

ผลของสารสกัดด้วยเอทานอลและแผ่นแปะจากตำรับยาทาแก้พิษฝี

ต่อการต้านเชื้อ *Staphylococcus epidermidis*

Effects of Ethanolic Extract from Thai Traditional Abscess Formula and Chitosan Patch against *Staphylococcus epidermidis*

วาอุกา พลาขงาม¹ ชลิตา สมโภชน์² และ นันทปภัสร นทีพิทักษ์^{*}

Waluga Plaingam¹ Chalita Sompoch² and Nanpaphat Nateepitak²

¹อาจารย์ประจำวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต

²นักศึกษาคณะศึกษาศาสตร์บัณฑิต สาขาการแพทย์แผนตะวันออก วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต

^{*}Lecturer in Oriental Medicine, Faculty of Oriental Medicine, Rangsit University

²Bachelor of Science in Oriental Medicine, Faculty of Oriental Medicine, Rangsit University

^{*}Corresponding author, E mail: walugabg@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาฤทธิ์ของตำรับยาทาแก้พิษฝีและพัฒนาฟิล์มไคโตซานรักษาสิวจากตำรับยาทาแก้พิษฝีของหมื่นสิทธิแพทย์ (จากพระคัมภีร์โพธิธรรมหลวงปู่) เตรียมจากสมุนไพร 6 ชนิดคือ กระเทียม หอม บำ เถา มวก ต้นมะเฟือง รากมะนาว รากมะกรูด และใบหม่อนในอัตราส่วนเท่ากันต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 จากการวิจัยการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดจากตำรับยาทาแก้พิษฝีพบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้คือ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร การตั้งตำรับฟิล์มไคโตซานใช้ไคโตซานจากกระดองปลาหมึก และซอร์บิทอลในอัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อศึกษาสูตรตำรับที่ดีที่สุดในการเตรียมแผ่นแปะไคโตซานรักษาสิว ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น ความสม่ำเสมอของ เนื้อฟิล์ม ค่า pH น้ำหนัก และการยึดเกาะของฟิล์มไคโตซาน การยับยั้งเชื้อเปรียบเทียบกับแผ่นแปะไฮโดรคอลลอยด์พบว่าฟิล์มไคโตซานรักษาสิวจากตำรับยาทาแก้พิษฝีที่ประกอบด้วยไคโตซาน 1.25 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/ปริมาตร โดยใช้ซอร์บิทอล 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร/ปริมาตร เป็นพลาสติกไซเซอร์ และใส่สารสกัดจากตำรับยาทาแก้พิษฝีปริมาณเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ดีที่สุด โดยเกิดวงใสเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 15.33 ± 0.58 มิลลิเมตร ขณะที่แผ่นแปะไฮโดรคอลลอยด์เกิดวงใสต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16.00 ± 0.00 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบและศึกษาทางคลินิกต่อไป

คำสำคัญ: ไคโตซาน แผ่นแปะสิ่ว ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

Abstract

The ethanolic extract and chitosan films from Thai traditional abscess formula that contain *Dregea volubilis*, *Xylinbaria minutiflora*, *Averrhoa carambola*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus hystrix* and *Morus alba* were studied to investigate their the antibacterial activity on *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984. The first experiment was a screening test for the antibacterial activity of abscess formula crude extract against *S. epidermidis* by agar diffusion assay. The crude extract had demonstrated a remarkable antimicrobial activity against *S. epidermidis*. Then the crude extract in the concentration range from 3.125-200 mg/ml was investigated for bacterial growth inhibition by using broth micro-dilution method. The study showed that crude extract could inhibit the growth of *S. epidermidis* at the concentration of 1.25 mg/ml. The final experiment, MBC of crude extract was determined from broth micro-dilution MIC tests by subculturing to agar media without crude extract. The study showed that the crude extract could kill *S. epidermidis* at the concentration of 2.5 mg/ml. In the chitosan film formulation development, chitosan from Cuttlefish bone and sorbitol was used to obtain the best formula for chitosan films. Each chitosan film was assessed in color, odor, uniformity of the films, pH, weight variation and adhesive property. When compared with hydrocolloid patch, the results indicated that the best chitosan films from Thai traditional abscess formula including chitosan 1.25 % w/v, sorbitol 10 % v/v and Thai traditional abscess formula extract at 2 times the minimum concentration had the clear zone against *S. epidermidis* ATCC 35984 of 15.33 ± 0.58 mm in diameter, whereas the clear zone of hydrocolloid patch against *S. epidermidis* ATCC 35984 was 16.00 ± 0.00 mm in diameter. Nevertheless, this chitosan films of Thai traditional abscess formula should be tested for anti-inflammatory property and clinical studies.

