ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม เปลือกทับทิมและเห้าขมิ้นชันต่อเชื้อโปรปิโอนิแบคทีเรียม แอคเน่ ในผู้ป่วยสิว

ปริญญานิพนธ์
ของ
ปุณณภา ดีวงกิจ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาตจวิทยา
พฤษภาคม 2561

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม เปลือกทับทิมและเห้าขมิ้นชันต่อเชื้อโปรปิโอนิแบคทีเรียม แอคเน่ ในผู้ป่วยสิว

ปริญญานิพนธ์

ของ

ปุณณภา ดีวงกิจ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาตจวิทยา

พฤษภาคม 2561

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม เปลือกทับทิมและเห้าขมิ้นชันต่อเชื้อโปรปิโอนิแบคทีเรียม แอคเน่ ในผู้ป่วยสิว

บทคัดย่อ

ของ

ปุณณภา ดีวงกิจ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาตจวิทยา

พฤษภาคม 2561

ปุณณภา ดีวงกิจ. (2561). การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม เปลือกทับทิมและเหง้าขมิ้นชันต่อเชื้อโปรปิโอนิแบคทีเรียม แอคเน่ ในผู้ป่วยสิว. ปริญญานิพนธ์ วท. ม.(ตจวิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ : รศ. นพ. มนตรี อุดมเพทายกุล, ผศ. มาลัย ทวีโชติภัทร์.

ปัจจุบันสิวเป็นโรคที่พบว่ามีการดื้อยาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากงานวิจัยล่าสุดพบว่าความชุกของเชื้อโปรปิโอนิแบคทีเรียม แอคเน่ ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูงขึ้นมาก โดยเฉพาะต่อยาคลินดามัยซินและยาอีริโทรมัยซิน งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยอันได้แก่ ใบมะขามป้อม เปลือกทับทิมและเหง้าขมิ้นชัน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโปรปิโอนิแบคทีเรียม แอคเน่ ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิว และเป็นการศึกษาเชิงทดลองทางห้องปฏิบัติการ ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่งแบบตัดขวาง โดยศึกษาในเชื้อโปรปิโอนิแบคทีเรียม แอคเน่ 75 สายพันธุ์ที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยสิวที่แสดงถึงกลุ่มประชากรไทย ทดสอบด้วยด้วยวิธี agar well diffusion เพื่อหาค่าโซนใสของการยับยั้ง (minimum inhibitory zone/MIZ) และวิธี broth microdilution เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration/MIC) จากนั้นนำมาสารสกัดหยาบทั้งสามชนิดมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดน้ำใส

พบว่าค่า MIZ ของใบมะขามป้อมมีค่าเฉลี่ย 14.99, 20.90 มิลลิเมตร (มม.) ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มก./มล.) ตามลำดับ ส่วนค่า MIZ ของเปลือกทับทิมได้ค่าเฉลี่ย 4.07, 9.95 มม. ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มก./มล. ตามลำดับ ในขณะที่เหง้าขมิ้นชันไม่พบโซนใสของการยับยั้ง ค่า MIC คือ 0.559, 1.003 และ 3.804 มก./มล. โดยเรียงจากใบมะขามป้อม, เปลือกทับทิมและเหง้าขมิ้นชัน ซึ่งความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า MIC ระหว่างใบมะขามป้อมและเหง้าขมิ้นชัน ($p<0.001$) รวมถึงระหว่างเปลือกทับทิมและเหง้าขมิ้นชัน ($p<0.001$) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างใบมะขามป้อมและเปลือกทับทิม ($p=0.092$) โลชั่นชนิดน้ำใสของทั้งสามสารสกัดหยาบ มีกลิ่นฉุนและสีขุ่น เมื่อนำมาทำวิธี agar well diffusion พบว่าโลชั่นชนิดน้ำใสที่มีสารสกัดหยาบของใบมะขามป้อมและเปลือกทับทิมสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ค่า MIZ เท่ากับ 21.67 และ 17.25 มม. ตามลำดับ ซึ่งค่า MIZ ของสารสกัดหยาบทั้งสองชนิดนี้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.439$) ส่วนโลชั่นชนิดน้ำใสที่มีสารสกัดหยาบของเหง้าขมิ้นชันพบว่าไม่มีการยับยั้ง โดยสรุปสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้งสามชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโปรปิโอนิแบคทีเรียม แอคเน่ ที่คัดแยกจากกลุ่มผู้ป่วยสิว โดยที่สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมออกฤทธิ์ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม และสุดท้ายคือสารสกัดหยาบจากเหง้าขมิ้นชัน

IN-VITRO STUDY OF THE 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

AN ABSTRACT

BY

POONNAPA DEEWONGKIJ

Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the

Master of Science Degree in Dermatology

at Srinakharinwirot University

May 2018

Poonnapa Deewongkij. (2561). 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. Master's thesis. M. Sc. (Dermatology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor: Asso. Prof. Montree Udompataikul , Assist. Prof. Malai Taweechotipatr.

The prevalence of antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) is on the rise. According to a recent study on antibiotic-resistant *P. acnes*, it was demonstrated that the prevalence of *P. acnes* resistance to antibiotics has emerged, particularly in clindamycin and erythromycin. The objective of this study is to perform an *in-vitro* study of the antimicrobial properties of *Phyllanthus emblica* L. leaves*, Punica granatum* L. peels*, and Curcuma longa* L. rhizomes crude extracts against seventy-five clinically isolated *P. acnes*. *P. acnes* were tested with the herbal crude extracts by agar well diffusion assay to evaluate minimal inhibitory zone (MIZ) and broth microdilution method to evaluate minimum inhibitory concentration (MIC). The lotion products from each crude extract were produced.

The means of the MIZ of *Phyllanthus emblica* L. at 5 mg/ml and 10 mg/ml were 14.99, 20.90 mm, respectively. For *Punica granatum* L., the means of MIZ at a concentration of 5 and 10 mg/ml were 4.07 and 9.95 mm. There were no inhibition zones identified among *Curcuma longa* L. rhizomes. The means of MIC of *Phyllanthus emblica* L., *Punica granatum* L., and *Curcuma longa* L. were 0.559, 1.003, and 3.804 mg/ml. With regard to the difference in the MIC activities of each extract, there was no statistically significant difference between *Phyllanthus emblica* L. and *Punica granatum* L. ($p=0.092$). However, there were significant differences between *Phyllanthus emblica* L. with *Curcuma longa* L. ($p<0.001$) and *Punica granatum* L. with *Curcuma longa* L. ($p<0.001$) as well. The lotion products of each crude extract were turbid and had a bad odor. The MIZ of the lotion of *Phyllanthus emblica* L., *Punica granatum* L. were 21.67 and 17.25 mm, respectively and without any statistically significant differences. However, no inhibition zone was identified in the lotion of *Curcuma longa* L. In conclusion, these three herbal crude extracts could inhibit the growth of *P. acnes*.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม เปลือกทับทิมและเหง้าขมิ้นชันต่อเชื้อโปรปิโอนิแบคทีเรียม แอคเน่ ในผู้ป่วยสิว

ของ

ปุณณภา ดีวงกิจ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
วันที่ ..... เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2561

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

.....ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์มนตรี อุดมเพทายกุล)

.....ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มาลัย ทวีโชติภัทร์)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสุวิรากร โอภาสวงศ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์มนตรี อุดมเพทายกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มาลัย ทวีโชติภัทร์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ นายแพทย์ฤทธี สมิทธิ์ฤทธี)

.....กรรมการ
(อาจารย์ แพทย์หญิงน้ำเพ็ญ ศิริวัฒน์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา แนวคิด ข้อเสนอแนะ การตรวจแก้ไขจาก อาจารย์ รศ. นพ. มนตรี อุดมเพทายกุล ที่ปรึกษาหลัก ควบคุมปริญญานิพนธ์ อาจารย์ ผศ. มาลัย ทวีโชติภัทร์ ปรึกษารองควบคุมปริญญานิพนธ์ อาจารย์ ผศ. พญ. สุวิรากร โอภาสวงศ์ ประธานกรรมการสอบปากเปล่า อาจารย์ นพ. ฤทธิ สมิทธิ์ฤทธี กรรมการสอบปากเปล่า อาจารย์ พญ. น้ำเพ็ญ ศิริวัฒน์ กรรมการสอบปากเปล่า และอาจารย์ นพ. ณัฐชาต จุไรรัตนาภรณ์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงในความกรุณาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ศูนย์ผิวหนัง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทุกท่านที่ประสิทธ์ประสาทวิชาความรู้อันเป็นการส่งเสริมความก้าวหน้าด้านการศึกษาให้แก่ผู้วิจัย คุณค่าของปริญญานิพนธ์นี้ผ็วิจัยมอบให้แด่ ครูอาจารย์ทุกท่าน

ขอขอบคุณเพื่อนร่วมชั้นเรียน รุ่นพี่ และรุ่นน้องสาขาตจวิทยา รุ่นพี่และรุ่นน้องที่เรียนปริญญาโทและเอกภาควิชาจุลชีววิทยา เจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา เจ้าหน้าที่ศูนย์ผิวหนัง ทุกคนที่ให้ความร่วมมือในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณมารดา และพี่น้องเพื่อนทุกคนที่ให้การสนับสนุนผู้วิจัยในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คุณค่าของปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แด่ มารดา บิดา พี่ น้อง เพื่อน และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ปุณณภา ดีวงกิจ

สารบัญ

บทที่ **หน้า**

1 บทนำ……1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……..1

คำถามของการวิจัย……3

คำถามหลัก……3

วัตถุประสงค์งานวิจัย……3

สมมติฐานงานวิจัย……3

2 เอกสารและงานวิจัยเกี่ยวข้อง……6

สิว……6

ระบาดวิทยา……6

สาเหตุและพยาธิกำเนิด……7

ลักษณะทางคลินิก……11

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ……16

การวินิจฉัยโรคและการวินิจฉัยแยกโรค……17

ภาวะแทรกซ้อน……18

การพยากรณ์โรค……18

การรักษาสิว……18

ยาทารักษาเฉพาะที่……18

ยารักษาแบบรับประทาน……20

การรักษามาตรฐานโดยแบ่งตามความรุนแรงของสิว……22

เชื้อก่อโรค *Propionibacterium acnes*……23

การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรค *Propionibacterium acnes*……24

สมุนไพรไทยและสารเคมีออกฤทธิ์ที่สำคัญ……26

สารประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร……27

การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร……30

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ……38

สารบัญ

บทที่ **หน้า**

2 (ต่อ)

คำนิยามของ minimal inhibitory concentration, minimal bactericidal concentration, minimal inhibitory zone....42

ปัจจัยที่อาจส่งผลต่อคุณภาพของการทดสอบความไวของยาต่อเชื้อ....42

สาเหตุของการเกิดความคลาดเคลื่อนในการทดสอบ....43

สมุนไพรไทยที่นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes*....43

3 วิธีดำเนินงานวิจัย....58

รูปแบบงานวิจัย....58

กลุ่มเป้าหมายของงานวิจัย....58

การคำนวณกลุ่มตัวอย่าง....60

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย....60

ขั้นตอนการวิจัย....63

การประเมินผล....66

การเก็บรวบรวมข้อมูลและการจัดการข้อมูล....66

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล....69

จริยธรรมทางการวิจัย....70

ระยะเวลาการทำวิจัย....71

แผนการดำเนินงานตลอดการวิจัย....71

สถานที่ทำการวิจัย....71

งบประมาณ....72

4 ผลการวิจัย....73

ผลการทดลอง....73

5 สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ....91

อภิปรายผล....91

อภิปรายผลการทดลอง....92

ผลการทดสอบโดยวิธี agar well diffusion....92

ผลการทดสอบโดยวิธี broth microdilution....94

ผลการเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์และการทดสอบโดยวิธี agar well diffusion....95

สารบัญ

บทที่ **หน้า**

5 (ต่อ)

สรุปผล.....97

ข้อเสนอแนะ.....97

บรรณานุกรม.....98

ประวัติย่อผู้วิจัย.....119

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 สรุปการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวกับการนำพืชสมุนไพรมาศึกษาในห้องทดลอง เพื่อดูความสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย.....44

2 สรุปส่วนประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรไทยทั้งหมด 20 ชนิดสมุนไพร.....51

3 แบบฟอร์มเก็บรวบรวมข้อมูลค่า MIZ, MIC ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด.....67

4 แบบฟอร์มเก็บรวบรวมข้อมูลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ นำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยารูปแบบเจลแล้วมาทำการทดสอบกับเชื้อ *P. acnes* โดยเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ยาที่ไม่มีสมุนไพรเป็นส่วนประกอบโดยวัดค่า MIZ.....68

5 แสดงระยะเวลาการทำงานวิจัย.....71

6 แสดงงบประมาณที่ใช้ในการวิจัย.....72

7 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางรอบ well (MIZ) เป็น มม.....73

8 แสดงค่าเฉลี่ยรวมของ MIZ ต่อเชื้อ *P. acnes* ทั้งหมด เชื้อ *P. acnes* กลุ่มดื้อยาและเชื้อ *P. acnes* กลุ่มไม่ดื้อยา.....77

9 ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution.....79

10 ผลค่าเฉลี่ยรวมของค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* (MIC) โดยจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ *P. acnes*.....84

11 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลเป็นวงใสเส้นผ่านศูนย์กลางรอบ well (MIZ) เป็น มม. เทียบกับตัวควบคุมที่ไม่มีส่วนประกอบของสารสกัดหยาบสมุนไพร (negative control).....89

12 เปรียบเทียบความแตกต่างของตำรับผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes*.....90

สารบัญภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 แสดงถึงพยาธิกำเนิดของการเกิดสิว....9

2 แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *P. acnes* และการเกิดสิว....11

3 Closed comedones....12

4 Open comedones....12

5 Papules....13

6 Pustules....13

7 Nodules....14

8 Cyst....14

9 Mild acne....15

10 Moderate acne....15

11 Severe acne....16

12 Percolator....34

13 Soxhlet extractor....35

14 การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะยิ่งยวด....37

15 96-well plate ในการทำ broth microdilution....40

16 Disk-diffusion method ซึ่งมีวงใสที่เรียกว่า inhibition zone....41

17 Antimicrobial gradient....41

18 ขั้นตอนการวิจัย....63

19 ตำรับผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบใบมะขามป้อมก่อนและหลังทดสอบความคงตัว....86

20 ตำรับผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบเปลือกทับทิมก่อนและหลังทดสอบความคงตัว....87

21 ตำรับผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบเหง้าขมิ้นชันก่อนและหลังทดสอบความคงตัว....88

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สิว เป็นหนึ่งในโรคทางผิวหนังที่พบได้บ่อย พบได้ในประชากรทั่วโลกประมาณร้อยละ 9.4 นับเป็นโรคที่มีความชุกเป็นอันดับ 8 ของโลก[1] ซึ่งพบได้ในประชากรวัยรุ่นถึงร้อยละ 85 จากการศึกษา [2] โดยตำแหน่งที่พบสิวได้บ่อย จะเป็นตำแหน่งที่มีต่อมไขมันปริมาณมาก เช่น ใบหน้า หน้าอก และหลัง เป็นต้น ซึ่งสิวเป็นโรคที่มีหลายลักษณะอาการทางคลินิค ตั้งแต่สิวอุดตันและสิวอักเสบ มีหลายระดับความรุนแรง นอกจากการเกิดสิวแล้วยังมีผลที่ตามมาหลังจากเป็นสิวได้ เช่น รอยแดงหรือรอยดำหลุมสิว เป็นต้น จะเห็นได้ว่าสิวเป็นโรคที่เรื้อรัง จากการศึกษาพบว่าสิวนั้นส่งผลกระทบต่อจิตใจของผู้ป่วย ทั้งในด้านความมั่นใจในตัวเอง การเข้าสังคม ความกังวลต่อรูปลักษณ์ ในบางคนอาจจะทำให้เกิดภาวะซึมเศร้า และมีความคิดฆ่าตัวตายได้ จะเห็นว่าภาพรวมนั้นสิวทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยลดลงได้[3]

สิวเป็นโรคที่เกิดจากหลายปัจจัยประกอบกัน หนึ่งในปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดสิวคือ เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* ซึ่งเชื้อ *P. acnes* เป็นเชื้อประจำถิ่นบนรูขุมขนของมนุษย์ เมื่อได้รับการกระตุ้น จะมีการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นการหลั่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (proinflammatory cytokines) ต่าง ๆ ทำให้เกิดการอักเสบของสิว[2, 4] จึงมีการนำยาปฏิชีวนะมาใช้รักษาสิวอักเสบ โดยอาศัยฤทธิ์ในการทำลายเชื้อ *P. acnes* หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* และฤทธิ์ลดการอักเสบ[5]

การรักษาสิวในปัจจุบัน มีแนวทางการักษาที่ชัดเจน รวมถึงประเทศไทยมีแนวทางการรักษาสิวสำหรับแพทย์ออกโดยสมาคมแพทย์ผิวหนังแห่งประเทศไทย ซึ่งมีการจัดระดับความรุนแรงของสิวออกเป็นสิวเล็กน้อย สิวปานกลาง และ สิวรุนแรง เพื่อให้ง่ายต่อการเลือกวิธีการรักษา การักษานั้นมีทั้งยากินและยาทาขึ้นกับระดับความรุนแรงของโรค โดยยาทาที่ใช้ในการรักษาหลัก ๆ คือ benzoyl peroxide, topical antibiotics และ topical retinoids ในส่วนของยากินคือ กลุ่ม tetracycline และ isotretinoin[6] ซึ่งจะพบว่าแพทย์มีการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งยากินและยาทาในการักษาสิวกันอย่างแพร่หลาย ส่งผลให้เกิดเชื้อดื้อยาขึ้น และจากการศึกษายังพบอีกว่ามีการจ่ายยาปฏิชีวนะเพียงตัวเดียวในการักษาสิว โดยไม่ใช้ร่วมกับยาตัวอื่น (monotherapy) ซึ่งจะทำให้เกิดอุบัติการณ์เชื้อดื้อยาของสิวต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น[7] พบว่ามากกว่าร้อยละ 50 ของเชื้อ *P. acnes* ดื้อต่อยาทากลุ่ม macrolides ในหลายประเทศ[8] นอกจากการดื้อยาของเชื้อ *P. acnes* แล้ว การใช้ยาทาปฏิชีวนะรักษา

สิวยังทำให้เกิดเชื้อดื้อยาตัวอื่นได้ด้วย เช่น *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* ในส่วนของยากินปฏิชีวนะรักษาสิวนั้นสามารถทำให้เกิดเชื้อดื้อยาที่สำคัญคือ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ซึ่งเชื้อดื้อยาตัวนี้สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดและถึงแก่ชีวิตได้[8] จะเห็นว่าปัญหาเชื้อดื้อยานั้นเป็นปัญหาที่สำคัญ

ในประเทศไทยนั้นการหาซื้อยาปฏิชีวนะทั้งในรูปแบบทาและกินนั้นเป็นเรื่องที่ทำได้ง่าย รวมทั้งผู้ป่วยไม่มีความรู้เพียงพอในการใช้ยา ทำให้การรักษาสิวไม่ได้ผลลัพธ์ที่ดีเท่าที่ควร จึงมีการศึกษาถึงอุบัติการณ์เชื้อดื้อยาขึ้นในประเทศไทย จากวิทยานิพนธ์ของ Laochunsuwan A. นิสิตปริญญาโท ด้านตจวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง 95 คน ช่วงตุลาคม 2016 ถึงกุมภาพันธ์ 2017 พบว่าเชื้อ *P. acnes* ที่เก็บมาจากสิวอุดตันของคนไข้นั้นดื้อต่อยา คลินดามัยซิน (clindamycin), อิริโทรมัยซิน (erythromycin) และ เตตร้าซัยคลิน (tetracycline) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและดื้อด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (minimal inhibitory concentration / MIC) ที่สูง นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่เคยมีประวัติใช้ยาปฏิชีวนะมาก่อน จะพบเชื้อ *P. acnes* ดื้อยามากกว่ากลุ่มที่ไม่เคยมีประวัติใช้ยาปฏิชีวนะมาก่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนยาด็อกซิซัยคลิน (doxycycline) และอะม็อกซีซิลิน (amoxicillin) ยังไม่พบมีการดื้อยา[9]

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีการศึกษาสมุนไพรเพื่อใช้ในการรักษาโรคกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นภูมิปัญญาพื้นบ้าน และมีการพัฒนานำมาใช้เป็นยารักษาโรค ในประเทศไทยนั้นมีสมุนไพรไทยมากมายหลายชนิด ทั้งหาง่ายและราคาไม่แพง สมุนไพรไทยจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์และเภสัชกรรม เนื่องจากอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยาพบสูงขึ้นเรื่อยๆ การใช้สมุนไพรในการรักษาสิวจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง ดังนั้นจึงเป็นที่มาที่จะคัดเลือกสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ มาทำการทดสอบกับเชื้อ *P. acnes* ที่เก็บได้จากกลุ่มตัวอย่างคนไข้จริง ๆ ซึ่งมีทั้งเชื้อที่ดื้อยาและไม่ดื้อยา เพื่อศึกษาดูว่าสมุนไพรไทยตัวนั้นจะสามารถนำมาใช้เป็นยาทางเลือกเพื่อรักษาสิวอักเสบได้หรือไม่

สมุนไพรไทยมีมากมายหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยอาศัยจากองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร และงานวิจัยของสมุนไพรนั้น ๆ ที่เคยศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* แล้วเปรียบเทียบกันระหว่างประโยชน์กับความเสี่ยงของสมุนไพรแต่ละตัว นำมาคัดเลือกสมุนไพร 3 ชนิดเพื่อมาทดสอบกับเชื้อ *P. acnes* ที่เก็บตัวอย่างจากคนไข้ ที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้[9]

คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก (Primary research question)

สารสกัดหยาบของสมุนไพรไทยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยสิวหรือไม่

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยสิวของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้งสามชนิด ได้แก่ ใบมะขามป้อม เปลือกทับทิม และเหง้าขมิ้นชัน

สมมติฐานของงานวิจัย

สารสกัดหยาบของสมุนไพรไทยทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยสิวได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

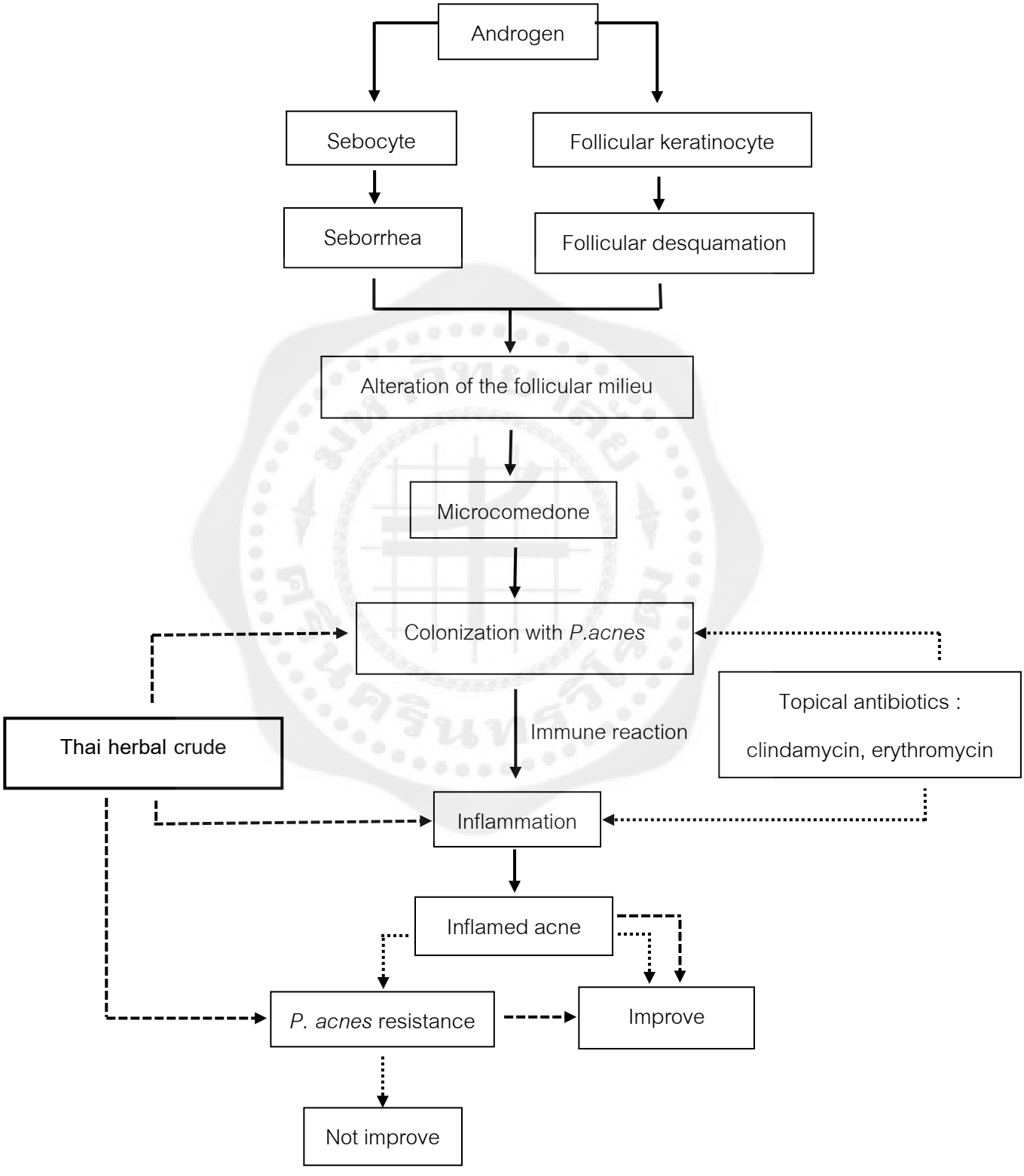
1. ได้ทราบถึงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ซึ่งแยกตัวอย่างได้จากคนไข้
2. ได้ข้อมูลในการนำไปพัฒนายาฆ่าเชื้อเพื่อต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว ซึ่งเป็นการรักษาทางเลือกในการรักษาสิวอักเสบ เพื่อลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* จากการใช้ยาปฏิชีวนะ
3. เป็นการส่งเสริมและพัฒนาสมุนไพรไทยพื้นบ้าน และนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์
4. เป็นการเพิ่มมูลค่าสมุนไพรไทยพื้นบ้านและให้เป็นที่ยอมรับในวงกว้าง

ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว คือ *P. acnes* ทั้งที่ดื้อยาและไม่ดื้อยา โดยเชื้อทดสอบแยกได้จากกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยสิวที่เป็นตัวแทนของประชากรในประเทศไทย โดยทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยอ่านผลจากโซนใสที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory zone / MIZ) และหาค่าความเข้มข้น

ของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ด้วยวิธี broth microdilution ซึ่งจะไม่มีการเจริญของเชื้อเห็นเป็นลักษณะใส (minimal inhibitory concentration / MIC)

กรอบแนวคิดงานวิจัย[10]



บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารรวมถึงงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และนำมาเสนอตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1.สิว (acne vulgaris)

2.การรักษาสิว (treatment of acne)

3.เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acne*s ที่ก่อให้เกิดสิวและการดื้อยาปฏิชีวนะ

4.สมุนไพรไทยและสารเคมีออกฤทธิ์ที่สำคัญ

5.การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร

6.การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

7.สมุนไพรไทยที่จะนำมาทดสอบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* ที่ดื้อยา

1. สิว (Acne Vulgaris)

สิวเป็นโรคที่มีการอักเสบของต่อมไขมันแบบเรื้อรัง ซึ่งเป็นโรคที่พบบ่อย โดยเฉพาะในวัยรุ่นและผู้ใหญ่ สามารถพบได้ทั้งเพศหญิงและเพศชาย[2, 11] ลักษณะอาการทางคลินิคของสิวมีหลายแบบทั้งที่มีการอักเสบและไม่มีการอักเสบ นอกจากนั้นสิวยังก่อให้เกิดผลที่ตามมา ไม่ว่าจะเป็นรอยแผลเป็นจากสิว หลุมสิว[12] ซึ่งล้วนส่งผลก่อให้เกิดความเครียดแก่ผู้ป่วยในเรื่องความสวยงาม อาจทำให้ผู้ป่วยขาดความมั่นใจ ไม่กล้าเข้าสังคม เกิดภาวะซึมเศร้าและถึงขั้นฆ่าตัวตายได้ จะเห็นได้ว่าสิวจึงเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขที่แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ควรให้ความสำคัญ[3]

ระบาดวิทยา

สิวสามารถพบได้ในทุกเพศ ทุกวัยและทุกเศรษฐานะ เชื่อว่าเกิดจากมีการผลิตของฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) มากขึ้นและไปกระตุ้นให้ต่อมไขมันทำงานมากขึ้น สิวจึงมักเกิดในบริเวณที่มีต่อมไขมันเยอะ เช่น หน้า หน้าอก เป็นต้น[11] จากระบาดวิทยาพบว่าสิวเป็นโรคที่พบร้อยละ 9.4 นับเป็นโรคที่มีความชุกเป็นอันดับแปดของโลก[1] และจะพบมากสุดในช่วงที่เข้าสู่วัยรุ่น และจะค่อย ๆ ลดลงหลังจากนั้น โดยที่มักพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย[3] ยังมีการศึกษาที่พบว่าเครื่องมือ

วัดปีสุขภาวะที่สูญเสียไปจากโรคและการบาดเจ็บของประชากร (Disability-Adjusted Life Years/DALYs) ในปี 2010 สิวคิดเป็นร้อยละ 58.22 จัดอยู่ในอันดับที่ 110 ของโลก[13]

สาเหตุและพยาธิกำเนิด

สาเหตุในการเกิดสิวนั้นมีหลายปัจจัยร่วมกัน (multifactorial) ทั้งจากปัจจัยกระตุ้นภายใน เช่น พันธุกรรม มีการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่เป็นสิวจะพบร่วมกับประวัติบุคคลในครอบครัวเป็นสิวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[14, 15] และพบมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบหลายยีน อาทิ ผู้ป่วยสิวมียีนที่ทำให้ *P. acnes* จับกับ Toll-like receptor 2 และ 4 บนเซลล์ keratinocyte จากนั้นจะไปกระตุ้นให้ keratinocyte หลั่ง chemokines ต่าง ๆ[16] พบว่าผู้ป่วยสิวมียีน TNFA บนจีโนไทป์ AA ที่ตำแหน่ง 308G>A ซึ่งกระตุ้นการสร้าง tumor necrotic factor-alpha (TNF-α)[16, 17] นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยสิวที่มีกลุ่มเบส CAG และ GGN แบบซ้ำ ๆ บนยีน androgen receptor (AR) บนโครโมโซม X ที่ Xq11-q12 จะมี androgen receptor บนเซลล์ epithelial ของต่อมไขมันมากกว่าคนปกติที่ไม่เป็นสิว ซึ่งทำให้สร้างไขมันมากกว่าปกติและกระตุ้นกระบวนการอักเสบด้วย[16, 18], ความผิดปกติของต่อมไร้ท่อ, และภาวะมีถุงน้ำในถุงรังไข่ เป็นต้น

ส่วนปัจจัยกระตุ้นจากภายนอก เช่น การกินอาหารที่มีดัชนีน้ำตาลสูง (high glycemic index food) หรือผลิตภัณฑ์จากนม (dairy products) ภาวะเครียด นอนดึก และการใช้เครื่องสำอางค์หรือครีมบำรุงผิวต่าง ๆ เป็นต้น[12, 19] จากการศึกษาพบว่าอาหารที่มีดัชนีน้ำตาลสูง ผลิตภัณฑ์จากนม ไขมันและเนื้อสัตว์ (western diet) จะกระตุ้นให้มีการหลั่ง insulin growth factor 1 (IGF-1) และอินซูลิน (insulin) มากขึ้น ทั้งสองสารนี้จะไปกระตุ้น mammalian target of rapamycin complex-1 (mTORC1) ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การเติบโตของเซลล์และความสมดุลของเมตาบอลิซึม โดยสรุปการกินอาหาร western diet จะไปกระตุ้น mTORC1 ตามต่อมไขมันให้ทำงานมากขึ้นและก่อให้เกิดสิวได้ การกินช็อกโกแลตยังกระตุ้นให้มีการหลั่ง IL-10 และ IL-1β ซึ่งจะไปกระตุ้น *P. acnes* ทำให้สิวเป็นมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการกินอาหารที่มีดัชนีน้ำตาลต่ำ จะลดการแสดงออกของ SREBP-1 และการหลั่ง IL-8 ซึ่งจะลดภาวการณ์อักเสบได้[20] มีการศึกษาพบว่าการสูบบุหรี่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดสิว[21] การกิน omega-3 fatty acids และ γ-linolenic acid สามารถช่วยให้สิวดีขึ้น[20] จากที่กล่าวมาข้างต้นเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดสิว พยาธิกำเนิดของสิว 4 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

1.การหนาตัวของชั้นหนังกำพร้าที่รูขุมขน (follicular hyperproliferation)

หนึ่งในลำดับต้น ๆ ของการเกิดสิวคือการสร้าง microcomedo โดยมีการกระตุ้นเซลล์คอร์นีโอไซต์ (corneocytes) ที่อยู่บริเวณส่วนต้นของรูขุมขน (infundibulum part) ทำให้มีการ

เพิ่มจำนวนมากขึ้นและเซลล์มีการจับกันแน่นมากขึ้น (increase cell cohesion) นำไปสู่การหลุดลอกของเซลล์คอร์นีโอไซต์ที่ผิดปกติ เซลล์คอร์นีโอไซต์หนาตัวขึ้นที่ส่วนต้นของรูขุมขน เกิดเป็น microcomedo หลังจากนั้นเซลล์เยื่อบุผิวรูขุมน (follicular epithelium) และ keratohyalin granules ที่อยู่ภายใต้ microcomedo จะเพิ่มจำนวนและขนาดขึ้น แต่ lamellar granules และ tonofilaments ลดลง เมื่อ microcomedo ขยายขนาดขึ้น มีการสะสมของเซลล์หนังกำพร้า (keratinocytes) และไขมันต่าง ๆ มากขึ้นกลายเป็น comedo ต่อมไขมันที่รูขุมขนนั้น ๆ จะเล็กลง เพราะว่ารูเปิดด้านบนเล็กลง ในเวลาต่อมาเมื่อแรงจากการสะสมของสารภายใน comedo มากขึ้น ผนังของ comedo จะแตกและอาจนำไปสู่การอักเสบได้[11, 22] ปัจจัยในการเกิด follicular hyperkeratinazation แบ่งเป็น 2 ปัจจัย ดังนี้

1.1 การกระตุ้นจากฮอร์โมนแอนโดรเจน

เอนไซม์ 17β-hydroxysteroid dehydrogenase และ 5α-reductase ทำงานเพิ่มมากขึ้นในช่วง adrenache (7-10 ปี) และก่อนมีระดูในหญิง ซึ่งจะไปเปลี่ยน dehydroepiandrosterone (DHEAS) เป็น dihydrotestosterone (DHT) ที่ keratinocyte บริเวณรูขุมขน และกระตุ้นให้เกิด follicular hyperkeratinization[23]

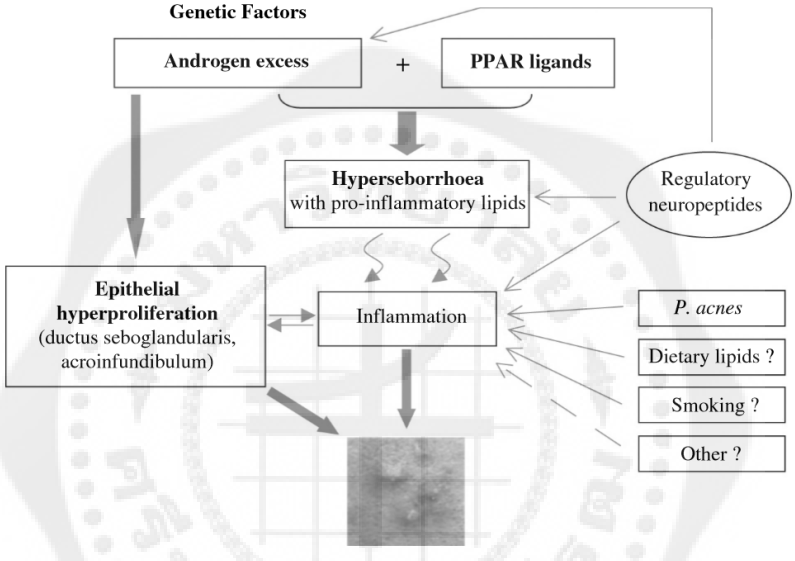
1.2 การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบในไขมันที่สร้างจาก sebaceous gland

