ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดชะเอมเทศต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เจริญแบบอิสระและแบบไบโอฟิล์ม

สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล* สุทธิมาส หยวกหยง กรรณิการ์ มาสี พชราวลี นันบุญตา และภัทธวุฒิ บุรีรักษ์

Antibacterial Activities of licorice Extract on Biofilms and Planktonic Cells of *Staphylococcus aureus*

Suttipalin Suwannakul*, Suttimas Yuankyong, Kannika Masi, Pacharawalee Nanbunta and Pattarawut Burirak

ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก

Preventive Department, Faculty of Dentistry, Naresuan University, Phitsanulok

* Corresponding author. Email address: oomdent@hotmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus (S. aureus)* ที่เจริญแบบอิสระและแบบไบโอฟิล์มของสารสกัดชะเอมเทศในตัวทำละลายเอทานอล โดยศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อเบื้องต้นด้วยวิธี disc diffusion method จากนั้นหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง (Minimal inhibitory concentration; MIC) และฆ่าเชื้อ (Minimal bactericidal concentration; MBC) *S. aureus* ที่เจริญแบบอิสระและแบบไบโอฟิล์มด้วยวิธี macrobroth dilution method เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ vancomycin ที่เป็นกลุ่มควบคุมบวก ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดชะเอมเทศมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น $\geq$ 0.78 มก./มล. เกิดโซนยับยั้ง (inhibition zone) เส้นผ่านศูนย์กลาง เฉลี่ย 6.15 ± 0.05 มม. ขณะที่ยา vancomycin ที่ความเข้มข้น 0.03 มก./มล. ทำให้เกิดโซนขนาด 10.43 ± 0.23 มม. ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดชะเอมเทศต่อเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบอิสระเท่ากับ 0.78 มก./มล. และ 1.56 มก./มล. ตามลำดับ โดยที่สารสกัดชะเอมเทศที่ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า MBC สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ภายในระยะเวลา 30 นาที ในขณะที่ยา vancomycin ที่ความเข้มข้น 0.03 มก./มล. สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบอิสระได้ทั้งหมด ค่า MIC ของสารสกัดชะเอมเทศที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* แบบไบโอฟิล์ม คือ 0.78 มก./มล. ขึ้นไป การทดสอบการทำลายเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญเป็นไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง พบว่า ทั้งสารสกัดชะเอมเทศและ vancomycin ไม่สามารถกำจัดเชื้อ *S. aureus* ในไบโอฟิล์มได้ทั้งหมด แต่สารสกัดที่ความเข้มข้น 50 มก./มล. ให้ผลที่เทียบเคียงได้กับใช้ยา vancomycin ที่ความเข้มข้น 0.03 มก./มล. ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดชะเอมเทศมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *S. aureus* ทั้งที่เจริญแบบไบโอฟิล์มและแบบอิสระ แม้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดชะเอมเทศที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มนั้นจะสูงแต่ประสิทธิภาพของสารสกัดต่อเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มสามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นยาทางเลือกในอนาคตโดยเฉพาะคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มได้

คำสำคัญ: ชะเอมเทศ การเจริญแบบอิสระ ไบโอฟิล์ม *Staphylococcus aureus*

Abstract

The aim of this study was to determine the effects of licorice extract on growth of *Staphylococcus aureus (S. aureus)* in planktonic and biofilm forms. Licorice root was extracted by ethanol. Its antibacterial activities were tested against *S. aureus* using disc diffusion method. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of the extract were subsequently determined using macrobroth dilution method, comparing to vancomycin which was used as positive control. Results showed that licorice extract at concentration of $\geq$ 0.78 mg/ml indicated antibacterial activities with inhibitory zone of 6.15±0.05 mm in diameter, while inhibitory zone of vancomycin at 0.03 mg/ml was 10.43 ± 0.23 mm in diameter. The MIC and MBC for planktonic *S. aureus* were 0.78 and 1.56 mg/ml, respectively; whereas vancomycin at concentration of 0.03 mg/ml completely eradicated *S. aureus* in planktonic form. On study of killing time by licorice extract, 2 folds of MBC demonstrated ability to inhibit growth of *S. aureus* within 30 minutes. The extract at concentration of 0.78 mg/ml up also

inhibited and eliminated growth of *S. aureus* in biofilm. Both licorice extract and vancomycin could not completely kill *S. aureus* in 24-hour established biofilm at any tested concentration; however, the extract at concentration of 50 mg/ml presented the inhibition results similar to 0.03 mg/ml of vancomycin. This study suggested that licorice extract has inhibition properties against growth of *S. aureus* in both biofilm and planktonic forms. Although, the higher concentration of the extract is needed to inhibit *S. aureus* biofilm, it presents the possibility to be developed as alternative medicine for inhibition of biofilm forming pathogens in the future.

