วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 31 ฉบับที่ 6 พฤศจิกายน - ธันวาคม 2565

Journal of Health Science
Vol. 31 No. 6, November - December 2022

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original article*

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ของแผ่นแปะจากเปลือกมะนาว ที่มีสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสน

ณัฐณิชา ธาดาชัยพงศธร มัธยมศึกษาตอนปลาย
อิสรีย์ คหกิจไพศาล มัธยมศึกษาตอนปลาย
กัญญณัช คงวณิช มัธยมศึกษาตอนปลาย
อรวรรณ ปิยะบุญ ปร.ด.
สาขาวิชาชีววิทยาและวิทยาศาสตร์สุขภาพ โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ นครปฐม

วันรับ: 1 เม.ย. 2565
วันแก้ไข: 11 ก.ค. 2565
วันตอบรับ: 21 ก.ค. 2565

บทคัดย่อ เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียสาเหตุหลักของการเกิดสิวอักเสบ ซึ่งวิธีการรักษาสามารถใช้แก่นฝางเสนที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยการนำสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนกับเพคตินจากเปลือกมะนาวมาพัฒนาเป็นแผ่นแปะสิวเพื่อลดการอักเสบ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย S. aureus และพัฒนาแผ่นแปะจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย S. aureus โดยแก่นฝางเสนถูกสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion เทียบกับผลการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะคลินดามัยซิน ความเข้มข้น 10,000 ppm พบว่า สารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนความเข้มข้น 10,000 ppm, 20,000 ppm, 40,000 ppm และยาปฏิชีวนะคลินดามัยซินความเข้มข้น 10,000 ppm สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย S. aureus เมื่อนำสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) พบว่า ค่า MIC ของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 625 ppm และค่า MBC ของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 40,000 ppm ต่อจากนั้นพัฒนาแผ่นแปะจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนเพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่าแผ่นแปะจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนความเข้มข้น 40,000 ppm สามารถฆ่าเชื้อ S. aureus โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 1.57 เซนติเมตร ดังนั้น ควรมีการศึกษาทดลองการใช้แผ่นแปะจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนทางคลินิกเพื่อพัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เวชสำอางต่อไป

คำสำคัญ: **แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*; แผ่นแปะจากเปลือกมะนาว; วิธี disc diffusion**

บทนำ

สิวเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนในร่างกายที่สร้างฮอร์โมนแอนโดรเจนมากกว่าปกติ โดยมีการสร้างไขมันเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการอุดตันจนเกิดเป็นสิวอุดตัน เมื่อมีการอักเสบของสิวเกิดขึ้นทำให้ปวดและมีลักษณะแดงนูนออกมากลายเป็นสิวอักเสบ แต่มีอยู่สาเหตุหนึ่งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ซึ่งพบได้ที่ผิวหนังและเยื่อเมือกของมนุษย์[1] ในทางการ

แพทย์แผนปัจจุบันการรักษาสิวอักเสบมีหลายวิธี วิธีที่นิยมใช้คือ การใช้ยาปฏิชีวนะสามารถรักษาสิวอักเสบได้เร็ว แต่ยาปฏิชีวนะก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาและการแพ้ต่อผู้ใช้[2] ดังนั้นการรักษาสิวอักเสบด้วยการใช้สารสกัดจากสมุนไพรเป็นวิธีการที่น่าสนใจเนื่องจากสารสกัดจากสมุนไพรมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค[3] เนื่องจากแก่นของฝางเสนมีสารบราซิลิน (brazilin) มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเนื่องจากสารบราซิลินมีความสามารถในการยับยั้งดีเอ็นเอและการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ของแบคทีเรีย[4] โดยเฉพาะบราซิลินมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactams ได้[5] จึงมีแนวคิดพัฒนาสารสกัดของแก่นฝางเสนในรูปของแผ่นแปะเพื่อสะดวกต่อการใช้งาน และเป็นรูปแบบเภสัชภัณฑ์ที่สามารถปลดปล่อยตัวยาได้ต่อเนื่องและนานขึ้น โดยเลือกใช้แผ่นแปะที่ได้จากเปลือกมะนาวเพราะสามารถให้ความยืดหยุ่นต่อผู้ใช้งานและไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้งาน[6]

