum* ที่สกัดด้วยน้ำ แปลผลเป็น low aggregative และสารสกัดหยาบจาก *Quercus infectoria* ที่สกัดด้วยน้ำและ ethanol จัดเป็น non aggregative เนื่องจากไม่เกิดการรวมกลุ่มกับ ammonium sulfate ทุกๆ ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (Table 3)

เนื่องจากสารสกัดหยาบด้วยน้ำและ ethanol จากพืชสมุนไพรเกือบทุกชนิดมีลักษณะเป็น high aggregative เมื่อนำมาทดสอบการเกิดการรวมกลุ่มกับ *E. coli* พบว่า เป็น high aggregative (Table 4) จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากสมุนไพรมีผลต่อสภาวะ hydrophobicity ของเชื้อ ยกเว้นสารสกัดหยาบบางชนิด ได้แก่ สารสกัดหยาบด้วยน้ำจาก *Piper sarmentosum* และ *Punica granatum* ซึ่งมีผลไปเพิ่มการเกิดการรวมกลุ่มของ *E. coli* ได้ดีเกือบ

Table 2. Salt aggregation test (SAT) of *Escherichia coli* strains with ammonium sulfate.

E. coli strains	ammonium sulfate (M)					Controls			Results of SAT titer
	1.5	0.75	0.5	0.25	0.05	Pp buffer	H_2O	DMSO	
RIMD 0509952 O157: H7	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
RIMD 05091078 O157: H7	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
RIMD 05091083 O157: H7	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
RIMD 05091056 O111: NM	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
RIMD 05091556 O22	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
RIMD 05091055 O26: H11	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
238/1	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
3198/3	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
3732/3	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
3738/1	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
3740/1	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
PSU 001 O157:H7	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
PSU 002 O157: H7	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
PSU 003 O157: H7	-	-	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
ATCC 25922	+	+	-	-	-	-	-	-	Low aggregative

+ = Aggregation, - = Non aggregation.

Table 3. Salt aggregation test (SAT) of aqueous and ethanolic extracts of medicinal plants (25 mg/ml) with ammonium sulfate.

Crude extracts	ammonium sulfate (M)					Pp buffer	Results of SAT titer
	1.5	0.75	0.5	0.25	0.05		
Acacia catechu	+*	+	+	+	-	-	High aggregative
	+ᵀ	+	+	+	+	-	High aggregative
Holarrhena antidysenterica	+	+	+	+	+	+	High aggregative
							High aggregative
Peltophorum pterocarpum	+	+	+	+	+	-	High aggregative
	+	+	+	+	+	-	High aggregative
Piper sarmentosum	+	+	+	-	-	-	Low aggregative
	+	+	+	+	+	-	High aggregative
Psidium guajava	+	+	+	+	-	-	High aggregative
	+	+	+	+	+	-	High aggregative
Punica granatum	+	-	-	-	-	-	Low aggregative
	+	+	+	+	+	+	High aggregative
Quercus infectoria	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
	-	-	-	-	-	-	Non aggregative
Tamarindus indica	+	+	+	+	+	-	High aggregative
	+	+	+	+	+	+	High aggregative

*** = Aqueous extracts, ᵀ = Ethanolic extracts, + = Aggregative, - = Non aggregative**

ทุกสายพันธุ์ โดยเปลี่ยนลักษณะการรวมกลุ่มจาก non aggregative เป็น high aggregative ส่วนสารสกัดหยาบด้วยน้ำและ ethanol จาก *Quercus infectoria* มีผลไปเพิ่มการเกิดการรวมกลุ่มของ *E. coli* บางสายพันธุ์ เช่น *E. coli* ATCC 25922 เปลี่ยนจากสายพันธุ์ที่เป็น low aggregative เป็น high aggregative ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบด้วยน้ำจาก *Punica granatum* และ *Piper sarmentosum* รวมทั้งสารสกัดหยาบด้วยน้ำและ ethanol จาก *Quercus infectoria* สามารถเพิ่ม hydrophobicity ของ *E. coli* Lawrence (1951) พบว่าในเปลือกผลของ *Punica granatum* มีปริมาณของ tannin สูงประมาณ 22-25% Turi และคณะ (1999) พบว่าปริมาณของ tannin มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อ โดยสารที่มี tannin สูงจะยับยั้งเชื้อได้ดีและทำให้มีการเกิดการรวมกลุ่ม

การเกิดการรวมกลุ่มระหว่างสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC กับ *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ (Table 5) พบว่ามีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ ชนิดของสมุนไพร และสารสกัด โดยภาพรวมแล้วที่ MIC การเกิดการรวมกลุ่มของเชื้อขึ้นกับความเข้มข้นของสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ กล่าวคือ สมุนไพรที่มีค่า MIC สูง มีปริมาณเนื้อสมุนไพรมากทำให้เกิดการรวมกลุ่มได้ดี โดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า ไม่สามารถแยกได้ชัดเจนว่าเป็นการเกิดการรวมกลุ่มกันเองของสมุนไพร การรวมกลุ่มของเชื้อ หรือการรวมกลุ่มของเชื้อกับสมุนไพร เพราะลักษณะการเกิดการรวมกลุ่มมีความใกล้เคียงกัน การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนอาจทำให้อธิบายได้ชัดเจนขึ้น

Table 4. Salt aggregation test (SAT) of *Escherichia coli* strains with crude medicinal plant extracts (25 mg/ml).

