กิจกรรมต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดชะครามและการประยุกต์ใช้ในการขึ้นตำรับยาน้ำ

Antimicrobial activity of *Suaeda maritima* extracts and application in mixtures formulation

พรเทพ ศรีผง

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนู เมยดง

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกษม คงนิรันดรสุข

บทคัดย่อ

ปัญหาสำคัญที่ส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์และทางการสาธารณสุขนั้นคือการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารสกัดหยาบจากชะครามในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยใบถูกนำมาสกัดด้วยเอทานอล สารสกัดหยาบถูกนำมาทดสอบกิจกรรมต้านเชื้อก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่าสารสกัดหยาบจากชะครามสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบประกอบด้วย *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ต่อเชื้อ *E. coli* อยู่ที่ 78.125 µg/ml เมื่อนำสารสกัดหยาบจากชะครามที่ความเข้มข้น 1xMIC, 2xMIC และ 3xMIC ไปพัฒนาตำรับยาน้ำและศึกษาความคงตัวของยาน้ำภายใต้สภาวะเร่งด้วยวิธี Freeze - thaw cycling method พบว่าสูตรที่มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากชะครามที่ 3xMIC (320 µg/ml) ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* (โซนใสในการยับยั้ง 18.33 มิลลิเมตร) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากชะครามที่มีศักยภาพในการเป็นส่วนประกอบสำคัญของสูตรตำรับยาน้ำเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้

คำสำคัญ : ชะคราม กิจกรรมต้านเชื้อก่อโรค ความคงตัว เอทานอล ยาน้ำ

ABSTRACT

Infections caused by pathogenic bacteria affect a significant problem to human and public health. This research aimed to investigate the potential of crude extracts from *Suaeda maritima* to inhibit the gastrointestinal tract pathogenic bacteria. The leaves were extracted with ethanol. The crude extract was tested for antimicrobial activity by using agar well diffusion assay. The results showed that crude extracts from *S. maritima* leaves against bacterial tested strains including *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus*. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of 78.125 µg/ml were obtained to against *E. coli.* Further tests involved developing mixture formulas with the crude extract at concentrations of 1xMIC, 2xMIC, and 3xMIC, and tested for their stability under accelerated conditions using the freeze-

thaw cycling method. It was found that a formula containing the crude extract at a concentration of 3XMIC (320 µg/ml) remained effective in inhibiting *E. coli* (18.33 mm of inhibition zone). This study demonstrates that crude extracts from *S. maritima* l have the potential to be a significant component in mixtures formulation, which designed to inhibit pathogenic bacteria.