Keywords: Chitosan, Acne patch, Antibacteria

1. บทนำ

ปัจจุบัน “สิว” เป็นปัญหาผิวหนังที่สร้างความกังวลให้กับคนทุกเพศทุกวัย ซึ่งสิวก่อเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนในร่างกายที่สร้างฮอร์โมนแอนโดรเจนมากกว่าปกติ โดยมีการสร้างไขมันเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการอุดตันจนเกิดเป็นสิวกุดตัน นอกจากนี้สิวยังเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น กรรมพันธุ์ การใช้เครื่องสำอาง การรับประทานอาหารหรือยา อารมณ์ และอากาศ เป็นต้น เมื่อมีการอักเสบของสิวก่อเกิดขึ้นจะทำให้ปวด มีลักษณะแดง นูนออกมา กลายเป็นสิวกักเสบ แต่มีอยู่สาเหตุหนึ่งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งพบได้ที่ผิวหนังและเยื่อเมือกของมนุษย์ (Widerström, Wiström, Sjöstedt, & Monsen, 2012) โดยจะไปทำให้ไขมันใต้ชั้นผิวหนังรวมตัวกันเกิดเป็นสิวกุดตัน ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบของสิวก่อเกิดเป็นเม็ดบวมแดงหรือเป็นหนองบนผิวหนังได้ ในทางการแพทย์แผนปัจจุบันการรักษาสิวกักเสบมีหลายวิธีด้วยกัน ทั้งการลดปริมาณของเชื้อที่ก่อให้เกิดการอักเสบของสิวก่อเกิด การลดการสร้างไขมันหรือการใช้เทคโนโลยีต่าง ๆ เข้ามาช่วยในการรักษา เช่น เลเซอร์ ซึ่งวิธีการรักษาจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับผู้ป่วย และอาการของโรค อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้คือ การใช้ยา antibiotics, topical retinoid, oral isotretinoin, benzoyl peroxide และ salicylic acid เป็นต้น (Chen, Lin, & Chen, 2016) ซึ่งการใช้ยาเหล่านี้มักพบว่า

