



การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด  
ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคผิวหนังชนิดผิวหนังอักเสบที่เรื้อรัง เอคเน่ ในหลอดทดลอง

*IN VITRO STUDY OF SYNERGISTIC ACTIVITIES OF  
PHYLLANTHUS EMBLICA L. LEAVES AND  
GARCINIA MANGOSTANA L. PEELS CRUDE*

ปภัสรา อัสวภาคย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด  
ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคสิวชนิดควิตีแบคทีเรียม เอคเน ในหลอดทดลอง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

IN VITRO STUDY OF SYNERGISTIC ACTIVITIES OF  
*PHYLLANTHUS EMBLICA* L. LEAVES AND  
*GARCINIA MANGOSTANA* L. PEELS CRUDE  
EXTRACTS TO *CUTIBACTERIUM ACNES*



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of MASTER OF SCIENCE  
(Dermatology)

Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด  
ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคผิวหนังดื้อยาแบคทีเรีย เอคเน ในหลอดทดลอง

ของ

ปภัสรา อัครภาคย์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์มนตรี อุดมเพทายกุล)

..... ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.มาลัย ทวีโชติภัทร์)

..... ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสุวิรากร โอภาสวงศ์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. แพทย์หญิงนันทิชา คมนามูล)

|                      |                                                                                                                                                                   |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อเรื่อง           | การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคผิวหนังชนิดสิวอักเสบที่เรียกว่า <i>C. acnes</i> ในหลอดทดลอง |
| ผู้วิจัย             | ปภัสรา อัครวาศย์                                                                                                                                                  |
| ปริญญา               | วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต                                                                                                                                              |
| ปีการศึกษา           | 2563                                                                                                                                                              |
| อาจารย์ที่ปรึกษา     | รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ มนต์รี อุดมเพทายกุล                                                                                                                       |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | รองศาสตราจารย์ ดร. มัลลย์ ทวีโชติภัทร์                                                                                                                            |

เนื่องจากอุบัติการณ์การเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Cutibacterium acnes* ที่สูงขึ้น ทำให้มีการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* เพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาสิว โดยพบว่าทั้งสารสกัดจากใบมะขามป้อมและสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ได้ดี แต่ไม่พบการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสมุนไพรทั้งสองชนิด งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนังชนิด *C. acnes* โดยเป็นการศึกษาเชิงทดลองทางห้องปฏิบัติการ ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่งแบบตัดขวาง (*In vitro*, experimental, cross-sectional study) นำเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยจากงานวิจัยก่อนหน้ามาศึกษาต่อยอด มาทดสอบกับสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion อ่านผลจากบริเวณไซของ การยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory zone/MIZ) ทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (minimal inhibitory concentration/MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ด้วยวิธี broth microdilution และศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธีการ checkerboard testing (antimicrobial synergy study - checkerboard testing) จะได้ค่า fractional inhibitory concentration index (FICI) พบว่าผลจากบริเวณไซของการยับยั้งเชื้อ (MIZ) และผลค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมเทียบกับสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดต่อเชื้อ *C. acnes* พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.3273$ ) ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดมีผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* โดยมีผลเสริมฤทธิ์กัน (synergy) และมีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (additive/partial synergy) รวม 62.86% โดยไม่มีผลต้านฤทธิ์กัน (antagonism) และพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ( $p = 0.708$ ) ได้ข้อสรุปว่าการรวมกันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ทั้งชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ จึงสามารถนำมาพัฒนาเป็นตำรับยาเพื่อเป็นหนึ่งในการรักษาสิทางเลือกและลดอุบัติการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *C. acnes*

คำสำคัญ : ใบมะขามป้อม, เปลือกมังคุด, เสริมฤทธิ์กัน, เชื้อ *Cutibacterium acnes*, สารสกัดหยาบ

|                |                                                                                                                                                                                |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title          | IN VITRO STUDY OF SYNERGISTIC ACTIVITIES OF<br><i>PHYLLANTHUS EMBLICA</i> L. LEAVES AND<br><i>GARCINIA MANGOSTANA</i> L. PEELS CRUDE<br>EXTRACTS TO <i>CUTIBACTERIUM ACNES</i> |
| Author         | PAPATSARA ASAVAPHARK                                                                                                                                                           |
| Degree         | MASTER OF SCIENCE                                                                                                                                                              |
| Academic Year  | 2020                                                                                                                                                                           |
| Thesis Advisor | Associate Professor Montri Udompataikul , M.D.                                                                                                                                 |
| Co Advisor     | Associate Professor Malai Taweechotipatr , Ph.D.                                                                                                                               |

With regard to antibiotic-resistant *Cutibacterium acnes*, several studies have substantiated the effectiveness of botanical extracts to inhibit *C. acnes*. Both extracts of *Phyllanthus emblica* L. leaves and *Garcinia mangostana* L. peels had good efficacy in terms of inhibiting the growth of *C. acnes* alone, but there were no studies about antimicrobial synergistic activities in both extracts, in combination. This is the first study investigated *in vitro* study of synergistic activities of *Phyllanthus emblica* L. leaves and *Garcinia mangostana* L. peel crude extracts to *C. acnes*. An experimental, cross-sectional study was used to investigate in this study. The clinical isolated *C. acnes* specimens were tested with the herb extracts in alone and in combination by agar well diffusion assay to evaluate minimum inhibition zone (MIZ), broth microdilution method to evaluate the minimum inhibitory concentration (MIC), and antimicrobial synergy study-checkerboard testing method to evaluate the fractional inhibitory concentration (FIC). The results of MIZ and MIC compared between *P. emblica* leaves and *G. mangostana* peels against overall *C. acnes* showed a statistically significant difference ( $p < 0.001$ ) and without statistically significant difference ( $p = 0.3273$ ), respectively. The combination of *P. emblica* leaves and *G. mangostana* peels extraction by checkerboard testing had 62.86% of the synergy group, 37.14% of the non-synergy group, and none of antagonism but there was no statistically significant difference between resistant *C. acnes* and susceptible *C. acnes* ( $p = 0.708$ ). In conclusion, the combination of *P. emblica* leaves and *G. mangostana* peels crude extract potentiated the antimicrobial synergy activity, suggesting a utilization of these herbs in combination therapy against multidrug-resistance *C. acnes* strains.

Keyword : *Phyllanthus emblica* L. leaves, *Garcinia mangostana* L. peels, Antimicrobial synergistic activities, *Cutibacterium acnes*, Crude extract

## กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความสามารถช่วยเหลือ และความเอาใจใส่อย่างดี ยิ่งตลอดจนการให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการปรับแก้ไขข้อบกพร่อง จากคณะกรรมการผู้ควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์มนตรี อุดมเพทยกุล และ รองศาสตราจารย์ ดร.มาลัย ทวีโชติภักดิ์ ที่ได้ให้ความเมตตา กรุณาเป็นที่ปรึกษาและให้ความช่วยเหลือชี้แนะแนวทางในสิ่งที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและการ ทำปริญญานิพนธ์นี้ด้วยความเอาใจใส่ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสุวิรากร โอภาสวงศ์ ประธาน กรรมการสอบปากเปล่า และอาจารย์ ดร. แพทย์หญิงนันทิชา คมนามูลที่ร่วมเป็นคณะกรรมการสอบ ปากเปล่า ผู้ให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาในการแก้ไขปริญญานิพนธ์ รวมทั้งคณาจารย์และ กรรมการบริหารหลักสูตรสาขาตจวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่าน ที่ได้กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่างๆ ให้แก่ผู้วิจัย ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านรวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกฝ่ายที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีทำ ให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานสาขาตจวิทยา รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกฝ่ายที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือผู้วิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกถึงคุณของบิดามารดาและครูอาจารย์ ที่อบรมสั่งสอนให้ ความรู้เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

ปภัสรา อัสวภาคย์

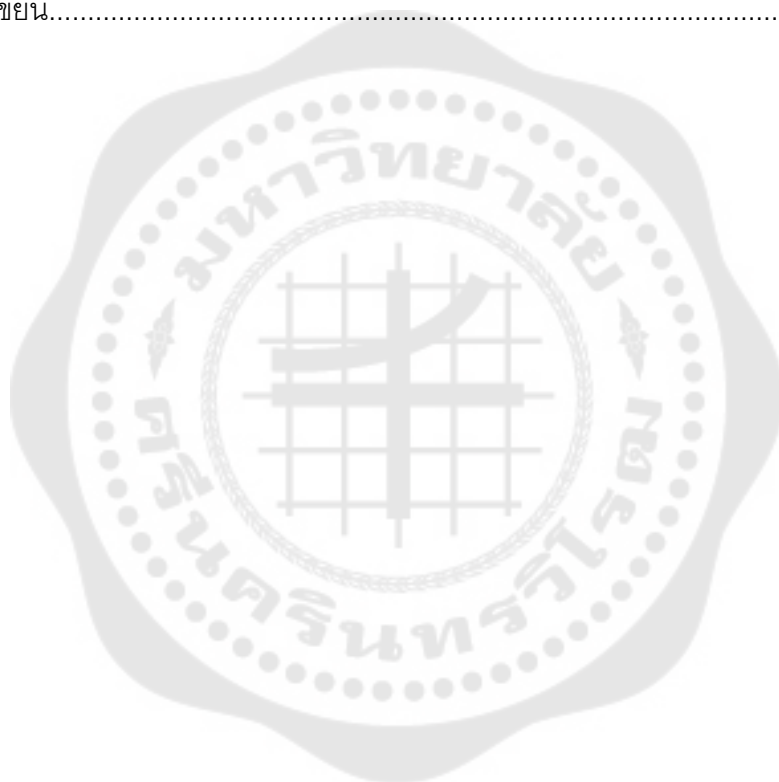
## สารบัญ

|                                                        | หน้า |
|--------------------------------------------------------|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย .....                                  | ง    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....                               | จ    |
| กิตติกรรมประกาศ.....                                   | ฉ    |
| สารบัญ .....                                           | ช    |
| สารบัญตาราง.....                                       | ฅ    |
| สารบัญรูปภาพ .....                                     | ฐ    |
| บทที่ 1 บทนำ.....                                      | 1    |
| ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....                    | 1    |
| คำถามการวิจัย.....                                     | 3    |
| วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....                          | 3    |
| สมมติฐานงานวิจัย.....                                  | 4    |
| ขอบเขตของโครงการวิจัย .....                            | 4    |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....                         | 5    |
| บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....                             | 7    |
| 1. สิว (acne vulgaris) .....                           | 7    |
| 1. บทนำ <sup>(4)</sup> .....                           | 7    |
| 2. ระบาดวิทยา <sup>(1-3, 27)</sup> .....               | 7    |
| 3. สาเหตุ และพยาธิกำเนิด <sup>(28-30)</sup> .....      | 8    |
| 4. ลักษณะทางคลินิก .....                               | 9    |
| 5. การจัดลำดับความรุนแรงของสิว <sup>(6, 7)</sup> ..... | 12   |
| 6. การวินิจฉัยโรค <sup>(28, 29)</sup> .....            | 14   |

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ <sup>(28, 29)</sup> .....                                                                                                  | 14 |
| 8. การวินิจฉัยแยกโรค .....                                                                                                                             | 14 |
| 9. ภาวะแทรกซ้อน.....                                                                                                                                   | 15 |
| 10. การพยากรณ์โรค (prognosis) .....                                                                                                                    | 18 |
| 11. การรักษาสิ่ว.....                                                                                                                                  | 18 |
| 2. เชื้อแบคทีเรีย <i>Cutibacterium acnes</i> และการดื้อยาปฏิชีวนะ .....                                                                                | 22 |
| 3. สมุนไพรไทย .....                                                                                                                                    | 24 |
| 4. มะขามป้อมกับการรักษาสิ่ว.....                                                                                                                       | 28 |
| 5. มังคุดกับการรักษาสิ่ว.....                                                                                                                          | 31 |
| 6. วิธีการสกัดสมุนไพร <sup>(70)</sup> .....                                                                                                            | 36 |
| 7. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial testing) <sup>(14-24)</sup> .....                                                                            | 37 |
| 8. การเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพด้วยวิธีการ checkerboard testing (antimicrobial synergy study - checkerboard testing) <sup>(25, 71)</sup> ..... | 43 |
| บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย .....                                                                                                                    | 45 |
| รูปแบบงานวิจัย .....                                                                                                                                   | 45 |
| กลุ่มเป้าหมายของงานวิจัย (target population).....                                                                                                      | 45 |
| อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย .....                                                                                                                          | 47 |
| ขั้นตอนการวิจัย .....                                                                                                                                  | 48 |
| การประเมินผล .....                                                                                                                                     | 52 |
| การเก็บรวบรวมข้อมูลและการจัดการข้อมูล (data collection and management).....                                                                            | 52 |
| สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล .....                                                                                                                  | 54 |
| จริยธรรมทางการวิจัย (ethical considerations).....                                                                                                      | 55 |
| ระยะเวลาการทำวิจัย .....                                                                                                                               | 55 |

|                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| บทที่ 4 ผลการวิจัย .....                                                                                                                                                                                                                                 | 58 |
| ข้อมูลการทดลองทั่วไป .....                                                                                                                                                                                                                               | 58 |
| ลักษณะโดยทั่วไปของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและจากเปลือกมังคุด .....                                                                                                                                                                                      | 58 |
| ลักษณะโดยทั่วไปของกลุ่มเชื้อ <i>Cutibacterium acnes</i> .....                                                                                                                                                                                            | 58 |
| ผลการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูล .....                                                                                                                                                                                                                       | 59 |
| ตอนที่ 1 การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและจากเปลือก<br>มังคุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> ด้วยวิธี agar well diffusion โดย<br>วัดผลจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้ง หรือ minimal inhibition zone<br>(MIZ) ..... | 59 |
| ตอนที่ 2 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด หรือ minimal inhibition concentration (MIC)<br>ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและจากเปลือกมังคุดที่ยับยั้งการเจริญของ<br>เชื้อ <i>C. acnes</i> ด้วยวิธี broth microdilution .....                                      | 68 |
| ตอนที่ 3 การทดสอบหาการเสริมฤทธิ์ หรือ fractional inhibitory concentration index<br>(FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ด้วยวิธีการ<br>checkerboard testing .....                                                                          | 77 |
| บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ .....                                                                                                                                                                                                               | 83 |
| อภิปรายผล .....                                                                                                                                                                                                                                          | 83 |
| อภิปรายผลการทดลอง .....                                                                                                                                                                                                                                  | 85 |
| ตอนที่ 1 การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและจากเปลือก<br>มังคุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> ด้วยวิธี agar well diffusion โดย<br>วัดผลจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้ง หรือ minimal inhibition zone<br>(MIZ) ..... | 85 |
| ตอนที่ 2 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด หรือ minimal inhibition concentration (MIC)<br>ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและจากเปลือกมังคุดที่ยับยั้งการเจริญของ<br>เชื้อ <i>C. acnes</i> ด้วยวิธี broth microdilution .....                                      | 87 |

|                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ตอนที่ 3 การทดสอบหาการเสริมฤทธิ์ หรือ fractional inhibitory concentration (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ด้วยวิธีการ checkerboard testing ..... | 89  |
| สรุปผล.....                                                                                                                                                         | 97  |
| ข้อเสนอแนะ .....                                                                                                                                                    | 98  |
| บรรณานุกรม .....                                                                                                                                                    | 99  |
| ประวัติผู้เขียน.....                                                                                                                                                | 107 |



## สารบัญตาราง

### หน้า

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ตาราง 1 สรุปการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวกับการนำพืชสมุนไพรมาศึกษาในห้องทดลอง เพื่อดูความสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย <i>C. acnes</i> .....                                                                                                                                                                                                                                               | 25 |
| ตาราง 2 แสดงสรุปการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวกับการศึกษาสารสกัดจากมะขามป้อมกับเชื้อแบคทีเรีย <i>C. acnes</i> ในหลอดทดลอง.....                                                                                                                                                                                                                                                         | 30 |
| ตาราง 3 แสดงสรุปการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวกับการศึกษาสารสกัดจากมังคุดกับเชื้อแบคทีเรีย <i>C. acnes</i> ในหลอดทดลอง.....                                                                                                                                                                                                                                                            | 34 |
| ตาราง 4 แสดงการแปลผลค่า FICI <sup>(72)</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 43 |
| ตาราง 5 แสดงแบบฟอร์มเก็บรวบรวมข้อมูลค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>C. acnes</i> ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางรอบหลุม (MIZ) หน่วยเป็นมิลลิเมตร.....                                                                                                                                                       | 53 |
| ตาราง 6 แสดงแบบฟอร์มเก็บรวบรวมข้อมูลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>C. acnes</i> (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution และข้อมูลการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>C. acnes</i> ของส่วนผสมระหว่างสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด โดยคำนวณค่า fractional inhibitory concentration index (FICI)..... | 53 |
| ตาราง 7 แสดงระยะเวลาการทำงานวิจัย.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 56 |
| ตาราง 8 แสดงงบประมาณในงานวิจัย.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 57 |
| ตาราง 9 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>C. acnes</i> ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางรอบหลุม (MIZ) เป็น มิลลิเมตร.....                                                                                                                                                                                                                        | 60 |
| ตาราง 10 แสดงค่าเฉลี่ยรวมของ MIZ ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อ <i>C. acnes</i> โดยจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ <i>C. acnes</i> ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ.....                                                                                                                                                                                                               | 65 |
| ตาราง 11 แสดงค่าเฉลี่ยรวมของ MIZ ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อ <i>C. acnes</i> โดยจำแนกตามสารสกัดหยาบสมุนไพรแต่ละชนิด.....                                                                                                                                                                                                                                                        | 67 |

|                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ตาราง 12 ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> ด้วยวิธี broth microdilution .....                                                                        | 69 |
| ตาราง 13 ผลค่าเฉลี่ยรวมของค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดยจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ <i>C. acnes</i> ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ .....      | 74 |
| ตาราง 14 ผลค่าเฉลี่ยรวมของค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดยจำแนกตามสารสกัดหยาบสมุนไพรแต่ละชนิด .....                                               | 76 |
| ตาราง 15 ผลการเสริมฤทธิ์ (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ด้วยวิธีการ checkerboard testing .....                                                                                                    | 78 |
| ตาราง 16 ผลการเสริมฤทธิ์ (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> (%) .....                                                                                 | 80 |
| ตาราง 17 ผลการเสริมฤทธิ์ (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดยจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ <i>C. acnes</i> ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ (%) ..... | 81 |
| ตาราง 18 แสดงการทบทวนวรรณกรรมที่ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรทั้งสองชนิดในผู้ป่วยสิว .....                                                                                                                     | 90 |
| ตาราง 19 แสดงการเปรียบเทียบการศึกษาวิจัยนี้กับการศึกษาวิจัยก่อนหน้า .....                                                                                                                                             | 95 |

## สารบัญรูปภาพ

### หน้า

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ภาพประกอบ 1 แสดงพยาธิกำเนิดของสิว <sup>(29)</sup> .....                                                  | 8  |
| ภาพประกอบ 2 แสดงสิวหัวปิด/สิวหัวขาว (closed/white head comedones) <sup>(28)</sup> .....                  | 9  |
| ภาพประกอบ 3 แสดงสิวหัวเปิด/สิวหัวดำ (open/black head comedones) <sup>(28)</sup> .....                    | 10 |
| ภาพประกอบ 4 แสดงสิวกักเสบแดง (papules) <sup>(29)</sup> .....                                             | 10 |
| ภาพประกอบ 5 แสดงสิวหัวหนอง (pustules) <sup>(28)</sup> .....                                              | 11 |
| ภาพประกอบ 6 แสดงสิวกักเสบขนาดใหญ่ (nodules) และสิวกักเสบขนาดใหญ่เป็นถุง (cysts) <sup>(28)</sup><br>..... | 11 |
| ภาพประกอบ 7 แสดงสิवरดับน้อย (mild acne) <sup>(28)</sup> .....                                            | 12 |
| ภาพประกอบ 8 แสดงสิवरดับปานกลาง (moderate acne) <sup>(28)</sup> .....                                     | 13 |
| ภาพประกอบ 9 แสดงสิवरดับรุนแรง (severe acne) <sup>(28)</sup> .....                                        | 13 |
| ภาพประกอบ 10 แสดงรอยแผลเป็นหลุมแบบไอซ์พิก (ice pick scar) <sup>(34)</sup> .....                          | 16 |
| ภาพประกอบ 11 แสดงรอยแผลเป็นหลุมแบบโรลลิ่ง (rolling scar) <sup>(28)</sup> .....                           | 16 |
| ภาพประกอบ 12 แสดงรอยแผลเป็นหลุมแบบบ็อกซ์คาร์ (box-car scar) <sup>(34)</sup> .....                        | 17 |
| ภาพประกอบ 13 แสดงแผลเป็นนูนคีลอยด์ (keloidal scar) <sup>(28)</sup> .....                                 | 17 |
| ภาพประกอบ 14 แสดงมะขามป้อม (A ใบ, B ลำต้น, C ดอก, D ผล, E เนื้อ, F เมล็ด) <sup>(54)</sup> .....          | 28 |
| ภาพประกอบ 15 แสดงมังคุด (A ผลมังคุด B เปลือกมังคุด C เนื้อมังคุด D เมล็ดมังคุด) <sup>(60)</sup> .....    | 32 |
| ภาพประกอบ 16 แสดงวิธี broth microdilution method <sup>(67)</sup> .....                                   | 39 |
| ภาพประกอบ 17 แสดงวิธี disk diffusion <sup>(23)</sup> .....                                               | 40 |
| ภาพประกอบ 18 แสดงวิธี antimicrobial gradient (E test) <sup>(24)</sup> .....                              | 41 |
| ภาพประกอบ 19 แสดงวิธี checkerboard testing <sup>(25)</sup> .....                                         | 44 |

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ภาพประกอบ 20 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>C. acnes</i> ด้วยวิธี agar well diffusion .....                                                 | 65 |
| ภาพประกอบ 21 แสดงผลค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> ด้วยวิธี broth microdilution ..... | 74 |
| ภาพประกอบ 22 แสดงผลการเสริมฤทธิ์ (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดด้วยวิธีการ checkerboard testing .....                              | 80 |



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สิวเกิดจากการอักเสบของรูขุมขนและต่อมไขมัน (pilosebaceous unit) ซึ่งเป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อย สิวเป็นโรคที่เกิดจากหลายปัจจัยประกอบกัน โดยมีปัจจัยสำคัญจากการกระตุ้นโดยเชื้อ *Cutibacterium acnes* (ชื่อเดิม *Propionibacterium acnes*) และอิทธิพลจากฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgens)<sup>(1)</sup> โดยสิวมามีด้วยลักษณะทางคลินิกได้หลายแบบ ได้แก่ สิวไม่อักเสบหรือสิวอุดตัน (non-inflammatory acne : comedones) สิวอักเสบ (inflammatory acne) สิวหัวหนอง (pustules) และสิวก้อนขนาดใหญ่ (nodules/cysts) โดยทั่วไปจะพบสิวที่บริเวณใบหน้าเป็นส่วนใหญ่ และบางครั้งสามารถพบได้ที่บริเวณคอ หน้าอก ไหล่ และหลังส่วนบน สิวสามารถพบได้ถึงประมาณ 80-90% ในวัยรุ่น และสามารถพบได้จนถึงวัยผู้ใหญ่<sup>(2, 3)</sup>

แม้ว่าสิวไม่ใช่โรคที่มีอันตรายจนถึงแก่ชีวิต แต่อาจส่งผลกระทบต่อจิตใจ ทำให้เกิดอาการกังวล ซึมเศร้า สูญเสียความมั่นใจในตนเอง ไปจนถึงมีความคิดฆ่าตัวตายได้ ซึ่งเหล่านี้มีผลต่อคุณภาพชีวิตในระยะยาวเป็นอย่างมาก<sup>(1, 4)</sup> จึงมีการพัฒนาวิธีการรักษาสิวและแนวทางการรักษาหลายวิธีตามระดับความรุนแรงของสิว<sup>(5)</sup> สำหรับประเทศไทยมีแนวทางการรักษาสิวสำหรับแพทย์ออกโดยสมาคมแพทย์ผิวหนังแห่งประเทศไทย<sup>(6)</sup> ซึ่งมีการจัดระดับความรุนแรงของสิวตามเกณฑ์ของลีดส์ (Leeds revised acne grading system)<sup>(7)</sup> โดยแบ่งออกเป็นความรุนแรงของสิवरดับน้อย ระดับปานกลาง และระดับรุนแรง โดยทั้งวิธีการรักษาสิวด้วยยาทา เช่น ยาทาเฉพาะที่เบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ (topical benzoyl peroxide) ยาปฏิชีวนะชนิดทา (topical antibiotics) ยาทาเฉพาะที่กรดวิตามินเอ (topical retinoids) เป็นต้น และวิธีการรักษาสิวด้วยยารับประทาน เช่น ยาปฏิชีวนะชนิดรับประทาน ยากรดวิตามินเอชนิดรับประทาน เป็นต้น<sup>(8)</sup>

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* เป็นสาเหตุที่ทำให้สิวเกิดการอักเสบมากขึ้น แล้วยังกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบกำเนิด (innate immunity) ทำให้เกิดการหลั่ง pro-inflammatory cytokines และเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดสิว จึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดทาเพื่อยับยั้งเชื้อ *C. acnes* โดยอัตราการดื้อยาของเชื้อเพิ่มมากขึ้น มีสาเหตุมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดทาเพียงอย่างเดียวหรือการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดรับประทานในระยะยาวและการเข้าถึงยาปฏิชีวนะได้ง่ายมากขึ้นจึงก่อให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *C. acnes*<sup>(8)</sup> โดยในสหรัฐอเมริกามีการศึกษาสำรวจการรักษาสิวด้วยยาปฏิชีวนะชนิดทาอย่างเดียวในปี ค.ศ. 1995 พบอัตราการใช้มากถึงร้อยละ 10 และพบว่าอัตราการใช้ลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงปี ค.ศ. 2010 เหลือเพียงร้อยละ 5 แม้ว่าอัตราการใช้ยา

ปฏิชีวนะชนิดทาเพียงอย่างเดียวจะลดลงอย่างมาก แต่ยังคงพบปัญหาเชื้อดื้อยาจากการรักษาสิว ด้วยยาปฏิชีวนะชนิดทา<sup>(9)</sup> ประชากรในประเทศไทยสามารถหาซื้อยาปฏิชีวนะทั้งรูปแบบยาทาและ ยารับประทานได้ง่าย และผู้ป่วยยังไม่ทราบวิธีการรักษาสิวที่เหมาะสมจึงทำให้ผลการรักษาไม่ดีเท่าที่ควรและพบปัญหาเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้น จึงมีการศึกษาในปี ค.ศ. 2017 Laochunsuwan A.<sup>(10)</sup> ทำการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *C. acnes* กับยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด ได้แก่ erythromycin, clindamycin, tetracycline, doxycycline และ amoxicillin พบว่าเชื้อดื้อ ยาปฏิชีวนะ erythromycin มากที่สุด รองลงมา คือ clindamycin และ tetracycline ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและคือด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต ของแบคทีเรียได้ (minimal inhibitory concentration / MIC) ที่สูง และพบว่าผู้ป่วยที่เคยมีประวัติ ใช้ยาปฏิชีวนะมาก่อน จะพบเชื้อ *C. acnes* ดื้อยามากกว่ากลุ่มที่ไม่มีประวัติใช้ยาปฏิชีวนะมา ก่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ doxycycline และ amoxicillin

ทั้งนี้ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมไปด้วยพืชสมุนไพรนานาชนิดเหมาะแก่การนำ สมุนไพรมาพัฒนาและประยุกต์ให้มีประสิทธิภาพดีเพื่อใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ เนื่องจาก การรักษาสิวในปัจจุบันมีอุบัติการณ์การดื้อยาที่เพิ่มมากขึ้น การรักษาสิวโดยใช้สารสกัดจาก สมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาสิว มีการศึกษาคุณสมบัติของสมุนไพรมากมายที่มี ฤทธิ์ในการรักษาโรคทางผิวหนัง โดยในปี ค.ศ. 2010 และ ค.ศ. 2018 จากการศึกษาของ Niyomkam P.<sup>(11)</sup> และ Deewongkij P.<sup>(12)</sup> ตามลำดับ ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพร ไทยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว พบว่าสารสกัดจากใบมะขามป้อม มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ และ ในปี ค.ศ. 2005 Chomnawang M. และคณะ<sup>(13)</sup> ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว ซึ่งได้แก่ เชื้อ *C. acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* พบว่าสารสกัดจากมังคุดเป็นหนึ่งในสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้ง การเจริญของเชื้อ *C. acnes*

จากที่กล่าวมาข้างต้นสารสกัดจากใบมะขามป้อมและสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ได้ แต่ยังไม่มีการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัด จากสมุนไพรทั้งสองชนิด จึงเป็นที่มาของโครงการวิจัยนี้ คือ การนำสารสกัดหยาบจาก ใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ที่ เคยเก็บจากอาสาสมัครแล้วนำมาศึกษาต่อยอด (SWUEC/E-272/2559) โดยสายพันธุ์เหล่านี้เก็บ รักษาอยู่ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส นำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ<sup>(14-24)</sup> ด้วยวิธี agar well

diffusion โดยอ่านผลจากบริเวณใสของการยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory zone/MIZ) และหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (minimal inhibitory concentration/MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ด้วยวิธี broth microdilution จากนั้นศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ทั้งชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธีการ checkerboard testing (antimicrobial synergy study - checkerboard testing)<sup>(25)</sup> จะได้ค่า fractional inhibitory concentration index (FICI) value ซึ่งจะสามารถนำมาพัฒนาสูตรเป็นยาทางเลือกในการรักษาสิวต่อไป

## คำถามการวิจัย

### คำถามหลัก

สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* หรือไม่ โดยประเมินจากค่า FICI

### คำถามรอง

1. สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ทั้งชนิดไม่ดื้อยาและดื้อยาปฏิชีวนะ หรือไม่ โดยดูจากค่า MIZ และ MIC
2. สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ดีกว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด หรือไม่ โดยดูจากค่า MIZ และ MIC
3. สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ชนิดที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ไม่แตกต่างกับ ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ หรือไม่ โดยดูจากค่า MIZ และ MIC
4. สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ชนิดที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ไม่แตกต่างกับ ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ หรือไม่ โดยดูจากค่า MIZ และ MIC

## วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

### วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคสิวชนิด *C. acnes*

### วัตถุประสงค์รอง

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ทั้งชนิดไม่ดื้อยาและดื้อยาปฏิชีวนะ โดยดูจากค่า MIZ และ MIC
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* เทียบกับ สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด โดยดูจากค่า MIZ และ MIC
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ชนิดที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ เทียบกับ ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ โดยดูจากค่า MIZ และ MIC
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ชนิดที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ เทียบกับ ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ โดยดูจากค่า MIZ และ MIC

### สมมติฐานงานวิจัย

#### สมมติฐานหลัก

สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes*

#### สมมติฐานรอง

1. สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ทั้งชนิดไม่ดื้อยาและดื้อยาปฏิชีวนะ
2. สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ดีกว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด
3. สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ชนิดที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ไม่แตกต่างกับ ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ
4. สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ชนิดที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ไม่แตกต่างกับ ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ

### ขอบเขตของโครงการวิจัย

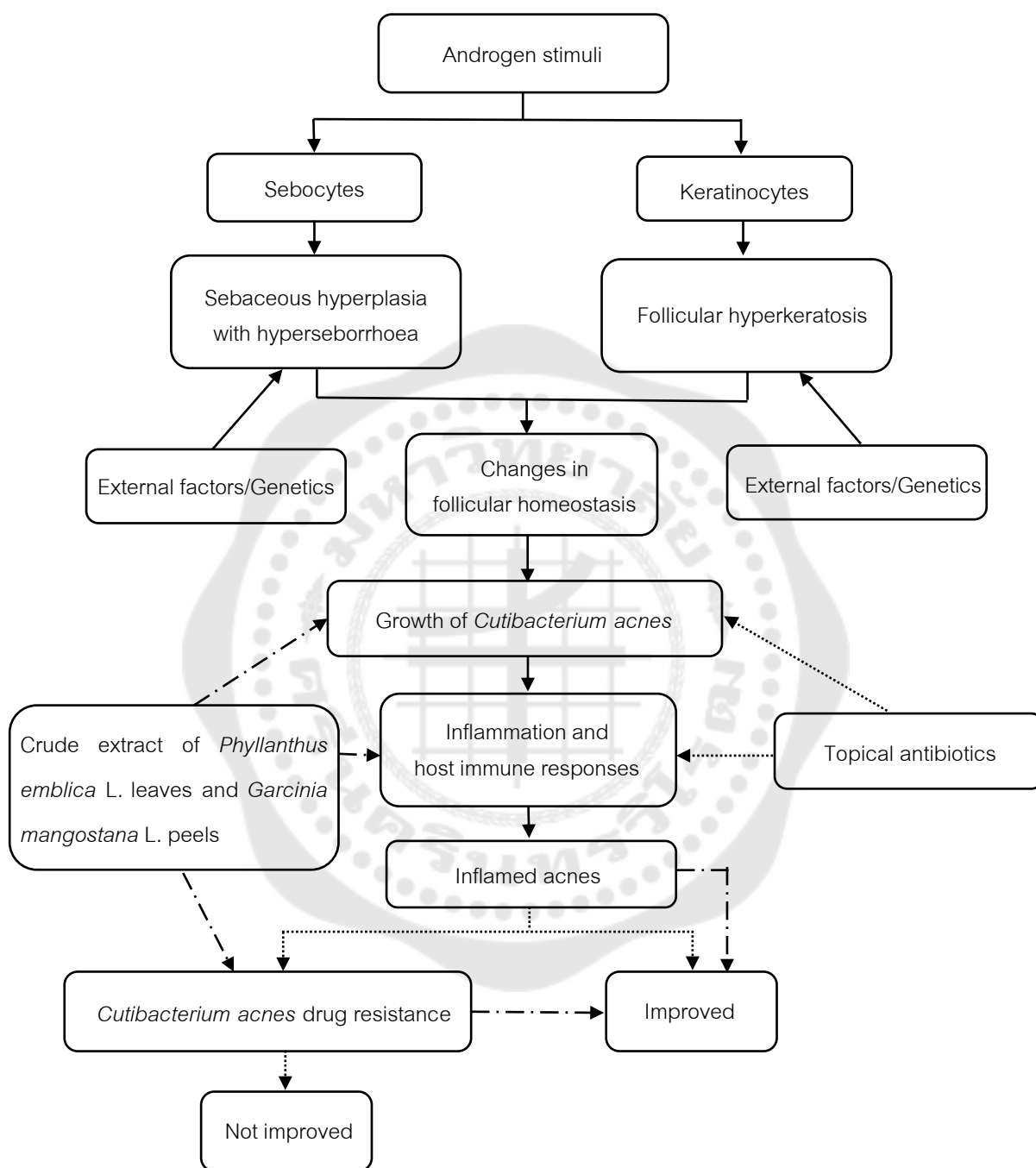
ศึกษาการยับยั้งและการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว โดยทดสอบกับเชื้อ *C. acnes* ที่เก็บรักษาอยู่ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส จำนวน 75 สายพันธุ์ ทั้งชนิดที่ดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ซึ่งแยกได้จากกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยสิวที่เป็นตัวแทนของประชากรในประเทศไทย โดยทดสอบฤทธิ์ใน

การยับยั้งเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion โดยอ่านผลจากบริเวณใสของการยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory zone/MIZ) และหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimal inhibitory concentration/MIC) ด้วยวิธี broth microdilution จากนั้นศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ทั้งชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธีการ checkerboard testing (antimicrobial synergy study - checkerboard testing)

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้องค์ความรู้ใหม่ของการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ในหลอดทดลอง และสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นยาในการรักษาสิวในอนาคต
2. ได้ข้อมูลค่า MIZ และ MIC ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ในหลอดทดลอง
3. ได้ข้อมูลเพื่อให้สามารถช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสิว และช่วยลดอุบัติการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ในการรักษาสิวในอนาคต
4. ทำให้สามารถนำผลผลิตทางการเกษตรของประเทศมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์และประยุกต์ให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์

กรอบแนวคิดงานวิจัย<sup>(26)</sup>



## บทที่ 2

### บททวนวรรณกรรม

ในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารรวมถึงงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และนำมาเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. สิว (acne vulgaris)
2. เชื้อแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* และการดื้อยาปฏิชีวนะ
3. สมุนไพรไทยที่นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes*
4. มะขามป้อมกับการรักษาสิว
5. มังคุดกับการรักษาสิว
6. วิธีการสกัดสมุนไพร
7. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial study)
8. การเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพด้วยวิธีการ checkerboard testing (antimicrobial synergy study - checkerboard testing)

#### 1. สิว (acne vulgaris)

##### 1. บทนำ<sup>(4)</sup>

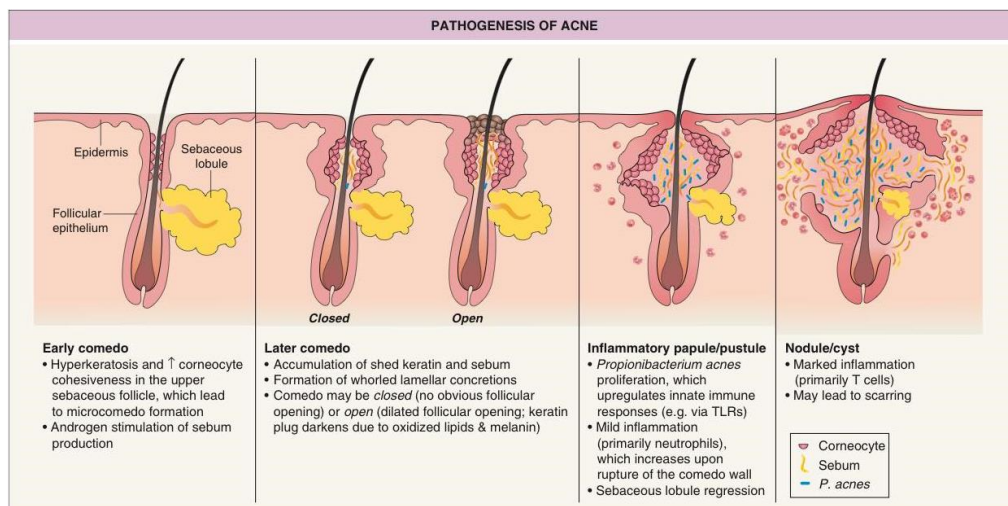
สิวเป็นหนึ่งในโรคผิวหนังที่ทำให้ผู้ป่วยมาพบแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านผิวหนังมากที่สุดโรคหนึ่ง โดยจัดเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากการอักเสบของรูขุมขนและต่อมไขมัน (pilosebaceous unit) และมีอาการแสดงทางผิวหนังที่หลากหลาย มักพบมากในวัยรุ่นและพบน้อยลงในวัยผู้ใหญ่ ซึ่งมีหลายปัจจัยที่สัมพันธ์กับการเกิดสิว เช่น พันธุกรรม เชื้อชาติ ความเครียด เป็นต้น นอกจากนี้มีผลกระทบต่อสภาพร่างกายภายนอก เช่น รอยแดงหรือรอยดำจากสิว รอยแผลเป็นจากสิว เป็นต้น แล้วยังส่งผลกระทบต่อสภาพจิตใจ อาจเกิดความสูญเสียความมั่นใจในตนเองไปจนถึงมีความคิดฆ่าตัวตายได้ ซึ่งเหล่านี้มีผลต่อคุณภาพชีวิตในระยะยาวเป็นอย่างมาก

##### 2. ระบาดวิทยา<sup>(1-3, 27)</sup>

สิวเป็นโรคผิวหนังที่พบได้ทุกเพศ ทุกวัย ส่วนใหญ่พบได้ประมาณ 80-90% ในวัยรุ่นเริ่มที่อายุ 12 ปี พบได้ในเด็กอายุต่ำที่สุด 8 ปี และสามารถพบสิวได้จนถึงวัยผู้ใหญ่ โดยอายุเฉลี่ยอยู่ที่ 45 ปี โดยในเชื้อชาติเอเชียและแอฟริกันมีแนวโน้มเกิดสิวกักเสบระดับรุนแรง ส่วนสิวกักเสบระดับน้อยมักพบในคนผิวขาวมากกว่า

### 3. สาเหตุ และพยาธิกำเนิด<sup>(28-30)</sup>

ปัจจุบันพบว่าสิวสามารถเกิดได้จากหลายปัจจัย โดยพยาธิสภาพหลักของการเกิดสิวมียี่ 4 ปัจจัย ดังนี้



ภาพประกอบ 1 แสดงพยาธิกำเนิดของสิว<sup>(29)</sup>

1. หนึ่งกำพร้าบริเวณรูขุมขนแบ่งตัวมากเกินไปและทำให้เกิดการอุดตันในรูขุมขน (follicular epithelial hyperproliferation and resultant follicular plugging) โดยอิทธิพลของฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) กรดไขมันจำเป็นไลโนเลอิก (linoleic acid) และไซโตไคน์ interleukin 1 alpha (IL-1 $\alpha$ ) ทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนัง (keratinocytes) ในหนึ่งกำพร้าบริเวณรูขุมขนและเกิดการอุดตันในรูขุมขน

2. การผลิตไขมันจากต่อมไขมันที่มากเกินไป (excess sebum production) โดยฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) กระตุ้นให้เซลล์ไขมัน (sebocytes) แบ่งตัวและผลิตไขมันเพิ่มขึ้น องค์ประกอบหลักของไขมันที่ทำให้เกิดสิว คือ ไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ซึ่งจะถูกรื้อ C. *acnes* ย่อยสลายกลายเป็นไขมันอิสระ (free fatty acids) ที่เป็นปัจจัยให้เชื้อ C. *acnes* เพิ่มจำนวนมากขึ้น

3. การอักเสบของผิวหนัง (inflammatory response) การอักเสบเกิดจากการแตกของสิวลุดตัน (comedones) และเกิดจากเชื้อ C. *acnes*

4. การพบเชื้อ C. *acnes* (the presence and activity of C. *acnes*) เชื้อ C. *acnes* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่อาศัยออกซิเจนในการหายใจ (gram positive

anaerobic bacteria) พบบริเวณรูขุมขนและต่อมไขมัน โดยจะหลั่งเอนไซม์ที่ทำให้สิวอุดตัน (comedone) แตก ได้แก่ lipases, proteases, hyaluronidases และ chemotactic factors และกระตุ้น inflammatory cell ให้เกิดการตอบสนอง โดยการหลั่งสาร pro-inflammatory cytokines ได้แก่ IL-1 $\alpha$ , IL-8, IL-12 และ TNF- $\alpha$  จึงเกิดการอักเสบขึ้น

#### 4. ลักษณะทางคลินิก

##### 4.1 ลักษณะทางคลินิกของสิว<sup>(6, 28, 29)</sup>

สิวจะพบมากบริเวณที่มีต่อมไขมันสูง โดยเฉพาะที่บริเวณใบหน้าเป็นหลัก และรองลงมาพบที่บริเวณคอ หลัง และอกส่วนบน โดยแบ่งลักษณะของสิวได้เป็น 2 ลักษณะ ดังนี้

1. สิวชนิดไม่อักเสบ (non-inflammatory lesions) คือ สิวที่เกิดจากการอุดตันของรูขุมขนแบ่งเป็น 2 ชนิด ดังนี้

1.1 สิวหัวปิด/สิวหัวขาว (closed/white head comedones) เป็นตุ่มนูนขนาดเล็ก สีเดียวกับผิวหนังหรือสีขาว ไม่มีรูเปิดของท่อเปิดของต่อมไขมัน จะสามารถเห็นชัดเจนด้วยการดึงผิวหนังให้ตึงหรือโดยการคลำ



ภาพประกอบ 2 แสดงสิวหัวปิด/สิวหัวขาว (closed/white head comedones)<sup>(28)</sup>

1.2 สิวหัวเปิด/สิวหัวดำ (open/black head comedones) เป็นตุ่มนูนขนาดเล็ก มีจุดสีดำอยู่ตรงกลางของรูขุมขนที่เกิดจากการขยายตัวของท่อไขมัน เนื่องจากมีการสะสมของผิวหนังชั้นขี้ไคล (keratin) เชื้อ *C. acnes* และไขมัน (lipid)



ภาพประกอบ 3 แสดงสิวหัวเปิด/สิวหัวดำ (open/black head comedones)<sup>(28)</sup>

2. สิวชนิดอักเสบ (inflammatory lesions) แบ่งเป็น 4 ชนิด คือ

2.1 สิวอักเสบแดง (papules) เป็นตุ่มนูน แดง ขนาดเล็ก



ภาพประกอบ 4 แสดงสิวอักเสบแดง (papules)<sup>(29)</sup>

2.2 สิวหัวหนอง (pustules) เป็นตุ่มนูน แดง ขนาดเล็ก มักกดเจ็บ และมีหนองอยู่ภายใน



ภาพประกอบ 5 แสดงสิวหัวหนอง (pustules)<sup>(28)</sup>

2.3 สิวอักเสบขนาดใหญ่ (nodules) เป็นตุ่มนูน ใหญ่ แดง มีหนองอยู่ข้างใต้

2.4 สิวอักเสบขนาดใหญ่เป็นถุง (cysts) เป็นตุ่มนูน ใหญ่ แดง มีหนองอยู่ข้างใต้และคลำได้เป็นลักษณะคล้ายถุงน้ำ



ภาพประกอบ 6 แสดงสิวอักเสบขนาดใหญ่ (nodules) และสิวอักเสบขนาดใหญ่เป็นถุง (cysts)<sup>(28)</sup>

### 5. การจัดลำดับความรุนแรงของสิว<sup>(6, 7)</sup>

มีการจัดลำดับความรุนแรงของสิวตามระบบของ Leeds revised acne grading system ไว้ดังนี้

#### สิวะระดับน้อย (mild acne)

มีสิวะไม่อักเสบ (comedones) เป็นส่วนใหญ่ หรือมีสิวะอักเสบขนาดเล็ก (papules และ pustules) จำนวนไม่เกิน 10 จุด



ภาพประกอบ 7 แสดงสิวะระดับน้อย (mild acne)<sup>(28)</sup>

#### สิวะระดับปานกลาง (moderate acne)

มีสิวะอักเสบขนาดเล็ก (papules หรือ pustules) จำนวนมากกว่า 10 จุด และ/หรือมีสิวะอักเสบขนาดใหญ่ (nodules หรือ cysts) จำนวนน้อยกว่า 5 จุด



ภาพประกอบ 8 แสดงสิ่วระดับปานกลาง (moderate acne)<sup>(28)</sup>

### **สิ่วระดับรุนแรง (severe acne)**

มีสิ่วอักเสบขนาดเล็ก (papules หรือ pustules) จำนวนมากกว่า 10 จุด มีสิ่วอักเสบขนาดใหญ่ (nodules หรือ cysts) จำนวนมากกว่า 5 จุด หรือมีสิ่วอักเสบขนาดใหญ่ (nodules) อักเสบอยู่นานและกลับเป็นซ้ำหรือมีหนองไหลหรือมีรูเปิดที่ผิวหนัง (sinus tracts)



ภาพประกอบ 9 แสดงสิ่วระดับรุนแรง (severe acne)<sup>(28)</sup>

## 6. การวินิจฉัยโรค<sup>(28, 29)</sup>

การวินิจฉัยโรคผิวหนังสามารถวินิจฉัยได้โดยการซักประวัติ การตรวจร่างกาย และลักษณะรอยโรคของผิวหนังที่อาจมาด้วยสิวไม่อักเสบ (non-inflammatory acnes) และสิวอักเสบ (inflammatory acnes) โดยทั่วไปจะพบสิวที่บริเวณใบหน้าเป็นส่วนใหญ่ และบางครั้งสามารถพบได้ที่บริเวณคอ หน้าอก ไหล่ และหลังส่วนบน แต่ในบางโรคอาจมีลักษณะรอยโรคคล้ายสิวจึงต้องมีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมเพื่อให้ได้การวินิจฉัยที่ถูกต้อง

## 7. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ<sup>(28, 29)</sup>

โดยปกติสิวไม่จำเป็นต้องตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติม ยกเว้นในกรณีที่สงสัยภาวะฮอร์โมนเพศชายสูงผิดปกติ (hyperandrogenism) โดยเฉพาะสิวที่พบในเด็กอายุ 1-7 ปี และผู้หญิงที่มีสิว (acne) ขนดก (hirsutism) อ้วน (obesity) และอาจพบภาวะผมบางทางพันธุกรรม (androgenetic alopecia) ร่วมด้วย เรียกว่า ภาวะถุงน้ำรังไข่หลายใบ (polycystic ovary syndrome; PCOS) ซึ่งภาวะฮอร์โมนเพศชายสูงผิดปกติอาจเกิดจากการสร้างฮอร์โมนเพศชายที่ผิดปกติจากรังไข่หรือต่อมหมวกไต ดังนั้น การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยแยกโรคที่ควรตรวจ ได้แก่ ระดับ serum DHEAS (dehydroepiandrosterone sulfate), total testosterone, free testosterone โดย 3 ค่านี้ถือว่ามีความไวสูงที่สุดสำหรับตรวจภาวะถุงน้ำรังไข่หลายใบ นอกจากนี้อาจพิจารณาส่งตรวจระดับ luteinizing hormone (LH) to follicle stimulating hormone (FSH) ratio, 17-hydroxyprogesterone, 24-hour urine test for urinary free cortisol และในกรณีที่ตรวจพบความผิดปกติควรส่งต่อให้แพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านต่อมไร้ท่อเพื่อทำการตรวจประเมินต่อและทำการรักษา

## 8. การวินิจฉัยแยกโรค

หากมีประวัติและลักษณะรอยโรคที่ไม่สามารถเข้ากับสิวได้อย่างชัดเจน ควรพิจารณาถึงโรคที่มีลักษณะรอยโรคคล้ายสิว ดังต่อไปนี้<sup>(28, 29, 31)</sup>

- รูขุมขนอักเสบ (folliculitis) แบ่งออกเป็น กลุ่มแรก คือ รูขุมขนอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ เช่น รูขุมขนอักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (bacterial folliculitis) รูขุมขนอักเสบจากการติดเชื้อเกลื้อน (pityrosporum folliculitis) และกลุ่มที่สอง คือ รูขุมขนอักเสบที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ เช่น รูขุมขนอักเสบที่เกิดจากการการระคายเคืองของเซลล์ชนิดอีโอซิโนฟิล (eosinophilic pustular folliculitis หรือ ofuji's disease) เป็นต้น

- โรคผิวหนังอักเสบโรซาเซีย (rosacea) เกิดรอยแดงมักเป็นที่บริเวณกลางใบหน้า (centrofacial area) และมองเห็นเส้นเลือดฝอย (telangiectasia) บนใบหน้าได้ชัดเจน

อาจเกิดตุ่มหนองหรือตุ่มสีแดงขนาดเล็ก และมีประวัติว่าเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงหรือรับประทานอาหารรสเผ็ดและแอลกอฮอล์ จะเกิดอาการหน้าแดงง่าย (flushing)

- ผื่นคล้ายสิวที่เกิดจากยา (acneiform drug eruption) ผื่นจะมีรูปร่างลักษณะและขนาดใกล้เคียงกัน (monomorphous pattern) มักเป็นตุ่มแดงขนาดเล็ก บางตุ่มอาจมีหนองและไม่พบสิวอุดตัน (comedones) ผื่นจะขึ้นพร้อมกันอย่างรวดเร็ว (abrupt onset) ภายหลังจากได้รับยา เช่น สเตียรอยด์ ลิเทียม เป็นต้น

- สิวข้าวสาร (milia) เป็นตุ่มสีขาวขนาดเล็กและแข็ง พบที่บริเวณใบหน้า หน้าผาก แก้ม จมูก หรือเปลือกตา พบได้ในทุกเพศ ทุกวัย ซึ่งมักจะถูกเข้าใจผิดว่าเป็นสิวอุดตัน

- ผื่นผิวหนังอักเสบรอบปาก (perioral dermatitis) เป็นผื่นสีแดง อาจมาด้วยตุ่มแดง (papules) ตุ่มน้ำ (vesicles) หรือตุ่มหนอง (pustules) อยู่บนพื้นผิวแดง (erythematous base) พบบ่อยบริเวณรอบริมฝีปาก

- ต่อมไขมันโต (sebaceous gland hyperplasia) เป็นตุ่มนูนสีเหลืองบนใบหน้า มักพบรอยนูนตรงกลางรอยโรค (central umbilication)

- เนื้องอกเส้นเลือด (angiofibromas) เป็นตุ่มนูนขนาดเล็กสีชมพูถึงแดง มักพบบริเวณกลางใบหน้าและด้านข้างจมูก ซึ่งพบในโรค tuberous sclerosis

## 9. ภาวะแทรกซ้อน

### ภาวะแทรกซ้อนด้านร่างกาย<sup>(32)</sup>

นอกจากสิวจะทำให้เกิดความเจ็บ (pain) และความไม่สวยงามแล้ว ภายหลังจากหายจากสิวยังสามารถเกิดรอยโรคที่เป็นผลแทรกซ้อนที่เกิดจากทั้งสิวกักเสบและสิวไม่อักเสบ ซึ่งสามารถแบ่งได้ดังนี้

3.1 รอยดำที่เกิดจากสิว (post-inflammatory hyperpigmentation)<sup>(33)</sup> พบได้มากในผู้ที่ผิวเข้ม และเป็นสิ่งที่ทำให้เกิดความกังวลเป็นอย่างมาก

3.2 รอยแผลเป็นชนิดหลุมที่เกิดจากสิว แบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่

3.2.1 รอยแผลเป็นหลุมแบบไอซ์พิก (ice pick scar) เป็นหลุมแคบลึก ขอบชัดเจน



ภาพประกอบ 10 แสดงรอยแผลเป็นหลุมแบบไอซ์พิก (ice pick scar)<sup>(34)</sup>

### 3.2.2 รอยแผลเป็นหลุมแบบโรลลิ่ง (rolling scar) เป็นหลุมกว้างตื้น

ขอบไม่ชัดเจน



ภาพประกอบ 11 แสดงรอยแผลเป็นหลุมแบบโรลลิ่ง (rolling scar)<sup>(28)</sup>

### 3.2.3 รอยแผลเป็นหลุมแบบบอซคาร์ (box-car scar) เป็นหลุมกว้าง ตื้น ขอบชัดเจน



ภาพประกอบ 12 แสดงรอยแผลเป็นหลุมแบบบอซคาร์ (box-car scar)<sup>(34)</sup>

### 3.3 รอยแผลเป็นชนิดนูนที่เกิดจากสิว (hypertrophic acne scar) แผลเป็นนูนที่ไม่โตเกินขอบเขตของแผล

### 3.4 แผลเป็นนูนคีลอยด์ (keloidal scar) แผลเป็นนูนที่โตเกินขอบเขต ของแผล



ภาพประกอบ 13 แสดงแผลเป็นนูนคีลอยด์ (keloidal scar)<sup>(28)</sup>

### ภาวะแทรกซ้อนด้านจิตใจ

เนื่องจากบริเวณที่มีสิวสามารถก่อให้เกิดความไม่สวยงามได้ ทั้งจากลักษณะรอยโรคและผลแทรกซ้อนที่เกิดจากสิว เช่น รอยดำที่เกิดจากสิว รอยแผลเป็นที่เกิดจากสิว เป็นต้น สิ่งเหล่านี้ย่อมทำให้เกิดความวิตกกังวล การสูญเสียความมั่นใจในตนเอง การปลีกตัวออกจากสังคม และอาจถึงขั้นมีความคิดฆ่าตัวตายได้<sup>(1)</sup>

### 10. การพยากรณ์โรค (prognosis)

สิวเป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรังที่สามารถหายเองได้ และส่วนใหญ่มักตอบสนองต่อการรักษาได้ดี สิวจะลดน้อยลงเมื่ออายุมากขึ้น โดยเริ่มหายเองตั้งแต่อายุประมาณ 20 ปีขึ้นไป แต่อาจมีผู้ป่วยบางส่วนมีสิวจนถึงอายุ 40 ปี<sup>(2)</sup>

### 11. การรักษาสิว

#### แนวทางการรักษาสิวตามความรุนแรงของสิว<sup>(6, 28, 29)</sup>

1. สิวเล็กน้อย (mild acne) ใช้ยาทาเฉพาะที่ โดยเลือกเป็นยาตัวใดตัวหนึ่งหรือใช้ร่วมกันหลายตัวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษา ได้แก่ benzoyl peroxide, topical retinoids, topical antibiotics (clindamycin solution, erythromycin solution), salicylic acid, azelaic acid, sulfur, resorcinol

2. สิวปานกลาง (moderate acne) ใช้ยาทาเฉพาะที่เหมือนกับการรักษาสิวเล็กน้อย (mild acne) ร่วมกับยาปฏิชีวนะชนิดรับประทาน กลุ่ม tetracyclines ถ้าแพ้ยาในกลุ่ม tetracyclines ให้ใช้กลุ่ม erythromycin แทน

3. สิวรุนแรง (severe acne) ใช้ยาทาเฉพาะที่ร่วมกับยารับประทาน isotretinoin (ควรปรึกษาแพทย์ผู้เชี่ยวชาญโรคผิวหนัง)

โดยการรักษาสิวตามความรุนแรงทั้ง 3 ความรุนแรงไม่ควรใช้ยาปฏิชีวนะชนิดทาหรือรับประทานเพียงอย่างเดียว (monotherapy) เพราะ มีความเสี่ยงต่อการเกิดเชื้อดื้อยา

#### ยารักษาสิวที่ใช้บ่อย<sup>(6, 28, 29, 35)</sup>

##### ยารักษาสิวชนิดทา

1. อนุพันธ์กรดวิตามินเอ (topical retinoids) เช่น tretinoin, adapalene, isotretinoin เป็นต้น

การออกฤทธิ์ เป็นยาที่ละลายสิวดุดตัน (comedolytic) โดยการช่วยทำให้เซลล์ผิวหนังในรูขุมขนเกิดการผลัดเซลล์ให้เป็นปกติมากขึ้น และช่วยต้านการอักเสบ (anti-inflammatory)

**วิธีใช้** ทาบางๆ ทุกวันวันละ 1 ครั้ง ก่อนนอน หากมีอาการระคายเคือง แนะนำให้ลดความถี่ของการใช้ยาหรือลดความเข้มข้นของยาลง

**ผลข้างเคียงและข้อควรระวัง**

- อาจระคายเคืองต่อผิว ทำให้เกิดอาการผิวแสบ แดง ลอก และทำให้ผิวไวต่อแสง แนะนำให้ทายาตอนกลางคืนและควรหลีกเลี่ยงแสงแดด

- Pregnancy category C ไม่แนะนำให้ใช้ในหญิงตั้งครรภ์หรือหญิงให้นมบุตร

**2. ยาทาเบนโซอิล เพอร์ออกไซด์ (benzoyl peroxide)**

**การออกฤทธิ์** ฆ่าเชื้อ *C. acnes*, gram positive organisms และ yeasts ที่พบในรูขุมขนและต่อมไขมัน และมีฤทธิ์ละลายสิวอุดตัน (comedolytic) แต่น้อยกว่าอนุพันธ์กรดวิตามินเอ

**วิธีใช้** ทาบางๆ ทุกวันวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น ทาทิ้งไว้แล้วล้างออก

**ผลข้างเคียงและข้อควรระวัง**

- อาจระคายเคืองต่อผิวหนัง ทำให้เกิดอาการผิวแสบ แดง และลอก แนะนำให้เริ่มทายาทิ้งไว้เป็นระยะเวลาสั้นๆ ก่อนเพื่อลดอาการระคายเคือง หลังจากนั้นจึงเพิ่มระยะเวลาในการทายาให้นานขึ้น

- ยาสามารถกัดสีเสื้อผ้าทำให้เสื้อผ้าต่างได้

- Pregnancy category C ไม่แนะนำให้ใช้ในหญิงตั้งครรภ์หรือหญิงให้นมบุตร

**3. ยาปฏิชีวนะชนิดทา (topical antibiotics เช่น clindamycin, erythromycin เป็นต้น)**

**การออกฤทธิ์** ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* และช่วยต้านการอักเสบ (anti-inflammatory)

**วิธีใช้** ทาเฉพาะบริเวณที่เป็นสิวกอักเสบ วันละ 2-3 ครั้ง

**ผลข้างเคียงและข้อควรระวัง**

- อาจระคายเคืองต่อผิว ทำให้เกิดอาการผิวแสบ แดง และลอก

- Pregnancy category B

- ไม่ควรใช้ยาปฏิชีวนะชนิดทาเพียงอย่างเดียว (monotherapy) ในการรักษาสิว เพราะ มีความเสี่ยงต่อการเกิดเชื้อดื้อยา

#### 4. กรดอะเซเลอิก (azelaic acid)

**การออกฤทธิ์** มีฤทธิ์เป็นยาต้านจุลชีพ โดยเฉพาะ *C. acnes* ช่วยลดสิวอุดตัน (comedones) ช่วยต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase จึงช่วยลดรอยดำที่เกิดตามหลังการอักเสบ (post inflammatory hyperpigmentation)

**วิธีใช้** ทาบางๆ ทั่วหน้า วันละ 2 ครั้ง เช้าและก่อนนอน

#### ผลข้างเคียงและข้อควรระวัง

- อาจระคายเคืองต่อผิว ทำให้เกิดอาการผิวแสบและแดง
- Pregnancy category B

#### ยารักษาสิวชนิดรับประทาน

##### 1. ยาปฏิชีวนะ ได้แก่

- ยาปฏิชีวนะกลุ่ม tetracyclines (tetracycline, doxycycline, minocycline) แนะนำให้ใช้เป็นลำดับแรก
- ยาปฏิชีวนะกลุ่ม macrolides (erythromycin, azithromycin) แนะนำให้ใช้ในกรณีที่ไม่สามารถใช้กลุ่ม tetracyclines ได้ เช่น หญิงตั้งครรภ์หรือหญิงให้นมบุตร เด็กอายุต่ำกว่า 8 ปี เป็นต้น
- ยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ เช่น trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX), penicillins เป็นต้น