1. บทนำ

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคเป็นปัญหาด้านสุขภาพของมนุษย์และทางการสาธารณสุขของหลายประเทศ โดยเฉพาะก่อให้เกิดโรคท้องเสีย สาเหตุหลักเกิดจากการรับเชื้อเข้าสู่ร่างกายผ่านการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย หรือมีการฆ่าเชื้อที่ไม่สมบูรณ์จำพวกอาหารปรุงสุกๆ ดิบๆ และเครื่องดื่มที่บริโภคนั้นไม่สะอาด โดยเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญได้แก่ *Escherichia coli* (นิพนธ์ สนหอม และคณะ, 2565) *Pseudomonas aeruginosa* (Resko et al., 2024) *Staphylococcus aureus* (ชาสวานี อิแต และคณะ, 2566) และ *Bacillus cereus* (Jovanovic et al., 2021) เมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายของผู้บริโภค ผู้ป่วยมักจะปวดท้อง ถ่ายเหลว คลื่นไส้ อาเจียน บางรายอาจจะถ่ายเป็นมูกเลือดได้ โดยแพทย์จะรักษาตามอาการโดยพิจารณาให้ยาแผนปัจจุบัน กลุ่มยาที่เป็นเกลือแร่ ใช้รักษาอาการร่างกายขาดเกลือแร่จากท้องเสีย แต่ถ้าอาการที่เป็นอยู่ไม่ดีขึ้นแพทย์จะใช้กลุ่มยาปฏิชีวนะ เช่น ยากลุ่ม quinolones จะได้รับการเลือกใช้เป็นลำดับแรกเพื่อใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคท้องร่วงในการรักษา (Eibl et al., 2021) แต่ในปัจจุบันเริ่มมีการใช้โพรไบโอติกส์ (Probiotics) ในการป้องกันกันเกิดอาการท้องเสีย (Collinson et al., 2020) เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ดีเข้าไปในลำไส้แล้วจะจับที่บริเวณผิวของลำไส้และผลิตสารต่อต้านหรือสารกำจัดจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ เพื่อช่วยในการป้องกันการเกิดอาการท้องเสีย นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการใช้ยาสมุนไพรในการรักษาเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามปัจจุบันวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดที่เป็นที่ยอมรับกันคือการใช้ยาปฏิชีวนะ แต่การใช้ยาปฏิชีวนะที่นานต่อเนื่องหรือมากเกินความจำเป็นนั้นจะส่งผลให้เกิดแนวโน้มเชื้อแบคทีเรียดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น (สุวรรณดี ทรัพย์เจริญ, และณัฐชา ด้วงรัก, 2567) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยานั้นส่งผลให้ผู้ที่ติดเชื้อเสียชีวิตได้ ซึ่งในปี พ.ศ.2557 ทั่วโลกมีผู้ที่เสียชีวิตจากการติดเชื้อดื้อยาถึง 700,000 คน (ฮัสสณา หวันประรัตน์ และคณะ, 2565) จึงจำเป็นจึงต้องหาวิธีใหม่ ๆ มาใช้แทนยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้มีความสนใจในการใช้สารสกัดจากสมุนไพรหรือพืชเพิ่มขึ้น เช่น การใช้ยาเหลืองปิดสมุทร ที่มีส่วนประกอบหลักคือเหง้าขมิ้นชัน (ณัฐรดา บุรุษเหลี่ยม, 2565) จากการศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรพบว่า สารเคอร์คูมินอย ที่อยู่ในขมิ้นชันสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus และ S. aureus* ได้ (สุวรรณดี ทรัพย์เจริญ และณัฐชา ด้วงรัก, 2567) หรือสารสกัดจากเปลือกมังคุดและ ไพล สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Staphylococcus aureus* ได้ (สุรเดช มัจฉาเวช และคณะ, 2566) รวมทั้งการใช้สารสกัดโพรพอริส และ ฟ้าทะลายโจร ในการยับยั้งเชื้อ *Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhi, Shigella flexneri, Enterobacter aerogenes, Pseudomonas aeruginosa และ E. coli* และ *Enteroaggregative* (กีรติญา เอี่ยมถาวร, 2555) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับสารสกัดหยาบชะครามด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ โดยมีค่า MIC 2.5 mg/ml ในเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ (Krishnasree and Peddi, 2021) และจากการศึกษาของ Peddi et al. (2021) พบว่าสารสกัดหยาบจากชะครามสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis, P. aeruginosa* ได้ สำหรับในประเทศไทยชะครามถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารและสมุนไพรรักษาโรค เนื่องจากมีสารต้านอนุมูลอิสระและลดการอักเสบได้ เช่น โรคตับอักเสบ (Bilal and Hossain, 2019) ในส่วนของการแพทย์แผนไทยได้ถูกนำมาใช้รักษาโรคโกโนเรีย (วรรณา วัฒนา และคณะ, 2565)

จากข้อมูลที่กล่าวมาจะเห็นว่าชะครามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการสกัดสารสำคัญจากชะครามเพื่อศึกษากิจกรรมในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร เพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการขึ้นตำรับยาน้ำที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารได้

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดชะครามในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

2.2 เพื่อศึกษาความคงตัวเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ยาน้ำจากสารสกัดชะคราม

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แบคทีเรียก่อโรคและการสภาวะการเพาะเลี้ยง

แบคทีเรียก่อโรคทีก่อโรคที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ *Escherichia coli* DMST 4212, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 4739, *Staphylococcus aureus* DMST 562, และ *Bacillus cereus* DMST 5040 เลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth (MHB) บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส รอบเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 การสกัดสารออกฤทธิ์จากใบชะครามด้วยเอทานอล

นำใบชะครามมาอบแห้งก่อนสกัดและบดเป็นชิ้นเล็กๆ (อารีย์ และคณะ., 2559) โดยสารละลายที่ใช้ในการสกัดคือเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95 อัตราส่วน 1:10 หมักเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน

3.3 ทดสอบฤทธิ์การยังยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารด้วยวิธี agar well diffusion assay

