



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

ผลของเจลต้านสิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*)
ต่อปัจจัยในการก่อสิวของเชื้อ *Staphylococcus* spp.

EFFECTS OF ANTI-ACNE GEL CONTAINING LUMINESCENT MUSHROOM
EXTRACTS (*NEONOTHOPANUS NAMBI*) ON FACTORS CAUSE ACNE
OF *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

โดย

ดร.สุกัลญา หลีแจ้

ดร.นันทพงศ์ ขำทอง และอาจารย์อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2559

ชื่อเรื่อง: ผลของเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*)
 ต่อปัจจัยในการก่อตัวของเชื้อ *Staphylococcus* spp.

ผู้วิจัย: ดร.สุกัญญา หลีแจ้, ดร.นันทพงศ์ ขำทอง และอาจารย์อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์

สถาบัน: วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีที่พิมพ์: 2560 สถานที่พิมพ์: มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์: มหาวิทยาลัยรังสิต จำนวนหน้างานวิจัย: 74 หน้า

คำสำคัญ: เห็ดเรืองแสง, *Neonothopanus nambi*, เจลต้านชีว, *Staphylococcus* spp.

ลิขสิทธิ์: มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

สารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของสิวและฝีหนองได้ดีมาก การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงมาพัฒนาเป็นเจลต้านชีว และทดสอบประสิทธิภาพของเจลในการลดปัจจัยการก่อตัวของเชื้อ *Staphylococcus* spp. จากการเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสงด้วยอาหาร potato dextrose broth (PDB) และสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเห็ดด้วยเอทิลอะซิเตท พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 (สายพันธุ์มาตรฐานที่สร้างไบโอฟิล์ม) โดยมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) อยู่ในช่วง 2-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จึงนำสารสกัดดังกล่าวไปพัฒนาเป็นเจลต้านชีว จากการเตรียมเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงความเข้มข้น 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (20 MIC) โดยใช้ carbopol Ultrez-21 เป็นสารก่อเจล แล้วนำมาศึกษาความคงตัวภายใต้อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าเจลมีลักษณะสีเหลืองอ่อนใส ไม่แยกชั้น มีความคงตัวดี และไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion และ broth microdilution ของเจลต้านชีว พบว่าเจลดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. epidermidis* ATCC 12228 (สายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม) และ *S. epidermidis* NPRC 011-015 (เชื้อที่แยกได้จากสิว) โดยมีค่าเฉลี่ยของ inhibition zone อยู่ในช่วง 9.01-13.09 มิลลิเมตร และมีค่า MIC/MBC อยู่ในช่วง 2-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ มีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างและทำลายไบโอฟิล์มของเจลต้านชีวต่อเชื้อ *S. epidermidis* พบว่าเจลต้านชีวที่ความเข้มข้น 1/2 MIC และ 1/4 MIC (4 และ 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control และไม่มีฤทธิ์ชักนำให้เชื้อสร้างไบโอฟิล์มเมื่อ

ทดสอบกับเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 นอกจากนี้ เจลด้านสิวที่ความเข้มข้น 1/2 MIC (4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถทำลายไบโอฟิล์มอายุ 1 และ 5 วันของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้มากกว่า 40 และ 25.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการศึกษาโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Scanning Electron Microscopy (SEM) พบว่าโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อที่บ่มด้วย เจลด้านสิวนี้มีความหนาแน่นลดลงอย่างชัดเจน และมีการสร้าง extracellular polymeric substance ลดน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับ negative control จากผลการศึกษาดังกล่าวสรุปได้ว่าเจลด้านสิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงนั้น มีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์สู่ท้องตลาดในอนาคต



Title: Effects of anti-acne gel containing luminescent mushroom extracts (*Neonothopanus nambi*) on factors cause acne of *Staphylococcus* spp.

Researcher: Dr. Sukanlaya Leejae, Dr. Nanthaphong Khamthong and Ampornrut Prapaiwong

Institution: College of Oriental Medicine, Rangsit University

Year of Publication: 2017 Publisher: Rangsit University

Source: Rangsit University No. of page: 74 pages

Keywords: Luminescent mushroom, *Neonothopanus nambi*, anti-acne gel, *Staphylococcus* spp.

Copyright: Rangsit University

Abstract

Luminescent mushroom extracts (*Neonothopanus nambi*) exhibited good antimicrobial activities especially against acne-inducing bacteria. Therefore, the aims of this research were to develop anti-acne gel containing the luminescent mushroom extract and to evaluate the effects of the gel on factors cause acne of *Staphylococcus* spp. The mushroom was cultured in potato dextrose broth (PDB) and the culture filtrate was extracted with ethyl acetate. The extract elucidated pronounced antibacterial activity against *S. aureus* ATCC 29213 and *S. epidermidis* ATCC 35984 (biofilm-positive strain) with minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values ranged from 2-16 µg/ml. For anti-acne gel preparation, the ethyl acetate extract at a concentration 160 µg/ml (20 MIC) and carbopal ultraz-21 (gelling agent) were used in this study. The stability test of the gel was performed at 30°C and 40°C for 6 months. The results showed that the gel was pale yellow, clear, good stability and not contaminated with microorganisms. Biological assessment was tested by agar well diffusion and broth microdilution methods. The results demonstrated that the anti-acne gel showed good activity against *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. epidermidis* ATCC 12228 (biofilm-negative strain) and *S. epidermidis* NPRC 011-015 (clinical strains) with mean of inhibition zone and MIC/MBC values ranged from 9.01-13.09 mm and 2-16 µg/ml, respectively. Moreover, the ability of the gel to prevent biofilm formation and kill mature biofilms was performed. Biofilm formation of *S. epidermidis* ATCC 35984 reduced more than 50% after treatment with 1/2 MIC and 1/4 MIC (4 and 2 µg/ml, respectively) of the anti-acne gel compared with negative control. In contrast, the gel not induced *S. epidermidis* ATCC 12228 to produce biofilm. In addition, the ability of 1 and 5 days staphylococcal biofilm-

grown cells decreased >40 and 25.15% after incubation with 1/2 MIC of the gel, respectively. Scanning Electron Microscopy clearly confirmed that treatment with the anti-acne gel at 1/2 MIC could reduce biofilm formation and inhibit extracellular polymeric substance production when compared with negative control. Therefore, the results suggested that anti-acne gel containing luminescent mushroom extract has the potential for further product development.



กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับความร่วมมืออย่างดียิ่งจากผู้ร่วมโครงการวิจัย ดร.นันทพงศ์ ขำทอง อาจารย์อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์ และอาจารย์กลุ่มวิจัย วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้ความร่วมมือในการทำวิจัย และเสนอแนะข้อมูลที่เป็นประโยชน์ จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.กฤษณา ไกรสินธุ์ อธิการ วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก ที่ให้คำปรึกษา และสนับสนุนในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ศุภยงค์ วรวิฑูริย์ ผู้อำนวยการสถานวิจัยความเป็นเลิศด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้ และขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำการทดลอง ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	22
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	22
วิธีการทดลอง	22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	30
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	50
สรุปผลการวิจัย	50
ข้อเสนอแนะ	51
บรรณานุกรม	52
ภาคผนวก	60
ประวัติผู้วิจัย	61

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง	23
2	ค่าน้ำหนักต่อปริมาตรและค่าร้อยละของผลิตภัณฑ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง	30
3	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อเชื้อ <i>Staphylococcus</i> spp.	31
4	ผลการประเมินความคงตัวของเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสง	36
5	ฤทธิ์ของเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการต้านเชื้อกลุ่ม <i>Staphylococcus</i> spp. ด้วยวิธี agar well diffusion	39
6	ฤทธิ์ของเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการต้านเชื้อกลุ่ม <i>Staphylococcus</i> spp. ด้วยวิธี broth microdilution	40
7	ผลการคัดเลือกเชื้อกลุ่ม <i>Staphylococcus</i> spp. สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์ม	42



สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะของดอกเห็ดเรืองแสงภายใต้แสงธรรมชาติและในที่มืด	4
2 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเห็ดเรืองแสง <i>Neonothopanus nambi</i>	5
3 ลักษณะเชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	11
4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i> บนอาหาร blood agar	12
5 Complete genome sequence ของเชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i>	13
6 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม beta-lactam ของเชื้อแบคทีเรีย	17
7 กระบวนการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย	19
8 ลักษณะของเจลด้านผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงโดยใช้ xanthan gum และ carbopol Ultrez-21 เป็นสารก่ोजล	33
9 ลักษณะของเจลที่มี carbopol Ultrez-21 เป็นสารก่ोजล	33
10 ลักษณะเจลด้านผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสงที่บ่มภายใต้อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน	35
11 การเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของ niacinamide	37
12 ผลของเจลด้านผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงและ vancomycin ต่อเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>S. epidermidis</i>	43
13 ผลของเจลด้านผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสงและ vancomycin ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>S. epidermidis</i>	45
14 ผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>S. epidermidis</i> หลังจากบ่มด้วยเจลด้านผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสง บันทึกภาพด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope	46
15 ผลของเจลด้านผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสงและ vancomycin ต่อเปอร์เซ็นต์การคงเหลือของไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>S. epidermidis</i> ที่สร้างไบโอฟิล์มแล้วเป็นเวลา 1 วัน	48
16 ผลของเจลด้านผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสงและ vancomycin ต่อเปอร์เซ็นต์การคงเหลือของไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>S. epidermidis</i> ที่สร้างไบโอฟิล์มแล้วเป็นเวลา 5 วัน	48
17 ผลการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>S. epidermidis</i> ที่สร้างไบโอฟิล์มแล้วเป็นเวลา 1 วันและ 5 วัน หลังจากบ่มด้วยเจลด้านผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสง บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ Scanning Electron Microscopy	49

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สิว (acne) จัดเป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อย โดยประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์จะพบในวัยรุ่นทั้งชายและหญิง (Tan, 2009) การเป็นสิวมักมีผลต่อคุณภาพชีวิตทั้งด้านอารมณ์ จิตใจ และสังคม จากผลการสำรวจยาที่ทำให้เกิดภาวะซึมเศร้าที่เป็นผลชักนำให้เกิดการฆ่าตัวตายของประชากรในประเทศอังกฤษ ในระหว่างปี ค.ศ. 1998-2011 พบว่ายารักษาสิว (isotretinoin) เป็นหนึ่งในสี่อันดับแรกที่มีผลทำให้คนเกิดภาวะซึมเศร้าและตัดสินใจฆ่าตัวตายในที่สุด (Thomas et al., 2014) อีกทั้งความเข้าใจของคนส่วนใหญ่เกี่ยวกับสิวมักเป็นเรื่องของความสวยงาม ทำให้หลายคนพยายามซื้อยามารักษาด้วยตนเอง ซึ่งแท้จริงแล้วการรักษาสิวจำเป็นต้องได้รับการดูแลจากแพทย์ผิวหนังอย่างเหมาะสม การใช้ยาโดยไม่จำเป็นหรือไม่เหมาะสมกับอาการ เป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการได้รับอันตรายจากการใช้ยาและทำให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น จากการสำรวจพบว่าประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของการรักษาสิวโดยใช้ยานั้นไม่ประสบผลสำเร็จ (Dreno et al., 2010) และทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาสิวเพิ่มสูงขึ้นเป็นลำดับ ดังนั้น ผลิตภัณฑ์รักษาสิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาสิว

เห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) มีลักษณะคล้ายกับเห็ดนางรม ลักษณะของดอกเห็ดมีสีขาวก้านสั้น ในสภาวะมืดเห็ดจะเรืองแสงสีเขียวอมเหลือง ซึ่งเห็ดชนิดนี้จัดเป็นเห็ดพิษ แต่สามารถนำสารพิษมาใช้ประโยชน์ได้ โดยนำไปใช้ในด้านควบคุมโรคพืช พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศได้ (Bua-art et al., 2010) แต่จากการวิจัยของอัมพรรัตน์ ประไพวงศ์ และคณะ (2559) พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสงในห้องปฏิบัติการโดยปราศจากพิษแต่ยังคงประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ โดยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และสารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่าไม่มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในหนูขาวเล็กสายพันธุ์ Swiss albino ที่ได้รับสารสกัดแบบครั้งเดียวในปริมาณ 0.5-2.0 กรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว (อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์ และคณะ, 2559) นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทไม่มีความเป็นพิษต่อไรทะเล โดยมีค่า median lethal concentration (LC₅₀) เท่ากับ 1,786.48 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (สุกัลญา หลีแจ้ และคณะ, 2559)

จากการวิจัยพบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสงขึ้นโคคลอโรมีเทน มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 โดยสามารถฆ่าเชื้อได้ภายในเวลา 1 ชั่วโมง โดยหนึ่งในกลไกการฆ่าเชื้อของสารสกัดดังกล่าวคือการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (สุกัลญา หลีแจ้ และคณะ, 2557) จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อเชื้อ *S. epidermidis* ที่เป็นสาเหตุของสิว พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีกว่าสารสกัดจากเส้นใย โดยมีค่า

ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration: MIC) และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (minimum bactericidal concentration: MBC) อยู่ในช่วง 4-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์เทียบเท่ากับ vancomycin ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อจาก *S. epidermidis* (เหมือนฝัน ชื่อตรง และคณะ, 2557)

ดังนั้น คณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นความสำคัญของพัฒนาเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสง และประเมินประสิทธิภาพในการลดบ่งชี้ในการก่อตัวของเชื้อ *Staphylococcus* spp. เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนการนำเจลดังกล่าวไปใช้ในอนาค

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเจลต้านชีวจากสารสกัดเห็ดเรืองแสง
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของเจลต้านชีวจากสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อเชื้อ *Staphylococcus* spp.
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการลดบ่งชี้การก่อตัวของเชื้อ *Staphylococcus* spp.

ขอบเขตของการวิจัย

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีมากทางคณะผู้วิจัยจึงเล็งถึงการนำสารสกัดดังกล่าวมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลต้านชีว และทดสอบประสิทธิภาพในการลดบ่งชี้การก่อตัวของเชื้อ *Staphylococcus* spp. เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนการนำเจลต้านชีวดังกล่าวไปพัฒนาต่อออกเป็นผลิตภัณฑ์สู่ท้องตลาดในอนาคต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่มีความคงตัวได้
2. มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อและการลดบ่งชี้การก่อตัวของเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อเชื้อ *Staphylococcus* spp.
3. มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ/นานาชาติ/อนุสิทธิบัตร อย่างน้อย 1 ฉบับ

บทที่ 2

ทฤษฎี เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เห็ดเรืองแสง

1.1 ข้อมูลพื้นฐาน

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Neonothopanus nambi*

อาณาจักร: Fungi

วงศ์: Marasmiaceae

เห็ดเรืองแสง (luminescent mushroom) คือเห็ดที่สามารถเรืองแสงได้ โดยเห็ดสามารถเปล่งแสงได้ทั้งในเวลากลางวันและกลางคืน แต่สามารถมองเห็นได้ในสภาวะที่มีดสนิทเท่านั้น ซึ่งแสงที่เรืองรองออกมานั้นอาจเป็นสีเขียวอมเหลืองหรือสีเขียวอมฟ้าตามแต่ชนิดของเห็ด เพื่อดึงดูดแมลงที่หากินในเวลากลางคืนมากัดกินดอกเห็ด เพื่อช่วยในการแพร่กระจายของสปอร์ โดยแสงที่เปล่งออกมานั้นสามารถมองเห็นได้ในระยะไกลประมาณ 10-20 เมตร ลักษณะของแสงที่เปล่งออกมาเป็นแสงที่มีความเย็นเช่นเดียวกับแสงของหิ่งห้อยหรือสัตว์ทะเลบางชนิด แตกต่างจากแสงของเทียนไขหรือไฟฟ้า ซึ่งเป็นแสงที่ให้พลังงานความร้อน ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า การเปล่งแสงทางชีวภาพ (bioluminescence) (กรมป่าไม้, กลุ่มงานหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้, อินเทอร์เน็ต, 2555; Kanokmedhakul et al., 2012)

เห็ดเรืองแสงที่พบในประเทศไทยนั้นมีการศึกษาครั้งแรกในปี พ.ศ. 2547 ซึ่งเห็ดดังกล่าวพบในพื้นที่โคกภูตากา อ. ภูเวียง จ. ขอนแก่น มีลักษณะคล้ายกับเห็ดนางรม ดอกเห็ดมีสีขาว ก้านสั้น มีกิริยาดอก ดังแสดงในภาพที่ 1 เห็ดออกดอกเป็นกลุ่ม ๆ ละ 4-5 ดอก มักพบบนท่อนไม้ที่ตายแล้ว จากการสกัด DNA และเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วน DNA ในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 (Internal Transcribed Spacer Region) ของส่วน rRNA gene ซึ่งเป็นส่วนที่มีความผันแปรในลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมาก สามารถนำมาบ่งชี้ในระดับชนิดได้ และได้นำชิ้นส่วน DNA นี้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS เห็ดเรืองแสงที่พบในเขตโคกภูตากานั้น มีความคล้ายคลึงกันกับเห็ดเรืองแสงชนิด *Omphalotus illudens* และยังคล้ายกับเห็ดที่มีชื่อ *Neonothopanus nambi* อีกด้วย ซึ่งเห็ดในสกุลนี้มีความซับซ้อนในการบ่งชี้มาก เนื่องจากนักอนุกรมวิธานมีการเปลี่ยนชื่อสกุลมาหลายครั้ง จากการศึกษาจนถึงปัจจุบันจึงสรุปในเบื้องต้นได้ว่าเห็ดเรืองแสงที่พบในโคกภูตากาเป็นเห็ดชนิด *N. nambi* (วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และคณะ, 2547)



ภาพที่ 1 ลักษณะของดอกเห็ดเรืองแสงภายใต้แสงธรรมชาติ (A) และในที่มืด (B)

(ที่มา: สุนทร ตรีนนทวัน, อินเทอร์เน็ต, 2555)

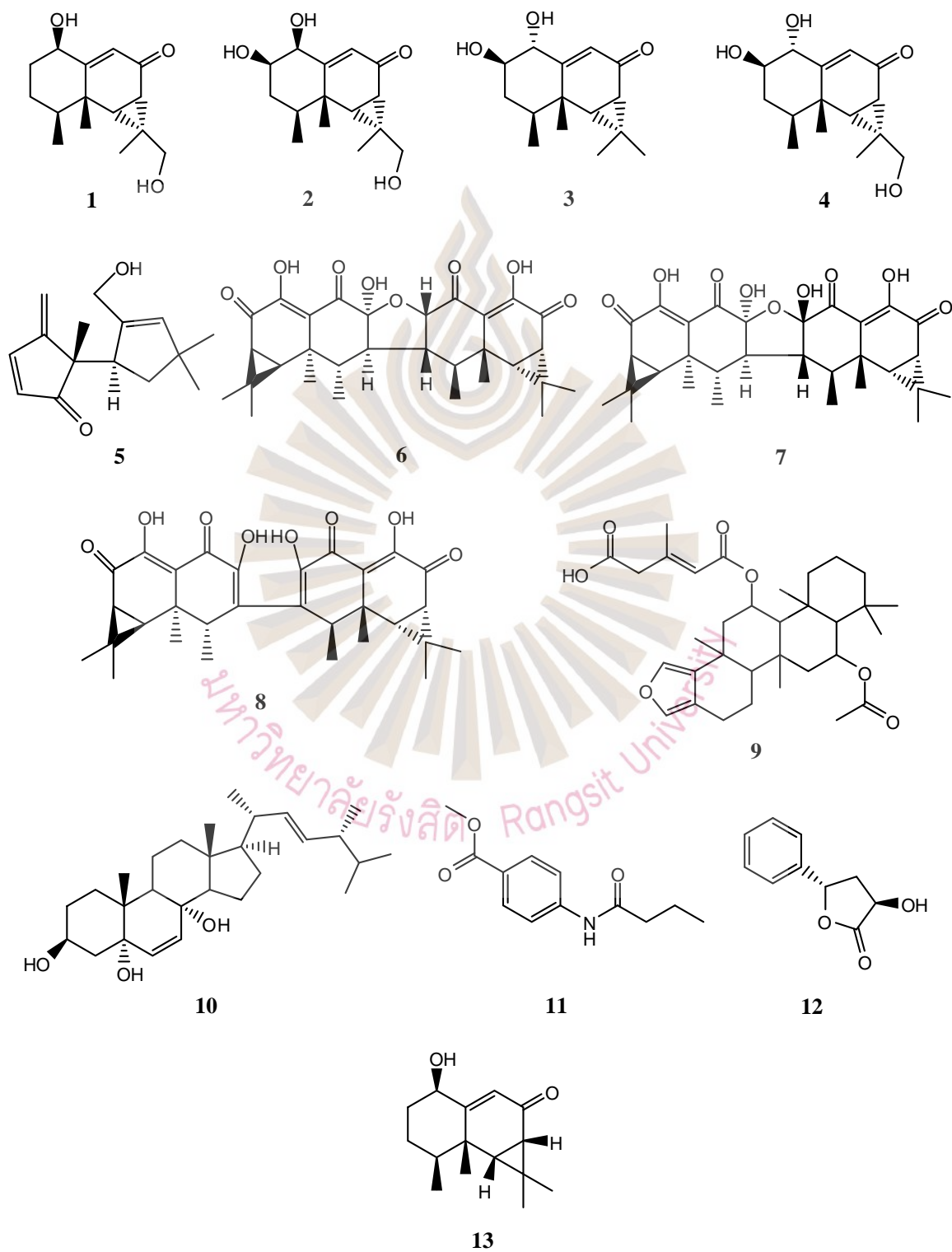
1.2 องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดเรืองแสง

จากการศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท พบกลุ่มสาร 3 กลุ่ม ได้แก่ flavonoid, saponin และ tannin แต่ตรวจไม่พบ anthraquinone, terpenoid, alkaloid และ cardiac glycoside (สุกัลญา หลีแจ้ และคณะ, 2559) จากการแยกสารบริสุทธิ์จากเห็ดเรืองแสงจำนวน 2 ไอโซเลต (PW1, PW2) ด้วยวิธีการทางเคมี แล้วนำมาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี โดยใช้เทคนิค infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectroscopy และ X-ray crystallography ซึ่งในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารออกฤทธิ์หลายชนิด สารที่พบในเห็ดเรืองแสง *N. nambi* นั้นเป็นสารชนิดใหม่ในกลุ่ม aristolane sesquiterpenes จำนวน 4 สาร ได้แก่ nambinone A-C (1-3) และ 1-*epi*-nambinone B (4) กลุ่ม sesquiterpenes ชนิดใหม่คือ nambinone D (5) กลุ่ม dimeric sesquiterpenes ชนิดใหม่ ได้แก่ aurisin K (6) รวมทั้งสารที่พบเป็นปริมาณมากที่สุดคือ aurisin A (7) (Kanokmedhakul et al., 2012)

นอกจากนี้ Tsarkova และคณะ ได้แยกสารบริสุทธิ์จากเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยเมทานอล ได้สารบริสุทธิ์จำนวน 7 สาร ได้แก่ nambinone A (1), nambinone C (3), aurisin Z (8), nambiscalarane (9), ergosta-6,22-diene-3 β ,5,8 α -triol (10), methyl 4-butyraminobenzoate (11) และ *trans*- α -hydroxy- γ -phenylbutyrolactone (12) (Tsarkova et al., 2016)

