ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชสูตรผสม และการประยุกต์ใช้ในสบู่เหลว

Antibacterial activities of formulated plant ethanolic extracts and application in liquid soap products

มณฑล วิสุทธิ[1*], จุฑามาศ หนูชื่น[1], ฉัตรสุดา ถนอมศิลป์[1], ชนัตรา พลวงนอก[2] และ วิมลรัตน์ ขวกเขียว[2]

Monton Visutthi[1*], Chuthamat Nuchuen[1], Chatsuda Thanomsin[1], Chanattra Pluangnok[2] and Wimonrat Khuakkhiao[2]

Received: 3 September 2023; **Revised**: 16 October 2023; **Accepted**: 2 November 2023

บทคัดย่อ

สารสกัดจากพืชส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ในงานวิจัยนี้จึงได้มีการพัฒนาสูตรผสมของสารสกัดจากพืช เพื่อให้ได้สูตรผสมของสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ การศึกษานี้ได้ทำการคัดเลือกพืชทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ ใบจากต้นสัก (*Tectona grandis* L.f.) เหง้าจากต้นไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) เหง้าจากต้นขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) และผลจากต้นมะม่วงหาวมะนาวโห่ (*Carissa carandas* Linn.) มาทำการเตรียมสารสกัดด้วย 95% เอทานอล จากนั้นได้นำมาเตรียมสูตรผสมทั้งหมด 15 สูตร และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ด้วยวิธี Agar disc diffusion และ Broth microdilution สูตรผสมที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่ดีจะถูกนำไปประเมินฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกับแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ จำนวน 8 สายพันธุ์ และนำไปประยุกต์ใช้ในสบู่เหลวเพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ควบคุมเชื้อแบคทีเรีย ทำการทดลองประสิทธิภาพการลดจำนวนเซลล์แบคทีเรียของสบู่เหลวผสมสารสกัดสูตรผสม ผลการทดลองพบว่า สารสกัดสูตรผสมที่ 4 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าสูตรผสมอื่น ๆ โดยมีค่า MIC ต่อแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ เท่ากับ 0.6-2.5 mg/ml และ 5.0-10.0 mg/ml ตามลำดับ และมีค่า MBC ต่อแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ เท่ากับ 2.5-10.0 mg/ml และ 10.0-20.0 mg/ml ตามลำดับ ผลการทดลองประสิทธิภาพของสบู่เหลวที่ผสมสารสกัดสูตรผสม พบว่าสบู่เหลวสามารถลดจำนวนเซลล์แบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดสูตรผสมระหว่างสัก ไพล ขมิ้น และมะม่วงหาวมะนาวโห่ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบได้ดี

คำสำคัญ: สารสกัดสูตรผสมจากพืช, ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย, สบู่เหลว

Abstract

Many plant extracts are more effective against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria. This research aimed to develop a plant extract formula with antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Four distinct plant species, namely leaves of *Tectona grandis* L.f., rhizomes of *Zingiber purpureum* Roscoe, rhizomes of *Curcuma longa* L., and fruits of *Carissa carandas* L., were extracted using 95% ethanol. A total of 15 different extract formulations were prepared and subsequently evaluated for their antibacterial efficacy against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922 using agar disc diffusion and broth microdilution methods. The most promising formulation was further assessed against eight strains of both Gram-positive and

[1] *หลักสูตรครุศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา*

[2] *หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา*

[1] *Bachelor of Education Program in Biology, Faculty of Education, Nakhon Ratchasima Rajabhat University*

[2] *Bachelor of Science Program in Biology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University*

** Corresponding author : E-mail : monton.v@nrru.ac.th*

Gram-negative bacteria. Additionally, the selected formulation was incorporated into a liquid soap, and its efficacy in reducing bacterial cell counts was investigated. The results demonstrated that the fourth formulation exhibited superior antibacterial activity with minimum inhibitory concentration (MIC) values ranging from 0.6 to 2.5 mg/ml against Gram-positive bacteria and 5.0 to 10.0 mg/ml against Gram-negative bacteria. Minimum bactericidal concentration (MBC) values of the formula against Gram-positive bacteria ranged from 2.5 to 10.0 mg/ml, while for Gram-negative bacteria, MBC values ranged from 10.0 to 20.0 mg/ml. This study also revealed that the liquid soap containing the extract formulation effectively reduced bacterial cell counts for both Gram-positive and Gram-negative bacteria. In conclusion, this study highlights the efficacy of the extract formula in combating a wide spectrum of bacterial infections.