โดยปกติไขมันประกอบด้วย ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) และกรดไขมัน (fatty acids) ร้อยละ 57.5, wax ester ร้อยละ 26, squalene ร้อยละ 12, cholesterol ester ร้อยละ 4.5 ซึ่งมีกรดไขมันที่จำเพาะของไขมันที่สร้างจาก sebaceous gland เช่น sapienic acid, sebaleic acid เป็นต้น[24, 25]

มีการศึกษาพบว่ากรดไขมันจำเป็นที่ผิวหนัง ชนิด linoleic acid ซึ่งจะอยู่บริเวณ infundibulum ของรูขุมขน เมื่อไขมันชนิดอื่นถูกสร้างมากขึ้น ปริมาณสัมพัทธ์ของ linoleic acid จะลดลง ทำให้เกิด follicular hyperkeratinization และทำให้ชั้นหนังกำพร้าอ่อนแอลง (impair epidermal barrier) นอกจากนี้ยังเพิ่มความสามารถในการซึมผ่าน (permeability) ของผนัง comedone มากขึ้น ส่งผลให้สารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบผ่านเข้ามาใน comedo ได้เพิ่มมากขึ้น[25, 26] ส่วน squalene เมื่อเกิด peroxidation ทำให้เกิด follicular hyperkeratinization ได้ และ wax esters สามารถกระตุ้นให้เกิด hyperkeratinization ได้เช่นกัน โดยเกิดจากการ β-oxidation ของ linoleic acid[25]

2.การแบ่งเซลล์ของต่อมไขมันเพิ่มขึ้นและการผลิตไขมันเพิ่มสูงขึ้น (sebaceous gland hyperplasia and increased sebum production)

ฮอร์โมนแอนโดรเจนที่หลั่งมากขึ้นในช่วงวัยรุ่นและช่วงก่อนมีระดูในผู้หญิง ทำให้พบว่าสิวจะเริ่มเป็นในช่วงอายุนี้ ซึ่งแอนโดรเจนจะไปกระตุ้นให้ต่อมไขมันมีการเปลี่ยนแปลง (differentiation) เพิ่มจำนวน (proliferation) และสร้างไขมัน (sebum production) มากขึ้น โดยต่อมไขมันจะหลั่งสารไขมันต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น เช่น triglyceride, cholesterol esters, squalene, wax ester เป็นต้นซึ่งสารเหล่านี้จะไปกระตุ้นวงจรการเกิด peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR pathway) ที่ทำให้เกิดการอักเสบ การสร้างไขมัน (lipogenesis) และการเพิ่มจำนวนของต่อมไขมัน[27, 28] (ภาพประกอบที่ 1)



ภาพประกอบ 1 แสดงถึงพยาธิกำเนิดของการเกิดสิว[29]

3.การเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Propionibacterium acnes* ที่บริเวณผิวหนัง (*Propionibacterium acne*s proliferation)

เชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* เป็นเชื้อ gram-positive, non-motile rods และไม่อาศัยออกซิเจนในการเจริญเติบโต ซึ่งจะอาศัยอยู่ภายในต่อมไขมันบริเวณรูขุมขน[22] และจะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ชนิดที่ 4 (delayed-type hypersensitivity) ขึ้นในร่างกายมนุษย์[30] มีการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยที่เป็นสิวจะพบเชื้อ *P. acnes* มากกว่าผู้ป่วยที่ไม่เป็นสิว แต่ปริมาณเชื้อไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค[31] กลไกที่ *P. acnes* กระตุ้นให้เกิดทั้งสิวอับเสบและสิวไม่อักเสบ ดังนี้ (ภาพประกอบที่ 2)

3.1 การกระตุ้นให้เกิดสิวอักเสบ

P. acnes หลั่ง lipases, chemotactic factors, metalloproteases และ porphyrin ซึ่งจะไปทำปฏิกริยากับโมเลกุลออกซิเจน (molecular oxygen) ทำให้เกิด reduced oxygen species และ free radical ต่าง ๆ ส่งผลให้เซลล์หนังกำพร้า (keratinocytes) ถูกทำลาย

P. acnes กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity โดยกระตุ้นผ่าน toll-like receptors (TLR) จะไปจับกับ TLR-2 และ TLR-4 ทำให้ถูกกระตุ้นมากขึ้นที่หนังกำพร้าส่วนบนและ *P. acnes* จะไปจับกับ protease-activated receptors 2 (PAR-2) กระตุ้นให้เกิดการสร้างและหลั่ง proinflammatory cytokines ได้แก่ interleukin-1α (IL-1α), interleukin 8 (IL-8), tumor necrotic factor-α (TNF-α), human β defensing-2 (hBD-2) และ matrix metalloproteinase (MMP 1, 2, 3, 9 และ 13) ทั้งหมดนี้จะก่อให้เกิดการอักเสบที่ชั้นหนังแท้ (dermis)[32]

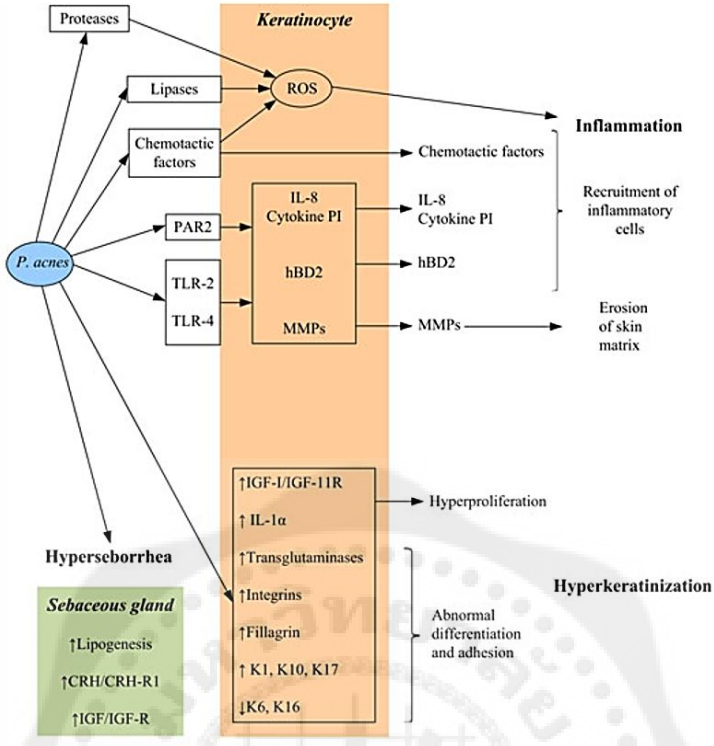
P. acnes มียีนส์ก่อโรค (virulence genes) คือ Christie, Atkins, Munch-Peterson factor (CAMP-5) ทำให้เซลล์เป็นรูจากสารพิษ (pore-forming toxins), sialidases ทำให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย, porphyrins จะไปทำลายผิวหนัง, endoglycoceramidases ทำให้เกิดการทำลายส่วนประกอบของเยื้อหุ้มเซลล์ ซึ่งทั้งหมดที่กล่าวไปนี้จะก่อให้เกิดการอักเสบ และทำลายเซลล์หนังกำพร้า (keratinocytes)[33]

นอกจากนี้ *P. acnes* ยังสามารถกระตุ้น humoral immunity ให้มีการสร้าง IgG และกระตุ้นระบบ complement ก่อให้เกิดการอักเสบได้ด้วย[23]

3.2 การกระตุ้นให้เกิดสิวไม่อักเสบหรือสิวอุดตัน

P. acnes ไปกระตุ้นให้มีการสร้างและหลั่ง interleukin 1 (IL-1) ทำให้มีการสร้าง comedone (comedone formation) และ *P. acnes* ยังกระตุ้นวงจร insulin-like growth factor-1/IGF-1 receptor (IGF-1/IGF-1R) ทำให้ keratinocyte มีการเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียยังกระตุ้นให้ต่อมไขมันผลิตไขมันเพิ่มขึ้นผ่านทาง corticotropin-releasing hormone/CRH-receptor (CRH/ CRH-R)[32]

มีการค้นพบว่ามียีนส์ก่อโรค (virulence gene) คือ Triacyl glycerol lipase (gehA) ที่จะไปย่อย triglycerides ให้กลายเป็น free-fatty acids และก่อให้เกิดสิวอุดตันได้[33]



ภาพประกอบ 2 แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *P. acnes* และการเกิดสิว[32]

4.การเกิดการอักเสบ (inflammatory response)

เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์หนังกำพร้าที่บริเวณรูขุมขน (follicular hyperkeratinization) ทำให้ไขมัน (sebum) keratin และ *P. acnes* สะสมอยู่ในรูขุมขน เมื่อสะสมมากขึ้นเรื่อย ๆ จะทำให้ผนังของรูขุมขนแตกออก ทั้ง *P. acnes*, keratin และ sebum สัมผัสกับชั้นหนังแท้เหมือนเป็นสิ่งแปลกปลอม จึงทำให้เกิดกระบวนการอักเสบตามมาเรียกว่า inflammatory response[19] ซึ่งจะมีการกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวของเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) โดยใน 24 ชั่วโมงแรกจะเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์ (lymphocytes) หลังจากผ่าน 24 ชั่วโมงแรกจะเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ (neutrophils)[34]

ลักษณะทางคลินิก[6, 12, 22]

สิวจะพบมากบริเวณที่มีต่อมไขมันสูง พบบ่อยที่สุดคือบริเวณใบหน้า รองลงมาคือบริเวณหน้าอกส่วนบน หลัง และคอ ซึ่งสิวแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ สิวชนิดไม่อักเสบและสิวชนิดอักเสบ โดยดูจากลักษณะทางคลินิก ดังนี้

1.สิวชนิดไม่อักเสบ เกิดจากมีการอุดตันของรูขุมขน มี 2 ประเภท

1.1 สิวอุดตันแบบหัวปิด (closed comedones) : ตุ่มกลมเล็กแข็งสีขาว ขนาดประมาณ 1 มม. จะเห็นชัดขึ้นเมื่อคลำหรือดึงผิวหนังให้ตึง ดังภาพประกอบที่ 3

ภาพประกอบ 3 Closed comedones[35]

1.2 สิวอุดตันแบบหัวเปิด (opened comedones) : ตุ่มกลมเล็กแข็งคล้าย closed comedones แต่จะเห็นมีรูเปิดและก้อนสีดำอุดอยู่ด้านบน ดังภาพประกอบที่ 4

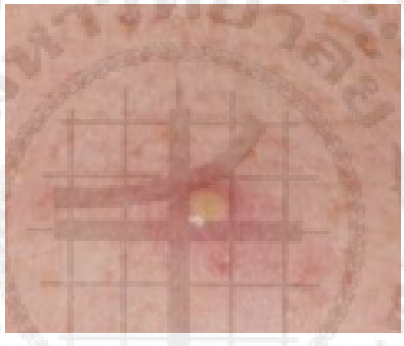
ภาพประกอบ 4 Open comedones[35]

2.สิวชนิดอักเสบ มี 4 ประเภท

2.1 Papules : ตุ่มนูนสีแดงขนาดเล็ก ประมาณ 1 – 5 มม. ดังภาพประกอบที่ 5

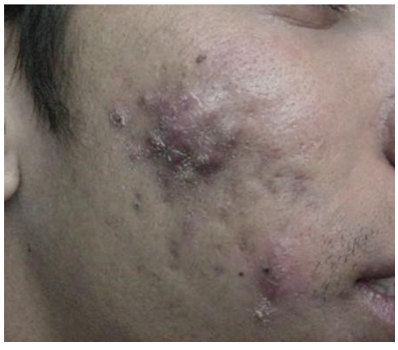
ภาพประกอบ 5 Papules[35]

2.2 Pustules : ตุ่มนูนที่ภายในบรรจุหนองจะเห็นเป็นสีขาว ซึ่งมีทั้ง superficial คืออยู่ตื้นและ deep คืออยู่ลึก ดังภาพประกอบที่ 6



ภาพประกอบ 6 Pustules[35]

2.3 Nodules : ก้อนสีแดงที่ขนาดใหญ่ขึ้นกว่า papules และ pustules ภายในบรรจุหนอง เจ็บ ดังภาพประกอบที่ 7



ภาพประกอบ 7 Nodules[12]

2.4 Cyst : ก้อนนูนแดงนิ่มและลึกกว่า nodules ภายในบรรจุหนองปนเลือด ดังภาพประกอบที่ 8

ภาพประกอบ 8 Cyst[22]

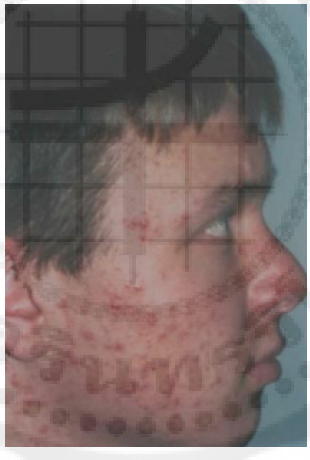
เมื่อสิวหายอาจจะไม่เหลือร่องรอยหรือเหลือร่องรอยได้หลายแบบ เช่น หลุมสิว รอยแดง รอยดำ แผลเป็นนูน เป็นต้น

การแบ่งระดับความรุนแรงของสิวตาม The Leeds Revised Acne Grading Scale[36]

1.สิวเล็กน้อย (mild acne) : มีสิวชนิดไม่อักเสบเป็นส่วนใหญ่ (comedo) และ/หรือมีสิวอักเสบชนิด papules หรือ pustules ไม่เกิน 10 จุด ดังภาพประกอบที่ 9

ภาพประกอบ 9 Mild acne[36]

2.สิวปานกลาง (moderate acne) : มีสิวอักเสบชนิด papules หรือ pustules มากกว่า 10 จุด และ/หรือ มีสิวอักเสบชนิด nodules น้อยกว่า 5 จุด ดังภาพประกอบที่ 10



ภาพประกอบ 10 Moderate acne[36]

3.สิวรุนแรง (severe acne) : มีสิวอักเสบชนิด papules และ pustules มากกว่า 10 จุดและมี nodules หรือ cyst จำนวนมากกว่า 5 จุดหรือมี nodules ที่อักเสบอยู่นานและกลับเป็นซ้ำ (recurrent) หรือมีหนองไหลมี sinus tract ดังภาพประกอบที่ 11

ภาพประกอบ 11 Severe acne[36]

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

โดยปกติสิวไม่จำเป็นต้องตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติม ยกเว้นสงสัยว่าผู้ป่วยมีภาวะฮอร์โมนแอนโดรเจนสูง (hyperandrogenism) กว่าปกติ ซึ่งอาการแสดงที่เราจะพบในผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้แก่ ผู้ป่วยเพศหญิงที่มีผิวมันมากกว่าปกติ (seborrhoea) ขนดก (hirsutism คือ ภาวะที่ผู้หญิงมากเกินไป ลักษณะคล้ายที่พบในเพศชาย) ผมบางจากฮอร์โมนเพศ (androgenic alopecia) เสียงทุ้มต่ำ (deepening of voice) โรคผิวหนังช้าง (acanthosis nigricans) เป็นต้น ในผู้ป่วยเหล่านี้จำเป็นต้องเจาะดูระดับฮอร์โมนแอนโดรเจน อย่างไรก็ตามผู้ป่วยกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ระดับฮอร์โมนแอนโดรเจนจะอยู่ในระดับปกติ แต่ระดับฮอร์โมนดีไฮโดรอิพิแอนโดรสเตอโรนซัลเฟต (dehydroepiandrosterone sulfate/DHEAS) จะสูงกว่าปกติ ภาวะฮอร์โมนแอนโดรเจนสูงกว่าปกติอาจจะมาจากต่อมหมวกไตทำงานผิดปกติหรือรังไข่ผลิตมากเกินไป เพราะฉะนั้นควรจะส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการดังนี้ ตรวจระดับฮอร์โมนดีไฮโดรอิพิแอนโดรสเตอโรนซัลเฟต ระดับผลรวมของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (serum total testosterone)และฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนอิสระ (serum free testosterone) นอกจากนี้หากผลตรวจทั้ง 3 ตัวที่กล่าวไปไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าฮอร์โมนแอนโดรเจนที่สร้างมากเกินไปมาจากต่อมหมวกไตหรือรังไข่ สามารถส่งตรวจระดับสัดส่วนของฮอร์โมนลูเทียไนซิ่ง (luteinizing hormone/LH) ต่อฮอร์โมนฟอลิเคิลสติมูเลทติง (follicle-stimulating hormone/FSH) (LH:FSH ratio) หรือระดับฮอร์โมน 17-ไฮดรอกซี่โปรเจสเตอโรน (serum 17-hydroxyprogesterone) เพิ่มเติมได้[37]

การตรวจทางห้องปฏิบัติการดังกล่าวควรจะตรวจในช่วงขณะมีประจำเดือนหรือก่อนหน้าเล็กน้อย (menstrual period) ไม่ควรตรวจช่วงตกไข่ (ovulation) ถ้าหากกินยาคุมกำเนิด ต้องหยุดกินยาก่อนตรวจอย่างน้อย 1 เดือน ถ้าผลตรวจระดับ DHEAS อยู่ในช่วง 4,000 – 8,000 นาโนกรัมต่อ

มิลลิลิตร จะคิดถึงผู้ป่วยมีภาวะต่อมหมวกไตทำงานมากกว่าปกติตั้งแต่กำเนิด (congenital adrenal hyperplasia) หากระดับ DHEAS มากกว่า 8,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะสงสัยว่าผู้ป่วยมีภาวะเนื้องอกที่ต่อมหมวกไต ซึ่งต้องตรวจเพิ่มเติมต่อไป[37]

ในกรณีที่ระดับ serum total testosterone มากกว่า 150 นาโนกรัมต่อเดซิลิตร จะสงสัยว่าฮอร์โมนแอนโดรเจนที่ผลิตมากเกินไปมาจากรังไข่ และถ้าระดับ serum total testosterone อยู่ในช่วง 150 – 200 นาโนกรัมต่อเดซิลิตรหรือสัดส่วนของ LH/FSH มากกว่า 2 เท่าขึ้นไป จะสงสัยว่าผู้ป่วยมีภาวะถุงน้ำรังไข่ (polycystic ovarian syndrome) ยิ่งตรวจพบระดับ serum total testosterone สูง จะสัมพันธ์กับเนื้องอกรังไข่ ซึ่งต้องมีปรึกษาแพทย์เฉพาะทางด้านนั้น ๆ และตรวจเพิ่มเติมต่อไป[37]

การวินิจฉัยโรคและวินิจฉัยแยกโรค[12, 22, 37]

การวินิจฉัยโรคสิวนั้นเป็นการวินิจฉัยจากประวัติ อาการและอาการแสดง การตรวจร่างกาย ซึ่งสิวนั้นมีหลายลักษณะอาการและหลายระยะ ทั้งสิวชนิดอักเสบและสิวชนิดไม่อักเสบ โดยต้องวินิจฉัยแยกโรคดังนี้

1.รูขุมขนอักเสบ (folliculitis) เช่น รูขุมขนอักเสบจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative folliculitis), รูขุมขนอักเสบจากเชื้อเกลื้อน (pityrosporum folliculitis), รูขุมขนอักเสบชนิดที่เกิดจากการการสะสมของเซลล์ชนิดอีโอซิโนฟิล (eosinophilic pustular folliculitis หรือ Ofuji's disease) เป็นต้น

2.โรคหน้าแดง (rosacea) ส่วนมากจะพบในกลุ่มที่อายุมากกว่าสิวและมักเป็นที่บริเวณกลางใบหน้า (centrofacial) ร่วมกับมีเส้นเลือดฝอยเล็ก ๆ ตามใบหน้า (telangiectasia) นอกจากนี้ผู้ป่วยจะให้ประวัติว่าเมื่อสัมผัสกับอากาศร้อนหรือกินอาหารรสเผ็ดและแอลกอฮอล์ จะหน้าแดงง่าย (flushing)

3.Acneiform drug eruption ผื่นจะเป็นลักษณะเดียวกันหมด (monomorphus) และไม่พบมีสิวอุดตัน (comedo) ผื่นจะขึ้นพร้อมกันอย่างรวดเร็ว (abrupt onset) ภายหลังจากได้รับยาเช่นสเตียรอยด์

4.Milia (intraepidermal keratin cysts) อาจจะสับสนกับ closed comedo ได้ แต่ milia จะมีสีขาวขุ่นและขนาดเล็กกว่า เด่นที่บริเวณใต้ตา

5.Perioral dermatitis ลักษณะเป็น papules และ pustules บนพื้นผิวแดง (erythematous base) จะเป็นสมมาตรกันทั้งซ้ายและขวา (symmetry) บริเวณรอบปาก แต่จะไม่มีผื่นบริเวณ vermillion border

6.Sebaceous gland hyperplasia ลักษณะเป็นตุ่มสีเหลืองบนใบหน้าขนาดประมาณ 1 – 3 มม. มักพบรอยบุ๋มตรงกลางรอยโรค

7.Angiofibromas ลักษณะเป็นตุ่มนูนเล็กสีแดงที่ดูโปร่งแสง (translucence) แบบสมมาตรบริเวณใบหน้า ข้างจมูก ซึ่งพบในโรค tuberous sclerosis

8.Flat wart ลักษณะเป็นตุ่มราบสีเหลืองหรือสีเนื้อ แบนและมีผิวโค้งเป็นรูปโดม

ภาวะแทรกซ้อน[12, 22, 37]

สิวทุกระยะสามารถเกิดผลแทรกซ้อนตามหลังได้ ไม่ว่าจะเป็นรอยแดงจากสิว (post-acne redness) รอยดำจากสิว (postinflammatory hyperpigmentation) และรอยแผลเป็นจากสิว (acne scar) นอกจากนี้สิวยังส่งผลกระทบต่อจิตใจ ทำให้สูญเสียความมั่นใจ ไม่กล้าเข้าสังคม คุณภาพชีวิตต่ำลง ภาวะซึมเศร้าและนำไปสู่การฆ่าตัวตายได้[38]

การพยากรณ์โรค (prognosis)[12, 22, 37]

สิวเป็นโรคที่มักจะเริ่มเป็นในช่วงอายุ 20 ปีเป็นต้นไป และสามารถหายได้เอง (spontaneous remission) โดยที่สิวนั้นสามารถเป็นต่อเนื่องได้นานจนถึงอายุ 30 – 40 ปี ในผู้หญิงสิวมักเป็น ๆ หาย ๆ (fluctuation) ตามรอบเดือน โดยจะเป็นมากช่วงมีรอบเดือน และมีการศึกษาที่พบว่าผู้หญิงที่มีระดับ DHEAS สูง จะเป็นสิ่งที่บ่งบอกว่าจะเป็นสิวรุนแรงหรือมีสิวแบบ nodulocystic เป็นระยะเวลานาน[39]

2. การรักษาสิว (Treatment of Acne)[12, 22, 37]

ยาทารักษาเฉพาะที่ (topical agents)

ยาทารักษาเฉพาะที่มีประโยชน์คือทำให้ยาเข้าถึงรูขุมขนและต่อมไขมันโดยตรง (pilosebaceous unit) และลดภาวะแทรกซ้อนจากการดูดซึมทางร่างกาย (systemic absorption) แต่อย่างไรก็ตามยาทาเฉพาะที่มีผลข้างเคียงทำให้เกิดการระคายเคืองได้[40]

1.ยาทาเฉพาะที่กรดวิตามินเอ (topical retinoids)

คือยากลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของวิตามินเอ โดยออกฤทธิ์ที่ retinoic acid receptors (RAR) มีฤทธิ์ละลายสิวชนิดอุดตัน (comedolytics) และลดการอักเสบได้ (anti-inflammatory) ซึ่งมีหลายชนิดทั้ง tretinoin, adapalene เป็นต้น กรดวิตามินเอเหมาะในการใช้ทาเพื่อละลายหัวสิวและป้องกันการเกิดสิว

วิธีใช้คือทายาวันละ 1 ครั้ง ก่อนนอน ทั่วบริเวณใบหน้า หลีกเลี่ยงรอบตา รอบปากและข้างจมูก ยามีผลข้างเคียงคือสามารถทำให้เกิดผื่นแพ้สัมผัสแบบระคายเคืองได้ (irritant contact dermatitis) และผิวไวต่อแสงได้ นอกจากนี้ใน 1 – 2 สัปดาห์แรกหลังใช้ สิวอาจจะเห่อมากขึ้นได้[40] ยากลุ่มนี้ควรหลีกเลี่ยงในหญิงตั้งครรภ์และให้นมบุตร

2.ยาทาปฏิชีวนะเฉพาะที่ (topical antibiotics)

ยากลุ่มนี้นิยมใช้ในสิวระดับน้อยจนถึงปานกลาง โดยให้ทาที่สิวขนิดอักเสบเป็นเวลา 2 ครั้งต่อวัน (เช้า/เย็น) ซึ่งจะออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* โดยตรงและมีฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วย ยาที่นิยมใช้คือ คลินดามัยซิน (clindamycin) และ อิริโทรมัยซิน (erythromycin) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-4 เนื่องจากมีการใช้ยากลุ่มนี้ค่อนข้างมาก ทำให้เกิดเชื้อดื้อยามากขึ้น[10] จึงไม่ควรใช้เป็นยาทาตัวเดียว ควรใช้ร่วมกับยาทาเฉพาะที่เบนโซอิล เพอร์ออกไซด์ (topical benzoyl peroxide) หรือ topical retinoids

Topical clindamycin และ erythromycin ออกฤทธิ์ที่ 50s ribosomal unit ไปยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียและไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยที่ topical clindamycin ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bacteriocidal) ส่วน topical erythromycin ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (bacteriostatic)[5] นอกจากนี้ topical clindamycin ยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วย โดยไปยับยั้งสารที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokines) เช่น Interleukin-1β, Interleukin-6, Interferon-γ, Tumor necrotic factor-α และ Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) เป็นต้น ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* สามารถกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย[41] ยังมีบางการศึกษาพบว่า topical clindamycin สามารถเพิ่มความสามารถในการจับกินเชื้อแบคทีเรียของเม็ดเลือดขาวได้ (phagocytosis and opsonization)[41] ผลข้างเคียงที่พบได้คือผิวแห้ง คันและแดง[42] มีรายงานการเกิดภาวะลำไส้อักเสบชนิดซูโดเมมเบรน (pseudomembranous enterocolitis) ภายหลังจากการใช้ยา topical clindamycin[43-45]

3.ยาทาเฉพาะที่เบนโซอิล เพอร์ออกไซด์ (topical benzoyl peroxide)

คือยาที่มีฤทธิ์ละลายสิวอุดตัน (comedolytic) และยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antimicrobial) โดยออกฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย *P. acnes* ผ่านทางการปล่อย free radical oxygen จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาเคมีระหว่าง free radical oxygen และ *P. acnes* ทำให้ *P. acnes* ตายจากการได้รับออกซิเจน (ปกติ *P. acnes* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน) นอกจากนี้ topical benzoyl peroxide ยังลดการเปลี่ยน triglycerides ไปเป็น free-fatty acid อีกด้วย สำหรับยาตัวนี้ยังไม่พบมีรายงานเชื้อดื้อยา[10] จึงนิยมใช้คู่กับยาทาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันเชื้อดื้อยา

Topical benzoyl peroxide มีหลายรูปแบบ (preparation) ทั้งเจล ครีม โลชั่น เป็นต้น แต่พบว่ายารูปแบบที่ทาทิ้งไว้บนผิวจะได้ผลค่อนข้างดี ซึ่งความเข้มข้นของยามีตั้งแต่ร้อยละ 2.5 – 10 แต่นิยมใช้ร้อยละ 2.5 – 5 โดยทาทิ้งไว้ทั่วหน้าเช้าและเย็นเป็นเวลา 5 -15 นาทีแล้วล้างออก เริ่มจากทิ้งไว้เป็นระยะเวลาสั้น ๆ ก่อนแล้วค่อยนานขึ้น ยาตัวนี้ใช้รักษาสิวอักเสบเป็นหลัก อาจมีฤทธิ์ comedolytic แต่ไม่ได้ผลดีเท่า topical retinoids[6] ผลข้างเคียงจากยามีดังนี้คือทำให้ผิวแห้ง ลอก แดง และยังสามารถก่อให้เกิดการะคายเคืองได้ (irritation effect)[42]

4.กรดอะเซเลอิค (azelaic acid)

คือยากลุ่ม dicarboxylic acid ที่พบในธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากสัตว์[42] โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatic) ของเชื้อ *P. acnes* ลดการอักเสบและฤทธิ์ comedolytic นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) สามารถลดรอยดำหลังการอักเสบได้ (postinflammatory hyperpigmentation) ผลข้างเคียงที่พบได้คือคัน รู้สึกแสบร้อนได้ (burning and stinging)[40, 42]

5.กรดซาลิไซลิก, รีซอซินอล, ซัลเฟอร์ (salicylic acids, resorcinol, sulfur)

Salicylic acid เป็นยาทาเฉพาะที่ที่มีฤทธิ์ comedolytic แต่น้อยกว่า topical retinoid ผลข้างเคียงที่พบได้คือทำให้เกิดผิวลอกเป็นขุย (peeling)[42], sulfur มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและฤทธิ์ comedolytic ได้เล็กน้อย[42] ส่วน resorcinol มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ผ่านทางการยับยั้ง para-aminobenzoic acid (PABA) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเจริญเติบโตของ *P. acnes*

ยารักษาแบบรับประทาน (systemic agents)

1.ยาปฏิชีวนะชนิดรับประทาน (antibiotics)

1.1 ยากลุ่ม Tetracyclines ซึ่งเป็นกลุ่มที่คลุมเชื้อได้กว้าง (broad-spectrum antibiotics) นิยมใช้ในการรักษาสิวชนิดอักเสบ ออกฤทธิ์โดยยับยั้งที่ 30s ribosome subunit ของแบคทีเรีย จึงไปยับยั้งการสร้างโปรตีนและการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes*[46] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและลดจำนวนการสร้าง free-fatty acid

1.1.1 ยาเตตร้าไซคลิน (teracycline) เป็น first generation ซึ่งได้ผลดี ราคาถูก และถูกสั่งใช้บ่อยในอดีต (prescription) จึงมีปัญหาเชื้อดื้อยาเกิดขึ้น โดยปกติจะเริ่มให้ผู้ป่วยกินที่ 1 กรัมต่อวัน หลังจากอาการทางคลินิกดีขึ้นจะลดเหลือ 500 มิลลิกรัมต่อวัน เนื่องจากยาจะถูกยับยั้งการดูดซึมจากอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนมวัว (dairy products) จึงต้องให้ผู้ป่วยรับประทานยานี้ขณะท้องว่าง ก่อนอาหารเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและไม่ควรรับประทานยาพร้อมกับยาเคลือบกระเพาะหรือ

ธาตุเหล็ก ผลข้างเคียงจากยาที่พบบ่อยคืออาการที่ระบบทางเดินอาหารเช่นคลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายเหลว เป็นต้น ยา tetracyclines ห้ามใช้ในสตรีตั้งครรภ์เนื่องจากยามีฤทธิ์ทำให้เด็กในครรภ์มีความผิดปกติได้ (teratogenicity) และหญิงให้นมบุตร นอกจากนี้ยังห้ามใช้ในเด็กที่อายุน้อยกว่า 8 ปี เพราะจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของกระดูกและทำให้ฟันเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองถึงน้ำตาลได้ โดยที่ไม่สามารถแก้ไขได้[46-48]

1.1.2 ยาด็อกซีไซคลิน (doxycycline) เป็น second generation ของกลุ่ม tetracyclines ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้ยาตัวนี้มากกว่า tetracycline เนื่องจากมีข้อดีกว่าตรงที่ยาตัวนี้สามารถกินพร้อมอาหารได้ อาหารไม่มีผลต่อการดูดซึมยา ขนาดยาที่ให้เริ่มรับประทานคือ 100 - 200 มิลลิกรัมต่อวัน หลังจากนั้นลดเหลือ 50 – 100 มิลลิกรัมต่อวันเมื่ออาการทางคลินิกดีขึ้น ผลข้างเคียงที่พบได้บ่อยคือคลื่นไส้ อาเจียน และอาจพบภาวะไวต่อแสง (photosensitivity reactions) และ photo-onycholysis ได้[46, 47]

1.1.3 ยามิโนไซคลิน (minocycline) เป็น second generation เช่นกัน ซึ่งมีประสิทธิภาพดีมาก ถ้าเทียบกับ tetracyclines แต่ราคาแพงและผลข้างเคียงสูง ขนาดที่ใช้คือ 50 – 200 มิลลิกรัมต่อวัน ผลข้างเคียงที่พบได้คือ อาการบ้านหมุนเนื่องจากยาตัวนี้สามารถผ่าน blood-brain barrier ได้ ทำให้เกิดภาวะแพ้ยาแบบรุนแรงได้ ไม่ว่าจะเป็น drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms และ serum sickness-like reaction นอกจากนี้ยังทำให้เกิดภาวะ systemic lupus-erythematosus-like syndrome และกระตุ้นให้เกิด autoimmune hepatitis ได้ รวมถึงทำให้สีผิวเปลี่ยนแปลงได้ (blue-black pigmentation) จากผลข้างเคียงที่กล่าวมายานี้จึงไว้ใช้ก็ต่อเมื่อยาปฏิชีวนะอื่น ๆ ไม่ได้ผลแล้ว[46, 47]

1.1.4 ยาไลมิไซคลิน (lymecycline) เป็น second generation สามารถดูดซึมได้ดี อาหารไม่มีผลต่อการดูดซึม ขนาดที่ใช้คือ 150 – 300 มิลลิกรัมต่อวัน ผลข้างเคียงที่พบได้คือ photosensitivity ส่วนอาการคลื่นไส้อาเจียนพบน้อยกว่า doxycycline[49, 50]

1.2 ยากลุ่มมาโครไลด์ (macrolide) อีรีโทรมัยซิน (erythromycin) ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. acnes* ที่ 23s RNA บน 50s ribosomal subunit ขนาดที่ใช้คือ 1,000 มิลลิกรัมต่อวัน ถ้าเทียบประสิทธิภาพกับกลุ่ม tetracyclines นั้น กลุ่มนี้ด้อยกว่าและมีโอกาสเกิดเชื้อดื้อยาสูงกว่า จึงเก็บกลุ่มนี้ไว้ใช้ในกรณีที่ผู้ป่วยไม่สามารถใช้กลุ่ม tetracyclines ได้ ผลข้างเคียงที่พบได้บ่อยคือคลื่นไส้อาเจียน ปวดท้อง ถ่ายเหลว ยากลุ่มนี้สามารถใช้สตรีมีครรภ์ หญิงให้นมบุตรและเด็กอายุต่ำกว่า 8 ปีได้[6, 46-48]

1.3 ยากลุ่มไตรเมโทรพิม ซัลฟาเมโทรซาโซล (trimethoprim-sulfamethoxazole, co-trimoxazole) ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียผ่านทางการยับยั้งการสร้างกรดโฟลิก (folic acid) ทำให้

เซลล์แบคทีเรียไม่สามารถแบ่งตัวได้[51] นำมาใช้รักษาสิวรุนแรงในกรณีที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอื่น ๆ เนื่องจากมีผลข้างเคียงที่ค่อนข้างรุนแรง ที่พบบ่อยขึ้นผลที่ทางเดินอาหารและการแพ้ยาแบบรุนแรงคือ Steven-Johnson syndrome-toxic epidermal necrolysis

1.4 ยาคลินดามัยซิน (clindamycin) ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียผ่านทาง 50S ribosomal subunit ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดี แต่การใช้ระยะยาวนั้นไม่ดี เนื่องจากจะกระตุ้นให้เกิด pseudomembranous colitis ได้ ซึ่งเป็นผลข้างเคียงที่รุนแรง จึงไม่นิยมนำมาใช้รักษาสิว[47]

1.5 ยาอะม็อกซิซิลิน (amoxicillin) ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bacteriocidal) ซึ่งมีประสิทธิภาพต่อเชื้อแกรมบวกเป็นหลัก (gram-positive bacteria) แต่ถ้าใช้ยาในขนาดที่สูงขึ้นจะสามารถฆ่าแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) และแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนได้ (anaerobic bacteria) จึงนำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะทางเลือกหนึ่งในการักษาสิว[52]

2.ยา Isotretinoin (13-cis-retinoic acid)