สุกัลญา หลีแจ้ และคณะ ได้เพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ด้วยอาหาร potato dextrose broth (PDB) แบบสำเร็จรูป โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นระยะเวลา 30 วัน จากนั้นสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเห็ดด้วยเอทิลอะซิเตท และแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี จากผลการทดลองพบว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้จำนวน 2 สาร คือ aurisin A (7) และ axinysone B (13) ดัง

ภาพที่ 2 (สุกัลญา หลีแจ้ และคณะ, 2557) จากรายงานของพิชญนันต์ มาณะสุว และคณะ (2559) พบว่าแยกสารบริสุทธิ์จากเห็ดเรืองแสงได้จำนวน 2 สาร ได้แก่ สาร 7 และสาร 11 โดยแยกได้จากน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท



ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเห็ดเรืองแสง *Neothopanus nambi*

1.3 การใช้ประโยชน์จากเห็ดเรืองแสง

1.3.1 ทางด้านการเกษตร

ไรโซปลา (*Luciaphorus perniciosus* Rack) เป็นศัตรูเห็ดที่มีขนาดเล็ก โดยไรโซปลา มีวงจรชีวิตที่สั้นมาก แต่สามารถแพร่กระจายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปจะพบไรโซปลาในพืชเห็ดถึง 4 เท่า ซึ่งไรโซปลาสามารถให้กำเนิดตัวอ่อนได้โดยไม่ต้องผสมพันธุ์กับไรโซปลา จึงทำให้ไรโซปลา ระบาดและทำลายเส้นใยเห็ดได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจไทยในวงกว้าง จึงมีการศึกษาวิจัยเพื่อใช้สารสกัดจากธรรมชาติหรือชีววิธีในการควบคุมไรโซปลา การศึกษาฤทธิ์การฆ่าไรโซปลาของส่วนสกัดจากน้ำเลี้ยงและเส้นใยเห็ดเรืองแสง โดยสกัดด้วยเฮกเซน ไคลลอโรฟอร์ม และเอทิลอะซิเตท แล้วนำสารสกัดความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทดสอบกับไรโซปลาเพศเมียจำนวน 100 ตัว ที่เพาะเลี้ยงบนเส้นใยเห็ดหนูด้วยการพ่น พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงและเส้นใยมีฤทธิ์การฆ่าไรโซปลาได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดชั้นเฮกเซนจากเส้นใยมีฤทธิ์ฆ่าไรโซปลาได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (กันทรส วิชัยดิษฐ และคณะ, 2557) นอกจากนี้ มีการศึกษาฤทธิ์การฆ่าไรโซปลาของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสง พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท สามารถฆ่าไรโซปลาได้มากที่สุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.45 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ส่วนสารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วยเฮกเซน สามารถฆ่าไรโซปลาได้มากที่สุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.88 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ส่วนน้ำเลี้ยงเห็ดที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัดนั้น พบว่าสามารถฆ่าไรโซปลาได้เพียง 33.08 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (อารียาช่วยอินทร์ และพีรวัฒน์ ชัยวันดี, 2559) จากการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงมีศักยภาพที่ดี สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ควบคุมไรโซปลาได้ในอนาคต

จากการศึกษาการใช้สาร aurisin A (7) ที่แยกได้จากเห็ดเรืองแสงควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศ พบว่าการใช้สาร 7 ให้ผลในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรครากปมได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ น้ำเลี้ยงเห็ดและเส้นใยก้อนเชื้อเห็ดมีส่วนลดอัตราการเกิดรากปมได้เช่นกัน แต่หากไม่ใช้สาร 7, น้ำเลี้ยงเห็ด เส้นใยก้อนเชื้อเห็ด หรือสารเคมี carbofuran อย่างใดอย่างหนึ่งแล้ว ต้นมะเขือเทศมีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรครากปมมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (สุริย์พร บัวอาจ และคณะ, 2554) นอกจากนี้ มีรายงานการใช้ น้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสง 2 ไอโซเลต (PW2 และ KKU2) ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าน้ำเลี้ยงเห็ดทั้ง 2 ไอโซเลตมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการฟักไข่ และสามารถฆ่าตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยดังกล่าวได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง และพบว่ากลุ่มไข่ที่ผ่านการแช่ในน้ำเลี้ยงเห็ดไอโซเลต KKU2 นั้น มีปริมาณของคอลลาเจนและไกลโคเจนในเนื้อเยื่อของกลุ่มไข่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มไข่ที่ไม่ผ่านการแช่ในน้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสง (วีรวัตร นามานุศาสตร์ และคณะ, 2556)

จากรายงานของ Bua-art et al. (2011) พบว่าการออกฤทธิ์ของ aurisin A (7) ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศนั้นไม่มีผลกระทบต่อเชื้อราและแบคทีเรียปฏิบัณท์ที่มีประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol) และแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน เช่น *Rhizobium* spp. นอกจากนี้ สาร 7 ยังออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราชั้นต่ำในสกุล *Pythium* spp. และ *Phytophthora palmivora* ที่เป็นสาเหตุโรคพืชได้อีกด้วย ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงศักยภาพและประสิทธิภาพของเห็ดเรืองแสงในการนำมาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพืช หรือนำมาผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ในการเกษตร

1.3.2 ทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ

1) การประเมินความเป็นพิษ

เห็ดเรืองแสงจัดเป็นเห็ดพิษและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย แต่การที่จะนำสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงมาใช้ประโยชน์ในสิ่งมีชีวิตนั้น จำเป็นต้องทดสอบความเป็นพิษทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อไรทะเล โดยเฉพาะเลี้ยงเห็ดด้วยอาหาร PDB บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นนำส่วนของน้ำเลี้ยงเห็ดมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท แล้วนำสารสกัดไปทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในไรทะเล จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดไม่มีความเป็นพิษต่อไรทะเล โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 1,786.48 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (สุกัลญา หลีแจ้ และคณะ, 2559)

จากการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงในหนูขาวเล็กพันธุ์ Swiss albino เพศผู้ (31.0 ± 1.6 กรัม) และเพศเมีย (27.4 ± 0.9 กรัม) โดยหนูได้รับสารสกัดดังกล่าวในปริมาณ 0.5-2.0 กรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว พบว่าค่า median lethal dose (LD_{50}) ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงและเส้นใยเห็ดเรืองแสงมีค่ามากกว่า 2.0 กรัม/กิโลกรัม ทั้งเพศผู้และเพศเมีย จากการสังเกตพฤติกรรมต่าง ๆ หลังจากหนูขาวได้สารสกัดทั้ง 2 ส่วนอย่างใกล้ชิดในช่วง 30 นาที ถึง 8 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดทั้ง 2 ส่วนที่ขนาด 2.0 กรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว ทำให้หนูขาวมีอาการซึม สงบนิ่ง แต่ไม่สูญเสียการทรงตัวในช่วง 3-4 ชั่วโมงแรกหลังจากได้รับสารสกัดดังกล่าวเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม เมื่อสังเกตอาการต่อไปจนครบ 7 วันหลังจากหนูขาวได้สารสกัดดังกล่าวพบว่าหนูขาวไม่แสดงอาการความเป็นพิษอื่น ๆ ตลอดการทดลอง ส่วนหนูขาวที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.5-1.5 กรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว ไม่แสดงพฤติกรรมที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเห็ดเรืองแสงมีคุณสมบัติและมีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นยาได้ในอนาคต (สุกัลญา หลีแจ้ และคณะ, 2557)

2) ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเห็ดเรืองแสง พบว่าสาร 3, 6 และ 7 ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด NCI-H187 ได้ โดยมีค่า median inhibition concentration (IC_{50}) เท่ากับ 16.42, 1.45 และ 1.55 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนสาร 7 สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งชนิด BC1 และ cholangiocarcinoma ได้ดีอีกด้วย และสาร 6 สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งชนิด KB ได้ดีเช่นกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.87 มิลลิโมลาร์ (Kanokmedhakul et al., 2012)

จากการตรวจสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อเซลล์มะเร็งเฉพาะเลี้ยงชนิด MCF-7, HeLa และ Colo205 โดยสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตทมีความเป็นพิษสูงสุดต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 และ Colo205 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.3 และ 0.002 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน มีความเป็นพิษสูงสุดต่อเซลล์มะเร็ง HeLa โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.72 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ชัญติกา พวงงาม และคณะ, 2558) การศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงมีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์มะเร็ง ดังนั้น สามารถนำมาศึกษาต่อยอดเพื่อพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งได้ในอนาคต

3) ฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง พบว่าสารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีที่สุด สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ (NO) ที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ macrophage โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.9-27.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทและเฮกเซน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 19.7 และ 25.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Prapaiwong et al., 2014)

นอกจากนี้ สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 24.3-125.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีรายงานการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเห็ดเรืองแสงด้วยการฉายรังสีแกมมาที่ความแรง 5, 10 และ 20 กิโลเกรย์ เปรียบเทียบแนวโน้มของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดก่อนและหลังการฉายรังสี โดยนำน้ำเลี้ยงและเส้นใยเห็ดเรืองแสงมาสกัดด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตท จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วยเฮกเซนมีแนวโน้มของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดก่อนทำการฉายรังสี แต่สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตทหลังฉายรังสีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลง (กัญญาวีร์ พุ่มบุตร และคณะ, 2557)

4) ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเห็ดเรืองแสงไอโซเลต PW1 ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วันในสภาวะมืด โดยนำขูดเพาะเลี้ยงมา ล้างล้างเป็นเวลา 2 ชั่วโมงทุก ๆ วันตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง จากนั้นทำการเตรียมสารสกัด หยาบและแยกสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ผลการทดลองพบว่าสาร 6 และ 7 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.61 และ 0.80 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) โดยมีค่า MIC เท่ากับ 23.84 และ 92.55 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (Kanokmedhakul et al., 2012)

นอกจากนี้ มีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของ สารสกัดจากเห็ดเรืองแสง โดยเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสงในอาหาร PDB สำเร็จรูป บ่มที่อุณหภูมิห้องใน สภาวะที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นสกัดสารออกฤทธิ์โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และทดสอบ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วยไคคลอโรมีเทนมี ประสิทธิภาพดีที่สุดในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 โดยสามารถฆ่าเชื้อได้ภายในเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งหนึ่งในกลไกการฆ่าเชื้อของสารสกัดดังกล่าวคือการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (สุกัญญา หลีแจ้ และคณะ, 2557)

สิว จัดเป็น โรคผิวหนังที่พบได้บ่อย โดยสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดสิวคือ เชื้อ *Propionibacterium acnes* การเป็นสิวมักมีผลต่อคุณภาพชีวิตทั้งด้านอารมณ์ จิตใจ และสังคม ทำให้สูญเสีย ความมั่นใจในตนเอง เกิดความเครียดและวิตกกังวล จึงมีการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในการรักษา สิว จากการศึกษาศักยภาพต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสง พบว่าสารสกัดจากน้ำ เลี้ยงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* ได้ในระดับดีมาก โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนการศึกษาศักยภาพของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ที่เป็นสาเหตุของสิว โดยนำน้ำเลี้ยงและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตท) และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย จากผลการทดลองพบว่าสาร สกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีกว่าสารสกัดจากเส้นใย โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 4-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (เหมือนฝัน ช่อตรง และคณะ, 2557)

นอกจากนี้ มีการศึกษาศักยภาพของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และบางสายพันธุ์สามารถก่อโรครุนแรงในคนได้ จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วยเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าสารสกัดจากเส้นใย โดยมี ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 256 และ 512 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ชนนาถ เจริญบุญญาฤทธิ์ และคณะ, 2557) จากการศึกษาลักษณะของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงและเส้นใยเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้ง

การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงและเส้นใยที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด (เฮกเซน ไคลลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตท) สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วย hexane มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าสารสกัดจากตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ (กิริยา มุลทองชุน และคณะ, 2557) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเห็ดเรืองแสงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* และ *E. coli* ได้ ซึ่งไบโอฟิล์มนั้นมีบทบาทสำคัญมากในการช่วยให้เชื้อแบคทีเรียคือยา หรือรอดชีวิตจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกัน และก่อให้เกิดการติดเชื้อและมีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยในโรงพยาบาลเพิ่มสูงขึ้น

5) ฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์และรา

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคผิวหนังของสารสกัดเห็ดเรืองแสงด้วยวิธี broth microdilution พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วยไคลลอโรมีเทน สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *Microsporum gypseum* ที่เป็นสาเหตุโรคกลากได้ดีที่สุด รองลงมาคือเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท โดยมีค่า MIC เท่ากับ 8, 16 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า minimum fungicidal concentration (MFC) >1,024 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (วันเพ็ญ นิจศรีวงษ์ และสุกศิจิ เฟงรัก, 2557) นอกจากนี้ มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ที่เป็นสาเหตุของโรค candidiasis โดยใช้วิธี broth microdilution จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยไคลลอโรมีเทนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ที่ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วยเฮกเซนและไคลลอโรมีเทนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์ก่อโรคคิงก์กล่าวได้ดี โดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (กิริยา ประเสริฐเมฆ และคณะ, 2557) ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อราและเชื้อยีสต์ก่อโรคได้ สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รักษาโรคผิวหนังที่มีสาเหตุจากเชื้อราได้

6) การพัฒนาผลิตภัณฑ์

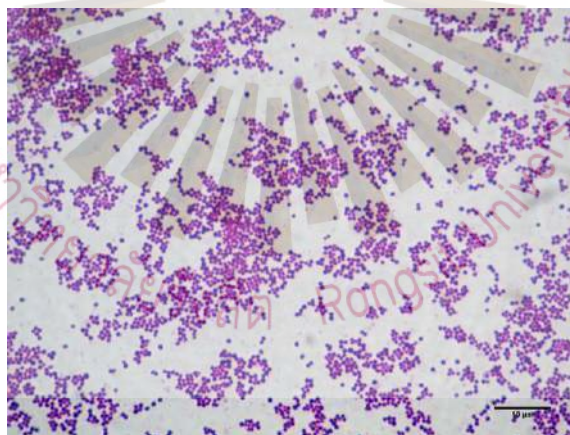
จากการพัฒนาเจลล้างมือฆ่าเชื้อที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสง (ความเข้มข้น 10,240 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 10 MIC) และใช้ carbopol Ultraz-21 เป็นสารก่อเจล จากการประเมินผลิตภัณฑ์ทางกายภาพและทางเคมี พบว่าเจลที่บ่มภายใต้สภาวะเร่งมีการแยกชั้นของเจล ค่า pH และค่าความหนืดลดลงเล็กน้อย ส่วนฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* พบว่ามีค่า MIC/MBC อยู่ในช่วง 2-64 และ 256-1,024 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (นันทิยา ชุมไชโย และคณะ, 2558)

2. *Staphylococcus epidermidis*

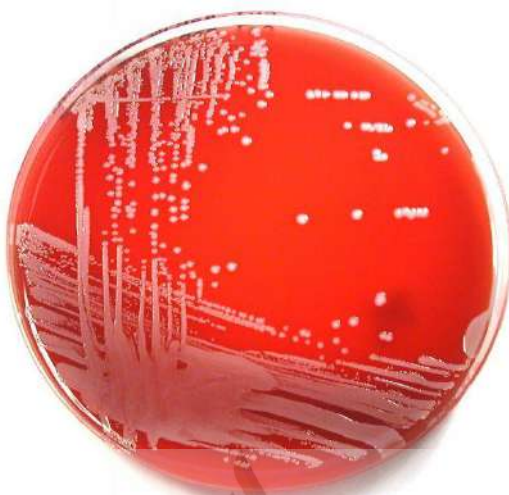
2.1 ข้อมูลพื้นฐาน

S. epidermidis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) รูปร่างกลม (cocci) ขนาดประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตร อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (ภาพที่ 3) ลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก สีขาว (ภาพที่ 4) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming bacteria) ไม่สร้างเอนไซม์ coagulase (coagulase-negative staphylococci; CoNS) สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

S. epidermidis เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal microbiota) ในคน สามารถพบเชื้อมากมายได้บริเวณผิวหนัง โพรงจมูก รูหู และทางเดินปัสสาวะส่วนปลาย ในอดีตไม่ค่อยเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ แต่เนื่องจากการใช้สายสวนปัสสาวะและอวัยวะเทียมในร่างกายเพิ่มมากขึ้น จึงพบว่ามีความสำคัญในการติดเชื้อในโรงพยาบาลสูงขึ้น จึงจัดให้เชืชนิดนี้เป็นแบคทีเรียก่อโรคฉวยโอกาส (opportunistic infection) นอกจากนี้ โรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *S. epidermidis* จะยากต่อการรักษา เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ และมีแบบแผนการดื้อยาไม่แน่นอนและแตกต่างกับ *S. aureus* โดยพบว่ามี การดื้อยาต่อกลุ่ม penicillinase-resistant penicillin และ cephalosporin มากกว่า *S. aureus* (นิธิ ตั้งศิริ-ทรัพย์, 2555)



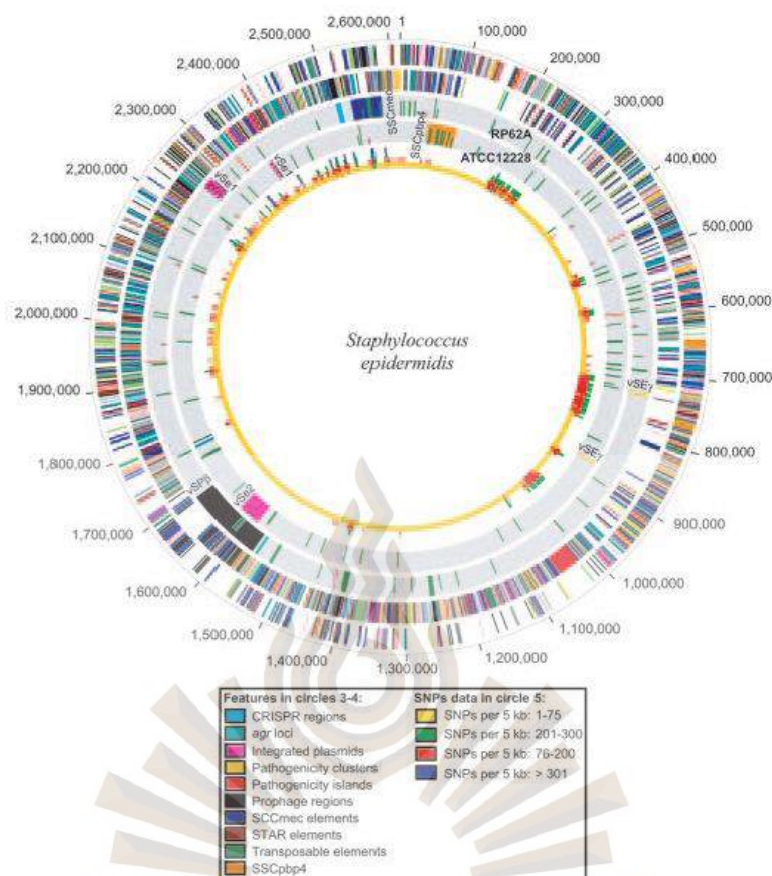
ภาพที่ 3 ลักษณะเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
(ที่มา: “*Staphylococcus epidermidis*,” internet, n.d.)



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* บนอาหาร blood agar
(ที่มา: “*Staphylococcus epidermidis*,” internet, n.d.)

2.2 โครงสร้างทางพันธุกรรม

ในปี ค.ศ. 2005 ได้มีการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมอย่างครบถ้วนของเชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์ RP62A โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี random shotgun พบว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวมี rRNA operon ทั้งสิ้นจำนวน 6 operon มีปริมาณเบส C+G เท่ากับ 32 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวของโครโมโซมเท่ากับ 2,616,530 bp นอกจากนี้ มีการศึกษาพลาสมิดหลายชนิดที่ encode สำหรับ resistant gene เช่น *vSe1* และ *vSe2* ที่พบในสายพันธุ์ RP62A และ ATCC 12228 โดยยีนนี้ encode สำหรับการสร้างโปรตีน cadmium and surface adhesion protein และมี CAP operon ซึ่ง operon นี้สามารถพบได้ในเชื้อ *Bacillus anthracis* (Gill et al., 2005) ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 Complete genome sequence ของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* โดยนำข้อมูลลำดับ DNA มาจากฐานข้อมูลใน GenBank (accession number: AE015929) (ที่มา: Namvar et al., 2014)

2.3 โครงสร้างของเซลล์และระบบเมตาบอลิซึม

S. epidermidis มีลักษณะของผนังเซลล์ที่พิเศษกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่น กล่าวคือ มี teichoic acid ที่ประกอบด้วย ribitol หรือ glycerol ที่จับกันด้วยพันธะ phosphodiester และเชื่อมกับ peptidoglycan ด้วยพันธะ covalent นอกจากนี้ ยังมี glycerol teichoic acid glycosyl ในโครงสร้างของผนังเซลล์อีกด้วย จึงสามารถใช้เอนไซม์ lysostaphin ในการแยกเชื้อ *Staphylococcus* ออกจากเชื้อกลุ่ม *Micrococcus* ได้ง่าย ขึ้น นอกจากนี้ เชื้อ *S. epidermidis* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีอากาศได้ แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาล mannitol ได้ ส่วนในสภาวะที่มีอากาศนั้น เชื้อสามารถผลิตกรดจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่หลากหลายได้ เช่น fructose, maltose, sucrose และ glycerol เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม เชื้อ *S. epidermidis* ส่วนใหญ่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ coagulase ได้ (Namvar et al., 2014)

2.4 นิเวศวิทยา

เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อ *S. epidermidis* นั้นอยู่ในกลุ่มเชื้อ *Staphylococcus* ที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ coagulase ได้ และเป็นหนึ่งในห้าของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้บ่อยที่สุดบริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกของมนุษย์ โดยสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ได้หลากหลาย เนื่องจากมีการใช้อุปกรณ์ สายสวน หรือการปลูกถ่ายอวัยวะเพิ่มมากขึ้น จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1980 เชื้อ *S. epidermidis* จึงถูกจัดให้เป็นหนึ่งในเชื้อฉวยโอกาสที่สามารถก่อโรคในคนได้ เนื่องจากมีอุบัติการณ์การติดเชื้อดังกล่าวในผู้ป่วยสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เช่น ผู้ป่วยโรคหัวใจที่ได้รับการผ่าตัด การผ่าตัดกระดูกสันหลัง ข้อต่อ หรือการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น (von Eiff et al., 2002) จากรายงานวิจัยพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ lipase ที่สามารถย่อย ester ได้หลายชนิด เช่น geranyl, unsaturated ester และ medium-chain ester โดยไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวของเชื้อจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางเทคโนโลยีทางชีวภาพได้ (Chang et al., 2001) โดยหากเชื้อดังกล่าวถูกบ่มด้วย *n*-propanol, propane, ethanol, chlorhexidine และ alcohol เชื้อจะไม่สามารถรอดชีวิตได้แม้จะมีการสร้างไบโอฟิล์มมาปกป้องตัวเซลล์ก็ตาม และหากบ่มเชื้อใน H_2O_2 เป็นเวลา 5 นาที จะลดการรอดชีวิตของเชื้อได้ ดังนั้น จึงมีการใช้ H_2O_2 ความเข้มข้น 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ในการลดจำนวนเชื้อหรือกำจัดเชื้อ *S. epidermidis* ที่มีการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของวัสดุ (Presterl et al., 2007)