**การออกฤทธิ์** ยับยั้งการเจริญของ *C. acnes* และช่วยต้านการอักเสบ (anti-inflammatory)

#### วิธีใช้

- Tetracycline ใช้ขนาด 500-1,000 มิลลิกรัม/วัน ขนาดสูงสุด 1,500 มิลลิกรัม/วัน รับประทานก่อนอาหารท้องว่าง
- Doxycycline ใช้ขนาด 100-200 มิลลิกรัม/วัน รับประทานหลังอาหาร

- Erythromycin ใช้ขนาด 1,000 มิลลิกรัม/วัน รับประทานหลังอาหาร

#### ผลข้างเคียงและข้อควรระวัง

- ยาปฏิชีวนะกลุ่ม macrolides จัดอยู่ในกลุ่ม pregnancy category B ผลข้างเคียงที่พบบ่อย ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ถ่ายเหลว

- ยาปฏิชีวนะกลุ่ม tetracyclines จัดอยู่ในกลุ่ม pregnancy category C ผลข้างเคียงที่พบบ่อย ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน อาจพบภาวะไวต่อแสง (photosensirivity)

- ไม่ควรใช้ยาปฏิชีวนะชนิดรับประทานเพียงอย่างเดียว (monotherapy) ในการรักษาสิว เพราะ มีความเสี่ยงต่อการเกิดเชื้อดื้อยา

## 2. อนุพันธ์กรดวิตามินเอชนิดรับประทาน isotretinoin (13-cis-retinoic acid)

**การออกฤทธิ์** ลดการหนาตัวของเซลล์ผิวหนังในรูขุมขนและต่อมไขมัน ลดขนาดต่อมไขมันและลดการผลิตไขมัน โดยปริมาณไขมันที่ลดลงจะส่งผลให้สภาพแวดล้อมในรูขุมขนเปลี่ยนไปจึงมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *C. acnes* และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory)

**วิธีใช้** oral isotretinoin ขนาดที่ใช้ 0.5-1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยรับประทานยาจนถึงขนาดยาสะสม (accumulative dose) 120-150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

### ผลข้างเคียงและข้อควรระวัง

- Pregnancy category X ต้องแนะนำให้คุมกำเนิดอย่างเคร่งครัด โดยควรเริ่มคุมกำเนิดอย่างน้อย 1 เดือนก่อนเริ่มยา ต้องคุมกำเนิดไปตลอดและต่อเนื่องไปอีกอย่างน้อย 1 เดือนภายหลังการหยุดยา

- ผลข้างเคียงที่พบได้บ่อย เช่น ปากแห้ง (พบเกือบทุกราย) ผิวแห้ง ตาแห้ง (ระหว่างที่ใช้ยาไม่ควรใส่คอนแทคเลนส์) ผื่นร่วน ผิวไหม้แดดได้ง่าย (sunburn) ไขมันโลหิตสูง ภาวะตับอักเสบ ส่งผลต่อระบบกระดูกและกล้ามเนื้อได้ เป็นต้น

## 3. ยาประเภทฮอร์โมน ได้แก่ ยาเม็ดคุมกำเนิดชนิดฮอร์โมนรวม (ฮอร์โมนเอสโตรเจนและฮอร์โมนโปรเจสเตอเจน)

### การออกฤทธิ์

- ด้านฮอร์โมนแอนโดรเจน โดยเพิ่มระดับของ sex hormone binding globulin (SHBG)

- กดการสร้างฮอร์โมนแอนโดรเจนจากรังไข่

- ฮอร์โมนโปรเจสเตอเจนมีฤทธิ์ด้านฮอร์โมนแอนโดรเจนด้วยการ block androgen receptor

**วิธีใช้** รับประทานเหมือนการรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิดตามปกติ

### **ผลข้างเคียงและข้อควรระวัง**

- Pregnancy category X

- ผลข้างเคียงที่พบได้ เช่น คลื่นไส้ อาเจียน น้ำหนักตัวเปลี่ยนแปลง เจ็บคัดตึงเต้านม สารคัดหลั่งจากช่องคลอดเปลี่ยนแปลง เป็นต้น

- อาจเพิ่ม ความเสี่ยงในการเกิดโรคหลอดเลือดอุดตัน (thromboembolism) โรคหลอดเลือดสมองตีบ (stroke) โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (myocardial infarction) และมะเร็งเต้านม

### **การรักษาเสริม (adjunctive therapy)<sup>(6, 35)</sup>**

1. การกดสิว (comedone extraction) เป็นหัตถการที่ใช้อุปกรณ์สำหรับกดสิว (extractor) กดเพื่อเอาสารที่อยู่ภายในรอยโรคสิวออกมา

2. การฉีดยาสเตียรอยด์เข้าที่สิว (intralesional steroid) เป็นการยาสเตียรอยด์เข้ารอยโรคสิวที่อักเสบหรือสิวที่เป็นซิสต์ เพื่อทำให้การอักเสบลดลงเร็วขึ้น

3. การรักษาด้วยแสงและเลเซอร์ (laser therapy and light therapy) เป็นหัตถการที่เลือกแสงและเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่นที่เหมาะสม มีกลไกในการลดการผลิตไขมัน มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *C. acnes* และช่วยด้านการอักเสบ (anti-inflammatory)

4. การใช้สารเคมีลอกผิว (chemical peeling) เป็นหัตถการที่ใช้กรดผลไม้มาทาบนผิวหนัง เพื่อกำจัดเซลล์ผิวหนังที่เสียออกไปและกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังใหม่ ช่วยลดสิวอุดตัน (comedones) และช่วยด้านการอักเสบ (anti-inflammatory)

## **2. เชื้อแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* และการดื้อยาปฏิชีวนะ**

เชื้อแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ (family) Propionibacteriaceae สกุล (genus) *Propionibacterium* ซึ่งพบเป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนังมนุษย์ (normal flora)<sup>(36)</sup> โดย *C. acnes* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่อาศัยออกซิเจนในการหายใจ (gram positive anaerobic bacteria) มีโครโมโซม เป็นวงกลมเดี่ยว (single circular chromosome) ประกอบด้วย 2,333 ยีนส์<sup>(37, 38)</sup> พบบริเวณรูขุมขนและต่อมไขมัน ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ lipases, proteases และ hyaluronidases ไปทำลายเนื้อเยื่อในผิวหนัง และหลั่ง pro-inflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) และ interleukin 8 (IL-8) ซึ่งจะก่อให้เกิดหนังกำพร้าบริเวณรูขุมขนแบ่งตัวมากขึ้นจนเกิดการอุดตันในรูขุมขน (hypercornification of the infundibulum of pilosebaceous follicles)

ทั้งก่อให้เกิดการรวมตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบและเกิดเป็นสิ่วอุดตันขึ้น (comedone formation) นอกจากนี้ เชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) ผ่าน toll-like receptors (TLR) จะไปจับกับ TLR-2 และ TLR-4 ทำให้เกิดการอักเสบที่ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน humoral immunity ให้มีการสร้าง IgG และกระตุ้นระบบ complement ก่อให้เกิดการอักเสบได้ด้วย<sup>(36, 39, 40)</sup>

เนื่องจากความแพร่หลายในการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งรูปแบบยาทาและยารับประทานในการรักษาสิวและโรคผิวหนังอื่นๆ เช่น โรคผิวหนังอักเสบโรซาเซีย (rosacea) เป็นต้น จึงทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* เพิ่มมากขึ้น การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียนั้นเกิดจากการกลายพันธุ์ของโครโมโซมเป็นหลัก<sup>(41)</sup>

โดยมีการศึกษากลไกการดื้อยาของเชื้อก่อโรค *C. acnes* ที่ดื้อต่อ tetracycline, erythromycin และ clindamycin พบว่ามีการกลายพันธุ์ระดับยีน (point mutation) บน rRNA เชื้อที่ดื้อต่อ erythromycin และ clindamycin พบว่ามีการกลายพันธุ์เฉพาะจุดบนยีนส์ 23S rRNA ลำดับเบสที่ 2057-2059 เป็นตำแหน่งที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ peptidyl transferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสร้าง RNA และเชื้อที่ดื้อต่อ tetracycline พบว่ามีการกลายพันธุ์เฉพาะจุดบนยีนส์ 16S rRNA ลำดับเบสที่ 1058 และเชื้อที่ดื้อต่อ macrolide, lincosamide, และ type B streptogramin (MLS) พบว่ามีการกลายพันธุ์เฉพาะจุดบนยีนส์ 23S rRNA ลำดับเบสที่ 2059<sup>(42, 43)</sup>

การรักษาสิวด้วยยาปฏิชีวนะชนิดทา เช่น erythromycin, clindamycin เป็นต้น เป็นวิธีในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ซึ่งการรักษาสิวด้วยยาปฏิชีวนะชนิดทาเพียงอย่างเดียวก่อให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยาที่เพิ่มมากขึ้นกว่าการรักษาพร้อมกับยาทาเฉพาะที่ชนิดอื่นๆ โดยในสหรัฐอเมริกามีการศึกษาสำรวจการรักษาสิวด้วยยาปฏิชีวนะชนิดทาอย่างเดียวในปี ค.ศ. 1995 พบอัตราการใช้มากถึงร้อยละ 10 และพบว่าอัตราการใช้ลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงปี ค.ศ. 2010 เหลือเพียงร้อยละ 5 แม้ว่าอัตราการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดทาเพียงอย่างเดียวจะลดลงอย่างมากแต่ยังคงพบปัญหาเชื้อดื้อยาจากการรักษาสิวด้วยยาปฏิชีวนะชนิดทา<sup>(9)</sup>

สำหรับในประเทศไทย เนื่องจากประชากรสามารถหาซื้อยาปฏิชีวนะทั้งรูปแบบยาทาและยารับประทานได้ง่าย และผู้ป่วยยังไม่ทราบวิธีการรักษาสิวที่เหมาะสมจึงทำให้ผลการรักษาไม่ดีเท่าที่ควรและพบปัญหาเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้น จึงมีการศึกษาในปี ค.ศ. 2017 Laochunswan A.<sup>(10)</sup> ทำการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *C. acnes* กับยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด ได้แก่ erythromycin, clindamycin, tetracycline, doxycycline และ amoxicillin พบว่ามีเชื้อที่ดื้อต่อยา

ปฏิชีวนะ clindamycin 47 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 62.66 ติดต่อยา erythromycin 48 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 64 ติดต่อยา tetracycline 1 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 1.33 สรุปภาพรวมคือ เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ erythromycin มากที่สุด รองลงมา คือ clindamycin และ tetracycline ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (minimal inhibitory concentration/MIC) ที่ความเข้มข้นต่ำ และพบว่าผู้ป่วยที่เคยมีประวัติใช้ยาปฏิชีวนะมาก่อน จะพบเชื้อ *C. acnes* ดื้อยามากกว่ากลุ่มที่ไม่มีประวัติใช้ยาปฏิชีวนะมาก่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ doxycycline และ amoxicillin

### 3. สมุนไพรไทย

สมุนไพร<sup>(44, 45)</sup> คือ สารที่ได้จากธรรมชาติ อาจได้จากพืช สัตว์ หรือแร่ธาตุ ที่มีคุณสมบัติในการบำบัดโรค บำรุงร่างกาย หรือใช้เป็นยาพิษ ความหมายของยาสมุนไพรในพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 ได้ระบุว่า “ยาสมุนไพร หมายความว่า ยาที่ได้จากพืช สัตว์ หรือแร่ธาตุ ซึ่งมีได้ผลสมปรุงหรือแปรรูป เช่น พืชก็ยังเป็นส่วนของราก ลำต้น ใบ ดอก ผล ฯลฯ ซึ่งมีได้ผ่านขั้นตอนการแปรรูปใดๆ” และในปัจจุบันมีการนำพืชสมุนไพรมาสกัด ดัดแปลง และแปรรูปเป็นยาแผนปัจจุบันเพื่อใช้รักษาโรคในระบบต่างๆ เช่น โรคในระบบทางเดินอาหาร โรคในระบบทางเดินหายใจ โรคในระบบกล้ามเนื้อ รวมทั้งโรคในระบบผิวหนังด้วย

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมไปด้วยพืชสมุนไพรนานาชนิดเหมาะแก่การนำมาพัฒนาและประยุกต์ให้มีประสิทธิภาพดีเพื่อใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ จึงนำมาสู่การหาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแล้วนำมาทดสอบกับเชื้อ *C. acnes* ดังการทบทวนวรรณกรรมตาราง 1

ตาราง 1 สรุปการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวกับการนำพืชสมุนไพรมาศึกษาในห้องทดลอง เพื่อดูความสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes*

| Author, Year                       | Title                                                                                                                                                                                | Results                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Chomnawang<br>2005 <sup>(13)</sup> | Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria                                                                                                        | สารสกัดจากสมุนไพรไทย 19 ชนิด พบว่า 13 ชนิด ได้แก่ ฟ้าทลายใจ, สะเดา, เสลดพังพอน, สدابเสือ, มังคุด, กระจับปี่แดง, พญาคาว, เทียนกิ่งขาว, ฝรั่ง, ชุมเห็ดเทศ, ชุมเห็ดเล็ก, ขี้เหล็ก และดาวเรือง มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดยดูจากค่า MIC และ MBC |
| Lim<br>2007 <sup>(46)</sup>        | <i>In vitro</i> activity of kaempferol isolated from the <i>Impatiens balsamina</i> alone and in combination with erythromycin or clindamycin against <i>Propionibacterium acnes</i> | สารสกัดจากต้นเทียนดอก มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> ทั้งชนิดเดี่ยวและไม่ได้อย่าปฏิชีวนะคลินดามัยซิน โดยดูจากค่า MIC                                                                                                                              |
| Niyomkam<br>2010 <sup>(11)</sup>   | Antibacterial activity of Thai herbal extracts on acne involved microorganism                                                                                                        | สารสกัดจากสมุนไพรไทย 18 ชนิด พบว่า 10 ชนิด ได้แก่ กระเทียม, ข่า, ขิง, สدابเสือ, มะขามป้อม, หว้า, ว่านมหากาฬ, ฝรั่ง, ทับทิม และขี้เหล็ก มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดยดูจากค่า MIC                                                             |

ตาราง 1 (ต่อ)

| Author, Year                        | Title                                                                                                                       | Results                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pothitirat<br>2010 <sup>(47)</sup>  | Free radical scavenging and anti-acne activities of mangosteen fruit rind extracts prepared by different extraction methods | สารสกัดจากเปลือกมังคุด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดยดูจากค่า MIC                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Puttarak<br>2010 <sup>(48)</sup>    | Antimicrobial activity and stability of rhinacanthins-rich <i>Rhinacanthus nasutus</i> extract                              | สารสกัดจากใบทองพันชั่ง มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดยดูจากค่า MIC และ MBC                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Chaichompoo<br>2011 <sup>(49)</sup> | Growth Inhibition of Some Pathogenic Bacteria by Local Medicinal Plant Extracts                                             | สารสกัดจากพืชในประเทศไทย 10 ชนิด พบว่า 3 ชนิด ได้แก่ มะเนียงน้ำ, กลอย และ มะยม มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดยดูจากค่า MIC และ MBC                                                                                                                                                                                                                 |
| Azimi<br>2012 <sup>(50)</sup>       | A review of phytotherapy of acne vulgaris: Perspective of new pharmacological treatments                                    | สารสกัดจากพืช 81 ชนิด พบว่า 37 ชนิด ได้แก่ สนเกาหลี, เถาเอ็นอ่อน, แฮ้ม, ครามป่า, น้ำนมราชสีห์, เหมือดหอม, เพปโป, กะเม็ง, เลมอนไมร์ทิล, ชุมเห็ดเทศ, สدابเสือ, มังคุด, เสลดพังพอน, ชาเขียว, เอ็กไคนาเซีย, โกรฐจุฬารศ, ถั่วยทอง, ยูคาลิปตัสวิมินาลิส, ไต๋วต่ง, กุหลาบ, เยอบาเมาเต้, เทียนดอก, วอลนัต, ฝรั่ง, ย่านลิเภา, พืชตระกูลบัวตอง, แมกโนเลีย, องุ่นโอเรกอน, กะเพรา, พุด |

ตาราง 1 (ต่อ)

| Author, Year                        | Title                                                                                                                                                                                                                                                  | Results                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                     |                                                                                                                                                                                                                                                        | ต่าง, ว่างหางจระเข้, พืชตระกูลสน, ทับทิม, พืชตระกูลมินต์, ทองพันชั่ง, ทามาริสก์ และ สมอเทศ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อ <i>C. acnes</i> โดยดูจากค่า MIC                                              |
| Rattanasena<br>2012 <sup>(51)</sup> | Antioxidant and Antibacterial Activities of Vegetables and Fruits Commonly Consumed in Thailand                                                                                                                                                        | สารสกัดจากผักและผลไม้ในประเทศไทย 16 ชนิด พบว่า 7 ชนิด ได้แก่ ผักกระเฉด, ผักแขยง, มะรุม, ตะขบป่า, มะขามป้อม, หมากรูด และสมอไทย มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดยดูจากค่า MIZ            |
| Dej-adisai<br>2014 <sup>(52)</sup>  | Antityrosinase and antimicrobial activities from Thai medicinal plants                                                                                                                                                                                 | สารสกัดจากพืชในประเทศไทย 77 ชนิด พบว่า 7 ชนิด ได้แก่ แก้ว, จำปาตะ, ตะลิงปลิง, มะจั่ว, มะเดื่อชุมพร, มะอึก และหัวร้อยรู มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดยดูจากค่า MIC และ MBC           |
| Deewongkij<br>2018 <sup>(12)</sup>  | <i>In-vitro</i> study of antibacterial activities of <i>Phyllanthus emblica</i> L. leaves, <i>Punica granatum</i> L. peels, and <i>Curcuma longa</i> L. rhizomes crude extracts to <i>Propionibacterium acnes</i> isolated from acne vulgaris patients | สารสกัดจากใบมะขามป้อม เปลือกทับทิม และเหง้าขมิ้นชัน พบว่าสารสกัดจากใบมะขามป้อมและเปลือกทับทิม มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> ทั้งชนิดดื้อยาและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ โดยดูจากค่า MIZ และ MIC |

#### 4. มะขามป้อมกับการรักษาผิว

ข้อมูลพรรณไม้<sup>(53-58)</sup>

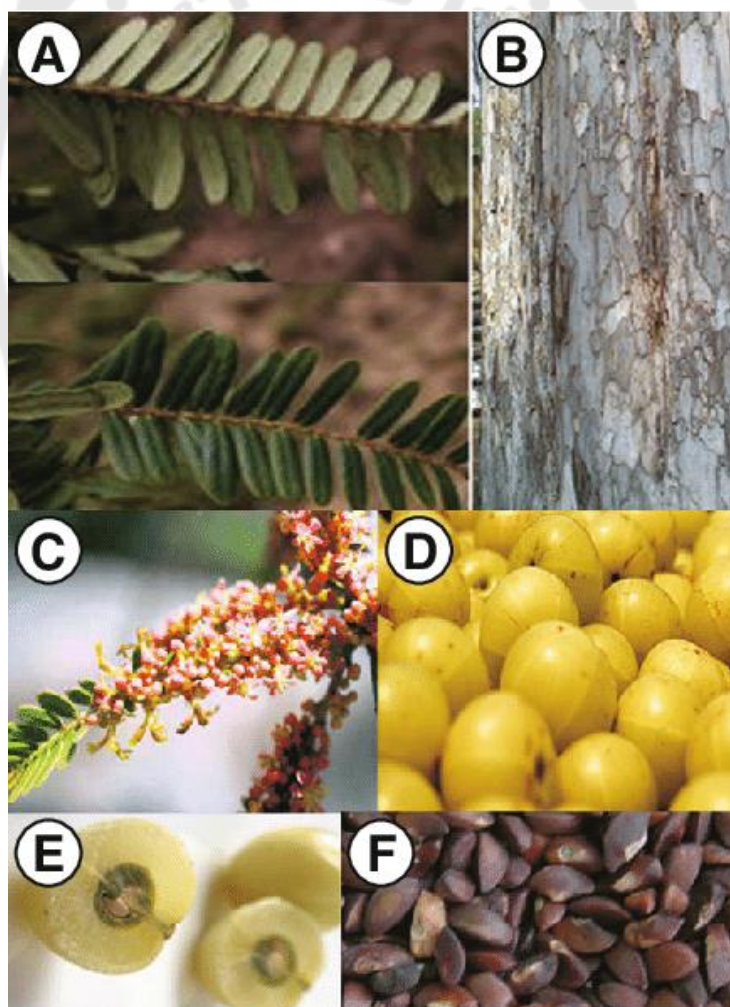
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Phyllanthus emblica* Linn. หรือ *Emblca officinalis* Gaertn.

ชื่อสามัญ : Indian gooseberry หรือ amla

วงศ์ : Phyllanthaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

- เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กจนถึงกลาง สูง 8-18 เมตร
- ใบเดี่ยว ขนาดใบสั้น สีเขียวอ่อนเรียงชิดกัน
- ดอกสีเหลืองอมเขียว ขนาดเล็ก
- ผลสุกมีสีน้ำตาลอมเหลืองทรงกลม เนื้อผลมีรสฝาดเปรี้ยว ขมและอมหวาน



ภาพประกอบ 14 แสดงมะขามป้อม (A ใบ, B ลำต้น, C ดอก, D ผล, E เนื้อ, F เมล็ด)<sup>(54)</sup>

มะขามป้อมเป็นพืชที่ปลูกมากในประเทศเขตร้อน ได้แก่ จีน อินเดีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นับเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เพราะอุดมไปด้วยกรดอะมิโน วิตามินซี และแร่ธาตุต่างๆ และทุกส่วนของมะขามป้อมสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นสมุนไพรในทางการแพทย์ เช่น ยาฆ่าเชื้อ ยาต้านการอักเสบ ยาต้านมะเร็ง ยารักษาโรค เป็นต้น

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในมะขามป้อม (bioactive compounds in indian gooseberry) ในแต่ละส่วนของมะขามป้อมประกอบไปด้วยสารประกอบหลายชนิด<sup>(53-58)</sup> ได้แก่ tannins, amino acids, alkaloids, flavonoids, phenolic compounds, carbohydrates และ vitamins โดยสารสกัดจากใบมะขามป้อม ประกอบด้วย gallic acid, ellagic acid, chebulic acid, chebulinic acid, chebulagic acid, amlic acid, alkaloids, phyllanthidine และ phyllantine ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (antiviral activity) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (antifungal activity) และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้ง pro-inflammatory cytokines ต่างๆ ได้แก่ IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-12 โดย IL-12 เป็นหนึ่งใน pro-inflammatory cytokines ที่ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบของผิว

โดย tannins เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในมะขามป้อมที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) ด้วยการยับยั้งการขนส่งโปรตีนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ (inhibit cells envelop transport proteins) และนอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ (inhibit microbial adhesions) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (inhibit extracellular microbial enzymes) เช่น lipases, proteases, hyaluronidases เป็นต้น<sup>(59)</sup> และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)<sup>(68)</sup> โดยสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid oxidation) ที่เป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) นอกจากนี้ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในมะขามป้อมอื่นๆ เช่น สาร phenolic compounds มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) สาร flavonoids มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างเม็ดสี (melanin) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ซึ่งมีหน้าที่ย่อยสลายคอลลาเจนในผิวหนัง (tyrosinase and collagenase inhibitory activity)<sup>(69)</sup> และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) เช่นเดียวกับ tannins และ phenolic compounds<sup>(68)</sup>

ปัจจุบันมีการศึกษาคุณสมบัติและประโยชน์ในทางการแพทย์ของมะขามป้อมมากมาย รวมทั้งคุณสมบัติของมะขามป้อมกับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ในปี ค.ศ. 2010 Niyomkam P. และคณะ<sup>(11)</sup> ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจาก

สมุนไพรไทย 18 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว ซึ่งได้แก่ เชื้อ *C. acnes*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ด้วยวิธีการ broth dilution method ผลการศึกษาพบว่า มีสารสกัดจากสมุนไพรไทย 13 ชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* และสารสกัดจากสมุนไพรไทย 14 ชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งพบว่าสารสกัดจากใบมะขามป้อมเป็นหนึ่งในสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* โดยจากการศึกษาพบว่า มีค่า MIC  $2.5 \times 10^3$  ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ ค่า MBC  $5 \times 10^3$  ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และในปี ค.ศ. 2018 Deewongkij P.<sup>(12)</sup> ได้ทำการศึกษาในหลอดทดลองเกี่ยวกับความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ของสารสกัดจากหยาดจากใบมะขามป้อม โดยใส่สารสกัดหยาดจากใบมะขามป้อมที่มีความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ทั้งกลุ่มดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ได้ โดยมีค่า MIC = 0.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในกลุ่มดื้อยาปฏิชีวนะ และ 0.557 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในกลุ่มไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ จึงสรุปได้ว่าสารสกัดหยาดจากใบมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ทั้งกลุ่มดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะได้

ตาราง 2 แสดงสรุปการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวกับการศึกษาสารสกัดจากมะขามป้อมกับเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ในหลอดทดลอง

| Author, Year                        | Title                                                                                                    | Results                                                                                                              |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Niyomkam<br>2010 <sup>(11)</sup>    | Antibacterial activity of Thai<br>herbal extracts on acne involved<br>microorganism                      | สารสกัดจากมะขามป้อม มีฤทธิ์ในการ<br>ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดย<br>มีค่า MIC $2.5 \times 10^3$ ug/ml |
| Rattanasena<br>2012 <sup>(51)</sup> | Antioxidant and Antibacterial<br>Activities of Vegetables and<br>Fruits Commonly Consumed in<br>Thailand | สารสกัดจากมะขามป้อม มีฤทธิ์ในการ<br>ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดย<br>มีค่า MIZ 1.68 ซม.                |

ตาราง 2 (ต่อ)

| Author, Year                       | Title                                                                                                                                                                                                                                                  | Results                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Deewongkij<br>2018 <sup>(12)</sup> | <i>In-vitro</i> study of antibacterial activities of <i>Phyllanthus emblica</i> L. leaves, <i>Punica granatum</i> L. peels, and <i>Curcuma longa</i> L. rhizomes crude extracts to <i>Propionibacterium acnes</i> isolated from acne vulgaris patients | สารสกัดจากใบมะขามป้อม เปลือกทับทิม และเหง้าขมิ้นชัน พบว่าสารสกัดจากใบมะขามป้อม มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> ทั้งชนิดดื้อยาและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ โดยมีค่า MIZ $14.99 \pm 3.77$ มล. และ MIC $0.599 \pm 0.685$ mg/ml |

## 5. มังคุดกับการรักษาสิว

ข้อมูลพรรณไม้<sup>(60, 61)</sup>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Garcinia mangostana* Linn. หรือ *Embllica officinalis* Gaertn.

