

ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากใบสะเดาอินเดีย
(*Azadirachta indica*) และใบสะเดาเหิม (*Azadirachta excelsa*): ทางเลือกจาก
ธรรมชาติสำหรับโรคเต้านมอักเสบในแพะ

Antimicrobial efficacy of crude leaf extracts from *Azadirachta indica* and
Azadirachta excelsa against *Staphylococcus aureus*: a natural alternative for
dairy goat mastitis

จิระศักดิ์ หิรัญพรพร, จารุณี เกษรพิกุล, สุรวัดน์ ชลอสนธิสกุล* และ ยุภา ปู่แดงอ่อน
Jeerasak Hiranyaphat, Charunee Kasornpikul, Surawat Chalorsuntisakul* and
Yupa Pootaengon

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี 76120
Faculty of Animal Sciences and Agricultural Technology, Silpakorn University, Phetchaburi Information Technology campus,
Phetchaburi, 76120

*Corresponding author: chalorsuntisaku_s@su.ac.th

Received: 16 June 2025; Revised: 23 October 2025; Accepted: 19 December 2025

บทคัดย่อ

การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมปศุสัตว์โดยเฉพาะในแพะนม ส่งผลให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย (Antimicrobial Resistance: AMR) อย่างรุนแรง ซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจมหาศาล ปัญหาด้านสุขภาพระดับโลกนี้เน้นย้ำถึงความจำเป็นเร่งด่วนในการค้นหาทางเลือกจากธรรมชาติที่ยั่งยืนและมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) เปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายต่างชนิดในการสกัดสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากใบสะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica*) และใบสะเดาเหิม (*Azadirachta excelsa*) และ 2) หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) ก่อโรค *S. aureus* ที่แยกได้จากแพะนม สารสกัดหยาบจากใบของพืชทั้งสองสายพันธุ์ถูกเตรียมด้วยตัวทำละลายสามชนิดคือ เอทานอล (C_2H_5OH) เฮกเซน (C_6H_{14}) และน้ำกลั่น (H_2O ; Distilled water) จากนั้นประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากแพะนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบด้วยเทคนิค Agar Well Diffusion เพื่อหาขนาดของโซนยับยั้ง (Inhibition Zones: IZ) และเทคนิค Broth Microdilution เพื่อกำหนดค่า MICs และ MBC ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบจากใบ *A. excelsa* ที่สกัดด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย IZ กว้างที่สุดถึง 2.45 ± 0.42 มม. ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากทั้งสองสายพันธุ์ที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำกลั่นมีค่า 7.81 มก./มล. ในขณะที่สารสกัดที่ใช้เฮกเซนมีค่า MIC ที่สูงกว่า (*A. indica* อยู่ที่ 31.25 มก./มล. และ *A. excelsa* อยู่ที่ 15.63 มก./มล.) อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบจากใบสะเดาทั้งสองสายพันธุ์ไม่ว่าจะสกัดด้วยตัวทำละลายใด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ได้อย่างมีนัยสำคัญ การวิเคราะห์ทางสถิติยืนยันความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ของค่า MIC และ MBC ระหว่างสายพันธุ์ของสะเดาและชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ การศึกษานี้ยืนยันถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแบบขึ้นกับความเข้มข้น (concentration-dependent efficacy) ของสารสกัดหยาบจากใบสะเดาทั้งสองชนิดต่อเชื้อ *S. aureus* ผลลัพธ์บ่งชี้ว่าสารประกอบทางธรรมชาติเหล่านี้มีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นทางเลือกแทนยาปฏิชีวนะในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปศุสัตว์ โดยเฉพาะโรคเต้านมอักเสบในแพะ

คำสำคัญ: สะเดาอินเดีย สะเดาเหิม ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โรคเต้านมอักเสบในแพะ

ABSTRACT

The widespread use of antibiotics in the livestock industry, particularly in dairy goats, has led to a severe problem of Antimicrobial Resistance (AMR), causing massive economic losses. This global health crisis underscores the urgent need for effective and sustainable natural alternatives. This research aimed to: 1) compare the efficacy of different solvents in extracting active compounds against *Staphylococcus aureus* from Indian neem (*Azadirachta indica*) leaves and Siamese neem (*Azadirachta excelsa*) leaves, and 2) determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against pathogenic *S. aureus* isolates from dairy goats. Crude leaf extracts from both plant species were prepared using three different solvents: ethanol (C₂H₅OH), hexane (C₆H₁₄), and distilled water (H₂O). The anti-*S. aureus* activity against isolates from goats with mastitis was evaluated using the Agar Well Diffusion technique to measure the Inhibition Zones (IZ), and the Broth Microdilution technique to determine the MICs and MBCs. The results demonstrated that the crude leaf extract of *A. excelsa* extracted with ethanol exhibited the best antibacterial activity, yielding the widest average IZ of 2.45 ± 0.42 mm. The MIC values for crude extracts from both species prepared with ethanol and distilled water were 7.81 mg/ml, while the hexane extracts showed higher MICs (*A. indica* at 31.25 mg/ml and *A. excelsa* at 15.63 mg/ml). Nonetheless, crude leaf extracts from both neem species, regardless of the solvent used, significantly inhibited the growth of *S. aureus*. Statistical analysis confirmed a significant difference ($P < 0.05$) in MIC and MBC values between the neem species and the type of solvent employed. This study confirms the concentration-dependent efficacy of crude leaf extracts from both neem species against *S. aureus*. The findings indicate that these natural compounds have the potential to be developed as alternatives to antibiotics for controlling pathogenic bacterial infections in livestock, particularly mastitis in dairy goats.

