



ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงต่อเชื้อ *Staphylococcus* spp. ที่เก็บจาก ผิวหนังสุนัขและมือเจ้าของสุนัข

ณัฐกาญจน์ นายมอญ^{1,*} ธิติชัย จารุเดชา¹ และ อารยา สืบขำเพชร²

¹ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

²ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร กรุงเทพฯ 10530

บทคัดย่อ: มะเขือพวง (*Solanum torvum* Sw.) เป็นพืชที่พบทั่วไปตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย มีสรรพคุณทางยาและใช้ในการรักษาโรคโดยวิธีแพทย์ทางเลือก การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงซึ่งสกัดด้วย 95% เอทานอล ต่อแบคทีเรียที่เก็บจากผิวหนังสุนัขและมือเจ้าของสุนัข โดยแบคทีเรียดังกล่าวได้ถูกนำมาจำแนกคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นที่จำเพาะต่อแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. แล้วนำมาทดสอบกับสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงด้วยวิธี broth microdilution test ใน microtiter plate 96-well และนำสารละลายจาก microtiter plate 96-well มาเพาะเชื้อต่อใน LB agar เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ (MBC) ตามลำดับ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียพบเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus sciuri* และ *Staphylococcus chromogenes* จากตัวอย่างทั้งสองแหล่ง ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงต่อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงสามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียดังกล่าวได้ทั้งหมด โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 3.91 - 62.5 mg/ml และมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus chromogenes* ได้ดีที่สุด ผลจากการวิจัยในครั้งนี้อาจนำไปสู่การพัฒนาใช้สารสกัดหยาบใบมะเขือพวงในการรักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อได้ต่อไป

คำสำคัญ: ใบมะเขือพวง สารสกัดหยาบ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย สุนัข

#ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2561. 13(2): 199-211.

E-mail address: cvtnkn@ku.ac.th

Efficiency of Ethanolic Leaf Extract of *Solanum torvum* Sw. against *Staphylococcus* spp. from Dog Skin and the Owner Hands

Nattakarn Naimon^{1,#}, Thitichai Jarudecha¹, and Araya Suebkhampet²

¹Department of Veterinary Technology, Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Bangkok, Thailand 10900

²Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Bangkok, Thailand 10530

Abstract: *Solanum torvum* Sw. is an alternative and traditional medicine plant which commonly found in Thailand. The aim of this study was to investigate the antibacterial activity of 95% ethanol crude extract of *S. torvum* SW. Leaves against pathogenic bacteria isolated from dog skin and owner hands (*in vitro*). The isolated bacteria were identified based on their biochemical characterization and determined their antibacterial activity of the extracts by using broth microdilution test in microtiter plate 96-well and subculturing into LB rich agar in order to explore the minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), respectively. The bacterial characterization used in this experiment was specific to the *Staphylococcus* spp. which revealed *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus chromogenes* in both of the sample sources. MIC and MBC were ranged between 3.91- 62.5 mg/ml and showed the greatest antibacterial activity against *Staphylococcus chromogenes*. This study suggested that the extracts was promising for development in the treatment against pathogenic bacterial skin diseases in the future.

Keywords: *Solanum torvum* Sw. Leaves, Crude extract, Antibacterial activity, Dog

[#]Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2018. 13(2): 199-211.

E-mail address: cvtnkn@ku.ac.th

บทนำ

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นซึ่งเหมาะต่อการเจริญเติบโตของพืชสมุนไพรต่างๆ รวมทั้งมะเขือพวงซึ่งพบได้ทั่วไปในทุกภูมิภาคของประเทศ มะเขือพวงจัดอยู่ในวงศ์ SOLANACEAE (*Solanum*

torvum Sw.) (โชติอนันต์ และคณะ, 2550) ในทาง การแพทย์แผนโบราณได้นำส่วนต่างๆ ของมะเขือ พวงมาใช้ในการรักษาโรค เช่น รากใช้พอกแก้ที่แตก เป็นแผล ลำต้นช่วยย่อยอาหาร ขับปัสสาวะ (Kala, 2005) แก้วไอ ขับเสมหะ (Siemonsma and Piluek,

1994) แก้วปวด ลอดักเสบ ทำให้เลือดหมุนเวียนได้ดี ใบใช้ห้ามเลือด เมล็ดในผลนำมาเผาไฟแล้วสุตดมเอาควัน บรรเทาอาการปวดฟัน (Ndebia et al., 2007; Agrawal et al., 2010) เป็นต้น ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากส่วนประกอบต่างๆ ของมะเขือพวง ขึ้นอยู่กับชนิดตัวทำละลายและวิธีการที่ใช้ในการสกัด พบว่ามีองค์ประกอบของสารเคมีหลายชนิด ได้แก่ glycoside, triterpenes, steroids, phytosterol (Nithyadevi and Sivakumar, 2015) tannins, saponins, phenolic compounds (Arif and Fareed, 2011) alkaloids, flavonoids (Chah et al., 2000) phenol (Thenmozhi and Mahadeva. 2012) isoflavonoid sulfate, steroidal glycoside (Arthan et al., 2002) chlorogenone และ neochlorogenone (Mohan and Bhandare, 2012) เป็นต้น

มะเขือพวงเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคหลายชนิดจึงมีนักวิจัยหลายท่านให้ความสนใจในการทดสอบฤทธิ์ของสารพฤษเคมีที่เป็นองค์ประกอบในส่วนประกอบต่าง ๆ ของมะเขือพวง ได้แก่ ใบ ดอก ผล ลำต้น และราก เป็นต้น จากการศึกษาของ Chah et al. (2000) พบว่าสารสกัดหยาบจากผลมะเขือพวงมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคหลายชนิดที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล และเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งได้แก่ เชื้อ *Actinomyces pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Aspergillus niger* และ *Candida albicans* และจากการศึกษาของ Bari et al. (2010) พบว่าสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ

ของมะเขือพวงมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิด โดยสารสกัดหยาบจากดอกมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *B. cereus*, *S. typhi* และ *Shigella dysenteriae* สารสกัดหยาบจากก้านและลำต้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *B. cereus* และ *S. typhi* สารสกัดหยาบจากรากมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *B. cereus*, *S. -β-haemolyticus* และ *S. typhi* และสารสกัดหยาบจากใบมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. dysenteriae* ได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่า สารสกัดหยาบจากใบมะเขือพวงด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียและราหลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาทิ *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris oryzae*, *Alternaria alternate*, *Tricoconis padwickii*, *Drechslera tetramera*, *Curvularia lunata*, *Fusarium moniliformae*, และ *Xanthomonas oryzae* ซึ่งก่อโรคในเมล็ดพันธุ์ข้าว (Lalitha et al., 2010) และต่อต้านเชื้อราและแบคทีเรียจากคลัง (stock) ในห้องปฏิบัติการ อาทิ *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *Aspergillus flavus* และ *C. albicans* เป็น (Ajaiyeoba, 1999) การศึกษาของ Naimon et al. (2015) พบว่าสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อมาตรฐานที่นำมาทดสอบซึ่งได้แก่ เชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, *S. intermedius* DMST 11465, *S. epidermidis* ATCC12228, *B. cereus* ATCC 11778 และ *P. aeruginosa* ATCC 11778

แม้ว่าการแพทย์แผนโบราณและแผนปัจจุบัน ยังมีแนวคิดและหลักการในการใช้สมุนไพรรักษาโรคที่แตกต่างกัน แต่การประยุกต์หรือเลือกใช้สมุนไพรให้เหมาะสมตามความจำเป็น หรือใช้ควบคู่กันกับการรักษาทางการแพทย์แผนปัจจุบัน อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาโรคให้ประสบความสำเร็จ และส่งผล

ต่อการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศได้ดียิ่งขึ้นจากการใช้สมุนไพรซึ่งเป็นพืชที่หาได้ง่ายในแต่ละท้องถิ่น (พร้อมจิต และรุ่งระวี, 2553) ปัจจุบันผู้คนเริ่มให้ความสำคัญในการดูแลสุขภาพด้วยการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติมากขึ้น และมีแนวโน้มที่สมุนไพรอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้ในทาง การแพทย์ เนื่องจากมีข้อมูลการศึกษาวิจัยพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ โดยการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ และคิดค้นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากสมุนไพรอย่างแพร่หลายมากขึ้น (Oluyeye and Adelabu, 2010) อย่างไรก็ตามสิ่งสำคัญของการผลิตยาหรือผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากพืชสมุนไพรควรต้องคำนึงถึงวิธีการเตรียมสมุนไพรในขั้นตอนการผลิต ได้แก่ การเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การทำให้แห้ง การแยกสิ่งปลอมปน การบรรจุหีบห่อ และการเก็บรักษา ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงต่อปริมาณและคุณภาพของยาสมุนไพร เพื่อรักษาคุณภาพของสารสำคัญซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ (วันดี, 2534)

โดยทั่วไปบริเวณผิวหนังของสุนัขสามารถพบเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ซึ่งในภาวะปกติไม่ก่อให้เกิดโรค (Hoffmann et al., 2014) เนื่องจากผิวหนังปกติมีสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลชีพเพราะมีลักษณะแห้งและมีเหงื่อซึ่งประกอบไปด้วยเกลือที่มีความเข้มข้นสูง รวมทั้งการขับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีคุณสมบัติทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นและสามารถฆ่าเชื้อโรคได้ แต่เมื่อผิวหนังได้รับบาดเจ็บ เช่น ถูกกัดหรือข่วนจากสัตว์ ถูกกระทบกระแทกจนทำให้เกิดบาดแผล หรือแผลจากการผ่าตัดซึ่งทำให้ผิวหนังอ่อนแอและอาจมีการติดเชื้อตามมาได้ ซึ่งการติดเชื้อที่ผิวหนังมักพบว่ามีสาเหตุเกิดจากเชื้อจุลชีพหลายชนิด เช่น *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S.*

pyogenes, *Clostridium tetani*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Proteus* sp., *E. coli* และ *Klebsiella* sp. เป็นต้น (อิสยา และพรทิพย์, 2553; Muthezhilan, et al., 2014)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงต่อแบคทีเรียประจำถิ่นในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. จากผิวหนังสุนัขและมือเจ้าของสุนัข ซึ่งปัจจุบันการเลี้ยงสุนัขค่อนข้างมีความใกล้ชิดกับมนุษย์มากขึ้น จึงมีโอกาที่จะเกิดการถ่ายทอดเชื้อโรคระหว่างกันได้โดยง่าย ซึ่งอาจเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขตามมาได้ ผลการศึกษาดังกล่าวอาจนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบใบมะเขือพวงในการรักษาการติดเชื้อที่ผิวหนังสุนัขได้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

