

การศึกษาการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhimurium ด้วยสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรไทย 12 ชนิด และสารสกัดหยาบผสม

THE STUDIES ON INHIBITION OF *ESCHERICHIA COLI* AND *SALMONELLA* TYPHIMURIUM OF 12 MEDICINAL PLANT CRUDE EXTRACTS AND THEIR MIXTURES

นิพนธ์ สนมอม¹ วีระพงษ์ วรประโยชน์² และ กฤตพร รำจวนเกียรติ^{3*}

^{1,3}วิทยาลัยนวัตกรรมเกษตรและเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี 12000

²กลุ่มวิจัยส่วนผสมฟังก์ชันและนวัตกรรมอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ปทุมธานี 12120

Nipon Sonhom¹, Weerapong Woraprayote², and Kittaporn Rumjuankiat^{3*}

^{1,3}College of Agricultural Innovation and Food Technology, Rangsit University, Pathum Thani, 12000

²Functional Ingredients and Food Innovation Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Pathum Thani, 12120

*E-mail: kittaporn.r@rsu.ac.th

Received: 25-05-2022

Revised: 11-08-2022

Accepted: 23-08-2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย 12 ชนิด สกัดด้วยน้ำและเอทานอล ในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* จำนวน 5 สายพันธุ์ และ *Salmonella* Typhimurium จำนวน 1 สายพันธุ์ ทดสอบโดยใช้วิธี spot-on-lawn รวมทั้งศึกษาเวลาในการฆ่าเชื้อ และการเสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบผสม จากการทดสอบพบว่า สารสกัดหยาบจากรากของโกฐน้ำเต้า (*Rheum palmatum* L.) เหง้ากระชาย (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) และต้นทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* L.) ที่สกัดด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ทดสอบได้ดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ในช่วง 0.19-0.78, 0.19-0.78 และ 0.19-1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ความเร็วในการฆ่าเชื้อของสารสกัด ที่ค่า MIC พบว่า สารสกัดหยาบโกฐน้ำเต้าสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้มากกว่า 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 12 ชั่วโมง การทดสอบความสามารถในการเสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบกระชาย ทองพันชั่ง และโกฐน้ำเต้า ด้วยวิธี checkerboard พบว่าทั้งสารสกัดหยาบกระชาย และสารสกัดหยาบทองพันชั่งสามารถเสริมฤทธิ์ สารสกัดหยาบโกฐน้ำเต้า ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* ATCC13311 ได้ โดย Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) มีค่าเท่ากับ 0.5 ทั้งนี้ส่วนผสมของสารสกัดหยาบโกฐน้ำเต้า และสารสกัดหยาบ

กระชายที่ความเข้มข้น 0.09 และ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* O157H:7 และ *S. Typhimurium* ATCC13311 ได้มากกว่า 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 6 ชั่วโมง

คำสำคัญ: กระชาย ทองพันชั่ง โกงฐน้ำเต้า สารสกัดหยาบ การฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

ABSTRACT

Antibacterial activity of aqueous and ethanolic crude extracts from twelve Thai medicinal plants was studied on inhibition of five strains of *Escherichia coli* and one strain of *Salmonella Typhimurium* using spot-on-lawn method including time-kill kinetic assay and synergistic effect of mixtures. Ethanolic crude extracts from the root of *Rheum palmatum* L., the rhizome of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and aerial part of *Rhinacanthus nasutus* L. exhibited minimum inhibitory concentration (MIC) values ranging from 0.19-0.78, 0.19-0.78 and 0.19-1.56 mg/mL, respectively. Ethanolic crude extract of *R. palmatum* L. inhibited both bacteria at more than 2 log CFU/mL in 12 h. Synergistic effects of mixture of crude extracts of *B. rotunda*, *R. nasutus* and *R. palmatum* were tested using checkerboard method. Crude extract of *B. rotunda* and *R. nasutus* synergized antibacterial activity with *R. palmatum* crude extract against *E. coli* O157H:7 and *S. Typhimurium* ATCC13311 at fractional inhibitory concentration index (FICI) of 0.5. *E. coli* O157H:7 and *S. Typhimurium* ATCC13311 were inhibited at more than 2 log CFU/mL in less than 6 h by mixture of crude extracts of *R. palmatum* and *B. rotunda* at concentrations of 0.09 and 0.19 mg/mL, respectively.

Keywords: *Rheum palmatum*, *Boesenbergia rotunda*, *Rhinacanthus nasutus*, Crude extract, Antibacterial activity