ก่อให้เกิดปัญหาการคื้อยา และการแพ้ต่อผู้ใช้ อีกทั้งเกสซ์กัณฑ์ในรูปขี้ผึ้ง ครีมหรือเจลในการรักษา ซึ่งไม่ค่อยสะดวกในการใช้ และติดอยู่ที่แผลได้ไม่นาน ทำให้ต้องทายาบ่อย ๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาตำรับยาดังกล่าวให้อยู่ในรูปของแผ่นแปะผิวเพื่อสะดวกต่อการใช้งาน และเป็นรูปแบบเกสซ์กัณฑ์ที่สามารถปลดปล่อยตัวยาได้ต่อเนื่อง และนานขึ้น สามารถปกป้องผิวจากการสัมผัสสิ่งสกปรกจากสิ่งแวดล้อมโดยเลือกใช้โคโตะซานที่เป็นพอลิเมอร์จากธรรมชาติให้คุณสมบัติเมื่อละลายน้ำจะมีความเหนียวสามารถก่อตัวเป็นเจลหรือแผ่นฟิล์มได้ นอกจากนี้พบว่ายังเป็นสารไม่มีพิษ และมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับการบอสม์เมทิลเซลลูโลส (carboxy methyl cellulose: CMC) (สุธิดา คงทอง, 2552) นอกจากนี้หากต้องการให้แผ่นแปะมีความยืดหยุ่นและยึดเกาะกับผิวหนังได้ดีขึ้นจะมีการผสมสารละลายโคโตะซานกับสารเพิ่มความยืดหยุ่น ที่นิยมใช้ในการเตรียมฟิล์มจากพอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น กลีเซอรอล และซอร์บิทอล เป็นต้น (Laohakunjit & Noomhorm, 2004) ในการวิจัยครั้งนี้เลือกตำรับยาแก้พิษฝีของหมื่นสิทธิแพทย์ จากพระคัมภีร์ไพจิตรมหาวงศ์ ซึ่งเตรียมได้จากสมุนไพร 6 ชนิดคือ กระทุงหมาบ้า เถามวก รากมะเฟือง รากมะนาว รากมะกรูด และใบหม่อน อย่างละเสมอกากัน ซึ่งในตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ ทางการแพทย์แผนไทย ฝี คือ ชื่อโรคชนิดหนึ่ง มีอาการบวมหนองคลั่งหนองข้างในทำให้ปวดและร้อนบริเวณหัวฝี หากมองในเชิงการแพทย์แผนปัจจุบันอาการดังกล่าวเกิดจากการอักเสบและ และมักมีการติดเชื้อโดยเฉพาะแบคทีเรียร่วมด้วย สำหรับสิวนั้นทางการแพทย์แผนไทย สิวเกิดจากปิตตะพิการ ทำให้มีความร้อนในร่างกายสูงขึ้น ทำให้เกิดพิษการ เกิดการอักเสบ ส่งผลให้เกิดฝีหนอง หรือสิวนองชนิดต่าง ๆ ได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ฝี กับ สิว มีความสัมพันธ์กัน จึงทำให้ผู้วิจัยคิดว่ายาตำรับนี้มีประสิทธิภาพในการใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อสิวนได้ อีกทั้งผู้วิจัยทำการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นแล้วจึงมีแนวโน้มว่ายาตำรับนี้น่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการรักษาสิวนได้ นอกจากนี้หากพิจารณาจากสมุนไพรที่ใช้ในตำรับ เช่น ใบหม่อนที่มีงานวิจัยก่อนหน้านี้พบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม Staphylococci เช่นเดียวกับ *S. epidermidis* (Wang, Zu, Fu, & Efferth, 2012) อย่างไรก็ตามในทางการแพทย์แผนไทยคำว่า ฝี อาจหมายถึง ก้อนเนื้อ หรือมะเร็งซึ่งแตกต่างจากสิวน (กรมวิชาการ กระทรวงศึกษาธิการ, 2542)

2. วัตถุประสงค์

- 1 เพื่อพัฒนาตำรับยาทาแก้พิษฝีในรูปแบบแผ่นแปะโคโตะซาน
- 2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ATCC 35984 ของสารสกัดและแผ่นแปะรักษาสิวน

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

นำสมุนไพรต้นกระทุงหมาบ้า เถามวก รากมะเฟือง รากมะนาว รากมะกรูด และใบหม่อน จากร้านเจริญสุขโฮสเทล ซึ่งผ่านการยืนยันจากผู้เชี่ยวชาญด้านพฤกษศาสตร์ นิรันดร์ วิพันธุ์เงิน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต อย่างละ 300 กรัมทำความสะอาด อบให้แห้งแล้วบดหยาบ จากนั้นนำไปสกัดด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ปริมาตร 5,000 มิลลิลิตร ทำการหมักทิ้งไว้ 7 วัน โดยทำการคนทุกวันจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และระเหยต่อด้วย حمامระเหยบน water bath จนแห้งคำนวณหาร้อยละของสารสกัดแล้วนำไปเก็บไว้ใน desiccators

3.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเบื้องต้นต่อเชื้อ *S. epidermidis* ของสารสกัดด้วยวิธี agar diffusion

ใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ swab เชื้อ *S. epidermidis* ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจาก ดร.สุกัญญา หลีแจ้ง วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ลงบนอาหาร trypticase soy agar (TSA) ด้วยวิธี 3-way swab technique เจาะหลุม TSA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หยดสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้ 20 เปอร์เซ็นต์ DMSO เป็น negative control และ ampicillin ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ปิยนุช พรหมกร และนภัสสร ราชรินทร์, 2559) เป็น positive control ลงไปหลุมละ 200 ไมโครลิตร โดยแต่ละตัวอย่างทดสอบ 3 ซ้ำ บ่มใน incubator 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง วัด inhibition zone ที่เกิดขึ้น สำหรับการทดสอบแผ่นเปาะโคโคซานจะตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร

3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ด้วยวิธี broth microdilution

3.3.1 การเตรียม stock solution ของสารสกัด ทำโดยเจือจางสารสกัดจาก (200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ด้วยน้ำกลั่น (DW) ปราศจากเชื้อแบบ serial two-fold dilution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 200-3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ) โดยให้มีปริมาตรที่เหลือสุดท้ายในหลอดเท่ากับ 400 ไมโครลิตร

3.3.2 การเตรียม stock solution ของ positive control ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ทำโดย เจือจางยา ampicillin ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วย DW ปราศจากเชื้อแบบ serial two-fold dilution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50-0.39 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ) โดยให้มีปริมาตรที่เหลือสุดท้ายในหลอดเท่ากับ 400 ไมโครลิตร

3.3.3 ชุดทดสอบใช้สารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ อาหาร Mueller-Hinton broth (MHB) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well plate

3.3.4 การเตรียม inoculum เตรียมโดยเลี้ยงเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ในอาหาร MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง นำมา suspend ในหลอดน้ำเกลือ (NSS) ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (มีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร) โดยนำแผ่นกระดาศสีขาวมาขีดเส้นดำ 2-3 เส้น แล้วนำหลอด 0.5 McFarland standard และหลอดเชื้อมาเทียบความขุ่น โดยดูความเข้มของเส้นให้ใกล้เคียงกัน ถ้าเชื้อที่เตรียมได้ขุ่นมากเกินไปให้เติม NSS ลงไปเพื่อเจือจาง หากเชื้อมีความขุ่นน้อยเกินไปก็เขี่ยเชื้อมาใส่เพิ่มแล้วเทียบความขุ่นอีกครั้ง

3.3.5 นำเชื้อ 0.5 McFarland standard ที่เตรียมได้มาเจือจางในอัตราส่วน 1:200 โดยดูดเชื้อ 60 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด MHB 8,940 ไมโครลิตรที่เตรียมไว้ (มีเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร) โดยมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 9 มิลลิลิตร

3.3.6 ใช้ micropipette ดูดเชื้อ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในทุกหลุมของชุดทดสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตร ส่วนชุดควบคุมดูด MHB แทนเชื้อหลุมละ 100 ไมโครลิตร

3.3.7 นำ 96-well plate บ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.3.8 การหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) หรือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 โดยเติมสี resazurin หลุมละ 10 ไมโครลิตร ในทุกหลุมแบบ aseptic technique แล้วนำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง อ่านหลุมที่เป็นสีม่วงเป็นค่า MIC

3.3.9 การหาค่า minimum bactericidal concentration (MBC) หรือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 โดยใช้ loop แตะสารในหลุมทุกหลุมที่ไม่มีเชื้อเจริญ (มีสีม่วง) มา streak ถี่ ๆ บนอาหาร TSA นำ plate บ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อ โดยสังเกตจากการเจริญเป็นโคโลนีบนรอย streak หลุมที่ไม่มีเชื้อเจริญคือค่า MBC

3.4 ขั้นตอนการเตรียมแผ่นแปะโคโดซาน

3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมโคโดซาน

นำผงโคโดซานขนาดอนุภาค 30 mesh มาทำการทดลองสูตรที่ 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 กรัม ละลายใน 1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก และ 1 เปอร์เซ็นต์ กรดแลคติก นำไปปั่นโดยใช้เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) จนโคโดซานละลายหมดได้สารละลายใส นำสารละลายโคโดซานที่ได้ทำการทดลองผสมกับซอร์บิทอลที่เป็นพลาสติกไซเซอร์ (plasticizer) ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นเทสารละลายที่ได้ลงในพิมพ์ จากนั้นนำไปเข้าตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนโคโดซานแห้ง และทดสอบคุณสมบัติต่อไป

3.4.2 ขั้นตอนการเตรียมฟิล์มโคโดซานที่ผสมสารสกัดจากตำรายาทาแก้พิษฝี

นำสารละลายโคโดซานที่ได้ทำการทดลองผสมกับพลาสติกไซเซอร์ (plasticizer) ได้แก่ ซอร์บิทอล และเติมสารสกัดในความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อได้ลงไป 1 มิลลิลิตร เทสารละลายที่ได้ลงในพิมพ์ จากนั้นนำไปเข้าตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนโคโดซานแห้ง แล้วทดสอบการยับยั้งต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984