คือยากลุ่ม retinoids ที่ออกฤทธิ์ลดปริมาณการผลิตไขมัน (sebum) และขนาดของต่อมไขมัน ลดการหนาตัวของ corneum ที่บริเวณรูขุมขน (hair follicles) เมื่อปริมาณไขมันลดลง จึงทำให้สภาวะแวดล้อมของรูขุมขนเปลี่ยนแปลง ทำให้ *P. acnes* ลดจำนวนลง และยังไปยับยั้งการทำงานของ leukotriene B4 ทำให้ภาวะการอักเสบ (inflammation) ลดลงด้วย[6] ซึ่งยาตัวนี้จะเลือกใช้ในกรณีที่เป็นสิวระดับรุนแรง โดยขนาดที่ใช้คือ 0.5 – 1 มิลลิกรัมต่อวัน และพบว่าถ้ากินยาจนถึงขนาดยาสะสม (accumulative doses) ที่ 120 – 150 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม จะสามารถลดการกลับเป็นซ้ำได้ร้อยละ 22 – 30 เมื่อติดตามผู้ป่วยเป็นเวลา 10 ปี[47] ผลข้างเคียงที่พบจากการใช้ยากลุ่มนี้คือปากแห้งซึ่งพบเกือบทุกราย ผิวแห้ง ตาแห้ง (ระหว่างที่ใช้ยาไม่ควรใส่คอนแทคเลนส์) ผมร่วง ผิวไหม้แดดได้ง่าย (sunburn) ไขมันโลหิตสูง ภาวะตับอักเสบ ส่งผลต่อระบบกระดูกและกล้ามเนื้อได้ เป็นต้น และต้องแนะนำให้ผู้ป่วยเพศหญิงคุมกำเนิดระหว่างที่กินยานี้อย่างเคร่งครัด เนื่องจากยานี้มีฤทธิ์ teratogen หากจะมีบุตรต้องหยุดยาอย่างน้อย 1 เดือน[6] ยากลุ่มนี้ห้ามให้ในสตรีมีครรภ์ (pregnancy category X) สตรีที่ให้นมบุตร และมีการทำงานของตับหรือไตผิดปกติ นอกจากนี้ไม่ควรกินยากลุ่มนี้คู่กับยากลุ่ม tetracyclines เนื่องจากจะเพิ่มโอกาสเกิด pseudotumor cerebri และไม่ควรกินยานี้คู่กับวิตามินเอและแอสไพรินขนาดสูง[47]

การรักษามาตรฐาน (first line treatment) โดยแบ่งตามความรุนแรงของสิว[6]

1.สิวเล็กน้อย (mild acne)

เลือกใช้ยาทาเฉพาะที่ โดยเลือกเป็นยาตัวใดตัวหนึ่งที่เป็นหลักฐานระดับ 1 คำแนะนำระดับ A หรือใช้ร่วมกันหลายตัวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษา มีดังนี้

1.1 Benzoyl peroxide ร้อยละ 2.5 - 5 (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ A)

1.2 Topical retinoids ร้อยละ 0.01 – 0.1 (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ A)

1.3 Clindamycin ร้อยละ 1 solution (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ A)

1.4 Erythromycin ร้อยละ 2 - 4 solution หรือ gel (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ A)

1.5 Salicylic acid (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ A)

1.6 Azelaic acid (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ C)

1.7 Sulfur, resorcinol (หลักฐานระดับ 2, คำแนะนำระดับ C)

หมายเหตุ ไม่ควรใช้ clindamycin หรือ erythromycin ทาอย่างเดียว (monotherapy) เพราะมีความเสี่ยงต่อการเกิดเชื้อดื้อยา ควรใช้ร่วมกับ benzoyl peroxide

2.สิวปานกลาง (moderate acne)

ใช้ยาทาเฉพาะที่ที่ใช้ใน mild acne ร่วมกับยาปฏิชีวนะแบบรับประทาน คือกลุ่ม tetracyclines ยาที่แนะนำคือ doxycycline 100 – 200 มิลลิกรัมต่อวัน รับประทาน 2 เวลา หลังอาหารเช้าและเย็น (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ A) ถ้าแพ้ยากลุ่ม tetracyclines ให้ใช้ erythromycin แทน (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ A)

3.สิวรุนแรง (severe acne)

ใช้ยาทาเฉพาะที่ร่วมกับยารับประทาน isotretinoin ขนาดที่รับประทานคือ 0.5 – 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัมต่อวัน (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ A) ข้อควรระวังต่าง ๆ ดังที่กล่าวไปแล้ว อาจรักษาร่วมกับการรักษาเสริม (adjuvant therapy) เช่น การกดสิว (comedonal extraction), การฉีดสเตียรอยด์เข้าที่สิว (intralesional steroid) หรือการทำเลเซอร์ (laser therapy) เป็นต้น หากการรักษามาตรฐานไม่ได้ผลใน 2 – 3 เดือน ควรพิจารณาใช้ยา second line drugs เช่น co-trimoxazole (sulfamethoxazole trimethoprim), dapsone เป็นต้น

3. เชื้อก่อโรค *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรูขุมขนและต่อมไขมันของร่างกาย (pilosebaceous unit) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สำคัญและเป็นปัจจัยหนึ่งในการก่อให้เกิดสิว โดยจะพบอยู่มากที่บริเวณที่มีต่อมไขมันสูง เช่น ใบหน้า หน้าอกส่วนบน หลัง คอ เป็นต้น[32]

Propionibacterium acnes เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ (family) Propionibacteriaceae สกุล (genus) Propionibacterium ซึ่งสกุลนี้สามารถพบเป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนังมนุษย์ (normal flora) ได้ 3 ชนิด คือ *Propionibacterium acnes, Propionibacterium avidum* และ *Propionibacterium granulosum*[53]

P. acnes เป็นเชื้อแกรมบวก (gram-positive bacteria) ที่ไม่อาศัยออกซิเจนในการดำรงชีวิต (anaerobic)[53] ไม่เคลื่อนไหว (non-motile) และลักษณะเป็นแท่งสั้น ๆ (rod)[22] มีโครโมโซมเป็นวงกลมเดี่ยว (single circular chromosome) ประกอบด้วย 2,333 ยีนส์ ซึ่งแบ่ง *P. acnes* ออกได้เป็นกลุ่ม ๆ ได้หลายแบบ ขึ้นกับวิธีการแบ่ง โดยมีความสำคัญคือทำให้ได้รู้ว่า *P. acnes* แต่ละชนิด (strain) มีผลต่อความรุนแรงของอาการทางคลินิคที่แตกต่างกัน[32] เชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ ซึ่งจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้สร้างแอนติบอดี (antibody) ผ่านทางปฏิกิริยาภาวะภูมิไวเกินชนิดที่ 4 (delayed type hypersensitivity) และกระตุ้นให้เกิดการอักเสบผ่านทางการหลั่งไซโตไคน์และเอนไซม์หลายชนิด[37]

การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรค *Propionibacterium acnes*

สิวเป็นโรคที่พบได้บ่อยในช่วงวัยรุ่นและส่งผลกระทบตามมาหลายอย่าง[1] ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* เป็นสาเหตุที่สำคัญสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดสิว จึงมีการนำยาปฏิชีวนะหลายชนิดมารักษาสิว เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของ *P. acnes* มีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นยารักษาเพียงตัวเดียว (monotherapy) ในการรักษาสิว[7] หรือผู้ป่วยซื้อยารักษาสิวมาใช้เองโดยขาดความรู้ความเข้าใจในการใช้ยาเพราะยาปฏิชีวนะสามารถหาซื้อได้เองตามร้านขายยา ทำให้มีอุบัติการณ์เชื้อดื้อยาสูงขึ้น[8]

กลไกการดื้อยาของเชื้อก่อโรค *P. acnes* ที่ดื้อต่อ erythromycin, clindamycin และ tetracycline พบว่ามีการกลายพันธุ์ระดับยีน (point mutation) บน rRNA[54] เชื้อที่ดื้อต่อ erythromycin พบว่ามีการกลายพันธุ์เฉพาะจุดบนยีนส์ 23S rRNA บนเบสลำดับที่ 2057 - 2059 เป็นตำแหน่งที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ peptidyl transferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เพื่อให้ RNA ยาวขึ้น[55] ส่วนเชื้อที่ดื้อต่อ tetracycline พบว่ามีการกลายพันธุ์เฉพาะจุดบนยีนส์ 16S rRNA บนเบส 1058[56] และเชื้อที่ดื้อต่อยา macrolide, lincosamide และ streptogramin B (MLS_B) พบว่ามีทรานสโพซอน (transposon) ที่มีชื่อว่า ermX อยู่ในดีเอ็นเอของแบคทีเรียนั้น ซึ่งทรานสโพซอนคือส่วนของดีเอ็นเอที่สามารถเคลื่อนย้ายตำแหน่งไปยังจีโนม (genome) อื่นของดีเอ็นเอได้[57]

สถานการณ์เชื้อดื้อยาของ *P. acnes* ในปัจจุบันเพิ่มสูงขึ้นจากในอดีตค่อนข้างมาก จากการศึกษาพบว่าความชุกเพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 20 ในปี 1979 กลายเป็นร้อยละ 64 ในปี 2000 โดยที่ยาที่มีอัตราการดื้อยาสูงคือ clindamycin และ erythromycin เมื่อเทียบกับกลุ่ม tetracyclines[58] ซึ่งการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียนั้นอาจจะเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ของโครโมโซมหรือยีนส์ก็ได้ (chromosomal mutation or gene acquisition) การดื้อยานั้นเริ่มพบหลังจากที่มีการนำยาปฏิชีวนะมาใช้ โดยยาปฏิชีวนะเริ่มใช้เป็นปีแรกในปี 1937[59] ยิ่งมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายมากเท่าไหร่เชื้อดื้อยายิ่งพบในอัตราที่สูงขึ้น จากการศึกษาพบเชื้อ *P. acnes* ที่ดื้อต่อยา clindamycin และ erythromycin เป็นครั้งแรกในปี 1979 และพบว่าดื้อต่อยากลุ่ม tetracyclines เป็นครั้งแรกในปี 1983 ในประเทศสหรัฐอเมริกา[58] หลังจากนั้นพบว่ามีหลายประเทศเริ่มหลายงานถึงอุบัติการณ์เชื้อดื้อยาของ *P. acnes* มากขึ้นเรื่อย ๆ จะยกตัวอย่างการศึกษาบางส่วนที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *P. acnes* ที่ดื้อยา เช่นในประเทศเกาหลี Sang Ho Moon และคณะ ได้ทำการเก็บเชื้อสิวจากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 100 คน พบว่าแยกขึ้นเชื้อ *P. acnes* 30 สายพันธุ์ ใน 30 สายพันธุ์นี้ สัดส่วนในการดื้อยากลุ่ม clindamycin และ erythromycin สูงกว่ายาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ คิดเป็น clindamycin ร้อยละ 30 และ erythromycin ร้อยละ 26.7[60], การศึกษาของ N.-M.T. Luk และคณะ ทำที่ฮ่องกง โดยเก็บตัวอย่างคนไข้ทั้งหมด 111 คน ซึ่งสามารถแยกได้เชื้อ *P.acnes* ทั้งหมด 86 สายพันธุ์ พบว่าร้อยละ 54.7 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิด โดยที่ดื้อต่อ clindamycin เป็นอันดับหนึ่ง รองลงมาเป็น erythromycin[61]

มีการศึกษาของ N.S.A. Abdel Fattah และคณะที่ประเทศอียิปต์ โดยทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 115 คน แยกเชื้อ P. acnes ได้ 98 สายพันธุ์ ซึ่งดื้อต่อยา clindamycin มากที่สุด รองลงมาคือ erythromycin [62] ยังมีการศึกษาในฝั่งยุโรป โดย J.I.ROSS, A.M.SNELLING และคณะ ได้รวมรวมผู้ป่วยทั้งหมด 664 คนจากหลาย ๆ ประเทศ พบว่าเชื้อที่ดื้อยาทั้งต่อ clindamycin และ erythromycin นั้นพบมากเมื่อเทียบกับ tetracyclines[63] ประเทศอังกฤษก็มีการศึกษาวิจัย ทำโดย P. Coates และคณะ พบว่าอัตราการเกิดเชื้อดื้อยาของ P. acnes สูงขึ้นมากจากในอดีต จากร้อยละ 34.5 ในปี 1991 เป็นร้อยละ 55.5 ในปี 2000 โดยที่ดื้อ erythromycin มากที่สุด จากตัวอย่างการศึกษาที่กล่าวไปทำให้เห็นว่าอัตราการเกิดเชื้อดื้อยาของ P. acnes นั้นสูงขึ้นมา

นอกจากในต่างประเทศแล้ว ประเทศไทยเองก็มีการทำการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อดื้อยาเช่นกัน ในปี 2001 มีปริญญานิพนธ์ที่ศึกษาถึงรูปแบบความไวของเชื้อ P. acnes จากผู้ป่วยสิวต่อยา clindamycin, erythromycin, tetracycline, doxycycline และ minocycline พบว่ามีเชื้อที่ดื้อต่อยา clindamycin ร้อยละ 6.15 และ erythromycin ร้อยละ 6.15 ส่วนยา tetracycline, doxycycline และ minocycline ไม่พบมีการดื้อต่อยาเหล่านี้ ซึ่งพบมีแนวโน้มดื้อยาในกลุ่มผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษามา

ก่อน มีอาการรุนแรงและในกลุ่มคนไข้อายุน้อย[64] และจากงานวิจัยของ Laochunsuwan A.[9] ได้ทำการศึกษากลุ่มผู้ป่วยสิวจำนวน 95 คน สามารถแยกเชื้อ P. acnes ได้ทั้งหมดจาก 75 คน คิดเป็นร้อยละ 78.95 และนำเชื้อ P. acnes ที่แยกได้มาทดสอบรูปแบบความไวของเชื้อต่อยา clindamycin, erythromycin, tetracycline, doxycycline, amoxicycline ซึ่งเป็นยาที่ใช้บ่อยในการรักษาสิวและพบว่ามีการดื้อยาในหลาย ๆ ประเทศ ผลที่ได้พบว่ามีเชื้อที่ดื้อต่อยา clindamycin 47 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 62.66 ดื้อต่อยา erythromycin 48 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 64 ดื้อต่อยา tetracycline 1 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 1.33 จะเห็นว่ามีอุบัติการณ์เชื้อดื้อยาต่อ erythromycin สูงที่สุด รองลงมาเป็น clindamycin นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบอีกว่ามีความสัมพันธ์ของเชื้อดื้อยา P. acnes ต่อกลุ่ม macrolides กับอายุและประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะนำมาก่อนอย่างมีนัยสำคัญ จากงานวิจัยดังกล่าวจึงเป็นที่มาของงานวิจัยในครั้งนี้ที่จะนำสมุนไพรไทยมาใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย P. acnes ที่แยกได้จากคนไข้ในงานวิจัยดังกล่าว[9] มาทำการทดลอง เพื่อลดปัญหาเชื้อดื้อยาและเป็นยาทางเลือกในการใช้สมุนไพรรักษาสิว

4. สมุนไพรไทยและสารเคมีออกฤทธิ์ที่สำคัญ[65-71]

สมุนไพรหมายถึง ผลิตผลจากธรรมชาติ ได้จากพืช สัตว์ และแร่ธาตุ ที่ใช้เป็นยาหรือผสมกับสารอื่น ๆ ตามตำรับยา เพื่อบำบัดโรค เป็นอาหาร บำรุงร่างกาย นำไปใช้เป็นเครื่องสำอางค์ ปัจุบันมีการนำสมุนไพรมาใช้ในด้านสาธารณสุขกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสมุนไพรมีประโยชน์หลายอย่างไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม และยังเสริมรายได้ให้แก่เกษตรกรไทยอีกด้วย ซึ่งสมุนไพรที่ได้จากพืชมาจาก 5 ส่วนหลัก ๆ คือ ดอก ใบ ลำต้น ผลและราก อย่างไรก็ตามการคัดเลือกสมุนไพรมาใช้นั่น ต้องอาศัยความรู้ ความเข้าใจถึงสารต่าง ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของสมุนไพร, ชนิดของสมุนไพร, ส่วนที่ใช้ว่าจะนำผล เปลือก ใบหรือรากมาใช้เนื่องจากแต่ละส่วนนั้นมีส่วนประกอบที่ไม่เหมือนกันในพืชบางชนิด, อายุของพืช ช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวเช่นถ้าต้องการใช้ดอก ควรเก็บก่อนดอกบาน เมล็ดควรเก็บระยะผลแก่ เป็นต้น เพราะว่าทุกองค์ประกอบที่กล่าวไปจะมีผลต่อสารสำคัญออกฤทธิ์ในพืชนั้น ๆ เพื่อให้ได้สารสำคัญนั้น ๆ ในปริมาณที่สูง เพื่อให้ได้ผลที่ดีที่สุด และต้องรู้วิธีสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร

พืชสมุนไพรประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด ซึ่งแต่ละส่วนของพืช จะมีสารประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันและปริมาณแตกต่างกัน ตามแต่พันธุ์พืช สภาพอากาศ ดิน แร่ธาตุ ช่วงเวลาไหนการเก็บ ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น การเข้าใจถึงองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นส่วนประกอบ

ของพืชสมุนไพรนั้นมีความสำคัญ เพื่อใช้ในการตัดสินใจและเลือกพืชสมุนไพรนำมาพัฒนาเป็นยา เครื่องสำอางค์ และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้อย่างเหมาะสม

สารประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพรจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ

1.สารประกอบปฐมภูมิ (primary metabolite) เป็นสารที่พบอยู่ในพืชชั้นสูง พืชสร้างเพื่อนำมาใช้ในการดำรงชีพ สามารถพบได้ในพืชทุก ๆ ชนิด เป็นผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) ได้แก่

1.1 โปรตีน (proteins) กรดอะมิโน (amino acids) และเอนไซม์ (enzymes) : โปรตีนคือสารอินทรีย์ที่มีส่วนประกอบเป็นไนโตรเจน โดยที่พืชมักสะสมโปรตีนในรูปของ aleurone grains แบ่งเป็น 3 กลุ่ม

1.1.1 Simple proteins เมื่อถูกย่อยจะให้กรดอะมิโน

1.1.2 Derived proteins หรือ protein hydrolysates เป็นการนำโปนตีนมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ protease จึงได้รูปนี้ออกมา

1.1.3 Conjugated proteins ประกอบด้วยโปรตีนจับกับส่วนที่ไม่ใช่โปรตีน

กรดอะมิโน (amino acids) เป็น carboxylic acid ที่ประกอบด้วย amino group อย่างน้อย 1 กลุ่ม มีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิสมของพืชชั้นสูง อาจมีฤทธิ์เป็นกรด กลาง เบสได้

เอนไซม์ (enzyme) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาต่าง ๆ เช่น lipase, lactase, proteolytic enzyme เป็นต้น โดยทั่วไปมีคุณสมบัติดังนี้ เป็น colloid ที่ละลายน้ำได้และแอลกอฮอล์ชนิดเจือจาง จะทำหน้าที่ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 – 40 °ซ ถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 65 ° ซ สารบางชนิดทำให้การทำงานของเอนไซม์แย่ลง เช่น ไอโอดีน โลหะหนัก เป็นต้น

1.2 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เป็นสารอินทรีย์ที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน โดยสร้างขึ้นจากการสังเคราะห์แสงและเก็บไว้เป็นอาหาร แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ

1.2.1 True sugar ได้แก่ monosaccharides เช่น pentose, xylose และ oligosaccharides เช่น maltose, lactose เป็นต้น

1.2.2 Polysaccharides ได้แก่ starch, dextrin, glycogen เป็นต้น

1.2.3 Derived carbohydrates เช่น pectin, alginstes, gums, mucilages เป็นต้น

1.3 ไขมัน (lipids) สารกลุ่มนี้เป็นเอสเตอร์ของกรดไขมันชนิดโมเลกุลยาวจับกับแอลกอฮอล์ ในพืชไขมันมักรวมอยู่กับโปรตีน และส่วนมากเป็นอาหารสำรองสะสมในเมล็ด สปอร์และเนื้อในของผล (bulbs) โดยที่

1.3.1 น้ำมันระเหยยาก (fixed oils) และไขมัน (fats) เป็นเอสเตอร์ของกรดสเตียริก (stearic), กรดปาลมิติก (palmitic), กรดโอเลอิก (oleic) เป็นต้น ส่วนใหญ่ได้จากส่วนเมล็ด น้ำมันระเหยยากมีสภาพเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ส่วนไขมันมีสภาพกึ่งแข็งกึ่งเหลวหรือเป็นของแข็ง

1.3.2 ไขแข็ง เป็น monohydric alcohol ของ cetyl, myristyl เป็นต้น น้ำมันและไขมันจากพืชประกอบด้วยกรดไขมันหลายชนิด ทำให้มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีในการเป็นอิโมเลียนท์ (emollient)

1.4 สารกลุ่มเรซิน (resins and resin combination) มีคุณสมบัติทางยาจึงมักนำไปใช้เป็นยา

1.4.1 เรซิน เป็นของแข็งใสหรือโปร่งแสง เปราะ เกิดจากการหลั่งของพืชเมื่อพืชมีภาวะโรคภัย มีองค์ประกอบทางเคมีที่ซับซ้อน แต่มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่แน่นอน มีความถ่วงจำเพาะมากกว่าน้ำ ไม่ละลายน้ำ, ปิฌตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) แต่ละลายในแอลกอฮอล์, คลอโรฟอร์ม, อีเธอร์, อะซีโตน และน้ำมันหอมระเหย ที่สำคัญละลายในสารละลาย chloral hydrate ซึ่งใช้เป็นคุณสมบัติที่แยกเรซินออกจากสารอื่น นอกจากนี้ยังสามารถพบเรซินปะปนอยู่กับสารชนิดอื่นได้ เช่น ปนกับน้ำมันหอมระเหย เรียกว่าโอลิโอเรซิน (oleoresin), ปนอยู่กับยางไม้เรียกว่า กัมเรซิน (gum-resins), ปนอยู่กับไกลโคไซด์ เรียกว่า glycoresins มีฤทธิ์ทางยา

1.4.2 บาลซัม (balsam) เป็นสารกึ่งแข็งกึ่งเหลวจากพืช ประกอบด้วย aromatic balsamic acid, benzoic acid หรือ cinnamic acid และมักมีน้ำมันหอมระเหยในปริมาณต่ำ

1.5 ยางไม้ (gums) เป็นของเหลวที่ได้จากพืช เก็บได้จากพืชเมื่อไปกรีดพืชนั้น ๆ บางชนิดนำมาทำเป็นยา

1.6 อื่น ๆ (others) เช่น เม็ดสี (pigment), เกลืออนินทรีย์ (inorganic salts) เป็นต้น

2.สารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolites) เป็นสารเคมีที่มีลักษณะเฉพาะ ที่พืชสร้างจากสารประกอบปฐมภูมิ ซึ่งจะทำหน้าที่ต่าง ๆ กัน เช่น ให้กลิ่น สี หรือมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบต่างกันในพืชแต่ละชนิด อาจจะเกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) โดยอาศัยเอนไซม์ เช่น แทนนิน (tannin) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ไกลโคไซม์ (glycosides) เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่มีสรรพคุณทางยา มีข้อสังเกตว่าสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยา อาจไม่ได้มาจากสารเดียว แต่อาจเป็นจากหลาย ๆ สารออกฤทธิ์ร่วมกันก็เป็นได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องรู้ถึงคุณลักษณะของสารเคมีแต่ละชนิดในกลุ่มนี้ ได้แก่

2.1 สารประกอบฟีนอล (phenols) เป็นสารประกอบของ aromatic ต่อกับกลุ่ม hydroxyl มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนและละลายน้ำ สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรค (anti-bacteria, anti-fungus) ลดการอักเสบได้ แต่ระคายเคือง จึงต้องเจือจางก่อนนำมาใช้ โดยมากสารกลุ่มนี้ในพืชมักอยู่ร่วมกับ

น้ำตาลในรูปของไกลโคไซด์ (glycosides) พบในสมุนไพรเช่น พลู กานพลู จำปา กระเจี๊ยบแดง ฝิ่น เป็นต้น

2.2 สารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) เป็น basic nitrogenous compounds ที่พบในพืช ปัจจุบันพบมากกว่า 5,000 ชนิด มักลงท้ายด้วย –ine มักพบในพืชตระกูลที่มีดอกโดยพบในเกือบทุกส่วนของพืชนั้น สารอัลคาลอยด์ในรูปอิสระ (free base) จะไม่ละลายน้ำหรือละลายได้เพียงเล็กน้อย แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อีเธอร์ คลอโรฟอร์มและตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ส่วนเกลือของอัลคาลอยด์จะมีคุณสมบัติในการละลายตรงข้ามกับอัลคาลอยด์อิสระ และมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่เด่นชัด มีฤทธิ์ทางยาเช่น morphine ในใบฝิ่น มีฤทธิ์ระงับปวด สาร quinine ในเปลือกต้นซิงโคนา (cinchona) ใช้รักษาโรคมาลาเรีย เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ลดการอักเสบและต้านแบคทีเรียได้ ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่พบเช่น โมกหลวง กลอย บัวหลวง เป็นต้น

2.3 สารกลุ่มไกลโคไซด์ (glycosides) เป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนและพบมากในพืชสมุนไพรชั้นสูง มักจะลงท้ายด้วย -oside ประกอบด้วย 2 ส่วน คือโครงสร้างส่วนที่เป็นน้ำตาลเรียกว่า glycone และส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลเรียกว่า aglycone (หรือ genin) สารกลุ่มนี้ละลายน้ำได้ดี ทำหน้าที่สะสมน้ำตาล ควบคุม กำจัดพิษและป้องกันอันตรายที่มีต่อพืช ไกลโคไซด์มีฤทธิ์ทางยามากมาย เช่น digitoxin, stophanthin, ouabain มีฤทธิ์กระตุ้นหัวใจ รากชะเอมเทศ มี glycyrrhizin ทำให้ผิวชุ่มชื้นและมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งไกลโคไซด์มีหลายชนิด ได้แก่

2.3.1 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) พบในพืชชั้นสูงทั่วไป เป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอล ส่วนใหญ่จะเป็นสารมีสี (pigment) นิยมสกัดด้วยเมธานอลหรือเอธานอล ไม่ละลายในอีเธอร์ สารกลุ่มนี้มีประโยชน์มากมาย ได้แก่ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น (anti-oxidant), ฤทธิ์ต้านมะเร็ง, ป้องกันโรคหลอดเลือดและหัวใจ, ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเช่นสาร myricetin, robinetin สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้โดยยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและบางสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถทำลายเซลล์เมมเบรนของเชื้อแบคทีเรียได้, มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ2 (phospholipase A2) ยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase), ฤทธิ์ต้านราและไวรัส พืชสมุนไพรที่พบเช่น ข่าเล็ก มะขามแขก ส้มแก้ว ชุมเห็ดเทศ หอมใหญ่ เปลือกมังคุด เป็นต้น

2.3.2 สารกลุ่มซาโปนิน (saponins) เป็นสารประกอบกลุ่มไกลโคไซด์ มีสูตรโครงสร้าง 2 แบบคือ triterpenoid และ steroid saponin ละลายในน้ำและแอลกอฮอล์ ไม่ละลายในอีเธอร์ พบได้ในโสม ชะเอม บัวบก เป็นต้น มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว เมื่อเขย่าสารละลายซาโปนินในน้ำจะได้ฟองที่คงทน สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยาจำพวก steroid hormones ถ้าฉีดสารเหล่านี้เข้ากระแสเลือดคนหรือสัตว์ จะทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตกได้ (hemolysis) แต่ถ้ารับประทานจะไม่เกิดพิษ

2.3.3 กลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquinone) เป็นสารกลุ่มใหญ่ของ natural quinone ซึ่งสารกลุ่มนี้จะพบได้ทั้งในรูปอิสระและรูปไกลโคไซด์ มีฤทธิ์เป็นยาระบายและต้านแบคทีเรีย พบในพืชสมุนไพรเช่น ชุมเห็ดเทศ ยอบ้าน สัก ขี้เหล็ก มะขามแขก เป็นต้น

2.3.4 สารกลุ่มแทนนิน (tannins) มีโครงสร้างเป็นสารเชิงซ้อน เป็นสารจำพวกโพลีฟีนอล มีฤทธิ์เป็นด่างเจือจาง ละลายน้ำ แอลกอฮอล์และอะซิโตน (acetone) จะพบในพืชที่มีรสขม เช่นเปลือกอบเชย เปลือกทับทิม ใบชา เป็นต้น พบในพืชเกือบทุกชนิดและกระจายอยู่ตามส่วนต่าง ๆ ของพืช สามารถตกตะกอนโปรตีนได้และทนต่อการย่อยสลายจาก proteolytic enzyme มีฤทธิ์ฝาดสมาน ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และทำให้เนื้อเยื่อสร้างเร็วขึ้น

2.3.5 สารกลุ่มคูมาริน (coumarins) เป็นอนุพันธุ์ของ α-pyrone พบได้ในพืชหลายชนิดและพบเกือบทุกส่วนของพืช เป็นสารที่ให้ทั้งรสขมและรสหวาน ละลายในแอลกอฮอล์ ซึ่งสารคูมารินมีหลายชนิด ฤทธิ์แตกต่างกันไปตามแต่ละชนิด เช่น bergapten ที่พบในคื่นไช่ มีฤทธิ์ป้องกันการแพ้แสงแดด, khellin จากเทียนเยาวพาณี มีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบ เป็นต้น พืชสมุนไพรที่พบเช่น มะตูม แก้ว ยี่โถ มะนาว เป็นต้น

2.4 กลุ่มน้ำมันหอมระเหย (volatile oils/essential oils) เป็นสารส่วนที่ให้กลิ่นหอม มีส่วนประกอบทางเคมีที่สลับซับซ้อน มีลักษณะเป็นน้ำมันได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ พบได้ในพืชมากมายหลายชนิด เป็นสารส่วนที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิสมของพืช สามารถระเหยได้ในอุณหภูมิห้อง มีฤทธิ์ขับลม ฆ่าเชื้อโรค, เชื้อราและปรสิต (antibacterial, antifungus, antihelmintics) ขับปัสสาวะได้ พบในพืชสมุนไพร เช่น ตะไคร้ กระเทียม ไพล ขมิ้น เป็นต้น

2.5 สารกลุ่มสเตอรอลและสเตอโรลิน (sterols and sterolins) จัดเป็นสเตียรอยด์ประเภท steroid alcohol พบได้ในพืชทั่ว ๆ ไป มีทั้งในรูป free form และ glycoside form ถ้าเป็น free form จะเรียกว่า sterols ส่วนถ้าเป็น glycosides form จะเรียกว่า sterolins ซึ่งต่างจาก sterols ที่ละลายในน้ำยาละลายไขมัน (fat solvents) ได้ไม่ดี มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และมีการนำมาใช้รักษาโรคหัวใจ พืชสมุนไพรที่พบได้เช่นระย่อม, เทียนบ้าน เป็นต้น

5. การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร

1.การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร สมุนไพรเป็นวัตถุดิบที่มีความสำคัญมากในการผลิตยาหรือเครื่องสำอางต่าง ๆ เพื่อให้ได้วัตถุดิบที่มีคุณภาพดี จึงต้องคำนึงถึงการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว ลดการปนเปื้อน และการเก็บรักษาสมุนไพรเพื่อให้มีอายุนานขึ้น ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.1 การเพาะปลูกและการเก็บเกี่ยวพืชสมุนไพร[68]

การเก็บเกี่ยวสมุนไพรต้องคำนึงถึงการเก็บให้ถูกชนิดของพืช เก็บให้ถูกส่วนที่ใช้ อายุที่เหมาะสมของพืชที่เก็บ ช่วงเวลาของวันและฤดูกาลที่เก็บ จะทำให้ได้สารสำคัญออกฤทธิ์ในปริมาณสูงและเป็นการสงวนพันธุ์ของสมุนไพรด้วย หลักเกณฑ์ทั่ว ๆ ไปในการเก็บสมุนไพรคือ

1.1.1 ใบ ควรเก็บตอนเช้าถึงสาย

1.1.2 ดอก ควรเก็บก่อนดอกบาน

1.1.3 ผล ควรเก็บเมื่อโตเต็มที่หรือผลแก่

1.1.4 เมล็ด ควรเก็บในระยะผลแก่

1.1.5 แก่นและเปลือกของรากและลำต้น ควรเก็บในช่วงฤดูร้อนหรือต้นฤดูฝน

1.1.6 ทั้งต้นของพืชล้มลุก ควรเก็บระยะที่กำลังออกดอก

1.1.7 รากและลำต้นใต้ดิน (หัว) ควรเก็บในช่วงที่พืชหยุดการเจริญเติบโต หรือในช่วงฤดูหนาวจนถึงฤดูร้อน

วิธีการเก็บนั้นไม่มีอะไรซับซ้อน ใบและดอกใช้วิธีเด็ด ราก หัวหรือเก็บทั้งต้น ใช้วิธีขุดอย่างระมัดระวัง ส่วนเครื่องมือที่ใช้เก็บสมุนไพร ควรเก็บให้สะอาดและบำรุงรักษาอยู่เสมอ อุปกรณ์ที่จะสัมผัสกับสมุนไพรโดยตรง ต้องปราศจากการปนเปื้อนและน้ำมันหล่อลื่น

1.2 การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว[72, 73]

สมุนไพรโดยทั่วไปมีทั้งใช้สดและใช้แห้ง การใช้สดข้อดีคือสะดวกและใช้ง่าย แต่ข้อเสียคือฤทธิ์การรักษาของยาไม่คงที่ ยาที่ใช้สดเช่น ว่านหางจระเข้ รากหญ้าคา เป็นต้น ส่วนสมุนไพรที่ใช้แห้ง จะได้คุณภาพยาที่คงที่มากกว่า จึงนิยมใช้ในรูปนี้ ถ้าหากปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวไม่ถูกต้อง จะทำให้สารสำคัญในสมุนไพรและวัตถุดิบคุณภาพต่ำลง โดยทั่วไปมีการปฏิบัติดังนี้ ได้แก่

1.2.1 การคัดเลือกสิ่งแปลกปลอม หลังจากที่เลือกซื้อสมุนไพรย่อมมีสิ่งปลอมปนหรือส่วนของพืชสมุนไพรที่ไม่ต้องการใช้หรือสมุนไพรคนละชนิดแต่มีลักษณะคล้ายกัน จึงจำเป็นต้องมีการคัดแยกออกก่อน เพื่อให้ได้พืชสมุนไพรที่ต้องการและได้วัตถุดิบที่คุณภาพดีที่สุด ลดอันตรายที่อาจเกิดจากสิ่งปลอมปน นอกจากนี้ควรคัดเอาดิน หิน ทรายหรือเศษหญ้าอื่น ๆ ที่ปนที่มองเห็นด้วยตาเปล่าออกด้วย

1.2.2 การทำความสะอาด หลังจากการเก็บเกี่ยวและคัดเลือกสิ่งแปลกปลอมที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าแล้ว ต้องมีการทำความสะอาดเพิ่มเติม เพื่อลดสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ อันได้แก่ ฝุ่น เชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อรา แบคทีเรีย ซึ่งพบปนเปื้อนในสมุนไพรได้ค่อนข้างบ่อย และสารพิษตกค้างอื่น ๆ เช่น ยาฆ่าแมลง โลหะหนักต่าง ๆ ยาฆ่าหญ้า เป็นต้น ให้น้อยลงให้อยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยต่อผู้ป่วย วิธีที่เลือกในการทำความสะอาดพืชสมุนไพรนั้นขึ้นอยู่กับชนิดสมุนไพรนั้น ๆ โดยมีหลักดังนี้

1.2.2.1 ถ้าจะล้างสมุนไพรแห้ง ต้องรองด้วยตะแกรง เนื่องจากสมุนไพรจะเปราะและแตกง่าย

1.2.2.2 ไม่ควรแช่สมุนไพรในน้ำนาน เนื่องจากอาจทำให้สูญเสียสารบางอย่างที่ละลายน้ำได้

1.2.2.3 สมุนไพรบางชนิดไม่สามารถล้างด้วยน้ำสะอาดได้ เช่น ดอกที่ร่วงง่าย ผลหรือเมล็ดบางชนิด จะใช้วิธีการเช็ดด้วยผ้าสะอาดแทน

1.2.2.4 ส่วนสมุนไพรที่เป็นลำต้นหรือรากที่ไว้สะสมอาหาร หรือผลบางชนิด ควรนำไปนึ่งหรือลวกก่อนที่จะทำให้แห้ง เพื่อป้องกันเชื้อราและทำให้เก็บได้นานขึ้น นอกจากนี้ความร้อนยังไปช่วยสลายเอนไซม์ที่จะไปเร่งให้เกิดการทำลายสารสำคัญในพืชสมุนไพรได้

