การจัดประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ

ครั้งที่ 17

เรื่อง

"งานวิจัยเพื่อการสร้างเสริมพลังสังคม สู่เศรษฐกิจไทยด้วยวิถีชีวิตใหม่ (New Normal)"

มนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์

วิทยาศาสตร์สุขภาพและวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี

วันเสาร์ที่ 28 และ วันอาทิตย์ที่ 29 พฤศจิกายน พ.ศ. 2563

ณ อาคารคณะทันตแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี

สารบัญ

ชื่อเรื่อง/ชื่อผู้วิจัย **หน้า**

ระบบภูมิคุ้มกัน 219

ศ.(พิเศษ) ทพ. ไพรัช ธีรวรางกูร

Cracked tooth 225

ศาสตราจารย์กิตติคุณ ทพ. วินัย ศิริจิตร

การใช้น้ำมันหอมระเหยเพื่อใช้ในการรักษาบาดแผลสดในม้า 238

สัตวแพทย์หญิงกฤติกา จันทะพันธ์

เอกพงศ์ เนตรอนงค์

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดรากของสมุนไพรชะเอมเทศ ต่อเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ที่ก่อโรคผิวหนังในสุนัข 255

สัตวแพทย์หญิงมุกดาศจี มหากนก

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดรากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra*) ต่อโรคติดเชื้อแบคทีเรียในสุนัขที่เกิดจากเชื้อ *Streptococcus* spp. ในหลอดทดลอง (in vitro) 266

ศุภพัทธ์ เขื่อนคำ

ธัญพิมล อภิชาตไพบูลย์

อาจารย์สัตวแพทย์หญิงมุกดาศจี มหากนก

ความสัมพันธ์ระหว่างสติปัฏฐานสี่ คลื่นสมองของมนุษย์ และคุณภาพชีวิต 277

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐาวรี ขันสำโรง

รองศาสตราจารย์จุฑามาศ เทพชัยศรี

ดร.สุภกรรณ จันทวงษ์

ดร.วัชรินทร์ พอสม

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดรากของสมุนไพรชะเอมเทศต่อเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ที่ก่อโรคผิวหนังในสุนัข

Antibacterial Activities of *Glycyrrhiza glabra* Root Extract against of *Staphylococcus* spp. in Canine superficial pyoderma

ผู้วิจัย สัตวแพทย์หญิงมุกดาศจี มหากนก

สาขาวิชา สูติศาสตร์ ศัลยศาสตร์ และอายุรศาสตร์ทางสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังในสุนัขเป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อย โดยทั่วไปแนวทางการรักษาโดยการให้ยาปฏิชีวนะร่วมกับการใช้ยาทาภายนอก ซึ่งอาจมีผลข้างเคียงต่อร่างกายสัตว์ และยังส่งผลให้เกิดเชื้อดื้อยาต่อไปในอนาคตได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคกันมากขึ้น การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดรากชะเอมเทศที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียสแตฟฟิโลคอคคัสที่ก่อโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังในสุนัขกลุ่มตัวอย่างพื้นที่ตำบลสระลงเรือ อำเภอห้วยกระเจา จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 16 ตัวอย่าง โดยทำการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียสแตฟฟิโลคอคคัสแล้วทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดรากชะเอมเทศด้วยวิธีการทดสอบ Well diffusion agar และทำการวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อและทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration test; MIC และ Minimum bactericidal concentration test; MBC) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกคือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากรากชะเอมเทศสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสแตฟฟิโลคอคคัสได้ในทุกความเข้มข้นของสารสกัด และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อขึ้นกับระดับความเข้มข้นของสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ผลเฉลี่ยของค่า MIC และ MBC เมื่อทดสอบด้วยวิธี broth microdilution method ได้ $\leq$ 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสารสกัดรากชะเอมเทศสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประกอบการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังของสุนัขได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : ชะเอมเทศ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย สแตฟฟิโลคอคคัส โรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนัง

Abstract

Canine pyoderma is the common skin disease in dog. Normally, the treatment of canine pyoderma using systemic antibiotics and topical therapy. These may have side effect to the dog and develop drug resistance in the future. Therefore using the herbal plants for treatment is increasing in nowadays. The objective of this study was to investigate an antibacterial activity of *Glycyrrhiza glabra* root extract against of *Staphylococcus* spp. in Canine superficial pyoderma. The samples were collected from the skin lesion that caused by bacterial infection in 16 dogs in Sa Long Ruea sub district, Huai Krachao district, Kanchanaburi province. Then bacterial culture and identification for *Staphylococcus* spp. was performed and antibacterial activity test of *Glycyrrhiza glabra* root extract was determined by Well diffusion agar, Minimum inhibitory concentration test (MIC) and Minimum bactericidal concentration test (MBC) which compared with Gentamicin as positive control. The results showed that *Glycyrrhiza glabra* root extract could be effective antibacterial activity against *Staphylococcus* spp. in all concentration of extract. The inhibitory activity significantly increased in a dose dependent manner. ($p<0.01$) The MIC and MBC by broth microdilution method were ≤ 0.01 g/ml. Finally, *Glycyrrhiza glabra* root extract can be effectively apply for treatment of canine pyoderma.

Key Words : Antibacterial activity, *Glycyrrhiza glabra*, *Staphylococcus* spp., Pyoderma

บทนำ

โรคผิวหนังติดเชื้อแบคทีเรีย (Pyoderma) ในสุนัขเป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหลักของโรคผิวหนัง (Primary disease) หรืออาจเป็นการติดเชื้อแทรกซ้อน (Secondary disease) จากสาเหตุอื่นๆ เช่น โรคขี้เรื้อนเปียก (Demodicosis) โรคผิวหนังติดเชื้อรา (Dermatophytosis) หรือโรคภูมิแพ้ผิวหนัง (Allergic dermatitis) เป็นต้น โดยสาเหตุส่วนใหญ่ของ Pyoderma เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ซึ่งจะก่อโรคโดยทำให้เกิดการอักเสบและการลอกหลุดของผิวหนัง จะพบรอยโรคต่างๆ เช่น ผิวหนังแดงอักเสบ (erythema) ขนร่วง (alopecia) สิ่งคัดหลั่ง (exudation) มีตุ่มแดง (papules) ตุ่มหนอง (pustule) และสะเก็ด (crust) เป็นต้น และมักพบว่ามีอาการคัน (pruritus) ร่วมด้วย (Mason, 1991)

เดิมแนวทางการรักษา pyoderma ในสุนัขมักจะรักษาโดยการให้ยาปฏิชีวนะ (systemic antibiotics) เบื้องต้นก่อน ร่วมกับมีการรักษาโดยใช้ยาทาภายนอก (topical therapy) เพียงเล็กน้อย ซึ่งการรักษาแนวทางนี้อาจทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus spp.* ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรายที่มีการติดเชื้อแบบเฉพาะที่ (local infection) ในปัจจุบันสัตวแพทย์ได้มีการรักษาโดยวิธี topical therapy เพิ่มมากขึ้น ควบคู่ไปกับการให้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากมีข้อดีคือทำให้สัตว์หายเร็วขึ้น จึงช่วยลดระยะเวลาในการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ ซึ่งจะส่งผลทำให้ลดผลข้างเคียง (adverse effects) ของยาปฏิชีวนะ และลดอุบัติการณ์การเกิดเชื้อดื้อยา (Bacterial resistance) ในอวัยวะอื่น ๆ ของร่างกายสัตว์ได้อย่างมาก อย่างไรก็ตามการรักษาโดยวิธี topical therapy เพียงอย่างเดียวโดยไม่ให้ยาปฏิชีวนะ สามารถใช้ได้ในรายที่มีการติดเชื้อที่ผิวหนังชั้นนอก (Superficial pyodermas) ทั้งในลักษณะการกระจายของรอยโรคแบบเฉพาะที่ (localized) แบบกระจายทั่วตัว (Generalized) ที่มีความรุนแรงน้อย (mild) และยังสามารถ

