ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*NEONOTHOPANUS NAMBI*)

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF LUMINESCENT MUSHROOM (*NEONOTHOPANUS NAMBI*) EXTRACTS AGAINST *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

โดย

มัชฌิมาภรณ์ ศักดิ์แพทย์

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก
วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีการศึกษา 2560

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF LUMINESCENT MUSHROOM (*NEONOTHOPANUS NAMBI*) EXTRACTS AGAINST *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

BY

MATCHIMAPORN SAKDIPAET

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN ORIENTAL MEDICINE

COLLEGE OF ORIENTAL MEDICINE

GRADUATE SCHOOL, RANGSIT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2017

วิทยานิพนธ์เรื่อง

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*NEONOTHOPANUS NAMBI*)

โดย
มัชฌิมาภรณ์ ศักดิ์แพทย์

ได้รับการพิจารณาให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก

มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีการศึกษา 2560

----------	----------
ดร.จงกล สายสิงห์	ดร.ณัฐกาญจน์ แดงมณี
ประธานกรรมการสอบ	กรรมการ
----------	----------
ดร.สุกัลญา หลีแจ้	ดร.นันทพงศ์ ขำทอง
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ร.ต.หญิง ดร.วรรณี ศุขสาตร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
28 พฤษภาคม 2561

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Thesis entitled

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF LUMINESCENT MUSHROOM (*NEONOTHOPANUS NAMBI*) EXTRACTS AGAINST *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

by

MATCHIMAPORN SAKDIPAET

was submitted in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Master of Science in Oriental Medicine

Rangsit University
Academic Year 2017

Dr. Jongkon Saising Examination Committee Chairperson	Dr. Nattakan Dangmanee Member
Dr. Sukanlaya Leejae Member and Advisor	Dr. Nanthaphong Khamthong Member and Co-Advisor

Approved by Graduate School

(Asst.Prof.Plt.Off. Vannee Sooksatra, D.Eng.)
Dean of Graduate School
May 28, 2018

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต (รหัสทุนวิจัย สวจ. 07/2559) และวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่สำหรับการทำวิจัย

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จขึ้นตามความตั้งใจของผู้วิจัยได้ เนื่องมาจากความเมตตากรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาทั้งสองท่านที่มีพระคุณยิ่ง ท่านแรกขอบพระคุณ ดร.สุกัลญา หลีแจ้ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ ตรวจแก้ไขความเรียบร้อย รวมทั้งยังให้ความช่วยเหลือในการแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานอีกด้วย และอีกท่านกราบขอบพระคุณ ดร.นันทพงศ์ ขำทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบพระคุณอาจารย์อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสง และคอยช่วยเหลือในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ อันประกอบด้วย ดร.จงกล สายสิงห์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร.นันทพงศ์ ขำทอง ดร.ณัฐกาญจน์ แดงมณี และ ดร.สุกัลญา หลีแจ้ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนบรรลุผลสำเร็จ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และน้องสาว ซึ่งเปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียนและคอยให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน คอยรับฟังปัญหาต่าง ๆ พร้อมทั้งให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางเป็นอย่างดี ตลอดจนเป็นกำลังใจและคอยอยู่เคียงข้างเสมอมาจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

มัชฌิมาภรณ์ ศักดิ์แพทย์
ผู้วิจัย

5607650 : สาขาวิชาเอก: การแพทย์แผนตะวันออก; วท.ม. (แพทย์แผนตะวันออก)

คำสำคัญ : *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*, *NEONOTHOPANUS NAMBI*, สิว

มัชฌิมาภรณ์ ศักดิ์แพทย์: ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง *NEONOTHOPANUS NAMBI* (ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF LUMINESCENT MUSHROOM (*NEONOTHOPANUS NAMBI*) EXTRACTS AGAINST *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*) อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร. สุกัลญา หลีแจ้, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ดร.นันทพงศ์ ขำทอง, 58 หน้า.

เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นบนผิวหนังและเยื่อเมือกของมนุษย์ โดยเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของสิว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* จากผลการทดลองพบว่าน้ำหนักของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 233.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 903.7 มิลลิกรัม ตามลำดับ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 โดยมีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC)/Minimum Bactericidal Concentration (MBC) เท่ากับ 2/2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบ Time-kill Assay พบว่าสารสกัดดังกล่าวที่ความเข้มข้น 4MIC (8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้ที่เวลา 2 ชั่วโมง

จากนั้นคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์ม พบว่าเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มมากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์นี้เพื่อไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งการสร้างและการทำลายไบโอฟิล์ม โดยใช้สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC และ 1/16MIC ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด โดยมีค่าเท่ากับ 29.79, 23.88, 20.83 และ 16.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่สารสกัดดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์ม และการศึกษาลักษณะไบโอฟิล์มภายใต้กล้อง

ลายมือชื่อนักศึกษา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

จุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) พบว่าสารสกัดความเข้มข้น 1/2MIC มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม แต่ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์ม

นอกจากนี้พบว่าสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ความเข้มข้น 1/2MIC และ 1/4MIC มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด โดยมีค่าเท่ากับ 22.22 และ 9.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Protease ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 พบว่าเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ไม่สร้างเอนไซม์ Protease

จากการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดเห็ดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane เป็นสารสกัดที่มีปริมาณมากที่สุด ซึ่งสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างแต่ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 นอกจากนี้สารสกัดดังกล่าวยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 อีกด้วย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ลายมือชื่อนักศึกษา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

5607650 : MAJOR: ORIENTAL MEDICINE; M.Sc. (ORIENTAL MEDICINE)

KEYWORDS : *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*, *NEONOTHOPANUS NAMBI*, ACNE

MATCHIMAPORN SAKDIPAET: ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF LUMINESCENT MUSHROOM (*NEONOTHOPANUS NAMBI*) EXTRACTS AGAINST *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*. THESIS ADVISOR: DR. SUKANLAYA LEEJAE, THESIS CO-ADVISOR: DR. NANTHAPHONG KHAMTHONG, 58 p.

Staphylococcus epidermidis is the normal microbiota on skin and mucous membranes of human. *S. epidermidis* can form biofilms which is one of the causes of acne. The objective of this study was to study antibacterial activity of luminescent mushroom extracted by organic solvents on the inhibition of *S. epidermidis* biofilm formation. The dichloromethane extracts from the cuture filtrate and mycelia gave the highest yields which were 233.0 mg/l and 903.7 mg, respectively. The result showed that the culture filtrate extracted with dichloromethane possessed antibacterial activity against *S. epidermidis* ATCC 12228 and *S. epidermidis* ATCC 35984 with MIC/MBC values as 2/2 µg/ml. From time-kill assay, the dichloromethane extract with a concentration of 4MIC (8 µg/ml) showed bactericidal property against *S. epidermidis* ATCC 35984 at 2 hours.

From the detection of biofilm-forming strains of *S. epidermidis*, it was found that the strain *S. epidermidis* ATCC 35984 was capable of forming biofilm. Thus, the strain was chosen for further study on the inhibition and destruction of biofilm formation of the dichloromethane extract against *S. epidermidis* ATCC 35984. The extracts were tested against *S. epidermidis* ATCC 35984 at the concentrations of 1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC and 1/16MIC. The result displayed that the percentage of inhibition increased with increasing extract concentration; the percentages of inhibition were 29.79, 23.88, 20.83 and 16.40, respectively. However, the extracts did not showed the destruction of biofilm. Under SEM microscope, the culture filtrate dichloromethane extract with the concentration of 1/2MIC was capable of inhibit the biofilm formation but did not kill mature biofilm.

Furthermore, the culture filtrate dichloromethane extract concentrations of 1/2MIC and

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

1/4MIC for inhibited lipase production of *S. epidermidis* ATCC 35984 was performed. The result showed that the percentages of inhibition were 22.22 and 9.26, respectively. But *S. epidermidis* ATCC 35984 not produced protease enzyme.

In conclusions, the culture filtrate dichloromethane extract gave the highest yield, it displayed pronounced antibacterial activity against the tested bacterial strains and was capable of inhibit the biofilm formation but did not kill mature biofilm of *S. epidermidis* ATCC 35984. Moreover, the extract was capable of inhibit lipase enzyme of *S. epidermidis* ATCC 35984.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ลายมือชื่อนักศึกษา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		**ก**
บทคัดย่อภาษาไทย		**ข**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		**ง**
สารบัญ		**ฉ**
สารบัญตาราง		**ฌ**
สารบัญรูป		**ญ**
บทที่ 1	**บทนำ**	**1**
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
	1.3 สมมติฐานการวิจัย	3
	1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย	3
	1.5 นิยามศัพท์	4
บทที่ 2	**ทบทวนวรรณกรรม**	**5**
	2.1 สิว	5
	2.2 *Staphylococcus epidermidis*	10
	2.3 เห็ดเรืองแสง	15
บทที่ 3	**ระเบียบวิธีวิจัย**	**23**
	3.1 วัสดุอุปกรณ์	23
	3.2 การเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสง	25
	3.3 การสกัดสารสำคัญจากเห็ดเรืองแสง *N. nambi*	25

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	3.4 การทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC)	26
	3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงโดยวิธี Time-kill Assay	27
	3.6 การคัดเลือกเชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์ม	28
	3.7 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis*	29
	3.8 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis*	30
	3.9 การศึกษาลักษณะไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)	30
	3.10 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงในยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase และ Protease ของเชื้อ *S. epidermidis*	31
บทที่ 4	**ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย**	**33**
	4.1 การสกัดสารสำคัญจากเห็ดเรืองแสง	33
	4.2 ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MBC	34
	4.3 ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* ของสารสกัดเห็ดเรืองแสง	37
	4.4 ผลการคัดเลือกเชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์ม	38
	4.5 ฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis*	39
	4.6 ฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis*	41
	4.7 ลักษณะไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)	42
	4.8 ฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase และ Protease ของเชื้อ *S. epidermidis*	46

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 5	**สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ**	**48**
	5.1 สรุปผลการวิจัย	48
	5.2 ข้อเสนอแนะ	49
บรรณานุกรม		**50**
ประวัติผู้วิจัย		**58**

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ผลการสกัดสารสำคัญจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane, Dichloromethane และ Ethyl Acetate	34
4.2	ค่า MIC และ MBC สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อเชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์มาตรฐาน	35
4.3	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ที่แยกได้จากรอยสิว	36
4.4	ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์ที่แยกได้จากรอยสิว	39
4.5	ความสามารถในการย่อยสลาย และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ Lipase ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงสกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984	47

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

1.1	กรอบแนวคิดการวิจัย	3
2.1	สิวชนิดไม่อักเสบ	6
2.2	สิวชนิดอักเสบ	6
2.3	กลไกการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis*	12
2.4	ปฏิกิริยาการเรืองแสงของเห็ดเรืองแสง	16
2.5	ลักษณะของเห็ดเรืองแสง *N. nambi*	17
3.1	ขั้นตอนการสกัดสารสำคัญจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสง *N. nambi*	25
3.2	ขั้นตอนการสกัดสารสำคัญจากเส้นใยเห็ดเรืองแสง *N. nambi*	26
4.1	ผล Time-kill Assay ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984	38
4.2	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane และ Vancomycin	40
4.3	เปอร์เซ็นต์การทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane และ Vancomycin	42
4.4	ลักษณะการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 โดยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)	44
4.5	ลักษณะการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 โดยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)	45
4.6	ผลการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ของโดยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane	47

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

4.7 ผลการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ของโดยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane 47

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เห็ดเรืองแสงเป็นเห็ดที่มีการเรืองแสงให้เห็นได้ด้วยตาเปล่าในเวลากลางคืนหรือในที่มืด โดยกระบวนการเรืองแสงที่เกิดขึ้นเป็นกระบวนการทางชีวภาพ เรียกว่า Bioluminescence ในปัจจุบันมีเห็ดเรืองแสงที่ถูกบันทึกชื่อไว้ประมาณ 80 สายพันธุ์ (Bondar, Shimomura, & Gitelson, 2012) และพบได้ในหลายทวีปทั่วโลก ได้แก่ อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ ยุโรป เอเชีย ออสเตรเลีย หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก และแอฟริกา (Bondar et al., 2012) โดยตัวอย่างสายพันธุ์ที่มีการค้นพบในทวีปต่าง ๆ เช่น *Mycena abieticola* พบในประเทศแม็กซิโก (Desjardin, Perry, Lodge, Stevani, & Nagasawa, 2010), *Mycene asterina* พบในประเทศบราซิล ทวีปอเมริกาใต้ (Desjardin, Capelari, & Stevani, 2007), *Mycena picta* พบในประเทศโปแลนด์ ทวีปยุโรป (Halama & Romanski, 2010), *Omphalotus nidiformis* พบในประเทศอินเดีย ทวีปเอเชีย (Shirmila & Radhamahy, 2012) และ *Panellus stipticus* พบมากในทวีปออสเตรเลีย (Prasher, Chandel, & Ahluwalia, 2012) เป็นต้น

เห็ดเรืองแสงสายพันธุ์ *Neonothopanus nambi* พบครั้งแรกในประเทศไทยในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ซึ่งอยู่ในเขตโคกภูตากา อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น (Bua-art, Saksirirat, Hiransalee, Kanokmedhakul, & Lekphrom, 2011) เห็ดเรืองแสงสายพันธุ์นี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับเห็ดนางรม การเจริญจะเจริญเป็นกลุ่ม ๆ ละ 4-5 ดอก ซึ่งปกติจะเจริญบนขอนไม้ หรือไม้ที่ตายแล้ว (Bua-art, Saksirirat, Hiransalee, Kanokmedhakul, & Lekphrom, 2010) โดยหมวกเห็ดมีสีขาว มีครีบใต้หมวกเห็ด และมีก้านสั้น ลักษณะในเวลากลางคืน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงคืนมืดหรือในห้องมืด เห็ดจะเรืองแสงโดยจะเห็นแสงสีเขียวอมเหลืองเปล่งออกมาบริเวณรอบ ๆ ครีบและก้านของเห็ด ซึ่งสามารถมองเห็นได้ในระยะไกลประมาณ 10-20 เมตร (Kanokmedhakul et al., 2012) แม้ว่าเห็ดเรืองแสงสายพันธุ์นี้จะเป็นเห็ดพิษ แต่ปัจจุบันนักวิจัยมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดสายพันธุ์นี้เพิ่มมากขึ้น เช่น การศึกษาฤทธิ์ในการกำจัดไส้เดือนฝอย ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืช (Bua-art et al., 2010; Bua-art et al., 2011; วีรวัตร นามานุศาสตร์, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, อนันต์ หิรัญสาลี และรัศมี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เหล็กพรม, 2556) การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *Plasmodium falciparum* และการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของวัณโรค (Kanokmedhakul et al., 2012) เป็นต้น อย่างไรก็ตามรายงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของเห็ดเรืองแสงต่อการต้านเชื้อ *S. epidermidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่จัดเป็นปัญหาสุขภาพในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษา

เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* เป็นแบคทีเรียใน Family Staphylococcaceae มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก เรียงตัวคล้ายพวงองุ่น *S. epidermidis* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal Microbiota) บนผิวหนังและเยื่อเมือกของมนุษย์ (Harris, Foster, & Richards, 2002) ซึ่งการติดเชื้อหรือการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *S. epidermidis* นั้นเกิดจากเชื้อเกาะติดกับเซลล์โฮสต์ (Venkatesh, Placencia, & Weisman, 2006) โดยปกติแล้วภายในร่างกายจะมีไขมัน โพลีแซกคาไรด์ โปรตีน และ โพลีเมอร์หลายชนิด เชื้อจะหลั่งเอนไซม์ออกมาเพื่อย่อยโพลิเมอร์เหล่านี้ นอกจากนี้เชื้อยังมีการสร้างไบโอฟิล์มบริเวณ Sebaceous Follicle (Burkhart, Burkhart, & Lehmann, 1999) โดย *S. epidermidis* จะมีการสร้างเอนไซม์ไลเปส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการเจริญเติบโตของเชื้อในผิวหนังบริเวณที่มีไขมันปริมาณมาก (Longshaw, Farrell, Wright, & Holland, 2000) และเป็นสาเหตุหนึ่งของสิว ปัญหาสิวเป็นปัญหาที่มีผลต่อสุขภาพจิต ทำให้ขาดความมั่นใจ วิตกกังวลใจ ก่อให้เกิดภาวะซึมเศร้า และนำไปสู่การฆ่าตัวตายของเยาวชนบางกลุ่ม (Hull & D'Arcy, 2005; Jappe, 2003)

ดังนั้นผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากเห็ดเรือง-แสง *N. nambi* ต่อเชื้อ *S. epidermidis* เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์รักษาสิว และส่งเสริมการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนของเห็ดเรืองแสงต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง

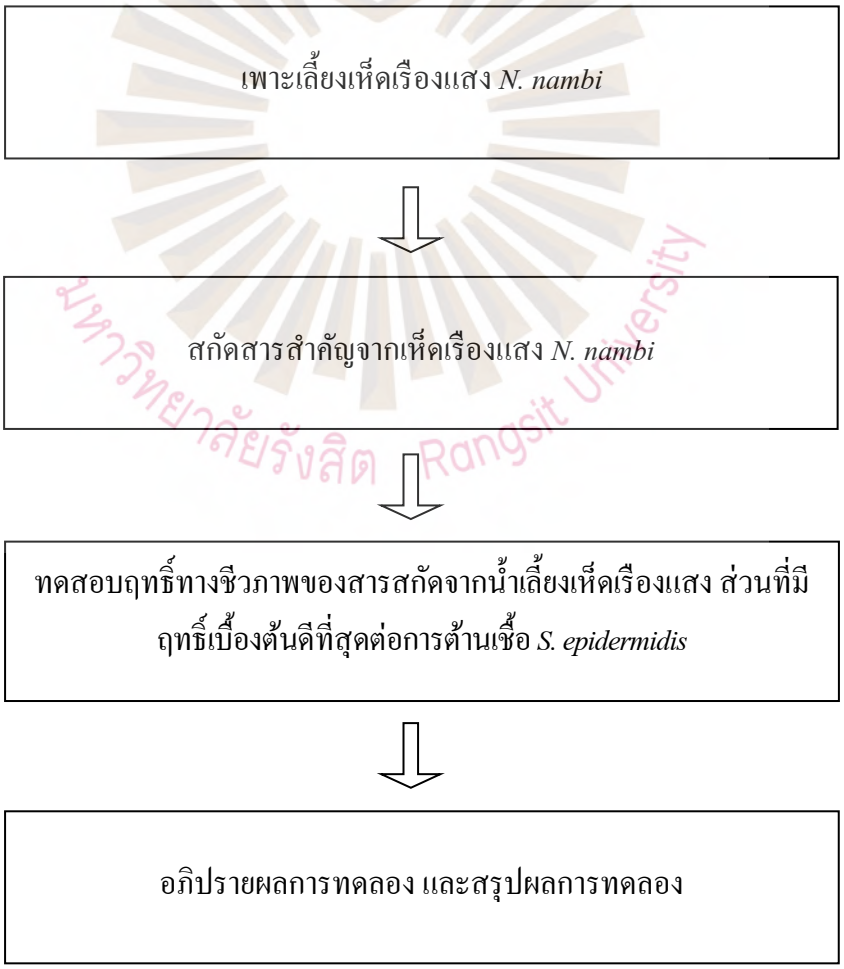
1.2.2 เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อเชื้อ *S. epidermidis*