Keywords: *Azadirachta indica*, *Azadirachta excelsa*, Antibacterials, Goat mastitis

บทนำ

เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ได้รับการยอมรับว่าเป็นหนึ่งในเชื้อโรคก่อโรคที่สำคัญที่สุดในภาคปศุสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ที่ให้น้ำนม เช่น โคเนื้อและแพะนม (Romano et al., 2020) การติดเชื้อ *S. aureus* ในสัตว์เหล่านี้เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคเต้านมอักเสบ (mastitis) ซึ่งนำไปสู่การสูญเสียทางเศรษฐกิจที่ร้ายแรงต่ออุตสาหกรรมการเกษตรทั่วโลก เนื่องจากผลผลิตน้ำนมลดลง คุณภาพน้ำนมเสื่อมลง และค่าใช้จ่ายในการรักษาที่สูงขึ้น (De Lima et al., 2020) นอกเหนือจากการสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจแล้ว เชื้อ *S. aureus* ยังเป็นภัยคุกคามที่สำคัญต่อสุขภาพของประชาชน (Public Health Threat) โดยเป็นเชื้อที่สามารถปนเปื้อนสู่ น้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นมและที่สำคัญ คือ สามารถผลิตสารพิษชนิดต่าง ๆ ออกมาปนเปื้อนในอาหาร (Romano et al., 2020) กลไกทางพยาธิสภาพของเชื้อ *S. aureus* นั้นซับซ้อน โดยไม่เพียงแต่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในแพะนมและสัตว์อื่นเท่านั้น แต่ยังมีสามารถในการผลิตสารพิษหลายชนิด เช่น TSST-1 (Toxic Shock Syndrome Toxin-1), exfoliative toxins และ leukocidins สารพิษเหล่านี้ส่งผลโดยตรงต่อการทำลายระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่ติดเชื้อและส่งเสริมให้เชื้อมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ภายในต่อมน้ำนม ทำให้การรักษายากยิ่งขึ้น (Rainard et al., 2018; Aslantaş et al., 2020) ทั้งนี้เชื้อ *S. aureus* มีการพัฒนาความสามารถในการดื้อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial Resistance: AMR) โดยเชื้อ *S. aureus* เป็นสาเหตุสำคัญของโรค

ด้านมออีกเสบที่ตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะในระยะแรก แต่พบว่าปัจจุบันเชื่อมีการปรับตัวทางพันธุกรรมและพัฒนาความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่อง (De Lima et al., 2020) ปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมให้เกิดการปรับตัวนี้ ได้แก่ การจัดการฟาร์มที่ขาดสุขศาสตร์ที่เหมาะสม และการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดเดิมซ้ำ ๆ เป็นเวลานาน ซึ่งทำให้เกิดการคัดเลือกสายพันธุ์ตามธรรมชาติที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้เพิ่มขึ้น (Park and Foster, 2021) การเพิ่มขึ้นของสายพันธุ์ที่ต้านทานยาปฏิชีวนะ (Antibiotic-Resistant Strains) เหล่านี้เป็นประเด็นที่น่ากังวลอย่างยิ่ง เพราะอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ หากเชื้อดื้อยาแพร่กระจายผ่านห่วงโซ่อาหารหรือการสัมผัสโดยตรง (Park and Foster, 2021) นอกจากนี้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะยังเผชิญกับอุปสรรคสำคัญจากการที่เชื้อ *S. aureus* สามารถสร้างเซลล์ที่มีความคงทน (persisted cells) ในเนื้อเยื่อของสัตว์ที่ติดเชื้ได้ เซลล์เหล่านี้สามารถรอดพ้นจากการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะทั่วไป ทำให้เกิดความท้าทายอย่างมากในการจัดการสัตว์ที่ติดเชื้ เนื่องจากเซลล์คงทนเหล่านี้สามารถเริ่มต้นการขยายตัวและก่อให้เกิดการติดเชื้ซ้ำ (recurrent infection) ได้อีกครั้งเมื่อหยุดการรักษา (Peyrusson et al., 2020) จากความเสี่ยงของการดื้อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มสูงขึ้น ภาวะการสร้างเซลล์คงทนของเชื้ และความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสู่สาธารณะ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องแสวงหาทางเลือกในการบำบัดรักษาใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพและยั่งยืน เพื่อลดการพึ่งพายาปฏิชีวนะหลักในภาคปศุสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สารสกัดจากพืชที่มีศักยภาพด้านจุลชีพสูง ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้ *S. aureus* ในฟาร์มแพะนมอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะเป็นการลดโอกาสในการเกิดการติดเชื้แบบไม่แสดงอาการ (subclinical infection) ซึ่งมีรายงานความเสี่ยงสูงถึงร้อยละ 50 ในช่วงเวลาการผลิตน้ำนม (Michael et al., 2023) และปัจจัยอื่น ๆ เช่น การแยกลูกแรกเกิดจากแม่ในขณะที่ยังมีการสร้างน้ำมน้อย และขาดการฉีดวัคซีนป้องกันโรค (Michael et al., 2023)