ใช้เพื่อป้องกันการติดเชื้อซ้ำ (Recurrence) ในระหว่างการรอผลวินิจฉัยเพื่อหาสาเหตุของโรคที่แท้จริง (Underlying causes) (Hillier *et al*., 2014)

อย่างไรก็ดีการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีสังเคราะห์มาใช้ในการรักษาโรคผิวหนังในสุนัข ก็อาจส่งผลข้างเคียงต่อร่างกายสัตว์ และยังอาจส่งผลให้เกิดเชื้อดื้อยาต่อไปในอนาคต จึงมีแนวคิดในการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากสมุนไพรหรือสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในการรักษาโรคผิวหนังติดเชื้อแบคทีเรียในสุนัข ตัวอย่างสมุนไพรที่เคยมีการศึกษาวิจัย เช่น ชะเอมเทศ (Licorice) สายน้ำผึ้ง (Lonicera) ดอกเบญจมาศ (Chrysanthemum) จิงเจี้ยะ (Schizonepeta) และอึ่งน้อย (Coptis) เป็นต้น (Cheng-Hung *et al*., 2012) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากรากของสมุนไพรชะเอมเทศมีฤทธิ์ลดการอักเสบ (Anti-inflammatory) และต้านแบคทีเรีย (Antibacterial) ได้ และเป็นสารสกัดจากธรรมชาติซึ่งมีผลข้างเคียงต่อร่างกายสัตว์น้อยกว่าการใช้สารเคมี อีกทั้งยังเป็นการลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรค pyoderma ในสุนัขได้อีกด้วย (Damle, 2014)

ชะเอมเทศเป็นพืชสมุนไพรและยาแผนโบราณที่ใช้กันอย่างแพร่หลายไปทั่วโลก เนื่องจากภายในชะเอมเทศมีสารองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ glycyrrhizin, glycyrrhizinic acid, glabrin A และ B และ isoflavones ซึ่งมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นยาลดการอักเสบ (anti-inflammatory) ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย (anti-bacterial) ยาต้านเชื้อรา (anti-fungal) ยารักษาเบาหวาน (anti-diabetic) ยาต้านไวรัส (antiviral) ยารักษาแผลหลุม (anti-ulcer) ยาแก้ไอ (antitussive) สารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) บำรุงผิวให้ขาว (skin whitening) และยาลดการขับปัสสาวะ (anti-diuretic agent) (Damle, 2014)

จากการศึกษาทางด้านพฤกษเคมีของสารสกัดรากชะเอมเทศพบว่ารากชะเอมเทศมีองค์ประกอบของสารหลายชนิด ได้แก่ สารไตรเทอร์ฟีน ซาโปนิน (Triterpene saponins) สารฟลาโวนอยด์ (Flavomoids) โพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) เพคติน (Pectins) น้ำตาล (Sugars) กรดอะมิโน (Amino acids) เกลือแร่ (Mineral salts) และสารอื่นๆ อีกหลายชนิด (Kateria *et al*., 2013) ซึ่งองค์ประกอบหลักที่ออกฤทธิ์ของสารสกัดรากชะเอมเทศ ได้แก่ สารไกลเซอร์ไรซิน (Glycyrrhizin) ซึ่งพบปริมาณมากถึง 10 – 25 เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดรากชะเอมเทศ และยังมีความหวานมากกว่าน้ำตาล 60 เท่าอีกด้วย โดย Glycyrrhizin เป็นสารประกอบซาโฟนิน (Saponin compound) ซึ่งประกอบไปด้วยสารไตรเทอร์พีนอยด์ อะไกลโคน (Triterpenoid aglycone) กรดไกลเซอร์รีติค (Glycyrrhetic acid) รวมตัวกับสารไดแซคคาไรด์ของกรดกลูคูโรนิค (Disaccharide of glucuronic acid) โครงสร้างโมเลกุลของ Glycyrrhizin (Kaur and Kaur, 2013)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดรากของสมุนไพรชะเอมเทศที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* spp. ที่ก่อโรคผิวหนังในสุนัขกลุ่มตัวอย่าง โดยเป็นการทดลองแบบ in vitro