นำสารสกัดชะครามที่ได้จากการสกัดใบชะคราม, ยาปฏิชีวนะ Norfloxacin (Chaina), ยาปฏิชีวนะ Tetracycline (Sigma-Aldrich, USA) และ Gallic Acid (Sigma-Aldrich, USA) มาเตรียมที่ความเข้มข้น 50,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนการทดสอบปรับให้มีความเข้มข้น 50 µg/ml โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวละลายสารสกัดก่อนนำมาทดสอบ ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยเริ่มจากการปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland no. 0.5 (10^7 CFU/ml) (Meidong et al., 2019) จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มลงในเชื้อแบคทีเรียก่อโรค นำมา Swab ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ให้ทั่วทั้งสามระนาบเพื่อให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคกระจายทั่วทั้งหมดของผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 2-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งสนิท นำ Cork Borer ขนาด 6 มิลลิเมตร เจาะหลุมในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหยดสารสกัดชะคราม ยาปฏิชีวนะ Norfloxacin ยาปฏิชีวนะ Tetracycline และ Gallic Acid ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อในหลุมควบคุม หยดลงในแต่ละหลุมจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งจากโซนใส (Clear Zone) ที่เกิดขึ้นวัดผลผการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทดสอบโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

3.4 การทดสอบหาความค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)

ในการทดสอบนี้ใช้ Mueller Hinton Broth (MHB) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และ ยาปฏิชีวนะ Norfloxacin ที่คัดได้จากข้อ 3.2.3 มาหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยเตรียมสารสกัดชะครามและยาปฏิชีวนะ Norfloxacin ให้มีความเข้มข้นที่ 50,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเป็นลำดับส่วนให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดและยาปฏิชีวนะเป็น 10,000, 5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5, 156.25, 78.125, 39.06 และ 19.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม

เชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ลงในทุกหลุมจำนวนหลุมละ 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาในการบ่ม ตรวจผลโดยการใช้เครื่องอ่านไมโครเพลต (Spectrostar Nano, Germany) ที่ 600 นาโนเมตรเพื่อดูค่าความขุ่นโดยเมื่อมีการเจริญให้เครื่องหมายบวก (+) หลุมที่ไม่มีความขุ่นไม่มีการเจริญให้เครื่องหมายลบ (-) โดยความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบจะเรียกความเข้มข้นนั้นว่า MIC

3.5 การทดสอบค่าหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น สามารถนำมาศึกษาต่อโดยนำหลุมที่ไม่มีการเจริญมาตรวจสอบการเจริญด้วยวิธี drop plate technique เพื่อหาค่า MBC (CLSI, 2011) ด้วยการหยดตัวอย่างหลุมที่ไม่มีการเจริญของสารทดสอบชนิดต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA รอให้แห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูความเข้มข้นของสารทดสอบที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีการเจริญในจานอาหารให้เครื่องหมายบวก (+) ส่วนสกัดที่ไม่มีการเจริญในจานอาหารให้เครื่องหมายลบ (-) การแปรผลคือความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อเจริญคือค่า MBC ของสารทดสอบต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคนั้น

3.6 การตั้งตำรับผลิตภัณฑ์ยาน้ำจากสารสกัดชะคราม

จากการ หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารนั้น สารสกัดชะครามสามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* DMST 4212 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 78.125 µg/ml และค่า MBC เท่ากับ 78.125 µg/ml ตามลำดับ จึงเลือกค่า MIC เท่ากับ 78.125 µg/ml มาทำการทดสอบต่อและสามารถพัฒนาการตั้งตำรับผลิตภัณฑ์ยาน้ำได้ 4 ตำรับ ในทุกตำรับจะมีส่วนประกอบทั้งหมดที่เหมือนกันแต่แตกต่างกัน โดยแบ่งตามความเข้มข้นของสารสกัดชะครามในแต่ละตำรับดังนี้ ตำรับที่ 1, ตำรับที่ 2, ตำรับที่ 3, และตำรับที่ 4 มีความเข้มข้นของสารสกัดชะครามที่ 0, 80 µg/ml, 160 µg/ml, และ 320 µg/ml ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

3.7 การทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ยาน้ำทั้ง 4 ตำรับ ภายใต้สภาวะเร่งด้วยวิธีการเก็บในที่ร้อนสลับเย็น (Freeze and thaw cycling method)

การทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ (Lertsatitthanakorn et al., 2014) โดยนำผลิตภัณฑ์ยาน้ำทั้ง 4 ตำรับ มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 45±2 องศาเซลเซียส อีก 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ (Heating-Cooling Cycle) ทำการทดสอบเช่นเดียวกันนี้ จนครบ 5 รอบ นำมาวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วบันทึกผลลักษณะทางกายภาพ ก่อนและหลัง (Freeze and thaw cycling method) โดยมีการบันทึก ลักษณะทางกายภาพโดยสังเกตจากลักษณะภายนอกของของผลิตภัณฑ์ยาน้ำ ได้แก่ ลักษณะสี การเกิดตะกอนและการแยกชั้นคุณสมบัติความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter และคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay (ตามวิธีในข้อ 3.3) โดยนำยาน้ำที่จะใช้ในการทดสอบไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที และกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 µm โดยใช้เชื้อ *Escherichia coli* DMST 4212 เป็นเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

3.8 การวิเคราะห์ผลด้วยวิธีทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยจาการทดลองในการศึกษาผลของการประสิทธิภาพของสารสกัดใบชะครามต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ และนำไปวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One Way Analysis of Variance ANOVA) เมื่อพบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan new Multiple Rang Test (DMRT)

4. สรุปผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดสารออกฤทธิ์จากใบชะคราม

ผลการสกัดสารออกฤทธิ์จากใบชะครามแห้งด้วยวิธีการหมักด้วยเอทานอล ได้ร้อยละของผลผลิตของสารสกัดหยาบจากใบชะคราม (*Suaeda maritima* crude extract; SM) สารสกัดหยาบจากใบชะครามที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวสีเขียวเข้ม น้ำหนักของสารสกัดหยาบใบชะครามเท่ากับ 287.24 กรัม คิดเป็นร้อยละผลผลิตสารสกัด (% Yield) เท่ากับ 28.72

4.2 ผลของสารสกัดหยาบจากชะครามในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion assay

จากการทดสอบสารสกัดหยาบจากใบชะครามต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคระบบทางเดินอาหารด้วยวิธี agar well diffusion assay ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทดสอบ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* DMST 4212, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 4739, *Staphylococcus aureus* DMST 562 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 โดยเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากชะคราม กับยาปฏิชีวนะ Norfloxacin, (NF) และ Tetracycline (TT) และสาร Gallic acid (GA) แสดงในตารางที่ 1 พบว่าสารสกัดหยาบจากชะครามยับยั้งเชื้อได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบโดยยับยั้ง *E. coli* ได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนยา Norfloxacin สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ยา Tetracycline ที่ยับยั้งได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบเช่นเดียวกันแต่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้สูงอย่างมีนัยสำคัญ โดยยับยั้ง *S. aureus* และ *B. cereus* ส่วนสาร Gallic acid ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ได้

4.3 ผลการทดสอบหา MIC และ MBC

จากการวิเคราะห์ค่า MIC ของสารสกัดจากชะครามในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 2 พบว่าค่า MIC ของสารสกัดจากชะครามต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ที่ 78.125 µg/ml เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ 10,000 µg/ml *S. aureus* และ *B. cereus* ที่ 5,000 µg/ml ตามลำดับ

ส่วนยาปฏิชีวนะนอร์ฟล็อกซาซินมีค่า MIC ต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *B. cereus* ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 19.53 µg/ml และ ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ 312.5 µg/ml