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และพัฒนาแผ่นแปะรักษาสิวจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดจากฝางเสนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สำหรับเป็นทางเลือกในการเพิ่มประสิทธิภาพของแผ่นแปะในปัจจุบันและยังเป็นการนำแก่นฝางเสนและเปลือกมะนาวมาเพิ่มมูลค่าอีกด้วย

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสน

นำผงของแก่นฝางหรือฝางเสน (*Caesalpinia sappan* L.) เป็นพืชในวงศ์ Caesalpiniaceae ที่เก็บตัวอย่างแก่นฝางเสนจากจังหวัดระยองในช่วงเดือนกันยายน พ.ศ. 2563 มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven, ยี่ห้อ Binder, เยอรมัน) หลังจากนั้นนำน้ำหนักแห้งของผงของแก่นฝางเสนจำนวน 1,200 กรัม มาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล 95% v/v ด้วยอัตราส่วนผงของแก่นฝางเสนต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1 ต่อ 5 w/v เป็นเวลา 5 วัน ต่อจากนั้นนำสารแขวนลอยมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 และนำสารละลายทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporators, รุ่น RV 10 auto V ยี่ห้อ IKA, เยอรมัน) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้สารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนจำนวน 67.68 กรัม คิดเป็นน้ำหนักสุทธิ (percent yield) เท่ากับ 5.64% จากน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนบรรจุขวดหุ้มอลูมิเนียมฟอยล์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนด้วยวิธี disc diffusion[7]

เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (*NA*, ยี่ห้อ Hi-media) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ถูกนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น $3X10^8$ CFU/มิลลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จนทั่วจานเพาะเชื้อ เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์สารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ส่วนการเตรียมสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนความเข้มข้น 10,000, 20,000 และ 40,000 ppm ด้วยการใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และการวางแผนทำการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) โดยแต่ละวิธี ทำซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ โดยวิธีควบคุมเชิงลบ คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ส่วนวิธีควบคุมเชิงบวก คือ ยาปฏิชีวนะคลินดามัยซิน ความเข้มข้น 10,000 ppm (clindamycin capsule 300 mg, CLINDA GPO ขององค์การเภสัชกรรม) ส่วนวิธีทดลอง คือ สารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนความเข้มข้น 10,000, 20,000 และ 40,000 ppm ด้วยการหยดสารแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงบนแผ่น paper disc ขนาดเส้นผ่าน-

ศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางบนเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ความเข้มข้น 3X10^{8} CFU/มิลลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้บ่มเชื้อ (incubator, ยี่ห้อ Memmert) แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (clear zone) แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเพื่อนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี One-way ANOVA และหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างวิธีทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสน (minimum inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี colorimetric broth microdilution[8]

การทดสอบในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนด้วยวิธี MIC ด้วยการวางการทดลองแบบ CRD โดยแต่ละวิธีทำซ้ำจำนวน 5 ซ้ำ ประกอบด้วย วิธีควบคุมเชิงลบคือ อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารสกัดหยาบ วิธีควบคุมเชิงบวก คือ ยาปฏิชีวนะคลินดามัยซิน ความเข้มข้น 10,000 ppm และวิธีทดลอง คือ สารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสน โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB, ยี่ห้อ Hi-media) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate และนำสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนความเข้มข้น 40,000 ppm และยาปฏิชีวนะคลินดามัยซินความเข้มข้น 10,000 ppm อย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในช่องแรกของแต่ละแถว ทำการเจือจางที่ละ 2 เท่า (2-fold serial dilution) จนได้สารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ทดสอบ (39.06-40,000 ppm)[5] และนำเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 3X10^{8} CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่สารละลายรีซาซูริน (resazurin sodium salt, HiMedia) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลการเปลี่ยนของสารละลายรีซาซูรินโดยถ้าสารไม่เปลี่ยนเป็นสีชมพูแสดงผลเป็นบวก

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสน (minimum bactericidal concentration, MBC) ด้วยวิธี agar dilution

นำความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนที่ให้ผลเป็นบวกของการทดสอบ MIC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ก็จะไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเชื้อไม่ตายก็จะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