1.2.3 การลดขนาดสมุนไพร ในสมุนไพรที่มีขนาดใหญ่ หนาหรือมีเนื้อแข็ง จำเป็นต้องลดขนาดเพื่อให้ทำให้แห้งได้ง่ายขึ้นและง่ายต่อการเก็บรักษาด้วย เช่นส่วนราก หัว เปลือก ผล จะลดขนาดโดยวิธีการฝานบาง ส่วนสมุนไพรที่ต้องการทำให้เป็นลง อาจจะลดขนาดโดยหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ หนาประมาณ 0.4 มม. กว้างและยาวประมาณ 1.5 ซม. เพื่อให้บดง่ายขึ้น โดยการลดขนาดนั้นควรทำบนถาดรองที่สะอาด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเพิ่มเติม

1.2.4 การทำให้แห้ง สมุนไพรถ้าชื้นมากเกินไป จะทำให้แบคทีเรียและเชื้อราเจริญได้ง่าย และเร่งให้สารสำคัญในสมุนไพรประสิทธิภาพลดลง จึงต้องทำให้แห้งด้วยวิธีคือ

1.2.4.1 การตาก อาจจะตากในร่มหรือแดด ขึ้นกับชนิดสมุนไพร

1.2.4.2 การอบ ควรเลือกใช้ตู้อบที่มีพัดลมระบายอากาศด้วย โดยควรเลือกอุณหภูมิให้เหมาะสม เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของสารสำคัญในสมุนไพร ในดอก ใบและพืชล้มลุกทั่วไปใช้อุณหภูมิที่ประมาณ 35 – 45°ซ เปลือกต้น เนื้อไม้ รากและเปลือกขนาดใหญ่ อบที่อุณหภูมิประมาณ 40 – 60°ซ ผล (ควรฝานแล้ว) และเมล็ด อบที่อุณหภูมิประมาณ 70 – 80°ซ

1.2.4.3 การผึ่งในที่ร่ม เหมาะกับสมุนไพรที่มีสารระเหย

1.3 การเก็บรักษาสมุนไพร[72, 73]

การเก็บรักษาสมุนไพรต้องเก็บให้ถูกวิธี เพื่อป้องกันเชื้อรา หนอน สี กลิ่น ลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนไปทำให้คุณภาพของสมุนไพรต่ำลง ส่งผลให้ฤทธิ์การรักษาลดลง ซึ่งวิธีในการเก็บรักษามีดังนี้

1.3.1 ต้องทำให้สมุนไพรที่จะเก็บรักษาแห้ง ดังที่กล่าวไปแล้ว

1.3.2 สถานที่เก็บต้องแห้ง เย็นและอากาศถ่ายเทได้ดี ใส่ในภาชนะที่สะอาด

1.3.3 ควรแบ่งสมุนไพรออกเป็นสัดส่วน แบ่งเป็นชนิด มีการติดชื่อชนิดและวันที่ที่เก็บแยกให้ชัดเจนเพื่อลดการสับสนในการหยิบใช้สมุนไพร เช่นสมุนไพรที่มีพิษ สมุนไพรที่มีกลิ่นหอม เป็นต้น และง่ายต่อการหยิบใช้

1.3.4 สมุนไพรที่มีกลิ่นหอมหรือระเหยง่าย ควรเก็บในภาชนะปิดและภาชนะที่ไม่ดูดกลิ่น

1.3.5 ป้องกันไฟ หนอน หนู แมลงต่าง ๆ

1.3.6 โดยทั่วไปสมุนไพรไม่ควรเก็บนานเกิน 2 ปี เนื่องจากฤทธิ์สมุนไพรอาจเปลี่ยนแปลงไปได้

2.การแตกย่อยเนื้อเยื่อของสมุนไพร[70]

เป็นขบวนการเพื่อทำให้เนื้อเยื่อของพืชมีขนาดเล็ก เพื่อทำให้การสกัดสารจากพืชง่ายและได้ผลดี ซึ่งมีหลายวิธี

2.1 Mechanical method เป็นวิธีการบดที่อาศัยโกร่ง (ที่บดยา) แต่ในทางอุตสาหกรรมจะไม่เหมาะเนื่องจากต้องใช้บดสารจำนวนมาก จึงต้องอาศัยเครื่องมือที่เหมาะสม ได้แก่

2.1.1 สมุนไพรแห้ง โดยบดด้วยเครื่องบดชนิด driven hammer mill เมื่อบดแล้วนำมาแร่ง (sieve) ด้วยตะแกรง เพื่อให้ได้ขนาดที่ต้องการ การบดด้วยวิธีนี้อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลลูโลสและโปรตีน เกิด millard reaction ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่าง reduce sugar และโปรตีน ได้สารประกอบเชิงซ้อนซึ่งแยกหรือ hydrolyse ได้ยาก และชิ้นส่วนบางส่วนของเครื่องบดหลุดไปปนกับสมุนไพร เพราะฉะนั้นส่วนที่ทำการบดควรทำจากแก้ว ceramic หรือ agate

2.1.2 สมุนไพรสด อาจทำได้โดยหั่น (slicing) โดยใช้มีดหรือบดด้วยเครื่องบดเนื้อ อาจต้องใส่ทรายหรือ alumina ผสมเพื่อให้บดง่ายและละเอียดขึ้น

2.1.3 Dilute suspension ใช้ waring blender, sonic และ supersonic vibration เขย่ากับทราย

2.2 Enzymatic disintegration เป็นวิธีการย่อยโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

2.3 Chemical disintegration เป็นวิธีการย่อยด้วยสารเคมี

3.การสกัดสมุนไพร[69-71, 74]

การสกัดสามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลาย ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน ได้แก่

3.1 การสกัดแบบหมัก (maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด ทิ้งไว้ประมาณ 7 วัน โดยเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึง

รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (marc) ให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง ซึ่งการสกัดวิธีนี้จะสกัดให้หมดจด (exhausted) อาจจะต้องสกัดซ้ำ ๆ หลายครั้ง

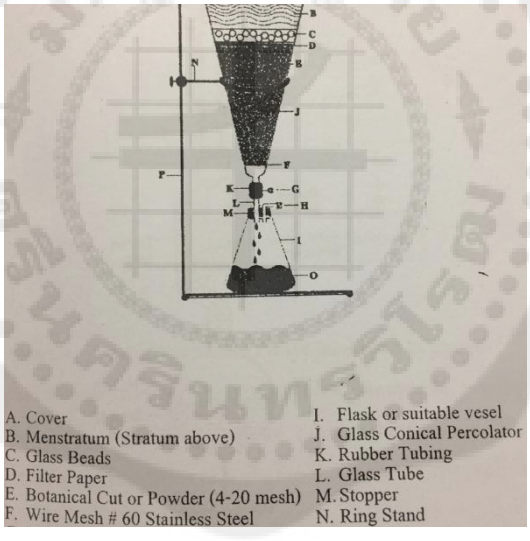
ข้อดี คือ สารสำคัญจะไม่ถูกความร้อน

ข้อเสีย คือ สิ้นเปลืองตัวทำละลาย

3.2 การสกัดแบบไหลผ่าน (percolation) เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า percolator ดังภาพประกอบที่ 12 นำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายให้พอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชม. เพื่อให้พองตัวเต็มที่ แล้วบรรจุผงยาทีละชั้นลงไปใน percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงกว่าสมุนไพรประมาณ 0.5 ซม. (solvent head) ทิ้งไว้ 24 ชม. จึงรินเอาสารสกัดออก โดยระหว่างที่รินออกต้องคอยเติมตัวทำละลายให้สูงเหนือสมุนไพร อย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดออกมาจนสมบูรณ์และบีบกากเพื่อนำสารสกัดออกให้มากที่สุด หลังจากนั้นนำไปกรอง

ข้อดี คือ สารสำคัญไม่ถูกความร้อน

ข้อเสีย คือ สิ้นเปลืองตัวทำละลาย



ภาพประกอบ 12 Percolator[69]

3.3 การสกัดแบบชง (infusion) เป็นวิธีการที่แช่สมุนไพรลงบนตัวทำละลายในระยะเวลาสั้น ๆ โดยที่ตัวทำละลายสามารถใช้ได้ทั้งรูปแบบเย็นหรือร้อน

ข้อดี คือ ใช้เวลาในการสกัดสั้น

ข้อเสีย คือ สารที่สกัดได้จะมีความเข้มข้นต่ำ

3.4 การสกัดด้วยการต้ม (decogtions) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญที่ละลายน้ำและทนต่อความร้อน ใช้เวลาต้มประมาณ 15 นาทีโดยส่วนใหญ่ การสกัดด้วยวิธีนี้ควรมีการใส่สารกันเสียหรือแช่แข็งเพื่อป้องกันจุลินทรีย์

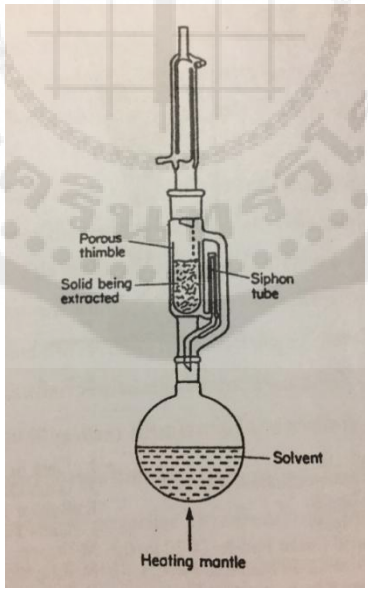
ข้อดี คือ ใช้เวลาน้อยในการสกัด ทำได้ง่าย

ข้อเสีย คือ สารสำคัญที่ไม่ทนต่อความร้อนอาจสลายไป สารสกัดชนิดนี้มีอายุสั้นจึงต้องมีการเตรียมใหม่ทุกครั้งถ้าจำเป็นต้องใช้สารสำคัญ

3.5 การสกัดด้วย soxhlet extractor เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง ดังภาพประกอบที่ 13 โดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ ซึ่งการสกัดจะอาศัยความร้อนทำให้ตัวทำละลายที่อยู่ใน flask (ภาชนะที่บรรจุตัวทำละลาย) ระเหยขึ้นไปด้านบน แล้วกลั่นตัวลงมาใน thimble ที่บรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับหนึ่ง จะเกิดกาลักน้ำขึ้น สารสกัดจะไหลกลับลงมาสู่ flask ขณะที่ flask ได้รับความร้อนไปเรื่อย ๆ จากหม้ออังไอน้ำ (heating mantle) ตัวทำละลายจะระเหยขึ้นไปด้านบน เหลือสารสกัดอยู่ใน flask เมื่อตัวทำละลายกระทบ condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ เป็นวงจรเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งได้สารสกัดที่สมบูรณ์

ข้อดี คือ ประหยัดตัวทำละลาย

ข้อเสีย คือ สมุนไพรจะโดนความร้อน อาจทำให้สารสำคัญบางอย่างสลายไปได้



ภาพประกอบ 13 Soxhlet extractor[69]

3.6 การสกัดด้วย Liquid – liquid extractor เป็นวิธีการสกัดสารละลายที่เป็นของเหลว ดังภาพประกอบที่ 14 โดยใส่สารละลายนั้นลงไปในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ผสมกับสารละลายชนิดแรก แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

3.6.1 Extractant lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

3.6.2 Raffinate lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

ข้อดี คือ ใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อยและการสกัดได้ประสิทธิภาพดี

ข้อเสีย คือ ใช้เวลาสกัดนาน สารที่ระเหยง่ายอาจสูญเสียระหว่างการสกัดและสาระสำคัญบางตัวอาจสลายไป เนื่องจากใช้ความร้อน

3.7 การสกัดด้วยใช้เครื่องคลื่นเหนือเสียง (ultrasound extraction) เป็นวิธีที่สกัดด้วยคลื่นความถี่ช่วง 20 – 2,000 กิโลเฮิร์ท ซึ่งจะช่วยให้ตัวทำละลายซึมผ่านเซลล์ของสมุนไพรได้ดีขึ้น พร้อม ๆ กับเป็นการสลายฟองอากาศในสมุนไพรด้วย ซึ่งการสลายฟองก๊าซในสมุนไพรเป็นการดึงสารที่อยู่ภายในสมุนไพรมาสัมผัสกับตัวทำละลายง่ายขึ้น

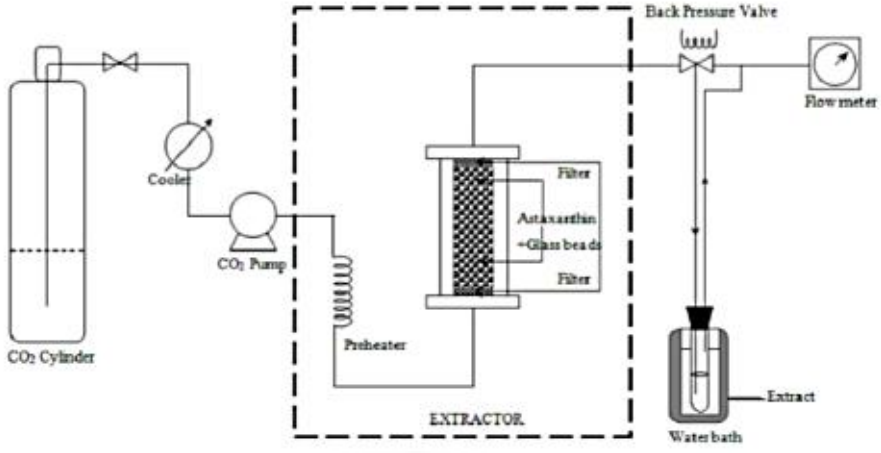
ข้อดี คือ ใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้น ง่ายในการดำเนินการ ลดการใช้ตัวทำละลายสกัดสารสำคัญได้ปริมาณมากและไม่สิ้นเปลืองพลังงาน

ข้อเสีย คือ สารสำคัญบางตัวอาจจะสลายเนื่องจากวิธีการสกัดนี้ใช้ความร้อน

3.8 การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะยิ่งยวด (supercritical fluid extraction) ภาพประกอบที่ 14 เป็นวิธีการสกัดที่ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวที่ปรับอุณหภูมิและความดันให้อยู่ในสภาวะยิ่งยวด (supercritical) ที่ 31.1°ซ ความดันบรรยากาศ 73.8 บรรยากาศ ในสภาวะนี้คาร์บอนไดออกไซด์จะแพร่กระจายน้อยกว่าในสภาวะก๊าซแต่หนืดน้อยกว่าสภาวะของเหลว ทำให้สกัดสารที่ไม่มีขั้วได้ดี เช่น น้ำมันหอมระเหย

ข้อดี คือ สกัดสารที่ไม่มีขั้วได้ดี ไม่ต้องผ่านความร้อนทำให้ไม่สูญเสียสารสำคัญในพืช ใช้เวลาในการสกัดน้อย รวดเร็วและไม่ใช้สารเคมีที่เป็นพิษ

ข้อเสีย คือ ราคาแพง



ภาพประกอบ 14 การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะยิ่งยวด[74]

4.หลักเกณฑ์ในการเลือกตัวทำละลาย[73] การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรจะได้ผลดีหรือไม่ขึ้นกับการเลือกตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

4.1 ต้องเป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี คือมีค่าการละลายหรือค่าความสามารถในการละลายที่ใกล้เคียงกัน

4.2 ตัวทำละลายนั้นควรละลายสารสำคัญที่ต้องการออกมามากที่สุด ส่วนสารที่ไม่ต้องการให้ออกมาน้อยที่สุด (selectivity)

4.3 เป็นตัวทำละลายที่ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

4.4 ตัวทำละลายที่เลือกต้องไม่ทำปฏิกริยากับสารสกัดที่ต้องการ

4.5 ตัวทำละลายต้องไม่เป็นพิษหรือก่อให้เกิดพิษ

4.6 ราคาสมเหตุสมผลและหาได้ง่าย

5.ตัวทำละลายที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดสารสำคัญสมุนไพร[73] ได้แก่

5.1 เฮกเซน (hexane) เหมาะในการสกัดสารสำคัญที่ไม่มีขั้ว มักใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับกำจัดไขมันจากสมุนไพร ข้อดีของสารนี้คือราคาถูก

5.2 อีเธอร์ (ether) เป็นตัวทำละลายที่มีอำนาจในการละลายน้อยกว่าคลอโรฟอร์ม (chloroform) แต่มีความจำเพาะในการสกัด (selectivity) มากกว่าคลอโรฟอร์ม ข้อเสียของตัวทำละลายนี้คือ ระเหยง่าย เกิด oxide ได้ง่าย ดูดน้ำได้มากและระเบิดง่าย

5.3 คลอโรฟอร์ม (chloroform) เป็นตัวทำละลายที่ดี แต่มีข้อเสียคือ selectivity น้อย เกิดสารละลาย 2 ตัวผสมกันง่าย (emulsion) และถ้าใช้สกัดสารที่เป็นด่างแก่อาจทำให้สารแยกออกเป็นกรดเกลือ (decompose)

5.4 แอลกอฮอล์ (alcohol) ตัวทำละลายในกลุ่มนี้ที่ใช้มากคือ เมธานอล (methanol) หรือเอธานอล (ethanol) มีความสามารถในการละลายกว้างมากและสามารถใช้ทำลายเอนไซม์ในพืชสมุนไพรได้ จึงเป็นตัวทำละลายชนิดที่เลือกได้ทั่วไป (all propose solvent)

6.การพัฒนายาจากสมุนไพร[68]

ปัจจุบันมีการผลิตยาที่ทำจากสมุนไพรมาใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งคณะกรรมการอาหารและยา ได้แบ่งประเภทยาจากสมุนไพรออกเป็น 4 ประเภท

6.1 ยาแผนโบราณ (traditional drugs) หมายถึง ยาสมุนไพรที่ได้จากสมุนไพรที่มีข้อบ่งชี้ สรรพคุณ ขนาดและวิธีการใช้เป็นไปตามองค์ความรู้ที่สืบทอดกันมา

6.2 ยาจากสมุนไพรแผนโบราณ (modified traditional drugs) หมายถึง ยาสมุนไพรที่มีข้อบ่งใช้ สรรพคุณ ขนาด และวิธีการใช้ที่เป็นไปตามองค์ความรู้ที่สืบทอดกันมา แต่มีการพัฒนารูปแบบ (dosage form) ไปจากเดิม ยาในกลุ่มนี้จัดเป็นยาแผนโบราณ

6.3 ยาจากสมุรไพรแผนปัจจุบัน (herbal medicine) หมายถึง ยาสมุนไพรที่ได้จากการวิจัยและพัฒนาด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ มีตัวยาสำคัญอยู่ในลักษณะสารกึ่งสังเคราะห์ (semipurified compounds) ยากลุ่มนี้จัดเป็นยาแผนปัจจุบัน

6.4 ยาแผนปัจจุบันที่เป็นยาใหม่ (new drugs) หมายถึง เป็นยาจากสมุนไพรที่ได้วิจัยและพัฒนาด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์จนได้ตัวยาสำคัญที่อยู่ในลักษณะสารประกอบบริสุทธิ์ (purified compounds) ที่ทราบสูตรโครงสร้างที่ชัดเจน ยากลุ่มนี้จัดเป็นยาแผนปัจจุบัน

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ (Antibiotic Susceptibility Testing)[75-82]

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพเป็นการทดสอบว่ายานั้นสามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพหรือการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพนั้นได้หรือไม่ ซึ่งวิธีที่เป็นมาตรฐานมีดังนี้ dilution method, diffusion method และ antimicrobial gradient test

1.Dilution method เป็นวิธีการทดสอบความไวเชื้อโดยดูจากความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยาหรือสารนั้นจะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนั้นได้ (minimal inhibitory concentration/MIC) หลักการคือยาจะถูกเจือจางครั้งละสองเท่า (two-folded serial dilution) ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะได้ความเข้มข้นที่

ต่างกัน หลังจากนั้นจะทำการใส่เชื้อลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาอยู่ ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้คือ ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่เห็นการเจริญของเชื้อ โดยความเข้มข้นที่ใช้จะแตกต่างกันขึ้นกับยาหรือสารและชนิดของเชื้อที่นำมาทดสอบ วิธีนี้สามารถแปลผลได้ 2 แบบคือ ผลเชิงคุณภาพ (qualitative) เช่นเชื้อที่ทดสอบมีความไวต่อยา (susceptible) ไวต่อยาปานกลาง (intermediate) หรือดื้อยา (resistant) และผลเชิงปริมาณ (quantitative) เช่น MIC ซึ่ง dilutional method ทำได้ 2 วิธี

1.1 Agar dilution เป็นวิธีที่นำยาที่ต้องการทดสอบมาผสมในวุ้น (agar) และใส่ในจาน ซึ่งจะผสมยาในวุ้นที่หลายความเข้มข้น หลังจากนั้นนำเชื้อที่ต้องการทดสอบมา 10^4 CFU/ml มาป้ายเป็นจุดลงบนจานที่มีวุ้นผสมยา หลังจากนั้นรอจนครบกำหนดเวลาการเจริญของเชื้อ ความเข้มข้นของยาที่ต่ำที่สุดที่เชื้อไม่เจริญเติบโตคือค่า minimal inhibitory concentration

ข้อดี คือ เป็นวิธีที่ได้การยอมรับให้เป็นมาตรฐานในการหาค่าความสามารถของยาที่จะยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ และเป็นวิธีที่ใช้เป็นมาตรฐานในประเทศแถบยุโรป นอกจากนี้วิธีนี้ยังสามารถทำกับเชื้อหลาย ๆ เชื้อไปพร้อมกันใน 1 จานเลี้ยงเชื้อได้และสามารถสังเกตการปนเปื้อนได้

ข้อเสีย คือ ใช้เวลามากและขั้นตอนในการเตรียม agar ค่อนข้างยุ่งยาก ต้องใช้บุคลากรที่มีความรู้ความสามารถเยอะ ไม่สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimum Bactericidal Concentration/MBC)

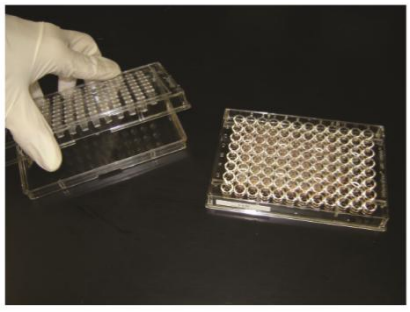
1.2 Broth dilution แบ่งออกเป็นอีก 2 วิธี

1.2.1 Broth macrodilution เป็นวิธีที่จะเจือจางยาลงในของเหลวที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง โดยแต่ละหลอดจะมีปริมาณของเหลวเลี้ยงเชื้อ 1 มล. จากนั้นจะใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปในหลอดทดลองปริมาณ 1–5 x 10^5 CFU/mL และทิ้งไว้ตามเวลาของเชื้อ แปลผลโดยดูว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้คือค่า MIC ซึ่งการแปลผลมีความคลาดเคลื่อนสูง จึงไม่เป็นที่นิยมใช้

1.2.2 Broth microdilution ดัดแปลงมาจาก broth macrodilution แต่มาทำในถาดหลุม 96 ช่อง (96-well plate) และใส่ของเหลวเลี้ยงเชื้อในแต่ละหลุมเพียง 0.1 มล ดังภาพประกอบที่ 15 สำหรับยาที่จะนำมาทดสอบสามารถหาซื้อได้ง่าย ข้อดีของวิธีนี้คือทำง่าย ราคาถูก ไม่ยุ่งยาก ทำให้ในห้องทดลองนิยมใช้วิธีนี้กันมาก

ข้อดีของทั้งสองวิธี คือ สามารถหาค่า MIC และค่า MBC ได้และให้ผลที่น่าเชื่อถือ

ข้อเสีย คือ ไม่สามารถสังเกตการณ์ปนเปื้อนได้

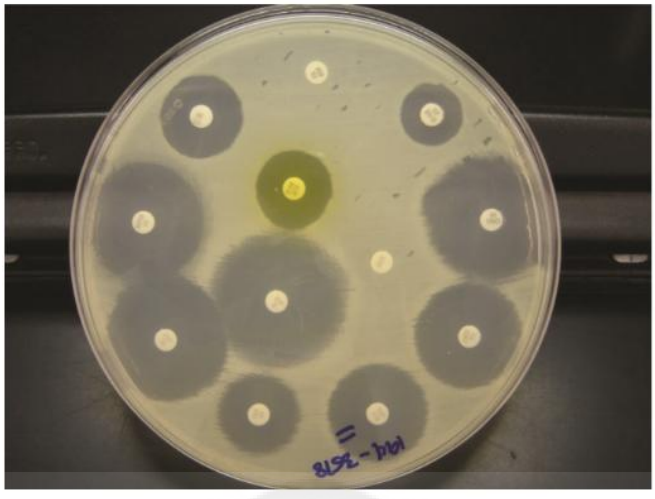


ภาพประกอบ 15 96-well plate ในการทำ broth microdilution[83]

2.Diffusion method เป็นวิธีการทดสอบที่ง่ายและใช้บ่อยในทางปฏิบัติ อาศัยหลักการแพร่ของยาออกจากภาชนะบรรจุยา เช่นหลุมที่เจาะลงในอาหารวุ้น (well) ถ้วยทรงกระบอก (cylinder cup) เม็ดยา (tablet) หรือกระดาษกรองวงกลม (filter paper-disc) เข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีเชื้อที่ต้องการทดสอบอยู่ ในขณะที่ยาแพร่เข้าไปในอาหารวุ้น แบคทีเรียที่อยู่ในอาหารวุ้นและไม่ถูกยับยั้งด้วยยาจะแบ่งตัวจนทำให้เชื้อเจริญเต็มพื้นที่ ส่วนบริเวณที่ถูกยายับยั้งจะไม่มีการเจริญของเชื้อจึงมองเห็นเป็นวงใส (inhibition zone) โดยขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสรอบภาชนะบรรจุยาที่ได้ จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบ

ข้อดี คือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว แปลผลง่าย ราคาไม่แพง

ข้อเสีย คือ บอกได้เป็นค่าคุณภาพ ไม่สามารถบอกเป็นค่าเชิงปริมาณได้เช่น MIC และไม่สามารถหาค่า MBC ได้ วิธีนี้สามารถใช้ได้กับเชื้อและยาบางชนิด



ภาพประกอบ 16 Disk-diffusion method ซึ่งมีวงใสที่เรียกว่า inhibition zone[83]

3.Antimicrobial gradient (E test) เป็นวิธีการที่รวม dilution และ diffusion เข้าด้วยกัน เป็นการวัดค่าเชิงปริมาณ วิธีการคือใช้อาหารวุ้นที่มีเชื้อความเข้มข้น 1-2 x 10^8 CFU/mL แล้วนำแผ่นพลาสติกที่เคลือบผงยาไว้มาวางบนอาหารวุ้น หลังจากนั้นทิ้งไว้ตามเวลาที่กำหนด แล้วมาอ่านผลโดยอ่านที่จุดตัดระหว่างวงใสกับค่าตัวเลข MIC บนผ่าพลาสติก ค่าที่ได้คือค่า MIC ของยานั้น ดังภาพประกอบที่ 17

ข้อดี คือ มีความแม่นยำสูง บอกค่า MIC ได้ และค่าที่ได้สอดคล้องไปกับ agar และ broth dilution test และเป็นวิธีเดียวในการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ได้รับการรับรองโดยองค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (USFDA)

ข้อเสีย คือ ราคาแพง

ภาพประกอบ 17 Antimicrobial gradient[83]

คำนิยามของ minimal inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC) **และ** minimal inhibition zone (MIZ)

1.Minimal inhibitory concentration (MIC)

หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ซึ่งหน่วยที่ใช้คือ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร

ค่า MIC สามารถนำไปใช้เปรียบเทียบดูความไวของเชื้อที่ทดสอบต่อยาต้านแบคทีเรีย ซึ่งวิธีทดสอบที่นิยมใช้มากที่สุดคือ broth dilution test

2.Minimal bactericidal concentration (MBC)

หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่นำมาทดสอบที่สามารถฆ่าเชื้อได้ร้อยละ 99.99 โดยทั่วไปใช้หน่วยคือ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร ปกติจะจำเป็นต้องหาค่านี้ในโรคที่เป็นแบบฉับพลันและถึงแก่ชีวิต โดยที่ต้องอาศัยยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโดยตรง

3.Minimal inhibition zone (MIZ)

หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ โดยวัดเป็นมิลลิเมตร

ปัจจัยที่อาจส่งผลต่อคุณภาพของการทดสอบความไวของยาต่อเชื้อแบคทีเรีย[80, 82, 83]

1.อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ (growth media) องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงนั้นมีหลายชนิด ซึ่งสามารถส่งผลต่อการทดสอบได้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีจะทำให้เชื้อทุกชนิดเจริญได้ ต้องมีความเป็นกรดและด่าง (pH) ที่เหมาะสม มีความเหมาะสมของประจุบวก (cation) เช่น ความเข้มข้นของแคลเซียม (Ca^{2+}) และแมกนีเซียม (Mg^{2+}) เพราะระดับของประจุบวกมีความสำคัญต่อการผ่านของยาทางเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อเพื่อเข้าไปออกฤทธิ์ภายในเซลล์ ถ้าหากประจุบวกต่ำเกินไป ยาจะผ่านเข้าเซลล์ของเชื้อได้ง่ายขึ้น จะพบว่าเชื้อจะไวต่อยาเกินความเป็นจริง อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในการทดสอบความไวของยา ได้แก่ Mueller Hinton broth ถ้าทดสอบแบคทีเรียที่เจริญยากจะนิยมใช้ Brain heart infusion broth หรือ Brucella broth ถ้าหากทำการทดสอบด้วยวิธี agar diffusion test ต้องคำนึงถึงความหนาของวุ้นอาหารที่ใช้ด้วย ให้อยู่ในความหนามาตรฐาน (ประมาณ 4 มม.) หากอาหารเพาะเลี้ยงมีวุ้นอาหารหนาน้อยเกินไป วงใสของการยับยั้งอาจกว้างเกินจริงทำให้แปลผลผิดพลาดได้

2.อุณหภูมิ (temperature) และ บรรยากาศ (atmosphere) การบ่มเชื้อที่ทำการทดสอบควรทำในอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อนั้น ๆ และบ่มในบรรยากาศที่ไม่มีก๊าซ

คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สามารถรวมกับน้ำ (H_2O) บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเกิดเป็นกรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) ซึ่งจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกรดมากขึ้น และอาจส่งผลให้การออกฤทธิ์ของยาบางอย่างเปลี่ยนแปลงไป

3.ปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบ (inoculum) หากใส่เชื้อปริมาณน้อยไป ความสามารถในการต้านยาหรือดื้อยาอาจจะไม่ชัดเจน และพบว่าเชื้อจะไวต่อยาเกินจริง แต่ถ้าหากใช้เชื้อมากเกินไป อาจพบว่าเชื้อดื้อต่อยาเกินความเป็นจริง

4.ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ (incubation period) แตกต่างกันในแต่ละเชื้อ ซึ่งมีผลต่อการแปลผลความไวของยา โดยทั่วไปควรบ่มเชื้อเป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง ยกเว้นในเชื้อที่เจริญช้าอาจต้องใช้เวลานานถึง 48 ชั่วโมง ในการทดสอบความไวต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียบางชนิดอาจมีข้อกำหนดที่จำเพาะ เช่น การทดสอบความไวยา vancomycin สำหรับเชื้อ *Enterococcus* spp. ควรบ่มเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เนื่องจากเชื้อที่ดื้อยาจะมีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ

สาเหตุของการเกิดความคลาดเคลื่อนในการทดสอบ[80, 82, 83]

มีได้หลายสาเหตุ ได้แก่

1.ข้อผิดพลาดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ เช่น ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันในแต่ละรุ่น แต่ละบริษัท พบว่ามีความแตกต่างกันในรายละเอียด แม้จะใช้สำหรับเชื้อชนิดเดียวกัน หรือไม่ได้เตรียมอาหารตามวิธีที่กำหนด

2.ข้อจำกัดของการทดสอบแต่ละวิธีที่มีต่อเชื้อบางชนิด เช่น diffusion method เหมาะกับเชื้อที่โตเร็วและมีอัตราการโตคงที่ในแต่ละ batch

3.ส่วนประกอบต่าง ๆ ของระบบการทดสอบ เช่น สภาวะแวดล้อมในการเก็บยาและเชื้อต้องมีความเหมาะสม

4.ขั้นตอนการทดสอบไม่ถูกต้อง เช่น เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเชื้อ การเตรียมสารละลายเชื้อที่จะใช้ทดสอบ (inoculum preparation) การอ่านค่า การแปลผล เป็นต้น

7. สมุนไพรไทยที่จะนำมาทดสอบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes*

จากปัญหาที่มีการใช้ยาทาปฏิชีวนะในการรักษาสิวอักเสบ ไม่ว่าจะเป็นคลินดามัยซิน, อิรีโทรมัยซิน หรืออื่น ๆ ทำให้พบว่าเกิดเชื้อแบคทีเรีย Propionibacterium acnes ดื้อยาเพิ่มขึ้นในหลายประเทศทั่วโลกและรวมถึงประเทศไทย จึงมีการหาการรักษาทางเลือกอื่น ๆ ที่จะนำมาใช้รักษาสิวอักเสบแทนยาทาปฏิชีวนะ จึงนำมาสู่การหาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและมีฤทธิ์ต้านเชื้อ

แบคทีเรีย แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อ *Propionibacterium acnes* ในห้องทดลอง ดังการทบทวนวรรณกรรมดังตาราง 1

ตาราง 1 สรุปการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวกับการนำพืชสมุนไพรมาศึกษาในห้องทดลอง เพื่อดูความสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย

Author	Journal / Year	Plants	Details
Masanori Kuroyanagi, et al.[84]	Journal of Natural Products 1999	*Sophora flavescens* (โสมรสขม)	มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* โดยดูจากค่า MIC
ปัทมาวดี เสตะกัณณะ, et al.[85]	วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2002	ใช้พืชในประเทศไทยทั้งหมด 20 ชนิดมาทดสอบ	พบว่ามีพืช 9 จาก 20 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยดูจากค่า MIC **ไม่ทดสอบกับ *P. acnes*
A. Jain, et al.[86]	Phytomedicine 2003	ใช้พืชในประเทศอินเดียทั้งหมด 6 ชนิดมาทดสอบ	พบว่ามีฤทธิ์ลดการสร้าง cytokine และ reactive oxygen species ต่อ *P. acnes*
Mullika Traidej, et al.[87]	Journal of Ethnopharmacology 2005	ใช้พืชในประเทศไทยทั้งหมด 19 ชนิดมาทดสอบ	มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* ทั้งหมด โดยดูจากค่า MIC
Fadi Qa'dan, et al.[88]	The American Journal of Chinese Medicine 2005	*Psidium guajava* (ฝรั่ง), *Juglans regia* (วอลนัต)	มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes*, *Staphylococci* spp. ทั้งหมด โดยใช้ inhibition zone ซึ่งทั้ง 2 ชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดีกว่า tea-tree oil

ตาราง 1 (ต่อ)

Author	Journal / Year	Plants	Details
J. Viyoch, et al.[89]	International Journal of Cosmetic Science 2006	น้ำมันหอมระเหยจาก *Ocimum basilicum L.* (ใบโหระพา), *Ocimum sanctum L.* (ใบกะเพรา), *Ocimum canum* (ใบแมงลัก)	มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* ทั้งหมด โดยดูจากค่า MIC
S.Weckesser, et al.[90]	Phytomedicine 2007	ใช้พืช 9 ชนิดของต่างประเทศมาทดสอบ	มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดรวมถึง *P. acnes* ด้วย โดยดูจากค่า MIC, MBC
Young-Hee Lim, et al.[91]	The Journal of Microbiology 2007	*Impatiens balsamina* (เทียนดอก)	มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* ทั้งที่ไม่ดื้อยาและดื้อต่อคลินดามัยซินเมื่อใช้ร่วมกับยาทาปฏิชีวนะ โดยดูจากค่า MIC, MBC
Tsung-Hsein Tsai, et al.[92]	Food Chemistry 2010	ใช้พืช 9 ชนิดของประเทศจีนมาทดสอบ	มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* ทั้งหมด 3 ชนิด โดยดูจากค่า MIC และทดสอบการยับยั้ง TNF-α, IL-1β, IL-8, MCP-1
พรเทพ เต็มรังสี[93]	วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ 2010	ใช้พืชในประเทศไทยทั้งหมด 5 ชนิดมาทดสอบ	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, MRSA, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* จากโรงพยาบาลและเชื้อมาตรฐานอีก 3 ชนิด คือ *S. aureus, P. aeruginosa, E. coli* โดยดูจากค่า MIC, MBC **ไม่ทดสอบกับ *P. acnes*