Keywords: Licorice, *Glycyrrhiza glabra*, Planktonic, Biofilm, *Staphylococcus aureus*

บทนำ

Staphylococcus aureus (S. aureus) เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อสิ่งแวดล้อมได้ดี (อรุณลักษณ์ ลุลิตานนท์, และคนอื่นๆ, 2554, น. 22-28) สามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อบนผิวหนัง กระดูกและในกระแสเลือด และยังเป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอหรืออยู่ในสภาวะพักฟื้น โดยมักจะแทรกซ้อนในผู้ป่วยที่ติดเชื้อทำให้มีอาการรุนแรงขึ้น (นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2551, น. 347-358) จากงานวิจัยต่างๆ ตลอดจนรายงานทางการแพทย์ พบว่าเชื้อ *S. aureus* หลายสายพันธุ์มีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นและมีการวิวัฒนาการกลายพันธุ์ (Mutagenesis) ทำให้มีคุณสมบัติในการต้านยาปฏิชีวนะ โดยสายพันธุ์ที่สำคัญ ได้แก่ Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) ซึ่งทำให้เกิดอาการติดเชื้อรุนแรงรักษาหายได้ยาก เนื่องจากมีการดื้อยาและทำให้มีอัตราเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูง (นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2551, น. 347-358) การรักษาการติดเชื้อ MRSA ที่มีความรุนแรงอาจจะต้องนำยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อสูง เช่น vancomycin มาใช้ในการรักษาทดแทนยาปฏิชีวนะอื่นๆ ที่ใช้ไม่ได้ผล อย่างไรก็ตาม vancomycin มักมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยโดยทำให้การทำงานของไตลดลง (Elyasi, Khalili, Dashti-Khavidaki, & Mohammadpour, 2012, pp. 1243-1255) จากการศึกษางานวิจัยพบว่าผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาพยาบาลในสถาบันมะเร็งแห่งชาติมีการติดเชื้อ *S. aureus* และ Enterococcus spp. ร้อยละ 11.2 และ 6.4 ตามลำดับ แบคทีเรียดื้อยาที่พบในผู้ป่วยมะเร็งคือ แบคทีเรียแกรมบวกดื้อยากลุ่ม MRSA (ร้อยละ 24.7) ขณะที่เชื้อทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยากลุ่ม penicillin (วรยุพา ถมปัด, นภารัตน์ คุ้มวงษ์, กรรณิกา มาฆะเซ็นต์, และยุทธนา สุขเจริญ, 2553, น. 68-76) เนื่องจากปัจจุบันยาปฏิชีวนะมักก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียมากขึ้น โดยเฉพาะเชื้อในกลุ่มที่มีการสร้างเอนไซม์ β-lactamase เช่น MRSA หรือ *S. aureus* ดังนั้นจึงได้มีการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้วางแผนการรักษาเพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ (Martin, & Ernst, 2003, pp. 241-246) ชะเอมเทศ *Glycyrrhiza glabra* Linn. เป็นไม้ยืนต้นที่พบในทางตอนใต้ของยุโรปและบางส่วนของเอเชีย มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดีหลายประการ อาทิ เช่น ต้านการติดเชื้อ และต้านไวรัส เป็นต้น (วันฉัตร แสวงศักดิ์, 2552) รากของชะเอมเทศใช้รักษาอาการบวม ล้างสารพิษในร่างกาย รักษาโรคกระเพาะอาหาร โรคตับ และโรคไต (Fukai, et al., 2002) รากของชะเอมเทศมีส่วนประกอบของสาร flavonoid อยู่จำนวนมาก (Long, Mead, Hendricks, Hardy, & Voyich, 2013, pp. 241-247) สารสกัดชะเอมเทศสายพันธุ์ *G. uralensis*, *G. glabra*, และสายพันธุ์อื่นๆ นำมาใช้เป็นยาสำหรับรักษาโรคกระเพาะอาหารอักเสบ แผลในกระเพาะอาหารและในลำไส้เล็ก อาหารเป็นพิษ แก้ไอ และยังมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็ง รวมถึงใช้รักษาโรคมะเร็งผิวหนัง เนื้องอกในตับ และถุงน้ำดี อีกทั้งยังใช้ในการรักษาระบบทางเดินปัสสาวะอีกด้วย (Fukai, et al., 2002, pp. 536-539) งานวิจัยหลายการศึกษาพบว่า สารสกัดจากชะเอมเทศสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดได้ ส่วนประกอบของชะเอมเทศมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ สามารถต้านต่อเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อจุลชีพก่อโรคทางคลินิกที่พบได้บ่อยและยังเป็นเชื้อที่กำลังพัฒนาเป็นเชื้อที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Irani, Sarmadi, Bermard, Ebrahini pour, & Bazarnov, 2010, pp. 425-428; Long, et al., 2013 and

Snowden, et al., 2014, pp. 241-247) มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดชะเอมเทศว่าสามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบอิสระมาบ้างแล้วแต่ผลการศึกษาที่ได้ไม่คงที่ (Mansouri, 1999; Meghashri, 2009; Sedighnia, et al., 2012, pp. 375-377) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลของสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม เนื่องจากเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคส่วนใหญ่มักอยู่ในรูปแบบไบโอฟิล์มมากกว่าแบบอิสระ ซึ่งมีความสามารถในการทนต่อสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าการอยู่แบบอิสระ (สุภารัตน์ จันทร์เหลือง, สยมพล อาลัย, เวทย์ ศรีละคร, และนพวัฒน์ เพ็งคำศรี, 2010, น. 279-286) การศึกษากับเชื้อแบบไบโอฟิล์มจึงอาจให้ประโยชน์ในการนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนายาที่ใช้ในการรักษาแบบทางเลือกได้มากขึ้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพจากสารสกัดชะเอมเทศต่อเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มเปรียบเทียบกับการเจริญแบบอิสระ และกับยาปฏิชีวนะ เพื่อที่จะนำไปใช้เป็นข้อมูลในการรักษาทางการแพทย์ต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

แบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

การเตรียมสารทดสอบ

รากชะเอมเทศที่มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นรากชะเอมเทศที่ปลูกในประเทศไทยที่ได้มาจากแหล่งเพาะปลูกเดียวกัน ซึ่งได้มาจากฤดูการเก็บเกี่ยวเดียวกันของทุกปี (ต.ค.-ธ.ค.) นำมาสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน) วิธีการสกัดสารชะเอมเทศโดยย่อเป็นดังนี้ นำรากชะเอมเทศที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาดนำมาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาบดให้เป็นผงละเอียดแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องที่ปราศจากความชื้น จากนั้นนำส่วนผงที่ได้มาสกัดในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 โดยชั่งส่วนผง 50 กรัม ละลายในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร และทำการสกัดในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดปากขวดให้สนิทแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 90 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกส่วนกากและส่วนเหลว นำส่วนเหลวที่สกัดได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยระบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้ถูกนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำมาทดสอบ จากนั้นสารสกัดที่ได้ถูกนำมาเตรียมให้มีความเข้มข้นตั้งต้น 1 กรัมต่อมล. (g/ml) และเตรียมยา vancomyin ให้มีความเข้มข้นตั้งต้น 3 มก./มล. (mg/ml) จากนั้นกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บสารที่เตรียมเป็นความเข้มข้นตั้งต้นไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

เชื้อโคโลนีเชื้อ *S. aureus* จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุ ประมาณ 24 ชั่วโมง 2-3 โคโลนี ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำมาปรับปริมาณเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc. Farland No.0.5 แล้วนำเชื้อที่ได้มาทำการทดสอบ และทำการนับจำนวนเชื้อตั้งต้นก่อนการทดลอง

การจำลองการเจริญของเชื้อ *S. aureus* แบบไบโอฟิล์ม

นำเชื้อ *S. aureus* ที่ได้จากการเตรียมเชื้อมาเจือจางในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ BHI โดยมีอัตราส่วนของเชื้อกับ BHI เป็น 1:100 นำมาใส่ใน microtiter plate ชนิด 96 หลุม ในปริมาณที่เท่ากันทุกหลุมเพื่อเป็นการจำลองการเจริญของเชื้อแบบไบโอฟิล์ม จากนั้นปิด microtiter plate ด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่มีการเขย่า เมื่อครบกำหนดทำการกำจัดอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์ที่ไม่มีการยึดเกาะกันออกโดยการล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง แล้วทำให้แห้งโดยการกลับถาดหลุมคว่ำลงกับกระดาษซับ เชื้อที่ได้จากการจำลองแบบไบโอฟิล์มจะอยู่ก้นหลุมซึ่งจะนำมาใช้ในการทดสอบการต้านเชื้อแบบไบโอฟิล์มของสารทดสอบ (Rukayadi, Han, Yong, & Hwang, 2010, pp. 1489-1493)

วิธีการการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดชะเอมเทศที่เจริญแบบอิสระ

การทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี Disc diffusion method

นำไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อมาจุ่มเชื้อ *S. aureus* ที่ได้เตรียมไว้ แล้วนำมาป้ายถี่ ๆลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วเป็น 3 ระนาบ แต่ละระนาบทำมุมกันประมาณ 60 องศา เพื่อให้แบคทีเรียกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นนำมาทดสอบกับสารสกัดชะเอมเทศเตรียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆที่ต้องการทดสอบ โดยกำหนดกลุ่มควบคุมลบคือน้ำกลั่นและกลุ่มบวกคือยา vancomycin ที่ความเข้มข้น 0.03 มก./มล. (Ateba, Mbewe, Moneoang, & Bezuidenhout, 2010, pp. 1-6) จากนั้นหยดสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 10 ไมโครลิตร ต่อ 1 ชิ้น ของ sterile paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วใช้ forceps ปราศจากเชื้อ คีบ sterile paper disc ที่หยดสารละลายแต่ละชนิดนำมาวางลงบนผิวหน้าอาหารแล้วกดเบา ๆเพื่อให้ติดแนบกับผิวหน้าอาหาร รอให้สารซึมซับผ่าน disc หลังจากนั้นคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น สารทดสอบที่มีบริเวณใสมากกว่า 6 มิลลิเมตร ถือว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* (พีรพัฒน์ สุพรรณพทธุ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2553, น. 15-28) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