การสกัดเพคตินในเปลือกมะนาว[9]

การสกัดเพคตินในเปลือกมะนาว (*Citrus aurantifolia*) เก็บตัวอย่างเปลือกมะนาวจากจังหวัดเพชรบุรีในช่วงเดือนพฤศจิกายน พุทธศักราช 2563 โดยการนำเปลือกมะนาวสดมาล้างน้ำทำความสะอาดและบดให้ละเอียด หลังจากนั้นนำเปลือกมะนาวไปสกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 95% ในอัตราส่วนเปลือกมะนาว: สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 95% เท่ากับ 1: 1 w/v ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเอาสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 95% ออก หลังจากนั้นนำเปลือกมะนาวล้างเปลือกด้วยน้ำกลั่นและบีบเอาน้ำกลั่นออกเปลือกมะนาว ต่อจากนั้นเปลือกมะนาวถูกอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนได้เปลือกมะนาวที่เป็นน้ำหนักแห้งนำไปสกัดต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (M) อัตราส่วนของเปลือกมะนาวบดแห้ง:กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 M เท่ากับ 1:12 w/v ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ต่อจากนั้นนำสาร-แขวนลอยจากเปลือกมะนาวบดแห้งมากรองผ่านผ้าขาวบาง แล้วนำสารแขวนลอยที่ได้จากการสกัดไปเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 M เท่ากับ 1:12 w/v แล้วนำสารแขวนลอยจากการสกัดครั้งที่ 1 สกัดด้วยกรด-

ไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ อีกครั้ง หลังจากนั้น สารแขวนลอยถูกกรองผ่านผ้าขาวบางและทำการตกตะกอนเพคตินด้วยอัตราส่วนของสารแขวนลอย: สารละลายเอทานอลเข้มข้น 95% เท่ากับ 1:1 v/v ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง หลังจากนั้นสารแขวนลอยถูกนำไปกรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกเพคติน เพคตินถูกล้างด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 95% จำนวน 3 ครั้ง และเพคตินถูกล้างด้วยอะซิโตนความเข้มข้น 50% จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นเพคตินถูกอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเพคตินถูกบดให้เป็นผงละเอียด

การขึ้นรูปแผ่นแปะจากเพคตินในเปลือกมะนาวกับสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสน

การขึ้นรูปแผ่นแปะ ประกอบด้วย 10% w/v เพคตินในเปลือกมะนาว, 7% v/v glycerin, 3% v/v polyethylene glycol (PEG 400) และ 1% v/v paraben concentrate รวมถึงการผสมสารที่แตกต่างกันตามสูตร ดังนี้ แผ่นแปะสูตรที่ 1 ใช้ 79% v/v น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แผ่นแปะสูตรที่ 2 ใช้ 79% w/v ยาปฏิชีวนะคลินดามัยซินความเข้มข้น 10,000 ppm และแผ่นแปะสูตรที่ 3 ใช้ 79% w/v สารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนความเข้มข้น 40,000 ppm หลังจากนั้นแผ่นแปะทั้งสามสูตรถูกตัดแผ่นแปะในแต่ละสูตรที่ได้ให้เป็นวงกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตร และแผ่นแปะทั้งสามสูตรมาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยระบบฆ่าเชื้อด้วยหลอด UV ในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow biohazard, BioAuell (Astec) รุ่น Microflow Class II) นาน 60 นาที

การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแผ่นแปะจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดจากแก่นฝางเสนด้วยวิธี disc diffusion

นำเชื้อแขวนลอยของแบคทีเรีย *S. aureus* ความเข้มข้น $3X10^8$ CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จนทั่วจานเพาะเชื้อ การวางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแต่ละวิธี ทำซ้ำ จำนวน 5 ซ้ำ วิธีมี 3 วิธี คือ แผ่นแปะสูตรที่ 1-3 ใช้ทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยการนำวางแผ่นแปะมาวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตเต็มพื้นที่จานเพาะเชื้อ จึงสังเกตการยับยั้งโดยดูบริเวณยับยั้งและวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี One-way ANOVA และหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างวิธีทดลองด้วยวิธี DMRT