ตาราง 1 (ต่อ)

Author	Journal / Year	Plants	Details
Pharkphoom Panichayupakaranant, et al.[94]	Pharmaceutical Biology 2010	ใช้พืชในประเทศไทยทั้งหมด 18 ชนิดมาทดสอบ	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes, S. aureus, S. epidermidis* โดยมีทั้งหมด 9 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้าน *P. acnes* ซึ่งดูจากค่า MIC, MBC
Yuangang Zu, et al.[95]	Molecules 2010	ใช้น้ำมันหอมระเหย (essential oil) จากพืชทั้งหมด 10 ชนิด	มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* ทั้งหมด 3 ชนิด คือ thyme (ไทม์), cinnamon (อบเชย), rose (กุหลาบ) โดยดูจากค่า MIC, MBC
Werayut Pothitirat, et al.[96]	Pharmaceutical Biology 2010	*Garcinia mangostana Linn.* (มังคุด)	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes, S. epidermidis* ซึ่งพบว่าสามารถต้านเชื้อ *P. acnes* ได้ที่การสกัดด้วยร้อยละ 50 เอธานอล จะมีประสิทธิภาพสูงสุด และโดยดูจากค่า MIC, MBC
P. Puttarak, et al.[97]	Phytomedicine 2010	*Rhinacanthus nasutus* (ทองพันชั่ง)	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans, P. acnes, H. pylori, S. aureus, S. epidermidis, C. albicans* พบว่าทุกชนิดมีฤทธิ์ยับยั้ง *P. acnes* ซึ่งดูจากค่า MIC, MBC

ตาราง 1 (ต่อ)

Author	Journal / Year	Plants	Details
Werayut Pothitirat, et al.[98]	Med Princ Pract 2010	*Garcinia mangostana Linn.* (มังคุด)	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes, S. epidermidis* โดยดูว่าตัวทำละลายใดที่ทำให้มีฤทธิ์ต้านเชื้อดีที่สุด พบว่าตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) ทำให้มังคุดมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* ดีที่สุด โดยดูจากค่า MIC, MBC
Auttayaporn Chaichompoo, et al.[99]	การประชุมวิชาการครั้งที่ 8 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน 2011	ใช้พืชในประเทศไทยทั้งหมด 10 ชนิดมาทดสอบ	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli, P. acnes, P. aeruginosa, S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis* โดยมีพืช 3 ชนิด คือ *Aesculus Assamica* (มะเนียงน้ำ), *Dioscorea hispida* (กลอย), *Phyllantus acidus* (มะยม) มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* ซึ่งดูจากค่า MIC, MBC
Mei-Lin Tsai, et al.[100]	Biosci. Biotechnol. Biochem 2011	น้ำมันหอมระเหยจากพืช 6 ชนิด	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, P. acnes, P. ovale, C. albicans* พบว่าน้ำมันหอมระเหยทุกตัว ยกเว้น *Pelargoniium fragrans* มีฤทธิ์ต้าน *P. acnes* ดูจากค่า MIC

ตาราง 1 (ต่อ)

Author	Journal / Year	Plants	Details
Hanieh Azimi, et al.[101]	Fitoterapia 2012	ใช้พืช 81 ชนิดมาทดสอบ	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes, S. aureus, S. epidermidis* โดยมีทั้งหมด 46 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้าน *P. acnes* ซึ่งดูจากค่า MIC
Jongkon Saising, et al.[102]	Clinical microbiology 2012	*Rhodomyrtus tomentosa (Aiton) Hassk* (ให้ทะ)	มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* โดยดูจากค่า MIC, MBC เทียบกับอิรีโทรมัยซิน และวัด cytotoxic effect ด้วย ซึ่งพบว่ามีน้อยสามารถใช้เป็นยาทาได้
Xu-Jie Qin, et al.[103]	Steroids 2012	*Paris polyphylla var. yunnanensis* (สัตฤาษี)	มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* โดยดูจากค่า MIC
Richa Sharma, et al.[104]	BMC Complementary and Alternative Medicine 2013	*Syzygium jambos L. (Alston)* (ใบชมพู่น้ำดอกไม้)	มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* โดยดูจากค่า MIC และวัด cytotoxic effect ด้วย ซึ่งพบว่ามีน้อย
Sukanya Dej-adisai, et al.[105]	Archives of Pharmacal Research 2014	ใช้พืช 77 ชนิดมาทดสอบ	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes, S. aureus, S. epidermidis* โดยมีทั้งหมด 7 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้าน *P. acnes* ซึ่งดูจากค่า MIC, MBC
Nilesh Prakash Nirmal, et al.[106]	Pharmaceutical Biology 2014	*Caesalpinia sappan L.* (ฝาง)	มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* โดยดูจากค่า MIC, MBC

ตาราง 1 (ต่อ)

Author	Journal / Year	Plants	Details
Kanya Plangsom, et al[107]	Huachiew Chalermprakiet Science and Technology Journal 2015	*Houttuynia cordata Thunb.* (ใบพลูคาว), *Allium sativum* (หัวกระเทียม), *Amomum krervanh Pierre* (เมล็ดกระวาน)	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ Gram negative bacteria (*E. coli, P. aeruginosa, P. vulgaris, Klebsiella* sp., *V. cholera, V. parahaemolyticus, Salmonella* sp.) และ Gram positive bacteria (*B. cereus, B. subtilis*, *S. aureus*) โดยที่กระเทียมสามารถยับยั้งได้ 6 ชนิด พลูคาวยับยั้งได้ 3 ชนิด ส่วนกระวานยับยั้งไม่ได้ **ไม่ทดสอบกับ *P. acnes*
Sirivan Athikomkulchat, et al.[108]	Natural Product Communications 2015	*Croton oblongifolius* (เปล้าใหญ่)	มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* โดยดูจากค่า MIC
Teddy Léguillier, et al.[109]	PLoS ONE 2015	*Calophyllum inophyllum L.* (ต้นกระทิง)	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* และ *P. granulosum*, cytotoxicity, การสมานแผล พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* โดยดูจากค่า MIC และไม่ทำลายเซลล์

ตาราง 1 (ต่อ)

Author	Journal / Year	Plants	Details
Palanivel Velmurugan, et al.[110]	Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 2015	*Pinus densiflora* (สน)	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Brevibacterium linens, P. acnes, B. cereus, S. epidermidis* พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* โดยดูจากค่า inhibition zone
Catherine Feuillolay, et al.[111]	Phytomedicine 2016	*Myrtus communis* (ชมพู่)	มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* โดยไปทำลาย biofilm และดูจากค่า MIC, MBC
วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, et al.[112]	วารสาร มฉก. วิชาการ วิทยาศาสตร์สุขภาพ 2016	ใช้พืชในประเทศไทยทั้งหมด 10 ชนิดมาทดสอบ	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus, B. cereus, E. coli* โดยดูจากค่า MIC, MBC พบว่าพืชทั้ง 10 ชนิดสามารถต้าน *S. aureus* ได้ 7 ชนิดต้าน *B. cereus* และ 5 ชนิดต้าน *E. coli* **ไม่ทดสอบกับ *P. acnes*
Palanivel Sathishkumar, et al.[113]	Journal of Photochemistry & Photobiology 2016	*Coriandrum sativum* (ผักชี)	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes, M. furfiur* พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* โดยดูจากค่า MIC
Chia-Jung Lee, et al.[114]	International Journal of Molecular Sciences 2017	*Punica granatum* (ทับทิม)	ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes, S. aureus* พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* โดยดูจากค่า MIC, MBC

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีการนำพืชสมุนไพรหลายชนิดมาศึกษาในห้องทดลองเพื่อศึกษาว่าฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* และแบคทีเรียอื่น ๆ ได้หรือไม่ ในงานวิจัยนี้สนใจเชื้อ *P. acnes* เป็นหลัก ซึ่งพบว่ามีสมุนไพรหลายตัวที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ได้ แต่งานวิจัยส่วนใหญ่ที่ทบทวนมานั้นใช้ *P. acnes* ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ไม่ได้ทดสอบกับเชื้อ *P. acnes* ที่แยกจากคนไข้สิว จึงสนใจที่จะเลือกพืชสมุนไพรที่พบในประเทศไทยที่มีคุณสมบัติดีที่สุดมาทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ที่แยกมาจากคนไข้จริงจากการทำวิทยานิพนธ์ของ Laochunsuwan A.[9] ตาราง 2 ด้านล่างรวบรวมสารออกฤทธิ์ ผลข้างเคียง และแหล่งที่พบของสมุนไพรไทย

ตาราง 2 สรุปส่วนประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรไทยทั้งหมด 20 ชนิดสมุนไพร

สมุนไพร	**ส่วนที่นำมาใช้**	**ส่วนประกอบทางเคมี (Phytochemical constituents)**	**โทษ**	**แหล่งที่พบ**
1.***Allium sativum L.*** **(กระเทียม)** (94, 115)	กลีบ (cloves)	tannins, cardiac glycosides, saponins, alkaloids, flavonoids	Diallyldisulfide พบเป็นสารที่ทำให้เกิดผื่นแพ้สัมผัสได้ (allergic contact dermatitis)[116-118] และมีกลิ่นแรง	พบได้ทั่วทุกภาคในประเทศไทย
2.***Aloe vera*** **(ว่านหางจระเข้)**[119, 120]	ใบ (leaves)	tannin, saponin, flavonoids, terpenoids, anthraquinones, sterol, salicylic acid	พบผลข้างเคียงน้อย มีรายงานเกิดอาการไวต่อแดดง่าย (phototoxicity), ผื่นแพ้สัมผัส[121]	พบได้ทั่วทุกภาค เนื่องจากขึ้นง่ายในดินทราย
3.***Alpinia galanga (L.) Willd.*** **(ข่า)**[122]	เหง้า (rhizomes)	tannin, flavonoids (galangin, galangoisoflavonoid), phenols (gallic acid), terpenoids, sterol (β-sitosterol), essential oil	มีรายงานที่ทำให้เกิดผื่นแพ้สัมผัสแบบ non-eczematous (non-eczematous contact dermatitis)[123, 124]	พบได้หลายภาคในประเทศไทย ปลูกง่าย

ตาราง 2 (ต่อ)

สมุนไพร	ส่วนที่นำมาใช้	ส่วนประกอบทางเคมี (Phytochemical constituents)	โทษ	แหล่งที่พบ
4.*Barleria lupulina* (เสลดพังพอน)[125]	ใบ (leaves)	alkaloids (barlerin alkaloid), glycoside (iridoid glycosides), phenol, ester, steroid, terpenoid, flavonoid, tannin	มีงานวิจัยพบว่าเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ แต่ยังไม่พบเซลล์อื่น[125]	ถิ่นกำเนิดที่ประเทศมาเลเซีย พบได้ทุกภาคในประเทศไทย
5.*Caesalpinia sappan heartwoods* (ฝาง)[106, 126, 127]	ไม้ (wood)	brazilin (พบมากที่สุดในฝาง ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ได้หลายกลไก รวมถึงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านการอักเสบ), xanthone, coumarin, chalcones, flavonoids (flavones, homoisoflavonoids)	มีการทดสอบในหนูทดลองพบว่าไม่ก่อให้เกิดพิษทั้งในระยะเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลัน	พบได้ทุกภาคในประเทศไทย
6.*Curcuma longa Linn* (ขมิ้น)[128-130]	เหง้า (rhizomes)	flavonoids (curcumin พบมากที่สุดและมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระ), phenols, terpenoids, alkaloids, sterols, essential oils	พบว่าสามารถใช้กับผิวหนังมนุษย์ได้ ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง, มีงานวิจัยรายงานทำให้เกิดผื่นแพ้สัมผัสจากสาร (contact dermatitis) แต่เป็นจำนวนน้อย[131]	พบได้ทุกภาคในประเทศไทย

ตาราง 2 (ต่อ)

สมุนไพร	ส่วนที่นำมาใช้	ส่วนประกอบทางเคมี (Phytochemical constituents)	โทษ	แหล่งที่พบ
7.*Dioscorea membranacea Pierre* (ยอดข้าวเย็นใต้) (132, 133)	เหง้า (rhizomes)	naphthofuranoxepins, phenanthraquinone, steroids, steroid saponins	Naphthofuranoxepins, phenanthraquinone มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ จึงนำมารักษามะเร็ง แต่ยังต้องศึกษาเพิ่มเติม	พืชประจำถิ่นในประเทศจีน
8.*Eupatorium odoratum L.* (สาบเสือ)[134-136]	ใบ (leaves)	tannin, phytosterols, coumarin, quinone, cardiacglycosides, terpinoids, steroids, phenol, flavanoid	มีงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากสาบเสือทำลายสิ่งแวดล้อมได้ ถ้าถูกทิ้งในความเข้มข้นที่สูง จำเป็นต้องมีการลดความเข้มข้นก่อนทิ้งสู่สิ่งแวดล้อม[137]	พบได้ทั่วไปในประเทศไทยในพื้นที่รกร้าง
9.*Garcinia mangostana Linn.* (มังคุด)[138-141]	เปลือกผล (fruit peel)	xanthone derivatives (α-mangostin พบมากที่สุด ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านการอักเสบ), phenols, flavonoids, triterpenoids	มีการทดลองในหนูไม่พบว่าเป็นพิษทั้งในระยะเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลัน	พบมากที่ภาคกลาง, ใต้และตะวันออกของประเทศไทย

ตาราง 2 (ต่อ)

สมุนไพร	ส่วนที่นำมาใช้	ส่วนประกอบทางเคมี (Phytochemical constituents)	โทษ	แหล่งที่พบ
10.*Gynura pseudochina var. hispida Thwaites* (ว่านมหากาฬ)[142-144]	ใบ (leaves)	flavonoids (quercetin 3- rutinoside), ester (5-monocaffeoylquinic acid, 3,5-di-caffeoylquinic acid, 4,5-di-caffeoylquinic acid)	Pyrrolizidine alkaloids มีผลทำให้เกิดพิษต่อระบบทางเดินอาหารในรูปกิน แต่ไม่พบงานวิจัยในรูปทา	พบได้ทุกภาคในประเทศไทย
11.*Impatiens balsamina L.* (เทียนดอก)[145]	ใบ (leaves)	alkaloids, glycosides, phenol, flavonoids, saponins, steroid, tannins, triterpenes	มีงานวิจัยพบว่าเป็นพิษต่อพยาธิตัวกลม แต่ไม่มีรายงานต่อเซลล์ผิวหนัง[146]	พบได้ทุกภาคในประเทศไทย แต่พบไม่มาก
12.*Morinda citrifolia L.* (ยอ)[147-150]	ใบ (leaves)	iridoids, flavonoids, coumarin, 1-hydroxyanthraquinones, essential oils (vanillin, cinnamaldehyde), triterpenoids	งานวิจัยไม่พบว่าก่อให้เกิดอาการแพ้ต่อร่างกายและมีงานวิจัยหนึ่งทำการทดสอบทางผิวหนัง (patch test) ไม่พบมีการแพ้[151]	พบในป่าเต็งรังตามพื้นที่ราบ
13.*Phyllanthus emblica L.* (มะขามป้อม)[152-154]	ใบ (leaves)	alkaloids (เป็นส่วนประกอบหลักที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย), phenols, tannins, saponins, flavonoid	มีงานวิจัยทำการทดลองในสัตว์ทดลองพบมีอาการแดงของผิวหนังเล็กน้อยใน 24 ชม.แรก หลังจากนั้นผิวหนังกลับมาปกติ[155] ส่วนอีกงานวิจัยหนึ่งพบว่าไม่มีผลข้างเคียง[154]	พบได้ทุกภาคในประเทศไทย

ตาราง 2 (ต่อ)

สมุนไพร	ส่วนที่นำมาใช้	ส่วนประกอบทางเคมี (Phytochemical constituents)	โทษ	แหล่งที่พบ
14.*Psidium guajava L.* (ฝรั่ง)[156, 157]	ใบ (leaves)	tannins, flavonoids (guaijaverin มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย), triterpenoids (β-sitosterol), phenolic compound (caffeic acid มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย), sterols, volatile oil	จากงานวิจัยไม่พบว่ามีผลข้างเคียงในสัตว์ทดลอง[156] และมีงานวิจัยหนึ่งพบว่ามีความเป็นพิษต่ำ[158]	พบได้ทุกภาคในประเทศไทย
15.*Punica granatum* (ทับทิม)[159-161]	เปลือกผล (fruit peel)	flavonoids, tannins, glycosides, saponins, alkaloids, phenols, terpenoids	งานวิจัยไม่พบว่ามีพิษต่อมนุษย์[162]	พบได้ทุกภาคในประเทศไทย
16.*Rhinacanthus nasutus* (ทองพันชั่ง) [163, 164]	ใบ (leaves)	naphthoquinone (เป็นส่วนประกอบหลักและมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย[165]), flavonoids, steroids, terpenoids, anthraquinones, lignans	มีงานวิจัยพบว่ามีความเป็นพิษต่ำหากสกัดอย่างถูกวิธี[166] และมีอีกงานวิจัยพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบที่ผิวหนังได้ ลดการระคายเคืองที่ผิวหนัง[167]	พบได้ทุกภาคในประเทศไทย

ตาราง 2 (ต่อ)

สมุนไพร	ส่วนที่นำมาใช้	ส่วนประกอบทางเคมี (Phytochemical constituents)	โทษ	แหล่งที่พบ
17.*Rhodomyrtus tomentosa (Aiton) Hassk* (โทะ)[168]	ใบ (leaves)	phloroglucinol (rhodomyrtone มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย[169]), flavonoid, terpenoid, anthracene glycoside, tannins	มีงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากโทะไม่ทำลายเซลล์สร้างเส้นใยในมนุษย์ (human fibroblast) จึงสามารถทาบนผิวหนังได้ไม่อันตราย[102]	พบมากทางภาคใต้ของประเทศไทย
18.*Senna siamea (Lam.) Irwin & Barneby* (ขี้เหล็ก)[170-172]	ใบ (leaves)	tannins, resins, steroids, alkaloids, phenol compounds, flavonoids, triterpenoids	มีงานวิจัยพบว่าสารสกัดในรูปผงสามารถทำให้เกิดอาการระคายเคืองที่ตา จมูกได้[172]	พบได้ทุกภาคในประเทศไทย

ตาราง 2 (ต่อ)

สมุนไพร	ส่วนที่นำมาใช้	ส่วนประกอบทางเคมี (Phytochemical constituents)	โทษ	แหล่งที่พบ
19.*Syzygium cumini (L.) Skeels* (หว้า)[173-176]	ใบ (leaves)	flavonoids, alkaloids, glycosides, steroids, phenols, tannins, sterols, saponins, essential oils	มีงานวิจัยพบว่าค่าปริมาณของสารเคมีที่ให้กับสัตว์ทดลองทั้งหมดเพียงครั้งเดียวแล้วทำให้กลุ่มของสัตว์ทดลองร้อยละ 50 ตายลง (lethal dose 50/LD50) ในใบมีค่าน้อยกว่าในลำต้น แปลว่าใบมีความเป็นพิษสูงกว่า[177, 178] และพบมี 1 งานวิจัยที่แนะนำว่าให้ใช้กับผิวหนังได้ปลอดภัย[179]	พบมากที่ภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย
20.*Syzygium jambos L.* (ชมพู่น้ำดอกไม้)[104, 180, 181]	ใบ (leaves)	flavonoids (myricetin มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ), triterpenoids (ursolic acid มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ), phenol compounds (gallic acid มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ), flavonol glycosides	มีงานวิจัยรายงานว่าสารสกัดจากชมพู่มีพิษต่อสัตว์ทดลอง แต่จำเป็นต้องมีการศึกษาในมนุษย์ต่อไป[182]	พบได้ทุกภาคในประเทศไทย แต่ปัจจุบันหาได้ยาก

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

รูปแบบงานวิจัย

การศึกษาเชิงทดลองทางห้องปฏิบัติการ ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่งแบบตัดขวาง (experimental, cross-sectional study)

กลุ่มเป้าหมายของงานวิจัย (target population)

เป็นงานวิจัยที่ทำต่อยอดจาก Laochunsuwan A.[9] ซึ่งงานวิจัยนี้เก็บตัวอย่างสิวอุดตันจากกลุ่มตัวอย่างจำนวน 95 คน โดยเลือกกลุ่มตัวอย่างจากอาสาสมัครที่มีสิวจำนวน 95 คนที่มารับการรักษาที่ศูนย์ผิวหนัง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒและสมัครใจเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยใช้เกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัครเพื่อเข้ามาศึกษาดังนี้ (inclusion criteria) : 1. เพศชายหรือหญิง, 2. อายุ 18 ปีขึ้นไป, 3. มีสิวระดับน้อย (สิวไม่อักเสบ (comedone) เป็นส่วนใหญ่หรือมีสิวอักเสบ (papule และ pustule) ไม่เกิน 10 จุด ตามเกณฑ์ของลีดส์ (mild acne vulgaris (inflammatory papules < 10 lesions) by the Leeds revised acne grading system), มีสิวระดับปานกลาง (สิวอักเสบแดงมากกว่า 10 เม็ด และสิวอักเสบเม็ดใหญ่ หรือซิสต์ น้อยกว่า 5 เม็ด) ตามเกณฑ์ของลีดส์ (moderate acne vulgaris (inflammatory papules > 10 lesions, nodules < 5 lesions) by the Leeds revised acne grading system) หรือมีสิวระดับรุนแรง (สิวอักเสบแดงมากกว่า 10 เม็ด หรือสิวอักเสบเม็ดใหญ่ หรือซิสต์ มากกว่ากว่า 5 เม็ด) ตามเกณฑ์ของลีดส์ (severe acne vulgaris (inflammatory papules > 10 lesions, nodules > 5 lesions) by the Leeds revised acne grading system) และ 4. ผู้ป่วยยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ และลงลายลักษณ์อักษรในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (informed consent form)

ส่วนเกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัครเพื่อออกจากการศึกษาดังนี้ (exclusion criteria) : 1. อาสาสมัครได้รับยาปฏิชีวนะชนิดทาและชนิดรับประทานเพื่อรักษาโรคอื่นในช่วง 2 สัปดาห์ก่อนทำการวิจัย, 2. หญิงตั้งครรภ์ หรือให้นมบุตร, 3. มีผื่นแพ้สัมผัส ผื่นแดงอักเสบบริเวณที่จะเก็บตัวอย่าง, 4. ผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง, 5. ผู้ป่วยสิวที่สงสัยว่าเกิดจากสาเหตุอื่น เช่น สิวจากผื่นแพ้สัมผัส (allergic contact dermatitis), สิวจากยาสเตียรอยด์ (steroid acne) และ 6. ผู้ป่วยไม่ให้ความร่วมมือในการมาติดตามระหว่างเข้าร่วมโครงการวิจัยได้

และใช้เกณฑ์การคัดอาสาสมัครออกในระหว่างทำการศึกษาดังนี้ (discontinuation criteria) : 1. เป็นความสมัครใจของผู้ป่วย และ 2. ผู้ทำวิจัยเห็นสมควรว่าควรออกจากโครงการ เมื่อได้อาสาสมัครครบแล้วจึงนัดอาสาสมัครมาซักประวัติทั่วไป ประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดรับประทานและยาทาเฉพาะที่ ตรวจร่างกาย ประเมินความรุนแรงของสิวตามเกณฑ์ของลีดส์ และบันทึกข้อมูลเก็บไว้ หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างสิวอุดตันจากอาสาสมัคร โดยใช้ร้อยละ 70 แอลกอฮอล์ ทำความสะอาดบริเวณสิวอุดตัน เมื่อแอลกอฮอล์แห้งแล้วใช้หัวเข็บเบอร์ 21 ปราศจากเชื้อแทงเพื่อเปิดหัวสิว และใช้ไม้กดสิวกดหัวสิวออก นำมาป้ายลงบนสไลด์แก้ว แล้วใช้สไลด์แก้วอีกแผ่นบดหัวสิวแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งป้ายลงบน Brucella agar plate โดยที่เขียนกำกับชื่อ-นามสกุล อาสาสมัคร, เลขที่ประจำตัวผู้ป่วยนอก, เลขลำดับในการทดลอง และวันที่กดเพาะเชื้อ แล้วนำ Brucella agar plate บรรจุลงใน anaerobic jar (Mitsubishi®, Japan) ซึ่งภายในเป็นสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใส่ anaerobic gas pack (Mitsubishi®, Japan) ไว้ แล้วนำไปใส่ในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เพื่อรอเพาะเชื้อ *P. acnes* ต่อไป เนื่องจาก *P. acnes* จะขึ้นในสภาวะไร้ออกซิเจน อีกส่วนหนึ่งป้ายใน Mueller Hinton agar plate เขียนรายละเอียดเช่นเดียวกับ Brucella agar plate แล้วบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจน หลังจากนั้นสังเกตว่าจานเพาะเชื้อมีเชื้อขึ้นหรือไม่ ถ้ามากกว่า 7 วันยังไม่มีโคโลนีแสดงว่าเชื้อไม่เจริญ นำเชื้อที่เจริญมาเพาะเลี้ยงให้ได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์และเพิ่มจำนวนเชื้อ หลังจากนั้นนำมาตรวจดูลักษณะเชื้อโดยการย้อมแกรมว่ามีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของ *P .acnes* คือเชื้อแกรมบวก ชนิดแท่งขนาดเล็ก ไม่มีสปอร์ แล้วนำเชื้อที่มีคุณสมบัติของ *P. acnes* มาตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ Api 20a (bio Meriux®) ว่าเป็นเชื้อ *P. acnes* จริง หลังจากทำการทดสอบดังที่กล่าวไปแล้ว พบว่าจากคนไข้ทั้งหมด 95 คน ขึ้นเชื้อ *P. acnes* ทั้งหมด 75 สายพันธุ์ หลังจากที่ได้เชื้อ *P. acnes* แล้วจึงนำมาทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disc diffusion, หาค่า MIC ด้วยวิธี Epsilometer test (E test®) โดยทดสอบกับยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิดที่นิยมนำมาใช้รักษาสิวอันได้แก่ clindamycin, erythromycin, doxycyxline, tetracycline, amoxycillin ซึ่งผลการวิจัยพบว่า *P. acnes* ดื้อต่อยา erythromycin จำนวน 48 คน คิดเป็นร้อยละ 64, clindamycin จำนวน 47 คน คิดเป็นร้อยละ 62.66 และมี 1 คน คิดเป็นร้อยละ 1.33 ที่ดื้อต่อ tetracycline จากงานวิจัยไม่พบเชื้อที่ดื้อต่อยา doxycycline และ amoxicillin และจากงานวิจัยพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *P. acnes* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม macrolide กับ อายุและประวัติการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมาก่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในงานวิจัยครั้งนี้จึงใช้เชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้และเพาะเชื้อขึ้นจากคนไข้ทั้งหมด 75 คน มาทำการทดลองต่อ โดยที่เชื้อ *P. acnes* นั้นถูกเก็บใน Brain heart infusion broth (BHI broth) และร้อยละ 20 กลีเซอรอล (glycerol) ในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -80°C ซึ่ง glycerol เป็นสารที่ช่วยปกป้องไม่ให้

เชื้อ *P. acnes* แตกจากความเย็นและคงคุณภาพของ *P. acnes* ไว้ เมื่อจะนำมาใช้ทำการทดลองจะนำ *P. acnes* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion agar ที่มี 10% horse serum

การคำนวณกลุ่มตัวอย่าง (sample size estimation)

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อยอดจากงานวิจัยของ Laochunsuwan A.[9] ดังที่กล่าวไปข้างต้น จึงอิงการคำนวณกลุ่มตัวอย่างจากงานวิจัยดังกล่าว ซึ่งคำนวณดังนี้

ใช้สูตรการคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size formula) ตาม Dupont WD, Plummer WD: 'Power and Sample Size Calculations (1990)

$$N = \frac{Z^2 P(1-P)}{d^2}$$

โดยอ้างอิงจาก Poomsuwan P. In vitro study of antibiotic sensitivity pattern of Propionibacterium acnes isolated from acne vulgaris patients [dissertation]. Bangkok: Chulalongkorn University; 2001[103]

ซึ่งประเภทของงานวิจัยดังกล่าวนั้นเป็นดังนี้

ตัวอย่าง 1 กลุ่ม (sample)

N = จำนวนตัวอย่าง

Z = ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 = 1.96

P = สัดส่วนของการตอบสนองต่อเชื้อดื้อยาแต่ละชนิด

d = ค่าความคลาดเคลื่อนของโอกาสที่เชื้อจะตอบสนองต่อยา = ร้อยละ 5

ค่า p ของยาแต่ละชนิดจากงานวิจัยอ้างอิงมีค่าแตกต่างกัน จึงเลือกใช้ค่าที่ให้จำนวนตัวอย่างสูงที่สุด โดยใช้ p ของ erythromycin และ clindamycin = 0.06 คำนวณตัวอย่างได้ 87 คน

โดยสรุปจะได้จำนวนขนาดตัวอย่าง (sample size) ทั้งหมด 87 คน และจากการศึกษาพบเชื้อ *P. acnes* จากสิวอุดตันประมาณร้อยละ 92[183] เพราะฉะนั้นจำนวนตัวอย่างเท่ากับ (100 x 87)/92 = 94.6 คน = 95 คน จึงสรุปว่าจำนวนขนาดตัวอย่าง เท่ากับ 95 คน

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1.ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

1.1 สารทำละลาย ได้แก่

1.1.1 เอธานอล (ethanol)

1.2 วัสดุอุปกรณ์ ได้แก่

1.2.1 มีดและเขียง

1.2.2 ขวดปริมาตร (flasks)

1.2.3 บีกเกอร์ (beakers)

1.2.4 กระดาษกรอง (filter papers)

1.2.5 ผ้าก็อซ (gauze)

1.2.6 กรวย (funnels)

1.2.7 แท่งแก้วคนสาร

1.2.8 หลอด Eppendorf

1.3 เครื่องมือ ได้แก่

1.3.1 เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator)

1.3.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator)

1.3.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

1.3.4 ตู้อบควบคุมความร้อน (hot air oven)

1.3.5 เครื่องชั่งน้ำหนักสารแบบทศนิยม 3 ตำแหน่ง (scale)

1.3.6 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)

1.3.7 เครื่องปั่น (blender)

1.3.8 ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส (4°c refrigerator)

1.4 สมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่

1.4.1 เปลือกทับทิม

1.4.2 เหง้าขมิ้น

1.4.3 ใบมะขามป้อม

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 *P. acnes* จากตัวอย่างผู้ป่วย ทั้งที่ดื้อยาและไม่ดื้อยา

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

2.1.6 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile destilled water)

2.1.7 กลีเซอรีน (glycerin)

2.2 อุปกรณ์ ได้แก่

2.2.1 ปากคีบ (forceps)

2.2.2 หลอดทดลอง (test tubes)

2.2.3 ขวดปริมาตร (flask)

2.2.4 Magnetic bars

2.2.5 Magnetics hot plate stirrer (Jencons®, Genesis)

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

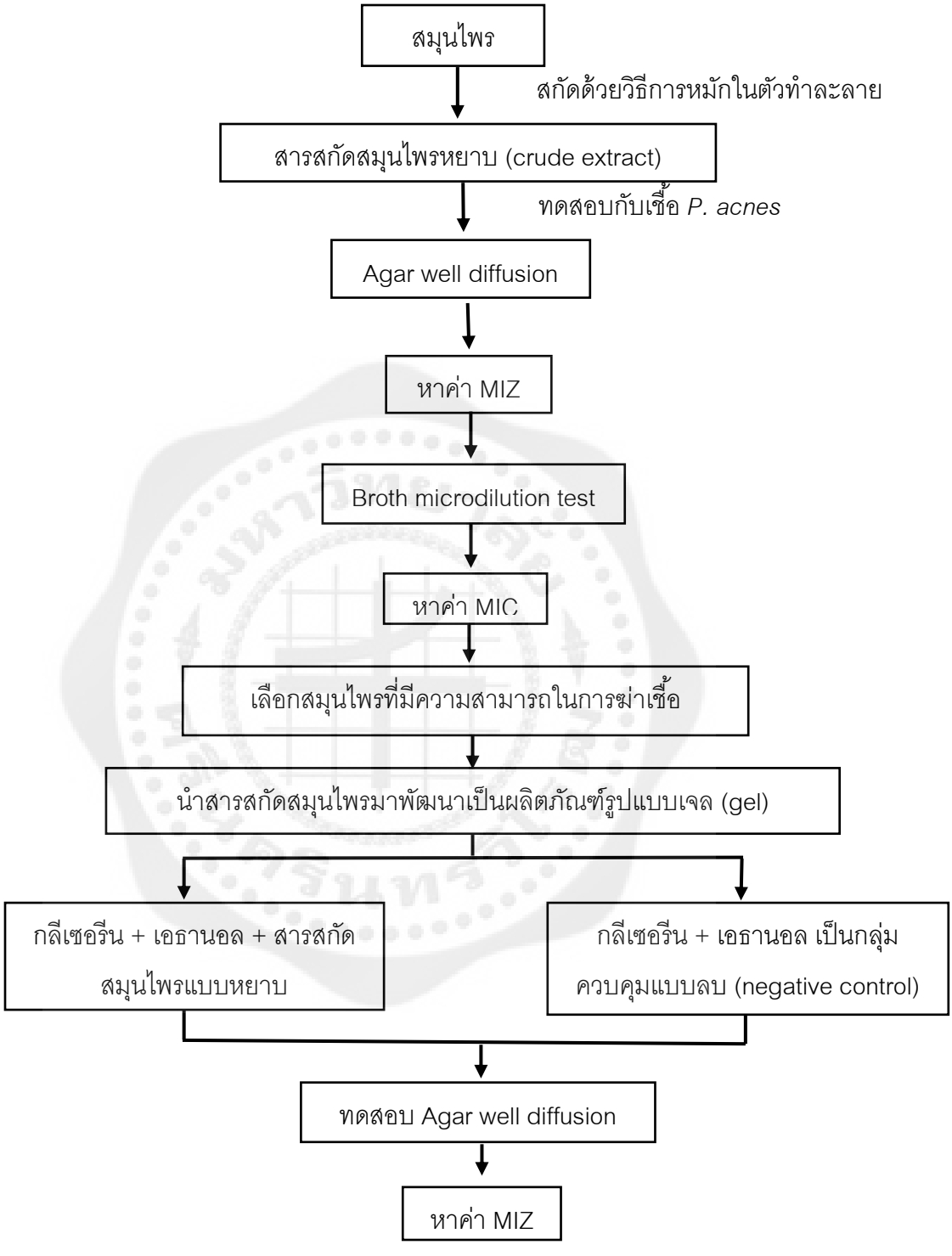
2.2.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิน้ำ (MW Lauda®)

2.2.8 ตู้พ่นอากาศบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ (laminar flow)

2.2.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.2.10 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator)

ขั้นตอนการวิจัย



ภาพประกอบ 18 ขั้นตอนการวิจัย

ด้านล่างเป็นการขยายความขั้นตอนวิจัยจากภาพประกอบ 18

1.การเตรียมสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่เลือกมา

1.1 นำส่วนของสมุนไพรที่จะใช้มาทำความสะอาดด้วยน้ำ จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ

1.2 นำไปอบแห้งด้วยตู้อบควบคุมความร้อนที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1.3 บดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น นำมาชั่งน้ำหนักและบันทึก

1.4 นำผงของสมุนไพรที่ได้ทั้ง 3 ชนิด มาแช่หมักในตัวทำลาย ดังนี้

1.4.1 เปลือกทับทิม หมักใน ethanol[114]

1.4.2 เหง้าขมิ้น หมักใน ethanol[184]

1.4.3 ใบมะขามป้อม หมักใน ethanol[185]

โดยแช่แต่ละชนิดแยกกัน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 25 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25°C นำสารสกัดที่ได้มากรองเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ซึ่งสาเหตุที่เลือก ethanol เป็นตัวทำละลายเพราะ ethanol มีค่าดัชนีขั้ว (polarity index) ที่อยู่กึ่งกลางระหว่างความมีขั้วและไม่มีขั้ว จะทำให้สามารถสกัดสารสำคัญเบื้องต้นได้มากที่สุด