1.2.3 เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์รักษาสิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง

1.3 สมมติฐานการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (*N. nambi*) การทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างและทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* และการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase และ Protease ของเชื้อ *S. epidermidis* สารสกัดจากเห็ดเรืองแสง *N. nambi* น่าจะมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* และน่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างและการทำลาย ไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* นอกจากนี้สารสกัดดังกล่าวน่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase และ Protease ของเชื้อ *S. epidermidis*

1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย



รูปที่ 1.1 กรอบแนวคิดของการทำวิจัย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

1.5 นิยามศัพท์

Bioluminescence การผลิตแสงตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต

Host คนหรือสัตว์ที่มีปรสิตอาศัยอยู่

Virulence Factor ปัจจัยที่ก่อให้ความรุนแรงของจุลินทรีย์ในการเจริญและการแพร่ กระจายภายในโฮสต์ โดยการรุกรานการป้องกันของโฮสต์

0.5 McFarland Standard มาตรฐานที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบจำนวนเชื้อแบคทีเรียในของเหลวแขวนลอย โดยเปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อในหลอดกับมาตรฐาน McFarland Standard ค่า 0.5 McFarland standard มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 1.5×10^8 CFU/ml

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุด (ในหลอดทดลอง) ที่สามารถยับยั้งการเจริญ เติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุด (ในหลอดทดลอง) ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

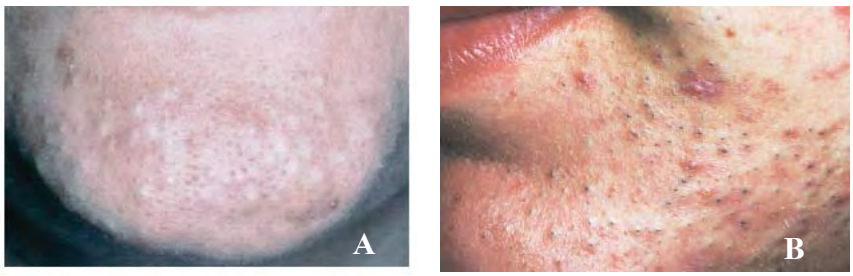
2.1 สิว

สิวเป็นโรคผิวหนังที่พบบ่อยที่สุด พบได้ในทุกเพศทุกวัยโดยเฉพาะในวัยรุ่น (Titus & Hodge, 2012) สิวจะปรากฏอาการในผู้หญิงช่วงอายุ 14-17 ปี และในผู้ชายช่วงอายุ 16-19 ปี ความรุนแรงของสิวจะมากขึ้น 3-5 ปี หลังจากเริ่มเป็นสิว และมักหายไปในช่วงอายุ 20-25 ปี ส่วนใหญ่มักเป็นสิวชนิดไม่รุนแรง มีเพียงไม่มากที่เป็นสิวอักเสบรุนแรง (นภดล นพคุณ และคณะ, ม.ป.ป.) ผู้ที่เป็นสิวในกรณีที่รุนแรง อาจทำให้เสียโฉม และอาจมีผลกระทบอย่างมากต่อบุคลิกภาพ การพัฒนาความสัมพันธ์ของหนุ่มสาว อาจส่งผลให้ชอบเก็บตัว ทำให้เกิดภาวะซึมเศร้าและการฆ่าตัวตาย (Jappe, 2003)

2.1.1 ประเภทของสิว

ลักษณะทางคลินิก สิวสามารถเกิดขึ้นได้บริเวณใบหน้า ลำคอ หน้าอก และหลังซึ่งมีต่อมไขมันปริมาณมาก (Mancini, 2008) ลักษณะของสิวแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ ได้แก่

2.1.1.1 สิวชนิดไม่อักเสบ เป็นสิวที่เกิดจากการอุดตันของรูขุมขนบนผิวหนังเรียกว่า Comedone (ductal hypercornification) มี 2 ชนิด คือ Closed Comedone มีลักษณะเป็นตุ่มกลม เล็ก แข็ง และมีสีขาวจะเห็นชัดขึ้นเมื่อดึงผิวหนังให้ตึงหรือเรียกว่า Whitehead ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (A) และ Open Comedone เป็นตุ่มกลม เล็ก แข็งคล้าย Closed Comedone แต่ตรงยอดมีรูเปิดและมีสีดำอยู่หรือเรียกว่า Blackhead ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (B) (นภดล นพคุณ และคณะ, ม.ป.ป.; Mancini, 2008; James, 2005)



รูปที่ 2.1 สิวชนิดไม่อักเสบ Closed Comedone (A) และ Open Comedon (B)

ที่มา: Mancini, 2008

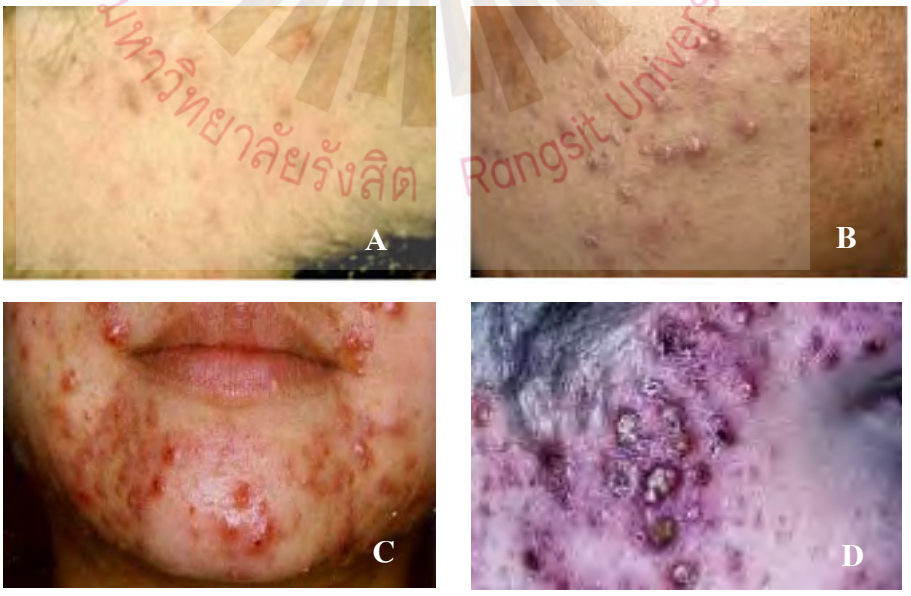
2.1.1.2 สิวชนิดอักเสบ (นภดล นพคุณ และคณะ, ม.ป.ป.)

1) papule ตุ่มสีแดงขนาดเล็ก

2) pustule ได้แก่ superficial และ deep pustule

3) nodule ก้อนสีแดงภายในมีหนองปนเลือด บางครั้งอาจเป็นหลายหัวติดกัน

4) cyst ก้อนนูนแดง นิ่ม ภายในมีหนองปนเลือด เมื่อสิวหายอาจจะเหลือร่องรอยได้หลายแบบ ได้แก่ รอยแดง รอยดำ หลุมแผลเป็น และแผลเป็นนูน ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 สิวชนิดอักเสบ papule (A), pustule (B), nodule (C) และ cyst (D)

ที่มา: Mancini, 2008

2.1.2 สาเหตุการเกิดสิว

สาเหตุหลักในการเกิดสิว คือการที่ร่างกายผลิตไขมันมากเกินไป เนื่องจากระดับฮอร์โมนที่สูงขึ้นในวัยแรกรุ่น (Archer, 2006; James, 2005) ไขมันจะอุดตันในรูขุมขน ทำให้รูขุมขนขยายและทำให้เกิดการอักเสบและบวมแดงขึ้นในผิวที่มีน้ำมันและสิ่งสกปรกสะสมอยู่บนผิว (Archer, 2006; Titus & Hodge, 2012) โดยปัจจัยต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดการผลิตไขมันมากเกินไป ได้แก่

2.1.2.1 ฮอร์โมน เกิดจากการผลิตฮอร์โมนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยฮอร์โมนที่สำคัญคือฮอร์โมนเทสโทสเทอโรน ซึ่งทำปฏิกิริยากับผิวในรูปแบบของ Dihydrotestosterone (DHT) (Jappe, 2003) จะทำให้ต่อมไขมันมีขนาดใหญ่ขึ้น ต่อมไขมันผลิตน้ำมันมากขึ้น รูขุมขนอุดตัน และนำไปสู่การเกิดสิว (Archer, 2006)

2.1.2.2 ฮอร์โมนในเพศหญิง เกิดจากร่างกายผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจนมากขึ้นเมื่อมีประจำเดือน ระดับความรุนแรงของสิวจะแตกต่างกันไปในแต่ละรอบเดือน (Archer, 2006)

2.1.2.3 แบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปบริเวณผิวหนัง และบริเวณผิวหนังที่เป็นสิวจะพบว่าเชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในวัยรุ่น นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่น *P. granulosum* และ *S. epidermidis* ได้ในผิวหนังของวัยรุ่นที่มีการผลิตน้ำมัน หรือไขมันในปริมาณมาก หรือในคนหน้ามัน (Archer, 2006) พบว่ามีจุลินทรีย์เพียง 3 สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดแผลสิว ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ Propionibacteria สายพันธุ์ Staphylococci และสายพันธุ์ Malassezia (Jappe, 2003) นอกจากนี้ยังมีสาเหตุอื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดสิว เช่น การใช้ยา การตั้งครรภ์ ความผิดปกติของต่อมไร้ท่อ และพันธุกรรม เป็นต้น (Archer, 2006)

2.1.3 การรักษาสิว

2.1.3.1 การรักษาเบื้องต้น (นภดล นพคุณ และคณะ, ม.ป.ป.) ในเบื้องต้นแพทย์ควรอธิบายถึงสาเหตุและปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดสิว จากนั้นแพทย์จึงทำการรักษาสิวจนอาการเริ่มดีขึ้นในเวลาประมาณ 2-3 เดือน และจะดีขึ้นมากในเวลา 4-8 เดือน นอกจากนี้แพทย์ควรแนะนำวิธีปฏิบัติระหว่างการรักษา เช่น การทำความสะอาดใบหน้า การหลีกเลี่ยงการใช้เครื่องสำอาง เป็นต้น

2.1.3.2 การรักษามาตรฐาน (first line treatment) แบ่งตามความรุนแรงของสิว (นภดล นพคุณ และคณะ, ม.ป.ป.; Titus & Hodge, 2012) คือ หากเป็นสิวเล็กน้อย (Mild Acne) อาจใช้เฉพาะยาทา เช่น Benzoyl Peroxide, Topical Isotretinoids, Clindamycin, Erythromycin, Salicylic Acid, Azelaic Acid และ Sulfur Resorcinol เป็นต้น โดยไม่ควรใช้ Clindamycin หรือ Erythromycin ทาอย่างเดียว เพราะมีความเสี่ยงต่อการเกิดเชื้อดื้อยา ควรใช้ร่วมกับ Benzoyl Peroxide หากเป็นสิวในระดับปานกลาง (Moderate Acne) ใช้ยาทาร่วมกับยารับประทาน โดยใช้ยาในกลุ่ม Tetracycline ในกรณีที่แพ้ยาในกลุ่ม Tetracycline ให้ใช้ Erythromycin แทน และหากเป็นสิวรุนแรง (Severe Acne) ควรปรึกษาแพทย์ผู้เชี่ยวชาญโรคผิวหนัง

2.1.3.3 การรักษาโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญโรคผิวหนัง (Second Line Treatment) (นภดล นพคุณ และคณะ, ม.ป.ป.; James, 2005) หากรักษาตามการรักษาวิธีมาตรฐานติดต่อกัน 2-3 เดือน แล้วไม่ได้ผลควรพิจารณาใช้ Second Line Drugs เช่น Co-trimoxazole (Sulfamethoxazole Trimethoprim), Dapsone, Amoxicillin, Isotretinoin และ Hormone ฯลฯ นอกจากนี้อาจมีวิธีการรักษาเสริม ได้แก่ Comedone Extraction, Intralesional Steroid, Laser Therapy, Light Therapy และ Cryotherapy

2.1.4 ยารักษาสิว ข้อควรระวัง และผลข้างเคียงจากการรักษา

2.1.4.1 Benzoyl Peroxide มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ที่พบในรูขุมขนต่อมไขมัน ยาออกฤทธิ์โดยปล่อยออกซิเจนอิสระออกมาเพื่อ Oxidise Protein ของเชื้อทำให้จำนวนเชื้อลดลง การใช้ยามีข้อควรระวังและผลข้างเคียง คือ ทำให้เกิดการระคายเคืองผิวหนัง ทำให้ผิวแห้งลอก ทำให้เกิด Allergic Contact Dermatitis ทำให้เป็นรอยด่างชั่วคราวได้ในบริเวณที่ทายา ถ้าทาบริเวณลำตัวควรใส่เสื้อผ้าสีขาว เพราะยาจะกัดสีเสื้อผ้าทำให้ด่างได้ และไม่ควรใช้ร่วมกับ Retinoic Acid

2.1.4.2 Topical Isotretinoids มีฤทธิ์ Comedolytic และลดการอักเสบ การใช้ยามีข้อควรระวังและผลข้างเคียง คือ ควรหลีกเลี่ยงการใช้ยานี้ในขณะตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร

2.1.4.3 Topical Antibiotics (Clindamycin และ Erythromycin) มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะ *P. acnes* รวมทั้งมีฤทธิ์ Antichemotaxis และ Anticomedogenic การใช้ยามีข้อควรระวังและผลข้างเคียง คือ อาการแดง ลอก และแสบ ๆ โดยเฉพาะรอบ ๆ ตา ไม่ควรใช้ Topical Antibiotics ตัว

เดียวติดต่อกันเป็นเวลานานเกิน 3-4 สัปดาห์ เพราะจะทำให้เกิดการดื้อยาได้ Clindamycin และ Erythromycin ให้ผลการรักษาที่มีความใกล้เคียงกัน clindamycin ค่อนข้างปลอดภัย แต่มีรายงานว่าทำให้เกิดโรคอุจจระร่วง และลำไส้ใหญ่อักเสบแต่อาการจะหายอย่างรวดเร็วหลังหยุดยา ส่วน erythromycin ไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองหรือการแพ้ ค่อนข้างปลอดภัย

2.1.4.4 Azelaic Acid ที่ความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *P. acnes* ช่วยลดการอักเสบและลดสิว การใช้ยามีข้อควรระวังและผลข้างเคียง คือ อาจมีอาการระคายเคือง แสบ แดงหรือหน้าลอก (นภดล นพคุณ และคณะ, ม.ป.ป.)

2.1.4.5 Tetracycline มีฤทธิ์เป็นยาต้านจุลินทรีย์ และลด Chemotaxis โดยยับยั้งการเจริญของ *P. acnes* ใน Microcomedones ไม่ได้ผลใน Open และ Closed Comedone เพราะไม่ใช่ Comedolytics แต่จะได้ผลในสิวอักเสบ โดยเฉพาะตุ่มหนอง การใช้ยามีข้อควรระวังและผลข้างเคียง คือไม่ควรรับประทานยาร่วมกับอาหารที่ลดปริมาณการดูดซึมของยา ได้แก่ นม วิตามินที่มีธาตุเหล็ก ยาเคลือบกระเพาะ และแคลเซียม การใช้ยาค่อนข้างปลอดภัยแม้จะใช้ติดต่อกันเป็นปี แต่ก็ควรตรวจผู้ป่วยทุก ๆ 3 เดือน การพิจารณาหยุดยาให้ดูจากอาการ ถ้าให้ยา 3-6 เดือนแล้วยังไม่ได้ผล ต้องเปลี่ยนวิธีการรักษา และสำหรับผู้ป่วยที่แพ้ Tetracycline อาจเปลี่ยนไปใช้ Erythromycin แทนได้

2.1.4.6 Erthromycin มีฤทธิ์เป็นยาต้านจุลินทรีย์ โดยยับยั้งการเจริญของ *P. acnes* ใน Micro-comedones ไม่ได้ผลใน Open และ Closed comedone เพราะไม่ใช่ Comedolytics แต่จะได้ผลในสิวอักเสบ โดยเฉพาะตุ่มหนอง การใช้ยามีข้อควรระวังและผลข้างเคียง คือถ้าให้ยา 3-6 เดือนแล้วยังไม่ได้ผล อาจต้องพิจารณาเปลี่ยนวิธีการรักษา

2.1.4.7 Isotretinoin (13-*cis*-retinoic Acid) มีฤทธิ์ลดขนาดต่อมไขมันและการผลิตไขมันบริเวณรูขุมขน ปริมาณไขมันที่ลดลงจะทำให้ภาวะแวดล้อมในรูขุมขนเปลี่ยนไป ปริมาณ *P. acnes* จึงลดลงด้วย การใช้ยามีข้อควรระวังและผลข้างเคียง คือ ห้ามใช้ในผู้ป่วยที่ตั้งครรภ์ ห้ามใช้กับผู้ที่แพ้ Paraben เมื่อให้ยานี้ในผู้ป่วยหญิงต้องให้คำแนะนำแก่ผู้ป่วยถึงการคุมกำเนิดเป็นอย่างดีในขณะที่ใช้ยาและหลังหยุดยาอย่างน้อย 1 เดือน มักอาการริมฝีปากอักเสบโดยเฉพาะผู้ป่วยที่ใช้ยาปริมาณมาก นอกจากนี้อาจทำให้ผิวแห้ง และทำให้ตาแห้ง (ระหว่างใช้ยานี้ควรงดใช้ Contact Lens)

2.1.4.8 Sulfamethoxazole Trimethoprim มีฤทธิ์เป็นยาต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยมีฤทธิ์

ยับยั้ง Bacterial Dihydrofolate Reductase ส่วนยา Sulfamethoxazole เป็น Competitive Inhibitor ของ *p*-Aminobenzoic Acid การใช้ยามีข้อควรระวังและผลข้างเคียง คือ ไม่ควรใช้เป็นยาตัวแรกในการรักษา เลือกใช้ในรายที่เป็นสิวมากจริง ๆ เนื่องจากมีผลข้างเคียงค่อนข้างรุนแรง ผลข้างเคียงจากยาปฏิชีวนะที่พบได้บ่อย คือ ผื่นคัน และตับอักเสบ

2.1.4.9 Sulfone (DADPS, DDS, Dapsone) มีฤทธิ์ยับยั้งการใช้ *p*-Aminobenzoic Acid ของเชื้อแบคทีเรีย ลดอาการอักเสบโดยลด Chemotaxis และ Stabilized Lysosome การใช้ยามีข้อควรระวังและผลข้างเคียง คือ ก่อนให้ยาควรเจาะตรวจโรคภาวะพร่องเอนไซม์ G-6PD และไม่ควรใช้เป็นยาตัวแรกในการรักษา เลือกใช้ในรายที่เป็นสิวมากจริง ๆ เนื่องจากผลข้างเคียงค่อนข้างรุนแรง

2.1.4.10 ยาประเภทฮอร์โมน ยาเม็ดคุมกำเนิดชนิดฮอร์โมนรวม มีฤทธิ์เพิ่มระดับของ Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) ทำให้ระดับของ Free Testosterone ลดลง กดการสร้าง Androgen จากรังไข่ และโปรเจสโตเจน ที่มีฤทธิ์ Anti-androgen สามารถ Block Androgen Receptor การใช้ยามีข้อควรระวังและผลข้างเคียง คือ อาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน น้ำหนักตัวเปลี่ยนแปลง เจ็บคัดตึงเต้านม เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารคัดหลั่งจากช่องคลอด เป็นต้น อาการดังกล่าวอาจเกิดขึ้นได้ใน 2-3 เดือนแรกที่ใช้ยา และมักจะลดลงเมื่อใช้ยานานขึ้น สำหรับผู้ป่วยที่ไม่คุ้นเคยการรักษาด้วยยาเม็ดคุมกำเนิด ควรปรึกษาแพทย์เฉพาะทางสูตินรีเวชวิทยา (นภดล นพคุณ และคณะ, ม.ป.ป.)