Keywords: Formulation plant extract, anti-bacterial activity, liquid soap

บทนำ

การติดเชื้อที่ผิวหนัง และการติดเชื้อเรื้อรังในบาดแผล เช่น การเป็นสิว แผลในผู้ป่วยเบาหวาน แผลไฟไหม้ หรือแผลจากอุบัติเหตุ ส่วนใหญ่มีสาเหตุการติดเชื้อจากแบคทีเรีย โดยจะพบการติดเชื้อของแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ เช่น *Propionibacterium* (*Cutibacterium*) *acnes* *Staphylococcus* sp. *Anaerococcus* sp. *Corynebacterium* sp. *Porphyromonas* sp. และ *Streptococcus* sp. (Misic *et al*., 2014; Kazimoto *et al*., 2018) การรักษาสิว หรือแผลติดเชื้อเรื้อรังส่วนใหญ่จะใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา ซึ่งการรักษาเป็นเวลานาน อาจจะก่อให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรียได้ ส่งผลให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะไม่ได้ผล เพื่อลดปัญหาการดื้อยา และป้องกันไม่ให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น การศึกษาวิจัยเพื่อใช้สารเคมีจากพืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง สำหรับการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อควบคุมโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง

การใช้สารเคมีที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ เช่น สัตว์ พืช แร่ธาตุ จึงเป็นทางเลือกที่ถูกนำมาใช้ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากพืช ซึ่งเป็นแหล่งทางเลือกที่มีการศึกษาวิจัยสำหรับค้นหาสารเคมีที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีเพียงชนิดเดียวอาจก่อให้เกิดการดื้อต่อสารเคมี แบบเดียวกับที่พบในยาปฏิชีวนะได้เช่นกัน (Lachapelle *et al*., 2013; Cieplik *et al*., 2019) ดังนั้นการศึกษาในรูปแบบสารสกัดหยาบจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง หลายงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่า การใช้สารสกัดจากพืชเพียงชนิดเดียว สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ (Visutthi, 2016) รวมไปถึงการใช้สารสกัดสูตรผสมด้วยเช่นกัน (Temrangsee *et al*., 2011; มณฑล วิสุทธิ, 2019) ซึ่งสอดคล้องกับตำรับยาแผนโบราณ จากการวิจัยในห้องปฏิบัติการพบว่า การใช้สารสกัดสูตรผสมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจำเป็นต้องมีการวิจัย เพื่อแสดงให้เห็นว่าสูตรผสมของสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดี ในงานวิจัยนี้ได้ทำการเลือกสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีจากพืช 4 ชนิด ได้แก่ สัก (*Tectona grandis*) ไพล (*Zingiber purpureum*) ขมิ้น (*Curcuma longa*) และมะม่วงหาวมะนาวโห่ (*Carissa carandas*) ซึ่งสารสกัดเหล่านี้ ได้มีการตรวจสอบเบื้องต้นแล้วว่าให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้นำสารสกัดจากพืชทั้ง 4 ชนิด มาเตรียมสูตรผสม และตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย จากนั้นนำสูตรผสมที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไปประเมินฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่น ๆ

การทดลอง

1. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง และการเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียแกรมบวก 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, Methicillin Resistant *S. aureus* NPRC 001R, *S. epidermidis* ATCC12228, *S. epidermidis* ATCC 35984 และ *S. intermedius* TISTR 668 และแบคทีเรียแกรมลบ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* NRRU 001, *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* NRRU 001R, *Chromobacterium violoceum* DMST 21761, *Klebsiella* sp. NRRU 004, *Salmonella enterica* NRRU 002 และ *S.* Typhi NRRU 003 ถูกนำมาแยกให้เป็นโคโลนี โดยเลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA, Hi-media) จากนั้นเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB, Hi-media) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการถ่ายเชื้อจากอาหาร TSB ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB, Hi-media) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 4-5 ชั่วโมง และนำมาปรับความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้เท่ากับความขุ่นของสารละลาย McFarland Standard No. 0.5 จะได้ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml และนำไปทดสอบในวิธีอื่นต่อไป

2. การเตรียมสกัดสารจากพืช

ส่วนต่าง ๆ ของพืชแต่ละชนิด ได้จากต้นไม้ที่พบในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา ทั้งหมด 4 ชนิด ซึ่ง ได้แก่ ใบสักเหง้าไพล เหง้าขมิ้น และผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ นำมาทำความสะอาด แล้วนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 ºC ประมาณ 3-4 วัน บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด และนำไปแช่ใน 95% เอทานอล นาน 7 วัน จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกกากออกจากสารละลาย นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator นำสารสกัดที่ได้ใส่ขวดแก้ว สารสกัดส่วนหนึ่งจะถูกนำมาละลายด้วยสารละลาย Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Hi-media) ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 500 mg/ml เพื่อใช้ในการทดลองอื่นต่อไป

Table 1 Extract formulation and the formula ratio of each plant extract.