ชื่อสามัญ : Mangosteen

วงศ์ : Guttiferae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

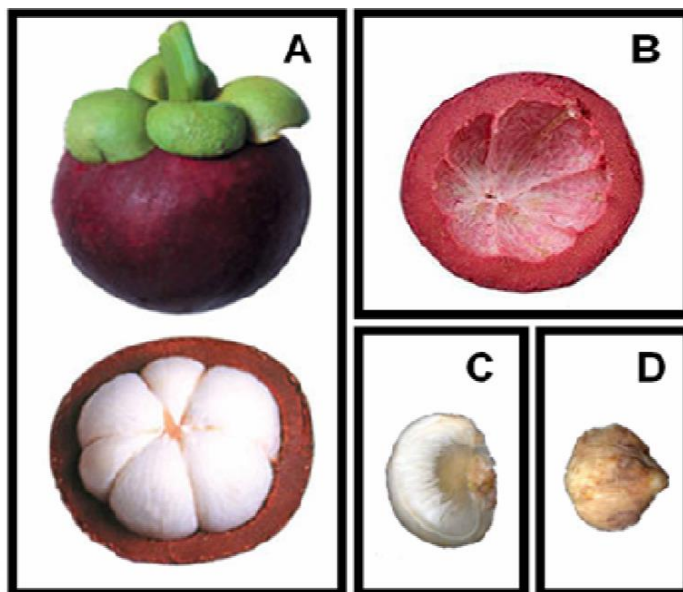
- ไม้ต้น สูง 10 - 12 เมตร ทุกส่วนมียางสีเหลือง

- ใบเดี่ยว รูปไข่หรือรูปวงรีแกมขอบขนาน เนื้อใบหนาเหนียว คล้ายหนัง หลังใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ท้องใบสีอ่อน

เจียวเข้มเป็นมัน ท้องใบสีอ่อน

- ดอกเดี่ยวหรือเป็นคู่ ออกที่ซอกใบ โกล่ปลายเป็นกิ่ง กลีบดอกสีแดง

- ผลเป็นผลสด สีม่วงแดง ค่อนข้างกลม



ภาพประกอบ 15 แสดงมังคุด (A ผลมังคุด B เปลือกมังคุด C เนื้อมังคุด D เมล็ดมังคุด)<sup>(60)</sup>

มังคุดได้รับการขนานนามว่า “ราชินีแห่งผลไม้เขตร้อน”<sup>(62)</sup> เนื่องจากมีชื่อเสียงโดดเด่นทางด้านรสชาติที่อร่อย มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจ มีคุณค่าทางโภชนาการที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายมากมาย และยังมีการนำมาใช้เป็นสมุนไพรในทางการแพทย์ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีการนำส่วนต่างๆ ของมังคุดมาใช้เป็นยารักษาโรคมานานหลายร้อยปีแล้ว อาทิเช่น ใช้เป็นยารักษาโรคบิด โรคท้องร่วง บาดแผลติดเชื้อที่ผิวหนัง โรคผิวหนังต่างๆ เป็นต้น

#### สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในมังคุด (bioactive compounds in mangosteen)<sup>(60, 62-65)</sup>

ในมังคุดประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิด ได้แก่ xanthones, tannins, flavonoids, anthocyanins และ phenolic acids โดยมีสารประกอบหลัก คือ xanthones ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenol compounds) ที่มีโครงสร้างวงอะโรมาติก 3 วง

มีการศึกษาพบสาร xanthones มากกว่า 60 ชนิดจากส่วนต่างๆ ของมังคุด โดยสาร xanthones หลักที่พบในมังคุด คือ  $\alpha$ -mangostin และ  $\gamma$ -mangostin และยังพบสาร xanthones อื่นๆ ได้แก่  $\beta$ -mangostin, 1-isomangostin, 3-isomangostin, 9-hydroxycalabaxanthone, 8-deoxygartanin, demethyl-calabaxanthone, garcinone B, garcinone D, garcinone E, gartanin, mangostanol, mangostanin และ mangostinone โดยสารหลักที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว คือ  $\alpha$ -mangostin ที่มีกลไกในการทำลายความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (disintegrate the cytoplasmic membrane integrity) ซึ่งเป็นกลไกหลักในการ

ออกฤทธิ์ และมีกลไกอื่น ๆ ได้แก่ ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ (inhibit the biofilm formation of microbe) ทำให้การแสดงออกของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวกับการแบ่งเซลล์ การสังเคราะห์ DNA และกระบวนการสร้างกรดไขมันลดลง (downregulation of genes involved cell division, DNA replication, and fatty acid biosynthetic pathway) นอกจากนี้ สาร xanthones ยังมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) และฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) โดยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid oxidation) ที่เป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical)

โดยสรุปสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในมังคุดมีคุณสมบัติหลายด้านทางชีวภาพและทางการแพทย์ ได้แก่ ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (antiviral activity) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (antifungal activity) ป้องกันการเกิดสิวจากเชื้อแบคทีเรีย (anti-acne-causing bacteria) และมีฤทธิ์ในการยับยั้ง pro-inflammatory cytokines :  $\text{TNF-}\alpha$  ซึ่งเป็นหนึ่งในกระบวนการเกิดสิว

โดยในปี ค.ศ. 2005 Chomnawang M. และคณะ<sup>(13)</sup> ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรวไทย 19 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว ซึ่งได้แก่ เชื้อ *C. acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* ด้วยวิธีการ disc diffusion method และ broth dilution method ผลการศึกษาพบว่ามีการสกัดจากสมุนไพรวไทย 13 ชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* และสารสกัดจากมังคุดเป็นหนึ่งในสมุนไพรวไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* โดยจากการศึกษาพบว่าค่า MIC 0.039 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC 0.039 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมิต้านน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากสมุนไพรวไทยชนิดอื่นๆ ที่ทำการศึกษา จึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากมังคุดฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* มากที่สุดในการศึกษา

ต่อมา Pothitirat W. และคณะ<sup>(66)</sup> ได้ทำการศึกษาต่อในปี ค.ศ. 2009 โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* และ *S. epidermidis* กับระดับความเข้มข้นของสารสกัด  $\alpha$ -mangostin จากเปลือกมังคุดจาก 13 จังหวัดของประเทศไทย พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่มีระดับความเข้มข้นของสาร  $\alpha$ -mangostin สูงที่สุดมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC = 7.81 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC = 15.63 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่า ระดับความเข้มข้นของสารสกัด  $\alpha$ -mangostin จากเปลือกมังคุด มีผลต่อ

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* โดยระดับความเข้มข้นของสาร  $\alpha$ -mangostin ที่สูงกว่าจะยิ่งเพิ่มความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes*

นอกจากตัวอย่างการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น ยังมีการนำสารสกัดจากเปลือกมังคุด มาศึกษาในห้องทดลอง เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ดังการทบทวนวรรณกรรมในตาราง 3

ตาราง 3 แสดงสรุปการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวกับการศึกษาสารสกัดจากมังคุดกับเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ในหลอดทดลอง

| Author, Year                       | Title                                                                         | Results                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Chomnawang<br>2005 <sup>(13)</sup> | Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria | สารสกัดจากมังคุด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> ได้ดีที่สุด โดยพิจารณาจากค่า MIC 0.039 mg/ml ซึ่งมีค่า MIC น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากสมุนไพรไทย 19 ชนิด |

ตาราง 3 (ต่อ)

| Author, Year                       | Title                                                                                                                                             | Results                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pothitirat<br>2009 <sup>(66)</sup> | Anti-acne inducing bacteria activity and $\alpha$ -mangostin content of <i>Garcinia mangostana</i> fruit rind extracts from different provenience | สารสกัดจากเปลือกมังคุดที่นำมาศึกษาจาก 13 จังหวัดของประเทศไทย พบว่า สารสกัดที่มีระดับความเข้มข้นของสาร $\alpha$ -mangostin สูงที่สุด มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>C. acnes</i> ได้มากที่สุด สรุปได้ว่ายิ่งระดับความเข้มข้นของสาร $\alpha$ -mangostin สูงจะยิ่งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>C. acnes</i> เพิ่มมากขึ้น |
| Pothitirat<br>2010 <sup>(47)</sup> | Free radical scavenging and anti-acne activities of mangosteen fruit rind extracts prepared by different extraction methods                       | สารสกัดจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วย 95% เอทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วย 50% และ 70% เอทานอล โดยดูจากค่า MIC                                                                                                                                                              |

จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาสารสกัดจากมะขามป้อมและสารสกัดจากมังคุดกับเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ในหลอดทดลองที่กล่าวมาข้างต้น พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้ดี จึงเป็นที่มาของการนำสมุนไพร 2 ชนิดนี้มาศึกษาการเสริมฤทธิ์กันในงานวิจัยนี้

## 6. วิธีการสกัดสมุนไพร<sup>(70)</sup>

เนื่องจากสารประกอบในสมุนไพรมีหลายชนิดและมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จึงต้องเลือกวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสมุนไพร ซึ่งมีหลายวิธี ดังนี้

- **การกลั่น (distillation)** นิยมในการสกัดสารที่ระเหยง่าย ไม่ละลายน้ำ และไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำ โดยเฉพาะกับการสกัดน้ำมันหอมระเหย (essential oils) จากส่วนต่างๆ ของพืช ใช้หลักการทำให้สารสำคัญหรือน้ำมันหอมระเหยระเหยเป็นไอและควบแน่นเป็นของเหลว โดยใช้ความร้อนหรือไอน้ำร้อนพาน้ำมันหอมระเหยออกมาจากพืชสมุนไพร โดยน้ำหรือไอน้ำจะแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อของพืช ความร้อนจะทำให้น้ำมันหอมระเหยกลายเป็นไอน้ำมาควบแน่นกับน้ำร้อนหรือไอน้ำและถูกส่งไปตามท่อและผ่านระบบหล่อเย็น และจะถูกควบแน่นกลายเป็นของเหลว

- **การสกัดแบบเพอร์โคเลชัน (percolation)** เป็นการใช้เครื่องชง (percolator) ทำได้โดยหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายผ่านอุปกรณ์เครื่องชง และปล่อยให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้าๆ พร้อมกับละลายสารสำคัญจากผงสมุนไพรออกมา

- **การสกัดแบบต่อเนื่อง (soxhlet extraction)** เป็นกระบวนการสกัดสารโดยการใช้ความร้อน และตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ โดยใช้เครื่องมือที่เป็นระบบปิดเรียกว่า soxhlet extractor วิธีการ คือ ใส่ตัวทำละลายลงในขวดบรรจุ (boiling flask) และให้ความร้อนเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยกลายเป็นไอไปตามช่อง (distillation path) โดยไอจะระเหยขึ้นสู่ส่วนบนซึ่งต่อกับเครื่องควบแน่น (condenser) แล้วถูกควบแน่นตกลงมาสู่ภาชนะที่บรรจุผงสมุนไพรไว้ (extraction thimble) เมื่อตัวทำละลายใน extraction chamber เพิ่มสูงขึ้นจนถึงระดับกาลักน้ำ (siphon arm) ตัวทำละลายจะไหลกลับสู่ขวดบรรจุตัวทำละลายด้านล่าง การสกัดจึงหมุนเวียนต่อเนื่องกัน ข้อดีคือ ประหยัดตัวทำละลาย ทำให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูง และสมุนไพรจะไม่ถูกความร้อนสูงเท่ากับการต้มโดยตรง แต่ไม่เหมาะกับพืชสมุนไพรและสารสำคัญที่ไม่ทนความร้อน

- **การสกัดแบบหมัก (maceration)** ทำโดยแช่ผงสมุนไพรในตัวทำละลาย จนกระทั่งตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปละลายสารสำคัญในผงสมุนไพรออกมา โดยระยะเวลาในการแช่ผงสมุนไพรในตัวทำละลายประมาณ 2-4 วัน หรือจนกระทั่งสารสำคัญที่ต้องการออกมาหมด หลังจากนั้นจึงกรองแยกกากสมุนไพรออกจากตัวทำละลาย ข้อดี คือ เหมาะกับสารสำคัญที่ไวต่อความร้อน ข้อเสีย คือ ต้องกวนบ่อย ใช้ตัวทำละลายมาก และมีค่าใช้จ่ายสูง

- **การสกัดโดยใช้ไขมัน (enfleurage)** เป็นวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม มักใช้กับดอกไม้กลีบบาง ขั้นตอน คือ วางกลีบดอกไม้ลงบนไขมันที่เกลี่ยไว้ ตั้งทิ้งไว้ กลิ่นของดอกไม้จะละลายในไขมัน จากนั้นเปลี่ยนกลีบดอกไม้ชุดใหม่ ทำซ้ำประมาณ 7-10 ครั้ง จนกว่าไขมันจะอิ่มตัว

หลังจากนั้นใช้ตัวทำละลาย เช่น แอลกอฮอล์สกัดกลั่นออกจากไขมัน และระเหยตัวทำละลายออก ที่อุณหภูมิและความดันต่ำ จะได้หัวน้ำหอมที่มีความเข้มข้นมาก แล้วนำมาแช่เย็นเพื่อแยกส่วนที่เป็นไขออก จะได้หัวน้ำหอมที่บริสุทธิ์ขึ้น

- **การสกัดด้วยของไหลวิกฤติยิ่งยวด (supercritical fluid extraction)** เป็นการสกัดที่อาศัยคุณสมบัติของตัวทำละลายที่สภาวะวิกฤติ ซึ่งของไหลวิกฤติยิ่งยวดเกิดจากการเพิ่มความดันและอุณหภูมิให้สูงกว่าจุดวิกฤติ (critical point) ของตัวทำละลายนั่นๆ โดยของไหลวิกฤติยิ่งยวดมีความสามารถในการสกัดสารสำคัญออกจากพืชสมุนไพรได้ดี เนื่องจากตัวทำละลายดังกล่าวมีคุณสมบัติอยู่ระหว่างของเหลวและแก๊ส คือ มีความหนาแน่นค่อนข้างสูงคล้ายของเหลว แต่จะมีความหนืดต่ำ ทำให้มีความสามารถในการแพร่เข้าไปในโครงสร้างของของแข็งได้ดี แต่มีต้นทุนของอุปกรณ์ที่มีราคาค่อนข้างสูง

- **การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave-assisted extraction; MAE)** เป็นวิธีการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่อยู่ในช่วง  $3 \times 10^2 - 3 \times 10^5$  เมกะเฮิรตซ์ และความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 0.01–1.00 เมตร ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดทำให้เกิดเสียดสีกันและเกิดความร้อนขึ้นและเกิดการสกัดสารสำคัญออกมา ข้อจำกัด คือ ไม่สามารถใช้ร่วมกับตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน เนื่องจากตัวทำละลายจะไม่สามารถดูดซับพลังงานคลื่นไมโครเวฟได้

- **การสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound assisted extraction; UAE)** เป็นการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในช่วง 20–100 กิโลเฮิรตซ์ เพื่อทำให้เกิดการสั่นสะเทือนในตัวทำละลายจะทำให้เกิดการสกัดและเกิดการปลดปล่อยสารสำคัญจากสมุนไพรออกมา ข้อดี คือ ลดระยะเวลา อุณหภูมิ ลดขนาดของอุปกรณ์ลง และได้ปริมาณสารสกัดสูงกว่า เมื่อเทียบกับการสกัดแบบหมักและการสกัดแบบต่อเนื่อง

## 7. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial testing)<sup>(14-24)</sup>

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antibacterial testing) คือ การทดสอบในหลอดทดลองเพื่อหาหาหรือสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ ซึ่งทำให้เกิดการค้นพบยารักษาโรคและช่วยในการพยากรณ์การตอบสนองของยา มีวิธีที่เป็นมาตรฐาน ดังนี้ dilution method, diffusion method และ antimicrobial gradient test

## 1. Dilution method

เป็นวิธีการตรวจสอบหาความเข้มข้นของยาที่ระดับต่ำสุด (minimum inhibition concentration; MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ โดยการเจือจางยาให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า (two-folded serial dilution) ใส่ลงในเชื้อที่กำลังเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสามารถทำได้ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดของเหลวและชนิดวุ้น โดยความเข้มข้นของยาที่ระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพได้ คือ ความเข้มข้นของยาที่ระดับต่ำสุดที่มองไม่เห็นการเจริญของเชื้อ โดยสามารถแปลผลได้ 2 แบบ คือ การแปลผลเชิงคุณภาพ (qualitative) เช่น เชื้อที่ทดสอบมีความไวต่อยา (susceptible) มีความไวต่อยาปานกลาง (intermediate) หรือดื้อยา (resistant) และการแปลผลเชิงปริมาณ (quantitative) เช่น ค่า MIC เป็นต้น โดย dilution method สามารถทำได้ 2 วิธี ดังนี้

**1.1 Agar dilution method** เป็นการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ ด้วยวิธีการนำยาหรือสารที่ต้องการทดสอบที่มีระดับความเข้มข้นต่างๆ กันมาผสมในวุ้น (agar) และใส่ในจาน หลังจากนั้นนำเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เจือจางแล้ว มาป้ายเป็นจุดลงบนจานวุ้นที่ผสมยาหรือสารที่ต้องการทดสอบ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงสังเกตการเจริญของเชื้อในจานวุ้นแต่ละระดับความเข้มข้นของยาหรือสารที่ต้องการทดสอบ โดยระดับความเข้มข้นของยาหรือสารที่ต้องการทดสอบที่ต่ำที่สุดที่เชื้อไม่เจริญเติบโต คือ ค่า minimal inhibitory concentration

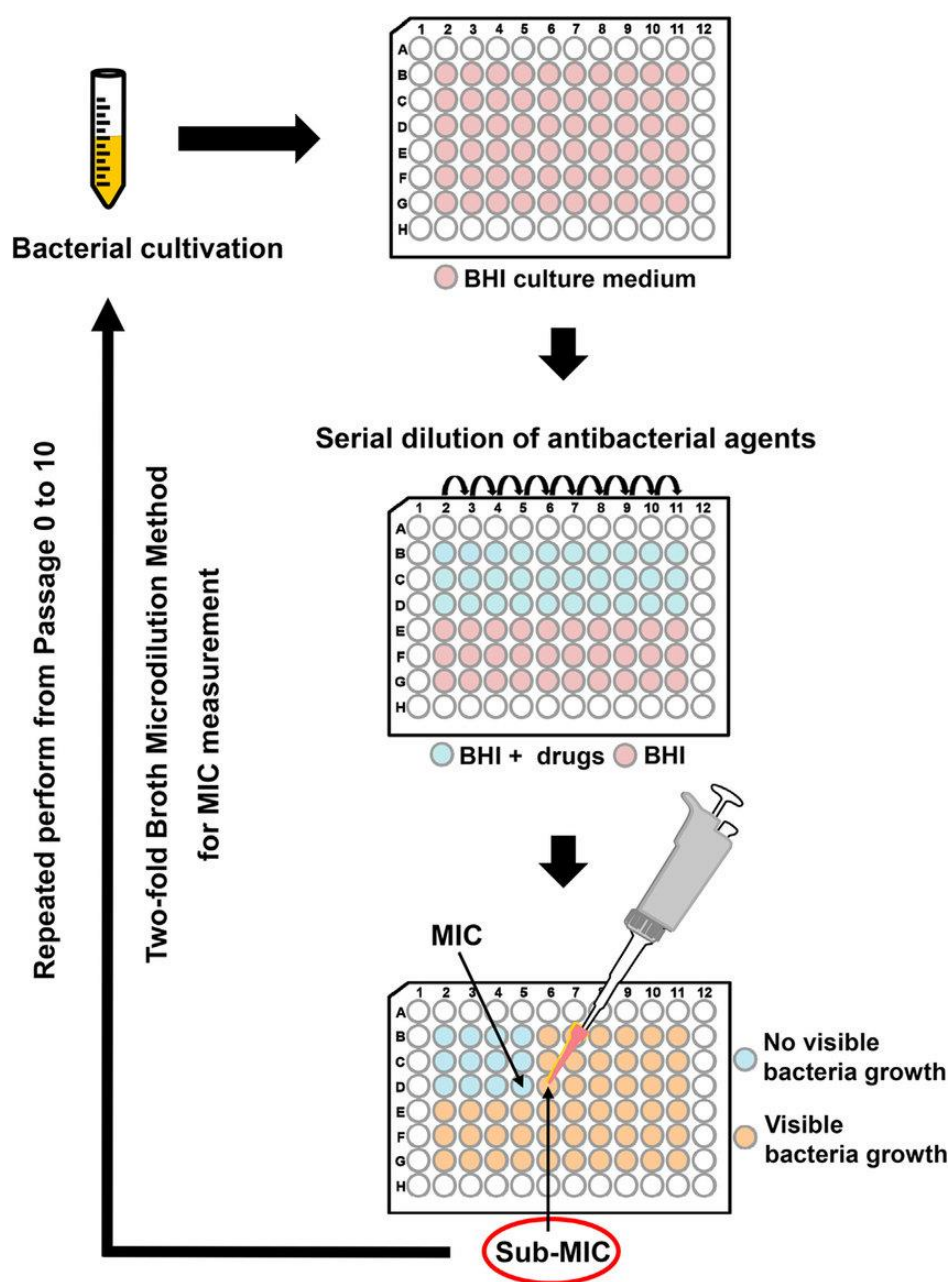
**ข้อดี** คือ เป็นวิธีที่สามารถทดสอบกับหลายเชื้อพร้อมกันใน 1 จานเลี้ยงเชื้อได้ และสามารถสังเกตการปนเปื้อนได้

**ข้อเสีย** คือ มีขั้นตอนการเตรียมอุปกรณ์ที่ค่อนข้างยุ่งยาก ต้องใช้เวลานาน และไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นของยาที่ระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimum bactericidal concentration/MBC)

## 1.2 Broth dilution method แบ่งออกเป็น 2 วิธี

**1.2.1 Broth macrodilution** เป็นการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาหรือสารที่ต้องการทดสอบ ด้วยวิธีการนำยาหรือสารที่ต้องการทดสอบมาเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า (two-folded serial dilution) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในหลอดทดลอง โดยแต่ละหลอดจะมีปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 2 มิลลิลิตร จากนั้นจะใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบลงไป ในหลอดทดลองปริมาณที่เหมาะสม และทิ้งไว้ตามเวลาของเชื้อ แปลผลโดยดูค่าความเข้มข้นระดับต่ำสุดของยาหรือสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ คือ ค่า MIC แต่ไม่นิยมใช้วิธีนี้ เนื่องจากมีความคลาดเคลื่อนสูงในการแปลผล

1.2.2 Broth microdilution ดัดแปลงมาจาก broth macrodilution เป็น การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ ด้วยวิธีการนำยาที่ต้องการทดสอบมาเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า (two-folded serial dilution) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ในถาดหลุม 96 ช่อง (96-well plate) และใส่ของเหลวเลี้ยงเชื้อในแต่ละหลุมเพียง 0.1 มล. ดังภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 16 แสดงวิธี broth microdilution method<sup>(67)</sup>

วิธี broth dilution method มีข้อดีและข้อเสีย ดังนี้

**ข้อดี** คือ ผลการทดสอบนำเชื้อถือ สามารถหาค่าความเข้มข้นของยาที่ระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (minimal inhibitory concentration/MIC) และค่าความเข้มข้นของยาที่ระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimum bactericidal concentration/MBC)

**ข้อเสีย** คือ ไม่สามารถสังเกตการปนเปื้อนได้ และสามารถทดสอบได้กับเชื้อเพียงชนิดเดียวต่อการทดสอบแต่ละครั้ง

## 2. Disk Diffusion (Kirby-Bauer)

เป็นการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาหรือสารที่ต้องการทดสอบ โดยอาศัยวิธีการแพร่ของยาออกจากกระดาษที่บรรจุยาที่มีระดับความเข้มข้นไว้ค่าหนึ่ง เมื่อยาแพร่เข้าไปในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ จะเกิดการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เห็นเป็นวงใส (inhibition zone) อยู่รอบกระดาษที่บรรจุยาหรือสารที่ต้องการทดสอบ โดยขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งรอบกระดาษบรรจุยาหรือสารที่ได้ จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบ

**ข้อดี** คือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว แปลผลง่าย ราคาไม่แพง

**ข้อเสีย** คือ สามารถแปลผลแบบเชิงคุณภาพ (qualitative) แบบเดียวเท่านั้น โดยสามารถบอกได้เพียงว่าเชื้อที่ทดสอบมีความไวต่อยา (susceptible) มีความไวต่อยาปานกลาง (intermediate) หรือดื้อยา (resistant) แต่ไม่สามารถแปลผลแบบเชิงปริมาณ (quantitative) เช่น ค่า MIC ได้ และไม่สามารถหาค่า MBC ได้



ภาพประกอบ 17 แสดงวิธี disk diffusion<sup>(23)</sup>

### 3. Antimicrobial gradient (E test)

เป็นการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาหรือสารที่ต้องการทดสอบ โดยแปลผลแบบเชิงปริมาณ (quantitative) ด้วยวิธีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นที่มีเชื้อความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำแผ่นพลาสติกที่เคลือบยาหรือสารที่ต้องการทดสอบที่มีระดับความเข้มข้นต่างๆ กันมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น บ่มทิ้งไว้ตามเวลาที่กำหนด แล้วนำมาอ่านผลโดยอ่านที่จุดตัดระหว่างวงใสกับค่าตัวเลข MIC บนแผ่นพลาสติก ค่าที่ได้คือค่า MIC ของยาหรือสารนั้น ดังภาพประกอบ 18



ภาพประกอบ 18 แสดงวิธี antimicrobial gradient (E test)<sup>(24)</sup>

**ข้อดี** คือ มีความแม่นยำสูง บอกค่า MIC ได้

**ข้อเสีย** คือ ราคาแพง

### ปัจจัยที่อาจมีผลต่อคุณภาพของการทดสอบความไวของยาต่อเชื้อจุลินทรีย์<sup>(19, 21, 67)</sup>

1. อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ (growth media) องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงสามารถส่งผลต่อการทดสอบได้ เช่น ค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) ระดับความเป็นประจุบวก (cation) เช่น ความเข้มข้นของแคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$ ) และแมกนีเซียม ( $\text{Mg}^{2+}$ ) เนื่องจากระดับความเป็นประจุบวกมีผลต่อการผ่านของยาทางเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อเพื่อเข้าไปออกฤทธิ์ภายในเซลล์ ถ้าหากประจุบวกต่ำเกินไป ยาจะผ่านเข้าเซลล์ของเชื้อได้ง่ายขึ้น จะพบว่าเชื้อจะไวต่อยาเกินความเป็นจริง

อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในการทดสอบความไวของยา ได้แก่ Mueller Hinton broth ถ้าทดสอบแบคทีเรียที่เจริญยากจะนิยมใช้ brain heart infusion broth หรือ Brucella broth ถ้าทดสอบด้วยวิธี agar diffusion test ต้องคำนึงถึงความหนาของวุ้นที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้อยู่ในความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร หากหนาน้อยเกินไป บริเวณโศกของการยับยั้งอาจกว้างเกินความเป็นจริงทำให้เกิดการแปลผลผิดพลาดได้ ดังนั้น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีจะต้องมีองค์ประกอบต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้นอย่างเหมาะสมเพื่อให้การทดสอบความไวของยาต่อเชื้อจุลินทรีย์มีความน่าเชื่อถือ

2. ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ (inoculum) ถ้าใช้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์น้อยเกินไปความสามารถในการต้านยาหรือดื้อยาอาจจะไม่ชัดเจน และพบว่าเชื้อจะมีความไวต่อยาเกินความเป็นจริง แต่ถ้าใช้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์มากเกินไป จะทำให้พบว่าเชื้อดื้อต่อยาเกินความเป็นจริง

3. อุณหภูมิ (temperature) และบรรยากาศ (atmosphere) ในการบ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบควรทำในอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ และบ่มในบรรยากาศที่ไม่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สามารถรวมกับน้ำ ( $\text{H}_2\text{O}$ ) บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเกิดเป็นกรดคาร์บอนิก ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) ซึ่งจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดมากขึ้น และอาจส่งผลให้การออกฤทธิ์ของยาบางอย่างเปลี่ยนแปลงไป

4. ระยะเวลาในการบ่มเชื้อจุลินทรีย์ (incubation period) มีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อจุลินทรีย์ โดยทั่วไปควรบ่มเชื้อเป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง แต่ในเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญช้าอาจใช้เวลานานถึง 48 ชั่วโมง และในการทดสอบความไวต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียบางชนิดอาจมีความจำเพาะ เช่น การทดสอบความไวของยา Vancomycin กับเชื้อ *Enterococcus spp.* ควรบ่มเชื้อเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เนื่องจากเชื้อ *Enterococcus spp.* ที่ดื้อยาจะมีการเจริญช้ากว่าเชื้อปกติ เป็นต้น

### สาเหตุของการเกิดความคลาดเคลื่อนในการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์<sup>(19, 21, 67)</sup>

1. ขั้นตอนการทดสอบไม่ถูกต้อง เช่น อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเชื้อจุลินทรีย์ ระยะเวลาการบ่มเชื้อจุลินทรีย์ การเตรียมสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ที่จะใช้ทดสอบ (inoculum preparation) การอ่านค่า การแปลผล เป็นต้น

2. ความผิดพลาดจากอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ อาจเกิดจากส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่เหมาะสมหรือการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ถูกต้องตามวิธีที่กำหนด

3. ข้อจำกัดของการทดสอบแต่ละวิธีที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด เช่น diffusion method เหมาะกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเร็ว

4. องค์ประกอบต่างๆ ของระบบการทดสอบ เช่น สภาวะแวดล้อมในการเก็บยาและเชื้อ เป็นต้น

## 8. การเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการ checkerboard testing (antimicrobial synergy study - checkerboard testing)<sup>(25, 71)</sup>

การศึกษาการเสริมฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการ checkerboard testing เป็นการประเมินประสิทธิภาพของส่วนผสมระหว่างสารที่ต้องการทดสอบเทียบกับประสิทธิภาพของแต่ละสารเพียงสารเดียว โดยแสดงผลเป็นค่า fractional inhibitory concentration index (FICI) value มีสูตร ดังนี้

$$FICI = FIC_A + FIC_B = \frac{MIC_{A \text{ in combination with B}}}{MIC_{A \text{ alone}}} + \frac{MIC_{B \text{ in combination with A}}}{MIC_{B \text{ alone}}}$$

ตาราง 4 แสดงการแปลผลค่า FICI<sup>(72)</sup>

| FICI           | Result                   |
|----------------|--------------------------|
| $\leq 0.5$     | Synergy                  |
| $> 0.5 - 1$    | Additive/partial synergy |
| $> 1 - \leq 4$ | Indifference             |
| $> 4$          | Antagonism               |

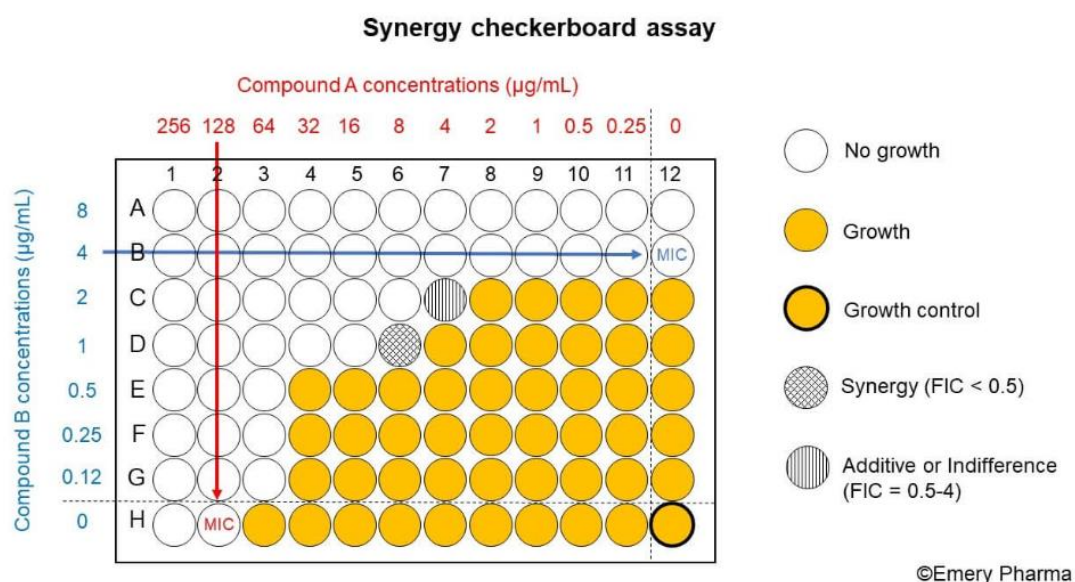
### การแปลผล<sup>(72)</sup>

- มีผลเสริมฤทธิ์กัน (synergy) คือ การที่ผสมสารสองชนิดแล้วทำให้ค่า MIC ลดลง หรือเมื่อผสมสารสองชนิดแล้วทำให้เพิ่มประสิทธิภาพดีขึ้นกว่าการใช้เพียงสารใดสารหนึ่ง

- มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (additive/partial synergy) คือ การที่ผสมสารสองชนิดแล้วทำให้ค่า MIC ลดลงเล็กน้อย หรือเมื่อผสมสารสองชนิดแล้วทำให้เพิ่มประสิทธิภาพดีขึ้นกว่าการใช้เพียงสารใดสารหนึ่งเพียงเล็กน้อย

- มีผลไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifference) คือ การที่ผสมสารสองชนิดแล้วทำให้ค่า MIC ไม่แตกต่าง หรือเมื่อผสมสารสองชนิดแล้วทำให้ประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากการใช้เพียงสารใดสารหนึ่ง

- มีผลต้านฤทธิ์กัน (antagonism) คือ การที่ผสมสารสองชนิดแล้วทำให้ค่า MIC เพิ่มขึ้นหรือเมื่อผสมสารสองชนิดแล้วทำให้ประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้เพียงสารใดสารหนึ่ง



ภาพประกอบ 19 แสดงวิธี checkerboard testing<sup>(25)</sup>

คำนิยามของ minimal inhibitory concentration (MIC), minimal inhibition zone (MIZ) และ fractional inhibitory concentration (FIC)<sup>(14, 25)</sup>

### 1. Minimal inhibitory concentration (MIC)

หมายถึง ค่าความเข้มข้นที่ระดับต่ำสุดของยาหรือสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ซึ่งเป็นค่าที่นิยมใช้บอกถึงความไวของเชื้อที่มีต่อยาหรือสาร หน่วยที่ใช้ คือ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร

### 2. Minimal inhibition zone (MIZ)

หมายถึง ค่าความเข้มข้นของยาหรือสารที่ระดับต่ำสุดที่จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็นมิลลิเมตร

### 3. Fractional inhibitory concentration (FIC)

หมายถึง ค่าการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของส่วนผสมระหว่างสารที่ต้องการทดสอบเทียบกับประสิทธิภาพของแต่ละสารเพียงสารเดียว

### บทที่ 3

## วิธีการดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบงานวิจัย

การศึกษาเชิงทดลองทางห้องปฏิบัติการ ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่งแบบตัดขวาง (experimental, cross-sectional study)

#### กลุ่มเป้าหมายของงานวิจัย (target population)

เป็นงานวิจัยที่ทำต่อยอดจาก Laochunsuwan A.<sup>(10)</sup> (SWUEC/E-272/2559) ซึ่งเก็บเชื้อ *Cutibacterium acnes* ที่คัดแยกจากกลุ่มตัวอย่างคนไข้สิว จำนวน 95 คน ที่มารับการรักษาที่ ศูนย์ผิวหนัง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ระหว่างวันที่ 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2559 จนถึง วันที่ 1 มีนาคม พ.ศ. 2560

โดยใช้เกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัครเพื่อเข้ามาศึกษา (inclusion criteria) มีดังนี้