ปัจจุบันสมุนไพรหลายชนิดได้รับการพิจารณาให้เป็นทางเลือกทดแทนยาปฏิชีวนะในการจัดการโรคติดเชื้ในสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica*) และสะเดาเทียม (*Azadirachta excelsa*) เป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง โดยเฉพาะสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในส่วนใบคือสารกลุ่ม Limonoids เช่น Nimbolide และ Gedunin ซึ่งมีรายงานการศึกษาอย่างกว้างขวางว่ามีคุณสมบัติในการต้านเชื้จุลชีพ โดยเฉพาะต่อเชื้แกรมบวก เช่น *S. aureus* ซึ่งแตกต่างจากสาร Azadirachtin ที่มักพบความเข้มข้นสูงในเมล็ด การใช้ส่วนใบจึงเป็นทางเลือกที่ปลอดภัยและเข้าถึงได้ง่าย การวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบสะเดาในประเทศไทยมีจำกัด และงานวิจัยส่วนใหญ่ยังขาดการเปรียบเทียบเชิงระบบเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด ที่จะดึงสารออกฤทธิ์ให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ทั้งนี้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) ได้รับความสนใจอย่างสูงในงานวิจัยเนื่องจากมีสารประกอบทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น การควบคุมมะเร็ง การต้านเชื้แบคทีเรีย การต้านเชื้ไวรัสและการต้านการอักเสบ (รภัสสา และคณะ, 2555) ด้วยเหตุนี้สะเดาจึงมักถูกขนานนามว่าเป็น “ต้นไม้มหัศจรรย์” (Miracle Tree) ในทางเภสัชวิทยา เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีที่ซับซ้อนและประโยชน์ที่หลากหลาย ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมากในงานวิจัยทางการเกษตรและปศุสัตว์ (Chen et al., 2018; Kharwar et al., 2020) สารสกัดหยาบจากต้นสะเดาแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้โรคหลายชนิด รวมถึงแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของวัณโรค (Srivastava et al., 2020; Wright et al., 2022) การศึกษาเฉพาะเจาะจงพบว่าสารสกัดหยาบจากใบสะเดาแสดงฤทธิ์ต้านเชื้แบคทีเรียที่รวดเร็ว โดยมีผลบวกต่อการทดสอบภายใน 30 นาทีต่อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ (Hemdan et al., 2023) และถูกนำมาใช้เป็นสารกันบูดตามธรรมชาติเพื่อควบคุมการเน่าเสียของเนื้อสัตว์ที่เกิดจากเชื้แบคทีเรีย โดยพบว่าสารสกัดสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้แบคทีเรียลงอย่างมีนัยสำคัญ (Del Serrone et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้ก่อโรคดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด โดยพบว่าสารสกัดจากสะเดาสามารถทำลายเชื้ได้ถึง 60% ภายใน 1 ชั่วโมง และทำลายทั้งหมดภายใน 8 ชั่วโมง (Del Serrone et al., 2015) ประสิทธิภาพของใบสะเดาในการแพทย์และการบริโภคเป็นผลมาจาก สารประกอบทางชีวภาพหลายชนิด (Hashim et al., 2021) สารประกอบสำคัญที่พบในใบสะเดาคือ Limonoids (tetranortriterpenoids) ซึ่งเป็นกลุ่มสำคัญที่สุดของสะเดา ตัวอย่างที่พบบ่อยในใบ

ได้แก่ nimbolide, gedunin, azadiradione, nimbin, nimbidin, salannin, nimbolinin, nimbolinin A and B สารเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติเป็น antimicrobial (Alzohairy, 2016; Rajendran et al., 2024) สารสกัดที่โดดเด่นที่สุดในใบสะเดาคือ nimbolide ซึ่งถูกศึกษากันมากในแง่ของฤทธิ์ต้านมะเร็งและต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Alzohairy, 2016; Rajendran et al., 2024) โดยทั่วไปคุณสมบัติของสารเหล่านี้ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต เมื่อใช้ในปริมาณที่จำกัดและมีการศึกษาพบว่าไม่มีความเป็นอันตรายและความเสี่ยงต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในสภาวะ in vivo ที่ได้รับสารสกัดหยาดจากสะเดา (Chen et al., 2018)

การศึกษาปัจจุบันจึงมุ่งเน้นไปที่การทบทวนสะเดาในฐานะสารรมยา สารกำจัดศัตรูพืชและสารควบคุมโรคสำหรับพืช ร่วมกับคุณสมบัติทางเคมีของสะเดาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Chassagne et al., 2021) ทั้งนี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากพืช (natural products: NPs) สามารถแบ่งตามประเภทได้เป็น 4 ประเภท ได้แก่ อัลคาลอยด์ (alkaloids), อนุพันธ์ฟีนอลิก (phenolic derivatives) เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) และสารเมตาบอไลต์ (metabolites) (Chassagne et al., 2021) และมีการพิจารณานิยามของสารต้านจุลชีพ (antimicrobial) ในที่นี้ว่าเป็นสารที่ฆ่าหรือจำกัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา ปรสิต และไวรัส หรือใช้คำว่าสารต้านเชื้อแบคทีเรียหรือยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะเมื่ออธิบายถึงสารที่ฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมักจะเน้นที่ค่าความเข้มข้นในการยับยั้งขั้นต่ำ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยค่า MIC หมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพที่ยับยั้งการเจริญเติบโตที่มองเห็นได้ของจุลินทรีย์ ด้วยปัญหาเชื้อดื้อยาที่เพิ่มขึ้นในอุตสาหกรรมปศุสัตว์ โดยเฉพาะการรักษาโรคเต้านมอักเสบในแพะที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะเติมเต็มช่องว่างทางความรู้ โดยการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์จากใบสะเดาทั้งสองสายพันธุ์ด้วยตัวทำละลายที่มีความมีความเข้มข้นต่างกัน เพื่อสร้างองค์ความรู้พื้นฐานในการพัฒนา สารสกัดหยาดจากใบสะเดาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกจากธรรมชาติสำหรับควบคุมและจัดการโรคเต้านมอักเสบในแพะต่อไป

การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลัก 1) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายต่างชนิด (เอทานอล เฮกเซน และน้ำกลั่น) ในการสกัดสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* จากใบสะเดาอินเดียและใบสะเดาเทียมที่แยกได้จากแพะนม และ 2) เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) และฆ่าเชื้อ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ก่อโรค *S. aureus* ด้วยสารสกัดหยาดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

1) การแยกเชื้อก่อโรคจากแพะป่วย: ประเมินอาการด้วยลักษณะทางกายภาพของเต้านมและที่เก็บน้ำนม สังเกตแพะนางที่อยู่ในช่วงให้น้ำนม และแม่แพะที่เพิ่งตกลูกและให้น้ำนมลูกแพะ จากนั้นคลำด้วยมือสวมถุงมือยาง ทำการคัดแยกแม่แพะตัวที่มีความผิดปกติของเต้านม เช่น แสดงอาการอักเสบของเต้านมที่ชัดเจน โดยจะพบว่ามีอาการแสดง อาทิเต้านมอักเสบเห็นได้ชัด เต้านมร้อนและบวมแดง เต้านมมีแผล เต้านมแห้งแฟบผิดปกติ มีก้อนเนื้อแข็งไม่สม่ำเสมอ หรือมีน้ำนมที่มีลักษณะผิดปกติจากน้ำนมปกติ เมื่อพบแล้วทำการคัดเลือกแยกไว้พร้อมทำสัญลักษณ์ (ดัดแปลงจากวิธีของธีรเจต และคณะ, 2564) นำแม่แพะที่คัดแยกไว้และแม่แพะที่สงสัยว่ามีลักษณะเต้านมอักเสบ แต่ไม่แสดงอาการให้เห็น มาทำการทดสอบด้วยน้ำยา California Mastitis Test (CMT) เมื่อน้ำยาทำปฏิกิริยากับน้ำนม จะเกิดความหนืดซึ่งจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนม ซึ่งจะพบมากในช่วงที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (Dohoo and Meek, 1982) ทำสัญลักษณ์แม่แพะทั้งหมดที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยน้ำยา CMT และเก็บตัวอย่างน้ำนมจากแม่แพะกลุ่มดังกล่าว

2) นำตัวอย่างน้ำนมที่เก็บได้ป้ายลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mannitol salt agar (MSA) และอาหาร Baird-Parker agar จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมงคัดเลือกโคโลนี ที่มีลักษณะคล้าย *Staphylococcus aureus* คัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะ typical colony หรือลักษณะ atypical colony มาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิด nutrient agar เพื่อทำการย้อมสีแกรมและทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ Coagulase test และ Catalase test ตามวิธีของ กิตติศักดิ์ และสุกมา (2550) โดยเชื้อ *S. aureus* คุณสมบัติติดสีแกรมบวก รูปปร่างกลมและให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี Coagulase test และ Catalase test โดยใช้เชื้อมาตรฐาน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ที่ได้รับอนุเคราะห์จาก ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี เป็นเชื้อควบคุมสำหรับการทดสอบดังกล่าว เพื่อยืนยันจากคัดแยกเชื้อก่อโรคจากนํ้ามที่ได้จากแม่แพะที่เป็นเต้านมอักเสบ เพื่อนำมาทดสอบกับสารสกัดหยาบจากใบสะเดา

3) นำใบสะเดาอินเดียและใบสะเดาเทียมมาล้างทำความสะอาด จากนั้นนำไปปั่นให้มีขนาดเล็กลง นำไปผึ่งลมให้แห้ง ใบสะเดาที่ทำให้แห้งแล้วถูกนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล (Semi-polar/Polar) เฮกเซน (Non-polar) และน้ำกลั่น (Polar) โดยใช้ สัดส่วน 1:10 (วัตถุดิบ 100 กรัม ต่อตัวทำละลาย 1,000 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วันโดยสกัดซ้ำ 3 ครั้ง นำสารสกัดหยาบมาเขย่าในเครื่องเขย่า เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบกรองด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรอง (Whatman™ No. 1) สารสกัดที่ได้จะนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) และคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (% Yield) ก่อนนำมาเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (Stock Solution)

4) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Broth Microdilution Method ดำเนินการตามมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) โดยมีการดัดแปลงจากงานวิจัยของ Nanasombat et al. (2009) เพื่อหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบ ในการทดลองนี้ได้ใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เป็นเชื้อควบคุม (Positive Control) และใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin เป็นสารควบคุม (Reference Antibiotic) สารสกัดหยาบจากสะเดาทั้งสองสายพันธุ์ใช้ที่ระดับความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63 และ 7.81 mg/ml ตามลำดับ

