ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย และต้านการเกิดไบโอฟิล์มของสมุนไพรจีน 3 ชนิด ต่อเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Antioxidant, Antibacterial and Anti-biofilm Activities of Three Chinese Herbs against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

วรพรรณี เผ่าทองศุข[1], วีระชัย ทับจันทร์[1], ปริญญา ศรีเมือง[1], ศรมน สุทิน[2], เสาวลักษณ์ มีศิลป์[3], วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์[4*]

[1]สาขาจุลชีววุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540

[2]สาขาวิทยาศาสตร์กายภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540

[3]คณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540

[4]คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540

Worrapannee Powtongsook[1], Weerachai Tubchan[1], Parinya Semuang[1], Soramon Sutin[2], Saowaluck Meesin[3], Watcharin Rangsipanuratn[4*]

[1]Division of Industrial Microbiology, Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan 10540

[2]Division of Physical Science, Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan 10540

[3]Faculty of Chinese Medicine, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan 10540

[4]Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan 10540

*Corresponding authors, e-mail: watcharin.rang@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสมุนไพรจีน 3 ชนิดต่อเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไวต่อยาเมธิซิลิน (Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* : MSSA) โดยการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านการเกิดไบโอฟิล์มของสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนที่สกัดด้วยเอทานอล 3 ชนิด ได้แก่ หวงไป่ (*Phellodendron chinensis* Schneid) ต้าหวง (*Rheum palmatum* Linn.) และอูเหมย (*Prunus mume* (Sieb) Sieb. Et Zucc.) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay พบว่าสารสกัดหยาบต้าหวงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} (50% Inhibitory Concentration) ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน BHT (Butylated hydroxyl toluene) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA และ MSSA ด้วยวิธี Agar well diffusion และ Colorimetric broth microdilution พบว่าสารสกัดหยาบหวงไป่และต้าหวงมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีกว่าอูเหมย สารสกัดหยาบหวงไป่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ MSSA ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบต้าหวง โดยหวงไป่มีค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) เท่ากับ 0.391 และต้าหวงมีค่า MIC เท่ากับ 1.562 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA มีค่า MIC เท่ากันคือ 1.562 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบหวงไป่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA และ MRSA ได้ร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้น 0.0244 และ 0.0488 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการวิจัยแสดงว่าสารสกัดหยาบหวงไป่ และต้าหวงมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพื่อใช้รักษาการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ต่อไป

คำสำคัญ : หวงไป่ ต้าหวง อูเหมย ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านไบโอฟิล์ม

5 มีนาคม 2565 / 30 มกราคม 2566 / 19 พฤษภาคม 2566

5 March 2022 / 30 January 2023 / 19 May 2023

Abstract

This study evaluated the efficacy of three Chinese herbs against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA). The antioxidant, antibacterial and anti-biofilm formation of ethanol extract of three Chinese herbs including Huang Pai (*Phellodendron chinensis* Schneid), Da Huang (*Rheum palmatum* Linn.), and Ou Mei (*Prunus mume* (Sieb) Sieb. Et Zucc.) were evaluated. Results from antioxidant activity using DPPH radical scavenging assay showed that Da Huang had the best antioxidant with an IC_{50} (50% Inhibitory Concentration) value similar to the standard BHT (Butylated hydroxyl toluene). Results from the agar well diffusion and colorimetric broth microdilution tests revealed that crude extracts of Huang Pai and Da Huang had better activities than Ou Mei. The antimicrobial activity of Huang Pai against MSSA was higher than Da Huang as seen by the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) value of 0.391 and 1.562 mg/ml, respectively. The anti-MRSA activity of both herbs' extracts had a similar MIC value of 1.562 mg/ml. Huang Pai showed the most potent anti-biofilm effect against MSSA and MRSA with 80% inhibition of biofilm formation at 0.0244 and 0.0488 mg/ml, respectively. Results from this study illustrated that Huang Pai and Da Huang have the potential for further development into natural products treating of *Staphylococcus aureus* infection.

Keywords : Huang Pai, Da Huang, Ou Mei, antioxidant, antibacterial, anti-biofilm

บทนำ

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อบริเวณผิวหนังที่พบบ่อย ได้แก่ แผลพุพอง ฝี หนอง รวมถึงการก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลโดยพบการติดเชื้อในผู้ป่วยหลังการผ่าตัดหรือติดเชื้อที่ปอด และแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดซึ่งส่งผลถึงขั้นผู้ป่วยเสียชีวิตได้ โดยปกติเชื้อทั่วไปจะไวต่อยาเมธิซิลลิน (Methicillin) หรือออกซาซิลลิน (Oxacillin) ซึ่งเป็นยาหลักในการรักษาเรียกว่า Methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) แต่พบรายงานการดื้อยาเมธิซิลลินครั้งแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1961 ในประเทศอังกฤษ และปัจจุบันพบแพร่กระจายไปทั่วโลก เรียกสายพันธุ์นี้ว่า Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ทำให้ไม่สามารถรักษาโดยใช้ยากลุ่มบีตาแล็กแทม เช่น เมธิซิลลิน ออกซาซิลลิน และยาชนิดอื่นในกลุ่มนี้ แพทย์แผนปัจจุบันจึงต้องรักษาโรคติดเชื้อ MRSA โดยการใช้ยากลุ่มอื่น ได้แก่ แวนโคมัยซิน (Vancomycin) ทิโคพลานิน (Teicoplanin) ไลนิโซลิด (Linezolid) ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพที่มีราคาแพง มีผลต่อไต และมีแนวโน้มที่เชื้อจะดื้อยามากขึ้น[(1)] องค์การอนามัยโลกจัดเชื้อนี้เป็น Superbug ที่ต้องการยาใหม่ในการรักษาอย่างเร่งด่วน ดังนั้น การสำรวจหาสารธรรมชาติจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการเกิดไบโอฟิล์ม จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการสร้างฐานข้อมูลเพื่อพัฒนาวิธีการรักษาที่เหมาะสมต่อไป