1. เพศชายหรือหญิง
2. อายุ 18 ปีขึ้นไป
3. มีสิवरะดับน้อย (สิวไม่อักเสบ (comedones) เป็นส่วนใหญ่หรือมีสิวกักเสบ (papule และ pustule) ไม่เกิน 10 จุด ตามเกณฑ์ของลีดส์ (mild acne vulgaris (inflammatory papules < 10 lesions) by the Leeds revised acne grading system), มีสิवरะดับปานกลาง (สิวกักเสบแดง มากกว่า 10 เม็ด และสิวกักเสบเม็ดใหญ่ หรือซิสต์ น้อยกว่า 5 เม็ด) ตามเกณฑ์ของลีดส์ (moderate acne vulgaris (inflammatory papules > 10 lesions, nodules < 5 lesions) by the Leeds revised acne grading system) หรือมีสิवरะดับรุนแรง (สิวกักเสบแดง มากกว่า 10 เม็ด หรือสิวกักเสบ เม็ดใหญ่ หรือซิสต์ มากกว่า 5 เม็ด) ตามเกณฑ์ของลีดส์ (severe acne vulgaris (inflammatory papules > 10 lesions, nodules > 5 lesions) by the Leeds revised acne grading system)

4. ผู้ป่วยยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ และลงลายลักษณ์อักษรใน ใบยินยอมเข้าร่วม โครงการวิจัย (informed consent form)

ส่วนเกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัครเพื่อออกจากการศึกษา (exclusion criteria) มีดังนี้

1. อาสาสมัครได้รับยาปฏิชีวนะชนิดทาและชนิดรับประทานเพื่อรักษาโรคอื่น ในช่วง 2 สัปดาห์ก่อนทำการวิจัย
2. หญิงตั้งครรภ์ หรือให้นมบุตร

3. มีผื่นแพ้สัมผัส ผื่นแดงอักเสบบริเวณที่จะเก็บตัวอย่าง
  4. ผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง
  5. ผู้ป่วยผิวหนังที่สงสัยว่าเกิดจากสาเหตุอื่น เช่น ผิวจากผื่นแพ้สัมผัส (allergic contact dermatitis), ผิวจากยาสเตียรอยด์ (steroid acne)
  6. ผู้ป่วยไม่ให้ความร่วมมือ ในการมาติดตามระหว่างเข้าร่วมโครงการวิจัยได้
- และเกณฑ์การคัดอาสาสมัครออกในระหว่างทำการศึกษา (discontinuation criteria)

มีดังนี้

1. เป็นความสมัครใจของผู้ป่วย
2. ผู้ทำวิจัยเห็นสมควรว่าควรออกจากโครงการ

ในงานวิจัยของ Laochunsuwan A.<sup>(10)</sup> มีการเก็บรวบรวมและบันทึกข้อมูลจากอาสาสมัคร ได้แก่ ข้อมูลทั่วไป, ประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดรับประทานและยาทาเฉพาะที่, การตรวจร่างกายพร้อมทั้งประเมินความรุนแรงของผิวหนังตามเกณฑ์ของลีตส์ และเก็บตัวอย่างจากผิวหนังจากอาสาสมัคร โดยทำความสะอาดบริเวณผิวหนังด้วย 70% แอลกอฮอล์ รอให้แห้งสนิทแล้วใช้หัวเข็มเบอร์ 21 ปราศจากเชื้อ แทงเปิดหัวสิวและใช้ไม้กดสิวกดหัวสิวนอกมาป้ายลงบนสไลด์แก้ว แล้วใช้สไลด์แก้วอีกแผ่นกดหัวสิวบ่งสิวจุดต้นเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ป้ายลงบน Brucella agar plate โดยมีการเขียนกำกับชื่อ-นามสกุล อาสาสมัคร, เลขที่ ประจำตัวผู้ป่วยนอก, เลขลำดับในการทดลอง และวันที่กดเพาะเชื้อ แล้วนำ brain heart infusion agar plate บรรจุลงใน anaerobic jar (Mitsubishi®, Japan) ซึ่งภายในเป็นสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใส่ anaerobic gas pack (Mitsubishi®, Japan) ไว้ แล้วนำไปใส่ในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และส่วนที่ 2 ป้ายใน Mueller Hinton agar plate และมีการเขียนข้อมูลกำกับเช่นเดียวกับส่วนที่ 1 แล้วบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจน หลังจากนั้นสังเกตว่ามีการเจริญของเชื้อหรือไม่ โดยถ้าภายใน 7 วัน ไม่พบโคโลนีแสดงว่าไม่มีการเจริญของเชื้อ จากนั้นนำโคโลนีของเชื้อที่เจริญมาเพาะเลี้ยงให้ได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์และเพิ่มจำนวนเชื้อ แล้วนำมาตรวจดูลักษณะเชื้อโดยการย้อมแกรมว่ามีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของ *C. acnes* คือเชื้อแกรมบวกชนิด แท่งขนาดเล็ก ไม่มีสปอร์ แล้วนำเชื้อที่มีคุณสมบัติของ *C. acnes* มาตรวจทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยใช้ชุดทดสอบ Api 20a (bio Merieux®) ว่าเป็นเชื้อ *C. acnes* จริง

หลังจากทำการทดสอบแล้วพบว่าจากคนไข้ทั้งหมด 95 คน มีเชื้อ *C. acnes* ทั้งหมด 75 สายพันธุ์หลังจากที่ได้เชื้อ *C. acnes* แล้วจึงนำมาทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อ

ยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disc diffusion และ หาค่า MIC ด้วยวิธี Epsilometer test (E test®) โดยทดสอบกับยาปฏิชีวนะ ได้แก่ clindamycin, erythromycin, doxycycline, tetracycline, amoxicillin ซึ่งผลการวิจัยของ Laochunsuwan A.<sup>(10)</sup> พบว่าเชื้อ *C. acnes* ดื้อต่อยา erythromycin จำนวน 48 คน คิดเป็นร้อยละ 64, clindamycin จำนวน 47 คน คิดเป็นร้อยละ 62.66 และมี 1 คน ดื้อต่อ tetracycline คิดเป็นร้อยละ 1.33 ที่จากงานวิจัยไม่พบ เชื้อที่ดื้อต่อยา doxycycline และ amoxicillin และจากงานวิจัยพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *C. acnes* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม macrolide กับอายุและประวัติการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมาก่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในงานวิจัยครั้งนี้จึงใช้เชื้อ *C. acnes* ที่แยกได้และเพาะเชื้อขึ้นจากคนไข้ทั้งหมด 75 คน มาทำการทดลองต่อ โดยที่เชื้อ *C. acnes* นั้นถูกเก็บใน brain heart infusion broth (BHI broth) และ 20% กลีเซอรอล (glycerol) ในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -80°C ซึ่งกลีเซอรอลเป็นสารที่ช่วยปกป้องไม่ให้เชื้อ *C. acnes* แตกจากความเย็นและคงคุณภาพของเชื้อไว้ เมื่อจะนำมาใช้ทำการทดลองจะนำ *C. acnes* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar ที่มี 10% horse serum

### อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารสกัดจากสมุนไพร ซึ่งได้มาจากสาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้แก่

1.1 สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม

1.2 สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด

2. ขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

2.1 สารและสารเคมี ได้แก่

2.1.1 Brain heart infusion agar และ brain heart infusion broth

2.1.2 Horse serum

2.1.3 McFarland standard solution

2.1.4 เชื้อ *C. acnes* ทั้งชนิดที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ที่เก็บจากอาสาสมัคร

จากงานวิจัย Laochunsuwan A. (SWUEC/E-272/2559)

2.1.5 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck®, Germany)

2.1.6 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile distilled water)

2.1.7 กลีเซอริน (glycerin)

## 2.2 อุปกรณ์ได้แก่

2.2.1 ปากคีบ (forceps)

2.2.2 หลอดทดลอง (test tubes)

2.2.3 ขวดปริมาตร (flask)

2.2.4 Magnetic bars

2.2.5 96 well plates

2.2.6 เครื่องอบฆ่าเชื้อ (P-selecta®, Plesoclave-II)

2.2.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิน้ำ (MW Lauda®)

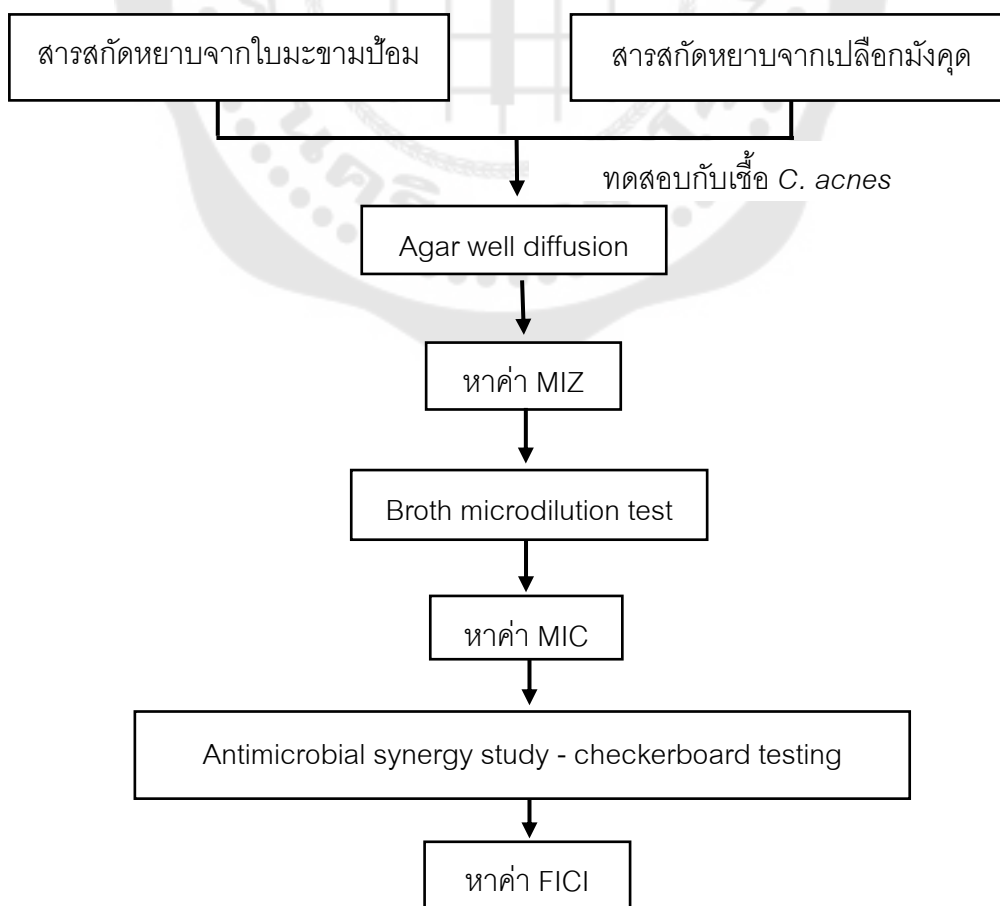
2.2.8 ตู้ฟุ้งอากาศบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ (laminar flow)

2.2.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.2.10 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator)

2.2.11 Magnetics hot plate stirrer (Jencons®, Genesis)

## ขั้นตอนการวิจัย



## 1. การเตรียมเชื้อ *C. acnes*

นำเชื้อ *C. acnes* ที่เก็บจากอาสาสมัครจากงานวิจัย Laochusuwan A. (SWUEC/E-272/2559) ที่เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ใน BHI broth และ 20% glycerol เพื่อรักษาคุณภาพของเชื้อ *C. acnes* ซึ่งการเก็บเชื้อ *C. acnes* นั้นเก็บแยกหลอดตามรหัสของอาสาสมัครซึ่งมีการเขียนรหัสลายลักษณ์อักษรอย่างชัดเจนที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ นำเชื้อ *C. acnes* บางส่วนจากหลอดเก็บเชื้อ มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่มี 10% horse serum หลังจากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน บ่มเป็นเวลา 3-5 วัน จนเชื้อเจริญเติบโตเป็น colony ที่ต้องการเสร็จสมบูรณ์ นำ colony นั้นมาใช้ทดสอบต่อไป

## 2. การเตรียมสารสกัดหยาบของสมุนไพร

สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด ได้มาจากสาขาวิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เตรียมโดยนำผงสมุนไพรแห้งที่ผ่านแรงเบอร์ 45 มาสกัดด้วยวิธี maceration เขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ 95% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย หลังสกัดเสร็จนำมาระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยวิธีการลดความดัน จนได้สารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดตามต้องการ

- สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม เป็นของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
- สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด เป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล

จากนั้นนำสารสกัดหยาบของใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดมาเตรียมเพื่อทดสอบ โดยผสมใน 1% DMSO โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 5 mg/ml

## 3. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ด้วยวิธี agar well diffusion

3.1 นำเชื้อ *C. acnes* ชนิดที่ดื้อยาและชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ มาใส่ใน BHI broth แล้ววัดความขุ่น (OD) ของเชื้อแต่ละชนิดให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml

3.2 เตรียมจานเพาะเชื้อ BHI Agar ที่มี 10% horse serum หลังจากนั้นใช้ cotton swab จุ่มลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ *C. acnes* ที่เตรียมจากข้อ 3.1 นำมาป้ายลงบนจานเลี้ยงเชื้อ โดยวิธี three-dimension swab โดยการป้าย 3 ทิศทาง เป็นแนวนอนกับจานจนเต็มจานเพาะเชื้อ ซึ่งแต่ละครั้งทำมุม 45 องศากับทิศทางการป้ายก่อนหน้า และทิ้งไว้เพื่อให้ส่วนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

3.3 ใช้ sterile cork border ขนาด 4 มม. เจาะหลุมบนอาหารแข็ง ในข้อ 3.2 โดยเว้นระยะห่างแต่ละหลุมพอประมาณ

3.4 ใส่สารสกัดหยาบของใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดที่เตรียมไว้ ในข้อ 2 ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ( $\mu\text{L}$ ) ลงในหลุมแต่ละหลุม

3.5 ทำซ้ำข้อ 3.1-3.3 จนครบเชื้อ *C. acnes* 75 สายพันธุ์

3.6 จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 3-5 วัน

3.7 บันทึกผลการทดลองโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้ง (inhibition zone) ประเมินผลเป็น มิลลิเมตร (มม.) แปลผลเป็น MIZ (minimal inhibition zone)

3.8 นำผลที่ได้ทั้งหมด มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibitory concentration/MIC) ของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ด้วยวิธี broth microdilution

4.1 นำเชื้อ *C. acnes* จากตัวอย่างที่เก็บไว้มาเลี้ยงใน BHI broth ที่มี 10% horse serum แล้ววัดความขุ่นของเชื้อแต่ละชนิดให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งจะมีเชื้อเท่ากับ  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml

4.2 เจือจางเชื้อ *C. acnes* ที่จะทดสอบให้มีความเข้มข้นประมาณ  $1.5 \times 10^6$  CFU/ml โดยเจือจาง 10 เท่าลงอีก 2 ครั้ง

4.3 เจือจางสารที่ต้องการทดสอบ คือ สารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด โดยเจือจางแต่ละชนิดลงเป็นลำดับส่วน 2 เท่า ด้วย BHI broth ใส่ใน 96 well plate จากนั้นเติม *C. acnes* ที่ปรับความขุ่นแล้วลงในแต่ละหลุมของ 96 well plate ที่มีสารสกัดสมุนไพรอยู่ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน บ่มเป็นเวลา 3-5 วัน

4.4 อ่านผลการเจริญของ *C. acnes* โดยการเติมสารละลาย 0.02% resazurin ปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี resazurin จากสีม่วงน้ำเงินเปลี่ยนเป็นสีชมพูแสดงว่ามีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเกิดจากเชื้อ *C. acnes* ที่มีชีวิตไปทำปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) กับสาร resazurin แต่ถ้าสี resazurin ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแสดงว่าไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดในหลุมทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ คือ หลุมทดสอบที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี resazurin

## 5. การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด

5.1 คัดเลือกตัวแทนเชื้อ *C. acnes* จากตัวอย่างทั้งชนิดที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ โดยวิธีการสุ่มตัวอย่างโดยแยกเชื้อ *C. acnes* ออกเป็นกลุ่มตามค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด ตามข้อ 4 แล้วทำการสุ่มอย่างง่ายเพื่อให้ได้จำนวนกลุ่มตัวแทนเชื้อ *C. acnes* ตามสัดส่วนของกลุ่มที่จัดตามค่า MIC แล้วนำตัวแทนเชื้อ *C. acnes* มาใส่ใน BHI broth ที่มี 10% horse serum แล้ววัดความขุ่นของเชื้อแต่ละชนิดให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งจะมีเชื้อเท่ากับ  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml

5.2 เจือจางเชื้อ *C. acnes* ที่จะทดสอบให้มีความเข้มข้นประมาณ  $1.5 \times 10^6$  CFU/ml โดยเจือจางลง 10 เท่า อีก 2 ครั้ง

5.3 เจือจางสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ คือ สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด โดยการผสมสารสกัดหยาบจากสมุนไพร 2 ชนิด เป็นอัตราส่วนในความเข้มข้นต่างๆ เจือจางแต่ละชนิดลงเป็นลำดับส่วน 2 เท่า ด้วย BHI broth ใส่ใน 96 well plate จากนั้นเติม *C. acnes* ที่ปรับความขุ่นแล้วลงในแต่ละหลุมของ 96 well plate ที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดอยู่ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน บ่มเป็นเวลา 3-5 วัน

5.4 อ่านผลการเจริญของ *C. acnes* ตามข้อ 4.4

ประเมินการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดที่อัตราส่วนในความเข้มข้นต่างๆ โดยนำค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ได้จากการทดลองในข้อ 5.4 มาทำการคำนวณหาค่า fractional inhibitory concentration (FIC) index จากสูตร

$$\text{FIC index} = \text{FIC}_{\text{สารสกัดจากใบมะขามป้อม}} + \text{FIC}_{\text{สารสกัดจากเปลือกมังคุด}}$$

$$\text{FIC สารสกัดจากใบมะขามป้อม} = \frac{\text{MIC ของสารสกัดจากใบมะขามป้อมที่ผสมสารสกัดจากเปลือกมังคุด}}{\text{MIC ของสารสกัดจากใบมะขามป้อม}}$$

$$\text{FIC สารสกัดจากเปลือกมังคุด} = \frac{\text{MIC ของสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ผสมสารสกัดจากใบมะขามป้อม}}{\text{MIC ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด}}$$

## การประเมินผล

1. ประเมินฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ของ สารสกัดหยาบของ ใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบของเปลือกมังคุด โดยรายงานเป็นค่า บริเวณโซนใสที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* (MIZ)
2. ประเมินฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ของ สารสกัดหยาบของ ใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบของเปลือกมังคุด โดยรายงานเป็นค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ได้ (MIC)
3. ประเมินการเสริมฤทธิ์การยับยั้งของอัตราส่วนของสารสกัดหยาบของใบมะขามป้อม และเปลือกมังคุดต่อ *C. acnes* โดยประเมินจากค่า FICI

## การเก็บรวบรวมข้อมูลและการจัดการข้อมูล (data collection and management)

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัย ของ Laochunsuwan A.<sup>(10)</sup> ซึ่งเป็นการศึกษารูปแบบความไวของ เชื้อ *C. acnes* จากผู้ป่วยสิวต่อยาปฏิชีวนะ ได้มาในรูปแบบไฟล์ข้อมูล (file) โดยข้อมูลที่นำมาใช้ คือ ผลการทดสอบความไวของเชื้อและการดื้อยาปฏิชีวนะ ทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิดที่นิยมใช้ในการรักษาสิว ได้แก่ clindamycin, erythromycin, doxycycline, tetracycline และ amoxicillin โดยอ่านผลเป็นค่า MIC ที่ MIC50 และ MIC90 อ้างอิงจากเกณฑ์ตาม CLSI โดยไม่ใช้ข้อมูลทางคลินิก หรือข้อมูลใดๆ ที่จะสามารถอ้างอิงถึงผู้ป่วยได้

ผู้วิจัยได้นำเชื้อ *C. acnes* ที่เก็บจากอาสาสมัครจากงานวิจัยข้างต้นมาทำทดสอบต่อ เชื้อ *C. acnes* เก็บไว้ใน BHI broth และ 20% glycerol โดยแช่ในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาคุณภาพของเชื้อ *C. acnes* โดยมีการเก็บแยกหลอดตามรหัสของ อาสาสมัครซึ่งมีการเขียนรหัสลายลักษณ์อักษรอย่างชัดเจนที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อนำเชื้อ *C. acnes* มาใช้ผู้วิจัยจะนำเชื้อบางส่วนจากหลอดเก็บเชื้อมาใส่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่มี 10% horse serum นำมาบ่มเพาะเลี้ยงเมื่อเชื้อเจริญเติบโตขึ้น จนได้ colony ที่ต้องการ จะนำ colony นั้นมาใส่ BHI agar ที่มี 10% horse serum อีกครั้ง และ บ่มเลี้ยงต่อจนได้ colony ที่ต้องการ แล้วนำ colony นั้นมาใช้ทดสอบต่อไป

เชื้อแบคทีเรียนี้ที่ได้จากผู้ป่วยจะเก็บไว้ในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 5 ปี นับจากเริ่มทำงานวิจัย เมื่อครบ 5 ปีจะทำลายเชื้อทิ้งโดยนำเข้าตู้อบฆ่าเชื้อ (autoclave)

แบบฟอร์มในการเก็บรวบรวมข้อมูลเป็นดังนี้

ตาราง 5 แสดงแบบฟอร์มเก็บรวบรวมข้อมูลค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางรอบหลุม (MIZ) หน่วยเป็นมิลลิเมตร

| สารสกัดหยาบของสมุนไพร     |                                 |                                  |
|---------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| เชื้อ <i>C. acnes</i> จาก | MIZ <sub>ใบมะขามป้อม</sub> (mm) | MIZ <sub>เปลือกมังคุด</sub> (mm) |
| อาสาสมัครรหัส ____        |                                 |                                  |
| รหัส 1                    |                                 |                                  |
| รหัส 2                    |                                 |                                  |

ตาราง 6 แสดงแบบฟอร์มเก็บรวบรวมข้อมูลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution และข้อมูลการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ของส่วนผสมระหว่างสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด โดยคำนวณค่า fractional inhibitory concentration index (FICI)

| เชื้อ <i>C. acnes</i><br>จาก | สารสกัดหยาบจาก<br>ใบมะขามป้อม         |                                                         | สารสกัดหยาบจาก<br>เปลือกมังคุด         |                                                         | FICI |
|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------|------|
|                              | MIC <sub>ใบมะขามป้อม</sub><br>(mg/ml) | MIC <sub>ใบมะขามป้อม+<br/>เปลือกมังคุด</sub><br>(mg/ml) | MIC <sub>เปลือกมังคุด</sub><br>(mg/ml) | MIC <sub>ใบมะขามป้อม+<br/>เปลือกมังคุด</sub><br>(mg/ml) |      |
| อาสาสมัคร<br>รหัส ____       |                                       |                                                         |                                        |                                                         |      |
| รหัส 1                       |                                       |                                                         |                                        |                                                         |      |
| รหัส 2                       |                                       |                                                         |                                        |                                                         |      |

## สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ คือ โปรแกรม The words statistics and data (Stata) version 14 for window

### 2. ข้อมูลเชิงอนุมาน (inferential statistics)

2.1 ค่า MIZ ของ สารสกัดหยาบของใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ต่อเชื้อ *C. acnes* ใช้ descriptive statistics ในการรายงานผลข้อมูล MIZ ของ สารสกัดหยาบของ ใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ต่อเชื้อ *C. acnes* 75 เชื้อ รายงานผลเป็นข้อมูลต่อเนื่อง (continuous data)

รายงานผลค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation/SD) เมื่อข้อมูลมีการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution)

รายงานผลเป็นค่ามัธยฐาน (median) และค่าส่วนเบี่ยงเบนควอไทล์ (inter-quartile range/IQR) เมื่อข้อมูลการกระจายตัวเป็นแบบไม่ปกติ

2.2 ค่า MIC (minimal inhibition concentration) ของ สารสกัด หยาบ ของ ใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ต่อ เชื้อ *C. acnes* 75 เชื้อ

รายงานผลค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation/SD) เมื่อข้อมูลมีการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution)

รายงานผลเป็นค่ามัธยฐาน (median) และค่าส่วนเบี่ยงเบนควอไทล์ (inter-quartile range/IQR) เมื่อข้อมูลการกระจายตัวเป็นแบบไม่ปกติ

2.3 ใช้ pair t-test ใช้สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน (dependent factor) เปรียบเทียบความแตกต่าง mean ของ MIC ของ สารสกัดหยาบของ ใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ต่อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ และ mean ของ MIC ของ สารสกัดหยาบของใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ต่อ *C. acnes* ชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ โดยกรณี ที่ ค่า MIC ของ *C. acnes* ชนิดดื้อยา และ MIC ของ *C. acnes* ชนิดไม่ดื้อยา มีการกระจายตัวแบบปกติ

2.4 ใช้ Wilcoxon Rank-sum test เปรียบเทียบความแตกต่างของค่า MIC ของ สารสกัดหยาบของใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ต่อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ และ MIC ของ *C. acnes* ชนิดไม่ดื้อยา ข้อมูลที่กระจายตัวแบบไม่เป็นปกติ ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่

### จริยธรรมทางการวิจัย (ethical considerations)

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อยอดจากงานวิจัยของ Laochunsuwan A.<sup>(10)</sup> และใช้เชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ที่เก็บจากอาสาสมัครจากงานวิจัยของ Laochunsuwan A.<sup>(10)</sup> ไม่ได้มีการเก็บเชื้อจากอาสาสมัครเพิ่ม ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวผ่านการรับรองจากโครงการจริยธรรมสำหรับโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒแล้ว โดยวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยดังกล่าวนี้ที่ขึ้นต่อคณะกรรมการจริยธรรมคือเพื่อศึกษารูปแบบความไวของเชื้อ *C. acnes* ต่อยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้รักษาสิวในประเทศไทย ส่วนวัตถุประสงค์รอง คือ ศึกษาความสัมพันธ์ของข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัคร ประวัติการรักษา ประวัติการใช้ยา และลักษณะทางคลินิกของอาสาสมัคร ว่ามีผลต่อรูปแบบความไวเชื้อ *C. acnes* ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ อย่างไร และศึกษาอัตราความชุกของการดื้อยาของ *C. acnes* ต่อยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการรักษาสิวในประเทศไทย โดยรูปแบบงานวิจัยเป็นการศึกษาเชิงพรรณนา ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่งแบบตัดขวาง (descriptive, cross-sectional study) และเหตุผลในการวิจัยคือมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสิวอย่างแพร่หลาย ผู้ป่วยมีการซื้อยาปฏิชีวนะชนิดทาใช้เองและมีวิธีการใช้ยาที่ไม่ถูกต้อง ทำให้ผลการรักษาสิวนั้นไม่ดีเท่าที่ควร ทำให้คาดว่าน่าจะมีการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อในผู้ป่วยสิวในประเทศไทย และในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมายังไม่พบรายงานอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อ *C. acnes* จึงเป็นที่มาของงานวิจัยดังกล่าวที่ต้องการจะศึกษารูปแบบความไวเชื้อของ *C. acnes* ในประเทศไทย เพื่อให้ทราบถึงรูปแบบความไวเชื้อของ *C. acnes* และความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยากับข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัคร ประวัติการรักษา ประวัติการใช้ยา และลักษณะทางคลินิกของอาสาสมัคร โดยงานวิจัยที่จะทำนี้ไม่มีการใช้ข้อมูลทางคลินิกหรือข้อมูลอื่นใดที่จะสามารถอ้างอิงถึงคนไข้ได้ จะมีการใช้เพียงค่าผลทดสอบความไวของเชื้อและการดื้อยาซึ่งเก็บในรูปแบบข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ (electronic files) และเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกจากคนไข้ จากที่กล่าวมางานวิจัยของ Laochunsuwan A.<sup>(10)</sup> ได้ผ่านการขอจริยธรรมทางงานวิจัยเป็นที่เรียบร้อยแล้ว งานวิจัยนี้จึงจะขอจริยธรรมทางการวิจัยในรูปแบบใช้เชื้อ *C. Acnes* สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกจากคนไข้ และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### ระยะเวลาการทําวิจัย

ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ เดือน ตั้งแต่ กรกฎาคม 2563 ถึง มิถุนายน 2564

## แผนการดำเนินงานตลอดการวิจัย

ตาราง 7 แสดงระยะเวลาการทำงานวิจัย

| ระยะเวลา                                                                                                | ก.ค. 63 | ส.ค. 63 | ก.ย. 63 | ต.ค. 63 | พ.ย. 63 | ธ.ค. 63 | ม.ค. 64 | ก.พ. 64 | มี.ค. 64 | เม.ย. 64 | พ.ค. 64 | มิ.ย. 64 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|---------|----------|
| ขั้นตอนวิธีการดำเนินงาน                                                                                 |         |         |         |         |         |         |         |         |          |          |         |          |
| 1. กำหนดหัวข้อวิจัย, ทบทวนวรรณกรรม และเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง, ตั้งคำถามวิจัย, ตั้งสมมติฐานงานวิจัย | x       | x       |         |         |         |         |         |         |          |          |         |          |
| 2. เสนอโครงร่างงานวิจัย, ขออนุมัติคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์                                    |         |         | x       | x       |         |         |         |         |          |          |         |          |
| 3. ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการและบันทึกข้อมูลงานวิจัย                                                    |         |         |         |         | x       | x       | x       | x       | x        |          |         |          |
| 4. วิเคราะห์ข้อมูลและแปลผลข้อมูลงานวิจัย                                                                |         |         |         |         |         |         |         |         | x        | x        | x       |          |
| 5. รายงานผลและตีพิมพ์ข้อมูลงานวิจัย                                                                     |         |         |         |         |         |         |         |         |          |          | x       | x        |

## สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

## งบประมาณ

ตาราง 8 แสดงงบประมาณในงานวิจัย

| ค่าใช้จ่าย                                                              | จำนวนเงิน (บาท) |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1. หมวดค่าตอบแทน                                                        | 20,000          |
| 1.1 ค่าตอบแทนผู้ช่วยวิจัย จำนวน 1 คน เป็นเงิน 200 บาท/วัน จำนวน 100 วัน | 20,000          |
| 2. หมวดค่าใช้สอย                                                        | 3,500           |
| 2.1 ค่าจ้างเหมาพิมพ์รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์                              | 2,500           |
| 2.2 ค่าจ้างสำเนาเย็บเล่มรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์                          | 1,000           |
| 3. หมวดค่าวัสดุและอุปกรณ์                                               | 122,930         |
| 3.1 ค่าวัสดุในการเพาะเลี้ยงเชื้อ                                        |                 |
| - Sterile Petri Dish 90x15 mm (500 pcs.) 8 packs                        | 12,800          |
| - Pipette tip 1000 ul. (1000 ea./pack) 4 packs                          | 1,800           |
| - Pipette tip 200 ul. (1000 ea./pack) 4 packs                           | 1,520           |
| - Brain Heart Infusion Agar 500 g. 6 ขวด                                | 10,500          |
| - Brain Heart Infusion Broth 500 g. 6 ขวด                               | 10,500          |
| - Microtube 1.5 ml (1000 ea./pack) 4 packs                              | 960             |
| - Sterile 96 well Microplate with Lid 6 packs                           | 21,000          |
| - Centrifuge tube 15 ml. Sterile 500 อัน                                | 2,250           |
| - Centrifuge tube 50 ml. Sterile 100 อัน                                | 550             |
| - Anaerobe gas pack / Merck, 10 ea./pack 6 packs                        | 9,000           |
| - Horse serum 500 ml 6 ขวด                                              | 34,200          |
| - ถุงมือ ไม่มีแป้ง No. S 10 กล่อง                                       | 1,600           |
| 3.2 ค่าสารสกัดสมุนไพร                                                   | 10,000          |
| 3.3 ค่าอุปกรณ์อื่นๆ                                                     |                 |
| - Ethanol                                                               | 2,000           |
| - DMSO                                                                  | 1,750           |
| - Resazurin                                                             | 8,000           |
| 3.4 ค่าจ้างเหมาจ่ายในการทำลายเชื้อและวัสดุปนเปื้อนเชื้อ                 | 5,000           |
| รวมงบประมาณทั้งสิ้น                                                     | 146,430         |

