ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ Staphylococci ที่แยกได้จากรอยสิว

Effect of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk Leaf Extracts on Staphylococci Isolated from Acne Lesions

จงกล สายสิงห์

Jongkon Saising

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Microbiology

Prince of Songkla University

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ Staphylococci ที่แยกได้จากรอยสิว

Effect of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk Leaf Extracts on Staphylococci Isolated from Acne Lesions

จงกล สายสิงห์

Jongkon Saising

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Microbiology

Prince of Songkla University

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ Staphylococci ที่แยกได้จากรอยสิว

ผู้เขียน นางสาวจงกล สายสิงห์

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

....

(ดร.เมตตา องค์สกุล)

คณะกรรมการสอบ

.................................ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย)

....กรรมการ

(ดร.เมตตา องค์สกุล)

....กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ กิตตินิยม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ Staphylococci ที่แยกได้จากรอยสิว
ผู้เขียน นางสาวจงกล สายสิงห์
สาขาวิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2550

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อ staphylococci จากผิวหน้าผู้เป็นสิว 90 ตัวอย่าง พบว่าได้เชื้อ staphylococci ทั้งหมด 149 สายพันธุ์ ซึ่งเป็น coagulase-positive 64 สายพันธุ์ และ coagulase-negative 85 สายพันธุ์ ทำการศึกษารูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อทั้ง 2 กลุ่มมีรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะที่คล้ายคลึงกัน เชื้อ staphylococci มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะทุกกลุ่มที่ทดสอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อมีการดื้อต่อยา clindamycin, erythromycin และ penicillin ในขณะที่ไวต่อยา vancomycin และ gentamicin อย่างน้อยที่สุด 96.4% ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบกระทุเบื้องต้นโดยวิธี disc diffusion ปรากฏว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ staphylococci ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ โดย coagulase-positive staphylococci และ coagulase-negative staphylococci มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 11-15 mm 82.8% และ 87% ตามลำดับ ทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) โดยวิธี broth microdilution ได้ค่า MIC อยู่ในช่วง 32–1024 µg/ml ซึ่งใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ค่า MIC_{50} ต่อเชื้อทั้ง 2 กลุ่มเท่ากับ 64 µg/ml ในขณะที่ MIC_{90} ต่อ coagulase-positive และ coagulase-negative staphylococci เท่ากับ 512 และ 256 µg/ml ตามลำดับ ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ 4 fractions พบว่าค่า MIC ที่ได้อยู่ระหว่าง 1-64 µg/ml ซึ่งน้อยกว่า MIC ของสารสกัดหยาบประมาณ 4-60 เท่า โดยพบว่า fraction R5 มีประสิทธิภาพดี นอกจากนี้สารบริสุทธิ์ที่ได้คือ rhodomyrtone ให้ค่า MIC ต่อสายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่ทดสอบเท่ากับ 0.5 µg/ml ซึ่งใกล้เคียงกับค่า MIC ของยา vancomycin ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดโดยวิธี time-kill study พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 4MIC สามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลงอย่างน้อย 3log เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เวลา 6-8 ชั่วโมง ในการทดสอบผลของสารสกัดหยาบต่อเอนไซม์ lipase และเอนไซม์ protease พบว่าสารสกัดหยาบมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ 4 แบบคือ ทำให้เอนไซม์ลดลง เอนไซม์เพิ่มขึ้น เอนไซม์เปลี่ยนแปลง 2 แบบ คือ ลดลงและเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นต่างกัน และไม่เปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากใบกระทุมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง biofilm โดยเชื้อส่วนใหญ่มีแนวโน้มในการสร้าง biofilm ลดลง จากผลการศึกษาที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบกระทุมีฤทธิ์ต้านเชื้อ staphylococci ที่ดีมาก นอกจากนี้ยังสามารถลดการสร้าง biofilm ของเชื้อส่วนใหญ่ที่ทดสอบ จึงน่าจะมีความเป็นไปได้ในการนำสาร rhodomyrtone และสารสกัดจากใบกระทุทำการศึกษาต่อไปเพื่อใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อจาก staphylococci

Thesis Title	Effect of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk Leaf Extracts on Staphylococci Isolated from Acne Lesions
Author	Miss Jongkon Saising
Major Programme	Microbiology
Academic Year	2007

ABSTRACT

One hundred and forty nine staphylococci were isolated from acne lesions on the faces (90 subjects). Sixty four isolates were coagulase-positive and 85 isolates were coagulase-negative. Antibiotic susceptibility patterns of the isolates were performed. The antibiotic resistance of staphylococci was present in most groups of antibiotics, especially, clindamycin, erythromycin, and penicillin. At least 96.4% of the isolates were susceptible to vancomycin and gentamicin. Preliminary screening of the antibacterial property of the extract using disc diffusion method demonstrated antibacterial activity of the extract on all test isolates. The inhibition zones of 82.8% of the coagulase-positive and 87% coagulase-negative staphylococci were from 11-15 mm. Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by broth microdilution method. The MIC ranges were from 32 to 1024 µg/ml with similar values of the minimal bactericidal concentration (MBC). MIC_{50} value for both staphylococci were 64 µg/ml. MIC_{90} values for coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci were 512 and 256 µg/ml, respectively. The MICs of 4 semi purified fractions were investigated. The MIC ranges were 1-64 µg/ml which different from the MIC of crude extract about 60 folds. Fraction R5 possesses the highest activity. Rhodomyrtone, pure compound isolated from this plant species was very effective against *S. aureus* ATCC 25923 and test isolates with the MIC value at 0.5 µg/ml which is very closed to that of vancomycin. Time-kill curves were assessed. At 4MIC, the test staphylococci was reduced by at least 3log fold from those of the control group within 6-8 h. The effects of crude extract on lipase and protease were investigated. After subMIC treatment, enzyme production were changed in 4 patterns; reduced, increased, both reduced and increased, and no difference. The extract could inhibit biofilm formation of most test staphylococci. This finding challenges the use of rhodomyrtone and the extract from *R. tomentosa* as an alternative agent for staphylococcal infections.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำช่วยเหลือและให้กำลังใจในเรื่องการศึกษา ค้นคว้าวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี อ.ดร.เมตตา องค์สกุล ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ รศ.วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำเรื่องการศึกษา ค้นคว้าวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กนกวรรณ กิตตินิยม กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม และขอขอบคุณ คุณอัษฎาวุธ หิรัญรัตน์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งได้ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์และสารบริสุทธิ์รวมทั้งคำแนะนำและคำปรึกษาในเรื่องสารสกัดจากใบกระทุ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณยายและครอบครัวที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนเรื่องการศึกษา ขอบคุณพี่และน้องร่วมรุ่น พี่และน้องในห้องปฏิบัติการทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ และคำปรึกษาที่ดีตลอดมา ขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือที่ดีมาตลอด

การวิจัยครั้งนี้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ปีการศึกษา 2549 และทุนผู้ช่วยนักวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

จงกล สายสิงห์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(9)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	18
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ	19
อุปกรณ์	20
วิธีการ	21
3. ผลการทดลอง	28
4. วิจารณ์	52
5. สรุป	58
เอกสารอ้างอิง	59
ภาคผนวก ก	74
ภาคผนวก ข	77
ประวัติผู้เขียน	79

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci	30
2. ค่า MIC และ MBC ของยาปฏิชีวนะและสารสกัดหยาบจากใบกระทุต่อเชื้อ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci	32
3. ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ และ Rhodomyrtone จากใบกระทุต่อเชื้อ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci	33
4. ผลการคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ Lipase และ Protease ของเชื้อ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci	37
5. ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ Lipase ของ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci	41
6. ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้างเอนไซม์ Lipase ของ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci	42
7. ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ Protease ของ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci	43
8. ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้างเอนไซม์ Protease ของ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci	44
9. ผลการคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สร้าง Biofilm ของเชื้อ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci	45

รายการรูป

รูปที่ **หน้า**

1. ต้น ใบ และดอกกระทุ 14
2. รูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci 29
3. Time-kill curves ของ Coagulase-positive Staphylococci และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 35
4. Time-kill curves ของ Coagulase-negative Staphylococci และ *Staphylococcus epidermidis* PSSCMI 0142 36
5. การคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ Lipase และ Protease 38
6. ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้างเอนไซม์ Lipase และ Protease 40
7. ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง Biofilm ของเชื้อ Staphylococci สายพันธุ์ NPRC 316 NPRC 326 NPRC 361 และ NPRC 577 46
8. ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง Biofilm ลดลง ของ Coagulase-positive Staphylococci และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 47
9. ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง Biofilm เพิ่มขึ้น ของ Coagulase-positive Staphylococci 48
10. ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการไม่เปลี่ยนแปลงการสร้าง Biofilm ของ Coagulase-positive Staphylococci 48
11. ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง Biofilm ลดลง ของ Coagulase-negative Staphylococci และ *Staphylococcus epidermidis* PSSCMI 0142 50
12. ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการไม่เปลี่ยนแปลงการสร้าง Biofilm ของ Coagulase-negative Staphylococci 51

ตัวย่อและสัญลักษณ์

cm	=	centimeter
CFU	=	colony forming unit
$^{\circ}C$	=	degree celcius
DMSO	=	dimethylsulfoxide
g	=	gram
h	=	hour
µg	=	microgram
µl	=	microliter
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
NaCl	=	sodium chloride
%	=	percent

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

สิวเป็นโรคอักเสบเรื้อรังที่รูขุมขนต่อมไขมัน พบได้บ่อยบริเวณใบหน้าและส่วนบนของลำตัว เช่น คอ อก หลัง และแขนส่วนบน โดยทั่วไปแล้วสิวเป็นปัญหาที่พบบ่อยในกลุ่มวัยรุ่น ซึ่งวัยรุ่น 8□% จะมีประสบการณ์เป็นสิว (Rzany and Kahl, 2□□6) แต่สามารถพบได้จนถึงวัยกลางคน (Loveckova and Havlikova, 2□□2) จากสถิติของสถาบันโรคผิวหนังในประเทศไทย สิวเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยมาพบแพทย์สูงเป็นอันดับที่ 2 ของผู้ป่วยนอกทั้งหมดที่รักษาที่สถาบันโรคผิวหนัง โดยในปี 255□มีจำนวน 12,666 ราย (สถาบันโรคผิวหนัง, 255□)

สาเหตุของสิวเกิดจากต่อมไขมันหลั่งไขมันมากกว่าปกติและเกิดการเปลี่ยนแปลงของท่อต่อมไขมันนำไปสู่การอุดตัน การสะสมของไขมันส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน *Propionibacterium acnes* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่ผิวหนัง นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์กลุ่ม staphylococci ซึ่งจะมีผลต่อการติดเชื้อ การอักเสบ และก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อหรือเกิดแผล (Majeed and Prakash, 2□□4)

ถึงแม้ว่า *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* จะไม่ได้เป็นสาเหตุของการเกิดสิวโดยตรงแต่มีความสำคัญต่อการอักเสบและการติดเชื้อ (Leeming *et al.*, 1988) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการกดหรือบีบสิวจะทำให้มีการอักเสบและติดเชื้อรุนแรงรวมทั้งมีการลุกลามของสิวมากขึ้น *S. epidermidis* เป็นเชื้อที่พบได้แพร่หลายในบริเวณ sebaceous follicle เชื้อจะสร้าง lipase ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ (Burkhart *et al.*, 1999) การสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายไขมันโดย *S. epidermidis* และ *S. aureus* น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ว่า เอนไซม์ lipase มีความสำคัญต่อเชื้อเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตในบริเวณที่เต็มไปด้วยไขมันของผิวหนัง (Longshaw *et al.*, 2□□□) นอกเหนือจาก *P. acnes* แล้ว เชื้อที่แยกได้จากสิว (acne lesion) ที่พบบ่อยที่สุดคือ *S. epidermidis* (Higaki, 2□□3)

การรักษาสิวจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่องและเป็นเวลานานซึ่งก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาได้ จากการทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ coagulase-negative staphylococci ที่แยกจากผิวหน้า พบว่าดื้อต่อยา tetracyclin 87.5%, erythromycin 68.8%, fusidic acid 56.3%, trimethoprim 42.4%, chloramphinicol 25%, clindamycin 9.4 % และ gentamycin 4.7% สายพันธุ์ดื้อยาส่วนใหญ่ที่แยกได้คือ *S. epidermidis* โดยดื้อต่อยาปฏิชีวนะไม่เกิน 8 ชนิด (Cove *et al.*, 199□) มีการศึกษาความไวของยาปฏิชีวนะ 9 ชนิด ต่อ *P. acnes* และ *S. epidermidis* ที่แยกได้จากสิวพบว่า *P. acne* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะน้อยว่า *S. epidermidis* โดย *S. epidermidis* มากกว่า 3□% ดื้อต่อยา erythromycin, roxithromycin และ clindamycin ซึ่งหลังจากรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเป็นระยะเวลานาน *S. epidermidis* มีการดื้อต่อยาเพิ่มขึ้น ในขณะที่การดื้อต่อยาของ *P. acne* ยังคง

จำกัด (Nishijima *et al.*, 2□□□) มีรายงานว่า coagulase-negative staphylococci มีการดื้อยา erythromycin 98% ในสัปดาห์ที่ 12 หลังจากรักษาด้วย erythromycin gel 2% (Mills *et al.*, 2□□2)

ถึงแม้ว่าสิวจะไม่ได้เป็นปัญหาสุขภาพที่ร้ายแรง แต่ในคนที่เป็นสิวรุนแรงจะก่อให้เกิดความเจ็บปวดและมีแผลเป็นซึ่งเป็นสาเหตุของความกังวลใจ ไม่มั่นใจ จากการทำแบบสอบถามนักเรียนมัธยมในประเทศนิวซีแลนด์ 9,398 คน พบว่า 1,329 คน มีปัญหาเรื่องสิว 1,294 คน มีอาการเครียด และ 432 คน มีความวิตกกังวล (Purvis *et al.*, 2□□6) นอกจากนี้การรักษาสิวต้องใช้เวลานานและต่อเนื่องทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายจำนวนไม่น้อยในการรักษาซึ่งรวมทั้งยาและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ผู้เป็นสิว 15-3□% จำเป็นที่จะต้องรักษาเนื่องจากความรุนแรงของโรค มีรายงานการรวบรวมข้อมูลในประเทศสหรัฐอเมริกาประเทศเดียวจากกลุ่มผู้ป่วยที่พบแพทย์และมีการสั่งจ่ายยาระหว่างปี 198□-1997 และข้อมูลใบสั่งยาจากร้านขายยาตั้งแต่ปี 1996-1998 พบว่าแต่ละปีมีใบสั่งยาปฏิชีวนะ 5 ล้านรายการ และ isotretionin 1.4 ล้านรายการ เพื่อใช้สำหรับรักษาสิว (Stern, 2□□□) และเมื่อมีรายงานถึงการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาสิวด้วยแล้วจึงน่าจะมีทางเลือกอื่นมาใช้ในการยับยั้งการเกิดสิวร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะหรือแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ

การใช้สมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากในบางท้องถิ่นมีการใช้สมุนไพรเป็นยาเพื่อรักษาโรคต่าง ๆรวมทั้งใช้ในการรักษาสิวหรือรักษาแผลอยู่แล้ว จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบ *Psidium guajava* และ *Juglans regia* ต่อแบคทีเรียที่แยกได้จากสิว พบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ (Qadan *et al.*, 2□□5) มีรายงานว่า *Garcinia mangostana* มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. epidermidis* (Chomnawang *et al.*, 2□□5) นอกจากนี้มีรายงานว่าสารสกัดจาก *Rosmarinus officinalis*, *Abies balsamea* และ *Usnea barbata* สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้เช่นกัน (Pichette *et al.*, 2□□6; Celiktas *et al.*, 2□□7 ; Weckesser *et al.*, 2□□7) จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่าสามารถยับยั้ง *B. cereus*, *E. feacalis*, *L. monocytogenes*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. mutans* และ *S. pyogenes* ได้ (Voravuthikunchai *et al.*, 2□□7) จึงน่าจะมีความเป็นได้ในการนำพืชดังกล่าวมาใช้ในการยับยั้ง *S. aureus* และ *S. epidermidis* ที่แยกได้จากสิว

การตรวจเอกสาร

1. สิว

สิวเป็นโรคอักเสบเรื้อรังที่รูขุมขนต่อมไขมัน พบได้บ่อยบริเวณใบหน้าและส่วนบนของลำตัว เช่น คอ อก หลัง และแขนส่วนบน โดยทั่วไปแล้วสิวเป็นปัญหาที่พบบ่อยในกลุ่มวัยรุ่น ซึ่งวัยรุ่น 80% จะมีประสบการณ์เป็นสิว (Rzany and Kahl, 2006) ผู้เป็นสิวส่วนใหญ่มีการพัฒนาของโรคซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยจะมากที่สุดเมื่ออายุประมาณ 16-17 ปีในผู้หญิง และ 17-18 ปี ในผู้ชาย จากนั้นในผู้ป่วยส่วนใหญ่ความรุนแรงจะค่อยๆลดลง แต่มีผู้ป่วยประมาณ 20% ที่ยังคงเป็นสิวจนถึงวัยผู้ใหญ่ (Shalita, 2004) และสามารถพบได้จนถึงวัยกลางคน (Loveckova and Havlikova, 2002)

โดยทั่วไปสิวแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สิวไม่อักเสบ (non inflammatory acne) และสิวอักเสบ (inflammatory acne) (Brook *et al.*, 1995)

สิวไม่อักเสบ (non inflammatory acne) แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

1. สิวหัวปิดหรือสิวหัวขาว (closed or white head comedones)

เป็นตุ่มนูนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-3 mm สีเดียวกับผิวหนัง ท่อเปิดของต่อมไขมันเหล่านี้แทบมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า ร้อยละ 75 ของสิวประเภทนี้จะกลายเป็นสิวอักเสบ

2. สิวหัวเปิดหรือสิวหัวดำ (open or black head comedones)

เป็นตุ่มนูน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-3 mm มีจุดดำอยู่ตรงกลางเกิดจากการขยายตัวของท่อไขมันและมีสารสีดำอุดแน่นอยู่ภายใน

สิวอักเสบ (inflammatory acne) แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

1. Papules

เป็นตุ่มนูนแข็งสีแดง มีขนาดแตกต่างกันออกไป สิวชนิดนี้เกิดจากสิวที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า 50% เกิดจากสิวหัวปิด 25% และเกิดจากสิวหัวเปิด 25%

2. Pustules

เป็นสิวหนองชนิดตื้นหรือลึก มีได้หลายขนาด สิวหนองชนิดตื้นมักหายได้เร็วกว่า ส่วนสิวหนองชนิดลึกจะมีอาการเจ็บร่วมด้วยและพบในผู้ที่เป็นสิวรุนแรง

3. Nodules

เป็นสิวอักเสบแดง เป็นตุ่มนูน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 8 mm ขึ้นไป สิวชนิดนี้เมื่อหายไปอาจเกิดแผลเป็นตามมาได้

4. Cyst

สิวขนาดใหญ่เป็นถุงใต้ผิวหนัง ภายในมีหนองหรือสารเหลวๆคล้ายเนย หายแล้วมักมีแผลเป็นหลงเหลืออยู่ สิวชนิดนี้พบได้ไม่บ่อยนัก

ระดับความรุนแรงของสิว (Oakley, 2005)

1. Mild acne มีสิวไม่อักเสบ หรือสิวอักเสบชนิด papulopustular เล็กน้อย หรือมีทั้ง 2 กลุ่ม
2. Moderate acne มีสิวอักเสบมากขึ้น และพบสิวชนิด nodules บ้าง มีแผลเป็นเล็กน้อย

3. Severe acne มีสิวอักเสบ ทั้งชนิด papules, pustules และ nodules จำนวนมาก กระจายอยู่ทั่ว รวมทั้งมีแผลเป็น

สาเหตุของการเกิดสิว

สิวเกิดจากสาเหตุหลัก 4 ประการ คือ ต่อมไขมันหลั่งไขมันมากกว่าปกติ การอุดตันของท่อขุมขน-ต่อมไขมัน การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย และการอักเสบ (Cunliffe, 1980)

1. ต่อมไขมันหลั่งไขมันมากกว่าปกติ

โดยส่วนใหญ่คนจะเริ่มเป็นสิวในช่วงวัยรุ่นจะมีระดับของ androgen สูง ส่งผลให้ต่อมไขมันหลั่งไขมัน(sebum) ออกมามาก ในคนที่เป็นสิวจะมีอัตราการสร้างไขมันมากกว่าคนที่ไม่เป็นสิว และความรุนแรงของสิวโดยทั่วไปจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณไขมันที่สร้าง (Federman and Kirsner, 2000)

2. ผนังท่อต่อมไขมันแบ่งตัวมากกว่าปกติและไม่หลุดลอกออก

ภาวะที่ผนังของท่อต่อมไขมันแบ่งตัวมากกว่าปกติและไม่หลุดลอกออกเมื่อรวมกับไขมันที่หลั่งออกมามากจะกลายเป็นส่วนอุดตันของท่อต่อมไขมันเรียกว่า microcomedone ซึ่งเป็นตัวเริ่มต้นที่จะทำให้เกิดสิวทั้งชนิดอักเสบและไม่อักเสบ (Federman and Kirsner, 2000) ถ้าทางเปิดของท่อต่อมไขมันมีขนาดเล็กจะมีการอุดตันอย่างเต็มที่ซึ่งพบในสิวหัวขาว (white head) ถ้าทางเปิดของท่อต่อมไขมันเปิดกว้างไม่อุดตัน ไขมันจะไหลออกมาที่ผิวหนังซึ่งพบในสิวหัวดำ (black head)

3. การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย

แบคทีเรีย 2 species หลักบนผิวหนังที่มีแนวโน้มทำให้เกิดสิวคือ *S. epidermidis* และ *P. acnes* (Cunliffe, 1980) *P. acnes* ย่อยไขมันจากต่อมไขมันให้เป็นกรดไขมันอิสระด้วยเอนไซม์ lipase และหลั่ง chemotactic factors ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ (Dréno and Khammari, 2004)

4. ปฏิกิริยาการอักเสบของผู้เป็นสิว

P. acnes สร้างและหลั่งเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้ host ได้รับความเสียหาย ได้แก่ lipase, protease, hyaluronidase และ phosphatase (Bruggemann *et al.*, 2004) lipase เป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดสิวและการอักเสบเนื่องจากจะย่อยไขมันในต่อมไขมันให้กลายเป็นกรดไขมันอิสระ นอกจากนี้ยังหลั่ง chemotactic factors ซึ่งเป็นตัวดึงดูด neutrophils, lymphocytes และ macrophages (Burkhart *et al.*, 1999) โดยจะปล่อยสารสื่ออักเสบ (inflammatory mediators) ได้แก่ lysosomal enzymes, reactive oxygen species และ pro-inflammatory cytokine เช่น interleukin-8 และ tumor necrosis factor-alpha (Jain and Basal, 2003) ส่วน staphylococci มีผลต่อการอักเสบ การติดเชื้อ และก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อหรือเกิดแผล (Majeed and Prakash, 2004)

2. แบคทีเรีย

staphylococci เป็นแบคทีเรียรูปกลม ติดสีแกรมบวก เรียงตัวคล้ายพวงองุ่น (irregular grapelike cluster) สามารถเจริญได้ดีบนอาหารชนิดต่างๆ สร้างสารสีตั้งแต่สีขาวจนถึงสีเหลืองเข้ม เชื้อบางตัวในกลุ่มนี้เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่ผิวหนังและเยื่อเมือก บางชนิดเป็นสาเหตุของการเกิดฝีหนอง และการติดเชื้อต่างๆ พวกที่ก่อโรคส่วนใหญ่สลายเม็ดเลือดแดง ทำให้พลาสมาเกิดการรวมกลุ่ม และสร้างเอนไซม์รวมทั้งสารพิษต่างๆหลั่งออกมานอกเซลล์

Genus *Staphylococcus* ประกอบด้วยแบคทีเรียไม่น้อยกว่า 3□ species แบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรค 3 species คือ *S. aureus, S. epidermidis* และ *S. saprophyticus* โดย *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่ทดสอบ coagulase ให้ผลบวก (coagulase- positive) ซึ่งสารมารถแยกจาก species อื่นๆได้ *S. aureus* เป็นเชื้อก่อโรคหลักในมนุษย์ เช่น อาหารเป็นพิษ การติดเชื้อที่ผิวหนัง ส่วนกลุ่มที่ทดสอบ coagulase ให้ผลลบ (coagulase- negative) เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในมนุษย์ซึ่งบางครั้งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อและพบว่าเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีอุปกรณ์สอดแทรกเข้าในร่างกาย สาเหตุของการติดเชื้อจากกลุ่ม coagulase-negative staphylococci เกิดจาก *S. epidermidis* ประมาณ 75% (Brooks *et al.*, 1995)

2.1 *Staphylococcus aureus*

ลักษณะทั่วไป

S. aureus จัดอยู่ใน Family Staphylococcaceae เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีกรัมบวก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 µm เรียงตัวคล้ายพวงองุ่น (irregular grapelike cluster) ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ไม่สร้างแฟลกเจลลา ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีสีขาวจนถึงสีเหลืองทอง มีลักษณะเรียบ กลม นูน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือ $37^{\circ}C$ pH 7-7.5 ค่า A_w ที่เหมาะสมกับการเติบโตคือ □.99 เติบโตดีที่ความเข้มข้น NaCl 7-1□% สามารถเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ทดสอบ catalase, coagulase และ thermostable nuclease ให้ผลบวก สามารถใช้น้ำตาล mannitol (Brooks *et al.*, 1995; MacFaddin, 2□□□) นอกจากนี้ยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานานในสภาพแห้งและทนต่อความร้อนซึ่งคุณสมบัตินี้ทำให้ *S. aureus* มีชีวิตอยู่ได้เกือบทุกสภาพแวดล้อมของร่างกายมนุษย์ 3□-4□% พบในโพรงจมูก นอกจากนั้นพบในเยื่อเมือกและผิวหนังซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ *S. aureus* ทำให้เกิดหนอง ฝี เกือบจะทุกส่วนของร่างกาย ตั้งแต่ผิวหนัง ปอด กระดูก ไต และหัวใจ (Schlievert and Peterson, 2□□7)