2.5 Virulence factor

ปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรค (virulence factor) ของเชื้อ *S. epidermidis* ประกอบด้วยรายละเอียดดังนี้

2.5.1 ไบโอฟิล์ม เชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกันหลายชนิดบนพื้นผิวของวัสดุหรือเซลล์จะมีการสร้างไบโอฟิล์มขึ้น เพื่อปกป้องตัวเชื้อจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ยาปฏิชีวนะ สารเคมีต่าง ๆ เป็นต้น โดยคุณสมบัติที่โดดเด่นของไบโอฟิล์มคือ ลดอัตราการซึมผ่านของยาหรือสารเคมี ลดอัตราการแบ่งเซลล์ ลดการสังเคราะห์โปรตีน ยับยั้งการจับกินของระบบภูมิคุ้มกัน (phagocytosis) และลดการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้นมานั้นสามารถทำให้เชื้อรอดพ้นจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกัน และทำให้เกิดการติดเชื้อเพิ่มสูงขึ้น (Namvar et al., 2014)

2.5.2 Polysaccharide intracellular adhesion (PIA) หรือ poly-*N*-acetylglucosamide (PNAG) หนึ่งในองค์ประกอบหลักของ extracellular matrix slime ที่พบในเชื้อ *S. epidermidis* ซึ่งควบคุมโดย *ica* gene operon (*icaA*, *icaD*, *icaB* และ *icaC*) ซึ่งการแสดงออกของ *ica* gene นั้นถูกควบคุมโดย *icaR* component (Namvar et al., 2014)

2.5.3 Biofilm-associated protein (Bap/Bhp) จัดเป็น surface adhesion protein ที่พบได้ทั่วไปในเชื้อ *S. epidermidis* และพบได้ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากเต้านมวัวอักเสบ โดย Bap จัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เชื้อ *S. epidermidis* มีความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มขึ้น เพราะเป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้างไบโอฟิล์ม (Namvar et al., 2014)

2.5.4 Phenol-soluble modulins (PSMs) จัดเป็น กลุ่ม ของ amphipathic ที่เป็น alpha-helical peptide ที่พบได้ในเชื้อก่อโรคลกลุ่ม staphylococci ทุกสายพันธุ์ โดย PSMs สามารถทำให้เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงแตก และกระตุ้นการหลั่ง cytokines และ neutrophils ทำให้เกิดการอักเสบได้ (Vuong et al., 2004) การจำแนกชนิดของ PSMs ในเชื้อ *S. epidermidis* โดยใช้เทคนิค mass spectrometry และ Edman degradation สามารถจำแนกได้ 6 ชนิด โดย PSM δ นั้นมีบทบาทสูงสุดในการทำให้เซลล์แตก (cytolysis) (Cheung et al., 2010)

2.5.5 สารพิษ (Toxin) เชื้อ *S. epidermidis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยนั้น พบว่ามีส่วน pathogenicity island (SePi) ซึ่งใช้สำหรับสร้าง staphylococcal enterotoxin-like toxin (SEIL) และ C3 enterotoxin (SEC3) (Marraffini and Sontheimer, 2008) นอกจากนี้ เชื้อยังมีการสร้าง delta-toxin ที่เป็นสาเหตุทำให้เม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดเลือดออกในลำไส้ (hemorrhagic enterocolitis) ในทารกแรกเกิดที่รักษาตัวในโรงพยาบาล (Vuong and Otto, 2002)

2.6 การแพร่กระจายของเชื้อ

S. epidermidis เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ตามผิวหนังของมนุษย์ และมีพบได้บ่อยบริเวณรักแร้ คีรษะ และโพรงจมูก (Kloos and Musselwhite, 1975) โดยเชื่อดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่ม coagulase-negative staphylococci (CoNS) ที่สามารถจำแนกออกจากเชื้อกลุ่ม coagulase-positive staphylococci เช่น *S. aureus* เนื่องจาก *S. epidermidis* ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ coagulase ได้ (Otto, 2009) เชื้อ *S. epidermidis* จัดเป็นเชื้อประจำถิ่นที่สามารถก่อโรคได้ โดยการก่อโรคนั้นมีความสัมพันธ์กับเซลล์เจ้าบ้าน (host) ซึ่งหากร่างกายของ host อ่อนแอหรือภูมิคุ้มกันต่ำ เชื้อชนิดนี้ก็สามารถก่อโรคได้ โดยเฉพาะการก่อโรคในโรงพยาบาล เช่น การติดเชื้อในผู้ป่วยที่ใช้สายสวนปัสสาวะ หรือผู้ป่วยที่ใช้อวัยวะเทียมในร่างกาย (Roger et al., 2009) ซึ่งการติดเชื้อดังกล่าวส่งผลให้อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยเพิ่มสูงขึ้น และยังนำไปสู่การพักรักษาตัวในโรงพยาบาลนานขึ้น ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มขึ้นตามลำดับ เช่น ในแอฟริกา (De Beer et al., 2011; Rosenthal et al., 2012) จากการแยกเชื้อบริเวณ โพรงจมูกของบุคลากรที่ทำงานในโรงพยาบาล จำนวน 163 คน พบว่ามี 96 คนที่ตรวจพบเชื้อ *S. epidermidis* (Pourmand et al., 2011) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาในประเทศเคนยา โดยการเก็บตัวอย่างเลือดจากทารกที่ตายตั้งแต่กำเนิด ในระหว่างปี ค.ศ. 2000-2009 พบว่าตรวจพบเชื้อ *S. epidermidis* สูงถึง 33 เปอร์เซ็นต์ (Kohli-Kochhar et al., 2011) นอกจากนี้ มีการศึกษาในประเทศบราซิลพบว่าสามารถแยก

เชื้อ *S. epidermidis* จากของเสียที่ทิ้งจากโรงพยาบาลได้ 2.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความเสี่ยงสูงมากที่เชื้อดังกล่าวจะมีการแพร่ระบาดออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกโรงพยาบาล (Nascimento et al., 2015)

ส่วนการเก็บตัวอย่างเชื้อจากแผลสดและแผลเรื้อรังในผู้ป่วยจำนวน 168 คนในประเทศมาเลเซีย พบว่าสามารถแยกเชื้อก่อโรคได้จำนวน 210 ไอโซเลต โดยตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ได้มากที่สุด (49 ไอโซเลต, 23 เปอร์เซ็นต์) ส่วนเชื้อ *S. epidermidis* ตรวจพบได้มากที่สุดในแผลสด (15 ไอโซเลต, 17.9 เปอร์เซ็นต์) และจากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะพบว่า *Staphylococcus* spp. มีอัตราคือต่อยาปฏิชีวนะมากที่สุด ได้แก่ penicillin และ ampicillin (Wong et al., 2015)

เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อ *S. epidermidis* นั้นเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยที่รับการผ่าตัด การใช้สายสวน หรือการปลูกถ่ายอวัยวะ จากรายงานของประเทศอังกฤษพบว่าผู้ป่วยที่ใช้อวัยวะเทียมในร่างกายในห้องผู้ป่วยวิกฤตของโรงพยาบาลนั้น อย่างน้อย 5 ราย (คิดเป็น 22 เปอร์เซ็นต์) จะมีการติดเชื้อ *S. epidermidis* ในกระแสเลือด (Rogers et al., 2009) และเชื้อดังกล่าวยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายอวัยวะ การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด (McCann et al., 2008) การติดเชื้อที่ตาเนื่องจากการปนเปื้อนเชื้อจากการใช้คอนแทกเลนส์ การติดเชื้อจากการใช้สายสวนปัสสาวะ (Warren, 2001) การติดเชื้อในกระแสเลือด และการติดเชื้อบริเวณอื่น ๆ นอกจากนี้ มีการตรวจพบเชื้อชนิดนี้บริเวณผิวหนังเพิ่มมากขึ้น มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว มีปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงในการก่อโรคที่หลากหลาย ส่งผลให้ *S. epidermidis* จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในคนเพิ่มสูงขึ้น (Namvar et al., 2014)

2.7 การดื้อยาปฏิชีวนะ

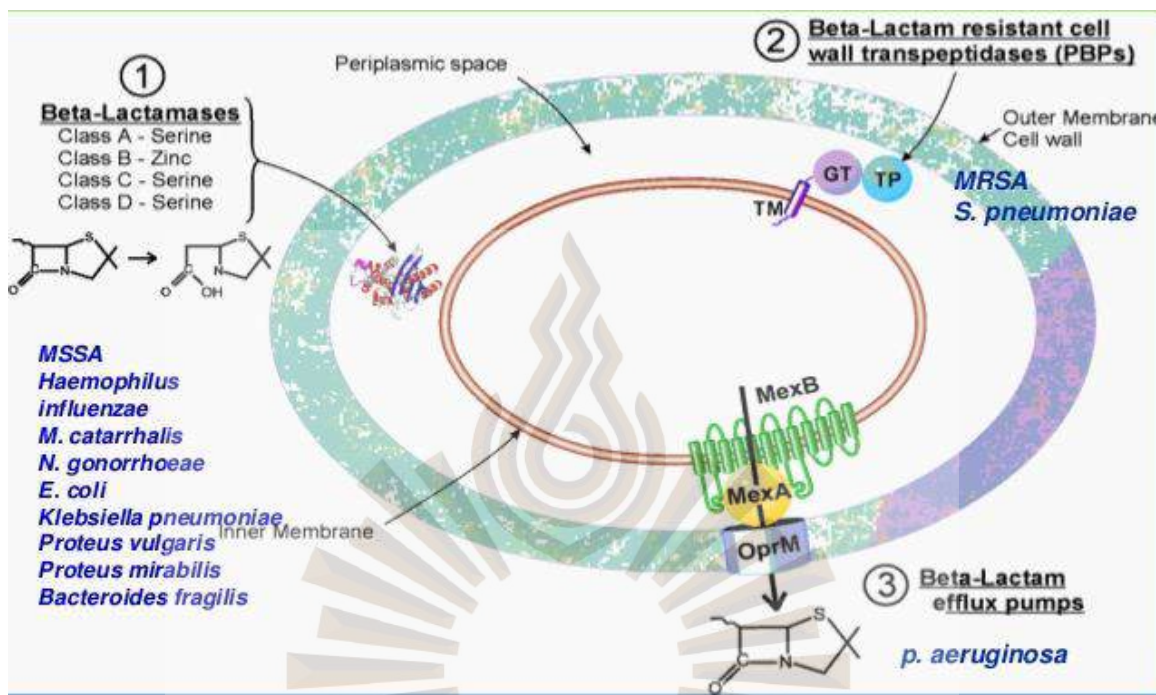
การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์ในปัจจุบันนั้นพบว่าเป็นปัญหาใหญ่ โดยเฉพาะเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาล กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียนั้นอาจเกิดกับยาเพียงแก่หนึ่งชนิด หรือมากกว่าหนึ่งชนิด อย่างไรก็ตาม การกลายพันธุ์และการได้รับยีนดื้อยาจากภายนอกนั้นก็ก็เป็นสาเหตุหนึ่งของการดื้อยาได้เช่นกัน (Garza-Gonzalez et al., 2010) นอกจากนี้ ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อหลายชนิด เช่น *S. epidermidis* ก็ทำให้เชื้อดื้อยาได้ โดยการลดความสามารถในการนำยาปฏิชีวนะเข้าสู่เซลล์ (Hall-Stoodley et al., 2004)

ในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาพบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในทางการแพทย์เพิ่มสูงขึ้น รวมถึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์แบบกว้าง เช่น ยากลุ่ม beta-lactam ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง จึงส่งผลให้เกิดปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาได้ง่ายขึ้น (Smith et al., 2003) อุบัติการณ์การดื้อยาต่อยากลุ่ม beta-lactam ของเชื้อ *S. epidermidis* นั้นพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยมี 3 กลไกหลักดังนี้ (ภาพที่ 6)

- เชื้อสร้างเอนไซม์ beta-lactamase เพื่อย่อยวงแหวน beta-lactam ของยา ทำให้ยาออกฤทธิ์ไม่ได้

- การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยา โดยเชื้อสร้าง PBP2a ทำให้ยาจับกับเป้าหมายไม่ได้หรือจับได้น้อยลง

- การเปลี่ยนแปลงความสามารถของเยื่อเลือกผ่าน ทำให้ยาแพร่เข้าเซลล์ได้น้อยลง



ภาพที่ 6 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม beta-lactam ของเชื้อแบคทีเรีย

ส่วนการดื้อต่อยากลุ่ม quinolones เช่น ciprofloxacin, ofloxacin, fusidic acid และยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่น ๆ เช่น vancomycin นั้น พบว่ามีอัตราที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งกลไกในการดื้อต่อยา fusidic acid คือ การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยาและป้องกันตัวเชื้อจากยาโดยยีน *fusA*, *fusE* (Norstrom et al., 2007) และมีการสร้างโปรตีนกลุ่ม FusB โดยยีน *fusB*, *fusC* และ *fusD* (O'Neill et al., 2007)

2.8 การป้องกันและการรักษา

S. epidermidis นับว่าเป็นหนึ่งในแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อจากอุปกรณ์ทางการแพทย์ (biomaterial-associated infection: BAI) ในโรงพยาบาลมากที่สุด เนื่องจากเชื้อมีการสร้าง extracellular polysaccharide และ ไบโอฟิล์ม ทำให้เชื้อสามารถเกาะติดและรอดชีวิตบนพื้นผิวที่หลากหลายของวัสดุได้เพิ่มขึ้น รวมทั้งยับยั้งการแพร่ของยาปฏิชีวนะเข้าไปในเซลล์ของเชื้อ (Waldvogel and Bisno, 2000) นอกจากนี้ การรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะและการกำจัดเชื้อจากพื้นผิวของวัสดุทางการแพทย์นั้นพบว่าเชื้อมีการดื้อต่อยาดังกล่าวอย่างรวดเร็ว จึงมีการพัฒนาและคิดค้นยาปฏิชีวนะเพื่อควบคุมเชื่อดังกล่าว

cationic antimicrobial peptides (Amps) เป็นกลุ่มยาที่มีเป้าหมายการออกฤทธิ์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) รวมถึงยาในกลุ่ม bactericidal peptides ที่มีองค์ประกอบของ lipopolysaccharide โดยจะลดจำนวนของเชื้อ *S. epidermidis* ในอุปกรณ์ทางการแพทย์และอวัยวะเทียมบางประเภท แต่จากงานวิจัยพบว่า furanone complex มีประสิทธิภาพในการลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ได้ (Lonn-Stensrud et al., 2009) ส่วนยาในกลุ่ม oxazolidinone เช่น linezolid ก็มีบทบาทสำคัญในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้หลากหลายชนิด เช่น methicillin-resistant staphylococci และ glycopeptides-resistant staphylococci โดยตัวยาจะไปยับยั้งการสร้างโปรตีน ซึ่งเป้าหมายการออกฤทธิ์นั้นคือการจับกับบริเวณ 70s initial complex ยานชนิดนี้ใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรคติดเชื้อในกระดูกและข้อต่อ (Mogenet et al., 2004) นอกจากนี้ มีสารออกฤทธิ์บางชนิดที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อได้ เช่น *N*-acetylcysteine (NAC) น้ำมันอบเชย และ farnesol โดยมีประสิทธิภาพสูงมากในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มและการยึดเกาะของเชื้อ (Gomes et al., 2011) ส่วนยา vancomycin, linezolid, daptomycin, tigecycline, quinupristin/dalfopristin และ dalbavacin นั้น ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจาก *S. epidermidis* ได้เช่นกัน นอกจากนี้ ยาที่มีฤทธิ์ในการลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้ เช่น rifampicin แต่ผลเสียที่ตามมาคือเชื้อมีการดื้อต่อยาดังกล่าวอย่างรวดเร็ว (Hellmark et al., 2009)

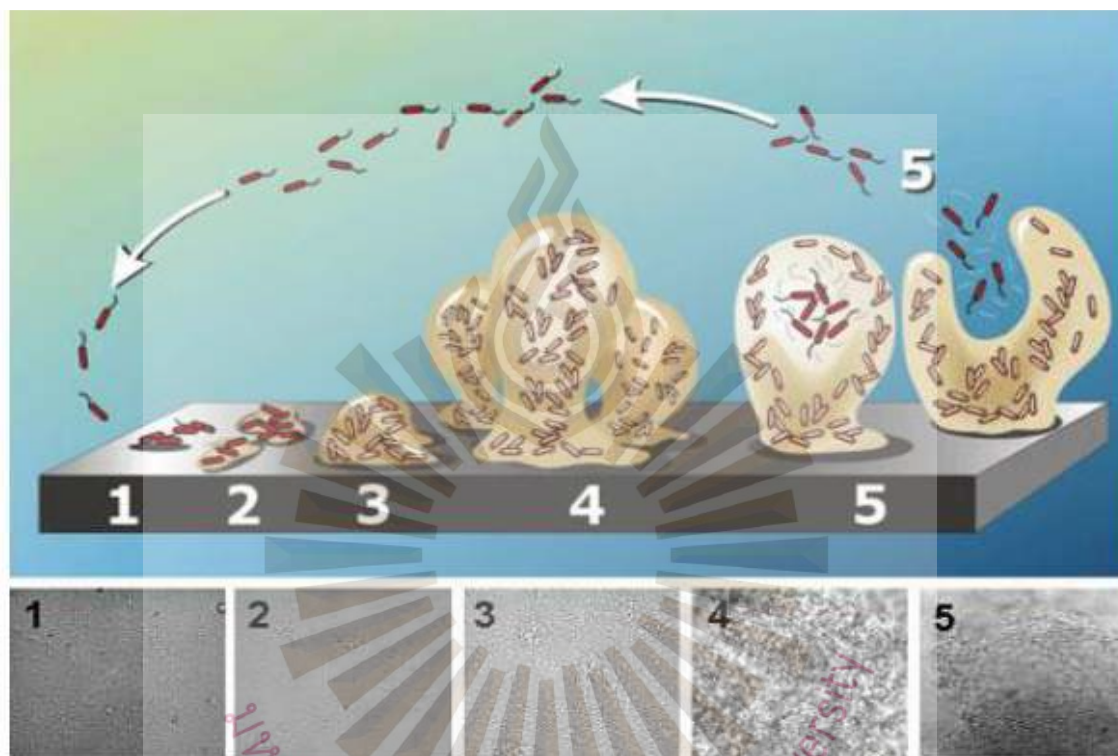
3. ไบโอฟิล์ม (Biofilm)

ไบโอฟิล์ม คือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน มีโครงสร้างจากสารพอลิเมอร์ เช่น แคปซูล (capsule) สารเมือก (slime) ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและปล่อยออกมานอกเซลล์เพื่อยึดเกาะกับพื้นผิวของวัสดุ และทำหน้าที่เป็นชั้นปกป้องแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายใน รวมทั้งสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งกลุ่มของแบคทีเรียหลายชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกันมีความสัมพันธ์อย่างซับซ้อน แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบใน ไบโอฟิล์ม ได้แก่ *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *Porphyromonas gingivalis* เป็นต้น (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิชยา รัตนานนท์, 2557)

3.1 กระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม

เกิดจากแบคทีเรียที่ล่องลอยอยู่อย่างอิสระตามธรรมชาติเปลี่ยนพฤติกรรมมายึดเกาะกับพื้นผิววัตถุต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมแทนด้วยแรงอ่อน ๆ ทางเคมี ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดจากการตอบสนองของแบคทีเรียจากสิ่งเร้าภายนอก ซึ่งถูกควบคุมโดย gene การยึดเกาะของแบคทีเรียสามารถยึดเกาะได้ในอุปกรณ์เกือบทุกพื้นผิว โดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นผิววัตถุที่มีผิวหน้าไม่เรียบ เป็นรอย หรือเกิดการขีดข่วน เพราะจะช่วยให้เกิดการหลบหลีกจากการทำความสะอาดได้ จากนั้นกระบวนการยึดเกาะก็จะเริ่มแข็งแรงขึ้นโดยอาศัยโครงสร้างของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายขนหรือเส้นผม เช่น พิล (pili) ฟิมเบรีย (fimbriae) หรือซิเลีย (cilia) เมื่อเวลาผ่านไปแบคทีเรียใหม่ก็จะเข้ามาทำการยึดเกาะกับ

แบคทีเรียกลุ่มแรก ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะเริ่มทำการแบ่งตัวและมีการสร้างสารเหนียว เรียกว่า extracellular polymeric substances (EPS) ขึ้นมาเพื่อช่วยในการยึดเกาะและป้องกันตัวเอง เมื่อโครงสร้างของไบโอฟิล์มขยายขนาดขึ้นเรื่อย ๆ ก็จะสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยปกติการสร้างไบโอฟิล์มจะใช้ระยะเวลาก่อตัวประมาณ 2-4 สัปดาห์ ดังแสดงในภาพที่ 7 (วฤณิ ปรีชานฤชิตกุล, 2557)



ภาพที่ 7 กระบวนการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย

(ที่มา: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1836/biofilms-ไบโอฟิล์ม>)

3.2 ปัญหาที่เกิดจากไบโอฟิล์ม

ไบโอฟิล์มมีลักษณะเป็นเมือกเหนียว พบบริเวณพื้นผิวของภาชนะ เครื่องจักร และอุปกรณ์แปรรูปอาหาร สามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้ดี (sanitizer) ล้างทำความสะอาด (cleaning) ได้ยาก มักทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหาร และนำมาซึ่งการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ หากกลุ่มของไบโอฟิล์มเหล่านั้นประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2557)

ไบโอฟิล์มเป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ เช่น ทำให้เกิดการสะสมของคราบแบคทีเรียในปาก ซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคฟันผุ ทำให้เกิดการอุดตันของท่อต่าง ๆ ทั้งท่อน้ำทิ้ง ท่อน้ำในระบบหล่อเย็น ท่อน้ำในเรือเดินสมุทร ท่อน้ำมัน รวมทั้งอุปกรณ์และเครื่องมือทางการแพทย์ นอกจากนี้ การที่

แบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ยังเป็นเหตุสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้ทนทานต่อยาปฏิชีวนะ เช่น ampicillin, tetracyclin, streptomycin และ gentamicin เป็นต้น จนนำไปสู่การติดเชื้อของเชื้อโรคหลายชนิดอีกด้วย ในปัจจุบันการกำจัดไบโอฟิล์มเป็นสิ่งที่กระทำได้ยากและมีค่าใช้จ่ายสูง จึงถือได้ว่าไบโอฟิล์มเป็นปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งของมนุษย์ในการต่อสู้กับแบคทีเรีย (วฤณฉวี ปริษานฤชิตกุล, 2557)

3.3 สารสกัดจากธรรมชาติกับการทำลายไบโอฟิล์ม

ปัจจุบันนักวิจัยให้ความสำคัญในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ โดยมุ่งเน้นการใช้สารสกัดจากธรรมชาติ เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีหรือสารสังเคราะห์ จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรหลายชนิดต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก โดยทดสอบใน *in vitro*, *ex vivo* และ *in situ* พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Vitis vinifera*, *Pinus* spp., *Coffea canephora*, *Camellia sinensis*, *Vaccinium macrocarpon*, *Galla chinensis*, *Caesalpinia ferrea* Martius, *Psidium cattleianum* รวมถึงน้ำผึ้งมานูกา (Manuka honey) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเกาะติดและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อในช่องปากได้ดี (Karygianni et al., 2016)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดจากสมุนไพรในอาร์เจนตินา พบว่าสารสกัดจาก *Lycium chilense* และ *Schinus fasciculatus* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus* sp. Mcr1 และ *Bacillus* sp. Mcn4 ได้ดีที่ความเข้มข้น 15.62 และ 62.50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจาก *L. chilense* สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus* sp. Mcr1 ได้สูงที่สุด (68 เปอร์เซ็นต์) สารสกัดจาก *Tessaria absinthioides* และ *Larrea divaricate* สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Bacillus* sp. Mcn4 ได้ 66 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจาก *Tagetes minuta* และ *L. chilense* สามารถยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *Bacillus* sp. Mcn4 บนวัสดุได้ (Romero et al., 2016)

จากงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากแปะก๊วย ginkgolic acid C15:1 และ C17:1 (ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และสารสกัดจาก *Ginkgo biloba* (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ แต่สารสกัดจากพืชดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ K-12 ได้ (Lee et al., 2014) สารสกัดจากกุหลาบญี่ปุ่น (*Rosa rugosa*) ซึ่งประกอบด้วย polyphenols (87.52 เปอร์เซ็นต์) และ flavonoids (61.03 เปอร์เซ็นต์) สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* K-12 และ *P. aeruginosa* PAO1 ได้ 67.02 และ 72.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงมีการนำสารสกัดดังกล่าวมาพัฒนาต่อยอดเพื่อเพิ่มอายุการเก็บรักษาและความปลอดภัยของอาหาร โดยมุ่งเน้นการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อเป็นหลัก (Zhang et al., 2014)

สารสกัดจากขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ เช่น *E. coli* (UPEC), *P. aeruginosa* PAO1, *Proteus mirabilis* และ *Serratia marcescens* เป็นต้น (Packiavathy et al., 2014) สารสกัดจากใบของ *Piper hispidum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans*, *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 15.6-62.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดดังกล่าวยังสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* และ *S. aureus* ได้ที่ความเข้มข้น 62.5 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Costa et al., 2016)

นอกจากนี้ มีการศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชต่อการยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อ จากรายงานพบว่า albitane diterpenoids (taxodone และ 15-deoxy-fuerstione) ที่แยกได้จากรากของ *Salvia austriaca* มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะติดและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ได้ดีมากที่ความเข้มข้น 1/2 MIC และ 1/4 MIC นอกจากนี้ taxodone สามารถทำลายเชื้อ *S. aureus* ในเลือดคนที่ทดสอบในหลอดทดลองได้ และยังยับยั้งการสร้าง germ tube และการเจริญเป็นเส้นใยของ *C. albicans* ได้เช่นกัน (Sadowska et al., 2016) ส่วน rhodomyrton เป็นสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบกระทุ (*Rhodomirtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) สารชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้หลากหลายสายพันธุ์ นอกจากนี้ rhodomyrton ยังสามารถยับยั้งการสร้างและทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. acnes* และเชื้อในกลุ่ม staphylococci ที่เป็นสาเหตุของสิวได้ดีมาก (Saising et al., 2011; Wunoo et al., 2017)

สารต้านไบโอฟิล์มสามารถแยกและสกัดได้จากเชื้อจุลินทรีย์เช่นกัน จากการศึกษาของ Merghni et al. (2017) พบว่า biosurfactant ที่สร้างโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* 9P และ 29P ที่แยกได้จากช่องปาก โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.92 และ 2.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า biosurfactant ที่ผลิตจากเชื้อ *L. casei* BS-LB1 และ BS-LZ9 สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้ 80.22-86.21 และ 53.38-64.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากงานวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรและเชื้อแบคทีเรีย นั้น สามารถยับยั้งและทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อได้หลากหลายสายพันธุ์ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ในการควบคุมหรือเป็นทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อได้ในอนาคต

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- Autoclave
- Centrifuge
- Incubator
- Biosafety Cabinet Class II
- Microplate reader
- pH meter
- Pipette
- Rotary evaporator
- Viscometer
- Vortex mixer
- Waterbath

2. การทดลอง

2.1 การเพาะเห็ดเรืองแสง (สกุลยีสต์ *N. nambi* หลี่เจี๋ย และคณะ, 2557)

นำเชื้อเห็ดเรืองแสง *N. nambi* มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเตรียมอาหารเหลว PBD โดยชั่งผงอาหาร PDB สำเร็จรูปน้ำหนัก 24 กรัม และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนละลาย จากนั้นนำไปบรรจุในขวดแก้วขวดละ 300 มิลลิลิตร หนึ่งมาเชื่อมด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รอจนอาหารเย็นตัวลง จากนั้นใช้ส่วนท้ายของ glass pasteur pipette ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเจาะชั้นวุ้นที่มีเชื้อเห็ดเรืองแสงบนอาหาร PDA จำนวน 3-5 ชั้น ใส่ลงในอาหารเหลว PDB ที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 1 เดือน

2.2 การสกัดสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสง (สกุลยีสต์ *N. nambi* หลี่เจี๋ย และคณะ, 2557)

นำเห็ดเรืองแสงที่ได้จากการเลี้ยงในข้อ 2.1 มากรองแยกระหว่างน้ำเลี้ยงเห็ดและเส้นใย นำน้ำเลี้ยงเห็ดมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท โดยใช้กรวยแยก (separating funnel) ปิดฝากรวยแยกให้สนิท เขย่าให้เข้ากัน เปิดก๊อกของกรวยแยกเพื่อไล่อากาศออก ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง แล้ววางให้เกิดการแยกชั้น จากนั้นเปิดก๊อกของกรวยแยกเพื่อไขชั้นน้ำเลี้ยงเห็ดไปสกัดต่อด้วยเอทิลอะซิเตท ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำชั้นเอทิล

อะซิเตทที่สกัดได้ทั้ง 3 ครั้งมารวมกัน ควบคุมความชื้นด้วย Na_2SO_4 anhydrous แล้วนำไปประเหยตัวทำละลาย ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ถ่ายสารสกัดเก็บไว้ในขวดเก็บสาร จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้ดูดควัน จนสารแห้งสนิทแล้วนำไปปั่นด้วย high vacuum pump เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อกำจัดตัวทำละลายที่หลงเหลืออยู่ นำสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง บันทึกข้อมูล และเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การควบคุมคุณภาพของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงโดยวิธีรงคเลขผิวนาง (thin-layer chromatography, TLC) ใช้การเปรียบเทียบลักษณะโครมาโทแกรม (chromatogram) ของสารหลักที่พบในเห็ดเรืองแสง คือ aurisin A (Kanokmedhakul et al., 2012) ซึ่งแยกได้จากห้องปฏิบัติการเทียบกับ aurisin A ในสารสกัด และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 29213 ของสาร aurisin A และสารสกัด (ต้องมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 1-4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

2.3 การเตรียมเจล

แบ่งน้ำกลั่นส่วนหนึ่งจากตำรับมาละลายสารก่อเจล โดยค่อย ๆ โปริยสารก่อเจล (carbopol Ultrez-21 หรือ xanthan gum) น้ำหนัก 1.5 กรัม เพื่อให้เกิดการกระจายตัวที่ดี ไขแห้งแก้วคนสารเบา ๆ จนสารก่อเจลกระจายตัวในน้ำและพองตัวจนหมด นำน้ำกลั่นส่วนที่เหลือละลาย niacinamide น้ำหนัก 12 กรัมในอีกภาชนะหนึ่ง หลังจากนั้นเทส่วนผสมนี้ลงในภาชนะที่มีสารก่อเจลอยู่ คนผสมให้เข้ากัน นำสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (มีความเข้มข้นสุดท้ายในสูตรเจลแต่ละสูตรเท่ากับ 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) น้ำหนัก 0.048 กรัม ละลายใน propylene glycol น้ำหนัก 15 กรัม ใส่ในสารละลายเจลที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี คนให้เข้ากัน เติม paraben concentrate น้ำหนัก 3 กรัม แล้วคนให้เข้ากันอีกครั้ง รายละเอียดของสูตรเจล ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของเจลต้านสิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง

ส่วนประกอบ	น้ำหนัก (g)		หน้าที่ในตำรับ
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	
Carbopol Ultrez-21	1.5	-	Gelling agent
Xanthan gum	-	1.5	Gelling agent
Niacinamide	12	12	Anti-inflammatory, skin lightening agent
สารสกัดเห็ดเรืองแสง (160 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.048	0.048	Anti-acne
Propylene glycol	15	15	Humectant, solvent
Paraben concentrate	3	3	Preservative
Water q.s. to	300	300	Vehicle

2.4 การประเมินคุณภาพและการศึกษาความคงตัวของเจลด้านผิวหนัง (ASEAN Guideline on Stability Study of Drug Product, 2013)

นำเจลด้านผิวหนังชุดทดสอบและชุดควบคุม (base gel) มาศึกษาความคงตัวภายใต้ 2 สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส/RH not specified และอุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส/75 เปอร์เซ็นต์ RH ± 5 เปอร์เซ็นต์ RH เป็นเวลา 0 และ 6 เดือน หลังจากนั้นประเมินลักษณะทางเคมีและกายภาพของเจลโดยการวัดความหนืดด้วยเครื่อง viscometer (MODEL DV-II + VISCOMETER) ด้วยเข็ม No. S64 และวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter (Mettler Toledo, Switzerland) และประเมินการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของเจลด้านผิวหนัง เช่น สี กลิ่น ความขุ่น และการแยกชั้น รวมทั้งตรวจหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนด้วยวิธี spread plate บันทึกผลการทดลอง

คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation: SD) ของค่า pH และความหนืดของเจลด้านผิวหนังที่บ่มภายใต้อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 6 เดือน โดยใช้โปรแกรม Excel และเปรียบเทียบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < .05$ ด้วยวิธี Paired-simple *t*-test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics

2.5 การประเมินประสิทธิภาพของเจลต่อการลดปัจจัยการก่อตัวของเชื้อ

2.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus* spp. ด้วยวิธี agar well diffusion (Clinical and Laboratory Standard Institute, 2011)

การเตรียมเชื้อ: นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *S. epidermidis* ที่แยกจากผิวหนังจำนวน 5 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA) บ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เชื้อเชื้อที่เป็น colony เดี่ยวจำนวน 3-5 colony เพาะเลี้ยงในอาหาร tryptic soy broth (TSB) เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียมาปรับความขุ่นด้วย normal saline solution (NSS) จนได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (มีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร)

การทดสอบ: นำเชื้อแบคทีเรียมาเกลี่ยจนทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะลงไปบนเนื้อวุ้น แล้วนำเจลด้านผิวหนังที่เตรียมไว้หยดลงไปในกลุ่ม ๆ ละ 80 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ในหน่วยมิลลิเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เป็น base gel (negative control) และยา vancomycin ความเข้มข้น 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (positive control) และผลิตภัณฑ์เจลรักษาผิวหนังจากท้องตลาด (Clindalin Gel[®] มี clindamycin 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

2.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus* spp. ด้วยวิธี broth microdilution (Clinical and Laboratory Standard Institute, 2011)

การเตรียมเชื้อ: ปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (ดังข้อ 2.5.1) จากนั้นนำไปปรับให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร ด้วยอาหาร MHB

การเจือจางเจลด้านลิว: เจือจางเจลด้านลิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงด้วยน้ำกลั่นแบบ serial 2-fold dilution ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.25-160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การทดสอบ: ทำการทดสอบใน 96 well plate โดยหยดเจลด้านลิวปริมาตร 20 ไมโครลิตร/หลุม อาหาร MHB ปริมาตร 80 ไมโครลิตร/หลุม และเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เติมสี resazurin ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วอ่านค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเจลด้านลิวที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (สีม่วง) และทดสอบหาค่า MBC โดยนำ loop จุ่มสารที่อยู่ในหลุมที่มีสีม่วงมา streak บนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง โดยอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่นำเชื้อได้ (ไม่มีเชื้อเจริญเติบโตบนอาหาร TSA) เป็นค่า MBC การทดลองดังกล่าวใช้ base gel เป็น negative control, ยา vancomycin เป็น positive control และผลิตภัณฑ์เจลรักษาผิวจากท้องตลาด (Clindalin Gel[®] มี clindamycin 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เป็นผลิตภัณฑ์เปรียบเทียบ

2.5.3 การทดสอบฤทธิ์ของเจลด้านลิวต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

1) การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Staphylococcus* spp. ที่สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด (ดัดแปลงจาก Lembke et al., 2006)

การเตรียมเชื้อ: ปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (ดังข้อ 2.5.1) โดยใช้อาหาร TSB แทนการใช้ NSS

การทดสอบ: inoculate เชื้อที่เตรียมไว้ 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well plate ที่มี TSB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ปริมาตรรวมใน 96-well plate เท่ากับ 200 ไมโครลิตร) นำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ใน 96-well plate ด้วย NSS หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง โดยเขย่า 96-well plate เบบ ๆ เพื่อกำจัดเอาเซลล์แบคทีเรียที่ไม่มีการยึดเกาะออก วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ crystal violet ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายสีที่ย้อมไบโอฟิล์มด้วย dimethyl sulphoxide (DMSO) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ TSB เป็นชุด negative control

การวิเคราะห์ผล: พิจารณาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ จากความสามารถในการเกาะติดของเชื้อ โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ (OD) กับค่าการดูดกลืนแสงของ negative control (OD_c) ซึ่งแบ่งเป็น 4 ระดับ คือ

- $OD < OD_c$ ไม่มีการเกาะติด
- $OD_c < OD \leq 2OD_c$ การเกาะติดน้อย
- $2OD_c < OD \leq 4OD_c$ การเกาะติดปานกลาง
- $4OD_c < OD$ การเกาะติดมาก

2) การทดสอบผลของเจลต้านลิวที่ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis*

การเตรียมเชื้อ: ปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (คั่งข้อ 2.5.1) โดยใช้อาหาร TSB แทนการใช้ NSS

การเจือจางเจลต้านลิว: เจือจางเจลต้านลิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงด้วย น้ำกลั่นแบบ serial 2-fold dilution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC และ 1/16 MIC

การทดสอบ: คุกเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well plate ที่มีเจลต้านลิวปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ TSB ปริมาตร 80 ไมโครลิตร (ปริมาตรรวมใน 96-well plate เท่ากับ 200 ไมโครลิตร) นำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ยา vancomycin เป็น positive control และน้ำกลั่นเป็น negative control

การวิเคราะห์ผล: พิจารณาความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบแต่ละความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของ negative control

3) การทดสอบผลของเจลต้านลิวที่ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis*

(Karaolis et al., 2005)

การเตรียมเชื้อ: ปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (คั่งข้อ 2.5.1) โดยใช้อาหาร TSB แทนการใช้ NSS

การเจือจางเจลต้านลิว: เจือจางเจลต้านลิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงด้วย น้ำกลั่นแบบ serial 2-fold dilution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC และ 1/16 MIC

การทดสอบ: คุกเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well plate ที่มีเจลต้านลิวปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ TSB ปริมาตร 80 ไมโครลิตร (ปริมาตรรวมใน 96-well plate เท่ากับ 200 ไมโครลิตร) นำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้าง

เซลล์ใน 96-well plate ด้วย NSS หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง โดยเขย่า 96-well plate เบา ๆ เพื่อกำจัดเอาเซลล์แบคทีเรียที่ไม่มีการยึดเกาะออก วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ crystal violet ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายสีที่ย้อมไบโอฟิล์มด้วย DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ยา vancomycin เป็น positive control และน้ำกลั่นเป็น negative control

การวิเคราะห์ผล: พิจารณาความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบแต่ละความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของ negative control

2.5.4 การทดสอบผลของเจลต้านชีวต่อการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* (ดัดแปลงจาก Lembke et al., 2006)

การเตรียมเชื้อ: ปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (ดังข้อ 2.5.1) โดยใช้อาหาร TSB แทนการใช้ NSS

การเจือจางเจลต้านชีว: เจือจางเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงด้วยน้ำกลั่นแบบ serial 2-fold dilution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC และ 1/16 MIC

การทดสอบ: ปลูกเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well plate ที่มี TSB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ปริมาตรรวมใน 96-well plate เท่ากับ 200 ไมโครลิตร) นำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 120 ชั่วโมง (5 วัน) โดยเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้างไบโอฟิล์มได้สมบูรณ์ หลังจากครบกำหนดเวลาดูอาหารเลี้ยงเชื้อออก เติม TSB หลุมละ 180 ไมโครลิตร และเติมเจลต้านชีวที่เจือจางแล้วลงในหลุม ๆ ละ 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ใน 96-well plate ด้วย NSS หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง โดยเขย่า 96-well plate เบา ๆ เพื่อกำจัดเอาเซลล์แบคทีเรียที่ไม่มีการยึดเกาะออก วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ crystal violet ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายสีที่ย้อมไบโอฟิล์มด้วย DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ยา vancomycin เป็น positive control และน้ำกลั่นเป็น negative control

การวิเคราะห์ผล: พิจารณาความสามารถในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบแต่ละความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของ negative control

2.5.5 การตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มบนผิวแก้วโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy: SEM) (ดัดแปลงจาก Asahi et al., 2015)

การเตรียมเชื้อ: ปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (ดังข้อ 2.5.1) โดยใช้อาหาร TSB แทนการใช้ NSS

การเจือจางเจลด้านผิว: เจือจางเจลด้านผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1/2 MIC

1) การเตรียมตัวอย่างเชื้อที่ถูกยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

นำกระจกสไลด์ใส่ลงใน 24-well plate เดิม TSB 800 ไมโครลิตร เดิมเจลด้านผิวที่เจือจางแล้ว 200 ไมโครลิตร และเติมเชื้อที่เตรียมไว้ 1,000 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คูดสารที่ทดสอบและแบคทีเรียที่ไม่เกาะติดออก ล้างเซลล์ใน 24-well plate ด้วย NSS หลุมละ 2,000 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นคงสภาพตัวอย่างไบโอฟิล์มด้วย 2.5 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde หลุมละ 1,000 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นขจัดน้ำออกจากตัวอย่างด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50-100 เปอร์เซ็นต์) โดยเติมลงในแต่ละหลุมเป็นเวลา 15 นาทีในทุก ๆ ความเข้มข้น ยกเว้นความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลา 30 นาที นำตัวอย่างส่งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยวิธี critical point drying และบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ SEM กำลังขยาย 4,000 เท่า

2) การเตรียมตัวอย่างเชื้อที่ถูกทำลายไบโอฟิล์ม

นำกระจกสไลด์ใส่ลงใน 24-well plate เดิม TSB 1,000 ไมโครลิตร และเชื้อที่เตรียมไว้ 1,000 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 120 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้างไบโอฟิล์มได้สมบูรณ์ หลังจากครบกำหนดเวลาคูดอาหารเลี้ยงเชื้อออก เดิม TSB หลุมละ 1,800 ไมโครลิตร และเติมเจลด้านผิวที่เจือจางแล้วลงในหลุม ๆ ละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คูดสารที่ทดสอบและแบคทีเรียที่ไม่เกาะติดออก ล้างเซลล์ใน 24-well plate ด้วย NSS หลุมละ 2,000 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นคงสภาพตัวอย่างไบโอฟิล์มด้วย 2.5 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde หลุมละ 1,000 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นขจัดน้ำออกจากตัวอย่างด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50-100 เปอร์เซ็นต์) โดยเติมลงในแต่ละหลุมเป็นเวลา 15 นาทีในทุก ๆ ความเข้มข้น ยกเว้นความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลา 30 นาที นำตัวอย่างส่งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยวิธี critical point drying และบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ SEM กำลังขยาย 4,000 เท่า



บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

3.1 ผลการเตรียมสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง

จากการเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสงด้วยอาหาร PDB สำเร็จรูป ปริมาตร 5 ลิตร แล้วบ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเห็ดและเส้นใยด้วยเอทิลอะซิเตทและเมทานอล ตามลำดับ ลักษณะของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเห็ดมีสีน้ำตาลอมเหลือง ส่วนสารสกัดจากเส้นใยมีสีน้ำตาลเข้มและมีความเหนียว จากการวิเคราะห์น้ำหนักของสารสกัดที่ได้พบว่าสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทของน้ำเลี้ยงเห็ดมีค่าเท่ากับ 725.5 มิลลิกรัม/ลิตร และสารสกัดชั้นเมทานอลของเส้นใยมีค่าร้อยละของผลิตภัณฑ์ (% yield) เท่ากับ 5.01 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเห็ดเรืองแสงของน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีน้ำหนักมากกว่าสารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วยเมทานอล กล่าวคือ เห็ดเรืองแสงมีการสร้างสารสำคัญแล้วปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (ในน้ำเลี้ยงเห็ด) มากกว่าเก็บไว้ภายในตัวเซลล์ จึงส่งผลให้ปริมาณของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเห็ดมีน้ำหนักมากกว่าสารสกัดจากเส้นใย จากงานวิจัยของคันทรส วิชัยดิษฐ และคณะ (2557) มีการเตรียมอาหาร PDB โดยใช้ส่วนผสมน้ำมันฝรั่งแบบเตรียมเองในการเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสง จากนั้นนำส่วนของน้ำเลี้ยงมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์พบว่าได้น้ำหนักของสารสกัดน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร PDB สำเร็จรูป เนื่องจากอาหาร PDB สำเร็จรูปจะมีการควบคุมปัจจัยที่ดีกว่าส่วนผสมน้ำมันฝรั่งแบบเตรียมเอง

ตารางที่ 2 ค่าน้ำหนักต่อปริมาตรและค่าร้อยละของผลิตภัณฑ์ (% yield) ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง

ส่วนของเห็ดเรืองแสง	ตัวทำละลายอินทรีย์	น้ำหนักของสารสกัดที่ได้ (mg)	น้ำหนักต่อปริมาตร (mg/l)	% yield
น้ำเลี้ยงเห็ด	เอทิลอะซิเตท	3,627.5	725.5	-
เส้นใย	เมทานอล	3,432.8	-	5.01

3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus* spp. ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 ด้วยวิธี broth microdilution พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วยเมทานอล โดยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดมีค่า MIC/MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* เท่ากับ 2/4 และ 8/16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดเรือง

แสงนั้นมีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (มีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* อยู่ในช่วง 1-4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนสารสกัดจากเส้นใยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 16-128 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3 จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสงมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้ดีกว่าสารสกัดจากเส้นใย โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 4-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (เหมือนฝัน ชื่อตรง และคณะ, 2557) ดังนั้นผู้วิจัยจึงพัฒนาเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เจลต้านชีวที่มีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 3 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อเชื้อ *Staphylococcus* spp.

