โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อก่อสิว *Cutibacterium acnes* จากสารที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

Screening of anti-*Cutibacterium acnes* activity of compounds from natural resources.

ชื่อนิสิต นางสาวสามินี มีผิวหอม **รหัสประจำตัวนิสิต** 5932356023

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อก่อสิว *Cutibacterium acnes* จากสารที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์.ดร.ชุลี ยมภักดี

นิสิตในโครงการ

นางสาวสามินี มีผิวหอม รหัสประจำตัวนิสิต 5932356023

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

หัวข้อโครงงาน การคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อก่อสิว *Cutibacterium acnes* จากสารที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

โดย นางสาวสามินี มีผิวหอม เลขประจำตัวนิสิต 5932356023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี

ปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน

(รองศาสตราจารย์ ดร. ชลี ยมภักดี)

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ศิตา วีรกุล)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Cutibacterium acnes* จากสารสกัดที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

ชื่อนิสิต นางสาวสามินี มีผิวหอม รหัสประจำตัว 5932356023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์.ดร.ชุลี ยมภักดี

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

สิวเป็นหนึ่งในปัญหาผิวหนังที่พบได้บ่อยที่สุดในวัยรุ่น จัดเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการอักเสบเรื้อรังของหน่วยของเส้นขน (Pilosebaceous unit) ซึ่งเกิดจากการอุดตันของต่อมไขมัน และส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อสิว *Propionibacterium acnes* ซึ่งปัจจุบันเปลี่ยนมาใช้ชื่อ *Cutibacterium acnes* การรักษาโดยใช้ยาทาภายนอกและยาปฏิชีวนะชนิดให้เข้าสู่ร่างกายนั้นเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการดื้อยาที่เกิดจากการใช้ยาอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการต้องหาสารชนิดใหม่ๆที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* มาเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านสิวต่อไป สารที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติเป็นแหล่งที่มีความน่าสนใจ ในการหายาใหม่ เนื่องจากมีความหลากหลายของโครงสร้างสูง ในงานวิจัยนี้มุ่งหมายในการคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* จากสารที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ ด้วยวิธี Resazurin Microtiter Plate Assay (REMA) รวมถึงหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ของสารออกฤทธิ์ที่ได้ หลังจากนั้นคัดเลือกสารที่ให้ผลบวกที่มีฤทธิ์ดีที่สุด มาทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันกับกรดธรรมชาติที่มีฤทธิ์อยู่แล้ว เพื่อหาสารที่ออกฤทธิ์ส่งเสริมกันโดยวิธี checkerboard dilution ผลการศึกษาพบว่า จากการคัดกรองหาสารบริสุทธิ์ที่แยกจากแหล่งธรรมชาติหรืออนุพันธุ์ของมันทั้งหมด 48 สาร พบว่ามี 11 สาร ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* ATCC11827 เมื่อนำสารธรรมชาติทั้ง 11 สารมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) พบว่าสาร AS-CY 1012 และ AS-CY 1013 มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ที่เป็นสิวดีที่สุด โดยมีค่า MIC ของทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) ของสารที่ให้ผลบวกทั้ง 11 สารกำลังอยู่ระหว่างการทดสอบ จากการนำสาร AS-CY 1012 และ AS-CY 1013 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* ได้ดีที่สุด มาทดสอบฤทธิ์ร่วมกับกรดธรรมชาติ salicylic acid พบว่าสาร AS-CY 1012 กับ salicylic acid ไม่มีฤทธิ์เสริมกัน ในขณะที่สารธรรมชาติ AS-CY1013 กำลังอยู่ในระหว่างการทดสอบ จากการทดสอบทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่าสาร AS-CY 1012 และ AS-CY 1013 มีศักยภาพที่สามารถนำมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์รักษาสิวได้

Project Title Screening of anti-Propionibacterium acnes activity from compounds from natural resources.

Investigator Miss Saminee Meephewhom

Advisor Associate. Professor. Chulee Yompakdee, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of science, Chulalongkorn University,2019

Abstract

Acne vulgaris is one of the most prevalent skin conditions affecting teenagers. It is a disease of the pilosebaceous unit. Blockage of sebaceous glands and colonization with *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) leads to acne formation. Acne treatments using topical and systemic antibiotics have led to drug resistance due to selective pressure. Therefore, searching for new compounds with affective anti-*C. acnes* activity is in need. Compounds isolated from natural sources are interesting for drug discover due to their high in structural diversity. The aim of this study is to screen natural compounds with anti-*C. acnes* activity using Resazurin Microtiter plate Assay (REMA) including determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of the candidate compounds. Then, the most efficient candidates were selected for combined treatment with natural acid by using checkerboard dilution assay. It was found that 11 out of 48 natural compounds screened could inhibit growth of *C. acnes* ATCC 11827. After that, all 11 candidates were tested for Minimal Inhibitory Concentration (MIC). The result showed that Compounds AS-CY 1012 and AS-CY 1013 exhibited the best growth inhibitory activity against *C. acne* ATCC 11827 and *C. acne* DSM 1897 (the clinical isolated strain) with MIC values at 6.25 µg/ml. However, Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of all in candidates are under investigation. Then, both of compounds AS-CY 1012 and AS-CY 1013 were tested in combination with natural acid, salicylic acid, the results revealed that compound AS-CY 1012 and salicylic acid showed indifferent effect. While the compound AS-CY 1013 is under investigation. It could be concluded that AS-CY1012 and AS-CY 1013 are high potential to be used as an ingredient in acne treatment products.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วย เหลืออย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่เสนอแนวคิดริเริ่มงานวิจัย และติดต่อประสานงาน รวมทั้งได้กรุณาให้ความรู้ แนวคิด และความห่วงใยตลอดมา ทำให้งานวิจัยสำเร็จไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ภูวไพรศิริศาล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สาร PP2001 ถึง PP2017 จำนวน 17 สาร และศาสตราจารย์ ดร. อภิชาต สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ให้ความอนุเคราะห์สาร AS-CY 204 ถึง AS-CY 1017 จำนวน 31 สาร

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยและตัวผู้วิจัยเองในอนาคต

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562 ที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ ในห้องปฏิบัติการ 2017 เพื่อน ๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยาและเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาแนะนำในเรื่องต่าง ๆ ทั้งในด้านความรู้วิชาการ และเทคนิคการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ เพื่อเสริมศักยภาพในการปฏิบัติงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา สมาชิกครอบครัวทุกคน ตลอดจนเพื่อน ๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และให้กำลังให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ด้วยความเคารพอย่างสูง

สามินี มีผิวหอม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
Abstract	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญรูป	V
สารบัญตาราง	VIII
บทที่ 1 : บทนำ	1
บทที่ 2 : วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย	21
บทที่ 3 : ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	29
บทที่ 4 : สรุปผลการทดลอง	50
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก ก	54
ภาคผนวก ข	55
ภาคผนวก ค	59

สารบัญรูป

หน้า

รูป 1-1 แสดงองค์ประกอบของชั้นหนังกำพร้า 2
รูป 1-2 แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบของผิวหนัง 3
รูป 1-3 แสดงลักษณะทางคลินิกชนิดต่าง ๆ ของสิว 6
รูป 1-4 แสดงลักษณะของเชื้อ *C. acnes* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 7
รูป 1-5 แสดงกลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย 12
รูป 1-6 แสดงประสิทธิภาพของ Succinic acid ต่อปริมาณของเชื้อก่อสิว *P. acnes* 13
รูป 1-7 แสดงประสิทธิภาพของ Salicylic acid ต่อการยับยั้งการเกิดสิว 14
รูป 1-8 Agar diffusion method 15
รูป 1-9 Agar dilution technique 16
รูป 1-10 Broth Microdilution test 17
รูป 1-11 แสดงกลไกการเปลี่ยนสีของ resazurin 18
รูป 1-12 แสดง checkerboard assay 18
รูป 3-1 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ AS-CY 204-209 29
รูป 3-2 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ AS-CY 210-215 30
รูป 3-3 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ AS-CY 216-221 30
รูป 3-4 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ AS-CY 222-226 30
รูป 3-5 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ AS-CY 1010-1017 31
รูป 3-6 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ PP2001-2008 31
รูป 3-7 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ PP2009-2017 31
รูป 3-8 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 205 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 34
รูป 3-9 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 205 ต่อ *C. acnes* DSM 1897 35
รูป 3-10 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 211 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 35

หน้า

รูป 3-11 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 211 ต่อ *C. acnes* DSM 1897 35
รูป 3-12 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 212 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 36
รูป 3-13 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 212 ต่อ *C. acnes* DSM 1897 36
รูป 3-14 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1012 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 36
รูป 3-15 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1012 ต่อ *C. acnes* DSM 1897 37
รูป 3-16 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1013 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 37
รูป 3-17 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1013 ต่อ *C. acnes* DSM 1897 37
รูป 3-18 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1014 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 38
รูป 3-19 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1014 ต่อ *C. acnes* DSM 1897 38
รูป 3-20 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1016 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 38
รูป 3-21 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1016 ต่อ *C. acnes* DSM 1897 39
รูป 3-22 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2006 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 39
รูป 3-23 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2006 ต่อ *C. acnes* DSM 1897 39
รูป 3-24 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2012 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 40

หน้า

รูป 3-25 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2012 ต่อ *C. acnes* DSM 1897 40

รูป 3-26 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2016 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 40

รูป 3-27 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2016 ต่อ *C. acnes* DSM 1897 41

รูป 3-28 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2017 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 41

รูป 3-29 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2017 ต่อ *C. acnes* DSM 1897 41

รูป 3-30 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของกรด Succinic acid ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 47

รูป 3-31 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของกรด Salicylic acid ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 47

รูป 3-32 แสดงผล checkerboard dilution ของ AS-CY1012 และ Salicylic acid 48

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1-1 แสดงระดับความรุนแรงของสิว 6
ตาราง 1-2 แสดงวิธีการรักษาสิว 9
ตาราง 2-1 รายชื่อสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 23
ตาราง 2-2 รายชื่อสารธรรมชาติและเพปไทด์ที่ใช้ในการทดลอง 23
ตาราง 3.1 สารที่นำมาคัดกรองฤทธิ์การเจริญของ C. acnes ATCC 11827 และความเข้มข้นตั้งต้น 32
ตาราง 3-2 ค่า MIC ของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* 45
ตาราง 3-3 ค่า MIC และค่า MBC ของสารธรรมชาติและเพปไทด์ 46

บทที่ 1

บทนำ

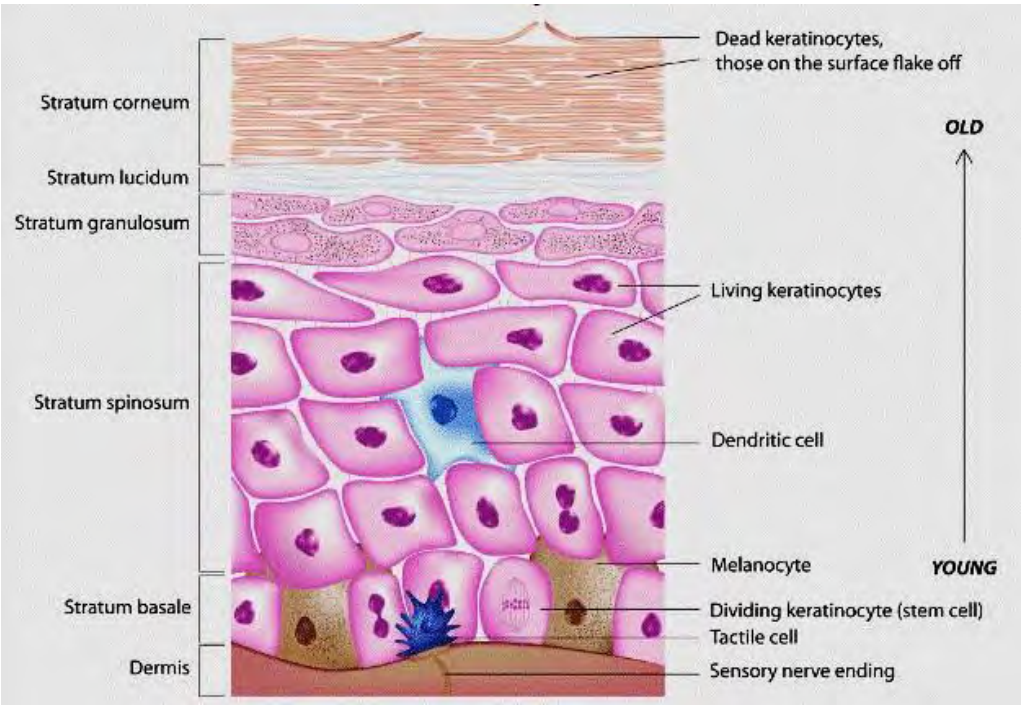
ผิวหนังจัดเป็นหนึ่งในอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดของร่างกาย มีโครงสร้างที่ซับซ้อน ประกอบด้วย เซลล์และเนื้อเยื่อหลายชนิด มีหน้าที่สำคัญต่อร่างกายในการดำรงชีวิต เช่น การป้องกันเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม การป้องกันแสงอัลตราไวโอเล็ต การรับความรู้สึก การหายของบาดแผล รวมถึงมีผลต่อภาวะทางจิตใจ ได้แก่ ด้านภาพลักษณ์ ความงาม เป็นต้น (Richard Wong, 2015) โดยเมื่อเข้าสู่ช่วงวัยรุ่น ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่วัยผู้ใหญ่มากขึ้น มักเกิดปัญหาผิวต่าง ๆ ขึ้น ซึ่งเกิดขึ้นจากหลายปัจจัย แต่หนึ่งในปัญหาสำคัญ คือ ปัญหาสิว โดยเกิดจากการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนในร่างกาย เช่น ฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศชายที่ผลิตมากในช่วงวัยรุ่น และสามารถพบได้ในเพศหญิงเช่นเดียวกัน โดยมีบทบาทสำคัญที่ทำให้ผิวผลิตน้ำมันมากขึ้น และนำไปสู่การเกิดสิว (Williams et al., 2012)

โครงสร้างของผิวหนัง (Structure of skin) แบ่งได้ 3 ชั้น (McGrath และ Uitto, 2010)

1. หนังกำพร้า (Epidermis) หนังกำพร้าเป็นชั้นนอกสุดของผิวหนัง มีความหนาประมาณ 0.05-0.1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเซลล์หลัก 4 ชนิด ได้แก่
   1.1. Keratinocytes เป็นเซลล์หลักของหนังกำพร้าแบ่งเป็นชั้นตามรูปร่างและส่วนประกอบในเซลล์ จัดเป็น stratified squamous epithelium เรียงจากชั้นในไปนอกสุด ตามลำดับ ได้แก่ Stratum basale หรือ stratum germinativum เป็นชั้นล่างสุดประกอบด้วยเซลล์รูปร่างสี่เหลี่ยม (cuboidal cell), Stratum spinosum เป็นชั้นที่ประกอบด้วยเซลล์ keratinocytes ซ้อนกัน รูปร่างเป็นหนาม (spinous/prickle cell), Stratum granulosum ประกอบด้วยเซลล์ keratinocytes ซ้อนกัน 3-5 ชั้น ลักษณะเด่นคือมีเม็ด granule ภายในเซลล์ ซึ่งเม็ด granule ดังกล่าวคือ keratohyaline granules มีหน้าที่ช่วยใน การสร้าง keratin Stratum corneum หรือผิวหนังชั้นขี้ไคล (keratin) เป็นชั้นนอกสุดของหนังกำพร้า เซลล์มีรูปร่างแบนมีไขมันมาเคลือบระหว่างเซลล์ สำหรับชั้น stratum lucidum เป็นเพียงช่องว่างระหว่างชั้น stratum granulosum and stratum corneum โดยพบได้ที่ผิวหนังบริเวณฝ่ามือฝ่าเท้า การแบ่งตัวและเจริญของ keratinocytes จากชั้น stratum basale ไปถึงชั้น stratum corneum ใช้ เวลา 2 สัปดาห์ และชั้น stratum corneum ใช้เวลาลอกหลุดอีก 2 สัปดาห์ ทำให้ระยะเวลารวมของผิวหนัง ชั้นกำพร้าจากชั้นล่างสุดเจริญไปจนเป็นชั้นขี้ไคลแล้วลอกหลุดออกใช้เวลารวม 4 สัปดาห์
   1.2. Melanocytes เป็นเซลล์ที่สร้างจาก neural crest ลักษณะรูปร่างเป็น dendrite cell แทรกตัว อยู่ในชั้น stratum Basale มีหน้าที่สร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin) แล้วส่งออกให้ keratinocytes ทำให้เกิดสี ผิวแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติและในรอยโรคต่าง ๆ ของผิวหนัง

1.3. Langerhans cells เป็นเซลล์ที่สร้างจาก mesoderm มีต้นกำเนิดที่ไขกระดูก ลักษณะเป็น dendrite cell เช่นกัน แทรกตัวในชั้นหนังกำพร้า ทำหน้าที่เป็น antigen presenting cells ในการจับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่บริเวณผิวหนังและส่งต่อไปยังต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง ซึ่งเป็นกุญแจสำคัญ สำหรับการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของร่างกายแบบจำเพาะ (adaptive immune responses)

1.4. Merkel cells เป็นเซลล์ที่แทรกตัวอยู่ในชั้น stratum Basale หน้าที่ยังไม่ทราบชัดเจนแต่เชื่อว่า ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ mechanoreceptor ตอบสนองต่อการสัมผัส และ neuroendocrine functions ในชั้นหนังกำพร้า เซลล์ keratinocytes ยึดติดกันด้วยโปรตีนหลายกลุ่มที่สำคัญคือ desmosome สำหรับการยึดติดกับหนังแท้มีชั้น basement membrane (Dermo-epidermal junction) เป็นตัวกั้น มีส่วนประกอบโปรตีนหลายชนิดในชั้นนี้ เช่น hemidesmosome, collagen type IV, VII, XVII เป็นต้น



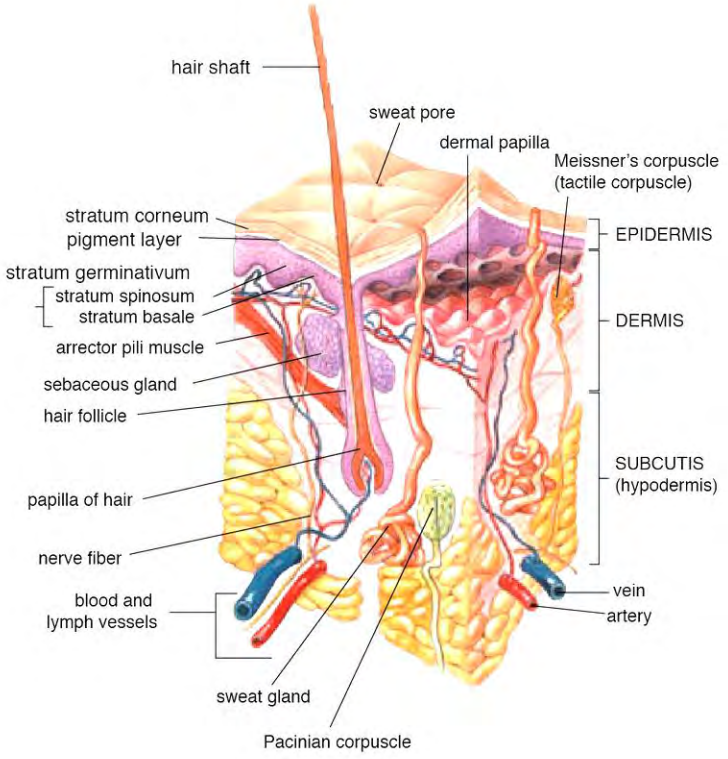
รูป 1-1 แสดงองค์ประกอบของชั้นหนังกำพร้า (Epidermis)
ที่มา : https://www.pharmabeautycare.com/content

2. หนังแท้ (Dermis)

หนังแท้ประกอบด้วย 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นเซลล์ และส่วนที่ไม่ใช่เซลล์ (Extracellular matrix) โดยเซลล์ที่สำคัญในหนังแท้คือ fibroblasts มีหน้าที่ในการสร้างเส้นใยโปรตีนที่สำคัญคือ collagen (80-85%) และ elastic fibers (2-4%) และสร้างสารที่เรียกว่า ground substance ซึ่งเป็นสารพวก polysaccharides ในชั้นหนังแท้มีเส้นเลือดและเส้นประสาทมาเลี้ยงจำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีรยางค์ของผิวหนัง (Skin appendages) ได้แก่ หน่วยของเส้นขน (Pilosebaceous unit) ซึ่งประกอบด้วยเส้นขน (Hair follicle) ต่อมไขมัน (Sebaceous gland) ต่อมเหงื่อชนิด apocrine (Apocrine sweat gland) และกล้ามเนื้อเรียบ (Arrector pili muscle) รยางค์ของผิวหนังยังพบ ต่อมเหงื่อชนิด eccrine (Eccrine sweat gland) ซึ่งมีหน้าที่ผลิตเหงื่อ และเล็บ (Nail) ซึ่งมีโครงสร้างและส่วนประกอบที่มีชื่อเฉพาะ

3. ผิวหนังชั้นไขมัน (Hypodermis หรือ Subcutis)

ผิวหนังชั้นไขมัน (Hypodermis หรือ Subcutis หรือ Subcutaneous fat หรือ Panniculus) ประกอบด้วยเซลล์ไขมัน เรียกว่า adipocytes ซึ่งจะอยู่กันเป็นก้อน (fat lobule) และกั้นด้วยผนังเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (fat septum) ซึ่งมี collagen หลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง เป็นส่วนประกอบ