ผลการศึกษา

สารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนที่ความเข้มข้น 10,000 ppm ไม่พบวงใสแสดงว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ส่วนสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนความเข้มข้น 20,000 ppm และ 40,000 ppm สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เท่ากับ 1.47 และ 1.98 เซนติเมตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนความเข้มข้น 20,000 ppm และ 40,000 ppm มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังตารางที่ 1

สารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนความเข้มข้น 40,000 ppm ถูกเลือกมาศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เท่ากับ 625 ppm และความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เท่ากับ 40,000 ppm ดังตารางที่ 2

จากการทดสอบแผ่นแปะ 3 สูตร ประกอบด้วย คือ แผ่นแปะสูตรที่ 1 แผ่นแปะจากเปลือกมะนาว แผ่นแปะสูตรที่ 2 แผ่นแปะกับยาปฏิชีวนะคลินดามัยซิน ความ-

ตารางที่ 1 ความสามารถของสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ซม.)
สารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสน ความเข้มข้น 10,000 ppm	0.00±0.00d*
สารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสน ความเข้มข้น 20,000 ppm	1.47±0.14c
สารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสน ความเข้มข้น 40,000 ppm	1.98±0.12b
ยาปฏิชีวนะคลินดามัยซิน ความเข้มข้น 10,000 ppm	2.52±0.23a
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	0.00±0.00d

หมายเหตุ - *One-way ANOVA ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
- ข้อมูลในแถวเดียวกันที่มีอักษรภาษาอังกฤษ (a, b, c ...) กำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยวิธีของ Duncan's multiple test

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสน (ppm)	ฤทธิ์ต้านจุลชีพ	
	MIC (ppm)	MBC (ppm)
40,000	+	+
20,000	+	-
10,000	+	-
5,000	+	-
2,500	+	-
1,250	+	-
625	+	-
312.5	-	-
156.25	-	-
78.12	-	-
39.06	-	-
0.00	-	-

หมายเหตุ ผลบวก (+) = แสดงการเจริญของเชื้อ; ผลลบ (-) = แสดงการไม่เจริญของเชื้อ
MIC = minimum inhibitory concentration; MBC = minimum bactericidal concentration

เข้มข้น 10,000 ppm และแผ่นแปะสูตรที่ 3 แผ่นแปะจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดจากแก่นฝางเสนความเข้มข้น 40,000 ppm มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เท่ากับ 0.00, 3.68 และ 0.24 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3) โดยแผ่นแปะสูตรที่ 2 กับแผ่นแปะสูตรที่ 3 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 3 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแผ่นแปะที่มีสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสน

สูตรแผ่นแปะ	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (เซนติเมตร)
แผ่นแปะสูตรที่ 1	0.00±0.00[c]*
แผ่นแปะสูตรที่ 2	3.68±0.31[a]
แผ่นแปะสูตรที่ 3	1.57±0.24[b]

หมายเหตุ - *One-way ANOVA ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
- ข้อมูลในแถวเดียวกันที่มีอักษรภาษาอังกฤษ (a, b, c ...) กำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยวิธีของ Duncan's multiple test;
- แผ่นแปะสูตรที่ 1 แผ่นแปะจากเปลือกมะนาว
- แผ่นแปะสูตรที่ 2 แผ่นแปะกับยาปฏิชีวนะคลินดามัยซิน ความเข้มข้น 10,000 ppm
- แผ่นแปะสูตรที่ 3 แผ่นแปะจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดจากแก่นฝางเสนความเข้มข้น 40,000 ppm