สารสกัด	MIC/MBC ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984
น้ำเลี้ยงสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท	2/4	8/16
เส้นใยสกัดด้วยเมทานอล	16/64	64/128
ยา vancomycin	0.5/1	2/4

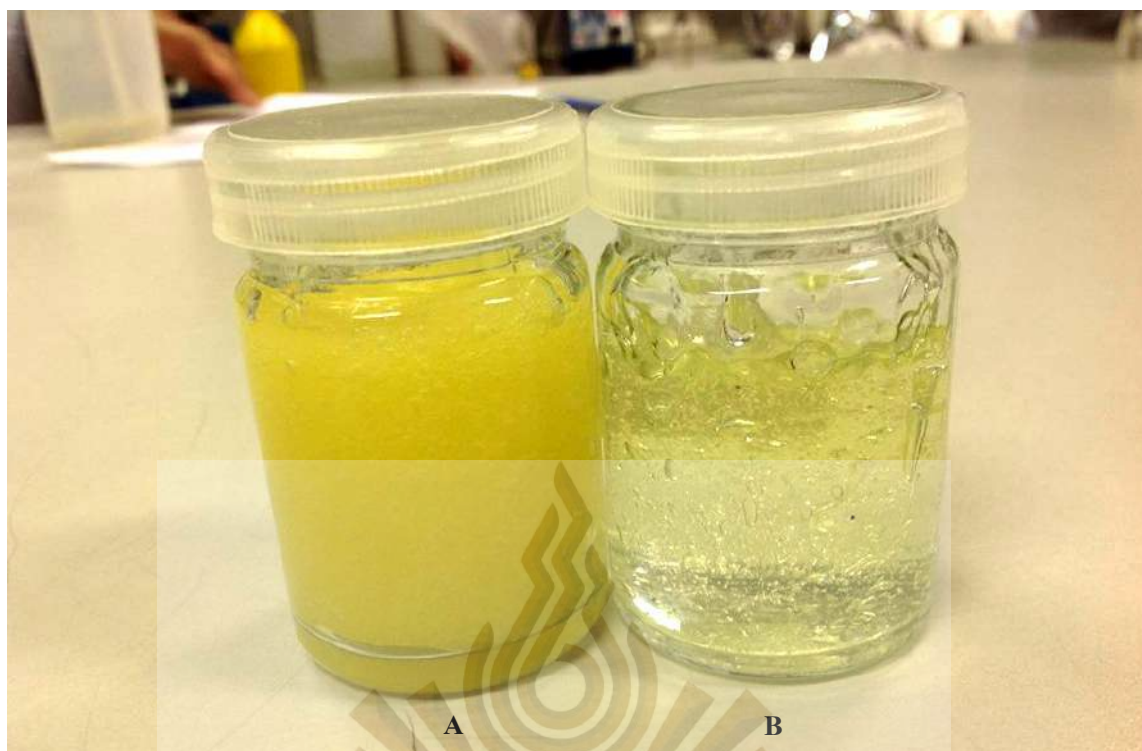
3.3 ผลการเตรียมเจลต้านชีวจากสารสกัดเห็ดเรืองแสง

ผลิตภัณฑ์รักษาชีวในท้องตลาดมีหลากหลายชนิด ทั้งผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์และผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากธรรมชาติ โดยมีการยื่นขอจดอนุสิทธิบัตรอย่างถูกต้องตามกฎหมาย ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่มีส่วนผสมของสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น ผลิตภัณฑ์รักษาชีวที่มีส่วนผสมของสาร plaunotol ที่สกัดได้จากต้นเปล้าน้อย ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *P. acnes* (โสภณ เริงสำราญ, 2540) ดำรับเจลรักษาชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดพ่นแห้งจากใบกระปือจี๊ดตัว ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อชีว และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองในสัตว์ทดลองและอาสาสมัคร (พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ, 2554) ผลิตภัณฑ์บรรเทาการเกิดชีวที่มีสารสกัดจากบานเย็นเป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีลักษณะเป็นสเปรย์พ่นบริเวณที่มีชีว เพื่อบรรเทาการเกิดชีว (พรรวิภา กฤษญาพงษ์, 2556) น้ำมันทาแก้ชีวที่ประกอบด้วย น้ำมันมะพร้าว สารสกัดขมิ้นชัน สารสกัดไพล สารสกัดพริก และสารสกัดตะไคร้ (สุรวุฒิ สนิทวงศ์ ณ อยุธยา, 2555) ผลิตภัณฑ์รักษาชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากผลไม้ โดยนำส่งสารสกัดในรูปอนุภาคทรงกลม เหมาะสำหรับทาผิวหนังบริเวณที่เป็นชีวอักเสบ (อรุณศรี ปรีเปรม, 2557) และ โลชั่นรักษาชีวชนิดเกิดเป็นแผ่นฟิล์มบนร่างกาย โดยมีสารออกฤทธิ์หลักคือ alpha-mangostin จากเปลือกมังคุด (รัฐพล อาษาสุจริต, 2557) ส่วนบอระเพ็ดพุงช้างนั้นได้มีการนำมาพัฒนาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์รักษาชีวที่หลากหลายรูปแบบ เช่น น้ำยารักษาชีว (อรรคชัย ตันตราวงศ์, 2554) สบู่ใส่ล้างหน้าต้านชีว (บุปผชาติ พตด้วง, 2556) และมาส์กแต้มชีว (อรรคชัย ตันตราวงศ์, 2556)

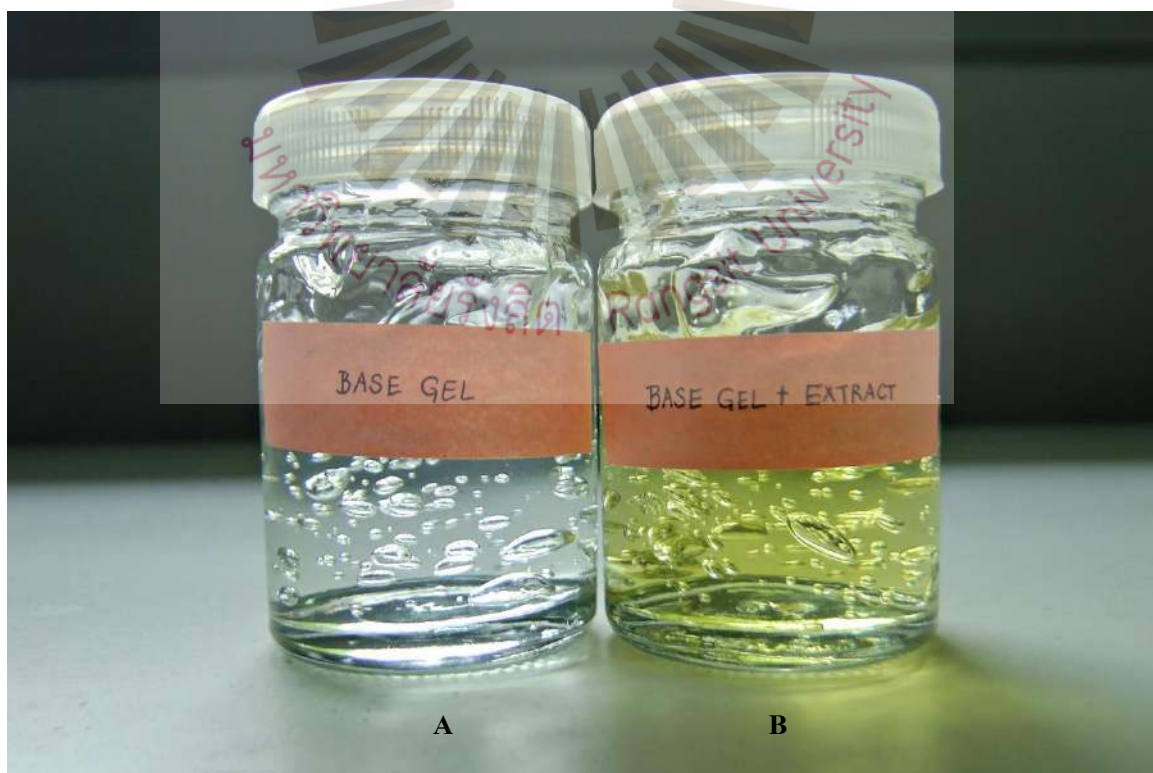
เป็นต้น นอกจากนี้ สารออกฤทธิ์ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียก็สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รักษาผิวได้เช่นกัน เช่น เจลแต้มสิวที่มีผลต้านเชื้อแบคทีเรียก่อสิวที่ประกอบด้วยสารกึ่งบริสุทธิ์คือ bacteriocin ซึ่งเตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brevibacillus laterosporus* (มณฑล เลิศคนาวนิชกุล, 2556) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานวิจัย สิทธิบัตร หรืออนุสิทธิบัตรเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์รักษาผิวหรือมาเชื้อที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงได้มีการเตรียมเจลต้านสิวจำนวน 2 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรมีสารก่อเจลที่แตกต่างกัน โดยสูตรที่ 1 ใช้ carbopol Ultrez-21 แต่สูตรที่ 2 ใช้ xanthan gum เป็นสารก่อเจล จากการทดลองพบว่าเจลต้านสิวจากสารสกัดเห็ดเรืองแสงความเข้มข้น 20 MIC (160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สูตรที่ 1 มีลักษณะสีเหลืองใส ละลายได้เร็ว ส่วนเจลต้านสิวจสูตรที่ 2 พบว่ามีลักษณะสีเหลืองขุ่น ละลายช้า มีความเหนียวมากกว่าสูตรที่ 1 จึงไม่เหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นเจลต้านสิว ดังแสดงในภาพที่ 8

จากงานวิจัยของรัชสีนี กาญจนอลงกรณ์ และธีรวัฒน์ จันทวีชรากร (2556) มีการเตรียมตำรับเจลของสารสกัดจากชาเพื่อใช้ในการรักษาผิวโดยใช้ carbopol® U20 2 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เป็นสารก่อเจล พบว่าเจลมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่ดี เมื่อทำการทดสอบความคงตัวของตำรับเจลดังกล่าวที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 35 วัน พบว่าเจลมีความคงตัวที่ดี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี ค่า pH และความหนืด นอกจากนี้ เจلدังกล่าวยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* สรุปได้ว่า carbopol เป็นสารก่อเจลที่ดี เหมาะสมในการเตรียมตำรับเจลต้านสิว และทำให้เจลมีความคงตัวได้ดี ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงเลือกเจลต้านสิวจสูตรที่ 1 ที่ใช้ carbopol Ultrez-21 เป็นสารก่อเจลในการทำการทดลองในครั้งนี้ ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 8 ลักษณะของเจลด้านสีที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงโดยใช้ xanthan gum (A) และ carbopol Ultrez-21 (B) เป็นสารก่อเจล



ภาพที่ 9 ลักษณะของเจลที่มี carbopol Ultrez-21 เป็นสารก่อเจล base gel (A), เจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง ความเข้มข้น 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (B)

3.4 ผลการศึกษาความคงตัวและการประเมินคุณภาพเจลด้านผิวหนัง

จากการเตรียมเจลด้านผิวหนังที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงความเข้มข้น 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (20 MIC) โดยใช้ carbopol Ultrez-21 เป็นสารก่อเจล แล้วนำมาประเมินความคงตัวตามมาตรฐานของ ASEAN Guideline on Stability Study of Drug Product (2013) โดยนำเจลด้านผิวหนังชุดทดสอบและชุดควบคุม (base gel) มาทำการศึกษาความคงตัว 2 สภาวะ คือภายใต้อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส/RH not specified และอุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส/75 เปอร์เซ็นต์ RH ± 5 เปอร์เซ็นต์ RH เป็นระยะเวลา 0 และ 6 เดือน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น การแยกชั้นของเจล ความหนืด และความเป็นกรด-ด่าง รวมทั้งตรวจหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในตำรับ

จากการทดสอบความคงตัวของเจลด้านผิวหนังภายใต้อุณหภูมิ 40 และ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสีของเจลทั้งชุดทดสอบและชุดควบคุมไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 กล่าวคือ เจลชุดทดสอบมีสีเหลืองใส และชุดควบคุมมีลักษณะใสไม่มีสี (ภาพที่ 10) ส่วนค่า pH ของเจลด้านผิวหนังชุดทดสอบและชุดควบคุมวันที่ 0 กับเดือนที่ 6 พบว่าเจลด้านผิวหนังทั้งสองชุดมีค่า pH แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < .05$ แต่จากการวัดค่าความหนืดของเจลชุดทดสอบและชุดควบคุมที่เก็บภายใต้ 2 สภาวะ (อุณหภูมิ 40 และ 30 องศาเซลเซียส) พบว่ามีค่าความหนืดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < .05$ (ตารางที่ 4) กล่าวคือ เจลชุดทดสอบที่บ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 30 องศาเซลเซียส มีค่าความหนืดลดลงจาก $90,050 \pm 7.32$ cP เป็น $52,580 \pm 0.11$ cP และ $85,050 \pm 3.05$ cP เป็น $52,340 \pm 6.46$ cP ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่าความหนืดที่ลดลงยังอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และไม่ได้ทำให้คุณลักษณะทางกายภาพของเจลเสียหายแต่อย่างใด ซึ่งค่าความหนืดที่ลดลงทั้ง 2 สภาวะเกิดจากการบ่มเป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้ส่วนประกอบภายในตำรับคือ niacinamide เกิดปฏิกิริยา hydrolysis เป็น nicotinic acid (ภาพที่ 11) ทำให้เกิดความเป็นกรดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่งผลให้การทำงานของ carbopol Ultrez-21 ลดลง จึงทำให้ค่าความหนืดของเจลลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ก็เกิดขึ้นในเจลชุดควบคุมที่บ่มภายใต้ 2 สภาวะเช่นเดียวกัน

จากการประเมินการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ราทั้งหมดในเจลด้านผิวหนังวันที่ 0 และเดือนที่ 6 ด้วยวิธี spread plate พบว่าตรวจไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบ (ตารางที่ 4) อาจเนื่องมาจากการเติม parabens concentrate ที่มีคุณสมบัติเป็นสารกันเสีย รวมทั้งสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราและแบคทีเรียได้ จึงทำให้ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ตลอดระยะเวลาที่ทดสอบ

ชุดทดสอบ



ชุดควบคุม



อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 10 ลักษณะเจลด้านผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสงความเข้มข้น 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
ที่บ่มภายใต้อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

ตารางที่ 4 ผลการประเมินความคงตัวของเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสง

สภาวะ	ผลิตภัณฑ์	สี กลิ่น การแยกชั้น	pH		ความหนืด (cP) (1x10 ³)		การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ราทั้งหมด (CFU/ml) ^a	
			ก่อน (เดือนที่ 0)	หลัง (เดือนที่ 6)	ก่อน (เดือนที่ 0)	หลัง (เดือนที่ 6)	ก่อน (เดือนที่ 0)	หลัง (เดือนที่ 6)
เก็บที่ 40°C	ชุดทดสอบ	ใส สีเหลือง ไม่มีกลิ่น ไม่แยกชั้น	5.02 ± 0.01	4.84 ± 0.14	90.05 ± 7.32*	52.58 ± 0.11*	0	0
	ชุดควบคุม	ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่แยกชั้น	4.97 ± 0.01	4.48 ± 0.01	104.43 ± 6.86*	61.20 ± 1.39*	0	0
เก็บที่ 30°C	ชุดทดสอบ	ใส สีเหลือง ไม่มีกลิ่น ไม่แยกชั้น	4.98 ± 0.04	4.48 ± 0.14	85.07 ± 3.05*	52.34 ± 6.46*	0	0
	ชุดควบคุม	ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่แยกชั้น	4.74 ± 0.16	4.48 ± 0.05	90.98 ± 3.11*	61.09 ± 7.58*	0	0

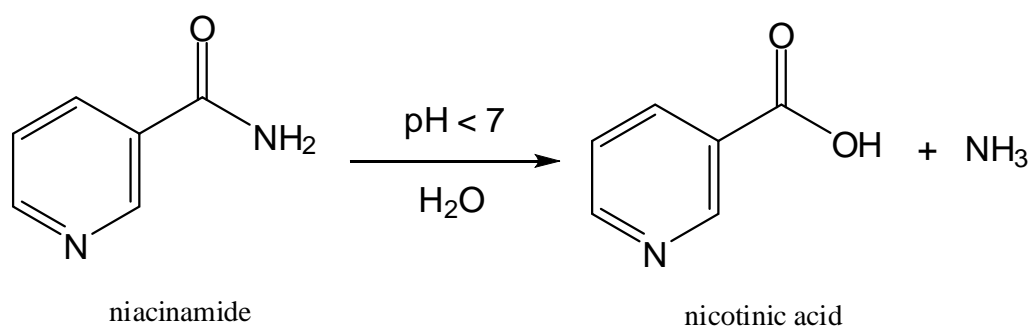
หมายเหตุ: ชุดทดสอบ = base gel + สารสกัดเห็ดเรืองแสงความเข้มข้น 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ชุดควบคุม = base gel

Mean ± SD (n=3)

* = แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < .05$

^a = การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี spread plate



ภาพที่ 11 การเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของ niacinamide

2.5 การประเมินประสิทธิภาพในการลดปัจจัยการก่อตัวของเจลด้านผิวหนัง

2.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus* spp. ด้วยวิธี agar well diffusion

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. โดยวิธี agar well diffusion ของเจลด้านผิวหนังที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (ความเข้มข้น 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่บ่มภายใต้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน ผลการทดลองพบว่าเจلدังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 35984 (สายพันธุ์มาตรฐานที่สร้างไบโอฟิล์ม), *S. epidermidis* ATCC 12228 (สายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม) และ *S. epidermidis* NPRC 011-015 (เชื้อที่แยกได้จากผิวหนัง) โดยมีค่าเฉลี่ยของ inhibition zone อยู่ในช่วง 9.01-11.22 มิลลิเมตร ส่วนเจลด้านผิวหนังที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่บ่มภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ โดยมีค่าเฉลี่ยของ inhibition zone อยู่ในช่วง 11.11-13.09 มิลลิเมตร แต่เจลด้านผิวหนังชุดควบคุม (base gel) และเจลด้านผิวหนังที่วางจำหน่ายในท้องตลาด (Clindalin Gel® มี clindamycin 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นั้น พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ ส่วนยา vancomycin (ความเข้มข้น 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่ใช้เป็น positive control นั้น พบว่ามีค่าเฉลี่ยของ inhibition zone อยู่ในช่วง 13.69-15.41 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 5 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเจลด้านผิวหนังที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงนั้น มีประสิทธิภาพในการด้านผิวหนังดีกว่าผลิตภัณฑ์เจลด้านผิวหนังที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด

2.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus* spp. ด้วยวิธี broth microdilution

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. โดยวิธี broth microdilution ของเจลด้านผิวหนังที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (ความเข้มข้น 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่บ่มภายใต้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าเจلدังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 โดยมีค่า MIC/MBC เท่ากับ 2-4/4-8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนฤทธิ์ในการต้านเชื้อ

S. epidermidis ATCC 35984 (สายพันธุ์มาตรฐานที่สร้างไบโอฟิล์ม) และ *S. epidermidis* ATCC 12228 (สายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม) พบว่ามีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 4-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ เจลต้านสิวดังกล่าวยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยสิวจำนวน 5 isolate โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 4-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ส่วนเจลต้านสิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่บ่มภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าเจลดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ โดยมี MIC และ MBC อยู่ในช่วง 2-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่เจลต้านสิวชุดควบคุม (base gel) ที่บ่มภายใต้ 2 สภาวะนั้น พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ ส่วนเจลต้านสิวที่วางจำหน่ายในท้องตลาด (Clindalin Gel[®] มี clindamycin 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นั้น พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบเช่นกัน (มีค่า MIC และ MBC มากกว่า 512 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนยา vancomycin ที่ใช้เป็น positive control นั้น พบว่ามีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.5-2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 6

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง และสารสกัดเห็ดเรืองแสงที่ผสมในเจลต้านสิว พบว่าสารสกัดเห็ดเรืองแสงทั้งสองส่วนมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน กล่าวคือ มีค่า MIC/MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* อยู่ในช่วง 2-4/4-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 3 และตารางที่ 6) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเห็ดเรืองแสงมีความคงตัวและมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดี แม้ว่าจะผสมอยู่ในเจลต้านสิวและบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส นานถึง 6 เดือน

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ของเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการต้านเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ด้วยวิธี agar well diffusion

ผลิตภัณฑ์	ค่าเฉลี่ย inhibition zone (mm)							
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 (biofilm positive)	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 (biofilm negative)	<i>S. epidermidis</i> NPRC 011 (clinical isolate)	<i>S. epidermidis</i> NPRC 012 (clinical isolate)	<i>S. epidermidis</i> NPRC 013 (clinical isolate)	<i>S. epidermidis</i> NPRC 014 (clinical isolate)	<i>S. epidermidis</i> NPRC 015 (clinical isolate)
ชุดทดสอบ (40°C)	11.02	10.83	10.10	11.01	10.81	9.01	10.92	11.22
ชุดควบคุม (40°C)	-	-	-	-	-	-	-	-
ชุดทดสอบ (30°C)	12.00	12.33	11.98	12.48	13.09	11.11	12.01	11.92
ชุดควบคุม (30°C)	-	-	-	-	-	-	-	-
Clindalin Gel®	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancomycin (160 µg/ml)	15.41	15.16	15.01	14.88	14.71	13.69	13.90	14.82

หมายเหตุ: ชุดทดสอบ = base gel + สารสกัดเห็ดเรืองแสงความเข้มข้น 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ชุดควบคุม = base gel

- = ไม่มี inhibition zone

Clindalin Gel® = เจลต้านชีวที่วางจำหน่ายในท้องตลาด มีส่วนผสมของ clindamycin 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 6 ฤทธิ์ของเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการต้านเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ด้วยวิธี broth microdilution

ผลิตภัณฑ์	MIC/MBC (µg/ml)							
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 (biofilm positive)	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 (biofilm negative)	<i>S. epidermidis</i> NPRC 011 (clinical isolate)	<i>S. epidermidis</i> NPRC 012 (clinical isolate)	<i>S. epidermidis</i> NPRC 013 (clinical isolate)	<i>S. epidermidis</i> NPRC 014 (clinical isolate)	<i>S. epidermidis</i> NPRC 015 (clinical isolate)
ชุดทดสอบ (40°C)	2-4/4-8	4/4-16	4-8/8-16	8/16	4-16/8-16	8/8-16	4/4-16	4-16/8-16
ชุดควบคุม (40°C)	-	-	-	-	-	-	-	-
ชุดทดสอบ (30°C)	2-4/4-8	4/4-16	2-4/8-16	2-4/4-16	4/4-16	4-16/8-16	2-4/16	4/4-16
ชุดควบคุม (30°C)	-	-	-	-	-	-	-	-
Clindalin Gel®	>512/>512	>512/>512	>512/>512	>512/>512	>512/>512	>512/>512	>512/>512	>512/>512
Vancomycin (160 µg/ml)	0.5/1	2/2	1/2	1/1	1/1	2/2	1/2	1/1

หมายเหตุ: ชุดทดสอบ = base gel + สารสกัดเห็ดเรืองแสงความเข้มข้น 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ชุดควบคุม = base gel

- = ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ

Clindalin Gel® = เจลต้านชีวที่วางจำหน่ายในท้องตลาด มีส่วนผสมของ clindamycin 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.5.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างและทำลายไบโอฟิล์มของเจลด้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง

1) การคัดเลือกเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp. สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์ม

ปัจจัยในการก่อโรคของเชื้อ *Staphylococcus* spp. คือ ความสามารถในการสังเคราะห์สาร extracellular polysaccharides จากการสลายสารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่จะพัฒนาและก่อให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์ม แบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์มได้จะทำให้กำจัดได้ยาก และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะต่ำลง (Hall-Stoody et al., 2004) การยับยั้งการสร้างและการสะสมไบโอฟิล์มจึงเป็นเป้าหมายสำคัญในลดการติดยาของเชื้อ และทำให้เชื้อถูกกำจัดโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ง่ายขึ้น ซึ่งการศึกษานี้ได้ทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus* spp. โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อใน 96-well plate ที่มีอาหาร TSB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้างไบโอฟิล์ม จากนั้นย้อมสีไบโอฟิล์มแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานนั้น มีระดับการเกาะติดกับพื้นผิวของ 96-well plate มากที่สุด จึงแปลผลได้ว่ามีระดับการสร้างไบโอฟิล์มสูงที่สุด (OD_{570} เท่ากับ 3.8350) ส่วนเชื้อ *S. epidermidis* NPRC 012 และ *S. epidermidis* NPRC 014 ที่แยกได้จากสัตว์นั้น มีระดับการเกาะติดและความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มอยู่ในระดับปานกลาง (OD_{570} อยู่ในช่วง 0.1950-0.2763) แต่เชื้อ *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228 (สายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม) และเชื้อ *S. epidermidis* ที่แยกได้จากสัตว์จำนวน 3 ไอโซเลตนั้น พบว่ามีระดับการเกาะติดน้อยและมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้ต่ำ (ตารางที่ 7)