3.5 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของแผ่นแปะโคโดซาน

ศึกษาลักษณะภายนอกของฟิล์มที่ได้ สี กลิ่น ความเหนียว ความเป็นกรด-ด่าง ความสม่ำเสมอของเนื้อฟิล์ม จากนั้นศึกษาความแปรปรวนของน้ำหนัก (S.D.) โดยตัดเป็นสี่เหลี่ยมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร จำนวน 10 แผ่น ชั่งน้ำหนักแล้ววิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของน้ำหนัก และศึกษาการยึดติดของแผ่นแปะโคโดซาน โดยนำฟิล์มที่เตรียมได้ตัดเป็นสี่เหลี่ยมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร จำนวน 5 แผ่น แปะไว้ด้านในของบีกเกอร์ที่บรรจุน้ำไว้ นำไปปั่นโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer จับเวลาที่ฟิล์มเกาะอยู่จนหลุดออกจากบีกเกอร์

ตารางที่ 1 สูตรตำรับแผ่นแปะโคโดซาน

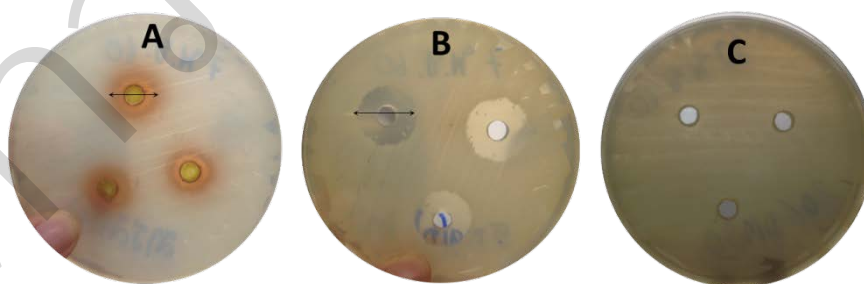
ตำรับที่	ปริมาณของโคโดซานที่ละลายอยู่ใน 1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติกและกรดแลคติก	ปริมาณสารละลายโคโดซานที่ใช้ตั้งตำรับ	ปริมาณซอร์บิทอล
1	1.00 กรัม	5.00 กรัม	10.00 กรัม
2			20.00 กรัม
3		10.00 กรัม	10.00 กรัม
4			20.00 กรัม
5	1.50 กรัม	5.00 กรัม	10.00 กรัม
6			20.00 กรัม
7		10.00 กรัม	10.00 กรัม
8			20.00 กรัม
9	2.00 กรัม	5.00 กรัม	10.00 กรัม
10			20.00 กรัม

ตำรับที่	ปริมาณของไลโคซานที่ละลายอยู่ใน 1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติกและกรดแลคติก	ปริมาณสารละลาย ไลโคซานที่ใช้ตั้งตำรับ	ปริมาณซอร์บิทอล
11	2.50 กรัม	10.00 กรัม	10.00 กรัม
12			20.00 กรัม
13		5.00 กรัม	10.00 กรัม
14	3.00 กรัม	10.00 กรัม	20.00 กรัม
15			10.00 กรัม
16			20.00 กรัม
17	3.00 กรัม	5.00 กรัม	10.00 กรัม
18			20.00 กรัม
19		10.00 กรัม	10.00 กรัม
20			20.00 กรัม

4. ผลการวิจัย

4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเบื้องต้นต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ของสารสกัด

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของตำรับยาที่สกัดด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลด้วยวิธี agar diffusion พบว่าสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้ เนื่องจากเกิดบริเวณการยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) (รูปที่ 1A และตารางที่ 2) เช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ ampicillin (รูปที่ 1B และตารางที่ 2) ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่สารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์ DMSO (รูปที่ 1 และตารางที่ 2) ไม่ทำให้เกิดบริเวณการยับยั้งการเจริญของเชื้อ