5) การทดสอบหาค่า MIC สารสกัดหยาบจากสะเดา โดยใช้วิธี Broth dilution ทำโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร Nutrient broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 (1.5×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) จากนั้น นำเชื้อมา 20 ไมโครลิตร ผสมสารสกัดหยาบจากสะเดา 60 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 120 ไมโครลิตรด้วยอาหาร Nutrient Broth ใส่ในจานทดลอง 96 หลุม โดยความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบจากสะเดาจะเท่ากับ 0.78 – 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจุลินทรีย์ที่ปราศจากสารสกัดหยาบ และตัวทำละลายของสารสกัดหยาบสะเดา จากนั้นนำจานหลุมไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Microplate reader ที่ OD₆₅₀ วิเคราะห์ค่า MIC จากความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสะเดาที่ใช้อ่านค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับตัวควบคุมที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีจุลินทรีย์ สำหรับหาค่า MBC ใช้หลอดเชื้อเชื้อจุ่มลงในแต่ละหลุมของจานหลุมทดสอบแล้วนำเชื้อมาเพาะลงบนอาหาร Nutrient agar นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการหาความเจริญเติบโตของเชื้อ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสะเดาที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโต จะเป็นค่า MBC ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ สำหรับการวิเคราะห์ ข้อมูลทางสถิติ ได้นำข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลอง Analysis of variance (ANOVA) ด้วยวิธี Tukey's test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ R

ผลการวิจัย

ผลการทดลอง พบว่า สารสกัดหยาบจากใบสะเดาอินเดีย (*A. indica*) มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ที่แยกจากนํ้ามแพะโดยผลการทดสอบ ค่า IZ ด้วยวิธี Agar well diffusion ของสารสกัดหยาบจากใบสะเดาด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล ความเข้มข้น 95% เฮกเซน และน้ำกลั่น พบว่ามีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* มากที่สุด โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของค่า inhibition zone เท่ากับ 2.45 ± 0.42 , 1.26 ± 0.23 , 1.63 ± 1.32 mm ตามลำดับ

และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าสารสกัดหยาบสะเดาอินเดียที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* จาก Table 1

Table 1 Zone of inhibition of Medicinal *Azadirachta indica* Extracts against *Staphylococcus aureus* of treatment

Treatment	Solvent			P-value	%CV
	Ethanol 95%	Hexane	Distilled Water		
1000 mg/ml	2.45±0.42	1.26±0.23	1.63±1.32	0.26 ^{ns}	45.70
500 mg/ml	1.71 ^a ±0.56	0.78 ^b ±0.15	0.58 ^b ±0.07	0.01 [*]	33.21
250 mg/ml	1.69 ^a ±0.34	1.85 ^a ±0.37	0.63 ^b ±0.00	<0.005 ^{**}	21.09
125 mg/ml	0.84±0.25	0.81±0.44	0.38±0.00	0.17 ^{ns}	43.22
62.50 mg/ml	0.46±0.14	0.40±0.22	0.31±0.05	0.53 ^{ns}	39.73
31.25 mg/ml	0.58 ^a ±0.07	0.28 ^b ±0.09	0.28 ^b ±0.09	<0.05 [*]	23.11
15.63 mg/ml	0.42±0.06	0.47±0.17	0.31±0.10	0.37 ^{ns}	31.49
7.81 mg/ml	0.31±0.05	0.40±0.22	0.34±0.05	0.74 ^{ns}	38.44
Gentamicin	2.26±0.00	2.17±0.15	2.08±0.15	0.29 ^{ns}	5.63

^{a, b} Different superscript letters in the same row indicate statistically significant differences at P < 0.05

จากผลการทดลอง Table 2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบสะเดาอินเดียที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล ความเข้มข้น 95% เฮกเซน พบว่าที่ระดับ 1000 mg/ml ให้ผลดีที่สุด ส่วนน้ำกลั่นให้ผลต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่า สารสกัดหยาบสะเดาอินเดียที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

Table 2 Zone of inhibition of Medicinal *Azadirachta excelsa* Extracts against *Staphylococcus aureus* of treatment diets

Treatment	Solvent			P-value	%CV
	Ethanol 95%	Hexane	Distilled Water		
1000 Mg/ml	2.99 ^a ±0.55	2.18 ^b ±0.39	0.96 ^c ±0.31	0.00 ^{**}	21.13
500 Mg/ml	2.54 ^a ±0.28	1.85 ^b ±0.37	0.58 ^c ±0.07	<0.005 ^{**}	16.54
250 Mg/ml	1.69 ^a ±0.34	1.85 ^a ±0.37	0.63 ^a ±0.00	<0.005 ^{**}	21.09
125 Mg/ml	1.07 ^a ±0.27	0.58 ^b ±0.07	0.58 ^b ±0.07	0.01 [*]	22.61
62.50Mg/ml	0.50±0.07	0.42±0.06	0.46±0.69	0.06 ^{ns}	14.57
31.25Mg/ml	0.38±0.11	0.76±0.37	0.31±0.05	0.10 ^{ns}	46.79
15.63Mg/ml	0.28 ^b ±0.09	1.32 ^a ±0.20	0.34 ^b ±0.50	<0.005 ^{**}	20.26
7.81 Mg/ml	0.31±0.05	0.43±0.18	0.31±0.05	0.40 ^{ns}	38.44
Gentamicin	2.18±0.31	2.18±0.31	2.17±0.15	0.99 ^{ns}	12.34

^{a, b} Different superscript letters in the same row indicate statistically significant differences at P<0.05

จากผลการทดลอง Table 3 ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดีที่สุดคือสารสกัดหยาบหยาบใบสะเดาอินเดียและใบสะเดาเทียมที่ใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอล 95% โดยมีค่า MIC เท่ากันคือ 7.81 mg/ml ส่วนการสกัดด้วยน้ำกลั่น ค่า MIC ของสะเดาอินเดีย มีค่า 7.81 mg/ml แตกต่างจากสะเดาเทียมที่ใช้การวิธีการเดียวกัน แต่มีค่า MIC 15.63 mg/ml