จากผลการทดลองดังกล่าว จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้สูงที่สุด (*S. epidermidis* ATCC 35984) และสายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยสุด (*S. epidermidis* ATCC 12228) ไปทดสอบผลของเจลด้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 7 ผลการคัดเลือกเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp. สายพันธุ์ที่สร้าง ไบโอฟิล์ม

เชื้อแบคทีเรีย	ค่าการดูดกลืนแสง (OD ₅₇₀)				แปลผล ระดับการเกาะติด
	OD	OD _c	2OD _c	4OD _c	
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.1860	0.096	0.192	0.384	การเกาะติดน้อย
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 (biofilm positive)	3.8350	0.096	0.192	0.384	การเกาะติดมาก
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 (biofilm negative)	0.1060	0.096	0.192	0.384	การเกาะติดน้อย
<i>S. epidermidis</i> NPRC 011 (clinical isolate)	0.1887	0.096	0.192	0.384	การเกาะติดน้อย
<i>S. epidermidis</i> NPRC 012 (clinical isolate)	0.2763	0.096	0.192	0.384	การเกาะติดปานกลาง
<i>S. epidermidis</i> NPRC 013 (clinical isolate)	0.1907	0.096	0.192	0.384	การเกาะติดน้อย
<i>S. epidermidis</i> NPRC 014 (clinical isolate)	0.1950	0.096	0.192	0.384	การเกาะติดปานกลาง
<i>S. epidermidis</i> NPRC 015 (clinical isolate)	0.1883	0.096	0.192	0.384	การเกาะติดน้อย

หมายเหตุ: OD = optical density

OD_c = ค่า optical density ของ negative control

2OD_c = 2 เท่าของค่า OD_c

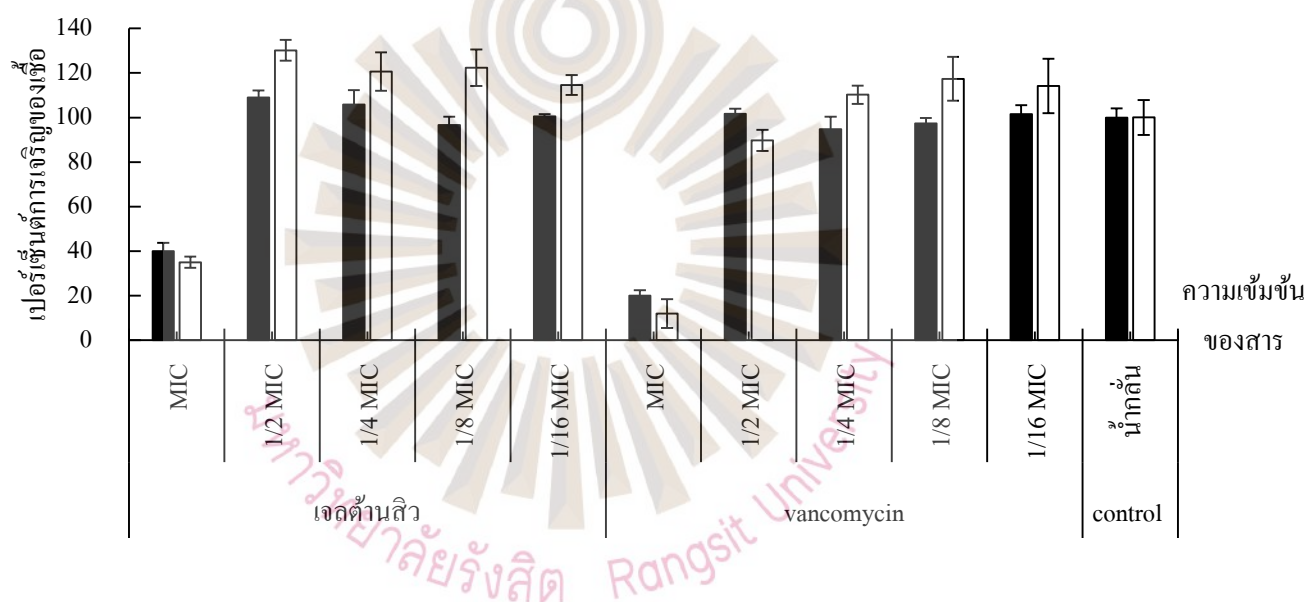
4OD_c = 4 เท่าของค่า OD_c

2) ผลของเจลต้านชีวต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis*

จากการทดสอบผลของเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 และ *S. epidermidis* ATCC 12228 โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSB ที่มีเจลต้านชีว หรือยา vancomycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (MIC ของเจลต้านชีวและยา vancomycin ต่อเชื้อทั้งสองสายพันธุ์คือ 4 และ 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าเจลต้านชีวและยา vancomycin ความเข้มข้น 1/2 MIC – 1/16 MIC ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ กล่าวคือ เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่

เจลด้านสิวและยา vancomycin ที่ความเข้มข้น MIC พบว่าเชื้อเจริญเติบโตได้เพียง 40 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 12

จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าเจลด้านสิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสง (ความเข้มข้น 1/2 MIC - 1/16 MIC) นั้น ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ จึงใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการทดสอบผลของเจลด้านสิวต่อการยับยั้งการสร้างหรือทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ในการทดลองขั้นต่อไป กล่าวคือ การทดสอบผลของสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ใด ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างหรือทำลายไบโอฟิล์มของเชื่อนั้น ๆ ต้องพิสูจน์ได้ว่าการสร้างไบโอฟิล์มที่น้อยลงนั้นไม่ได้เกิดจากจำนวนเชื้อที่ลดน้อยลง (ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตหรือถูกฆ่า) แต่เกิดจากฤทธิ์ของสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์นั้น ๆ มีผลต่อกระบวนการสร้างหรือทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อโดยตรง



ภาพที่ 12 ผลของเจลด้านสิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงและยา vancomycin ต่อเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 (สีดำ) และ *S. epidermidis* ATCC 12228 (สีขาว)

3) ผลของเจลด้านสิวต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis*

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการแบ่งเกณฑ์การจัดกลุ่มฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มออกเป็น 3 กลุ่ม (Manner et al., 2013) ดังนี้

- Highly active: สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์
- Moderately active: สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์

- Inactive: สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์

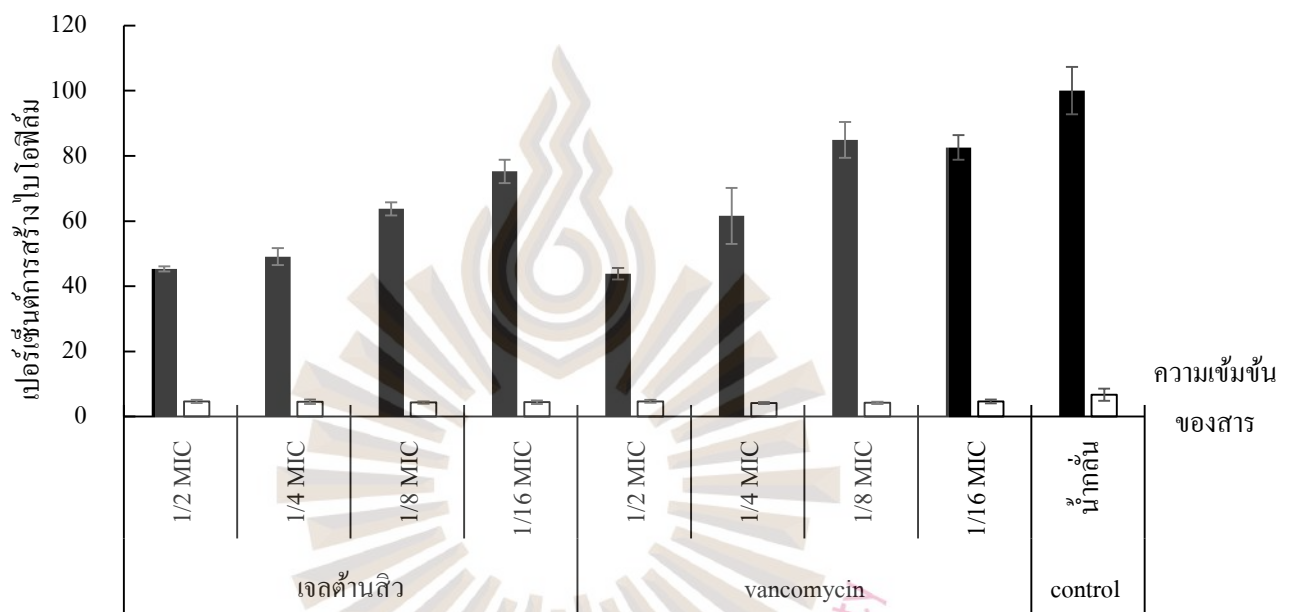
จากผลการทดสอบฤทธิ์ของเจลด้านสิ่วที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มโดยไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 (สายพันธุ์มาตรฐานที่สร้างไบโอฟิล์ม) พบว่าเจลด้านสิ่วที่ความเข้มข้น 1/2 MIC และ 1/4 MIC (2 และ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) จัดอยู่ในกลุ่ม moderately active กล่าวคือ เจลมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control ส่วนเจลด้านสิ่วที่ความเข้มข้น 1/8 MIC และ 1/16 MIC พบว่าเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์) จึงจัดอยู่ในกลุ่ม inactive ส่วนยา vancomycin ที่ใช้เป็น positive control นั้น พบว่ายาที่ความเข้มข้น 1/2 MIC (1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มโดยไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม moderately active (มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) ส่วนยา vancomycin ที่ความเข้มข้น 1/4 MIC, 1/8 MIC และ 1/16 MIC เชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์) จึงจัดอยู่ในกลุ่ม inactive (ภาพที่ 13)

นอกจากนี้ มีการศึกษาผลของเจลด้านสิ่วที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการชักนำการสร้างไบโอฟิล์ม โดยทดสอบกับเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 (สายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม) พบว่าเจลด้านสิ่วทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (1/2 MIC - 1/16 MIC) ไม่มีฤทธิ์ชักนำให้เชื้อสร้างไบโอฟิล์มเมื่อเปรียบเทียบกับ negative control (ภาพที่ 13)

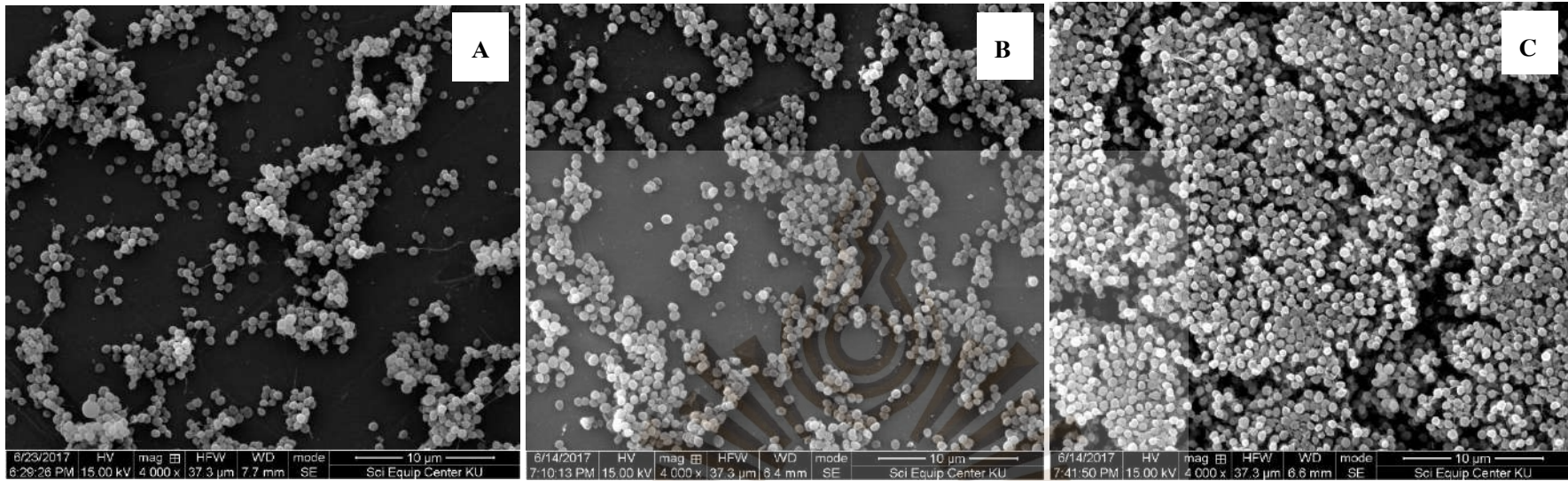
จากผลการทดลองดังกล่าว จึงเลือกความเข้มข้นของเจลด้านสิ่วและยา vancomycin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้สูงที่สุด (1/2 MIC) และไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ นำไปบ่มกับเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของเชื้อที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ผลการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำกลั่นซึ่งใช้เป็น negative control (ภาพที่ 14C) โครงสร้างของไบโอฟิล์มมีเชื้อเกาะอยู่อย่างหนาแน่น และมีการสร้าง extracellular polymeric substances เพื่อช่วยให้เชื้อมีการเกาะติดกันอย่างหนาแน่น แต่เมื่อทดสอบกับเจลด้านสิ่วที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (14A) พบว่ามีความหนาแน่นของไบโอฟิล์มลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับ negative control เนื่องจากเชื้อมีความสามารถในการยึดเกาะกับผิวแก้วลดน้อยลง จึงลอยตัวอยู่ในอาหาร TSB เซลล์เหล่านี้จึงถูกขจัดออกเมื่อล้างเซลล์ด้วย NSS ส่งผลให้ไบโอฟิล์มที่สร้างนั้นไม่มีความหนาแน่นและมีการสร้าง extracellular polymeric substances ลดน้อยลง ส่วนยา vancomycin ที่ใช้เป็น positive control นั้น พบว่าเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์มลดน้อยลงเช่นเดียวกับเจลด้านสิ่ว (ภาพที่ 14B)

จากงานวิจัยของศิริยา มุลทองชุน และคณะ (2557) พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงและเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตท

สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดที่สกัดด้วย hexane มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าสารสกัดจากตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียก่อโรครวมพวกและแกรมลบได้ ซึ่งไบโอฟิล์มนั้นมีบทบาทสำคัญในการช่วยให้เชื้อแบคทีเรียคือยา หรือรอดชีวิตจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกัน และก่อให้เกิดการติดเชื้อและมีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยในโรงพยาบาลเพิ่มสูงขึ้น



ภาพที่ 13 ผลของเจลด้านสีที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสงและยา vancomycin ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 (สีดำ) และ *S. epidermidis* ATCC 12228 (สีขาว)



ภาพที่ 14 ผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 หลังจากบ่มด้วยเจลด้านสิ่วที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสง ความเข้มข้น 1/2 MIC (A), ยา vancomycin ความเข้มข้น 1/2 MIC (B) และน้ำกลั่น (C) บันทึกภาพด้วยกล้อง scanning electron microscope (SEM) กำลังขยาย 4,000 เท่า



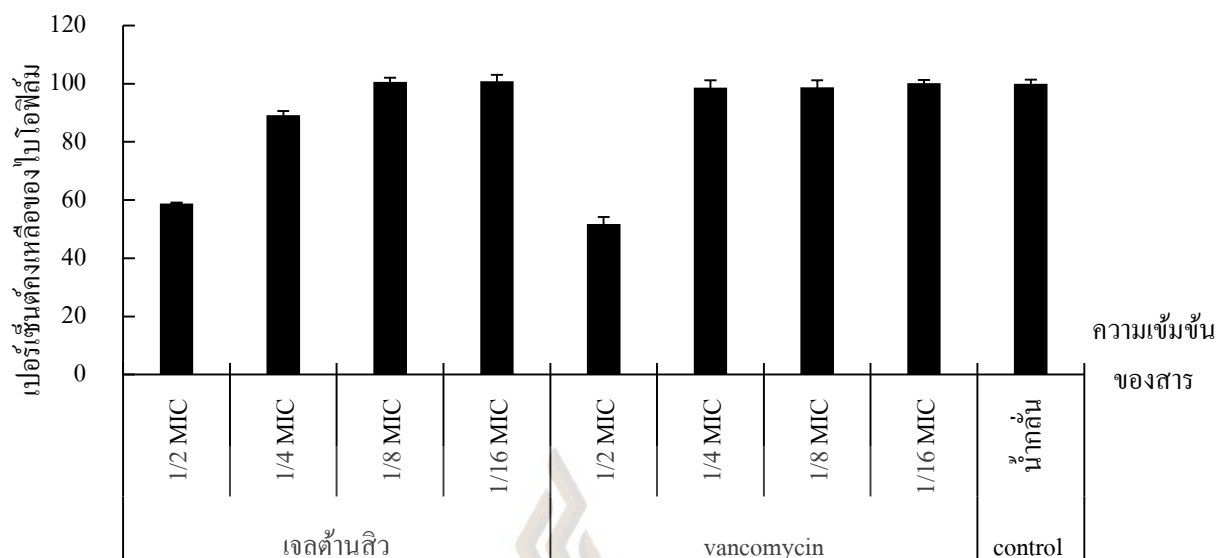
4) ผลของเจลด้านสิวต่อการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis*

จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้กำหนดเกณฑ์การทำลายไบโอฟิล์มที่สร้างจากเชื้อ โดยกำหนดว่า หากสารใดสามารถทำลายไบโอฟิล์มได้มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ แปลผลได้ว่าสารนั้นมีฤทธิ์เป็นบวกในการทำลายไบโอฟิล์ม (Pitts et al., 2003)

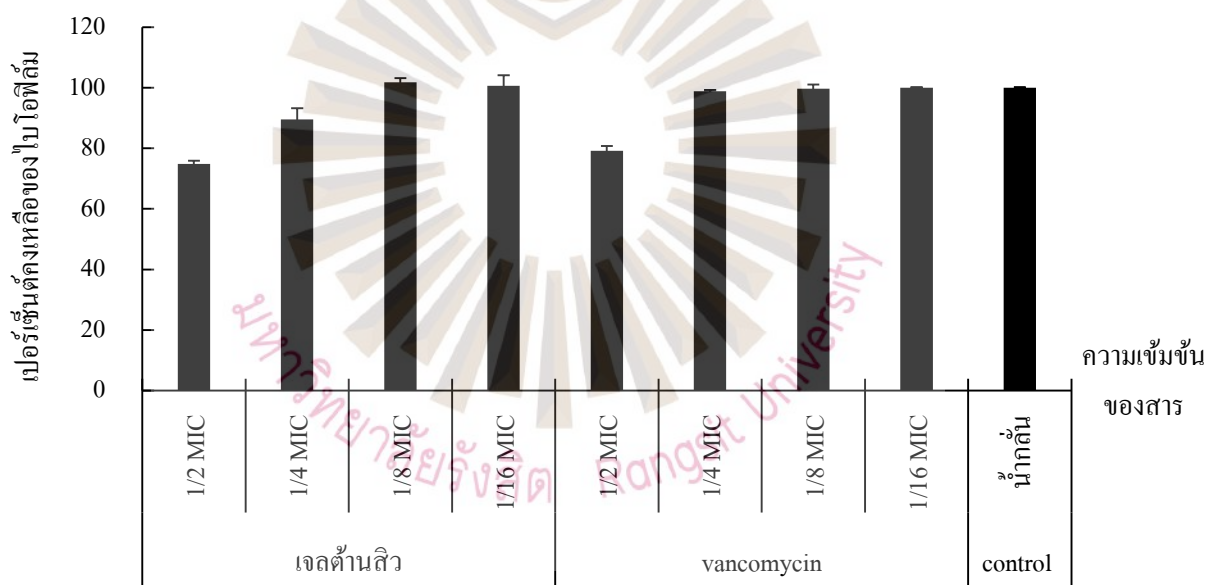
จากการทดสอบฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มของเจลด้านสิวที่ที่ส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ที่สร้างไบโอฟิล์มแล้วเป็นเวลา 1 วัน พบว่าเจลด้านสิวที่ความเข้มข้น 1/2 MIC (2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อได้ 41.19 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเจลด้านสิวที่ความเข้มข้น 1/4 MIC - 1/16 MIC พบว่าทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อได้น้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยา vancomycin ที่ใช้เป็น positive control นั้น พบว่าทำลายไบโอฟิล์มได้ 48.24 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1/2 MIC (1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ดังภาพที่ 15 ซึ่งผลการทดลองที่ได้นั้น สอดคล้องกับการศึกษาโครงสร้างของเชื้อที่อาศัยอยู่ในไบโอฟิล์มโดยใช้กล้อง SEM พบว่าโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อที่บ่มด้วยเจลด้านสิวและยา vancomycin นั้นมีความหนาแน่นลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ negative control (บ่มด้วยน้ำกลั่น) ดังภาพที่ 17A-C

นอกจากนี้ ผลการทดสอบฤทธิ์ของเจลด้านสิวที่ที่ส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ที่สร้างไบโอฟิล์มแล้วเป็นเวลา 5 วัน พบว่าเจลด้านสิวที่ความเข้มข้น 1/2 MIC (2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อได้ 25.15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเจลด้านสิวที่ความเข้มข้น 1/4 MIC - 1/16 MIC พบว่าทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อได้น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับยา vancomycin ที่ใช้เป็น positive control (ภาพที่ 16) ส่วนการศึกษาโครงสร้างของเชื้อที่อาศัยอยู่ในไบโอฟิล์มโดยใช้กล้อง SEM ที่กำลังขยาย 4,000 เท่า พบว่าโครงสร้างของไบโอฟิล์มของเชื้อนั้นมีความหนาแน่นลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ negative control (ภาพที่ 17D-F)