การทดสอบโดยวิธี Macrobroth dilution method

เตรียมหลอดทดลองขนาด 100 มิลลิเมตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อและทำให้แห้งสำหรับใช้ในการทดสอบอย่างละ 15 หลอด แบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มทดสอบสารสกัดชะเอมเทศ 13 หลอด (สำหรับ 13 ความเข้มข้นทดสอบ) กลุ่มควบคุมบวก 1 หลอด (ยา vancomycin ความเข้มข้น 0.03 มก./มล.) และกลุ่มควบคุมลบ 1 หลอด (อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI) เจือจางความเข้มข้นของสารสกัดชะเอมเทศโดยวิธี 2-fold dilution ให้ได้ทั้งหมด 13 ความเข้มข้น ดังนี้ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.391, 0.195, 0.098, 0.049 และ 0.025 มก./มล. จากนั้นเติมเชื้อ *S. aureus* ที่เตรียมไว้ลงในทุกหลอดในปริมาณที่เท่ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้สังเกตหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดและไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC บันทึกหน่วยเป็นมก./มล. (พัชรีญา สมาธิ, เพ็ญโฉม จันทร์หวาน, ภัสพิมล มากคง และมณฑล เลิศคณาวนิชกุล, 2552) นำสารละลายแต่ละหลอดไปเกลี่ย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ชนิดแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผลโดยการสังเกตการเจริญของแบคทีเรียบนจานเพาะเชื้อ นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในแต่ละจานเพาะเชื้อ โดยจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่เพาะจากหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นของสารละลายต่ำที่สุดและไม่พบโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* หรือพบโคโลนีของ *S. aureus* เจริญน้อยกว่า 5 โคโลนี คือระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ เป็นค่า MBC (สุภารัตน์ จันทร์เหลือง, 2010, น. 279-286) ทำการทดลอง 3 ซ้ำตลอดขั้นตอนการทดลอง

การศึกษาระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *S.aureus* โดยเทคนิค time-kill assay

ศึกษาการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดชะเอมเทศที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 4 เท่า ของค่า MBC เป็นระยะเวลา 30, 60 และ 90 นาที เตรียมเชื้อ *S. aureus* ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ BHI ให้ได้ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ 10^5 CFU/ml. จากนั้นทำการ spread เชื้อที่ได้จากการทดลองขั้นต้นตามระยะเวลาที่กำหนดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ชนิดแข็ง ทำการนับจำนวนโคโลนีเชื้อที่เจริญหลังทำการเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมแสดงการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากสารสกัดชะเอมเทศ ผลการศึกษาแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อที่เจริญ (CFU/ml.) และระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ (time-killing curve) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

ใช้ microtiter plate ชนิด 96 หลุมในการดำเนินการทดสอบ โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มทดสอบ กลุ่มทดสอบเป็นสารสกัดชะเอมเทศซึ่งเตรียมความเข้มข้นต่าง ๆ 8 ความเข้มข้น (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 และ 0.781 มก./มล.) กลุ่มควบคุมบวก (ยา vancomycin ความเข้มข้น 0.03 และ 0.06 มก./มล.) และกลุ่มควบคุมลบ (อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI อย่างเดียว)

ทุกความเข้มข้นของทุกกลุ่มทดสอบเตรียมความเข้มข้นละ 3 หลุม เติมเชื้อ *S. aureus* ในปริมาณที่เท่ากันลงในแต่ละหลุม โดยทุกหลุมจะมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ไมโครลิตร จากนั้นปิดถาดด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังครบกำหนด สังเกตดูหลุมที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่อาหารเลี้ยงเชื้อยังคงใสหรือไม่มีความขุ่น บันทึกผลเป็นค่า MIC จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เติมสารละลาย PBS ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และขูดเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มที่ก้นของถาดหลุมแต่ละหลุมด้วย sterile pipette tip ดูดสารละลายจากแต่ละหลุมไปเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่เพาะจากหลุมที่มีความเข้มข้นของสารละลายต่ำที่สุดและไม่พบโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* หรือพบโคโลนีของ *S. aureus* เจริญน้อยกว่า 5 โคโลนี จะเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ หรือเป็นค่า MBC ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ตลอดขั้นตอนการทดลอง (Rukayadi, et al., 2010, pp. 1489-1493)

ดำเนินการทดสอบหาค่า MBEC (Minimal Biofilm Eradication Concentration) โดยนำ microtiter plate ชนิด 96 หลุมที่ผ่านขั้นตอนการจำลองการเจริญของเชื้อ *S. aureus* แบบไบโอฟิล์มที่มีอายุ 24 ชั่วโมง มาเติมสารทดสอบที่แยกเป็นชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ข้างต้น โดยให้มีปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 200 ไมโครลิตร ปิดถาดด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังครบกำหนดทำการวิเคราะห์เพื่อหาค่า MBEC (วิธีการวิเคราะห์และอ่านค่าเช่นเดียวกับการหาค่า MBC) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ตลอดขั้นตอนการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดสอบเบื้องต้นหาความไวของเชื้อต่อสารทดสอบแสดงเป็น ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ค่า MIC, MBC และ MBEC แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard errors) ในขณะที่ค่า time-killing แสดงช่วงเวลาในการยับยั้งเชื้อ ณ ความเข้มข้นหนึ่ง ๆ ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าต่าง ๆทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 17.0 ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และ Post Hoc Tests (Tukey HSD)