Formulation	Plant extracts			
	Leaves of *Tectona grandis*	**Rhizomes of** *Zingiber purpureum*	**Rhizomes of** *Curcuma longa*	**Fruits of** *Carissa carandas*
Formula 1	2	1	1	1
Formula 2	1	2	1	1
Formula 3	1	1	2	1
Formula 4	1	1	1	2
Formula 5	1	1	1	1
Formula 6	1	1	1	-
Formula 7	1	1	-	1
Formula 8	1	-	1	1
Formula 9	-	1	1	1
Formula 10	1	1	-	-
Formula 11	1	-	1	-
Formula 12	1	-	-	1
Formula 13	-	1	1	-
Formula 14	-	1	-	1
Formula 15	-	-	1	1
Tectona grandis	1	-	-	-
Zingiber purpureum	-	1	-	-
Curcuma longa	-	-	1	-
Carissa carandas	-	-	-	1

3. การเตรียมสูตรสารสกัดพืช

สารสกัดที่เตรียมได้ข้างต้น จะถูกนำมาเตรียมเป็นสูตรผสมด้วยอัตราส่วนตามที่ระบุใน Table 1 (ดัดแปลงจาก Temrangsee *et al*., 2011; มณฑล วิสุทธิ, 2019) จะได้สูตรผสมที่แตกต่างกันทั้งหมด 15 สูตร จากนั้นนำสูตรผสมที่ได้ไปตรวจฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียตามวิธี agar disc diffusion และ Broth microdilution

4. การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion

สูตรผสม และสารสกัดแต่ละชนิด จะถูกหยดในปริมาตร 10 µl (5 mg/disc) ลงบนแผ่นกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion (มณฑล วิสุทธิ, 2017; 2019) เชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ข้างต้น จะถูกนำมาใช้ทดสอบด้วยการใช้ cotton swab จุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) จากนั้นวางแผ่นสารสกัด ในการทดลองนี้ได้ใช้ชุดควบคุม negative control ใช้เป็น DMSO และ positive control ใช้เป็นยาปฏิชีวนะ Enrofloxacin (10 µg/disc; Hi-media) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นรอบแผ่นสารสกัดด้วย venire caliper 3 ครั้ง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยของวงการยับยั้ง

5. การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Broth microdilution

สูตรผสมและสารสกัดจะถูกนำมาศึกษาปริมาณการยับยั้งแบคทีเรียด้วยการหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และค่า Minimum bactericidal concentration (MBC) (มณฑล วิสุทธิ, 2017; 2019) โดยมีวิธีดังนี้ นำเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นแล้วข้างต้น มาเจือจางต่อด้วยอาหารเหลว MHB ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 1.0 x 10^6 CFU/ml นำสูตรผสมและสารสกัดที่ต้องการทดสอบมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 80 mg/ml ทำการเจือจางสูตรผสมและสารสกัดใน 96-well plate แบบลำดับส่วนปริมาตร 100 µl จากนั้นเติมเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้น ใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate หลุมละ 100 µl จะได้ความเข้มข้นสุทธิของสูตรผสมและสารสกัดเป็น 20-0.31 mg/ml โดยให้มีหลุมควบคุมเป็นเชื้อกับอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อกับสูตรผสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

(Negative control) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลองด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 nm และบันทึกผลการทดลองเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับหลุม กลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control) ซึ่งจะมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ Negative control

จากนั้นนำอาหารของแต่ละหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากการหาค่า MIC ปริมาตร 10 µl เพาะเลี้ยงบนอาหาร MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผล และบันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร จะได้เป็นค่า MBC

6. การเตรียมสบู่เหลวสำหรับล้างหน้า

นำส่วนประกอบสบู่ (Table 2) ได้แก่ หัวสบู่ (Texapon N8000) น้ำหนัก 330 กรัม ผสมกับ Ammonium Lauryl Sulfate ปริมาณ 30 กรัม และเกลือ NaCl ปริมาณ 30 กรัม ใส่ภาชนะพร้อมกับผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่น 550 มิลลิลิตร ตามด้วย Prioly B-750D และ Glycerin อย่างละ 30 กรัม ผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน กวนจนให้อุณหภูมิเย็นลดลง จากนั้นนำไปใช้ในการทดลองอื่นต่อไป

Table 2 Ingredients of liquid soap.

Ingredients	Amount
Texapon N8000	330 g
Ammonium Lauryl Sulfate	30 g
Sodium Chloride	30 g
Distilled water	550 ml
Prioly B-750D	30 g
Glycerin	30 g

7. การตรวจสอบประสิทธิภาพของสบู่เหลวผสมสารสกัดสูตรผสม ต่อการลดปริมาณแบคทีเรีย

7.1 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง การทดลองในส่วนนี้ ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 และ *E. coli* ATCC 25922 นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl มีเชื้อประมาณ 1.5 x 10^6 CFU/ml

7.2 การเตรียมสบู่ผสมสารสกัดสูตรผสม

นำเนื้อสบู่ที่ได้ผสมกับสารสกัดด้วยความเข้มข้นที่ระดับ MBC 2MBC 4MBC และ 8MBC

7.3 การทดสอบประสิทธิภาพการลดแบคทีเรียบนผิวหนังของสบู่เหลวผสมสารสกัดสูตรผสม

ในการทดลองนี้ได้ใช้หนังหมูสด นำมาล้างทำความสะอาด และตัดให้เป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 4x5 ซม. (ซึ่งสามารถวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้) จากนั้นแช่หนังหมูใน 70% แอลกอฮอล์นาน 20 นาที เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนออก และผึ่งให้แห้ง ทาเชื้อที่เตรียมไว้ ข้อ 7.1) ให้ทั่วผิวหนังหมูผึ่งให้แห้ง และนำไปทดลอง โดยแบ่งหนังหมูออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 สำหรับควบคุมจำนวนเชื้อที่ทาลงบนหนัง กลุ่มที่ 2 นำไปล้างน้ำเปล่า กลุ่มที่ 3 ล้างด้วยสบู่ที่ไม่ได้ผสมสารสกัด และกลุ่มที่ 4 ล้างด้วยสบู่ที่ผสมสารสกัด โดยได้เตรียมไว้ 4 ความเข้มข้น ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