แหล่งที่มาของใบมะเขือพวง

ใบมะเขือพวงที่ใช้ในการวิจัยเก็บจากต้นมะเขือพวงที่ขึ้นอยู่ตามธรรมชาติในเขตพื้นที่ ตำบลและ อำเภอกู่ซาง จังหวัดน่าน ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2554 และได้รับการรับรองเอกลักษณ์ โดยสำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ประเทศไทย (รหัส BKF 186114)

การเตรียมสารสกัดหยาบใบมะเขือพวง

นำใบมะเขือพวงมาทำความสะอาด แล้วตากให้แห้งในที่ร่มประมาณ 1 สัปดาห์ นำมาปั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ โดยเครื่องปั่นเอนกประสงค์ ที่ความเร็ว 20,000 รอบ/วินาที จากนั้นนำผงใบมะเขือพวงแช่ใน 95 % เอทานอล (อัตราส่วน 1:10) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ กรองแยกสารสกัดออกจากผงใบมะเขือพวงด้วยสำลี และกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman

No.1) ตามลำดับ นำสารสกัดที่ได้เข้าสู่ขั้นตอนการระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator N-1001: EYELA®) จากนั้นเก็บสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงที่ระเหยตัวทำละลายไว้ในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

การเตรียมสารละลายสารสกัดหยาบใบมะเขือพวง

นำสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส มาละลายใน 1% phosphate buffer saline (PBS) อัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/วินาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อแยกตะกอนที่อาจตกค้างอยู่ออกไป แล้วนำส่วนของ supernatant มาใช้ในการทดสอบกับแบคทีเรีย (ฉัฐกาญจน์, 2557)

แหล่งที่มาของเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างแบคทีเรียเก็บจากผิวหนังสุนัขที่มีสุขภาพดีที่เข้ารับบริการโปรแกรมการดูแลสุขภาพจากโครงการสัตว์เลี้ยงสุขภาพดี คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

วิธีการเก็บเชื้อจากสุนัขโดยใช้สำลีพันปลายไม้ปราศจากเชื้อป้ายผิวหนังสุนัขบริเวณจมูก ปาก และหัว และเก็บตัวอย่างจากมือเจ้าของสุนัขโดยล้างมือให้สะอาดก่อนที่จะสัมผัสสุนัขบริเวณจมูก ปาก และหัว จากนั้นใช้สำลีปราศจากเชื้อพันปลายไม้ป้ายบริเวณมือเจ้าของสุนัขทันทีหลังจากการสัมผัสสุนัข (ใบอนุญาตใช้สัตว์ทดลองเลขที่ ACKU 01557)

การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียเบื้องต้น

นำแบคทีเรียที่ได้จากสุนัขสุขภาพดีและเจ้าของสุนัขจำนวน 18 คู่ โดยเก็บจากผิวหนังสุนัขบริเวณจมูก 18 ตัวอย่าง บริเวณปาก 18 ตัวอย่าง และบริเวณหัว 18 ตัวอย่าง และมือเจ้าของ 18

ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 72 ตัวอย่าง มาตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Davis et al. (2014) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ จุ่มแช่สำลีพันปลายไม้ใน stuart transport medium และนำไปเพาะเชื้อในห้องปฏิบัติการภายใน 8 ชั่วโมง แล้วจุ่มลงใน buffered peptone water (BPW) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วดูดเชื้อที่ขึ้นใน BPW ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด soybean casein digest medium ที่มี 7.5% NaCl บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ขึ้นมาเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด mannitol salt agar หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วจึงเลือกโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Staphylococcus* spp. มาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด nutrient agar เพื่อนำมาย้อมสีแกรม ทดสอบโคแอกกูเลส (coagulase test) และคาตาเลส (catalase test) โดยเชื้อที่ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม และให้ผลบวกต่อการทดสอบคาตาเลสจะถูกเลือกเพื่อทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป (วัชรินทร์ และคณะ, 2553)

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Staphylococcus* spp.

เลือกเฉพาะแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้าย *Staphylococcus* spp. ซึ่งได้ตัวอย่างแบคทีเรียจากผิวหนังสุนัขบริเวณจมูก 12 ตัวอย่าง บริเวณปาก 14 ตัวอย่าง และบริเวณหัว 13 ตัวอย่าง และมือเจ้าของ 18 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 57 ตัวอย่าง นำมาจำแนกชนิดในระดับสกุลและสปีชีส์ โดยใช้ชุดตรวจแบบสำเร็จรูป Api® 20 staph (API BioMerieux; France) ซึ่งมีทั้งหมด 20 ช่อง ภายในแต่ละช่องบรรจุซับสเตรทที่เป็นตัวบ่งชี้ชนิดของเชื้อซึ่งอยู่ในรูปแบบ

แห้ง ประกอบด้วย negative control, D- glucose, D-fructose, D-mannose, D-maltose, D-lactose, D-trehalose, D-mannitol, xylitol, D-melibiose, nitrate de potassium, β -naphtyl phosphate, sodium pyruvate, D-raffinose, D-xylose, D-saccharose, methyl α D- glucopyranoside, N-acetyl-glucosamine, L-arginine และ urease เพื่อทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ทางชีวเคมี โดยมีขั้นตอนดังนี้ เชื้อเชื้อจาก stock มา 1 โคโลนี แล้วนำมา streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Luria bertani's rich agar: (LB agar) นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาเตรียมสารละลายเชื้อโดยละลายแบคทีเรียใน sterile liquid paraffin ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No 0.5 จากนั้นดูดสารละลายเชื้อใส่ลงในช่องต่างๆ ของแถบ api แล้วนำมาใส่ภาชนะที่มีน้ำกลั่นปิดฝา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล จากนั้นนำตัวเลขที่อ่านค่าได้จากชุดตรวจแบบสำเร็จรูปไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม apiweb™

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration: MIC) และหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) ของสารสกัดหยาบไ้มะเขือพวง

นำแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Staphylococcus* spp. มาหาค่า MIC ตามวิธีของ Hutru and Bulet (1997) โดยแบคทีเรียที่นำมาทดสอบต้องอยู่ในระยะที่เซลล์สามารถเจริญหรือแบ่งเซลล์ได้ โดยทั่วไปจะใช้เชื้อที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง โดยเชื้อจาก stock มา 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Luria bertani's rich

medium: (LB broth) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้ใส่ลงใน 1% PBS ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำซ้ำ 4 ครั้ง โดยดัดแปลงจากวิธีของ Bradford et al. (2008) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ค่าความขุ่นที่ $OD_{600\text{ nm}} = 0.1 - 0.2$ แล้วปรับความเข้มข้น (100 เท่า) และเจือจางด้วย Poor broth medium: (PB broth) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD_{600\text{ nm}}$ ให้อยู่ในช่วง 0.001 – 0.002 โดยความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้คือ 1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียใน microtiter plate 96-well มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- (1) เติม PB broth 200 ไมโครลิตร ลงในแถวที่ 12 หลุม A-H เพื่อใช้เป็น negative control
- (2) เติม 1%PBS 100 ไมโครลิตร ลงในแถวที่ 1 หลุม A-H เพื่อใช้เป็น solvent control
- (3) เติม PB broth 100 ไมโครลิตร ลงในแถวที่ 2-11 หลุม A เพื่อใช้เป็น positive control
- (4) เติม PB broth 100 ไมโครลิตร ลงในแถวที่ 2-11 ในหลุม H แล้วเติมสารสกัดหยาบไ้มะเขือพวง 100 ไมโครลิตร ลงในแถวที่ 2 แล้วทำ 2-fold serial dilution จนถึงแถวที่ 11 ให้ดูดสารละลายทิ้งไป และเติม PB broth 100 ไมโครลิตร ลงในแถวที่ 2-11 ในหลุม H อีกครั้ง เพื่อใช้เป็น background สารสกัดจากหยาบไ้มะเขือพวง ซึ่งมีทั้งหมด 10 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 250 mg/ml, 125 mg/ml, 62.5 mg/ml, 31.25 mg/ml, 15.63 mg/ml, 7.81 mg/ml, 3.91 mg/ml, 1.95 mg/ml, 0.98 mg/ml, 0.49 mg/ml ตามลำดับ

(5) เติม PB broth 100 ไมโครลิตร ลงในแถว ที่ 2-11 หลุม B-G จากนั้นเติมสารสกัดหยาบใบมะเขือพวง 100 ไมโครลิตร ในแถวที่ 2 ของหลุม B-G แล้วทำ 2-fold serial dilution จนถึงแถวที่ 11 ให้ดูการละลายทิ้งไป ซึ่งมี 10 ระดับความเข้มข้น เท่ากับแถว background (แถวที่ 2-11 หลุม H) เพื่อใช้เป็นกลุ่มทดสอบ