ผลการวิจัย

การทดสอบขั้นต้นเพื่อหาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบอิสระ โดยวิธี disc diffusion method พบว่าสารสกัดชะเอมเทศที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 0.78 มก./มล. มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. aureus* โดยก่อให้เกิดโซนยับยั้งซึ่งเป็นโซนใสที่มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าหรือเท่ากับ 6.15 ± 0.05 มก./มล. เปรียบเทียบกับโซนยับยั้งขนาด 10.43 ± 0.23 มก./มล. ของกลุ่มควบคุมบวก (vancomycin ที่ความเข้มข้น 0.03 มก./มล.) และกลุ่มควบคุมลบ (น้ำกลั่น) ซึ่งไม่พบโซนยับยั้ง ดังแสดงในตารางที่ 1 การหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดชะเอมเทศที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบอิสระด้วยวิธี Macrobroth dilution method พบค่า MIC และ MBC ของสารสกัดชะเอมเทศตรวจพบที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.78 และ 1.56 มก./มล. ตามลำดับ ในขณะที่ยา vancomycin ที่ความเข้มข้นที่ 0.03 และ 0.06 มก./มล. ตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบ เมื่อนำสารสกัดชะเอมเทศมาทดสอบหาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี time-kill assay พบว่าสารสกัดชะเอมเทศที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 4 เท่า ของค่า MBC สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ภายในระยะเวลา 30 นาที ที่ยาสัมผัสกับเชื้อ โดยพบว่ามีปริมาณเชื้อ *S. aureus* ลดลงเมื่อเทียบกับเชื้อตั้งต้น คิดเป็นร้อยละของเชื้อที่รอดชีวิตเท่ากับ 63.06 40.65 และ 23.08 ตามลำดับ การยับยั้งเชื้อมีลักษณะแปรผันตามความเข้มข้นที่มากขึ้นและระยะเวลาที่นานขึ้น ที่ 90 นาที เชื้อที่รอดชีวิตในแต่ละความเข้มข้นเท่ากับ 27.03 12.2 และ 9.23 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* แบบไบโอฟิล์ม พบว่าสารสกัดชะเอมเทศที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.78

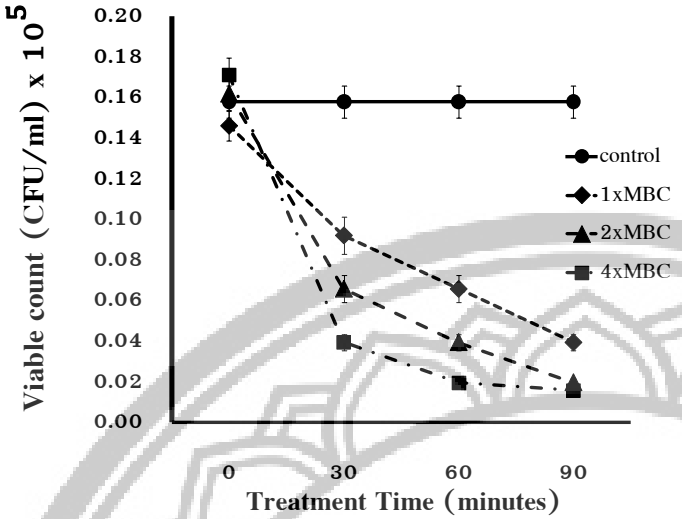
มก./มล. ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ที่พัฒนาไปเป็นแบบไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ โดยให้ค่าร้อยละการรอดชีวิตที่ความเข้มข้น 0.78, 1.56 และ 3.13 มก./มล. เท่ากับ72.95 43.77 และ 22.65 ตามลำดับ ความเข้มข้นของสารสกัดในช่วง 6.25 – 100 มก./มล. ตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อในแบบไบโอฟิล์ม ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับผลการยับยั้งที่เกิดจากกลุ่มควบคุมบวก (ยา vancomycin ที่ความเข้มข้น 0.03 และ 0.06 มก./มล.) ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* แบบไบโอฟิล์มแสดงในรูปที่ 2 ความสามารถในการกำจัดเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม (biofilm eradication ability) พบว่า สารสกัดชะเอมเทศมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญเป็นไบโอฟิล์มแล้วในแบบจำลองอายุ 24 ชั่วโมง โดยให้ผลการทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสกัด 100 มก./มล. ดีกว่ากลุ่มควบคุมบวกทั้ง 2 ความเข้มข้น (0.03 และ 0.06 มก./มล.) ในขณะที่ สารสกัดที่ความเข้มข้น 50 มก./มล. แสดงผลการยับยั้งที่ใกล้เคียงกับยา vancomycin ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.03 มก./มล. ความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่ 0.78 มก./มล. ขึ้นไป แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมลบ อย่างไรก็ตาม ผลจากการทดสอบนี้ไม่พบว่าทั้งสารสกัดจากชะเอมเทศและยา vancomycin ที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการกำจัดเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมงได้ทั้งหมด (Minimal biofilm eradication concentration; MBEC)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของโซนยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ของสารสกัดชะเอมเทศที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นและค่าเฉลี่ยของโซนยับยั้งของยา vancomycin ที่ความเข้มข้น 0.03 มก./มล.