E. coli strains	Result of SAT titer							
	Acacia catechu	*Holarrhena antidysenterica*	*Peltophorum pterocarpum*	*Piper sarmentosum*	*Psidium guajava*	*Punica granatum*	*Quercus infectoria*	*Tamarindus indica*
RIMD 0509952 O157: H7	H*/H$^{\tau}$	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	N/L	H/H
RIMD 05091078 O157: H7	H/H	H/H	H/H	N/H	H/H	H/H	N/L	H/H
RIMD 05091083 O157: H7	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	N/N	H/H
RIMD 05091056 O111: NM	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	N/L	H/H
RIMD 05091556 O22	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/N	H/H
RIMD 05091055 O26: H11	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/L	H/H
238/1	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	N/N	H/H
3198/3	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	N/N	H/H
3732/3	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	N/N	L/H
3738/1	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	N/N	L/H
3740/1	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	N/N	H/H
PSU 001 O157: H7	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	L/L	H/H
PSU 002 O157: H7	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	N/L	H/H
PSU 003 O157: H7	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	L/L	H/H
ATCC 25922	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H	H/H

*** = Aqueous extracts, $^{\tau}$ = Ethanolic extracts, H = High aggregative, L = Low aggregative, N = Non aggregative.**

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ทั้ง 15 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด ได้แก่ สารสกัดหยาบด้วย ethanol จาก *Quercus infectoria* รองลงมาคือสารสกัดหยาบด้วยน้ำจาก *Peltophorum pterocarpum* ผลการศึกษา SAT พบว่า *E. coli* เกือบทุกสายพันธุ์ไม่เกิดการรวมกลุ่มกับ ammonium sulfate จัดเป็น non aggregative ยกเว้น *E. coli* ATCC 25922 ที่เป็น low aggregative สารสกัดหยาบด้วยน้ำจาก *Punica granatum* และ *Piper sarmentosum* มีผลไปเพิ่มการเกิดการรวมกลุ่มของ *E. coli* ได้ดีเกือบทุกสายพันธุ์ สารสกัดหยาบด้วยน้ำและ ethanol จาก *Quercus infectoria* มีผลไปเพิ่มการเกิดการรวมกลุ่มของ *E. coli* ได้บางสายพันธุ์ โดยรวมแล้วความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่ใช้ทดสอบไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดการรวมกลุ่มของ *E. coli* ทั้ง 15 สายพันธุ์ เนื่องจากพืชสมุนไพรที่ศึกษาหาได้ง่ายในท้องถิ่น ราคาไม่แพงและสกัดง่าย ดังนั้นจึงควรศึกษาต่อในรายละเอียดเพื่อหาสารบริสุทธิ์ส่วนที่มีฤทธิ์ดีเพื่อที่จะนำมาพัฒนาใช้เป็นยาต้านแบคทีเรียต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก Thailand-Tropical Diseases Research Programme. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ID 02-1-ENT-07-042) ปี 2004-2005

Table 5. Salt aggregation test (SAT) of *Escherichia coli* strains with crude medicinal plant extracts at concentration of minimal inhibitory concentration (MIC).

E. coli strains	Result of SAT titer							
	Acacia catechu	*Holarrhena antidysenterica*	*Peltophorum pterocarpum*	*Piper sarmentosum*	*Psidium guajava*	*Punica granatum*	*Quercus infectoria*	*Tamarindus indica*
RIMD 0509952 O157: H7	L*/N[†]	N/ND	N/H	H/H	H/H	L/L	N/N	H/H
RIMD 05091078 O157: H7	L/N	H/H	L/H	L/H	L/H	N/N	N/N	ND/H
RIMD 05091083 O157: H7	L/L	H/H	L/H	L/H	L/H	N/N	N/N	N/H
RIMD 05091056 O111: NM	L/L	N/H	L/H	H/H	H/H	N/N	L/N	L/H
RIMD 05091556 O22	L/L	H/H	L/H	L/H	H/H	N/L	H/H	L/ND
RIMD 05091055 O26: H11	L/L	N/H	N/H	L/H	H/H	N/N	N/N	L/H
238/1	L/L	ND/H	H/H	L/H	H/H	ND/H	N/N	L/H
3198/3	N/N	ND/H	H/H	L/H	H/H	N/H	N/L	N/ND
3732/3	L/L	H/H	H/H	L/ND	H/H	L/H	N/L	L/ND
3738/1	N/N	H/H	N/H	L/ND	H/H	N/H	N/N	ND/H
3740/1	L/N	H/H	L/H	L/ND	L/H	N/H	N/N	L/ND
PSU 001 O157: H7	N/L	H/H	N/H	L/H	L/H	N/L	N/L	H/H
PSU 002 O157: H7	N/N	ND/H	N/H	L/H	H/H	ND/H	N/L	ND/L
PSU 003 O157: H7	L/N	ND/H	N/H	L/H	L/H	ND/H	N/N	L/ND
ATCC 25922	H/H	ND/H	H/H	H/H	H/H	ND/H	H/H	L/H