ศาสตร์การแพทย์แผนจีนในประเทศไทยได้เริ่มแพร่หลายมากขึ้นในปัจจุบันโดยจะถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ ตามตำรับยาจีนแผนโบราณและให้ผลการรักษาเป็นที่น่าพึงพอใจในระดับหนึ่ง แต่ยังมีงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์สมุนไพรจีนในเรื่องของการต้านเชื้อดื้อยาไม่มากนัก ดังนั้น ถ้ามีงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์มาสนับสนุนจะทำให้สมุนไพรจีนเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาเป็นยารักษาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยสมุนไพรจีนที่คณะผู้วิจัยสนใจ มี 3 ชนิด ได้แก่

หวงไป่ (หวงป้อ ในภาษาจีนกลาง หรือ อึ่งแปะ ในภาษาจีนแต้จิ๋ว) (Chinese Cork tree) เป็นสมุนไพรจีนมาจากพืชที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Phellodendron chinensis* Schneid, *P. amurense* Rupr. จัดอยู่ในวงศ์ *Rutaceae*[2] การแพทย์แผนจีนใช้ส่วนเปลือกของลำต้นในการทำยา จัดเป็นยาสมุนไพรในกลุ่มขจัดความร้อนชื้น (Dampness-removing herb) มีรสขม ฤทธิ์เย็น ออกฤทธิ์กับเส้นลมปราณไต กระเพาะปัสสาวะ และลำไส้ใหญ่ ใช้รักษาอาการที่วินิจฉัยด้วยทฤษฎีแพทย์แผนจีนว่ามีสาเหตุจากความร้อนชื้น อาทิเช่น ตกขาว ปัสสาวะติดขัด ท้องร่วง ภาวะดีซ่าน ภาวะร้อนวูบวาบ เหงื่อออกกลางคืน หรือโรคเชื้อราที่ผิวหนังเรื้อรัง[3] การศึกษาทางห้องปฏิบัติการพฤกษเคมีพบว่า หวงไป่มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ได้แก่ Berberine, Phellodendrine, Jatrorrhizine, Magnoflorine, Candicine, Obacunone, 3-acetyl-3, 4-dihydro-5, 6-dimethoxy-1H-2-benzopyran-1-one และพบมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา คือสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ต้านการอักเสบ ต้านจุลชีพ ต้านแบคทีเรีย ต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ และลดไข้[4-5]

ต้าหวง (ตั่วอึ๊ง ในภาษาจีนแต้จิ๋ว แพทย์แผนไทยเรียก โกฐน้ำเต้า) (Radix et Rhizoma Rhei, Chinese Rhubarb) เป็นสมุนไพรจีนมาจากส่วนรากและเหง้าของพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Rheum palmatum* Linn., *R. tanguticum* Maxim. Ex Balf., *R. officinale* Baill. จัดอยู่ในวงศ์ *Polygonaceae* ตามทฤษฎีการแพทย์แผนจีนต้าหวงจัดอยู่ในกลุ่มยาระบาย มีรสขม ฤทธิ์เย็น ออกฤทธิ์กับเส้นลมปราณม้าม กระเพาะอาหาร ลำไส้ใหญ่ ตับ และเยื่อหุ้มหัวใจ รักษากลุ่มอาการที่เกิดจากความร้อนภายในร่างกายมากเกินไป เช่น อาการท้องผูก (ลำไส้ใหญ่มีความร้อนมากเกินไป) อาเจียนเป็นเลือด เลือดกำเดาไหล ฝีหนอง ท้องร่วง ฯลฯ หรือกลุ่มอาการเลือดคั่งภายใน เช่น ประจำเดือนไม่มา น้ำคาวปลาผิดปกติ[3] จากการศึกษาทางห้องปฏิบัติการพฤกษเคมีพบว่า ต้าหวงมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ได้แก่ Emodin, Rhein, Quinones, Coumarins, Chrysopanol, Aloe-emodin, Physcion ฯลฯ และมีคุณสมบัติสามารถต้านอนุมูลอิสระ ต้านไวรัส ต้านการเกิดเนื้องอก สามารถปกป้องเซลล์ประสาทในสมอง และเพิ่มการเคลื่อนตัวของระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น[6]