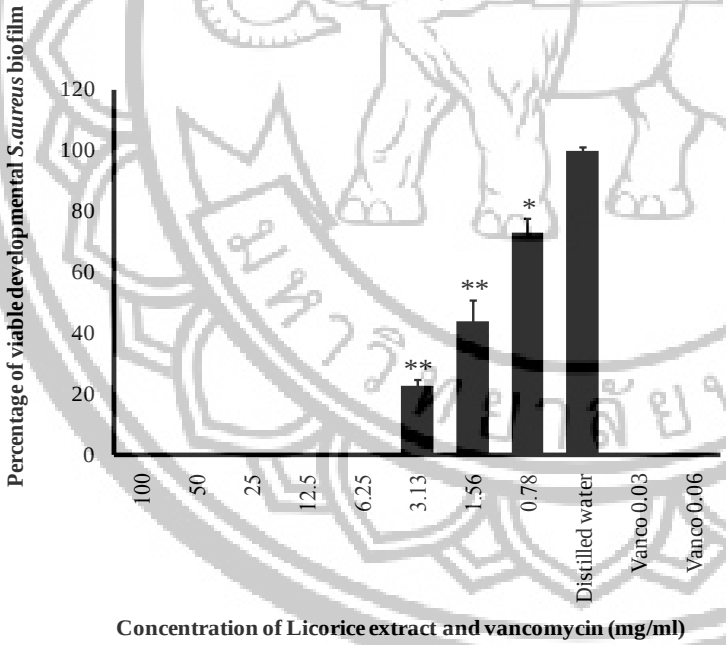
สารทดสอบ	ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าโซนยับยั้ง (mean ± SD) mm.
สารสกัดชะเอมเทศ	100	15.41 ± 1.16
	50	13.03 ± 0.83
	25	10.76 ± 0.36
	12.5	9.25 ± 0.79
	6.25	8.10 ± 0.14
	3.13	7.01 ± 0.60
	1.56	6.30 ± 0.15
	0.78	6.15 ± 0.05
น้ำกลั่น	0	0
Vancomycin	0.03	10.43 ± 0.23

ตารางที่ 2 แสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดชะเอมเทศต่อการยับยั้งและการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบอิสระโดยวิธี Macrobroth dilution method

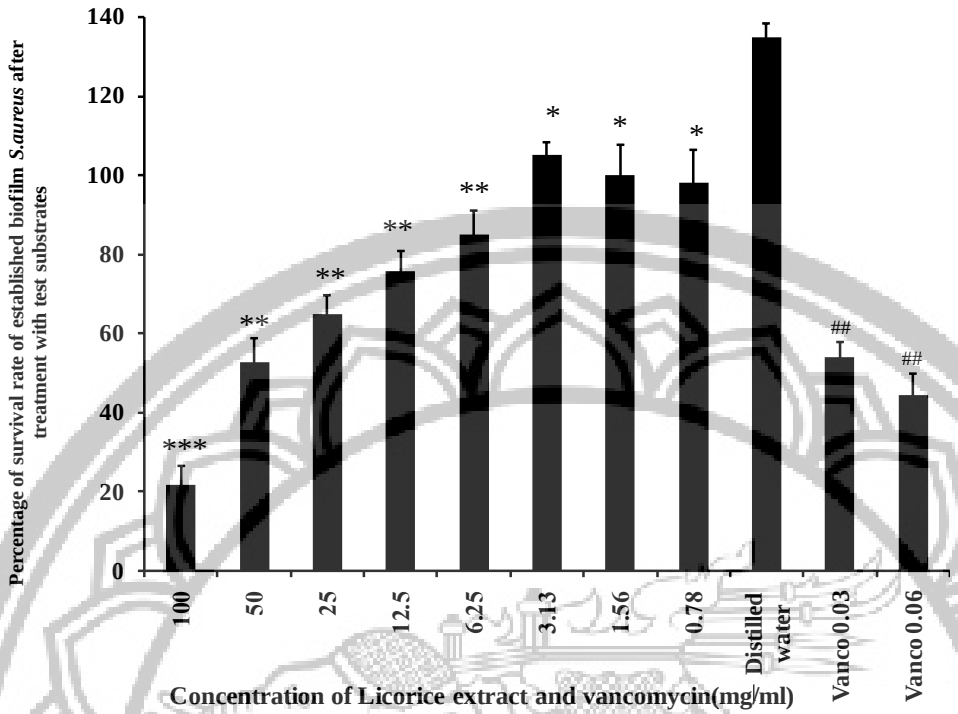
	Licorice Extract	
Pathogen	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
***S.aureus* ATCC25923**	0.78	1.56



รูปที่ 1 Time-kill assay แสดงจำนวนโคโลนีเชื้อต่อมิลลิลิตร (x 10^5 CFU/ml) หลังทดสอบด้วยสารสกัดชะเอมเทศที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (1, 2 และ 4 เท่าของค่า MBC) เป็นระยะเวลา 30, 60 และ 90 นาที ผลการศึกษาแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ยมาตราฐาน ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตราฐาน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง



รูปที่ 2 กราฟแสดงร้อยละของจำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญเป็นไบโอฟิล์ม หลังทดสอบด้วยสารสกัดชะเอมเทศที่ความเข้มข้นต่าง ๆเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับยา vancomycin (เครื่องหมาย * และ ** แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุมลบที่เป็นน้ำกลั่น ที่ $P < 0.05$ และ $P < 0.01$, ตามลำดับ)



รูปที่ 3 กราฟแสดงร้อยละของจำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญเป็นไบโอฟิลม์อายุ 24 ชั่วโมง และรอดชีวิต หลังทดสอบด้วยสารสกัดชะเอมเทศที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับยา vancomycin (เครื่องหมาย *, ** และ *** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุมลบที่เป็นน้ำกลั่น ที่ $P < 0.05$, $P < 0.01$ และ $P < 0.001$, ตามลำดับ)(เครื่องหมาย ## แสดงความแตกต่างย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างยา vancomycin กับกลุ่มควบคุมลบที่เป็นน้ำกลั่น ที่ $P < 0.01$)