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

งานวิจัยเรื่อง การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคผิวหนังชนิดผิวหนังอักเสบเรื้อรัง ในหลอดทดลอง ซึ่งแบ่งเป็น 3 ตอน ดังนี้

**ตอนที่ 1** การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและจากเปลือกมังคุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้ง หรือ minimal inhibition zone (MIZ)

**ตอนที่ 2** การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด หรือ minimal inhibition concentration (MIC) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและจากเปลือกมังคุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี broth microdilution

**ตอนที่ 3** การทดสอบหาการเสริมฤทธิ์ หรือ fractional inhibitory concentration index (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ด้วยวิธีการ checkerboard testing

### ข้อมูลการทดลองทั่วไป

#### ลักษณะโดยทั่วไปของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและจากเปลือกมังคุด

สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) และจากเปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) ซึ่งได้มาจากสาขาวิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เตรียมโดยนำผงสมุนไพรแห้งที่ผ่านแรงเบอร์ 45 มาสกัดด้วยวิธี maceration เขย่าอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ 95% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย หลังสกัดเสร็จนำมาระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยวิธีการลดความดัน จนได้สารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดตามต้องการ

- สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม เป็นของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
- สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด เป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล

#### ลักษณะโดยทั่วไปของกลุ่มเชื้อ *Cutibacterium acnes*

ในงานวิจัยนี้ได้นำเชื้อ *C. acnes* จากงานวิจัยของ Laochusuwan A.<sup>(10)</sup> (SWUEC/E-272/2559) ซึ่งได้มีการคัดแยกจากอาสาสมัครชายหรือหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปี ขึ้นไป ทั้งหมด 95 คน ที่เป็นสิวโดยแบ่งระดับความรุนแรงของสิวตามเกณฑ์ของลีดส์ (Leeds revised

acne grading system) พบว่าเป็นสิ่วระดับความรุนแรงน้อยร้อยละ 69.5 ผู้ป่วยระดับความรุนแรงปานกลางร้อยละ 25.3 และผู้ป่วยระดับความรุนแรงมากร้อยละ 5.2 และข้อมูลอาสาสมัครแบ่งตามประวัติการรักษา แบ่งเป็นอาสาสมัครที่ไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะร้อยละ 37.9 เคยได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะชนิดกินอย่างเดียวร้อยละ 7.4 เคยได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะชนิดทาอย่างเดียวร้อยละ 31.6 และเคยได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะชนิดกินและชนิดทาร้อยละ 23.2 และจากการเก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครเมื่อนำไปเพาะเชื้อ พบว่าเป็นเชื้อ *C. acnes* 75 สายพันธุ์ *Staphylococcus spp.* 15 สายพันธุ์ และ *Propionibacterium granulosum* 5 สายพันธุ์

จากข้อมูลดังที่กล่าวไปข้างต้น ผู้วิจัยนำเชื้อ *C. acnes* 75 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ จำนวน 48 สายพันธุ์ ตั้งแต่รหัส 1-44 และรหัส 72-75 และสายพันธุ์ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ จำนวน 27 สายพันธุ์ ตั้งแต่รหัส 45-71 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar ที่มี 10% horse serum หลังจากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน บ่มเป็นเวลา 3-5 วัน จนเชื้อเจริญเติบโตเป็น colony ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. acnes* มีเชื้อเจริญเติบโตเป็น colony 70 สายพันธุ์ จาก 75 สายพันธุ์ และเชื้อไม่เจริญเติบโตเป็น colony 5 สายพันธุ์ ได้แก่ รหัส 1, 3, 6, 7 และ 46

### ผลการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูล

ตอนที่ 1 การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและจากเปลือกมังคุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้ง หรือ minimal inhibition zone (MIZ)

ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้ง (MIZ) รอบหลุม (well) ที่หยอดสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 5 มก./มล. ไว้ ซึ่งบริเวณใสของการยับยั้งแสดงถึงเชื้อถูกยับยั้งและไม่มีการเจริญเติบโต ดังแสดงในตาราง 9 ซึ่งแสดงถึงค่าเฉลี่ย MIZ ของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดจำแนกแต่ละเชื้อรวมทั้งสิ้น 70 สายพันธุ์

ตาราง 9 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางรอบหลุม (MIZ) เป็น มิลลิเมตร

| รหัสเชื้อ<br><i>C. acnes</i> | สารสกัดหยาบจาก<br>ใบมะขามป้อม<br>(ค่าเฉลี่ย) | สารสกัดหยาบจาก<br>เปลือกมังคุด<br>(ค่าเฉลี่ย) |
|------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1                            | -                                            | -                                             |
| 2                            | 11.50                                        | 11.50                                         |
| 3                            | -                                            | -                                             |
| 4                            | 9.00                                         | 11.50                                         |
| 5                            | 11.50                                        | 12.00                                         |
| 6                            | -                                            | -                                             |
| 7                            | -                                            | -                                             |
| 8                            | 9.50                                         | 11.00                                         |
| 9                            | 12.00                                        | 10.00                                         |
| 10                           | 10.50                                        | 10.00                                         |
| 11                           | 11.50                                        | 9.50                                          |
| 12                           | 10.00                                        | 10.00                                         |
| 13                           | 18.00                                        | 15.00                                         |
| 14                           | 11.50                                        | 14.50                                         |
| 15                           | 20.00                                        | 11.00                                         |
| 16                           | 12.00                                        | 11.00                                         |

ตาราง 9 (ต่อ)

| รหัสเชื้อ<br><i>C. acnes</i> | สารสกัดหยาบจาก<br>ใบมะขามป้อม<br>(ค่าเฉลี่ย) | สารสกัดหยาบจาก<br>เปลือกมังคุด<br>(ค่าเฉลี่ย) |
|------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 17                           | 14.50                                        | 9.00                                          |
| 18                           | 14.50                                        | 10.50                                         |
| 19                           | 13.50                                        | 9.50                                          |
| 20                           | 12.00                                        | 9.50                                          |
| 21                           | 12.00                                        | 10.00                                         |
| 22                           | 12.00                                        | 9.50                                          |
| 23                           | 12.00                                        | 9.50                                          |
| 24                           | 15.00                                        | 16.00                                         |
| 25                           | 26.00                                        | 10.00                                         |
| 26                           | 11.50                                        | 11.00                                         |
| 27                           | 12.50                                        | 8.50                                          |
| 28                           | 11.50                                        | 12.00                                         |
| 29                           | 18.00                                        | 15.00                                         |
| 30                           | 11.00                                        | 8.00                                          |
| 31                           | 0.00                                         | 0.00                                          |
| 32                           | 12.00                                        | 10.00                                         |

ตาราง 9 (ต่อ)

| รหัสเชื้อ<br><i>C. acnes</i> | สารสกัดหยาบจาก<br>ใบมะขามป้อม<br>(ค่าเฉลี่ย) | สารสกัดหยาบจาก<br>เปลือกมังคุด<br>(ค่าเฉลี่ย) |
|------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 33                           | 10.50                                        | 9.00                                          |
| 34                           | 18.50                                        | 0.00                                          |
| 35                           | 13.00                                        | 10.00                                         |
| 36                           | 12.00                                        | 10.50                                         |
| 37                           | 12.00                                        | 10.00                                         |
| 38                           | 19.00                                        | 10.00                                         |
| 39                           | 15.50                                        | 9.50                                          |
| 40                           | 22.00                                        | 10.00                                         |
| 41                           | 11.00                                        | 10.00                                         |
| 42                           | 11.00                                        | 10.00                                         |
| 43                           | 15.00                                        | 10.50                                         |
| 44                           | 16.00                                        | 11.50                                         |
| 45                           | 19.00                                        | 10.00                                         |
| 46                           | -                                            | -                                             |
| 47                           | 14.50                                        | 10.00                                         |
| 48                           | 17.00                                        | 12.00                                         |

ตาราง 9 (ต่อ)

| รหัสเชื้อ<br><i>C. acnes</i> | สารสกัดหยาบจาก<br>ใบมะขามป้อม<br>(ค่าเฉลี่ย) | สารสกัดหยาบจาก<br>เปลือกมังคุด<br>(ค่าเฉลี่ย) |
|------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 49                           | 28.00                                        | 10.00                                         |
| 50                           | 0.00                                         | 8.50                                          |
| 51                           | 18.00                                        | 15.00                                         |
| 52                           | 18.00                                        | 15.00                                         |
| 53                           | 18.50                                        | 15.00                                         |
| 54                           | 16.50                                        | 15.00                                         |
| 55                           | 17.50                                        | 15.00                                         |
| 56                           | 17.50                                        | 15.00                                         |
| 57                           | 18.00                                        | 15.00                                         |
| 58                           | 17.50                                        | 15.00                                         |
| 59                           | 18.00                                        | 15.00                                         |
| 60                           | 18.00                                        | 15.00                                         |
| 61                           | 17.50                                        | 15.00                                         |
| 62                           | 19.00                                        | 10.00                                         |
| 63                           | 17.00                                        | 15.00                                         |
| 64                           | 18.50                                        | 15.00                                         |

ตาราง 9 (ต่อ)

| รหัสเชื้อ<br><i>C. acnes</i> | สารสกัดหยาบจาก<br>ใบมะขามป้อม<br>(ค่าเฉลี่ย) | สารสกัดหยาบจาก<br>เปลือกมังคุด<br>(ค่าเฉลี่ย) |
|------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 65                           | 16.50                                        | 15.00                                         |
| 66                           | 19.00                                        | 10.00                                         |
| 67                           | 15.00                                        | 13.50                                         |
| 68                           | 21.50                                        | 10.50                                         |
| 69                           | 19.00                                        | 10.00                                         |
| 70                           | 18.50                                        | 10.00                                         |
| 71                           | 17.00                                        | 10.00                                         |
| 72                           | 18.50                                        | 8.50                                          |
| 73                           | 18.50                                        | 15.00                                         |
| 74                           | 19.00                                        | 10.00                                         |
| 75                           | 19.00                                        | 10.00                                         |

ขนาดหลุม เท่ากับ 4 มม. หน่วย MIZ คือ มม. - : เชื้อไม่เจริญเติบโตจากการ  
เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพประกอบ 20 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes*  
ด้วยวิธี agar well diffusion

ค่าเฉลี่ยรวมของค่า MIZ ทั้งหมดต่อเชื้อและจำแนกเป็นเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ แสดงดังตาราง 10

ตาราง 10 แสดงค่าเฉลี่ยรวมของ MIZ ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อ *C. acnes* โดยจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ

| เชื้อ <i>C. acnes</i> | สารสกัดหยาบ  | MIZ              |                      | <i>p</i> -value* |
|-----------------------|--------------|------------------|----------------------|------------------|
|                       |              | Mean $\pm$ SD    | Median (IQR)         |                  |
| ทั้งหมด<br>(N=70)     | ใบมะขามป้อม  | 15.14 $\pm$ 4.65 | 15.75 (12.00, 18.50) | < 0.001          |
|                       | เปลือกมังคุด | 11.20 $\pm$ 3.02 | 10.00 (10.00, 15.00) |                  |

ตาราง 10 (ต่อ)

| เชื้อ <i>C. acnes</i>    | สารสกัดหยาบ  | MIZ              |                      | <i>p</i> -value* |
|--------------------------|--------------|------------------|----------------------|------------------|
|                          |              | Mean $\pm$ SD    | Median (IQR)         |                  |
| กลุ่มดีดื้อยา<br>(N=44)  | ใบมะขามป้อม  | 13.76 $\pm$ 4.32 | 12.00 (11.50, 17.00) | < 0.001          |
|                          | เปลือกมังคุด | 10.22 $\pm$ 2.90 | 10.00 (9.50, 11.00)  |                  |
| กลุ่มไม่ดื้อยา<br>(N=26) | ใบมะขามป้อม  | 17.48 $\pm$ 4.31 | 18.00 (17.00, 18.50) | 0.0001           |
|                          | เปลือกมังคุด | 12.87 $\pm$ 2.49 | 15.00 (10.00, 15.00) |                  |

ขนาดหลุม เท่ากับ 4 มม. หน่วย MIZ คือ มม. \**p*-value คิดจาก Wilcoxon matched signed-rank test

จากตาราง 10 เมื่อได้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้งเชื้อรอบหลุม หน่วยเป็น มม. จึงนำค่า MIZ มาเฉลี่ยรวมทั้งหมด และจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยา ปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ

โดยพบว่าค่าเฉลี่ยรวม MIZ ต่อเชื้อทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม เท่ากับ 15.14  $\pm$  4.65 มม. และค่าเฉลี่ยรวม MIZ ต่อเชื้อทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดเท่ากับ 11.20  $\pm$  3.02 มม. สรุปว่าค่าเฉลี่ยรวม MIZ ต่อเชื้อทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมมากกว่าค่าเฉลี่ยรวม MIZ ต่อเชื้อทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด และพบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ )

เมื่อนำค่าเฉลี่ยรวมของ MIZ ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อ *C. acnes* มาจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ พบว่าค่าเฉลี่ยรวม MIZ ในกลุ่มเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมเท่ากับ 13.76  $\pm$  4.32 มม. และค่าเฉลี่ยรวม MIZ ในกลุ่มเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดเท่ากับ 10.22  $\pm$  2.90 มม. เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรวม MIZ ในกลุ่มเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะระหว่าง

สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) และในกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ พบว่าค่าเฉลี่ยรวม MIZ ในกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยาปฏิชีวนะของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมเท่ากับ  $17.48 \pm 4.31$  มม. และค่าเฉลี่ยรวม MIZ ในกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยาปฏิชีวนะของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดเท่ากับ  $12.87 \pm 2.49$  มม. และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรวม MIZ ในกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยาปฏิชีวนะระหว่างสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0001$ )

ตาราง 11 แสดงค่าเฉลี่ยรวมของ MIZ ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อ *C. acnes* โดยจำแนกตามสารสกัดหยาบสมุนไพรแต่ละชนิด

| สารสกัดหยาบ  |                          | MIZ              |                      | p-value* |
|--------------|--------------------------|------------------|----------------------|----------|
|              |                          | Mean $\pm$ SD    | Median (IQR)         |          |
| ใบมะขามป้อม  | กลุ่มดื้อยา<br>(N=44)    | $13.76 \pm 4.32$ | 12.00 (11.50, 17.00) | 0.0002   |
|              | กลุ่มไม่ดื้อยา<br>(N=26) | $17.48 \pm 4.31$ | 18.00 (17.00, 18.50) |          |
| เปลือกมังคุด | กลุ่มดื้อยา<br>(N=44)    | $10.22 \pm 2.90$ | 10.00 (9.50, 11.00)  | 0.0005   |
|              | กลุ่มไม่ดื้อยา<br>(N=26) | $12.87 \pm 2.49$ | 15.00 (10.00, 15.00) |          |

ขนาดหลุม เท่ากับ 4 มม. หน่วย MIZ คือ มม. \*p-value คิดจาก Two-sample Wilcoxon rank-sum test

จากตาราง 11 เมื่อนำค่าเฉลี่ยรวม MIZ ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อ *C. acnes* ที่ได้มาจำแนกตามสารสกัดหยาบสมุนไพรแต่ละชนิด พบว่า ค่าเฉลี่ยรวม MIZ ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมต่อเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะเท่ากับ  $13.76 \pm 4.32$  มม. และค่าเฉลี่ยรวม MIZ ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมต่อเชื้อ *C. acnes* ชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะเท่ากับ  $17.48 \pm 4.31$  มม. และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรวม MIZ ของสารสกัดหยาบจาก

ใบมะขามป้อมต่อเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะกับชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ พบว่า บริเวณใสของการยับยั้งเชื้อมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0002$ )

ค่าเฉลี่ยรวม MIZ ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดต่อเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะเท่ากับ  $10.22 \pm 2.90$  มม. และค่าเฉลี่ยรวม MIZ ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดต่อเชื้อ *C. acnes* ชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะเท่ากับ  $12.87 \pm 2.49$  มม. และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรวม MIZ ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดต่อเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะกับเชื้อ *C. acnes* ชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ พบว่า บริเวณใสของการยับยั้งเชื้อมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0005$ )

สรุปได้ว่าจากวิธี agar well diffusion สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ได้ โดยค่าเฉลี่ยรวม MIZ ต่อเชื้อ *C. acnes* ทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมมากกว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แปลว่า สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด และค่าเฉลี่ยรวม MIZ ของสารสกัดหยาบทั้งสองชนิดระหว่างเชื้อ *C. acnes* ชนิดที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและชนิดที่ไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ พบว่า ในกลุ่มเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมีค่า MIZ น้อยกว่ากลุ่มเชื้อที่ไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ชนิดที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะดีกว่าเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ

**ตอนที่ 2 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด หรือ minimal inhibition concentration (MIC) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและจากเปลือกมังคุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี broth microdilution**

ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจากวิธี agar well diffusion จะได้ความเข้มข้น 5 มก./มล. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ได้ นำความเข้มข้นนั้นมาเป็นความเข้มข้นเริ่มต้นในการหา MIC ด้วยวิธี broth microdilution ได้ผลค่าเฉลี่ย MIC ของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดต่อเชื้อแต่ละสายพันธุ์รวมทั้งหมด 70 สายพันธุ์ ดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 12 ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี broth microdilution

| รหัสเชื้อ<br><i>C. acnes</i> | สารสกัดหยาบจาก<br>ใบมะขามป้อม<br>(ค่าเฉลี่ย) | สารสกัดหยาบจาก<br>เปลือกมังคุด<br>(ค่าเฉลี่ย) |
|------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1                            | -                                            | -                                             |
| 2                            | 0.039                                        | 0.078                                         |
| 3                            | -                                            | -                                             |
| 4                            | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 5                            | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 6                            | -                                            | -                                             |
| 7                            | -                                            | -                                             |
| 8                            | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 9                            | 0.156                                        | 0.078                                         |
| 10                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 11                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 12                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 13                           | 0.039                                        | 0.039                                         |
| 14                           | 0.156                                        | 0.078                                         |
| 15                           | 0.039                                        | 0.078                                         |

ตาราง 12 (ต่อ)

| รหัสเชื้อ<br><i>C. acnes</i> | สารสกัดหยาบจาก<br>ใบมะขามป้อม<br>(ค่าเฉลี่ย) | สารสกัดหยาบจาก<br>เปลือกมังคุด<br>(ค่าเฉลี่ย) |
|------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 16                           | 0.039                                        | 0.078                                         |
| 17                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 18                           | 0.156                                        | 0.078                                         |
| 19                           | 0.078                                        | 0.039                                         |
| 20                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 21                           | 0.156                                        | 0.078                                         |
| 22                           | 0.156                                        | 0.078                                         |
| 23                           | 0.156                                        | 0.078                                         |
| 24                           | 0.059                                        | 0.078                                         |
| 25                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 26                           | 0.078                                        | 0.039                                         |
| 27                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 28                           | 0.156                                        | 0.078                                         |
| 29                           | 0.039                                        | 0.078                                         |
| 30                           | 0.039                                        | 0.156                                         |
| 31                           | 0.313                                        | 0.078                                         |

ตาราง 12 (ต่อ)

| รหัสเชื้อ<br><i>C. acnes</i> | สารสกัดหยาบจาก<br>ใบมะขามป้อม<br>(ค่าเฉลี่ย) | สารสกัดหยาบจาก<br>เปลือกมังคุด<br>(ค่าเฉลี่ย) |
|------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 32                           | 0.020                                        | 0.039                                         |
| 33                           | 0.020                                        | 0.156                                         |
| 34                           | 0.039                                        | 0.039                                         |
| 35                           | 0.156                                        | 0.039                                         |
| 36                           | 0.156                                        | 0.078                                         |
| 37                           | 0.156                                        | 0.078                                         |
| 38                           | 0.156                                        | 0.039                                         |
| 39                           | 0.156                                        | 0.039                                         |
| 40                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 41                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 42                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 43                           | 0.156                                        | 0.078                                         |
| 44                           | 0.039                                        | 0.078                                         |
| 45                           | 0.156                                        | 0.078                                         |
| 46                           | -                                            | -                                             |

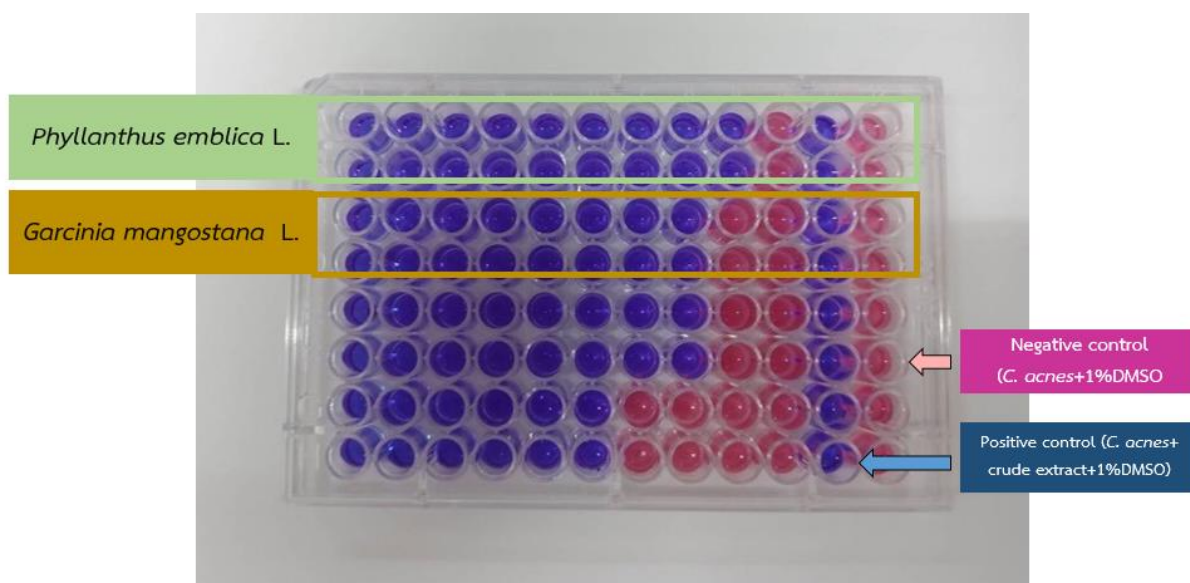
ตาราง 12 (ต่อ)

| รหัสเชื้อ<br><i>C. acnes</i> | สารสกัดหยาบจาก<br>ใบมะขามป้อม<br>(ค่าเฉลี่ย) | สารสกัดหยาบจาก<br>เปลือกมังคุด<br>(ค่าเฉลี่ย) |
|------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 47                           | 0.156                                        | 0.039                                         |
| 48                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 49                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 50                           | 0.020                                        | 0.078                                         |
| 51                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 52                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 53                           | 0.039                                        | 0.039                                         |
| 54                           | 0.039                                        | 0.078                                         |
| 55                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 56                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 57                           | 0.078                                        | 0.156                                         |
| 58                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 59                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 60                           | 0.039                                        | 0.078                                         |
| 61                           | 0.039                                        | 0.039                                         |
| 62                           | 0.313                                        | 0.078                                         |

ตาราง 12 (ต่อ)

| รหัสเชื้อ<br><i>C. acnes</i> | สารสกัดหยาบจาก<br>ใบมะขามป้อม<br>(ค่าเฉลี่ย) | สารสกัดหยาบจาก<br>เปลือกมังคุด<br>(ค่าเฉลี่ย) |
|------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 63                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 64                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 65                           | 0.078                                        | 0.078                                         |
| 66                           | 0.020                                        | 0.039                                         |
| 67                           | 0.039                                        | 0.078                                         |
| 68                           | 0.156                                        | 0.078                                         |
| 69                           | 0.039                                        | 0.039                                         |
| 70                           | 0.039                                        | 0.039                                         |
| 71                           | 0.020                                        | 0.039                                         |
| 72                           | 0.020                                        | 0.078                                         |
| 73                           | 0.039                                        | 0.078                                         |
| 74                           | 0.039                                        | 0.039                                         |
| 75                           | 0.039                                        | 0.078                                         |

หน่วย MIC คือ มก./มล. -: เชื้อไม่เจริญเติบโตจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพประกอบ 21 แสดงผลค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี broth microdilution

ตาราง 13 ผลค่าเฉลี่ยรวมของค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* โดยจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ

| เชื้อ <i>C. acnes</i> | สารสกัดหยาบ  | MIC               |                      | <i>p</i> -value* |
|-----------------------|--------------|-------------------|----------------------|------------------|
|                       |              | Mean $\pm$ SD     | Median (IQR)         |                  |
| ทั้งหมด<br>(N=70)     | ใบมะขามป้อม  | 0.087 $\pm$ 0.060 | 0.078 (0.039, 0.156) | 0.3273           |
|                       | เปลือกมังคุด | 0.072 $\pm$ 0.024 | 0.078 (0.078, 0.078) |                  |

ตาราง 13 (ต่อ)

| เชื้อ <i>C. acnes</i>     | สารสกัดหยาบ  | MIC               |                      | <i>p</i> -value* |
|---------------------------|--------------|-------------------|----------------------|------------------|
|                           |              | Mean $\pm$ SD     | Median (IQR)         |                  |
| กลุ่มเชื้อยา<br>(N=44)    | ใบมะขามป้อม  | 0.092 $\pm$ 0.060 | 0.078 (0.039, 0.156) | 0.1512           |
|                           | เปลือกมังคุด | 0.074 $\pm$ 0.024 | 0.078 (0.078, 0.078) |                  |
| กลุ่มไม่เชื้อยา<br>(N=26) | ใบมะขามป้อม  | 0.079 $\pm$ 0.061 | 0.078 (0.039, 0.078) | 0.5992           |
|                           | เปลือกมังคุด | 0.071 $\pm$ 0.025 | 0.078 (0.039, 0.078) |                  |

หน่วย MIC คือ มก./มล. \**p*-value คัดจาก Wilcoxon matched signed-rank test

เมื่อได้ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี broth microdilution ต่อเชื้อ 70 สายพันธุ์ จึงนำค่า MIC มาเฉลี่ยรวมทั้งหมด และจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดเชื้อยาปฏิชีวนะและไม่เชื้อยาปฏิชีวนะ ดังแสดงในตาราง 13

ค่าเฉลี่ยรวม MIC ต่อเชื้อทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมเท่ากับ  $0.087 \pm 0.060$  มก./มล. และค่าเฉลี่ยรวม MIC ต่อเชื้อทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดเท่ากับ  $0.072 \pm 0.024$  มก./มล. เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรวม MIC ต่อเชื้อทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมกับสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.3273$ )

ค่าเฉลี่ย MIC ในกลุ่มเชื้อเชื้อยาปฏิชีวนะของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมเท่ากับ  $0.092 \pm 0.060$  มก./มล. เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย MIC ในกลุ่มเชื้อเชื้อยาปฏิชีวนะของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดซึ่งเท่ากับ  $0.074 \pm 0.024$  มก./มล. พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.1512$ ) ส่วนในกลุ่มเชื้อไม่เชื้อยาปฏิชีวนะของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมเท่ากับ  $0.079 \pm 0.061$  มก./มล. เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย MIC ในกลุ่มเชื้อ

ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดซึ่งเท่ากับ  $0.071 \pm 0.025$  มก./มล. พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.5992$ )

ตาราง 14 ผลค่าเฉลี่ยรวมของค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* โดยจำแนกตามสารสกัดหยาบสมุนไพรแต่ละชนิด

| สารสกัดหยาบ  |                          | MIC               |                      | <i>p</i> -value* |
|--------------|--------------------------|-------------------|----------------------|------------------|
|              |                          | Mean $\pm$ SD     | Median (IQR)         |                  |
| ใบมะขามป้อม  | กลุ่มดื้อยา<br>(N=44)    | $0.092 \pm 0.060$ | 0.078 (0.039, 0.156) | 0.2796           |
|              | กลุ่มไม่ดื้อยา<br>(N=26) | $0.079 \pm 0.061$ | 0.078 (0.039, 0.078) |                  |
| เปลือกมังคุด | กลุ่มดื้อยา<br>(N=44)    | $0.074 \pm 0.024$ | 0.078 (0.078, 0.078) | 0.5462           |
|              | กลุ่มไม่ดื้อยา<br>(N=26) | $0.071 \pm 0.025$ | 0.078 (0.039, 0.078) |                  |

หน่วย MIC คือ มก./มล. \**p*-value คัดจาก Two-sample Wilcoxon rank-sum test

เมื่อนำค่าเฉลี่ยรวม MIC ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อ *C. acnes* ที่ได้มา จำแนกตามสารสกัดหยาบสมุนไพรแต่ละชนิด พบว่า ค่าเฉลี่ยรวม MIC ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมต่อเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะเท่ากับ  $0.092 \pm 0.060$  มก./มล. เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. acnes* ชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะซึ่งมีค่าเฉลี่ยรวม MIC เท่ากับ  $0.079 \pm 0.061$  มก./มล. พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.2796$ ) และค่าเฉลี่ยรวม MIC ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดต่อเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะเท่ากับ  $0.074 \pm 0.024$  มก./มล. เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. acnes* ชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะซึ่งมีค่าเฉลี่ยรวม MIC เท่ากับ

$0.071 \pm 0.025$  มก./มล. พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.5462$ ) ดังแสดงในตาราง 14

โดยสรุปจากวิธี broth microdilution พบว่าค่าเฉลี่ยรวม MIC ต่อเชื้อ *C. acnes* ทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมมีค่ามากกว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด แปลผลได้ว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ดีกว่าสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่าความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมในยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ไม่แตกต่างจากสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด และเมื่อเปรียบเทียบค่า MIC เฉลี่ยของสารสกัดหยาบทั้งสองชนิดระหว่างเชื้อ *C. acnes* ชนิดที่ติดต่อยาปฏิชีวนะและชนิดที่ไม่ติดต่อยาปฏิชีวนะ พบว่า ในกลุ่มเชื้อที่ติดต่อยาปฏิชีวนะมีค่า MIC สูงกว่ากลุ่มเชื้อที่ไม่ติดต่อยาปฏิชีวนะ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่าทั้งสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ชนิดติดต่อยาปฏิชีวนะไม่แตกต่างกับเชื้อ *C. acnes* ชนิดไม่ติดต่อยาปฏิชีวนะ