2.2 *Staphylococcus epidermidis*

2.2.1 ลักษณะทั่วไปของ *S. epidermidis*

S. epidermidis เป็นแบคทีเรียใน Family Staphylococcaceae และจัดอยู่ใน Genus *Staphylococcus* ซึ่งมีทั้งหมด 32 species โดยส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อก่อโรค หรือเป็นเชื้อ Commensals โดยเชื้อแบคทีเรียใน Genus นี้มีทั้งชนิด Aerobe และ Facultative Anaerobe เชื้อเป็น Catalase Positive และ Oxidase Negative และมักพบเซลล์อยู่กันเป็นกลุ่ม คู่ หรือ 4 เซลล์ (Parija, 2012) *S. epidermidis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม จัดเรียงตัวคล้ายพวงองุ่น สาเหตุที่เชื้อมีลักษณะคล้ายพวงองุ่นเนื่องจากการแยกเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ของเซลล์ลูกเมื่อเกิดการแบ่งตัวของเชื้อ โดยส่วนใหญ่จะพบเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง แต่เมื่อเชื้อเจริญเติบโตในอาหารเหลว มักจะพบการเรียงตัวเป็นสายโซ่สั้น ๆ และเมื่อเสมียร์เชื้ออาจพบการเรียงตัวได้หลายลักษณะ ทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นกลุ่ม เป็น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เซลล์คู่ และเป็นกลุ่ม 3 หรือ 4 เซลล์ (Parija, 2012) เคลื่อนที่ไม่ได้ ไม่สร้างสปอร์ เป็น Facultative Anaerobe ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน โดยจะเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-42 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 37 องศาเซลเซียส เจริญได้ที่ pH 7.4-7.6 โดยเจริญได้ดีที่ pH 7 และสร้างโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Parija, 2012) เชื้อจะมีทั้งกลุ่มที่เป็น Coagulase-positive *S. epidermidis* และ Coagulase-negative *S. epidermidis* แต่กลุ่มที่มีความสำคัญในการก่อโรคคือ Coagulase-negative *S. epidermidis* (Namvar et al., 2014)

S. epidermidis เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal Microbiota) ที่สำคัญบริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกของมนุษย์ (Namvar et al., 2014) โดยเป็นสายพันธุ์หนึ่งที่คัดแยกได้มากที่สุดจากเยื่อบุผิวหนังมนุษย์ ส่วนใหญ่พบมากบริเวณรักแร้ ศีรษะ เชื้อมีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ของมนุษย์ และมีความทนทานต่อสภาวะความเข้มข้นของเกลือสูง ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการดำรงชีวิตเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นบริเวณผิวหนังมนุษย์ (Granslo et al., 2010) โดยทั่วไปจุลินทรีย์ประจำถิ่นจะเจริญเติบโตได้โดยอาศัยน้ำ กรดอะมิโน เกลือแร่ กรดไขมันจากต่อมเหงื่อและต่อมไขมันจากผิวหนัง ในต่อมไขมันลึกลงไปมีจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนและใช้ไขมันเป็นอาหาร ซึ่งปกติจะไม่เป็นอันตราย แต่ก็พบว่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดสิว (ธีระ ปานทิพย์อำพร, 2551) โดยสามารถคัดแยก *S. epidermidis* ได้ 10-24 สายพันธุ์ จากผิวหนังคนทั่วไป การเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* บนผิวหนังจะขึ้นอยู่กับสภาพของผิวหนัง หากผิวและเยื่อเมือกมีสุขภาพดีจะทำให้เชื้อมีการเจริญได้อย่างดี เนื่องจากสุขภาพของผิวและความชื้นของผิวที่แตกต่างกัน สารอาหาร ค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิ เชื้อต้องปรับตัวให้เหมาะสมกับความหลากหลายของสภาพแวดล้อม เพื่อให้สามารถอาศัยอยู่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในผิวและเยื่อเมือกของมนุษย์ได้และไม่ก่อโรค (Fey, 2014)

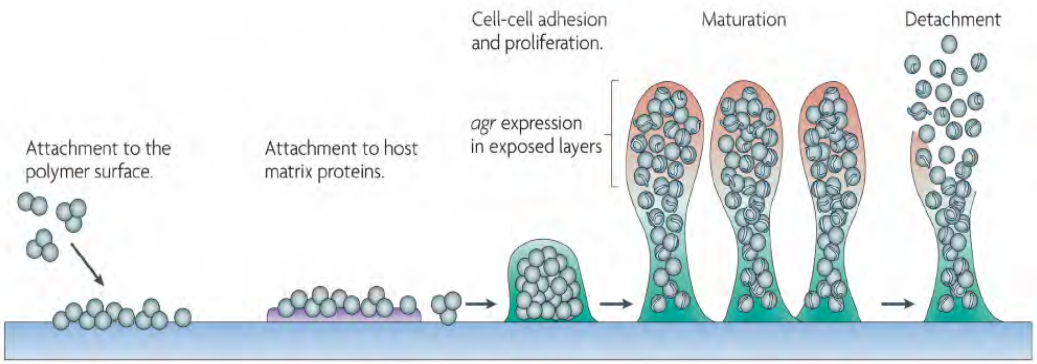
2.2.2 Virulence Factor ของเชื้อ *S. epidermidis*

Virulence factor ของเชื้อ *S. epidermidis* มีรูปแบบแตกต่างกัน เช่น ความรุนแรงและความสามารถของเชื้อโรคที่จะลดประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของเซลล์โฮสต์ หรือความสามารถของเชื้อในการทำให้เกิดการติดเชื้อและก่อให้เกิดโรคในโฮสต์ โดยปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของเชื้อ ได้แก่ การหลีกเลี่ยงภูมิคุ้มกัน การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การยึดเกาะของเชื้อบนโฮสต์ หรือปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่โฮสต์ โดยทั่วไป *S. epidermidis* มี Virulence Factor ไม่กี่แบบที่ทำให้เกิดความเสียหายโดยตรงต่อเซลล์โฮสต์ จึงต้องปรับระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์เพื่อป้องกันการติดเชื้ออย่างถาวร (Granslo et al., 2010)

2.2.2.1 ไบโอฟิล์ม

ไบโอฟิล์ม คือ เซลล์ของเชื้อที่มีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มและเพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยลักษณะทางสรีระวิทยาและโครงสร้างพื้นฐานของไบโอฟิล์มจะมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและหลบหลีกกลไกการป้องกันของโฮสต์ นอกจากนี้เชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนให้เหมาะสำหรับสร้างไบโอฟิล์ม (Otto, 2009) ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มเป็นหนึ่งใน Virulence Factor ของเชื้อ *S. epidermidis* (Saising, Singdam, Ongsakul, & Voravuthikulchai, 2012) เชื้อ *S. epidermidis* จะสร้างไบโอฟิล์มเพื่อให้อยู่รอดในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ เช่น ในสภาวะที่ออกซิเจนหรือไอออน (Fe) มีจำกัด โดยบริเวณที่เชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์ม เช่น ในเนื้อเยื่อหรือเลือด (Gotz, 2002) ซึ่งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* เป็นกลไกที่สำคัญที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ

การสร้างไบโอฟิล์มเริ่มจาก เชื้อมีการยึดเกาะกับพื้นผิว เช่น ผิวหนัง พลาสติก และอุปกรณ์ทางการแพทย์ เป็นต้น เชื้อที่ยึดติดอยู่กับอุปกรณ์ทางการแพทย์และพื้นผิวของวัสดุจะเข้าสู่ร่างกายหลังจากที่สัมผัสหรือสอดใส่เข้าไปในร่างกายในระหว่างการรับการรักษา (Fey, 2014; O'Gara & Humphreys, 2001) จากนั้น Exopolysaccharide, Specific Proteins และ Accessory Macromolecules จะทำให้เกิดการรวมตัวกันระหว่างเซลล์เป็นโครงสร้างเซลล์ ดังนั้นการพัฒนาของไบโอฟิล์มจะมีการแพร่กระจายไปบนพื้นผิว โดยมีการทำงานร่วมกันของแต่ละเซลล์ของเชื้อ และมีการสร้าง Extracellular Biofilm Matrix ซึ่งเป็นช่องทางที่ลำเลียงสารอาหารไปยังเซลล์ไบโอฟิล์ม ทำให้ไบโอฟิล์มเพิ่มจำนวนขึ้น เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว (Maturation) จะเกิดการปลดปล่อยเซลล์ออกมา (Detachment) เป็นเซลล์เดี่ยว (Single Cells) หรือเซลล์กลุ่ม (Cell Cluster) โดยรูปที่ 2.3 แสดงกลไกการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อซึ่งจะนำไปสู่การแพร่กระจายของเชื้อ (Otto, 2009)



รูปที่ 2.3 กลไกการสร้างไบโอฟิลม์ของ *S. epidermidis*

ที่มา: Otto, 2009

ความแตกต่างระหว่างไบโอฟิล์มแบบบางและแบบหนา คือ ไบโอฟิล์มแบบบาง จะมีความหนาแน่นเฉลี่ยประมาณ 3.5 log CFU/ตารางเซนติเมตร ส่วนไบโอฟิล์มแบบหนา จะมีความหนาแน่นเฉลี่ยประมาณ 7.6 log CFU/ตารางเซนติเมตร (Mah & O'Toole, 2001)

การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ถูกกระตุ้นด้วยแอลกอฮอล์ จากการทดสอบผลของแอลกอฮอล์ 3 ชนิด ต่อการสร้างไบโอฟิล์ม ได้แก่ 6% ethanol, 4% propanol และ 6% isopropanol พบว่าเชื้อ *S. epidermidis* 18 สายพันธุ์ จาก 37 สายพันธุ์สร้างไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้น จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแอลกอฮอล์มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์ม (Knobloch, Horstkotte, Rohde, Kaulfers, & Mack, 2002) โดยทั่วไปเชื้อ *S. epidermidis* จะเป็นแบคทีเรียที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ แต่เมื่อเชื้อสร้างไบโอฟิล์มพบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตได้มากขึ้น เนื่องจากการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสามารถปกป้องเซลล์ของเชื้อจากการถูกทำลายโดยยาปฏิชีวนะได้ (Mah & O'Toole, 2001)

2.2.2.2 เอนไซม์ Lipase และ Protease

แบคทีเรีย *Staphylococcus* sp. มีการสร้าง Extracellular Enzyme ได้แก่ Protease, Lipase, Cellulase, Xylanase, Amylase, Laccase, Urease, DNase และ Pectinase (Costa et al., 2013; Appak, 2006) เอนไซม์เหล่านี้มีผลในการทำลายเนื้อเยื่อของเซลล์โฮสต์ มีผลต่อกลไกการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้เอนไซม์ Lipase และ Protease ยังมีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตและแพร่กระจ่ายของเชื้อ (Costa et al., 2013) ซึ่ง Lipase และ Protease เป็น Exoproteins ที่มีความสำคัญต่อความรุนแรงของเชื้อ *S. epidermidis* ในการก่อโรคในเซลล์โฮสต์ (Vuong, Gotz, & Otto, 2000)

1) lipase เป็นเอนไซม์ที่เชื้อ *S. epidermidis* สร้างขึ้นมากที่สุด ด้วยกระบวนการ Lipotic activity ของเชื้อ โดยเอนไซม์ Lipase จะกระตุ้นทั้งการย่อยสลายและการสังเคราะห์สารพวก Esters จากกลีเซอรอลและ Long-chain Fatty Acid นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มว่าเชื้อจะมีการหลั่งไขมันในขณะที่อาศัยอยู่บนผิวหนังของเซลล์โฮสต์ เมื่อระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์โฮสต์อ่อนแอลงเชื้อจะเป็นเชื้อฉวยโอกาสและเกิดภาวะการติดเชื้อ โดยไขมันที่เกิดจากเอนไซม์ Lipase จะเป็นแหล่งอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเชื้อบนผิวหนังของเซลล์โฮสต์ (Appak, 2006) โดยเชื้อ *S. epidermidis* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Lipase ซึ่งมีส่วนทำให้เกิดสิว (Males, Rogers, & Parisi, 1975)

2) Protease เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวมีผลต่อกระบวนการก่อโรคในเซลล์โฮสต์ โดยมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Plasma Protease ของเซลล์โฮสต์ ซึ่งจะทำให้เนื้อเยื่อของเซลล์โฮสต์ถูกทำลาย เอนไซม์ Protease แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ Exopeptidases เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะเปปไทด์ของอะมิโนหรือหมู่คาร์บอกซิล บริเวณใกล้กับส่วนปลายของสารตั้งต้น และ Endopeptidases เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะเปปไทด์ของอะมิโนหรือหมู่คาร์บอกซิล บริเวณไกลจากส่วนปลายของสารตั้งต้น เอนไซม์ Protease สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 4 ชนิด ตามกลไกการทำงาน ได้แก่ Serine Proteases, Aspartic Proteases, Cycteine Proteases และ Metalloproteases (Appak, 2006)

2.2.3 การดื้อยาของ *S. epidermidis*

2.2.3.1 การดื้อยาของ methicillin-resistant *S. epidermidis* (MRSE)

เชื้อ MRSE มักจะคัดแยกได้จากผิวหนังมนุษย์ และเกิดจากกลุ่มเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่บนอุปกรณ์การแพทย์เข้าสู่เซลล์โฮสต์ เชื้อที่อยู่บนอุปกรณ์การแพทย์ 53.3 เปอร์เซ็นต์ เป็น MRSE ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ และเชื้อ 17 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการก่อโรคได้สูงขึ้นเมื่อสร้างไบโอฟิล์ม อย่างไรก็ตาม การวินิจฉัยการติดเชื้อ MRSE ในปัจจุบันใช้วิธีการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อซึ่งต้องใช้เวลานาน และการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ มีความแม่นยำต่ำ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาการวินิจฉัยให้มีความถูกต้องและปฏิบัติได้ง่ายยิ่งขึ้น ในการคัดแยกเชื้อ *S. epidermidis* ที่ดื้อต่อ Methicillin สำหรับรักษาจะทำได้ยาก เนื่องจากจะดื้อต่อยาหลายชนิด และอาจทำให้มีอัตราการเสียชีวิตที่สูงขึ้น จึงมีการนำยา Vancomycin มาใช้แทนยาในกลุ่ม Beta-lactam เพื่อการป้องกันการติดเชื้อ ซึ่งอาจช่วยลดปัญหาการเกิดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาได้ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการใช้ยากลุ่ม Glycopeptides (เช่น ยา Vancomycin) กับกลุ่ม Beta-lactams (ส่วนใหญ่เป็นยา Cefazolin) ยา Vancomycin มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อ MRSE ได้ดีกว่ายาใน Cefazolin และเหมาะสำหรับในกรณีที่แพ้ยากลุ่ม Beta-lactam อย่างรุนแรงแนะนำให้ใช้ยา Vancomycin ในขนาด 1-1.5 กรัม ทางเส้นเลือดดำอย่างช้า ๆ เช่น 1 ชั่วโมง (ธนะพันธ์ พิบูลย์บรรณกิจ, 2552)

2.2.2.3 การดื้อยาของเชื้อ *S. epidermidis*

ยาปฏิชีวนะ Methicillin เป็นยาปฏิชีวนะชนิดแรกที่นิยมเลือกใช้ในการ

รักษาโรคติดเชื้อ *S. epidermidis* 75-90 เปอร์เซ็นต์ ที่คัดแยกได้ในโรงพยาบาล แต่ในปัจจุบันมีการพัฒนาของเชื้อ *S. epidermidis* ที่ดื้อต่อยา Methicillin นอกจากนี้ *S. epidermidis* สายพันธุ์ที่ดื้อยา Methicillin จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะอื่น ๆ เช่น Rifamycin, Flouroquinolones, Gentamicin, Tetracycline, Chloramphenicol, Erythromycin, Clindamycin และ Sulfonamides และสามารถดื้อต่อ Streptogramins, Linezolid และ Tigecycline เล็กน้อย แม้จะมีการต่อต้านการ Methicillin และยาปฏิชีวนะอื่น ๆ โดยพบว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ของ *S. epidermidis* ที่ติดเชื้อรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะ เช่น Vancomycin แต่การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของยาปฏิชีวนะ Vancomycin ลดลง (Otto, 2009) นอกจากนี้ในรายงานนี้พบเชื้อ *S. epidermidis* ดื้อต่อยา Clindamycin และ Erythromycin ถึงร้อยละ 40 ส่วนเชื้อ *S. epidermidis* ที่เป็นเชื้อประจำถิ่น ในบางคนอาจจะเป็นเชื้อก่อโรคร่วมในคนที่เป็นโพรงอากาศข้างจมูกอักเสบได้ โดยการพบเชื้อที่ดื้อยาสูงนั้นอาจเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างไม่ใช้ยาปฏิชีวนะที่เจาะจงกับเชื้อ ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยา (จอมพล ตันตระวรศิลป์, 2550)