ความรุนแรงของเชื้อ

S. aureus สร้างและหลั่งเอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งมีบทบาทต่อความรุนแรงของเชื้อ ได้แก่ alpha, beta, gamma และ delta toxin ซึ่งมีบทบาทต่อ cell membrane ของ host และทำให้เกิดการทำลายเซลล์ leucocidin ทำลาย phagocytes, clumping factor coagulase และ hyaluronidase นอกจากนี้สร้างเอนไซม์ lipase ซึ่งจะย่อยสลายไขมันบนผิวหนังของมนุษย์และเพิ่มจำนวนบนผิวหนัง สร้างเอนไซม์ protease ซึ่งทำหน้าที่ทั่วไปคือสลายโปรตีนทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ (Archer, 1998) หลายสายพันธุ์หลั่ง exotoxin ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค เช่น toxic shock

syndrome (TSS), staphylococccal scaled skin syndrome (SSSS) และ staphylococccal food poisoning (SFP) (Schlievert and Peterson, 2□□7)

การแพร่กระจายของเชื้อ

อาจเกิดในคนเดียวกันโดยการกระจายจากบริเวณที่เป็นแผลไปยังบริเวณที่ไม่มีการติดเชื้อ หรืออาจกระจายจากคนหนึ่งไปสู่คนหนึ่งโดยสัตว์พวกปลวก มด อากาศ หรือ มือที่ไม่สะอาดของผู้ดูแลผู้ป่วยซึ่งอาจจะถ่ายทอดจากผิวหนังที่เป็นแผลไปสู่ผู้ป่วยได้ (Forbes *et al.*, 2□□2)

2.2 *Staphylococcus epidermidis*

ลักษณะทั่วไป

S. epidermidis จัดอยู่ใน Family Staphylococcaceae เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีกรัมบวก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 μm เรียงตัวคล้ายพวงองุ่น ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ไม่สร้างแฟลกเจลลา ไม่เคลื่อนที่ (MacFaddin, 2□□□) โคโลนีบน sheep blood agar 5% มีขนาดเล็กจนถึงปานกลางสีเทา–ขาว สร้างสารเมือกที่มีลักษณะเหนียวและเกาะติดผิวหน้าอาหารแข็ง ทดสอบ catalase ให้ผลบวก ทดสอบ coagulase ให้ผลลบ ไม่สามารถใช้น้ำตาล mannitol ได้ *S. epidermidis* เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal microbiota) บนผิวหนังและเยื่อเมือกของมนุษย์ กระจายอยู่อย่างกว้างขวางและเป็นจำนวนมากทั่วทั้งผิวของร่างกายและจะไม่ก่อโรคในคนที่สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง (Forbes *et al.*, 2□□2)

ความรุนแรงของเชื้อ

S. epidermidis เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม coagulase-negative staphylococci ซึ่งขั้นตอนแรกของการติดเชื้อหรือเพิ่มจำนวนของเชื้อคือการเกาะติด host เช่น ผิวหนังหรือพื้นผิววัสดุต่าง ๆที่สอดใส่เข้าไปในร่างกาย เช่น สายสอดเข้าร่างกาย หรือ อวัยวะเทียมต่าง ๆ โดยเชื้อจะหลั่ง extracellular polysaccharide สร้าง biofilm เพื่อช่วยในการหลบหลีกกลไกการป้องกันของ host cell และยาปฏิชีวนะ (Venkatesh *et al.*, 2□□6) นอกจากนี้เชื้อยังสร้าง hemolysin, lipase, protease และ toxin (Koneman *et al.*, 1997)

การแพร่กระจายของเชื้อ

S. epidermidis เป็นอีกเชื้อหนึ่งซึ่งเป็นปัญหามากที่สุดของการติดเชื้อแบคทีเรียในโรงพยาบาล ซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้อในแผลผ่าตัด ในผู้ป่วยที่มีอุปกรณ์สอดแทรกเข้าในร่างกาย เช่น การใช้อุปกรณ์สายสวนทางจมูก ท่อสายยางอาหารหรือน้ำ และข้อต่อเทียม (Oleksy *et al.*, 2□□4 and Schlievert and Peterson, 2□□7) โดยเชื้อสามารถแพร่กระจายไปยังบริเวณที่ไม่มีการติดเชื้อได้ หรืออาจกระจายจากคนหนึ่งไปสู่คนหนึ่งในโรงพยาบาลสามารถนำไปสู่การติดเชื้อของผู้ป่วย (Forbes *et al.*, 2□□2)

3. Virulence factors ของ *S.aureus* และ *S. epidermidis* ที่เกี่ยวข้องกับสิว

3.1 Biofilm

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในธรรมชาติจะไม่อยู่เป็นลักษณะเดี่ยว ๆ หรือลอยเป็นอิสระใน suspension แต่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มและสร้าง biofilm (Sutherland, 2□1) biofilm เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียซึ่งเกาะติดกับพื้นผิวสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์เหล่านี้จะอยู่ภายใน extracellular polysaccharide ที่มันหลั่งออกมาหลังจากเกาะติดกับพื้นผิว เช่น อุปกรณ์การแพทย์ที่สอดใส่เข้าไปในร่างกาย คราบหินปูนที่เกาะบนฟัน บนผิวหนัง (Burkhart and Burkhart, 2□3) แบคทีเรียส่วนมากจะสร้าง biofilm ซึ่งทั้งแบคทีเรียกรัมบวก กรัมลบ และยีสต์สามารถอยู่ร่วมกันได้ภายใน biofilm เดียวกัน (Donlan, 2□2) ลักษณะของ biofilm จะถูกกำหนดด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก ปัจจัยภายในจะเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมและองค์ประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ ปัจจัยภายนอก ได้แก่ สิ่งแวดล้อมทางกายภาพและเคมีที่จุลินทรีย์นั้นอยู่ (Burkhart and Burkhart, 2□3)การสร้าง biofilm มี 2 ขั้นตอนหลักคือ 1. การเกาะติดของเซลล์กับพื้นผิว 2. การเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์และสร้าง extracellular matrix (Yarwood *et al.*, 2□4) การเกาะติดของจุลินทรีย์กับพื้นผิวขึ้นอยู่กับลักษณะหรือคุณสมบัติของผิวเซลล์และธรรมชาติของพื้นผิวที่แบคทีเรียจะเกาะติดซึ่งในช่วงแรกของการเกาะติดนั้นจะเกี่ยวข้องกับแรงต่างๆเช่น แรง van der Waal’s, hydrophobicity interactions และ polarity (Eiff *et al.*, 2□2; Veenstra *et al.*, 1996) ขั้นตอนการเกาะติดมีความสัมพันธ์กับ surface-assiciated proteins (staphylococcal surface proteins; SSP-1, SSP-2) และ biofilm-associated protein (Bap) (Cucarella *et al.*, 2□1) นอกจากโปรตีนแล้ว polysaccharide ได้แก่ polysaccharide/adhesin (PS/A) ยังมีส่วนเกียวข้องในขั้นตอนการเกาะติด หลังจากนั้นแบคทีเรียมีการเติบโตเพิ่มจำนวนและมีการรวมกันของเซลล์เป็น multilayered cell clusters ในขั้นตอนนี้เกี่ยวข้องกับ polysaccharide intracellular adhesin (PIA), accumulation-associated protein (AAP) และ polysaccharide/adhesin (PS/A) (Eiff *et al.*, 2□2) จากการศึกษากระบวนการสร้าง biofilm ของ *S. aureus* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน พบว่ามี 4 ขั้นตอน คือ 1. การปรากฏของ fibrin fibers 2. การสร้าง fibrin net 3. การเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย 4. การปกคลุมแบคทีเรียด้วย extracellular polymeric substance (Katsuyama *et al.*, 2□5) ภายใน biofilm matrix แบคทีเรียจะจัดการการใช้อาหารที่เป็นประโยชน์อย่างเหมาะสมทำให้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ กิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆสามารถพบได้โดยทั่วไปภายใน biofilm (Burkhart and Burkhart, 2□3) ในกรณีของ *P. acnes* จะหลั่ง extracellular products ได้แก่ hyaluronidase, protease, lipase และ chemotactic factors สำหรับดึงดูด neutrophils, lymphocytes และ macrophages ภาวะแวดล้อมและกิจกรรมของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงอย่างสม่ำเสมอ และการเปลี่ยนแปลงนี้ขึ้นกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ ซึ่งจะมีบทบาทต่อจำนวนของเอนไซม์ที่สร้างขึ้น (Burkhart and Burkhart, 2□3) extracellular polysaccharide ทำหน้าที่เป็นตัวกรอง และเป็นทางสำหรับสารอาหารและแร่ธาตุต่างๆเข้าไปในเซลล์ที่อยู่ด้านใน และป้องกันเซลล์จากระบบภูมิคุ้มกันของ host สารพิษต่างๆ รวมทั้งยาปฏิชีวนะ การแลกเปลี่ยนพลาสมิดจะเกิดขึ้นเร็วภายใน biofilm เนื่องจากเซลล์อยู่ติดกันมาก (Donlan, 2□2) จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าแบคทีเรียที่มีการสร้าง biofilm จะทนทานต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าแบคทีเรียที่ล่องลอยอยู่อย่าง

อิสระ 50-500เท่า (Mah and O'Toole, 2001) นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียใน biofilm จะมีอัตราการรอดชีวิตต่อยาปฏิชีวนะสูงกว่า cell suspension 1000เท่า (Stewart and Costerton, 2001) จากการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus* spp. และ *P. acnes* ที่สร้าง biofilm บน polymethylmethacrylate bone cement พบว่า *P. acnes* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้ดื้อต่อยา cefamandole, ciprofloxacin และ vancomycin ส่วน *Staphylococcus* spp. 10สายพันธุ์ ดื้อต่อยา gentamicin and cefamandole และ 8 ใน 10สายพันธุ์ดื้อต่อยา vancomycin (Ramage *et al.*, 2003) *P. acnes* ทนทานต่อยาปฏิชีวนะความเข้มข้นสูง ๆ เป็นผลมาจากการมีชีวิตอยู่ภายใน biofilm matrix ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการแทรกซึมของยาปฏิชีวนะเป็นไปได้ช้า (Burkhart and Burkhart, 2003)

การผลิต polysaccharide intracellular adhesion สำหรับการสร้าง biofilm ของ *S. epidermidis* ถูกส่งเสริมโดย alcohols ซึ่งเป็นองค์ประกอบในยารักษาสิวเฉพาะที่ จากการทดลองผลของ alcohol 3 ชนิด ได้แก่ ethanol, n-propanol และ isopropanol ต่อการสร้าง biofilm ของ *S. epidermidis* ที่แยกได้ 37 สายพันธุ์ พบว่ามี 18 สายพันธุ์ ที่มีการสร้าง biofilm เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่า alcohol และองค์ประกอบอื่น ๆ ของยาอาจจะมีผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิต (Knobloch *et al.*, 2002) นอกจากนี้การสร้าง biofilm ใน *Staphylococcus* spp. ถูกชักนำโดยสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความดันหรืออุณหภูมิ (Rachid *et al.*, 2000)

การทดสอบฤทธิ์ของ allicin ที่ความเข้มข้น subMIC ต่อการสร้าง biofilm ของ *S. epidermidis* สายพันธุ์ พบว่าที่ความเข้มข้น 1/2MIC การสร้าง biofilm ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Perez-Giraldo *et al.*, 2003) การใช้ Polytoxinol™ ซึ่งเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จาก *Eucalyptus globulus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus* sp., *Syzygium aromaticum* และกลุ่ม citrus, butylated hydroxytoluene, triclosan และ 95% ethanol สามารถยับยั้งการสร้าง biofilm ของ coagulase-negative staphylococci (Al-Shuneigat *et al*, 2005) นอกจากนี้ 3′-5′-cyclic dyguanalic acid สามารถยับยั้งการสร้างของ *S. aureus* ได้มากกว่า 50% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Karaolis *et al.*, 2005) จากการศึกษาผลของ farnesol ต่อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา methicillin และสายพันธุ์ที่ไวต่อยา methicillin พบว่าสามารถที่จะยับยั้งการสร้าง biofilm ของ *S. aureus* ได้ และการใช้ farnesol 100μM ร่วมกับ gentamicin 2.5 MIC สามารถที่จะลดจำนวนแบคทีเรียลงได้มากกว่า 2log (Jabra-Rizk *et al.*, 2006) การทดสอบประสิทธิภาพของ tea tree oil ต่อ *S. aureus* (MRSA และ MSSA) และ coagulase-negative staphylococci ที่สร้าง biofilm พบว่าเมื่อใช้ tea tree oil 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมงสามารถทำลาย biofilm ของ MRSA และ MSSA ได้อย่างสมบูรณ์ แต่สำหรับ biofilm ของ coagulase-negative staphylococci มีเพียง 5 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 9 สายพันธุ์ที่ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ (Brady *et al.*, 2006) มีรายงานว่า biofilm ของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ดื้อต่อยา oxacillin, vancomycin และ linezolid แต่ไวต่อ salvipisone ซึ่งเป็น diterpenoid ที่แยกได้จากรากขนอ่อนของ *Salvia sclarea* โดยสามารถจำกัดการสร้าง biofilm ของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ (Kuzma *et al.*, 2007) มีการใช้ sodium metabisulfite ในการยับยั้ง planktonic และ biofilm staphylococci โดยมีฤทธิ์ในการฆ่า *S.*

aureus, *S. lugdunensis* และ *S. epidermidis* ที่ความเข้มข้น 512, 512, และ 1,024 µg/ml ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 720 µl/ml สามารถยับยั้งเชื้อที่สร้าง biofilm ได้ (Frank and Patel, 2007) จากการทดสอบผลของผลของ oregano, carvacrol, และ thymol ที่ความเข้มข้น subMIC ต่อ การสร้าง biofilm ของ *S. aureus* 6 สายพันธุ์ และ *S. epidermidis* 6 สายพันธุ์ พบว่าสามารถลดการสร้าง biofilm ของแบคทีเรียทั้งสองได้ (Nostro *et al.*, 2007)

3.2 เอนไซม์

โดยทั่วไปแล้วพบแบคทีเรีย staphylococci บริเวณเยื่อเมือกและผิวหนัง ในสภาวะปกติเยื่อเมือกและผิวหนังทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันการติดเชื้อ อย่างไรก็ตามเมื่อผิวหนังถูกทำลายหรือมีบาดแผลจะมีการติดเชื้อ staphylococci เกิดขึ้น จากนั้นจะหลั่งสารและเอนไซม์ต่างๆออกมานอกเซลล์ทำให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนและอยู่รอด ส่งผลร้ายต่อผิวหนังหรือเนื้อเยื่อ เอนไซม์จะสลายสารตั้งต้นต่างๆ รวมทั้ง โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน เอนไซม์ที่หลั่งออกมานี้แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1. กลุ่มที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคได้แก่ catalase, coagulase, lipase, protease, hyaluronidase และ β-lactamase 2. กลุ่มที่ไม่มีผลต่อความรุนแรงของโรค ได้แก่ lysostaphin, nuclease และ phosphatase (Vijaykumar, 2001) staphylococci ผลิต เอนไซม์ย่อยไขมันหลายชนิด การย่อยสลายไขมันนี้ขึ้นกับเอนไซม์ 3 กลุ่ม คือ lipase, esterase และ phosphatidase ซึ่ง staphylococci ส่วนใหญ่ที่พบในมนุษย์จะเป็นพวกสลายไขมันโดยธรรมชาติ (Vijaykumar, 2001)

S. aureus ผลิต protease 3 กลุ่ม ได้แก่ serine protease, cysteine protease และ metaloprotease ซึ่งจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการป้องกันของ host และทำลายเนื้อเยื่อ (Dubin, 2002) หน้าที่โดยทั่วไปของ protease คือการย่อยสลายโปรตีนจากนั้นจะนำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อขณะเดียวกันเชื้อสามารถใช้สารอาหารที่เป็นประโยชน์สำหรับการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน (Projan and Novick, 1997) ในผู้เป็นสิว แบคทีเรียกลุ่ม staphylococci จะมีผลต่อการติดเชื้อ การอักเสบและก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อหรือเกิดแผล (Majeed and Prakash, 2004) การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสิวต้องใช้เวลานาน ซึ่งจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตเอนไซม์โดยการฆ่าหรือยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียเพื่อป้องกันให้การอักเสบของแผลลดลง (Higaki, 2003)

การศึกษาความไวของ *S. epidermidis*, *S. aureus* และ *P. acnes* ต่อยาพื้นบ้านของญี่ปุ่น (kampo) 10 ชนิด พบว่า *S. aureus* และ *S. epidermidis* ไวต่อ kampo ทั้ง 10 ชนิด โดยค่า MIC อยู่ในช่วง 25-400 mg/ml ส่วน *P. acnes* ไวต่อ kampo 1 ชนิด คือ keigai-rengyo-to ค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.78-25 mg/ml (Higaki *et al.*, 1997) นอกจากนี้จากการศึกษาการต้านเอนไซม์ lipase ของ shiunko ต่อ *P. acnes* ที่แยกจากผู้ป่วยสิว โดย shiunko เป็น Kampo ชนิดหนึ่ง ผลิตจาก *Lithospermi radix*, *Angelicae radix*, *Oleum sesami*, *Cera flava* และ *Ades suillus* ซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและใช้ในการรักษาฝี หนอง พบว่า shiunko ความเข้มข้น 0.01% และ 0.1% สามารถยับยั้งกิจกรรมของ lipase ได้ประมาณ 8% และ 14% ตามลำดับ (Higaki *et al.*, 1998) จากการศึกษาผลของสารสกัดจาก *Helichrysum italicum* ต่อการเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์ของ *S. aureus* 20 สายพันธุ์ พบว่าสามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อและเอนไซม์บางชนิดได้ เช่น coagulase, DNAse, thermonuclease และ lipase ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1/2 และ 1/4 MIC (Nostro *et al.*, 2001a) เช่นเดียวกับการศึกษาผลของสารสกัดจาก *Nepeta*

cataria ต่อการสร้างเอนไซม์ของ *S.aureus* 44 สายพันธุ์ พบว่าสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ DNAse, thermonuclease และ lipase ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบรวมทั้ง ATCC ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1/2 และ 1/4 MIC (Nostro *et al.*, 2□□1b) Edwards-Jones and Foster (2□□2) พบว่า silver sulphadiazine ไม่สามารถทำให้การสร้างเอนไซม์ protease ของ *S. aureus* 2 สายพันธุ์ที่ทดสอบลดลงอย่างมีนัยสำคัญได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุมหลังจาก 24 ชั่วโมง มีรายงานว่าการสร้าง protease ของ *S. aureus* สายพันธุ์ NCTC 6571 ลดลงเมื่อทดสอบกับ tea three oil ความเข้มข้น □.□16% และ □.□31% โดยระดับ protease ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ หลังจาก 24 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ (Hammer *et al.*, 2□□5) ได้มีศึกษาผลของสารธรรมชาติ ได้แก่ glycyrrhizic acid, digitonin, catechin และ kaempferol ต่อการยับยั้ง lipase ของ *P. acnes* พบว่า catechin and kaempferol สามารถยับยั้ง lipase ได้ดีที่สุด (Falcocchio *et al.*, 2□□6) จากการศึกษาผลของสารสกัดจาก propolis ที่ความเข้มข้น 1/2MIC และ 1/4MIC ต่อการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ coagulase และ lipase ของ *S. aureus*, *S epidermidis*, *S. homonis* และ *S. warnerii* พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/2MIC สามารถทำให้การสร้างเอนไซม์ lipase ลดลง 17-5□% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Scazzocchio, 2□□6)

4. การรักษาสิว (ปรียาและประวิตร, 2548)

1. ยาทา

1.1 Comedolytic group

1.1.1 Retinoic acid

1.1.1.1 Tretinoin ขนาด □.□25%, □.□5% และ □.1% ออกฤทธิ์โดยการทำให้มีการหลุดลอกของ comedone ป้องกันการเกิด comedone ใหม่ แต่ไม่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *P. acnes* ใช้ได้ดีในการรักษาสิวที่ไม่รุนแรง จะเห็นผลหลังจากทายาทุกคืนประมาณ 3-4 เดือน ยากกลุ่มนี้สลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกแสงแดดจึงแนะนำให้ใช้ยาก่อนนอน ผลข้างเคียงจากการใช้ยาคือ การระคายเคืองบริเวณผิวหนัง หน้าแดง แสบ แห้ง ลอกเป็นขุย ควรใช้ยาความเข้มข้นต่ำก่อนและเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเมื่อผิวคุ้นกับยามากขึ้น อาจทำให้เป็นสิวมากขึ้นในช่วง 3-4 สัปดาห์แรกที่ใช้ยา นอกจากนั้นยังทำให้เกิดการแพ้แสงแดดได้

1.1.1.2 Isotretionin ขนาด □.□5% เจล สามารถทำให้เคราตินกลับสู่สภาวะปกติ ลดการทำงานของต่อมไขมัน และลดการอักเสบ ใช้ลดปริมาณสิวทั้งชนิดที่อักเสบและไม่อักเสบ ได้ผลดีในสิวชนิดไม่รุนแรง

1.1.1.3 Adapalene เป็น synthetic retinoids ตัวใหม่ มีข้อแตกต่างจาก tretinoin คือ ได้ผลดีกับสิวอักเสบและผลข้างเคียงน้อยกว่า

1.1.2 Salicylic acid ผสมในยาทาสิวในรูปของโลชั่นหรือครีม เมื่อใช้ความเข้มข้น 5-1□% สามารถลด comedone ได้ แต่ได้ผลน้อยกว่า retinoic acid

1.2 ยาปฏิชีวนะ

1.2.1 Erythromycin solution 2-4% ทำให้จำนวน *P. acnes* และ กรดไขมันอิสระลดลง และยังลดอาการอักเสบ ใช้ได้ผลดีในสิวชนิดไม่รุนแรง สามารถลดการอักเสบได้ร้อยละ 5□-6□เมื่อใช้ยาทาเช้า-เย็น นาน 8-12 สัปดาห์

1.2.2 Clindamycin solution 1% ให้ผลเช่นเดียวกับ erythromycin solution 2-4%

1.2.3 Erythromycin-zinc complex (erythromycin 4% และ zinc acetate 1-2% ลดจำนวน *P. acnes* และ กรดไขมันอิสระ โดยพบว่าได้ผลดีกว่า erythromycin 2% ชนิดทา หรือ tetracycline ชนิดรับประทาน 5□□มิลลิกรัม/วัน เชื่อว่า zinc จะช่วยให้ erythromycin ซึมผ่านผิวหนังได้ดีขึ้น

1.2.4 Benzoyl peroxide (BP) 2.5%, 5%, และ 1□% ครีมหรือเจล ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *P. acnes* ลดอาการอักเสบ และลดปริมาณไขมันที่ผิวหนัง ผลข้างเคียงคือ หน้าแดง แสบแห้ง และเป็นขุย

2. ยารับประทาน

2.1 ยาปฏิชีวนะ ออกฤทธิ์ลดจำนวน *P. acnes* และกรดไขมันอิสระ ทำให้จำนวนของสิวและการอักเสบลดลง และป้องกันการเกิดสิวใหม่ ยาปฏิชีวนะที่ใช้บ่อยได้แก่

2.1.1 Tetracycline 1-2 กรัม/วัน แบ่งให้วันละ 2-4 ครั้ง ก่อนอาหาร 3□-6□นาที ปกติยานี้ต้องรับประทานอย่างน้อย 3-4 สัปดาห์จึงเริ่มเห็นผล ควรให้ในขนาดสูงก่อน เมื่อดีขึ้นค่อยๆลดขนาดยาลง

2.2.2 Erythromycin ได้ผลดีพอๆกับ tetracycline ใช้รักษาสิวในเด็กและหญิงมีครรภ์ หรือผู้ป่วยที่ไม่สามารถทนผลข้างเคียงของ tetracycline ได้ erythromycin ขนาด 1-2 กรัม/วันแบ่งให้วันละ 2-4 ครั้งหลังอาหาร

2.2.3 Co-trimoxazole ใช้ในผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วย tetracycline และ erythromycin ขนาดที่ให้คือ 4 เม็ดต่อวัน ใช้เวลาประมาณ 4-6 สัปดาห์จึงจะเห็นผล

2.2 Retinoid

Isotetrionin เป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาสิวอักเสบรุนแรง ออกฤทธิ์ลดขนาดต่อมไขมันและการผลิตไขมัน ลดการหนาตัวของ corneum ที่บริเวณรูขุมขน ปริมาณไขมันที่ลดลงจะทำให้ภาวะแวดล้อมในรูขุมขนเปลี่ยนไป จำนวน *P. acnes* จึงลดลงด้วย

5. การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย Staphylococci

จากการทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ coagulase-negative staphylococci ที่แยกจากผิวหน้า พบว่าดื้อต่อยา tetracyclin 87.5%, erythromycin 68.8%, fusidic acid 56.3%, trimethoprim 42.4%, chloramphinicol 25%, clindamycin 9.4 % และ gentamycin 4.7% สายพันธุ์ดื้อยาส่วนใหญ่ที่แยกได้ส่วนใหญ่ คือ *S. epidermidis* โดยดื้อต่อยาปฏิชีวนะไม่เกิน 8 ชนิด (Cove *et al.*, 199□) นอกจากนี้มีการทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ coagulase-negative staphylococci ในกลุ่มตัวอย่างที่รักษาด้วย erythromycin ชนิดทา และ benzoyl peroxide เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าในกลุ่มที่รักษาด้วย erythromycin อย่างเดียวหลังจาก 12 สัปดาห์ *S.*

epidermidis ดื้อต่อยา erythromycin นอกจากนี้ยังดื้อต่อ clindamycin and tetracycline ส่วนการรักษาด้วย benzoyl peroxide เพียงอย่างเดียว และ benzoyl peroxide ร่วมกับ erythromycin สามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนได้และไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการดื้อต่อ erythromycin และยาปฏิชีวนะอื่น (Harkaway *et al.*, 1992) การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *S. aureus* ที่แยกจากผู้เป็นสิว 63 คน osteomyelitis 95 คน และ furunculosis 53 คน และโรคติดเชื้ออื่น 57 คน พบว่า *S. aureus* ส่วนใหญ่ดื้อต่อยา penicillin 91.5%, amplicillin 86%, tetracycline 73% และ doxycycline 53.1% (Ekiel *et al.*, 1995) การศึกษาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มที่เป็นสิวซึ่งรักษาด้วย tetracycline ชนิดรับประทานพบว่า *S. epidermidis* ดื้อต่อยา tetracycline 87.5% และ minocycline 3□% ในขณะที่ *P. acnes* ดื้อต่อยา tetracycline 7% และไม่ดื้อต่อยา minocycline (Noyon *et al.*, 1998) การทดสอบความไวของ *P. acnes* และ *S. epidermidis* ที่แยกจากสิว 3□ตัวอย่าง ต่อยาปฏิชีวนะ 7 ชนิด คือ ampicillin, erythromycin, roxithromycin, clindamycin, tetracycline, minocycline และ nadifloxacin พบว่า *P. acnes* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะน้อยกว่า *S. epidermidis* โดยที่ *S. epidermidis* มากกว่า 3□% ดื้อต่อยา erythromycin, roxithromycin และ clindamycin หลังจากรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน *S. epidermidis* ดื้อต่อยาเพิ่มขึ้น แต่การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *P. acnes* ยังคงจำกัด ดังนั้นเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสิวจึงตั้งข้อสังเกตว่าไม่เฉพาะ *P. acnes* เท่านั้นที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะแต่ *S. epidermidis* ก็ดื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วย (Nishijima *et al.*, 2□□□) มีรายงานว่า coagulase-negative staphylococci มีการดื้อยา erythromycin 98% ในสัปดาห์ที่ 12 หลังจากรักษาด้วย erythromycin gel 2% (Mills *et al.*, 2□□2) นอกจากนี้ศึกษาการดื้อต่อยา erythromycin ของแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เป็นสิวระดับความรุนแรงน้อยถึงปานกลางจำนวน 4□คน พบว่า *S. epidermidis* ดื้อต่อยา erythromycin 95% และ *P. acnes* ดื้อต่อ erythromycin 52% (Dreno and Poli, 2□□3) การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *S. aureus* ที่แยกได้จากผิวหนังที่เป็นโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic dermatitis) 1□□ สายพันธุ์ พบว่าเชื้อดื้อต่อยา erythromycin 18%, roxithromycin 19%, amoxicillin 13% และ clindamycin 1% ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบไวต่อ amoxicillin/clavulanic acid, Cefadroxil และ cefuroxim (Hoeger, 2□□4)

S. aureus 127 สายพันธุ์ที่แยกได้จากโพรงจมูกและผิวหนังบริเวณมือของพยาบาลไวต่อยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่ทดสอบยกเว้น erythromycin และ azithromycin โดยเชื้อดื้อต่อยาทั้ง 2 ชนิดนี้ 29.1% และ 22% ตามลำดับ เชื้อทุกสายพันธ์ไวต่อยา vancomycin นอกจากนี้พบว่า linezolid มีฤทธิ์ที่ดีในการต้าน staphylococci (Poiata *et al.*, 2□□6) จากการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *S. aureus* 129 isolates และ coagulase-negative staphylococci 58 isolates พบว่า ดื้อต่อยา oxacillin 71.1% และ erythromycin 47.1% (Arslan and Ozkardes, 2□□7) นอกจากนี้การทดสอบดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ cagulase-negative staphylococci 2□□สายพันธุ์ โดยเชื้อที่พบมากที่สุดคือ *S. epidermidis* 87 สายพันธุ์ พบว่าดื้อต่อยา methicillin 67.5% โดยในกลุ่มนี้จะดื้อต่อยา gentamicin 9□%, erythromycin 8□%, clindamycin 72%, trimethoprim-sulfamethoxazole 68%, ciprofloxacin 67%, tetracycline 6□%, chloramphenicol 56% และ fusidic acid 25% (Koksal *et al.*, 2□□7) จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* พบว่า *S.*

aureus ไวต่อ vancomycin 80.5 %, methicillin 68.0%, erythromycin 55.6%, novobiocin, 54.1% และ bacitracin 25.0% ส่วน *S. epidermidis* ไวต่อ methicillin 84.8%, vancomycin 81.2%, novobiocin 63.6%, erythromycin 42.4% และ bacitracin 27.8% (Bashir *et al.,* 2007) การทดสอบรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ clindamycin, gentamicin, trimethoprim sulfamethoxazole, erythromycin, vancomycin, ciprofloxacin, tetracycline, chloramphenicol และ nitrofurantoin ของ *S. aureus*, MRSA 18 สายพันธุ์ และ MSSA 62 สายพันธุ์ พบว่า รูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *S. aureus* แตกต่างจาก MRSA และ MSSA สำหรับ MRSA พบว่าเชื้อดื้อต่อยาหลายชนิดแต่ไม่พบว่าดื้อต่อ vancomycin ส่วน MSSA ไวต่อยาเกือบทุกชนิดที่ทดสอบ Brown and Ngeno (2007) ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *S. aureus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่อจำนวน 298 ราย พบว่า MRSA และ MSSA 77% และ 69.9% ดื้อต่อ erythromycin 77% และ 74.8% ดื้อต่อ clindamycin 100% และ 97.1% ดื้อต่อ minocycline และ 100% และ 98.1% ดื้อต่อ rifampin ตามลำดับ (Ho *et al.*, 2008) เชื้อ MRSA ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากโพรงจมูกดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่ม ซึ่งเชื้อดื้อต่อ tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole และ erythromycin มากกว่าชนิดอื่น และมีอัตราการดื้อต่อ rifampicin, fusidic acid, gentamicin และ ciprofloxacin ต่ำกว่ายาชนิดอื่น ในขณะที่พบว่าไม่มีเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม glycopeptides (Randrianirina *et al.*, 2007) จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ เชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในไนจีเรีย พบว่าเชื้อไวต่อ gentamicin 50.0%, erythromycin 40.0% และ streptomycin 30.0% และดื้อต่อ cloxacillin, penicillin, ampicillin และ tetracycline (Obiazi *et al.*, 2007)

6. กระทุ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk

วงศ์ : Myrtaceae

ชื่อสามัญ (ไทย) : กระทุ ทุ พรวด

ชื่อสามัญ (อังกฤษ) : downy myrtle, downy rose myrtle, rose myrtle, hill gooseberry, hill guava, isenbery bush, ceylon hill

ชื่ออื่น : กาทุ ง้าย ชวด ปุ้ย

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

ต้นกระทุ เป็นไม้พุ่มเขียวชะอุ่มทั้งปี ความสูงประมาณ 2-3 m

ใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามรูปไข่ปลายมน (elliptic-oval) ยาวประมาณ 5-8 cm กว้างประมาณ 1.5-4 cm หน้าใบเป็นมันสีเขียวเข้ม ส่วนหลังใบสีนวลมีขนละเอียดปกคลุม โดยมีเส้นใบนูนสามเส้น ประกอบด้วยเส้นกลางใบ 1 เส้น และเส้นขอบใบ 2 เส้น ก้านใบยาวประมาณ 5 mm เป็นเหลี่ยมมีขน

ดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อกระจุกซ้อนที่ง่ามใบหรือปลายกิ่ง ฐานรองดอกรูปถ้วย โคนกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นรูปกรวย ปลายแยก 5 แฉก ผิวมีขนนุ่มหนาแน่น กลีบดอก 5 กลีบ รูปร่าง

ค่อนข้างกลม ขนาด 1.5-2 cm สีชมพู ด้านนอกมีขนสีขาว สีของดอกกระทุเป็นสีชมพูกุหลาบ กลีบดอกชั้นเดียว มีสีชมพูอ่อนถึงแก่ในช่อเดียวกัน ขนาดดอกกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 cm

ผล รูปกลมถึงเกือบกลม ขนาด 9-1□mm ผิวมีขนคล้ายกำมะหยี่หนาแน่น ผลอ่อน มีสีเขียวแล้วจะค่อยๆสุกกลายเป็นสีแดง จนสุกจัดกลายเป็นสีม่วงอมดำ เนื้อผลสีชมพูแดง ภายในมีเมล็ดจำนวนมาก เมล็ดรูปไต สีน้ำตาลอ่อน ผลรับประทานได้ รสหวาน (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2548)

กระทุเป็นไม้ท้องถิ่นทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งพบได้บ่อยบนดินทราย บริเวณชายฝั่งทะเลทั้งสองด้านทางใต้ของไทย และจังหวัดตราดในภาคตะวันออก ความเป็นกรดด่างของดินอยู่ระหว่าง 4.□-1□.□ซึ่งเฉลี่ยคือ 5.8 (Winotai *et al.*, 2□□5) กระทุสามารถทนความเค็มและเกร็ดน้ำแข็ง (frost) ได้ สามารถทนอุณหภูมิได้ถึง -7°C และยังสามารถปรับตัวกับไฟป่า อีกทั้งเจริญเติบโตได้ดีหลังจากเกิดไฟไหม้ป่า

การปลูก ขณะนี้ยังไม่มีการปลูกกระทุเพื่อประโยชน์ทางการค้า มีเพียงการปลูกกระทุไว้เพื่อเป็นการเก็บรวบรวมพันธุ์และตกแต่งสถานที่ ในมลรัฐฮาวายและฟลอริดาของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศมาเลเซียกระทุถือว่าเป็นวัชพืชหลักหรือร้ายแรง (principal or noxious weed) มีรายงานการสำรวจเบื้องต้นเกี่ยวกับสัตว์กินพืชต่อพืชชนิดนี้ตั้งแต่เดือนเมษายน 2□□1 ถึงเดือนพฤษภาคม 2□□2 เพื่อที่จะรวบรวมข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับการกระจาย, ลักษณะทางชีววิทยา และ การใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (Winotai *et al.*, 2□□5)

รูปที่ 1 ต้น ใบ และดอกกระทุ

มีการศึกษาและแยกสารประกอบต่างๆที่สกัดได้จากกระทุ พบว่าเป็นสารกลุ่ม triterpenoids และ steroids ได้แก่ lupeol, beta-amyrin, beta-amyrenonol, betulin, friedelin, alpha-amyrin และ taraxerol (Hui *et al*., 1975) จากนั้นมีการพบสาร triterpenoids สารใหม่ 2 สาร hopenediol และ oleananolides (Hui and Li, 1976) นอกจากนี้สามารถแยกได้สาร tomentosin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม tannins (Liu *et al*., 1997) มีการศึกษาและสามารถ แยกได้สารในกลุ่ม tannins จากใบและรากได้ 4 สาร คือ pedunculangin, casuariin, castalagin และ tomentosin (Liu *et al*., 1998) และมีรายงานว่าสามารถแยกได้สาร flavone glycosides และ ellagitannin จากใบ (Hou *et al*., 1999) สารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตจากใบกระทุสามารถแยกได้สาร rhodomyrtone ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม acylphloroglucinols (Salni *et al*., 2002)

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อจุลินทรีย์มีรายงานไม่มากนัก สาร rhodomyrtone มีฤทธิ์ในการต้าน *E. coli* และ *S. aureus* (Salni *et al*., 2002) จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่าสามารถยับยั้ง *B. cereus*, *E. feacalis*, *L. monocytogenes*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. mutans* และ *S. pyogenes* ได้ (Voravuthikunchai *et al*., 2007) การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. pyogenes* ของส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน อะซิโตน เมทานอล และเอทานอล จากใบกระทุ พบว่าสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน อะซิโตน และเอทานอล มีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.015-0.062 และ 0.125-1.0 mg/ml ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลค่า MIC และ MBC มากกว่า 1.0 mg/ml (อาอีเซาะส์, 2550)

มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารในกลุ่ม acylphloroglucinols เช่น hyperforin ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จาก *Hypericum perforatum* มีฤทธิ์ในการต้าน MRSA, MSSA และ *S. aureus* ATCC 25923 ที่ดีมากโดยค่า MIC อยู่ในช่วง 0.1-1 µg/ml (Schempp *et al*., 1999; Reichling *et al*., 2001) มีรายงานว่า myrtucommulone และ semi myrtucommulone ที่แยกได้จาก *Myrtus communis* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ staphylococci โดยค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 2 และ 64 µg/ml ตามลำดับ (Appendino *et al*., 2002) สารกลุ่ม acylphloroglucinols ที่แยกได้จาก *Hypericum foliosum* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิดโดยค่า MIC อยู่ในช่วง 16-32 µg/ml (Gibbons *et al*., 2005)

7. การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรต่อแบคทีเรีย

จากการทดสอบสารสกัดจากพืช 10 ชนิดและสารพฤกษเคมี 6 ชนิด ต่อจุลินทรีย์ที่ไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ *S. aureus*, *Salmonella choleraesuis, Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis, Candida albicans, Proteus* spp, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella* spp., *Enterobacter aerogenes* และ *E. coli* พบว่าสารสกัดจาก *Caryophyllus aromaticus* และ *Syzygyum joabolanum* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้สูงสุด คือ 64.2% และ 57.1% ตามลำดับ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ดื้อยา 83.3% ค่า MIC ของสารสกัดจากพืชและสารพฤกษเคมีที่ใช้ทดสอบอยู่ระหว่าง 10-400 mg/ml (Nascimento *et al*., 2000) การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือก *Syzygium jambos* มีฤทธิ์ต้าน *S. aureus*, *Yersinia*

enterocolitica, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii* และ *Staphylococcus warneri* โดย ค่า MIC อยู่ระหว่าง 5□-1□□□, 25□-1□□□, 8-25□, 25□และ 8-1□□□µg/ml ตามลำดับ (Djipa *et al*., 2□□□) สารสกัดจาก *Hypericum perforatum* มีฤทธิ์ในการต้าน MRSA โดยค่า MIC อยู่ในช่วง 1.3-2.5 mg/ml (Reichling *et al*., 2□□1) นอกจากนี้การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบ Eucalyptus 26 species และ flavonoid จาก *Eucalyptus maculate* พบว่า สารสกัดจาก *E. globulus*, *E. maculata* และ *E. viminalis* สามารถยับยั้ง แบคทีเรียแกรมบวกได้ 6 ชนิด คือ *S. aureus* , MRSA, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* และ *P. acnes* และเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* โดยค่า MIC อยู่ในช่วง 3.9-6.3 mg/l แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบคือ *E. coli* และ *Pseudomonas putida* นอกจากนี้ 2′,6′-dihydroxy-3′-methyl-4′-methoxy-dihydrochalcone, eucalyptin และ 8-desmethyl-eucalyptin ซึ่งแยกจากสารสกัดของ *E. maculata* สามารถยับยั้งเชื้อได้ 7 ชนิดโดยค่า MIC อยู่ในช่วง 1-31 mg/l (Takahashi *et al*., 2□□4) สารสกัดจากเมล็ดของ *Syzygium aromaticum* มีค่า MIC เท่ากับ 781 µg/ml เมื่อทดสอบกับ MRSA (Abu-Shanab *et al*., 2□□4) มีการศึกษาผลของสารสกัดด้วยเมทานอลจากใบ *Eucalyptus camaldulensis* และ *Terminalia catappa* ต่อ *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* และ *S. aureus* ATCC 1□32□7 และสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย พบว่าสารสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้ง *B. subtilis* และ *S. aureus* ATCC 1□32□7 และสายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยได้ โดยค่า MIC อยู่ในช่วง 1.25-5 µg/ml (Babayi *et al*., 2004) การทดสอบผลของสารสกัดจากสมุนไพร 19 ชนิด ต่อ *P. acnes* และ *S. epidermidis* พบว่าจากการทดสอบโดยวิธี disc diffusion มีสารสกัดจากสมุนไพร 13 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. acnes* โดย *Senna alata*, *Eupatorium odoratum*, *Garcinia mangostana* และ *Barleria lupulinp* ยับยั้งได้ดี เมื่อทดสอบโดยวิธี broth dilution สารสกัดจาก *G. mangostana* มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด MIC และ MBC ของ *P. acnes* และ *S. epidermidis* มีค่าเท่ากับ □.□39 และ □.156 mg/ml (Chomnawang *et al*., 2□□5) การทดสอบฤทธิ์สารสกัดจากใบของ *Psidium guajava* และ *Juglans regia* ต่อแบคทีเรียที่แยกได้จากสิวโดยวิธี disc diffusion method พบว่า ขนาดวงใสของ *P. acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* มีค่าอยู่ในช่วง 15.8-17.6 mm 11.3-15.7 mm และ 12.9-15.5 mm ตามลำดับ (Qadan *et al*., 2□□5) จากการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 7 ชนิด ได้แก่ *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus*, *Citrus hystrix*, *Ocimum sanctum*, *Ocimum basilicum*, *Zingiber cassumunar* และ *Zingiber officinale* เพื่อใช้ในการควบคุมสิว พบว่า *C. nardus* ยับยั้ง *P. acnes* ได้ดีที่สุด MIC มีค่าเท่ากับ □.□□5-□.3 µl/ml และ MBC มีค่าเท่ากับ □.6-1.2 µl/ml ค่า MIC และ MBC ของ *C. citratus* เท่ากับ □.6 µl/ml ค่า MIC และ MBC ของ *C. hystrix* เท่ากับ 5.□µl/ml (Lertsatitthanakorn *et al*., 2□□6) การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจาก *Abies balsamea* ต่อ *E. coli* และ *S. aureus* พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. Coli* แต่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ โดย MIC คือ 56 µg/ml และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยด้วย GC-MS พบว่าประกอบด้วย monoterpenes มากกว่า 96% และ sesquiterpenes ซึ่งมี beta-pinene 29.9%, delta-3-carene 19.6% และ alpha-pinene 14.6% เป็นองค์ประกอบหลักมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* โดยค่า MIC เท่ากับ 13.6 µg/ml, 5.1 µg/ml และ 2.6 µg/ml ตามลำดับ (Pichette *et al*.,

2006) การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบ *E. globulus* ต่อ *S. aureus* 56 สายพันธุ์ *S. pyogenes* 25 สายพันธุ์ *S. pneumoniae* 12 สายพันธุ์ พบว่าค่า MIC$_{50}$ ต่อเชื้อเหล่านี้เท่ากับ 64 32 และ 16 μg/ml ตามลำดับ ส่วน MIC$_{90}$ มีค่าเท่ากับ 128 64 และ 32 μg/ml ตามลำดับ (Salari *et al.*, 2006) มีรายงานผลของสารสกัดจาก *Rosmarinus officinalis* ด้วย methanol ต่อ *S. aureus*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus feacalis*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* and *C. albicans* พบว่าสามารถยับยั้ง *S. epidermidis* และ *S. aureus* ได้ โดยค่า MIC และ MBC อยู่ระหว่าง 10-20 mg/ml (Celiktas *et al.*, 2007) การศึกษาผลของสารสกัดจากพืช 6 ชนิด คือ *Gentiana lutea, Harpagophytum procumbens, Boswellia serrat, Usnea barbata, R. officinalis* และ *Salvia officinalis* และ สารจากพืชได้แก่ usnic acid, carnosol, carnosic acid, ursolic acid, oleanolic acid, harpagoside, boswellic acid และ gentiopicroside ในการต้านแบคทีเรียและยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับโรคผิวหนัง (ทั้งกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนและไม่ต้องออกซิเจน) พบว่าสารสกัดจาก *U. barbata* และ usnic acid มีประสิทธิภาพดีที่สุดโดยเฉพาะกับแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน และยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเช่น *S. aureus*, *P. acnes*, *Corynebacterium* spp. รวมทั้งยีสต์ *M. furfur* (Weckesser *et al.*, 2007) การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Pneumatopteris afra*, *Platycerium bifurcatum* และ *Nephrolepsis bisserata* ในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella spp.* และ *Salmomelia typhi* พบว่า MIC อยู่ในช่วง 25-100 μg/ml MIC ของ *P. afra*, *P. bifurcatum* และ *N. bisserata* ต่อ *S. aureus* มีค่าเท่ากับ 12.5 12.5 และ 50 μg/ml ตามลำดับ (Ojo *et al.*, 2007) นอกจากนี้มีรายงานว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากใบของ *Cordia boissieri* มีประสิทธิภาพในการต้าน *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาได้ โดยค่า MIC เท่ากับ 250 μg/ml (Molina-Salinas *et al.*, 2007) การศึกษาฤทธิ์ของ *Callistemon rigidus* ในการต้านเชื้อ *S. sureus* ที่ดื้อต่อยา 27 สายพันธุ์ พบว่าค่า MIC อยู่ในช่วง 1.25-80 μg/ml โดย MIC$_{50}$ และ MIC$_{90}$ มีค่าเท่ากับ 5 และ 40 μg/ml ตามลำดับ (Gomber and Saxsena, 2007)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ coagulase-positive และ coagulase-negative staphylococci ที่แยกได้จากสิวโดยวิธี disc diffusion

2. เพื่อศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากใบกระทุในการยับยั้ง coagulase-positive และ coagulase-negative staphylococci ที่แยกได้จากสิวโดยวิธี disc diffusion

3. เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบและสารสกัดแยกส่วนจากใบกระทุที่มีผลยับยั้งหรือฆ่า coagulase-positive และ coagulase-negative staphylococci ที่แยกได้จากสิว

4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของสารสกัดหยาบจากใบกระทุโดยวิธี time-kill study

5. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบกระทุต่อการสร้างเอนไซม์ และ biofilm ของเชื้อ coagulase-positive และ coagulase-negative staphylococci ที่แยกได้จากสิว

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

 1.1 เชื้อ staphylococci ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่

 1.1.1 แบคทีเรียกลุ่ม coagulase-positive staphylococci ที่แยกได้จากสิว

 1.1.2 แบคทีเรียกลุ่ม coagulase-negative staphylococci ที่แยกได้จากสิว

 1.1.3 *Staphylococcus epidermidis* PSSCMI □142

 1.2 เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบคือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

เชื้อแบคทีเรียในข้อ 1.1.3 และ 1.2 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. ยาต้านจุลินทรีย์

 2.1 แผ่นยามาตรฐาน (Oxoid)

 2.1.1 Ciprofloxacin 3□µg

 2.1.2 Clindamycin 2 µg

 2.1.3 Erythromycin 15 µg

 2.1.4 Gentamicin 1□µg

 2.1.5 Penicillin 1 µg

 2.1.6 Oxacillin 1□µg

 2.1.7 Teicoplanin 3□µg

 2.1.8 Tetracycline 3□µg

 2.1.9 Trimethoprim-sulfamethoxazole 1.25/23.75 µg

 2.1.1□Vancomycin 3□µg

 2.2 ยาปฏิชีวนะ

 2.2.1 Clindamycin

 2.2.2 Erythromycin

 2.2.3 Penicillin

 2.2.4 Vancomycin

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ
    - 3.1 Mannitol Salt Agar (MSA) (Merck)
    - 3.2 Mueller-Hinton Agar (MHA) (Difco)
    - 3.3 Mueller-Hinton Broth (MHB) (Difco)
    - 3.4 Nutrient Agar (NA) (Difco)
    - 3.5 Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco)
    - 3.6 Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco)
4. สารเคมี
    - 4.1 Dimethylsulfoxide (Sigma)
    - 4.2 95% Ethanol (Merck)
    - 4.3 Hydrogen peroxide (BDH)
    - 4.4 Sodium chloride (Merck)

อุปกรณ์

1. Autoclave (Tomy, ES 315)
2. Balance (Sartorius, BP 210S)
3. Beaker (Pyrex)
4. Duran bottle (Duran)
5. Filter paper disc ขนาด 6 mm (Whatman)
6. Hot air oven (Binder, T410340)
7. Hot plate stirrer (Lab. Companion, HP 3000)
8. Incubator (Heraeus, B 5100E)
9. Laminar air flow cabinet (Gelman, BH 143AS)
10. Light microscope (Olympus, CX31RBSFA)
11. Micropipette ขนาด 1-10 μl, 2-20 μl, 20-200 μl, และ 100-1000 μl (Eppendorf)
12. Microtiter plate แบบ 96 wells (Corning)
13. Multichannel micropipette ขนาด 20-200 μl (Finnpipette)
14. Petri dish (Anumbra)
15. Refrigerator (Sanyo)
16. Test tube (Pyrex)
17. Vernier caliper (Whale)
18. Vortex mixer (Vortex Genie 2, G 560E)
19. Water bath (Julabo, TW 20)