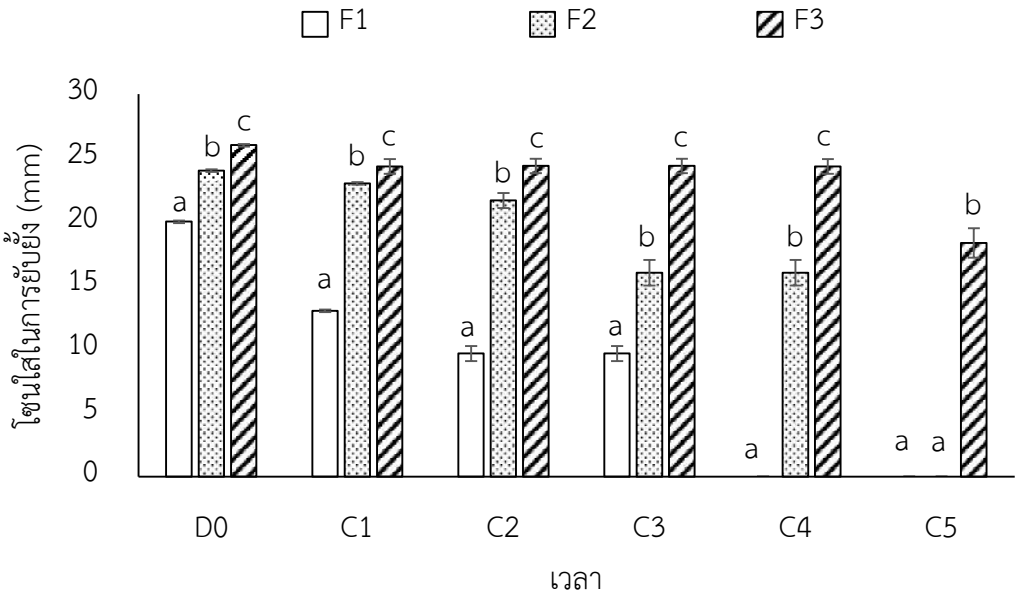
ตารางที่ 1 ตารางผลของสารสกัดชะคราม, Norfloxacin, Tetracycline และ Gallic acid ในการยับยั้งเชื้อ แบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารสายพันธุ์ต่าง ๆ

ตัวอย่างทดสอบ	ขนาดโซนใสยับยั้ง (mm)			
	E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*B. cereus*
สารสกัดชะคราม	39.33±1.15^{d}	12.67±0.58^{a}	34.68±1.15^{c}	31.68±0.58^{b}
Norfloxacin	47.67±0.58^{c}	30±0.00^{a}	40±2.65^{b}	39.67±0.58^{b}
Tetracycline	26.00±0.00^{b}	11.68±1.15^{a}	33±0.00^{c}	32±0.00^{c}
Gallic acid	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}

ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากกากกัญชาที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 (ET50)

แบคทีเรียทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัดชะคราม (µg/ml)			
	MIC		MBC	
	SM	NF	SM	NF
E. coli	78.125	19.53	78.125	19.53
P.aeruginosa	10,000	312.5	10,000	625
S. aureus	5,000	19.53	10,000	19.53
B. cereus	5,000	19.53	5000	19.53



ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพของยาน้ำตำรับต่าง ๆ ต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* DMST 4212 (ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$))

4.3 ผลการศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ยาน้ำทั้ง 4 ตำรับ ภายใต้สภาวะเร่งด้วยวิธีการเก็บในที่ร้อนสลับเย็น (Freeze and thaw cycling method)

จากการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ย้ำน้ำจากสารสกัดชะครามทั้ง 4 ตำรับ โดยแบ่งตามความเข้มข้นของสารสกัดชะคราม ได้แก่ 0 µg/ml (F0), 80 µg/ml (F1, 1xMIC), 160 µg/ml (F2, 2xMIC) และ 320 µg/ml (F3, 3xMIC) ตามลำดับ เมื่อเก็บภายใต้สภาวะเร่ง (Freeze and thaw cycling method) ทำการศึกษา 5 cycle (1 cycle ประกอบด้วยการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และเก็บที่ 45 องศาเซลลเซียส 24 ชั่วโมง) ในการตรวจสอบความคงตัวของยาน้ำทำการศึกษาด้านลักษณะทางกายภาพ การวัดค่าความเป็นกรดด่าง และการทดสอบทางด้านการต้านเชื้อก่อโรค (antimicrobial activity) ต่อเชื้อ *E. coli*

ลักษณะทางกายภาพโดยตลอดการเก็บรักษา 5 cycle ของยาน้ำทั้ง 4 สูตร พบว่าทั้ง 4 สูตร มีลักษณะไม่แตกต่างกันโดยมีลักษณะของยาเป็นสีเหลืองอ่อน และมีตะกอน

สามารถสรุปได้ว่ายาน้ำจากสารสกัดชะคราม มีลักษณะทางกายภาพทั้งก่อนและหลังการเก็บภายใต้สภาวะเร่งนั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของยาน้ำจากสารสกัดชะครามเบื้องต้นทั้ง 4 ตำรับ พบว่ามีค่า pH ระหว่าง 6.206 – 6.755 จากข้อมูล pH ที่ได้จากการศึกษาพบว่าทำให้ทราบว่าช่วง pH ของสูตรยาทั้งหมด 4 ตำรับ มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยแต่ยังอยู่ในช่วงเกณฑ์ปกติของการพัฒนาตำรับยาน้ำ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของยาน้ำต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยทดสอบกับ *E. coli* DMST 4212 ดังภาพที่ 1 พบว่าสูตรที่มีประสิทธิภาพสูงคือ F3 ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากชะครามที่ความเข้มข้น 3xMIC พบยังคงมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อก่อโรคทดสอบได้เมื่อทดสอบ cycle ที่ 5 จากผลการศึกษานี้สูตรที่ F3 ดังภาพที่ 1 จึงถือเป็นสูตรที่เหมาะสมในการพัฒนาต่อไป