Table 3 Minimal inhibitory concentration (MIC) of *Azadirachta indica* and *Azadirachta excelsa* leaves extracted against pathogenic bacteria isolated from the goat

Plant Extract	Part used	MIC (mg/ml)		
		Ethanol 95%	Hexane	Distilled Water
<i>Azadirachta indica</i>	Leaves	7.81	31.25	7.81
<i>Azadirachta excelsa</i>	Leaves	7.81	15.63	15.63

จากผลการทดลอง Table 4 ความเข้มข้นสูงสุดที่สุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* 95% เฮกเซน และน้ำกลั่น พบว่าสารสกัดหยาบจากใบสะเดาอินเดียที่ใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอลและน้ำกลั่น มีค่า MBC เท่ากัน คือ 31.25 mg/ml ซึ่งเท่ากับกับสารสกัดหยาบจากใบสะเดาเทียมที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย สารสกัดหยาบจากใบสะเดาอินเดีย ที่ใช้ตัวทำละลายเป็น Hexane กับสารสกัดหยาบจากใบสะเดาเทียม ที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย มีค่า MBC เท่ากันคือ 62.25 mg/ml

Table 4 Minimal bactericidal concentration (MBC) of *Azadirachta indica* and *Azadirachta excelsa* leaves extract against pathogenic bacteria isolated from the goat

Plant Extract	Part used	MBC (mg/ml)		
		Ethanol 95%	Hexane	Distilled Water
<i>Azadirachta indica</i>	Leaves	31.25	62.25	31.25
<i>Azadirachta excelsa</i>	Leaves	62.25	31.25	31.25

การอภิปรายผล

การใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มเป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้สัตว์เลี้ยงของเกษตรกรดื้อยาและมีการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนม และเนื้อสัตว์เพื่อเป็นการลดการส่งต่อยาปฏิชีวนะสู่ผู้บริโภคและลดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย จึงมีการศึกษาสารประกอบจากพืชท้องถิ่นที่พบได้ง่ายมาทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ โรคเต้านมอักเสบที่พบเกิดจากการติดเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุด มักพบเชื้อมักจะอาศัยอยู่บริเวณเต้านมและผิวหนังของแพะโดยลักษณะคล้ายพวงอุ้ง (Crippa et al., 2024) ดังนั้นการเลือกใช้สารสกัดจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เป็นอันดับแรกก่อนการใช้ยาปฏิชีวนะจึงเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมในยุคปัจจุบัน ในการทดลองนี้พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากใบสะเดาอินเดียและใบสะเดาเทียมที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอล ในการสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำนมแพะที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ ใบสะเดาเมื่อผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายขั้วสูง (polar) พบว่าการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญ

ของเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 62.5 mg/ml และสำหรับเชื้อที่ดื้อยา การยับยั้งอยู่ที่ 125 mg/ml (Quelemes et al., 2015) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Alzohairy (2016) พบว่าสารสกัดที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และงานวิจัยของ Kaseke et al. (2023) ยืนยันว่าสะเดาเป็นหนึ่งในพืชที่มีศักยภาพสำหรับควบคุมโรคเห็บแมลง แต่ต้องการศึกษาปฏิกิริยาที่เสริมฤทธิ์กันภายในสารสกัดจากสะเดาและระหว่างสารประกอบสะเดากับยาปฏิชีวนะเพื่อศึกษากลไกที่นอกเหนือไปจากฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบเหล่านี้ จากการศึกษาแบบ in-vivo จากงานวิจัยของ Silvyana et al. (2022) ใช้ตัวทำละลายขั้วต่ำ (non-polar) ได้แก่ เฮกเซนในการสกัดสารประกอบจากใบสะเดาผลปรากฏว่ามีองค์ประกอบเป็น lipids, nonpolar terpenoids, hydrocarbons fatty acids และ limonoids ซึ่งมีฤทธิ์เฉพาะต่อเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสะเดาที่ใช้เฮกเซนและเอทานอลเป็นสารสกัด เมื่อเปรียบเทียบกับเฮกเซนให้ผลบวกลดน้อยกว่า polar solvents ทั้งนี้จากงานวิจัยของ Amutha et al., 2017 พบว่าวงใสของการยับยั้ง (inhibition zones) ต่อ *S. aureus* แสดงว่าสารสกัดหยาบจากใบสะเดาโดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย มีฤทธิ์ต้านเชื้อ (aqueous leaf extract) ให้ผลว่ามีการต่อต้านเชื้อ *Staphylococcus spp.* อย่างมีนัยสำคัญในระดับความเข้มข้นที่ค่อนข้างต่ำ (Akinduti et al., 2022)