วิจารณ์

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาแผ่นแปะจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดจากฝางเสนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* โดยการทดสอบสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* พบว่าสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญ เติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เนื่องจากสารจากแก่นฝางเสนโดยเฉพาะสารบราซิลินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น การยับยั้งดีเอ็นเอและการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย[4] เมื่อนำสารสกัดจากแก่นฝางเสนมาเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะคลินดามัยซินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* พบว่า การยับยั้งการเจริญเติบโตในแบคทีเรียของสารสกัดจากแก่นฝางเสนต่ำกว่ายาปฏิชีวนะคลินดามัยซิน ดังนั้นการนำสารสกัดจากแก่นฝางเสนมาใช้แทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในรูปของผลิตภัณฑ์ให้มีประสิทธิภาพ จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมของสารสกัดจากพืช เช่น ระยะเวลาในการเสื่อมสลายของสารสกัด วิธีการเก็บรักษาสารสกัด และความสะดวกในการใช้ผลิตภัณฑ์ของสารสกัด[10] ส่วนผลของความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เท่ากับ 625 ppm และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนในการศึกษานี้สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เท่ากับ 40,000 ppm ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Nirmal & Panichayupakaranant[11] ได้เก็บตัวอย่างแก่นฝางเสนในจังหวัดชลบุรี ช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2555 และผลของสารสกัดแก่นฝางเสนในการความเข้มข้นต่ำสุดสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เท่ากับ 250 ppm แสดงให้เห็นว่าพื้นที่ปลูกที่แตกต่างกันมีผลต่อการสร้างสร้างสำคัญในพืช[12] ในการสกัดสารหยาบจากแก่นฝางเสนด้วยเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสม เนื่องจากเอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสามารถละลายสารสำคัญที่มีสมบัติมีขั้วได้ ซึ่งอาจเป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) โดยเฉพาะบราซิลิน[13]

การสกัดเพคตินจากเปลือกมะนาวด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 M เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมเนื่องจากกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ สามารถสกัดเพคตินที่นำไปใช้เป็นสารก่อฟิล์มในการนำไปทำเป็นแผ่นแปะได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของธานุวัฒน์ และคณะ[9] พบว่าเพคตินจากเปลือกมะนาวที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มีปริมาณเพคตินสูงที่สุดและมีปริมาณเมทอกซิลต่ำที่สุด ซึ่งจะทำให้มีความสามารถในการดูดซับสูงซึ่งเหมาะสมกับ

การนำไปทำเป็นแผ่นแปะ และงานวิจัยของวลีพรรณ[6] พบว่าเพคตินจากเปลือกมะนาวเหมาะสมสำหรับการทำแผ่นแปะเนื่องจากโครงสร้างของเพคตินเป็นพอลิเมอร์แบบโครงร่างตาข่ายที่มีความสามารถในการกักเก็บของเหลวหรือสารและสามารถคงรูปร่างได้ นอกจากนี้เพคตินจากเปลือกมะนาวไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม

สรุป

สารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และการพัฒนาแผ่นแปะจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนที่ความเข้มข้น 40,000 ppm สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ เนื่องจากสารจากแก่นฝางเสนซึ่งมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เป็นการรักษาทางเลือกหรือใช้ร่วมกับการรักษาหลักในการรักษาสิว ดังนั้น ควรมีการศึกษาต่อยอดแผ่นแปะจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนเพิ่มเติม เช่น การทดสอบแผ่นแปะจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสนต่อความเป็นพิษของเซลล์และทางคลินิก ระยะเวลาความเสถียรของแผ่นแปะจากเปลือกมะนาวที่มีสารสกัดหยาบจากแก่นฝางเสน การศึกษาการกระจายตัวของสารออกฤทธิ์รอบ ๆ บริเวณทำการแปะแผ่นปิดสิว รวมถึงวิธีการแปะแบบอื่น เช่น การแปะแผ่นปิดสิวขณะนอนหลับเพื่อให้สามารถไปใช้งานจริงและสะดวกมากขึ้นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ให้ทุนอุดหนุนโครงงานวิจัยพัฒนาและวิศวกรรมโครงการ “การประกวดโครงงานของนักวิทยาศาสตร์รุ่นเยาว์ ครั้งที่ 23” และสาขาวิชาชีววิทยาและวิทยาศาสตร์สุขภาพ โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Widerström M, Wiström J, Sjöstedt A, Monsen T. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2012;20-7:(1)31.
2. Chen J, Ying GG, Wei XD, Liu YS, Liu SS, Hu LX, et al. Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes from domestic sewage by constructed wet-lands: effect off low configuration and plant species. Science of the Total Environment 2016;571:974-82.
3. Nelish PN, Mithun SR, Rangabhatla GSVP, Mehraj A. Brazilin from *Caesalpinia sappan* heartwood and its pharmacological activities. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2015;8:421-30.
4. Nirmal NP, Panichayupakaranant P. Antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatoryactivities of standardized brazilin-rich Caesalpinia sappan extract, Pharmaceutical Biology 2015;53:1339-43.
5. Kim KJ, Yu HH, Jeong SI, Cha JD, Kim SM, You YO. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Ethnopharmacology 2004;91:81-7.
6 วลีพรรณ รกิติกุล. การสังเคราะห์ไฮโดรเจลของเพคตินจากผลข้าวปั้นพระฤาษีสำหรับการปลด ปล่อยปุ๋ยไนโตรเจน. วารสารวิจัยรามคำแหง (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) 2563;23(1):39-46.
7. Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Journal of Microbiological Methods 2010;81:121-6.
8. Liua M, Seidela V, Katerereb DR, Graya AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. Methods