รูป 1-2 แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบของผิวหนัง

ที่มา : http://mayskin.blogspot.com

สิวเป็นโรคผิวหนังที่พบบ่อยชนิดหนึ่งในวัยหนุ่มสาว เมื่อมีอายุมากขึ้นสิวจะลดน้อยลง จนหายไปในที่สุด แต่ผู้ป่วยบางรายยังคงเกิดสิวอยู่ หลังพ้นจากวัยรุ่นไปแล้ว เนื่องจากสิวเกิดจากการอักเสบของต่อมไขมัน (sebaceous) ทำให้เรามักจะพบสิวในบริเวณที่มีต่อมไขมันมาก เช่น ใบหน้า หน้าอก หลังส่วนบน คอ ไหล่ หรือต้นแขน โดยพบได้หลายระยะทั้งสิวอุดตัน เช่น สิวหัวเปิดสีดำหรือสิวหัวปิดซึ่งจะเห็นเป็นหัวขาว ๆ อยู่ใต้ผิวหนัง ต่อมาอาจกลายเป็นสิวอักเสบเห็นเป็นตุ่มแดง (papulonodular) ได้ บางรายถ้าการอักเสบมากอาจพบเป็นตุ่มหนอง (pustule) หรือเป็นสิวอักเสบขนาดใหญ่ที่อยู่ลึกลงไปใต้ผิวหนังที่ เรียกว่า สิวหัวช้าง (nodulocystic) ได้ด้วย โดยทั่วไปแล้วอาการสิวอักเสบอาจหายได้เองในเวลาหลาย ๆ ปีแต่การที่มีสิวอักเสบนั้น ทำให้เสียความมั่นใจ และมีความกังวลใจได้ นอกจากนี้ถ้าไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้องอาจเกิดแผลเป็นตามมา ดังนั้น การรักษาสิวจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่อาจเกิดตามมาภายหลัง

สาเหตุ 4 ประการที่นำไปสู่การก่อตัวของสิว (Williams et al., 2012)

1. Seborrhea คือ การผลิตน้ำมันของต่อมไขมันในผิวมากเกินไป เกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น ฮอร์โมน สภาพอากาศ ยาบางชนิด พันธุกรรม เป็นต้น
2. Hyperkeratosis คือ การที่ผิวหนังชั้นนอกสุด (Stratum corneum) เกิดการหนาตัวขึ้นผิดปกติ เนื่องจากเกิดการผลัดเซลล์ผิวที่ตายแล้วผิดปกติ ทำให้เกิดการอุดตันของท่อต่อมไขมัน และส่งผลรบกวนการไหลของน้ำมันออกมานอกผิวหนัง
3. Microbial colonization คือ แบคทีเรีย Propionibacterium acne ที่เจริญเติบโตอยู่บริเวณรูขุมขน เป็นสาเหตุให้สิวอุดตัน เกิดการอักเสบ บวมแดง หรือเป็นหัวหนองขึ้นมา
4. Inflammation คือ กระบวนการอักเสบของร่างกาย ทำให้เกิดสิวบวมแดงและอักเสบขึ้น ในกรณีที่เป็น Severe acne การอักเสบจะขยายและลึกลงไปในบริเวณเนื้อเยื่อที่อยู่ใกล้เคียงมากขึ้น

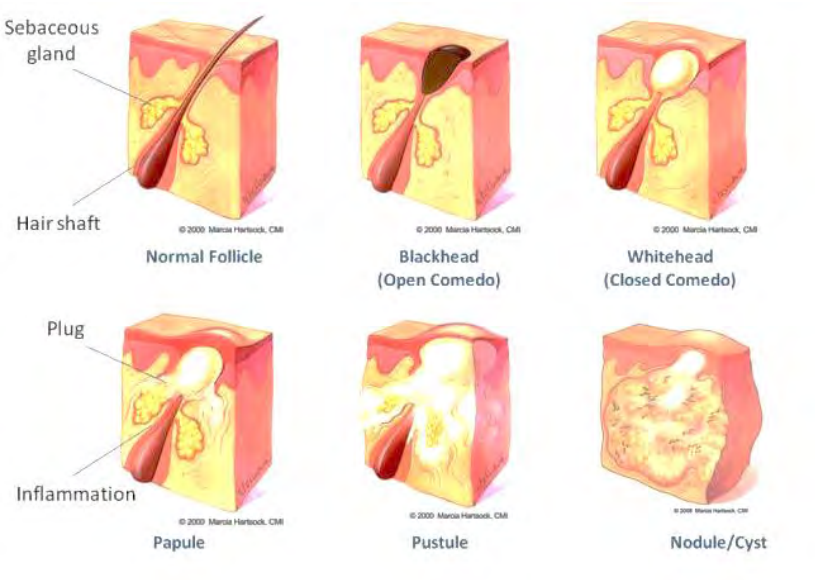
ปัจจัยสำคัญที่เป็นสาเหตุการเกิดสิว

1. **การเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน** ระดับฮอร์โมนแอนโดรเจน(androgen) ที่สูงขึ้นในช่วงวัยรุ่น โดยเฉพาะใน เพศชาย ทำให้สามารถพบสิวในช่วงอายุนี้มากกว่าช่วงอายุอื่น ๆ ฮอร์โมนนี้ทำหน้าที่กระตุ้นให้ต่อมไขมันมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีการสร้างไขมันออกมามากขึ้น ทำให้มีการอุดตันของรูขุมขนตามมา เกิดเป็นสิวอุดตันและกลายเป็นสิวอักเสบในที่สุด ในผู้หญิงบางราย อาจพบทั้งสิวอุดตันและสิวอักเสบขึ้นบ่อยในช่วงก่อนมีประจำเดือน ซึ่งเป็นช่วงที่ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพิ่มสูงขึ้น ทำให้รูขุมขนบวม และเกิดการคั่งของน้ำในร่างกาย
2. **ความเครียด** เมื่อเกิดความเครียด ร่างกายจะหลั่งฮอร์โมนคอร์ติซอลซึ่งไปกระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังผลิตน้ำมันออกมามากขึ้น ซึ่งเป็นอีกสาเหตุหนึ่งของการเกิดสิว
3. **กรรมพันธุ์** พบว่าถ้าบุคคลในครอบครัวเป็นสิวและมีสภาพผิวมัน จะมีโอกาสเป็นสิวได้มากกว่าสภาพผิวชนิดอื่น ๆ โดยทั่วไปผู้ที่มีผิวมันมักมีรูขุมขนกว้าง ผิวหยาบ รวมทั้งหน้ามันเยิ้ม ทำให้เกิดสิ่งสกปรกสะสม ง่ายต่อการเกิดสิว

4. **การติดเชื้อแบคทีเรีย** *Propionibacterium acne* (*P. acne*) เป็นหนึ่งในสาเหตุการเกิดสิวที่สำคัญ เพราะทำให้แบคทีเรียไมโครไบโอม (Microbiome) บนผิวไม่สมดุลซึ่งอาจทำให้เกิดสิวได้เช่นกัน แบคทีเรียไมโครไบโอม ที่สมดุลมีประโยชน์ต่อการสร้างเกราะป้องกันผิว หากมีจำนวนไมโครไบโอมที่ไม่สมดุล ผิวจะอ่อนแอ และเกิดสิวได้
5. **การใช้เครื่องสำอางหรือครีมบำรุงผิว** เป็นสาเหตุสำคัญของสิวอุดตันและสิวอักเสบ โดยเฉพาะในผู้ที่มีผิวแพ้ง่าย เนื่องจากเครื่องสำอางบางประเภทมีน้ำมันเป็นส่วนประกอบ ซึ่งอาจทำให้เกิดการอุดตัน
6. **การกินอาหารบางประเภท** ช็อคโกแลต อาจเป็นสาเหตุของการเกิดสิวได้ แม้จะยังไม่มีหลักฐานรองรับ

ลักษณะทางคลินิกของสิว แบ่งเป็น 2 ประเภท

1. **สิวไม่อักเสบ (noninflammatory acnes) ได้แก่**
   - **1.1** สิวหัวขาว (closed or white comedones) ลักษณะเป็นตุ่มนูนเล็กน้อย เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 มิลลิเมตร มีสีเดียวกับผิวหนังปกติ เกิดจากการอุดตันสะสมอยู่ในท่อเปิดของต่อมไขมันและรูขุมขน (Pilosebaceous unit) แต่ท่อเปิดจะเล็กมากจนมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า
   - **1.2** สิวหัวดำ (opened or black comedones) ลักษณะเป็นตุ่มนูนเล็กน้อย เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 มิลลิเมตร เป็นจุดสีดำปรากฏบนผิวหนัง เกิดจากการอุดตันของขน เนื้อเยื่อ และไขมันภายในรูขุมขน สารเมลานิน (melanin) หรือเม็ดสีที่เซลล์ผิวหนังจะทำปฏิกิริยากับสารที่อุดตันให้เปลี่ยนเป็นสีดำ ในขณะที่สารเหล่านั้นจะโผล่พ้นขึ้นมาสัมผัสกับออกซิเจน
2. **สิวอักเสบ (inflammatory acnes) ได้แก่**
   - 2.1 สิวชนิดตุ่มนูนแดง (papules) ขนาดไม่เกิน 0.5 เซนติเมตร เป็นสิวอักเสบในระยะแรกที่เปลี่ยนมาจากสิวอุดตัน (comedones)
   - 2.2 สิวหัวหนอง (pustules) มีลักษณะเป็นตุ่มแดงและปวด ข้างบนตุ่มมีหัวหนองสีเหลือง
   - 2.3 สิวอักเสบแดงเป็นก้อนเล็ก (nodules) มีลักษณะคล้ายกับสิวอักเสบแบบตุ่มนูนแดง แต่มีขนาดใหญ่กว่า แข็งเป็นไต เมื่อสัมผัสหรือกดจะรู้ว่าอยู่ลึกใต้ผิวหนัง
   - 2.4 สิวเป็นถุงขนาดใหญ่ใต้ผิวหนัง (cysts) พบได้ไม่บ่อย ถุงน้ำใต้ผิวหนังอาจมีขนาดใหญ่หลายเซนติเมตร ไม่แดง ไม่ปวด มีลักษณะเป็นถุงภายในมีของเหลวข้นหนืดสีเหลือง สิวชนิดนี้แม้รักษาจนยุบแล้ว มันจะกลายเป็นแผลเป็นก้อนนูนหรือหลุมสิวขนาดใหญ่



รูป 1-3 แสดงลักษณะทางคลินิกชนิดต่าง ๆ ของสิว

ที่มา : https://sites.google.com/site/ploy580410127

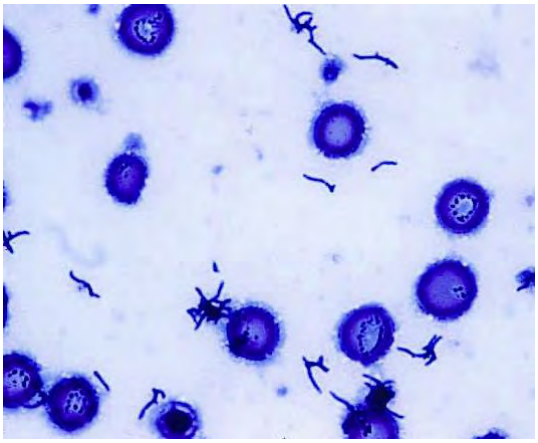
ตาราง 1-1 แสดงระดับความรุนแรงของสิว (นพ.นภดล และคณะ, 2010)

ระดับความรุนแรง	**ลักษณะ**
สิวเล็กน้อย	หัวสิวไม่อักเสบเป็นส่วนใหญ่ หรือ มีสิวอักเสบ (papule/pustule) ไม่เกิน 10 จุด
สิวปานกลาง	มี papule/pustule ขนาดเล็กมากกว่า 10 จุด และ/หรือ มี nodule น้อยกว่า 5 จุด
สิวรุนแรง	มี papule/pustule จำนวนมาก หรือมี nodule/cyst เป็นจำนวนมาก หรือมี nodule อักเสบอยู่นานและกลับเป็นซ้ำหรือมีหนองไหล

เชื้อแบคทีเรียก่อสิว (Dreno B, 2018 และ Perry AL, 2006)

ผิวหนังประกอบด้วยกลุ่มประชากรแบคทีเรียหลัก 3 กลุ่ม คือกลุ่ม *Corynebacteria*, *Propionibacteria* และ *Staphylococci* ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) เป็นสาเหตุหลักของการเกิดสิว ส่งผลต่อการอักเสบของผิวหนัง โดยจากการตรวจสอบทางพันธุกรรมและ metagenomic เมื่อไม่นานมานี้ ทำให้เปลี่ยนชื่อของ *P. acnes* ไปเป็น *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) (Dreno B, 2018)

ซึ่งลักษณะสำคัญของ *C. acnes* คือ สามารถเจริญได้ดีในบริเวณที่มีไขมัน เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแบบกลมรี ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่ทนได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน ได้กรดโพรดิโอนิค (Propionic acid) เป็นผลผลิตจากการหมัก (Perry AL, 2006)



รูป 1-4 แสดงลักษณะของเชื้อ *C. acnes* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ที่มา : https://www.doctor.or.th/clinic/detail/6867

การรักษาสิว (Rathi SK, 2011 และ Kraft J, 2011)

วิธีการที่ใช้ในการรักษาสิวขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรง ความพึงพอใจในการรักษา อายุ และการตอบสนองต่อการรักษาก่อนหน้านี้ ซึ่งเป้าหมายในการรักษาจะแตกต่างกันตามกลไกการเกิดสิว เช่น ลดการผลิตฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) ลดการผลิต sebum เพื่อป้องกันการอุดตันของรูขุมขน ลดการเพิ่มจำนวนของ *P. acnes* และลดการอักเสบ เป็นต้น

หลักการรักษาสิว

1. ควรหยุดสาเหตุที่ทำให้เกิดสิว เช่น การงดใช้เครื่องสำอางที่ไม่จำเป็น
2. งดการกระทำที่จะทำให้สิวที่เป็นอยู่เป็นเพิ่มมากขึ้น เช่น การบีบสิว
3. การใช้ยารักษาสิว ควรปรึกษาแพทย์เพื่อรักษา ไม่ควรซื้อยามารักษาเอง เนื่องจากอาจไม่ตรงกับชนิดของสิว รวมถึงอาจทำให้เชื้อสิวเกิดการดื้อยาได้
4. ต้องมีความอดทน เนื่องจากการรักษาสิวส่วนมากต้องใช้เวลานาน

การรักษาแบ่งออกเป็น 2 วิธีหลัก

1. การใช้ยาทา (topical therapy) เหมาะกับผู้ป่วยที่เป็นสิวน้อย และสิวปานกลาง เป็นการรักษาที่อาจจะใช้ยาเพียงตัวเดียวหรือหลายตัวร่วมด้วย ได้แก่
   1.1 Benzoyl peroxide จัดเป็นยาที่ต้านการอักเสบ ยาลอกผิวหนัง และยาที่มีฤทธิ์ละลายหัวสิว มีรูปแบบผลิตภัณฑ์สำหรับล้าง โลชั่น ครีม และเจล โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5-10% ข้อจำกัด

ของยานี้ คือ ความเข้มข้นจะขึ้นกับการระคายเคืองของผิวหนัง ความแห้งกร้าน และมีอาการไหม้ ซึ่งเกิดได้ภายในเวลาอันรวดเร็วของการใช้ยา และจะยังคงอยู่เมื่อยังใช้ต่อไป

1.2 Topical retinoids กำจัดสิวอุดตันที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า (microcomedone) ยานี้จะใช้ในช่วงแรกของการรักษา อาจจะใช้เพียงตัวเดียว หรือใช้ร่วมกับตัวอื่น ช่วยลดการอุดตันของรูขุมขน ส่งผลให้ลดสิวอุดตันที่มองไม่เห็น สิวอักเสบ และสิวไม่อักเสบ ผลข้างเคียงที่สำคัญ คือ ผิวหนังระคายเคือง มีลักษณะเป็นผื่นแดง ผิวลอก ผิวไหม้

1.3 Topical antibiotics (ยาทาปฏิชีวนะ) อาจจะใช้เดี่ยวหรือใช้ร่วมกับยาอื่น ซึ่งยานี้มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของ *P. acnes* และลดการอักเสบ เช่น erythromycin และ clindamycin ซึ่งเป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาสิวและมีความหลากหลายของรูปแบบผลิตภัณฑ์ ผลข้างเคียงของยานี้ คือ มีอาการผื่นแดง ผิวลอก คัน ผิวแห้ง และผิวไหม้ ซึ่งผลข้างเคียงนี้เป็นการพัฒนาทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยา ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ยาเหล่านี้เดี่ยว ๆ

1.4 สารอื่น ๆ ได้แก่

1.4.1 Salicylic acid เป็นสารที่มีฤทธิ์ละลายหัวสิว

1.4.2 Azelaic acid มีประสิทธิภาพต่อสิวอักเสบและสิวอุดตัน

1.4.3 Lactic acid ช่วยป้องกันและลดสิว

2. การใช้ยากิน (Systemic therapy) จะเหมาะกับความรุนแรงของสิวปานกลางถึงสิวรุนแรง ไม่ควรใช้กับความรุนแรงของสิวน้อย เนื่องจากเสี่ยงต่อการดื้อยา โดยอาจใช้เป็นยากินปฏิชีวนะ การรักษาด้วยฮอร์โมน ยา tetracyclines และกลุ่มอนุพันธ์มักเป็นทางเลือกแรกที่ใช้ อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะควบคู่กับ topical retinoids อาจตอบสนองเร็วและมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ยาเพียงอย่างเดียว

ตาราง 1-2 แสดงวิธีการรักษาสิว

Severity; clinical findings	Treatment options	
	First line	Second line
Mild		
Comedonal	Topical retinoid	Alternative topical retinoid Salicylic acid washes
Papular/pustular	Topical retinoid Topical antimicrobial • benzoyl peroxide • clindamycin • erythromycin Combination products	Alternative topical retinoid plus alternative topical antimicrobial Salicylic acid washes
Moderate		
Papular/pustular	Oral antibiotics • tetracyclines • erythromycin • trimethoprim–sulfamethoxazole Topical retinoid ± benzoyl peroxide	Alternative oral antibiotic Alternative topical retinoid Benzoyl peroxide
Nodular	Oral antibiotic Topical retinoid ± benzoyl peroxide	Oral isotretinoin Alternative oral antibiotic Alternative topical retinoid Benzoyl peroxide
Severe	Oral isotretinoin	High-dose oral antibiotic Topical retinoid (also maintenance therapy) Benzoyl peroxide

(แหล่งที่มา : kraft J, 2011)

การใช้ Antimicrobial agent (Kanokwan, 2008)

Antimicrobial agent คือ สารเคมีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือฆ่าจุลินทรีย์ ได้โดยที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตที่ถูกจุลินทรีย์นั้นรุกราน นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะยังจัดเป็นยาต้านจุลินทรีย์ด้วย ซึ่งยาปฏิชีวนะ (antibiotic) คือ ยาต้านจุลินทรีย์ที่ได้มาจากสารที่ผลิตด้วยจุลินทรีย์ ได้แก่ รา และแบคทีเรีย รวมทั้งสารกึ่งสังเคราะห์ (semisynthetic) ที่มีลักษณะคล้ายสารธรรมชาติ

สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ดีควรมีคุณสมบัติ ดังนี้

1. มีฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเชื้อ
2. มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (bactericidal) มากกว่ายับยั้งการเจริญ (bacteriostatic)
3. ไม่ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาได้ง่าย
4. มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้าง (broad-spectrum)
5. ไม่เกิดอาการแพ้ยาหรือผลข้างเคียงเมื่อใช้ไปนาน ๆ

สามารถแบ่งยาต้านแบคทีเรียออกได้เป็น 3 ชนิด

1. การออกฤทธิ์ของยา (action of drug)
   1.1 Bactericidal คือ ยาที่มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย เช่น Penicillin, Streptomycin
   1.2 Bacteriostatic คือ การออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น Tetracycline
2. ขอบเขตการออกฤทธิ์ (antimicrobial spectrum)
   2.2 ยาที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์แคบ (Narrow spectrum) คือ ยาที่ออกฤทธิ์เฉพาะเชื้อกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง เช่น Erythromycin
   2.3 ยาที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้าง (Board spectrum) ยาที่ออกฤทธิ์ควบคุมหลายกลุ่ม เช่น chloramphenicol, tetracycline
3. กลไกการออกฤทธิ์ (mechanism of action)
   3.1 ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรีย จะทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ผนังเซลล์แตก ทำให้แบคทีเรียตายทันที จัดเป็นยาต้านจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียโดยตรง ยากลุ่มนี้มีความปลอดภัยสูง เนื่องจากเซลล์ของสัตว์ชั้นสูงทั่วไปไม่มีผนังเซลล์ ยากลุ่มนี้ได้แก่ ยากลุ่มเบตา-แลคแตม (β-lactam)
   3.2 ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของแบคทีเรีย มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย จะทำให้โปรตีนและไอออน รวมถึงของเหลวภายในเซลล์ไหลออกมานอกเซลล์ ทำให้แบคทีเรียตาย ยากลุ่มนี้มีพิษมากที่สุด เนื่องจากในเซลล์สัตว์ก็มีเยื่อหุ้มเซลล์เช่นเดียวกัน แต่เนื่องจากคุณสมบัติที่ต่างกัน ยาจึงมีผลทำลายเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียมากกว่าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของสัตว์
   3.3 ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย โดยไปยับยั้งการทำงานของไรโบโซม เซลล์จึงไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ ยากลุ่มนี้จึงไม่มีผลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เพียงแต่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเท่านั้น จำเป็นต้องใช้ภูมิต้านทานของร่างกายในการทำลายแบคทีเรียที่เหลืออยู่ โดยจะแบ่งเป็นกลุ่มที่ขัดขวางไรโบโซมชนิด 50S และกลุ่มที่ขัดขวางไรโบโซมชนิด 30S
   3.4 ยาที่มีผลทำให้กระบวนการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียผิดปกติ โดยยาจะไปจับกับ 30S ในเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียตาย เช่น Streptomycin
   3.5 ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิค (Nucleic acid) ขแงแบคทีเรีย โดยยากลุ่มนี้จะส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอ ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของแบคทีเรียได้ ยากลุ่มนี้จึงยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น Rifampicin