(6) เติมสารละลายแบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร ในแถวที่ 1-11 ของหลุม A-G โดยสารละลายในแต่ละหลุมมีปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วเติม p-Iodonitro tetrazolium chloride: INT (Sigma-Aldrich, USA) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย ลงไปทุกหลุมๆ ละ 40 ไมโครลิตร (0.2 mg/ml) (Elof, 1998) นำไปบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที แล้วอ่านผล โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายในแต่ละหลุมของกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม หากพบว่าสารละลายในหลุมใดเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือม่วง แสดงว่ายังคงมีแบคทีเรียเจริญเติบโตอยู่ ดังนั้นสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงที่ความเข้มข้นในหลุมดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ ส่วนหลุมที่ไม่พบการเปลี่ยนสีของสารละลาย แสดงผลว่าสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ ดังนั้นสารละลายในหลุมใดของกลุ่มทดลองที่ไม่พบการเปลี่ยนสีดังกล่าวเป็นหลุมแรกจึงอ่านผลเป็นค่า MIC แล้วบันทึกผลการทดลอง

จากนั้นหาค่า MBC โดยเลือกสารละลายจาก microtiter plate 96-well มา 3 ความเข้มข้น ได้แก่ สารละลายที่ให้ค่า MIC สารละลายที่ให้ค่า MIC ต่ำ (MIC^{-1}) และสูง (MIC^{+1}) (MIC^{+2}) เพื่อนำมา streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LB agar และนำไป

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลการทดลอง โดยค่าความเข้มข้นของสารละลายจากหลุมใดที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อคือค่า MBC

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการสกัดสารสกัดหยาบใบมะเขือพวง โดยใช้ 95% เอทานอล เป็นตัวทำละลาย แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ได้ปริมาณสารสกัดหยาบ โดยคิดเป็นร้อยละ 9 (% yield) ของน้ำหนักสารสกัดหยาบเทียบกับน้ำหนักผงแห้งของใบมะเขือพวง

จากผลการทดสอบแบคทีเรียที่เก็บจากผิวหนังสุนัขบริเวณจมูก 12 ตัวอย่าง บริเวณปาก 14 ตัวอย่าง และบริเวณหัว 13 ตัวอย่าง และมือเจ้าของ 18 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 57 ตัวอย่าง นำมาเพาะเชื้อเพื่อแยกชนิดโดยเลือกเฉพาะเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีคล้าย *Staphylococcus* spp. และนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อในระดับสกุลและสปีชีส์ แล้วอ่านผลและนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม apiweb™ stand alone V 1.2.1 เพื่อแยกชนิดของเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. (Marples and Richardson, 1982) พบว่าเป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ทั้งหมดจำนวน 15 ตัวอย่าง โดยแยกเป็นเชื้อที่เก็บจากผิวหนังสุนัขบริเวณจมูก 3 ตัวอย่าง บริเวณปาก 4 ตัวอย่าง และบริเวณหัว 3 ตัวอย่าง และมือเจ้าของ 3 ตัวอย่าง และสามารถจำแนกเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. sciuri* และ *S. chromogenes* (ตารางที่ 1) อ่านค่าโดยตัวเลขที่ได้จากชุดตรวจทางชีวเคมีแบบสำเร็จรูป แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม apiweb™ stand alone V 1.2.1 สามารถ

ใช่ง่าย และมีความจำเพาะในการตรวจสูง โดยการอ่านค่าจาก % identification เพื่อแยกชนิดของเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ซึ่งเป็นค่าเฉพาะเนื่องจากโปรแกรมนี้ได้ทำการทดสอบและรวบรวมสายพันธุ์และสายพันธุ์ของต้นกำเนิดต่างๆ ที่ถูกรวมอยู่ในฐานข้อมูล ซึ่งมีความแม่นยำในการระบุชนิดของเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ได้ถึง 85-90% (Kloos and Wolfshohl, 1980) ซึ่งเป็นค่าทางชีวเคมีเบื้องต้น ถ้าให้ค่าสูงก็จะมีแนวโน้มเป็นเชื้อชนิดนั้น ๆ แต่ทั้งนี้การเก็บจากบริเวณอวัยวะส่วนต่างๆ ของสุนัขและมือเจ้าของ เมื่อนำมาทดสอบเชื้อบางตัวอาจจะทำปฏิกิริยาโคแอกกูเลสและคาตาเลส ที่ต่างกันจึงส่งผลทำให้ค่า % identification แตกต่างกันได้ จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาใช้ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC และ MBC กับสารสกัดหยาบใบมะเขือพวง โดยทำการทดสอบ 6 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบมะเขือพวง และพบว่าสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิดได้ โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 3.91-31.25, 7.18, 31.25 และ 3.91 mg/ml ตามลำดับ และมีค่า MBC อยู่ระหว่าง 7.18-31.25, 15.63-31.25, 62.5 และ 3.91 mg/ml ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อ *S. chromogenes* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 3.91 mg/ml ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Naimon et al. (2015) ซึ่งได้ทดสอบสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงที่สกัดด้วย 95% เอทานอลกับเชื้อมาตรฐานซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus* spp. ได้แก่ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบ

มะเขือพวงมีผลยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียดังกล่าวมีความแตกต่างกัน โดยความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงที่สามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดในงานวิจัยนี้เท่ากับ 3.91-31.25 mg/ml และ 7.18-31.25 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งมีค่าในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ต่ำกว่าและสูงกว่าค่าที่ศึกษาโดย Naimon et al. (2015) ซึ่งมีค่าเข้มข้นที่ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 15.63 mg/ml อย่างไรก็ตาม เชื้อ *S. aureus* ที่เก็บจากมือเจ้าของสุนัขมีความเข้มข้นในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่สูงกว่า (31.25 mg/ml) ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงในการยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียที่แตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากแหล่งที่มาของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบมาจากแหล่งที่แตกต่างกัน รวมถึงปริมาณและคุณภาพของพืชเคมีในสารสกัดหยาบที่ใช้ในแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันด้วยสารต่างๆ อาทิ phenolic compounds, terpenoids, saponins, alkaloids และ flavonoids ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงมีผลยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียได้ (Arumugam et al., 2016; Naimon et al., 2015; Thenmozhi and Mahadeva (2012) สารพฤษเคมีดังกล่าวยังพบเป็นส่วนประกอบในพืชต่างๆ หลายชนิด ดังตัวอย่างจากการศึกษาของ Arunkumar and Mulhusevram (2009) พบว่าสารสกัดใบว่านหางจระเข้ซึ่งมีส่วนประกอบของสารในกลุ่ม tannin, saponin, flavonoids และ terpenoid มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* ที่ก่อโรคทางคลินิกได้ และการศึกษาโดย Uma (2011) พบว่าสารสกัดหยาบใบเนียมหูเสือ (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. พบสารกลุ่ม

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงต่อเชื้อแบคทีเรีย

Sample No.	Name of bacteria	Identification (%)	Source of bacterial isolation		MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
			Human/Dog	Area		
1	<i>S. aureus</i>	88.4	Dog	Mouth	3.91	15.63
2	<i>S. aureus</i>	97.7	Dog	Head	7.18	15.63
3	<i>S. aureus</i>	96.0	Dog	Nasal	7.18	7.18
4	<i>S. aureus</i>	88.4	Human	Hand	31.25	31.25
5	<i>S. epidermidis</i>	97.1	Dog	Head	7.18	15.63
6	<i>S. epidermidis</i>	95.7	Dog	Nasal	7.18	31.25
7	<i>S. epidermidis</i>	92.8	Human	Hand	7.18	15.63
8	<i>S. sciuri</i>	90.6	Dog	Head	31.25	62.5
9	<i>S. chromogenes</i>	89.7	Dog	Mouth	3.91	3.91
10	<i>S. chromogenes</i>	89.7	Dog	Mouth	3.91	3.91
11	<i>S. chromogenes</i>	89.7	Dog	Mouth	3.91	3.91
12	<i>S. chromogenes</i>	89.7	Dog	Nasal	3.91	3.91
13	<i>S. chromogenes</i>	89.7	Human	Hand	3.91	3.91

หมายเหตุ: อ่านผลและนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม apiweb™ stand alone V 1.2.1 เพื่อแยกชนิดของเชื้อ

phenolic compounds และ terpenoids เป็นองค์ประกอบซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Gupta et al., 2011; Daglia, 2012)

ปัจจุบันพบว่ามีการใช้พืชสมุนไพรเป็นตัวเลือกสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ หรือนำมาใช้ประโยชน์ในการฆ่าแบคทีเรียร่วมกับยาแผนปัจจุบัน (Tanaka et al., 2002; Chen et al., 2005) เนื่องจากปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะเริ่มพบมากขึ้น นอกจากนี้พฤติกรรมการเลี้ยงสุนัขในยุคปัจจุบันที่เจ้าของค่อนข้างมีความใกล้ชิดกับสุนัขมากขึ้น หากสุนัขหรือคนเกิดบาดแผลบริเวณผิวหนังโอกาสที่เชื้อประจำถิ่นที่มีอยู่บริเวณผิวหนังปกติอาจก่อความรุนแรงได้ง่ายขึ้น และอาจถ่ายทอดเชื้อไปมาระหว่างสุนัขและ

เจ้าของได้หากการรักษาสุขอนามัยไม่ดีพอ ซึ่งผิวหนังของสุนัขบริเวณจมูก ปากและหัวมักเป็นบริเวณที่ได้รับการสัมผัสจากมือของเจ้าของ และผลการทดสอบโดยการเก็บตัวอย่างเชื้อแล้วนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์นั้น พบว่าเชื้อที่เก็บจากผิวหนังของสุนัขบริเวณจมูก ปากและหัว และมือเจ้าของสุนัขมีความสัมพันธ์กัน เนื่องจากผิวหนังบริเวณดังกล่าวเป็นตำแหน่งที่สุนัขและคนมีโอกาสสัมผัสกันค่อนข้างบ่อยนั่นเองฤทธิ์ของสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ที่สามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียดังผลการทดลองที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นอาจนำมาต่อยอดพัฒนาสารสกัดหยาบใบมะเขือพวงให้อยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรเพื่อใช้สำหรับ