**ตอนที่ 3 การทดสอบหาการเสริมฤทธิ์ หรือ fractional inhibitory concentration index (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ด้วยวิธีการ checkerboard testing**

คัดเลือกตัวแทนเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธีการสุ่มอย่างง่าย เพื่อให้ได้จำนวนกลุ่มตัวแทนเชื้อ *C. acnes* ตามสัดส่วนของกลุ่มที่จัดตามค่า MIC จากตัวอย่างทั้งชนิดติดต่อยาปฏิชีวนะและไม่ติดต่อยาปฏิชีวนะ นำมาทดสอบหาผลการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด (FICI) ด้วยวิธีการ checkerboard testing ต่อเชื้อแต่ละสายพันธุ์รวมทั้งหมด 35 สายพันธุ์ ดังแสดงในตาราง 15

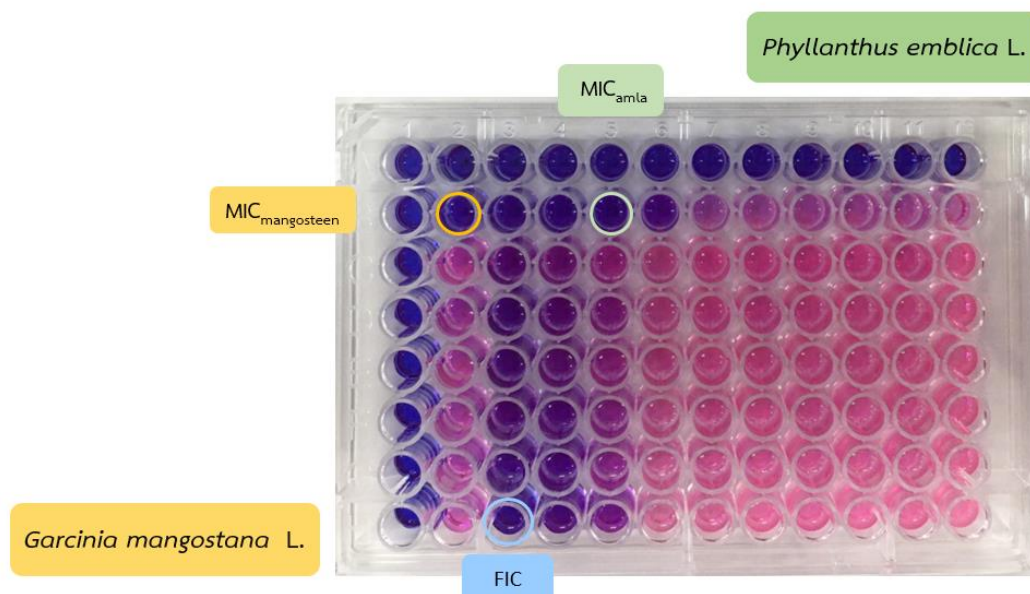
ตาราง 15 ผลการเสริมฤทธิ์ (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ด้วยวิธีการ checkerboard testing

| รหัส<br>เชื้อ<br>C. | สารสกัดหยาบจาก<br>ใบมะขามป้อม         |                                                   | สารสกัดหยาบจาก<br>เปลือกมังคุด     |                                                   | *FICI | Type of<br>interaction |
|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------|-------|------------------------|
|                     | MIC <sub>มะขามป้อม</sub><br>(มก./มล.) | MIC <sub>มะขามป้อม+<br/>มังคุด</sub><br>(มก./มล.) | MIC <sub>มังคุด</sub><br>(มก./มล.) | MIC <sub>มังคุด+<br/>มะขามป้อม</sub><br>(มก./มล.) |       |                        |
| <i>acnes</i>        |                                       |                                                   |                                    |                                                   |       |                        |
| 2                   | 0.039                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 1.359 | Indifference           |
| 9                   | 0.156                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.359 | Synergy                |
| 10                  | 0.078                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.692 | Additive               |
| 13                  | 0.039                                 | 0.104                                             | 0.039                              | 0.002                                             | 2.718 | Indifference           |
| 14                  | 0.156                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.359 | Synergy                |
| 16                  | 0.039                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 1.359 | Indifference           |
| 18                  | 0.156                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.359 | Synergy                |
| 19                  | 0.078                                 | 0.026                                             | 0.039                              | 0.001                                             | 0.359 | Synergy                |
| 20                  | 0.078                                 | 0.104                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 1.359 | Indifference           |
| 21                  | 0.156                                 | 0.026                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.192 | Synergy                |
| 22                  | 0.156                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.359 | Synergy                |
| 23                  | 0.156                                 | 0.026                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.192 | Synergy                |
| 28                  | 0.156                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.359 | Synergy                |
| 29                  | 0.039                                 | 0.104                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 2.692 | Indifference           |
| 30                  | 0.039                                 | 0.026                                             | 0.156                              | 0.003                                             | 0.686 | Additive               |
| 32                  | 0.020                                 | 0.052                                             | 0.039                              | 0.013                                             | 2.933 | Indifference           |
| 33                  | 0.020                                 | 0.013                                             | 0.156                              | 0.007                                             | 0.695 | Additive               |
| 35                  | 0.156                                 | 0.104                                             | 0.039                              | 0.001                                             | 0.692 | Additive               |
| 36                  | 0.156                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.359 | Synergy                |
| 37                  | 0.156                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.359 | Synergy                |
| 41                  | 0.078                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.692 | Additive               |
| 43                  | 0.156                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.359 | Synergy                |
| 44                  | 0.039                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 1.359 | Indifference           |

ตาราง 15 (ต่อ)

| รหัส<br>เชื้อ       | สารสกัดหยาบจาก<br>ใบมะขามป้อม         |                                                   | สารสกัดหยาบจาก<br>เปลือกมังคุด     |                                                   | *FICI | Type of<br>interaction |
|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------|-------|------------------------|
|                     | MIC <sub>มะขามป้อม</sub><br>(มก./มล.) | MIC <sub>มะขามป้อม+<br/>มังคุด</sub><br>(มก./มล.) | MIC <sub>มังคุด</sub><br>(มก./มล.) | MIC <sub>มังคุด+<br/>มะขามป้อม</sub><br>(มก./มล.) |       |                        |
| <i>C.<br/>acnes</i> |                                       |                                                   |                                    |                                                   |       |                        |
| 45                  | 0.156                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.359 | Synergy                |
| 47                  | 0.156                                 | 0.052                                             | 0.039                              | 0.001                                             | 0.359 | Synergy                |
| 48                  | 0.078                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.692 | Additive               |
| 49                  | 0.078                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.013                                             | 0.833 | Additive               |
| 50                  | 0.020                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.052                                             | 3.267 | Indifference           |
| 57                  | 0.078                                 | 0.052                                             | 0.156                              | 0.104                                             | 1.333 | Indifference           |
| 60                  | 0.039                                 | 0.104                                             | 0.078                              | 0.052                                             | 3.333 | Indifference           |
| 64                  | 0.078                                 | 0.052                                             | 0.078                              | 0.026                                             | 1.000 | Additive               |
| 66                  | 0.020                                 | 0.026                                             | 0.039                              | 0.026                                             | 1.967 | Indifference           |
| 68                  | 0.156                                 | 0.104                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 0.692 | Additive               |
| 69                  | 0.039                                 | 0.052                                             | 0.039                              | 0.001                                             | 1.359 | Indifference           |
| 73                  | 0.039                                 | 0.104                                             | 0.078                              | 0.002                                             | 2.692 | Indifference           |

\* FICI  $\leq$  0.5= Synergy; FICI>0.5 or  $\leq$  1= Additive/Partial synergy; and FICI>1 or  $\leq$  4=Indifference; and FICI>4=Antagonism



ภาพประกอบ 22 แสดงผลการเสริมฤทธิ์ (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดด้วยวิธีการ checkerboard testing

ตาราง 16 ผลการเสริมฤทธิ์ (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* (%)

| เชื้อ <i>C. acnes</i><br>Type of interaction | Synergy        | Additive/<br>Partial synergy | Indifference   | Antagonism |
|----------------------------------------------|----------------|------------------------------|----------------|------------|
| ทั้งหมด<br>(N=35)                            | 13<br>(37.14%) | 9<br>(25.72%)                | 13<br>(37.14%) | 0<br>(0%)  |
| กลุ่มดีดอยา<br>(N=24)                        | 11<br>(45.18%) | 5<br>(20.84%)                | 8<br>(33.33%)  | 0<br>(0%)  |
| กลุ่มไม่ดีดอยา<br>(N=11)                     | 2<br>(18.18%)  | 4<br>(36.36%)                | 5<br>(45.46%)  | 0<br>(0%)  |

จากตาราง 16 นำผลการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด (FICI) ด้วยวิธีการ checkerboard testing ต่อเชื้อ 35 สายพันธุ์ จึงนำค่า FICI ทั้งหมดมาคำนวณ พบว่า 13 สายพันธุ์ (37.14%) มีผลเสริมฤทธิ์กัน (synergy), 9 สายพันธุ์ (25.72%) มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (additive or partial synergy), 13 สายพันธุ์ (37.14%) มีผลไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifference) และ ไม่พบว่ามีผลต้านฤทธิ์กัน (antagonism)

ตาราง 17 ผลการเสริมฤทธิ์ (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* โดยจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ (%)

| เชื้อ <i>C. acnes</i><br>Type of interaction | Synergy +                |  | Indifference + |  | <i>p</i> -value* |
|----------------------------------------------|--------------------------|--|----------------|--|------------------|
|                                              | Additive/Partial synergy |  | Antagonism     |  |                  |
| กลุ่มดื้อยา<br>(N=24)                        | 16<br>(66.67%)           |  | 8<br>(33.33%)  |  | 0.708            |
| กลุ่มไม่ดื้อยา<br>(N=11)                     | 6<br>(54.54%)            |  | 5<br>(45.46%)  |  |                  |

\**p*-value คิดจาก Fisher's exact test

จากตาราง 17 ผลการเสริมฤทธิ์ (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* โดยจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ พบว่าผลการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดต่อเชื้อ 35 สายพันธุ์ โดยเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ มีผลเสริมฤทธิ์กัน (รวมผลร้อยละของกลุ่ม synergy และกลุ่ม additive or partial synergy) เท่ากับ 66.67% และมีผลไม่เสริมฤทธิ์กัน (รวมผลร้อยละของกลุ่ม indifference และ กลุ่ม antagonism) เท่ากับ 33.33% ส่วนเชื้อ *C. acnes* ชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ มีผลเสริมฤทธิ์กัน (รวมผลร้อยละของกลุ่ม synergy และกลุ่ม additive or partial synergy) เท่ากับ 54.54% และมีผลไม่เสริมฤทธิ์กัน (รวมผลร้อยละของกลุ่ม indifference และ กลุ่ม antagonism) เท่ากับ 45.46% เมื่อเปรียบเทียบ

ระหว่างกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value = 0.708)

สรุปได้จากวิธี checkerboard testing พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* 35 สายพันธุ์ โดยมีผลเสริมฤทธิ์กัน (synergy) และมีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (additive/ partial synergy) รวม 62.86% และไม่พบว่ามีผลต้านฤทธิ์กัน (antagonism) และเมื่อจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ พบว่าผลการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดระหว่างกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่าผลการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ



## บทที่ 5

### สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### อภิปรายผล

สิวเป็นโรคผิวหนังเกิดจากการอักเสบของรูขุมขนและต่อมไขมัน (pilosebaceous unit) ซึ่งพบมากในวัยรุ่นและพบน้อยลงในวัยผู้ใหญ่ สิวเกิดจากทั้งปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน เช่น พันธุกรรม ฮอโมน ความเครียด เป็นต้น<sup>(1)</sup> โดยพยาธิสภาพหลักของการเกิดสิว มี 4 ปัจจัย<sup>(28-30)</sup> ได้แก่ หนึ่งกำพร้าบริเวณรูขุมขนแบ่งตัวมากเกินไปและทำให้เกิดการอุดตันในรูขุมขน (follicular epithelial hyperproliferation and resultant follicular plugging) การผลิตไขมันจากต่อมไขมันที่มากเกินไป (excess sebum production) การอักเสบของผิวหนัง (inflammatory response) และการพบเชื้อ *Cutibacterium acnes* (the presence and activity of *C. acnes*)

ในประเทศไทยมีแนวทางการรักษาสิวสำหรับแพทย์ออกโดยสมาคมแพทย์ผิวหนังแห่งประเทศไทย<sup>(6)</sup> ซึ่งมีการจัดระดับความรุนแรงของสิวตามเกณฑ์ของลีดส์ (Leeds revised acne grading system)<sup>(7)</sup> โดยแบ่งออกเป็นความรุนแรงของสิवरดับน้อย ระดับปานกลาง และระดับรุนแรง โดยวิธีการรักษาสิวมีหลายวิธี ทั้งวิธีการรักษาสิวด้วยยาทา เช่น ยาทาเฉพาะที่เบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ (topical benzoyl peroxide) ยาปฏิชีวนะชนิดทา (topical antibiotics) ยาทาเฉพาะที่กรดวิตามินเอ (topical retinoids) เป็นต้น และวิธีการรักษาสิวด้วยยารับประทาน เช่น ยาปฏิชีวนะชนิดรับประทาน ยากรดวิตามินเอชนิดรับประทาน เป็นต้น<sup>(6)</sup>

โดยเชื้อ *C. acnes* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่อาศัยออกซิเจนในการหายใจ (gram positive anaerobic bacteria)<sup>(37, 38)</sup> พบบริเวณรูขุมขนและต่อมไขมัน ซึ่งสามารถทำให้เกิดแบ่งตัวของหนึ่งกำพร้าบริเวณรูขุมขนมากขึ้นจนเกิดการอุดตันในรูขุมขน และก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบและเกิดเป็นสิวดูตันขึ้น (comedone formation)<sup>(36, 39, 40)</sup>

เนื่องจากความแพร่หลายในการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งรูปแบบยาทาและยารับประทานในการรักษาสิว จึงทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* เพิ่มมากขึ้น โดยในสหรัฐอเมริกามีการศึกษาสำรวจการรักษาสิวด้วยยาปฏิชีวนะชนิดทาอย่างเดียวนับปี ค.ศ. 1995 พบอัตราการให้มากถึงร้อยละ 10 และพบว่าอัตราการให้ลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงปี ค.ศ. 2010 เหลือเพียงร้อยละ 5 แม้ว่าอัตราการให้ยาปฏิชีวนะชนิดทาเพียงอย่างเดียวจะลดลงอย่างมาก แต่ยังคงพบปัญหาเชื้อดื้อยาจากการรักษาสิวด้วยยาปฏิชีวนะชนิดทา<sup>(9)</sup> ประชากรในประเทศไทยสามารถหาซื้อยาปฏิชีวนะทั้งรูปแบบยาทาและยารับประทานได้ง่าย และผู้ป่วยยังไม่ทราบวิธีการ

รักษาสิวที่เหมาะสมจึงทำให้ผลการรักษาไม่ดีเท่าที่ควรและพบปัญหาเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้น จึงมีการศึกษาในปี ค.ศ. 2017 Laochunswan A.<sup>(10)</sup> ทำการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *C. acnes* กับยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด ได้แก่ erythromycin, clindamycin, tetracycline, doxycycline และ amoxicillin พบว่าเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ erythromycin มากที่สุด รองลงมา คือ clindamycin และ tetracycline ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและดื้อด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุด (minimal inhibitory concentration / MIC) ของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ที่สูง และพบว่าผู้ป่วยที่เคยมีประวัติให้ยาปฏิชีวนะมาก่อน จะพบเชื้อ *C. acnes* ดื้อยามากกว่ากลุ่มที่ไม่มีประวัติให้ยาปฏิชีวนะมาก่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ doxycycline และ amoxicillin

ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรไทยที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) มากมาย จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เคยมีงานวิจัยทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสมุนไพร 2 ชนิดนี้กับเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการ พบว่าสารสกัดหยาบของสารทั้งสองตัวนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ได้ แต่ยังไม่พบการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดจากสมุนไพรทั้งสองชนิดในเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิ่ว

การศึกษานี้ในครั้งนี้ วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิ่วทั้งหมด 70 สายพันธุ์ โดยศึกษาในห้องทดลองเชิงพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ประยุกต์ เพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยสิ่ว ลดปัญหาเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะและนำผลผลิตผลการเกษตรของประเทศมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์ในทางการแพทย์

การศึกษานี้ ศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ทั้งหมด 70 สายพันธุ์ จากงานวิจัยของ Laochunswan A.<sup>(10)</sup> (SWUEC/E-272/2559) นำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ<sup>(14-24)</sup> ด้วยวิธี agar well diffusion โดยอ่านผลจากบริเวณใสของการยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory zone/MIZ) และหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimal inhibitory concentration/MIC) ด้วยวิธี broth microdilution จากนั้นศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ทั้งชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี checkerboard testing (antimicrobial synergy study -

checkerboard testing)<sup>(25)</sup> จะได้ค่า fractional inhibitory concentration index (FICI) value ซึ่งจะสามารถนำมาพัฒนาสูตรเป็นยาทางเลือกในการรักษาสิวต่อไป

### อภิปรายผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและจากเปลือกมังคุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้ง หรือ minimal inhibition zone (MIZ)

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ได้ โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้ง (inhibition zone) รอบหลุมที่เติมสารสกัดหยาบ ซึ่งประเมินผลเป็น มิลลิเมตร (มม.) แปลผลเป็นค่า MIZ (minimal inhibition zone)

จากการทดลองด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ทั้ง 70 สายพันธุ์ โดยที่ความเข้มข้นที่ 5 มก./มล. ของสารสกัดหยาบ พบว่าค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมเท่ากับ 15.14 มม. และสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดเท่ากับ 11.20 มม. และค่าเฉลี่ยรวม MIZ ต่อเชื้อทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Deewongkij P.<sup>(12)</sup> พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยสิว มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้งเท่ากับ 14.99 มม. และจากการศึกษาของ Chomnawang M.T.<sup>(13)</sup> พบว่าสารสกัดหยาบจากมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการ มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้งมากกว่าเท่ากับ 15 มม. ซึ่งจะเห็นได้ว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมมีความใกล้เคียงกับสารสกัดหยาบจากมังคุด แต่จากงานวิจัยทั้งสองทำการศึกษาในเชื้อ *C. acnes* ต่างสายพันธุ์กันจึงส่งผลต่อค่า MIZ ในการศึกษาด้วย ในขณะที่งานวิจัยนี้ ผลการศึกษาความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมดีกว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion สันนิษฐานว่าเนื่องจากสารสกัดหยาบที่ทำการสกัดในแต่ละครั้งจะได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* แต่ละครั้งไม่เท่ากัน ในวิจัยครั้งนี้จึงมีค่า MIZ แตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้า แต่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ได้ใกล้เคียงกัน

เมื่อสังเกตผลค่า MIZ เฉลี่ยของสารสกัดหยาบทั้งสองชนิดจะพบว่าเมื่อแยกเป็นกลุ่มเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ MIZ ของสารสกัดหยาบทั้งสองชนิดระหว่างเชื้อ *C. acnes* ชนิดที่ดื้อยาปฏิชีวนะและชนิดที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ พบว่าค่า MIZ ในการยับยั้งเชื้อทั้งสองกลุ่ม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อสังเกตค่าเฉลี่ยรวม MIZ ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อ *C. acnes* ที่ได้มาจำแนกตามสารสกัดหยาบสมุนไพรแต่ละชนิด พบว่า ค่าเฉลี่ยรวม MIZ ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะดีกว่าเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ และค่าเฉลี่ยรวม MIZ ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ชนิดไม่ดื้อยาปฏิชีวนะดีกว่าเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ ดังแสดงในตาราง 11

เนื่องจากวิธี agar well diffusion เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. acnes* ใน Brain heart infusion (BHI) agar ซึ่ง BHI agar ประกอบด้วย calf brain infusion, beef heart infusion, proteose peptone, เดกซ์โตรส (dextrose), ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate), โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride), น้ำที่ผ่านขบวนการขจัดอิออนของสารละลายทั้งหมด (deionized water) และวุ้น (agar) ส่วนประกอบทั้งหมดของ BHI agar ที่กล่าวมาเป็นการที่มีชีวิต ซึ่งสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม มีสารแทนนิน (tannin) เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลัก เป็นสารที่มีชีวิตและชอบน้ำ (hydrophilic compound) จึงละลายผ่าน BHI agar ได้ดี กลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแทนนิน คือ ยับยั้งการขนส่งโปรตีนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ (inhibit cells envelop transport proteins) และนอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ (inhibit microbial adhesions) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ (inhibit extracellular microbial enzymes) เช่น lipase, protease, hyaluronidase เป็นต้น<sup>(59)</sup>

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในเปลือกมังคุด คือ สารแซนโทน (xanthenes) ซึ่งเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic compound) จึงละลายผ่านตัวกลางใน BHI agar ได้ไม่ดี ทำให้บริเวณใสของการยับยั้งรอบหลุมต่อเชื้อ *C. acnes* มีขนาดเล็กกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในมังคุดมีกลไกในการทำลายความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (disintegrate the cytoplasmic membrane integrity) ซึ่งเป็นกลไกหลักในการออกฤทธิ์ และมีกลไกอื่น ๆ ได้แก่ ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ (inhibit the biofilm formation of microbe) และทำให้การแสดงออกของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์

การสังเคราะห์ DNA และกระบวนการสร้างกรดไขมันลดลง (downregulation of genes involved cell division, DNA replication, and fatty acid biosynthetic pathway)<sup>(60, 62-65)</sup>

โดยสรุปจากการทดลองด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ได้ โดยพบบริเวณใสของการยับยั้งรอบหลุม (well) สารสกัดยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุด เนื่องจากสารออกฤทธิ์ในใบมะขามป้อมเป็นสารที่มีขี้และชอบน้ำ จึงละลายผ่าน BHI agar ได้ดีกว่าสารออกฤทธิ์ในเปลือกมังคุดซึ่งเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สารสกัดยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุด และพบว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ชนิดที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะดีกว่าเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**ตอนที่ 2 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด หรือ minimal inhibition concentration (MIC) ของสารสกัดจากใบมะขามป้อมและจากเปลือกมังคุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี broth microdilution**

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion เพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* เมื่อได้ผลแล้ว จึงนำมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี broth microdilution ต่อไป

การแปลผลการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution โดยอ่านผลการเจริญของ *C. acnes* ในหลุมของ 96-well plates ด้วยการเติมสารละลาย 0.02% resazurin แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี resazurin จากสีม่วงน้ำเงินเปลี่ยนเป็นสีชมพูแสดงว่ามีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเกิดจากเชื้อ *C. acnes* ที่มีชีวิตไปทำปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) กับสาร resazurin แต่หากสี resazurin ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแสดงว่าไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ซึ่งหลุมทดสอบที่อ่านค่า MIC จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี resazurin

อย่างไรก็ตามการแปลผลจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี resazurin อาจเกิดความคลาดเคลื่อนจากการสังเกตได้ จึงมีการทำซ้ำ (duplicate) ในทุกการทดลองและทดสอบ

ทั้งหมด 2 ครั้ง พบว่าค่า MIC ของแต่ละการทดลองมีค่าเท่ากันหรือใกล้เคียงกันทั้งสิ้น จึงเชื่อได้ว่ามีความถูกต้องแม่นยำ

ผลการทดลองดังที่กล่าวในบทที่ 4 ค่า MIC เฉลี่ยต่อเชื้อ *C. acnes* ทั้งหมด 70 สายพันธุ์ ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมเท่ากับ 0.087 มก./มล. และสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดเท่ากับ 0.072 มก./มล. แปลผลได้ว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ดีกว่าสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม อย่างไรก็ตามความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ระหว่างสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC เฉลี่ยของสารสกัดหยาบทั้งสองชนิดระหว่างเชื้อ *C. acnes* ชนิดที่ติดต่อยาปฏิชีวนะและชนิดที่ไม่ติดต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าในกลุ่มเชื้อที่ติดต่อยาปฏิชีวนะมีค่า MIC สูงกว่ากลุ่มเชื้อที่ไม่ติดต่อยาปฏิชีวนะ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่มีการนำสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* พบว่าค่า MIC ของสารสกัดจากใบมะขามป้อมต่อเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ เท่ากับ 2.5 มก./มล.<sup>(11)</sup> และค่า MIC ของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ เท่ากับ 0.039 มก./มล.<sup>(13)</sup> ซึ่งจะเห็นว่าลำดับความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด มีความสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ คือ ค่า MIC ของสารสกัดจากใบมะขามป้อมสูงกว่าค่า MIC ของสารสกัดจากเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* และมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษาสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิว มีค่า MIC เท่ากับ 0.559 มก./มล.<sup>(12)</sup> ส่วนในงานวิจัยนี้ สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิว มีค่า MIC เท่ากับ 0.087 มก./มล. สันนิษฐานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมในวิจัยครั้งนี้มีมากกว่าของงานวิจัยก่อนหน้านี้ เนื่องจากสารสกัดหยาบที่ทำการสกัดในแต่ละครั้งจะได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในแต่ละครั้งไม่เท่ากัน ในวิจัยครั้งนี้จึงมีค่า MIC น้อยกว่าในงานวิจัยก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ ผู้วิจัยมีความเห็นว่า การทำการทดลองในเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิวที่มีผ่านการใช้ยาและการรักษาสิวด้วยวิธีต่าง ๆ เป็นตัวแทนภาวะทางคลินิกได้ดีกว่าเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ

### ตอนที่ 3 การทดสอบหาการเสริมฤทธิ์ หรือ fractional inhibitory concentration index (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ด้วยวิธีการ checkerboard testing

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion และการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี broth microdilution พบว่าสารสกัดหยาบทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ชนิดที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและชนิดที่ไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เมื่อได้ผลแล้วจึงนำค่าความเข้มข้นต่ำสุดมาทดสอบต่อเพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ด้วยวิธีการ checkerboard testing

การแปลผลการทดสอบด้วยวิธีการ checkerboard testing โดยอ่านผลการเจริญของ *C. acnes* ในหลุมของ 96-well plates ด้วยการเติมสารละลาย 0.02% resazurin แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี resazurin จากสีม่วงน้ำเงินเปลี่ยนเป็นสีชมพูแสดงว่ามีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเกิดจากเชื้อ *C. acnes* ที่มีชีวิตไปทำปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) กับสาร resazurin แต่หากสี resazurin ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแสดงว่าไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ในการทดสอบมีการทำซ้ำ (duplicate) ในทุกการทดลองและทดสอบทั้งหมด 2 ครั้ง พบว่าผลของค่า FICI ของแต่ละการทดลองมีค่าเท่ากันหรือใกล้เคียงกันทั้งสิ้น จึงเชื่อได้ว่ามีความถูกต้องแม่นยำ โดยค่า FICI คือ ค่าการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของส่วนผสมระหว่างสารที่ต้องการทดสอบเทียบกับประสิทธิภาพของแต่ละสารเพียงสารเดียว

ถ้าค่า  $FICI \leq 0.5$  หมายถึง มีผลเสริมฤทธิ์ (synergy),  $FICI > 0.5-1.0$  หมายถึง มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (additive/partial synergy),  $FICI > 1 - \leq 4$  หมายถึง ผลไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifference) และ  $FICI > 4.0$  หมายถึง มีผลต้านฤทธิ์กัน (antagonism)

ผลการทดลองดังที่กล่าวในบทที่ 4 คือ ผลการเสริมฤทธิ์ (FICI) ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุด ด้วยวิธีการ checkerboard testing ต่อเชื้อ 35 สายพันธุ์ จึงนำค่า FICI ทั้งหมดมาคำนวณ พบว่า 13 สายพันธุ์ (37.14%) มีผลเสริมฤทธิ์กัน (synergy) 9 สายพันธุ์ (25.72%) มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (additive/partial synergy) 13 สายพันธุ์ (37.14%) มีผลไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifference) และ ไม่พบว่ามีผลต้านฤทธิ์กัน (antagonism) โดยค่า FICI ที่เสริมฤทธิ์กันดีที่สุด เท่ากับ 0.192 ซึ่งมีอัตราส่วนผสมของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 0.026 mg/ml และสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้น 0.002 mg/ml สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดเสริม

ฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* โดยมีผลเสริมฤทธิ์กัน (synergy) และมีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (additive/ partial synergy) รวม 62.86%

เมื่อจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะพบว่าผลการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดต่อเชื้อ 35 สายพันธุ์โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มของเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ

ตาราง 18 แสดงการทบทวนวรรณกรรมที่ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรทั้งสองชนิดในผู้ป่วยสิว

| วิจัย                          | Chuajedton et al. <sup>(73)</sup><br>(2012)                                                     | Sriviriyakul et al. <sup>(74)</sup><br>(2016)                           |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| หัวข้อวิจัย                    | Antimicrobial activity of <i>Phyllanthus emblica</i> fruit extract and its cosmetic application | Clinical efficacy of topical mangosteen extract nanoparticle loaded gel |
| วิธีการศึกษาวิจัย              | Double-blind, randomized, parallel design                                                       | Double-blinded, randomized controlled trial, split-face study           |
| จำนวนอาสาสมัคร                 | 25                                                                                              | 28                                                                      |
| ระดับความรุนแรงสิวของอาสาสมัคร | Mild to moderate acne vulgaris                                                                  | Mild to moderate acne vulgaris                                          |
| เพศ (คน)                       | ชาย (9)<br>หญิง (16)                                                                            | ชาย (4)<br>หญิง (24)                                                    |
| อายุ (ปี)                      | 18-37                                                                                           | 18-40                                                                   |
| ระยะเวลา (สัปดาห์)             | 4                                                                                               | 12                                                                      |

ตาราง 18 (ต่อ)

| วิจัย              | Chua Jedton et al. <sup>(73)</sup><br>(2012)                                                                                                                                                                                            | Sriviriyakul et al. <sup>(74)</sup><br>(2016)                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ยาที่นำมา<br>ศึกษา | - 10% w/w gel containing<br>emblica extract (GCE)<br>- 1% clindamycin gel (CM)                                                                                                                                                          | - 0.5% w/w topical<br>mangosteen extract<br>nanoparticle loaded gel (MNLG)<br>- 1% clindamycin gel (CM)                                                                                                                                                    |
| วิธีการทายา        | - Apply given gel on acne lesions<br>twice daily after cleaning face<br>- Randomized divided<br>into two groups with the similar<br>severity in each group (1% CM : 13<br>patients and 10% w/w GCE : 12<br>patients)                    | - 2.5% benzyl peroxide on the<br>entire face before facial washing in<br>the morning for 5 minutes once<br>daily<br>- Apply 0.5% w/w MNLG on one<br>side of the face and 1% CM on<br>another side twice daily                                              |
| วิธีการวัดผล       | - Acne lesion count (papules and<br>pustules)                                                                                                                                                                                           | - Acne lesion count (non-<br>inflammatory acne and<br>inflammatory acne)<br>- Post-acne erythema (Photograph<br>and Antera 3D)                                                                                                                             |
| ผลการศึกษา         | The individual acne reduction<br>(number of papule and pustule<br>lesion counts) from week 0 to week<br>4 was significantly different ( $p <$<br>0.05)<br>- 10% w/w GCE : mean acne<br>reduction 59.08%<br>- 1% CM: mean acne reduction | In 0.5% w/w MNLG group from<br>baseline to week 12<br>- Acne comedone reduction was<br>63.1% ( $p = 0.001$ )<br>- The pustule, papule and nodule<br>lesion counts were 89%, 53.1%,<br>and 57.5% respectively ( $p = 0.001$ ,<br>0.001, 0.013 respectively) |