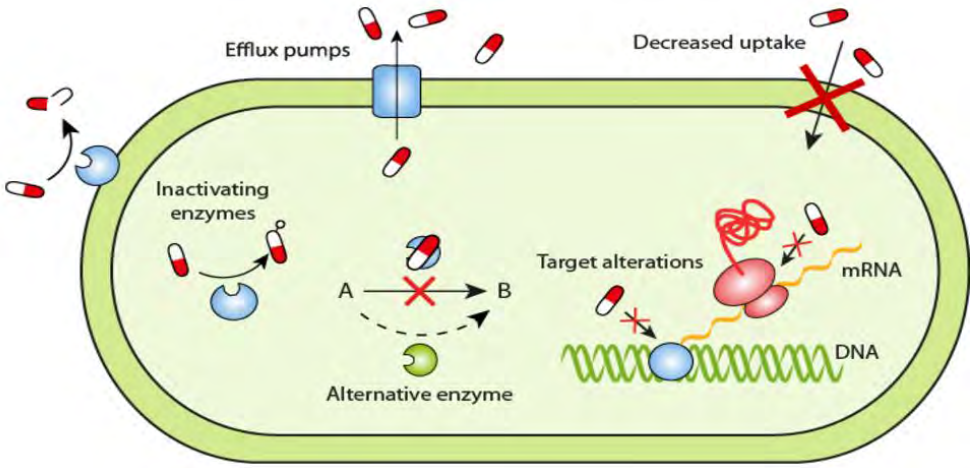
3.6 ยาที่มีผลขัดขวางกระบวนการเมทาบอลิซึม (Metabolism) ของแบคทีเรีย โดยยาจะไปยับยั้งกระบวนการเมทาบอลิซึมของกรดโฟลิกในแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตหรือแบ่งตัวได้ ยาจึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เช่น Sulfonamide

การดื้อยาปฏิชีวนะ (Drug resistance)

การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเป็นปัญหาที่ใหญ่ขึ้นและซับซ้อนมากขึ้นทุกขณะ เกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียมีการปรับตัวต่อยาโดยวิธีการต่าง ๆ เพื่อที่จะขจัดหรือลดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ โดยการดื้อยาอาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติของเชื้อนั้น ๆ หรืออาจเกิดภายใต้ความกดดันของยาปฏิชีวนะ

แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. Intrinsic resistance การที่เชื้อแบคทีเรียดื้อยาอยู่แล้วตามธรรมชาติ เช่น การกำจัดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบด้วยยา Vancomycin เนื่องจากยามีขนาดใหญ่จนไม่สามารถเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียได้
2. Acquired resistance เป็นกลไกที่แบคทีเรียพัฒนาขึ้นมาเพื่อขจัดหรือลดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะโดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 4 กลไกใหญ่ ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดอาจใช้หลาย ๆ กลไกรวมกันในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะแต่ละขนาน ดังนี้
   2.1 Drug inactivation/Modification เป็นกลไกที่พบมากที่สุด เกิดจากแบคทีเรียสร้างเอนไซม์มาทำลายหรือเปลี่ยนแปลงยาปฏิชีวนะ เช่น penicillinases
   2.2 Alteration of target site โดยวิธีการนี้ยาสามารถเข้าไปในผนังเซลล์เพื่อไปตำแหน่งเป้าหมายได้ แต่ไม่สามารถจับกับตำแหน่งเป้าหมายได้เพราะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมายของยา จึงทำให้ยาออกฤทธิ์ต่อไม่ได้ เช่น ใน *Streptococcus pneumoniae* โปรตีนที่จับกับ penicillin หรือ PBP (penicillin binding protein) จะเปลี่ยนโครงสร้างเป็น PBPX ทำให้เกิดการดื้อยาตามมา
   2.3 Bypass pathways เชื้อที่ดื้อยาสร้าง alternative target ขึ้นมาใหม่ แล้วยาปฏิชีวนะมาจับกับเป้าหมายอันใหม่แทน
   2.4 Decreased uptake แบคทีเรียมีกลไกป้องกันไม่ให้ยาเข้าไปภายในเซลล์ หรือใช้ energy-requiring membrane efflux pump นำยาออกไป



รูป 1-5 แสดงกลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย

ที่มา : https://www.semanticscholar.org/paper/An-Evaluation-of-Antibiotic-Resistance

กรดธรรมชาติ (Natural acid) (Kornphaka, 2019)

ปัจจุบันได้นำกรดธรรมชาติมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยารักษาสิวเพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดธรรมชาติสังเคราะห์ได้จากแหล่งธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยกว่าสารที่สังเคราะห์ขึ้น ทั้งยังสามารถลดการเกิดเชื้อดื้อยาในการใช้ยาปฏิชีวนะได้ ซึ่งกรดธรรมชาติที่นิยมนำมาใช้มีหลายชนิด ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและความต้องการของผู้ที่จะนำไปใช้

ชนิดของกรดธรรมชาติที่นิยมใช้

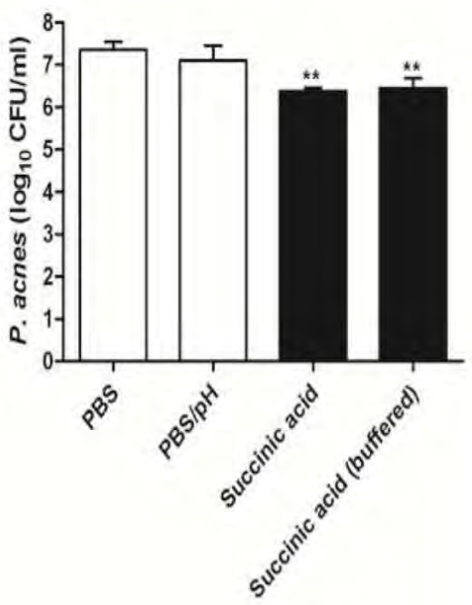
1. Salicylic acid เป็นสารที่มีฤทธิ์ละลายหัวสิว
2. Azelaic acid มีประสิทธิภาพต่อสิวอักเสบและสิวอุดตัน
3. Lactic acid ช่วยป้องกันและลดสิว
4. Succinic acid ช่วยลดการเจริญของเชื้อก่อสิว
5. Linoleic acid ทำหน้าที่สลาย comedones ให้สิวมีขนาดเล็กลงได้
6. Glycolic acid ช่วยลดการเกิดสิวและรอยสิว

จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่ากรดธรรมชาติชนิด Succinic acid (Yanhan W, 2014) และ Salicylic acid (Jin L, 2019) เป็นกรดธรรมชาติที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อสิว *C. acnes* จึงเลือกนำกรดธรรมชาติทั้งสองชนิดนี้ไปศึกษาต่อ

กรดธรรมชาติ Succinic acid (Yanhan W, 2014)

Succinic acid เป็นกรดธรรมชาติที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการหายใจของสิ่งมีชีวิตอยู่แล้ว โดยเมื่อเกิดการสังเคราะห์ภายในเซลล์จะรักษาสมดุลความเป็นกรดเบสไว้ เมื่อใช้ Succinic acid ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 2 เป็นส่วนผสมของยารักษาสิว จึงจำเป็นต้องปรับค่า pH ให้

เหมาะสมกับสภาพผิวด้วย โดย Succinic acid มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อสิว *P. acnes* โดยตรง หรืออาศัยกระบวนการหายใจในเซลล์ของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียท้องถิ่นบนผิวหนัง ภายใต้สภาวะที่มีไขมัน ก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อสิวได้เช่นกัน



รูป 1-6 แสดงประสิทธิภาพของ Succinic acid ต่อปริมาณของเชื้อก่อสิว *P. acnes*
ที่มา : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3888247

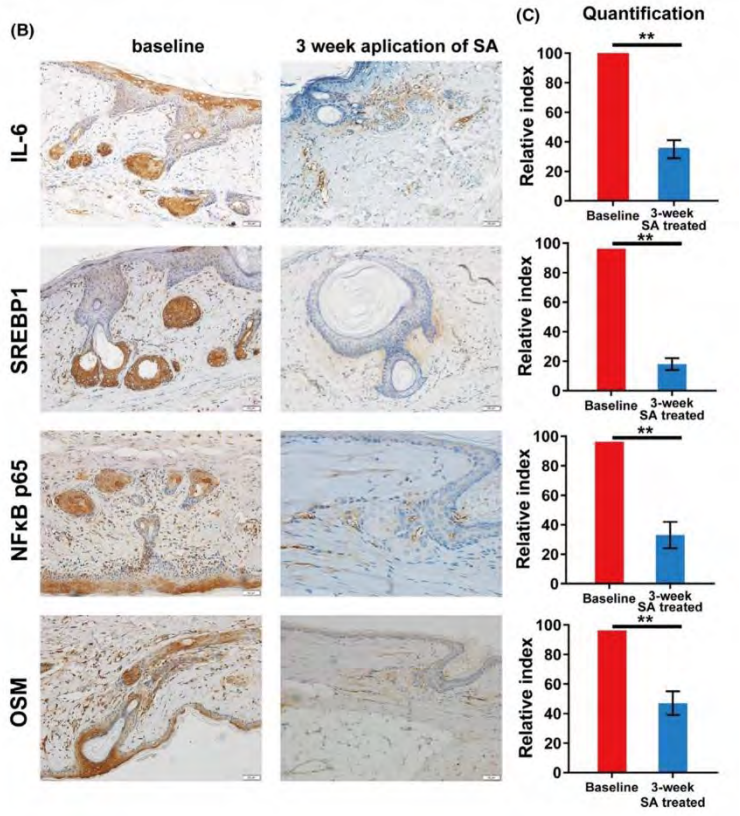
จากรูปแสดงปริมาณเซลล์ *P. acnes* เมื่อบ่มด้วยอาหาร PBS (pH 7.4) และ PBS/pH (pH 5.5) เทียบกับปริมาณเซลล์ที่บ่มด้วยอาหาร PBS ที่เติม5 mM succinic acid (pH 5.5) และ succinic acid (buffered) (pH 7.4)

จากผลการวิจัยพบว่าปริมาณเชื้อก่อสิว *P. acnes* เมื่อบ่มในอาหาร PBS ที่เติมกรดธรรมชาติ 5 mM succinic acid เทียบกับปริมาณเชื้อที่บ่มในอาหาร PBS เพียงอย่างเดียว มีปริมาณเชื้อก่อสิวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปได้ว่า succinic acid มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อสิว

กรดธรรมชาติ Salicylic acid (Jin L, 2019)

Salicylic acid เป็นกรดธรรมชาติที่นิยมนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยารักษาสิว โดยมีประสิทธิภาพในการละลายหัวสิว และลดการเจริญเติบโตของเชื้อก่อสิว โดยมีค่า pH เท่ากับ 4 ซึ่งในงานวิจัยได้วิเคราะห์ผลของ Salicylic acid ในระดับเซลล์ พบว่า Salicylic acid ส่งผลต่อวิถีการเกิดสิว 3 วิถี คือ AMPK-SREBP-1 pathway ซึ่งเป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิปิด, NF-kB

signaling pathway ซึ่งเป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ และวิถีที่ก่อให้เกิดการอักเสบ



รูป 1-7 แสดงประสิทธิภาพของ Salicylic acid ต่อการยับยั้งการเกิดสิว

ที่มา : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/exd.13934

การย้อมเนื้อเยื่อของหนูที่รักษาด้วย salicylic acid เพื่อศึกษาโปรตีนเป้าหมายที่พบได้ในทั้ง 3 วิถี แล้วเปรียบเทียบปริมาณกับชุดควบคุมคือเนื้อเยื่อของหนูปกติ และแสดงปริมาณโปรตีนในกราฟด้านข้าง

จากผลการวิจัยพบว่าปริมาณโปรตีนเป้าหมายที่สามารถพบได้จากใน 3 วิถีที่ก่อให้เกิดสิว มีปริมาณโปรตีนลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปได้ว่า Salicylic acid มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดสิว ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของวิถีที่ก่อให้เกิดสิว

สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* (Crina S, 2017)

การศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพการต้านเชื้อแบคทีเรียหรือต้านการอักเสบในสารสกัดจากธรรมชาติมีความแพร่หลายมากขึ้นในปัจจุบัน รวมทั้งสารอนุพันธุ์ที่แยกได้จากพืช น้ำมันสกัดจากพืช หรือองค์ประกอบต่าง ๆ ในพืช ที่นำมาใช้ในการรักษาสิว เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะที่ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อก่อสิว และเพื่อพัฒนาสารสกัดจากธรรมชาติไปเป็นสารตั้งต้นในการทำยาหรือครีมรักษาสิวในอนาคต

ค่าที่แสดงประสิทธิภาพของยาหรือสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Crina S, 2017)

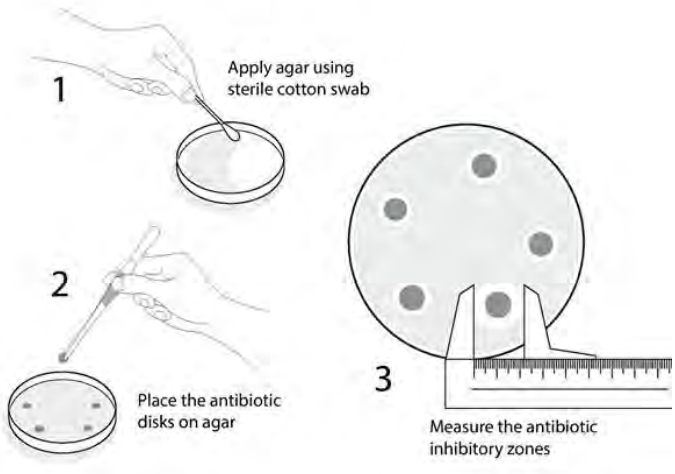
Minimal Inhibitory Concentration (MIC) คือ ความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยค่า MIC สามารถนำไปเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่ง ๆ ต่อสารต้านจุลชีพหลาย ๆ ชนิด หรือความไวของเชื้อหลาย ๆ ชนิดต่อจุลินทรีย์หนึ่ง ๆ

Minimal Lethal Concentration (MLC) คือ ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยาที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ หากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรียจะใช้คำเฉพาะเจาะจง คือ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) การทดสอบ (MLC) ทำได้ต่อเนื่องจากการหาค่า MIC ซึ่งนิยมทำจาก broth dilution test โดยการใช้เชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ไม่มีเชื้อเจริญตั้งแต่ความเข้มข้นมากกว่าค่า MIC ขึ้นไป โดยนำส่วนใสของหลอดที่มีความเข้มข้นที่ยาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ไปเพาะเชื้อต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เพื่อหาค่า MLC โดยที่ความเข้มข้นดังกล่าวต้องไม่มีเชื้อเจริญ หรือเกือบไม่มีเชื้อเจริญขึ้น (99.9% ของเชื้อถูกฆ่า)

การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ (Susceptibility test) (Crina S, 2017)

การประเมินประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพอย่างหนึ่ง สามารถทำได้หลายวิธี เช่น

1. Agar diffusion method เป็นวิธีที่แพร่หลายมากที่สุด เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น วิธีการนี้เป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ สามารถบ่งบอกได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ แต่ไม่อาจทราบค่า MIC และ MLC ที่แน่ชัดได้

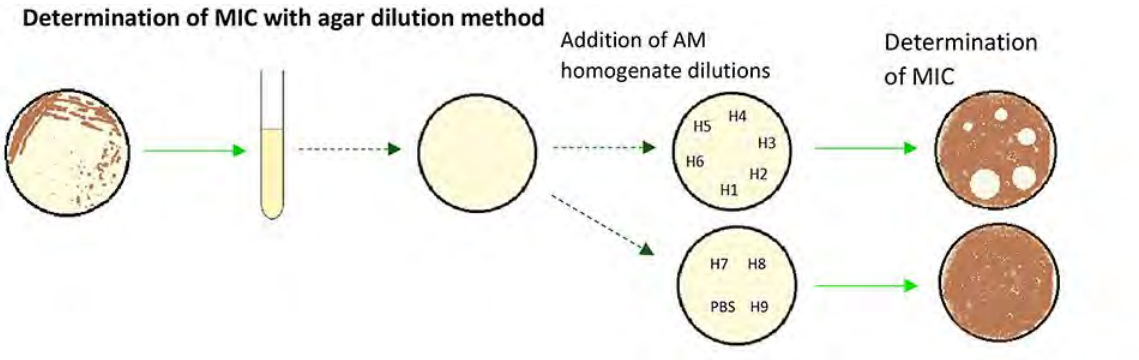


รูป 1-8 Agar diffusion method

ที่มา : https://www.acs.edu.au/info/sciences/chemical-sciences

2. Agar dilution technique เป็นการติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยยาต้านจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นต่างกันเป็นลำดับ โดยดูจากความเข้มข้นที่ใช้ในการรักษา (Therapy range) วิธีการ คือ การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นของยาเจือจางตามลำดับโดยครอบคลุมความเข้มข้นของยาต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในการรักษา ในกรณีที่ต้องการทดสอบ

เชื้อพร้อมกันหลายชนิด จะใช้เครื่องมือที่เรียกว่า multiple inoculator stick และถาดหลุม (multiple well tray) สำหรับใส่เชื้อ โดยเติมเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยลงในหลุม หลุมละชนิด โดยมีจุลินทรีย์สายพันธุ์มาตรฐานเป็นตัวควบคุม (control stain) กด multiple inoculator stick ลงในหลุมที่เตรียมเชื้อไว้แล้วนำไปแตะกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเรียงจากที่มียาต้านจุลินทรีย์ความเข้มข้นต่ำไปสูง การอ่านผลโดยเชื้อที่ไวต่อยาต้านจุลินทรีย์จะไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่เชื้อดื้อยาจะเห็นการเจริญบริเวณ stick ที่สัมผัสกับหน้าอาหาร



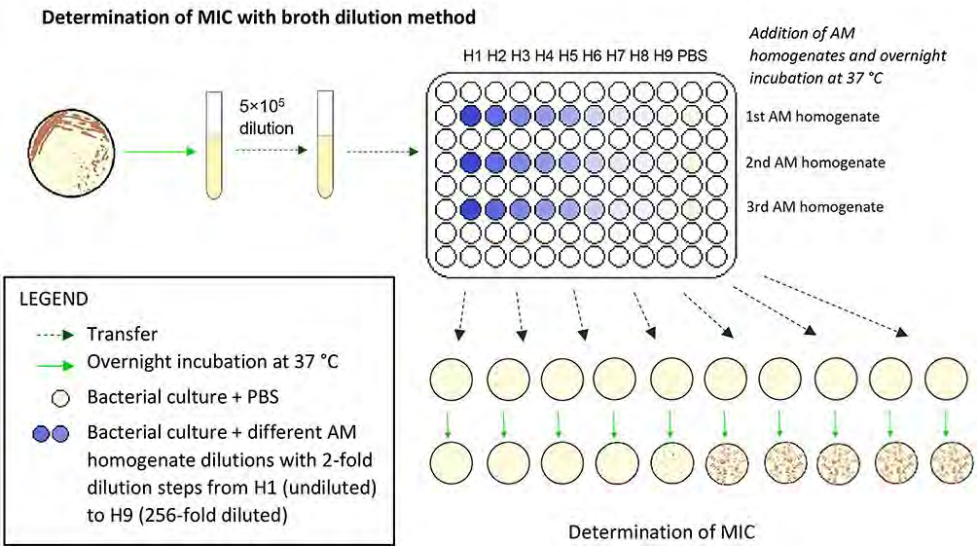
รูป 1-9 Agar dilution technique

ที่มา : https://www.dovepress.com

3. Broth dilution technique หลักการ คือ เจือจางสารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเจือจางเชื้อเป็นแบบอนุกรม 2 เท่า (2-fold serial dilution) ตามลำดับ จากนั้นจึงเติมเชื้อที่มีปริมาณคงที่ เทียบความขุ่นกับสารมาตรฐาน McFarland หมายเลข 0.5 หรือวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเชื้อที่เหมาะสม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น และมีชุดควบคุมคือ อาหารที่ไม่เติมสารทดสอบ ภายหลังการบ่มเพาะเชื้อสามารถอ่านค่า MIC ได้จากการสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อโดยดูจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว วิธีนี้เป็นวิธีการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสารทดสอบที่ละเอียด ทำให้ทราบทั้งค่า MIC และ MBC โดยวิธีนี้สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 วิธี ได้แก่

   3.1 Broth Macrodilution test เป็นการทดสอบในหลอดทดลองโดยอ่านค่า MIC โดยการดูความขุ่นด้วยตาเปล่า แต่เนื่องจากต้องใช้สารในปริมาณมากจึงไม่เป็นที่นิยม

   3.2 Broth Microdilution test เป็นการทดสอบใน 96-well plate การอ่านค่า MIC โดยดูความขุ่นด้วยตาเปล่า หรืออาจใช้สารบางอย่างที่สามารถบ่งชี้การเจริญเติบโตของเชื้อ เพื่อให้อ่านค่าได้ง่ายขึ้น ซึ่งสารที่นิยมใช้คือ Resazurin



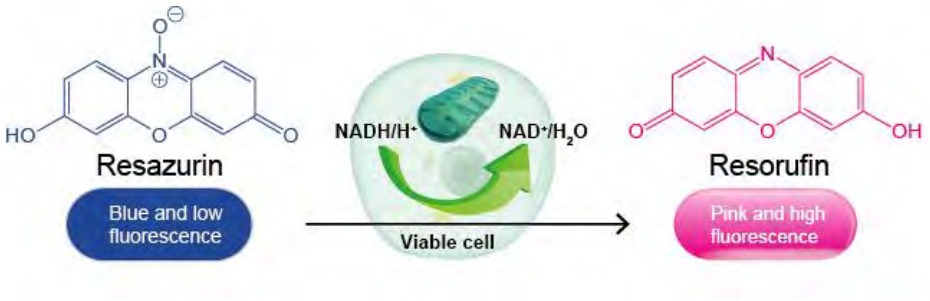
รูป 1-10 Broth Microdilution test

ที่มา : https://www.dovepress.com

Resazurin (Satyajit, 2007)

Resazurin เป็นสารบ่งชี้ออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction indicator) ชนิดหนึ่ง สามารถเปลี่ยนสีได้เมื่อเปลี่ยนสถานะปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation state) การใช้สารบ่งชี้ในการอ่านผลของ broth microdilution test ทำให้อ่านผลได้ชัดเจนยิ่งขึ้น หากแบคทีเรียมีชีวิตอยู่จะใช้ออกซิเจนในการหายใจ ทำให้ค่าออกซิเดชัน-รีดักชันในอาหารลดลง ซึ่งจะเปลี่ยนสีสารบ่งชี้ โดยการเปลี่ยนแปลงสีตัวบ่งชี้ resazurin จากสีน้ำเงินไปเป็นสีชมพูของ resorufin และระยะที่ 2 จะเปลี่ยนจากสีชมพูของ resorufin เป็นไม่มีสีของสาร hydroresorufin