อูเหมย หรือ บ๊วยดำ (โอวบ๊วย ในภาษาแต้จิ๋ว) (Chinese plum, Japanese apricot) เป็นสมุนไพรจีนมาจากผลห่ามของพืชที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Prunus mume* (Sieb) Sieb. Et Zucc. อยู่ในวงศ์ *Rosaceae* ตามทฤษฎีการแพทย์แผนจีนอูเหมยจัดอยู่ในกลุ่มยาเก็บกัก หรือฝาด-สมาน มีรสเปรี้ยว-ฝาด ฤทธิ์สุขุม ออกฤทธิ์กับเส้นลมปราณตับ ม้าม ปอด และลำไส้ใหญ่ สรรพคุณสามารถให้ความชุ่มชื้นกับปอด ระงับไอ แก้ไอแห้ง ไอเรื้อรัง มีฤทธิ์สมานลำไส้ ระงับอาการท้องร่วง บิดเรื้อรัง มีฤทธิ์ฆ่าพยาธิ และมีฤทธิ์เสริมธาตุน้ำ แก้ร้อนใน กระหายน้ำ[3] จากการศึกษาทางห้องปฏิบัติการพฤกษเคมีพบว่า อูเหมยมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญได้แก่ Citric acid, Malic acid, Succinic acid, Tartaric acid, 3-O-caffeoylquinic acid, 5-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid ฯลฯ สามารถต้านแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านมะเร็ง[7]

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบของสมุนไพรจีน 3 ชนิด ได้แก่ หวงไป่ ต้าหวง และอูเหมย ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย และยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA และ MSSA

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดหยาบจากสมุนไพรจีน[8] นำสมุนไพรจีน 3 ชนิด ได้แก่ หวงไป่ส่วนเปลือก ต้าหวงส่วนราก และอูเหมยส่วนผล จากคลินิกหัวเฉียวเวชกรรม แผนกการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ มาหั่นและปั่นให้ละเอียด จากนั้นชั่งมา 300 กรัม ผสมกับเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 1:6 เขย่าและหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน นำมากรองหยาบด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปกรองละเอียดด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) จากนั้นนำสารสกัดหยาบไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) และทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งเยือกแข็ง (Freeze dryer) นำสารสกัดหยาบที่ได้มาชั่ง เพื่อคำนวณร้อยละของน้ำหนักสารสกัดหยาบ/น้ำหนักแห้ง (% yield) และเก็บใส่ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging assay[9] เตรียมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรจีนให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน Absolute ethanol แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การทดสอบแต่ละความเข้มข้นจะเตรียมหลุมทดสอบ ประกอบด้วย สารสกัดสมุนไพรจีนความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุม Microtiter plate และเติมสารละลาย DPPH (0.004 กรัม ใน Absolute ethanol 100 มิลลิลิตร) 100 ไมโครลิตร เป็น Sample สารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับ Absolute ethanol เป็น Blank sample, Absolute ethanol 100 ไมโครลิตร และ DPPH 100 ไมโครลิตร เป็น Control และ Absolute ethanol 200 ไมโครลิตร เป็น Blank ของ Control เขย่าให้สารผสมเข้ากัน และบ่มทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (Biochrom EZ Read 800, UK) แต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง นำมาคำนวณหา % inhibition และนำไปพลอตกราฟ เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรจีนที่สามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระร้อยละ 50 (50% Inhibition Concentration; IC_{50}) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT) (ถ้าสารสกัดหยาบมีค่า IC_{50} ต่ำ หมายถึงมีการยับยั้งอนุมูลอิสระของ DPPH ได้ดี) และคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\%\ \text{Inhibition} = \frac{[OD_{517}\ \text{Control} - (OD_{517}\ \text{Sample} - OD_{517}\ \text{Blank sample})] \times 100}{OD_{517}\ \text{Control}}$$

เมื่อ OD_{517} Control = ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ของเอทานอลผสมกับ DPPH

OD_{517} Sample = ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารสกัดสมุนไพรจีนผสมกับ DPPH

OD_{517} Blank sample = ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดสมุนไพรจีนผสมกับเอทานอล

การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบสมุนไพรจีน

1. วิธี Agar well diffusion[10] ชั่งสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด 1 กรัม ละลายกับ 40% DMSO 10 มิลลิลิตร จะมีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อและเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เพาะเชื้อ MRSA (Clinical isolate) และ MSSA 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 6538 บน Trypticase soy agar ที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยเชื้อใส่ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 (เชื้อ 1.5×10^8 CFU/ml) จากนั้นจุ่มไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ และบิดสำลีกับผนังหลอดทดลองให้หมาด ป้ายบนผิวหน้าอาหารเพาะเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA, Oxoid UK) จำนวน 3 ระนาบ เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ด้วย Cork borer จานละ 6 หลุม เติมสารสกัดหยาบสมุนไพรปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ในหลุม โดยใช้ยาคลอแรมฟีนิคอล (Chloramphenicol) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นชุดควบคุมผลบวก และใช้ 40% DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (Inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

2. การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration: MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration: MBC) โดยวิธี Colorimetric broth microdilution[8] นำสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ MSSA และ MRSA จากวิธี Agar well diffusion มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton broth (MHB) ใน microtiter plate ปราศจากเชื้อ โดยปิเปตต์ MHB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 ถึงหลุมที่ 12 ของ Microtiter plate ปิเปตต์สารสกัดหยาบความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 จากนั้นทำการเจือจางแบบ 2-folded dilution โดยปิเปตต์จากหลุมที่ 1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่ 2 ทำเช่นนี้ไปจนถึงหลุมที่ 11 ซึ่งแต่ละหลุมให้ปิเปตต์สารละลายขึ้นลงเพื่อทำให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการปิเปตต์สารจากหลุมที่ 11 ออก 50 ไมโครลิตรจะได้สารสกัดความเข้มข้น 50-0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อ 10^6 CFU/ml ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1-12 (หลุมที่ 12 เป็นหลุมควบคุมผลบวก) บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบตามเวลาที่กำหนด จะหยดสีรีซาซูริน (Resazurin) ความเข้มข้น 0.18% ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส อีก 2-4 ชั่วโมง อ่านผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนที่อาหารยังคงมีสีน้ำเงินเป็นค่า MIC ในการศึกษานี้ใช้ยาคลอแรมฟีนิคอลความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก และ 40% DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD) การควบคุมคุณภาพใช้เชื้อมาตรฐาน *S. aureus* ATCC 29213 จากนั้นใช้ loop จุ่มเชื้อในหลุมทดสอบ MIC ทุกหลุมมาเพาะบน Trypticase soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญเป็นค่า MBC

การทดสอบฤทธิ์การต้านไบโอฟิล์มของสารสกัดหยาบสมุนไพรจีน วิธี Crystal violet staining for biofilm assay ดัดแปลงตามวิธีของ Lin et al.[11] นำสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion broth ใน Microtiter plate ให้ได้ความเข้มข้น 50-0.024 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมเชื้อที่ปรับความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยมียาคลอแรมฟีนิคอลความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก และ 40% DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำ Reverse osmosis (RO) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นเติม 0.1% Crystal violet ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ล้างออกด้วยน้ำ RO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ทำการชะสีออกจากไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย A (Ethanol 70 % + Acetic acid 5% + น้ำ 25%) เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ถ่ายสารละลาย 100 ไมโครลิตร ลงใน Microtiter plate ใหม่ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (Biochrom EZ Read 800, UK) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%\ \text{Inhibition} = \frac{(OD_{570}\ \text{Negative control} - OD_{570}\ \text{Experiment}) \times 100}{OD_{570}\ \text{Negative control}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ นำข้อมูลมาทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างหลายกลุ่มด้วยวิธี Tukey's multiple comparisons test โดยโปรแกรม GraphPad Prism 8 และทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่ม ด้วยวิธี Paired Samples Test โดยโปรแกรมวิเคราะห์สำเร็จรูป

ผลการวิจัย

ผลการสกัดสมุนไพรจีนทั้ง 3 ชนิด พบว่า สารสกัดหยาบอูเหมย มีผลผลิตมากที่สุดร้อยละ 26.90 รองลงมาคือสารสกัดหยาบหวงไป่ และต้าหวงร้อยละ 15.38 และ 8.94 ตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assay เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT พบว่า ต้าหวงมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ IC_{50} เท่ากับ 0.0228 ± 0.0005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แตกต่างกับสารมาตรฐาน BHT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.9992) สารสกัดหวงไป่และอูเหมย มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ IC_{50} เท่ากับ 0.2850 ± 0.0004 และ 0.6249 ± 0.0244 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ น้อยกว่าสารมาตรฐาน BHT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.0001) (ตารางที่ 1)

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบหวงไป่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่าสมุนไพรชนิดอื่น ๆ คือ มีขนาดค่าเฉลี่ยโซนใสต่อ *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25923 และ MRSA เท่ากับ 27.00±0.20, 17.91±0.35, 23.18±0.11 มิลลิเมตร ยกเว้นสารสกัดหยาบต้าหวงมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ดีกว่า คือมีขนาดค่าเฉลี่ยโซนใสเท่ากับ 23.23±0.15 มิลลิเมตร และสารสกัดหยาบอูเหมยมีขนาดค่าเฉลี่ยโซนใสน้อยที่สุดเท่ากับ 12.98±0.17, 14.12±0.12, 12.01±0.16 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เนื่องจากสารสกัดหยาบหวงไป่และต้าหวงมีฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าอูเหมยจึงนำไปทดสอบหาค่า MIC ต่อไป

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Colorimetric broth microdilution เป็นการอ่านค่า MIC โดยการเติมสารรีซาซูรินลงไปในหลุมหลังจากบ่มครบเวลา ถ้าสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เชื้อจะมีการเจริญโดยใช้ก๊าซออกซิเจน ทำให้สีรีซาซูรินถูกรีดิวซ์และเปลี่ยนสีอาหารจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูอย่างชัดเจน (กรณีไม่เติมสารนี้จะพบว่าการอ่านค่า MIC โดยดูความขุ่น จะมีสีและความขุ่นของสารสกัดหยาบมารบกวน) ผลค่า MIC ของสารสกัดหยาบหวงไป่และต้าหวงต่อเชื้อ MRSA มีค่าเท่ากันคือ 1.562 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MIC ของสารสกัดหยาบของหวงไป่และต้าหวงต่อเชื้อ MSSA มีค่าเท่ากับ 0.391 และ 1.562 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนค่า MBC ของสารสกัดหยาบหวงไป่และต้าหวงต่อเชื้อ MRSA มีค่าเท่ากับ 3.125 และ 6.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC ของสารสกัดหยาบหวงไป่และต้าหวงต่อเชื้อ MSSA มีค่าเท่ากับ 0.781 และ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3) แสดงว่าสารสกัดหยาบหวงไป่มีฤทธิ์ต้านเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าต้าหวง