กรอบแนวคิดในการทำวิจัย

เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดรากของสมุนไพรชะเอมเทศที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคผิวหนังติดเชื้อแบคทีเรีย (Superficial pyoderma) ในสุนัขกลุ่มตัวอย่าง จำนวน 16 ตัว ไม่จำกัดเพศ อายุ 1 – 5 ปี มีการเลี้ยงแบบปล่อย (Outdoor) และอยู่ในพื้นที่ตำบลสระลงเรือ อำเภอห้วยกระเจา จังหวัดกาญจนบุรี วิธีและขั้นตอนการศึกษาโดยทำการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* spp. จากสุนัขที่เป็นโรคผิวหนัง แล้วนำเชื้อที่ได้ไปทำการทดลองโดยประเมินผลของฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดรากของสมุนไพรชะเอมเทศด้วยวิธี agar disk diffusion methods และทำการหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และหาค่า minimum bactericidal concentration (MBC) ด้วยวิธี broth dilution methods

วิธีการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียจำนวน 16 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากการเก็บตัวอย่างรอยโรคจากผิวหนังของสุนัขที่เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนัง (Canine pyoderma) ซึ่งเป็นสุนัขที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เขตตำบลสระลงเรือ จังหวัดกาญจนบุรี โดยวิธีการเก็บตัวอย่างใช้ sterile swab เก็บตัวอย่างหนอง (purulent exudates) จากรอยโรคที่เป็นตุ่มหนอง (pustules) หรือตุ่มแดง (papules) ที่สงสัยว่าเกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย แล้วใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (Transport medium)

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ สารสกัดรากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* Root Extract) ในรูปแบบของเหลวซึ่งสกัดโดยเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) และน้ำ โดย บริษัท เอสเค เฮิร์บ จำกัด (SK Herb Co., Ltd.)

3. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

3.1 การเพาะเชื้อแบคทีเรียและการทดสอบเพื่อแยกชนิดของเชื้อกลุ่ม Staphylococcus (Bacterial culture and Identification) ตามวิธีมาตรฐานของ Bacteriological Analytical Manual; BAM (ดัดแปลงจาก Bennett and Lancette, 2003) เพื่อหาเชื้อ *Staphylococcus* spp.

1) เพาะแยกเชื้อ *Staphylococcus* spp. จากตัวอย่างลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโบไวน์บลัดอะการ์ (Bovine blood agar) โดยนำตัวอย่างที่เก็บมาเกลี่ยให้เต็มหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (Spread) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

2) ทำการถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่ (Sub-culture) เพื่อเพาะแยกเชื้อที่ต้องการออกจากเชื้ออื่นที่ปะปนโดยทำการนำแท่งห่วงเหล็กเขี่ยโคโลนีที่คาดว่าจะเป็นเชื้อ *Staphylococcus* spp. ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโบไวน์บลัดอะการ์ (Bovine blood agar) และอาหารเลี้ยงเชื้อแมนนิทอลซอลท์อะการ์ (Mannitol salt agar) แล้วนำมากระจายเชื้อลงบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อโบไวน์บลัดอะการ์แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3) ทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ ดังนี้ ย้อมสีแกรม (Gram stain) ทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์แคตาเลส (Catalase test) ทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์โคแอกกูเลส (Coagulase) การทดสอบการหมักในน้ำตาลกลูโคส (Anaerobic utilization of glucose) และการทดสอบการหมักในน้ำตาลแมนนิทอล (Anaerobic utilization of mannitol)

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus* spp. ของสารสกัดจากรากชะเอมเทศในห้องปฏิบัติการ (Antibacterial Activities of *Glycyrrhiza glabra* Root Extract)