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบสะเดาทั้งสองสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากแพะนม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารสกัดที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย (Semi-polar/Polar) แสดงประสิทธิภาพดีที่สุด โดยมีค่า MIC ต่ำที่สุดที่ 7.81 mg/ml สำหรับทั้ง *A. indica* และ *A. excelsa* การที่สารสกัดเอทานอลมีประสิทธิภาพสูงที่สุด สอดคล้องกับคุณสมบัติทางเคมีของสารออกฤทธิ์หลักในใบสะเดา ซึ่งมักเป็นสารกลุ่ม Limonoids และ Phenolics ซึ่งละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วสูง/กึ่งขั้ว ประเด็นความมีขั้วของตัวทำละลาย (Polarity) จากการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อลดลงตามลำดับดังนี้: เอทานอล > น้ำกลั่น > เฮกเซน ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ในใบสะเดา เป็นสารที่มีความมีขั้ว (Polar compounds) มากกว่าสารที่ไม่มีขั้ว (Non-polar compounds) อย่างไรก็ตาม พบผลลัพธ์ที่น่าสนใจใน *A. excelsa* คือค่า MIC ในน้ำกลั่นและเฮกเซนมีค่าเท่ากันที่ 15.63 mg/ml ผลลัพธ์นี้แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ในใบ *A. excelsa* อาจมีองค์ประกอบที่ซับซ้อนกว่า (Complex chemical profile) โดยอาจมีสารออกฤทธิ์ที่ละลายได้ดีในทั้งตัวทำละลายมีขั้วสูง (น้ำกลั่น) และไม่มีขั้ว (เฮกเซน) เช่น กลุ่มลิพิด (Lipids), เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) หรือกรดไขมัน (Fatty acids) ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียเฉพาะสายพันธุ์ ซึ่งต่างจาก *A. indica* ที่แสดงให้เห็นการยับยั้งในน้ำกลั่นที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอล เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่น ผลการศึกษาค่า MIC/MBC มีความผันแปร ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์พืช สภาพภูมิอากาศที่ปลูก วิธีการสกัด และความไวของเชื้อ *S. aureus* แต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้ ค่า MBC ที่ใกล้เคียงกับค่า MIC ในสารสกัดเอทานอล แสดงให้เห็นว่าสารสกัดมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ (Bactericidal) อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการรักษาโรคติดเชื้อ

บทสรุป

ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบสะเดาอินเดียและใบสะเดาเทียมในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 95% เฮกเซน และน้ำกลั่น พบว่าสารสกัดหยาบจากใบสะเดาอินเดียและสะเดาเทียมที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอล 95% ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ให้ผลดีที่สุด โดยมีค่าบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 2.45 ± 0.42 และ 2.99 ± 0.55 mm ตามลำดับ และมีค่า MBC เท่ากับ 31.25 และ 62.50 mg/ml ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบสะเดาอินเดียและใบสะเดาเทียมมีประสิทธิภาพที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในการรักษาโรคเห็บแมลงอีกเสบ ลดจำนวนการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มเลี้ยงแพะนมและอุตสาหกรรมน่านมแพะต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งถัดไป ควรมีการศึกษาแบบ *in vivo* ถึงแม้ว่าสารสกัดหยาบจากใบสะเดาจะแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ได้ดีในหลอดทดลอง (*in vitro*) แต่ก่อนการนำไปใช้ในสัตว์ (*in vivo*) เพื่อรักษาโรคเต้านมอักเสบโดยตรง จำเป็นต้องมีการศึกษาความเป็นพิษ (Toxicology and Safety Study) อย่างเข้มงวดต่อเซลล์เต้านมและต่อแพะ เพื่อประเมินความปลอดภัยในการใช้จริง และการพัฒนาสูตรตำรับที่เหมาะสมสำหรับการใช้ภายในเต้านม (Intramammary infusion formulation) เพื่อให้มั่นใจในความคงตัวของสารออกฤทธิ์ ประสิทธิภาพสูงสุด และความปลอดภัยสูงสุดของสัตว์

เอกสารอ้างอิง

- กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร, และสุกมา สามงามนิม. 2550. การตรวจวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบและคุณภาพน้ำนมดิบทางห้องปฏิบัติการ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- ธีรเจต เลหาเสถียร, ภาวัต เสรีตระกูล, กนกอร นนท์ศิริ, และศิริชัย เอี่ยมมุสิก. 2564. ความชุกของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่แยกได้จากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบในจังหวัดเพชรบุรี. เกษตร 50(2): 409–418.
- รภัสสา จันทาพร, อภิเดช แสงดี, และพนิดา อริมตสี. 2555. การวิจัยและพัฒนาสารสกัดธรรมชาติทดแทนสารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูในการผลิตมะละกออินทรีย์ของพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนกลาง. คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม, มหาสารคาม.
- Akinduti, P. A., H. F. Emoh-Robinson, Y. D. Obamoh-Triumphant, T. T. Obafemi, and T. T. Banjo. 2022. Antibacterial activities of plant leaf extracts against multi-antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* associated with skin and soft tissue infections. BMC Complement. Med. Ther. 22: 47.
- Alzohairy, M. A. 2016. Therapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2016: 7382506.
- Amutha, K., A. A. Kumar, and A. Godavari. 2017. Antibacterial effect of aqueous neem extract on bacterial isolates from mobile phones. Res. J. Pharm. Tech. 10: 501–507.
- Aslantaş, A. G., G. V. Tomás, B. V. Jorge, C. Benito, S. P. Angeles, C. M. Pilar, and C. Mónica. 2020. *Staphylococcus aureus* exotoxins and their detection in the dairy industry and mastitis. Toxins 12: 537.
- Chassagne, F., S. Tharanga, P. Gina, J. T. Lyles, D. Micah, M. Lewis, M. S. Akram, S. Sarah, R. F. Darya, and L. Q. Cassandra. 2021. A systematic review of plants with antibacterial activities: A taxonomic and phylogenetic perspective. Front. Pharmacol. 11: 586548.
- Chen, J., X. Fan, J. Zhu, L. Song, Z. Li, F. Lin, R. Yu, H. Xu, and J. Zi. 2018. Limonoids from seeds of *Azadirachta indica* A. Juss. and their cytotoxic activity. Acta Pharm. Sin. B 8: 639–644.
- Crippa, B. L., L. G. de Matos, F. N. Souza, and N. C. C. Silva. 2024. Non-*aureus* staphylococci and mammaliicocci (NASM): Their role in bovine mastitis and One Health. J. Dairy Res. 91: 1–13.
- de Lima, M. C., B. B. Mariana, M. S. Thalita, C. P. Richard, K. d. C. Laís, H. S. G. Samuel, L. d. C. Sanely, M. d. C. Mateus, and A. S. M. Maria. 2020. Profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from goat persistent mastitis before and after treatment with enrofloxacin. BMC Microbiol. 20: 127.
- Del Serrone, P., C. Toniolo, and M. Nicoletti. 2015. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) oil to tackle