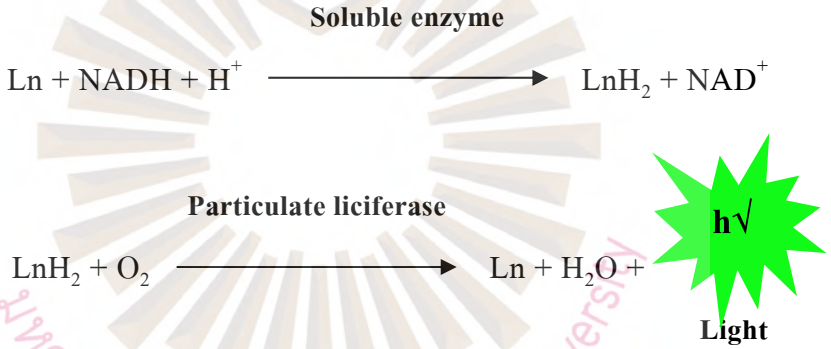
2.3 เห็ดเรืองแสง

เห็ดเรืองแสงเป็นเห็ดที่มีการเรืองแสงให้เห็นด้วยตาเปล่าในเวลากลางคืน โดยเกิดจากกระบวนการทางชีวภาพที่เรียกว่า Bioluminescence (Bondar et al., 2012) ในปัจจุบันมีการค้นพบเห็ดเรืองแสงประมาณ 80 สายพันธุ์ และพบได้ในหลายทวีปทั่วโลก (Desjardin et al., 2007; Vydryakova, Van, Shoukouhi, Psurtseva, & Bissett, 2011) การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับเห็ดเรืองแสงมีมานานหลายปี โดยศึกษาใน 3 ด้านหลัก ๆ ได้แก่ การพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสงภายในห้องปฏิบัติการ การศึกษาระบบกลไกการเรืองแสงของเห็ดเรืองแสง และการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารเรืองแสงของเห็ดเรืองแสงมาใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ (Bondar et al., 2012; Shimomura, 2006)

เห็ดบางชนิดสามารถเรืองแสงได้เช่นเดียวกับพืชและสัตว์บางชนิด แต่กลไกการเรืองแสงของเห็ดเรืองแสงมีความซับซ้อนมากกว่าการเรืองแสงของพืชและสัตว์ (Bondar et al., 2012) การศึกษากลไกการเรืองแสงของเห็ดเรืองแสงมีมานานนับร้อยปี แต่มีข้อสังเกตว่ากลไกการเรืองแสงของเห็ดเรืองแสงแตกต่างจากแบคทีเรียและสัตว์หลายชนิด (Shimomura, 2006) โดยมีผู้เชี่ยวชาญให้ความเห็นว่าการเรืองแสงของเห็ดเรืองแสงเป็นกลไกในระดับโมเลกุลของเซลล์ในราชั้นสูง มีการสันนิษฐานเกี่ยวกับแนวคิดของการเรืองแสงเป็น 2 แนวคิด คือ Luciferase-luciferin System และการเกิดออกซิเดชั่น

ของ Organic Substrates ซึ่งคาดว่าเกิดขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์เฉพาะในการเกิดปฏิกิริยา แต่นักวิจัยค้นพบว่ามีเอนไซม์เฉพาะ (Luciferase) เกิดขึ้นในแนวคิดที่ 2 นักวิจัยต่างให้ความสนใจ แนวคิด

Luciferase-luciferin System และการศึกษาทดลองเกี่ยวกับเอนไซม์เฉพาะ Luciferase แต่การศึกษาค้นคว้าก็ไม่ประสบผลสำเร็จ จนกระทั่ง Airth และ McElroy สามารถสกัดสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงได้สำเร็จ และได้บันทึกไว้ว่า เนื่องจากเอนไซม์ Luciferase ในสารสกัดมีความเข้มข้นต่ำ จึงทำให้การทดลองที่ผ่านมาไม่ประสบผลสำเร็จ ต่อมา Airth และ Foerster ได้ศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับปฏิกิริยา Luciferin-luciferase โดยเตรียม Luciferin จากเห็ดสายพันธุ์ *Armillaria mellea* และ Luciferase จากเห็ด *Collybia velutipes* และนำเสนอรูปแบบการเกิดปฏิกิริยา Luciferin-luciferase ในการเรืองแสงของเห็ดโดยปฏิกิริยาดังกล่าวมี 2 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (Bondar et al., 2012; Shimomura, 2006)



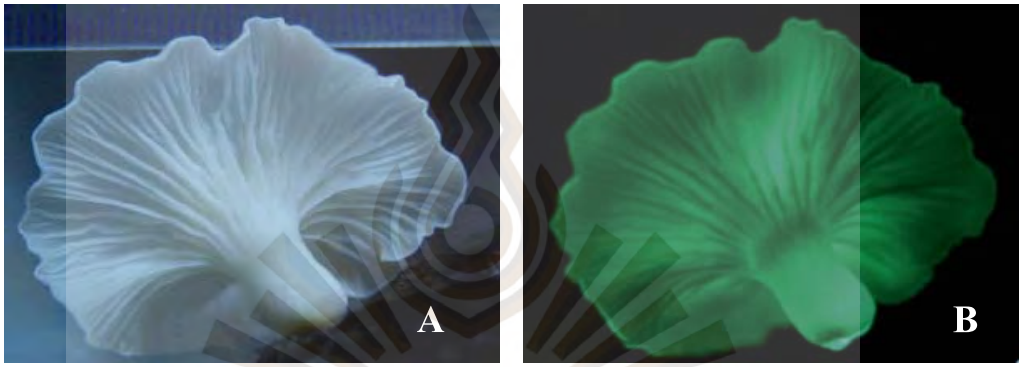
รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาการเรืองแสงของเห็ดเรืองแสง
ที่มา: Bondar et al., 2012; Shimomura, 2006

ในแต่ละขั้นตอนของวงจรชีวิตของเห็ดเรืองแสง จะมีการเรืองแสงสีเขียวในช่วงความยาวคลื่น 520-530 นาโนเมตร โดยเห็ดเรืองแสงที่มีอายุน้อยจะเรืองแสงได้สว่างกว่าเห็ดเรืองแสงที่มีอายุมาก และการเรืองแสงของดอกเห็ดแต่ละสายพันธุ์ก็จะมีความสว่างแตกต่างกัน (Bondar et al., 2012)

2.3.1 *Neonothopanus nambi*

เห็ดเรืองแสงสายพันธุ์ *Neonothopanus nambi* ในประเทศไทยมีการรายงานครั้งแรกว่าพบในเขตโคกภูตากา อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น ซึ่งเป็นพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (Bua-art et al., 2011) เห็ดเรืองแสงสายพันธุ์นี้

มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับเห็ดนางรม การเจริญจะเจริญเป็นกลุ่ม ๆ ละ 4-5 ดอก ซึ่งปกติจะเจริญบนขอนไม้ หรือไม้ที่ตายแล้ว (สุรีย์พร บัวอาจ, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และสมเดช กนกเมธากุล 2552; Bua-art et al., 2010) ลักษณะดอกเห็ดในช่วงเวลากลางวัน คือมีครีบและหมวกเห็ดสีขาว มีก้านสั้น ส่วนลักษณะในเวลากลางคืน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงคืนมืดหรือในห้องมืด เห็ดจะเรืองแสง โดยจะเห็นแสงสีเขียวอมเหลืองเปล่งออกมาบริเวณรอบ ๆ ครีบเห็ดและก้านของเห็ด ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ซึ่งสามารถมองเห็นได้ในระยะไกลประมาณ 10-20 เมตร (Kanokmedhakul et. al., 2012)



รูปที่ 2.5 ลักษณะของเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ในที่สว่าง (A) และที่มืด (B)
ที่มา: Vydryakova et al., 2011

เห็ดเรืองแสงที่พบในเขตโคกภูตากา มีการรายงานเบื้องต้นโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน rDNA เทียบกับฐานข้อมูลของธนาคารยีน (GenBank) ซึ่งในขณะนั้นได้รายงานว่าเป็นเห็ดในสกุล *Omphalotus* sp. ต่อมาได้พบเห็ดที่มีลักษณะคล้ายกันกับเห็ดที่พบในเขตโคกภูตากาในบริเวณมหาวิทยาลัยขอนแก่น และได้ศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ rDNA กับฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าเป็นเห็ดในสกุล *Omphalotus* sp. เช่นเดียวกัน แต่หลังจากที่ได้ศึกษาลำดับ นิวคลีโอไทด์ใน rRNA Gene พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ด *N. nambi* โดยมีค่าความเหมือน (similarity) ในระดับ 94 เปอร์เซ็นต์ ประกอบกับเมื่อเปรียบเทียบลักษณะรูปร่าง และสีของดอก และข้อมูลจากผู้เชี่ยวชาญด้านเห็ดเรืองแสง จึงสรุปได้ว่าเห็ดเรืองแสงสายพันธุ์ดังกล่าวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Neonothopanus nambi* (สุรีย์พร บัวอาจ และคณะ, 2552)

จากการทดลองของ Bondar et al. (2009) พบว่าการเรืองแสงของเห็ดเรืองแสงแต่ละสายพันธุ์จะอยู่ในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน โดยเห็ดเรืองแสง *N. nambi* มีการเรืองแสงอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 480-630 นาโนเมตร (Bondar et al., 2012)

2.3.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดเรืองแสง *N. nambi*

แม้ว่าเห็ดเรืองแสงสายพันธุ์นี้จะเป็นเห็ดพิษ แต่ในปัจจุบันนักวิจัยมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดสายพันธุ์นี้เพิ่มมากขึ้น ได้แก่

2.3.2.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดเรืองแสง *N. nambi*

อรรถเวช กองนักวงษ์, วชิราภา ประวันนา และศุภวัฒน์ พรหมแสง (2557) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเห็ดเรืองแสง *N. nambi* โดยการเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) จากนั้นสกัดส่วนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยเห็ดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ Hexane, Dichloromethane และ Ethyl Acetate นำส่วนสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Dichloromethane จากน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งมีปริมาณมากและเห็นการแยกของสารได้ชัดเจนในการวิเคราะห์ด้วยรงควัตถุผิวบาง (TLC) มาแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟีต่าง ๆ จากการวิเคราะห์ TLC Chromatogram คาดว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้จำนวน 4 สาร (F2431, F2432, F2442 และ F24511) และกำลังบันทึกข้อมูล ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารทั้ง 4 ชนิด เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีต่อไป (อรรถเวช กองนักวงษ์ และคณะ, 2557) ส่วน Kanokmedhakul et al. (2012)ได้คัดแยกสารพิษในกลุ่ม Sesquiterpenes (C_{15}) ของเห็ดเรืองแสง *N. nambi* โดยการนำสารบริสุทธิ์ที่คัดแยกจากเห็ดเรืองแสง จำนวน 2 ไอโซเลท (PW1 และPW2) ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารด้วยวิธีการทางเคมี และแปลผลด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี โดยใช้ Infrared Spectroscopy (IR), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR), Mass Spectroscopy (MS) และ X-ray Crystallography ซึ่งจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารออกฤทธิ์นี้ พบสารทั้งหมด 7 สาร คือสารชนิดใหม่ในกลุ่ม Aristolane Sesquiterpenes ได้แก่ Nambinone A, Nambinone B, Nambinone C และ 1-*epi*-nambinone B สารชนิดใหม่ในกลุ่ม Sesquiterpenes ได้แก่ Nambinone D และสารในกลุ่ม Dimeric Sesquiterpenes ได้แก่ Aurisin A และ Aurisin K (Kanokmedhakul et al., 2012)

นอกจากนี้มีการประเมินคุณภาพเห็ดเรืองแสง *N. nambi* โดยณิชากร ศรีพุ่มบาง และมาณิภา ไพนรินทร์ (2557)ได้ศึกษาลักษณะของเส้นใยเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีองค์ประกอบหลักเป็นเซลล์แบบไม่มีผนังกั้น การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของเส้นใย พบว่าปริมาณเถ้ารวม ปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ Ethanol และปริมาณสารสกัดด้วยน้ำอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน แต่ความชื้นไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน จากการทำ

การวิเคราะห์ด้วยรงควัตถุผิวบาง (TLC) และการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัด Hexane, Dichloromethane, Ethyl Acetate และน้ำจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อ พบสารกลุ่มคาร์ดิแอกไกลโคไซด์และแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ทั้งในเส้นใยและน้ำเลี้ยง แต่ไม่พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในส่วนของเส้นใย และยังพบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ สเตียรอยด์ และเทอร์ปีนในการวิเคราะห์ด้วยรงควัตถุผิวบาง (TLC) (ฉิชากร ศรีพุ่มบาง และมาณิภา ไพนรินทร์, 2557)

2.3.2.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ในการต้านจุลินทรีย์

Kanokmedhakul et al. (2012) ศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์จำนวน 7 สารที่แยกได้จากเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ต่อการต้านเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคมาลาเรีย และเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรควัณโรค โดยทดลองด้วยวิธี Microculture Radioisotope Technique พบว่าสาร Aurisin A และ Aurisin K มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. falciparum* และนำสารที่คัดแยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยวิธี Micro Plate Alamar Blue Assay (MPBA) พบว่าสาร aurisin A และ aurisin K มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *M. tuberculosis* (Kanokmedhakul et al., 2012) นอกจากนี้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* ของสารสกัดเห็ดเรืองแสง *N. nambi* โดยทำการสกัดสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงและทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* ที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว นำสารสกัดที่สกัดได้มาทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) พบว่าสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ต้าน *S. epidermidis* ได้ดีกว่าสารสกัดในเส้นใยเห็ดเรืองแสง โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 4-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และยังพบว่าสารสกัดทั้งหมด ทั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยเห็ดเรืองแสงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase ของเชื้อ *S. epidermidis* (เหมือนฝัน ซื่อตรง, ฐานิกา กระจ่างฉาย และรัตนาภรณ์ เทพธวัช, 2557) ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* ด้วยวิธี TLC Autobiography Assay พบว่าสารสกัดในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* โดยเกิด Clear Zone ตามการเคลื่อนที่ของสาร (สุกัญญา ผิวดำ, ปาอีซะ เจะหลง และสุนิสา เกื้อชาติ, 2558) และยังพบว่ามีการคัดแยกเชื้อรา *Microsporum gypseum* MU-SH4 จากผู้ป่วย เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อของสารสกัดเห็ดเรืองแสง *N. nambi* โดยการนำสารสกัดมาหาค่า MIC และค่า Minimum Fungidal Concentration (MFC) ด้วยวิธี Broth Microdilution พบว่าสารสกัดเห็ดเรืองแสงที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย Dichloromethane สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคได้ดี โดยมีค่า MIC เท่ากับ 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และมีค่า MFC มากกว่า 1,024 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (วันเพ็ญ นิจศรีวงษ์ และสุภศจี แฟงรัก, 2557) ส่วนการศึกษา

ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ของสารสกัดเห็ดเรืองแสง *N. nambi* เมื่อทดสอบฤทธิ์โดยการนำสารสกัดมาหาค่า MIC และ MBC พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์มน้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* โดยเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์มน้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดในส่วนเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* (ดีรยา มูลทองชุน, จินต์ศุจี รักขิตพินิจดุลย์ และอิศราภรณ์ วุฒิหิรัญวิทย์, 2557) ส่วนการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* โดยการหาค่า MIC และค่า MBC ด้วยวิธี Broth Microdilution ของชนนาถ เจริญบุญญาฤทธิ์ และคณะ พบว่าสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane ยับยั้ง *E. coli* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 256 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าสารสกัดเห็ดเรืองแสงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ในระดับปานกลาง ควรทำสารสกัดให้บริสุทธิ์ อาจทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือหาตัวนำสารติดกับสารเข้าสู่เซลล์ *E. coli* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ (ชนนาถ เจริญบุญญาฤทธิ์, รัฏภรณ์ พรมแก้ว และอมลรดาณี สุวีระ, 2557)

2.3.2.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ในการยับยั้งศัตรูพืช

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศของเห็ดเรืองแสง *N. nambi* เนื่องจากไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* เป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญที่สร้างความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจทั่วโลก รวมถึงมะเขือเทศ พืชที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปมเข้าทำลายจะมีอาการรากบวมเป็นปุ่มปม ทำให้รากพืชไม่สามารถดูดน้ำและอาหารไปใช้ได้ ส่งผลให้พืชแคระแกร็น เหี่ยวง่าย ใบเหลือง ผลผลิตลดลง และทำให้ต้นล้ม หรือตายได้ถ้าถูกทำลายในระยะต้นกล้า (วีรวัตร นามานุศาสตร์ และคณะ, 2556) ทางผู้วิจัยได้นำประโยชน์จากความเป็นพิษของเห็ดเรืองแสงมาใช้ในการควบคุมโรครากปมในมะเขือเทศ โดยเฉพาะใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นสาเหตุโรคพืช (วีรวัตร นามานุศาสตร์ และวีรศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, 2554) นอกจากนี้ยังพบการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราโรคพืชของสาร Aurisin A ที่สกัดได้จากเห็ดเรืองแสง *N. nambi* โดยทดสอบฤทธิ์ของสาร Aurisin A ที่สกัดได้จากเห็ดเรืองแสงต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Phytophthora parasitica*, *P. palmivora*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhyzoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* และ *Sclerotium rolfsii* พบว่าสาร Aurisin A ที่ความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 500 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช *P. parasitica*, *P. palmivora* และ *P. aphanidermatum* ที่ระดับความเข้มข้นของสาร Aurisin A 500 มิลลิกรัม/ลิตร (Bua-art et al., 2011) แต่การใช้สาร Aurisin A ไปควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศอาจ

มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมายและจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อพืช ได้แก่ ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (*Steinernema carpocapsae*) เชื้อราที่ใช้ทำปุ๋ยหมัก (*Aspergillus* sp.) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderm*a spp., *Bacillus subtilis* และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (*Rhizobium* sp.) พบว่าสาร aurisin A ไม่มีผลต่อการตายของ *S. carpocapsae* และจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ *Aspergillus* sp., *Trichoderm*a spp., *B. subtilis* และ *Rhizobium* sp. เมื่อครบ 260 ชั่วโมง (สุรีย์พร บัวอาจ, 2554) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงแนวทางการนำสาร Aurisin A ที่สกัดจากเห็ดเรืองแสง (*N. nambi*) ไปใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตบางชนิดและจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อพืช (สุรีย์พร บัวอาจ และคณะ, 2552) และยังมีการศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าไรไข่ปลา (*Luciaphorus perniciosus* Rack) ของเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ทำการทดสอบโดยเตรียมส่วนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสง แล้วนำสารละลายความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของส่วนสกัดหยาบไปทดสอบกับไรไข่ปลาเพศเมียจำนวน 100 ตัว ที่เพาะเลี้ยงบนเส้นใยเห็ดหูหนูด้วยการพ่น พบว่าส่วนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยเห็ดเรืองแสงมีฤทธิ์ในการฆ่าไรได้สูงถึง 90-100 เปอร์เซ็นต์ (คันธรส วิชัยดิษฐ, ปาริสา แตงบุตร และสุชาวดี กุฎีรัตน์, 2557)

2.3.2.4 การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ในการต้านมะเร็งและต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของเห็ดเรืองแสง *N. nambi* โดยการนำสารบริสุทธิ์จำนวน 7 สาร ได้แก่ Nambinone A, Nambinone B, Nambinone C, 1-*epi*-Nambinone B, Nambinone D, Aurisin A และ Aurisin K ที่คัดแยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง โดยวิธี Colorimetric Method พบว่าสาร nambinone C, aurisin A และ aurisin K มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอด และนอกจากนี้ยังพบว่าสาร Aurisin A และ Aurisin K มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (Kanokmedhakul et al., 2012)

นอกจากนี้ยังพบการศึกษาความเป็นพิษเบื้องต้นต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง MCF-7, HeLa และ Colo205 ของเห็ดเรืองแสง *N. nambi* เมื่อทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยเห็ดเรืองแสงมาทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นโดยวิธี MTT Assay พบว่าสารสกัดหยาบมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Dichloromethane และ Ethyl Acetate ในน้ำเลี้ยงเชื้อมีความเป็นพิษสูงสุดในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 และ Colo205 ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Dichloromethane และ Ethyl Acetate ในเส้นใยเห็ดเรืองแสง มีความเป็นพิษสูงสุดในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด HeLa แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจาก

เห็ดเรืองแสงมีความเป็นพิษสูง และมีประโยชน์ต่อการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อไปได้ (ชัฏติกา พวงงาม, วรัญญา แก้วมาก และอัญชลี เปิดชั้น, 2558) และได้พบการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ด้วยวิธีการฉายรังสีแกมมา เมื่อทดสอบโดยนำสารสกัดเห็ดเรืองแสงไปฉายรังสีแกมมาที่ความแรง 5, 10 และ 20 กิโลเกรย์ และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay เพื่อเปรียบเทียบแนวโน้มของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดก่อนและหลังการฉายรังสีแกมมา พบว่าแนวโน้มไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่มีการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Dichloromethane และ Ethyl Acetate ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (กัญญาวีร์ พุ่มบุตร, แสงนภา บูรณาภา และอัสมา บินซัน, 2557)

2.3.2.5 การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดเรืองแสง *N. nambi*

การพัฒนาเจลต้านสิวจากสารสกัดเห็ดเรืองแสง *N. nambi* เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของเจลต้านสิวต่อเชื้อ *S. epidermidis* โดยการหาค่า MIC และ MBC พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Ethyl Acetate ในน้ำเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีกว่าสารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วย Methanol โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 4-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการเตรียมตำรับเจลต้านสิวจึงเตรียมจากสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น 20MIC โดยใช้ Carbopol Ultrez-21 เป็นสารก่อเจล เมื่อนำไปทดสอบความคงตัวภายใต้สภาวะเร่งเป็นเวลา 12 วัน และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน ผลการประเมินทางกายภาพและเคมีของเจลต้านสิว พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีเจล และค่า pH ไม่แตกต่างกัน แต่ค่าความหนืดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$ ผลการประเมินทางชีวภาพของเจลต้านสิวโดยวิธี Agar Well Diffusion และวิธี Broth Microdilution พบว่าเจลต้านสิวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ฟาตีฮะ วาโซ๊ะ, ฟาฎีละห์ บาเหะ และซารีนา บือซาบูละ, 2558) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเจลล้างมือฆ่าเชื้อจากสารสกัดเห็ดเรืองแสง *N. nambi* เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ของเจลล้างมือ พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ดีกว่าเส้นใยเห็ดเรืองแสง จึงใช้สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 10MIC ในการเตรียมตำรับเจล โดยใช้ Carbopol Ultrez-21 เป็นสารก่อเจล เมื่อนำไปทดสอบความคงตัวภายใต้สภาวะเร่งเป็นเวลา 12 วัน และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน ผลการประเมินทางกายภาพและเคมีของเจลล้างมือพบว่า เจลมีการแยกชั้น มีค่า pH และค่าความหนืดลดลงเล็กน้อย ผลการประเมินทางชีวภาพของเจลล้างมือโดยวิธี Agar Well Diffusion และวิธี Broth Microdilution พบว่าเจลล้างมือมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* (นันทิยา ชุมไชโย, ฮารีส จารู และอธิเดช ดวงตา, 2558)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

1) *S. epidermidis* ATCC 35984
2) *S. epidermidis* ATCC 12228
3) *S. epidermidis* clinical isolate 10 isolates
4) *N. nambi*

3.1.2 สารเคมีและยาปฏิชีวนะ

1) casein
2) dichloromethane (CH_2Cl_2)
3) dimethyl sulfoxide (DMSO)
4) distilled water (DW)
5) ethyl acetate (EtOAc)
6) hexane
7) normal saline solution (NSS)
8) resazurin
9) sodium sulfate (Na_2SO_4)
10) tributyrin
11) vancomycin
12) methanol (MeOH)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) Mueller-Hinton broth (MHB)
2) nutrient agar (NA)
3) potato dextrose agar (PDA)
4) potato dextrose broth (PDB)
5) tryptic soy agar (TSA)
6) tryptic soy broth (TSB)

3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

1) กรวยแยกสาร
2) ขวดเก็บสาร
3) ขวดโซดา
4) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
5) จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
6) autoclave
7) beaker
8) cylinder
9) fume hood
10) incubator
11) loop
12) microcentrifuge tube
13) micropipette
14) microplate reader
15) microtiter plate
16) pipette tip
17) rotary evaporator
18) test tube
19) vacuum pump

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

20) vortex mixer

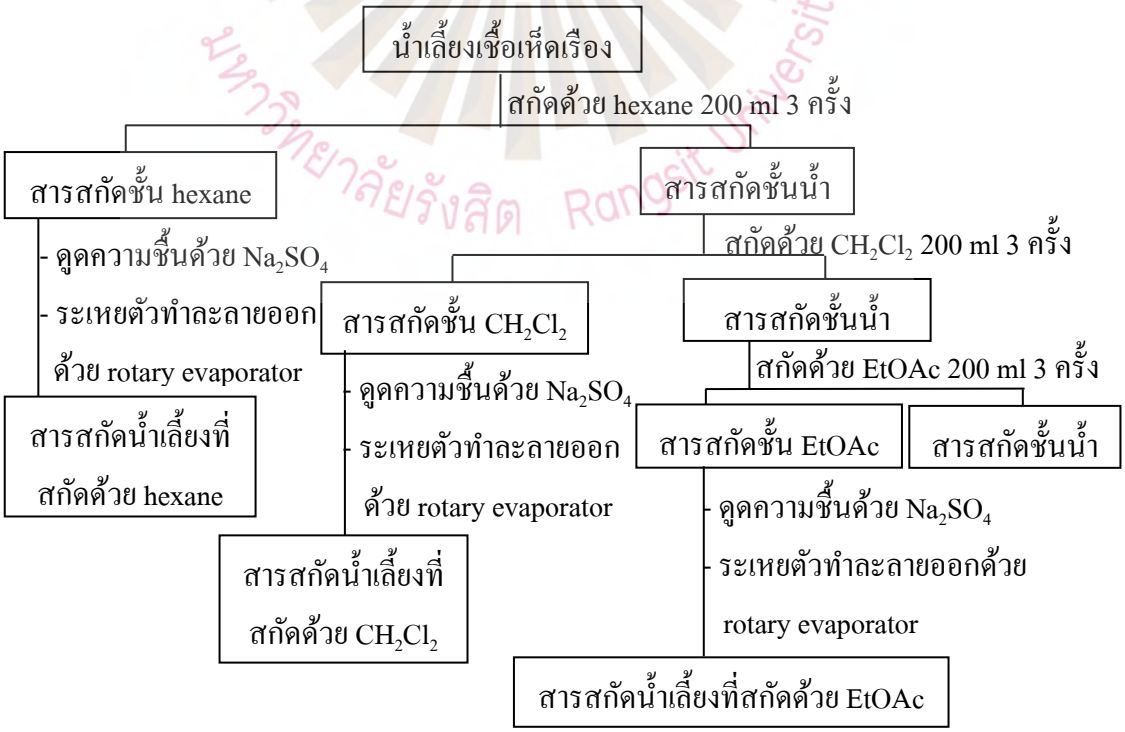
3.2 การเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสง

เพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) ปริมาณ 5 ลิตร เป็นเวลา 30 วัน โดยนำอาหาร PDB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น inoculate เชื้อเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ลงในอาหาร PDB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน โดยนำมาโดนแสงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทุกวัน

3.3 การสกัดสารสำคัญจากเห็ดเรืองแสง *N. nambi*

กรองแยกน้ำเลี้ยงและเส้นใยของเห็ดเรืองแสง *N. nambi* จากนั้นสกัดสารสำคัญในน้ำเลี้ยงและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงดังรูปที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ hexane, dichloromethane (CH_2Cl_2) และ ethyl acetate (EtOAc)

3.3.1 การสกัดสารสำคัญจากน้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสง *N. nambi*



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดสารสำคัญจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสง *N. nambi*

3.3.2 การสกัดสารสำคัญจากเส้นใยเห็ดเรืองแสง *N. nambi*

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดสารสำคัญจากเส้นใยเห็ดเรืองแสง *N. nambi*

3.4 การทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI (Cockerill et al., 2012)

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ ดร.ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย สถานวิจัยความเป็นเลิศทางด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวประกอบด้วย *S. epidermidis* ATCC 35984 (สายพันธุ์มาตรฐานที่สร้างไบโอฟิล์ม) *S. epidermidis* ATCC 12228 (สายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม) และเชื้อ *S. epidermidis* ที่แยกจากผู้ป่วยจำนวน 10 ไอโซเลท (NPRC011-020)

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ให้ได้โคโลนีเดี่ยว โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.5 McFarland Standard (มีเชื้อประมาณ 1.5 x 10^8 CFU/มิลลิลิตร) ด้วย Normal Saline Solution (NSS) จากนั้นเจือจางเชื้อด้วยอาหาร Mueller-Hinton Broth (MHB) ให้มีเชื้อประมาณ 1 x 10^6 CFU/มิลลิลิตร

การหาค่า MIC นั้นทำการทดสอบโดยเจือจางสารสกัดเห็ดเรืองแสงแบบลำดับสอง (Serial Two-fold Dilution) ด้วยอาหาร MHB ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 128-0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน Microtiter Plate แล้วดูดเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ในแต่ละหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร เขย่าเล็กน้อย บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ Resazurin ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทุกหลุม แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง อ่านค่า MIC โดยบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ หรือไม่มีการเปลี่ยนสีของ 0.1 เปอร์เซ็นต์ Resazurin (สีม่วง) โดยใช้ยา Vancomycin เป็น Positive Control และใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO เป็น Negative Control

ส่วนการหาค่า MBC นั้นทำการทดสอบโดยดูดสารปริมาตร 10 ไมโครลิตรของแต่ละหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อจากการทดสอบ MIC ใน Microtiter Plate (หลุมที่เป็นสีม่วง) มาหยดลงบนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผล MBC โดยบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (ไม่มีเชื้อเจริญ) เป็นค่า MBC

3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงโดยวิธี Time-kill Assay

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA ให้ได้โคโลนีเดี่ยว โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ปรับเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland Standard ด้วย NSS จากนั้นเจือจางเชื้อด้วยอาหาร MHB ให้มีเชื้อประมาณ 1 x 10^6 CFU/มิลลิลิตร

เจือจางสารสกัดเห็ดเรืองแสงแบบลำดับสองด้วย Distilled Water ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย

เท่ากับ 4MIC, 2MIC, MIC, 1/2MIC และ 1/4MIC ดูดสารสกัดที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร MHB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วดูดเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ในแต่ละหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างมานับจำนวนเชื้อที่เวลา 0, 0.2, 0.4, 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง โดยนำมาเจือจางด้วย NSS แล้วนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี Drop Plate บนอาหาร TSA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO เป็น Negative Control

3.6 การคัดเลือกเชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์ม (ดัดแปลงจาก จงกล สายสิงห์, 2551)

นำเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 (สายพันธุ์มาตรฐานที่สร้างไบโอฟิล์ม) *S. epidermidis* ATCC 12228 (สายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม) และเชื้อ *S. epidermidis* ที่แยกจากผู้ป่วยจำนวน 10 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA ให้ได้โคโลนีเดี่ยว โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ปรับเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland Standard จากนั้นเจือจางเชื้อด้วยอาหาร TSB ให้มีเชื้อประมาณ 1 x 10^6 CFU/มิลลิลิตร ดูดเชื้อลงใน Microtiter Plate 100 ไมโครลิตร แล้วเติมอาหาร TSB 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง Optical Dencity (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ล้างด้วย NSS 200 ไมโครลิตร 2 ครั้ง เขย่า Microtiter Plate เพื่อนำแบคทีเรียที่ไม่เกาะติดออก ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ย้อมสีไบโอฟิล์มด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ Crystal Violet 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นและทิ้งให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO 200 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ จนสี Crystal Violet ละลายหมด นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO เป็นชุดควบคุม

หาค่าความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ (OD) กับค่าการดูดกลืนแสงของ Negative Control (OD_c) (Stepanovic, Circovic, Ranin, & Vlahovic, 2004) ซึ่งแบ่งเป็น 4 ระดับ คือ

$OD \leq OD_c$	หมายถึง ไม่สร้างไบโอฟิล์ม
$OD_c < OD \leq 2OD_c$	หมายถึง สร้างไบโอฟิล์มเล็กน้อย

$2OD_c < OD \leq 4OD_c$ หมายถึง สร้างไบโอฟิล์มปานกลาง

$4OD_c < OD$ หมายถึง สร้างไบโอฟิล์มมาก

3.7 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* (ดัดแปลงจาก Saising et al., 2011; Saising et al., 2012)

นำเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 (สายพันธุ์มาตรฐานที่สร้างไบโอฟิล์ม) *S. epidermidis* ATCC 12228 (สายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม) และเชื้อ *S. epidermidis* ที่แยกจากผู้ป่วยที่สร้างไบโอฟิล์มมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA ให้ได้โคโลนีเดี่ยว โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ปรับเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland Standard จากนั้นเจือจางเชื้อด้วย TSB ให้มีเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร

เตรียมสารสกัดเห็ดเรืองแสงโดยเจือจางสารสกัดเห็ดเรืองแสงแบบลำดับสองด้วย Distilled Water ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC และ 1/16MIC

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยดูดสารสกัดเห็ดเรืองแสงแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ใส่ลงใน Microtiter Plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมอาหาร TSB ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และดูดเชื้อที่เตรียมไว้ลงไป 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ล้างด้วย NSS 200 ไมโครลิตร 2 ครั้ง เขย่า Microtiter Plate เพื่อนำแบคทีเรียที่ไม่เกาะติดออก ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ย้อมสีไบโอฟิล์มด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ Crystal Violet 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นและทิ้งให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO 200 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ จนสี Crystal Violet ละลายหมด นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้ยา Vancomycin เป็นชุด Positive Control และใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO เป็นชุด Negative Control วิเคราะห์ความแตกต่างของการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ เมื่อทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุม

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม} = \frac{\text{ค่า OD ชุดควบคุม} - \text{ค่า OD ชุดทดลอง}}{\text{ค่า OD ชุดควบคุม}} \times 100$$

3.8 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* (ดัดแปลงจาก Saising et al., 2011; Saising et al., 2012)

นำเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 (สายพันธุ์มาตรฐานที่สร้างไบโอฟิล์ม) *S. epidermidis* ATCC 12228 (สายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม) และเชื้อ *S. epidermidis* ที่แยกจากผู้ป่วยที่สร้างไบโอฟิล์มมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA ให้ได้โคโลนีเดี่ยว โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ปรับเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland Standard จากนั้นเจือจางเชื้อด้วย TSB ให้มีเชื้อประมาณ 1 x 10^6 CFU/มิลลิลิตร

ทดสอบฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มโดยดูดเชื้อที่เตรียมไว้ ลงใน Microtiter Plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้างไบโอฟิล์ม จากนั้นล้างด้วย NSS 2 ครั้ง เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 180 ไมโครลิตร และเติมสารสกัดความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC และ 1/16MIC หลุมละ 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วย NSS 200 ไมโครลิตร 2 ครั้ง เขย่า Microtiter Plate เพื่อนำแบคทีเรียที่ไม่เกาะติดออก ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ย้อมสีไบโอฟิล์มด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ Crystal Violet 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นและทิ้งให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO 200 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ จนสี Crystal Violet ละลายหมด นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้ยา Vancomycin เป็นชุด Positive Control และใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO เป็นชุด Negative Control วิเคราะห์ความแตกต่างไบโอฟิล์มของเชื้อ หลังการทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุม

$$\text{เปอร์เซ็นต์การทำลายไบโอฟิล์ม} = \frac{\text{ค่า OD ชุดควบคุม} - \text{ค่า OD ชุดทดลอง}}{\text{ค่า OD ชุดควบคุม}} \times 100$$

3.9 การศึกษาลักษณะไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) (ดัดแปลงจาก Saising et al., 2012)

นำเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 (สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์ม) มาศึกษาการสร้างไบโอฟิล์ม โดยบ่มบน Polystyrene Discs เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เติมสารสกัดเห็ด

เรืองแสงความเข้มข้นเท่ากับ 1/2MIC นำไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้ง ตรึงเชื้อให้ติดกับ Discs ด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ Glutaraldehyde ใน PBS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS แล้วตรึงด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ Osmium Tetroxide ใน PBS อีก 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น และทำให้แห้งด้วย Ethanol นำไปวางบน Aluminium Stubs เมื่อแห้งแล้วเคลือบด้วยทองคำ จากนั้นนำตัวอย่างไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO เป็น Negative Control เปรียบเทียบลักษณะความหนาแน่น และปริมาณไบโอฟิล์ม เมื่อทดสอบกับสารความเข้มข้นต่าง ๆ กับชุดควบคุม