1.5 กากที่เหลือนำมาทำซ้ำตามข้อ 1.4 อีก 1 ครั้ง รวมเป็นทั้งหมด 2 ครั้ง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มารวมกัน แล้วนำไประเหยให้แห้งด้วย rotary evaporator และ rotary vacuum evaporator หลังจากนั้นจะได้สารสกัดด้วย ethanol ของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด

1.6 นำสารสกัดที่ได้มาชั่งน้ำหนักและบันทึกไว้

2.การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* โดยวิธี agar well diffusion

2.1 นำเชื้อ *P. acnes* ทั้งที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาจากตัวอย่างที่เก็บไว้มาใส่ใน Brain heart infusion broth แล้ววัดความขุ่นของเชื้อแต่ละชนิดให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งจะมีเชื้อเท่ากับ $1.5x10^8$ โคโลนียูนิตต่อมิลลิลิตร (CFU/ml)

2.2 เตรียมจานเพาะเชื้อ Brain Heart Infusion Agar ที่มี 10%Horse serum และจากนั้นนำไม้พันสำสีชุบสารละลายของเชื้อ *P. acnes* มาป้ายลงให้ทั่วจานเพาะเชื้อ Brain Heart Infusion Agar ทำทั้งหมด 3 ครั้ง เรียกวิธีนี้ว่า three-dimension swab โดยที่แต่ละครั้งให้ป้ายในแนวขนานกันไปจนเต็มจานเพาะเชื้อ แล้วทิศทางในการป้ายครั้งต่อไปให้ทำมุม 45 องศากับทิศทางการป้ายในครั้งก่อนหน้า และทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาทีเพื่อให้ส่วนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

2.3 เจาะหลุมบนอาหารแข็งที่ทำการเกลี่ยเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 2.2 ด้วย sterile cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มม. โดยให้แต่ละหลุมห่างกันพอประมาณ

2.4 ใส่สารสกัดจาก ethanol ของสมุนไพรชนิดนั้น ๆ ที่ละลายใน DMSO ประมาณ 40 ไมโครลิตร (µl) ลงในหลุมแต่ละหลุม โดยความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดคือ 5, 10 mg/ml

2.5 ใส่ DMSO 40 µl ลงในหลุมหนึ่งเพื่อเป็นตัวแปรควบคุมว่าผลเป็นลบ (negative control)

2.6 ทำซ้ำในข้อ 2.4 และ 2.5 จนครบสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด

2.7 นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 3 วัน

2.8 บันทึกผลการทดลองโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone)

2.9 ทำการทดลองทั้งหมดซ้ำอีก 2 การทดลอง รวมทั้งหมดเป็น 3 การทดลอง แล้วนำผลที่ได้ทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.การหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth microdilution

3.1 นำเชื้อ *P. acnes* จากตัวอย่างที่เก็บไว้มาใส่ใน Brain Heart Infusion broth ที่มี 10% Horse serum แล้ววัดความขุ่นของเชื้อแต่ละชนิดให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งจะมีเชื้อเท่ากับ $1.5x10^8$ CFU/ml

3.2 เจือจางสารละลาย *P. acnes* ที่จะทดสอบให้มีความเข้มข้นประมาณ $0.5x10^6$ CFU/ml โดยเจือจาง 10 เท่าลงอีก 2 ครั้ง

3.3 เจือจางสารที่ต้องการทดสอบคือสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด โดยเจือจางแต่ละชนิดเป็นลำดับส่วน 2 เท่า ด้วย Brain Heart Infusion broth ใส่ใน microtiter plate จากนั้นเติม *P. acnes* ที่ปรับความขุ่นแล้วลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate ที่มีสารสกัดสมุนไพรอยู่ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน

3.4 อ่านผลการเจริญของ *P. acnes* จากการสังเกตความขุ่นของแบคทีเรียที่ทดสอบในแต่ละหลุมด้วยตาเปล่าเทียบกับหลุมควบคุมซึ่งมีเชื้อ *P. acnes* เพียงอย่างเดียว และหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว โดยค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหรือยาปฏิชีวนะในหลุมทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ซึ่งหลุมทดสอบนั้นจะใส

4.การเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์

4.1 เลือกสารสกัดที่เหมาะสมที่สุดมาทำเป็นตำรับผลิตภัณฑ์น้ำใสหรือเจล เนื่องจากเหมาะสมในผู้ป่วยที่เป็นสิวมากที่สุด เพราะมีความมันน้อยกว่าแบบครีมและไม่มีส่วนประกอบที่ก่อให้เกิดสิวอุดตัน (comedogenic substances)

4.2 เตรียมตำรับยาน้ำใส มีส่วนประกอบคือ

4.2.1 Glycerin ร้อยละ 10

4.2.2 Ethanol ร้อยละ 20

4.2.3 สารสกัดจากสมุนไพรที่เหมาะสม ร้อยละ X

4.2.4 Sterile distilled water ร้อยละ 70 – X

เลือกสารสกัดที่ความเข้มข้น 10 เท่าของผลการทดสอบหาค่า MIC และเตรียมตำรับยาน้ำใสที่ไม่มีสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อใช้เป็น negative control

4.3 ประเมินผลทางกายภาพและทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมในข้อกำหนดทั่วไปสำหรับเครื่องสำอางค์ (158) (มอก. 152-2539) โดยประเมินที่ลักาณะเนื้อผลิตภัณฑ์ กลิ่น สี ความเป็นกรดและด่าง ความหนืด แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบ/วินาที นาน 20 นาที และประเมินลักษณะทางกายภาพซ้ำอีกครั้ง

4.4 นำตำรับที่ได้มาทดสอบความสารมารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ทั้งที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาด้วยวิธี agar well diffusion อีกครั้ง โดยใช้ตำรับที่ไม่มีสารสกัดจากสมุนไพรเป็น negative control

การประเมินผล

1.ประเมินฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดจากสมุนไพรแบบหยาบต่อ *P. acnes* โดยประเมินจากค่า MIZ

2.ประเมินฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดจากสมุนไพรแบบหยาบต่อ *P. acnes* โดยประเมินจากค่า MIC

การเก็บรวมรวมข้อมูลและการจัดการข้อมูล (Data Collection and Management)

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยการศึกษารูปแบบความไวของเชื้อ *P. acnes* จากผู้ป่วยสิวต่อยาปฏิชีวนะของ Laochunsuwan A.[9] ได้มาในรูปแบบไฟล์ข้อมูล (file) ซึ่งข้อมูลทีนำมาใช้มีดังนี้ คือ ผลการทดสอบความไวของเชื้อและการดื้อยา (ทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิดที่นิยมใช้ในการรักษาสิวได้แก่ clindamycin, erythromycin, doxycycline, tetracycline, amoxicillin) โดยอ่านผลเป็นค่า MIC ที่ MIC50 และ MIC90 อ้างอิงจากเกณฑ์ตาม CLSI[186] โดยไม่ใช้ข้อมูลทางคลินิก หรือข้อมูลใด ๆ ที่จะอ้างอิงถึงผู้ป่วยได้

ผู้วิจัยได้นำเชื้อ *P. acnes* ที่เก็บจากอาสาสมัครจากงานวิจัยข้างต้นมาทำทดสอบต่อ ซึ่งเชื้อ *P. acnes* นั้นเก็บที่ตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -80°C โดยเก็บไว้ใน BHI broth และร้อยละ 20 glycerol เพื่อรักษาคุณภาพของเชื้อ *P. acnes* ซึ่งการเก็บเชื้อ *P. acnes* นั้นเก็บแยกหลอดตามรหัสของอาสาสมัคร

ซึ่งมีการเขียนรหัสลายลักษณ์อักษรอย่างชัดเจนที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อจะนำเชื้อ *P. acnes* มาใช้ผู้วิจัยจะนำเชื้อบางส่วนจากหลอดเก็บเชื้อมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่มีร้อยละ 10 horse serum หลังจากนั้นบ่มเพาะเลี้ยงเมื่อเชื้อเจริญเติบโตขึ้นจนได้ colony ที่ต้องการ จะนำ colony นั้นมาใส่ BHI agar ที่มีร้อยละ 10 horse serum อีกครั้ง และบ่มเลี้ยงต่อจนได้ colony ที่ต้องการ แล้วนำ colony นั้นมาใช้ทดสอบต่อไป

เชื้อแบคทีเรียนี้ที่ได้จากผู้ป่วยจะเก็บไว้ในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 5 ปีนับจากเริ่มทำงานวิจัย เมื่อครบ 5 ปีจะทำลายเชื้อทิ้งโดยนำเข้าตู้อบฆ่าเชื้อ (autoclave)

แบบฟอร์มในการเก็บรวมรวมข้อมูลเป็นดังนี้

ตาราง 3 แบบฟอร์มเก็บรวมรวมข้อมูลค่า MIZ, MIC ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด

สารสกัดหยาบของสมุนไพร	**เชื้อ *P. acnes* จากอาสาสมัครรหัส ___ (ดื้อยา clindamycin / ดื้อยา erythromycin / ไม่ดื้อยา)**	
	MIZ (mm)	MIC (µg/ml)
1. เปลือกทับทิม		
2. เหง้าขมิ้นชัน		
3. ใบมะขามป้อม		

ตาราง 4 แบบฟอร์มเก็บรวมรวมข้อมูลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ นำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยารูปแบบเจลแล้วมาทำการทดสอบกับเชื้อ *P. acnes* โดยเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ยาที่ไม่มีสมุนไพรเป็นส่วนประกอบโดยวัดค่า MIZ

				สารสกัดหยาบของสมุนไพรที่มีฤทธิ์ค่าเชื้อมากที่สุดผสมในรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบเจล	**ผลิตภัณฑ์แบบเจลที่ไม่มีส่วนผสมของสมุนไพร (Negative control)**
				1. _____ 2. _____ 3. _____	
P. acnes	ใส่ยา	Clindamycin	MIZ (mm.)		
		Erythromycin	MIZ (mm.)		
	ไม่ใส่ยา		MIZ (mm)		

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

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

2.ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัคร (baseline characteristics)

2.1 ข้อมูลเชิงกลุ่ม (categorical data) รายงานผลเป็น ความถี่ (frequency) และปริมาณร้อยละ (percentage)

2.2 ข้อมูลต่อเนื่อง (continuous data)

2.2.1 ในกรณีที่ข้อมูลมีการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution) รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (standard deviation/SD)

2.2.2 ในกรณีที่ข้อมูลมีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ (not normal distribution) รายงานผลเป็นมัธยฐาน (median) และค่าส่วนเบี่ยงเบนควอไทล์ (inter-quartile range)

3.ข้อมูลเชิงอนุมาน (inferential statistics)

3.1 ตรวจสอบข้อมูลที่เก็บรวบรวมได้ว่าเป็นการกระจายว่าเป็นโค้งปกติ ซึ่งมีหลายวิธี เช่น

3.1.1 นำข้อมูลที่ได้มาวาดกราฟ: normal quantile plot, probability plot และ distribution plot ในกรณีที่ข้อมูลมีจำนวนมาก (มากกว่า 100 – 300 จำนวนขึ้นไป)

3.1.2 การทดสอบการแจงแจงแบบปกติด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้สถิติ: Kolmogorov-Smirnov test หรือ Shapiro-Wilk W test ซึ่ง Kolmogorov-Smirnov test ใช้เมื่อข้อมูลมีมากกว่า 50 ข้อมูล ส่วน Shapiro-Wilk W test ใช้เมื่อข้อมูลมีน้อยกว่า 50 ข้อมูล

โดยการวิเคราะห์จะกำหนดสมมติฐานว่าให้ข้อมูลที่เก็บรวบรวมได้มีการแจกแจงแบบปกติ คือ H0 (null hypothesis) ส่วนข้อมูลที่เก็บรวบรวมได้มีการแจกแจงแบบไม่ปกติ คือ H1 (alternative hypothesis) โดยแปลผลว่าถ้าค่านัยสำคัญทางสถิติ (significant/sig.) มากกว่าค่าระดับนัยสำคัญแอลฟา (α) แสดงว่ายอมรับสมมติฐาน H0 ข้อมูลแจงแจงแบบปกติ แต่ถ้าค่า sig. น้อยกว่าค่า α แสดงว่ายอมรับสมมติฐาน H1 ข้อมูลแจกแจงแบบไม่ปกติ

3.2 Linear mixed-effects model ใช้สำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย (mean) ของข้อมูลต่อเนื่อง (continuous data) ที่ได้จากข้อมูลมากกว่าหรือเท่ากับ 2 กลุ่มขึ้นไปที่เป็นอิสระต่อกัน (independent factor) หรือไม่เป็นอิสระต่อกัน (dependent factor) และเป็นข้อมูลที่มีการกระจายตัวแบบปกติ ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ นอกจากนี้ยังสามารถนำตัวแปรกวน (confounding factor) มาคิดด้วย โดยจะทำการศึกษาในหัวข้อ ดังนี้

3.2.1 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของ MIC ระหว่างสารสกัดหยาบของสมุนไพรแต่ละตัวที่ทำทดสอบกับ *P. acnes*

3.3 Wilcoxon Rank-Sum test ใช้สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน (independent factor) และเป็นข้อมูลที่กระจายตัวแบบไม่ปกติ ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยจะทำการศึกษาในหัวข้อ ดังนี้

3.3.1 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของ MIZ ที่ทำเป็นตำรับยาระหว่างตำรับยาที่มีสารสกัดหยาบจากสมุนไพรเป็นส่วนประกอบและตำรับยาที่ไม่มีสมุนไพรเป็นส่วนประกอบ (negative control)

3.3.2 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของ MIZ ระหว่างตำรับยาที่มีสารสกัดหยาบจากสมุนไพรแต่ละชนิด

จริยธรรมทางการวิจัย (Ethical Considerations)

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อยอดและใช้เชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ที่เก็บจากอาสาสมัครจากงานวิจัยของ Laochunsuwan A.[9] ที่ได้กล่าวไปแล้ว ไม่ได้เก็บเชื้อจากอาสาสมัครเพิ่ม ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวนั้นได้ผ่านการรับรองจากโครงการจริยธรรมสำหรับโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒเป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยดังกล่าวนั้นที่ยื่นต่อคณะกรรมการจริยธรรมคือเพื่อศึกษารูปแบบความไวของเชื้อ *P. acnes* ต่อยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ที่นิยมใช้รักษาสิวในประเทศไทย ส่วนวัตถุประสงค์รองคือ ศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทั่วไปของอาสาสมัคร, ประวัติการรักษา เป็นต้น กับรูปแบบความไวเชื้อ *P. acnes* ต่อยาปฏิชีวนะต่าง ๆ และศึกษาอัตราความชุกของการดื้อยาของ *P. acnes* ต่อยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการรักษาสิว โดยรูปแบบในการวิจัยเป็นแบบ cross-section และเหตุผลในการวิจัยคือมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสิวอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ผู้ป่วยยังซื้อยาใช้เองอีกด้วย ทำให้ผลการรักษาสิวนั้นไม่ดีเท่าที่ควรและในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมายังไม่พบรายงานอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อ *P. acnes* จึงเป็นที่มาของงานวิจัยดังกล่าวที่ต้องการจะศึกษารูปแบบความไวเชื้อของ *P. acnes* ในประเทศไทย เพื่อให้ทราบถึงรูปแบบความไวเชื้อของ *P. acnes* และความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยากับลักษณะทั่วไปของอาสาสมัคร ประวัติการรักษา การใช้ยา และลักษณะทางคลินิก โดยงานวิจัยที่จะทำนี้ไม่ใช้ข้อมูลทางคลินิกหรือข้อมูลใด ๆ ที่จะอ้างอิงถึงคนไข้ได้มาใช้ จะใช้เพียงค่าผลทดสอบความไวของเชื้อและการดื้อยา ซึ่งเก็บในรูปแบบข้อมูลอิเลกทรอนิกส์ (electronic files) และเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกจากคนไข้ จากที่กล่าวมางานวิจัยของ Laochunsuwan A. ได้ผ่านการขอจริยธรรมทางงานวิจัยเป็นที่

เรียบร้อย งานวิจัยนี้จึงจะขอจริยธรรมทางการวิจัยในรูปแบบใช้เชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกจากคนไข้ และเก็บที่ -80°ซ

ระยะเวลาการทำวิจัย

ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 7 เดือน ตั้งแต่ กันยายน 2560 ถึง มีนาคม 2561

แผนการดำเนินงานตลอดการวิจัย

ตาราง 5 แสดงระยะเวลาการทำงานวิจัย

ขั้นตอน	May60	Jun60	July60	Aug60	Sep60	Oct60	Nov60	Dec60	Jan61	Feb61	Mar61	Apr61
1.คิดหัวข้อวิจัย, ค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง, ตั้งคำถามวิจัย, ตั้งสมมติฐานงานวิจัย, เสนอโครงร่างงานวิจัย, ขออนุมัติคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์	x	x	x	x	x							
2.ทำแลบ, เก็บข้อมูลงานวิจัย					x	x	x	x	x			
3.วิเคราะห์ข้อมูลวิจัย, แปลผลข้อมูลวิจัย								x	x	x		
4.รายงานผลวิจัย, ตีพิมพ์ผลงานวิจัย										x	x	x

สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

งบประมาณ

ตาราง 6 แสดงงบประมาณที่ใช้ในการวิจัย

ค่าใช้จ่าย	จำนวนเงิน (บาท)
1. หมวดค่าใช้สอยและค่าตอบแทน	14,000
1.1 ค่าจ้างเหมาพิมพ์แบบสอบถาม/รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์	4,000
1.2 ค่าผู้ช่วยวิจัย จำนวน 1 คน คนละ 200 บาท/วัน จำนวน 50 วัน ประกอบด้วย พญ. วาทินี อมรเพชรกุล	10,000
2. หมวดค่าวัสดุและอุปกรณ์	90,430
2.1 ค่าวัสดุในการเพาะเลี้ยงเชื้อ	52,680
- Sterile Petri Dish 90x15 mm (500 pcs.) 6 pack	9,000
- Pipette tip 1000 ul. (1000 ea./pack) 4 pack	1,800
- Pipette tip 200 ul. (1000 ea./pack) 4 pack	1,520
- Brain Heart Infusion Agar 500 g. 2 ขวด	3,100
- Brain Heart Infusion Broth 500 g. 2 ขวด	3,100
- Microtube 1.5 ml (1000 ea./pack) 4 pack	960
- Sterile 96 well Microplate with Lid 4 pack	4,500
- Centrifuge tube 15 ml. Sterile 500 อัน	2,250
- Centrifuge tube 50 ml. Sterile 100 อัน	550
- Anaerobe gas pack / Merck, 10 ea./pack 5 pack	7,500
- Horse serum 500 ml 4 ขวด	16,800
- ถุงมือ ไม่มีแป้ง No. S 10 กล่อง	1,600
2.2 ค่าสมุนไพรที่จะนำมาสกัด	25,000
2.3 ค่าอุปกรณ์ที่จะนำมาใช้ในการสกัดสาร	5,750
- Ethanol	2,000
- DMSO	1,750
- อื่น ๆ	2,000
2.4 ค่าจ้างเหมาจ่ายในการทำลายเชื้อและวัสดุปนเปื้อนเชื้อ	7,000
รวมงบประมาณทั้งสิ้น	104,430

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการทดลอง

1.สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม, เปลือกทับทิม และเหง้าขมิ้นชัน

การสกัดด้วยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลายเอทานอล ได้ผลดังนี้

1.1 สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม เป็นของเหลวหนืดสีเขียวออกน้ำตาลเข้ม น้ำหนักสารสกัดที่ได้คือ 18.58 กรัม คิดเป็นร้อยละ 18.58

1.2 สารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม เป็นของเหลวหนืดสีออกน้ำตาลเข้ม น้ำหนักสารสกัดที่ได้คือ 24.76 กรัม คิดเป็นร้อยละ 24.76

1.3 สารสกัดหยาบจากเหง้าขมิ้นชัน เป็นของเหลวหนืดสีออกแดงอิฐเข้ม น้ำหนักสารสกัดที่ได้คือ 29.79 กรัม คิดเป็นร้อยละ 29.79

2.ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion

ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลจากเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของการยับยั้ง (MIZ) รอบหลุม (well) ที่หยอดสารสกัดหยาบไว้ ซึ่งวงใสของการยับยั้งแสดงถึงไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังแสดงในตาราง 7 ซึ่งแสดงถึงค่าเฉลี่ย MIZ ของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดจำแนกแต่ละเชื้อรวมทั้งสิ้น 75 สายพันธุ์

ตาราง 7 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางรอบ well (MIZ) เป็น มม.

รหัสเชื้อ *P. acnes*	**สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม (ค่าเฉลี่ย)**		**สารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม (ค่าเฉลี่ย)**		**สารสกัดหยาบจากเหง้าขมิ้นชัน (ค่าเฉลี่ย)**	
	5 มก./มล.	**10 มก./มล.**	**5 มก./มล.**	**10 มก./มล.**	**5 มก./มล.**	**10 มก./มล.**
1	18.50	19.50	11.35	13.60	-	-
2	12.50	21.75	8.25	13.25	-	-
3	17.00	21.00	10.00	12.75	-	-

ตาราง 7 (ต่อ)

รหัสเชื้อ *P. acnes*	สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม (ค่าเฉลี่ย)		สารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม (ค่าเฉลี่ย)		สารสกัดหยาบจากเหง้าขมิ้นชัน (ค่าเฉลี่ย)	
	5 มก./มล.	10 มก./มล.	5 มก./มล.	10 มก./มล.	5 มก./มล.	10 มก./มล.
4	15.75	21.75	8.75	11.75	-	-
5	16.00	21.00	9.00	10.00	-	-
6	23.00	30.00	11.00	14.50	-	-
7	16.00	20.25	8.25	11.50	-	-
8	14.50	20.50	9.25	12.75	-	-
9	20.50	24.00	11.25	14.00	-	-
10	20.50	25.75	10.25	13.00	-	-
11	19.00	28.00	11.00	13.75	-	-
12	22.25	29.25	8.75	13.25	-	-
13	23.50	30.00	11.50	16.00	-	-
14	16.25	21.75	8.00	12.75	-	-
15	15.00	22.75	8.75	11.50	-	-
16	16.50	22.50	10.50	12.50	-	-
17	17.50	24.50	7.75	12.50	-	-
18	0.00	18.50	-	-	-	-
19	15.75	19.25	4.00	10.50	-	-
20	15.00	19.00	5.00	10.50	-	-
21	12.50	15.50	-	9.50	-	-
22	6.00	14.00	-	4.50	-	-
23	14.25	19.25	-	12.00	-	-
24	12.00	15.25	-	9.50	-	-
25	9.00	13.50	-	3.50	-	-
26	14.75	19.00	-	-	-	-

ตาราง 7 (ต่อ)

รหัสเชื้อ *P. acnes*	สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม (ค่าเฉลี่ย)		สารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม (ค่าเฉลี่ย)		สารสกัดหยาบจากเห้าขมิ้นชัน (ค่าเฉลี่ย)	
	5 มก./มล.	10 มก./มล.	5 มก./มล.	10 มก./มล.	5 มก./มล.	10 มก./มล.
27	14.50	21.50	-	11.50	-	-
28	12.50	18.00	-	5.00	-	-
29	7.00	16.00	-	9.50	-	-
30	10.25	14.75	-	-	-	-
31	6.00	14.75	-	-	-	-
32	17.50	22.00	8.00	12.00	-	-
33	11.50	20.75	-	9.25	-	-
34	15.00	21.00	-	10.50	-	-
35	15.25	23.25	-	10.75	-	-
36	13.50	23.50	-	10.25	-	-
37	15.75	23.50	3.75	11.00	-	-
38	14.25	22.00	-	9.50	-	-
39	15.50	22.50	-	11.75	-	-
40	17.00	22.00	-	11.00	-	-
41	15.75	21.00	7.75	10.75	-	-
42	12.50	22.25	-	8.00	-	-
43	15.25	21.00	3.50	10.50	-	-
44	21.75	24.00	-	12.00	-	-
45	16.50	22.50	4.50	11.00	-	-
46	17.75	20.00	9.00	12.00	-	-
47	15.25	21.75	4.25	11.25	-	-
48	13.25	18.00	3.25	10.00	-	-
49	17.50	21.50	7.75	11.25	-	-

ตาราง 7 (ต่อ)

รหัสเชื้อ *P. acnes*	สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม (ค่าเฉลี่ย)		สารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม (ค่าเฉลี่ย)		สารสกัดหยาบจากเห้าขมิ้นชัน (ค่าเฉลี่ย)	
	5 มก./มล.	10 มก./มล.	5 มก./มล.	10 มก./มล.	5 มก./มล.	10 มก./มล.
50	16.00	22.25	-	-	-	-
51	18.50	22.25	9.00	12.75	-	-
52	13.75	19.00	-	4.50	-	-
53	16.75	20.50	4.25	10.00	-	-
54	13.50	23.50	4.25	9.25	-	-
55	15.00	20.50	4.25	9.00	-	-
56	17.25	20.50	-	9.00	-	-
57	9.75	12.00	9.00	11.25	-	-
58	16.75	23.75	4.25	11.75	-	-
59	13.00	20.00	4.00	8.75	-	-
60	15.75	21.50	8.25	11.00	-	-
61	15.50	22.50	-	11.50	-	-
62	14.75	20.50	9.75	12.75	-	-
63	12.75	18.25	-	10.75	-	-
64	13.50	18.00	-	10.25	-	-
65	12.50	15.75	-	-	-	-
66	14.50	17.50	-	8.00	-	-
67	16.50	23.00	-	11.25	-	-
68	16.00	21.75	-	9.50	-	-
69	14.00	20.00	-	10.00	-	-
70	10.25	17.00	4.50	9.00	-	-
71	17.50	22.00	-	13.00	-	-
72	18.00	24.00	3.50	10.75	-	-

ตาราง 7 (ต่อ)

รหัสเชื้อ *P. acnes*	**สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม (ค่าเฉลี่ย)**		**สารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม (ค่าเฉลี่ย)**		**สารสกัดหยาบจากเห้าขมิ้นชัน (ค่าเฉลี่ย)**	
	5 มก./มล.	**10 มก./มล.**	**5 มก./มล.**	**10 มก./มล.**	**5 มก./มล.**	**10 มก./มล.**
73	16.00	22.75	8.75	10.50	-	-
74	16.75	23.00	3.50	13.00	-	-
75	15.00	20.50	3.75	10.25	-	-

ขนาดหลุม (well) เท่ากับ 4 มม. -: ไม่มีวงใสของการยับยั้งรอบหลุมสารสกัดหยาบสมุนไพร.

ค่าเฉลี่ยรวมของค่า MIZ ทั้งหมดต่อเชื้อและจำแนกเป็นเชื้อกลุ่มที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะแสดงดังตาราง 8

ตาราง 8 แสดงค่าเฉลี่ยรวมของ MIZ ต่อเชื้อ *P. acnes* ทั้งหมด เชื้อ *P. acnes* กลุ่มดื้อยาและเชื้อ *P. acnes* กลุ่มไม่ดื้อยา

สารสกัดหยาบ		**MIZ ที่สารความเข้มข้น 5 มก./มล. (mean ± SD)**	**MIZ ที่สารความเข้มข้น 10 มก./มล. (mean ± SD)**
ใบมะขามป้อม	ต่อเชื้อทั้งหมด (N=75)	14.99 ± 3.77	20.90 ± 3.45
	ต่อเชื้อดื้อยา (N=44)	14.87 ± 4.60	21.17 ± 3.94
	ต่อเชื้อไม่ดื้อยา (N=31)	15.15 ± 2.15	20.52 ± 2.63

ตาราง 8 (ต่อ)

สารสกัดหยาบ		MIZ ที่สารความเข้มข้น 5 มก./มล. (mean ± SD)	MIZ ที่สารความเข้มข้น 10 มก./มล. (mean ± SD)
เปลือกทับทิม	ต่อเชื้อทั้งหมด (N=75)	4.07 ± 4.17	9.95 ± 3.65
	ต่อเชื้อดื้อยา (N=44)	4.45 ± 4.63	10.06 ± 4.03
	ต่อเชื้อไม่ดื้อยา (N=31)	3.54 ± 3.42	9.78 ± 3.11
เหง้าขมิ้นชัน	ต่อเชื้อทั้งหมด (N=75)	-	-
	ต่อเชื้อดื้อยา (N=44)	-	-
	ต่อเชื้อไม่ดื้อยา (N=31)	-	-

ขนาดหลุม (well) เท่ากับ 4 มม.

3.ผลการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution

ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจากวิธี agar well diffusion จะได้ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 5 หรือ 10 มก./มล. ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ได้ นำความเข้มข้นนั้นมาเป็นความเข้มข้นเริ่มต้นในการหา MIC ด้วยวิธี broth microdilution ได้ผลค่าเฉลี่ย MIC ของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดต่อเชื้อแต่ละสายพันธุ์รวมทั้งหมด 75 สายพันธุ์ดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution

รหัสเชื้อ *P. acnes*	**สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม (ค่าเฉลี่ย)**	**สารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม (ค่าเฉลี่ย)**	**สารสกัดหยาบจากเหง้าขมิ้นชัน (ค่าเฉลี่ย)**
1	0.625	1.250	0.625
2	0.078	1.250	0.313
3	0.313	0.625	1.250
4	0.313	1.250	0.625
5	0.313	1.250	0.078
6	0.313	1.250	1.250
7	0.313	1.250	2.500
8	0.313	0.625	1.250
9	0.313	0.625	2.500
10	0.313	0.625	1.250
11	0.625	0.625	1.250
12	0.625	0.625	1.250
13	0.625	1.250	2.500
14	0.313	0.625	2.500
15	0.313	0.625	1.563
16	0.313	0.625	1.250

ตาราง 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ *P. acnes*	**สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม (ค่าเฉลี่ย)**	**สารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม (ค่าเฉลี่ย)**	**สารสกัดหยาบจากเหง้าขมิ้นชัน (ค่าเฉลี่ย)**
17	5.000	7.500	5.000
18	0.625	0.313	5.000
19	0.313	0.078	0.078
20	0.469	0.156	3.750
21	0.625	0.469	3.750
22	0.156	0.625	3.750
23	0.117	0.313	5.000
24	0.156	0.039	0.703
25	0.469	0.313	10.000
26	0.098	0.039	0.117
27	0.078	0.078	0.156
28	0.078	0.156	1.875
29	0.059	0.313	7.500
30	2.500	3.750	10.000
31	0.117	0.117	3.750
32	0.078	0.313	0.078

ตาราง 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ *P. acnes*	**สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม (ค่าเฉลี่ย)**	**สารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม (ค่าเฉลี่ย)**	**สารสกัดหยาบจากเห้าขมิ้นชัน (ค่าเฉลี่ย)**
33	2.500	2.500	10.000
34	0.313	0.625	5.000
35	0.313	1.250	5.000
36	0.625	1.250	10.000
37	1.250	1.250	5.000
38	0.313	1.250	5.000
39	0.313	0.938	5.000
40	0.313	1.250	1.875
41	0.625	1.250	5.000
42	0.313	0.625	5.000
43	0.313	0.938	5.000
44	0.469	0.625	5.000
45	0.625	1.250	5.000
46	0.625	1.250	10.000
47	0.625	1.250	5.000
48	0.157	0.938	2.500

ตาราง 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ *P. acnes*	**สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม (ค่าเฉลี่ย)**	**สารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม (ค่าเฉลี่ย)**	**สารสกัดหยาบจากเห้าขมิ้นชัน (ค่าเฉลี่ย)**
49	0.313	0.313	10.000
50	1.250	1.250	10.000
51	0.157	0.625	2.500
52	0.469	1.250	5.000
53	0.235	0.625	2.500
54	0.625	1.250	10.000
55	0.313	1.250	5.000
56	0.313	0.938	5.000
57	0.313	0.938	10.000
58	0.313	0.625	5.000
59	0.625	1.250	5.000
60	0.313	0.625	3.750
61	0.313	0.625	1.250
62	0.469	1.250	1.875
63	1.250	1.250	5.000
64	1.250	1.250	5.000

ตาราง 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ *P. acnes*	**สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม (ค่าเฉลี่ย)**	**สารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม (ค่าเฉลี่ย)**	**สารสกัดหยาบจากเหง้าขมิ้นชัน (ค่าเฉลี่ย)**
65	1.250	1.250	5.000
66	0.313	1.250	0.625
67	0.625	1.250	1.250
68	0.625	1.875	2.500
69	0.625	1.250	1.250
70	1.250	1.250	1.250
71	0.625	1.875	3.750
72	0.157	0.625	0.938
73	0.313	0.625	3.750
74	0.625	0.625	3.750
75	0.313	0.625	2.500

หน่วย MIC คือ มก./มล.