ผลการวิเคราะห์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มโดยวิธี Crystal violet staining for biofilm assay ต่อเชื้อ MSSA พบว่าสารสกัดหยาบหวงไป่ความเข้มข้น 0.0244-1.5625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มดีกว่าต้าหวงและอูเหมยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดหยาบหวงไป่ ต้าหวง และอูเหมยที่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ MSSA ได้มากกว่าร้อยละ 80 มีค่าเท่ากับ 0.0244, 0.0976 และ 0.3906 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 1) แสดงว่าสารสกัดหยาบหวงไป่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่สุด รองลงมาคือต้าหวง และอูเหมย ตามลำดับ ส่วนผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดหยาบหวงไป่ ต้าหวง และอูเหมยต่อเชื้อ MRSA พบว่าที่ความเข้มข้น 0.0244-3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบหวงไป่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มดีกว่าสารสกัดหยาบต้าหวงและอูเหมยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดหยาบหวงไป่ ต้าหวง และอู่เหมยที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่าร้อยละ 80 มีค่า 0.0976, 0.3906 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบหวงไป่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่สุด รองลงมาคือต้าหวงและอูเหมย เมื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกันพบว่าสารสกัดหยาบหวงไป่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA ได้ดีกว่าเชื้อ MRSA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.0488 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มต่อเชื้อ MSSA และ MRSA ได้มากกว่าร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดเท่ากับ 0.0488 และ 0.0976 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนเทียบกับสารมาตรฐาน BHT

สารสกัดหยาบ	IC_{50} ± SD* มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	ค่าสถิติโดยวิธี Tukey's multiple comparisons test *P*-value
หวงไป่	0.2850 ± 0.0004^{b}	<0.0001
ต้าหวง	0.0228 ± 0.0005^{a}	0.9992
อูเหมย	0.6249 ± 0.0244^{c}	<0.0001
BHT	0.0241 ± 0.0009^{a}	-

* ค่า IC_{50} แสดงค่าเฉลี่ย (Mean) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ (N=3)

a, b, c แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเปรียบเทียบสารสกัดสมุนไพรจีนกับ BHT, *P*-value < 0.05 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (N=3)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนต่อเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี Agar well diffusion

สารสกัดสมุนไพร ความเข้มข้น 25 mg/ml	ค่าเฉลี่ยโซนใส (มิลลิเมตร) ± SD*		
	S. aureus ATCC 6538	*S. aureus* ATCC 25923	MRSA
หวงไป่	27.00 ± 0.20^{a}	17.91 ± 0.35^{b}	23.18 ± 0.11^{c}
ต้าหวง	19.95 ± 0.31^{a}	23.23 ± 0.15^{b}	19.04 ± 0.25^{c}
อูเหมย	12.98 ± 0.17^{a}	14.12 ± 0.12^{b}	12.01 ± 0.16^{c}

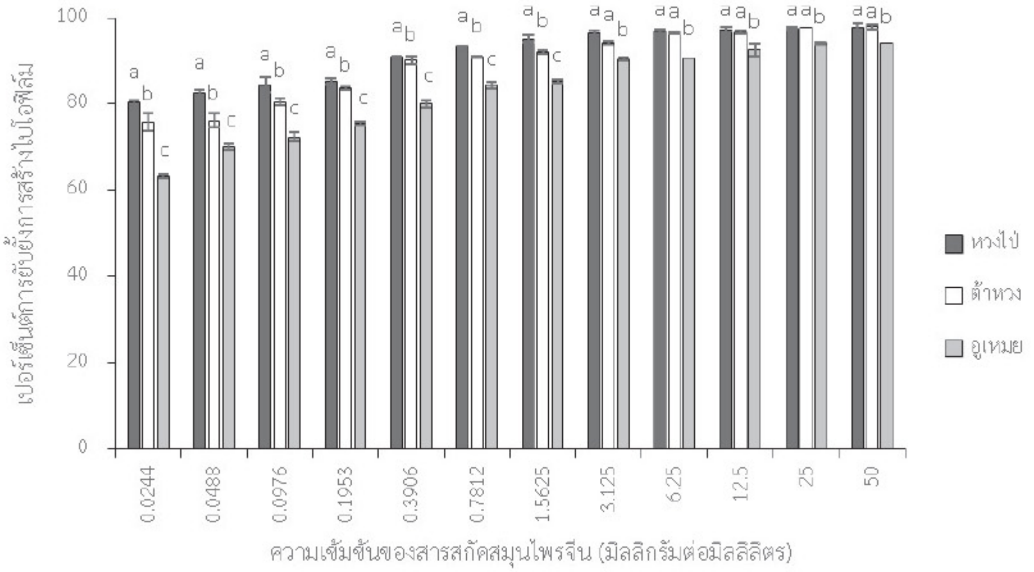
* หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