5. อภิปรายผล

ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดชะครามต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารเพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ยาน้ำ ผลการวิจัยได้ดังนี้สามารถอภิปรายผลตามลำดับของวัตถุประสงค์การวิจัยดังต่อไปนี้ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ เอทานอลซึ่งเป็นหนึ่งในตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังตัวอย่างงานของ Kim et al. (2016) ที่ทำการศึกษากิจกรรมการต้านเชื้อจากสารสกัดชะครามในสภาวะแวดล้อมที่มีความเค็มและงานวิจัยของ Patra et al. (2011) ที่ทำการศึกษากิจกรรมการต้านเชื้อและการต้านมะเร็งจากสารสกัดชะครามแบบสกัดหยาบโดยทั้งสองงานวิจัยนั้นได้นำเอทานอลมาใช้ในการสกัดสารสำคัญจากชะครามแตกต่างกันที่งานวิจัยแรกใช้เอทานอลอย่างเดียวกับอีกงานวิจัยที่มีการเปรียบเทียบสารที่นำมาสกัดหลายประเภท ซึ่งคลอดคล้องไปในทางเดียวกันว่าสารสกัดจากชะครามที่สกัดด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ผลการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion assay ในงานวิจัยนี้ใช้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดชะครามพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* DMST 4212, *P. aeruginosa* DMST 4739, *S. aureus* DMST 562, และ *B. cereus* DMST 5040 ได้ ซึ่งงานวิจัยของ Beulah et al. (2021) ได้ใช้วิธีนี้ในการทดสอบสารสกัดชะครามต่อการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa, S. aureus* โดยมีค่าโซนใสอยู่ที่ 4.1±1.2 และ 4.9±1.3 มิลลิเมตร หรือแม้แต่งานวิจัยของ Sathish et al. (2016) ได้ใช้วิธีนี้ในการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางเคมีของพืชที่ขึ้นตามน้ำเค็มในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *B. cereus* โดยมีค่าโซนใสอยู่ที่ 9±0.6 และ 7.8±0.45 มิลลิเมตร เพื่อความชัดเจนต่อการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดชะครามโดยในงานวิจัยส่วนมากมักหาค่า MIC และ MBC ร่วมด้วยโดยค่า MIC และ MBC ของสารสกัดชะครามนั้นสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยในงานวิจัยพบว่าค่า MIC และ MBC ต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* DMST 4212 มีค่าเท่ากับ 78.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Patra et al. (2021) ที่ทดสอบสกัดสารสกัดจากชะครามในตัวทำละลายเอทานอล พบว่าค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC อยู่ที่ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หากค่า MIC ที่ความเข้มข้นต่ำสุดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้นั้นดังนั้นความเข้มข้นที่สูงขึ้นก็จะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดียิ่งขึ้น เช่นเดียวกับค่า MBC ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ หากค่าความเข้มข้นสูงขึ้นก็จะสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดียิ่งขึ้น และค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบนั้นสามารถนำไปพัฒนาโดยพัฒนาเป็นตำรับยาน้ำได้ เพื่อใช้เป็นส่วนผสมหลักในผลิตภัณฑ์ของตำรับยาน้ำโดยยาน้ำถูกพัฒนาเป็น 4 ตำรับ คือ ที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น Control เป็นสูตรที่ 1, 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสูตรที่ 2, 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสูตรที่ 3 และ 320 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสูตรที่ 4 และทำการศึกษาความคงตัวเบื้องต้นและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ เชื้อ *E. coli* DMST 4212 เป็นเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งเมื่อครบรอบการเก็บที่ 5 cycle สูตรที่ความเข้มข้นของสารสกัดชะคราม 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแล้ว แต่สูตรที่ ความเข้มข้น 320 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นยังคงมีประสิทธิภาพต่อเชื้อ *E. coli* DMST 4212 อยู่