เมื่อได้ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุด(MIC) ของสารสกัดหยาบทั้งสามชนิดต่อเชื้อ 75 สายพันธุ์ จึงนำค่า MIC มาเฉลี่ยรวมทั้งหมด และแยกเป็นกลุ่มเชื้อที่ดื้อยาและเชื้อไม่ดื้อยา ดังแสดงในตาราง 10 นำค่าเฉลี่ยรวม MIC ต่อเชื้อทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรวม MIC ต่อเชื้อทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบทับทิม พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุด(MIC) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.092) ค่าเฉลี่ยรวม MIC ต่อเชื้อทั้งหมดของสารสกัดหยาบใบมะขามป้อมเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบเหง้าขมิ้นชัน และสารสกัดหยาบเปลือกทับทิม

เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบเหง้าขมิ้นชัน พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งสองกลุ่ม (p<0.001) ดังแสดงในตารางที่ 10

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย MIC ในกลุ่มเชื้อดื้อยาระหว่างสารสกัดหยาบใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบเปลือกทับทิม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.214) ส่วนระหว่างสารสกัดหยาบใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบเหง้าขมิ้นชัน ค่าเฉลี่ย MIC ในกลุ่มเชื้อดื้อยาพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001) เช่นเดียวกับระหว่างสารสกัดหยาบเปลือกทับทิมและสารสกัดหยาบเหง้าขมิ้นชัน (p<0.001) ดังแสดงในตาราง 10

ในกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยา พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุด(MIC) ระหว่างสารสกัดหยาบใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบเปลือกทับทิม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.240) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดหยาบใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบเหง้าขมิ้นชันในกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยา พบว่าค่าเฉลี่ย MIC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001) ส่วนสารสกัดหยาบเปลือกทับทิมเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบเหง้าขมิ้นชัน พบว่ามีความแตกต่างของค่าความเข้มข้นต่ำสุด(MIC) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001) ดังแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 ผลค่าเฉลี่ยรวมของค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* (MIC) โดยจำแนกตามกลุ่มของเชื้อ *P. acnes*

เชื้อ *P. acnes*	**สารสกัดหยาบ**	MIC (mean ± SD)	*p*-value*
ทั้งหมด (N=75)	ใบมะขามป้อม	0.559 ± 0.685	Reference
	เปลือกทับทิม	1.003 ± 0.954	p=0.092
	เหง้าขมิ้นชัน	3.804 ± 2.901	p<0.001
กลุ่มดื้อยา (N=44)	ใบมะขามป้อม	0 .560 ± 0 .850	Reference
	เปลือกทับทิม	0 .970 ± 1.211	p=0.214
	เหง้าขมิ้นชัน	3.394 ± 2.863	p<0.001
กลุ่มไม่ดื้อยา (N=31)	ใบมะขามป้อม	0 .557 ± 0.348	Reference
	เปลือกทับทิม	1.048 ± 0.375	p=0.240
	เหง้าขมิ้นชัน	4.385 ± 2.901	p<0.001

หน่วย MIC คือ มก./มล. * *p*-value คิดจาก Linear mixed-effects model

4.ผลการเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์น้ำใสและผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion

4.1 สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม เลือกค่า MIC ที่สูงสุดจากการทดลองข้างต้นที่ทดสอบกับเชื้อ 75 สายพันธุ์คือ 5 มก./มล. ในกลุ่มเชื้อดื้อยา และ 1.25 มก./มล. ในกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยา มาเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์ โดยใช้ความเข้มข้น 10 เท่าของค่า MIC คือ 5% w/w และ 1.25% w/w ตามลำดับ โดยมีส่วนประกอบดังนี้

	ในกลุ่มเชื้อดื้อยา	ในกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยา
สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อม	5 %	1.25 %
Steriled distilled water	65 %	68.75 %
Ethanol	20 %	20 %
Glycerine	10 %	10 %

ตำรับผลิตภัณฑ์ที่ได้ลักษณะเป็นน้ำขุ่นสีเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน มีกลิ่นฉุน เมื่อทาลงบนผิวให้ความรู้สึกเย็น ใช้เวลาซึมลงผิวประมาณ 10 วินาทีและระเหยหมดไม่ทิ้งคราบบนผิว ไม่แสบหรือคัน pH เท่ากับ 3

เมื่อนำตำรับผลิตภัณฑ์ไปทดสอบความคงตัวด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วย microcentrifuge ที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ผลิตภัณฑ์มีลักษณะทางกายภาพดังนี้ เป็นน้ำขุ่นสีเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ตกตะกอน เมื่อทาลงบนผิวให้ความรู้สึกเย็น ใช้เวลาซึมลงผิวประมาณ 10 วินาทีและระเหยหมดไม่ทิ้งคราบบนผิว pH เท่ากับ 3

ก่อนทดสอบความคงตัว

หลังทดสอบความคงตัว

ภาพประกอบ 19 ตำรับผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบใบมะขามป้อมก่อนและหลังทดสอบความคงตัว

4.2 สารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม เลือกค่า MIC ที่สูงสุดจากการทดลองข้างต้นที่ทดสอบกับเชื้อ 75 สายพันธุ์คือ 7.5 มก./มล. ในกลุ่มเชื้อดื้อยา และ 1.875 มก./มล. ในกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยา มาเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์ โดยใช้ความเข้มข้น 10 เท่าของค่า MIC คือ 7.5% w/w และ 1.88% w/w ตามลำดับ โดยมีส่วนประกอบดังนี้

	ในกลุ่มเชื้อดื้อยา	ในกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยา
สารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม	7.5 %	1.88 %
Steriled distilled water	62.5 %	68.12 %
Ethanol	20 %	20 %
Glycerine	10 %	10 %

ตำรับผลิตภัณฑ์ที่ได้ลักษณะเป็นน้ำขุ่นสีเหลืองอ่อน ไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน มีกลิ่นฉุน เมื่อทาลงบนผิวให้ความรู้สึกเย็น ใช้เวลาซึมลงผิวประมาณ 10 วินาทีและระเหยหมดไม่ทิ้งคราบบนผิว ไม่แสบหรือคัน pH เท่ากับ 5

เมื่อนำตำรับผลิตภัณฑ์ไปทดสอบความคงตัวด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วย microcentrifuge ที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ผลิตภัณฑ์มีลักษณะทางกายภาพดังนี้ เป็นน้ำขุ่นสีเหลืองอ่อน ไม่แยกชั้น ตกตะกอน เมื่อทาลงบนผิวให้ความรู้สึกเย็น ใช้เวลาซึมลงผิวประมาณ 10 วินาทีและระเหยหมดไม่ทิ้งคราบบนผิว pH เท่ากับ 5

ก่อนทดสอบความคงตัว

หลังทดสอบความคงตัว

ภาพประกอบ 20 ตำรับผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบเปลือกทับทิมก่อนและหลังทดสอบความคงตัว

4.3 สารสกัดหยาบจากเหง้าขมิ้นชัน เลือกค่า MIC ที่สูงสุดจากการทดลองข้างต้นที่ทดสอบกับเชื้อ 75 สายพันธุ์คือ 10 มก./มล. ในกลุ่มเชื้อดื้อยาและ 10 มก./มล. ในกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยา มาเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์ โดยใช้ความเข้มข้น 10 เท่าของค่า MIC คือ 10% w/w และ 10% w/w ตามลำดับ โดยมีส่วนประกอบดังนี้

	ในกลุ่มเชื้อดื้อยา	ในกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยา
สารสกัดหยาบจากเหง้าขมิ้นชัน	10 %	10 %
Steriled distilled water	60 %	60 %
Ethanol	20 %	20 %
Glycerine	10 %	10 %

ตำรับผลิตภัณฑ์ที่ได้ลักษณะเป็นน้ำขุ่นสีแดงอิฐออกส้ม แยกชั้น มีตะกอน มีกลิ่นฉุน เมื่อทาลงบนผิวให้ความรู้สึกเย็น ใช้เวลาซึมลงผิวประมาณ 5 วินาทีและระเหยหมด ทิ้งคราบบนผิวเป็นสีเหลือง ไม่แสบหรือคัน pH เท่ากับ 3

เมื่อนำตำรับผลิตภัณฑ์ไปทดสอบความคงตัวด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วย microcentrifuge ที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ผลิตภัณฑ์มีลักษณะทางกายภาพเหมือนก่อนทดสอบดังนี้ เป็นน้ำขุ่นสีแดงอิฐออกส้ม มีตะกอน มีกลิ่นฉุน เมื่อทาลงบนผิวให้ความรู้สึกเย็น ใช้เวลาซึมลงผิวประมาณ 5 วินาทีและระเหยหมด ทิ้งคราบบนผิวเป็นสีเหลือง pH เท่ากับ 3 และแยกชั้นมากขึ้น

ก่อนทดสอบความคงตัว

หลังทดสอบความคงตัว

ภาพประกอบ 21 ตำรับผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบเห้าขมิ้นชันก่อนและหลังทดสอบความคงตัว

4.4 นำตำรับผลิตภัณฑ์ของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* โดยเลือกสายพันธุ์ที่มีค่า MIC สูงที่สุดจากการทดลองข้างต้นจากกลุ่มเชื้อดื้อยาและกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยา ด้วยวิธี agar well diffusion ได้ผลดังตาราง 11

ตาราง 11 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลเป็นวงใสเส้นผ่านศูนย์กลางรอบ well (MIZ) เป็น มม. เทียบกับตัวควบคุมที่ไม่มีส่วนประกอบของสารสกัดหยาบสมุนไพร (negative control)

ผลิตภัณฑ์รูปแบบน้ำใส	**เชื้อ *P. acnes***	MIZ	*p*-value*
มีสารสกัดหยาบ	ที่ดื้อยา	25.33	
ใบมะขามป้อม	ที่ไม่ดื้อยา	18.00	0.053
ตัวควบคุม	ทั้งหมด	-	
มีสารสกัดหยาบ	ที่ดื้อยา	22.00	
เปลือกทับทิม	ที่ไม่ดื้อยา	12.50	0.053
ตัวควบคุม	ทั้งหมด	-	
มีสารสกัดหยาบ	ที่ดื้อยา	-	
เหง้าขมิ้นชัน	ที่ไม่ดื้อยา	-	-
ตัวควบคุม	ทั้งหมด	-	

ขนาดหลุม (well) เท่ากับ 4 มม. -: ไม่มีวงใสของการยับยั้งรอบหลุมสารสกัดหยาบสมุนไพร. **p*-value คิดจาก Wilcoxon Rank-Sum test

เมื่อได้ผล MIZ ของตำรับผลิตภัณฑ์ของแต่ละสารสกัดหยาบสมุนไพร นำมาเปรียบเทียบความแตกต่างในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ระหว่างผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดหยาบสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ควบคุมที่ไม่มีส่วนประกอบของสารสกัดหยาบจากสมุนไพร (negative control) พบว่าสามารถยับยั้งได้และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตาราง 11

เปรียบเทียบระหว่างตำรับผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดหยาบใบมะขามป้อมและตำรับผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดหยาบเปลือกทับทิม พบว่าความสามารถการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองตำรับผลิตภัณฑ์นี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 12 เปรียบเทียบความแตกต่างของตำรับผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes*

ผลิตภัณฑ์รูปแบบน้ำใส	**เชื้อ *P. acnes***	MIZ	*p*-value*
มีสารสกัดหยาบใบมะขามป้อม	ที่ดื้อยา	25.33	0.439
	ที่ไม่ดื้อยา	18.00	
มีสารสกัดหยาบเปลือกทับทิม	ที่ดื้อยา	22.00	
	ที่ไม่ดื้อยา	12.50	

ขนาดหลุม (well) เท่ากับ 4 มม. **p*-value คิดจาก Wilcoxon Rank-Sum test

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผล

สิวเป็นหนึ่งในโรคผิวหนังที่พบบ่อย ทั้งในเพศชายและหญิง ซึ่งจะพบอุบัติการณ์สูงช่วงวัยรุ่นและผู้ใหญ่ตอนต้น สิวเกิดจากทั้งปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน เช่น พันธุกรรม ฮอร์โมน ภาวะเครียด และการกินอาหารที่มีดัชนีน้ำตาลสูง เป็นต้น[2, 15] พยาธิกำเนิดของโรคประกอบด้วย 4 ปัจจัยหลัก ได้แก่ การหนาตัวของชั้นหนังกำพร้าที่รูขุมขน (follicular hyperproliferation)[11] การผลิตไขมันเพิ่มสูงขึ้น (hyperseborrhea) การเกิดการอักเสบ (inflammatory response) และการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Propionibacterium acnes* ที่บริเวณผิวหนัง (*P. acnes* hyperproliferation)

เชื้อ *P. acnes* เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเกิดสิว เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียนี้เองสามารถกระตุ้นทั้งการอักเสบ การหนาตัวของชั้นหนังกำพร้าและทำให้สร้างไขมันจากต่อมไขมันเพิ่มขึ้นด้วย จะเห็นได้ว่าเชื้อ *P. acnes* เป็นสาเหตุทั้งสิวชนิดอักเสบและสิวชนิดไม่อักเสบ[32]

การรักษาสิวมีหลายวิธีมีทั้งยาทา ยากิน และการรักษาเสริมต่าง ๆ ขึ้นกับความรุนแรงของอาการทางคลินิก ยาทาปฏิชีวนะทั้ง clindamycin และ erythromycin เป็นหนึ่งในยาทารักษาสิวที่ใช้อย่างแพร่หลาย นอกจากแพทย์จะเป็นผู้สั่งจ่าย ผู้ป่วยยังสามารถซื้อใช้เองได้ (over-the-counter drug) รวมไปถึงผู้ป่วยขาดความรู้ความเข้าใจในการรักษาสิวและใช้ยาทาปฏิชีวนะเป็นยาทาเดี่ยว (monotherapy)[7, 8] ทำให้เกิดปัญหาเชื้อ *P. acnes* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ มีการศึกษาพบว่าปัญหาเชื้อ *P. acnes* ดื้อยาเพิ่มสูงขึ้นทั่วโลกทั้งในยุโรปและเอเชีย[58] รวมถึงประเทศไทย ประเทศไทยอัตราความชุกของ *P. acnes* ดื้อยาเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเทียบงานวิจัยที่ทำการศึกษาในปีพ.ศ. 2544[64] และงานวิจัยล่าสุดของประเทศไทยที่ทำในปีพ.ศ. 2559 พบว่าเชื้อดื้อต่อยา clindamycin ร้อยละ 6.15 ในปีพ.ศ. 2544 แต่ในปีพ.ศ. 2559 อัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 62.66 ส่วนในปีพ.ศ. 2544 อัตราเชื้อดื้อยา erythromycin คิดเป็นร้อยละ 6.15 และเพิ่มเป็นร้อยละ 64 ในปีพ.ศ. 2559 จากงานวิจัยในปีพ.ศ. 2559 ของ Laochunsuwan A. พบว่าการดื้อยาของเชื้อ *P. acnes* สัมพันธ์กับอายุและประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะนำมาก่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[9]

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มีการศึกษาวิจัยจำนวนมากเกี่ยวกับสมุนไพรไทย พบว่าสมุนไพรไทยมีสารออกฤทธิ์ (phytochemicals) หลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าใบมะขามป้อม เปลือกทับทิม เหง้าขมิ้นชัน มีสารพฤกษเคมีหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอล (phenols) ฟลาโว

นอยด์ (flavonoids) แทนนิน (tannins) อัลคาลอยด์ (alkaloids) และสารกลุ่มซาโปนิน (saponins) เป็นต้น ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เคยมีงานวิจัยทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสมุนไพร 3 ชนิดนี้กับเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการ พบว่าสารสกัดหยาบของสารทั้งสามตัวนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ได้ แต่ยังไม่พบการศึกษาดังกล่าวในเชื้อ *P. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิว นอกจากนี้ยังพบว่าเปลือกทับทิมและเหง้าขมิ้นชัน ไม่พบการระคายเคืองต่อผิวหนังมนุษย์ ส่วนใบมะขามป้อมพบมีการระคายเคืองต่อผิวหนังสัตว์ทดลอง แต่ยังไม่มีรายงานว่าพบการระคายเคืองต่อผิวหนังมนุษย์ และที่สำคัญสมุนไพรไทยทั้งสามชนิดนี้สามารถหาได้ง่าย พบในทุกภาคของประเทศไทย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิวทั้งหมด 75 สายพันธุ์ โดยเป็นการศึกษาในห้องทดลองเชิงพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ประยุกต์ เพื่อนำมาพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์ยับยั้งเชื้อ *P. acnes* จากสมุนไพรไทย เพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยสิว ลดปัญหาเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะในปัจจุบัน รวมถึงยังพัฒนาส่งเสริมการใช้สมุนไพรไทยให้เป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายต่อไป นอกจากนี้ยังเพิ่มมูลค่าให้สมุนไพรไทย

โดยสรุปการศึกษาวิจัยนี้ ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ทั้งหมด 75 เชื้อที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยสิวจากงานวิจัยของ Laochunsuwan A[9] ของสารสกัดหยาบใบมะขามป้อม สารสกัดหยาบเปลือกทับทิมและสารสกัดหยาบเหง้าขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทานอล โดยการหมักทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยวัดจากวงใสของการยับยั้ง (MIZ) ด้วยวิธี agar well diffusion และนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution จากนั้นนำสารสกัดหยาบทั้งสามชนิดมาเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์น้ำใสเบื้องต้น แล้วทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion อีกครั้ง

อภิปรายผลการทดลอง

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* โดยวิธี agar well diffusion

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าสารสกัดหยาบเหง้าขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทานอลให้ผลการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ไม่ดี โดยไม่เห็นโซนใสของการยับยั้งรอบสารสกัดของเชื้อทั้ง 75 สายพันธุ์ ส่วนสารสกัดหยาบใบมะขามป้อมและเปลือกทับทิมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ได้ โดยเห็นโซนใสของการยับยั้งรอบหลุมสารสกัดหยาบสมุนไพร ทั้งนี้ความเข้มข้นที่ 10 มก./มล. ของแต่ละสารสกัดหยาบวงใสของการยับยั้งจะมีค่ามากกว่าที่ความเข้มข้น 5 มก./มล.

อย่างไรก็ยังคงนำสารสกัดหยาบเหง้าขมิ้นชันมาทดลองด้วยวิธี broth microdilution เนื่องจากมีงานวิจัยหนึ่งพบว่าสารออกฤทธิ์หลักในเหง้าขมิ้นชันที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียคือ เคอร์คูมิน (curcumin) เป็นสารกลุ่มฟีนอลที่ให้สีเหลือง ชอบไขมัน (lipophilic substance)และไม่มีขั้ว สามารถละลายได้ในเอทานอล อะซีโตน คีโตนและคลอโรฟอร์ม แต่ไม่ละลายในน้ำ สาร curcumin ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียผ่านทางการจับกับไลโปโปรตีน (lipoproteins) ที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (permeability) ของแบคทีเรียเสียไป นำไปสู่การตายของแบคทีเรีย[187]

วิธี agar well diffusion ต้องเลี้ยงเชื้อ *P. acnes* ใน Brain Heart Infusion agar (BHI agar) ซึ่ง BHI agar ประกอบด้วย เด็กซ์โตรส (dextrose) ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate) โซเดียม คลอไรด์ (sodium chloride) น้ำที่ผ่านขบวนการขจัดอิออนของสารละลายทั้งหมด (deionized water) วุ้น (agar) สาร Brain Heart Infusion from ที่เป็นรูปของแข็งเอนไซม์ที่ไว้ย่อยเนื้อเยื่อของสัตว์ และเอนไซม์จากตับอ่อนที่ไว้ย่อยเคซีน (casein) ส่วนประกอบทั้งหมดของ BHI agar ที่กล่าวมาเป็นสารที่มีขั้ว ทำให้สารออกฤทธิ์ curcumin ไม่สามารถละลายผ่าน BHI agar ได้ จึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ได้ ส่งผลให้ไม่เห็นวงใสของการยับยั้งดังผลการทดลอง

ส่วนสารออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบของใบมะขามป้อมและเปลือกทับทิมเป็นสารที่มีขั้วและชอบน้ำ (hydrophilic substances) จึงละลายผ่าน BHI agar ได้ จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่าสารออกฤทธิ์ที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของใบมะขามป้อมคือ กรดเชบูลินิค (chebulinic acid) และ กรดเชบูเลกิค (chebulagic acid) เป็นสารประกอบกลุ่มแทนนิน[188] ส่วนสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเปลือกทับทิมคือ พูนิคาลิน (punicalin), พีดันคูลากิน (pedunculagin) และ พูนิคาลากิน (punicalagin) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแทนนินเช่นกัน[189] แทนนินเป็นสารที่ละลายในน้ำและแอลกอฮอล์ มีความเป็นกรด ให้รสฝาด กลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแทนนินมีหลายกลไก เช่น ออกฤทธิ์โดยตรงต่อกระบวนการเมตาบอลิสม (metabolism) ผ่านทางการยับยั้งการสร้าง ATP ที่มีกระบวนการ oxidation เกิดขึ้นด้วย (oxidative phosphorylation) ลดปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทำให้เกิดภาวะขาดเหล็กของแบคทีเรีย (iron deprivation) เป็นต้น[190, 191]

โดยสรุปจากการทดลองด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิมและสารสกัดหยาบจากมะขามป้อม ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยเห็นวงใสของการยับยั้งล้อมรอบหลุม (well) และที่ความเข้มข้น 10 มก./มล. วงใสของการยับยั้งจะมีค่ามากกว่าที่ความเข้มข้น 5 มก./มล. ส่วนสารสกัดหยาบจากเหง้าขมิ้นชันไม่พบวงใสของการยับยั้งรอบหลุม ผู้วิจัยจึง

สันนิษฐานว่าสารออกฤทธิ์ในใบมะขามป้อมและเปลือกทับทิมเป็นสารที่มีขั้ว ละลายผ่าน BHI agar ได้ ส่วนสารออกฤทธิ์ในเห้าขมิ้นชันเป็นสารที่ไม่มีขั้ว จึงละลายผ่าน BHI agar ไม่ได้

ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ*P. acnes* (Minimum inhibitory concentration/MIC) ด้วยวิธี broth microdilution

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion ซึ่งเป็นการคัดกรองในเบื้องต้นว่าสารสกัดหยาบนั้น ๆ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหรือไม่ เมื่อได้ผลแล้วจึงเลือกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* มาเป็นความเข้มข้นเริ่มต้นในการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* (MIC) ต่อไป ในส่วนของสารสกัดหยาบจากเห้าขมิ้นชันนั้น แม้ว่าจะไม่มีวงใสของการยับยั้งในการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion แต่จากที่กล่าวข้างต้นผู้วิจัยสันนิษฐานว่าเปลือกขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. acnes* จึงนำมาทดสอบหาค่า MIC ต่อ โดยเริ่มที่ความเข้มข้นสูงสุด (10 มก./มล.)

การแปลผลการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution ใช้วิธีสังเกตในหลุมของ 96-well plates ว่าหลุมใดที่ไม่เกิดความขุ่นขึ้นแสดงถึงการยับยั้งการเจริญของเชื้อ จึงอ่านผลที่ความเข้มข้นนั้น อย่างไรก็ตามการแปลผลเรื่องความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดสอบนี้ทำได้ยาก เพราะสารสกัดหยาบของสมุนไพรบางชนิดออกสีเหลืองและเชื้อ *P. acnes* มีลักษณะเป็นครีม นอกจากนี้สารสกัดหยาบมีการตกตะกอน จึงทำให้ยากในการสังเกตว่าขุ่นหรือไม่ แต่เนื่องจากมีหลุมควบคุมและผู้วิจัยทำซ้ำ (duplicate) ในทุกการทดลองและทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง พบว่าผลของค่า MIC ของแต่ละการทดลองมีค่าเท่ากันหรือใกล้เคียงกันทั้งสิ้น จึงเชื่อได้ว่ามีความถูกต้องแม่นยำ

ผลการทดลองเป็นดังที่กล่าวในบทที่ 4 ค่า MIC โดยเฉลี่ยของสารสกัดหยาบใบมะขามป้อมเท่ากับ 0.559 มก./มล. เปลือกทับทิมเท่ากับ 1.003 มก./มล. และเห้าขมิ้นชันเท่ากับ 3.804 มก./มล. แปลผลได้ว่าสารสกัดหยาบใบมะขามป้อมมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ดีที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดหยาบเปลือกทับทิม และอันดับสุดท้ายคือสารสกัดหยาบเห้าขมิ้นชัน โดยที่ความแตกต่างของความสามารถในการยับยั้งเชื้อ P. acnes ระหว่างใบมะขามป้อมและเปลือกทับทิมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่ระหว่างใบมะขามป้อมและเห้าขมิ้นชัน รวมถึงเปลือกทับทิมและเห้าขมิ้นชันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้าที่นำสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการ พบว่าค่า MIC ของใบมะขามป้อมต่อเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการเท่ากับ 2.5 มก./มล. MIC ของเปลือกทับทิมต่อเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของ

ห้องปฏิบัติการเท่ากับ 0.156 มก./มล. และ MIC ของเหง้าขมิ้นชันต่อเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการเท่ากับ 0.024 มก./มล.[94, 192] ซึ่งจะเห็นว่าลำดับความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดต่างกับงานวิจัยนี้กล่าวคืองานวิจัยครั้งนี้สารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อดีที่สุด ในขณะที่งานวิจัยก่อนหน้าสารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด ซึ่งเชื้อ *P. acnes* ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยสิวอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมจริงในชีวิตประจำวันของคนไข้ ผ่านการใช้ยาและการรักษาต่าง ๆ จึงแสดงว่าการทำการทดลองในเชื้อ *P. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิวน่าจะเป็นตัวแทนภาวะทางคลินิกได้ดีว่าการทดลองที่ทำในเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ผู้วิจัยสันนิษฐานว่าสารออกฤทธิ์หลักของเหง้าขมิ้นชันคือ curcumin นั้นมีการใช้อย่างแพร่หลายทั้งในผลิตภัณฑ์รูปแบบทาและรูปแบบรับประทาน จึงอาจทำให้ผล MIC ในการทดลองนี้ที่ทำการศึกษากับเชื้อ *P. acnes* ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยสิวมีค่าสูงที่สุดจากสารสกัดหยาบสมุนไพรทั้งหมด ซึ่งเชื้อ *P. acnes* เหล่านี้อาจจะดื้อต่อสาร curcumin ได้

เมื่อสังเกตผล MIC เฉลี่ยของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิดจะพบว่าหากแยกเป็นกลุ่มเชื้อ *P. acnes* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและกลุ่มที่ไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือใบมะขามป้อมยับยั้งได้ดีที่สุด ส่วนเหง้าขมิ้นชันยับยั้งได้น้อยที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ MIC ของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิดระหว่าง *P. acnes* 2 กลุ่มจะเห็นว่าค่า MIC ในกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยาสูงกว่าเชื้อดื้อยา ผู้วิจัยสันนิษฐานว่ากลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *P. acnes* และกลไกการยับยั้งเชื้อของสมุนไพรเป็นคนละกลไก ทำให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อใน 2 กลุ่มนี้ไม่ไปในทิศทางเดียวกัน

ผลการเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์และผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* โดยวิธี agar well diffusion

ผู้วิจัยนำสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิดมาเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของค่า MIC ดังที่กล่าวในผลการทดลองบทที่ 4 เมื่อเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์เบื้องต้นเป็นที่เรียบร้อย จึงนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* อีกครั้งด้วยวิธี agar well diffusion

การเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์ ผู้วิจัยเลือกเตรียมตำรับยาที่เป็นน้ำใส เนื่องจากตำรับยาในรูปแบบอื่น ๆ เช่น ครีม ยาขี้ผึ้ง หรือเจล จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายหรือสารนำพายาที่อุดตันรูขุมขนก่อให้เกิดสิวได้ จึงไม่เหมาะกับการพัฒนาตำรับยาเพื่อใช้ในการรักษาสิว[193] นอกจากนี้ผู้วิจัยเลือกใช้ตัวทำละลายและตัวนำพายาที่หาได้ง่าย มีความสารมารถละลายได้กว้าง มีใช้ทั่วไปสำหรับตำรับยา

น้ำใส ราคาไม่แพง ไม่ก่อให้เกิดสิวและก่อให้เกิดอาการระคายเคืองต่ำ นั่นคือ เอทานอล น้ำกลั่นและกลีเซอรีน เท่านั้น

ผลของการเตรียมผลิตภัณฑ์ของสารสกัดหยาบใบมะขามป้อม พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำขุ่นสีเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน มีกลิ่นฉุน ไม่แสบหรือคัน ซึมลงผิวเร็วและไม่ทิ้งคราบบนผิว pH เท่ากับ 3 หลังการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมในข้อกำหนดทั่วไปสำหรับเครื่องสำอาง (มอก.152-2539)[194] พบว่าลักษณะอื่น ๆ เหมือนก่อนทดสอบ แต่หลังทดสอบเกิดตกตะกอน

ผลิตภัณฑ์ของสารสกัดหยาบเปลือกทับทิม ได้ลักษณะน้ำขุ่นสีเหลืองอ่อน ไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน มีกลิ่นฉุน ไม่แสบหรือคัน ซึมลงผิวเร็วและไม่ทิ้งคราบบนผิว pH เท่ากับ 5 หลังการทดสอบ พบว่าลักษณะอื่น ๆ เหมือนก่อนทดสอบ แต่หลังทดสอบเกิดตกตะกอน

ส่วนตำรับผลิตภัณฑ์ของสารสกัดหยาบเหง้าขมิ้นชัน ได้ลักษณะน้ำขุ่นสีแดงอิฐออกส้ม แยกชั้น มีตะกอน มีกลิ่นฉุน ไม่แสบหรือคัน ซึมลงผิวเร็วและทิ้งคราบบนสีเหลืองผิว pH เท่ากับ 3 หลังการทดสอบ พบว่าลักษณะอื่น ๆ เหมือนก่อนทดสอบ แต่การแยกชั้นมากขึ้น

จากผลของตำรับผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สมุนไพร พบว่าความคงตัวของผลิตภัณฑ์ยังไม่ดี มีกลิ่นฉุน ทิ้งคราบบนผิวในบางสารสกัด แต่เนื่องจากตำรับผลิตภัณฑ์นี้เป็นเพียงการเตรียมตำรับยาในเบื้องต้นเท่านั้น หากจะนำไปผลิตเป็นตำรับผลิตภัณฑ์เพื่อใช้จริงอาจจะต้องมีการแต่งกลิ่น การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ของแต่ละสารสกัด ใส่สารกันเสียเพิ่มเติมเพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวและน่าใช้มากขึ้น โดยควรพิจารณาเลือกสารกันเสียและสารแต่งกลิ่นที่ไม่ก่อให้เกิดสิวและอาการระคายเคืองของผิวหนัง

อย่างไรก็ตามจากภาวะค่า pH ปกติของผิวหนังมีค่าประมาณ 4.5 – 5.5 ในหญิงและประมาณ 4 – 5.5 ในชาย พบว่าผิวหนังปกติมีภาวะเป็นกรด ซึ่งภาวะนี้ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเกราะป้องกันผิว (barrier system of the skin) ป้องกันเชื้อโรคและการอักเสบต่าง ๆ ได้[195] นอกจากนี้ภาวะผิวหนังเป็นกรดยังทำให้เชื้อ *P. acnes* ที่อาศัยอยู่ในต่อมไขมันและรูขุมขน (pilosebaceous follicle) บนผิวหนัง ไม่เพิ่มจำนวนและทำงานมากขึ้น จนก่อให้เกิดการอักเสบและเป็นสิวตามมา เนื่องจากเชื้อ *P. acnes* จะเจริญได้ดีในสภาวะ pH เท่ากับ 6 – 6.5[196] จะเห็นว่าตำรับผลิตภัณฑ์เบื้องต้นที่ผู้วิจัยทำขึ้นนั้น ทั้ง 3 สารสกัดมีค่า pH เป็นกรดทั้งสิ้น โดยที่ตำรับผลิตภัณฑ์เปลือกทับทิมค่า pH เท่ากับ 5 ใกล้เคียงกับผิวหนังปกติมากที่สุด จะไม่เป็นการรบกวนสมดุลความเป็นกรดด่างของผิวและยังยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ได้ ส่วนตำรับผลิตภัณฑ์ของใบมะขามป้อมและเหง้าขมิ้นชันมีค่า pH เท่ากับ 3 มีความเป็นกรดสูงกว่าเปลือกทับทิม อาจจะรบกวนสมดุลความ

เป็นกรดด่างของผิวและก่อให้เกิดอาการระคายเคืองได้[197] แต่ข้อดีคือสภาวะนี้จะไม่เหมาะแก่การเจริญของเชื้อ *P. acnes*

เมื่อนำตำรับผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *P. acnes* เบื้องต้นด้วยวิธี agar well diffusion อีกครั้ง พบว่าตำรับยาน้ำใสของสารสกัดหยาบจากใบมะขามป้อมและตำรับยาน้ำใสของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิมนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ได้ โดยที่ยับยั้งได้ทั้งกลุ่มที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่เลือกมาเป็นตัวแทนของกลุ่ม (เลือกจากเชื้อที่มีค่า MIC สูงที่สุดจากแต่ละกลุ่ม เพื่อแทนว่าเป็นเชื้อที่น่าจะยับยั้งการเจริญเติบโตได้ยาก) เมื่อเทียบกับตำรับผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผสมสารสกัดหยาบที่ใช้เป็น negative control นั้นไม่พบว่ามีโซนใสของการยับยั้งแต่อย่างใด ส่วนตำรับยาน้ำใสของสารสกัดหยาบจากเหง้าขมิ้นชันไม่พบมีโซนใสของการยับยั้งเหมือนเช่นผลการทดลองก่อนหน้า ผู้วิจัยสันนิษฐานว่าผลวิจัยที่ได้ของตำรับยาน้ำใสของสารสกัดหยาบจากเหง้าขมิ้นชันมีคุณสมบัติเช่นเดียวกันกับที่กล่าวไปข้างต้น จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งด้วยวิธี agar well diffusion

สรุปผล

ใบมะขามป้อม เปลือกทับทิม และเหง้าขมิ้นชันมีสารพฤกษเคมีหลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการได้ แต่ไม่เคยมีงานวิจัยที่นำสารสกัด 3 ชนิดนี้มาทดสอบกับเชื้อ *P. acnes* ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยสิว การศึกษานี้พบว่าสารสกัดหยาบใบมะขามป้อมและสารสกัดหยาบเปลือกทับทิมที่สกัดด้วยเอทานอลโดยวิธีการหมัก มีสารออกฤทธิ์ที่มีขั้ว ส่วนสารสกัดหยาบเหง้าขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทานอล มีสารออกฤทธิ์ที่ไม่มีขั้ว โดยสารทั้งสามชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิวได้ โดยค่า MIC เรียงจากใบมะขามป้อม เปลือกทับทิม และเหง้าขมิ้นชันเท่ากับ 0.559 มก./มล.1.003 มก./มล. และ 3.804 มก./มล. ตามลำดับ

เมื่อนำสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมาทำเป็นตำรับผลิตภัณฑ์น้ำใสเบื้องต้นของแต่ละสมุนไพร พบว่าผลิตภัณฑ์ยังไม่มีความคงตัวหลังทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ตามมอก.152-2539 แต่มีค่า pH เป็นกรดทั้ง 3 ตำรับ ซึ่งเหมาะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* และเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* พบว่าใบมะขามป้อมและเปลือกทับทิมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ส่วนเหง้าขมิ้นชันไม่พบโซนใสของการยับยั้งรอบหลุมสารสกัดหยาบสมุนไพร ผลสอดคล้องกับการทดลองครั้งแรกที่ยังไม่นำมาทำตำรับผลิตภัณฑ์

การศึกษาครั้งนี้นำไปสู่การค้นพบสมุนไพรไทยพื้นบ้านทั้ง 3 ชนิดที่ราคาไม่แพง หาง่าย พบได้ทุกภาคของประเทศไทยซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิว ซึ่งไม่เคยมีงานวิจัยใดที่นำสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้มาทำกับเชื้อ *P. acnes* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยสิวมาก่อน นอกจากนี้สารสกัดหยาบสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้อีกด้วย ซึ่งการค้นพบครั้งนี้อาจนำไปสู่การศึกษาวิจัยต่อยอดเพื่อพัฒนาตำรับยาเพื่อเป็นการรักษาทางเลือกในกลุ่มผู้ป่วยสิวซึ่งเหมาะกับผู้ป่วยสิวในปัจจุบัน และเพื่อลดอุบัติการณ์การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *P. acnes* อีกด้วย นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมการใช้สมุนไพรไทยพื้นบ้าน และเพิ่มมูลค่าให้สมุนไพรไทย

ข้อเสนอแนะ

1.การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น จึงใช้สารสกัดหยาบสมุนไพร หากเป็นไปได้ในอนาคตควรทำการวิเคราะห์และสกัดแยกหาสารออกฤทธิ์ที่เป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อไป

2.ปริมาณสารออกฤทธิ์ของสมุนไพรในแต่ละฤดู แต่ละช่วงวัน และแต่ละภูมิภาคมีความแตกต่างกัน หากมีการทำซ้ำผลการทดลองอาจมีการคลาดเคลื่อนได้

3.การเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์ อาจพัฒนาตำรับยาที่มีประสิทธิภาพและความคงตัวมากกว่านี้ เช่น นำสารออกฤทธิ์ของสมุนไพรนั้น ๆ มาเป็นส่วนประกอบหลักแทนการใช้สารสกัดหยาบ อาจมีการเติมสารกันเสียหรือแต่งกลิ่น เป็นต้น เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวและน่าใช้มากยิ่งขึ้น

4.ควรมีการการศึกษาต่อยอด หลังจากที่สกัดสารออกฤทธิ์ของแต่ละสมุนไพรและปรับตำรับผลิตภัณฑ์เรียบร้อยแล้ว โดยทำการศึกษาเรื่องความปลอดภัยและความระคายเคืองในสัตว์ทดลองและนำมาประยุกต์ใช้ในการทดลองทางคลินิกกับผู้ป่วยสิวต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

1. Tan JKL, Bhate K. (2015). A global perspective on the epidemiology of acne. *British Journal of Dermatology*. 172: 3-12.
2. Picardo M, Eichenfield LF, Tan J. (2017). Acne and Rosacea. *Dermatology and Therapy.* 7(1): 43-52.
3. Bhate K, Williams HC. (2013). Epidemiology of acne vulgaris. *British Journal of Dermatology.* 168(3): 474-85.
4. Nagy I, Pivarcsi A, Kis K, Koreck A, Bodai L, McDowell A, et al. (2006). Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes and Infection.* 8(8): 2195-205.
5. Leccia MT, Auffret N, Poli F, Claudel JP, Corvec S, Dreno B. (2015). Topical acne treatments in Europe and the issue of antimicrobial resistance. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 29(8): 1485-92.
6. Noppakun N, Sindhuphak W, Wattanakrai P, Akaraphanth R, Timpatanapong P, et a. (2010). Clinical practice guideline in acne. *Clinical Practice Guideline.* 58-80.
7. Hoover WD, Davis SA, Fleischer AB, Feldman SR. (2014). Topical antibiotic monotherapy prescribing practices in acne vulgaris. *Journal of Dermatological Treatment.* 25(2): 97-9.
8. Walsh TR, Efthimiou J, Dréno B. (2016). Systematic review of antibiotic resistance in acne: an increasing topical and oral threat. *The Lancet Infectious Diseases.* 16(3): e23-e33.
9. Laochunsuwan A, Taweechotipatr M, Udompataikul M. (2017). *In vitro study of antibiotic susceptibility of Propionibacterium acnes isolated from acne vulgaris patients.* Dissertation, Ms.C. (Dermatology). Thailand: Srinakharinwirot University. Photocopied.
10. Gollnick H, Cunliffe W, Berson D, Dreno B, Finlay A, Leyden JJ, et al. (2003). Management of Acne: A Report From a Global Alliance to Improve Outcomes in

Acne. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 49(1, Supplement): S1-S37.