[a, b, c] แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเปรียบเทียบสารสกัดสมุนไพรจีนต่อเชื้อ 3 ชนิด *P*-value ของสารสกัดสมุนไพรหวงไป่ ต้าหวง และ อูเหมย เท่ากับ <0.0001, 0.003 และ 0.0006 ตามลำดับ

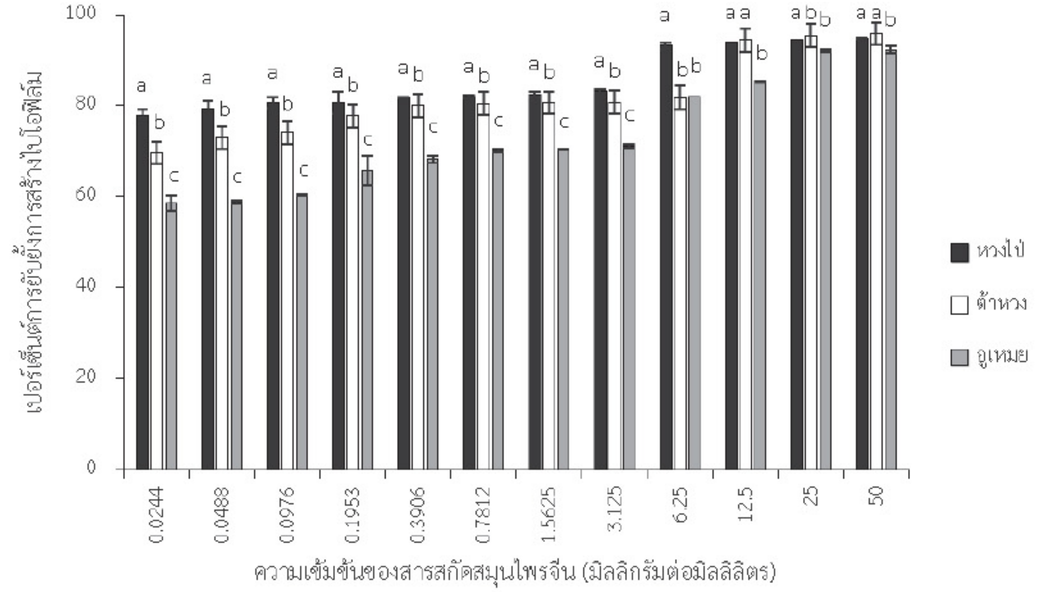
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนต่อเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี Colorimetric broth microdilution

สารสกัดหยาบสมุนไพรจีน	MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		MBC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	
	MSSA*	MRSA	MSSA*	MRSA
หวงไป่	0.391	1.562	0.781	3.125
ต้าหวง	1.562	1.562	3.125	6.250

*MSSA = *S. aureus* ATCC 6538



รูปที่ 1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA ของสารสกัดหยาบหวงไป่ ต้าหวง และอูเหมย ที่ความเข้มข้น 0.0244 - 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากกราฟตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p*<0.05) โดยเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนทั้ง 3 ชนิดต่อเชื้อ MSSA



รูปที่ 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MRSA ของสารสกัดหยาบหวงไป่ ต้าหวง และอูเหมย ที่ความเข้มข้น 0.0244 - 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากกราฟตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนต่อเชื้อ MRSA

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ในสมัยโบราณจนถึงปัจจุบันมีการนำสมุนไพรจีนมาต้มกับน้ำเป็นยาดื่มเพื่อการรักษา ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรจีนเนื่องจากเอทานอลจัดเป็นสารกลุ่มที่มีขั้วปานกลางใกล้เคียงกับน้ำ และมีงานวิจัยที่นิยมใช้เอทานอลในการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรไทยและสมุนไพรจีน(4,10,12-13) เพราะสามารถสกัดได้ทั้งสารที่มีขั้วและสารที่ไม่มีขั้วออกมาได้ มีความสามารถละลายสารได้กว้างขวาง และค่อนข้างปลอดภัยกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นถ้านำมาพัฒนาเพื่อใช้กับร่างกายมนุษย์

ผลการสกัดสมุนไพรจีนพบว่า สารสกัดหยาบอูเหมยให้ร้อยละผลผลิต (% Yield) มากกว่าหวงไป่ และต้าหวงตามลำดับ ซึ่งผลผลิตของต้าหวง (ร้อยละ 8.94) สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ผลผลิตใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 9.48-16.09)(14) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรจีนทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบต้าหวงมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกับสารมาตรฐาน BHT มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0228±0.0005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง) ส่วนสารสกัดหยาบหวงไป่และอูเหมยมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน BHT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปว่า แม้ว่าสารสกัดหยาบอูเหมยจะให้ร้อยละผลผลิตมากที่สุด แต่การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบต้าหวงให้ผลดีที่สุด และอูเหมยมีการยับยั้งอนุมูลอิสระน้อยที่สุด ไม่ได้แปรผันตามปริมาณที่สารสกัดได้