บทนำ

ปัจจุบันคนไทยเสี่ยงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษมากขึ้น อันเนื่องมาจากการรับประทานอาหารที่ปรุงไม่สุก อาหารทะเล รวมทั้งอาหารค้างคืน ซึ่งอาจมีการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคท้องร่วงได้ เช่น *Salmonella* spp., *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น การรายงานการแพร่ระบาดของโรคของกองระบาดวิทยา พบว่าในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ. 2560-พ.ศ. 2564) มีรายงานการพบผู้ป่วยเป็นโรคอุจจาระร่วงมากที่สุดในช่วงเดือน มกราคมถึงกุมภาพันธ์ และเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน โดยในปี 2564 พบผู้ป่วยมากถึง 503,816 ราย สำหรับในปี 2565 มีรายงานผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงสะสม 33,365 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 50.41 ต่อประชากรแสนคน ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มอายุ 25-34 ปี ถึงร้อยละ 14.15 (Department of disease control, 2022) อาการที่พบได้บ่อยคือ อาการปวดท้อง ท้องเดิน คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้เล็กน้อย ในบางรายที่รุนแรงอาจเกิดอาการช็อคหมดสติได้ การรักษาจะใช้วิธีการรักษาแบบพุงอาการ อาจมีการให้น้ำ และอาหารอ่อน ในส่วนของการใช้ยาปฏิชีวนะยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่และมักจะให้หลีกเลี่ยงการใช้ เนื่องจากยาปฏิชีวนะไม่มีผลต่อการลดอาการของโรค (Institute of public health sciences, 2014)

เชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค ได้แก่ *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria) มีรูปร่างเป็นแท่ง ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เจริญได้ดีทั้งในสภาวะมีอากาศ และไม่มีอากาศ เป็นแบคทีเรีย

ที่จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) ประเภท fecal coliform ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่พบได้ในลำไส้ของคน และสัตว์เลือดอุ่น (Saeedi et al., 2017) เชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์เป็นสาเหตุก่อให้เกิดอาการท้องร่วงได้ หากรับประทานอาหาร น้ำ หรือเครื่องดื่มที่มีการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้ (Berthe et al., 2013) กลไกการก่อโรคของเชื้อ *E. coli* แต่ละสายพันธุ์นั้นมีความแตกต่างกันไป เช่น เชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* เป็นเชื้อที่สามารถผลิตสาร Enterotoxin ซึ่งก่อให้เกิดอาการท้องร่วงแบบเฉียบพลัน ถ่ายเหลวเป็นน้ำ เชื้อ Enterohaemorrhagic *E. coli* ที่สามารถผลิตสาร Shiga ซึ่งเป็นสารพิษที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง ถ่ายเป็นมูกเลือด ก่อให้เกิดกลุ่มอาการเม็ดเลือดแดงแตก อาจถึงขั้นไตวายเฉียบพลันได้ (Institute of public health sciences, 2014; Kaper et al., 2004)

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria) มีรูปร่างเป็นแท่ง ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เจริญได้ทั้งในสภาวะมีอากาศ และไม่มีอากาศ ไม่สร้างแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า (flagella) ที่ยาว โดยมีอยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) เป็นแบคทีเรียที่พบได้ลำไส้มนุษย์และสัตว์ อาหารที่พบว่าการปนเปื้อน คือ เครื่องใน เนื้อไก่ ไช้ และนมดิบ (Coburn et al., 2007) อาการของโรคจากการได้รับเชื้อ คือ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องร่วง เป็นไข้ สามารถพบหลังจากได้รับเชื้อมาแล้วประมาณ 8-72 ชั่วโมง (Orndorff et al., 1999) นอกจากนี้ *Salmonella* บางสายพันธุ์สามารถทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ได้ อาทิ *S. enterica*, *S. Paratyphi* A, B และ C (Gänzle, 2015) สำหรับการรักษายังไม่มีแนวทางที่ใช้ในการปฏิบัติ เนื่องจากแพทย์ไม่สามารถแยกอาการท้องร่วงที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Salmonella* หรือมีสาเหตุมาจากเชื้อชนิดอื่นได้ จนกว่าจะทราบข้อมูลการเพาะเชื้อ แต่แพทย์มักทำการวินิจฉัยโดยภาพรวมว่าเป็นโรคท้องร่วงจากการติดเชื้อ จึงทำการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น norfloxacin หรือ co-trimoxazole เป็นต้น (Coburn et al., 2007)

จากผลการรายงานจำนวนผู้ป่วยปัจจุบันพิษสุนัขไพรจึงได้รับความนิยมในการนำมารักษาโรคมามากขึ้น เนื่องจากมีการตระหนักถึงปัญหาการดื้อยาหรือผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการใช้ยาปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีการนำสมุนไพรไทยมาใช้ในการต้านจุลชีพ โดยตามหลักการแพทย์แผนไทย ยาที่ใช้รักษาอาการท้องร่วงท้องเสียจะมีรสฝาด ซึ่งรสฝาดที่เกิดขึ้นมีสารที่สำคัญคือแทนนิน ซึ่งเป็นกรดอ่อนๆ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Jarriyawattanachai et al., 2016) นอกจากนี้มีรายงานว่าพิษสุนัขไพรไทยจำนวนหลายชนิดที่สามารถใช้รักษาโรคในระบบทางเดินอาหาร และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ อาทิ พริกไทย สมอไทย กระชายดำ และขมิ้น (Jarriyawattanachai et al., 2016; Packiavathy et al., 2014; Saeloh & Visutthi, 2021) เป็นต้น Khan et al. (2022) ได้รายงานการศึกษาสารสกัดหยาบสมอไทยที่ใช้เอทานอลในการสกัด พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *Staphylococcus* sp. และ *Bacillus* sp. ได้ที่ความเข้มข้น 10, 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ Karimi et al. (2018) ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *E. coli*, *Acinetobacter junii* และ *Candida albicans* ด้วยสารสกัดหยาบขมิ้นที่ใช้เอทานอลในการสกัด พบว่าการใช้สารสกัดหยาบขมิ้นที่ความเข้มข้น 20, 5, 20 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ตามลำดับ