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดชะเอมเทศต่อการต้านเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบอิสระในเบื้องต้น พบว่าสารสกัดชะเอมเทศมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่า ความเข้มเข้มข้นของสารสกัดชะเอมเทศระหว่าง 0.5-6.25 มก./มล. ทำให้เกิดโซนยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ขนาด 9-16 มม. (Mansouri, 1999; Meghashri, 2009; Sedighnia, et al., 2012) ผลของ MIC และ MBC ที่ทดสอบในครั้งนี้ ให้ค่าเท่ากับ 0.78 และ 1.56 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Meghashri (2009) ที่ให้ค่า MIC ในช่วง 0.2-1.2 มก./มล. และรายงานของ Irani, et al., (2010) ที่ได้ค่า MIC 2.5 มก./มล. และ MBC 10 มก./มล. ในทางตรงกันข้ามสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดในตัวละลายเอทานอลจากการศึกษาของ (Singhal, Chaudhary, Chand, & Pal, 2012, pp. 610-615) สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 12600 ที่ค่า MIC 0.042 มก./มล. และ MBC เท่ากับ 0.167 มก./มล. ค่าที่แตกต่างระหว่างผลการวิจัย อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของขั้นตอนการสกัด สายละลายที่ใช้ในการสกัด สายพันธุ์ *S. aureus* และสายพันธุ์ของชะเอมเทศที่ใช้ในการทดสอบ

การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า สารสกัดชะเอมเทศมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อ *S. aureus* อิสระใน 30 นาทีแรก โดยมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาสัมผัสนานขึ้น อย่างไรก็ตาม เชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติมักอยู่ร่วมกันแบบไบโอฟิล์มมากกว่าแบบอิสระ

ก่อนหน้านี้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อของน้ำมันกานพลู (Clove oil) และน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (Lemongrass oil) ต่อเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบอิสระและแบบไบโอฟิล์ม (Chamdit, & Siripermpool, 2012, pp. 28-36) และ ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียจากน้ำมันหอมระเหยของมิ้นต์ต่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) (Kraivaphan, Amornchart, & Maneepitsamai, 2013, pp. 100-106) แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดชะเอมเทศต่อเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบเพื่อหาค่า MIC ที่ยับยั้งการเจริญการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ในรูปแบบไบโอฟิล์ม จากการทดสอบพบว่าค่า MIC ของสารสกัดชะเอมเทศตั้งแต่ 0.78 มก./มล. เป็นต้นไป สามารถยับยั้งการเจริญเป็นแบบไบโอฟิล์มได้ และยับยั้งได้ทั้งหมดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 6.25 - 100 มก./มล. นอกจากนี้สารสกัดชะเอมเทศตั้งแต่ 0.78 มก./มล. ขึ้นไปยังมีฤทธิ์ทำลายเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญเป็นไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมงได้ แม้จะไม่สามารถกำจัดหรือฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตามสารสกัดชะเอมเทศที่ความเข้มข้น 50 มก./มล. เป็นต้นไป ให้ผลการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์มเทียบเคียงได้กับ ยา vancomycin ที่ความเข้มข้น 0.03 มก./มล. การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มจะต้องใช้สารสกัดชะเอมเทศที่มีความเข้มข้นสูงกว่าการฆ่าเชื้อที่เจริญแบบอิสระ ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญแบบไบโอฟิล์มจะมีชั้นป้องกันที่แข็งแรงและถูกทำลายได้ยากกว่า (สุภารัตน์ จันทร์เหลือง, สยมพล อาลัย, เวทย์ ศรีละคร, และนพวัฒน์ เพ็งคาศรี, 2010, น. 279-286) ซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการเข้าถึงของยาปฏิชีวนะหรือสารยับยั้งที่มีความสำคัญบางชนิด และมีผลทำให้เชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มมีฤทธิ์ต้านทานต่อยาหรือสารยับยั้งมากกว่าเชื้อที่เจริญแบบอิสระ ผลการทดสอบนี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาสารสกัดชะเอมเทศขึ้นมาใช้เป็นยาทางเลือกที่อาจนำมาใช้เสริมหรือทดแทนยาปฏิชีวนะที่มักจะก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาอยู่เสมอ โดยเฉพาะการนำมาใช้ต้านเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพและความเป็นไปได้เบื้องต้นในการนำสารสกัดจากสมุนไพรไทยจำพวก ชะเอมเทศ มาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่มักจะก่อให้เกิดโรคและกลายพันธุ์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น *S. aureus* แม้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสกัดจากสมุนไพรไม่อาจเทียบเท่ากับยาปฏิชีวนะ แต่เนื่องจากหาได้ง่ายในประเทศ ราคาถูก ปลูกเองได้ มีผลข้างเคียงน้อย (พัชรีญา สมาธิ, และคณะ, 2552) และที่สำคัญคือ ไม่ก่อให้เกิดเชื้อโรคสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ ทำให้สามารถนำผลการศึกษามาต่อยอดพัฒนาเพื่อให้เป็นยาทางเลือกชนิดใหม่ ๆได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลการศึกษาของสารสกัดชะเอมเทศต่อการทำลายเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญเป็นไบโอฟิล์ม ซึ่งแม้แต่ยาปฏิชีวนะที่แรงอย่าง vancomycin ซึ่งมักนำมาใช้กับเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาหลายชนิดก็ยังมีข้อจำกัดในการทำลายเชื้อไม่ต่างจากสารสกัดจากชะเอมเทศที่ความเข้มข้นในระดับหนึ่งมากนัก การศึกษากลไกการเข้าถึงของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อที่เจริญในแบบไบโอฟิล์มในอนาคตจึงอาจนำมาซึ่งองค์ความรู้ในการพัฒนายาชนิดใหม่ที่ราคาถูกและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่มดังกล่าว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ ในการสนับสนุนเงินทุนในการวิจัย ขอขอบคุณบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด ที่อนุเคราะห์สารสกัด และขอขอบคุณ ผศ.ทญ.ดร.รุ่งอรุณ เกรียงไกรที่ให้คำปรึกษาในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์. (2551). การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus* และแนวทางการควบคุม. *สงขลานครินทร์เวชสาร, 27*(4), 347-358.