*** = Aqueous extracts, [†] = Ethanolic extracts, H = High aggregative, L = Low aggregative, N = Non aggregative, ND = Not done.**

เอกสารอ้างอิง

Annuk, H., Hirmo, S., Turi, E., Mikelsaar, M., Arak, E., and Wadstrom, T. 1999. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. FEMS., 72: 41-45.

Burnett, S.L., Chen, J., and Beuchat, L.R. 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157: H7 to the surface and intestinal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. Appl. Env. Microbiol., 66: 4679-4687.

Gibbson, R.J., 1992. Bacterial attachment to host tissue. **In,** Gorbach, S.L. (Ed), Infect. Dis., W.B., Saunders, Philadelphia., 10: 7-17.

Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., and Gill, H.S. 2001. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an entertoxigenic *Escherichia coli.* Intl. J. Food Microbiol., 67: 207-216.

Jallat, C., Darfeuille-Michaud, A., Rich, C., and Joly, B. 1994. Survey of clinical isolates of diarrhoeagenic *Escherichia coli*: diffusely adhering *E. coli* strains with multiple adhesive factors. Res. Microbiol., 145: 621-632.

Li, J., and McLansborough, L.A. 1999. The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. Intl. J. Food

Microbiol., 53: 185-193.

Lawrence, G.H.M. 1951. Taxonomy of vascular plants. New York. Macmilan publishing Co., INC.

Lorian, V. 1996. Antibiotic in Laboratory Medicine, 4th edn. Williams and Wilkins, Baltimore.

Pai, C.H., Ahmed, N., Lior, H., Johnson, W.M., Sims, H.V., and Woods, D.E., 1988. Epidemiology of sporadic diarrhea due to Verocytotoxin- producing *Escherichia coli*: a 2-year prospective study. J. Infect. Dis., 157: 1054-1057.

Paton, J.C., and Paton, A.W., 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections., Clin. Microbiol. Rev., 11: 450-497.

Scotland, S.M., Smith, H.R., and Rowe, B., 1985. Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* O157. Lancet ii., 885-886.

Takeuchi, K., Matute, C.M., Hassan, A.N., and Frank, J.F. 2000. Coparison of attachment of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas flrorescens* to lettuce leaves. J. Food Protection., 63:1433-1437.

Turi, M., Turi, E., Koljalg, S., and Mikelssar, M. 1997. Influence of aqueous extract of medicinal plants on surface hydrophobicity of *Escherichia coli* strain of different origin. APMIS., 105: 956-965.

Vieira, R.H., Rodigues, D.D., Gon calves, F.A., Menezes, F.G., Aragao, J.S., and Sousa, O.V. 2000. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* Linn. and *Carica papaya* Linn.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo., 43: 145-148.

Voravuthikunchai, S.P., Lorthrrranuwat, A., Jeeju, W., Sririrak, T., Phongpaichit, S. and Supawita, T. 2004a. Effective medicinal plants against enterohaemorrhargic *Escherichia coli* O157: H7. J. Ethnopharmacol., 94: 49-54.

Voravuthikunchai, S.P., Popapy, W. and Supavita, T. 2004b. Antibacterial activity of crude extracts of medicinal plants used in Thailand against pathogenic bacteria. J. Ethnopharmacologia., 33: 60-65.

Wells, T., Barrett, J., and Griffin, P.M. 1995. A university of outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course. J. Infect. Dis., 172 : 1122-1125.

Yoh, M., Frimpong, E.K., and Honda, T. 1997. Effect of antimicrobial agents, especially fosfomycin, on the production and release of vero toxin by enterohaemorrhargic *Escherichia coli* O157: H7. FEMS. Immunol. Med. Microbiol., 19: 54-64.

Yoh, M., Frimpong, E.K., Voravuthikunchai, S.P. and Honda, T. 1999. Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolonees and macrolide) on the production of verotoxin by enterohaemorrhargic *Escherichia coli* O157: H7. Can. J. Microbiol., 45: 732-739.