โดยยังมีโซนใสอยู่ที่ 18.33 มิลลิเมตร ผลการวัด pH ไม่แตกต่างกันขณะที่ผลของลักษณะภายนอกทางกายภาพก็ยังคงสีไม่มีการเปลี่ยนแปลง มีตะกอนเล็กน้อยดังเดิม จากงานวิจัยของ Lertsatitthanakorn et al. (2014) ได้ทำการศึกษากิจกรรมการต้านเชื้อจากน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในผลิตภัณฑ์สบู่เหลว หลังจากการเก็บสภาวะเร่งพบว่ามีประสิทธิภาพลดลงจากตอนเริ่มต้น ซึ่งสอดคล้องกัน โดยพบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน โซนใสที่เกิดขึ้นลดลงจากเดิม 2 มิลลิเมตร แสดงว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อลดลงการคงตัวทางกายภาพก็ยังเหมือนเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นถ้าต้องการพัฒนาตำรับยาน้ำควรเลือกที่ค่าความเข้มข้นของสารสกัดชะครามที่ 3 เท่าของค่า MIC

6. ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

ในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้มุ่งเน้นศึกษาสารจากธรรมชาติเพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารซึ่งสารสกัดจากชะครามมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารทั้งแกรมบวกและแกรมลบ นอกจากนี้ยังทราบถึงความเข้มข้นของสารสกัดชะครามที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้พัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์ยาน้ำ ซึ่งข้อมูลของสารสกัดชะครามจากการศึกษานี้ ควรทำการทดสอบด้านความปลอดภัยก่อนนำไปใช้เพื่อป้องกันผลที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ โดยต้องหาปริมาณที่เหมาะสม อีกทั้งควรศึกษาหาสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัด ทำการตรวจสอบปริมาณสารโซเดียมคลอไรด์และไอโอดีน เนื่องจากชะครามเป็นพืชที่มีการเจริญได้ดีบริเวณพื้นที่ดินเค็ม สารสกัดที่นำไปประยุกต์ใช้นั้นอาจจะมีปริมาณสารโซเดียมคลอไรด์และไอโอดีนสูงและมีผลต่อผู้ป่วยโรคไตและผู้ป่วยความดันจึงควรมีการวิเคราะห์ปริมาณสารเหล่านี้ก่อนนำสารสกัดจากชะครามไปใช้ในพัฒนาตำรับยาน้ำในอนาคต

ข้อเสนอแนะในการทำการวิจัยครั้งต่อไป

เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาครั้งต่อไป ผู้วิจัยขอเสนอแนะประเด็นที่ควรทำการศึกษาในครั้งต่อไป ได้แก่ การวิเคราะห์ชนิดของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในสารสกัดชะครามและปริมาณของโซเดียมคลอไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดชะคราม รวมถึงความคงทดของสารสกัดชะครามเมื่ออยู่ในผลิตภัณฑ์ยาน้ำและความเข้มข้นของสารสกัดชะครามที่เหมาะสม

7. เอกสารอ้างอิง

กีรติญา เอี่ยมถาวร. (2555). **การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและการต้าน อนุมูลอิสระโดยโพรพอลิสนมผึ้งและฟ้าทะลายโจร.** วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีวิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ซาสวานี อิแต, ฟาดีละห์ เต๊ะมาลอ, และพูรกอนนี มูซอ. (2566) **ฤทธิ์ต้านเชื้อ Staphylococcus aureus ของผลิตภัณฑ์เจลจากสารสกัดหยาบใบสาบเสือ**. หลักสูตรวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

ณัฐรดา บุรุษเหลี่ยม. (2565). โรคระบบทางเดินอาหารดูแลก่อนเป็นโรคร้าย. **วารสารโรงพยาบาล ชลบุรี,** 47(2), 171-171.

นิพนธ์ สนหอม วีระพงษ์ วรประโยชน์ และกฤตพร รำจวนเกรียรติ. (2565). การศึกษาการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella Typhimurium* ด้วยสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรไทย 12 ชนิดและสารสกัดหยาบผสม. **วารสารวิจัยราชภัฏพระนครสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี,** 17(2), 26-38.

วรรณา วัฒนา กฤษณะ พวงระย้า และพิชิต สุดตา, (2565). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ สารสกัดใบชะครามชนิดสดและแห้ง. **ศรีนครินทร์เวชสาร**, 37(1), 72-75.