1) การทดสอบ Well diffusion agar โดยทดสอบฤทธิ์ของชะเอมเทศในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งมูเลอร์ฮินตันอะการ์ (Mueller-Hinton agar; MHA) ตามวิธีของ Bauer *et al*. (1966) โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีความขุ่นที่ 0.5 McFarland (ประมาณ 10^8 cfu/ml เกลี่ยเชื้อด้วยไม้พันสำลี (sterile swab) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่ว จากนั้นทำการเจาะรูเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วหยดสารสกัดรากชะเอมเทศลงไป 40 ไมโครลิตร/หลุม ตามลำดับความเข้มข้น และบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากรากชะเอมเทศทั้งหมด 4 ระดับดังนี้ 1.0 (100%), 0.5 (50%), 0.25 (25%) และ 0.125 (12.5%) กรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) และกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) โดย Positive control คือ ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน (Gentamicin) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (CLSI, 2009) และ Negative control คือ น้ำกลั่น (Distilled water) ที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของขนาดวงใส (Inhibition zone) เวเนียร์ คาลิเปอร์ (vernier caliper) ทำการบันทึกขนาดวงใสเป็นมิลลิเมตร

2) การทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งและทำลายแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration test; MIC และ Minimum bactericidal concentration test; MBC ตามลำดับ) (ดัดแปลงจาก Alderman and Smith, 2001; Brantner, 1994; Halliwell, 1989; Murray *et al*., 2003) ด้วยวิธี broth microdilution method ตามวิธีของ CLSI (2006) โดยเตรียมสารสกัดรากชะเอมเทศผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว มูเลอร์ฮินตันบรอท (Muller Hinton broth ; MHB) ที่ความเข้มข้น 22 ระดับ ได้แก่ 0.9 (90%), 0.85 (85%), 0.8 (80%), 0.75 (75%), 0.7 (70%), 0.65 (65%), 0.6 (60%), 0.55 (55%), 0.5 (50%), 0.45 (45%), 0.4 (40%), 0.35 (35%), 0.3 (30%), 0.25 (25%), 0.2 (20%), 0.15 (15%), 0.1 (10%), 0.05 (5%), 0.04 (4%), 0.03 (3%), 0.02 (2%) และ 0.01 (1%) กรัมต่อมิลลิลิตร แล้วใส่สารสกัดชะเอมเทศลงในไมโครเพลท (microplate) ความเข้มข้นละ 1 หลุม ในปริมาณหลุมละ 190 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเติมเชื้อแบคทีเรียมีที่เตรียมไว้โดยมีความขุ่นที่ 0.5 McFarland (ประมาณ 10^8 cfu/ml) ลงในไมโครเพลททุกหลุมๆ ละ 10 ไมโครลิตร โดยมีกลุ่มควบคุมไมโครเพลทละ 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือประกอบด้วยยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน (Gentamicin) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ MIC Broth ผสมรวมกับแบคทีเรีย กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MIC Broth ผสมรวมกับแบคทีเรีย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2

องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผล โดยสังเกตดูความขุ่นด้วยสายตา โดยความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถมองไม่เห็นความขุ่นจะเป็นค่า Minimum inhibitory concentration (MIC)

จากนั้นทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum bactericidal concentration; MBC) โดยนำสารละลายในหลุมของไมโครเพลทที่ไม่มีการเจริญของเชื้อโดยดูดมาปริมาณ 10 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อมูเลอร์ฮินตันอะการ์ และบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ไม่น้อยกว่า 99.99 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น

4. วิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) ของแต่ละความเข้มข้น และปริมาณเชื้อ *Staphylococcus* spp. ที่เหลืออยู่ภายหลังการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA ด้วยโปรแกรม Statistics Package for the Social Sciences; SPSS v.24

ผลการวิจัย

1.ผลการทดสอบหาเชื้อ *Staphylococcus* spp.