กลุ่มที่ 1 เมื่อลงเชื้อเสร็จแล้วนำไปหาจำนวนเชื้อตามวิธีด้านล่าง กลุ่มที่ 2 นำหนังหมูไปล้างน้ำนาน 30 วินาที กลุ่มที่ 3 และ 4 หยดสบู่ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงบนหนังหมูถูสบู่ให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที และล้างออกด้วยน้ำนาน 30 วินาที จากนั้นนำไปหาปริมาณเชื้อ

หนังหมูแต่ละกลุ่มการทดลอง มีหนังหมู 2 แผ่น แผ่นที่ 1 เมื่อผ่านการทดลองแล้ว นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Selective media (Mannitol salt agar สำหรับ *S. epidermidis* และ Eosin methylene blue สำหรับ *E. coli*) อีกหนึ่งแผ่นนำไปหาปริมาณเชื้อบนผิวหนัง โดยการใส่ในถุงที่มีน้ำเกลือ 9 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจาง 10 เท่า และดูดเชื้อที่เจือจางแล้วมา 1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Selective media นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 16-18 ชั่วโมง ตรวจสอบและนับจำนวนโคโลนี คำนวนปริมาณเชื้อ

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล ด้วยวิธี One way ANOVA วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) เวอร์ชั่น 22 และกำหนดความเชื่อมั่นทางสถิติที่ระดับ 95% ตามลำดับ

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากพืช และสูตรผสม

ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชและสูตรผสมด้วยวิธี Agar disc diffusion แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากพืชและสูตรผสมที่เตรียมขึ้น มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเพียงอย่างเดียว โดยสารสกัดจากใบสักให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ (มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งมากกว่า 10 มม.) ดีกว่าสารสกัดจากเหง้าขมิ้น เหง้าไพล และผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ (Table 3)

สารสกัดจากพืช และสารสกัดสูตรผสมทั้งหมดถูกนำไปตรวจหาค่า MIC และค่า MBC ด้วยวิธี Broth microdilution ผลการทดลองพบว่า สารสกัดสูตรผสมที่ 4 ให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ และเชื้อดื้อยา โดยมีค่า MIC/MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* และเชื้อดื้อยา MRSA เท่ากับ 0.6/10 mg/ml และ 1.25/20 mg/ml ตามลำดับ และค่า MIC/MBC ต่อเชื้อ *E. coli* และเชื้อดื้อยา *E. coli* R เท่ากับ 10/20 mg/ml และ 10/20 mg/ml ตามลำดับ สารสกัดสูตรผสมให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าการใช้สารสกัดเพียงชนิดเดียว (Table 4)

งานวิจัยนี้เป็นการสร้างสารสกัดสูตรผสมที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบ การเตรียมสูตรผสมนี้ เตรียมจากสารสกัดที่สกัดด้วย 95% เอทานอล และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก จากงานวิจัยในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย พบว่าสารสกัดจากใบสักให้สีแดงเข้ม และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี สารสกัดจากไพลให้สีเหลืองเข้ม สารสกัดจากขมิ้นให้สีเหลือง สารสกัดทั้งสองชนิดมีการละลายน้ำต่ำ สารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มีสีแดง และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบได้ (มณฑล วิสุทธิ, 2019) เมื่อนำมาเตรียมเป็นสูตรผสม และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ผลการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion สารสกัดไม่แสดงผลการยับยั้งกับแบคทีเรียแกรมลบ (Table 3) ซึ่งพบได้ในผลการทดลองก่อนหน้านี้ (มณฑล วิสุทธิ, 2017, 2019; Visutthi, 2016) สารสกัดที่มีการละลายน้ำไม่ดี จะให้ผลการทดลองเป็นลบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion

การนำสารสกัดแต่ละชนิดมาผสมกันมีความจำเป็นต้องศึกษาการเสริมฤทธิ์ และการต้านฤทธิ์กันของสารสกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากต้องการให้สารสกัดมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ผลการทดลองในตารางที่ 3 และ 4 ได้แสดงให้เห็นว่า การผสมกันของสารสกัดให้ผลการยับยั้งเชื้อแตกต่างกันเมื่อเทียบกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดเพียงชนิดเดียว เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ (มณฑล วิสุทธิ, 2019) สารสกัดใบพลู ผสมกับเหง้าข่า ให้ผลยับยั้งและฆ่าเชื้อ ดีกว่าการทดสอบด้วยสารสกัดจากใบพลู หรือเหง้าข่าเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง

2. ผลการประเมินฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสูตรผสมที่ 4 ด้วยวิธี Broth microdilution

ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดีของสารสกัดสูตรผสมที่ 4 สูตรผสมนี้จึงถูกนำไปตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Klebsiella* sp., *Salmonella* Typhi, *Salmonella enterica*, *Acinetobacter baumannii*, *Chromobacterium violoceum*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ผลการทดลองพบว่า สารสกัดสูตรที่ 4 ให้ค่า MIC อยู่ระหว่าง 1.25-10 mg/ml และมีค่า MBC อยู่ระหว่าง 5-20 mg/ml (Table 5) ค่าอัตราส่วนระหว่าง MBC/MIC อยู่ระหว่าง 1-16 เท่า โดยค่าอัตราส่วนระหว่าง MBC/MIC ต่อแบคทีเรียแกรมบวก อยู่ระหว่าง 2-16 เท่า ค่าอัตราส่วนระหว่าง MBC/MIC ต่อแบคทีเรียแกรมบวก อยู่ระหว่าง 1-8 เท่า

พืชที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้ มีการรายงานฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมากมาย เช่น ใบสัก จากงานวิจัยของ Prajuabjinda *et al*. (2012) รายงานว่าสารสกัดจากใบสักที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ในระดับดี (มีค่า MIC เท่ากับ 0.15 mg/ml) ไพลที่สกัดด้วยเฮกเซนให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดี โดยมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* (ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1.09 และ 2.19 mg/ml) และ *E. coli* (ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 2.19 และ 4.37 mg/ml) (Taechowisan *et al*., 2018) สารสกัดจากเหง้าขมิ้นชันที่สกัดด้วยน้ำ ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 4-16 mg/ml และมีค่า MBC อยู่ระหว่าง 16-32 mg/ml (Niamsa & Sittiwet, 2009) ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion (Jampa *et al*., 2019; มณฑล วิสุทธิ, 2019) ในรายงานวิจัยนี้ ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดแต่ละชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่มีฤทธิ์หรือมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในระดับต่ำ (Table 4) และเมื่อเตรียมเป็นสูตรผสม และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Broth microdilution พบว่าสูตรผสมที่ 4 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีทั้งแกรมบวก และแกรมลบรวมถึงแบคทีเรียดื้อยา สูตรที่ 4 มีส่วนผสมของสารสกัดทั้ง 4 ในอัตราส่วน 1:1:1:2 (ใบสัก:เหง้าไพล:เหง้าขมิ้นชัน:ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่) แสดงการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัด นอกจากนี้ อัตราส่วนระหว่างค่า

MBC/MIC ยังแสดงให้เห็นว่าสูตรผสมที่ 4 มีประสิทธิภาพที่ดีต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 เท่า (Gonzalez *et al*., 2013) อย่างไรก็ตามผลการทดสอบกับแบคทีเรียบางชนิดให้อัตราส่วนที่มากกว่า 8 เท่า (Table 5) ดังนั้นการเลือกใช้สูตรผสมนี้ เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิดอาจจะต้องระมัดระวัง อัตราส่วน MBC/MIC เป็นการประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของสารที่สามารถใช้ควบคุมเชื้อแบคทีเรีย การนำไปประยุกต์ใช้จริงอาจจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

Table 3 Antibacterial activities of different formula extracts using agar disc diffusion.

Formulations and extracts	**Inhibition zone (mm±SD)**			
	S. aureus	**MRSA**	***E. coli***	***E. coli* R**
Formula 1	7.50±0.21	8.80±0.15	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 2	7.50±0.07	9.80±0.17	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 3	7.50±0.07	10.70±0.15	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 4	8.50±0.07	9.30±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 5	8.00±0.00	9.50±0.07	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 6	7.00±0.00	10.30±0.21	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 7	7.00±0.14	9.30±0.15	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 8	9.00±0.00	8.50±0.07	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 9	7.00±0.00	9.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 10	8.00±0.00	8.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 11	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 12	10.00±0.00	10.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 13	8.00±0.00	9.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 14	8.00±0.00	7.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Formula 15	10.00±0.00	10.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Tectona grandis	10.70±0.12	15.80±0.30	0.00±0.00	0.00±0.00
Zingiber purpureum	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Curcuma longa	0.00±0.00	8.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Carissa carandas	0.00±0.00	9.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Antibiotic	28.00±0.17	21.70±0.06	23.70±0.32	10.30±0.06

Table 4 MIC and MBC values of different formula extracts.