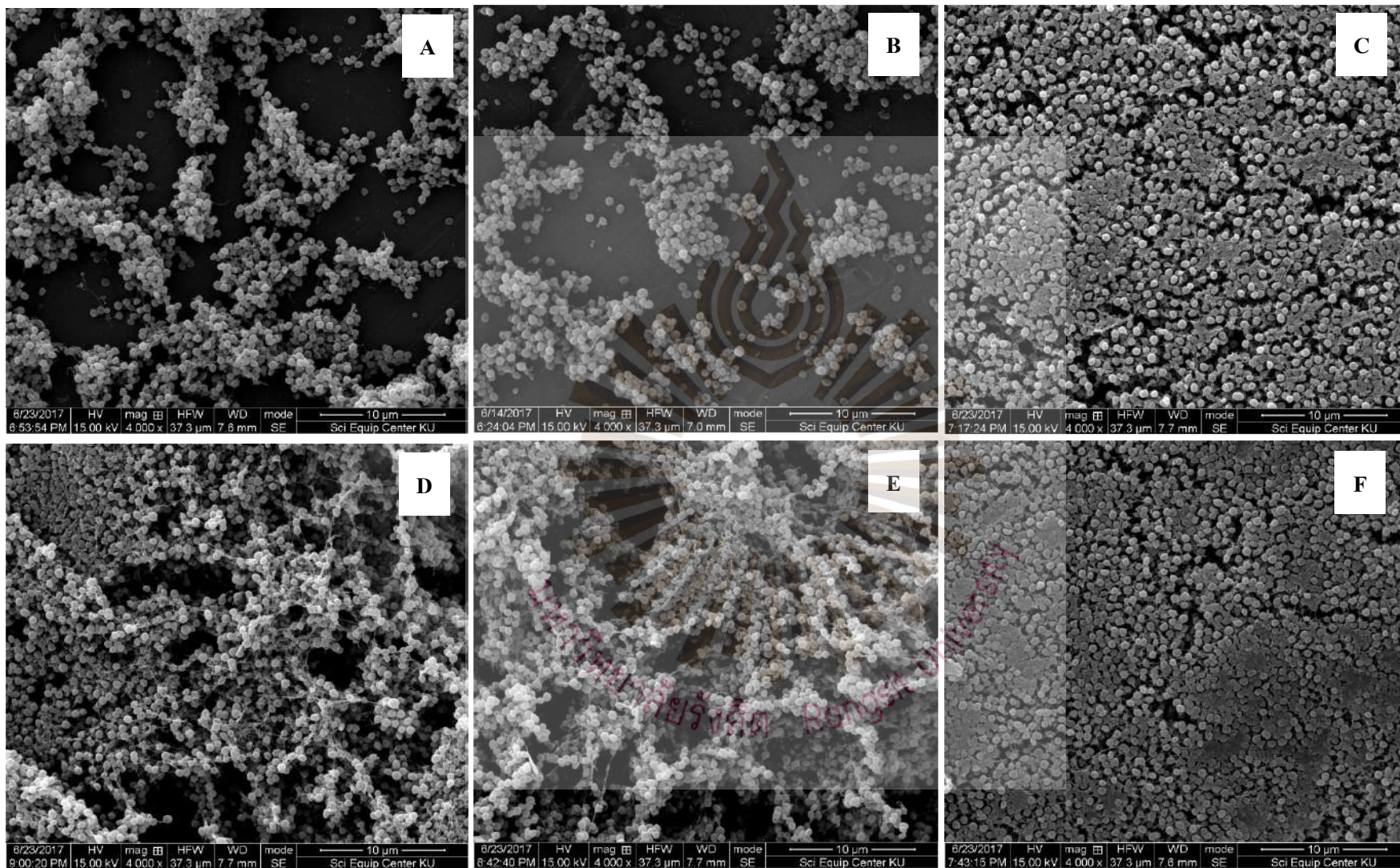
จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเจลด้านสิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงนั้นมีประสิทธิภาพในการทำลายไบโอฟิล์มที่มีอายุน้อย (1 วัน) ได้ดีกว่าไบโอฟิล์มที่มีอายุมาก (5 วัน) เนื่องจากไบโอฟิล์มในสภาวะ mature (5 วัน) จะมีลักษณะที่หนาและมีโครงสร้างที่ซับซ้อนมากกว่าไบโอฟิล์มในระยะแรก (1 วัน) ทำให้สารออกฤทธิ์ได้ยากขึ้น (Filoche et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าเจลด้านสิวดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีกว่าทำลายไบโอฟิล์ม โดยที่ความเข้มข้น 1/2 MIC มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ 54.64 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 13) แต่สามารถทำลายไบโอฟิล์มอายุ 5 วัน ได้เพียง 25.15 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 16) ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มจะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่าออกฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์ม (Donlan and Costerton, 2002)



ภาพที่ 15 ผลของเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสงและยา vancomycin ต่อเปอร์เซ็นต์การคงเหลือของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ที่สร้างไบโอฟิล์มแล้วเป็นเวลา 1 วัน



ภาพที่ 16 ผลของเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสงและยา vancomycin ต่อเปอร์เซ็นต์การคงเหลือของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ที่สร้างไบโอฟิล์มแล้วเป็นเวลา 5 วัน



ภาพที่ 17 ผลการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ที่สร้างไบโอฟิล์มแล้วเป็นระยะเวลา 1 วัน (A-C) และ 5 วัน (D-F) หลังจากนั้นบ่มด้วย เจลด้านสิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสง ความเข้มข้น 1/2 MIC (A, D), ยา vancomycin ความเข้มข้น 1/2 MIC (B, E) และและน้ำกลั่น (C, F) บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ Scanning Electron Microscopy (SEM) กำลังขยาย 4,000 เท่า

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงด้วยอาหาร PDB ในสถานะที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 1 เดือน และสกัดสารออกฤทธิ์จากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเห็ดด้วยเมทานอลและเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 (สายพันธุ์มาตรฐานที่สร้างไบโอฟิล์ม) ได้ดีกว่าสารสกัดจากเส้นใย จึงนำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดความเข้มข้น 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (20 MIC) ไปพัฒนาเป็นเจลต้านชีว โดยใช้ carbopol Ultrez-21 เป็นสารก่อเจล แล้วนำมาศึกษาความคงตัวของตัวภายใต้อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าเจลมีลักษณะสีเหลืองอ่อน ใส ไม่แยกชั้น และมีความคงตัวดี จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion และ broth microdilution ของเจลต้านชีว พบว่าเจลดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. epidermidis* ATCC 12228 (สายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม) และ *S. epidermidis* NPRC 011-015 (เชื้อที่แยกได้จากชีว) โดยมีค่าเฉลี่ยของ inhibition zone อยู่ในช่วง 9.01-13.09 มิลลิเมตร และมีค่า MIC/MBC อยู่ในช่วง 2-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ มีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างและทำลายไบโอฟิล์มของเจลต้านชีวต่อเชื้อ *S. epidermidis* พบว่าเจลต้านชีวที่ความเข้มข้น 1/2 MIC และ 1/4 MIC (4 และ 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control และไม่มีฤทธิ์ชักนำให้เชื้อสร้างไบโอฟิล์มเมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 นอกจากนี้ เจลต้านชีวที่ความเข้มข้น 1/2 MIC สามารถทำลายไบโอฟิล์มอายุ 1 และ 5 วันของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้มากกว่า 40 และ 25.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเจลต้านชีวที่ความเข้มข้น 1/4 MIC - 1/16 MIC พบว่าทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อได้น้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการศึกษาโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อโดยใช้กล้อง SEM ที่กำลังขยาย 4,000 เท่า พบว่าโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อที่บ่มด้วยเจลต้านชีวนั้นมีความหนาแน่นลดลงอย่างชัดเจน และมีการสร้าง extracellular polymeric substance ลดน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับ negative control

จากผลการศึกษาดังกล่าวสรุปได้ว่าเจลต้านชีวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงนั้นมีความคงตัวดี และมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ได้ดีมาก รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างและทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของชีวได้ดี จึงเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนการนำเจลต้านชีวดังกล่าวไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ผู้ต้องตลาดในอนาคต

2. ข้อเสนอแนะ

- ควรทดสอบกับเชื้อ *P. acnes* และแบคทีเรียก่อสิวชนิดอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติมก่อนออกสู่เชิงพาณิชย์

- ควรทดสอบการระคายเคือง และผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นในระยะยาวจากการใช้เจลต้านสิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงในสัตว์ทดลองและอาสาสมัครก่อนนำไปใช้จริง



บรรณานุกรม

- กัญญาวิวีร์ พุ่มบุตร, แสงนภา บุรณาภา, อัสมา บินซัน. การศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเห็ดการบูรและเห็ดเรืองแสงด้วยการฉายรังสีแกมมา [ปริญญาานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยรังสิต; 2557.
- กิริณา ประเสริฐเมฆ, กิติพันธ์ ขาวน้อม, ฤกษ์ดี รุ่งกาญจนกุล. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) ต่อการยับยั้ง *Candida albicans* [ปริญญาานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยรังสิต; 2557.
- กลุ่มงานหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ กรมป่าไม้. นักวิจัย ม.ขอนแก่น ค้นพบเห็ดเรืองแสง [อินเทอร์เน็ต]. 2555 [เข้าถึงเมื่อ 21 สิงหาคม 2560]. เข้าถึงได้จาก: <http://biodiversity.forest.go.th/index.php>.
- คันธรส วิชัยดิษฐ, ปาริสา แดงบุตร, สุขชาติ ภูฎิรัตน์. การศึกษาฤทธิ์การฆ่าไรไปปลา (*Luciaphorus perniciosus* Rack) ของส่วนสกัดหยาบจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi* Speg.) [ปริญญาานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยรังสิต; 2557.
- ศิรยา มุลทองชุน, จินต์ศุจี รักจิตพินิจกุล, อิศราภรณ์ วุฒินิรัญวิทย์. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* [ปริญญาานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยรังสิต; 2557.
- ชัญติกา พวงงาม, วัณญา แก้วมาก, อัญชลี เปิดชั้น. การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเห็ดเรืองแสงต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7, HeLa และ Colo205 [ปริญญาานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยรังสิต; 2558.
- ชนนาด เจริญบุญญาฤทธิ์, รัฎถิภรณ์ พรหมแก้ว, และอมลธดาณี สุวีระ. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) ต่อการยับยั้ง *Escherichia coli* [ปริญญาานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยรังสิต; 2557.
- รัชสิณี กาญจนอลงกรณ์, ชีรวัดน์ จันทวัชรา. การพัฒนาตำรับเจลของสารสกัดชาเพื่อใช้ในการรักษาผิว [ปริญญาานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต]. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยมหิดล; 2556.
- นันทยา ชุมไชโย, ฮาริส จารุ, อธิเดช ดวงตาไ. การพัฒนาเจลล้างมือฆ่าเชื้อที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) [ปริญญาานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยรังสิต; 2558.
- นิธิ ตั้งศิริทรัพย์. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกกล้วยหอมดิบต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อสิวและการติดเชื้อมีผิวหนังที่พบได้บ่อย [ปริญญาานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2555.

- พิชญานันท์ มาณะสุวอ, ภูมินทร์ จิตตะกาญจน์, อัจฉริยา ยิ่งยวด. เมทาบอลไลต์จากเห็ดเรืองแสง [ปริญญา นิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยรังสิต; 2559.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมวงศ์, นิธิยา รัตนานนท์. ไบโอฟิล์ม (Biofilms) [อินเทอร์เน็ต]. 2557 [เข้าถึงเมื่อ 27 สิงหาคม 2559]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1836/biofilms-ไบโอฟิล์ม>.
- วฤชณี ปริชานฤชิตกุล. ไบโอฟิล์มอยู่รอบ ๆ ตัวเรา [อินเทอร์เน็ต]. 2557 [เข้าถึงเมื่อ 4 เมษายน 2559]. เข้าถึงได้จาก: http://it.doa.go.th/pibai/pibai/n14/v_9-oct/kayaipon.html.
- วันเพ็ญ นิจศิริวงษ์, สุกศจี แฝงรัก. การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) ต่อการยับยั้ง *Microsporium gypseum* MU-SH4 ที่แยกได้จากผู้ป่วย [ปริญญา นิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยรังสิต; 2557.
- วีรวัตร นามานุศาสตร์, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และวราภรณ์ ตันฑนุช. ผลของ culture filtrate จากเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* Speg. ต่อการฟักไข่ และการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากลม *Meloidogyne incognita* Chitwood. *Khon Kaen Agr J* 2556;41:321-26.
- วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, จิรยุทธ์ คำขจร, นิวัฒน์ เสนาะเมือง. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน Internal Transcribes Spacer Region (ITS) จาก rRNA gene ของเห็ดเรืองแสง. ใน การสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2547; 26-27 มกราคม 2547; คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น; 2547.
- สุกัลญา หลีแจ้, ชีรทัศน์ สุดสาย, นันทพงศ์ ขำทอง, อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์. การศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*). รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต. 2557.
- สุกัลญา หลีแจ้, สุกัลญา ผิวคำ, ปาอีชะ เจะหลง, สุนิสา เกื้อชาติ, รุ่งฤทัย นาวิชัย, พรทิวา นิยมเจ็ด, กฤษณะพัฒน์ คล้ายมาลี, นันทพงศ์ ขำทอง, อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์. 2559. การตรวจสอบทางพิษวิทยาและความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อไรทะเลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*). การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2559 (RSU National Research Conference 2016), หน้า 85-93.
- สุนทร ตรีนันทวัน. เห็ดเรืองแสง [อินเทอร์เน็ต]. 2555 [เข้าถึงเมื่อ 26 มีนาคม 2558]. เข้าถึงได้จาก: <http://edtech.ipst.ac.th/index.php/2011-07-29-04-02-00/2011-08-09-07-26-40/18-2011-08-09-06-29-06/778-2012-12-31-06-46-33.html>.
- สุรีย์พร บัวอาจ. ผลของสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi* Speg.) ต่อไส้เดือนฝอยรากลม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) [ปริญญา นิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2554.

- เหมือนฝัน ชื่อตรง, ฐานิกา กระจ่างฉาย, รัตนาภรณ์ เทพวิษ. การศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) [ปริญญาานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยรังสิต; 2557.
- อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์, สุกัลญา หลีแจ้, ฐานปนาวรรณ นาสมยนต์, ชีรทัศน์ สุดสาย, นันทพงศ์ ขำทอง. กรรมวิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดพิษ *Neonothopanus nambi* ที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ด้านมะเร็ง และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และลดการเกิดพิษ. เลขที่คำขออนุสิทธิบัตร 1503002240. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์, 2558.
- อาริยา ช่วยอินทร์, พีรวัฒน์ ชัยวันดี. การศึกษาฤทธิ์ฆ่าไรของสารสกัดหยาบและน้ำเลี้ยงเชื้อจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) ต่อไรไข่ปลา (*Luciaphorus perniciosus*) [ปริญญาานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยรังสิต; 2559.
- โสภณ เรืองสำราญ. การใช้ปลาโนทอลเป็นสารต่อต้านโรคสีว. เลขที่คำขอสสิทธิบัตร 034734. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์, 2540.
- พิมพ์ร ลีลาพรพิสิฐ. ผลิตภัณฑ์รักษาสิ่วผสมสารสกัดพ่นแห้งจากกระบือเจ็ดตัว. เลขที่คำขอสสิทธิบัตร 0701000224. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์, 2554.
- มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. เจลแต้มสิ่วที่มีผลต้านแบคทีเรียก่อสิ่วที่ประกอบด้วยโปรตีนชีวสารกึ่งบริสุทธิ์. เลขที่คำขอสสิทธิบัตร 1001000495. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์, 2556.
- อรรคชัย ดันตราวงศ์. สูตรและกรรมวิธีผลิตน้ำยารักษาสิ่วจากสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง. เลขที่คำขออนุสิทธิบัตร 1003000310. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์, 2554.
- บุปผชาติ พดด้วง. สูตรตำรับและกรรมวิธีการผลิตสบู่ใส่ล้างหน้าด้านสิ่วที่มีส่วนผสมของสารสกัดหัวบอระเพ็ดพุงช้าง. เลขที่คำขออนุสิทธิบัตร 1003000534. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์, 2556.
- อรรคชัย ดันตราวงศ์. สูตรมาสค์แต้มสิ่วจากสารสกัดหัวบอระเพ็ดพุงช้างและกรรมวิธีการผลิต. เลขที่คำขออนุสิทธิบัตร 1103000594. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์, 2556.
- พรรวิภา กฤษณาพงษ์. ผลิตภัณฑ์บรรเทาการเกิดสิ่ว ที่มีสารสกัดจากบานเย็นเป็นส่วนประกอบหลัก. เลขที่คำขออนุสิทธิบัตร 1003000483. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์, 2556.
- สุรวุฒิ สนิทวงศ์ ณ อยุธยา. น้ำมันทาแก้สิ่ว. เลขที่คำขออนุสิทธิบัตร 1103000058. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์, 2555.
- อรุณศรี ปรีเปรม. สารผสมลดการอักเสบจากสิ่วและกรรมวิธีการผลิตสารผสมดังกล่าว. เลขที่คำขออนุสิทธิบัตร 1103000093. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์, 2557.
- รัฐพล อาญาสุจริต. สูตรโลชั่นรักษาสิ่วชนิดเกิดเป็นแผ่นฟิล์มบนร่างกาย. เลขที่คำขอสสิทธิบัตร 1201002680. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์, 2557.

- Asahi Y, Miura J, Tsuda T, Kuwabata S, Tsunashima K, Noiri Y, et al. Simple observation of *Streptococcus mutans* biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids. *Amb Express* 2015;5:1-9.
- ASEAN Guideline on Stability Study of Drug Product. 2013. Update version 5th Draft. p. 3-7.
- Bua-art S, Saksirirat W, Hiransalee A, Kanokmedhakul S, Lekphrom R. Effect of bioactive compound from luminescent mushroom (*Neonothopanus nambi* Speg.) on root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* Chitwood) and non-target organisms. *KKU Res J* 2011;16:331-41.
- Bua-art S, Saksirirat W, Kanokmedhakul V, Hiransalee A, Lekphrom R. Extraction of bioactive compounds from luminescent mushroom (*Neonothopanus nambi*) and its effect on root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *KKU Res J* 2010;15:726-37.
- Chang RC, Chou SJ, Shaw JF. Synthesis of fatty acid esters by recombinant *Staphylococcus epidermidis* lipases in aqueous environment. *J Agric Food Chem* 2001;49:2619-22.
- Cheung GY, Rigby K, Wang R, Queck SY, Braughton KR, Whitney AR, Teintze M, DeLeo FR, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. *PLoS Pathog* 2010;6.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-eighth Edition; Clinical and Laboratory Standards Institute: Pennsylvania. 2011.
- Costa GM, Endo EH, Cortez DAG, Nakamura TU, Nakamura CV, Dias Filho BP. Antimicrobial effects of *Piper hispidum* extract, fractions and chalcones against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *J Mycol Med* 2016;26:217-26.
- De Beer J, Brysiewicz P, Bhengu BR. Intensive care nursing in South Africa. *S Afr J Crit Care* 2011;27:6-10.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-93.
- Dreno B, Thiboutot D, Gollnick H, Finlay AY, Layton A, Layden JJ, et al. Large-scale worldwide observational study of adherence with acne therapy. *Int J Dermatol* 2010;49:448-56.
- Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in Microbial Ecology. *J Dent Res* 2010;89:8-18.
- Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol.* 2005;187:2426-38.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:95-108.
- Gomes F, Leite B, Teixeira P, Cerca N, Azeredo J, Oliveira R. Farnesol as antibiotics adjuvant in *Staphylococcus epidermidis* control *in vitro*. *Am J Med Sci.* 2011;341:191-5.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:95-108.
- Hellmark B, Unemo M, Nilsson-Augustinsson A, Söderquist B. Antibiotic susceptibility among *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections with special focus on rifampicin and variability of the *rpoB* gene. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:238-44.
- Kanokmedhakul S, Lekphron R, Kanokmedhakul K, Hahnvajjanawong C, Bua-art S, Saksirirat W, et al. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. *Tetrahedron* 2012;68:8261-66.
- Karaolis DK, Rashid MH, Chythanya R, Luo W, Hyodo M, Hayakawa Y. c-di-GMP (39-59-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1029-38.
- Karygianni L, Al-Ahmad A, Argyropoulou A, Hellwig E, Anderson AC, Skaltsounis AL. Natural antimicrobials and oral microorganisms: a systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. *Frontiers Microbiol* 2016;6:1-17.
- Kloos WE, Musselwhite MS. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol* 1975;30:381-5.
- Kohli-Kochhar R, Omuse G, Revathi G. A ten-year review of neonatal bloodstream infections in a tertiary private hospital in Kenya. *J Infect Dev Ctries* 2011;5:799-803.
- Lembke C, Podbielski A, Hidalgo-Grass C, Jonas L, Hanski E, Kreikemeyer B. Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. *Appl Environ Microb* 2006;72:2864-75.
- Lee JH, Kim YG, Ryu SY, Cho MW, Lee J. Ginkgolic acids and *Ginkgo biloba* extract inhibit *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Int J Food Microb* 2014;174:47-55.

- Lönn-Stensrud J, Landin MA, Benneche T, Petersen FC, Scheie AA. Furanones, potential agents for preventing *Staphylococcus epidermidis* biofilm infections? J Antimicrob Chemother 2009;63:309-16.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. Science 2008;322:1843-5.
- McCann MT, Gilmore BF, Gorman SP. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. J Pharm Pharmacol 2008;60:1551-71.
- Merghni A, Dallel I, Noumi E, Kadmi Y, Hentati H, Tobji S, et al. Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* and their anti-biofilm effect in oral *Staphylococcus aureus* strains. Microb Pathogen 2017;104:84-9.
- Mogenet I, Raetz-Dillon S, Canonge JM, Archambaud M, Bonnet E. Successful treatment of *Staphylococcus epidermidis* hip prosthesis infection with oral linezolid. Ann Pharmacother 2004;38:986-8.
- Namvar AE, Bastarahang S, Abbasi N, Ghehi GS, Farhadbakhtiarian S, Arezi P, et al. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. GMS Hygiene Infect Control 2014;9.
- Norström T, Lannergård J, Hughes D. Genetic and phenotypic identification of fusidic acid-resistant mutants with the small colony-variant phenotype in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:4438-46.
- Nascimento TC, da Silva VL, Ferreira-Machado AB, Diniz CG. Potential spread of multidrug-resistant coagulase-negative staphylococci through healthcare waste. J Infect Dev Ctries 2015;9:29-34.
- O'Neill AJ, McLaws F, Kahlmeter G, Henriksen AS, Chopra I. Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1737-40.
- Otto M. *Staphylococcus epidermidis*-the “accidental” pathogen. Nat Rev Microbiol 2009;7:555-67.
- Packiavathy IASV, Priya S, Pandian SK, Ravi AV. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin and anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. Food Chem 2014;148:453-60.
- Pitts B, Hamilton MA, Zalver N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. J Microbiol Meth 2003;54:269-76.

- Pourmand MR, Abdossamadi Z, Salari MH, Hosseini M. Slime layer formation and the prevalence of *mecA* and *aap* genes in *Staphylococcus epidermidis* isolates. *J Infect Dev Ctries* 2011;5:34-40.
- Prapaiwong A, Leejae S, Sudsai T, Phonkrathok S, Suksuwan A, Tangyuenyongwatana P, Kraissintu K. 2014. *Neonothopanus nambi* Speg., a new source of antibiotic and anti-inflammatory agents. p. 257. Abstract 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty, 6-8 May 2014. Phuket, Thailand.
- Presterl E, Suchomel M, Eder M, Reichmann S, Lassnigg A, Graninger W, et al. Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:417-20.
- Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am* 2009;23:73-98.
- Romero CM, Vivacqua CG, Abdulhamid MB, Baigori MD, Slanis AC, Gaudio de Allori MC, et al. Biofilm inhibition activity of traditional medicinal plants from Northwestern Argentina against native pathogen and environmental microorganisms. *Rev Soc Bras Med Trop* 2016;49:703-12.
- Rosenthal VD, Bijie H, Maki DG, Mehta Y, Apisarnthanarak A, Medeiros EA, et al. International nosocomial infection control consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. *Am J Infect Control* 2012;40:396-407.
- Sadowska B, Kuzma L, Micota B, Budzynska A, Wysokinska H, Klys A, et al. New biological potential of abietane diterpenoids isolated from *Salvia austriaca* against microbial virulence factors. *Microb Pathogen* 2016;98:132-9.
- Saising J, Ongsakul M, Voravuthikunchai SP. *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. ethanol extract and rhodomyrtone: a potential strategy for the treatment of biofilm-forming staphylococci. *J Med Microbiol* 2011;60:1793-800.
- Smith AJ, Robertson D, Tang MK, Jackson MS, MacKenzie D, Bagg J. *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. *Br Dent J* 2003;195:701-3.
- Tan JKL. Adapalene 0.1% and benzoyl peroxide 2.5%: a novel combination for treatment of acne vulgaris. *Skin Therapy Lett Pharm* 2009;4:1-3.
- Thomas KH, Martin RM, Potpkar J, Pirmohamad M, Gunnell D. Reporting of drug induced depression and fatal and non-fatal suicidal behavior in the UK from 1998-2011. *BMC Pharmacol Toxicol* 2014;15:54.