วิธี Resazurin microtiter plate assay (REMA) เป็นวิธี broth microdilution test ที่มีการดัดแปลงเพื่อสะดวกต่อการอ่านผล โดยการเติม resazurin ซึ่งเป็นสารบ่งชี้การเจริญของจุลชีพทดสอบ หากไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบจะไม่มีการเปลี่ยนสี แต่ถ้าเชื้อเจริญจะเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีม่วงหรือสีชมพู ซึ่งวิธีนี้ทำได้รวดเร็ว แม่นยำ และเหมาะในการที่จะใช้กับสารธรรมชาติ เนื่องจากสามารถลดการรบกวนการอ่านผล เนื่องจากสีและความขุ่นของสารทดสอบบางชนิด โดยเฉพาะหากเป็นสารธรรมชาติซึ่งมักมีสี และละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ยาก นอกจากนี้การศึกษายังพบว่าการใช้วิธี REMA เป็นวิธีที่ดีในการใช้ทดสอบกับสารสกัดจากสมุนไพรหรือธรรมชาติ เมื่อเทียบกับ Agar diffusion ซึ่งมีข้อจำกัดในการแพร่ของสาร กล่าวคือ inhibition zone ไม่สามารถบ่งบอกความแรงในการออกฤทธิ์ของสารได้เสมอไป จึงทำให้วิธี REMA มีความไวต่อการตรวจได้ดีกว่า Agar diffusion ที่ต้องใช้สารในปริมาณมากกว่าจึงจะสามารถตรวจสอบฤทธิ์ของสารได้ (ทศพล, 2552)

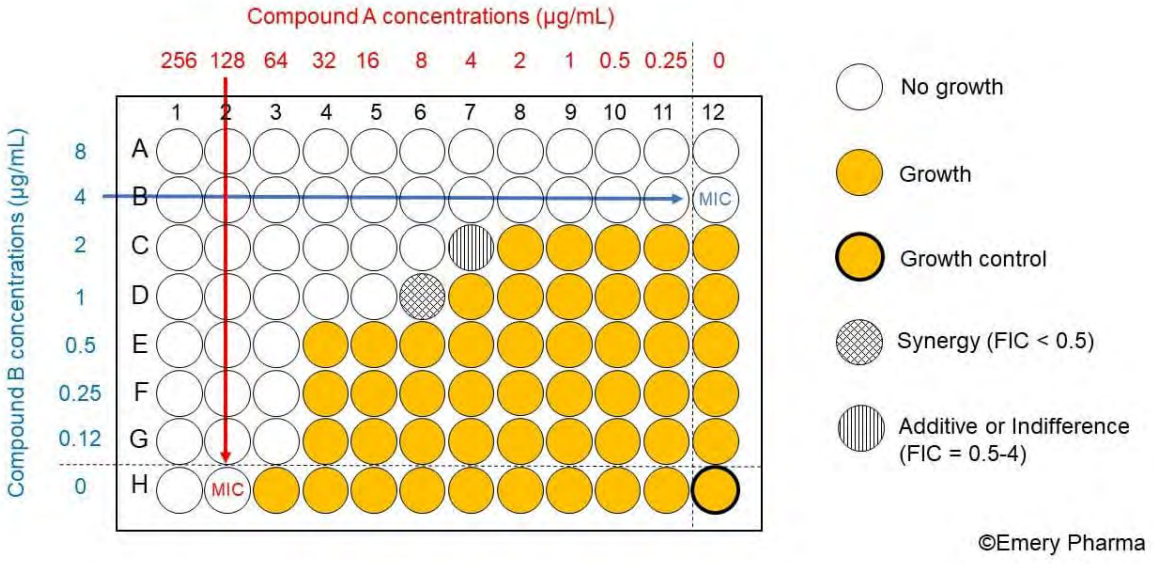


รูป 1-11 แสดงกลไกการเปลี่ยนสีของ resazurin

ที่มา : https://www.creative-bioarray.com/support/resazurin-cell-viability-assay.htm

Checkerboard dilution (Lippincott Williams, 2005)

Checkerboard testing เป็นการวัดการทำงานร่วมกันโดยการวิเคราะห์ตารางตรวจสอบ (Checkerboard) ใช้เพื่อกำหนดผลกระทบต่อความแรงของการรวมกันของยาปฏิชีวนะเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของยาปฏิชีวนะแต่ละตัว การเปรียบเทียบนี้แสดงได้เป็นค่าดัชนี Fractional Inhibitory Concentration (FIC) ค่าดัชนี FIC คำนึงถึงการรวมกันของยาปฏิชีวนะที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า MIC ของยาปฏิชีวนะแต่ละตัว



รูป 1-12 แสดง checkerboard assay

ที่มา : https://emerypharma.com/biology/antimicrobial-synergy-study-checkerboard-assay/

Fractional inhibitory concentration (FIC) =

$$\frac{\text{MIC of compound1 or compound2 in combination}}{\text{MIC of compound1 or compound2 in alone}}$$

Fractional inhibitory concentration index (FICI) =

FIC of compound1+FIC of compound2

* ซึ่งค่า FICI ที่คำนวณได้สามารถแสดงถึงผลการออกฤทธิ์เมื่อใช้สาร 2 ชนิดร่วมกันโดยมีเกณฑ์ในการประเมิณ ดังนี้ (Milne & Gould, 2012)

FICI $\leq$ 0.5	แสดงว่าได้ผลออกฤทธิ์เสริมกัน (synergistic effect)
0.5 $<$ FICI $\leq$ 1	แสดงว่าได้ผลออกฤทธิ์เพิ่มกัน (additive effect)
1 $<$ FICI $\leq$ 4	แสดงว่าไม่มีผลใด ๆเกิดขึ้น (Indifferent)
FICI $\geq$ 4	แสดงว่าได้ผลออกฤทธิ์ต้านกัน (antagonistic effect)

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดกรองหาสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *C. acnes* โดยการใช้วิธี Resazurin microtiter plate assay และศึกษาการออกฤทธิ์ส่งเสริมกันของสารธรรมชาติ โดยใช้วิธี Checkerboard dilution assay

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ฝึกฝนให้มีความชำนาญและทักษะในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ และการทำงานในห้องปฏิบัติการอย่างถูกต้อง
2. สามารถคัดกรองหาสารธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพดีในการต้านการเจริญของ *C. acnes* ได้
3. ผลการทดลองนี้สามารถใช้เป็นองค์ความรู้ เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาต่อยอดในอนาคตได้
4. ฝึกการทำงานให้เป็นระบบ รู้จักการวางแผนงาน และการบริหารเวลาในการทดลอง

บทที่ 2
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

รายชื่อ	บริษัท
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)	Lab Service, Thailand
ตู้เย็นอุณหภูมิ (Refrigerator) 4 องศาเซลเซียส	Sunyo electric, Japan
ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ (Incubator) 37 องศาเซลเซียส	Memmert, Germany
ตู้อบฆ่าเชื้อชนิดความร้อนแห้ง (Hot air oven)	Memmert, Germany
ตู้อบแห้ง (Dryer)	Memmert, Germany
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)	Tony, USA
เครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator)	Sonic materials, USA
ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 10,20,200 และ 1000 ไมโครลิตร	Gilson, France
เครื่องชั่งละเอียด	BioHit, Finland
เครื่องชั่งหยาบ	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องปั่นผสม	Scientific industries, USA
อุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป	Pyrex, USA

2.1.2 วัสดุ

รายชื่อ	บริษัท
Syringe filter	Whatman, USA
กระบอกฉีดยา	NIPPO, USA
หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์	Corning, USA
96 well plate	Corning, USA
Pipette tips	Corning, USA

2.1.3 สารเคมี

รายชื่อ	บริษัท
Dimethyl sulfoxide	Merck, Germany
Resazurin	Sigma, USA
Ethyl alcohol	Becton, France
Agar	Becton, France

2.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

รายชื่อ	บริษัท
Muller Hinton Agar	Oxiod, UK
Muller Hinton Broth	Oxiod, UK

2.1.5 สายพันธุ์แบคทีเรีย

ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ห้องปฏิบัติการวิจัยโปรตีโอมิกส์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ตาราง 2-1 รายชื่อสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	สายพันธุ์
Cutibacterium acnes	ATCC 11827
Cutibacterium acnes	DSM 1897*

*สายพันธุ์ที่แยกจากใบหน้าของคนเป็นสิว

2.1.6 สารธรรมชาติที่ใช้ทดสอบ

สารธรรมชาติที่ใช้ทดสอบทั้งหมดจำนวน 48 ชนิด ได้รับจากห้องปฏิบัติการของ ศาสตราจารย์ ดร. อภิชาต สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ภูวไพรศิริศาล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 2-2 รายชื่อสารธรรมชาติที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับ	สารสกัด	ประเภทของสาร	ชนิดของสาร
1	AS-CY 204	สารสกัดหยาบ	-
2	AS-CY 205	สารสกัดหยาบ	-
3	AS-CY 206	สารสกัดหยาบ	-
4	AS-CY 207	สารสกัดหยาบ	-
5	AS-CY 208	สารสกัดหยาบ	-
6	AS-CY 209	สารสกัดหยาบ	-
7	AS-CY 210	สารสกัดหยาบ	-
8	AS-CY 211	สารสกัดหยาบ	-
9	AS-CY 212	สารสกัดหยาบ	-
10	AS-CY 213	สารสกัดหยาบ	-
11	AS-CY 214	สารสกัดหยาบ	-
12	AS-CY 215	สารสกัดหยาบ	-
13	AS-CY 216	สารบริสุทธิ์	-
14	AS-CY 217	สารบริสุทธิ์	-
15	AS-CY 218	สารบริสุทธิ์	-

ลำดับ	สารสกัด	ประเภทของสาร	ชนิดของสาร
16	AS-CY 219	สารบริสุทธิ์	-
17	AS-CY 220	สารบริสุทธิ์	-
18	AS-CY 221	สารบริสุทธิ์	-
19	AS-CY 222	สารบริสุทธิ์	-
20	AS-CY 223	สารบริสุทธิ์	-
21	AS-CY 224	สารบริสุทธิ์	-
22	AS-CY 225	สารบริสุทธิ์	-
23	AS-CY 226	สารบริสุทธิ์	-
24	AS-CY 1010	สารสกัดหยาบ	-
25	AS-CY 1011	สารสกัดหยาบ	-
26	AS-CY 1012	สารสกัดหยาบ	-
27	AS-CY 1013	สารสกัดหยาบ	-
28	AS-CY 1014	สารสกัดหยาบ	-
29	AS-CY 1015	สารสกัดหยาบ	-
30	AS-CY 1016	สารสกัดหยาบ	-
31	AS-CY 1017	สารสกัดหยาบ	-
32	PP2001	สารบริสุทธิ์	Piporine
33	PP2002	สารบริสุทธิ์	Sesamin
34	PP2003	สารบริสุทธิ์	Lawsone
35	PP2004	สารบริสุทธิ์	Alpinetin
36	PP2005	สารบริสุทธิ์	Cardamomin
37	PP2006	สารบริสุทธิ์	Pinocembrin
38	PP2007	สารบริสุทธิ์	Pinostrobin
39	PP2008	สารบริสุทธิ์	Quercetin
40	PP2009	สารบริสุทธิ์	Aegeline
41	PP2010	สารบริสุทธิ์	Anisolactone
42	PP2011	สารบริสุทธิ์	2,3-epoxyoanisolactone
43	PP2012	สารบริสุทธิ์	Lansioside C
44	PP2013	สารบริสุทธิ์	Lansionic acid
45	PP2014	สารบริสุทธิ์	Capsugenin-25,20-o-beta-diglucoside

ลำดับ	สารสกัด	ประเภทของสาร	ชนิดของสาร
46	PP2015	สารบริสุทธิ์	Androgrpaholide
47	PP2016	สารบริสุทธิ์	Alterporriol A
48	PP2017	สารบริสุทธิ์	Violacein

2.2 ขั้นตอนการทดลอง

2.2.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เลี้ยงแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 2 สายพันธุ์ คือ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว Muller-Hinton broth นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 1 (ประมาณ $5x10^8$ CFU/ml)

2.2.2 การเตรียมสารละลาย Resazurin

ละลายสี resazurin ด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วย syringe membrane filter ที่มีรูขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส หลีกเลี่ยงแสง

2.2.3 การคัดกรองหาสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *C. acnes* เบื้องต้นโดยวิธี

Resazurin microtiter plate assay

2.2.3.1 การเตรียมสารธรรมชาติที่ใช้ทดสอบ

ละลายสารที่สกัดจากธรรมชาติที่ใช้ทดสอบด้วย 100% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

2.2.3.2 การคัดกรองสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes*

ในการคัดกรองสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* ใช้ *C. acnes* ATCC 11827 สำหรับการคัดกรอง โดยเจือจางสารธรรมชาติจากข้อ 2.2.3.1 ลงไปในอาหารเหลว Muller-Hinton broth (MHB) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมเซลล์แบคทีเรียแขวนลอย สายพันธุ์ *C. acnes* ATCC 11827 ให้ได้ความเข้มข้นเซลล์สุดท้าย 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงใน 96 well-plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยชุดควบคุมบวกคือ เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยใน MHB ที่มียา ciprofloxacin

ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุมลบคือ เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยใน MHB ที่มี DMSO ความเข้มข้นสุดท้าย 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นเติมสารละลาย Resazurin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตสีของ Resazurin จากชุดควบคุมบวกจะต้องเป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสี ชุดควบคุมลบจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู เปรียบเทียบกับชุดสารทดลองซึ่งต้องเป็นสีน้ำเงิน จึงจะแสดงให้เห็นว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes*

2.2.3.3 การหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) ของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes*

ละลายสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* ATCC 11827 ที่ได้ผลจากการทดลองข้อ 2.2.3.2 ในอาหารเหลว Muller-Hinton broth (MHB) จากนั้นเจือจางสารธรรมชาติแบบอนุกรม 2 เท่า ด้วยอาหารเหลวลงใน 96-well plate จากนั้นใส่เซลล์แบคทีเรียแขวนลอย *C. acnes* ATCC 11827 หรือ *C. acnes* DSM 1097 ให้ได้ความเข้มข้นเซลล์สุดท้าย 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงใน 96 well-plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยชุดควบคุมบวกคือ เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยใน MHB ที่มียา ciprofloxacin ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุมลบคือ เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยใน MHB ที่มี DMSO ความเข้มข้นสุดท้าย 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นเติมสารละลาย Resazurin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตสีของ Resazurin จากชุดควบคุมบวกจะต้องเป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสี ชุดควบคุมลบต้องเปลี่ยนเป็นสีชมพู เปรียบเทียบกับชุดสารทดลอง โดยค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) คือ ความเข้มข้นของสารธรรมชาติที่ต่ำที่สุดที่ Resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่เปลี่ยนสี

2.2.3.4 การหาค่า Minimal Bactericidal concentration (MBC) ของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes*

ละลายสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* ATCC 11827 ที่ได้ผลจากการทดลองข้อ 2.2.3.2 ในอาหารเหลว Muller-Hinton broth (MHB) จากนั้นเจือจาง

สารธรรมชาติแบบอนุกรม 2 เท่า ด้วยอาหารเหลวลงใน 96-well plate จากนั้นใส่เซลล์แบคทีเรียแขวนลอย *C. acnes* ATCC 11827 หรือ *C. acnes* DSM 1097 ให้ได้ความเข้มข้นเซลล์สุดท้าย 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงใน 96 well-plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยชุดควบคุมบวกคือ เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยใน MHB ที่มียา ciprofloxacin ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุมลบคือ เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยใน MHB ที่มี DMSO ความเข้มข้นสุดท้าย 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นนำเซลล์จากแต่ละหลุมมา spread plate ลงบน Muller-Hinton Agar (MHA) แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นตรวจผลโดยการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย ความเข้มข้นแรกของสารใด ๆ ที่ไม่มีโคโลนีของแบคทีเรีย *C. acnes* เจริญขึ้น คือค่า Minimal Bactericidal concentration (MBC)

2.2.4 การหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) ของกรดธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes*

ในการศึกษานี้จะใช้กรดธรรมชาติ succinic acid และ salicylic acid สำหรับการศึกษาโดยการละลาย succinic acid และ salicylic acid ในอาหารเหลว Muller-Hinton broth (MHB) จากนั้นเจือจางกรดธรรมชาติแบบอนุกรม 2 เท่า ด้วยอาหารเหลวลงใน 96-well plate จากนั้นใส่เซลล์แบคทีเรียแขวนลอย *C. acnes* ATCC 11827 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงใน 96 well-plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยชุดควบคุมบวกคือ เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยใน MHB ที่มียา ciprofloxacin ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุมลบคือ เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยใน MHB ที่มี DMSO ความเข้มข้นสุดท้าย 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นเติมสารละลาย Resazurin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตสีของ Resazurin จากชุดควบคุมบวกซึ่งต้องเป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสี ชุดควบคุมลบซึ่งเปลี่ยนเป็นสีชมพู เปรียบเทียบกับชุดสารทดลอง โดยค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) คือ ความเข้มข้นของสารธรรมชาติที่ต่ำที่สุดที่ Resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่เปลี่ยนสี

2.2.5 การศึกษาการออกฤทธิ์เมื่อใช้สารธรรมชาติร่วมกับกรดธรรมชาติในการต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยาโดยวิธี checkerboard dilution

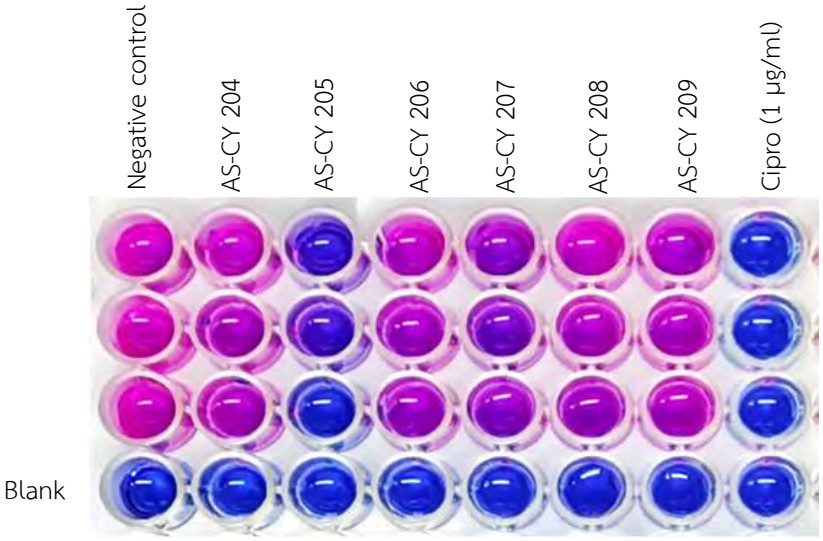
ในการศึกษาผลการออกฤทธิ์เมื่อใช้สารธรรมชาติร่วมกับกรดธรรมชาติในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย *C. acnes* โดยวิธี checkerboard dilution ได้ดำเนินการตามวิธีที่ระบุใน Chang,

1995 โดยคัดเลือกสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย *C. acnes* ที่ดีที่สุด โดยพิจารณาจากค่า MIC และ MBC แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย *C. acnes* ร่วมกับกรดธรรมชาติ โดยใช้วิธี checkerboard dilution เริ่มจากละลายสารธรรมชาติในอาหารเหลว MHB จากนั้นทำการเจือจางแบบอนุกรมสองเท่าด้วยอาหารเหลวลงใน 96 well plate ตามแนวคอลัมน์ (แนวแกน Y) ของเพลท และกรดธรรมชาติทำเช่นเดียวกับตัวแรกแต่ทำลงใน 96 well plate ในแต่ละแถว (แนวแกน X) จากนั้นใส่เซลล์แขวนลอย *C. acnes* ATCC 11827 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม resazurin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงแต่ละหลุมแล้วนำไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าหลุมควบคุมบวกจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู จากนั้นอ่านค่า MIC ที่ได้เมื่อใช้สารธรรมชาติร่วมกับยาปฏิชีวนะ นำค่า MIC ของแต่ละสารไปคำนวณหาค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และ fractional inhibitory concentration index (FICI) ตามลำดับ

บทที่ 3
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การคัดกรองหาสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์ ATCC 11827 โดยวิธี Resazurin microtiter plate assay

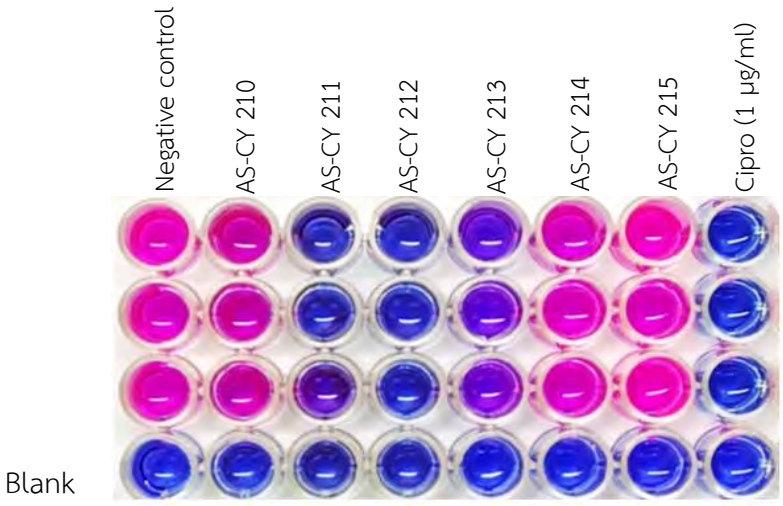
จากการคัดกรองสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ C. acnes ATCC 11827 โดยมีชุดควบคุมบวกคือ เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยในอาหารที่มียา ciprofloxacin และชุดควบคุมลบคือ เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยใน MHB ที่มีตัวทำละลาย DMSO เท่านั้น อีกทั้งยังมี blank เป็นตัวควบคุมการทดลองที่ไม่ใส่เซลล์แบคทีเรียแขวนลอย เป็นชุดควบคุมการเปลี่ยนสีของสารธรรมชาติ ซึ่งการพิจารณาสารที่มีฤทธิ์ ได้พิจารณาจากสารที่ให้ผลการเปลี่ยนสีของ Resazurin เหมือนชุดควบคุมบวก คือให้ผลเป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลง หลังเติมสารละลาย Resazurin การทดสอบทั้งหมดได้ทำ 3 ซ้ำ จากผลการทดสอบสารธรรมชาติทั้งหมด แสดงผลดังภาพ