สารต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญในการช่วยต้านการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อที่ผิวหนัง มาจากธรรมชาติและการสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี สารประกอบฟีโนลิก ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระแบบสารสังเคราะห์ ได้แก่ BHA (Butylated hydroxyanisole), BHT (Butylated hydroxytoluene), TBHQ (Tertiary butyl hydroquinone) เป็นต้น ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย ซึ่งจะเห็นได้จากการเป็นส่วนประกอบของอาหารและผลิตภัณฑ์สุขภาพหลายชนิด สารเหล่านี้จะทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ในร่างกายเพื่อป้องกันเซลล์ไม่ให้ถูกทำลาย สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติจะพบได้ในสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนทั้ง 3 ชนิด สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่พบ Phellodendrine และ Berberine จากเปลือกหวงไป่[15] Quinones, Coumarins และ Emodin จากต้าหวง[16] และสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระคือ 3-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid และ 5-O-caffeoylquinic acid จากอูเหมย[12]

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย MSSA และ MRSA ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรจีนด้วยวิธี Agar well diffusion และการหาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี Colorimetric broth microdilution พบว่าสารสกัดหยาบหวงไป่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ MSSA ทั้ง 2 สายพันธุ์และ MRSA ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ต้าหวง และอูเหมยตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยสมุนไพรไทย พบว่าสารสกัดหยาบหวงไป่และต้าหวงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MSSA ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชัน จันทน์แดง จันทน์แปดกลีบ ชุมเห็ดเทศ ฝาง พริกไทยดำ ฟ้าทะลายโจร ยี่หร่า สมอไทย และอบเชย[10] เปลือกมังคุด ขมิ้นชัน ใบบัวบก[17] แต่ใกล้เคียงกับชะเอมเทศ (MIC 0.78 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร MBC 1.56 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)[18] สารสกัดหยาบหวงไป่และต้าหวงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA เท่ากัน แต่มีค่า MIC สูงกว่ารากต้าหวงที่สกัดด้วยเมทานอล (0.075 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)[19] จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดหยาบหวงไป่ และต้าหวง มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย MSSA และ MRSA ได้ดี สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim et al.[20] ที่ทำการสำรวจฤทธิ์การต้านเชื้อ Multidrug-resistant *S. aureus* ของสมุนไพรจีน 239 ชนิด และพบว่าหวงไป่เป็นหนึ่งในสมุนไพร 18 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA และมีพิษต่อเซลล์ต่ำ (Lowcytotoxicity) และ Lee et al.[21] ที่พบว่าต้าหวงมีสารสำคัญ คือ Emodin ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ระดับหนึ่งและเสริมฤทธิ์เมื่อใช้ร่วมกับยาออกซาซิลลินและแอมพิซิลลิน ทำให้ค่า MIC ของยาทั้งสองลดลง

S. aureus เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารเมือกที่มีความเหนียวออกภายนอกเซลล์ทำให้เชื้อที่แบ่งตัวอยู่รวมกันเป็นกลุ่มบนพื้นผิว เรียกว่า ไบโอฟิล์ม ทำหน้าที่ยึดเกาะพื้นผิว ช่วยปกคลุมเซลล์แบคทีเรีย ทำให้ระบบภูมิต้านทานของร่างกายและสารต้านจุลชีพเข้าไปทำลายเชื้อได้ยาก รวมทั้งสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ภายใน ดังนั้น ถ้าเชื้อไปยึดเกาะกับพื้นผิวอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ใส่เข้าไปในร่างกาย จะทำให้เชื้อดื้อยาและมีโอกาสแพร่กระจายเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA และ MRSA ด้วยวิธี Crystal violet staining for biofilm assay พบว่าสารสกัดหยาบหวงไป่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีกว่าสารสกัดหยาบต้าหวงและสารสกัดหยาบอูเหมยตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yan et al.[16] พบว่าต้าหวงมีสารสำคัญ คือ Emodin (1,2,8-Trihydroxy-6-methylanthraquinone) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* CMCC 26003