สุวรรณดี ทรัพย์เจริญ, และณัฐชา ด้วงรัก. (2567). ผลของขมิ้นชันต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ในระบบทางเดินอาหารของคน: ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดขมิ้นชัน.**วารสารกรม วิทยาศาสตร์การแพทย์**, 66(1), 18-33.

สุรเดช มัจฉาเวช, ซารียะห์ มูซอเลาะยา, และอิมรอน มีชัย. (2566). ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและสมบัติ เชิงกลของน้ำยางธรรมชาติผสมสารสกัดจากไพลและเปลือก

มังคุด. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา**, 8(2), 47-56

อารีย์ ทองภักดี7, ศรัญญา น้อยพิทักษ์, โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา, และ กรกช ชั้นจิรกุล. (2559). การ เจริญของชะครามในพื้นที่ดินเค็ม. **Veridian E-journal Science and Technology Silpakorn University**, 3(6), 380-389.

ฮัสสณา หวันประรัตน์ กัสตูรี แวมะแอ และนูรไลลี หะยีดือราแม. (2565). ผลของการใช้แบบบันทึกการดูแลผู้ป่วยติดเชื้อ แบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพต่ออัตราการเกิดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพและความสมบูรณ์ของการใช้แบบ บันทึกโรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์. **วราสารวิจัยการพยาบาลและสาธารณสุข**, 2(3), 1-13.

Beulah, G., Divya, D., Kumar, N.S., Sravya, M.V.N., Rao, K.G., Chintagunta, A.D. and Simhachalam, G. (2021). Purification and characterization of bioactive compounds extracted from *Suaeda maritima* leaf and its impact on pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in *Catla catla* fingerlings. **Amb Express,** 11, 1-10.

Bilal, M.A.D. and Hossain, M.A. (2019). Antibacterial activity of different crude extracts of *Suaeda maritima* used traditionally for the treatment of hepatitis. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, 22, 101383.

Collinson, S., Deans, A., Padua-Zamora, A., Gregorio, G.V., Li, C., Dans, L.F., and Allen, S.J. (2020). Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, (12), 1-5.

Eibl, C., Bexiga, R., Viora, L., Guyot, H., Félix, J., Wilms, J., Tichy, A. and Hund, A. (2021). The antibiotic treatment of calf diarrhea in four European countries: a survey. **Antibiotics,** 10(8), 910-917.

Jovanovic, J., Ornelis, V. F., Madder, A. and Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,** 20(4), 3719-3761.

Kim, H.R., Park, G.N., Jung, B.K., Yoon, W.J., Jung, Y.H. and Chang, K.S. (2016). Antibacterial activity of *Suaeda australis* in Halophyte. **Journal of the Korean Applied Science and Technology,** 33(2), 278-285.

Krishnasree, T. and Peddi, P. (2021). *Suaeda maritima* (L.) Dumort green synthesis-reduced nickel oxide nanoparticles for antioxidant and bactericidal activity. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Science**, 9(6), 823-830.

Lertsatitthanakorn, P., Manwiwattanakun, K., Paengnakorn, N. and Khunkitti, K. (2014). Antibacterial Activity of an Effective Essential coil Formulated in Liquid Soap Against Skin Bacteria. **Chiang Mai Journal of Science,** 1(1), 71-83.

Meidong, R., Khotchanalekha, K., Doolgindachbaporn, S., Nagasawa, T., Nakao, M., Sakai, K. and Tongpim, S. (2018). Evaluation of probiotic *Bacillus aerius* B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Pla-mong *Pangasius bocourti*, **Fish & Shellfish Immunology,** 73, 1-10.

Patra, J.K., Dhal, N.K. and Thatoi, H.N. (2011). In vitro bioactivity and phytochemical screening of *Suaeda maritima* (Dumort): A mangrove associate from Bhitarkanika, India**. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 4(9), 727-734.

Peddi, P., Ptsrk, P.R., Rani, N.U. and Tulasi, S.L. (2021). Green synthesis, characterization, antioxidant, antibacterial, and photocatalytic activity of *Suaeda maritima* (L.) Dumort aqueous extract-mediated

copper oxide nanoparticles. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 19(1), 131.

Sathish, P., Jaswanth, G., Gurudhathan, K.B., Gopinath, J., Gayathri, P.K. and Yuvaraj, D. (2016). Phytochemical investigation and antibacterial activity of salt marsh plant extracts. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, ISSN, 0974-2115.