จากผลการเก็บตัวอย่างจากสุนัขที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ตำบลสระลงเรือ จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 16 ตัว โดยเป็นการเก็บตัวอย่างจากรอยโรคที่เกิดตุ่ม (Papule) และตุ่มหนอง (Pustule) ที่สงสัยว่าเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนัง นำมาเพาะแยกเชื้อ และทำการทดสอบคุณสมบัติทางสันฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ โดยพบเชื้อ *Staphylococcus* spp. ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง

2.ผลการทดสอบ Well diffusion agar

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus* spp. ของสารสกัดจากรากชะเอมเทศ ด้วยวิธี Well diffusion agar พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (Inhibition zone) ของสารสกัดรากชะเอมเทศที่ระดับความเข้มข้น 1.0 (100%), 0.5 (50%), 0.25 (25%) และ 0.125 (12.5%) กรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 18.28±1.03, 14.91±0.42, 12.50±0.48 และ 10.97±0.22 มิลลิเมตร ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากรากชะเอมเทศสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus* spp. ได้ในทุกความเข้มข้นของสารสกัด และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อขึ้นกับระดับความเข้มข้นของสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) โดยสารสกัดที่มีความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสูงมากที่สุด และประสิทธิภาพลดลงตามลำดับความเข้มข้นของสารสกัดรากชะเอมเทศ

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus* spp. ของสารสกัดจากรากชะเอมเทศ ด้วยวิธี Well diffusion agar โดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone

	Zone diameters (mm.)				
Specimen	GEN (10 µg/ml)	Conc. 1.0 g/ml (100%)	Conc. 0.5 g/ml (50%)	Conc. 0.25 g/ml (25%)	Conc. 0.125 g/ml (12.5%)
SA-M1	21	16.5	14.50	12	11
SA-M2	22	18	14.50	12	10.50
SA-M3	21	18	15	13	10.50
SA-M4	21	18.50	16	12.50	11
SA-M5	21	18	15.50	13	11
SA-M6	21	17.50	15	12	11
SA-M7	21	18	15	12.50	11
SA-M8	23	18.50	15	12	11
SA-M9	21	18	15	12	11
SA-M10	25	21.50	15	13	11
SA-M11	21	19	15	13	11.50
SA-M12	21	18.50	14.50	12	11
SA-M13	22.50	18.50	14.50	12	11
SA-M14	21	17.50	14.50	13	11
SA-M15	21	18.50	14.50	13	11
SA-M16	22	18	15	13	11
Mean±SD	21.60±1.11	18.28±1.03	14.91±0.42	12.50±0.48	10.97±0.22
(Min-Max)	(21-25)	(16.50-21.50)	(14.50-16)	(12-13)	(10.50-11.50)
P-value	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.01$

Conc.; Concentration of *Glycyrrhiza glabra* crude extract, GEN; Concentration of Gentamicin

นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดรากชะเอมเทศในแต่ละความเข้มข้น โดยคำนวณหาอัตราร้อยละการยับยั้งเชื้อของสารสกัดรากชะเอมเทศต่อยาที่เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) ได้ผลการคำนวณดังแสดงในตารางที่ 2 โดยจากผลการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดรากชะเอมเทศที่มีอัตราร้อยละการยับยั้งเชื้อสูงมากที่สุด คือ สารสกัดรากชะเอมเทศที่ระดับความเข้มข้น 1.0 (100%) กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่

84.70±3.23 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคือระดับความเข้มข้น 0.5 (50%), 0.25 (25%) และ 0.125 (12.5%) กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับโดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 69.19±3.92, 58.02±3.55 และ 50.91±2.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 2 อัตราร้อยละการยับยั้งเชื้อของสารสกัดรากชะเอมเทศต่อยาที่เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก

	Inhibitory activity (%)			
Specimen	Conc. 1.0 g/ml (100%)	Conc. 0.5 g/ml (50%)	Conc. 0.25 g/ml (25%)	Conc. 0.125 g/ml (12.5%)
SA-M1	78.57	69.05	57.14	52.38
SA-M2	81.82	65.91	54.55	47.73
SA-M3	85.71	71.43	61.90	50.00
SA-M4	88.10	76.19	59.52	52.38
SA-M5	85.71	73.81	61.90	52.38
SA-M6	83.33	71.43	57.14	52.38
SA-M7	85.71	71.43	59.52	52.38
SA-M8	80.43	65.22	52.17	47.83
SA-M9	85.71	71.43	57.14	52.38
SA-M10	86.00	60.00	52.00	44.00
SA-M11	90.48	71.43	61.90	54.76
SA-M12	88.10	69.05	57.14	52.38
SA-M13	82.22	64.44	53.33	48.89
SA-M14	83.33	69.05	61.90	52.38
SA-M15	88.10	69.05	61.90	52.38
SA-M16	81.82	68.18	59.09	50.00
Mean±SD	84.70±3.23	69.19±3.92	58.02±3.55	50.91±2.68
(Min-Max)	(78.57-90.48)	(60-76.19)	(52-61.90)	(44-54.76)
P-value	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.01$

Conc.; Concentration of *Glycyrrhiza glabra* crude extract

$$\text{Formula} = \frac{\text{Sample(mm.)} \times 100\%}{\text{Positive control(mm.)}}$$

3. ผลการทดสอบ Minimum inhibitory concentration test (MIC) และ Minimum bactericidal concentration test (MBC)

การทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดรากชะเอมเทศที่สามารถยับยั้ง และทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration test; MIC และ Minimum bactericidal concentration test; MBC ตามลำดับ) ต่อเชื้อ *Staphylococcus* spp. ด้วยวิธี broth and agar microdilution method (CLSI, 2006) พบว่าผลเฉลี่ยของค่า MIC และ MBC จากการทดสอบได้เป็น ≤ 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร (1 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลค่าเฉลี่ยของระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดรากชะเอมเทศที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และทำลายเชื้อ (MBC) *Staphylococcus* spp. (g/ml)

Specimen	MIC		MBC	
	(g/ml)	%	(g/ml)	%
***Staphylococcus* spp.**	0.01	1	0.01	1

สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผล

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดรากชะเอมเทศที่มีผลต่อเชื้อ *Staphylococcus* spp. ที่ก่อโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังในสุนัขกลุ่มตัวอย่างพื้นที่ตำบลสระลงเรือ อำเภอห้วยกระเจา จังหวัดกาญจนบุรี โดยวิธีการทดสอบ Well diffusion agar โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกคือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากรากชะเอมเทศสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus* spp. ได้ในทุกความเข้มข้นของสารสกัด และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อขึ้นกับระดับความเข้มข้นของสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) และการวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อและทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration test; MIC และ Minimum bactericidal concentration test; MBC) โดยผลเฉลี่ยของค่า MIC และ MBC เมื่อทดสอบด้วยวิธี broth microdilution method ได้ ≤ 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sedighinia *et al*. (2012) และ Karahan *et al*. (2016) ซึ่งสนับสนุนว่าสารสกัดจากรากชะเอมเทศมีประสิทธิภาพสูงในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococcus โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อสแตฟฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus)* นอกจากนี้สารสกัดรากชะเอมเทศยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น เชื้อสเตรปโตคอคคัส ไพโอจีเนส (*Streptococcus pyogenes)* เชื้อเอ็นเทอร์โรคอคคัส เฟคาลิส *(Enterococcus faecalis),* เชื้อเอชเชอริเชียโคไล *(Escherichia coli)*, เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทน (*Streptococcus mutans)* และเชื้อแอคติโนมัยเซสวิสโคซัส *(Actinomyces viscosus)* (Nirmala and Selvaraj, 2011 และ Shapna *et al*., 2010) อย่างไรก็ตามผลการวิจัยส่วนใหญ่รายงานว่าสารสกัดรากชะเอมเทศออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสาเหตุมาจากความแตกต่างทางโครงสร้างของผนังเซลล์ (Cell wall) ของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากโครงสร้างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยชั้นของลิโพพอลิแซ็คคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งมีคุณสมบัติในการป้องกันสารเคมีที่เป็นพิษไม่ให้เข้าสู่เซลล์ได้ จึงส่งผลสารสกัดออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ไม่ดี (Karahan *et al*., 2016)

