

๑๕ / ๒๕๕๗
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ผลของน้ำมันหอมระเหยจากขิงต่อ Planktonic cells และไบโอฟิล์ม
ของ *Candida albicans*

(Effect of Essential oil from *Zingiber officinale* on
Planktonic Cells and Biofilms of *Candida albicans*)
ผลของลูกอมขิง (Ginger Lozenges)

โดย

พรรนิภา ศิริเพิ่มพูล
จุฑาภรณ์ ศิริเพิ่มพูล

ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณแผ่นดิน 2556
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

๙๙๐๑๖๖๗๕

- 7 ก.ค. 2558

354991

มีนาคม 2557

รับบริการ

๙-๘ ก.ค. 2558

หัวข้อวิจัย

ผลของน้ำมันหอมระเหยจากขิงต่อ Planktonic cells และไบโอฟิล์มของ *Candida albicans* : ผลของลูกอมขิง

(Effect of Essential oil from Zingiber officinale on Planktonic Cells and Biofilms of *Candida albicans* : Ginger Lozenges)

หัวหน้าโครงการ

พรานิภา ศิริเพิ่มพูล

ภาควิชา

จุลชีววิทยา

ปีงบประมาณ

2556

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของลูกอมขิงต่อ Planktonic cell และไบโอฟิล์มของเชื้อ *Candida albicans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 12 isolates และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายลูกอมขิงที่สามารถยับยั้งเชื้อและทำลายเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC ; Minimum Fungicidal Concentration, MFC) โดยวิธี Microbroth dilution assay และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ (Minimum biofilms eradication concentration; MBEC) โดยการย้อมสี Crystal violet ผลการศึกษาพบว่าสารละลายลูกอมขิงสามารถยับยั้งการเจริญของ Planktonic cell ได้โดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 1.2-2.4% และ เท่ากับหรือมากกว่า 2.4% (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ ส่วน Sessile cell ในไบโอฟิล์มถูกยับยั้งได้โดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 4.8% และมากกว่า 4.8% (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับสารละลายลูกอมขิงความเข้มข้นในช่วง 0.3-1.2% (ปริมาตร/ปริมาตร) สามารถกำจัดคราบไบโอฟิล์มของเชื้อให้ลดลงได้ 48%-53%

คำสำคัญ : ไบโอฟิล์ม, ลูกอมขิง, ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effect of ginger lozenges against 12 clinical isolates of *C. albicans* and a type strain, *C. albicans* ATCC 90028, in both planktonic cell and biofilm. The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (MFC) and minimum eradication biofilm concentration (MEBC) of ginger lozenges were evaluated by broth microdilution and crystal violet staining assay. The results from broth microdilution assay revealed that the MIC and MFC of ginger lozenges on planktonic cell were 1.2%-2.4% and $\geq 2.4\%$, respectively. Moreover, MIC and MFC of ginger lozenges on sessile cells in biofilm were 4.8% and $\geq 4.8\%$, respectively. Employing crystal violet staining assay for biofilm eradication study, the result showed that 0.3-1.2% of ginger lozenges could eradicate 48%-53% of mature biofilm.

Keywords: Biofilms, ginger lozenges, anti-biofilm activity

สารบัญ

	หน้า
สารบัญภาพ	๗
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	3
รายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อ <i>Candida albicans</i>	3
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับจึง.....	8
รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	12
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	14
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	19
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	23
สรุปผลการทดลอง.....	23
อภิปรายผลการทดลอง.....	23
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก	31
ภาคผนวก ก ภาพประกอบผลการทดสอบ.....	31

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ค่า MIC และ MFCของลูกอมซิงก่อนอบแห้งต่อ Planktonic cell ของ <i>C. albicans</i>	19
2	ค่า MIC และ MFCของลูกอมซิงหลังอบแห้งต่อ Planktonic cell ของ <i>C. albicans</i>	20
3	ค่า MIC และ MFCของลูกอมซิงหลังอบแห้งต่อไบโอฟิล์มของ <i>C. albicans</i>	21
4	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรจากการย้อมไบโอฟิล์มของ <i>C. albicans</i> ที่เหลือหลังบ่มรวมกับสารละลายลูกอมซิงความเข้มข้นต่างๆ	22
5	ผลิตภัณฑ์ลูกอมซิง (Ginger Lozenges).....	31
6	ผล MIC ของลูกอมซิงก่อนอบแห้งต่อ Planktonic cell ของ <i>C. albicans</i>	32
7	ผล MIC ของลูกอมซิงหลังอบแห้งต่อไบโอฟิล์มของ <i>C. albicans</i>	33
8	ผลการย้อมคราบไบโอฟิล์มของ <i>C. albicans</i> หลังได้รับสารละลายลูกอมซิงอบแห้งความเข้มข้นแตกต่างกัน.....	34