3.10 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase และ protease ของเชื้อ *S. epidermidis* (ดัดแปลงจาก Saising et al., 2012)

นำแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานและ Clinical Isolate มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA ให้ได้โคโลนีเดี่ยว โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ปรับเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland Standard ด้วย NSS จากนั้นเจือจางเชื้อด้วยอาหาร MHB ให้มีเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร

เตรียมสารสกัดเห็ดเรืองแสง โดยเจือจางสารสกัดเห็ดเรืองแสงแบบลำดับสองด้วย Distilled Water ให้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (1/2MIC และ 1/4MIC)

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase โดยดูดสารสกัดที่เตรียมไว้ 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี Nutrient Agar (NA) หลอมเหลว ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ Tributyrin เทอาหารดังกล่าวลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รอจนอาหารแข็งตัว จากนั้นหยดเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสรอบโคโลนี และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี นำค่าที่วัดได้คำนวณหาค่าความสามารถในการย่อยสลาย โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO เป็นชุดควบคุม อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เพื่อคำนวณหาค่าความสามารถในการย่อยสลาย จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase จากสูตร

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างเอนไซม์} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสชุดควบคุม} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสชุดทดลอง}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสชุดควบคุม}} \times 100$$

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Protease โดยดูดสารสกัดที่เตรียมไว้ 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี NA หลอมเหลว ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ที่เติม 2 เปอร์เซ็นต์ Casein เทอาหารดังกล่าวลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รอจนอาหารแข็งตัว จากนั้นหยดเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนขุ่นรอบโคโลนี และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี นำค่าที่วัดได้คำนวณหาค่าความสามารถในการย่อยสลาย โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO เป็นชุดควบคุมอ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงขุ่นรอบโคโลนีและขนาดเส้นผ่าน-ศูนย์กลางโคโลนี เพื่อคำนวณหาความสามารถในการย่อยสลาย จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Protease จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างเอนไซม์} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโซนขุ่นชุดควบคุม} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางโซนขุ่นชุดทดลอง}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโซนขุ่นชุดควบคุม}} \times 100$$

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การสกัดสารสำคัญจากเห็ดเรืองแสง

เมื่อทำการสกัดสารสำคัญจากเห็ดเรืองแสง ด้วยวิธี Liquid-liquid Extraction โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ Hexane, Dichloromethane และ Ethyl Acetate สามารถแยกสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ 3 ส่วนสกัด ได้แก่ สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Hexane, Dichloromethane และ Ethyl Acetate โดยมีค่าน้ำหนักสารสกัดเท่ากับ 23.7, 233.0 และ 105.6 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และสามารถแยกสารสกัดเส้นใยได้เป็น 3 ส่วนสกัด ได้แก่ สารสกัดเส้นใยที่สกัดด้วย hexane, Dichloromethane และ Ethyl Acetate โดยมีน้ำหนักสารสกัดเท่ากับ 313.6, 903.7 และ 205.9 มิลลิกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

การสกัดสารสำคัญจากเห็ดเรืองแสงด้วยวิธี Liquid-liquid Extraction โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ Hexane, Dichloromethane และ Ethyl Acetate นั้น เป็นการสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเรียงลำดับความมีขั้วจากตัวทำละลายไม่มีขั้ว ไปจนถึงตัวทำละลายมีขั้ว ซึ่งวิธีนี้จะทำให้ได้สารสกัดที่มีขั้วตามขั้วของตัวทำละลายซึ่งมีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย (อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, ดมลักษณ์ สุขอัตตะ, สุภนิดา บัวบาน, ประภัสสร รักถาวร และณิชา กรม-เจริญกุล, 2549) โดยผลจากการสกัดสารสำคัญพบว่า น้ำหนักของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 233.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ 903.7 มิลลิกรัม ตามลำดับ แสดงว่าสารสำคัญในเห็ดเรืองแสงสามารถละลายในตัวทำละลาย Dichloromethane ได้มากที่สุด ซึ่ง Dichloromethane เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง มีคุณสมบัติในการทำละลายได้ทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว (ภาวนา พนมเขต, สุรศักดิ์ แว่นรัมย์ และธันยาการย์ ศรีวรมาศ, 2554)

ตารางที่ 4.1 ผลการสกัดสารสำคัญจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยเห็ดเรืองแสงด้วยตัวทำละลาย Hexane, Dichloromethane และ Ethyl acetate

สารสกัดเห็ดเรืองแสง	น้ำหนักสารสกัด (mg)	น้ำหนักสารสกัด (mg/l)
สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย hexane	118.5	23.7
สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย dichloromethane	1,165.0	233.0
สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย ethyl acetate	528.0	105.6
สารสกัดเส้นใยที่สกัดด้วย hexane	313.6	-
สารสกัดเส้นใยที่สกัดด้วย dichloromethane	903.7	-
สารสกัดเส้นใยที่สกัดด้วย ethyl acetate	205.9	-

4.2 ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI (Cockerill et al., 2012)

4.2.1 ผลการหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *S. epidermidis* ATCC 35984

เมื่อทำการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Hexane, Dichloromethane และ Ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *S. epidermidis* ATCC ได้ดีมาก โดยมีค่า MIC/MBC 2-4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยยามาตรฐาน Vancomycin มีค่า MIC/MBC ต่อเชื้อทั้งสองสายพันธุ์เท่ากับ 1/1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้ดี โดยมีค่า MIC/ MBC เท่ากับ 8/8 และ 4/4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากเส้นใยของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Hexane และ Ethyl Acetate มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้น้อยกว่า โดยมีค่า MIC และ MBC มากกว่า 128 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.2

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับยามาตรฐาน Vancomycin โดยมีค่า MIC/MBC เท่ากับ 2/2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางจะมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับส่วนสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูง (ภาวนา พนมเขต และคณะ, 2011) จึงนำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ที่แยกได้จากรอยสิวในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.2 ค่า MIC และ MBC สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อเชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์มาตรฐาน

สารสกัดเห็ดเรืองแสง	*S. epidermidis* ATCC 12228		*S. epidermidis* ATCC 35984	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
น้ำเลี้ยงเชื้อสกัดด้วย hexane	2	2	4	4
น้ำเลี้ยงเชื้อสกัดด้วย dichloromethane	2	2	2	2
น้ำเลี้ยงเชื้อสกัดด้วย ethyl acetate	4	4	4	4
เส้นใยสกัดด้วย hexane	>128	>128	>128	>128
เส้นใยสกัดด้วย dichloromethane	8	8	4	4
เส้นใยสกัดด้วย ethyl acetate	128	>128	>128	>128
vancomycin	1	1	1	1

4.2.2 ผลการหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย dichloromethane ต่อเชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์ที่แยกได้จากรอยสิว

ผลการทดลองพบว่า สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 (สายพันธุ์มาตรฐานที่สร้างไบโอฟิล์ม) *S. epidermidis* ATCC 12228 (สายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม) และเชื้อ *S. epidermidis* ที่แยกจากรอยสิวจำนวน 10 ไอโซเลท (*S. epidermidis* NPRC 011-020) โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 1-2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.3

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ของสารสกัดเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ เห็ดสายพันธุ์ *Cantharellus cibarius*, *Fistulina hepatica*, *Lepista nuda*, *Russula delica* และ *Tricholoma portentosum* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 10-20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Alves, Ferreira, Martins, & Pintado, 2012) เห็ดสายพันธุ์ *Agaricus bisporus*, *Hygrophorus agathosmus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus sajor-caju*, *Suillus collitinus* โดยค่า MIC เท่ากับ 7.81-62.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Alves, et al., 2012)

นอกจากนี้ผลการวิจัยของ Kamonwannasit et al. (2013) พบว่าสารสกัดใบกฤษณามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* โดยมีค่า MIC/MBC เท่ากับ 6/12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และยังพบว่าสารฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการสกัดพืชสายพันธุ์ *Elaeagnus glabra* และต้นคีเปล (*Stelechocarpus burahol*) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ได้ โดย *Elaeagnus glabra* มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และต้นคีเปลมีค่า MIC/MBC เท่ากับ 60/500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Nishino et al., 1987; Indariani, Hidayat, Darusman, & Batubara, 2017) จากการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดี เนื่องจากมีค่า MIC/ MBC น้อยกว่าสารสกัดชนิดอื่น ๆ

ตารางที่ 4.3 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ที่แยกได้จากรอยสิว

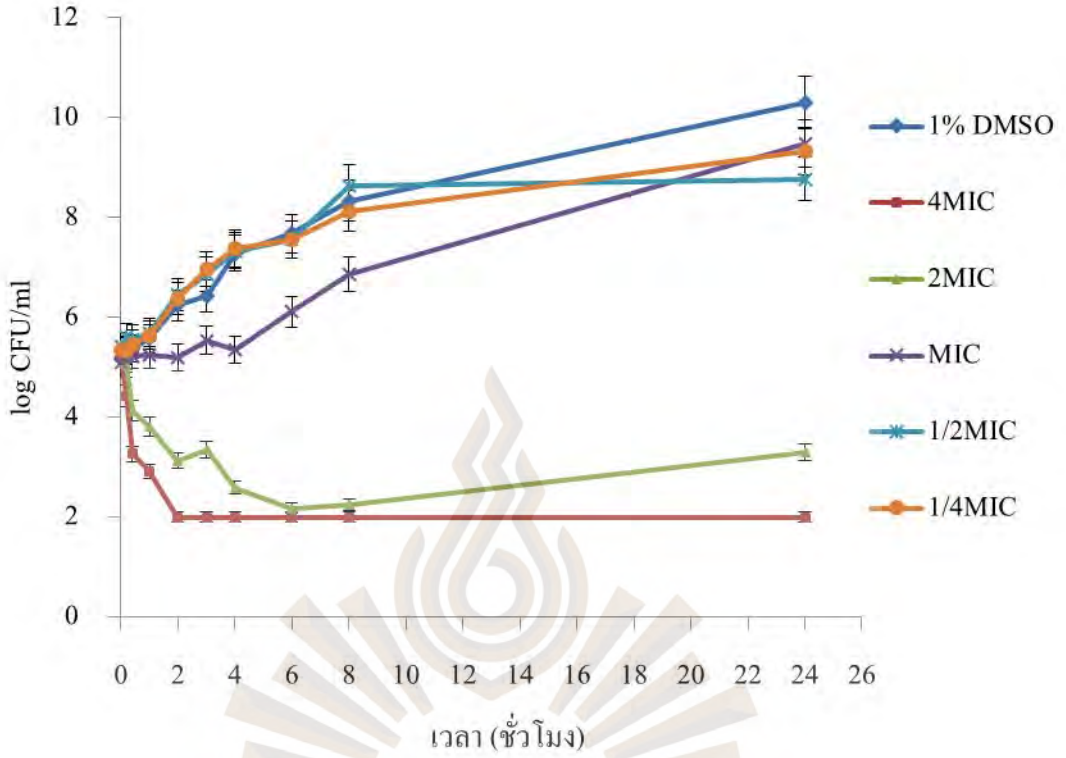
เชื้อ *S. epidermidis*	สารสกัด		vancomycin	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
S. epidermidis ATCC 35984	2	2	1	1
S. epidermidis ATCC 12228	2	2	1	1
S. epidermidis NPRC 011	2	2	1	1
S. epidermidis NPRC 012	2	2	1	1
S. epidermidis NPRC 013	2	2	1	1
S. epidermidis NPRC 014	2	2	1	1
S. epidermidis NPRC 015	1	1	0.5	0.5
S. epidermidis NPRC 016	2	2	1	1
S. epidermidis NPRC 017	2	2	1	1

ตารางที่ 4.3 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ที่แยกได้จากรอยสิว (ต่อ)

เชื้อ *S. epidermidis*	สารสกัด		vancomycin	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
S. epidermidis NPRC 018	2	2	1	1
S. epidermidis NPRC 019	2	2	1	1
S. epidermidis NPRC 020	1	1	0.5	0.5

4.3 ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* ของสารสกัดเห็ดเรืองแสง

จากการทดสอบ Time-kill Assay ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 พบว่าสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น 4MIC (8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ 2MIC (4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ โดยเชื้อลดลง ≥ 1log CFU/ml ที่เวลา 1 ชั่วโมง และไม่พบการเจริญของเชื้อที่เวลา 2 ชั่วโมงและ 6 ชั่วโมง โดยที่ความเข้มข้น 4MIC (8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ไม่พบการเจริญของเชื้อในช่วงเวลาหลังจาก 2 ชั่วโมง ส่วนสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เนื่องจากเชื้อมีการเจริญต่ำกว่าชุดควบคุมในทุกช่วงเวลา และสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/2MIC (1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ 1/4MIC (0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ไม่พบการยับยั้งการเจริญ เติบโตของเชื้อในทุกช่วงเวลาเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงรูปที่ 4.1 ซึ่งการวิจัยของ Saising et al. (2011) ได้ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ด้วยสารสกัดใบกระทุ พบว่าสามารถฆ่าเชื้อได้ที่เวลา 16 ชั่วโมง และพบว่าสารสกัด Tea-Tree Oil ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ในการการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* โดยการเจริญของเชื้อลดลงที่เวลา 1 ชั่วโมง (Brady, Loughlin, Gilpin, Kearney & Tunney, 2006) นอกจากนี้ Chovanova, Mikulasova and Vaverkova (2013) พบว่าสารสกัดต้นเสจ (*Salvia officinalis*) ความเข้มข้น 1/2MIC สามารถยับยั้งเชื้อ โดยเชื้อลดลง ≥1log CFU/ml ที่เวลา 6 ชั่วโมง จากการวิจัยแสดงให้เห็นว่า สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสง มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อได้ดี



รูปที่ 4.1 ผล Time-kill Assay ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984

4.4 ผลการคัดเลือกเชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์ม

การคัดเลือกเชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มจากความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อกับของ Negative Control พบว่าเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มมาก ส่วนเชื้อ *S. epidermidis* NPRC012, NPRC014, NPRC016, NPRC017, NPRC018 และ NPRC019 พบว่าเชื้อมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มปานกลาง และสำหรับเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* NPRC011, NPRC013, NPRC015, และ NPRC020 มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งเชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม เป็นสายพันธุ์ที่มีความผิดปกติของยีน *ica* (Ziebuhr et al., 1999) และเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้างไบโอฟิล์ม (Zhang et al., 2003)

จากการศึกษาของ Williams and Bloebaum (2010) ทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 มีการสร้างไบโอฟิล์ม จากผลการทดลองจึงนำเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มไปใช้ในการทดสอบการยับยั้งและการทำลายไบโอฟิล์มของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อไป

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์ที่แยกได้จากรอยสิว

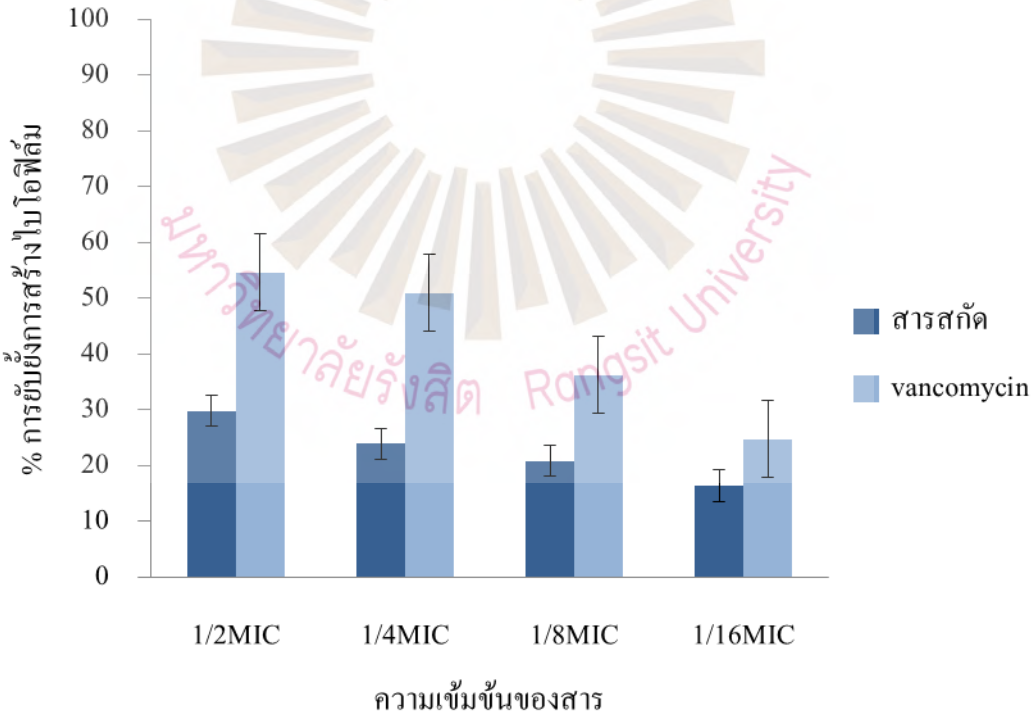
เชื้อ *S. epidermidis*	ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม
S. epidermidis ATCC 35984	สร้างไบโอฟิล์มมาก
S. epidermidis ATCC 12228	สร้างไบโอฟิล์มเล็กน้อย
S. epidermidis NPRC 011	สร้างไบโอฟิล์มเล็กน้อย
S. epidermidis NPRC 012	สร้างไบโอฟิล์มปานกลาง
S. epidermidis NPRC 013	สร้างไบโอฟิล์มเล็กน้อย
S. epidermidis NPRC 014	สร้างไบโอฟิล์มปานกลาง
S. epidermidis NPRC 015	สร้างไบโอฟิล์มเล็กน้อย
S. epidermidis NPRC 016	สร้างไบโอฟิล์มปานกลาง
S. epidermidis NPRC 017	สร้างไบโอฟิล์มปานกลาง
S. epidermidis NPRC 018	สร้างไบโอฟิล์มปานกลาง
S. epidermidis NPRC 019	สร้างไบโอฟิล์มปานกลาง
S. epidermidis NPRC 020	สร้างไบโอฟิล์มเล็กน้อย

4.5 ฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis*

จากการทดลองการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC และ 1/16MIC ซึ่งความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มเป็นหนึ่งใน Virulence Factor ของเชื้อ *S. epidermidis* (Saising et al., 2012) พบว่าสารสกัดเห็ดเรืองแสงดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดเรืองแสง กล่าวคือ

มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม เท่ากับ 29.79, 23.88, 20.83 และ 16.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่สารสกัดเห็ดเรืองแสงสกัดด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้น้อยกว่ายามาตรฐาน (Vancomycin) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเท่ากับ 54.64, 50.91, 36.25 และ 24.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.2

จากการวิจัยของ Giraldo et al. (2003) พบว่าสาร Allicin จากกระเทียม (*Allium sativum*) ที่ความเข้มข้น MIC สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ได้ และยังมีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากต้นชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 โดยปริมาตรสาร 0.1-1.0 มิลลิกรัม มีเปอร์เซ็นต์การสร้างไบโอฟิล์มลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Saito et al., 2012) นอกจากนี้ Kuzma, Rozalski, Walencka, Rozalska, and Wysokkinska (2007) พบว่าสาร Salvipisone จาก *Salvia sclarea* สามารถใช้เป็นสารต้านไบโอฟิล์มของ Staphylococci ที่ดื้อยาได้ จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเช่นเดียวกับสารสกัดชนิดอื่น ๆ



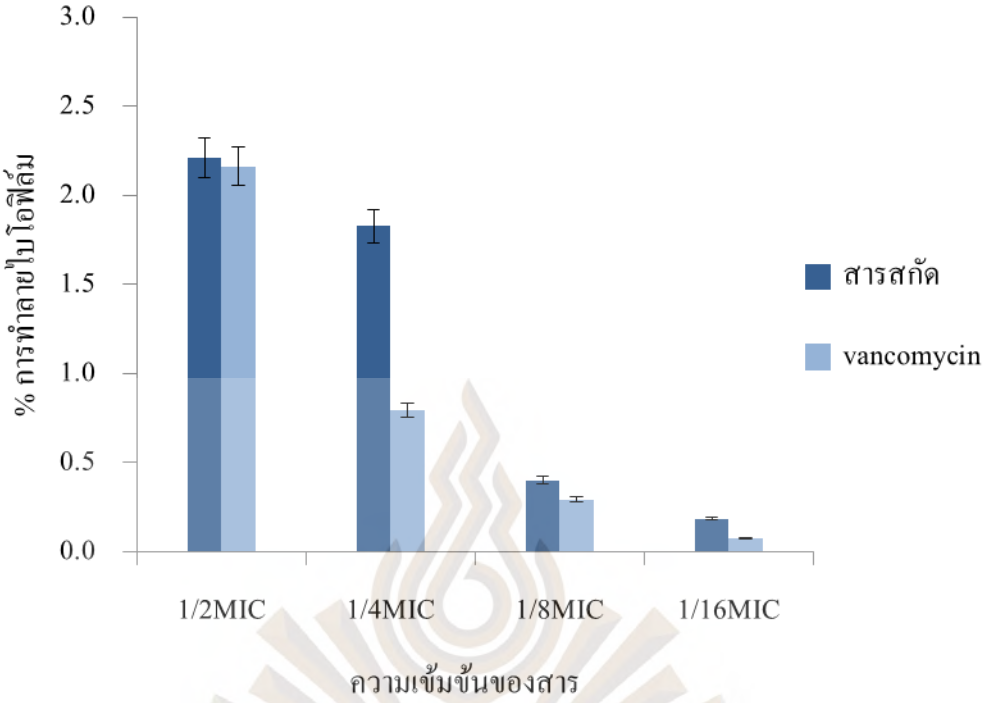
รูปที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane และ Vancomycin

4.6 ฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis*

จากการทดลองการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC และ 1/16MIC พบว่าสารสกัดเห็ดเรืองแสงไม่มีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยมีเปอร์เซ็นต์การทำลายไบโอฟิล์ม เท่ากับ 2.21, 0.80, 0.29 และ 0.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน Vancomycin ที่ใช้เป็น Positive Control ในการทดสอบนั้นพบว่าที่ความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC และ 1/16MIC มีเปอร์เซ็นต์การทำลายไบโอฟิล์ม เท่ากับ 2.16, 1.83, 0.40 และ 0.19 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารสกัดและยามาตรฐาน Vancomycin ไม่เหมาะสมต่อการทดลอง เนื่องจากสารที่มีความเข้มข้น ≥MIC น่าจะมีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์ม

จากงานวิจัยของจากผลงานวิจัยของ El-Azizi, Rao, Kanchanapoom and Khardori (2005) ทดสอบฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ Vancomycin, Quinupristin/Dalfopristin และ Linezolid ความเข้มข้น ≥MIC การทดสอบพบว่ายาปฏิชีวนะมีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* และ Sakimura et al. (2015) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ของยาปฏิชีวนะ Vancomycin ที่ความเข้มข้น MIC-32MIC ซึ่งพบว่ายา Vancomycin ความเข้มข้น 16MIC และ 32MIC ยามีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* โดยมีปริมาณเชื้อลดลงจากประมาณ 10^7 CFU/มิลลิลิตร เหลือเพียง 0-10^3 CFU/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่ายาปฏิชีวนะ Vancomycin ความเข้มข้น MIC-8MIC ยาดังกล่าวมีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* โดยค่ามวลของไบโอฟิล์มที่ได้จากการวัดค่า OD_{570} ลดลงจากประมาณ 1.5-1.6 เหลือเพียง 0-1.2 (Laplante & Mermel, 2009)

ดังนั้นสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ในความเข้มข้น ≥ MIC อาจมีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาต่อไป



รูปที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane และ Vancomycin

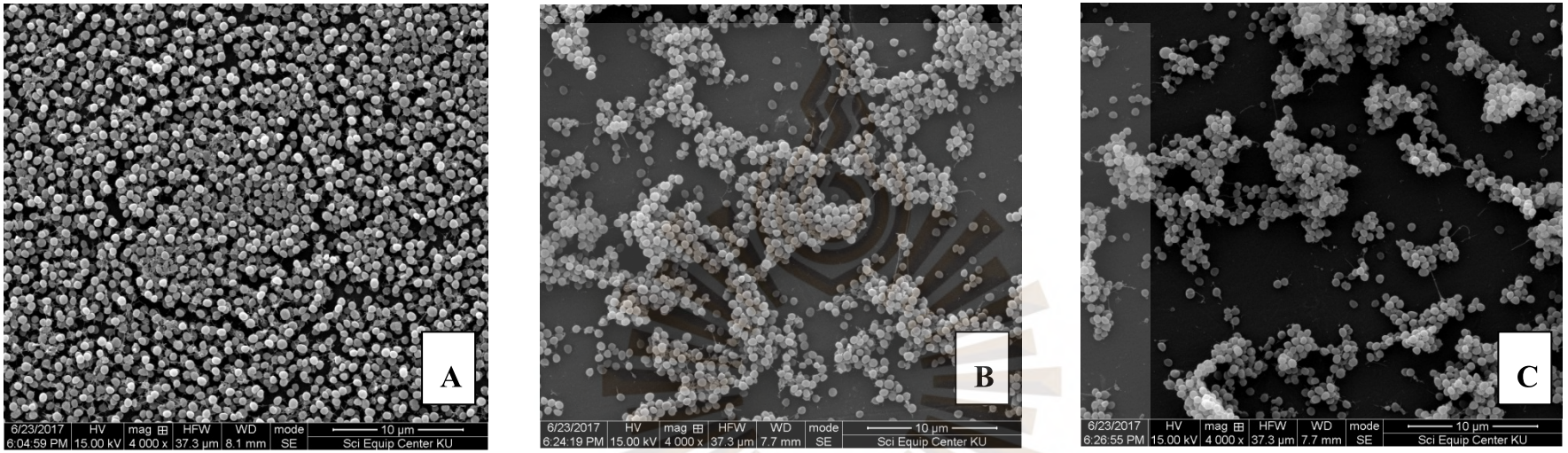
4.7 ลักษณะไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC 35984 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)

จากการศึกษาการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ SEM พบว่าสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ความเข้มข้น 1/2MIC มีความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ แต่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้น้อยกว่ายา Vancomycin เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม คือ จากรูปที่ 4.4 ลักษณะไบโอฟิล์มของชุดทดลองมีความหนาแน่นของไบโอฟิล์มน้อยกว่าในชุดควบคุม (1 เปอร์เซ็นต์ DMSO) แต่ยังหนาแน่นมากกว่าชุด Vancomycin

จากการศึกษาลักษณะการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ SEM พบว่าสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ความ

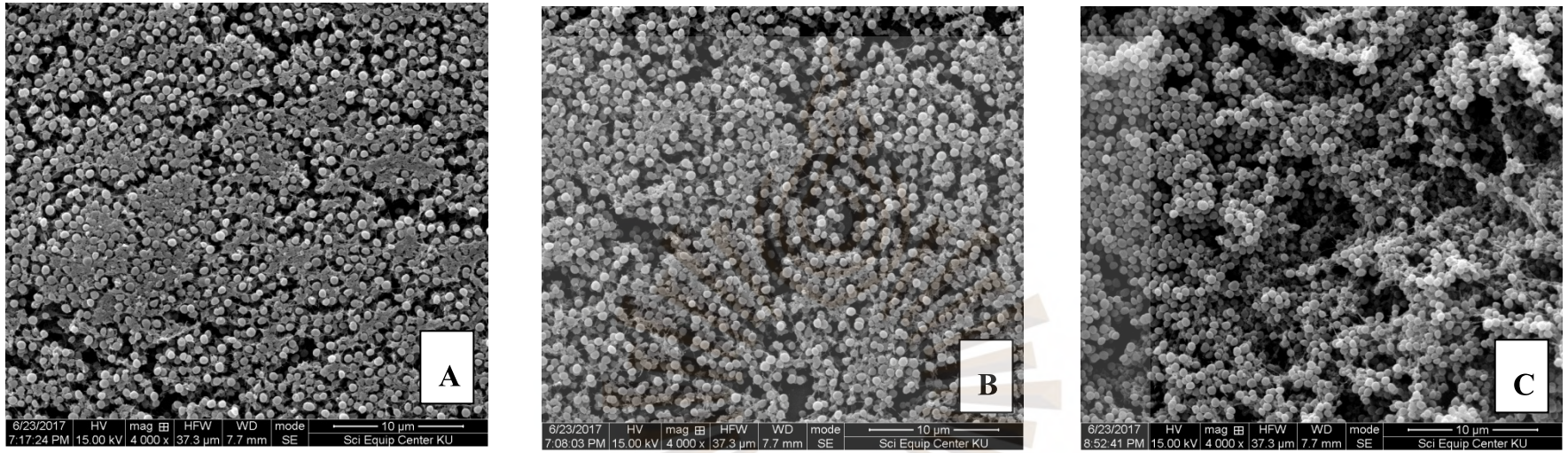
เข้มข้น 1/2MIC ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังรูปที่ 4.5 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองการทำลายไบโอฟิล์ม คือ สารสกัดและยา Vancomycin มีเปอร์เซ็นต์การทำลายไบโอฟิล์มต่ำเมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากการวิจัยของ Saising et al. (2011) ที่ศึกษาลักษณะไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ที่สร้างขึ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 5 วัน จากนั้นทดสอบการทำลายไบโอฟิล์มด้วยสารสกัดใบกระทุ พบว่าสารสกัดใบกระทุความเข้มข้น 16MIC มีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์ม Kamonwannasit et al. (2013) ยังพบว่าสารสกัดจากใบกฤษณา ความเข้มข้น MIC มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ได้ โดยลักษณะเซลล์ของเชื้อการบวมและบิดเบี้ยวหลังการบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นสารสกัดเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ในความเข้มข้น ≥MIC อาจมีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์ม ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาต่อไป และ Wang, Qiu, Yao, Tang, Dai, and Zhu (2009) ศึกษาลักษณะของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 และ *S. epidermidis* ATCC 12228 ที่ทดสอบด้วยสารสกัด Berberine ≥30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 สร้างไบโอฟิล์มมากเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ SEM และ *S. epidermidis* ATCC 12228 ไม่มีการสร้างไบโอฟิล์มเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ SEM

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 4.4 ลักษณะการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 โดยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบส่องกราด (SEM) 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO (A) สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงสกัดด้วย Dichloromethane ความเข้มข้น 1/2MIC (B) และยา Vancomycin ความเข้มข้น 1/2MIC (C)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 4.5 ลักษณะการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 โดยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO (A) สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงสกัดด้วย Dichloromethane ความเข้มข้น 1/2MIC (B) และยา Vancomycin ความเข้มข้น 1/2MIC (C)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

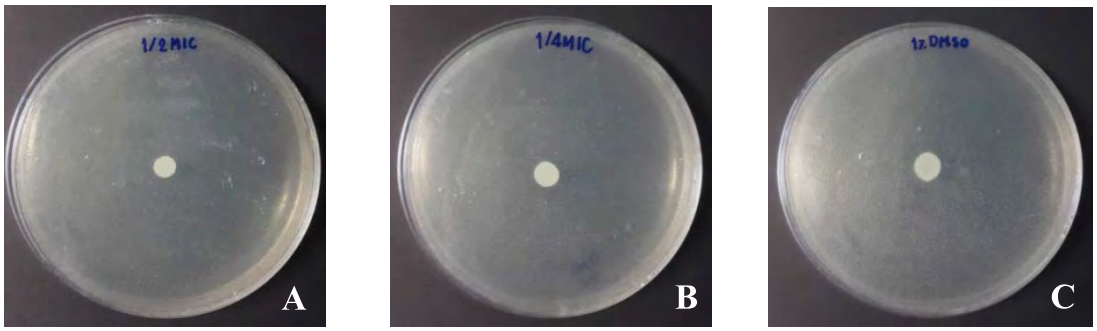
4.8 ฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase และ Protease ของเชื้อ *S. epidermidis*

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 พบว่าเชื้อมีการสร้างโซนใสรอบ ๆ โคโลนี ดังรูปที่ 4.6 โดยโซนใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อที่ทดสอบด้วยสารสกัดความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC และชุดควบคุม (1 เปอร์เซ็นต์ DMSO) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 1.2, 1.4 และ 1.8 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ Lipase ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงความเข้มข้น 1/2 MIC และ 1/4MIC มีค่าเท่ากับ 22.22 และ 9.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5 ดังนั้นสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/2MIC และ 1/4MIC มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Protease ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 พบว่าเชื้อไม่สร้างเอนไซม์ Protease รูปที่ 4.7

การวิจัยของ Scazzocchioa, D'Auriaa, Alessandrinia and Pantanellab (2006) พบว่าสารสกัดจาก Propolis ที่ความเข้มข้น 1/2MIC มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ Coagulase และ Lipase โดยการสร้างเอนไซม์ lipase ของ *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. homonis* และ *S. warnerii* ลดลง 17-50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้มีสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดจาก *Elaeagnus glaba* สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase ของเชื้อ *S. epidermidis* โดยการยับยั้งการสร้างเอนไซม์จะเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด (Nishino et al., 1987) จากงานวิจัยของ จงกล สายสิงห์ (2551) พบว่าเชื้อ Coagulase-positive *S. epidermidis* ทั้งหมด 64 สายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์ Protease ได้เพียง 17 สายพันธุ์ ส่วนเชื้อ Coagulase-negative *S. epidermidis* ทั้งหมด 64 สายพันธุ์ที่ทดสอบ สามารถสร้างเอนไซม์ Protease ได้ 56 สายพันธุ์ นอกจากนี้ Saising et. al. (2012) คัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ Staphylococci ที่แยกได้จากรอยสิว ยังพบว่าเชื้อที่แยกได้จากรอยสิวส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์ Lipase ได้มากกว่าเอนไซม์ Protease

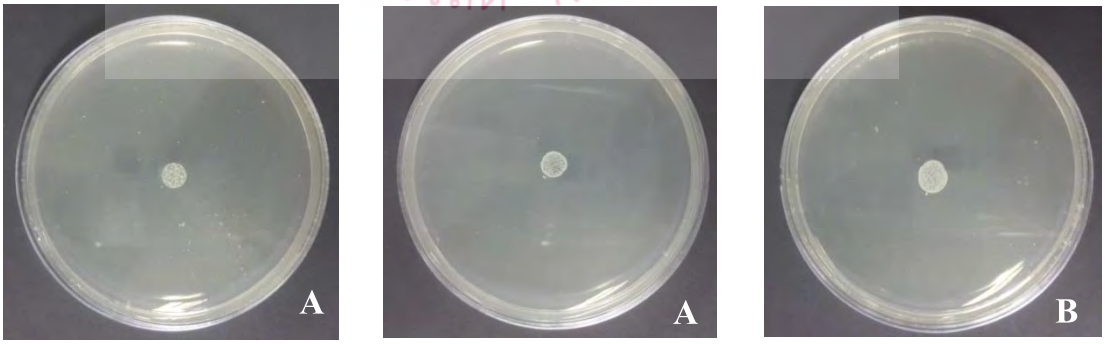
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 4.6 ผลการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ความเข้มข้น 1/2MIC (A), 1/4MIC (B) และ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO (C)

ตารางที่ 4.5 ค่าความสามารถในการย่อยสลาย และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ Lipase ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงสกัดด้วย Dichloromethane ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984

ผลการทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัด	
	1/2MIC	1/4MIC
ความสามารถในการย่อยสลายของชุดควบคุม	2.57	2.57
ความสามารถในการย่อยสลายของชุดทดลอง	2.00	2.33
เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ lipase	22.22	9.26



รูปที่ 4.7 ผลการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Protease ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ขอ . สารสกัด น้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ความเข้มข้น 1/2MIC (A), 1/4MIC (B), และ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO (C)

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลงานวิจัย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ซึ่งผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังนี้ สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย Dichloromethane มีน้ำหนักมากที่สุดคือ 1.1650 กรัม คิดเป็นน้ำหนักสารสกัด 233.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีที่สุดโดยมีค่า MIC/MBC เท่ากับ 2/2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทดสอบ Time-kill Assay พบว่าสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น 4MIC (8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถฆ่าเชื้อได้ที่เวลา 2 ชั่วโมง และไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อในช่วงเวลาถัดไป จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงที่สกัดด้วย Dichloromethane ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด และสารสกัดดังกล่าวความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC และ 1/16MIC ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์ม การทดสอบลักษณะไบโอฟิล์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์ SEM พบว่าสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ที่ความเข้มข้น 1/2MIC มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม แต่ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์ม ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย Dichloromethane ต่อการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Lipase ของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 พบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ Lipase เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดเรืองแสง นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ไม่สร้างเอนไซม์ Protease

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่า สารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น <MIC ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์ม ดังนั้นจึงควรศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น ≥MIC ในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ในโอกาสต่อไป รวมทั้งศึกษาลักษณะไบโอฟิล์มของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ SEM โดยการใช้สารสกัดจากเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น ≥MIC ซึ่งน่าจะมีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดี และหากต้องการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์รักษาสิวควรศึกษาฤทธิ์ด้านอื่น ๆ ของสารสกัดเพิ่มเติม ดังนี้