- enteropathogenic *Escherichia coli*. Biomed. Res. Int. 2015: 343610.
- Dohoo, I. R., and A. H. Meek. 1982. Somatic cell count in bovine milk. Can. Vet. J. 23: 119–125.
- Hashim, N., A. Suhaila, S. H. Lili, R. G. Saidatul, and J. Rafidah. 2021. A study of neem leaves: Identification of method and solvent in extraction. Mater. Today Proc. 42: 217–221.
- Hemdan, B. A., A. Mostafa, M. M. Elbatany, A. M. EL-Feky, T. Paunova-Krasteva, S. Stoitsova, M. A. El-Liethy, G. E. El-Taweel, and M. A. Mraheil. 2023. Bioactive *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* leaves extracts with anti-SARS CoV-2 and antibacterial activities. PLoS One 18: e0282729.
- Kaseke, T. B., Z. Chikwambi, C. Gomo, A. B. Mashingaidze, and C. Murungweni. 2023. Antibacterial activity of medicinal plants on the management of mastitis in dairy cows: A systematic review. Vet. Med. Sci. 9: 2800–2819.
- Kharwar, R. N., K. S. Vijay, M. Ashish, K. Jitendra, K. S. Dheeraj, K. V. Satish, K. G. Surendra, K. Anuj, K. Nutan, R. Bharadwaj, and K. Souvik. 2020. Harnessing the phytotherapeutic treasure troves of the ancient medicinal plant *Azadirachta indica* (neem) and associated endophytic microorganisms. Planta Med. 86: 906–940.
- Michael, C. K., T. L. Daphne, G. C. V. Natalia, S. M. Vasia, P. Efthymia, and C. F. George. 2023. Longitudinal study of subclinical mastitis in sheep in Greece: An investigation into incidence risk, associations with milk quality and risk factors of the infection. Animals 13: 3295.
- Nanasombat, S., and N. Teckchuen. 2009. Antimicrobial antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. J. Med. Plant. Res. 3: 443–449.
- Park, S., and J. R. Foster. 2021. *Staphylococcus aureus* in agriculture: Lessons in evolution from a multispecies pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 34: e00182-20.
- Peyrusson, F., V. Hugo, K. N. Tjep, L. Rachel, S. Odile, J. Y. Coppée, W. Christiane, T. Tanel, and V. B. Françoise. 2020. Intracellular *Staphylococcus aureus* persists upon antibiotic exposure. Nat. Commun. 11: 2200.
- Quelemes, P. V., M. L. G. Perfeito, M. A. Guimarães, R. C. dos Santos, D. F. Lima, C. Nascimento, M. P. N. Silva, M. J. d. S. Soares, C. D. Ropke, P. Eaton, J. de Moraes, and J. R. S. A. Leite. 2015. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract on resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms. J. Ethnopharmacol. 175: 287–294.
- Rainard, P., G. Christophe, C. Thierry, F. Thierry, H. Christophe, R. Mickael, T. K. Gwenola, K. Zuzana, C. Anne, B. Florence, R. R. Gilbert, and M. Patrice. 2018. Host factors determine the evolution of infection with *Staphylococcus aureus* to gangrenous mastitis in goats. Vet. Res. 49: 72.
- Rajendran, P., K. Renu, B. M. Abdallah, E. M. Ali, V. P. Veeraraghavan, K. Sivalingam, Y. Rustagi, S. A. Abdelsalam, R. I. H. Ibrahim, and S. Y. Al-Ramadan. 2024. Nimbolide: Promising agent for prevention and treatment of chronic diseases (recent update). Pharmaceuticals (Basel). 17(3): 353. (PMCID: PMC10989234).
- Romano, A., A. Gazzola, V. Bianchini, C. Cortimiglia, A. M. Maisano, P. Cremonesi, H. U. Graber, F. Vezzoli, and M. Luini. 2020. *Staphylococcus aureus* from goats are genetically heterogeneous and distinct to bovine ones. Front. Vet. Sci. 7: 628.

- Silvyana, A. E., R. Rahmasari, and B. Elya. 2022. *Azadirachta indica* hexane extract: Potent antibacterial activity against *Propionibacterium acne* and identification of its chemicals content. *Pharmacogn. J.* 14: 489–496.
- Srivastava, S. K., B. Agrawal, A. Kumar, and A. Pandey. 2020. Phytochemicals of *Azadirachta indica* source of active medicinal constituent used for cure of various diseases: A review. *J. Sci. Res.* 64(1): 385–390.
- Wright, M. R., H. W. Ian, C. B. Faith, W. Hannah, and D. S. Merrell. 2022. In vitro antibacterial activity of nimbolide against *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacol.* 285: 114828.
- Yerima, M. B., S. M. Jodi, K. Oyinbo, H. M. Maishanu, A. A. Farouq, and A. U. Junaidu. 2012. Effect of neem extracts (*Azadirachta indica*) on bacteria isolated from adult mouth. *J. Basic. Appl. Sci.* 20: 64–67.