บทที่ 1

บทนำ

Biofilms เป็นการรวมกลุ่มกันของจุลินทรีย์บนพื้นผิวของสิ่งมีชีวิตหรือไม่มีชีวิตก็ได้ จุลินทรีย์จะมีการสร้างสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) มาห่อหุ้มเซลล์ไว้ด้วยกัน ทำให้เกิดเป็นลักษณะโครงสร้างที่ซับซ้อน (Hall-Stoodley, Costerton, & Stoodley, 2004) และทำให้เชื้อที่อยู่ในสภาพ Biofilms นี้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม สารเคมี ยาต้านจุลชีพ รวมทั้งกลไกการป้องกันตนเองของมนุษย์มากกว่าเชื้อที่อยู่ในสภาพปกติหรือ Planktonic cell ด้วย (Brown & Gilbert, 1993)

Biofilms มีบทบาทสำคัญต่อมนุษย์หลายด้าน ในด้านการแพทย์พบว่า Biofilms เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลต่อการรักษา เนื่องจากทำให้เชื้อทนต่อระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยและยาที่ใช้รักษาได้มากขึ้น (Sharma & Yadav, 2008) ในบรรดาเชื้อก่อโรคที่มีความสามารถในการสร้าง Biofilms นั้นพบว่า *Candida albicans* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคประเภทฉวยโอกาสสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้ทั้งแบบเฉพาะที่และแบบกระจายทั่วร่างกาย โดยเฉพาะในผู้ที่มีปัจจัยนำโรคอยู่ก่อนแล้ว เช่นผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ คนไข้มะเร็งที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัด รวมทั้งผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะติดต่อกันเป็นเวลานาน (Zhang *et al.*, 2002) มักสร้าง Biofilms และเป็นปัญหาในการรักษาโรคในคนไข้กลุ่มดังกล่าว ทำให้การใช้สารต้านเชื้อราแบบดั้งเดิมนั้นเป็นไปได้ค่อนข้างยาก เพราะในสภาวะที่เป็น Biofilms นั้นยาออกฤทธิ์ได้จำกัด เนื่องจากยาแทรกซึมผ่านชั้นของ Biofilms ได้ยาก และยังเกิดการสร้างพันธะเคมีระหว่างยากับโครงสร้างพื้นฐานของ Biofilms หรือ Extracellular polymer ที่เชื้อสร้างขึ้นมาอีกด้วย (Meyer, 2003; Sanglard *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2007) ทำให้เกิดการดื้อยาขึ้น

Amphotericin B ซึ่งเป็นยาที่เคยใช้รักษาโรคติดเชื้อราแบบกระจายทั่วกายมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1950 นั้น มีความเป็นพิษต่อดับและไต ส่วน Nystatin ซึ่งเป็นยาเตรียมในรูปแบบใช้ภายนอกนั้นก็ยังมีปัญหาจากการใช้ยา กล่าวคือ ยามีรสชาติไม่ชวนใช้ และต้องใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน นอกจากนี้ยังมีปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือพบการดื้อยาของเชื้อมากขึ้น (Giuliana, *et al.* 1999; Miller, *et al.* 2001; Vianna, *et al.* 2004; Barasch, *et al.* 2004) ดังนั้นการรักษาโรคติดเชื้อรา จึงยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทางการแพทย์ และมีความจำเป็นในการแสวงหาสารใหม่จากธรรมชาติในการยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากชิงมาผลิตเป็นลูกอมสมุนไพรเพื่อทำลายเชื้อ *C. albicans*

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเตรียมลูกอมชิงโดยใช้น้ำมันหอมระเหยชิงเป็นองค์ประกอบ จากนั้นจึงทดสอบประสิทธิภาพของลูกอมชิงในการทำลาย biofilms ของเชื้อ *C. albicans* ในหลอดทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำน้ำมันหอมระเหยชิงมาผลิตเป็นลูกอมสมุนไพรเพื่อทำลายเชื้อ *C. albicans* ได้อันจะเป็นการประหยัดงบประมาณในการรักษาผู้ป่วยและยังเป็นการเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรไทยอีกประการหนึ่งด้วย

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อ *Candida albicans*
2. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับจุลินทรีย์
3. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อ *Candida albicans*

Candida albicans ถูกจัดลำดับไว้ในอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum Saccharomycotina

Class Saccharomycetes

Order Saccaromycetales

Family Saccharomycetaceae

Genus *Candida*

Species *C. albicans*

ลักษณะโดยทั่วไปของ *Candida albicans*

C. albicans เป็นราที่มีรูปร่างได้หลายแบบ (Polymorphic fungi) ส่วนมากเจริญในรูปของ ยีสต์และแตกหน่อออกไปโดยการสร้าง Blastoconidia นอกจากนี้ยังสามารถเจริญเป็น Hyphae หรือ Pseudohyphae ได้โดยการงอก Germ tube ออกไปจากเซลล์ยีสต์ โดยทั่วไปเซลล์มีลักษณะ กลม หรือรี ขนาดประมาณ 4-5 μm ผนังเซลล์ประกอบด้วย Mannan Glucan และ Chitin พบ เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในช่องปากและระบบทางเดินอาหารของมนุษย์โดยไม่ทำให้เกิดโรค (Ryan & Ray, 2010) และยังพบได้บ่อยว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อแบบฉวยโอกาสทั้งในช่องปากและในระบบ สืบพันธุ์ของมนุษย์ รวมทั้งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อจากโรงพยาบาล โดยแหล่งรังเชื้อมักเป็นจากตัว สืบพันธุ์ของมนุษย์ รวมทั้งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อจากโรงพยาบาล โดยแหล่งรังเชื้อมักเป็นจากตัว

ของผู้ป่วยเองมากกว่าที่จะติดเชื้อมาจากผู้ป่วยรายอื่น การใส่สายสวนต่าง ๆ ไว้ในร่างกายผู้ป่วยเป็นช่องทางเข้าติดเชื้อได้เป็นอย่างดี

กลไกการก่อโรค

เนื่องจากเชื้อชนิดนี้พบได้เป็นปกติบนพื้นผิวของเยื่อเมือก การทำให้เกิดโรคเป็นการติดเชื้อแบบฉวยโอกาส หากเชื้อเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากยีสต์ไปเป็นแบบ Hyphae พบว่าสัมพันธ์กับการบุกรุกเนื้อเยื่อ ทั้งแบบ Superficial และเนื้อเยื่อชั้นลึกลงไป กลไกการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในหลอดทดลองเช่นนี้พบว่าถูกควบคุมด้วยสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันเช่น Serum, pH, อุณหภูมิ และกรดอะมิโน แต่ยังไม่ทราบว่าสิ่งใดเป็นปัจจัยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเช่นนี้ในร่างกายมนุษย์

Hyphae ของ *C. albicans* สามารถเกาะได้ดีกับเซลล์เยื่อบุผิวของมนุษย์ โดยอาศัยโปรตีนที่เรียกว่า Hyphal wall protein (Hwp1) บนผิวของ Hyphae ซึ่งพบได้เฉพาะบนผิวของ Germ tube และ Hyphae เท่านั้น นอกจากนี้ Hyphae ยังสามารถปล่อยเอนไซม์ Proteinase และ Phospholipase ออกมาย่อยเซลล์เยื่อบุผิว ช่วยในการบุกรุกเนื้อเยื่อ เอนไซม์ชนิดหนึ่งของ Hyphae ที่มีชื่อว่า Secreted aspartic proteinase (Saps) สามารถย่อย Keratin และ Collagen จึงช่วยให้เชื้อสามารถบุกรุกเนื้อเยื่อชั้นที่ลึกลงไปได้ง่ายขึ้น บริเวณผิว Hyphae ของ *C. albicans* มีโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติคล้าย Complement receptors (CR2, CR3) บนผิวของเซลล์ฟาโกไซต์ ทำให้เกิดการจับกับ C3b บนผิวของ Hyphae แทนที่จะจับกับ Receptor บนผิวของเซลล์ฟาโกไซต์ ดังนั้นจึงทำให้ Hyphae ทนทานต่อการถูกจับกินด้วยเซลล์ฟาโกไซต์ ปริมาณ CR2, CR3 นี้พบว่ามี การสร้างเพิ่มขึ้นในสภาวะที่มีกลูโคส