สรุปว่า สารสกัดหยาบหวงไป่มีฤทธิ์ต้านเชื้อและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ MSSA และ MRSA ได้ดีที่สุด และสารสกัดหยาบต้าหวงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด จึงเป็นทางเลือกที่ดีทางหนึ่งที่จะนำมาศึกษาต่อเกี่ยวกับการสกัดสารสำคัญแต่ละชนิดในสมุนไพรจีน เพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อในกลุ่มที่ทำให้เกิดฝี หนอง ได้แก่ ยาทาภายนอก สเปรย์ฆ่าเชื้อ และแผ่นพลาสเตอร์ปิดแผลต่อไป หรือใช้ร่วมกับยาแผนปัจจุบันเพื่อรักษาการติดเชื้อบริเวณผิวหนังที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ MSSA และ MRSA อย่างไรก็ตามคงต้องพิจารณาเกี่ยวกับแหล่งที่มาของสมุนไพรจีน การนำเข้าจากต่างประเทศ ราคา แนวโน้มที่จะมีการส่งเสริมการปลูกในประเทศไทยเพื่อใช้ในเชิงพาณิชย์ และศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพของสมุนไพรจีนที่แตกต่างกันตามแหล่งเพาะปลูก ภูมิอากาศและฤดูกาลต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Brown NM, Goodman AL, Horner C, Jenkins A, Brown EM. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Updated guidelines from the UK. JAC-Antimicrob resist [Internet]. 2021 February [cited 2022 Jan 5];3(1):1-18. Available from:https://doi.org/10.1093/jacamr/dlaa114
2. Xu GJ, Wang Q, editors. Colors illustrations of Chinese Materia Madica. Fujian: Fukjian Science and Technology Publish House; 2006.
3. Gao XM, editors. Chinese Materia Medica. 2nd ed. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine; 2007.
4. Sun Y, Lenon GB, Yang AWH. *Phellodendri* cortex: A phytochemical, pharmacological, and pharmacokinetic review. [Internet]. 2019 [cited 2021 Dec 25]. Available from: https://doi.org/10.1155/2019/7621929.
5. Feng Y, Niu MG, Zhang QW. Research progress on chemical components and pharmacological activity of *Phellodendri amurensis* cortex. Mod Chin Med. 2021;21(8):1486-98.
6. Yu W, Xue Y, Xia PF, Ma X, Yang RJ, Hu JR, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of *Rhei Radix et Rhizoma* and predictive analysis on quality markers. Chin Tradit Herb Drugs. 2019;50(19):4821-37.
7. Bailly C. Anticancer properties of Prunus mume extracts (Chinese plum, Japanese apricot). J Ethnopharmacol [internet]. 2020 [Cited 2021 Dec 1];10:246:112215. Available from:http://doi: 10.1016/j.jep.2019.112215

8. Sabayjai D, Bun-ek A, Sutin S, Sintamuth O, Nintasen R, Powtongsook W. Antibacterial, anti-biofilm and antioxidant activities of Chinese herb extracts against oral cavity bacteria. The Sci J of Phetchaburi Rajabhat University. 2020;17(1):33-44.

9. Predner D, Hsieh PC, Lai PY, Charles AL. Evaluation of drying methods on antioxidant activity, total phenolic and total carotenoid contents of sweet potato *Ipomoea batatas* (Lam.) var. Tainong73. J Int Coop. 2008;3(2):73-86.

10. Rangsipanuratn W, Kammarnjassadakul P, Janwithayanuchit I. Antibacterial activities of ten Thai herbal extracts against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* ATCC 25922. HCU J. 2016;19(38):35-48.

11. Lin NJ, Keeler C, Kraigsley AM, Ye J, Lin-Gibson S. Effect of dental monomers and initiators on *Streptococcus mutans* oral biofilms. Dent Mater. 2018;34(5):776-85.

12. Daozong X, Xiaoqin W, Jiayi S, Qing Y, Ying Z. Phenolic compounds from the edible seeds extract of Chinese Mei (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) and their antimicrobial activity. Food Sci Technol. 2011;44(1):347-49.

13. Miao WG, Tang C, Ye Y. Traditional Chinese medicine extraction method by ethanol delivers drug-like molecules. Chin J Nat Med. [internet]. 2019 [cited 2021 Dec 10];17(9):713-20. Available from: http://doi:10.1016/S1875-5364(19)30086-X

14. Mehmet B, Metin Y, Oruc A, Mirostaw K, Renata F, Serap Y. Antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities of Turkish Rhubarb (*Rheum palmatum* L.) leaf extracts. MDPI. 2017;1:1032.

15. Kim YJ, Lim HS, Kim Y, Lee J, Kim BY, Jeong SJ. Phytochemical quantification and the in vitro acetylcholinesterase inhibitory activity of *Phellodendron chinense* and its components. Molecules [internet]. 2017 [cited Dec 2];22:925. Available from: http://doi:10.3390/molecules22060925

16. Yan X, Gu S, Shi Y, Cui X, Wen S, Ge J. The effect of emodin on *Staphylococcus aureus* strains in planktonic form and biofilm formation *in vitro*. Arch Microbiol. 2017;199(9):1267-75.

17. Pojanaukij N, Kajorncheappunngam S. Comparison of antimicrobial activity of mangosteen crude, turmeric and gotu kola extract. Naresuan University J. 2010;18(1):1-9. (in Thai)

18. Suwannakul S, Yuankyong S, Masi K, Nanbunta P, Burirak P. Antibacterial activities of licorice extract on biofilms and planktonic cells of *Staphylococcus aureus*. Naresuan University J. 2014;22(1):80-90. (in Thai)

19. Aly MM, Gumgumjee NM. Antimicrobial efficacy of *Rheum palmatum, Curcumalonga* and *Alpinia officinarum* extracts against some pathogenic microorganisms. Afr J Biotechnol. 2011;10(56):12058-63.

20. Kim G, Gan R, Zhang D, Farha AK, Habimana O, Mavumengwana V, et al. Large-scale screening of 239 traditional Chinese medicinal plant extracts for their antibacterial activities against multidrug-resistant Staphylococcus aureus and cytotoxic activities. Pathogens [internet]. 2020 [cited 2021 Dec 6];9:185. Available from: http://doi:10.3390/pathogens9030185

21. Lee YS, Kang OH, Choi JG, Oh YC, Keum JH, Kim SB, et al. Synergistic effect of emodin in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pharm Biol. 2010;48(11):1285-90.