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างจากบริเวณผิวหน้าผู้เป็นสิว 90 ตัวอย่าง จากกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ไม่ใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสิว กลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสิว และกลุ่มที่รักษาสิวด้วยวิธีอื่นๆ อายุระหว่าง 18-44 ปี เป็นชาย 18 คน และหญิง 72 คน โดยใช้ cotton swab ปราศจากเชื้อเกลี่ยผิวหน้าบริเวณที่เป็นสิว จากนั้น swab ลงบนอาหาร mannitol salt agar (MSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีสีเหลืองทอง สีเทา หรือสีขาวขุ่นบนอาหารสีเหลือง และโคโลนีสีขาวบนอาหารสีชมพู subculture แต่ละโคโลนี ลงบน MSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ streak ลงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง บ่งชี้ลักษณะโคโลนี

2. การบ่งชี้ลักษณะ (Holt *et al.*, 1994)

ย้อมสีกรัม ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวคล้ายพวงองุ่น ทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ mannitol fermentation เลือกโคโลนีที่มีสีเหลืองทอง สีเทา หรือสีขาวขุ่นบนอาหารสีเหลือง และโคโลนีสีขาวบนอาหารสีชมพู ทดสอบ catalase ให้ผลบวก และ ทดสอบ coagulase ให้ผลบวกแสดงว่าเป็นกลุ่ม coagulase-positive ถ้าให้ผลลบแสดงว่าเป็นกลุ่ม coagulase-negative

3. การสกัดสารสกัดหยาบจากใบกระทุ

นำใบกระทุอบที่อุณหภูมิ 50°C นาน 4-5 วัน บดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักก่อนการสกัดด้วยเอทานอล 95% ในอัตราส่วนของสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:2 เขย่าเบาๆ ทิ้งไว้ 7 วัน ระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45°C นำสารสกัดที่ได้ชั่งน้ำหนักและเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ 4°C คำนวนหาร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้ ตามสูตร

$$\%\ \text{YIELD} = \frac{\text{น้ำหนักของสมุนไพรที่ได้จากการสกัด}}{\text{น้ำหนักของสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด}} \times 100$$

4. การแยกสารสกัดจากใบกระทุเป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (Semi-purified fraction) และ สารบริสุทธิ์ (Pure compound)

ละลายสารสกัดที่ได้จากข้อ 3 ด้วยเมทานอล แล้วทำการแยกส่วนที่ไม่ละลายออกโดยการกรอง นำส่วนที่เป็นสารละลายมาระเหยให้แห้งโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40-60°C นำสารสกัดที่ได้มาละลายด้วยไดคลอโรมีเทนในปริมาณที่น้อยที่สุดที่สามารถละลายสารสกัดได้หมด ทำการแยกส่วนสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ใช้ไดคลอโรมีเทน 100% และอะซีโตน 10-100% เป็นตัวชะสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ออกจากคอลัมน์ตามลำดับ ใช้ไดคลอโรมีเทน 100% เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำการตรวจสอบสารละลายที่ถูกชะออกมาด้วย

ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography; TLC) ที่มีซิลิกาเจลเป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) และทำการรวมสารละลายที่มีลักษณะของจุดสารบนทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีที่คล้ายกันเข้าด้วยกัน ใช้การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทำการคัดแยกสาร (bioassay-guided fractionation) จากสารสกัดไดคลอโรมีเทนให้ได้สารกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified fraction) และ/หรือสารบริสุทธิ์ (pure compound) ใช้วิธีการเอกซ์เทนซีฟ 1 (extensive 1) และ 2ดี เอ็นเอ็มอาร์ สเปคโทรสโคปี (2D NMR spectroscopy) และ แมสสเปคโทรสโคปี (mass spectroscopy) ทำการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ซึ่งทั้งสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์และสารบริสุทธิ์นี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม และคุณอัษฎาวุธ หิรัญรัตน์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

5. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียและฤทธิ์ของสมุนไพรต่อการต้านแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion method (CLSI, 2006a)

5.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน Mueller-Hinton Broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. □.5 ด้วย □.85% NaCl (มีเชื้อประมาณ 1.5 x 1□^{8} CFU/ml)

5.2 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ

ละลายสารสกัดใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้น 25□mg/ml เตรียมแผ่นสารสกัดจากสมุนไพรโดยหยดสารสกัด 1□µl ลงกลางแผ่น disc ไร้เชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้ง

5.3 การทดสอบกับแผ่นยามาตรฐานและแผ่นสารสกัดจากสมุนไพร

จุ่มเชื้อจากข้อ 5.1 โดยใช้ cotton swab เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) 3 แนว ทำมุม 6□° วางแผ่นยามาตรฐานได้แก่ ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, penicillin, oxacillin, teicoplanin, tetracycline, trimethoprim-sulfamrthoxazole และ vancomycin และแผ่นสารสกัดจากสมุนไพรโดยแต่ละแผ่นห่างกันประมาณ 15-2□ mm และห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 mm บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง

ใช้สายพันธุ์มาตรฐาน *S. aureus* ATCC 25923 ทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะเพื่อใช้เป็น quality control

5.4 การอ่านผล

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) โดยใช้ vernier caliper สำหรับการทดสอบกับแผ่นยามาตรฐานนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับตารางมาตรฐาน CLSI ซึ่งแสดงผลออกมา 3 ลักษณะ ดังนี้

Susceptible (S) เชื้อมีความไวต่อยาต้านแบคทีเรีย

Intermediate (I) เชื้อมีความไวปานกลางต่อยาที่ทดสอบ

Resistant (R) เชื้อดื้อยาที่ใช้ทดสอบ

วิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อโดยใช้ one-way ANOVA (P< □.□5)

6. การทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) โดยวิธี broth microdilution (CLSI, 2006b)

6.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. □.5 ด้วย □.85% NaCl แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ 1.□x 1□^{6} CFU/ml ด้วย MHB

6.2 การเตรียมสารสกัดหยาบ

เตรียมสารสกัดสมุนไพรให้มีความเข้มข้นเป็น1□เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (1□24 µg/ml) ด้วยตัวทำละลาย DMSO

6.3 การทดสอบหาค่า MIC

ทำการเจือจางสารสกัดแบบลำดับสองให้มีความเข้มข้น 1□24-2 µg/ml ใน microtiter plate แบบ 96 หลุมให้มีปริมาตรหลุมละ 2□µl ดูด MHB ใส่ลงใน microtiter plate หลุมละ 8□µl ดูดเชื้อจากข้อ 6.1 ใส่ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 1□□µl เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-2□ชั่วโมง

การอ่านผล บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MIC

6.4 การทดสอบหาค่า MBC

นำแต่ละหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากการทดสอบหาค่า MIC เพาะเลี้ยงบนอาหาร MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MBC

นอกจากนี้ทำการหาค่า MIC และ MBC ของยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด ได้แก่ clindamycin, erythromycin, penicillin และ vancomycin และ ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์และสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีการเดียวกัน

หาค่า $MIC_{5□}$ และ $MIC_{9□}$ ของสารสกัดหยาบและยาปฏิชีวนะ ซึ่ง $MIC_{5□}$ คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยั้บยั้งเชื้อได้ 5□% ของสายพันธุ์ที่ทดสอบ ส่วน $MIC_{9□}$ คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยั้บยั้งเชื้อได้ 9□% ของสายพันธุ์ที่ทดสอบ

7. การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของสารสกัดหยาบและสารสกัดแยกส่วนจากกระทุโดยวิธี Time-Kill Study (Lorian, 1996)

7.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. □.5 ด้วย □.85% NaCl แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ 1.□x $1□^{6}$ CFU/ml ด้วย MHB

7.2 การเตรียมสารสกัดเตรียมสารสกัดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1□ เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (1/2 MIC, MIC, 2 MIC และ 4 MIC)

7.3 การทดสอบสารสกัด

ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้น □.5 ml จากข้อ 7.2 เติม TSB ปริมาตร 2 ml เติมเชื้อจากข้อ 7.1 ปริมาตร 2.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นับจำนวนโคโลนี ที่เวลา □, 2, 4, 6, 8, 12 ,16,2□และ 24 ชั่วโมง โดยเมื่อครบเวลาที่กำหนดให้ทำ dilution นำแต่ละ dilution ทำการ spread บนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง

ตรวจผลโดยนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วง 3□-3□□ โคโลนี เขียนกราฟระหว่าง log จำนวนโคโลนี กับเวลา

8. การคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ Lipase และ Protease ของเชื้อ Staphylococci

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบป้ายลงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) ซึ่งมี tributyrin 1% และ casein 2% สำหรับการทดสอบเอนไซม์ lipase และ protease ตามลำดับ เชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ lipase เกิดวงใสรอบโคโลนี ส่วนเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ protease เกิดวงขุ่นรอบโคโลนี

9. การทดสอบผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้างเอนไซม์ Lipase และ Protease ของเชื้อ Staphylococci (ดัดแปลงจาก Nostro *et al.*, 2001)

9.1 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่มีการสร้างเอนไซม์ (จากการทดสอบในข้อ 8) เพาะเลี้ยงบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ 2.0 x 10^6 CFU/ml ด้วย TSB

9.2 การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่า ของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (1/2MIC, 1/4 MIC และ 1/8MIC)

9.3 การทดสอบผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้างเอนไซม์ lipase

ผสมสารสกัดในข้อ 9.2 ปริมาตร 2 ml กับ NA หลอมเหลว18 ml ที่เติม tributyrin 1% หยดเชื้อจากข้อ 9.1 ลงไป 5 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 72 ชั่วโมง

การอ่านผล วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี คำนวณหาความสามารถในการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) ซึ่งเท่ากับ เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสหารด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

9.4 การทดสอบผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้างเอนไซม์ protease

ผสมสารสกัดในข้อ 9.2 ปริมตาร 2 ml กับ NA หลอมเหลว 18 ml ที่เติม casein 2% หยดเชื้อจากข้อ 9.1 ลงไป 5 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง

การอ่านผล วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงขุ่นรอบโคโลนีและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี คำนวณหา degree of hydrolysis

จากค่า degree of hydrolysis ที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับค่า degree of hydrolysis ของชุดควบคุม (1% DMSO) เพื่อคำนวณหาร้อยละของการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ (เพิ่มขึ้นหรือลดลง) จาก

$$\frac{\text{Degree of hydrolysis ชุดควบคุม} - \text{Degree of hydrolysis ชุดทดลอง} \times 100}{\text{Degree of hydrolysis ชุดควบคุม}}$$

ถ้าร้อยละการเปลี่ยนแปลง ≤ 50% แสดงว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงบางส่วน (Partial differentiation) ถ้าร้อยละการเปลี่ยนแปลง > 50% แสดงว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด (Total differentiation)

10. การคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สร้าง Biofilm ของเชื้อ Staphylococci (ดัดแปลงจาก Karaolis *et al.*, 2005)

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี ใส่ลงใน TSB ซึ่งมี glucose □.25% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง เจือจางให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland no. □.5 แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ 1.□ x 1□^{6} CFU/ml ด้วย TSB ซึ่งมี glucose □.25% จากนั้นดูดเชื้อใส่ลงใน microtiter plate 1□□μl เติม TSB ซึ่งมี glucose □.25% 1□□ μl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffered saline (PBS) 2□□μl 2 ครั้ง เขย่า microtiter plate เพื่อเอาแบคทีเรียที่ไม่มีการเกาะติดออก ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ย้อมสี biofilm โดยการเติม □.1% crystal violet 2□□ μl ทิ้งไว้ 3□นาที ล้างออกด้วยน้ำและทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นเติม DMSO ลงไป 2□□ μl เขย่าเบา ๆ วัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density - OD) ที่ 57□nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ใช้ TSB ซึ่งมี glucose □.25% เป็น negative control

พิจารณาความสามารถในการสร้าง biofilm ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์จากความสามารถในการเกาะติดของเชื้อ (adherent capability) โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ (OD) กับค่าการดูดกลืนแสงของ negative control (OD_C) ซึ่งแบ่งเป็น 4 ระดับ คือ

1. $OD < OD_C$ ไม่มีการเกาะติด (non-adherent)
2. $OD_C < OD \leq 2OD_C$ การเกาะติดน้อย (weakly adherent)
3. $2OD_C < OD \leq 4OD_C$ การเกาะติดปานกลาง (moderately adherent)
4. $4OD_C < OD$ การเกาะติดมาก (strongly adherent)

11. การทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากใบกระทุต่อการสร้าง Biofilm ของเชื้อ Staphylococci (ดัดแปลงจาก Karaolis *et al.*, 2005)

11.1 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรียที่สายพันธุ์ที่มีการสร้าง biofilm สูงสุดของเชื้อ coagulase-positive และ coagulase-negative staphylococci กลุ่มละ 1□สายพันธุ์ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* PSSCMI □142 เพาะเลี้ยงบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี ใส่ลงใน TSB ซึ่งมี glucose □.25% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง เจือจางให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland no. □.5 แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ 1.□x 1□^{6} CFU/ml ด้วย TSB ซึ่งมี glucose □.25%

11.2 การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1□ เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC และ1/16 MIC)

11.3 การทดสอบผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง biofilm

ดูดสารสกัดจากข้อ 11.2 แต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน microtiter plate 2□µl เติม TSB ปริมตาร 8□µl ซึ่งมี glucose □.25% และเชื้อจากข้อ 11.1 ลงไป 1□□µl บ่มที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$ นาน 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffered saline (PBS) 2□□µl 2 ครั้ง เขย่า microtiter plate เพื่อเอาแบคทีเรียที่ไม่มีการเกาะติดออก ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ย้อมสี biofilm โดยการเติม □.1% crystal violet 2□□µl ทิ้งไว้ 3□นาที ล้างออกด้วยน้ำและทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม DMSO ลงไป 2□□ µl เขย่าเบาๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 57□nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมี 1% DMSO แทนสารสกัด

วิเคราะห์ความแตกต่างของการสร้าง biofilm ของเชื้อเมื่อทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ กับชุดควบคุมโดยใช้ one-way ANOVA (P<□.□5)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ผลการเก็บตัวอย่างและการบ่งชี้ลักษณะ

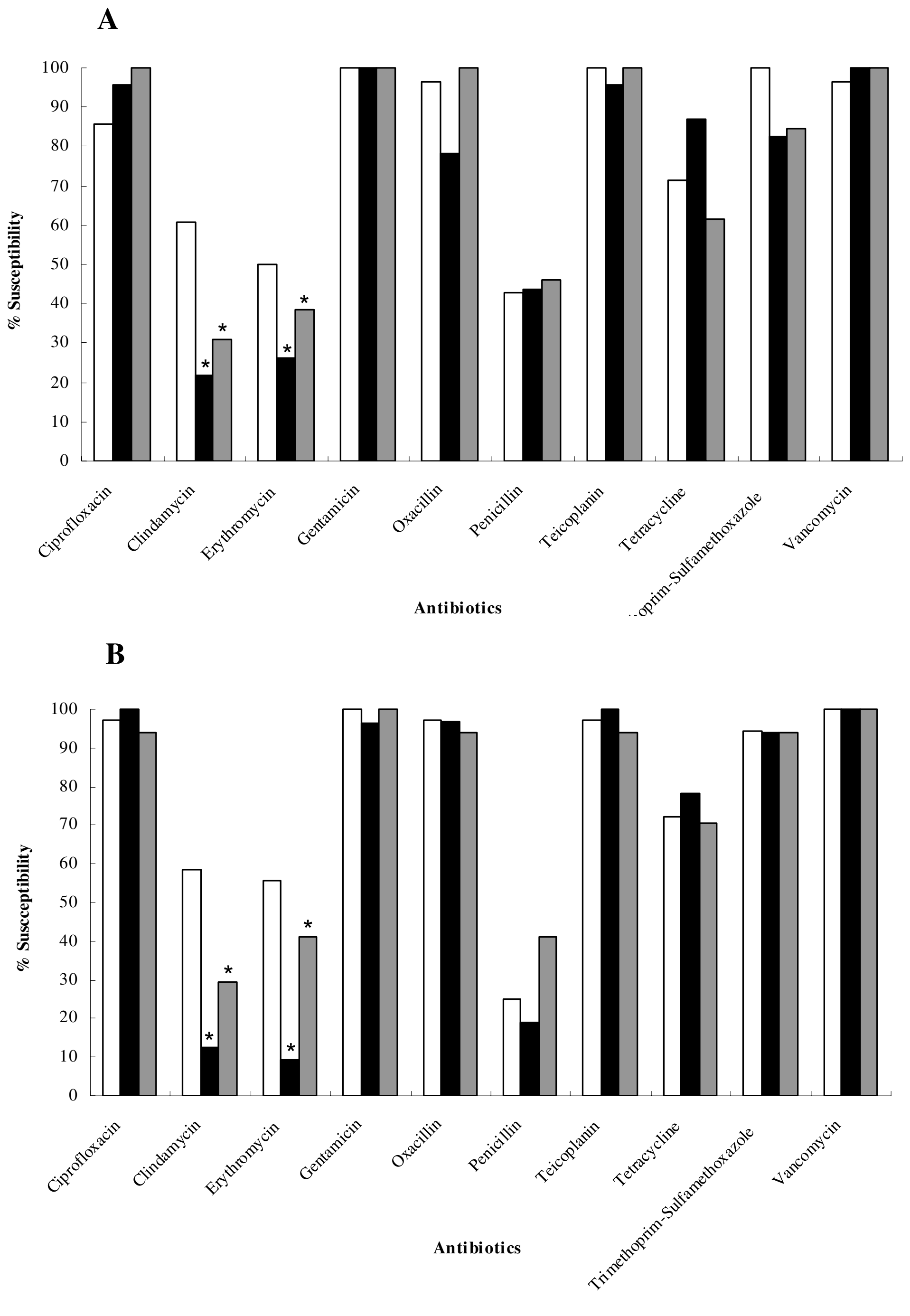
จากการเก็บตัวอย่างจากผิวหน้าบริเวณที่เป็นสิว 90 ตัวอย่าง จากกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ไม่ใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสิว กลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสิว และกลุ่มที่รักษาสิวด้วยวิธีอื่นๆ นำเชื้อที่แยกได้ย้อมสีกรัม ทดสอบ mannitol fermentation, catalase, และ coagulase พบว่าเชื้อ staphylococci ที่แยกได้เป็น coagulase-positive staphylococci 64 สายพันธุ์ (isolates) และ coagulase-negative staphylococci 85 สายพันธุ์

2. ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากใบกระทุ

การสกัดสารจากใบกระทุด้วยเอทานอล 95% ในอัตราส่วนของสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:2 พบว่า ร้อยละของสารสกัดที่ได้มีค่าเท่ากับ 7%

3. ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียโดยวิธี Disc Diffusion

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2 รูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ staphylococci ทั้ง 2 กลุ่มใกล้เคียงกัน ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ coagulase-positive staphylococci ดังแสดงในรูปที่ 2A เชื้อทุกกลุ่มที่ทดสอบไวต่อยา gentamicin 100% และไวต่อยา teicoplanin และ vancomycin เกือบ 100% นอกจากนี้จะไวต่อยา ciprofloxacin, oxacillin และ trimethoprim-sulfamethoxazole อย่างน้อยที่สุด 80% ส่วน coagulase-negative staphylococci (รูปที่ 2B) เชื้อทั้ง 3 กลุ่มที่แยกได้จากสิวไวต่อยา vancomycin 100% ในขณะที่กลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะและกลุ่มที่ใช้การรักษาอื่นๆ ไวต่อยา gentamicin 100% ส่วนกลุ่มที่ไม่ใช้ยาปฏิชีวนะไวต่อยา gentamicin 96.4% เชื้อทุกกลุ่มที่แยกได้จะไวต่อยา ciprofloxacin, oxacillin, teicoplanin และ trimethoprim-sulfamethoxazole มากกว่า 90% และประมาณ 70% จะไวต่อยา tetracycline เชื้อจะไวต่อยา clindamycin, erythromycin และ penicillin น้อยกว่ายาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ เชื้อจะไวต่อยา clindamycin และ erythromycin น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ใช้ยาปฏิชีวนะอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



รูปที่ 2 รูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ coagulase-positive staphylococci (A) และ coagulase-negative staphylococci (B) ที่แยกได้จากสิวกลุ่มที่ไม่ใช้ยาปฏิชีวนะ (แท่งสีขาว)กลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ (แท่งสีดำ) และกลุ่มที่รักษาโดยวิธีอื่นๆ (แท่งสีเทา) * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้ยาปฏิชีวนะ

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดจากใบกระทุโดยวิธี Disc Diffusion

เมื่อนำแผ่น disc ที่มีสารสกัดความเข้มข้น 2.5 mg/disc มาทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรียได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่แยกได้ทุกสายพันธุ์ โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของ coagulase-positive staphylococci และ coagulase-negative staphylococci มีค่า 11-15 mm จำนวน 82.8% และ 87% ตามลำดับ เส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ยของเชื้อทั้งสองกลุ่มเท่ากับ 12.1 ± 1.8□และ 14 ± 1.67 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบกับ *S. aureus* ATCC 25923 ขนาด inhibition zone มีค่าเท่ากับ 11 mm ในขณะที่ *S. epidermidis* PSSCMI □142 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสมีค่าเท่ากับ 21 mm

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส	เปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์ (%)	
(mm)	Coagulase-positive (n=64)	Coagulase-negative (n=85)
≤ 1□	14.1	1.2
11-15	82.8	87.□
16-2□	3.1	11.8

5. ผลการทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของยาปฏิชีวนะและสารสกัดจากใบกระทุโดยวิธี broth microdilution

5.1 ยาปฏิชีวนะ

ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิดได้แก่ clindamycin, erythromycin, penicillin และ vancomycin ต่อเชื้อ staphylococci ที่แยกได้ทุกสายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 2 MIC$_{5\square}$ ของยา clindamycin ต่อเชื้อ coagulase-positive staphylococci และ coagulase-negative staphylococci มีค่า 32 และ 512 µg/ml ตามลำดับ ส่วน MIC$_{5\square}$ของยา erythromycin เท่ากับ 64 และ 128 µg/ml ในขณะที่ MIC$_{9\square}$ของยา clindamycin และ erythromycin ต่อ staphylococci ทั้ง 2 กลุ่ม มากกว่า 1□24 µg/ml สำหรับยา penicillin ค่า MIC$_{5\square}$ และ MIC$_{9\square}$ ต่อเชื้อกลุ่ม coagulase-positive staphylococci คือ □.5 และ 16 µg/ml ซึ่งใกล้เคียงกับ coagulase-negative staphylococci ค่า MIC$_{5\square}$และ MIC$_{9\square}$เท่ากับ 1 และ 8 µg/ml ในขณะที่ MIC$_{5\square}$และ MIC$_{9\square}$ของยา vancomycin ต่อเชื้อ coagulase-positive staphylococci มีค่าเท่ากับ 1 µg/ml โดยใกล้เคียงกับ MIC$_{5\square}$และ MIC$_{9\square}$ ต่อ coagulase-negative staphylococci ซึ่งเท่ากับ 1 และ 2 µg/ml ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่า MIC$_{5\square}$และ MIC$_{9\square}$ของยา vancomycin ต่ำกว่า MIC breakpoint ในขณะที่ MIC$_{5\square}$และ MIC$_{9\square}$ของยา clindamycin, erythromycin และ penicillin สูงกว่า MIC breakpoint ค่า MIC ของยา clindamycin, erythromycin, penicillin และ vancomycin ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 8 µg/ml, 2 µg/ml, □.12 µg/ml และ □.5 µg/ml ตามลำดับ

5.2 สารสกัดหยาบจากใบกระทุ

ค่า MIC ของสารสกัดที่ใช้ทดสอบแสดงในตารางที่ 2 ค่า MIC อยู่ในช่วง 32–1□24 µg/ml โดยที่ค่า MIC$_{5\square}$ และ MIC$_{9\square}$ ต่อเชื้อ coagulase-positive staphylococci คือ 64 และ 512 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับ coagulase-negative staphylococci ค่า MIC$_{5\square}$และ MIC$_{9\square}$เท่ากับ 64 และ 256 µg/ml ตามลำดับ ส่วน MIC ของสารสกัดต่อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* PSSCMI □142 มีค่าเท่ากับ 32 µg/ml

5.3 สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์และสารบริสุทธิ์

สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกได้มีทั้งหมด 2□fractions และสารบริสุทธิ์คือ rhodomyrtone นำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ 4 fractions ได้แก่ R4, R5, R6 และ R7 (เนื่องจากมีการศึกษาในห้องปฏิบัติการก่อนหน้านี้ว่ามีฤทธิ์ในการต้าน *S. pyogenes*) และสาร rhodomyrtone มาทดสอบฤทธิ์ของสารต่อเชื้อ coagulase-positive staphylococci 2 สายพันธุ์ คือ NPRC 3□2 และ NPRC 348 coagulase-negative staphylococci 2 สายพันธุ์ คือ NPRC 5□2 และ NPRC 58□โดยคัดเลือกทั้ง 4 สายพันธุ์นี้จากค่า MIC ต่ำสุดและสูงสุดในแต่ละกลุ่ม นอกจากนี้ทำการทดสอบกับ*S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* PSSCMI □142 ค่าMIC และ MBC ได้ผลดังตารางที่ 3 พบว่าค่า MIC และ MBC ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ R4-R7 ต่อ NPRC 3□2, NPRC 5□2, NPRC 58□, *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* PSSCMI □142 อยู่ในช่วง 1-8 µg/ml ในขณะ

ตารางที่ 2 ค่า MIC และ MBC ของยาปฏิชีวนะและสารสกัดหยาบจากใบกระทุต่อเชื้อ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci

สารต้านจุลินทรีย์	coagulase-positive staphylococci (n=64)		coagulase-negative staphylococci (n=85)		MIC range (µg/ml)	MBC range (µg/ml)	MIC of *S. aureus* ATCC 25923 (µg/ml)	MIC breakpoints (µg/ml)	
	$MIC_{5□}$ (µg/ml)	$MIC_{9□}$ (µg/ml)	$MIC_{5□}$ (µg/ml)	$MIC_{9□}$ (µg/ml)				Susceptible	Resistant
Clindamycin	32	>1□24	512	>1□24	8->1□24	8->1□24	8	≤□.5	≥4
Erythromycin	64	>1□24	128	>1□24	□.5□->1□24	1->1□24	2	≤□.5	≥8
Penicillin	□.5	16	1	8	□.□6-64	□.□6-64	□.12	≤□.12	≥□.25
Vancomycin	1	1	1	2	□.25-2	□.25-4	□.5	≤4	≥32
สารสกัดหยาบจากกระทุ	64	512	64	256	32-1□24	32->1□24	32		

ตารางที่ 3 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ และ Rhodomyrtone จากใบกระทุต่อเชื้อ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci

สารสกัด	MIC/MBC (µg/ml)					
	Coagulase-positive Staphylococci		Coagulase-negative Staphylococci		*S. aureus*	*S. epidermidis*
	NPRC 3□2 (32 µg/ml)[a]	NPRC 348 (5□□µg/ml)[a]	NPRC 5□2 (32 µg/ml)[a]	NPRC 58□ (25□µg/ml)[a]	ATCC 25923 (32 µg/ml)[a]	PSSCMI □142 (32 µg/ml)[a]
R4	8/8	>128	4/4	2/4	4/8	4/4
R5	2/2	8/8	1/1	2/2	1/2	1/1
R6	4/4	32/32	2/2	2/2	2/2	2/2
R7	8/8	64/64	4/4	4/4	2/4	4/4
Rhodomyrtone	□.5/□.5	8/8	□.5/□.5	1/1	□.5/□.5	□.5/□.5

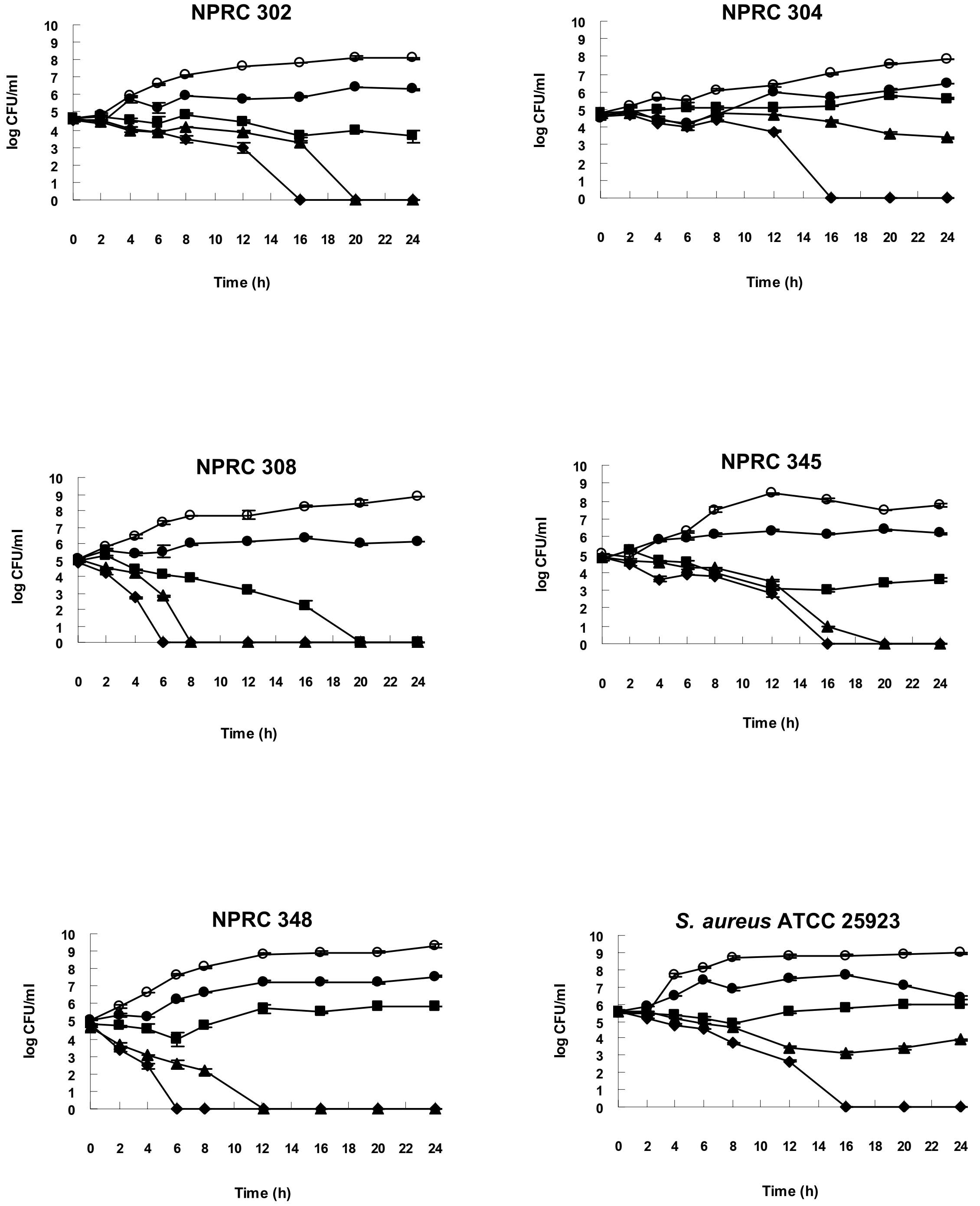
[a] ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากใบกระทุ

ที่ค่า MIC และ MBC ต่อ NPRC 348 อยู่ระหว่าง 8->128 µg/ml เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ rhodomyrtone พบว่า MIC และ MBC ต่อ NPRC 3□2 NPRC 5□2 *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* PSSCMI □142 มีค่าเท่ากับ □.5 µg/ml ในขณะที่ MIC และ MBC ต่อ NPRC 348 และ NPRC 58□มีค่าเท่ากับ 8 µg/ml และ 1 µg/ml

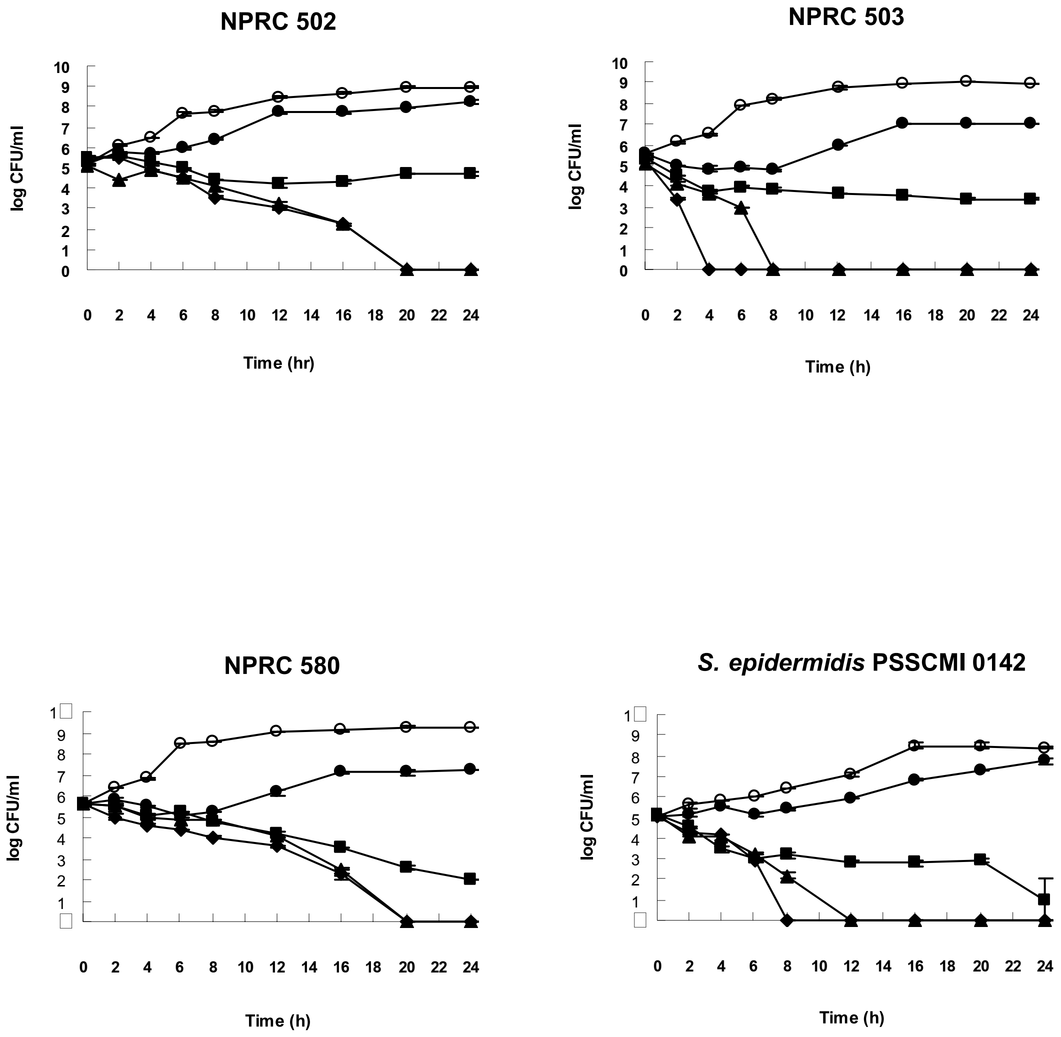
6. ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของสารสกัดจากใบกระทุโดยวิธี time-kill study

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากกระทุต่อเชื้อ coagulase-positive staphylococci และ coagulase-negative staphylococci โดยวิธี time-kill study พบว่ารูปแบบของการรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 2 กลุ่มมีความคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 3 และ รูปที่ 4) เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นความสามารถในการยับยั้งเชื้อหรือฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นด้วย coagulase-positive staphylococci (รูปที่ 3) ที่ความเข้มข้น MIC สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ เมื่อทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 4MIC โดยส่วนใหญ่จำนวนเชื้อลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมอย่างน้อยที่สุด 3log ภายในเวลา 6-8 ชั่งโมง ยกเว้น NPRC 3□4 ที่ความเข้มข้น 4MIC นี้สามารถฆ่าเชื้อได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบรวมทั้ง *S. aureus* ATCC 25923 โดยสายพันธุ์ NPRC 3□8 และ 348 สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้ภายในเวลา 6 ชั่วโมง ในขณะที่ NPRC 3□2, NPRC 3□4, NPRC, 345 และ *S. aureus* ATCC 25923 สารสกัดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อทั้งหมดที่เวลา 16 ชั่วโมง

ผลของสารสกัดจากกระทุต่อเชื้อ coagulase-negative staphylococci แสดงดังรูปที่ 4 ที่ความเข้มข้น MIC สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบเช่นเดียวกับ coagulase-positive staphylococci สารสกัดที่ความเข้มข้น 2MIC สามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลงอย่างน้อยที่สุด 3log เมื่อเทียบกับชุดควบคุมภายในเวลา 6-8 ชั่วโมง และสามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งหมดที่เวลา 8 และ 12 ชั่งโมง สำหรับสายพันธุ์ NPRC 5□3 และ *S. epidermidis* PSSCMI □142 ตามลำดับ ในขณะที่ NPRC 5□2 และ NPRC 58□สารสกัดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ทั้งหมดที่เวลา 2□ชั่งโมง



รูปที่ 3 Time-kill curves ของ coagulase-positive staphylococci และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ชุดควบคุม (○) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/2MIC (●), MIC (■), 2MIC (▲) and 4MIC (◆)



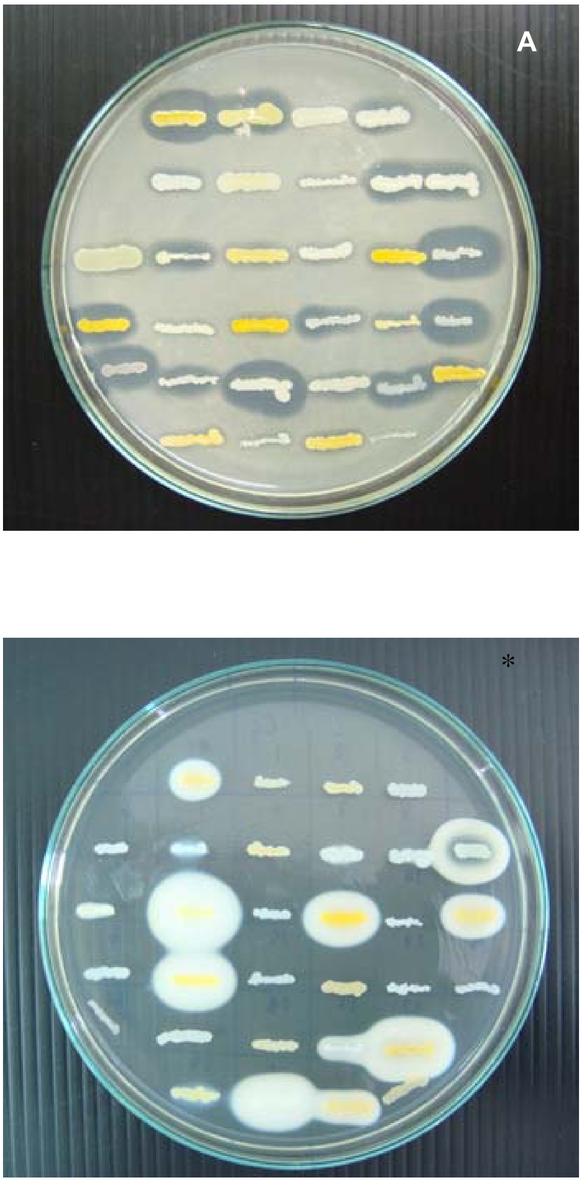
รูปที่ 4 Time-kill curves ของ Coagulase-negative Staphylococci และ *Staphylococcus epidermidis* PSSCMI □142 ชุดควบคุม (○) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/2 MIC (●), MIC (■), 2 MIC (▲) and 4 MIC (◆)

7. ผลการคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ Lipase และ Protease ของเชื้อ Staphylococci

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ lipase และ protease ของเชื้อ coagulase-positive staphylococci 64 สายพันธุ์ และ coagulase-negative staphylococci 85 สายพันธุ์ โดยการสร้างเอนไซม์ lipase สังเกตจากวงใสรอบรอยขีด ในขณะที่การสร้างเอนไซม์ protease สังเกตจากวงขุ่นรอบรอยขีดดังแสดงในรูปที่ 5 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์แสดงดังตารางที่ 4 เชื้อ coagulase-positive staphylococci สามารถสร้างเอนไซม์ lipase ได้ 42 สายพันธุ์ (65.6%) และสร้างเอนไซม์ protease ได้ 17 สายพันธุ์ (26.6%) ในขณะที่ coagulase-negative staphylococci สามารถสร้างเอนไซม์ lipase และ protease ได้ 85 สายพันธุ์ (1[illegible]%) และ 56 สายพันธุ์ (65.7%) ตามลำดับ และพบว่า *S. aureus* ATCC 25923 สามารถสร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ ในขณะที่ *S. epidermidis* PSSCMI [illegible]142 สามารถสร้างได้เฉพาะเอนไซม์ lipase เท่านั้น

ตารางที่ 4 ผลการคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ Lipase และ Protease ของเชื้อ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci

เอนไซม์	จำนวนสายพันธุ์ (%)	
	Coagulase-positive (n=64)	Coagulase-negative (n=85)
Lipase	42 (65.6)	85 (1[illegible])
Protease	17 (26.6)	56 (65.7)



รูปที่ 5 การคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ Lipase (A) และ Protease (B) ของเชื้อ Staphylococci

8. ผลการทดสอบผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง เอนไซม์ Lipase และ Protease ของเชื้อ Staphylococci

สารสกัดจากใบกระทุมีผลต่อการยับยั้งหรือการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ lipase และ protease เพียงบางส่วน (degree of hydrolysis เปลี่ยนแปลง ≤ 5□% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม)

8.1 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้างเอนไซม์ Lipase

จากการนำเชื้อ coagulase-positive staphylococci 42 สายพันธุ์ และ coagulase-negative staphylococci 85 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ lipase ได้ ทดสอบกับสารสกัดจากใบกระทุที่ความเข้มข้น 1/2MIC 1/4MIC และ 1/8MIC ดังแสดงในรูปที่ 6A สารสกัดจากใบกระทุมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ lipase ของ coagulase-positive staphylococci โดยทำให้เอนไซม์ลดลง 13 สายพันธุ์ (3□.9%) เพิ่มขึ้น 15 สายพันธุ์ (35.7%) มีการเปลี่ยนแปลงทั้ง 2 แบบ 1 สายพันธุ์ (2.4%) คือ NPRC 361 และไม่มีการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ lipase 13 สายพันธุ์ (3□.9%) ดังตารางที่ 5 ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1/2MIC 1/4MIC และ 1/8MIC สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ lipase ได้ 11 สายพันธุ์ (26.2%) 1□ สายพันธุ์ (23.8%) และ 1□ สายพันธุ์ (23.8%) ในขณะเดียวกันสารสกัดทั้ง 3 ความเข้มข้นนี้สามารถทำให้เชื้อกลุ่มนี้สร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น 9 สายพันธุ์ (21.4%) 12 สายพันธุ์ (28.6%) และ 12 สายพันธุ์ (28.6%) ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ส่วน NPRC 361 เมื่อทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/2MIC และ 1/8MIC การสร้างเอนไซม์ลดลง ในขณะที่ 1/4MIC ทำให้การสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น

สำหรับเชื้อ coagulase-negative staphylococci สารสกัดจากใบกระทุไม่สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ lipase ได้ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ 79 สายพันธุ์ (92.9%) ในทางตรงกันข้ามสามารถทำให้เชื้อนี้สร้างเอนไซม์ lipase เพิ่มขึ้น 6 สายพันธุ์ (7.1%) ดังตารางที่ 5 โดยมีผลทำให้การสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1 สายพันธุ์ (1.2%) 4 สายพันธุ์ (4.7%) และ 2 สายพันธุ์ (2.4%) ที่ความเข้มข้น 1/2MIC 1/4MIC และ 1/8MIC ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

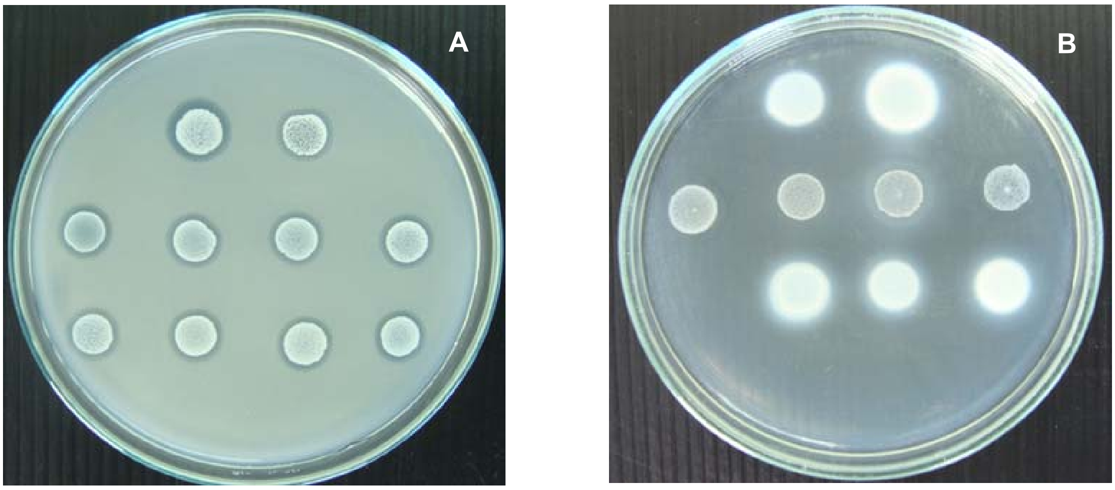
8.2 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้างเอนไซม์ Protease

เมื่อนำเชื้อ coagulase-positive staphylococci 17 สายพันธุ์ และ coagulase-negative staphylococci 56 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ protease ได้ ทดสอบกับสารสกัดจากใบกระทุที่ความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC, และ 1/8MIC ดังแสดงในรูปที่ 6B พบว่าสารสกัดจากใบกระทุมีผลทำให้การสร้างเอนไซม์ protease ของ coagulase-positive staphylococci ลดลง 1□ สายพันธุ์ (58.8%) เพิ่มขึ้น 2 สายพันธุ์ (11.8%) และไม่มีการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ 5 สายพันธุ์ (29.4%) ดังตารางที่ 7 โดยสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ protease ของ coagulase-positive staphylococci ได้ 7 สายพันธุ์(41.2%) 6 สายพันธุ์ (35.3%) และ 7 สายพันธุ์ (41.2%) ที่ความเข้มข้น 1/2MIC 1/4MIC และ 1/8MIC ตามลำดับ และเพิ่มการสร้างเอนไซม์ protease ของเชื้อกลุ่มนี้ 1 สายพันธุ์ (5.9%) 2 สายพันธุ์ (11.8%) และ 2 สายพันธุ์ (11.8%) ที่ความเข้มข้นดังกล่าว (ตารางที่ 8)

ในขณะเดียวกันสารสกัดมีผลทำให้การสร้างเอนไซม์ protease ของ coagulase-negative staphylococci ลดลง 7 สายพันธุ์ (12.5%) เพิ่มขึ้น 3 สายพันธุ์ (5.4%) มีการเปลี่ยนแปลงทั้ง 2 แบบ 1 สายพันธุ์ (1.8%) คือ NPRC 512 และไม่มีการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ protease 45

สายพันธุ์ (8□4%) ดังตารางที่ 7 ซึ่งสารสกัดสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ protease ของ coagulase-negative staphylococci ได้ 5 สายพันธุ์ (8.9%) 2 สายพันธุ์ (3.6%) และ 2 สายพันธุ์ (3.6%) ที่ความเข้มข้น 1/2MIC 1/4MIC และ 1/8MIC ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีผลทำให้เชื้อกลุ่มนี้สร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นความเข้มข้นละ 2 สายพันธุ์ (3.6%) ส่วน NPRC 512 ที่ความเข้มข้น 1/4MIC และ 1/8MIC การสร้างเอนไซม์ลดลง ในขณะที่ 1/2MIC ทำให้การสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 8)

สำหรับ *S. aureus* ATCC 25923 สารสกัดจากใบกระทุไม่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ lipase และ protease และไม่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ lipase ของ *S. epidermidis* PSSCMI □142



รูปที่ 6 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้างเอนไซม์ Lipase (A) และ Protease (B) ของ เชื้อ Staphylococci

ตารางที่ 5 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ Lipase ของ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci ที่สร้างเอนไซม์ Lipase ได้

Staphylococci	จำนวนสายพันธุ์ (%)			
	เอนไซม์ลดลง	เอนไซม์เพิ่มขึ้น	เอนไซม์เปลี่ยนแปลงทั้งลดลงและเพิ่มขึ้น	เอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลง
Coagulase-positive (n=42)	13 (3[illegible].9)	15 (35.7)	1 (2.4)	13 (3[illegible].9)
Coagulase-negative (n=85)	-	6 (7.1)	-	79 (92.9)

ตารางที่ 6 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้างเอนไซม์ Lipase ของ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci ที่สร้างเอนไซม์ Lipase ได้

Staphylococci	จำนวนสายพันธุ์ (%)					
	เอนไซม์ลดลง			เอนไซม์เพิ่มขึ้น		
	1/2MIC	1/4MIC	1/8MIC	1/2MIC	1/4MIC	1/8MIC
Coagulase-positive (n=42)	11 (26.2)	1□(23.8)	1□(23.8)	9 (21.4)	12 (28.6)	12 (28.6)
Coagulase-negative (n=85)	-	-	-	1 (1..2)	4 (4.7)	2 (2.4)

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ Protease ของ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci ที่สร้างเอนไซม์ Protease ได้

Staphylococci	จำนวนสายพันธุ์ (%)			
	เอนไซม์ลดลง	เอนไซม์เพิ่มขึ้น	เอนไซม์เปลี่ยนแปลงทั้งลดลงและเพิ่มขึ้น	เอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลง
Coagulase-positive (n=17)	1□(58.8)	2 (11.8)	-	5 (29.4)
Coagulase-negative (n=56)	7 (12.5)	3 (5.4)	1 (1.8)	45 (8□.4)

ตารางที่ 8 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้างเอนไซม์ Protease ของ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci ที่สร้างเอนไซม์ Protease ได้

Staphylococci	จำนวนสายพันธุ์ (%)					
	เอนไซม์ลดลง			เอนไซม์เพิ่มขึ้น		
	1/2MIC	1/4MIC	1/8MIC	1/2MIC	1/4MIC	1/8MIC
Coagulase-positive (n=17)	7 (41.2)	6 (35.3)	7 (41.2)	1 (5.9)	2 (11.8)	2 (11.8)
Coagulase-negative (n=56)	5 (8.9)	1 (1.8)	1 (1.8)	2 (3.6)	2 (3.6)	2 (3.6)

9. ผลการคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สร้าง Biofilm ของเชื้อ Staphylococci