- Tsarkova AS, Dubinnyi MA, Baranov MS, Oguienko AD, Yampolskya IV. Nambiscalarane, a novel sesterterpenoids comprising a furan ring, and other secondary metabolites from bioluminescent fungus *Neonothopanus nambi*. *Mendeleev Commun* 2016;26:191-2.
- von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2002;2:677-85.
- Vuong C, Dürr M, Carmody AB, Peschel A, Klebanoff SJ, Otto M. Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. *Cell Microbiol* 2004;6:753-9.
- Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect* 2002;4:481-9.
- Waldvogel FA, Bisno AL, editors. Infections associated with indwelling medical devices. Washington, D.C.: ASM Press; 2000.
- Warren JW. Catheter-associated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17:299-303.
- Wong SY, Manikam R, Muniandy S. Prevalence and antibiotic susceptibility of bacteria from acute and chronic wounds in Malaysian subjects. *J Infect Dev Ctries* 2015;9:936-44.
- Wunoo S, Saising J, Voravuthikunchai SP. Rhodomyrtone inhibits lipase production, biofilm formation, and disorganizes established biofilm in *Propionibacterium acnes*. *Anaerobe* 2017;43:61-8.





ประวัติผู้วิจัย 1

คำนำหน้า นาย นาง นางสาว
 ตำแหน่งทางวิชาการ ศ. รศ. ผศ. อื่นๆ
 ชื่อผู้วิจัย สุกัลญา
 นามสกุลผู้วิจัย หลีแจ้
 ชื่อภาษาอังกฤษ Sukanlaya
 นามสกุลภาษาอังกฤษ Leejae
 วัน/เดือน/ปี เกิด 14 พฤษภาคม 2528
 ที่อยู่ (บ้าน) Rill Condo Rangsit 93/58 หมู่ 7 ต. หลักหก อ. เมือง
 จังหวัด (บ้าน) ปทุมธานี
 รหัสไปรษณีย์ (บ้าน) 12000
 โทรศัพท์ (บ้าน) -
 แฟกซ์ (บ้าน) -
 ที่อยู่ (ที่ทำงาน) วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต 52/347 หมู่บ้านเมืองเอก
 ต. พหลโยธิน ต. หลักหก อ. เมือง
 จังหวัด (ที่ทำงาน) ปทุมธานี
 รหัสไปรษณีย์ (ที่ทำงาน) 12000
 โทรศัพท์ (ที่ทำงาน) 02-997-2222 ต่อ 4894
 แฟกซ์ (ที่ทำงาน) 02-997-2222 ต่อ 5160
 E-Mail Address: rhodomyrtone_sl@yahoo.com

ปริญญาตรี

สาขา จุลชีววิทยา (เกียรตินิยมอันดับ 1)
 ปีที่จบ 2551
 สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
 ประเทศ ไทย

ปริญญาโท

สาขา -
 ปีที่จบ -

สถาบัน -

ประเทศ -

ปริญญาเอก

สาขา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีที่ยื่น 2555

สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประเทศ ไทย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ

Leejae, S., Sudsai, T. and Krobthong, C. 2015. *Eupatorium ayapana*, a natural source of anti-biofilm, anti-inflammatory and anti-oxidant agents. *Rangsit Journal of Arts and Sciences* 5: 141-149.

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

Sudsai, T., **Leejae, S.,** Dangmanee, N., Chatgat, W., Chaniad, P. and Tewtrakul, S. 2017. Antibacterial and anti-HIV-1 integrase properties of isolated compounds from *Boesenbergia kingie*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 39: 131-135.

Tungcharoen, P., Sudsai, T., **Leejae, S.,** Wattanapiromsakul, C., Tansakul, P. and Tewtrakul, S. 2017. Wound healing activity of *Curcuma zedoaroides*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 38: 621-630.

Sriyatep, T., Chakthong, S., **Leejae, S.** and Voravuthikunchai, S.P. 2014. Two lignans, one alkaloid and flavanone from the twigs of *Feroniella lucida*. *Tetrahedron* 70: 1773-1779.

Leejae, S., Hasap, L. and Voravuthikunchai, S.P. 2013. Inhibition of staphyloxanthin biosynthesis in *Staphylococcus aureus* by rhodomertone, a new antibiotic candidate. *Journal of Medical Microbiology* 62: 421-428.

Leejae, S., Taylor, P.W. and Voravuthikunchai, S.P. 2013. Antibacterial mechanisms of rhodomertone against drug-resistant Gram-positive pathogenic bacteria. *Journal of Medical Microbiology* 62: 78-85.

Leejae, S. and Voravuthikunchai, S.P. 2013. Effect of rhodomertone on tolerance to multiple stresses in *Staphylococcus aureus*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* (Revised).

Leejae, S., Yingyongnarongkul, B., Suksamrarn, A. and Voravuthikunchai, S.P. 2012. Synthesis and structure-activity relationship of rhodomyrtone derivatives as antibacterial agent. *Chinese Chemical Letters* 23: 1011-1014.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในประเทศ

ศุภกัญญา หลีแจ้, สุภกัญญา ผิวคำ, ปาอีชะ เจะหลง, สุนิสา เกื้อชาติ, รุ่งฤทัย นาวิชัย, พรทิวา นิมนต์, กฤษณะพัฒน์ คล้ายมาลี, นันทพงศ์ ขำทอง, อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์. 2559. การตรวจสอบทางพฤกษเคมีและความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อไรทะเลของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*). การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2559 (RSU National Research Conference 2016), หน้า 85-93.

Leejae, S., Bakasatae, N., Intamon, W., Korkitpaisal, C., Sudsai, T. and Prapaiwong, A. 2015. Antioxidant activity of caterpillar fungus (*Cordyceps militaris*) grown on rice berry and jasmine rice. The Rangsit University National Research Conference. April 24, 2015.

Prapaiwong, A., **Leejae, S.,** Sudsai, T., Phonkrathok, S., Suksuwan, A., Tangyuenyongwatana, P. Kraisintu, K. 2014. *Neonothopanus nambi* Speg., a new source of antibiotic and anti-inflammatory agents. p. 257. Abstract 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty, 6-8 May 2014. Phuket, Thailand.

Suaisom, C., **Leejae, S.,** Kumpun, S., Voravuthikunchai, S.P. and Yingyongnarongkul, B. 2013. Chemical constituents and antibacterial activity from *Rhodomyrtus tomentosa* leaves. p. 232. Abstract Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON 2013), Chemical Science for Green Community, 23-25 January 2013. Bangsaen Beach, Chonburi, Thailand.

Leejae, S., Yingyongnarongkul, B., Suksamrarn, A. and Voravuthikunchai, S.P. 2008. Synthesis and structure-activity relationship of rhodomyrtone derivatives as antibacterial agent. p 21. Abstract RGJ Seminar Series LXXXIII: Natural Resources and Management for Sustainable Utilization, 31 August 2011. Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

Leejae, S., Prapaiwong, A., Khamthong, N., Sudsai, T., Phonkrathok, S., Suksuwan, A., Voravuthikunchai, S.P. and Kraisintu, K. 2014. Antibacterial mechanisms of *Neonothopanus nambi* extracts against pathogenic bacteria. Asian Symposium on Sciences of Oriental Medicine, 2-3 July 2014. Pathumthani, Thailand.

- Leejae, S.,** Taylor, P.W. and Voravuthikunchai, S.P. 2012. *In vivo* toxicity and antibacterial mechanisms of rhodomyrton: a new candidate of antibiotic. p. 453. Abstract 4th International Conference on Natural Products for Health and Beauty, 28-30 November 2012. Chiang Mai Orchid Hotel, Chiang Mai, Thailand.
- Shankar, S., Chorachoo, J., **Leejae, S.** and Voravuthikunchai, S.P. 2012. Green synthesis of silver nanoparticles using *Rhodomyrtus tomentosa* acetone extract and evaluation of antibacterial activity. p. 461. Abstract 4th International Conference on Natural Products for Health and Beauty, 28-30 November 2012. Chiang Mai Orchid Hotel, Chiang Mai, Thailand.
- Leejae, S.,** Hasap, L. and Voravuthikunchai, S.P. 2011. Effect of rhodomyrton on pigment production in *Staphylococcus aureus*. p. 121. Abstract 1st International Congress on Natural Products, 17-18 October 2011. Phang Nga, Thailand.
- Leejae, S.,** Polsiri, N. and Voravuthikunchai, S.P. 2011. Haemolysis property of acetone extract and rhodomyrton on human erythrocyte. p. 148. Abstract 1st International Congress on Natural Products, 17-18 October 2011. Phang Nga, Thailand.
- Leejae, S.,** Yingyongnarongkul, B. and Voravuthikunchai, S.P. 2010. Improve extraction method for rhodomyrton from *Rhodomyrtus tomentosa* leaves. p. 114. Abstract 1st Current Drug Development International Conference, 6-8 May 2010. Woraburi Phuket Resort and Spa, Phuket, Thailand.
- Leejae, S.,** Yingyongnarongkul, B. and Voravuthikunchai, S.P. 2008. Antibacterial activity of fluorescein-labelled rhodomyrton derivative against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VISA), p. 169. Abstract 2nd International Conference on Natural Products for Health and Beauty, 17-19 December 2008. Naresuan University, Phayao, Thailand.
- Leejae, S.** and Voravuthikunchai, S.P. 2011. Effect of rhodomyrton on tolerance to multiple stresses in *Staphylococcus aureus*. p. 276. Abstract RGJ-Ph.D. Congress XII, 1-3 April 2011. Jomtein Palm Beach Resort, Chonburi, Thailand.
- Leejae, S.,** Yingyongnarongkul, B. and Voravuthikunchai, S.P. 2009. Synthesis and structure-activity relationship study of rhodomyrton against pathogenic bacteria. p. 26. Abstract RGJ Seminar Series LXIV: Science and Technology for the Sustainable Development, 4 September 2009. Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ

Leejae, S., Sakdipaet, M., Krobthong, C., Moonthongchun, K., Rakkitpinijdu, J., Wuthirunwit, I., Prapaiwong, A., Khamthong, N. and Kraissintu, K. 2015. Antibacterial activity and anti-biofilm formation of *Neonothopanus nambi* against pathogenic bacteria. Proceeding of the International Conference of Herbal Medicine Industrialization as Complementary Therapy in Natural Disasters. Royal Ambarukmo Hotel, Yogyakarta, Indonesia, January 7, 2015. p. 22.

Leejae, S., Taylor, P.W. and Voravuthikunchai, S.P. 2013. Localization and macromolecular biosynthesis inhibition of rhodomyrton, a new candidate of antibiotic. p 137. Abstract the Australian Society for Microbiology Annual Scientific Meeting and the Australian Mycological Society Scientific Meeting, 7-12 July 2013. Adelaide Convention Centre, Adelaide, South Australia.

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล

-

บทความวิชาการที่ได้ตีพิมพ์ในวารสาร

-

หนังสือ

ศุภยงค์ วรวิฑูคุณชัย, **สุกัลญา หลีแจ้**. 2560. สมุนไพรไทยต้านเชื้อจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; กรุงเทพมหานคร: 562 หน้า, ISBN: 978-974-03-3612-9.

สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

สุกัลญา หลีแจ้, อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์, ชีรทัศน์ สุดสาย และนันทพงศ์ ขำทอง. 2560. ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ. (อยู่ระหว่างพิจารณาจากกรมทรัพย์สินทางปัญญา).

อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์, สุกัลญา หลีแจ้, ฐานปนาวรรณ นาสมนต์, ชีรทัศน์ สุดสาย, นันทพงศ์ ขำทอง. 2559. กรรมวิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดพิษ *Neonothopanus nambi* ที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ด้านมะเร็ง และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และลดการเกิดพิษ. เลขที่คำขออนุสิทธิบัตร 1503002240.

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ
จุลชีววิทยาทางการแพทย์



ประวัติผู้วิจัย 2

คำนำหน้า นาย นาง นางสาว
 ตำแหน่งทางวิชาการ ศ. รศ. ผศ. อื่นๆ
 ชื่อผู้วิจัย นันทพงษ์
 นามสกุลผู้วิจัย ขำทอง
 ชื่อภาษาอังกฤษ Nanthaphong
 นามสกุลภาษาอังกฤษ Khamthong
 วัน/เดือน/ปี เกิด 12 มกราคม 2527
 ที่อยู่ (บ้าน) 12/4 หมู่ 4 ถ. บ้านนา-หาดสำราญ ต. หาดสำราญ อ. หาดสำราญ
 จังหวัด (บ้าน) ตรัง
 รหัสไปรษณีย์ (บ้าน) 92120
 โทรศัพท์ (บ้าน) -
 แฟกซ์ (บ้าน) -
 ที่อยู่ (ที่ทำงาน) วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต 52/347 หมู่บ้านเมืองเอก
 ถ. พหลโยธิน ต. หลักหก อ. เมือง
 จังหวัด (ที่ทำงาน) ปทุมธานี
 รหัสไปรษณีย์ (ที่ทำงาน) 12000
 โทรศัพท์ (ที่ทำงาน) 02-997-2222 ต่อ 4898
 แฟกซ์ (ที่ทำงาน) 02-997-2222 ต่อ 5160
 E-Mail Address: nanthaphong.k@rsu.ac.th

ปริญญาตรี

สาขา เคมี คณะวิทยาศาสตร์
 ปีที่จบ 2550
 สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
 ประเทศ ไทย

ปริญญาโท

สาขา เคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์
 ปีที่จบ 2552

สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเทศ ไทย

ปริญญาเอก

สาขา เคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์
ปีที่จบ 2556
สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเทศ ไทย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ

-

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. An antibacterial cytochalasin derivative from the marine-derived fungus *Diaporthaceae* sp. PSU-SP2/4. *Phytochem. Lett.* **2014**, *10*, 5-9.

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Pakawatchai, C.; Saithong, S.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. Acremonoside, a phenolic glucoside from the sea fan-derived fungus *Acremonium polychromum* PSU-F125. *Phytochem. Lett.* **2014**, *10*, 50-54.

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. Bioactive polyketides from the sea fan-derived fungus *Penicillium citrinum* PSU-F51. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8245-8250.

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Tadpetch, K.; Kaewpet, M.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. Tetrahydroanthraquinone and xanthone derivatives from the marine-derived fungus *Trichoderma aureoviride* PSU-F95. *Arch. Pharm. Res.* **2012**, *35*, 461-468.

Trisuwan, K.; **Khamthong, N.;** Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. Anthraquinone, cyclopentanone, and naphthoquinone derivatives from the sea fan-derived fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1507-1511.

Rukachaisirikul, V.; **Khamthong, N.;** Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Hutadilok-Towatana, N.; Graidist, P.; Sakayaroj, J.; Kirtikara, K. Cyclohexene, diketopiperazine, lactone and phenol

derivatives from the sea fan-derived fungi *Nigrospora* sp. PSU-F11 and PSU-F12. *Arch. Pharm. Res.* **2010**, *33*, 375-380.

Rukachaisirikul, V.; **Khamthong, N.**; Sukpondma, Y.; Pakawatchai, C.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J.; Kirtikara, K. An [11]cytochalasin derivative from the marine-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-F100. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 1409-1411.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ

Khamthong, N.; Phongpaichit, S.; Pedpradab, P.; Rukachaisirikul, V. 2013. Secondary metabolites from the sponge-derived fungus *Diaporthaceae* sp. PSU-SP2/4. Proceeding of the 39th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 39). Bangkok International Trade & Exhibition Center (BITEC), Bangkok, Thailand, October 21-23, 2013. p. 100.

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Tadpetch, K.; Kaewpet, M.; Phongpaichit, S., Preedanon, S.; Sakayaroj, J. 2012. Antibacterial anthraquinones from the sea fan-derived fungus *Trichoderma aureoviride* PSU-F95. Proceeding of the RGJ-Ph.D. Congress XIII. Jomtien Palm Beach Hotel & Resort Pattaya, Chonburi, Thailand, April 6-8, 2012. p. 146.

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. 2011. Chromones and anthraquinones from the marine-derived fungus *Trichoderma* sp. PSU-F95. Proceeding of the 14th Asian Chemical Congress 2011 (14ACC). Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, September 5-8, 2011. p. 546.

Khamthong, N.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J.; Rukachaisirikul, V. 2011. Chromones and anthraquinones from the marine-derived fungus *Trichoderma* sp. PSU-F95. Proceeding of the RGJ Seminar Series LXXXIII. Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand, August 31, 2011. p. 30.

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. 2011. Benzopyranone, xanthone and anthraquinone derivatives from the sea fan-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F51. Proceeding of the International Congress for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC Congress VII). Jomtien Palm Beach Hotel & Resort Pattaya, Chonburi, Thailand, May 4-7, 2011. p. 180.

Khamthong, N.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J.; Rukachaisirikul, V. 2010. Chromones and anthraquinones from the marine-derived fungus *Trichoderma* sp. PSU-F95. Proceeding of the 36th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 36). Bangkok

International Trade & Exhibition Center (BITEC), Bangkok, Thailand, October 26-28, 2010. p. 119.

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Hutadilok-Towatana, N.; Sakayaroj, J. 2010. Benzopyranone and xanthone derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F51. Proceeding of the 7th IMT-GT UNINET and the 3rd Joint International PSU-UNS Conferences. The 60th Anniversary of His Majesty the King's Accession to the Throne International Convention Center, Prince of Songkla University, Thailand, October 7-8, 2010. p. 273.

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. 2009. Metabolites from the marine-derived fungus *Fusarium* sp. PSU-F135. Proceeding of the 35th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 35). The Tide Resort (Bangsean Beach), Chonburi, Thailand, October 15-17, 2009. p. 150-151.

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J. 2009. Metabolites from the marine-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-F100. Proceeding of the International Congress for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC Congress VI). Jomtien Palm Beach Hotel & Resort Pattaya, Chonburi, Thailand, May 3-6, 2009. p. 63.

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. 2008. Metabolites from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F12. Proceeding of the 34th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 34). Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, October 31 - November 2, 2008. p. 151.

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S. 2008. Carboxylic acid and mellein derivatives from the mycelial extract of the marine-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-F100. Proceeding of the 10th National Graduate Research Conference. Sukhothai Thammathirat Open University, Thailand, September 11-12, 2008. p. 236.

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S. 2007. Chemical constituents from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F11. Proceeding of the 33rd Congress on Science and Technology of Thailand (STT 33). Walailak University, Thailand, October 18-20, 2007. p. 172.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ

Leejae, S.; Sakdipaet, M.; Krobthong, C.; Moonthongchun, K.; Rakkitpinijdnun, J.; Wuthirunwit, I.; Prapaiwong, A.; **Khamthong, N.**; Kraisintu, K. 2015. Antibacterial activity and anti-biofilm formation of *Neonothopanus nambi* against pathogenic bacteria. Proceeding of the International Conference of Herbal Medicine Industrialization as Complementary Therapy in Natural Disasters. Royal Ambarukmo Hotel, Yogyakarta, Indonesia, January 7, 2015. p. 22.

Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S. 2008. Cyclohexene derivatives from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F11. Proceeding of the 6th Regional IMT-GT Uninet Conference 2008. The Gurney Resort Hotel & Residences Penang, Malaysia, August 28-30, 2008. p. 549-550.

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล

-

บทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสาร

-

สาขาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

เคมีอินทรีย์



ประวัติผู้วิจัย 3

คำนำหน้า	<input type="checkbox"/> นาย	<input type="checkbox"/> นาง	<input checked="" type="checkbox"/> นางสาว	
ตำแหน่งทางวิชาการ	<input type="checkbox"/> ศ.	<input type="checkbox"/> รศ.	<input type="checkbox"/> ผศ.	<input type="checkbox"/> อื่นๆ
ชื่อผู้วิจัย	อัมพรรัตน์			
นามสกุลผู้วิจัย	ประไพวงศ์			
ชื่อภาษาอังกฤษ	Ampornrut			
นามสกุลภาษาอังกฤษ	Prapaiwong			
วัน/เดือน/ปี เกิด	2 กุมภาพันธ์ 2529			
ที่อยู่ (บ้าน)	140/136 ม. 2 ต. คลองทราย อ. นาทวี			
จังหวัด (บ้าน)	สงขลา			
รหัสไปรษณีย์ (บ้าน)	90160			
โทรศัพท์ (บ้าน)	-			
แฟกซ์ (บ้าน)	-			
ที่อยู่ (ที่ทำงาน)	วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต 52/347 หมู่บ้านเมืองเอก			
	ถ. พหลโยธิน ต. หลักหก อ. เมือง			
จังหวัด (ที่ทำงาน)	ปทุมธานี			
รหัสไปรษณีย์ (ที่ทำงาน)	12000			
โทรศัพท์ (ที่ทำงาน)	02-997-2222 ต่อ 4894			
แฟกซ์ (ที่ทำงาน)	02-997-2222 ต่อ 5160			
E-Mail Address:	sarcina_sine789@hotmail.com			

ปริญญาตรี

สาขา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
ปีที่ยจบ	2552
สถาบัน	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเทศ	ไทย

ปริญญาโท

สาขา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
ปีที่ยจบ	2555

สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเทศ ไทย

ปริญญาเอก

สาขา -
ปีที่จบ -
สถาบัน -
ประเทศ -

ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ

-

ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

-

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ

Leejae S, Bakasatae N, Intamon W, Korkitpaisal C, Sudsai T, and **Prapaiwong A**. 2015. Antioxidant activity of caterpillar fungus (*Cordyceps militaris*) grown on rice berry and jasmine rice. The Rangsit University National Research Conference. April 24, 2015.

Prapaiwong A, Leejae S, Sudsai T, Phonkrathok S, Suksuwan A, Tangyuenyongwatana P, Kraisintu K. 2014. *Neonothopanus nambi* Speg., a new source of antibiotic and anti-inflammatory agents. p. 257. Abstract 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty, 6-8 May 2014. Phuket, Thailand.

Prapaiwong A, and Umsakul, K. 2010. Screening of bacteria with antimicrobial activity from marine macro-organisms. The 2nd CMU Graduate Research Conference. November 26, 2010.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ

Leejae, S., Sakdipaet, M., Krobthong, C., Moonthongchun, K., Rakkitpinijidun, J., Wuthirunwit, I., **Prapaiwong, A.**, Khamthong, N. and Kraisintu, K. 2015. Antibacterial activity and anti-biofilm formation of *Neonothopanus nambi* against pathogenic bacteria. Proceeding of the

International Conference of Herbal Medicine Industrialization as Complementary Therapy in Natural Disasters. Royal Ambarrukmo Hotel, Yogyakarta, Indonesia, January 7, 2015. p. 22.

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล

-

บทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสาร

-

สาขาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ
จุลชีววิทยา