ข้อเสนอแนะ

จากผลงานวิจัยในครั้งนี้พบว่าสารสกัดรากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra*) มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) ได้โดยที่ระดับความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ค่อนข้างใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาฤทธิ์หรือเภสัชกลศาสตร์ในการออกฤทธิ์ ตลอดจนความเป็นพิษของสารสกัดรากชะเอมเทศเพิ่มเติม เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาประสิทธิภาพสารสกัดรากชะเอมเทศสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ประกอบการรักษาโรคผิวหนังติดเชื้อแบคทีเรียของสุนัขได้อย่างปลอดภัย และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Alderman, D.J. and Smith, P. (2001). Development of draft protocols of standard Reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. Aquaculture, 3: 211-243.

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493–496.

Bennett R.W. and Lancette G.A. (2003). Bacteriological Analytical Manual (BAM). U.S. Food and Drug Administration. from http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch laboratory Methods.

Brantner, A., Pfeiffer, KP. and Brantner, H. (1994). Applicability of diffusion methods required by the pharmacopoeias for testing antibacterial activity of natural compounds. *Traditional Chinese material: a respect and prospect*, 49: 512-6.

Cheng-Hung Lai, Pan-Chen Liu, Wei-Ming Lee, Han-Yuan Lin. (2012). Apitoxin quapuncture and Administration of Herbal Medicines in a Dog with Superficial Pyoderma. *Thai J Vet Med. 2012. 42(3): 373-377.*

CLSI. (2006). Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard M7-A7.7th ed. CLSI Wayne PA USA, 26: 2.

CLSI. (2009). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard M02-A10, 10th ed. CLSI, Wayne, PA. 29: 1.

Damle, M. (2014). *Glycyrrhiza glabra* (Liquorice) - a potent medicinal herb. International Journal of Herbal Medicine, 2(2): 132-136

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989). Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford Science Publications*, 5: 905-961.

Hillier A, Lloyd DH, Weese JS, et al. (2014). Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). Vet Dermatol, 25: 163–175.

Karahan, F., Avsar C., Ilker I., Ozyigit and Berber, I. (2016). Antimicrobial and antioxi-dant activities of medicinal plant *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera* from different habitats. *Biotechnology and Biotechnological equipment*, 30: 797-804.

Kataria, R., Gurpreet, S., Avneet, G., J, Sunny. and Jindal, A. (2012). Pharmacological activities on *Glycyrrhiza glabra* a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6:5-7.

Kaur, R. and Kaur, H.P. (2013). *Glycyrrhiza glabra*: A phytopharmacological review. *International Journal of pharmaceutical sciences and research*, 4(7):2470-2477.

Mason, I.S. (1991). Canine pyoderma. Journal of Small Animal Practice, 32(8):381-386.

Murray, P.R., Baron, E. J., Jorgensen, J.J., Pfaller, M.A., and Yolken, R.H. (2003). Manual of Clinical Microbiology. *American Society of Microbiology*, 8:1-2310.

Nirmala, P. and Selvaraj, T. (2011). Anti-inflammatory and anti-bacterial activities of *Glycyrrhiza glabra*. *Journal of Agricultural Technology*, 7: 815-823.

Sedighinia, F., Afshar, A.S., Soleimanpour, S., Zarif, R., Asili, J., and Ghazvini, K. (2012). Antibacterial activity of Glycyrrhiza glabra against oral pathogens: an in vitro study. Avicenna Journal of Phytomedicine, 2(3): 118-124.

Shapna S, Afroza H, Kaiser H, Kaniz FU and Sumon, R. (2010). Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of methanolic extract of *Glycyrrhiza glabra*. Agric. *Biol J N Am*, 1:957-960.