จากการทดสอบหาเชื้อสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง biofilm จากเชื้อ staphylococci ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 9 พบว่าเชื้อกลุ่ม coagulase-positive staphylococci 64 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบการสร้าง biofilm สามารถแบ่งเชื้อออกได้เป็น 4 กลุ่ม ตามระดับการเกาะติด คือ ไม่มีการเกาะติด (non-adherent) 3 สายพันธุ์ (4.7%) การเกาะติดน้อย (weakly adherent) 39 สายพันธุ์ (6□.9%) การเกาะติดปานกลาง (moderately adherent) 8 สายพันธุ์ (12.5%) และการเกาะติดมาก (strongly adherent) 14 สายพันธุ์ (21.9%) ในขณะที่เชื้อกลุ่ม coagulase-negative staphylococci ทั้งหมด 85 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบการสร้าง biofilm พบว่าไม่มีการเกาะติด 1 สายพันธุ์ (1.2%) การเกาะติดน้อย 31 สายพันธุ์ (36.5%) การเกาะติดปานกลาง 31สายพันธุ์ (36.5%) และการเกาะติดมาก 22 สายพันธุ์ (25.9%) จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า เชื้อกลุ่ม coagulase-negative staphylococci มีการระดับเกาะติดปานกลางและการเกาะติดมากสูงกว่า coagulase-positive staphylococci สำหรับ *S. aureus* ATCC 25923 มีระดับการเกาะติดมาก และ *S. epidermidis* PSSCMI □142 มีระดับการเกาะติดน้อย

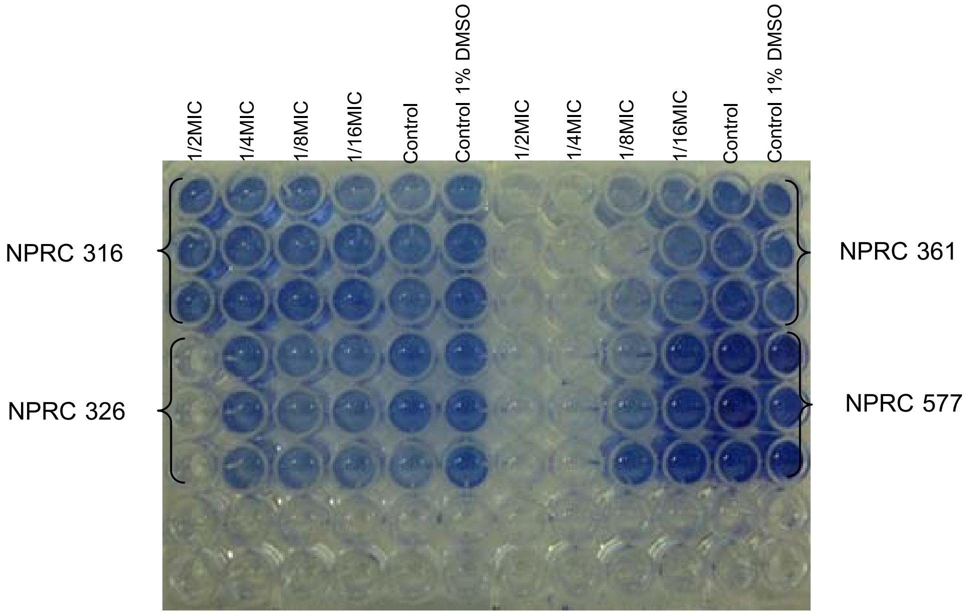
ตารางที่ 9 ผลการคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สร้าง Biofilm ของเชื้อ Coagulase-positive และ Coagulase-negative Staphylococci

ระดับการเกาะติด	จำนวนสายพันธุ์ (%)	
	Coagulase-positive (n=64)	Coagulase-negative (n=85)
ไม่มีการเกาะติด	3 (4.7)	1 (1.2)
การเกาะติดน้อย	39 (6□.9)	31 (36.5)
การเกาะติดปานกลาง	8 (12.5)	31 (36.5)
การเกาะติดมาก	14 (21.9)	22 (25.9)

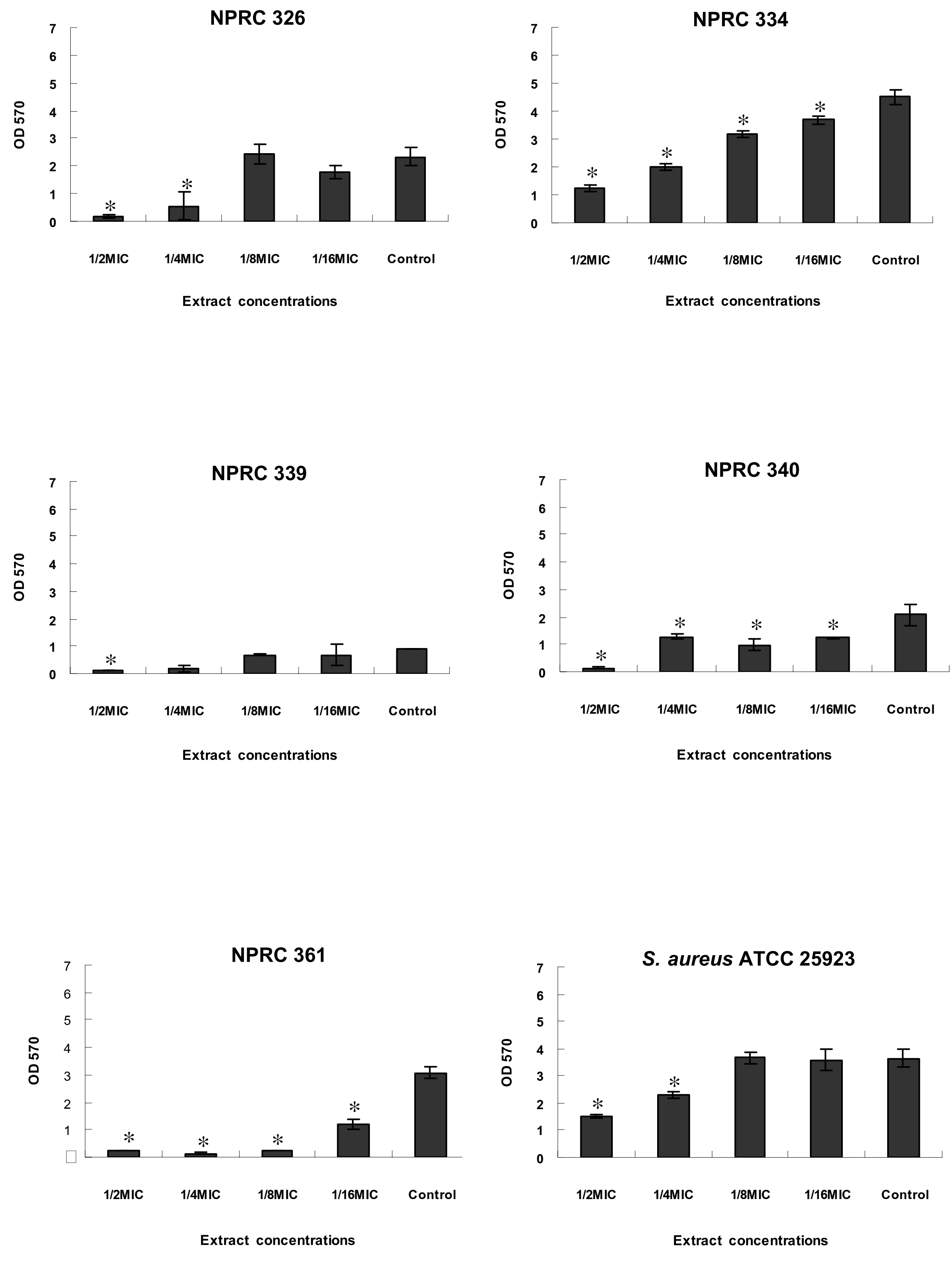
10. ผลการทดสอบผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง Biofilm

จากการทดสอบเชื้อกลุ่ม coagulase-positive และ coagulase-negative staphylococci ที่สามารถสร้าง biofilm ได้นั้น คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง biofilm ได้สูงสุดกลุ่มละ 1□ สายพันธุ์ เพื่อทำการทดสอบผลของสารสกัดจากใบกระทุที่ความเข้มข้น 1/2MIC 1/4MIC 1/8MIC และ 1/16MIC ต่อการสร้าง biofilm ดังรูปที่ 7

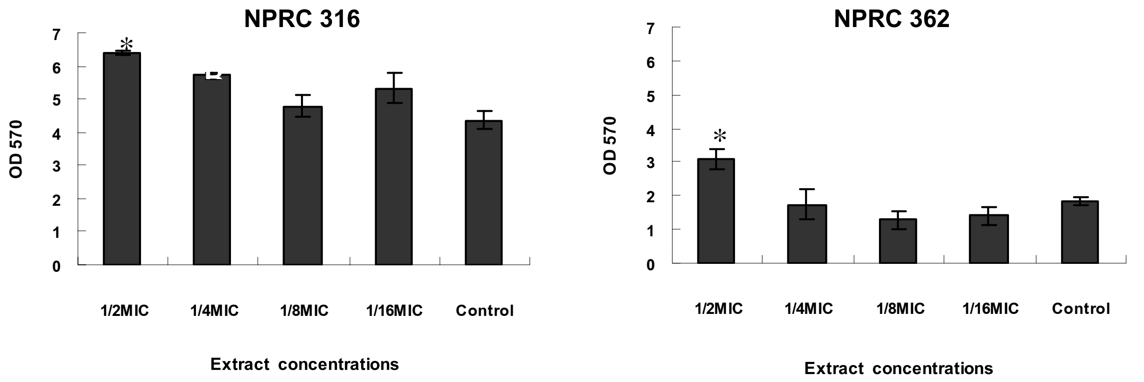
การทดสอบผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง biofilm ของเชื้อกลุ่ม coagulase-positive staphylococci 1□สายพันธุ์ การสร้าง biofilm ของเชื้อลดลง 5 สายพันธุ์ (รูปที่ 8) โดยพบว่า สายพันธุ์ NPRC 334 NPRC 34□และ NPRC 361 การสร้าง biofilm ของเชื้อลดลงทุกความเข้มข้นที่ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ (p<□.□5) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม สายพันธุ์ NPRC 326 และ NPRC 339 การสร้าง biofilm ของเชื้อมีแนวโน้มลดลงเมื่อทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น โดยการสร้าง biofilm ของ NPRC 326 ที่ 1/2MIC และ 1/4MIC น้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<□.□5) ส่วน NPRC 339 มีเพียงที่ 1/2MIC เท่านั้นที่ทำให้การสร้าง biofilm ของเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (p<□.□5) ในขณะที่ NPRC 316 และ NPRC 362 เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น เชื้อมีแนวโน้มที่จะสร้าง biofilm มากขึ้น ดังรูปที่ 9 ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1/2MIC และ 1/4MIC NPRC 316 มีการสร้าง biofilm มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<□.□5) ในทำนองเดียวกันที่ความเข้มข้น 1/2MIC NPRC 362 มีการสร้าง biofilm มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน นอกจากนี้มีเชื้อที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงการสร้าง biofilm เมื่อทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ NPRC 324 NPRC 329 และ NPRC 357 (รูปที่ 1□)



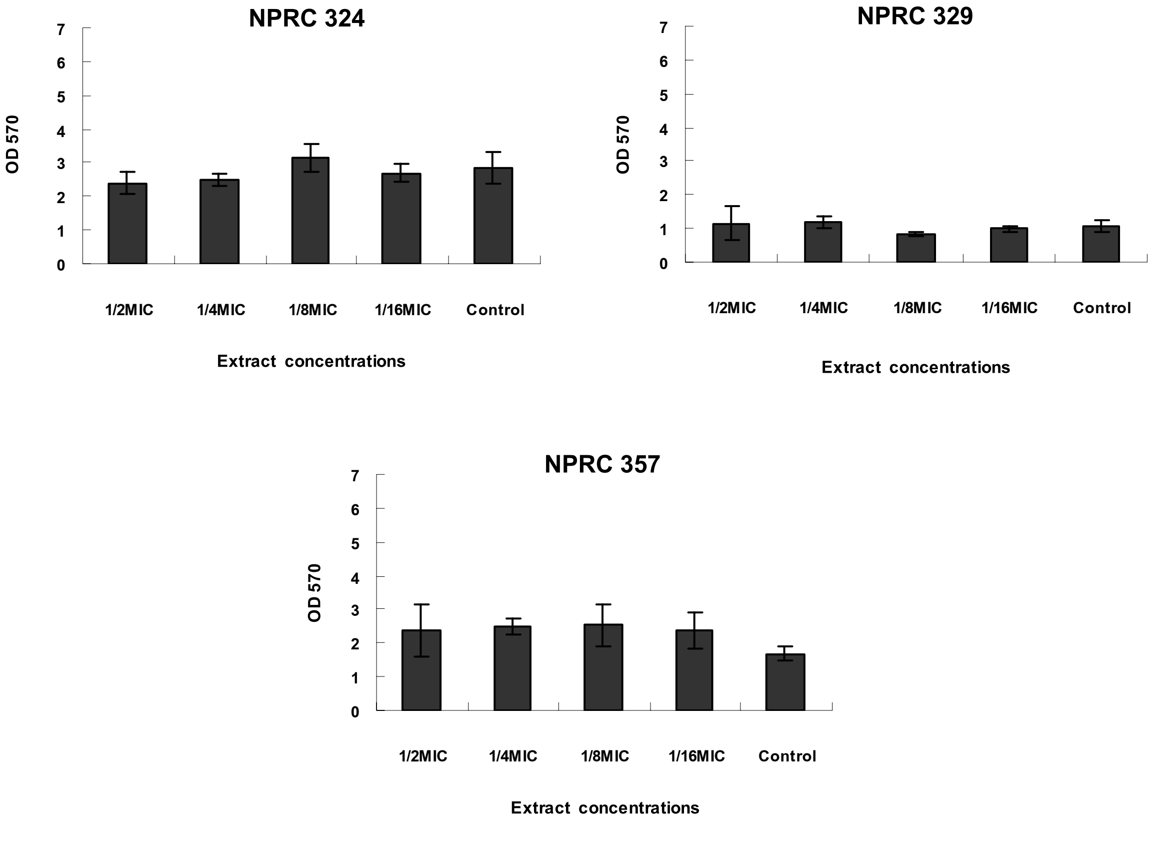
รูปที่ 7 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง Biofilm ของเชื้อ Staphylococci สายพันธุ์ NPRC 316 NPRC 326 NPRC 361 และ NPRC 577



รูปที่ 8 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง Biofilm ลดลงของ Coagulase-positive Staphylococci และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<□.□5) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (1% DMSO)

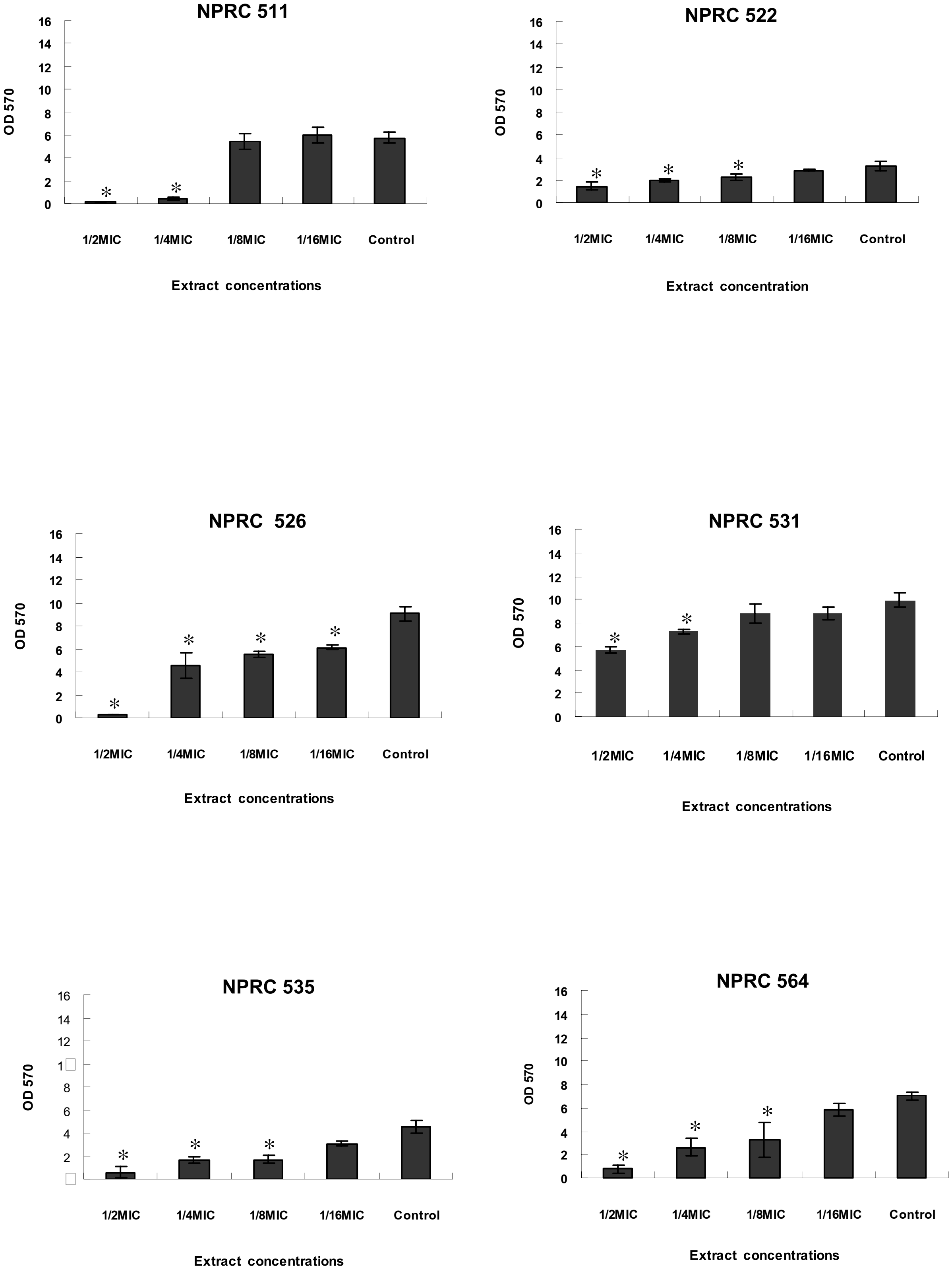


รูปที่ 9 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง Biofilm เพิ่มขึ้นของ Coagulase-positive Staphylococci * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (1% DMSO)

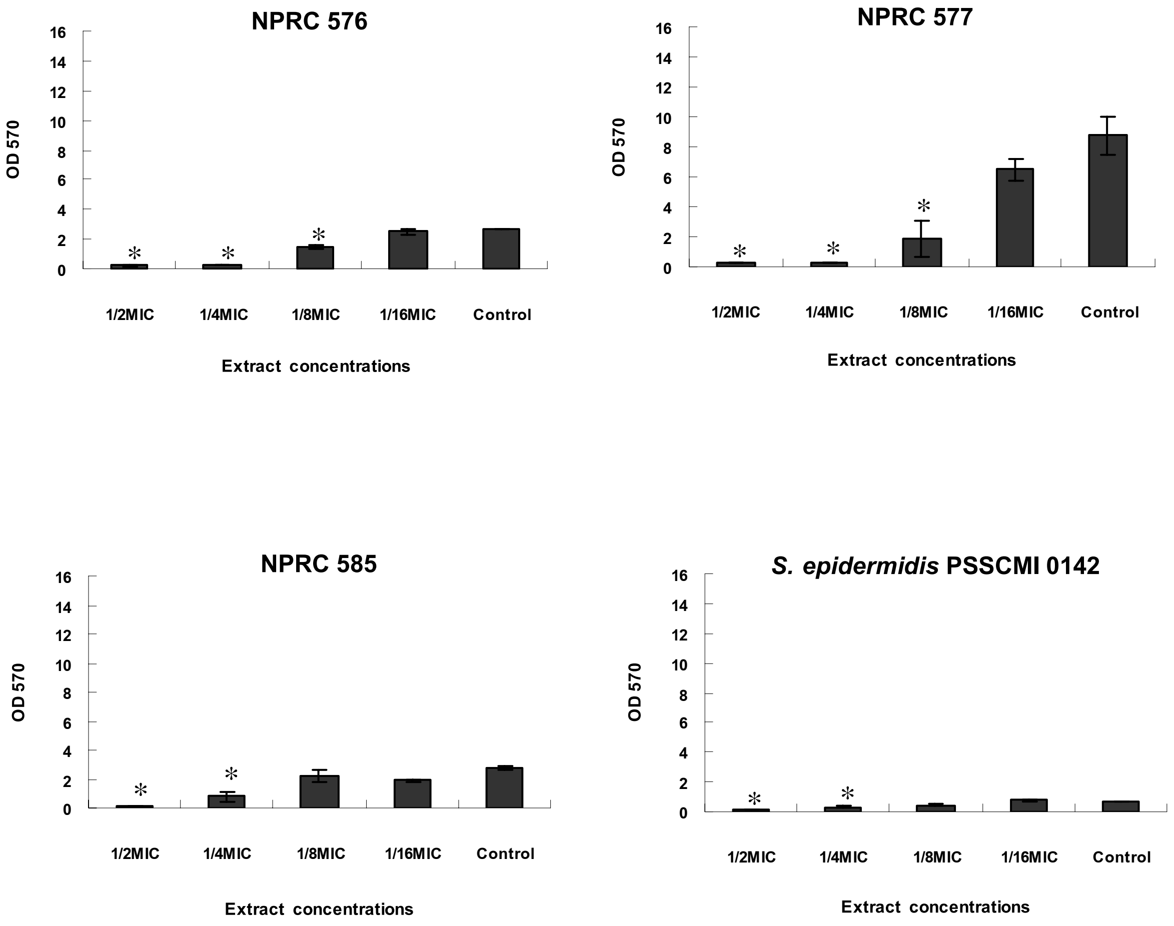


รูปที่ 10 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการไม่เปลี่ยนแปลงการสร้าง Biofilm ของ Coagulase-positive Staphylococci

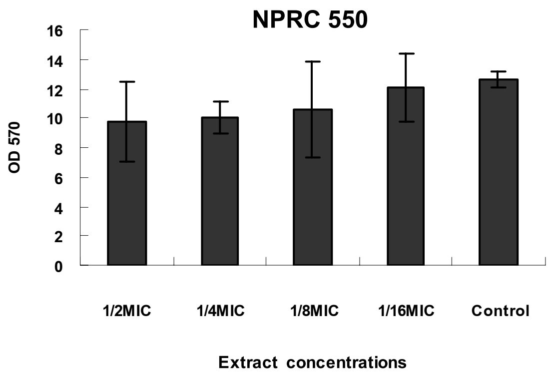
จากการศึกษาผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง biofilm ของเชื้อ coagulase-negative staphylococci 1□สายพันธุ์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 11 พบว่าสารสกัดจากใบกระทุสามารถลดการสร้าง biofilm ของเชื้อกลุ่มนี้ได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ การสร้าง biofilm ของสายพันธุ์ NPRC 526 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (p<□.□5) ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ในขณะที่ NPRC 522 NPRC 535 NPRC 564 NPRC 576 และ NPRC 577 สารสกัดที่ความเข้มข้น 1/2MIC 1/4MIC และ 1/8MIC สามารถทำให้การสร้าง biofilm ของสายพันธุ์เหล่านี้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (p<□.□5) ส่วน NPRC 511 NPRC 531 NPRC 585 และ *S. epidermidis* PSSCMI □142 เมื่อทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/2MIC และ 1/4MIC การสร้าง biofilm ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (p<□.□5) สำหรับ NPRC 55□ หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด การสร้าง biofilm มีแนวโน้มลดลง อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 12)



รูปที่ 11 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง Biofilm ลดลงของ Coagulase-negative staphylococci และ *Staphylococcus epidermidis* PSSCMI 142



รูปที่ 11 (ต่อ) ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง Biofilm ของ Coagulase- negative Staphylococci และ *Staphylococcus epidermidis* PSSCMI □142



รูปที่ 12 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการไม่เปลี่ยนแปลงการสร้าง Biofilm ของ Coagulase-negative Staphylococci

บทที่ 4

วิจารณ์

เชื้อ staphylococci เป็นเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้บริเวณผิวหนังของมนุษย์ ซึ่งการติดเชื้อกลุ่มนี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ผิวหนังหรือการติดเชื้อทั้งระบบ เช่น impetigo, furuncle, subcutaneous abscess, staphylococcal scalded skin syndrome และ toxic shock syndrome (Iwatsuki *et al*., 2□□6) นอกจากนี้ยังเป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากสิวที่พบบ่อยกลุ่มหนึ่งด้วย (Brook *et al*., 1995) ซึ่งการปล่อยกรด oleic acid ที่เกิดจากการสลายไขมันที่ผิวหนังโดยเอนไซม์ lipase ของเชื้อกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อการเกิดโรค (O'Leary and Weld, 1964) จากการแยกเชื้อ staphylococci จากผิวหน้าของผู้เป็นสิว 9□ราย พบว่าเป็น coagulase-positive staphylococci 64 สายพันธุ์ และ coagulase-negative staphylococci 85 สายพันธุ์ จะเห็นได้ว่าสายพันธุ์ที่แยกได้เป็น coagulase-negative มากกว่า coagulase-positive staphylococci มีรายงานว่านอกเหนือจาก *P. acnes* แล้ว เชื้อที่แยกได้จากสิวที่พบบ่อยที่สุดคือ *S. epidermidis* (Higaki, 2□□3) นอกจากนี้ Burkhart *et al.* (1999) รายงานว่า *S. epidermidis* เป็นเชื้อที่พบได้แพร่หลายในบริเวณ sebaceous follicle

การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรคส่งผลกระทบไปทั่วโลกทั้งต่อสุขภาพและเศรษฐกิจ ปัจจุบันนี้มีงานวิจัยหลายงานที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อกลุ่ม staphylococci มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้อยู่อย่างกว้างขวาง ได้แก่ ยากลุ่ม beta-lactams, glycopeptides, aminoglycosides, macrolides, tetracyclines, quinolones และกลุ่มอื่นๆ (Nishijima *et al*., 2□□□; Hoeger, 2□□4; Brown and Ngeno, 2□□7) ในการศึกษาครั้งนี้ เชื้อ staphylococci มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะทุกกลุ่มที่ทดสอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อมีการดื้อต่อยา clindamycin, erythromycin และ penicillin ซึ่งมีงานวิจัยที่รายงานการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ coagulase-negative staphylococci และ *S. aureus* ต่อยาทั้ง 3 ชนิดนี้ (Cove *et al*., 1998; Nishijima et al., 2□□□; Kim *et al*, 2□□4 Koksal *et al*., 2□□7) จากผลการทดลองในครั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อมีการดื้อต่อยา clindamycin และ erythromycin ค่อนข้างสูง ซึ่งยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นยาชนิดทาที่นิยมใช้ในการรักษาสิว (Toyoda and Morohashi, 1998; Kunynetz, 2□□2; Longshore and Hollandworth, 2□□3) นอกจากนี้พบว่าเชื้อที่แยกได้จากกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสิวจะไวต่อยา clindamycin และ erythromycin น้อยกว่าเชื้อที่แยกได้จากกลุ่มที่ไม่ใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา Harkaway *et al*. (1992) ได้ทำการศึกษาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ coagulase-negative staphylococci หลังจากการใช้ยารักษาสิวชนิดทา พบว่าหลังจากรักษาด้วย erythromycin 12 สัปดาห์ เชื้อ *S. epidermidis* เกือบทั้งหมดมีการดื้อต่อยา erythromycin และมีการดื้อต่อยา clindamycin และ tetracycline เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้มีรายงานว่า *S. epidermidis* มากกว่า 3□% ของสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบดื้อต่อยา clindamycin, erythromycin และ roxithromycin โดยหลังจากการรักษาสิวด้วยยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานพบว่า *S. epidermidis* มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น (Nishijima *et al*., 2□□□) coagulase-negative staphylococci ที่

แยกได้จากผิวหน้ามีการดื้อต่อยา erythromycin 87% และหลังจากการรักษาด้วย erythromycin gel 2% การดื้อต่อยา erythromycin เพิ่มขึ้นเป็น 98% (Mills *et al.*, 2□□2)

เนื่องจากเชื้อ staphylococci มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นนักวิจัยจำนวนมากจึงได้พยายามหาวิธีต่างๆ เพื่อใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจาก staphylococci ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากพืชมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ซึ่งสารสกัดจากพืชมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์โดยตรงไม่ว่าจะเป็นฤทธิ์ฆ่า (cidal) หรือยับยั้ง (static) ซึ่งขณะนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อจุลินทรีย์น้อยมาก จากผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ staphylococci ในครั้งนี้ พบว่าค่า MIC ของสารสกัดหยาบอยู่ในช่วง 32-1□24 µg/ml โดย MIC$_5$□ เท่ากับ 64 µg/ml ส่วน MIC $_9$□ อยู่ระหว่าง 256-512 µg/ml มีงานวิจัยหลายงานที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชในวงศ์ Myrtaceae สารสกัดจากเมล็ดของ *Syzygium aromaticum* มีค่า MIC เท่ากับ 781 µg/ml เมื่อทดสอบกับ MRSA (Abu-Shanab *et al.*, 2□□4) ในขณะที่สารสกัดจากใบของ *Eucalyptus globulus* มีค่า MIC$_5$□ และ MIC $_9$□ ต่อ *S. aureus* เท่ากับ 64 และ 128 µg/ml (Salari *et al.*, 2□□6) Djipa *et al.* (2□□□) พบว่า สารสกัดจากเปลือกของ *Syzygium jambos* สามารถยับยั้ง *S. aureus* สายพันธุ์ต่างๆได้โดยค่า MIC อยู่ระหว่าง 5□-1□□□µg/ml นอกจากนี้สารสกัดจากใบของ *Syzygium cumini* มีฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ซึ่ง MIC มีค่าเท่ากับ 2□□µg/ml (Oliveira *et al.*, 2□□7a) จะเห็นได้ว่าพืชในวงศ์ Myrtaceae หลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ staphylococci ซึ่งกระทุเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเชื้อกลุ่มนี้ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำสารสกัดหยาบเหล่านี้ไปทำการแยกสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์และสารบริสุทธิ์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารต่อเชื้อ staphylococci ต่อไป

สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ R4-R7 มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเชื้อ staphylococci ที่ทดสอบโดยค่า MIC และ MBC ที่ได้อยู่ระหว่าง 1-64 µg/ml ขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่ทดสอบ ซึ่งสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์หล่านี้สามารถให้ ค่า MIC น้อยกว่า MIC ของสารสกัดหยาบประมาณ 4-6□เท่า โดย fraction R5 สามารถลดค่า MIC ลงได้มากที่สุด รองลงมาคือ R6, R7 และ R4 ตามลำดับ Gibbons (2□□4) ได้แบ่งกลุ่มสารจากพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ staphylococci ออกเป็น 11 กลุ่ม ได้แก่ monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes, phenylpropanoids และ stilbenoids, simple phenols และ tropolones, flavonoids, Alkaloids Polyketides และ polyynes, sulfur containing products และ acylphloroglucinols) สารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตจากใบกระทุสามารถแยกได้สาร rhodomyrtone ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม acylphloroglucinols มีฤทธิ์ในการต้าน *E. coli* และ *S. aureus* (Salni *et al.*, 2□□2) มีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารในกลุ่ม acylphloroglucinols เช่น hyperforin ซึ่งเป็นสาร ที่แยกได้จาก *Hypericum perforatum* มีฤทธิ์ในการต้าน MRSA, MSSA และ *S. aureus* ATCC 25923 ที่ดีมากโดยค่า MIC อยู่ในช่วง □.1-1 µg/ml (Schempp *et al.*, 1999; Reichling *et al.*, 2□□1) นอกจากนี้ myrtucommulone และ semi myrtucommulone ที่แยกได้ จาก *Myrtus communis* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ staphylococci โดยค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 2 และ 64 µg/ml ตามลำดับ (Appendino *et al.*, 2□□2) สารกลุ่ม acylphloroglucinols ที่แยกได้จาก *Hypericum foliosum* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิดโดยค่า MIC อยู่ในช่วง 16-32 µg/ml (Gibbons *et al.*, 2□□5) เป็นที่

น่าสนใจว่าสาร rhodomyrtone ที่แยกได้จากใบกระทุในครั้งนี้มีประสิทธิภาพสูงในการต้าน *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* PSSCMI 0142, coagulase-positive staphylococci สายพันธุ์ NPRC 302 และ coagulase-negative staphylococci สายพันธุ์ NPRC 502 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.5 µg/ml ในขณะที่ค่า MIC ต่อ NPRC 580 เท่ากับ 1 µg/ml ซึ่งค่าที่ได้นี้ใกล้เคียงกับค่า MIC ของยา vancomycin มาก ถึงแม้ว่าค่า MIC ต่อ NPRC 348 จะมากกว่า 1 µg/ml คือมีค่า 8 µg/ml แต่เมื่อเทียบกับค่า MIC ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อสายพันธุ์นี้ ซึ่งเท่ากับ 500 µg/ml แล้ว จะเห็นว่า ค่า MIC ของ rhodomyrtone น้อยกว่า ค่า MIC ของสารสกัดหยาบประมาณ 60 เท่า จากผลการศึกษาที่ได้นี้ จึงน่าจะมีความเป็นไปได้ในการนำสาร rhodomyrtone และสารสกัดจากใบกระทุไปใช้เพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อจาก staphylococci ต่อไป

การใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารต้านจุลินทรีย์ในการรักษาโรคนั้น ไม่ได้ทดสอบเพียงฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อหรือยับยั้งเชื้อเท่านั้นแต่ยังรวมถึงการศึกษาผลของยาโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้น subMIC ต่อ virulence factors ต่างๆ ที่เชื้อปล่อยออกมาด้วย ซึ่งยาปฏิชีวนะสามารถที่จะมีผลทั้งลดและเพิ่มการสังเคราะห์และปลดปล่อย virulence factors (Bernardo *et al.*, 2004) ผลการคัดเลือกหาสายพันธุ์ ที่สร้างเอนไซม์ lipase และ protease ของเชื้อ staphylococci ทั้ง 2 กลุ่มแสดงให้เห็นว่า เชื้อที่แยกได้จากผิวหน้าของผู้เป็นสิวนี้สามารถสร้างเอนไซม์ lipase ได้มากกว่าเอนไซม์ protease และในขณะเดียวกันเชื้อกลุ่ม coagulase-negative staphylococci มีจำนวนสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ได้มากกว่าเชื้อ coagulase-positive staphylococci ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าเอนไซม์ lipase จาก staphylococci มีผลต่อการเกิดสิว (Reisner and Puhvel, 1969) ซึ่ง *S. epidermidis* เป็นเชื้อที่พบได้แพร่หลายในบริเวณ sebaceous follicle เชื้อจะสร้าง lipase ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ (Burkhart *et al.*, 1999) การสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายไขมันโดย *S. epidermidis* และอาจรวมทั้ง *S. aureus* น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าเอนไซม์ lipase มีความสำคัญต่อเชื้อเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตในบริเวณผิวหนังซึ่งเต็มไปด้วยไขมัน (Longshaw *et al.*, 2000)

จากการทดลองผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้างเอนไซม์ lipase และ protease พบว่าสารสกัดจากใบกระทุที่ความเข้มข้น subMIC มีผลต่อการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นและในขณะเดียวกันก็มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ด้วย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์นี้เป็นการเปลี่ยนแปลงเพียงบางส่วน (เพิ่มขึ้นหรือลดลง $\leq$ 50% จากชุดควบคุม) มีการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทดสอบผลของสารต้านแบคทีเรียที่ความเข้มข้น subMIC ต่อการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ สารสกัดด้วยเอทิลอีเทอร์ จาก *Helichrysum italicum* ที่ความเข้มข้น 1/2MIC สามารถยับยั้งเอนไซม์ coagulase, DNAse, thermonuclease และ lipase ของ *S. aureus* ATCC 6538P, MRSA และ MSSA ได้ ในขณะที่ 1/4MIC สามารถยับยั้งเพียงเอนไซม์ DNAse และ thermonuclease (Nostro *et al.*, 2001a) นอกจากนี้ Nostro *et al.* (2001b) พบว่าสารสกัดจาก *Nepeta cataria* สามารถยับยั้งเอนไซม์ DNAse, thermonuclease, และ lipase ได้ แต่ไม่มีผลต่อเอนไซม์ coagulase ของ MRSA และ MSSA สารสกัดจาก propolis ที่ความเข้มข้น 1/2MIC มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ coagulase และ lipase โดยการสร้างเอนไซม์ lipase ของ *S. aureus*, *S epidermidis*, *S. homonis*, และ *S. warnerii* ลดลง 17-50% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

(Scazzocchio *et al.*, 2006) การศึกษาของ Edwards-Jones and Foster (2002) พบว่า Silver sulphadiazine ไม่สามารถทำให้การสร้างเอนไซม์ protease ของ *S. aureus* 2 สายพันธุ์ที่ทดสอบลดลงอย่างมีนัยสำคัญได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุมหลังจาก 24 ชั่วโมง นอกจากนี้การศึกษาผลของ tea tree oil ต่อการสร้างเอนไซม์ protease ของ *S. aureus* 6 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ protease ได้อย่างสมบูรณ์ โดย 3 สายพันธุ์ การสร้างเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนอีก 3 สายพันธุ์ การสร้างเอนไซม์ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Hammer *et al.*, 2005) มีรายงานก่อนหน้านี้ว่า ยาปฏิชีวนะกลุ่มที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่น clindamycin, erythromycin และ linezolid สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีน รวมทั้ง virulence factors ต่างๆ เช่น protease, enterotoxin, autolysin และ haemolysin (Sofer *et al.*, 1999; Herbert *et al.*, 2001; Bernardo *et al.*, 2004) ยาปฏิชีวนะกลุ่ม beta-lactam ซึ่งมีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ เช่น methicillin ที่ความเข้มข้น subMIC มีผลกระตุ้นให้มีการสร้าง alpha-toxin และการสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้น (Doss *et al.*, 1993; Ohlsen *et al.*, 1998)นอกจากนี้จากการผลการทดลองพบว่ามีเชื้อบางสายพันธุ์ที่การเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์หลังจากทดสอบด้วยสารสกัดมีการเปลี่ยนแปลงทั้ง 2 แบบคือ เพิ่มขึ้นและลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดที่ใช้ทดสอบเป็นสารสกัดหยาบซึ่งยังไม่ทราบองค์ประกอบและสัดส่วนของสารทั้งหมดที่ชัดเจนและแน่นอน ซึ่งอาจทำให้มีผลต่อการกระตุ้นหรือยับยั้งการสร้างเอนไซม์ได้ นอกจากนี้อาจขึ้นอยู่กับความแตกต่างของเชื้อที่แยกได้แต่ละสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ

virulence factor ที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของเชื้อกลุ่ม staphylococci คือ biofilm ซึ่ง biofilm เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียซึ่งเกาะติดกับพื้นผิวสิ่งแวดล้อม
จุลินทรีย์เหล่านี้จะอยู่ภายใน extracellular polysaccharide ที่มันหลั่งออกมาหลังจากเกาะติดกับพื้นผิว (Burkhart and Burkhart, 2003) ทำให้สามารถทนต่อสารต้านจุลินทรีย์ได้ในระดับความเข้มข้นสูง ซึ่งส่งผลให้การรักษาโรคติดเชื้อเป็นไปได้ยาก และการรักษาจะยุ่งยากขึ้นเมื่อเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคนั้นเกิดการดื้อยาหลายชนิด (Frank and Patel, 2007) ดังนั้นจึงได้มีความสนใจในการหาทางเลือกหรือสารอื่นๆที่มีประสิทธิภาพในการต้าน biofilm ซึ่งสารจากธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากพืชเป็นทางเลือกที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการกำจัดการแพร่กระจายของจุลินทรีย์ที่ยากต่อการรักษาเหล่านี้ จากการคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง biofilm ของเชื้อ staphylococci ทั้ง 2 กลุ่มที่แยกได้จากผิวหน้าของผู้เป็นสิว พบว่าเชื้อกลุ่ม coagulase-positive staphylococci ส่วนใหญ่ (60.9%) มีความสามารถในการเกาะติดน้อย ในขณะที่ coagulase-negative staphylococci เชื้อมีความสามารถในการเกาะติดระดับปานกลาง 36.5% และระดับมาก 25.9% ซึ่งมากกว่า coagulase-positive staphylococci ความสามารถในการสร้าง biofilm เป็น virulence factor ที่สำคัญของเชื้อกลุ่ม staphylococci ทำให้เชื้ออยู่รอดใน host ได้นานขึ้น เนื่องจากสามารถหลบหลีกกลไกการป้องกันของ host และเชื้อสามารถทนต่อสารต้านจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นสูงได้ (Oliveira *et al.*, 2006) นอกจากนี้ Vuong and Otto (2002) รายงานว่า โดยทั่วไปแล้ว *S. epidermidis* จะไม่สร้าง virulence factor ต่างๆ เช่น ท็อกซินหรือเอนไซม์มากเท่า *S. aureus* ซึ่งความสามารถในการก่อโรคที่สำคัญของ *S. epidermidis* คือการเกาะติดกับพื้นผิวเติบโตเพิ่มจำนวนสร้างสารที่หลั่งออกมาปกคลุมเพื่อป้องกันเซลล์ (biofilm)

จากการทดลองผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการสร้าง biofilm จะเห็นว่า สารสกัดจากใบกระทุมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง biofilm ทั้งกลุ่ม coagulase-positive staphylococci และ coagulase-negative staphylococci โดยเชื้อส่วนใหญ่มีแนวโน้มในการสร้าง biofilm ลดลง มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่การสร้าง biofilm เพิ่มขึ้นหรือไม่มีผลต่อการสร้าง biofilm ของเชื้อ มีรายงานการใช้สารต้านจุลินทรีย์ต่างๆในการยับยั้ง biofilm Perez-Giraldo *et al.* (2□□3) พบว่าสาร allicin จาก *Allium sativum* ที่ความเข้มข้น subMIC สามารถยับยั้งการสร้าง biofilm ของ *S. epidermidis* ได้ การใช้ Polytoxinol™ ซึ่งเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จาก *Eucalyptus globulus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus* sp., *Syzygium aromaticum* และกลุ่ม citrus, butylated hydroxytoluene, triclosan และ 95% ethanol สามารถยับยั้งการสร้าง biofilm ของ coagulase-negative staphylococci ได้เช่นกัน (Al-Shuneigat *et al.*, 2□□5) มีรายงานว่า oregano, carvacrol และ thymol สามารถลดการสร้าง biofilm ของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ลงได้ ที่ความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC, และ 1/8MIC (Nostro *et al.*, 2□□7) Kuzma *et al.* (2□□7) พบว่า Salvipisone จาก *Salvia sclarea* มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นสารต้าน biofilm ของ staphylococci ที่ดื้อยา ในขณะที่มีการศึกษาผลของสารสกัดจาก tea tree oil ต่อเชื้อ *S. aureus* พบว่าเชื้อสายพันธุ์ต่างๆที่ทดสอบ มีการตอบสนองต่อ tea tree oil 3 รูปแบบคือ ไม่มีผลต่อการสร้าง biofilm มีผลทำให้การสร้าง biofilm ลดลง และมีผลทำให้การสร้าง biofilm เพิ่มขึ้น (Hammer *et al.*, 2□□5) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้การสร้าง biofilm ที่ลดลงอาจเนื่องมาจากสารสกัดมีฤทธิ์ไปยับยั้งปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการสร้าง biofilm (Hammer *et al.*, 2□□5) ซึ่งอาจเริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการเกาะติด การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การหลั่ง extracellular polysaccharide การสร้าง fibrin fiber และ glycocalyx (Katsuyama *et al.*, 2□□5; Musk and Hergenrother, 2□□6) ในทางตรงกันข้าม เชื้อที่มีการสร้าง biofilm เพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากสารหรือสภาวะต่างๆที่เชื้อมีชีวิตอยู่ก่อนที่จะนำมาทดสอบ (Hammer *et al.*, 2□□5) สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและสารต่างๆ เช่น detergent, urea, ethanol อุณหภูมิสูงหรือความดัน ต่างก็มีผลชักนำให้ *Staphylococcus* spp. มีการสร้าง biofilm เพิ่มขึ้นได้ (Rachid *et al.*, 2□□□; Knobloch *et al.*, 2□□2) นอกจากนี้มีรายงานว่า ที่ความเข้มข้น subMIC ยาปฏิชีวนะสามารถที่จะกระตุ้นหรือยับยั้งการสร้าง biofilm ได้ (Dunne *et al.*, 199□; Rachid *et al.*, 2□□□; Cerca *et al.*, 2□□5) ซึ่งการกระตุ้นหรือการยับยั้งนี้ขึ้นกับแต่ละสายพันธุ์ การรวมกันของสารต้านจุลินทรีย์ในขณะศึกษา (Frank and Patel, 2□□7) ยากลุ่มที่มีผลต่อ ribosome เช่น tetracycline และ quinupristin-dalfopristin ที่ความเข้มข้น subMIC สามารถกระตุ้นให้เชื้อสร้าง biofilm เพิ่มขึ้นได้ (Rachid *et al.*, 2□□□) ในทางกลับกันยากลุ่ม beta-lactam เช่น dicloxacillin สามารถลด biofilm ของ *S. epidermidis* และ *S. haemolyticus* ได้ (Cerca *et al.*, 2□□5) นอกจากนี้ (Frank and Patel, 2□□7) รายงานว่า nafcillin ที่ความเข้มข้น subMIC สามารถกระตุ้น *S. lugdunensis* สายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่ทดสอบให้สร้าง biofilm เพิ่มขึ้นได้ ในขณะที่ tetracycline และ linezolid ทำให้การสร้าง biofilm ลดลง 93% และ 8□% ของสายพันธุ์ที่ทดสอบตามลำดับ จากการทดลองนี้พบว่าสารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกได้คือ Rhodomyrtone ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม acylphlorogucinols เช่นเดียวกับการศึกษาของ Salni *et al.*, 2□□2 กลไกในการออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์ของสารกลุ่มนี้ยังไม่มีรายงานแน่ชัดแต่จากผลการศึกษาครั้งนี้คิดว่าสารกลุ่มนี้น่าจะมีฤทธิ์ฆ่า

(cidal) มากกว่ายับยั้ง (static) เนื่องจากค่า MBC เท่ากับ MIC หรือแตกต่างกันไม่เกิน 4 เท่า (Lorian, 1996) นอกจากสารในกลุ่ม acylphloroglucinols ที่พบในพืชกลุ่มนี้แล้วมีรายงานการค้นพบสารกลุ่มอื่นก่อนหน้านี้ ได้แก่ triterpenoids (Hui *et al.*,1975; Hui and Li, 1976), tannins (Ai *et al.*, 1997; Hou *et al.*, 1998), ellagitannin และ flavone glycoside (Hou *et al.*,1999) ซึ่งสารเหล่านี้มีกลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์จุลินทรีย์แตกต่างกันไป

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อเอนไซม์ และ biofilm ใช้สารสกัดหยาบในการทดสอบซึ่งยังไม่ทราบองค์ประกอบและสัดส่วนของสารทั้งหมดที่ชัดเจนและแน่นอน กลไกการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่ม tannins เกี่ยวข้องกับการทำให้ adhesin, เอนไซม์ หรือ โปรตีนเสียสภาพ หรือ สามารถจับกับสารพวก polysaccharide (Cowan, 1999) จากผลการศึกษาครั้งนี้สารกลุ่ม tannins จึงน่าจะมีบทบาทต่อการยับยั้งการสร้าง biofilm ของเชื้อในขั้นตอนต่าง ๆซึ่งเกี่ยวข้องกับสารพวกโปรตีนและ polysaccharide นอกจากสารกลุ่ม tannins แล้วการศึกษาฤทธิ์ของ carvacrol ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม terpenoids พบว่า carvacrol สามารถยับยั้งการสร้าง biofilm ในระยะแรกของการสร้าง ซึ่งนำไปสู่การยับยั้งการสร้าง biofilm matrix ซึ่ง carvacrol ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนแต่แบคทีเรียยังคงสามารถที่จะเจริญต่อไปได้ (Knowles *et al.*, 2005) นอกจากนี้ carvacrol และ thymol สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ผิวเซลล์ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงผิวเซลล์แบคทีเรียและส่งผลต่อการเกาะติด polystyrene microtitre plate (Nostro *et al.*, 2007) Cowan (1999) รายงานว่ากลไกการออกฤทธิ์สารในกลุ่ม terpenoids เกี่ยวข้องกับการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ จากผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบกระทุมีฤทธิ์ต้านเชื้อ staphylococci ที่ดีมาก นอกจากนี้ยังสามารถลดการสร้าง biofilm ของเชื้อส่วนใหญ่ที่ทดสอบ จึงน่าจะมีความเป็นไปได้ในการนำสาร rhodomyrtone และสารสกัดจากใบกระทุทำการศึกษาต่อไปเพื่อใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อจาก staphylococci

บทที่ 5

สรุป

1. เชื้อ coagulase-positive และ coagulase-negative staphylococci ที่แยกได้จากสิวส่วนใหญ่ดื้อต่อยา clindamycin, erythromycin, และ penicillin
2. สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากใบกระทุมีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ staphylococci ที่แยกได้จากสิว
3. สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์และสารบริสุทธิ์จากใบกระทุมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ staphylococci ที่แยกได้จากสิว
4. สารสกัดหยาบจากใบกระทุมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ staphylococci ที่แยกได้จากสิว 4 แบบ คือ การสร้างเอนไซม์ลดลง เพิ่มขึ้น ทั้งลดลงและเพิ่มขึ้น และไม่มีการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์
5. สารสกัดหยาบจากใบกระทุมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการสร้าง biofilm ของเชื้อ staphylococci ที่แยกได้จากสิว 3 แบบ คือ ทำให้การสร้าง biofilm ลดลง ทำให้การสร้าง biofilm เพิ่มขึ้น และไม่มีผลต่อการสร้าง biofilm โดยสามารถยั้งยั้งการสร้าง biofilm ของสายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่ทดสอบได้

รายการเอกสารอ้างอิง

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กองคุ้มครองพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าตามอนุสัญญา, 2548. คู่มือศึกษาพันธุ์พืชป่า เล่มที่ 2. ชุมนุมการเกษตรแห่งประเทศไทย: กรุงเทพฯ

ปรียา กุลละวณิชย์ และประวิตร พิศาลบุตร. 2548. ตำราโรคผิวหนังในเวชปฏิบัติปัจจุบัน (Dermatology 2□1□). พิมพ์ครั้งที่ 1. โฮลิสติก พับลิชชิ่ง: กรุงเทพฯ

สถาบันโรคผิวหนัง. 255□. สถิติโรคของสถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. เข้าถึงได้จาก http://inderm.go.th/nuke_8□2/modules.php (วันที่สืบค้น 2 พฤษภาคม 2551)

อาอีเซาะส์ ยานยา. 255□. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของใบโทะ. โครงงานทางเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.

Abu-Shanab, B., Adwan, G., Abu-Safiya, D., Jarrar, N. and Adwan, K. 2□□4. Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Utilized in Popular Medicine in Palestine. Turk. J. Biol. 28: 99-1□2.