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ศึกษาฤทธิ์ของพิษสุนัขไพรไทยจำนวน 12 ชนิด (โดยคัดเลือกพิษสุนัขไพรจากการที่มีสรรพคุณในการใช้รักษาโรคในระบบทางเดินอาหาร) ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* จำนวน 5 สายพันธุ์ และ *S. Typhimurium* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของพิษสุนัขไพรต่อการยับยั้งเชื้อเป้าหมาย รวมทั้งศึกษาระยะเวลาในการยับยั้งเชื้อ เพื่อประเมินศักยภาพในการนำสารสกัดหยาบพิษสุนัขไพรไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วิธีการ

1. การสกัดสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร

ขิงสมุนไพรแห้งสับละเอียดจำนวน 12 ชนิด (ตารางที่ 1) ชนิดละ 20 กรัม แช่ตัวทำละลายสองชนิด ได้แก่ น้ำและเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 ต่อ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) นาน 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ดัดแปลงวิธีการจาก (Zhang et al., 2018) หลังจากนั้นนำมารองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Whatman No.1, GE Healthcare, USA) แล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator; Buchi R-114, Switzerland) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะข้นเหนียว แล้วละลายด้วยสาร dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วย syringe filters ขนาด 0.2 ไมครอนเมตร (Advantec, Japan) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 5 สายพันธุ์ และ *S. Typhimurium*

ตารางที่ 1 พืชสมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษาการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. Typhimurium*

ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้
กระชาย	<i>Boesenbergia rotunda</i> (L.) Mansf.	เหง้า
ขมิ้น	<i>Curcuma longa</i> L.	เหง้า
เปล้าน้อย	<i>Croton fluvialis</i> Esser.	ลำต้น
น้ำนมราชสีห์	<i>Euphorbia hirta</i> L.	ทั้งต้น
กะเม็ง	<i>Eclipta prostrata</i> L.	ลำต้นและใบ
ปอกะบิด	<i>Helicteres isora</i> L.	ผล
เปราะหอม	<i>Kaempferia galanga</i> L.	เหง้า
ลูกใต้ใบ	<i>Phyllanthus niruri</i> L.	ทั้งต้น
พริกไทย	<i>Piper nigrum</i> L.	ผล
สมอไทย	<i>Terminalia chebula</i> Retz.	ผล
โกฐน้ำเต้า	<i>Rheum palmatum</i> L.	ราก
ทองพันชั่ง	<i>Rhinacanthus nasutus</i> L.	ลำต้นและใบ

2. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. Typhimurium*

2.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* F18, *E. coli* O157:H7, *E. coli* ATCC35401, *E. coli* JCM1903T และ *S. Typhimurium* จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ *S. Typhimurium* ATCC13311 บนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA; Difco, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายโคโลนีเดียวลงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.2 การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (minimum inhibition concentration; MIC)

วิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยทดสอบด้วยวิธี Spot-on-lawn ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก (Ennahar et al., 2001) เทาอาหาร TSA ที่ผสมวุ้นความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้แห้งตัว จากนั้นดูดเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 30 ไมโครลิตร ลงในอาหาร TSA ที่ผสมวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเททับบนอาหารเดิมที่เตรียมไว้ นำสารสกัดหยาบสมุนไพรแต่ละชนิดเจือจางให้ความเข้มข้นลดลงครึ่งละ 2 เท่า (2-fold serial dilution) หลังจากนั้นดูดสารสกัดหยาบที่เจือจาง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ สารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดถูกเลือก ไปศึกษาเวลาในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. Typhimurium* และทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรผสมต่อไป

3. การศึกษาเวลาในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. Typhimurium* ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ดี (โกลูน่าเต้า)

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* จำนวน 5 สายพันธุ์ และ *S. Typhimurium* ในอาหาร TSB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง โดยทดสอบเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 1.0×10^4 CFU ต่อ มิลลิตร เติมน้ำสารสกัดหยาบ (โกลูน่าเต้า) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ MIC (จากการทดลองที่ 2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ยังมีชีวิต (viable count) ด้วยวิธี Drop plate บนอาหาร TSA ทุก 2 ชั่วโมง ซึ่งดัดแปลงวิธีการจาก Mun et al. (2013)

4. การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. Typhimurium* ด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรผสม

ทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบสมุนไพรผสม ได้แก่ สารสกัดหยาบโกลูน่าเต้าร่วมกับสารสกัดหยาบกระชาย และสารสกัดหยาบโกลูน่าเต้าร่วมกับสารสกัดหยาบทองพันชั่ง ด้วยวิธี Checkerboard antimicrobial synergy testing วิธีการดัดแปลงจาก Ahmad et al. (2019) เตรียมสารสกัดหยาบสมุนไพรผสมโดยนำสารสกัดหยาบโกลูน่าเต้า เริ่มความเข้มข้น 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร (2MIC) เจือจางความเข้มข้นลดลงครึ่งละ 2 เท่า ตามแกน X (ตามแนวนอนใน 96-well microplate) ส่วนสารสกัดหยาบกระชายและสารสกัดหยาบทองพันชั่ง เริ่มความเข้มข้นเท่ากับ 0.78 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เจือจางความเข้มข้นลดลงครึ่งละ 2 เท่า ตามแกน Y (ตามแนวตั้งใน 96-well microplate) (Falcon, USA) หลังจากนั้นดูดตัวอย่างในหลุมปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157H:7 และ *S. Typhimurium* ATCC13311 ด้วยวิธี Spot-on-lawn นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบชนิดเดียว และสารสกัดหยาบผสมที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและคำนวณค่า fractional inhibitory concentration index (FICI) ตามสมการ

$$\Sigma FICI = FICI A + FICI B$$

FICI A = MIC ของสารผสม A/MIC ของสาร A เดี่ยว ๆ

FICI B = MIC ของสารผสม B/MIC ของสาร B เดี่ยว ๆ

หมายเหตุ : FICI ; fractional inhibitory concentration index และแปลผลดังนี้ $FICI \leq 0.5$ เสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Synergy); $0.5 < FICI \leq 4$ ไม่เสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (No interaction) และ $FICI > 4$ ต้านฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Antagonism)

5. การศึกษาเวลาในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. typhimurium* ด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรผสม

จากการทดสอบที่ 4 จึงนำสารสกัดหยาบโสมน้ำเต้าร่วมกับสารสกัดหยาบกระชายที่ความเข้มข้น 0.09 และ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบโสมน้ำเต้าร่วมกับสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่ความเข้มข้น 0.09 และ 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มาผสมกับสารละลายแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157H:7 และ *S. typhimurium* ATCC13311 ความเข้มข้น 1.0×10^4 CFU ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เพื่อบันทึกข้อมูลปริมาณเชื้อที่มีชีวิตด้วยวิธี Drop plate บนอาหาร TSA (Mun et al., 2013)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. Typhimurium* ด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรไทย 12 ชนิด

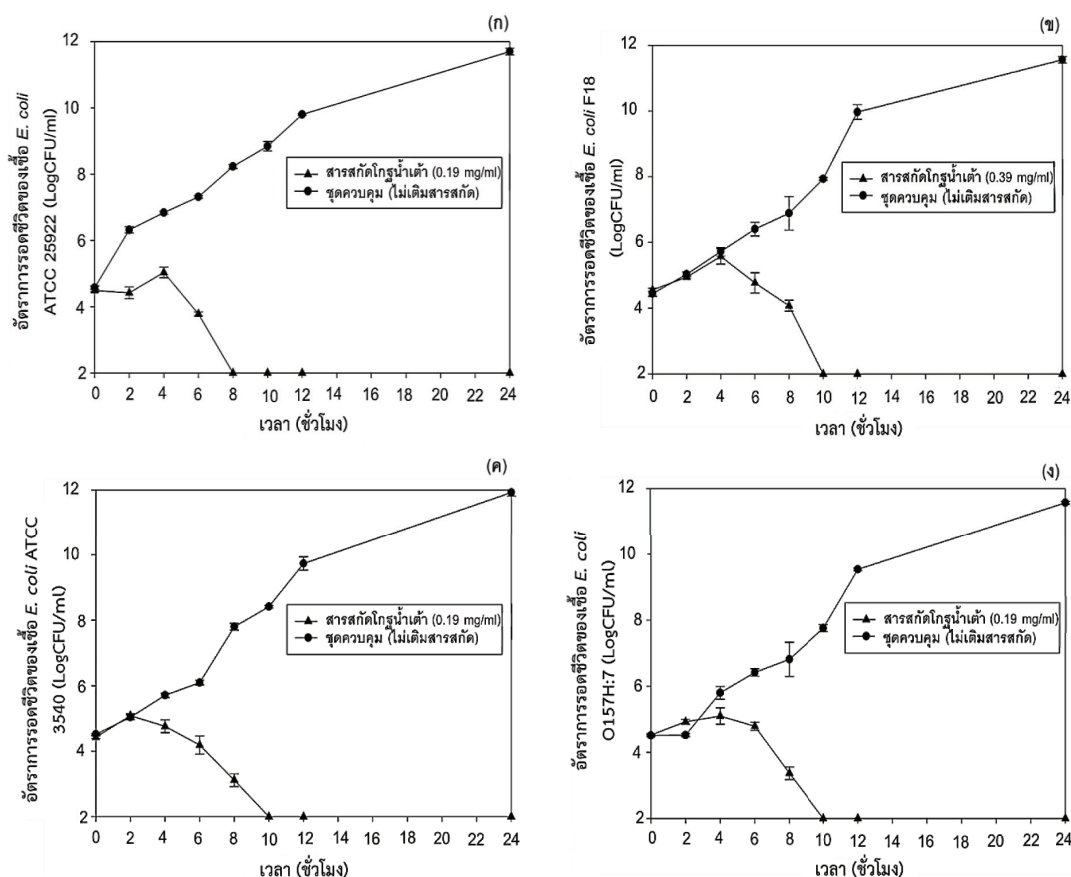
จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. Typhimurium* ด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพร โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอลยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. Typhimurium* ได้ดีกว่าน้ำ โดยสารสกัดหยาบโสมน้ำเต้าที่สกัดด้วยเอทานอลยับยั้งเชื้อทดสอบดีที่สุด โดยมีค่า MIC ในช่วงความเข้มข้น 0.19-0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำพบว่า สารสกัดหยาบน้ำนมราชสีห์แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบสมุนไพรชนิดอื่นๆ ที่ใช้น้ำเป็นตัวสกัด เช่นเดียวกัน โดยมีค่า MIC ในช่วงความเข้มข้น 1.56-6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับการรายงานของ Sen & Batra (2012) ที่พบว่าสารสกัดต้นเลี่ยน (*Melia azedarach* L.) ที่ใช้เอทานอลเป็นตัวสกัดให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* MTCC4317, *Staphylococcus aureus* MTCC3160, *E. coli* MTCC1652, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC4676, *Aspergillus niger* MTCC282, *A. flavus* MTCC2456, *Fusarium oxysporum* MTCC6659 และ *Rhizopus stolonifer* MTCC2591 ได้ดีกว่าการสกัดโดยใช้น้ำ เนื่องจากตัวสกัดเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยกว่าน้ำสามารถทำลายผนังเซลล์ของพืช และละลายสารโพลีฟีนอลออกจากเซลล์พืชได้ง่ายขึ้น (Adnan et al., 2014) โดยสารโพลีฟีนอลพบได้ในพืช มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี อีกทั้งละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (Cowan, 1999) นอกจากนี้รายงานของ Zhang et al. (2017) ยังพบสารสำคัญในโสมน้ำเต้าหลายชนิด เช่น anthraquinones, gallic acid, flavonoids, polyphenols, anthocyanins, organic acids และ chromones โดยสารในกลุ่มของ Anthraquinones มีด้วยกันหลายชนิด เช่น emodin, physcion, rhein, aloe-emodin และ chrysophanol Dai et al. (2021) พบว่าสาร rhein ที่พบได้ในโสมน้ำเต้าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC25923, *S. aureus* MRSA ATCC43300, *Listeria monocytogenes* CICC21529, *P. aeruginosa* CICC216252 และ *Enterococcus faecalis* BNCC102668 ได้ ในขณะที่ Stompor-Gorący. (2021) ได้รายงานว่าสาร emodin และ chrysophanol ในโสมน้ำเต้า ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC25903, *Klebsiella pneumoniae* NCTC13368, *E. coli* ATCC 25722, *P. aeruginosa* DSMZ 1117 และ *C. albicans* ได้