Formulations and extracts	**MIC and MBC values (mg/ml)**			
	S. aureus	**MRSA**	***E. coli***	***E. coli* R.**
Formula 1	20/2.5	2.5/>20	20/20	>20/>20
Formula 2	20/0.6	20/0.6	20</20	>20/>20
Formula 3	10/0.6	20/0.6	20/20	20/>20
Formula 4	10/0.6	20/1.25	20/10	20/10
Formula 5	20/0.6	20/0.6	20/20	>20/>20
Formula 6	10/2.5	20</5	>20/>20	>20/>20
Formula 7	20/5	5/>20	20/20	>20/>20

Table 4 MIC and MBC values of different formula extracts

Formulations and extracts	MIC and MBC values (mg/ml)			
	S. aureus	**MRSA**	***E. coli***	***E. coli* R.**
Formula 8	20/10	20/2.5	20/20	20/20
Formula 9	10/10	5/20	20</10	20/>20
Formula 10	20</10	10/>20	>20/>20	>20/>20
Formula 11	20</5	2.5/>20	>20/>20	>20/>20
Formula 12	20</5	20</5	20/10	20/10
Formula 13	20/5	5/2.5	>20/>20	>20/>20
Formula 14	10/5	20/5	20</10	10/>20
Formula 15	20/5	10/2.5	10/>20	5/>20
Tectona grandis	5/5	1/2.50	20/>20	5/>20
Zingiber purpureum	2</100	10/>20	>20/>20	>20/>20
Curcuma longa	0.6/5	2</50	>20/>20	>20/>20
Carissa carandas	20/5	20/5	20/5	5/>20

Table 5 Antibacterial activities of formula 4 against other bacterial strains

Bacterial strains	MIC values (mg/ml)	MBC values (mg/ml)	MBC/MIC ratio
*Acinetobacter baumanni*i NRRU 001	10	10	1
Escherichia coli ATCC 25922	10	20	2
Escherichia coli NRRU 001R	10	20	2
Chromobacterium violoceum DMST 21761	5	10	2
Klebsiella sp. NRRU 004	10	20	2
Salmonella enterica NRRU 002	10	20	2
Salmonella Typhi NRRU 003	2.5	20	8
Staphylococcus aureus ATCC 29213	0.6	10	16
Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 001R	1.25	20	16
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	2.5	5	2
Staphylococcus epidermidis ATCC 35984	2.5	10	4
Staphylococcus intermedius TISTR 668	1.25	5	4

3. ประสิทธิการควบคุมเชื้อแบคทีเรียของสบู่เหลวผสมสารสกัดสูตรผสมที่ 4

ประสิทธิภาพของสบู่เหลวผสมสารสกัดทั้ง 4 ความเข้มข้น ต่อการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียของหนังหมู ผลการทดลองพบว่า สบู่เหลวผสมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น MBC 2MBC 4MBC และ 8MBC สามารถลดจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *S. epidermidis* ได้ดีอย่างมีนัยสำคัญ (Figure 1) เมื่อเทียบกับการใช้สบู่เหลวปกติ เช่นเดียวกับการทดสอบกับหนังหมูที่ทาเชื้อ *E. coli* สบู่ที่ผสมสารสกัดสามารถลดจำนวนเซลล์แบคทีเรียได้ (Figure 2)

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงการนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สบู่เหลว ซึ่งสบู่เหลวที่ผสมสารสกัดสามารถลดจำนวนเซลล์แบคทีเรียได้ดีกว่าสบู่เหลวปกติ ในสบู่เหลวปกติมีสารลดแรงตึงผิวซึ่งจะช่วยทำให้แบคทีเรียที่เกาะอยู่ที่

ผิวหนังหลุดออกไปพร้อมกับการล้างน้ำ การเพิ่มสารสกัดเข้าไปในส่วนผสมช่วยให้สบู่เหลวสามารถกำจัดเซลล์แบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ การเลือกใช้สารสกัดจากไพล หรือขมิ้นชัน คณะผู้วิจัยได้คาดหวังถึงประโยชน์ของสีของสารสกัดตามภูมิปัญญาของการใช้ขมิ้นชันพอกผิว จะช่วยให้ผิวมีสีเหลืองสว่าง ผลการใช้สบู่เหลวผสมสารสกัดสูตรที่ 4 จะช่วยให้ผิวของผู้ใช้มีสีเหลืองสว่างคล้ายกับการใช้ขมิ้นทาที่ผิวหนังตามภูมิปัญญาของไทย สังเกตได้จากการทดลองใช้ของคณะผู้วิจัย อีกทั้งพืชทั้ง 4 ชนิด ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่มีความเป็นพิษ หรือมีความเป็นพิษต่ำ สารสกัดจากใบสักที่ปริมาณ 2,000 mg/kg ไม่พบความผิดปกติในหนู (Candra *et al*., 2019) สารสกัดจากไพลที่ความเข้มข้น 1,125 mg/kg ไม่พบความผิดปกติในหนูทดลอง (Koontongkaew *et al*., 2014) Soleimani *et al*. (2018) ได้สรุปว่า สารสกัดจากขมิ้นชันไม่มีความเป็นพิษในมนุษย์หากบริโภค 500 mg สองครั้งต่อวัน นาน 30 วัน และ Neimkhum *et al*. (2021) ได้รายงานว่าสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มีความเหมาะสมที่จะพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ในเวชสำอาง