ทาบรเวณผวนนงหรือการรกษาการตดเชอแบคทเรรีย
ในบาดแผลของคณและสัฒวโนนาคดได

สรุปล

จากผลการทดสอบสารสกดทยาบใบมะเชอ
พวงพบวามีศัภยาพในการยับยั้งและฆ่าแบคทเรรียใน
กลุ่ล *Staphylococcus* spp. ที่แยจากผวนนงสนุข
ที่มีสุภยาพดีและมือเจ้าของสนุขได โดยมฤทธีในการ
ยับยั้งและฆ่าเชอ *S. chromogenes* ไดดีที่สุด
อยางไรก็ตามประสิทธิภยาของสารพฤภษเคมิในสาร
สกดทยาบที่มีคณสมบัตดังกล่าวยงตองคานึงถึงปจจย
ตางๆ ที่อาจสงผลตอปริมาณและคณภยาของพฤภษ
เคมิในสารสกดทยาบ ไดแก ฤดูกาล พื้นที่การ
เพาะปลุก ชวงเวลาในการเก็บเกียว ระยะเวลาและ
การเก็บรกษาหลังกาการเก็บเกียว และการเลือกตัว
ทาละลาย ซึ่งตองคานึงคณสมบัตดานความคงตัวที่ดี
ไมมีพิษตกคาง สามารถละเหยออกได และวธีที่
เลือกใชในการสกดตด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ไดรับทุนสนับสนุนจาก โครงการวิจัย
ทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปิงบประมาณ 2557 และ
ขอขอบคณโครงการสัฒวเลียงสุภยาพดี คณะเทคนิก
การสัฒพพท์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร ที่เอื้อเพื่อ
หองปฏิบัติการ และ ผศ.สพ.ญ.ดร.ฉันทานันต มีขนอน
ที่ใหความอนุเคราะห์เชอแบคทเรรียที่ใช้สําหรับการ
ทดสอบในการวิจัยครั้งนี้ใหสำเร็จลุลวงไดด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

โชติอนันต และคณะ. 2550. รกษาโรคด้วยสมุนไพรร
ไกล้ตัว. กรุงเทพมหานคร: The Knowledge
Center. 485 หน้า.

ฉันทาญจัน นานมอญ. 2557. การศีกษาประสิทธิภยา
ของสารสกดทยาบใบมะเชอพวงตอการหาย
ของบาดแผลในหนูเมาส์. กรุงเทพมหานคร.
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยิมหนคร. 75 หน้า.

พรอมจิต ศรลัมพ์ และรุ่งระวี เต็มศิริ ฤภษกุล. 2553.
รสาสมุนไพรรกษาโรคเคมิ: ความเหมือนที่
แตกตาง. กรุงเทพมหานคร: พิมพที่หาง
หุนส่วล จํากัด สามลดา. 92 หน้า.

วชิรณทร รังสีภานูรัตน, อิศรา จันทรวิธานุชิต, พร
ทิภย์ พิงมวง, สมหญิง งามอรุเลศ และสมล
รัตน ชวงษ์วัฒนะ. 2553.การวิจัยยโรคตด
เชอ แบ ค ท เร รีย ทา ง ก า ร พ พ ท ย์ .
กรุงเทพมหานคร: บริษัท วิ.พรันท์. 344
หน้า.

วันดี ภฤษณพนธ์. 2534. ยาและผลิดภณตจาก
ธรรมชาติ: การเตรียมยาสมุนไพรรเพื่อการค้า.
กรุงเทพมหานคร: สำนัก พิม พ
มหาวิทยาลัยมหิดล. 475 หน้า.

Agrawal, A. D., P. P. Bajpei, A. A. Patil,
and S.R. Bavaskar. 2010. *Solanum*
Torvum SW. A Phytopharmacological
review. Shree Sureshdada Jain
Pharmaceutical Education and
Research Center, Jamner, Tal: Jamner,
Dist: - Jalgaon, State: - Maharashtra.
Der Pharmacia Lettre. 2(4): 403-407.

Ajaiyeoba, E. O. 1999. Comparative
phytochemical and antimicrobial
studies of *Solanum macrocarpum* and
Solanum torvum leaves. Fitoterapi.
70: 184 -186.