รูปที่ 1 แสดงลักษณะ inhibition zone ของเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ATCC 35984 เมื่อทดสอบด้วย (A) สารสกัดตำรับยาทาแก้พิษฝี ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (B) ampicillin ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (C) 20 เปอร์เซ็นต์ DMSO

ตารางที่ 2 ผลการคัดกรองฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ATCC 35984 ของสารสกัดหยาบจากตำรับยาทาแก้พิษฝี

ตัวอย่าง	Inhibition zone (มิลลิเมตร) (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
สารสกัดตำรับยาทาแก้พิษฝี	7.33 $\pm$ 6.35
Ampicillin (positive control)	18.67 $\pm$ 1.15
DMSO (negative control)	ไม่เกิด clear zone

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ที่ยังเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ด้วยวิธี broth microdilution

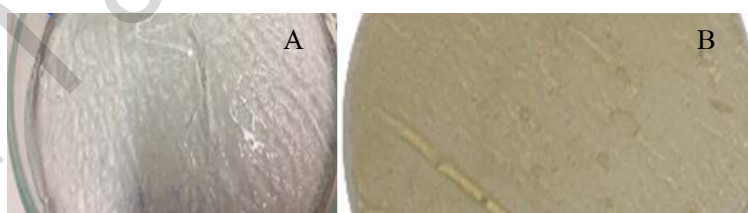
เมื่อทดสอบด้วยวิธี broth microdilution ในการหาค่า MIC และนำมา streak บน TSA ในการหาค่า MBC พบว่าสารสกัดจากตำรับยาทาแก้พิษฝีที่ความเข้มข้น 200-3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรสามารถหาค่า MIC และ MBC ได้เช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 50-0.39 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดตำรับยาทาแก้พิษฝี และยา ampicillin ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984

ตัวอย่าง	MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	MBC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
สารสกัดตำรับยาทาแก้พิษฝี	1.250	2.500
Ampicillin (positive control)	0.078	0.156
DMSO (negative control)	-	-

4.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของแผ่นแปะไคโตซาน

4.3.1 จากการดูลักษณะภายนอกและเนื้อสัมผัสของแผ่นแปะพื้นที่ยังไม่ใส่สารสกัดพบว่าในทุกตำรับให้แผ่นแปะสีขาวใส เนื้อฟิล์มมีความสม่ำเสมอ ไม่มีกลิ่นกรด แสดงดังรูปที่ 2A แต่แตกต่างกันที่ความเหนียวและการยืดหยุ่น ซึ่งพบว่าตำรับที่มีไคโตซาน 1.25 % ปริมาณ 10 กรัมในตำรับผสมกับชอร์บิทอล 20 กรัม มีความเหนียวและการยืดหยุ่นที่ดีที่สุด ส่วนของแผ่นแปะเมื่อใส่สารสกัดลงไปพบว่ามีสีเหลืองใสแสดงดังรูปที่ 2B



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของแผ่นแปะพื้นที่ไม่ใส่สารสกัด (A) และที่ใส่สารสกัด (B)

4.3.2 จากการตรวจสอบการยืดติดของแผ่นแปะพื้นที่พบว่าที่ความเข้มข้นสุดท้ายของไคโตซานเป็น 1.25 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับชอร์บิทอล 20 % ให้ค่าเฉลี่ยการยืดติดสูงสุดคือ 3.5 ชั่วโมง จึงเลือกตำรับนี้มาพัฒนาใส่สารสกัดสมุนไพรโดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดอ้างอิงจากค่า MIC และ MBC พบว่าแผ่นแปะมีค่าการยืดติดที่ต่ำลงเหลืออยู่ที่ 2.5 ชั่วโมง

4.3.3 จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของแผ่นแปะไคโตซานที่มีสารสกัดจากตำรับยาทาแก้พิษฝี เทียบกับแผ่นแปะสิวไฮโดรคอลลอยด์ในห้องทดลองด้วยวิธี disc diffusion พบว่าแผ่นแปะไคโตซานที่มีสารสกัดมีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของแผ่นแปะไคโตซานที่มีสารสกัดจากตำรับยาทาแก้พิษฝี