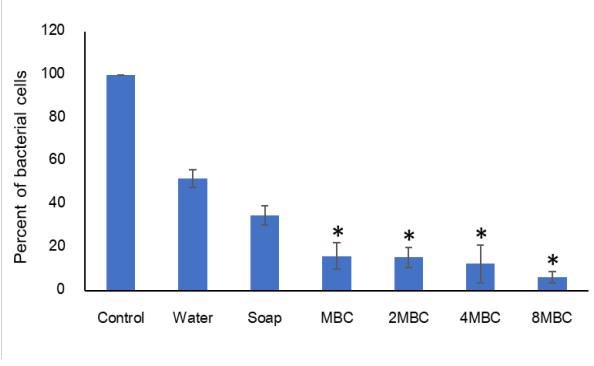

Figure 1 The effect of liquid soap mixed with various concentration of extract formula 4 on reducing the number of *S. epidermidis* cells. Data are presented as the means ± SD of three representative percent of bacterial cells. The results showed statistically significance (*, $p < 0.05$) of the differences between the 4 formulas and soap control results.

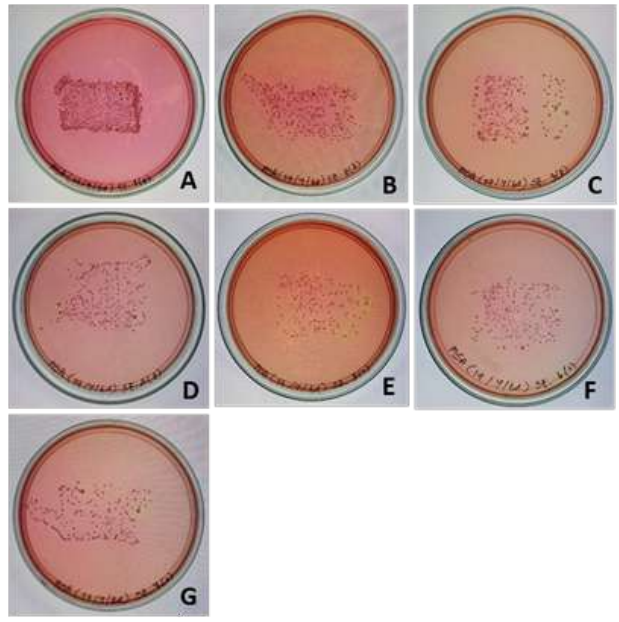

Figure 2 The effects of liquid soap mixed with various concentration of extract formula 4 on reducing the number of *S. epidermidis* cells. A; the initial amount of bacteria, B-G; the amount of bacterial remaining after washing with B, tap water; C, liquid soap; D-G, liquid soap mixed with extract formula 4 at MBC (D); 2MBC (E); 4MBC (F); 8MBC (G).

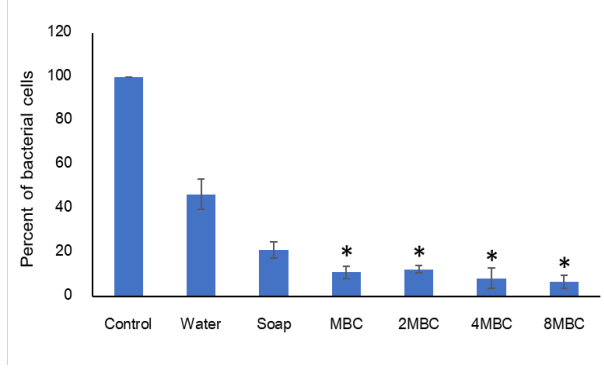

Figure 3 The effect of liquid soap mixed with different concentration of extract formula 4 on reducing the number of *E. coli* cells. Data are presented as the means ± SD of three representative percent of bacterial cells. The results showed statistically significance (*, $p < 0.05$) of the differences between the 4 formulas and soap control results.

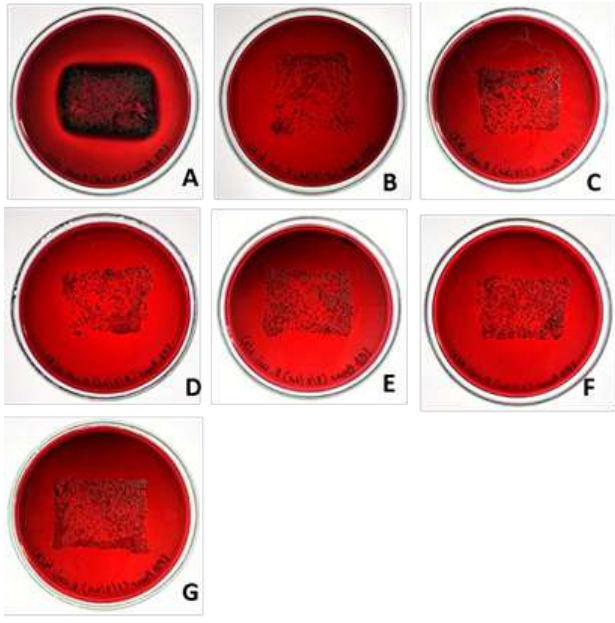

Figure 4 The effects of liquid soap mixed with various concentration of extract formula 4 on reducing the number of *E. coli* cells. A; the initial amount of bacteria, B-G; the amount of bacterial remaining after washing with B, tap water; C, liquid soap; D-G, liquid soap mixed with extract formula 4 at MBC (D); 2MBC (E); 4MBC (F); 8MBC (G).