5.2.1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นสาเหตุในการเกิดสิว

5.2.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรย์บางชนิด เช่น ยีสต์ รา และไวรัสบางชนิดนั้นสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อและเป็นสาเหตุของปัญหาสิวได้

5.2.3 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ เพื่อลดการอักเสบซึ่งอาจเกิดขึ้นจากสิวอักเสบ

5.2.4 ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไขมัน เพื่อลดการสร้างไขมัน หรือต้านไขมันที่ผิวหนังของโฮสต์สร้างขึ้น เพื่อลดการอุดตันของไขมันซึ่งเป็นปัญหาสิว

5.2.5 ฤทธิ์ในการลดระดับฮอร์โมน สารสกัดอาจมีฤทธิ์ในการการลดระดับการสร้างฮอร์โมนเทสโทสเทอร์โรนในเพศชาย ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ต่อมไขมันบนผิวหนังผลิตไขมันมากขึ้น รวมทั้งฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ร่างกายจะมีการผลิตมากขึ้นในช่วงที่เพศหญิงมีประจำเดือน

5.2.6 ฤทธิ์ในการรักษารอยแผลในผู้ป่วยสิว ในสิวอักเสบบางประเภทหลังจากหายแล้วอาจทิ้งร่องรอยแผลไว้

5.2.7 ทดสอบความปลอดภัยของสารสกัด ควรทดสอบว่าสารสกัดมีความเป็นพิษ หรือเป็นอันตรายต่อการนำไปใช้กับโฮสต์หรือไม่ อย่างไร

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม

กัญญาวีร์ พุ่มบุตร, แสงนภา บูรณาภา และอัสมา บินซัน. (2557). *การเพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเห็ดการบูรและเห็ดเรืองแสงด้วยวิธีการฉายรังสีแกมมา* (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

คันธรส วิชัยดิษฐ, ปาริสา แตงบุตร และสุชาวดี กุฎีรัตน์. (2557). *การศึกษาฤทธิ์การฆ่าไรไข่ปลา (Luciaphorus perniciosus) ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi)* (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

คีรยา มูลทองชุน, จินต์สุจี รักขิตพินิจดุล และอิสราภรณ์ วุฒิหิรัญวิทย์. (2557). *การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้ง Escherichia coli และ Pseudomonas aeruginosa* (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

จงกล สายสิงห์. (2551). ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุ่มต่อเชื้อ Staphylococci ที่แยกได้จากรอยสิว (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

จอมพล ตันตระวรศิลป์ (2550). การศึกษาแบคทีเรียประจำถิ่นใน middle meatus โดยวิธีส่องกล้องทางจมูกในอาสาสมัครปกติ. สืบค้นจาก https://www.rcot.org/download/rcot-Resident 2008_a17.pdf

ชัฏติกา พวงงาม, วรัญญา แก้วมาก และอัญชลี เปิดชั้น. (2558). *การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเห็ดเรืองแสง ต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7, HeLa และ Colo205* (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

ชนนาถ เจริญบุญญาฤทธิ์, รัฏภรณ์ พรมแก้ว และอมลรดาณี สุวีระ. (2557). *การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi) ต่อการยับยั้ง Escherichia coli* (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

ณิชากร ศรีพุ่มบาง และมาณิภา ไพนรินทร์. (2557). *การประเมินคุณภาพเห็ดเรืองแสง* (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

ธนะพันธ์ พิบูลย์บรรณกิจ. (2552, พฤษภาคม). *ภาวะการติดเชื้อที่เกิดขึ้นภายหลังการผ่าตัดของระบบหัวใจและทรวงอก.* การฝึกอบรมระยะสั้นปี 2552, กรุงเทพมหานคร.

ธีระ ปานทิพย์อำพร. (2551, กันยายน). *สถานีวิทยุกระจายเสียงแห่งประเทศไทย.* สืบค้นจาก https://soclaimon.wordpress.com

นันทิยา ชุมไชโย, ฮารีส จารู และอธิเดช ดวงตา. (2558). *การพัฒนาเจลล้างมือฆ่าเชื้อที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi)* (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

บรรณานุกรม (ต่อ)

นภดล นพคุณ, เพ็ญวดี ทิมพัฒนพงศ์, วัณณศรี สินธุภัค, เพ็ญพรรณ วัฒนไกร, รัศนี อัครพันธ์, นลินี สุทธิไพศาล, . . . เจตน์ วิทิตสุวรรณกุล. (ม.ป.ป.) Clinical Practice Guideline Acne. *แนวทางการดูแลรักษาโรค Acne*, 57-80.

ฟาตีฮะ วาโซ๊ะ, ฟาฎีละห์ บาเหะ และซารีนา บือซาบูละ. (2558). *การพัฒนาเจลต้านสิวจากสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi)* (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

ภาวนา พนมเขต, สุรศักดิ์ แว่นรัมย์, และธันยาการย์ ศรีวรมาศ. (2554). ฤทธิ์ต้านจุลชีพของส่วนสกัดของพืชไทยต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด, 23*(2), 151-158.

วันเพ็ญ นิจศรีวงษ์ และสุภศจี แฟงรัก. (2557). *การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi) ต่อการยับยั้ง Microsporum gypseum MU-SH4 ที่แยกได้จากผู้ป่วย* (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

วีรวัตร นามานุศาสตร์ และวีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. (2554). การทดสอบวัสดุในการเพาะเลี้ยงและกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายของเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* Speg. *วารสารแก่นเกษตร 39*. *ฉบับพิเศษ*, 202-207.

วีรวัตร นามานุศาสตร์, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, อนันต์ หิรัญสาลี และรัศมี เหล็กพรม. (2556). ประสิทธิภาพของเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* Speg. ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) ในมะเขือเทศ. *วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 18*(5), 824-831.

สุกัญญา ผิวดำ, ปาอีซะ เจะหลง และสุนิสา เกื้อชาติ. (2558). *การตรวจสอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านเชื้อ Staphylococcus epidermidis ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง Neonothopanus nambi.* (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

สุรีย์พร บัวอาจ, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และสมเดช กนกเมธากุล. (2552). การจำแนกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* และผลของสารออกฤทธิ์ต่อไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงศัตรูพืช (*Steinernema carpocapsae*). *โครงการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 12*, ขอนแก่น สืบค้นจาก http://www.cab.kps.ku.ac.th/db_cab/reports/paper/07-06-08-000177.pdf

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม (ต่อ)

สุรีย์พร บัวอาจ. (2554). *ผลของสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi Speg.) ต่อไส้เดือนฝอยรากปม (Meloidogyne incognita Chitwood) และสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย*. (Unpublished Doctoral dissertation). มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

เหมือนฝัน ซื่อตรง, ฐานิภา กระจ่างฉาย และรัตนาภรณ์ เทพธวัช. (2557). *การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ Staphylococcus epidermidis ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง* (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

อรรถเวช กองนักวงษ์, วชิราภา ประวันนา และศุภวัฒน์ พรหมแสง. (2557). *การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเห็ดเรืองแสง* (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, สุภนิดา บัวบาน, ประภัสสร รักถาวร และณิชา กรมเจริญกุล. (2549). *การสกัดแยกสารและน้ำมันหอมระเหยจากพืชขั้นพื้นฐาน*. กรุงเทพฯ: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทาการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร.

Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Martins, A., & Pintado, M. (2012). Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. *Journal of Applied Microbiology, 113*, 466-574.

Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., & Pintado, M. (2012). A review on antimicrobial activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica, 78*, 1707-1718. doi: http://dx.doi.org/ 10.1055/s-0032-1315370

Appak, S. (2006). Biochemical and molecular characterization of extracellular enzyme producing Staphylococci isolated from different origins. (Master's Thesis, Mugla University). Retrieved from https://scholar.google.co.th

Archer, P. (2006) *The complete guide to acne; prevention, treatment and remedies.* Melbourne: Another eBook Wholesaler Publication.

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

Bondar, V. S., Shimomura, O., & Gitelson, J. I. (2012). Luminescence of higher mushrooms. *Journal of Siberian Federal University, 4*(5), 333-337.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Bua-art, S., Saksirirat, W., Kanokmedhakul, S., Hiransalee, A., & Lekphrom, R. (2010). Extraction of bioactive compounds from luminescent mushroom (*Neonothopanus nambi*) and its effect on root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *KKU Research Journal*, *15*(8), 726-737.

Bua-art, S., Saksirirat, W., Kanokmedhakul, S., Hiransalee A., & Lekphrom, R. (2011). Effect of bioactive compound from luminescent mushroom (*Neonothopanus nambi* Speg.) on root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* Chitwood) and non-target organisms. *KKU Research Journal*, *16*(4), 331-341.

Burkhart, C. G., Burkhart, C. N., & Lehmann, P. F. (1999). Acne: a review of immunologic and microbiologic factors. *Postgraduate Medical Journal, 75*, 328-331.

Chovanova, R., Mikulasova, M., & Vaverkova, S. (2013). *In vitro* antibacterial and antibiotic resistance modifying effect of bioactive plant extracts on methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Microbiology, 166*(3), 1-8.

Cockerill, F. R., Wikler, M. A., Alder, J., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Ferraro, M. J., . . . Zimmer, B. L. (2012). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria That grow aerobically; approved standard* (9th ed.). United States: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Costa, A. R., Batistao, D. W. F., Ribas, R. M., Sousa, A. M., Pereira, M. O. & Botelho, C. M. (2013). *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, Badajoz: Formatex Research Center.

Desjardin, D. E., Capelari, M., & Stevani C. V. (2007). Bioluminescent mycena species from Sao Paulo, Brazil. *Mycologia, 99*(2), 317-331.

Desjardin, D. E., Perry, B. A., Lodge, D. J., Stevani, C. V., & Nagasawa, E. (2010). Luminescent *Mycena*: new and noteworthy species. *Mycologia, 102*(2), 459-477. doi: 10.3852/09-197

El-Azizi, M., Rao, S., Kanchanapoom, T., & Khardori, N. (2005). In vitro activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin and linezolid against intact and disrupted biofilms of staphylococci. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials,* 1-9. doi:10.1186/1476-0711-4-2

Fey, P. D., (Ed.). (2014). *Staphylococcus epidermidis methods and protocols*. United State: Springer.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Giraldo, C. P., Villalo, G. C., Silos, R. S., Rubio, R. M., Blanco, B. T., & Garcia A. C. G. (2003). In vitro activity of allicin against *Staphylococcus epidermidis* and influence of subinhibitory concentrations on biofilm formation. *Journal of Applied Microbiology*, *95*, 709-711. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02030.x

Gotz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*, *43*(6), 1367-1378.

Granslo, H. N. (2010). *Staphylococcus epidermidis*-virulence factors and innate immune response. University of Thomso, 1-121.

Halama, M. & Romanski, M. (2010). A new record of *Mycena picta* (Fr.: Fr.) Harmaja (*Agaricales*, *Basidiomycota*) from the Wigierski National Park (NE Poland). *Opole Scientific Society Nature Journal, 43*, 29-36.

Harris, L. G., Foster, S. J., & Richards, R. G. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European Cells and Materials, 4*, 39-60.

Hull, P. R., & D'Arcy, C. (2005). Acne, depression, and suicide. *Clinics in Dermatology, 23*, 665-674. doi:10.1016/j.det.2005.05.008

Indariani, S., Hidayat, A, Darusman, L., & Batubara, I. (2017) Antibacterial activity of flavonoid from kepel (*Stelechocarpus burahol*) leaves against *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. *9*(10), 292-296.

James, W. D. (2005). Acne. *The New England Journal of Medicine, 352*, 1463-1472.

Jappe, U. (2003). Pathological mechanisms of acne with special emphasis on *Propionibacterium acnes* and related therapy. *Acta Derm Venereol Journal, 83*, 241-248.

Kamonwannasit, S., Nantapong, N., Kumkrai, P., Luecha, P., Kupittayanant, S., & Chudapongse N. (2013). Antibacterial activity of *Aquilaria crassna* leaf extract against *Staphylococcus epidermidis* by disruption of cell wall. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2-7. doi:10.1186/1476-0711-12-20

Kanokmedhakul, S., Lekphrom, R., Kanokmedhakul, K., Hahnvajanawong, C., Bua-art, S., Saksirirat, W., . . . Kongsaeree, P. (2012). Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. *Tetrahedron, 68*, 8261-8266.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม (ต่อ)

Knobloch, J. K. M., Horstkotte, M. A., Rohde, H., Kaulfers, P. M. & Mack, D. (2002). Alcoholic Ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis. Journal of Antimicrobial Chemothera, 49*, 683-687.

Kuzma, L., Rozalski, M., Walencka, E., Rozalska, B. and Wysokkinska, H. (2007). Antimicrobial activity of diterpinoids from hairy roots of *salvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. *Phytomedicine, 14*, 31-35.

Laplante, K. L., & Mermel L. A. (2009). In vitro activities of telavancin and vancomycin against biofilm-producing *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Enterococcus faecalis* Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53*(7), 3166-3169. doi:10.1128/ AAC.01642-08

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

Mah, T. F. C. & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trendsin Microbiology, 9*(1), 34-39.

Males, B. M., Rogers, W. A., & Parisi, J. T. (1975). Virulence factors of biotypes of *Staphylococcus epidermidis* from clinical sources. *Journal of Clinical Microbiology, 1*(3), 256-261.

Mancini, A. J. (2008) . Incidence, prevalence and pathophysiology of acne. *Proceedings, 8*(4), 100-205.

Namvar, A. E., Bastarahang, S., Abbasi, N., Ghehi, G. S., Farhadbakhtiarian, S., Arezi, P., . . . Chermahin, S. G. (2014). Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hygiene and Infection Control, 9*(3), 91-10.

Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., Mori, A., Kobayashi, K., & Fukushima M. (1987). Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry, 51*(1), 139-143.

O' Gara, J. P., & Humphreys, H. (2001). *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implication. *Journal of Medical Microbiology, 50*, 582-587.

Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*-the "accidental" pathogen. *Nature Reviews Microbiology, 7*(8), 555–567. doi:10.1038/nrmicro2182

บรรณานุกรม (ต่อ)

Parija, S. C. (2012). *Microbiology and Immunology* (2nd ed.). Haryana: Elsevier.

Prasher, I. B., Chandel, V. C., & Ahluwalia, A. S. (2012). Influence of culture conditions on mycelial growth and luminescence of *Panellus stipticus* (bull.) P. Karst. *Journal of Research in Biology, 2*(3), 152-159.

Saising, J., Dube,L., Ziebandt, A.K., Voravuthikunchai, S.P., Nega, M. and Getz, F. (2012) Activity of Gallidermin on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56*(11), 5804-5810. doi: 10.1128/AAC.01296-12

Saising, J., Ongsakul, M. and Voravuthikunchai. S. P. (2011). *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. ethanol extract and rhodomyrtone: a potential strategy for the treatment of biofilm-forming staphylococci. *Journal of Medical Microbiology, 60*, 1793-1800. doi: 10.1099/jmm. 0.033092-0

Saising, J., Singdam, S., Ongsakul, M. and Voravuthikunchai, S. P. (2012). Lipase, protease, and biofilm as the major virulence factors in staphylococci isolated from acne lesions. *BioScience Trends, 6*(4), 160-164. doi: 10.5582/bst.2012.v6.4.160

Saito, S. T., Trentin, D. S., Macedo, A. J., Pungartnik, C., Gosmann, G., Silveira, J. D., . . . Brendel, M. (2012). Bioguided fractionation shows *Cassia alata* extract to inhibit *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* growth and biofilm formation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* 1-13. doi:10.1155/2012/867103

Sakimura,T., Kajiyama, S., Adachi, S., Chiba, K., Yonekura, A., Tomita, M., . . . Osaki, M. (2015). Biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* expressing vancomycin resistance early after adhesion to a metal surface. *BioMed Research International, 2015*, 1-9.

Scazzocchioa, F., D'Auriaa, F. D., Alessandrinia, D., Pantanellab, P. (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research, 161,* 327-333. doi:10.1016/ j. micres.2005.12.003

Shimomura, O. (2006). *Bioluminescence: chemical principles and methods.* Singapore, World Science Publishing.

Shirmila, J. G. & Radhamany, P. M. (2012). Identification and determination of antioxidant constituents of bioluminescent mushroom. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2*(14), 386-391.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Stepanovic, S., Cirkovic, I. C., Ranin, L., & Vlahovic, M. S. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology, 38*, 428-432. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x

Titus, S. & Hodge, J. (2012). Diagnosis and treatment of acne. *American Family Physician, 86*(8), 734-740.

Venkatesh, M. P., Placencia, F., & Weisman, L. E. (2006). Coagulase-negative Staphylococcal infections in the neonate and child: an update. *Seminars in pediatric infectious diseases, 17*, 120-127.

Vuong, C., Gotz, F. & Otto, M. (2000). Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis. Infection and Immunity, 68*(3), 1048-1053.

Vydryakova, G. A., Van, D. T., Shoukouhi, P., Psurtseva, N. V. & Bissett, J. (2011). Intergenomic and intragenomic ITS sequence heterogeneity in *Neonothopanus nambi* (Agaricales) from Vietnam. *Mycology, 3*(2), 89-99.

Wang, X., Qiu, S., Yao, X., Tang, T., Dai, K., & Zhu, Z. (2009). Berberine inhibits *Staphylococcus epidermidis* adhesion and biofilm formation on the surface of titanium alloy. *Journal of Orthopaedic Reserch Novembe,* 1-6. Doi: 10.1002/jor.20917

Williams, D. L., & Bloebaum, R. D., (2010). Observing the biofilm matrix of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 grown using the CDC biofilm reactor. *Microscopy and Micro-analysis, 16*, 143-152. doi:10.1017/S143192760999136X

Zhang, Y. Q., Ren, S. X., Li, H. L., Wang, Y. X., Fu, G., Yang, J., . . . Wen, Y. M. (2003). Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Molecular Microbiology, 49*(6), 1577-1593.

Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lobner, I., Gotz, F., & Hacker, J. (1999). A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Molecular Microbiology, 32*(2), 345-356.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	มัชฌิมาภรณ์ ศักดิ์แพทย์
วัน เดือน ปีเกิด	26 ตุลาคม 2532
สถานที่เกิด	จังหวัดตราด ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา, 2555
ที่อยู่ปัจจุบัน	1/104 ซอยโกสุมรวมใจ40 แขวงดอนเมือง เขตดอนเมือง กรุงเทพมหานคร
สถานที่ทำงาน	บริษัท วิช ฟรอม มอม จำกัด
ตำแหน่งปัจจุบัน	ผู้จัดการทั่วไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University