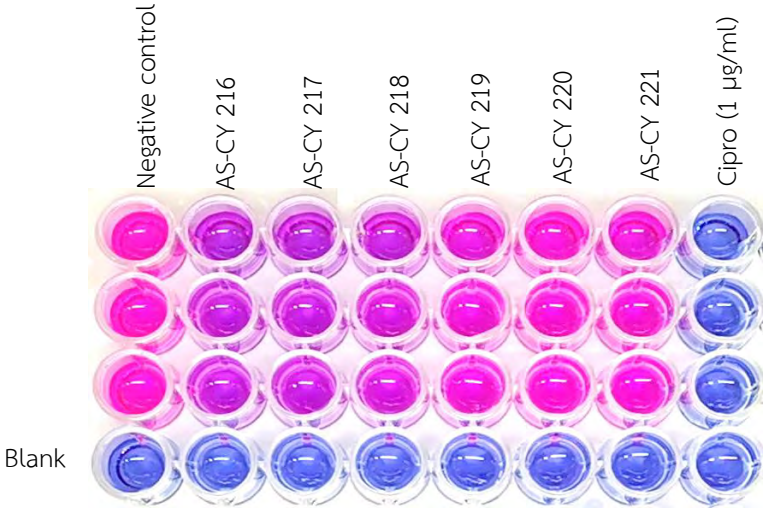
รูป 3-1 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ AS-CY 204-209

Negative control: เซลล์ทดสอบแขวนลอยที่ใส่เฉพาะตัวทำละลาย DMSO

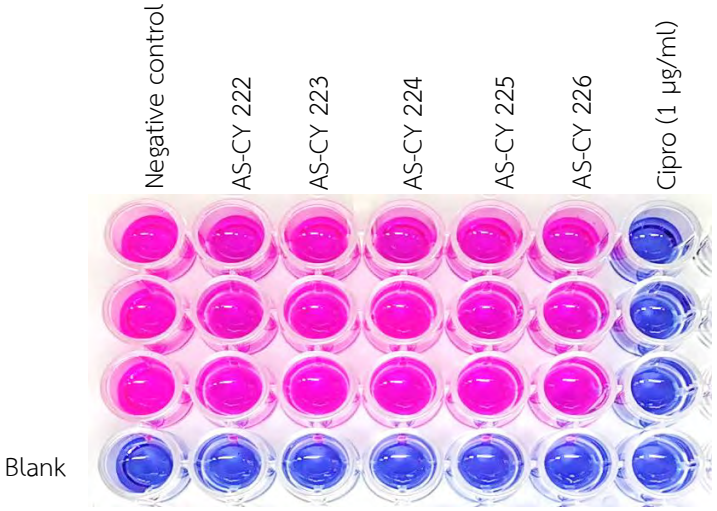
Cipro: เซลล์ทดสอบแขวนลอยที่เติมยา Ciprofloxacin เป็นชุดควบคุมผลบวก



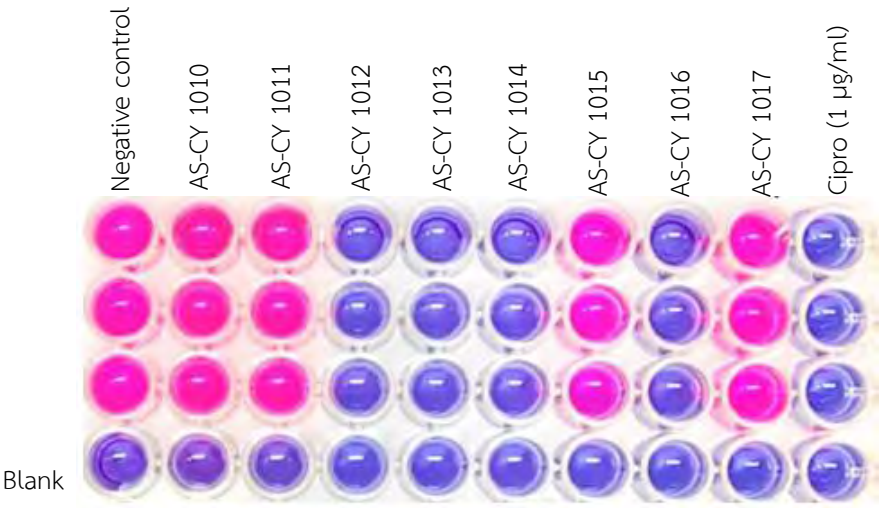
รูป 3-2 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ AS-CY 210-215



รูป 3-3 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ AS-CY 216-221

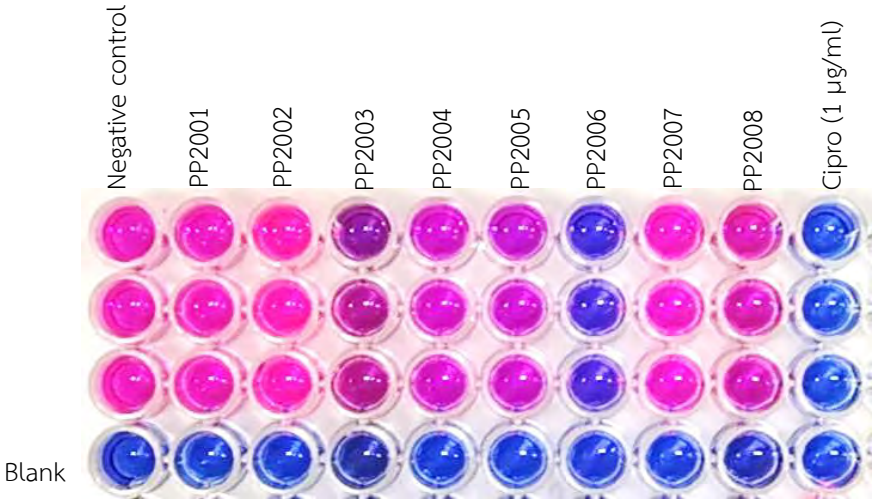


รูป 3-4 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ AS-CY 222-226



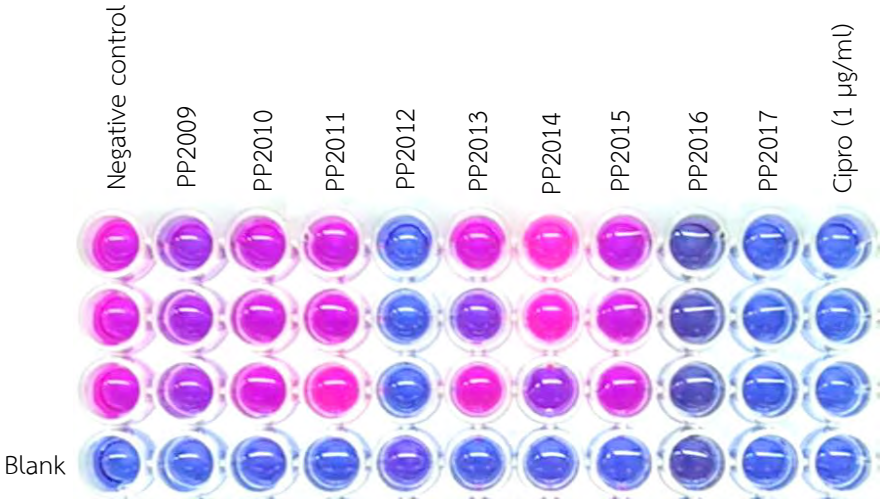
ความเข้มข้นสาร (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

รูป 3-5 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ AS-CY 1010-1017



ความเข้มข้นสาร (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

รูป 3-6 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ PP2001-2008



ความเข้มข้นสาร (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

รูป 3-7 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารธรรมชาติบริสุทธิ์ PP2009-2017

เลี้ยงเซลล์แขวนลอยความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร MHB ที่มีสารธรรมชาติ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นเติมสารละลาย resazurin บ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง จากรูปทั้งหมดแสดงการทดสอบ 3 ซ้ำ และเมื่อพิจารณารูปที่ 3-1 พบว่ามีสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* ATCC 11827 ทั้งหมด 1 ชนิด ได้แก่ AS-CY 205 รูป 3-2 พบว่ามีสารที่มีฤทธิ์ทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ AS-CY 211 และ AS-CY 212 รูป 3-5 พบว่ามีสารที่มีฤทธิ์ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ AS-CY 1012, AS-CY 1013, AS-CY 1014 และ AS-CY 1016 รูป 3-6 พบว่ามีสารที่มีฤทธิ์ทั้งหมด 1 ชนิด ได้แก่ PP 2006 รูป 3-7 พบว่ามีสารที่มีฤทธิ์ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ PP2012, PP2016 และ PP2017 รวมสารที่มีฤทธิ์ทั้งหมดเท่ากับ 11 ชนิด ซึ่งผลการทดลองพบว่าสี resazurin ในหลุมทดสอบด้วยสารดังกล่าวมีสีน้ำเงิน ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับชุดควบคุมบวกที่เป็นเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยในอาหารที่มียา ciprofloxacin ที่ให้สีเป็นสีน้ำเงิน หรือไม่มีการเปลี่ยนสี แสดงให้เห็นว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *C. acnes* โดยผลการทดสอบทั้งหมดได้ถูกสรุปในตาราง 3-1

ตาราง 3-1 ผลการทดสอบการคัดกรองฤทธิ์การเจริญของ *C. acnes* ATCC 11827

ลำดับ	สารสกัด	ประเภทของสาร	ผลทดสอบ
1	AS-CY 204	สารสกัดหยาบ	-
2	AS-CY 205	สารสกัดหยาบ	+
3	AS-CY 206	สารสกัดหยาบ	-
4	AS-CY 207	สารสกัดหยาบ	-
5	AS-CY 208	สารสกัดหยาบ	-
6	AS-CY 209	สารสกัดหยาบ	-
7	AS-CY 210	สารสกัดหยาบ	-
8	AS-CY 211	สารสกัดหยาบ	+
9	AS-CY 212	สารสกัดหยาบ	+
10	AS-CY 213	สารสกัดหยาบ	-
11	AS-CY 214	สารสกัดหยาบ	-
12	AS-CY 215	สารสกัดหยาบ	-
13	AS-CY 216	สารบริสุทธิ์	-
14	AS-CY 217	สารบริสุทธิ์	-
15	AS-CY 218	สารบริสุทธิ์	-
16	AS-CY 219	สารบริสุทธิ์	-
17	AS-CY 220	สารบริสุทธิ์	-

ลำดับ	สารสกัด	ประเภทของสาร	ผลทดสอบ
18	AS-CY 221	สารบริสุทธิ์	-
19	AS-CY 222	สารบริสุทธิ์	-
20	AS-CY 223	สารบริสุทธิ์	-
21	AS-CY 224	สารบริสุทธิ์	-
22	AS-CY 225	สารบริสุทธิ์	-
23	AS-CY 226	สารบริสุทธิ์	-
24	AS-CY 1010	สารสกัดหยาบ	-
25	AS-CY 1011	สารสกัดหยาบ	-
26	AS-CY 1012	สารสกัดหยาบ	+
27	AS-CY 1013	สารสกัดหยาบ	+
28	AS-CY 1014	สารสกัดหยาบ	+
29	AS-CY 1015	สารสกัดหยาบ	-
30	AS-CY 1016	สารสกัดหยาบ	+
31	AS-CY 1017	สารสกัดหยาบ	-
32	PP2001	สารบริสุทธิ์	-
33	PP2002	สารบริสุทธิ์	-
34	PP2003	สารบริสุทธิ์	-
35	PP2004	สารบริสุทธิ์	-
36	PP2005	สารบริสุทธิ์	-
37	PP2006	สารบริสุทธิ์	+
38	PP2007	สารบริสุทธิ์	-
39	PP2008	สารบริสุทธิ์	-
40	PP2009	สารบริสุทธิ์	-
41	PP2010	สารบริสุทธิ์	-
42	PP2011	สารบริสุทธิ์	-
43	PP2012	สารบริสุทธิ์	+
44	PP2013	สารบริสุทธิ์	-
45	PP2014	สารบริสุทธิ์	-
46	PP2015	สารบริสุทธิ์	-

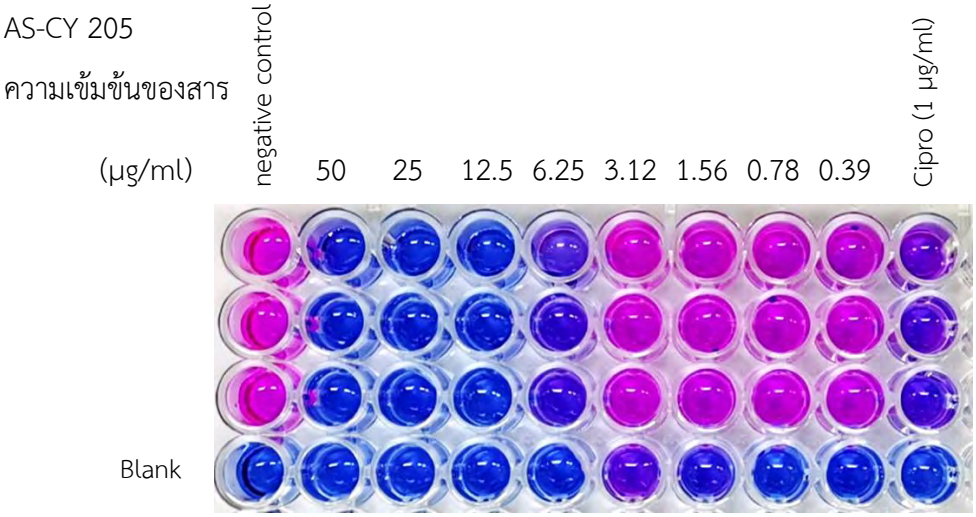
ลำดับ	สารสกัด	ประเภทของสาร	ผลทดสอบ
47	PP2016	สารบริสุทธิ์	+
48	PP2017	สารบริสุทธิ์	+

+ แสดงถึงสารมีฤทธิ์ต้านการเจริญต่อ *C. acnes* ATCC 11827

-แสดงถึงสารไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญต่อ *C. acnes* ATCC 11827

3.2 การหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

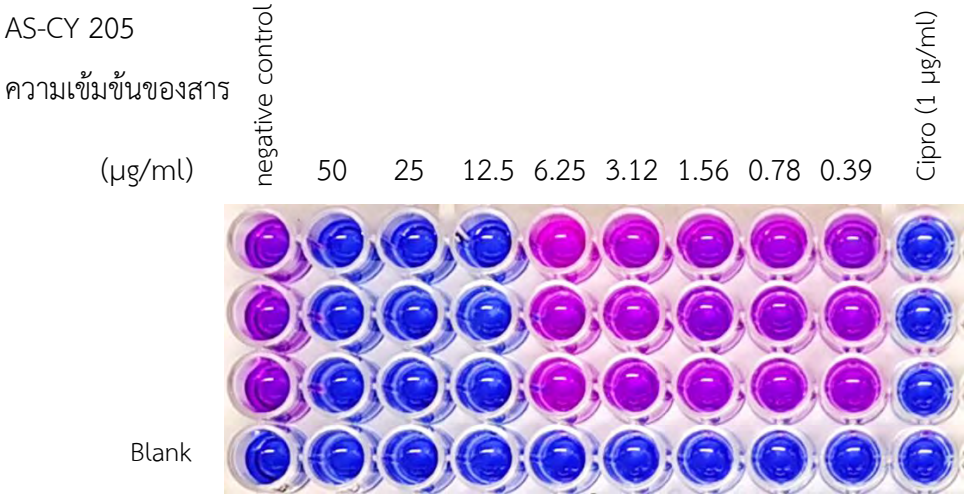
นำสารธรรมชาติที่ให้ผลบวกจากการคัดกรองทั้งหมด 11 ชนิดมาทำการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) ของเชื้อ *C. acnes* โดยได้ทดสอบกับ *C. acnes* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 มีชุดควบคุมผลบวกคือ เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยในอาหารที่มียา ciprofloxacin และชุดควบคุมผลลบคือ เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยในอาหารที่มี DMSO อีกทั้งยังมี blank เป็นตัวควบคุมการทดลอง คือเป็นชุดการทดลองที่ไม่ใส่เซลล์แบคทีเรียแขวนลอย ซึ่งการพิจารณาค่า MIC ได้พิจารณาจากความเข้มข้นต่ำที่สุดของหลุมที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสี และ blank คือ ชุดการทดลองควบคุมการเปลี่ยนสีหลังเติมสารละลาย resazurin ซึ่งจากผลการทดสอบแสดงดังภาพ



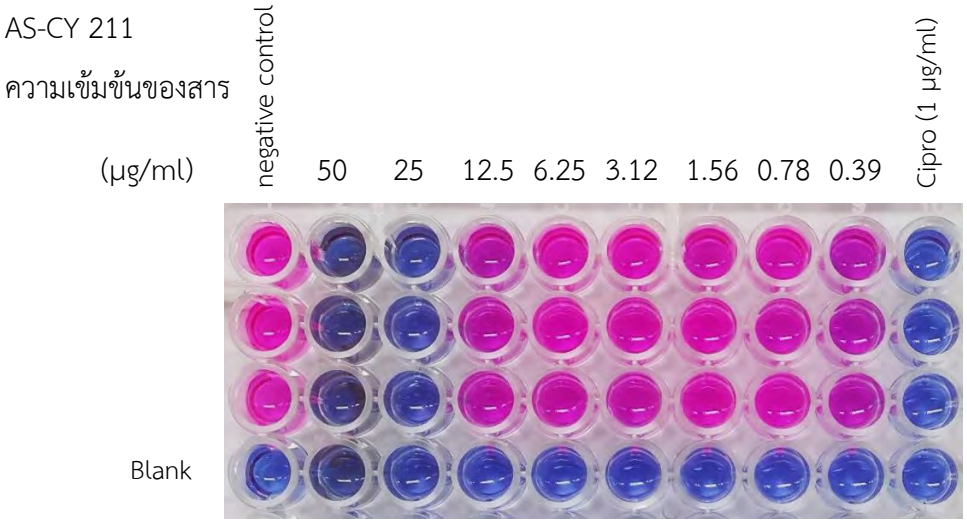
รูป 3-8 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 205 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827

Negative control: เซลล์ทดสอบแขวนลอยที่ใส่เฉพาะตัวทำละลาย DMSO

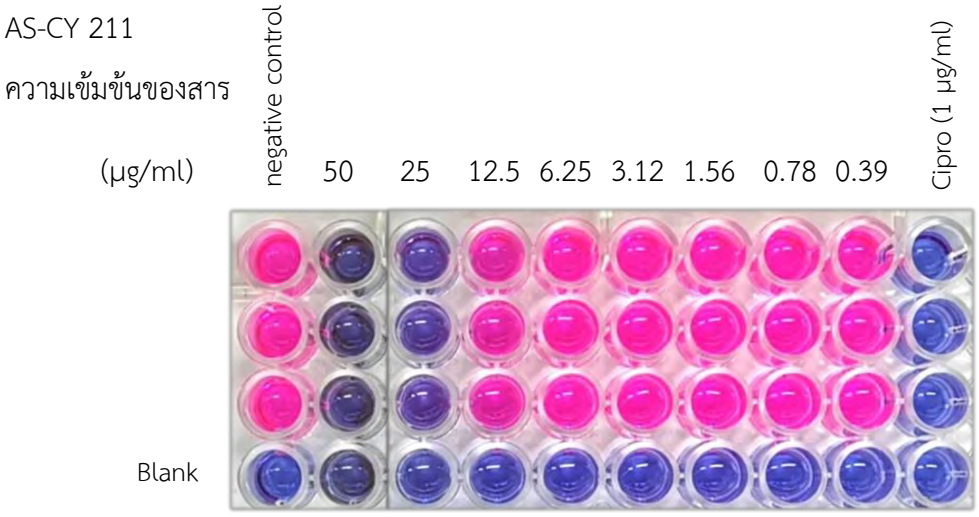
Cipro: เซลล์ทดสอบแขวนลอยที่เติมยา Ciprofloxacin เป็นชุดควบคุมผลบวก



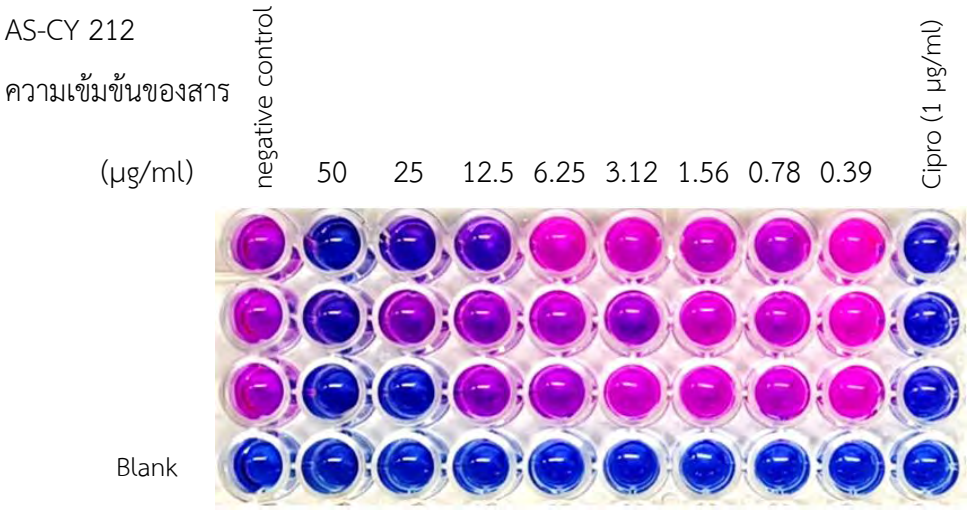
รูป 3-9 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 205 ต่อ *C. acnes* DSM 1897