2007;42(4):325-29.

9. ธานุวัฒน์ ลาภตันศุภผล, ปฏิมา ทองขวัญ, ศิริลักษณ์ สรงพรมทิพย์. การสกัดเพคตินจากเปลือกผักและผลไม้. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 2013;44(2):433-6.
10. ณัฐา จริยภมรกุร, ชิดชนก ศุขศรีไพศาล, กัญญาวีร์ นวลศรี. การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบชะพลู. การประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่11; 8-9 ธันวาคม 2557; มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2557. p. 1768-74.
11. Nirmal NP, Panichayupakaranant P. Antibacterial activities of brazilin and *C. sappan* extracts anti-propionibacterium acnes assay-guided purification of brazilin and preparation of brazilin rich extract from *Caesalpinia sappan* heartwood. Pharmaceutical Biology 2014;52(9): 1204-07.
12. มณฑล วิสุทธิ. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococci ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นบางชนิดในจังหวัดนครราชสีมา. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 2560;45(4):805-16.
13. ไอลดา แกนุ, สุปรานี กองคำ. ผลของการสกัดด้วยเอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแก่นฝาง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2021;10(1):96-108.

Abstract: Effcacy of Lemon Peel Patch with *Caesalpinia sappan* Heartwood Crude Extracts in Inhibiting Acne-Causing Bacteria *Staphylococcus aureus*

Nutnicha Thadachaiphongsathon, secondary education; Issaree Kahakijpaisal, secondary education; Kanyanat Kongvanich, secondary education; Orawan Piyaboon, Ph.D.

Department of Biology and Health Science, Mahidol Wittayanusorn School, Nakhon Pathom, Thailand

Journal of Health Science 2022;31(6):1132-9.

Staphylococcus aureus is one of the main causative bacteria of inflammatory acne. An alternative treatment for acne causing *S. aureus* is to use *Caesalpinia sappan* heartwood containing bioactive compounds. Therefore, *C. sappan* heartwood crude extracts and pectin from lemon peels should be used to develop a patch for decreasing the inflammatory process. The purposes of this research were to study the activity of crude extract from *C. sappan* heartwood against *S. aureus* and develop the acne patch from lemon peels with *C. sappan* heartwood crude extracts against *S. aureus*. *Caesalpinia sappan* heartwood was extracted by 95% ethanol while 10,000 ppm of clindamycin was used as the positive control. The crude extracts were examined for antibacterial activity against *S. aureus* using the disc diffusion method; and the antibacterial activity using the crude extracts of plant heartwood at 10,000, 20,000, 40,000 ppm and clindamycin at 10,000 ppm was compared. The crude extract was tested for the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC). The results showed that the MIC of *S. aureus* was 625 ppm and the MBC was 40,000 ppm. Subsequently, the patch from lemon peels with *C. sappan* heartwood crude extracts was developed and tested for inhibiting acne-causing *S. aureus*. The results indicated that the patch from lemon peels with 40,000 ppm of *C. sappan* heartwood crude extracts had the average inhibition zone diameter of 1.57 cm. indicating some antibacterial activity. Thus, the patch from lemon peels with *C. sappan* heartwood crude extracts should be further studied for anti-inflammatory and clinical effects aiming for the development of a drug or a cosmeceutical product.

Keywords: lemon peel patch; *Staphylococcus aureus*; disc diffusion method