- Arif, M., and S. Fareed. 2011. Pharmacognostical studies and evaluation of total phenolic and flavonoid contents of traditionally utilized fruits of *Solanum torvum* SW. Indian J. Nat. Prod. Resour. 2(2): 218-224.
- Arthan, D., J. Svasti, P. Kittakoop, D. Pittayakhachonwut, M. Tanticharoen, and Y. Thebtaranonth. 2002. Antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum*. Phytochemistry. 59(4): 459-463.
- Arumugam, G., M. K. Swamy, and U. R. Sinniah. 2016. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. MDPI. Molecules 2016, 21, 369. [Online] Available: <http://www.mdpi.com/journal/molecules>
- Arunkumar, S. and M. Mulhuseelvam. 2009. Analysis of Phytochemical Constituents and Antimicrobial Activities of *Aloe vera* L. Against Clinical Pathogens. World J. Agric. Sci. 5(5): 572-576.
- Bari, M. A., W. Islam, A. R. Khan, and A. Mandal. 2010. Antibacterial and Antifungal of *Solanum torvum* (Solanaceae). Int. J. Agric. Biol. 12(3):386-390.
- Bradford, S.A., Tazehkand, S.S., Torkzaban, S. and Walker S.L. 2008. Cell Preparation Methods Influence *Escherichia coli* D12g Surface Chemistry and Transport in Saturated Sand. J. Environ. Qual. 37:2108-2115.
- Chah, K. F., K. N. Muko, and S. I. Oboegbulem. 2000. Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of *Solanum torvum* Fruit. Fitoterapia. 71:187-189.
- Chen, C. J., Y. C. Huang, C. H. Chiu, L. H. Su and T. Y. Lin. 2005. Clinical features and genotyping analysis of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Taiwanese children. Pediatr. Infect. dis. J.24: 40-45.
- Daglia, M. 2012. Polyphenols as Antimicrobial Agents. Curr Opin Biotech. 23: 174-181.
- Davis, J. A., C. R. Jackson, P. J. Fedorka-Cray, J. B. Barrett, J. H. Brousse, J. Gustafson, and J. M. Kucher. 2014. Carriage of Methicillin-resistant *Staphylococci* by Healthy Companion Animals in the US. Letters in Applied Microbiology. 59: 1-8.
- Elof, J. N. 1998. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Med.* 64: 711-713.

- Gupta, N., G. Saxena and S.S.Kalra. 2011. Antimicrobial activity pattern of certain terpenoids. Int. J. Pharm. Bio. Sci. 2: 87-91.
- Hetru, C. and P. Bulet. 1997. Strategies for the Isolation and Characterization of Antimicrobial Peptides of Invertebrates. Methods in Molecular Biology. W. M. Shafer, Humana Press Inc., Totowa. J. Antimicrob. Chemother. 78: 35-49.
- Hoffmann, A. R., A. P. Patterson, A. Alison Diesel, S. D. Lawhon, H. J. Ly, C. E. Stephenson, J. J Mansell, J. M. Steiner, S. E. Dowd, T. Olivry, S. Jan, and J. S. Suchodolski. The Skin Microbiome in Healthy and Allergic Dogs. 2014. *PLOS ONE*. Available:<http://www.plosone.org>. January 2014 Vol. 9 Issue 1, e83197.
- Kala, C. P. 2005. Ethnomedicinal botany of the Apatani in the Eastern Himalayan region of India. Ethno. and Ethnomed. 1: 1-8.
- Kloos, W. E. and J. F. Wolfshohl. 1980. Identification of *Staphylococcus* Species with the API STAPH-IDENT System. J. Clin. Microbiol. Sept. 1982, p. 509-516. [Online]. Available: <http://www.asm.org/on> January 9, 2019 by guest.
- Lalitha, V., K. Raveesha, and B. Kiran. 2010. Antimicrobial activity of *Solanum torvum* Swart against important seed borne pathogens of padd. Iranica J. Energy & Environ. 1(2): 160-164.
- Marples, R. R. and J. F. Richardson. 1982. Evalution of a micromethod gallery (API Staph) for the identification of staphylococci and micrococci. J. Clin. Pathol. 1982;35: 650-656
- Mohan and Bhandare. 2012. Protetive Effect of *Solanum torvum* Against Testicular Toxicity in Male Winter Rat. Int. J. Pharm. Sci. 4(3): 188-192.
- Muthezhilan, R., N. Yogananth, Priyanka and A. H. Jaffar. 2012. Fatty Acid Composition and Antimicrobial Activity of *Solanum torvum* SW. J. Modern Biotechnol. 1(2): 75-78.
- Naimon, N., U. Pongchairerk, and A. Suebkhampet. 2015. Phytochemical Analysis and Antibacterial Activity of Ethanolic Leaf Extract of *Solanum torvum* Sw. Against Pathogenic Bacteria. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 49: 516-523.
- Ndebias, E. J., R. Kamgang, and B. N. Nkeh-Chungag. 2007. Analgesic and Anti-Inflammatory Properties of Queous Extract from Leaves of *Solanum torvum* (Solanaceae). Afr. J. Trad. CAM. 4(2): 240-244.

- Nithyadevi, J. and R. Sivakumar. 2015. Phytochemical Screening and GC-MS, FT-IR Analysis of Methanolic Extract Leaves of *Solanum Torvum* SW. *IJRSB*. 3(9): 61-66.
- Oluyeye, J. O. and D. M. Adelabu, D.M. 2010. Microbial Contamination of Some Hawked Herbal Products in Ado-Ekiti, Nigeria. *Continental J. Microbiology* 4: 8-14.
- Tanaka, H., M. Sato and S. Fujiwara. 2002. Antibacterial activity of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 228-489.
- Thenmozhi, A. and R. U. S. Mahadeva. 2012. Comparative free radical scavenging potentials of different parts of *Solanum torvum*. *Free Radicals and Antioxidants. SciBioMed.org and Phcog. Net.* 2(2): 24-29.
- Uma, M., S. Jothinayagi, S. Kumaravel, and P. Kalaiselvi. 2011. Of Determination Bioactive Components of *Plectranthus amboinicus* Lour by GC-MS Analysis. *N Y Sci J.* 2011: 48