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบพืชสมุนไพรไทย 12 ชนิด ที่ยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. Typhimurium*

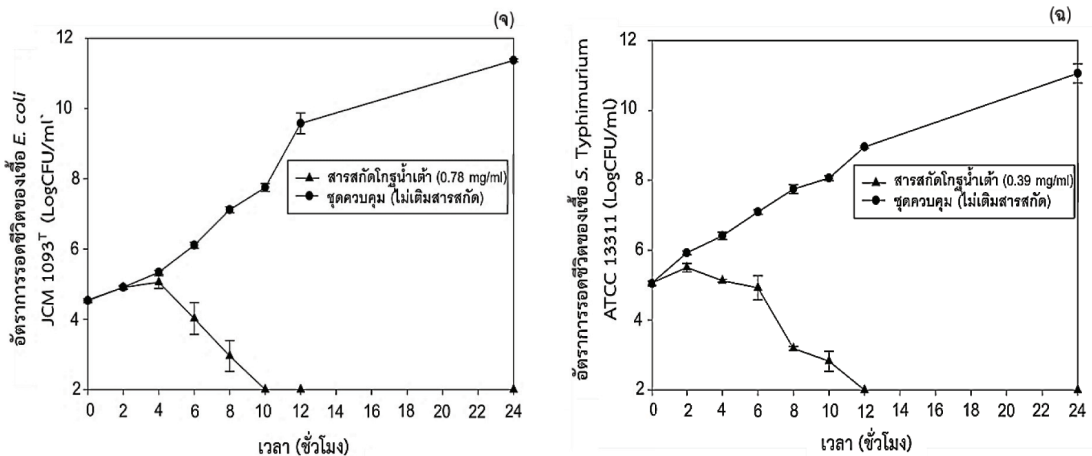
พืชสมุนไพร	สารที่ใช้ ในการสกัด	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)					
		<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>S.</i>
		ATCC 25922	F18	O157:H7	ATCC 35401	JCM 1093 ^T	Typhimurium ATCC13311
กระชาย	เอทานอล	0.78	0.78	0.39	0.19	0.39	0.78
	น้ำ	12.5	3.12	12.5	12.5	25	12.5
ขมิ้น	เอทานอล	0.39	1.56	0.78	0.39	0.39	1.95
	น้ำ	3.12	25	12.5	6.25	6.25	12.5
เปล้าน้อย	เอทานอล	0.78	0.39	1.56	0.78	0.39	1.56
	น้ำ	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	6.25
น้านมราชสีห์	เอทานอล	0.39	0.39	0.78	0.39	0.78	0.78
	น้ำ	3.12	1.56	3.12	6.25	6.25	3.12
กะเม็ง	เอทานอล	1.56	0.78	0.78	0.39	0.39	1.56
	น้ำ	3.12	12.5	12.5	6.25	12.5	12.5
ปอกะบิด	เอทานอล	1.56	0.78	0.78	0.78	0.39	0.78
	น้ำ	6.25	3.12	6.25	6.25	12.5	6.25
เปราะหอม	เอทานอล	0.78	0.39	0.78	0.39	0.78	1.56
	น้ำ	12.5	3.12	6.25	6.25	12.5	12.5
ลูกใต้ใบ	เอทานอล	0.78	0.78	0.39	0.39	0.39	0.39
	น้ำ	3.12	6.25	3.12	12.5	12.5	6.25
พริกไทย	เอทานอล	0.39	0.78	0.39	0.78	0.39	1.56
	น้ำ	6.25	6.25	12.5	12.5	6.25	12.5
สมอไทย	เอทานอล	0.78	0.78	0.39	0.39	0.78	0.78
	น้ำ	3.12	6.25	12.5	3.12	6.25	12.5
โกฐน้ำเต้า	เอทานอล	0.19	0.39	0.19	0.19	0.78	0.39
	น้ำ	6.25	6.25	12.5	3.12	6.25	12.5
ทองพันชั่ง	เอทานอล	0.39	0.78	0.19	0.78	1.56	0.78
	น้ำ	6.25	12.5	12.5	12.5	25	25

2. การศึกษาเวลาในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. Typhimurium* ด้วยสารสกัดหยาบโกลูโนไซด์

การทดสอบความเร็วในการฆ่าเชื้อ *E. coli* ATCC25922, *E. coli* F18, *E. coli* O157:H7, *E. coli* ATCC3540, *E. coli* JCM1093^T และ *S. Typhimurium* ATCC13311 ด้วยสารสกัดหยาบโกลูโนไซด์ที่ความเข้มข้น 0.19, 0.39, 0.19, 0.19, 0.78 และ 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ระดับ MIC ต่อเชื้อแต่ละสายพันธุ์ตามลำดับ นาน 24 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบโกลูโนไซด์สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ทั้ง 5 สายพันธุ์และ *S. Typhimurium* เป็นไปในแนวทางเดียวกัน (ภาพที่ 1) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *E. coli* ATCC25922 พบว่าในเวลาเพียง 8 ชั่วโมง เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตลดลงได้มากกว่า 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 1ก) และใช้เวลา 12 ชั่วโมงในการฆ่าเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC13311 ให้ลดปริมาณลง 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 1ฉ) จากการทดลองของ Techaoei (2022) ได้ศึกษาเวลาในการฆ่าเชื้อของสารสกัดฝางที่ความเข้มข้น 2.50, 5.00 และ 7.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการใช้สารสกัดความเข้มข้น 7.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถฆ่าเชื้อ *Aeromonashydrophila* และ *Streptomyces* sp. ได้ดีที่สุดที่ระยะเวลา 9 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรมีผลต่อความเร็วในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย



ภาพที่ 1 ระยะเวลาในการยับยั้งเชื้อ (ก) *E. coli* ATCC25922 (ข) *E. coli* F18
(ค) *E. coli* O157:H7 (ง) *E. coli* ATCC3540 (จ) *E. coli* JCM1093^T (ฉ) *S. Typhimurium* ATCC13311
ของสารสกัดหยาบโกลูโนไซด์ที่สกัดด้วยเอทานอล



ภาพที่ 1 (ต่อ)

3. การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. Typhimurium* ด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรผสม

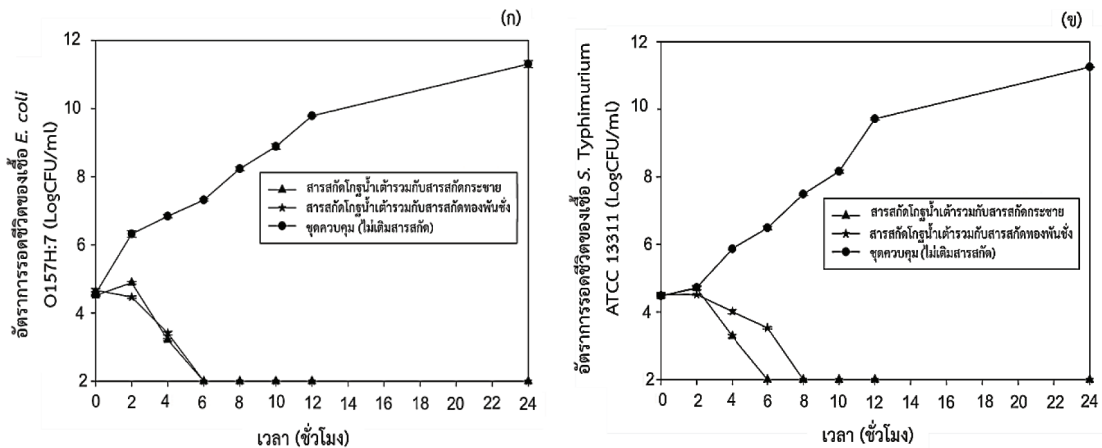
การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบโสมน้ำเต้า สารสกัดหยาบกระชาย และ สารสกัดหยาบทองพันชั่ง (ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ดี และเชื่อมีความสำคัญในทางการแพทย์ ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบที่ใช้เอทานอลเป็นตัวสกัด) พบว่าสารสกัดหยาบกระชาย และสารสกัดหยาบทองพันชั่งสามารถเสริมฤทธิ์กันกับสารสกัดหยาบโสมน้ำเต้าในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157H:7 และ *S. Typhimurium* ATCC13311 ได้ โดยมีค่า FICI เท่ากับ 0.5 แสดงดังตารางที่ 3 โดยการใช้สารสกัดหยาบโสมน้ำเต้าความเข้มข้น 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการใช้สารสกัดหยาบกระชายความเข้มข้น 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157H:7 และ *S. Typhimurium* ATCC13311 ได้ดีกว่าการใช้สารสกัดหยาบโสมน้ำเต้าความเข้มข้น 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารสกัดหยาบทองพันชั่งความเข้มข้น 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากใช้ความเข้มข้นที่น้อยกว่า จากการทดลองของ Gadisa et al. (2019) รายงานว่า สารสกัดสมุนไพรต่างชนิดที่นำมาผสมกันระหว่าง *Thymus schimper* กับ *Blepharis cuspidata*, *B. cuspidata* กับ *Boswellia ogadensis* และ *B. ogadensis* กับ *T. schimper* ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 นั้นสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922 ได้ที่ความเข้มข้น 1.56, 6.25 และ 6.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การใช้สารสกัดเพียงชนิดเดียว ได้แก่ *T. schimper*, *B. cuspidata* และ *B. ogadensis* สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922 ได้ที่ความเข้มข้น 6.50, 12.5 และ 6.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบสมุนไพร

สารสกัดหยาบที่ใช้ทดสอบ	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบ ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		FICI	ΣFICI	ผลที่ได้
	สารสกัดหยาบ ชนิดเดี่ยว	สารสกัดหยาบ ผสม			
สารสกัดหยาบโกฐน้ำเต้า/ สารสกัดกระชาย	0.39/0.78	0.09/0.19	0.23/0.24	0.5	เสริมฤทธิ์ การยับยั้ง
สารสกัดหยาบโกฐน้ำเต้า/ สารสกัดทองพันชั่ง	0.39/1.56	0.09/0.39	0.23/0.24	0.5	เสริมฤทธิ์ การยับยั้ง

4. ความเร็วในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของส่วนผสมสมุนไพร

การทดสอบความเร็วในการฆ่าเชื้อ *E. coli* O157H:7 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ของส่วนผสมสารสกัดหยาบโกฐน้ำเต้ากับสารสกัดหยาบกระชาย และสารสกัดหยาบโกฐน้ำเต้ากับสารสกัดหยาบทองพันชั่ง พบว่าส่วนผสมของสารสกัดหยาบโกฐน้ำเต้าความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับสารสกัดหยาบกระชายความเข้มข้น 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* O157H:7 และ *S. Typhimurium* ATCC13311 ได้มากกว่า 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร (ร้อยละ 99) ภายในเวลา 6 ชั่วโมง ในขณะที่ส่วนผสมของสารสกัดหยาบโกฐน้ำเต้าความเข้มข้น 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับสารสกัดหยาบทองพันชั่งที่ความเข้มข้น 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* O157H:7 และ *S. Typhimurium* ATCC13311 ได้มากกว่า 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 6 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ (ภาพที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ye et al. (2013) ที่พบว่าสาร carvacrol ที่ได้จากการสกัดออริกานที่ความเข้มข้น 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ร่วมกับ สาร cinnamaldehyde ที่ได้จากการสกัดอบเชยที่ความเข้มข้น 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ โดยตรวจสอบผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 0.5 ซึ่งหลังจากทดสอบความเร็วในการฆ่าเชื้อของสารสกัดหยาบดังกล่าว พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงลดลงต่ำกว่า 0.1 ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 2 ระยะเวลาในการยับยั้งแบคทีเรีย (ก) *E. coli* ATCC25922 และ (ข) *S. Typhimurium* ATCC13311 ด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรผสม 1) สารสกัดหยาบโสมน้ำเต้ากับสารสกัดหยาบกระชาย และ 2) สารสกัดหยาบโสมน้ำเต้ากับสารสกัดหยาบทองพันชั่ง

สรุป

สารสกัดหยาบพืชสมุนไพรทั้ง 12 ชนิด ที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* จำนวน 5 สายพันธุ์ และเชื้อ *S. Typhimurium* ได้ดีกว่าการใช้เป็นตัวยับยั้ง จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากโสมน้ำเต้ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด การใช้สารสกัดหยาบโสมน้ำเต้า สามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ATCC25922 ได้จนอยู่ในระดับต่ำกว่าที่จะสามารถตรวจวัดได้ ภายในเวลา 8 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าสารสกัดโสมน้ำเต้ายังสามารถใช้ร่วมกับสารสกัดหยาบกระชาย และสารสกัดหยาบทองพันชั่ง เพื่อเสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* O157H:7 และ *S. Typhimurium* ATCC13311 ได้ ทั้งนี้การใช้สารสกัดหยาบโสมน้ำเต้าร่วมกับกระชายสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าการใช้สารสกัดหยาบโสมน้ำเต้าร่วมกับทองพันชั่ง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยวิทยาลัยนวัตกรรมการเกษตร และเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยรังสิต และขอขอบคุณกลุ่มวิจัยส่วนผสมฟังก์ชันและนวัตกรรมอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำหรับการช่วยเหลือในด้านเครื่องมือ และการให้คำปรึกษาในการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Adnan, M., Bibi, R., Mussarat, S., Tariq, A., & Shinwari, Z. K. (2014). Ethnomedicinal and phytochemical review of Pakistan medicinal plants used as antibacterial agents against *Escherichia coli*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13(1), 1-18.
- Ahmad, M. I., Keach, J. E., Behl, T., & Panichayupakaranant, P. (2019). Synergistic effect of α -mangostin on antibacterial activity of tetracycline, erythromycin, and clindamycin against acne involved bacteria. *Chinese Herbal Medicines*, 11(4), 412-416.

- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., & Petit, F. (2013). Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. **Applied and Environmental Microbiology**, 79(15), 4684-4693.
- Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. **Immunology and Cell Biology**, 85(2), 112-118.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 12(4), 564-582.
- Dai, L. X., Li, J. C., Miao, X. L., Guo, X., Shang, X. F., Wang, W. W., & Zhang, J. Y. (2021). Ultrasound-assisted extraction of five anthraquinones from *Rheum palmatum* water extract residues and the antimicrobial activities. **Industrial Crops and Products**, 162, 1-12.
- Department of disease control. (2022). **Prevention of diseases and health hazards occurring in the summer of Thailand, 2022**. Announcement of the department of disease control.
- Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (2001). Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. **International Journal of Food Microbiology**, 70(3), 291-301.
- Gadisa, E., Weldearegay, G., Desta, K., Tsegaye, G., Hailu, S., Jote, K., & Takele, A. (2019). Combined antibacterial effect of essential oils from three most commonly used Ethiopian traditional medicinal plants on multidrug resistant bacteria. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 19(1), 1-9.
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, 2, 106-117.
- Institute of public health sciences. (2014). *Escherichia coli*. Retrieved from http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/fact_sheet/12_57.pdf [April 2022]
- Jarriyawattanachai, W., Chaveerach, P., & Chokesajjawatee, N. (2016). Antimicrobial activity of Thai-herbal plants against food-borne pathogens *E. coli*, *S. aureus* and *C. jejuni*. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, 11, 20-24.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 2(2), 123-140.
- Karimi, N., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Mehramuz, B., & Kafil, H. S. (2018). Antioxidant, antimicrobial and physicochemical properties of turmeric extract-loaded nanostructured lipid carrier (NLC). **Colloid and Interface Science Communications**, 22, 18-24.
- Khan, I., Ullah, Z., Shad, A. A., Fahim, M., & Öztürk, M. (2022). *In vitro* antioxidant, anticholinesterase inhibitory, and antimicrobial activity studies of *Terminalia chebula* (Retz) and *Terminalia arjuna* (Roxb). **South African Journal of Botany**, 146, 395-400.

- Mun, S. H., Joung, D. K., Kim, Y. S., Kang, O. H., Kim, S. B., Seo, Y. S., & Kwon, D. Y. (2013). Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, 20(8), 714-718.
- Orndorff, P. E., Tsois Renée, M., Adams, L. G., Ficht Thomas, A., & Bäumlér Andreas, J. (1999). Contribution of *Salmonella* Typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves. **Infection and Immunity**, 67(9), 4879-4885.
- Packiavathy, I. A. S. V., Priya, S., Pandian, S. K., & Ravi, A. V. (2014). Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. **Food Chemistry**, 148, 453-460.
- Saeedi, P., Yazdanparast, M., Behzadi, E., Salmanian, A. H., Mousavi, S. L., Nazarian, S., & Amani, J. (2017). A review on strategies for decreasing *E. coli* O157:H7 risk in animals **Microbial Pathogenesis**, 103, 186-195.
- Saeloh, D., & Visutthi, M. (2021). Efficacy of Thai plant extracts for antibacterial and anti-Biofilm activities against pathogenic bacteria. **Antibiotics**, 10(12), 1-9.
- Sen A, & Batra A. (2012). Evaluation of antimicrobial activity of different solvent extracts of medicinal plant: *Melia azedarach* L. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**. 4(2), 67-73.
- Stompor-Gorący, M. (2021). The health benefits of emodin, a natural anthraquinone derived from rhubarb a summary update. **International Journal of Molecular Sciences**, 22(17), 1-16.
- Techaoei, S. (2022). Time-kill kinetics and antimicrobial activities of Thai medical plant extracts against fish pathogenic bacteria. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, 13(1), 25-29.
- Ye, H., Shen, S., Xu, J., Lin, S., Yuan, Y., & Jones, G. S. (2013). Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. **Food Control**, 34(2), 619-623.
- Zhang, Q. Y., Wang, F. X., Jia, K. K., & Kong, L. D. (2018). Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects. **Frontiers in Pharmacology**, 9, 1-25.
- Zhang, Y., Zhou, L., Ma, W., Shi, X., Zhang, H., & Shi, X. (2017). Bidirectional solid fermentation using *Trametes robiniophila* Murr. for enhancing efficacy and reducing toxicity of rhubarb (*Rheum palmatum* L.). **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, 4(3), 306-313.