11. Lynn DD, Umari T, Dunnick CA, Dellavalle RP. (2016). The epidemiology of acne vulgaris in late adolescence. *Adolescent Health, Medicine and Therapeutics*. 7: 13-25.
12. Layton A, Eady A, Zouboulis CC. (2016). *Acne.* In: Griffiths CE, Barker J, Bleiker T, al e, editors. Rook's Textbook of Dermatology. 9th. United kingdom: Wiley blackwell. p. 90.1 - .66.
13. Whitsitt J, Karimkhani C, Boyers LN, Lott JP, Dellavalle RP. (2015). Comparing burden of dermatologic disease to search interest on google trends. *Dermatology Online Journal*. 21(1).
14. Dréno B, Jean-Decoster C, Georgescu V. (2016). Profile of patients with mild-to-moderate acne in Europe: a survey. *European Journal of Dermatology*. 26(2): 177-84.
15. El-Fetoh NMA, Alenezi NG, Alshamari NG, Alenezi OG. (2016). Epidemiology of acne vulgaris in adolescent male students in Arar, Kingdom of Saudi Arabia. *The Journal Of The Egyptian Public Health Association*. 91(3): 144-9.
16. S zabó K, Kemény L. (2011). Studying the genetic predisposing factors in the pathogenesis of acne vulgaris. *Human Immunology*. 72(9): 766-73.
17. Li L, Wu Y, Li L, Cai YF, Geng L, Gao XH, et al. (2015). The tumour necrosis factor-α 308G>A genetic polymorphism may contribute to the pathogenesis of acne: a meta-analysis. *Clinical and Experimental Dermatology*. 40(6): 682-7.
18. Lichtenberger R, Simpson MA, Smith C, Barker J, Navarini AA. (2017). Genetic architecture of acne vulgaris. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 31(12): 1978-90.
19. Webster GF. (2002). Acne vulgaris. *British Medical Journal*. 325(7362): 475-9.
20. Suh DH, Kwon HH. (2015). What's new in the physiopathology of acne? *British Journal of Dermatology*. 172: 13-9.

21. Wolkenstein P, Machovcová A, Szepietowski JC, Tennstedt D, Veraldi S, Delarue A. (2018). Acne prevalence and associations with lifestyle: a cross-sectional online survey of adolescents/young adults in 7 European countries. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 32(2): 298-306.

22. Zaenglein AL, Thiboutot D. (2012). *Acne Vulgaris.* In: Bolognia JL, Jorizzo JL, Schaffer JV, editors. Dermatology. 3th ed. USA: Elsevier.

23. มนตรี อุดมเพทายกุล. (2558). *การรักษาสิว*. In:เวชศาสตร์ผิวพรรณในวัยเด็ก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บริษัท บียอนด์ เอ็นเทอร์ไพรซ์ จำกัด. p. 89-118.

24. Zouboulis CC, Picardo M, Ju Q, Kurokawa I, Tör**ő**csik D, Bíró T, et al. (2016). Beyond acne: Current aspects of sebaceous gland biology and function. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders.* 17(3): 319-34.

25. Ottaviani M, Camera E, Picardo M. (2010). Lipid Mediators in Acne. *Mediators of Inflammation.* 858176.

26. Araviiskaia E, Dréno B. (2016). The role of topical dermocosmetics in acne vulgaris. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 30(6): 926-35.

27. Zouboulis CC. (2014). Acne and sebaceous gland function. *Clinics in Dermatology*. 22(5): 360-6.

28. Zouboulis CC, Jourdan E, Picardo M. (2014). Acne is an inflammatory disease and alterations of sebum composition initiate acne lesions. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 28(5): 527-32.

29. Zouboulis CC, Eady A, Philpott M, Goldsmith LA, Orfanos C, Cunliffe WC, et al. (2005). What is the pathogenesis of acne? *Experimental Dermatology*. 14(2): 143-52.

30. Jeremy AHT, Holland DB, Roberts SG, Thomson KF, Cunliffe WJ. (2003). Inflammatory Events Are Involved in Acne Lesion Initiation. *Journal of Investigative Dermatology.* 121(1): 20-7.

31. Leyden JJ, McGinley KJ, Mills OH, Kligman AM. (1975). Propionibacterium Levels In Patients With And Without Acne Vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology.* 65(4): 382-4.

32. Beylot C, Auffret N, Poli F, Claudel JP, Leccia MT, Del Giudice P, et al. (2014). Propionibacterium acnes: an update on its role in the pathogenesis of acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 28(3): 271-8.

33. Kumar B, Pathak R, Mary PB, Jha D, Sardana K, Gautam HK. (2016). New insights into acne pathogenesis: Exploring the role of acne-associated microbial populations. *Dermatologica Sinica.* 34(2): 67-73.

34. Norris JFB, Cunliffe WJ. (1988). A histological and immunocytochemical study of early acne lesions. *British Journal of Dermatology.* 118(5): 651-9.

35. Becker M, Wild T, Zouboulis CC. Objective assessment of acne. Clinics in Dermatology. 2017; 35(2): 147-55.

36. O'brien S, Lewis J, Cunliffe W. (1998). The Leeds revised acne grading system. *Journal of Dermatological Treatment*. 9(4): 215-20.

37. Zaenglein AL, Graber EM, Thiboutot D. (2012). *Acne Vulgaris and Acneiform Eruptions.* In:Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 8th ed. USA: McGraw-Hill. p. 897 - 917.

38. Gieler U, Gieler T, Kupfer JP. (2015). Acne and quality of life – impact and management. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 29: 12-4.

39. Lucky AW, Biro FM, Huster GA, Leach AD, Morrison JA, Ratterman J. (1994). Acne vulgaris in premenarchal girls: An early sign of puberty associated with rising levels of dehydroepiandrosterone. *Archives of Dermatology.* 130(3): 308-14.

40. Fox L, Csongradi C, Aucamp M, du Plessis J, Gerber M. (2016). Treatment Modalities for Acne. *Molecules.* 21(8): 1063.

41. Nguyen TA, Eichenfield LF. (2015). Profile of clindamycin phosphate 1.2%/benzoyl peroxide 3.75% aqueous gel for the treatment of acne vulgaris. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology.* 8: 549-54.

42. Akhavan A, Bershad S. (2003). Topical acne drugs. *American Journal of Clinical Dermatology.* 4(7): 473-92.

43. Milstone EB, McDonald AJ, Scholhamer CF, Jr. (1981). Pseudomembranous colitis after topical application of clindamycin. *Archives of Dermatology.* 117(3): 154-5.

44. Parry MF, Rha C. (1986). Pseudomembranous colitis caused by topical clindamycin phosphate. *Archives of Dermatology*. 122(5): 583-4.

45. Guay DR. (2007). Topical clindamycin in the management of acne vulgaris. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 8(15): 2625-64.

46. Farrah G, Tan E. (2016). The use of oral antibiotics in treating acne vulgaris: a new approach. *Dermatologic Therapy*. 29(5): 377-84.

47. Zouboulis CC, Piquero-Martin J. (2003). Update and Future of Systemic Acne Treatment. *Dermatology*. 206(1): 37-53.

48. Antoniou C, Dessinioti C, Stratigos AJ, Katsambas AD. (2009). Clinical and Therapeutic Approach to Childhood Acne: An Update. *Pediatric Dermatology*. 26(4): 373-80.

49. Bossuyt L, Bosschaert J, Richert B, Cromphaut P, Mitchell T, Al Abadie M, et al. (2002). Lymecycline in the treatment of acne: an efficacious, safe and cost-effective alternative to minocycline. *European Journal of Dermatology*. 13(2): 130-5.

50. Dubertret L, Alirezai M, Rostain G, Lahfa M, Forsea D, Niculae BD, et al. (2002). The use of lymecycline in the treatment of moderate to severe acne vulgaris: a comparison of the efficacy and safety of two dosing regimens. *European Journal of Dermatology*. 13(1): 44-8.

51. Zaenglein AL, Pathy AL, Schlosser BJ, Alikhan A, Baldwin HE, Berson DS, et al. (2016). Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 74(5): 945-73.e33.

52. Cheung MJ, Taher M, Lauzon GJ. (2005). Acneiform facial eruptions: A problem for young women. *Canadian Family Physician*. 51(4): 527-33.

53. Webster GF. (1990). Inflammatory Acne. *International Journal of Dermatology*. 29(5): 313-7.

54. Ross J, Snelling A, Eady E, Cove J, Cunliffe W, Leyden J, et al. (2001). Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic-resistant Propionibacterium acnes isolated from acne patients attending dermatology clinics in Europe, the USA, Japan and Australia. *British Journal of Dermatology*. 144(2): 339-46.

55. Ross JI, Eady EA, Cove JH, Jones CE, Ratyal AH, Miller YW, et al. (1997). Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 41(5): 1162-5.

56. Lomholt HB, Kilian M. (2014). Clonality and anatomic distribution on the skin of antibiotic resistant and sensitive Propionibacterium acnes. *Acta Dermato-Venereologica*. 94(5): 534-8.

57. Ross JI, Eady EA, Carnegie E, Cove JH. (2002). Detection of transposon Tn5432-mediated macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance in cutaneous propionibacteria from six European cities. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 49(1): 165-8.

58. Dessinioti C, Katsambas A. (2017). Propionibacterium acnes and antimicrobial resistance in acne. *Clinics in Dermatology*. 35(2): 163-7.

59. Davies J, Davies D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74(3): 417-33.

60. Moon SH, Roh HS, Kim YH, Kim JE, Ko JY, Ro YS. (2012). Antibiotic resistance of microbial strains isolated from Korean acne patients. *The Journal of Dermatology*. 39(10): 833-7.

61. Luk NM, Hui M, Lee H, Fu L, Liu Z, Lam L, et al. (2013). Antibiotic-resistant Propionibacterium acnes among acne patients in a regional skin centre in Hong Kong. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 27(1): 31-6.

62. Abdel Fattah N, Darwish Y. (2013). In vitro antibiotic susceptibility patterns of Propionibacterium acnes isolated from acne patients: an Egyptian university hospital-based study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 27(12): 1546-51.

63. Ross J, Snelling A, Carnegie E, Coates P, Cunliffe W, Bettoli V, et al. (2003). Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. *British Journal of Dermatology*. 148(3): 467-78.

64. Poomsuwan P. (2001). In vitro study of antibiotic sensitivity pattern of Propionibacterium acnes isolated from acne vulgaris patients Dissertation, Ms.C. (Dermatology) Thailand: Chulalongkorn university. Photocopied.

65. อัมพร ค. (2541). สารเคมีที่พบในสมุนไพรและการทดสอบเบื้องต้น. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์.* 40(1): 67-84.

66. วีณา จ. (2556). *สารฟลาโวนอยด์และสมุนไพร.* พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยลัยมหิดล.

67. รุ่งระวี เ, วงศ์สถิตย์ ถ, สมภพ ป, และคนอื่น ๆ. (2542). *สมุนไพร: ยาไทยที่ควรรู้.* พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: อมรินทร์ พริ้นติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง.

68. ลัดดาวัลย์ ค. (2559). *ตำราเภสัชกรรมไทย.* พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์แผนไทยเดิม.

69. พิมพร ล. (2543). *เครื่องสำอางค์ธรรมชาติ ผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนัง.* พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

70. วีณา จ. (2534). *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ.* พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

71. รศ.ดร.วราภรณ์ จ, รศ.ดร.นพมาศ ส, ตีรณะชัยดีกุล ดว. (2558). *คู่มือการผลิตเครื่องสำอางขั้นพื้นฐาน.* พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: กองวิชาการ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา.

72. เย็นจิตร เ. (2551). *คู่มือการใช้สมุนไพรไทย-จีน.* พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข.

73. อนุชิต พ. (2545). *การพัฒนาคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพร.* พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา: ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

74. ดวงกมล เ. (2557). การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง.* 23(2).

75. Collins CH, Lyne PM, Grange JM. (1995). *Antimicrobial Susceptibility Tests.* Microbiological methods. Oxford: Butterworth-Heinemann. p. 178 - 205.

76. Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Österlund A, et al. (2003). European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 52(2): 145-8.

77. Lalitha M. (2004). *Manual on antimicrobial susceptibility testing* (under the auspices of Indian association of medical microbiologists). Vellore, India: CMC.

78. Holland TL, Woods CW, Joyce M. (2009). Antibacterial Susceptibility Testing in the Clinical Laboratory. *Infectious Disease Clinics of North America*. 23(4): 757-90.

79. Jorgensen JH, Turnidge JD. (2015). *Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods.* In: Manual of Clinical Microbiology, 11th ed. Washington DC: American Society of Microbiology. p. 1253-73.

80. Patel JB, Tenover FC, Turnidge JD, Jorgensen JH. (2011). *Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods* In: Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington DC: American Society of Microbiology. p. 1122 - 43.

81. Cockerill FR, Wikler MA, Alder FJ, Dudley MN, al e. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard—Ninth Edition Clinical and Laboratory Standards Institute 32(2).

82. Pottinger P, Reller LB, Ryan KJ. (2014). *Antibacterial Agents and Resistance*. In: Sherris Medical Microbiology. 6th ed. (International edition). New York: McGrawHill. p. 419 - 32.

83. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 49(11): 1749-55.

84. Kuroyanagi M, Arakawa T, Hirayama Y, Hayashi T. (1999). Antibacterial and Antiandrogen Flavonoids from Sophora f lavescens. *Journal of Natural Products*. 62(12): 1595-9.

85. ปัทมาวดี เ, จารีย์ บ, ธิดารัตน์ บ. (2545). การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพรไทย. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*. 44(2): 110-24.

86. Jain A, Basal E. (2003). Inhibition of Propionibacterium acnes-induced mediators of inflammation by Indian herbs. *Phytomedicine*. 10(1): 34-8.

87. Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. (2005). Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. 101(1–3): 330-3.

88. Qa'dan F, Thewaini A-J, Ali DA, Afifi R, Elkhawad A, Matalka KZ. (2005). The Antimicrobial Activities of Psidium guajava and Juglans regia Leaf Extracts to

Acne-Developing Organisms. *The American Journal of Chinese Medicine*. 33(02): 197-204.

89. Viyoch J, Pisutthanan N, Faikreua A, Nupangta K, Wangtorpol K, Ngokkuen J. (2006). Evaluation of in vitro antimicrobial activity of Thai basil oils and their micro-emulsion formulas against Propionibacterium acnes. *International Journal of Cosmetic Science.* 28(2): 125-33.
90. Weckesser S, Engel K, Simon-Haarhaus B, Wittmer A, Pelz K, Schempp CM. (2007). Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*. 14(7–8): 508-16.
91. Lim Y-H, Kim I-H, Seo J-J. (2007). In vitro activity of kaempferol isolated from the Impatiens balsamina alone and in combination with erythromycin or clindamycin against Propionibacterium acnes. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*. 45(5): 473-7.
92. Tsai T-H, Tsai T-H, Wu W-H, Tseng JT-P, Tsai P-J. (2010). In vitro antimicrobial and anti-inflammatory effects of herbs against Propionibacterium acnes. *Food Chemistry.* 119(3): 964-8.
93. พรเทพ เ. (2010). *ฤทธิ์ต้านจุลินทรีน์ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อที่แยกจากแผลติดเชื้อ* ปริญญานิพนธ์ วท. ม. (วิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.
94. Niyomkam P, Kaewbumrung S, Kaewnpparat S, Panichayupakaranant P. (2010). Antibacterial activity of Thai herbal extracts on acne involved microorganism. *Pharmaceutical Biology*. 48(4): 375-80.
95. Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, et al. (2010). Activities of ten essential oils towards Propionibacterium acnes and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules.* 15(5): 3200-10.
96. Pothitirat W, Chomnawang MT, Supabphol R, Gritsanapan W. (2010). Free radical scavenging and anti-acne activities of mangosteen fruit rind extracts prepared by different extraction methods. *Pharmaceutical Biology.* 48(2): 182-6.

97. Puttarak P, Charoonratana T, Panichayupakaranant P. (2010). Antimicrobial activity and stability of rhinacanthins-rich Rhinacanthus nasutus extract. *Phytomedicine*. 17(5): 323-7.

98. Pothitirat W, Chomnawang MT, Gritsanapan W. (2010). Anti-Acne-Inducing Bacterial Activity of Mangosteen Fruit Rind Extracts. *Medical Principles and Practice.* 19(4): 281-6.

99. Auttayaporn C, Narumol T. (2011). Growth Inhibition of Some Pathogenic Bacteria by Local Medicinal Plant Extracts *การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 8 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน*.

100. Tsai M-L, Lin C-C, Lin W-C, Yang C-H. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2011; 75(10): 1977-83.

101. Azimi H, Fallah-Tafti M, Khakshur AA, Abdollahi M. (2012). A review of phytotherapy of acne vulgaris: Perspective of new pharmacological treatments. *Fitoterapia*. 83(8): 1306-17.

102. Saising J, Voravuthikunchai SP. (2012). Anti Propionibacterium acnes activity of rhodomyrtone, an effective compound from Rhodomyrtus tomentosa (Aiton) Hassk. leaves. *Anaerobe.* 18(4): 400-4.

103. Qin X-J, Sun D-J, Ni W, Chen C-X, Hua Y, He L, et al. (2012). Steroidal saponins with antimicrobial activity from stems and leaves of Paris polyphylla var. yunnanensis. *Steroids*. 77(12): 1242-8.

104. Sharma R, Kishore N, Hussein A, Lall N. (2013). Antibacterial and anti-inflammatory effects of Syzygium jambos L. (Alston) and isolated compounds on acne vulgaris. *Complementary and Alternative Medicine.* 13: 292-.

105. Dej-adisai S, Meechai I, Puripattanavong J, Kummee S. (2014). Antityrosinase and antimicrobial activities from Thai medicinal plants. *Archives of Pharmacal Research*. 37(4): 473-83.

106. Nirmal NP, Panichayupakaranant P. (2014). Anti-Propionibacterium acnes assay-guided purification of brazilin and preparation of brazilin rich extract from Caesalpinia sappan heartwood. *Pharmaceutical Biology.* 52(9): 1204-7.

107. Kanya P, Pornpimon K. (2015). Antibacterial activity of ethanolic extracts of Houttuynia cordata Thunb., Allium sativum and Amomum krervanh Pierre on some bacteria. *Huachiew Chalermprakiet Science and Technology Journal.* 1(2).

108. Athikomkulchai S, Tadtong S, Ruangrungsi N, Hongratanaworakit T. (2015). Chemical composition of the essential oil from croton oblongifolius and its antibacterial activity against propionibacterium acnes. *Natural Product Communications.* 10(8): 1459-60.

109. Léguillier T, Lecsö-Bornet M, Lémus C, Rousseau-Ralliard D, Lebouvier N, Hnawia E, et al. (2015). The Wound Healing and Antibacterial Activity of Five Ethnomedical Calophyllum inophyllum Oils: An Alternative Therapeutic Strategy to Treat Infected Wounds. *PLoS ONE.* 10(9): e0138602.

110. Velmurugan P, Park J-H, Lee S-M, Jang J-S, Lee K-J, Han S-S, et al. (2015). Synthesis and characterization of nanosilver with antibacterial properties using Pinus densiflora young cone extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 147: 63-8.

111. Feuillolay C, Pecastaings S, Gac CL, Fiorini-Puybaret C, Luc J, Joulia P, et al. (2016). A Myrtus communis extract enriched in myrtucummulones and ursolic acid reduces resistance of Propionibacterium acnes biofilms to antibiotics used in acne vulgaris. *Phytomedicine.* 23(3): 307-15.

112. วัชรินทร์ ร, พัชรี กอ, จันทร์วิทยานุชิต. (2016). ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus aureus ATCC 25923, Bacillus cereus และ Escherichia coli ATCC 25922 = Antibacterial activities of ten Thai herbal extracts against staphylococcus aureus ATCC 25923, Bacillus cereus and Escherichia coli ATCC 25922. *วารสาร มฉก วิชาการ วิทยาศาสตร์สุขภาพ.* 19(38): 35 - 48.

113. Sathishkumar P, Preethi J, Vijayan R, Mohd Yusoff AR, Ameen F, Suresh S, et al. (2016). Anti-acne, anti-dandruff and anti-breast cancer efficacy of green synthesised silver nanoparticles using Coriandrum sativum leaf extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 163: 69-76.

114. Lee C-J, Chen L-G, Liang W-L, Wang C-C. (2017). Multiple Activities of Punica granatum Linne against Acne Vulgaris. *International Journal of Molecular Sciences.* 18(1): 141.

115. Huzaifa U, Labaran I, Bello A, Olatunde A. (2014). Phytochemical screening of Aqueous extract of Garlic (Allium sativum) bulbs. *Report and Opinion.* 6(8): 1-4.

116. Papageorgiou C, Corbet J-P, Menezes-Brandao F, Pecegueiro M, Benezra C. (1983). Allergic contact dermatitis to garlic (Allium sativum L.) Identification of the allergens: The role of mono-, di-, and trisulfides present in garlic. *Archives of Dermatological Research.* 275(4): 229-34.

117. Rudzki E. (1978). Dermatitis from epoxy resin, triethylenetetramine and ethylenediamine. *Contact Dermatitis.* 4(1): 53-.

118. Burgess JF. (1952). Occupational Dermatitis. *Canadian Medical Association Journal*. 66(3): 275-.

119. Arunkumar S, Muthuselvam M. (2009). Analysis of phytochemical constituents and antimicrobial activities of Aloe vera L. against clinical pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*. 5(5): 572-6.

120. Joseph B, Raj SJ. (2010). Pharmacognostic and phytochemical properties of Aloe vera linn an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 4(2): 106-10.

121. Guo X, Mei N. (2016). Aloe vera: A review of toxicity and adverse clinical effects. *Journal of Environmental Science and Health, Part C.* 34(2): 77-96.

122. Kaushik D, Yadav J, Kaushik P, Sacher D, Rani R. (2011). Current pharmacological and phytochemical studies of the plant Alpinia galanga. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 9(10): 1061-5.

123. Hong SJ, Chang CH. (2006). Erythema multiforme-like generalized allergic contact dermatitis caused by Alpinia galanga. *Contact Dermatitis*. 54(2): 118-20.

124. Goon A, Goh C-L. (2011). Noneczematous contact reactions. *Contact dermatitis.* Springer. p. 415-27.

125. Kumari R, Dubey RC. (2016). Phytochemical Analysis and Antibacterial and Cytotoxic Properties of Barleria lupulina Lindl. Extracts. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. 7(10).

126. Nirmal NP, Rajput MS, Prasad RGSV, Ahmad M. (2015). Brazilin from Caesalpinia sappan heartwood and its pharmacological activities: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 8(6): 421-30.

127. Badami S, Rai SR, Moorkoth S, Rajan S, Suresh B. (2003). Pharmacognostical evaluation of Caesalpinia sappan heartwood. *Ancient Science of Life*. 23(2): 100.

128. Sawant R, Godghate A. (2013). Qualitative phytochemical screening of rhizomes of curcuma longa linn. *International Journal of Science, Environment and Technology*. 2(4): 634-41.

129. Sabale P, Modi A, Sabale V. (2013). Curcuma longa Linn. A Phytochemical and Phytopharmacological Review. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 5(2): 59-68.

130. Gupta S, Lather A, Jaiswal V, Garg S, Jyoti KA. (2010). Phytochemistry of curcuma longa-an overview. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 4: 1-9.

131. Calapai G, Miroddi M, Minciullo PL, Caputi AP, Gangemi S, Schmidt RJ. (2014). Contact dermatitis as an adverse reaction to some topically used European herbal medicinal products–part 1: Achillea millefolium–Curcuma longa. *Contact Dermatitis*. 71(1): 1-12.

132. Tewtrakul S, Itharat A. (2006). Anti-allergic substances from the rhizomes of Dioscorea membranacea. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 14(24): 8707-11.

133. Itharat A, Plubrukarn A, Kongsaeree P, Bui T, Keawpradub N, Houghton PJ. (2003). Dioscorealides and dioscoreanone, novel cytotoxic naphthofuranoxepins, and 1, 4-phenanthraquinone from Dioscorea membranacea Pierre. *Organic Letters*. 5(16): 2879-82.

134. Jofeena J. (2015). Analysis of phytochemicals from Eupatorium odoratum flower. *International Journal of Ayurveda and Pharma Research*. 3(7).

135. Bose P, Chakrabarti P, Chakravarti S, Dutta S, Barua A. (1973). Flavonoid constituents of Eupatorium odoratum. *Phytochemistry*. 12(3): 667-8.

136. Akinmoladun AC, Ibukun E, Dan-Ologe I. (2007). Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of Chromolaena odorata. *Scientific Research and Essays*. 2(6): 191-4.

137. Chairat M, Darumas U, Bremner JB, Bangrak P. (2011). Dyeing of cotton yarn with the aqueous extract of the leaves of Eupatorium odoratum L. in Thailand and associated extract toxicity studies. *Coloration Technology.* 127(5): 346-53.

138. Bunyong R, Chaijaroenkul W, Plengsuriyakarn T, Na-Bangchang K. (2014). Antimalarial activity and toxicity of Garcinia mangostana Linn. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 7(9): 693-8.

139. Obolskiy D, Pischel I, Siriwatanametanon N, Heinrich M. (2009). Garcinia mangostana L.: a phytochemical and pharmacological review. *Phytotherapy Research*. 23(8): 1047-65.

140. Manimekalai I, Sivakumari K, Ashok K, Rajesh S. (2015). Phytochemical profiling of mangosteen fruit, Garcinia mangostana. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(2): 221-52.

141. Al-Massarani SM, El Gamal AA, Al-Musayeib NM, Mothana RA, Basudan OA, Al-Rehaily AJ, et al. (2013). Phytochemical, antimicrobial and antiprotozoal evaluation of Garcinia mangostana pericarp and α-mangostin, its major xanthone derivative. *Molecules.* 18(9): 10599-608.

142. Siriwatanametanon N, Heinrich M. (2011). The Thai medicinal plant Gynura pseudochina var. hispida: chemical composition and in vitro NF-kappaB inhibitory activity. *Natural Product Communications*. 6(5): 627-30.

143. Roeder E, Eckart A, Wiedenfeld H. (1996). Pyrrolizidine alkaloids from Gynura divaricata. *Planta Medica*. 62(04): 386-.

144. U.S. Food & Drug Administration. (2012). *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Pyrrolizidine Alkaloids*. Retrieved May 26, 2017, from www.fda.gov,

145. Manikandan A, Rajendran R, Abirami M, Kongarasi K. (2016). ntimicrobial activity and phytochemical analysis of Impatiens balsamina seed (kaci-t-tumpai) collected from

combinatore district, Tamil nadu, India. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 7(12): 5039.

146. Jiang H-F, Zhuang Z-H, Hou B-W, Shi B-J, Shu C-J, Chen L, et al. (2017). Adverse Effects of Hydroalcoholic Extracts and the Major Components in the Stems of Impatiens balsamina L. on Caenorhabditis elegans. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*. 4245830.
147. Potterat O, Hamburger M. (2007). Morinda citrifolia (Noni) fruit-phytochemistry, pharmacology, safety. *Planta Medica.* 73(03): 191-9.
148. Abou Assi R, Darwis Y, Abdulbaqi IM, khan AA, Vuanghao L, Laghari MH. (2017). Morinda citrifolia (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. *Arabian Journal of Chemistry.* 10(5): 691-707.
149. Devi CK, Krishna D. (2013). Phyto chemical Screening, Antibacterial, Antifungal and Anthelmintic Activity of Morinda citrifolia stem. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2(1).
150. Deng S, West BJ, Jensen CJ. (2011). Phytochemical, antioxidant and toxicological investigation of Morinda citrifolia L. blossoms. *ISRN Analytical Chemistry.* 2012(2012): 160871.
151. Palu AK, West BJ, Jensen CJ. (2012). Noni seed oil topical safety, efficacy, and potential mechanisms of action. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 2: 74-78.
152. Dhale D, Mogle U. (2011). Phytochemical screening and antibacterial activity of Phyllanthus emblica (L.). *Science Research Reporter.* 1(3): 138-42.
153. Gaire BP, Subedi L. (2014). Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of Phyllanthus emblica Linn. *Chinese Journal of Integrative Medicine.* 1-8.
154. Variya BC, Bakrania AK, Patel SS. (2016). Emblica officinalis (Amla): A review for its phytochemistry, ethnomedicinal uses and medicinal potentials with respect to molecular mechanisms. *Pharmacological Research.* 111: 180-200.
155. Reungpatthanaphong S, Sematong T, Potduang B, Kunhachan P, Keeta I, Niwaspragrit C. (2013). Acute Skin Irritation Test of Facial & Body Gel Wash and Moisturizing

Gel Products Comprising A Patented Mixed Extract From Embilica and Ma-khwaen. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences 38.

156. Gutiérrez RMP, Mitchell S, Solis RV. (2008). Psidium guajava: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology.* 117(1): 1-27.

157. Metwally A, Omar A, Harraz F, El Sohafy S. (2010). Phytochemical investigation and antimicrobial activity of Psidium guajava L. leaves. *Pharmacognosy magazine.* 6(23): 212.

158. Faleiro JH, Gonçalves RC, dos Santos MNG, da Silva DP, Naves PLF, Malafaia G. (2016). The Chemical Featuring, Toxicity, and Antimicrobial Activity of Psidium cattleianum (Myrtaceae) Leaves. *New Journal of Science*. 7538613.

159. Haque N, Sofi G, Ali W, Rashid M, Itrat M. (2015). A comprehensive review of phytochemical and pharmacological profile of Anar (Punica granatum Linn): A heaven's fruit. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine.* 1(1): 22-6.

160. Bhandary SK, Kumari S, Bhat VS, Sharmila K, Bekal MP. (2012). Preliminary phytochemical screening of various extracts of Punica granatum peel, whole fruit and seeds. *Journal of Health Science*. 2(4): 35-8.

161. Khaleel AI, Sijam K, Rashid TS, Ahmad KB. (2016). Phytochemical determination and antibacterial activity of Punica granatum peel extracts against plant pathogenic bacteria. *American Journal of Plant Sciences*. 7(1): 159.

162. Jurenka J. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (Punica granatum L.): a review. *Alternative Medicine Review.* 13(2): 128.

163. Bukke S, Raghu P, Sailaja G, Kedam TR. (2011). The study on Morphological, Phytochemical and Pharmacological aspects of Rhinacanthus nasutus (L) Kurz (A Review). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 1(08): 26-32.

164. Bukke S, Mallepogu V, Kedam T. (2013). Phytochemical Analysis, In-Vitro Antioxidant Activity and Proximate Analysis on Rhinacanthus Nasutus(L) Kurz Leaf. *Indian Journal of Applied Research.* 3(5).

165. Babula P, Adam V, Havel L, Kizek R. (2007). Naphthoquinones and their pharmacological properties. *Ceska a Slovenska Farmacie: Casopis Ceske*

Farmaceuticke Spolecnosti a Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti. 56(3): 114-20.

166. Ananda Raj VB, Kumar SS, Kumar KS. (2015). HPTLC Standardization and Quantification of Rhinacanthus nasutus. *Journal of Medicinal Plants*. 3(6): 51-5.
167. Dryer L, Ptchelintsev D. (2012). Use of plant extracts to prevent and/or reduce the signs of subjective discomfort and/or irritation in the topical application of cosmetic products. *Google Patents*.
168. Hamid HA, Roziasyahira Mutazah SSZ, Yusoff MM. (2017). Rhodomyrtus tomentosa: A phytochemical and pharmacological review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 10(1): 10-6.
169. Limsuwan S, Trip EN, Kouwen TR, Piersma S, Hiranrat A, Mahabusarakam W, et al. (2009). Rhodomyrtone: a new candidate as natural antibacterial drug from Rhodomyrtus tomentosa. *Phytomedicine*. 16(6): 645-51.
170. Bukar A, Mukhtar M, Hassan A. (2009). Phytochemical screening and antibacterial activity of leaf extracts of Senna siamea (Lam) on Pseudomonas aeruginosa. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*. 2(1): 139-42.
171. Smith YA. (2009). Determination of chemical composition of Senna-siamea (Cassia leaves). *Pakistan Journal of Nutrition*. 8(2): 119-21.
172. Kamagaté M, Koffi C, Kouamé N, Akoubet A, Alain N, Yao R, et al. (2014). Ethnobotany, phytochemistry, pharmacology and toxicology profiles of Cassia siamea Lam. *Journal of Phytopharmacol*. 3(1): 57-76.
173. Prabhakaran S, Gothandam K, Sivashanmugam K. (2011). Phytochemical and antimicrobial properties of Syzygium cumini an ethanomedicinal plant of Javadhu hills. *Pharmaceutical Research*. 1(1): 22-32.
174. Gowri SS, Vasantha K. (2010). Phytochemical screening and antibacterial activity of Syzygium cumini (L.)(Myrtaceae) leaves extracts. International Journal of PharmTech Research. 2(2): 1569-73.
175. Ayyanar M, Subash-Babu P. (2012). Syzygium cumini (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(3): 240-6.

176. Sah AK, Verma VK. (2011). Syzygium cumini: An overview. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 3(3): 108-13.

177. Silva SdN, Abreu IC, Silva GFC, Ribeiro RM, Lopes AdS, Cartágenes MdSdS, et al. (2012). The toxicity evaluation of Syzygium cumini leaves in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 22(1): 102-8.

178. Ugbabe G, Ezeunala M, Edmond I, Apev J, Salawu O. (2010). Preliminary phytochemical, antimicrobial and acute toxicity studies of the stem, bark and the leaves of a cultivated Syzygium cumini Linn.(Family: Myrtaceae) in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 9(41): 6943-747.

179. Ketylin FM, Mello JC, Higa OZ, Rodas AC, Corrêa MA, Mendes-Giannini MJ, et al. (2010). Antimicrobial and cytotoxic activity of fruit extract from Syzygium cumini (L.) Skeels. *Latin America Journal of Pharmacy*. 29(5): 725-30.

180. Islam MR, Parvin MS, Islam ME. (2012). Antioxidant and hepatoprotective activity of an ethanol extract of Syzygium jambos (L.) leaves. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 6.

181. Mahmoud II, Marzouk MSA, Moharram FA, El-Gindi MR, Hassan AMK. (2001). Acylated flavonol glycosides from Eugenia jambolana leaves. *Phytochemistry*. 58(8): 1239-44.

182. Mohanty S, Cock IE. (2010). Bioactivity of Syzygium jambos methanolic extracts: Antibacterial activity and toxicity. *Pharmacognosy Research.* 2(1): 4-9.

183. Arrese JE, Goffin V, Avila-Camacho M, Greimers R, Piérard GE. (1998). A pilot study on bacterial viability in acne. Assessment using dual flow cytometry on microbials present in follicular casts and comedones. *International Journal of Dermatology*. 37(6): 461-4.

184. Raj V, Peepliwal A, Lariya S. (2016). Phytochemical and antimicrobial screening of polyherbal formulation for anti acne activity . *World Journal of Pharmaceutical Research*. 5(3): 1069-83.

185. Rattanasena P. (2012). Commonly Consumed in Thailand. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 15(18): 877-82.

186. (CLSI). CaLSI. (2016). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: CLSI supplement M100S. 26th. Wayne, PA: CLSI.

187. Nisar T, Iqbal M, Raza A, Safdar M, Iftikhar F, Waheed M. (2015). Turmeric: A promising spice for phytochemical and antimicrobial activities. *American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Sciences.* 15(7): 1278-88.

188. Hasan MR, Islam MN, Islam MR. (2016). Phytochemistry, pharmacological activities and traditional uses of Emblica officinalis: A review. *International Current Pharmaceutical Journal.* 5(2): 14-21.

189. Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9(6): 635-54.

190. Doughari JH. (2012). Phytochemicals: Extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. *Phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. InTech.

191. Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30(12): 3875-83.

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

193. Goodman G. (2009), Cleansing and moisturizing in acne patients. American *Journal of Clinical Dermatology*. 10(1): 1-6.

194. มาตรฐานอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง มอก.152-2539, (2539).

195. Prakash C, Bhargava P, Tiwari S, Majumdar B, Bhargava RK. (2017). Skin Surface pH in Acne Vulgaris: Insights from an Observational Study and Review of the Literature. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 10(7): 33-9.

196. Ali SM, Yosipovitch G. (2013). Skin pH: from basic science to basic skin care. *Acta Dermato-Venereologica.* 93(3): 261-9.

197. Kross RD. (2017). Multifunctional topical formulation for the treatment of acne vulgaris and other skin conditions. *Google Patents*.

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวปุณภา ดีวงกิจ
วัน เดือน ปีเกิด	4 เมษายน พ.ศ. 2534
สถานที่เกิด	อ.ธนบุรี จ.กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	58/1834 ถ.พระราม 2 เขตจอมทอง แขวงบางมด จ.กรุงเทพฯ10150

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2551	ระดับชั้นมัธยมศึกษา จาก โรงเรียนสาธิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปทุมวัน
พ.ศ. 2557	ระดับปริญญาแพทยศาสตรบัณฑิต (พ.บ.) คณะแพทยศาสตร์ จาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2561	ระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาตจวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