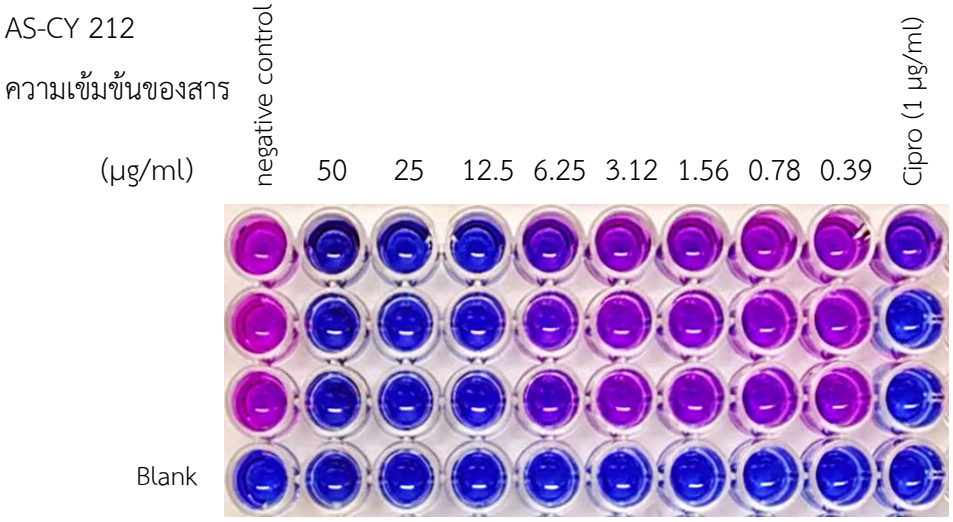
รูป 3-10 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 211 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827



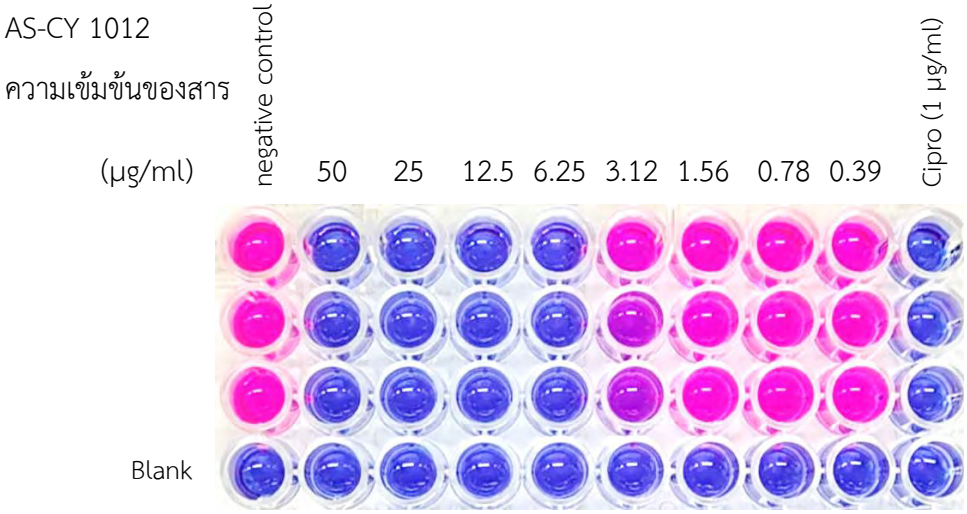
รูป 3-11 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 211 ต่อ *C. acnes* DSM 1897



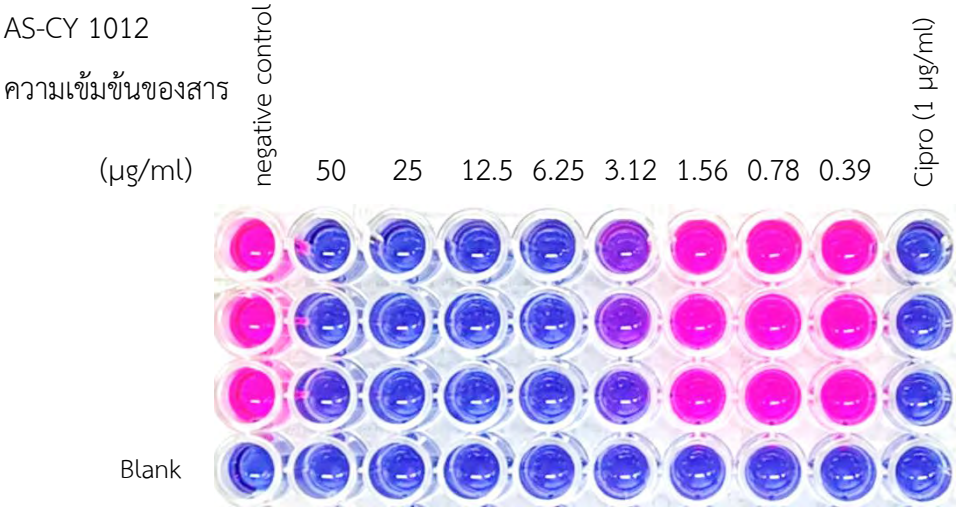
รูป 3-12 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 212 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827



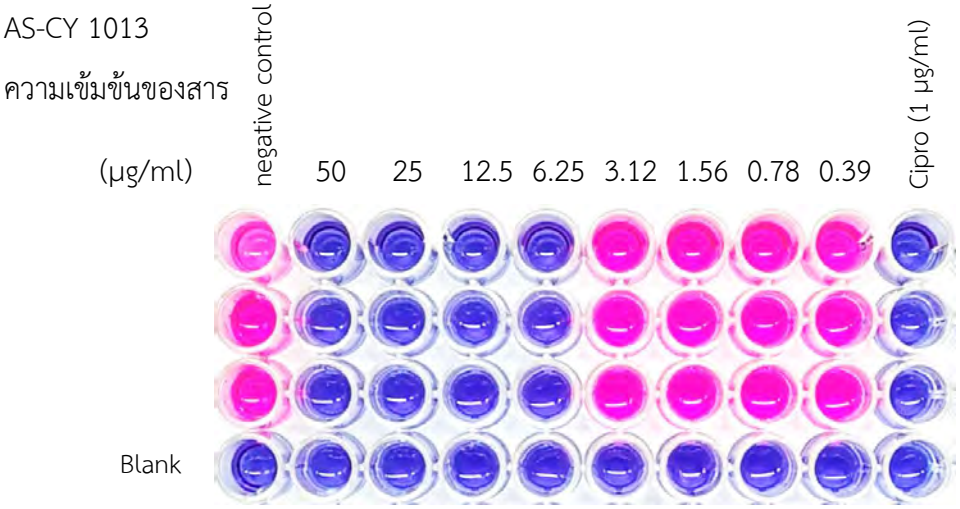
รูป 3-13 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 212 ต่อ *C. acnes* DSM 1897



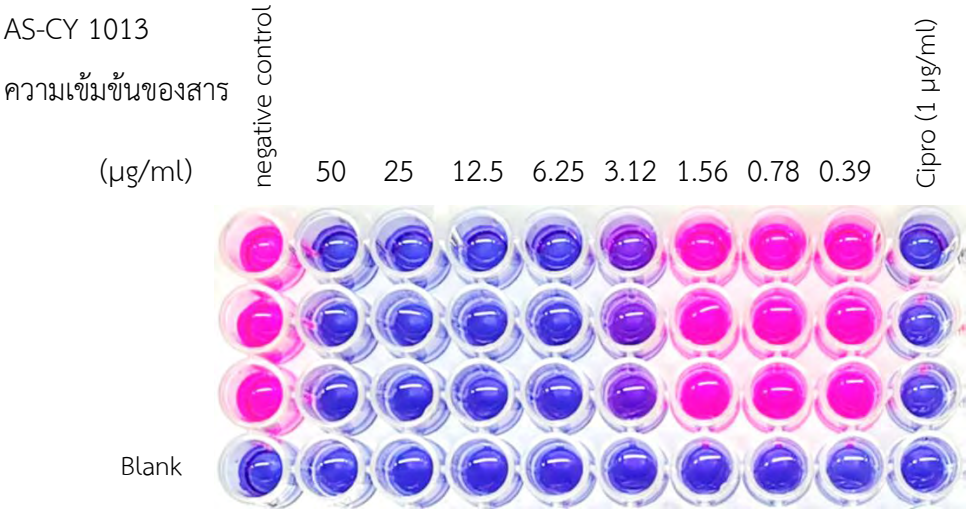
รูป 3-14 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1012 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827



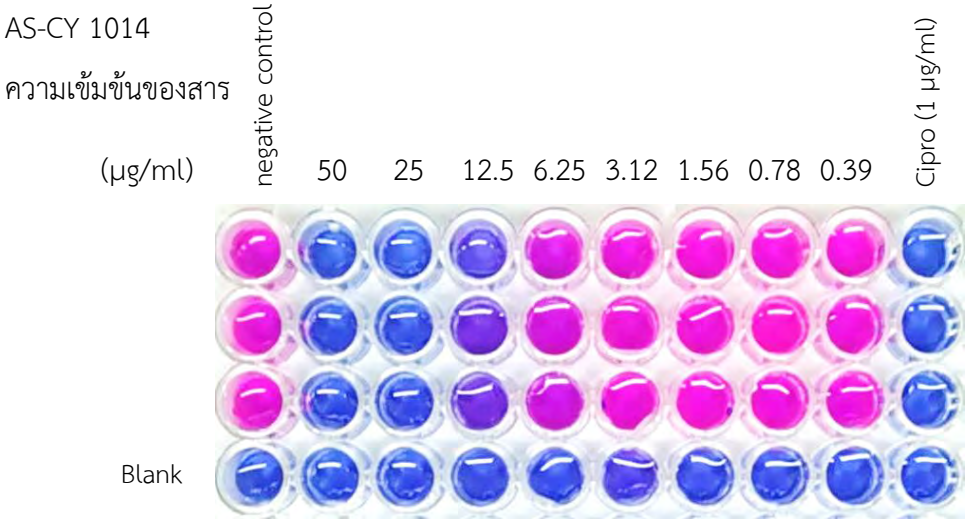
รูป 3-15 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1012 ต่อ *C. acnes* DSM 1897



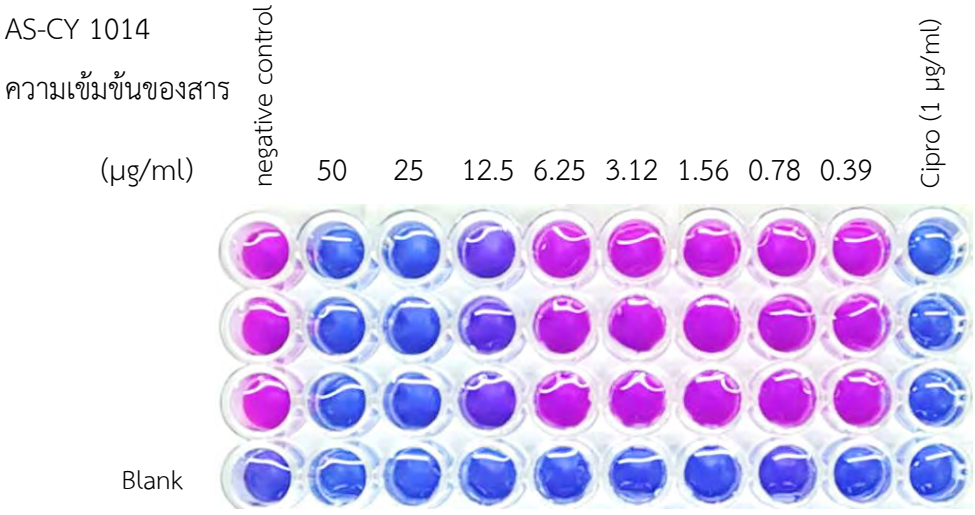
รูป 3-16 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1013 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827



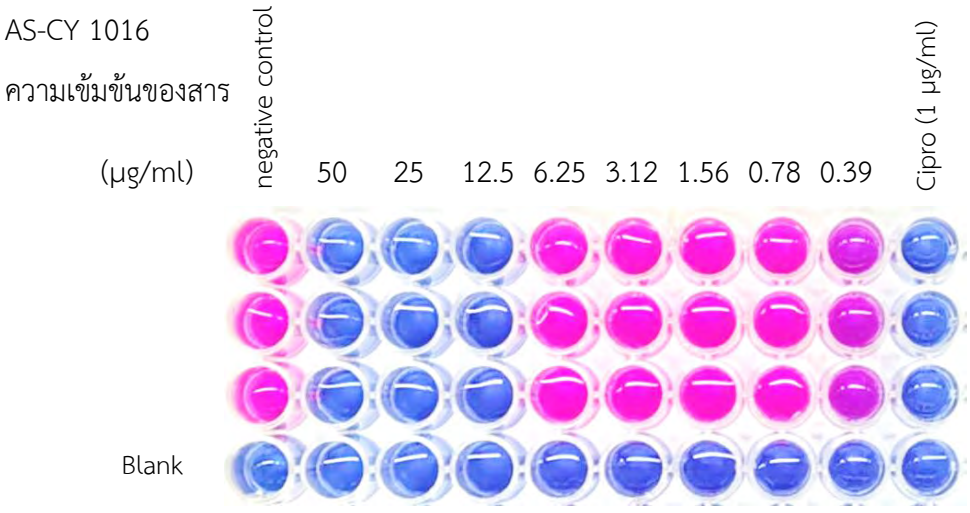
รูป 3-17 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1013 ต่อ *C. acnes* DSM 1897



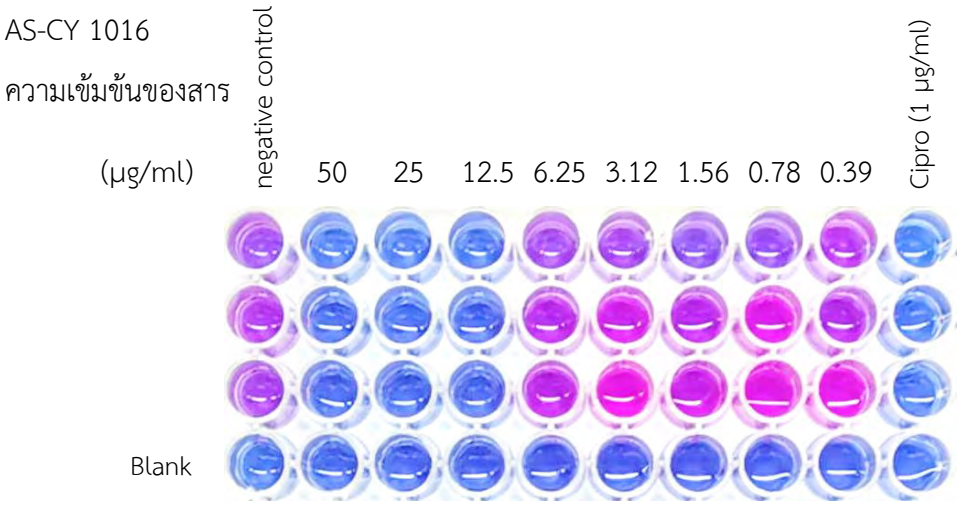
รูป 3-18 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1014 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827



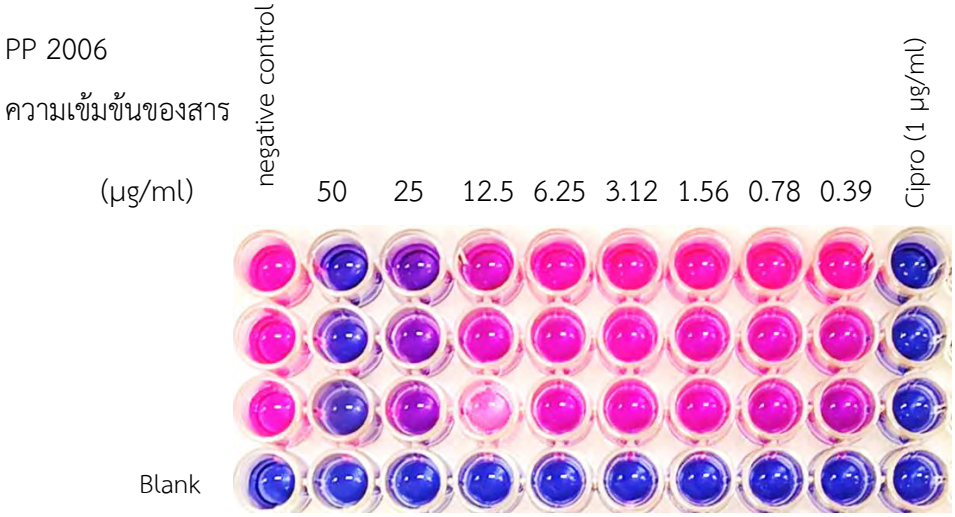
รูป 3-19 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1014 ต่อ *C. acnes* DSM 1897



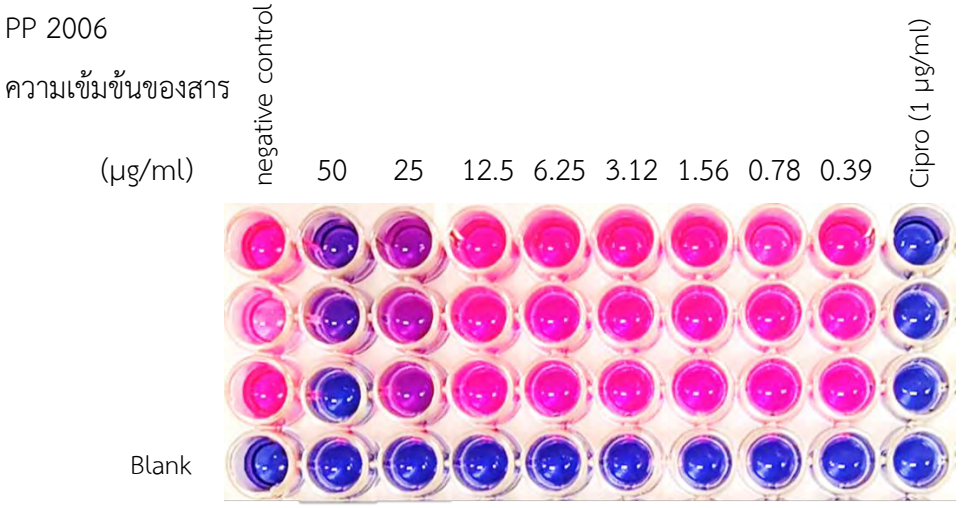
รูป 3-20 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1016 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827



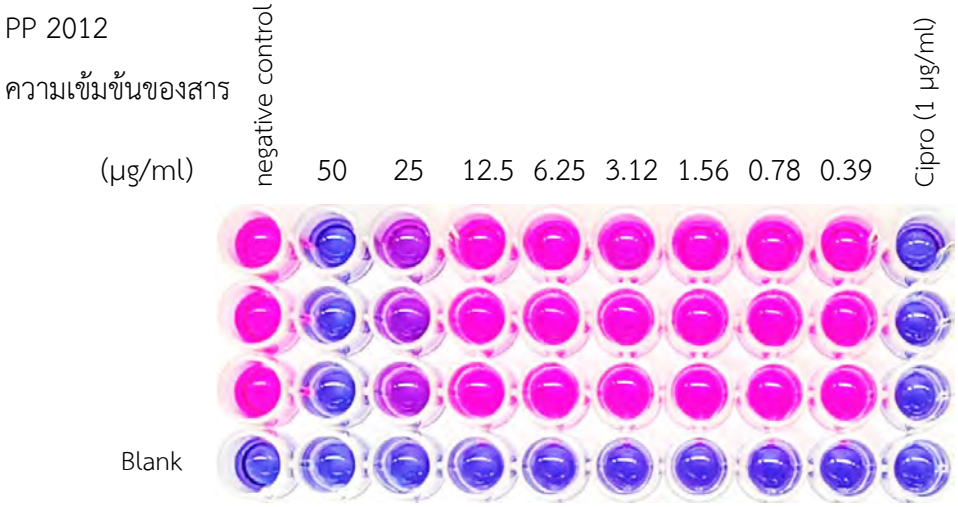
รูป 3-21 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร AS-CY 1016 ต่อ *C. acnes* DSM 1897



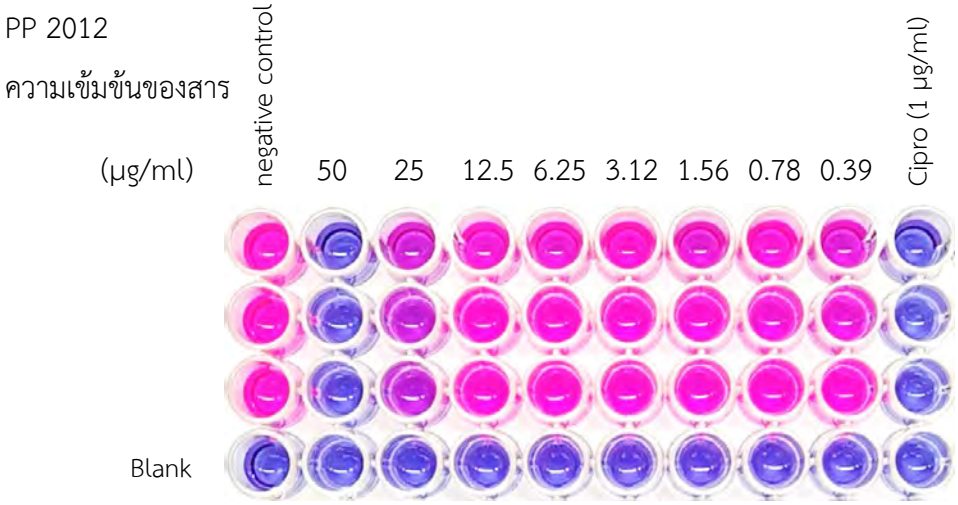
รูป 3-22 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2006 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827



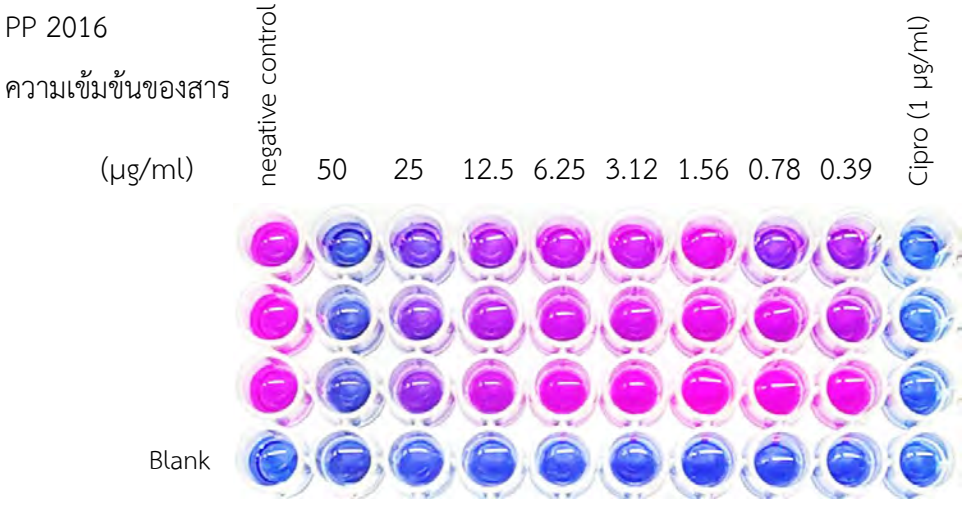
รูป 3-23 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2006 ต่อ *C. acnes* DSM 1897