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบรวมถึงเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะของสารสกัดสูตรผสมของใบสัก เหง้าไพล เหง้าขมิ้นชัน ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ด้วยอัตราส่วนผสม 1:1:1:2 สูตรผสมนี้สามารถใช้เป็นสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดผิว และประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สำหรับควบคุมเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 และทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยของนักศึกษา

เอกสารอ้างอิง

มณฑล วิสุทธิ. (2017). ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococci ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นบางชนิดในจังหวัดนครราชสีมา. *KKU Science Journal, 45*(4), 805-816.

มณฑล วิสุทธิ. (2019). Formulation of plant extracts for some pathogenic bacteria inhibition. *Progress in Applied Science and Technology, 9*(2), 125-135.

Candra, D. H., Eka, S. P., & Sinta, W. U. (2019). Acute toxicity of Indonesian natural food colorant *Tectona grandis* leaf extract in Wistar rats. *Journal of Medical Sciences, 19*, 69-74.

Cieplik, F., Jakubovics, N. S., Buchalla, W., Maisch, T., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2019). Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria–is there cause for concern?. *Frontiers in Microbiology, 10*, 587.

Gonzalez, N., Sevillano, D., Alou, L., Cafini, F., Gimenez, M. J., Gomez-Lus, M. L., Prieto, J. & Aguilar, L. (2013). Influence of the MBC/MIC ratio on the antibacterial activity of vancomycin versus linezolid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a pharmacodynamic model simulating serum and soft tissue interstitial fluid concentrations reported in diabetic patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 68*(10), 2291-2295.

Jampa, O., Panthong, S., & Itharat, A. (2019). Phytochemical constituents, anti-microbial, anti-inflammatory and cytotoxic activities of *Carissa carandas* L. fruit and seed extracts. *Thammasat Medical Journal, 19*(4), 654-666.

Kazimoto, T., Abdulla, S., Bategereza, L., Juma, O., Mhimbira, F., Weisser, M., Utzinger, J., von Müller, L., & Becker, S. L. (2018). Causative agents and antimicrobial resistance patterns of human skin and soft tissue infections in Bagamoyo, Tanzania. *Acta tropica, 186*, 102-106.

Koontongkaew, S., Poachanukoon, O., Sireeratawong, S., Dechatiwongse Na Ayudhya, T., Khonsung, P., Jaijoy, K., Soawakontha, R., & Chanchai, M. (2014). Safety evaluation of *Zingiber cassumunar* Roxb. rhizome extract: acute and chronic toxicity studies in rats. *International Scholarly Research Notices, 2014*,632608.

Lachapelle, J. M., Castel, O., Casado, A. F., Leroy, B., Micali, G., Tennstedt, D., & Lambert, J. (2013). Antiseptics in the era of bacterial resistance: a focus on povidone iodine. *Clinical Practice, 10*(5), 579.

Misic, A. M., Gardner, S. E., & Grice, E. A. (2014). The wound microbiome: modern approaches to examining the role of microorganisms in impaired chronic wound healing. *Advances in wound care, 3*(7), 502-510.

Neimkhum, W., Anuchapreeda, S., Lin, W. C., Lue, S. C., Lee, K. H., & Chaiyana, W. (2021). Effects of *Carissa carandas* Linn. Fruit, pulp, leaf, and seed on oxidation, inflammation, tyrosinase, matrix metalloproteinase, elastase, and hyaluronidase inhibition. *Antioxidants, 10*(9), 1345.

Niamsa, N., & Sittiwet, C. (2009). Antimicrobial activity of *Curcuma longa* aqueous extract. *Journal of Pharmacology and Toxicology, 4*(4), 173-177.

Prajuabjinda, O., Panthong, S., & Itharat, A. (2012). Antimicrobial activity of Thai medicinal preparation of Khampramong Temple used for cancer treatment and its plant components. *Journal of the Medical Association of Thailand,* 95, S159-65.

Soleimani, V., Sahebkar, A., & Hosseinzadeh, H. (2018). Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances. *Phytotherapy Research, 32*(6), 985-995.

Taechowisan, T., Suttichokthanakorn, S., & Phutdhawong, W. S. (2018). Antibacterial and cytotoxicity activities of phenylbutanoids from *Zingiber cassumunar* Roxb. *Journal of Applied Pharmaceutical Science, 8*(7), 121-127.

Temrangsee, P., Kondo, S., & Itharat, A. (2011). Antibacterial activity of extracts from five medicinal plants and their formula against bacteria that cause chronic wound infection. *Journal of the Medical Association of Thailand,* 94, S166-71.

Visutthi, M. (2016). Anti-bacterial and anti-quorum sensing properties of selected medicinal plants from Nakhon Ratchasima Province, Thailand. *Progress in Applied Science and Technology, 6*(1), 1-13.