ตาราง 18 (ต่อ)

| วิจัย | Chua Jedton et al. <sup>(73)</sup><br>(2012)                                                    | Sriviriyakul et al. <sup>(74)</sup><br>(2016)                                                                                                                                    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       | 56.25%                                                                                          | - Post-acne erythema decreased statistically significant at week 12 ( $p < 0.001$ )                                                                                              |
|       | - At the end of each week, mean acne reduction between two groups was not different, $p > 0.05$ | In 1% CM group from baseline to week 12                                                                                                                                          |
|       |                                                                                                 | - Acne comedone reduction was 59.9% ( $p < 0.001$ )                                                                                                                              |
|       |                                                                                                 | - The pustule, papule and nodule lesion counts were 84.9%, 47.9%, and 42.4% respectively ( $p < 0.001$ , 0.005, 0.021 respectively)                                              |
|       |                                                                                                 | - Post-acne erythema decreased statistically significant at week 12 ( $p = 0.027$ )                                                                                              |
|       |                                                                                                 | - No statistically significant difference between 0.5% w/w MNLG and 1% CM in the reduction of the number of acne lesions, post-acne erythema and the presence of adverse effects |
|       |                                                                                                 | - 4 missing patients                                                                                                                                                             |

ตาราง 18 (ต่อ)

| วิจัย       | Chuaedton et al. <sup>(73)</sup><br>(2012)                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Sriviriyakul et al. <sup>(74)</sup><br>(2016)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ผลข้างเคียง | <ul style="list-style-type: none"> <li>- In 10% w/w GCE : 12 numbers of case reported every week (4 mild scaling, 1 mild dryness, 2 mild pruritus, 4 mild stinging, 1 moderate stinging)</li> <li>- In 1% CM : 6 numbers of case reported every week (1 mild dryness, 3 mild pruritus, 2 mild stinging)</li> <li>- No severe side effects</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Evaluated by phone at day 0, 7, and every follow up visit</li> <li>- In 0.5% w/w MNLG : N (%)               <ul style="list-style-type: none"> <li>Week 2 : 2 mild irritation (7.1%), 1 moderate irritation (3.6%), 25 negative (89.3%)</li> <li>Week 4 : 2 mild irritation (7.7%), 0 moderate irritation (0%), 24 negative (92.3%)</li> <li>Week 8, 12 : 24 negative (100%)</li> </ul> </li> <li>- In 1% CM : N (%)               <ul style="list-style-type: none"> <li>Week 2 : 2 mild irritation (7.1%), 0 moderate irritation (0%), 26 negative (92.9%)</li> <li>Week 4, 8, 12 : 24 negative (100%)</li> </ul> </li> <li>- No severe side effects</li> </ul> |

จากตาราง 18 ในการศึกษาของ Chuaedton L.<sup>(73)</sup> พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนสิวอักเสบที่ลดลง ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มเจลทาสิวจากสารสกัดผลมะขามป้อมกับกลุ่ม clindamycin gel และพบรายงานผลข้างเคียงในแต่ละสัปดาห์โดยแสดงเป็นจำนวนครั้งของกลุ่มเจลทาสิวจากสารสกัดผลมะขามป้อมมากกว่าในกลุ่ม clindamycin gel และในการศึกษาของ Sriviriyakul K.<sup>(74)</sup> เมื่อครบ 12 สัปดาห์ของการศึกษา พบว่าจำนวนสิวอักเสบที่ลดลงและผลข้างเคียงจากการใช้ยาของกลุ่มเจลทาสิวจากสารสกัดจากมังคุดไม่มีความแตกต่างกับ 1% clindamycin gel จึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้เจลทาสิวจากสมุนไพรทั้งสองชนิดสามารถรักษาสิวได้ไม่แตกต่างจากการใช้ clindamycin gel และผลข้างเคียงจากการใช้ยาไม่แตกต่างจากการใช้

clindamycin gel และจากผลการทดสอบการระคายเคือง (skin irritation test) ของเจลทาสีวจากสารสกัดจากมังคุดพบว่ามีความถี่ของอาการระคายเคืองเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัดจากมังคุด<sup>(74)</sup> จึงสรุปได้ว่าการใช้ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้เกิดอาการระคายเคืองเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

จากที่กล่าวไปข้างต้น พบว่าทั้งสองการศึกษามีการใช้สารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดในการทำเจลทาสีวที่มีความเข้มข้นสูง จึงทำให้เกิดผลข้างเคียงของการใช้เจลทาสีวจากสมุนไพรแต่ละชนิดไม่แตกต่างจากการใช้ clindamycin gel จากการศึกษานี้ พบว่าสมุนไพรทั้งสองชนิดสามารถทำหน้าที่เสริมฤทธิ์กันโดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* เช่นเดียวกับการใช้สมุนไพรเพียงชนิดเดียว แต่การนำสมุนไพรทั้งสองชนิดมาผสมกันจะเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่ต่ำลง ซึ่งคาดว่าจะสามารถลดโอกาสในการเกิดผลข้างเคียงของการใช้เจลทาสีวจากสมุนไพรให้น้อยลงกว่าการใช้ clindamycin gel ได้ ข้อดีของการใช้สมุนไพรสองชนิดมาเสริมฤทธิ์กัน คือ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว ช่วยลดโอกาสการดื้อของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีต่อยาปฏิชีวนะ (decreased emergence of resistant strains) ลดการเกิดพิษจากการใช้ยาจากการลดปริมาณยาที่ใช้ (decreased dose-related toxicity as a result of reduced dosage)<sup>(25)</sup> และลดต้นทุนของการใช้สารสกัดจากสมุนไพรได้มากกว่าการใช้สารสกัดจากสมุนไพรเพียงชนิดเดียวอีกด้วย นอกเหนือจากฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวแล้ว ในใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) และมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ที่ใช้ในการสร้างเม็ดสี (melanin)<sup>(60-63)</sup> จึงเป็นประโยชน์ในการลดรอยดำที่เกิดจากสิวได้ด้วย จากที่กล่าวไปข้างต้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดจึงเป็นตัวเลือกที่ดีที่จะนำมาเป็นส่วนประกอบในการพัฒนาตำรับยาเพื่อใช้ในการรักษาสิวต่อไป

ตาราง 19 แสดงการเปรียบเทียบการศึกษาวิจัยนี้กับการศึกษาวิจัยก่อนหน้า

|                                                                  | Chomnawang M.T.<br>และคณะ <sup>(13)</sup>                         | Deewongkij P.<br>และคณะ <sup>(12)</sup>                       | Our study                                                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ปีที่<br>ศึกษาวิจัย<br>(ค.ศ.)                                    | 2005                                                              | 2018                                                          | 2021                                                                                                                                                                                                 |
| วิธีการ<br>ศึกษาวิจัย                                            | <i>In vitro</i> , experimental,<br>cross-sectional study          | <i>In vitro</i> , experimental,<br>cross-sectional study      | <i>In vitro</i> , experimental,<br>cross-sectional study                                                                                                                                             |
| จำนวน (N)                                                        | 1<br>(Standard <i>C. acnes</i><br>ATCC 6919)                      | 75<br>(Isolated <i>C. acnes</i> )                             | 70<br>(Isolated <i>C. acnes</i> )                                                                                                                                                                    |
| สารสกัด<br>สมุนไพรที่<br>ทำการ<br>ทดสอบ<br>วิธีวัด<br>ผลการวิจัย | <i>Garcinia mangostana</i><br><br>MIZ<br>MIC                      | <i>Phyllanthus emblica</i><br><br>MIZ<br>MIC                  | <i>Phyllanthus emblica</i><br><i>Garcinia mangostana</i><br><br>MIZ<br>MIC<br>FIC                                                                                                                    |
| ผลการวิจัย                                                       | <i>Garcinia mangostana</i><br>MIZ $\geq 15$ mm<br>MIC 0.039 mg/ml | <i>Phyllanthus emblica</i><br>MIZ 14.99 mm<br>MIC 0.559 mg/ml | <i>Phyllanthus emblica</i><br>MIZ 15.14 mm<br>MIC 0.087 mg/ml<br><br><i>Garcinia mangostana</i><br>MIZ 11.20 mm<br>MIC 0.072 mg/ml<br><br>FICI : Synergy and<br>additive/partial<br>synergy = 62.86% |

จากตารางที่ 19 ในงานวิจัยนี้พบว่าค่าเฉลี่ย MIZ และ MIC ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมเท่ากับ 15.14 มม. และ 0.087 มก./มล. และค่าเฉลี่ย MIZ และ MIC ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดเท่ากับ 11.20 มม. และ 0.072 มก./มล. จากการศึกษาท่อนำเกี่ยวกับสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม มีการศึกษาของ Deewongkij P.<sup>(12)</sup> พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยสิวเหมือนกับในงานวิจัยนี้ มีค่าเฉลี่ย MIZ และ MIC เท่ากับ 14.99 มม. และ 0.559 มก./มล. และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Niyomkam P.<sup>(11)</sup> พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการ เท่ากับ MIC 2.5 มก./มล. และการศึกษาของ Rattanasena P.<sup>(51)</sup> พบว่าสารสกัดหยาบจากผลมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการ มีค่า MIZ เท่ากับ 16.8 มม. ส่วนการศึกษาท่อนำเกี่ยวกับสารสกัดจากมังคุด มีการศึกษาของ Chomnawang M.T.<sup>(13)</sup> พบว่าสารสกัดจากมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการ มีค่า MIZ มากกว่าเท่ากับ 15 มม. และค่า MIC เท่ากับ 0.039 มก./มล. และการศึกษาของ Pothitirat<sup>(47)</sup> พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการได้ดีที่สุดด้วยวิธี soxhlet extraction โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.007 มก./มล. เมื่อเปรียบเทียบงานวิจัยนี้กับงานวิจัยท่อนำพบว่าค่าเฉลี่ย MIZ และ MIC มีทั้งค่าที่สอดคล้องและไม่สอดคล้องกัน เนื่องจากมีความแตกต่างกันในเรื่องเชื้อ *C. acnes* คือ ในบางการศึกษาใช้เชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการซึ่งมีโอกาสการดื้อยาปฏิชีวนะน้อยกว่าเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยสิว และการสกัดสมุนไพรในแต่ละครั้งจะได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่เท่ากัน ทำให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ได้ประสิทธิภาพที่แตกต่างกันและทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลการศึกษาในแต่ละครั้งได้

โดยในงานวิจัยนี้ถือเป็นงานวิจัยแรกที่ศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว โดยทดสอบกับเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิว โดยมีผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้ทั้งชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ซึ่งการค้นพบครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาตำรับยาเพื่อใช้รักษาสิวและนำไปศึกษาในผู้ป่วยสิวต่อไป

## สรุปผล

ใบมะขามป้อม และเปลือกมังคุด มีสารฟลักซ์เคมีหลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานทางห้องปฏิบัติการได้ แต่ยังไม่พบการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดจากสมุนไพรทั้งสองชนิดในเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิว การศึกษานี้พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิวได้ โดยค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบเปลือกมังคุด เท่ากับ 0.087 มก./มล. และ 0.072 มก./มล. ตามลำดับ

เมื่อนำสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้งสองชนิดมาทดสอบการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* พบว่าใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดมีผลเสริมฤทธิ์กันโดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้ดีและคาดว่าจะสามารถลดโอกาสในการเกิดผลข้างเคียงของการใช้สารสกัดจากสมุนไพรที่มีความเข้มข้นสูงได้ การศึกษาครั้งนี้นำไปสู่การค้นพบสมุนไพรไทยพื้นบ้านทั้งสองชนิดที่สามารถหาได้ง่ายในประเทศไทยซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิว ซึ่งไม่เคยมีงานวิจัยใดที่นำสมุนไพรทั้งสองชนิดนี้มาทดสอบการเสริมฤทธิ์กันกับเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิวมามาก่อน นอกจากนี้สารสกัดหยาบสมุนไพรทั้งสองชนิดนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ ซึ่งการค้นพบครั้งนี้ อาจนำไปสู่การศึกษาวิจัยต่อยอดเพื่อพัฒนาตำรับยา เพื่อเป็นการรักษาทางเลือกในกลุ่มผู้ป่วยสิวซึ่งเหมาะกับผู้ป่วยสิวในปัจจุบัน เพื่อลดอุบัติการณ์การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *C. acnes* และส่งเสริมการนำสมุนไพรไทยมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์

### ข้อดีของการศึกษาวิจัยนี้

1. เป็นงานวิจัยแรกที่ศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและเปลือกมังคุดในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิว ทั้งชนิดดื้อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ

2. การนำสมุนไพรสองชนิดมาเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวแล้ว ยังช่วยลดโอกาสการดื้อของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีต่อยาปฏิชีวนะ ลดต้นทุนของการใช้สารสกัดจากสมุนไพรได้มากกว่าการใช้สารสกัดจากสมุนไพรเพียงชนิดเดียว และการนำสมุนไพรสองชนิดน่าจะ มีข้อดีมากกว่าการใช้สารสกัดจากสมุนไพรเพียงชนิดเดียว คือ อาจเสริมฤทธิ์กันในด้านอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ที่ใช้ในการสร้างเม็ดสี (melanin) มีประโยชน์ในการลดรอยดำที่เกิดจากสิวได้ด้วย ซึ่งจะต้องทำการศึกษาทางคลินิกกับผู้ป่วยสิวเพิ่มเติมต่อไป

### ข้อจำกัดของการศึกษาวิจัยนี้

1. การสกัดสมุนไพรในแต่ละครั้งจะได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่เท่ากัน ทำให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน จึงทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลการศึกษาในแต่ละครั้งได้

### ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นซึ่งใช้สารสกัดหยาบสมุนไพร โดยการสกัดสมุนไพรในแต่ละครั้งจะได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่เท่ากัน ทำให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ประสิทธิภาพที่แตกต่างกันและทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลการศึกษาในแต่ละครั้งได้ หากเป็นไปได้ในอนาคตควรทำการวิเคราะห์และสกัดแยกหาสารออกฤทธิ์ที่เป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อไป

2. ควรมีการศึกษาต่อยอดด้านการพัฒนาตำรับยา หลังจากที่ได้สกัดสารออกฤทธิ์ของแต่ละสมุนไพรและปรับการเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์ พัฒนารูปแบบยาที่มีประสิทธิภาพ โดยทำการศึกษาเรื่องความปลอดภัยและความระคายเคืองในสัตว์ทดลอง

3. ควรมีการศึกษาต่อยอดด้านการนำมาประยุกต์ใช้ในการทดลองทางคลินิกกับผู้ป่วยผิวเพื่อศึกษาเรื่องประสิทธิภาพในการรักษาผิว ผลข้างเคียงจากการใช้สารสกัดหยาบจากสมุนไพร และเก็บตัวอย่างผิวมาศึกษาในรูปแบบความไวของเชื้อ *C. acnes* เพื่อทดสอบหาโอกาสการดื้อยาต่อสารสกัดหยาบสมุนไพร

## บรรณานุกรม

1. Sutaria AH, Masood S, Schlessinger J. Acne Vulgaris. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459173/>
2. Purdy S, Deberker D. Acne vulgaris. BMJ Clin Evid. 2008;1714:1-71.
3. Chim C. Acne vulgaris. In: Dong B, Elliott D, editors. ACSAP 2016 Book 2 Dermatologic Care. Washington, DC: American College of Clinical Pharmacy; 2016. p. 7-27.
4. Bhate K, Williams HC. Epidemiology of acne vulgaris. Br J Dermatol. 2012;168(3):474-85.
5. Rathi S. Acne vulgaris treatment : The Current Scenario. Indian J Dermatol. 2011;56(1):7-13.
6. Noppakun N, Sindhuphak W, Wattanakrai P, Akaraphanth R, Timpatanapong P, et al. Clinical practice guideline in acne. Clinical practice guideline. 2010:58-80.
7. O'Brien S, Lewis J, Cunliffe W. The Leeds revised acne grading system. J Dermatol Treat. 2009;9(4):215-20.
8. Dessinioti C, Katsambas A. Propionibacterium acnes and antimicrobial resistance in acne. Clin Dermatol. 2016;35(2):163-7.
9. Hoover WD, Davis SA, Fleischer AB, Feldman SR. Topical antibiotic monotherapy prescribing practices in acne vulgaris. J Dermatol Treat. 2014;25(2):97-9.
10. Laochunsuwan A, Taweechotipatr M, Udompataikul M. *In vitro* study of antibiotic susceptibility of Propionibacterium acnes isolated from acne vulgaris patients. J Med Assoc Thai. 2017;100(10):s24-31.
11. Niyomkam P, Kaewbumrung S, Kaewnpparat S, Panichayupakaranant P. Antibacterial activity of Thai herbal extracts on acne involved microorganism. Pharm Biol. 2010;48(4):375-80.
12. Deewongkij P, Taweechotipatr M, Kamanamool N, Udompataikul M. In-vitro study of antibacterial activities of Phyllanthus emblica L. leaves, Punica granatum L. peels, and

*Curcuma longa* L. rhizomes crude extracts to propionibacterium acnes isolated from acne vulgaris patients. J Med Assoc Thai. 2018;101(9):1169-76.

13. Chomnawang M, Surassmo S, Nukoolkarn V, Gritsanapan W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. J Ethnopharmacol. 2005;101(1-3):330-3.

14. Collins C, Lyne P, Grange J. Antimicrobial susceptibility tests. Microbiological methods. 7<sup>th</sup> ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1995. p. 178 - 205.

15. Kahlmeter G, Brown D, Goldstein F, MacGowan A, Mouton J, Österlund A, et al. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. J Antimicrob Chemother. 2003;52(2):145-8.

16. Lalitha M. Manual on antimicrobial susceptibility testing (under the auspices of Indian association of medical microbiologists). Vellore. 1<sup>st</sup> ed. India: CMC; 2004.

17. Holland T, Woods C, Joyce M. Antibacterial susceptibility testing in the clinical laboratory. Infect Dis Clin North Am. 2009;23(4):757-90.

18. Jorgensen J, Turnidge J. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: James H, Jorgensen J, Turnidge J, editors. Manual of Clinical Microbiology. 7<sup>th</sup> ed. Washington, DC: American Society of Microbiology; 2015. p. 1253-73.

19. Patel J, Tenover F, Turnidge J, Jorgensen J. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. In: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, et al. editors. Manual of clinical microbiology. 10<sup>th</sup> ed. Washington DC: American Society of Microbiology; 2011. p. 1122 - 43.

20. Cockerill F, Wikler M, Alder F, Dudley M, et al. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 9<sup>th</sup> ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

21. Pottinger P, Reller L, Ryan K. Antibacterial agents and resistance. In: Ryan K, George R, editors. Sherris Medical Microbiology. 6<sup>th</sup> ed. New York: McGrawHill; 2014. p. 419 - 32.

22. Wang S, Wang H, Ren B, Li H, Weir M, Zhou X, et al. Do quaternary ammonium monomers induce drug resistance in cariogenic, endodontic and periodontal bacterial

species? *Dent Mater*. 2017;33(10):1127-38.

23. Maza L, Pezzlo M, Bittencourt C, Peterson E. Antimicrobial susceptibility testing. 3<sup>rd</sup> ed. Washington, DC: American Society of Microbiology; 2020.

24. Schaechter M. Antimicrobial susceptibility testing. In: Tenover FC, editor. *Encyclopedia of Microbiology*. 3<sup>rd</sup> edition ed. New York: Academic Press; 2009. p. 66-7.

25. Lorian. Antimicrobial combinations. In: Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM, editors. *Antibiotics In Laboratory Medicine*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2005. p. 365-440.

26. Gollnick H. Current concepts of the pathogenesis of acne: implications for drug treatment. *Drugs*. 2003;63(15):1579-96.

27. Beylot C, Auffret N, Poli F, Claudel JP, Leccia MT, Giudice P, et al. *Propionibacterium acnes*: an update on its role in the pathogenesis of acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;28(3):271-8.

28. Goh C, Cheng C, Agak G, Zaenglein A, Graber E, Thiboutot D, et al. Acne vulgaris. In: Kang S, Amagai M, Bruckner A, Enk A, Margolis D, McMichael A, et al., editors. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 9<sup>th</sup> ed. New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2019. p. 1391-418.

29. Zaenglein A, Thiboutot D. Acne Vulgaris. In: Bolognia J, Schaffer J, Cerroni L, editors. *Dermatology*. 4<sup>th</sup> ed. USA: Elsevier; 2012. p. 588-603.

30. Harper J. An update on the pathogenesis and management of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. 2004;51(1):S36-8.

31. Layton A, Eady A, Zouboulis C. Acne. In: Griffiths C, Barker J, Bleiker T, et al. editors. *Rook's textbook of dermatology*. 9<sup>th</sup> ed. United Kingdom: Wiley blackwell; 2016. p. 90.1-66.

32. Knutsen-Larson S, Dawson A, Dunnick C, Dellavalle R. Acne vulgaris: pathogenesis, treatment, and Needs assessment. *Dermatol Clin*. 2012;30(1):99-106.

33. Perkins AC, Cheng CE, Hillebrand GG, Miyamoto K, Kimball AB. Comparison of the epidemiology of acne vulgaris among Caucasian, Asian, Continental Indian and African American women. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;25(9):1054-60.

34. Fabbrocini G, Annunziata M, D'Arco V, Vita V, Lodi G, Mauriello MC, et al. Acne scars: pathogenesis, classification and treatment. *Dermatol Res Pract*. 2010;2010:1-13.
35. วาสนา วชิรมน และ พูลเกียรติ สุขนวนิช. 10+ โรคผิวหนังต้องรู้ กรุงเทพฯ: สาขาวิชาโรคผิวหนัง ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล; กรุงเทพฯ: 2559.
36. Dreno B, Pecastaings S, Corvec S, Veraldi S, Khammari A, Roques C. *Cutibacterium acnes* ( *Propionibacterium acnes* ) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32(2):5-14.
37. Sinha P, Srivastava S, Mishra N, Yadav NP. New perspectives on antiacne plant drugs: contribution to modern therapeutics. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-19.
38. Brüggemann H, Henne A, Hoster F, Liesegang H, Wiezer A, Strittmatter A, et al. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science*. 2004;305:671-3.
39. Dessinioti C, Katsambas A. The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2010;28(1):2-7.
40. Webster G. Inflammatory Acne. *Int J Dermatol*. 1990;29(5):313-7.
41. McLaughlin J, Watterson S, Layton A, Bjourson A, Barnard E, McDowell A. *Propionibacterium acnes* and acne vulgaris: new insights from the integration of population genetic, multi-omic, biochemical and host-microbe studies. *Microorganisms*. 2019;7(5):1-29.
42. Ross J, Eady E, Cove J, Jones C, Ratyal AH, Miller YW, et al. Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(5):1162-5.
43. Ross JI, Snelling A, Eady E, Cove JH, Cunliffe WJ, Leyden JJ, et al. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients attending dermatology clinics in Europe, the U.S.A., Japan and Australia. *Br J Dermatol*. 2001;144(2):339-46.
44. รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล และคณะ. สมุนไพร : ยาไทยที่ควรรู้. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บริษัท สยามบุ๊คส์ แอนด์ พับลิเคชันส์ จำกัด; 2542.

45. คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. บัญชียาจากสมุนไพร พ.ศ. 2549 ตามประกาศคณะกรรมการแห่งชาติด้านยา (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2549 เรื่องบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2547 (ฉบับที่ 4). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2551.
46. Lim Y-H, Kim I-H, Seo J-J. In vitro activity of kaempferol isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against *Propionibacterium acnes*. *J Microbiol.* 2007;45(5):473-7.
47. Pothitirat W, Chomnawang M, Supabphol R, Gritsanapan W. Free radical scavenging and anti-acne activities of mangosteen fruit rind extracts prepared by different extraction methods. *Pharm Biol.* 2010;48:182-6.
48. Puttarak P, Charoonratana T, Panichayupakaranant P. Antimicrobial activity and stability of rhinacanthins-rich *Rhinacanthus nasutus* extract. *Phytomedicine.* 2010; 4(17(5)):323-7.
49. Auttayaporn C, Narumol T. Growth Inhibition of Some Pathogenic Bacteria by Local Medicinal Plant Extracts. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 8 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 2554;1:792-801.
50. Azimi H, Fallah-Tafti M, Khakshur A, Abdollahi M. A review of phytotherapy of acne vulgaris: Perspective of new pharmacological treatments. *Fitoterapia.* 2012; 12(83(8)):1306-17.
51. Rattanasena P. Antioxidant and Antibacterial Activities of Vegetables and Fruits Commonly Consumed in Thailand. *Pak J Biol Sci.* 2012;15(18):877-82.
52. Dej-adisai S, Meechai I, Puripattanavong J, Kummee S. Antityrosinase and antimicrobial activities from Thai medicinal plants. *Arch Pharm Res.* 2014;37(4):473-83.
53. Yadav S, Singh MK, Singh P, Kumar V. Traditional knowledge to clinical trials: A review on therapeutic actions of *Emblca officinalis*. *Biomed Pharmacother.* 2017;93:1292-302.
54. Gaire B, Subedi L. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Phyllanthus emblica* Linn. *Chin J Integ Med.* 2015:1-8.
55. Variya B, Bakrania A, Patel S. *Emblca officinalis* (Amla): A review for its phytochemistry, ethnomedicinal uses and medicinal potentials with respect to molecular

mechanisms. *Pharmacol Res.* 2016;111:180-200.

56. Poltanov E, Shikov A, Dorman D, Pozharitskaya O, Makarov V, Tikhonov V, et al. Chemical and antioxidant evaluation of Indian gooseberry (*Emblica officinalis* Gaertn., syn. *Phyllanthus emblica* L.) supplements. *Phytotherapy research : PTR.* 2010;23(9): 1309-15.

57. Khan K. Role of *Emblica officinalis* in Medicine - A Review. *Bot Res Intl.* 2009; 2(8):218-28.

58. Hasan M, Islam M, Islam M. Phytochemistry, pharmacological activities and traditional uses of *Emblica officinalis*: A review. *Int Curr Pharm J.* 2016;5(2):14-21.

59. Khurana S, Tiwari R, Khan S, Yattoo DM, Bashir M, Dhama K. *Emblica officinalis* (Amla) with a particular focus on its antimicrobial potentials: a review. *J Pure Appl Microbiol.* 2019;13:1995-2012.

60. Khumsupan P, Gritsanapan W. Anti-acne activity of *Garcinia mangostana* L.: A Review. *Plant Sci Today.* 2014;1(3):147-50.

61. Ghasemzadeh A, Jaafar HZ, Baghdadi A, Tayebi-Meigooni A. Alpha-mangostin-rich extracts from mangosteen pericarp: optimization of green extraction protocol and evaluation of biological activity. *Molecules.* 2018;23(8):1852-67.

62. Obolskiy D, Pischel I, Siriwatanametanon N, Heinrich M. *Garcinia mangostana* L.: A Phytochemical and Pharmacological Review. *Phytotherapy research : PTR.* 2009; 23(8):1047-65.

63. Suttirak W, Manurakchinakorn S. In vitro antioxidant properties of mangosteen peel extract. *J Food Sci Technol.* 2012;51(12):3546-58.

64. Rohman A, Rafi M, Alam G, Muchtaridi M, Windarsih A. Chemical composition and antioxidant studies of underutilized part of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit. *J Appl Pharm Sci.* 2019;9(8):047–52.

65. Sivaranjani M, Leskinen K, Aravindraj C, Saavalainen P, Pandian S, Skurnik M, et al. Deciphering the Antibacterial Mode of Action of Alpha-Mangostin on *Staphylococcus epidermidis* RP62A Through an Integrated Transcriptomic and Proteomic Approach. *Front Microbiol.* 2019;10:1-16.

66. Pothitirat W, Chomnawang M, Gritsanapan W. Anti-acne inducing bacteria activity

and  $\alpha$ -mangostin content of *Garcinia mangostana* fruit rind extracts from different provenience. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2010;48(2):182-6.

67. Reller L, Weinstein M, Jorgensen J, Ferraro M. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1749-55.

68. Nain P, Saini V, Sharma S. In-vitro antibacterial and antioxidant activity of *Emblica officinalis* leaves extract. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2012;4(1):385-90.

69. Ito J, Hara K, Someya T, Myoda T, Sagane Y, Watanabe T, et al. Data on the inhibitory effect of traditional plants from Sri Lanka against tyrosinase and collagenase. *Data Brief.* 2018;20:573-76.

70. ภาววรรณ นิละพงษ์ บุษบา ผลโยธิน และวันแข็ง สติธิกิจโยธิน. การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรไทย: การสกัดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยตัวทำละลาย. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 2561;(4):901-10.

71. Van vuuren S, Viljoen A. Plant-Based Antimicrobial Studies - Methods and Approaches to Study the Interaction between Natural Products. *Planta medica.* 2011; 77:1168-82.

72. Bassolé I, Lamien-Meda A, Bayala B, Obame Engonga L-C, Ilboudo A, Franz C, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine.* 2011;18:1070-4.

73. Niyomkam P, Kaewbumrung S, Kaewnpparat S, Panichayupakaranant P. Antibacterial activity of Thai herbal extracts on acne involved microorganism. *Pharmaceutical Biology.* 2010;48(4):375-80.

74. Vaughn AR, Haas KN, Burney W, Andersen E, Clark AK, Crawford R, et al. Potential Role of Curcumin Against Biofilm-Producing Organisms on the Skin: A Review. *Phytotherapy Research.* 2017;31(12):1807-16.

75. Chuajedton L, Muangsiri W, Werawatganone P. Antimicrobial activity of *Phyllanthus Emblica* fruit extract and its cosmetic application. Bangkok: Chulalongkorn University; 2012. Retrieved from [https://doi.nrct.go.th/ListDoi/listDetail?Resolve\\_ DOI=](https://doi.nrct.go.th/ListDoi/listDetail?Resolve_DOI=)

10.14457/CU.the.2012.248

76. Lueangarun S, Sriviriyakul K, Tempark T, Managit C, Sithisarn P. Clinical efficacy of 0.5% topical mangosteen extract in nanoparticle loaded gel in treatment of mild-to-moderate acne vulgaris: A 12-week, split-face, double-blinded, randomized, controlled trial. *J Cosmet Dermatol*. 2019;18:1-9.



## ประวัติผู้เขียน

|                   |                           |
|-------------------|---------------------------|
| ชื่อ-สกุล         | ปัทมรา อัครวาทย์          |
| วัน เดือน ปี เกิด | 6 สิงหาคม พ.ศ. 2534       |
| สถานที่เกิด       | กรุงเทพมหานคร             |
| วุฒิการศึกษา      | พ.ศ. 2559                 |
|                   | แพทยศาสตรบัณฑิต           |
|                   | จาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