พัชรีญา สมาธิ, เพ็ญโฉม จันทร์หวาน, ภัสพิมล มากคง และมณฑล เลิศคณาวนิชกุล. (2552). *ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรไทย*. สงขลา: มหาวิทยาลัยทักษิณ.

พีรพัฒน์ สุพรรณพทธุ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2553). ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าและสารสมุนไพรสกัดสดบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*. *Thai J Toxicology, 25*(1), 15-28.

วรยุพา ถมปัด, นภารัตน์ คุ้มวงษ์, กรรณิกา มาฆะเซ็นต์ และยุทธนา สุขเจริญ. (2553). จุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและการดื้อยาต้ายจุลชีพในผู้ป่วยมะเร็ง. *วารสารโรคมะเร็ง, 30*(2), 68-76.

วันฉัตร แสวงศักดิ์. (2552). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชะเอมเทศ (Glycyrrhiza glabra Linn.) และการตรวจสอบกลีเซอร์ไรซิน. สืบค้นเมื่อ 17 มีนาคม 2557, จาก http://cuir.car.chula.ac.th/ handle/123456789/16094.

สุภารัตน์ จันทร์เหลือง, สยมพล อาลัย, เวทย์ ศรีละคร และนพวัฒน์ เพ็งคำศรี. (2010). ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดข่าลิงต่อเชื้อ Enterococcus faecalis ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal, 5*(4), 279-286.

อรุณลักษณ์ ลุลิตานนท์, ธิดารัตน์ ดำนา, อรุณวดี ชนะวงศ์, พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์, นิชา เจริญศรี, เสกสิทธิ์ สังคีรี, และคนอื่น ๆ. (2554). การติดตามสถานการณ์ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่ไวต่อ vancomycin และ chlorhexidine ลดลงในโรงพาบาลศรีนครินทร์. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด, 24*(1), 22-28.

Ateba, C. N., Mbewe, M., Moneoang, M. S., & Bezuidenhout, C. C. (2010). Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk in the Mafikeng area, North West province, South Africa. *South African Journal of Science, 106*(11/12), 1-6.

Chamdit S., & Siripermpool P. (2012). Antimicrobial effect of clove and lemongrass oils against planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences, 39* (2), 28-36.

Fukai, T., Marumo, A., Kaitou, K., Kanda, T., Terada, S., & Noruma, T. (2002). Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia, 73*(6), 536-539.

Elyasi, S., Khalili, H., Dashti-Khavidaki, S., & Mohammadpour, A. (2012) Vancomycin-induced nephrotoxicity: mechanism, incidence, risk factors and special populations. A literature review. *European Journal of Clinical Pharmacology, 68*(9), 1243-1255.

Irani, M., Sarmadi, M., Bermard, F., Ebrahini pour, Gh. H., & Bazarnov, H. Sh. (2010). Leaves antimicrobial activity of Glycyrrhiza glabra L. Iranian *Journal of Pharmaceutical Research, 9*(4), 425-428.

Long, D. R., Mead, J., Hendricks, J. M., Hardy, M. E., & Voyich, J. M. (2013) 18β-Glycyrrhetinic acid inhibits methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survival and attenuates virulence gene expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57*(1), 241-247.

Kraivaphan, P., Amornchart, C., & Maneepitsamai, Y. (2013). Bacterial effects of three mint essential oils on Porphyromonas gingivalis in planktonic and biofilm cells. *Research Journal of Medicinal Plant*, *7*(2), 100-106.

Mansouri, S. (1999). Inhibition of *Staphylococcus aureus* mediated by extracts of Iranian plants. *Pharmaceutical Biology*, *37*(5). 375-377.

Martin, K. W., & Ernst, E. (2003) Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, *51*(2), 241-246.

Meghashri, S. G. (2009). In vitro antifungal and antibacterial activities of root extract of Glycyrrhiza glbra. *Journal of Applied Sciences Research*, 5, 1436-1439.

Rukayadi, Y., Han, S., Yong, D., & Hwang, J. K. (2010). In Vitro Antibacterial Activity of Panduratin A against enterococci clinical isolates. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *33*(9), 1489-1493.

Singhal, G., Chaudhary. S., Chand, L., & Pal, K. (2012) Antimicrobial activity of different extracts of Glycyrrhiza glabra. *International Journal of Pharma Professional's Research*, *3*(2), 610-615.

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

Snowden, R., Harrington, H., Morrill, K., Jeane, L., Garrity, J., & Orian, M., et al. (2014) A comparison of the anti-*Staphylococcus aureus* activity of extracts from commonly used medicinal plants. *Journal of Alternative and Complement Medicine*, *20*(5), 375-382.