Al-Shuneigat, J., Cox, S.D. and Markham, J.L. 2□□5. Effects of a topical essential oil-containing formulation on biofilm-forming coagulase-negative staphylococci. Lett. Appl. Microbiol. 41: 52-55.

Appendino, G., Bianchi, F., Minassi, A., Sterner, O., Ballero, M. and Gibbons, S. 2□□2. Oligomeric acylphloroglucinols from myrtle (*Myrtus communis*). J. Nat. Prod. 65: 334-338.

Archer, G.L. 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. Clin. Infect. Dis. 26: 1179-1181.

Arslan, S. and Ozkardes, F. 2□□7. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1□2: 29-33.

Babayi, H., Kolo, I., Okogun, J.I. and Ijah, U.J.J. 2004. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. BIOKEMISTRI. 16: 106-111.

Bashir, A., Mujahid, T.Y. and Jehan, N. 2007. Antibiotic resistance profile: isolation and characterization of clinical isolates of staphylococci from patients with community-acquired skin infections. Pak. J. Pharm. Sci. 20: 299-304.

Bernardo, K., Pakulat, N., Fleer, S., Schnaith, A., Utermohlen, O., Krut, O., Muller, S. and Kronke, M. 2004. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 546-555.

Brady, A., Loughlin, R., Gilpin, D., Kearney, P. and Tunney, M. 2006. In vitro activity of tea-tree oil against clinical skin isolates of meticillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci growing planktonically and as biofilms. J. Med. Microbiol. 55: 1375-1380.

Brook, I., Frazier, E.H., Cox, M.E. and Yeager, J.K. 1995. The aerobic and anaerobic microbiology of pustular acne lesions. Anaerobe. 1: 305-307.

Brooks, G.F., Butel, J.S. and Ornston, L.M. 1995. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 20th ed. A Simon and Schuster company: Connecticut.

Brown, P.D. and Ngeno, C. 2007. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from hospital and community sources in southern Jamaica. Int. J. Infect. Dis. 11: 220-225.

Bruggemann, H., Henne, A., Hoster, F., Liesegang, H., Wiezer, A., Strittmatter, A., Hujer, S., Durre, P. and Gottschalk, G. 2004. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. Science. 305: 671-673.

Burkhart, C.G., Burkhart, C.N. and Lehmann, P.F. 1999. Acne: a review of immunologic and microbiologic factors. Postgrad. Med. J. 75: 328-331.

Burkhart, C.N. and Burkhart, C.G. 2003. Microbiology's principle of biofilms as a major factor in the pathogenesis of acne vulgaris. Int. J. Dermatol. 42: 925-927.

Celiktas, O., Kocabas, E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T. and Baser, K. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry. 100: 553-559.

Cerca, N., Martins, S., Sillankorva, S., Jefferson, K.K., Pier, G.B., Oliveira, R. and Azeredo, J. 2005. Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 71: 8677-8682.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006a) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, Ninth edition, CLSI Document M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006b) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard, Seventh edition, CLSI Document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Chomnawang, M.T., Surassmo, S., Nukoolkarn, V.S. and Gritsanapan, W. 2005. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. J. Ethnopharmacol. 101: 330-333.

Cove, J.H., Eady, E.A. and Cunliffe, W.J. 1990. Skin carriage of antibiotic-resistant coagulase-negative staphylococci in untreated subjects. J. Antimicrob. Chemother. 25: 459-469.

Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12: 564-582.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. and Penades, J.R. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J. Bacteriol. 183: 2888-2896.

Cunliffe, W.J. 1980. Acne vulgaris: pathogenesis and treatment. Br. Med. J. 280: 1394-1396.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. and Penades, J. R. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J. Bacteriol. 183: 2888-2896.

Djipa, C.D., Delmee, M. and Quetin-Leclercq, J. 2000. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) alston (Myrtaceae). J. Ethnopharmacol. 71: 307-313.

Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8: 881-890.

Doss, S.A., Tillotson, G.S. and Amyes, S.G. 1993. Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotics on the virulence of *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Bacteriol. 75: 123- 128.

Dréno, B. and Khammari, A. 2004. Acne – Inflammatory affection of pilosebaceous follicle:The most frequent cutaneous illness of modern time. Business briefing:European Phamacotherapy. 130-135.

Dreno, B. and Poli, F. 2003. Epidemiology of acne. Dermatology. 206: 7-10.

Dubin, G. 2002. Extracellular proteases of *Staphylococcus* spp. Biol. Chem. 383: 1075-1086.

Dunne, W.M., Jr. 1990. Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin or cefamandole on biofilm production by coagulase-negative staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 390-393.

Edwards-Jones, V. and Foster, H.A. 2002. Effects of silver sulphadiazine on the production of exoproteins by *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 51: 50-55.

Eiff, C., Peters, G. and Heilmann, C. 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. The Lancet. 2: 667-685.

Ekiel, A., Kapp-Burzynska, Z., Rogala-Zawada, D., Klaptocz, B. and Wilk, I. 1995. Susceptibility to antibiotics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pus specimens obtained from patients referred for autovaccine therapy. Med. Dosw. Mikrobiol. 47: 127-132.

Falcocchio, S., Ruiz, C., Pastor, F.I.J., Saso, L. and Diaz, P. 2006. *Propionibacterium acnes* GehA lipase, an enzyme involved in acne development, can be successfully inhibited by defined natural substances. J. Mol. Catal., B Enzym. 40: 132-137.

Federman, D.G. and Kirsner, R.S. 2000. Acne vulgaris: pathogenesis and therapeutic approach. Am. J. Manag. Care. 6: 78-87.

Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. 2002. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 11th ed. Mosby: Missouri.

Frank, K.L. and Patel, R. 2007. Activity of sodium metabisulfite against planktonic and biofilm *Staphylococcus* species. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 57: 355-359.

Gibbons, S. 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. Nat. Prod. Rep. 21: 263-277.

Gibbons, S., Moser, E., Hausmann, S., Stavri, M., Smith, E. and Clennett, C. 2005. An anti-staphylococcal acylphloroglucinol from *Hypericum foliosum*. Phytochemistry. 66: 1472- 1475.

Gomber, C. and Saxena, S. 2007. Anti-Staphylococcal potential of *Callistemon rigidus*. Cent. Eur. J. Microbiol. 2: 79-88.

Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. 2005. Effects of Tea Tree Oil on *Staphylococcus aureus* Virulence Factors. Rural Industries Research and Development Corporation.

Harkaway, K.S., McGinley, K.J., Foglia, A.N., Lee, W.L., Fried, F., Shalita, A.R. and Leyden, J.J. 1992. Antibiotic resistance patterns in coagulase-negative staphylococci after treatment with topical erythromycin, benzoyl peroxide, and combination therapy. Br. J. Dermatol. 126: 586-590.

Herbert, S., Barry, P. and Novick, R.P. 2001. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 69: 2996-3003.

Higaki, S. 2003. Lipase inhibitors for the treatment of acne. J. Mol. Catal., B Enzym. 22: 377–384.

Higaki, S., Morimatsu, S., Morohashi, M. and Yamagishi, T. 1998. The anti-lipase activity of shiunko on *Propionibacterium acnes*. Int. J. Antimicrob. Agents. 10: 251–252.

Higaki, S., Morimatsu, S., Morohashi, M., Yamagishi, T. and Hasegawa, Y. 1997. Susceptibility of *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to 10 Kampo formulations. J. Int. Med. Res. 25: 318- 324.

Ho, P.L., Chuang, S.K., Choi, Y.F., Lee, R.A., Lit, A.C., Ng, T.K., Que, T.L., Shek, K.C., Tong, H.K., Tse, C.W., Tung, W.K. and Yung, R.W. 2008. Community-associated methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: skin and soft tissue infections in Hong Kong. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. Doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.12.015

Hoeger, P.H. 2004. Antimicrobial susceptibility of skin-colonizing *S. aureus* strains in children with atopic dermatitis. Pediatr. Allergy Immunol. 15: 474-477.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams & Wilkins: Maryland.

Hou, A.J., Wu, Y.J. and Liu, Y.Z. 1999. Flavones glycosides and ellagitannin from downy rosemyrtle (*Rhodomyrtus tomentosa)*. Zhongcaoyao. 30: 645-648.

Hui, W.H. and Li, M.M. 1976. Two new triterpenoids from *Rhodomyrtus tomentosa*. Phytochemistry. 15: 1741-1743.

Hui, W.H., Li, M.M. and Luk, K. 1975. Triterpenoids and steroids from *Rhodomyrtus tomentosa*. Phytochemistry. 14: 833-834.

Iwatsuki, K., Yamasaki, O., Morizane, S. and Oono, T. 2006. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. J. Dermatol. Sci. 42: 203-214.

Jabra-Rizk, M.A., Meiller, T.F., James, C.E. and Shirtliff, M.E. 2006. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. Antimicrob. Agents Chemother. 50: 1463-1469.

Jain, A. and Basal, E. 2003. Inhibition of *Propionibacterium acnes*-induced mediators of inflammation by Indian herbs. Phytomedicine. 10: 34-38.

Karaolis, D.K., Rashid, M.H., Chythanya, R., Luo, W., Hyodo, M. and Hayakawa, Y. 2005. c-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. Antimicrob. Agents Chemother. 49: 1029-1038.

Katsuyama, M., Ichikawa, H., Ogawa, S. and Ikezawa, Z. 2005. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. J. Dermatol. Sci. 38: 197-205.

Kim, H.B., Jang, H.C., Nam, H.J., Lee, Y.S., Kim, B.S., Park, W.B., Lee, K.D., Choi, Y.J., Park, S.W., Oh, M.D., Kim, E.C. and Choe, K.W. 2004. In vitro activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary-care hospitals in Korea: a nationwide survey. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 1124- 1127.

Knobloch, J.K.M., Horstkotte, M.A., Rohde, H., Kaulfers, P.M. and Mack, D. 2002. Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. J. Antimicrob. Chemother. 49: 683-687.

Knowles, J.R., Roller, S., Murray, D.B. and Naidu, A.S. 2005. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Appl. Environ. Microbiol. 71: 797-803.

Koksal, F., Yasar, H. and Samasti, M. 2007. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. Microbiol. Res. doi:10.1016/j.micres.2007.03.014.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. and Win Jr, W.C. 1997. Color Atlas and Textbook Diagnostic Microbiology. 5th ed. JB Lippincott: Philadelphia.

Kunynetz, R. 2002. Systemic antibiotic therapy for acne: a review. Skin Therapy Lett. 7: 3-7.

Kuzma, L., Rozalski, M., Walencka, E., Rozalska, B. and Wysokinska, H. 2007. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. Phytomedicine. 14: 31-35.

Leeming, P., Holland, T. and Cunliffe, J. 1988. The microbial colonization of inflamed ache vulgaris lesions. J. Dermatol. 118: 203-208.

Lertsatitthanakorn, P., Taweechaisupapong, S.A., C. and Khunkitti, W. 2006. In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. Int. J. Aromather. 16: 43-49.

Liu, Y.Z., Hou, A.J., Ji, C.R. and Wu, Y.J. 1997. A new C-glycosidic hydrolyzable tannin from *Rhodomyrtus tomentosa*. Chinese Chemical Letters. 8: 39-40.

Liu, Y.Z., Hou, A.J., Ji, C.R. and Wu, Y.J. 1998. Isolation and structure of hydrolysable tannins from *Rhodomyrtus tomentosa*. Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa. 10: 14-19.

Longshaw, C.M., Farrell, A.M., Wright, J.D. and Holland, K.T. 2000. Identification of a second lipase gene, gehD, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases. Microbiology. 146: 1419-1427.

Longshore, S.J. and Hollandsworth, K. 2003. Acne vulgaris: one treatment does not fit all. Cleve. Clin. J. Med. 70: 670-678.

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

Loveckova, Y. and Havlikova, I. 2002. A microbiological approach to acne vulgaris. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 146: 29-32.

MacFaddin, J.F. 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3th ed. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia.

Mah, T.F. and O'Toole, G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. 9: 34-39.

Majeed, M. and Prakash, L. 2004. Fighting acne and more:effective natural approaches to skin care. Cosmetics and toiletries manufature worldwide. 215-219.

Mills, O., Jr., Thornsberry, C., Cardin, C.W., Smiles, K.A. and Leyden, J.J. 2002. Bacterial resistance and therapeutic outcome following three months of topical acne therapy with 2% erythromycin gel versus its vehicle. Acta. Derm. Venereol. 82: 260-265.

Molina-Salinas, G.M., Perez-Lopez, A., Becerril-Montes, P., Salazar-Aranda, R., Said-Fernandez, S. and de Torres, N.W. 2007. Evaluation of the flora of northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. J. Ethnopharmacol. 109: 435- 441.

Musk, D.J. and Hergenrother, P.J. 2006. Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: effective compounds and promising targets. Curr. Med. Chem. 13: 2163-2177.

Nascimento, G., Locatelli, J., Freitas, P. and Silva, G. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistance bacteria. Braz. J. Microbiol. 31: 247-256.

Nishijima, S., Kurokawa, I., Katoh, N. and Watanabe, K. 2000. The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions. J. Dermatol. 27: 318-323.

Nostro, A., Bisignano, G., Cannatelli, M.A., Crisafi, G., Paola Germano, M. and Alonzo, V. 2001a. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Antimicrob Agents. 17: 517-520.

Nostro, A., Cannatelli, M.A., Crisafi, G. and Alonzo, V. 2001b. The effect of *Nepeta cataria* extract on adherence and enzyme production of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Antimicrob. Agents. 18: 583-585.

Nostro, A., Roccaro, A.S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., Cioni, P.L., Procopio, F. and Blanco, A.R. 2007. Effects of oregano, carvacrol and

thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J. Med. Microbiol. 56: 519-523.

Noyon, V., Legallou, F., Richet, H. and Dreno, B. 1998. The resistance of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* to cyclines. The Research and Study Group on Acne. Ann. Dermatol. Venereol. 125: 885-887.

Obiazi, H. A. K., Nmorsi, O. P. G., Ekundayo, A.O. and Ukwandu, N.C.D. 2□□7. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* from clinical isolates grown at 37^{o}C and 44^{o}C from Irrua, Nigeria. Afr. J. Microbial. Res. 1□ 57-6□

O'Leary, W.M. and Weld, J.T. 1964. Lipolytic Activities of *Staphylococcus aureus*. I. Nature of the Enzyme Producing Free Fatty Acids from Plasma Lipids. J. Bacteriol. 88: 1356-1363.

Oakley, A.M.M. 2□□5. Acne. nzfp Continuing Medical Education. 32: 4□□-4□3.

Ohlsen, K., Ziebuhr, W., Koller, K.P., Hell, W., Wichelhaus, T.A. and Hacker, J. 1998. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2817-2823.

Ojo, O.O., Ajayi, A.O. and Anibijuwon, II. 2□□7. Antibacterial potency of methanol extracts of lower plants. J. Zhejiang Univ. Sci. *B.* 8: 189-191.

Oleksy, A., Golonka, E., Banbula, A., Szmyd, G., Moon, J., Kubica, M., Greenbaum, D., Bogyo, M., Foster, T.J., Travis, J. and Potempa, J. 2□□4. Growth phase-dependent production of a cell wall-associated elastinolytic cysteine proteinase by *Staphylococcus epidermidis*. Biol. Chem. 385: 525-535.

Oliveira, G.F., Furtado, N.A., Filho, A.A., Martins, C.H., Bastos, J.K., Cunha, W.R. and Silva, M.L. 2□□7. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. Braz. J. Microbiol. 38: 381-384.

Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L.M., Bernardo, F. and Vilela, C.L. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. Vet. Microbiol. 118: 133-140.

Perez-Giraldo, C., Cruz-Villalon, G., Sanchez-Silos, R., Martinez-Rubio, R., Blanco, M.T. and Gomez-Garcia, A.C. 2003. In vitro activity of allicin against *Staphylococcus epidermidis* and influence of subinhibitory concentrations on biofilm formation. J. Appl. Microbiol. 95: 709-711.

Pichette, A., Larouche, P.L., Lebrun, M. and Legault, J. 2006. Composition and antibacterial activity of Abies balsamea essential oil. Phytother. Res. 20: 371-373.

Poiata, A., Tuchilus, C., Ambarus, A., Teodor, A., Teodorescu, I., Luca, V. and Buiuc, D. 2006. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from colonized hospital personnel. Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. 110: 723-726.

Projan, S. and Novick, R. 1997. The molecular basis of pathogenicity. In The Staphylococci in human disease. Churchill Livingstone: New York.

Purvis, D., Robinson, E., Merry, S. and Watson, P. 2006. Acne, anxiety, depression and suicide in teenagers: a cross-sectional survey of New Zealand secondary school students. J. Paediatr. Child Health. 42: 793-796.

Qadan, F., Thewaini, A.J., Ali, D.A., Afifi, R., Elkhawad, A. and Matalka, K.Z. 2005. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms. Am. J. Chin. Med. 33: 197-204.

Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J. and Ziebuhr, W. 2000. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 3357-3363.

Ramage, G., Tunney, M.M., Patrick, S., Gorman, S.P. and Nixon, J.R. 2003. Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. Biomaterials. 24: 3221-3227.

Randrianirina, F., Soares, J.L., Ratsima, E., Carod, J.F., Combe, P., Grosjean, P., Richard, V. and Talarmin, A. 2007. In vitro activities of 18 antimicrobial agents against

Staphylococcus aureus isolates from the Institut Pasteur of Madagascar. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. doi:10.1186/1476-0711-6-5

Reichling, J., Weseler, A. and Saller, R. 2001. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. Pharmacopsychiatry. 34 Suppl 1: S116-118.

Reisner, R.M. and Puhvel, M. 1969. Lipolytic activity of *Staphylococcus albus*. J. Invest. Dermatol. 53: 1-7.

Rzany, B. and Kahl, C. 2006. Epidemiology of acne vulgaris. J. Dtsch. Dermatol Ges. 4: 8-9.

Salari, M.H., Amine, G., Shirazi, M.H., Hafezi, R. and Mohammadypour, M. 2006. Antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders. Clin. Microbiol. Infect. 12: 194-196.

Salni, D., Sargent, M.V., Skelton, B.W., Soediro, I., Sutisna, M., White, A.H. and Yulinah, E. 2002. Rhodomyrtone, an antibotic from *Rhodomyrtus tomentosa*. Aust. J. Chem. 55: 229-232.

Scazzocchio, F., D'Auria, F.D., Alessandrini, D. and Pantanella, F. 2006. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. Microbiol. Res. 161: 327-333.

Schempp, C.M., Pelz, K., Wittmer, A., Schopf, E. and Simon, J.C. 1999. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. Lancet. 353: 2129.

Schlievert, P.M. and Peterson, M.L. 2007. Staphylococci: Abscesses and Toxin-Mediated Diseases. In Engleberg, N.C., Dirita, V. and Dermody, T.S. Schaechter's Mechanisms of Microbial Disease. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia.

Shalita, A.R. 2004. Acne: clinical presentations. Clin. Dermatol. 22: 385-386.

Sofer, D., Gilboa-Garber, N., Belz, A. and Garber, N.C. 1999. 'Subinhibitory' erythromycin represses production of *Pseudomonas aeruginosa* lectins, autoinducer and virulence factors. Chemotherapy. 45: 335-341.

Stern, R.S. 2000. Medication and medical service utilization for acne 1995-1998. J. Am. Acad. Dermatol. 43: 1042-1048.

Stewart, P.S. and Costerton, J.W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 358: 135-138.

Sutherland, I.W. 2001. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. Trends Microbiol. 9: 222-227.

Takahashi, T., Kokubo, R. and Sakaino, M. 2004. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from Eucalyptus maculata. Lett. Appl. Microbiol. 39: 60-64.

Toyoda, M. and Morohashi, M. 1998. An overview of topical antibiotics for acne treatment. Dermatology. 196: 130-134.

Veenstra, G.J., Cremers, F.F., van Dijk, H. and Fleer, A. 1996. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. J. Bacteriol. 178: 537-541.

Venkatesh, M.P., Placencia, F. and Weisman, L.E. 2006. Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonate and child: an update. Semin. Pediatr. Infect Dis. 17: 120-127.

Vijaykumar, P. 2001. Staphylococcal extracellular/ surface enzymatic activity. In *Staphylococcus aureus* Infection and Disease. Honeyman, A.L., Friedman, H. and Bendinelli, M. Kluwer academic/Plenum Publisher: New York.

Voravuthikunchai, S. P., Limsuwan, S. and Chusri, S. (2007) New Perspectives on Herbal Medicines for Bacterial Infections. In *Recent Progress in Medicinal Plants*, Vol.18: Natural Products II (Govil, G. N., Singh, V. K. and Siddqui, T., Eds.), Stadium Press, LLC, Houston, Texas, U.S.A., pp. 41-101.

Vuong, C. and Otto, M. 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. Microbes Infect. 4: 481-489.

Weckesser, S., Engel, K., Simon-Haarhaus, B., Wittmer, A., Pelz, K. and Schempp, C.M. 2007. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. Phytomedicine. 14: 508-516.

Winotai, A., Wright, T. and Goolsby, J.A. 2005. Herbivores in Thailand on *Rhodomyrtus tomentosa* (Myrtaceae), an invasive weed in Florida. Florida Entomologist. 88: 104- 105.

Yarwood, J.M., Bartels, D.J., Volper, E.M. and Greenberg, E.P. 2004. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. J. Bacteriol. 186: 1838-1850.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

Casein Agar

ส่วนประกอบ Beef extract 3.□ g

Peptone 5.□ g

Casein sodium salt 2□.□ g

Distilled water 1□□□.□ ml

วิธีเตรียม ละลายส่วยผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

Mannitol Salt Agar (MSA)

ส่วนประกอบ Peptone from casein 5.□ g

Enzymatic digest of animal tissue 5.□ g Meat extract 1.□ g

Sodium chloride 75.□ g D-mannitol 1□.□ g

Phenol red □.□25 g

Agar 12.□ g

Distilled water 1□□□.□ ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 1□8 g ต่อน้ำกลั่น 1□□□ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

Mueller-Hinton Agar (MHA)

ส่วนประกอบ Beef extract 3□□.□ g

Casamino acids technical 17.5 g

Starch 1.5 g

Agar 15.□ g

Distilled water 1□□□.□ ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 38.□g ต่อน้ำกลั่น 1□□□ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

Mueller-Hinton Broth (MHB)

ส่วนประกอบ Beef extract 3□□.□ g

Bacto Casamino acids technical 17.5 g

Bacto soluble starch 1.5 g

Distilled water 1□□□.□ ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 21.□g ต่อน้ำกลั่น 1□□□ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

Tributyrin agar

ส่วนประกอบ Beef extract 3.□ g

Peptone 5.□ g

Tributyrin 1□.□ ml

Distilled water 1□□□.□ ml

วิธีเตรียม ละลายส่วยผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

Tryptic Soy Agar (TSA)

ส่วนประกอบ Pancreatic digest of casein 15.□ g

Enzymatic digest of soy bean meal 5.□ g

Sodium chloride 5.□ g

Agar 15.□ g

Distilled water 1□□□.□ ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 4□.□g ต่อน้ำกลั่น 1□□□ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

Tryptic Soy Broth (TSB)

ส่วนประกอบ Pancreatic digest of casein 17.□ g

Enzymatic digest of soybean meal 3.□ g

Dextrose 2.5 g

Sodium chloride 5.□ g

Dipotassium phosphate 2.5 g

Distilled water 1□□□.□ ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 3□.□g ต่อน้ำกลั่น 1□□□ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

1. น้ำยาทดสอบ Catalase

35% H_2O_2 8.6 ml

Distilled water 1□□.□ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีชาแล้วแช่ตู้ยืน

2. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีกรัม

2.1 Crystal violet

สารละลาย A : ละลาย crystal violet 2.□g ใน 95% ethyl ethanol ปริมาตร 2□ml

สารละลาย B : ละลาย ammonium oxalate □.8 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 8□ml

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองได้เป็น crystal violet staining reagent

2.2 95% ethyl ethanol

2.3 Gram iodine

บด iodine 1.□g และ potassium iodine 2.□g เข้าด้วยกัน แล้วค่อยๆเติมน้ำกลั่นลงไปผสมจนกระทั่ง iodine ละลาย เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3□□ml เก็บไว้ในขวดสีชา

2.4. Safranin

ละลาย safranin O 2.5% (w/v) ใน 95% ethyl ethanol ปริมาตร 1□ml เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1□□ml

3. 0.85% Normal Saline Solution

Sodium chloride □□8.5 g

Distilled water □91.5 ml

ละลาย Sodium chloride ในน้ำกลั่นแล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$C เป็นเวลา 15 นาที

4. McFarland standard

วิธีเตรียม

นำ H_2SO_4 1% v/v ผสมกับ $BaCl_2.2H_2O$ 1.175% w/v จะได้ตะกอนขาวขุ่นของ $BaSO_4$ อัตราส่วนของ H_2SO_4 1% และ $BaCl_2.2H_2O$ 1.175% เพื่อเตรียม McFarland standard หมายเลขต่างๆ ดังตาราง

McFarland Standard No.	□.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1□
Barium chloride (ml)	□.□5	□.1	□.2	□.3	□.4	□.5	□.6	□.7	□.8	□.9	1.□
Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.□
Approx. cell density (x1□^{8}/mL)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	3□

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวจงกล สายสิงห์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 491□22□□2□

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	**ชื่อสถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2543

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนผู้ช่วยนักวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Saising, J., Ongsakul, M., and Voravuthikunchai, S. P. 2□□7. Antibacterial Activities of Ethanolic Extract of *Rhodomyrtus tomemtosa* (Ait.) Hassk against Coagulase- positive Staphylococci Isolated from Acne Lesions. Abstract of 33th Congress on Science and Technology of Thailand. Walailak University, 18-2□October 2□□7. p. 92.