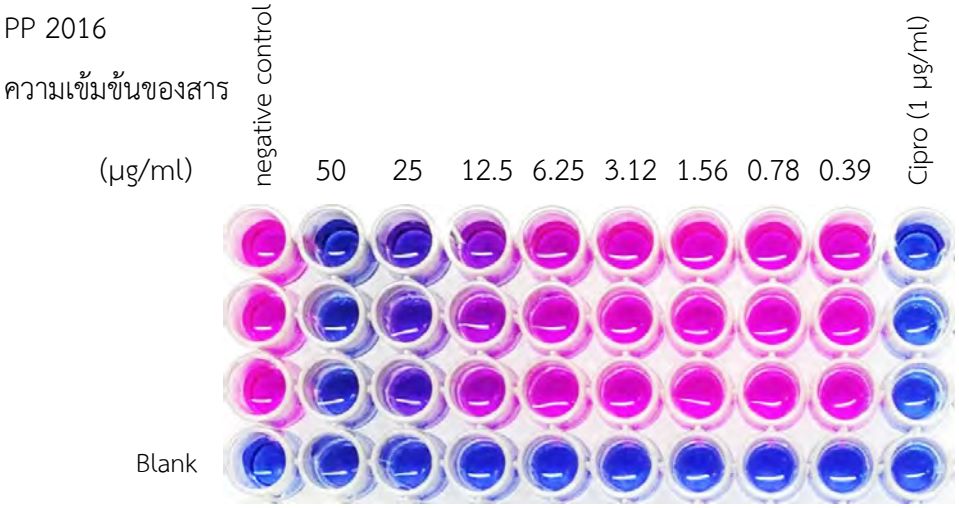
รูป 3-24 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2012 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827



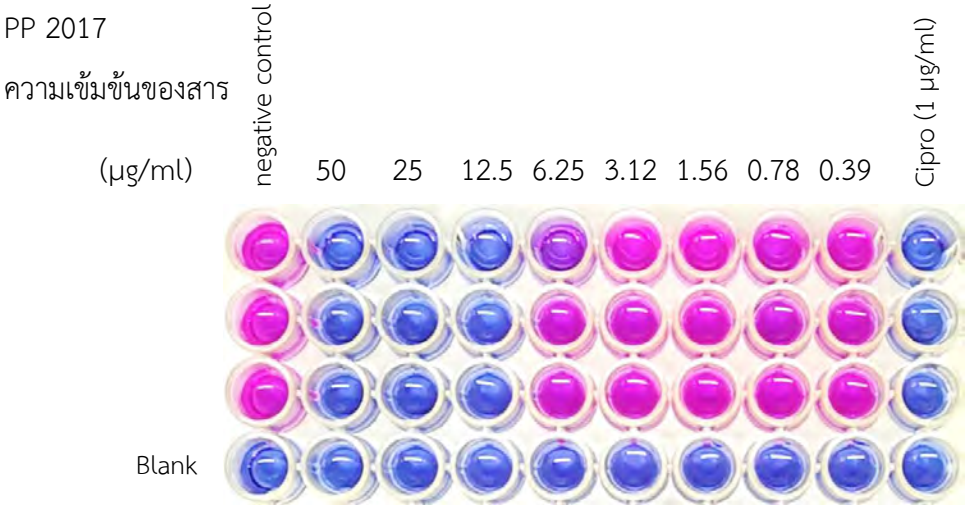
รูป 3-25 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2012 ต่อ *C. acnes* DSM 1897



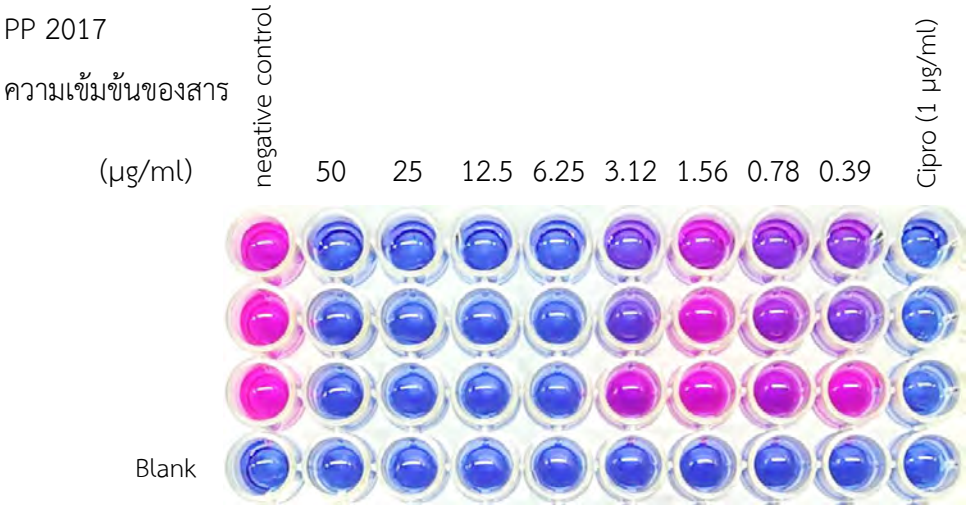
รูป 3-26 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2016 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827



รูป 3-27 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2016 ต่อ *C. acnes* DSM 1897



รูป 3-28 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2017 ต่อ *C. acnes* ATCC 11827



รูป 3-29 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของสาร PP 2017 ต่อ *C. acnes* DSM 1897

เลี้ยงเซลล์แขวนลอยความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร MHB ที่มีสารธรรมชาติที่ให้ผลบวกที่แปรผันความเข้มข้นซึ่งเจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นเติมสารละลาย resazurin บ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง จากรูปทั้งหมดแสดงการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยเมื่อพิจารณารูป 3-8 จะเป็นการเจือจางสาร AS-CY 205 แบบอนุกรม 2 เท่า ของ *C. acnes* ATCC 11827 พบว่าความเข้มข้นแรกที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในรูป 3-9 เป็นการเจือจางสาร AS-CY 205 แบบอนุกรม 2 เท่า ของเชื้อ *C. acnes* DSM 1897 พบว่าความเข้มข้นแรกที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดสอบรูป 3-10 และ 3-11 เป็นการเจือจางสาร AS-CY 211 แบบอนุกรม 2 เท่าของ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของ *C. acnes* ATCC 11827 พบว่าความเข้มข้นแรกที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของเชื้อ *C. acnes* DSM 1897 เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิด ถูกยับยั้งด้วยสารชนิดนี้ที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน

จากผลการทดสอบรูป 3-12 และ 3-13 เป็นการเจือจางสาร AS-CY 212 แบบอนุกรม 2 เท่าของ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของ *C. acnes* ATCC 11827 พบว่าความเข้มข้นแรกที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของเชื้อ *C. acnes* DSM 1897 เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นน้อยกว่าเชื้อ *C. acnes* ATCC 11827

จากผลการทดสอบรูป 3-14 และ 3-15 เป็นการเจือจางสาร AS-CY 1012 แบบอนุกรม 2 เท่าของ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของ *C. acnes* ATCC 11827 พบว่าความเข้มข้นแรกที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของเชื้อ *C. acnes* DSM 1897 เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดถูกยับยั้งด้วยสารชนิดนี้ที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน

จากผลการทดสอบรูป 3-16 และ 3-17 เป็นการเจือจางสาร AS-CY 1013 แบบอนุกรม 2 เท่าของ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของ *C. acnes* ATCC 11827 พบว่าความเข้มข้นแรกที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 6.25

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของเชื้อ *C. acnes* DSM 1897 เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดถูกยับยั้งด้วยสารชนิดนี้ที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน

จากผลการทดสอบรูป 3-18 และ 3-19 เป็นการเจือจางสาร AS-CY 1014 แบบอนุกรม 2 เท่าของ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของ *C. acnes* ATCC 11827 พบว่าความเข้มข้นแรกที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของเชื้อ *C. acnes* DSM 1897 เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดถูกยับยั้งด้วยสารชนิดนี้ที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน

จากผลการทดสอบรูป 3-20 และ 3-21 เป็นการเจือจางสาร AS-CY 1016 แบบอนุกรม 2 เท่าของ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของ *C. acnes* ATCC 11827 พบว่าความเข้มข้นแรกที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของเชื้อ *C. acnes* DSM 1897 เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดถูกยับยั้งด้วยสารชนิดนี้ที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน

จากผลการทดสอบรูป 3-22 และ 3-23 เป็นการเจือจางสาร PP 2006 แบบอนุกรม 2 เท่าของ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของ *C. acnes* ATCC 11827 พบว่าความเข้มข้นแรกที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของเชื้อ *C. acnes* DSM 1897 เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดถูกยับยั้งด้วยสารชนิดนี้ที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน

จากผลการทดสอบรูป 3-24 และ 3-25 เป็นการเจือจางสาร PP 2012 แบบอนุกรม 2 เท่าของ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของ *C. acnes* ATCC 11827 พบว่าความเข้มข้นแรกที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของเชื้อ *C. acnes* DSM 1897 เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดถูกยับยั้งด้วยสารชนิดนี้ที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน

จากผลการทดสอบรูป 3-26 และ 3-27 เป็นการเจือจางสาร PP 2016 แบบอนุกรม 2 เท่าของ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของ *C. acnes* ATCC 11827 พบว่าความเข้มข้นแรกที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของเชื้อ *C. acnes* DSM 1897 เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิด ถูกยับยั้งด้วยสารชนิดนี้ที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน

จากผลการทดสอบรูป 3-28 และ 3-29 เป็นการเจือจางสาร PP 2017 แบบอนุกรม 2 เท่าของ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของ *C. acnes* ATCC 11827 พบว่าความเข้มข้นแรกที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นแรกที่สี resazurin ของเชื้อ *C. acnes* DSM 1897 เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นน้อยกว่าเชื้อ *C. acnes* ATCC 11827

ซึ่งจากผลของ MIC ของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ได้สรุปในตาราง 3-2

ตาราง 3-2 ค่า MIC ของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* สายพันธุ์ ATCC 11827 และสายพันธุ์ DSM 1897

ลำดับที่	สาร	MIC (µg/ml)	
		C. acnes ATCC 11827	*C. acnes* DSM 1897
1	AS-CY 205	12.5	12.5
2	AS-CY 211	25	25
3	AS-CY 212	50	12.5
4	AS-CY 1012	6.25	6.25
5	AS-CY 1013	6.25	6.25
6	AS-CY 1014	12.5	12.5
7	AS-CY 1016	12.5	12.5
8	PP 2006	50	50
9	PP 2012	50	50
10	PP 2016	50	50
11	PP 2017	12.5	6.25

จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า จากการคัดกรองหาสารธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญ *C. acnes* ATCC 11827 รวมทั้งหมด 48 ชนิด พบว่าสารธรรมชาติที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ที่แตกต่างกัน คือทั้งที่ไม่มีฤทธิ์ ฤทธิ์อ่อน และมีฤทธิ์ดี จำนวน 11 ชนิด โดยสารที่มีฤทธิ์ดีได้ถูกนำมาทดสอบหาค่า MIC ต่อไปในเชื้อ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 จากค่า MIC จากสารทดสอบ พบว่า 9 ใน 11 สาร ให้ค่า MIC ที่เท่ากันใน *C. acnes* ทั้งสองสายพันธุ์ ในขณะที่ 2 ใน 11 สาร คือ AS-CY 212 และ PP2017 ที่พบว่าค่า MIC ใน *C. acnes* สายพันธุ์ DSM 1897 มีค่าต่ำกว่า ซึ่งจากการทดสอบสามารถสรุปได้ว่า สารธรรมชาติ AS-CY1012 และ AS-CY1013 มีฤทธิ์ที่ดีที่สุด เนื่องจากมีค่า MIC ของ *C. acnes* ทั้งสองสายพันธ์ต่ำสุด คือ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 การหาค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ของสารที่ให้ผลบวก

นำสารธรรมชาติที่ให้ผลบวกจากการคัดกรองทั้งหมด 11 ชนิดมาทำการทดสอบกับ *C. acnes* ATCC 11827 โดยชุดควบคุมบวก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งของเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยในอาหารที่มียา ciprofloxacin และชุดควบคุมลบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งของเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยในอาหารที่มี DMSO ซึ่งการพิจารณาค่า MBC ได้พิจารณาจากความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง ซึ่งแสดงค่าดังในตาราง

ตาราง 3-3 ค่า MIC และค่า MBC ของสารธรรมชาติที่ให้ผลบวกทั้ง 11 สาร

ลำดับที่	สาร	MIC (µg/ml)		MBC (µg/ml)
		C. acnes ATCC 11827	*C. acnes* DSM 1897	*C. acnes* ATCC 11827
1	AS-CY 205	12.5	12.5	ไม่ได้ทดสอบ
2	AS-CY 211	25	25	50
3	AS-CY 212	50	12.5	50
4	AS-CY 1012	6.25	6.25	ไม่ได้ทดสอบ
5	AS-CY 1013	6.25	6.25	ไม่ได้ทดสอบ
6	AS-CY 1014	12.5	12.5	ไม่ได้ทดสอบ
7	AS-CY 1016	12.5	12.5	ไม่ได้ทดสอบ
8	PP 2006	50	50	ไม่ได้ทดสอบ
9	PP 2012	50	50	ไม่ได้ทดสอบ
10	PP 2016	50	50	ไม่ได้ทดสอบ
11	PP 2017	12.5	6.25	ไม่ได้ทดสอบ

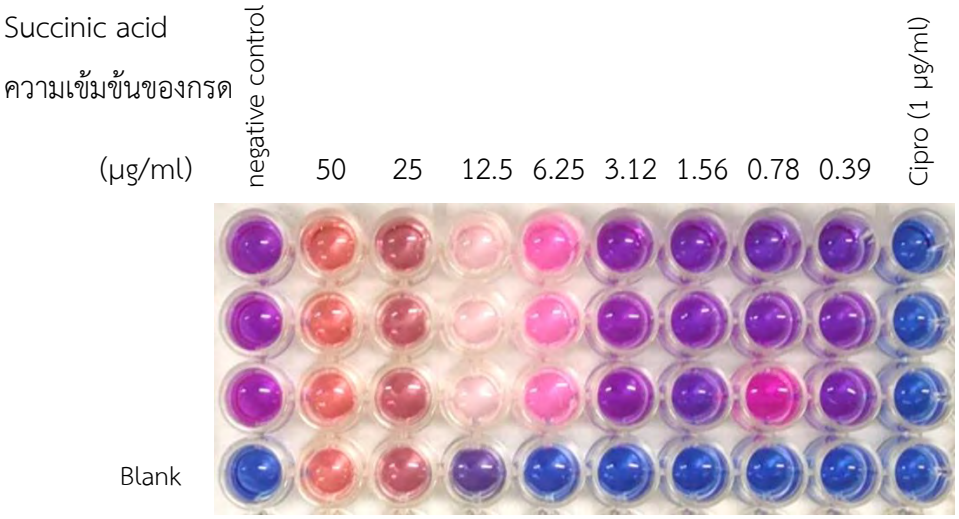
ได้ทำการทดสอบหาค่า MBC ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 ใน 2 สาร คือ AS-CY 211 และ AS-CY 212 พบว่าทั้ง 2 สารมีฤทธิ์ฆ่า *C. acnes* ATCC 11827 เท่ากัน มีค่า MBC เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อีก 9 สาร ยังไม่ได้รับการทดสอบหาค่า MBC

3.4 การศึกษาการออกฤทธิ์เมื่อใช้สารธรรมชาติร่วมกับกรดธรรมชาติในการต้านการเจริญของ *C. acnes*

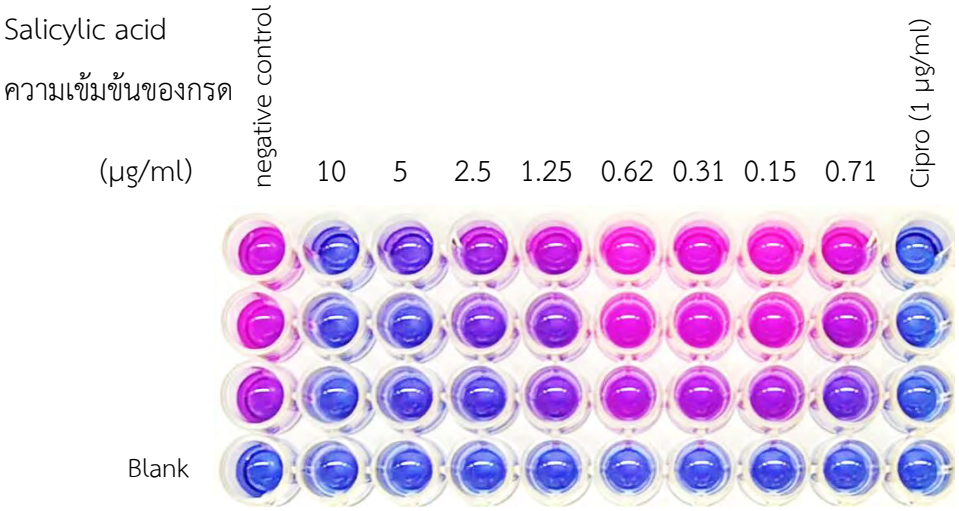
จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า succinic acid และ salicylic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. acnes* (Yanhan W, 2014 and Jin L, 2019) ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงได้เลือกกรดธรรมชาติทั้ง 2 ชนิดนี้มาทำการศึกษาการออกฤทธิ์เมื่อใช้สารธรรมชาติร่วมกับกรดธรรมชาติในการต้านการเจริญของ *C. acnes*

3.4.1 การหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) ของกรดธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes*

ทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสาร succinic acid และ salicylic acid ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ได้ ซึ่งจากผลการทดสอบแสดงผลดังภาพ



รูป 3-30 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของกรด Succinic acid ต่อ *C. acnes* ATCC 11827

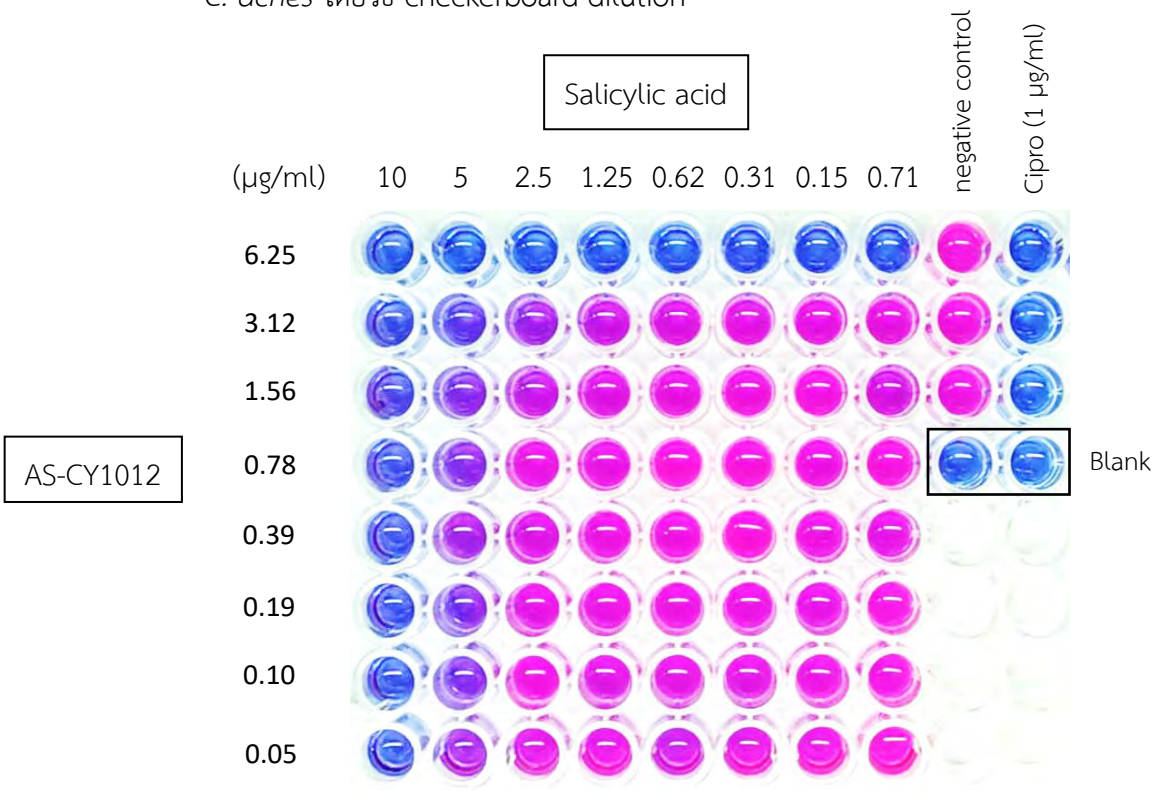


รูป 3-31 ค่า MIC เจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ของกรด Salicylic acid ต่อ *C. acnes* ATCC 11827

เลี้ยงเซลล์แขวนลอยความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร MHB ที่มีกรดธรรมชาติที่คัดเลือกมา 2 ชนิด คือ succinic acid และ salicylic acid ที่แปรผันความเข้มข้นซึ่งเจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นเติมสารละลาย resazurin บ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง โดยเมื่อพิจารณารูป 3-30 เป็นการเจือจาง succinic acid แบบอนุกรม 2 เท่า ของ *C. acnes* ATCC 11827 พบว่าค่าความเป็นกรดของของ succinic acid ที่มากเกินไป (pH=2) ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการอ่านผลด้วยวิธีการเติม resazurin เนื่องจากสีที่แสดงให้เห็นผิดเพี้ยนไปดังแสดงในหลุมที่เป็น blank ซึ่งเป็นหลุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่า succinic acid ยังสามารถเพิ่มการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ATCC 11827 ซึ่งผลที่ได้ขัดแย้งกับงานวิจัยที่มีรายงานมาก่อนหน้า (Yanhan W, 2014 and Jin L, 2019)