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	inhibition zone (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; มิลลิเมตร)
แผ่นแปะผสมสารสกัดตำรับยาทาแก้พิษฝี	5.0	15.33 $\pm$ 0.58
	2.5	-
แผ่นแปะไฮโดรคอลลอยด์	-	16.00 $\pm$ 0.00

5. การอภิปรายผล

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเบื้องต้นต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ของสารสกัดหยาบตำรับยาด้วย 95% เอทานอลพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้แต่ในการวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถระบุได้ว่ามาจากสารในกลุ่มใดเนื่องจากการเป็นสารสกัดยาทั้งตำรับ และในการทดสอบเบื้องต้นเลือกใช้วิธี agar diffusion มาดัดแปลงใช้ในการทดสอบคัดกรองฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย นั้นเนื่องจากยังไม่มีรายงานการวิจัยใดที่ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ของสารสกัดหยาบจากตำรับยามาก่อน ซึ่งวิธีนี้สามารถแทนการวาง disc ยามาตรฐานได้โดยตรง อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวเป็นวิธีการทดสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบบ้างเบื้องต้นเท่านั้น และในการวิจัยครั้งนี้ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ซึ่งเหมาะกับสารกลุ่มที่มีความเป็นขี้ผึ้ง ละลายน้ำได้ดี และมีขนาดโมเลกุลเล็ก จึงจะสามารถแพร่ซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จนทำให้เกิดการยับยั้งที่ชัดเจน เห็นเป็นโซน แต่สำหรับสารชีวภาพบางชนิดที่มีความเป็นขี้ผึ้งหรือมีโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งไม่สามารถแพร่ซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อได้ อาจทำให้ไม่มีการเกิดโซนก็ได้

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของแผ่นแปะไคโตซานที่มีสารสกัดจากตำรับยาทาแก้พิษฝี เทียบกับแผ่นแปะสิวไฮโดรคอลลอยด์ในห้องทดลองด้วยวิธี disc diffusion พบว่าแผ่นแปะไคโตซานที่มีสารสกัดมีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้ พบว่าความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์มีค่าน้อยซึ่งเหมาะแก่การนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป ซึ่งความรู้ที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์ในการนำสารสกัดหยาบจากตำรับยามาทดสอบฤทธิ์อื่นๆ เช่น ด้านการอักเสบ รวมทั้งวิจัยทางคลินิก และเพื่อพัฒนาเป็นยาตำรับใหม่ที่ใช้ในการรักษาสิวต่อไป

6. บทสรุป

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ของสารสกัดจากตำรับยาทาแก้พิษฝีพบว่าสารสกัดจากตำรับยาทาแก้พิษฝีมียุทธสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ MBC เท่ากับ 2.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในส่วนของฟิล์มไคโตจากตำรับยาทา

แก้พิษฝีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (2 เท่าของค่า MBC)

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออกที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยและขอขอบคุณ ดร.สุกัญญา หลีแจ้ง ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทำวิจัยพร้อมทั้งข้อคิดที่เป็นประโยชน์ในการวิจัยครั้งนี้

8. เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการ กระทรวงศึกษาธิการ. (2542). หนังสือชุดวรรณกรรมหายาก แพทย์ศาสตร์สงเคราะห์: ภูมิปัญญาการแพทย์และมรดกทางวรรณกรรมของชาติ. กรุงเทพมหานคร, 820-22.
- สุธิดา คงทอง. (2552). ไคดิน-ไคโตซาน. วารสารวิชาการอุตสาหกรรมศึกษา, 3(1), 1-7.
- Chen, H. Y., Lin, Y. H., & Chen, Y. C. (2016). Identifying Chinese herbal medicine network for treating acne: implications from a nationwide database. *Journal of ethnopharmacology*, 179, 1-8.
- Laohakunjit, N., & Noomhorm, A. (2004). Effect of plasticizers on mechanical and barrier properties of rice starch film. *Starch-Stärke*, 56(8), 348-356.
- Wang, W., Zu, Y., Fu, Y., & Efferth, T. (2012). In vitro antioxidant and antimicrobial activity of extracts from *Morus alba* L. leaves, stems and fruits. *The American journal of Chinese medicine*, 40(02), 349-356.
- Widerström, M., Wiström, J., Sjöstedt, A., & Monsen, T. (2012). Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(1), 7-20.