ในรูป 3-31 เป็นการเจือจาง Salicylic acid แบบอนุกรม 2 เท่า ของเชื้อ *C. acnes* DSM 1897 พบว่าความเข้มข้นแรกที่ resazurin เป็นสีน้ำเงินหรือไม่มีการเปลี่ยนสีเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า Salicylic acid มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *C. acnes* ดังนั้นจึงเลือกนำกรดธรรมชาติ Salicylic acid มาหาผลการส่งเสริมฤทธิ์กันกับสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ดีที่สุด โดยใช้วิธี checkerboard dilution เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ดีที่สุดในการต้านการเจริญของเชื้อ *C. acmes*

3.4.2 การศึกษาการออกฤทธิ์เมื่อใช้สารธรรมชาติร่วมกับกรดธรรมชาติในการต้านการเจริญของ *C. acnes* โดยวิธี checkerboard dilution



รูป 3-32 แสดงผล checkerboard dilution ของ AS-CY1012 และ Salicylic acid

ในการศึกษาการออกฤทธิ์เมื่อใช้สารธรรมชาติร่วมกับกรดธรรมชาติในการต้านการเจริญของ *C. acnes* โดยวิธี checkerboard dilution ในการศึกษานี้ได้ใช้ salicylic acid ทดสอบกับสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ดีที่สุด ซึ่งได้รับจากค่า MIC ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ AS-CY1012 และ AS-CY1013 จากผลการทดสอบ พบว่า Salicylic acid และสารธรรมชาติ AS-CY1012 ไม่มีผลต่อกันในการออกฤทธิ์ กล่าวคือ ไม่มีฤทธิ์ส่งเสริมกันและไม่มีฤทธิ์ต้านกัน ดังแสดงในรูป 3-32 ในขณะที่ Salicylic acid และสารธรรมชาติ AS-CY1013 ยังไม่ได้รับการทดสอบ

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ใช้วิธี Resazurin Microtiter Plate Assay (REMA) ในการคัดกรองสารธรรมชาติทั้งหมดจำนวน 48 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย *C. acnes* โดยการใช้ *C. acnes* ATCC 11827 ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานสำหรับการคัดกรอง ซึ่งจากการคัดกรองพบสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* ทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ดังนี้ AS-CY 205, AS-CY 211, AS-CY 212, AS-CY 1012, AS-CY 1013, AS-CY 1014, AS-CY 1016, PP 2006, PP2012, PP2016 และ PP2017 โดยผลการคัดกรองสารธรรมชาติทั้งหมด ได้ถูกแสดงในตาราง 3-1

จากนั้นจึงนำสารธรรมชาติทั้งหมดที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* ATCC 11827 ทั้ง 11 ชนิด มาทำการทดสอบหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) โดยทำการทดสอบกับเซลล์ *C. acnes* ATCC 11827 และ *C. acnes* DSM 1897 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ถูกแยกได้จากผู้ที่เป็นสิว พบว่าสารธรรมชาติที่ให้ผลบวกทุกชนิดมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *C. acnes* DSM 1897 ได้ โดยพบว่าสารธรรมชาติ AS-CY 1012 และ AS-CY 1013 มีค่า MIC ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ต่ำสุด คือ 6.25 ug/ml โดยค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของสารธรรมชาติทั้งหมดที่ทดสอบได้ถูกแสดงไว้ในตาราง 3-2

จากนั้นนำสารธรรมชาติทั้งหมดที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. acnes* ทั้งหมด 11 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบหาค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ต่อ *C. acnes* ATCC 11827 พบว่าจากการทดสอบสารที่ให้ผลบวก 2 สาร คือ AS-CY 211 และ AS-CY 212 พบฤทธิ์ฆ่า *C. acnes* ATCC 11827 โดยสารที่มีฤทธิ์ฆ่า *C. acnes* ATCC 11827 ที่ดีที่สุด คือ AS-CY 211 และ AS-CY 212 ซึ่งมีค่า MBC เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน แสดงค่าดังในตาราง 3-3 ในขณะที่สารธรรมชาติอีก 9 ชนิด ยังไม่ได้ถูกนำมาทดสอบ

นอกจากนี้ได้คัดเลือกสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *C. acnes* ได้ดีที่สุด ซึ่งได้รับจากผลการทดลองหาค่า MIC คือสารธรรมชาติ AS-CY1012 และ AS-CY 1013 มาทดสอบหาการออกฤทธิ์เสริมกันร่วมกับกรดธรรมชาติที่ได้เลือกมาว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *C. acnes* คือ Salicylic acid จากการทดสอบพบว่า Salicylic acid และสารธรรมชาติ AS-CY1012 ไม่มีผลต่อกันในการออกฤทธิ์ กล่าวคือ ไม่มีฤทธิ์ส่งเสริมกันและไม่มีฤทธิ์ต้านกัน ดังแสดงในรูป 3-32 ในขณะที่สาร AS-CY 1013 ยังไม่ได้รับการทดสอบ

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้สรุปได้ว่าสารธรรมชาติ AS-CY 1012 และ AS-CY 1013 น่าจะมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในยารักษาสิวได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ แพรเขียว. 2551. การคัดกรองสารต้านเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Staphylococcus aureus* ดื้อยาจากสารสกัดสมุนไพรจากสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยวิธี Resazurin microtiter plate. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทศพล คิดชอบ. 2552. การพัฒนาวิธีการคัดกรองที่ให้ผลสัมฤทธิ์สูงเพื่อหาฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจากสมุนไพรไทย. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ธนวรรณ จันทร์สุระ. 2560. การคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Propionibacterium acnes* จากสารที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ธันยพร วิวรรธน์อภินัย. 2559. การคัดกรองและศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภญ. วรรณพร ศรีสุคนธรัตน์. 2558. สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในบ้านเรือนหรือทางสาธารณสุข. สำนักควบคุมเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข

รศ.นพ.นภดล นพคุณ และคณะ. 2010. Clinical Practice Guideline Acne. [Online]. http://www.dst.or.th/files_news/Acne_2010.pdf. Accessed 20 April 2018

ศรีศุภลักษณ์ สิงคาลวณิช. Update management of acne in adolescent. Thai Pediatric Joumal. 2009 Vol.16 No.3

Akaza N, Akamatsu H, Numata S et al. Fatty acid compositions of triglycerides and free fatty acids in sebum depend on amount of triglycerides, and do not differ in presence or absence of acne vulgaris. J Dermatol. 2015 Dec;41(12):1069-76

Albert-JY, Shinta M, John-JY, Sunita K, Chee-HC, Chien-CC, Chun-MH. A microtube Array Membrane (MTAM) Encapsulated Live Fermenting *Staphylococcus epidermidis* as a Skin Probiotic Patch against *Cutibacterium acnes*. Int. J. Mol. Sci. 2019 Jan; 20(1):14

Biswal I, Gaind R, Kumar N et al. In vitroantimicrobial susceptibility patterns of *Propionibacterium acnes* isolated from patients with acne vulgaris. J Infect Dev Ctries. 2016; 10(10):1140-45

Bong Seon Kang, Jae-Gu Seo, Gwa-Su Lee, Jung-Hwa Kim, Sei Yeon Kim, Ye Won Han, Hoon Kang, Hyung Ok Kim, Ji Hwan Rhee, Myung-Jun Chung, and Young Min Park. Antimicrobial Activity of Enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against

Propionibacterium acnes, the Causative Agent in acnes Vulgaris, and Its Therapeutic Effect. The J. Microbiol. 2009. P.101-9

Chandran S, Shanmugam M, Krishnaswamy B, Prabhanand BJ, Venkat K and Shunmugiah Karutha P. A combination of ellagic acid and tetracycline inhibits biofilm formation and the associated virulence of *Propionibacterium acnes* in vitro and in vivo, Biofouling. 2016. 32:4. P.397-410

Claudia J, Mauro M, Maria LP and Marianna U. In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oils from Sardinian Flora against *Cutibacterium* (Formerly *Propionibacterium*) *acnes* and Its Enhancement by Chitosan. Sci. Pharm. 2018

Cogen AL, Nizet V and Gallo RL. Skin microbiota: A source of disease or defence?. Br J Dermatol. 2008 Mar;158(3):442-55

Crina S, Bianca C, Gabriela D, Coralia B, Veronica D, Mariana-CC, Marcela P, Gratiela GP, Luminita M, Veronica L. Development and Sequential Analysis of a New Multi-Agent, Anti-Acne Formulation Based on Plant-Derived Antimicrobial and Anti-Inflammatory Compounds. Int J Mol Sci. 2017 Jan 17;18(1):175

Dreno B, Pecastaings S, Corvec S, Veraldi S, Khammari A, Roques C. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris. JEADV. 2018 June. P.5-14

Hellmark B, Unemo M, Nilsdotter-Augustinsson A, Soderguist B. In vitro antimicrobial synergy testing of coagulase-negative staphylococci isolated from prosthetic joint infections using Etest and with a focus on rifampicin and linezolid. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 29(5)(2010 May) 591-95

Jin L, Tianxin C, Xiang W, Xiaoxue L, Dan D, Gu H, Xian J. Salicylic acid treats acne vulgaris by suppressing AMPK/SREBP1 pathway in sebocytes. Experimental Dermatology. 2019. P.787-93

Keisuke N, Hidemasa N, Yuko T, Nobukazu H, Makoto K and Norihisa N. *Propionibacterium acnes* is developing gradual increase in resistance to oral tetracyclines. J. Med. Microbiol. 2017. P.66:8–12

Kornphaka K, Yuda C, Natcha C, Pravit A. The efficacy of glycolic acid, salicylic acid, glucono-lactone, and licochalcone A combined with 0.1% adapalene vs adapalene monotherapy in mild-to-moderate acne vulgaris: a double-blinded within-person comparative study. Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. 2019:12. P151-61

Kraft J, Freiman A. Management of acme. CMAJ. 2011;183(7):E430-E435

Lippincott W, Wilkins, Philadelphia, PA. Antimicrobial Combinations. In Antibiotics In Laboratory Medicine. 2005. Pp.365-441

Luvira V. Overveiw of antibiotic resistance. Songkla Med J. 2006;24(5):453-59

McGraft JA, Uitto J. Anatomy and Organization of Human Skin. In:Bums T, Breathnach S, Cox N, et al., editors. Rook′s textbook of Dermatology. 8thed. West Sussex: Wiley-Blackwell;2010. P.3.1-3.53

Mi-Sun Kang , Jong-Suk Oh , Seok-Woo Lee, Hoi-Soon Lim, Nam-Ki Choi, and Seon-Mi Kim. Effect of *Lactobacillus reuteri* on the Proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. The J Microbiol. 2012. P.137–42

Orapin K, Kanlayapron C, Ailada K, Janissata J. Anti-Acne-Inducing Bacterial Activity (*Propionibacterium acnes*) of Trans-Oxyresveratrol and Ressorcinol from Heartwood of Artocarpus lakoocha Roxb. Adv. Sci. 2017

Picardo M, Ottaviani M, Camera E, Mastrofrancesco A. Sebaceous gland lipids. Dermatoendocrinol. 2009 Mar;1(2):68-71

Rathi SK. Acne vulgaris treatment : the current scenario. Indian J Dermatol. 2011 56(1), 7-13

Richard W, Stefan G, Wolfgang W, Jean-Claude G, Jason K. W. The dynamic anatomy and patterning of skin. Exp. Dermatol. 2015 Aug. P.92-98

Sket T, Ramuta TZ, Starcic EM, Kreft ME. Different Effects Of Amniotic Membrane Homogenate on the Growth Of Uropathogenic *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* And *Serratia marcescens*. Infect. Drug Resist. 2019. P.3365-3375

Tsai T-H, Chuang L-T, Lien T-J et al. Rosmarinus officinalis Extract Suppresses *Propionibacterium acnes*-Induced Inflammatory Responses. J Med Food. 2013 Apr; 16(4): 324-33

Williams HC, Dellavalle RP and Garner S. Acne vulgaris. Lancet. 2012;379, 361-372.

Zouboulis CC, Boschnakow A. Chronological ageing and photoageing of the human sebaceous gland. Clin Exp Dermatol. 2001;26:600-7

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Muller-Hinton Broth (MHB)

Beef extract	20 กรัม
Acidicase Peptone	17.5 กรัม
Starch	1.5 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เมื่อละลายเป็นเนื้อเดียวกันจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Muller-Hinton Agar (MHA)

Beef extract	20 กรัม
Acidicase Peptone	17.5 กรัม
Starch	1.5 กรัม
Agar	17.0 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

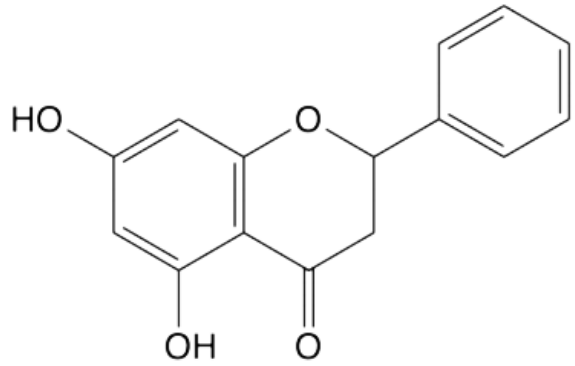
pH 7.4 $\pm$0.2

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เมื่อละลายเป็นเนื้อเดียวกันจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

รายละเอียดของสารธรรมชาติบางตัว

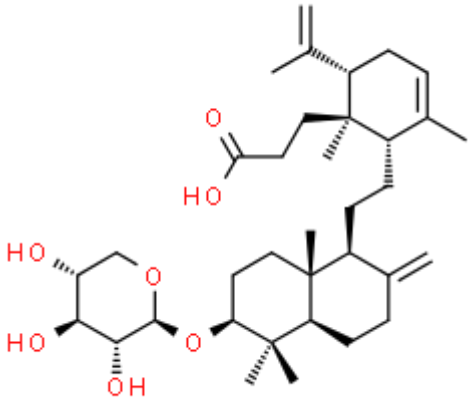
Pinocembrin (PP2006)



ที่มา : http://www.arda.or.th/datas/qrfile

Pinocembrin มีชื่อเรียกตาม IUPAC ว่า 5,7-dihydroxyflavanone จัดเป็นสารประเภท Unprenylated flavanone มีลักษณะทางกายภาพเป็นผลึกสีขาวแกมเหลือง ที่สามารถสกัดได้จากต้นและรากของกระชายเหลือง โดยมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Boesenbergia pandurata* พบว่ามีคุณสมบัติทางชีวภาพทั่วไป คือ ต้านการอักเสบและติดเชื้อ, ช่วยสมานแผล, ระงับโรคฉวยโอกาสในผู้ป่วยโรคเอดส์, เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ, ป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาท, ต้านการกลายพันธุ์ต้านมะเร็ง และ ลดการสะสมไขมัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาและพบว่า Pinocembrin มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดสิว (*C. acnes*) ได้ (สุคันธรส ธาดากิตติสาร และคณะ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

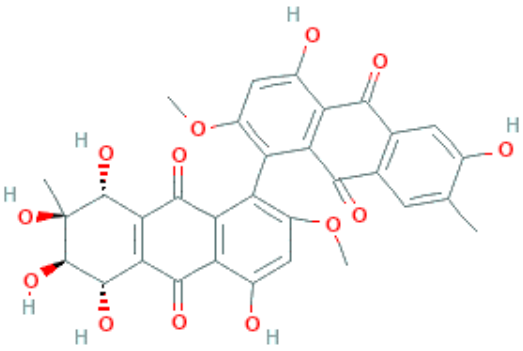
Lansioside C (PP2012)



ที่มา : http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10268044.html

Lansioside C มีชื่อเรียกตาม IUPAC ว่า 3-[2-(2-{5,5,8a-trimethyl-2-methylidene-6-[(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)oxy]-decahydronaphthalen-1-yl}ethyl)-1,3-dimethyl-6-(prop-1-en-2-yl) cyclohex-3-en-1-yl]propanoic acid เป็นสารประเภท triterpenoid glycoside เป็นสารต้านจุลชีพที่สำคัญที่แยกได้จากเปลือกผลไม้ลองกอง (Lansium domesticum) จากการศึกษา พบว่าสารนี้สามารถยังยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก Staphylococcus aureus และ Bacillus subtilis ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านยีสต์และรา (Eufrocinio C และคณะ, Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2015; 3(5): 140-143)

Alterporriol A (PP2016)



ที่มา : https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alterporriol-A

Alterporriol A มีชื่อเรียกตาม IUPAC ว่า 4,6-dihydroxy-2-methoxy-7-methyl-1-[(5*S*,6*R*, 7*S*,8*R*)-4,5,6,7,8-pentahydroxy-2-methoxy-7-methyl-9,10-dioxo-6,8-dihydro-5*H*-anthracen-1-yl]anthracene-9,10-dione เป็นสารประเภท anthraquinone สามารถแยกได้จากเชื้อรา *Alternaria porri* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ก่อโรคในพืช ลักษณะของโรคคือทำให้เกิดโรคใบจุดม่วงหรือใบไหม้กับพืชพวกหอมแบ่งหรือหอมใหญ่ จากการศึกษาพบว่า มีคุณสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB (ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศร และคณะ, กลุ่มวิจัยโรคพืช ส านักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2555)

Violacein (PP2017)

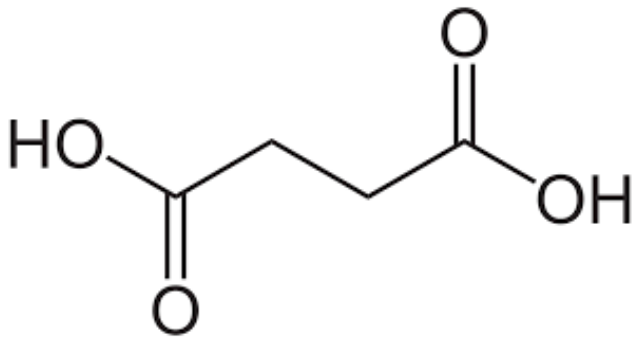
ที่มา : http://oknation.nationtv.tv/blog/olympus27/2013/09/04/entry-1

Violacein ลักษณะทางกายภาพเป็นผลึกสีม่วงเข้ม สามารถสกัดแยกได้จากแบคทีเรีย *Janthinobacterium lividium* (*J.lividum*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน เจริญอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน มีถิ่นอาศัยในดิน ลักษณะเด่น คือ มีโคโลนีสีม่วงคล้ำ เกือบดำ สีนี้มาจากสาร Violacein ซึ่งเกิดจากการ metabolize สาร glycerol จากแหล่งคาร์บอน ซึ่งสารนี้มีคุณสมบัติในการต่อต้านแบคทีเรียไวรัส โปรโตซัว และเชื้อราด้วย คุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อราที่น่าสนใจเป็นพิเศษ คือ การที่ผิวหนังของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอย่าง Salamande หลังแดงมีสาร Violacein พวก indole-3 - carboxaldehyde ทำให้มันไม่ติดเชื้อ chytridiomycosis จากรา Batrachochytrium dendrobatidis ซึ่งเป็นราก่อโรคสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญพันธ์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (vassana musa และคณะ, 2014)

ภาคผนวก ค

รายละเอียดกรดธรรมชาติที่น่าสนใจ

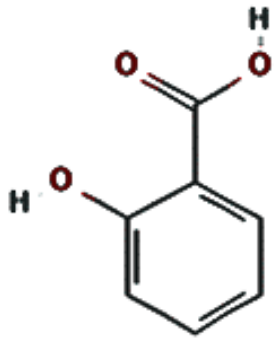
Succinic acid



ที่มา : http://digital_collect.lib.buu.ac.th/dcms/files/54910150.pdf

กรดซัคซินิค (Succinic acid) มีสูตรโมเลกุลคือ C4H6O4 พบครั้งแรกในอำพัน (Amber) กรดซัคซินิคเป็นสารตัวกลางและผลิตภัณฑ์ที่สำคัญและมีบทบาทในการนำไปใช้อย่างกว้างขวาง สำหรับอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตอาหาร สารปรุงแต่งอาหาร อุตสาหกรรมยา สารลดแรงตึงผิว ผงซักฟอก สารฆ่าเชื้อโรค สารตัวกลางในการทำน้ำหอม กรดซัคซินิคยังเป็นสาร ตัวกลางสำหรับอุตสาหกรรมเคมี ถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารเคมีหลากหลายชนิด นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพของกรดซัคซินิคที่มีต่อการยับยั้งการเกิดเชื้อสิวได้ ซึ่งต่อมาได้มีการนำกรดซัคซินิคไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์รักษาสิวหลาย ๆ ชนิด (ณัฐพงษ์ ดิฐกุลชัยมงคล, 2559)

Salicylic acid



ที่มา : https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Salicylic-acid#section=InChI

Salicylic acid มีชื่อเรียกตาม IUPAC ว่า 2-hydroxybenzoic acid เป็นสารสกัดหลักที่พบในกลุ่มเครื่องสำอางดูแลปัญหาเรื่องสิว ผลิตมาจากเปลือกของ ต้นวิลโล่ Willow Tree นิยมนำมาผสมกับเครื่องสำอาง เพราะสามารถผลัดเซลล์ผิวได้ดี ซึ่งละลายได้ดีในน้ำมัน นอกจากนี้กรดธรรมชาตินี้ใช้รักษาโรคบนผิวหนัง เช่น หูดที่ผิวหนังหรือเท้า กรดซาลิไซลิกเป็น keratolytic มันเป็นยาประเภทเดียวกันกับแอสไพริน (ซาลิไซเลต) มันทำงานโดยการเพิ่มปริมาณความชุ่มชื้นในผิวและละลายสารที่ทำให้เซลล์ผิวติดกัน ทำให้ง่ายต่อการผลัดเซลล์ผิว อีกทั้งยังได้มีการศึกษาเพิ่มเติม พบว่ากรดซาลิซิลิกมีฤทธิ์ให้สารละลายมีสภาพเป็นกรดช่วยต่อต้าน และยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวได้ (National Library Of Medicine)