Virulence factors

Virulence factors ที่ช่วยให้ *C. albicans* สามารถ Colonized หรือบุกรุกเนื้อเยื่อได้นั้นเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบต่าง ๆ เช่น ผนังเซลล์ของเชื้อ ความสามารถในการเกาะติดและการสร้าง Proteolytic enzyme โดยผนังเซลล์ของเชื้อมีบทบาทโดยรวมคือช่วยทำให้เชื้อสามารถเจริญและป้องกันแรงดันออสโมติกได้เนื่องจากเซลล์เชื้อต้องสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกตลอดเวลา ส่วน Ligand หรือโมเลกุลที่ปรากฏอยู่บนผิวเซลล์เชื้อจะทำหน้าที่ส่งเสริมให้เซลล์ Colonized อยู่ได้บน

เนื้อเยื่อของโฮสต์ ในขณะที่ Proteolytic enzyme ที่เชื้อสร้างขึ้นมาจะทำหน้าที่ช่วยให้เชื้อสามารถบุกรุกเนื้อเยื่อได้ (Calderone & Brawn, 1991)

1. ผนังเซลล์

ผนังเซลล์ของ *C.albicans* ประกอบด้วยสารต่าง ๆ ได้แก่ Mannan, Glucan และ Chitin โดยพบว่ามี Mannan ประมาณ 23%, Glucan 40-60%, โปรตีน 6-25%, ไขมัน 1-7% และ Chitin 0.6-9% ของน้ำหนักผนังเซลล์แห้ง ผลการศึกษาทางด้าน Ultrastructure แสดงให้เห็นว่าผนังเซลล์ประกอบด้วยชั้นของโครงสร้างที่ทึบแสงอิเล็กตรอนต่างกัน จำนวนชั้นและรูปร่างของผนังแตกต่างกันออกไปขึ้นกับระยะการเจริญ รูปร่างของเชื้อ สายพันธุ์ที่นำมาศึกษา อาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งกระบวนการตรึงเซลล์ก่อนนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากการศึกษาด้วยวิธีการต่างๆ ให้ผลสอดคล้องกันว่าพบ mannan กระจายตัวเป็นส่วนประกอบอยู่โดยทั่วไปในผนังเซลล์ทุกชั้น ส่วน Chitin และ Glucan นั้นพบเป็นส่วนประกอบเฉพาะผนังเซลล์ชั้นใน (Inner layer) เท่านั้น ส่วนผนังชั้นนอกประกอบด้วยสาร Mannan หรือ Mannoprotein ก่อตัวกันในลักษณะเป็นเมือกหรือ Capsule ปกคลุมอยู่ด้านนอกนั่นเอง ซึ่งผนังชั้นนอกสุดนี้จะถูกขับออกมาในระหว่างที่เกิดการติดเชื้อ Mannan เป็น major cell surface antigen ชนิดแรกสุดที่พบ *C.albicans* แบ่งเป็น 2 serotype คือ serotype A และ B มีหลักฐานแสดงให้เห็นว่า side chain ของ mannan แสดงความเป็น epitopes ที่แตกต่างกันของแต่ละ Serotype (Hasenclever & Mitchell, 1961; Calderone & Brawn, 1991)

2. Adhesion

Candida สายพันธุ์ที่ก่อโรคได้นั้นจะสามารถ Colonized และติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อได้หรือไม่ขึ้นกับความสามารถของเชื้อในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อเมือก *Candida* สายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ เช่น *C.albicans* และ *C.tropicalis* นั้นสามารถยึดเกาะเนื้อเยื่อได้ดีกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคเช่น *C.krusei* และ *C.guilliermondii* มีการศึกษาพบว่า Hydrophobic cell ของเชื้อ *C.albicans* มีความรุนแรงในการก่อโรคมมากกว่า Hydrophilic cells ในการศึกษาคุณสมบัติ Hydrophobicity ของเซลล์ *C.albicans* จำนวน 19 isolates กับการเกาะติดบน HeLa cells พบว่าความสามารถในการเกาะติดนั้นเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติ Hydrophobicity แต่กลไกนี้ไม่ใช่กลไกหลักเพียงอย่างเดียวที่มีอิทธิพลต่อการยึดเกาะเพราะยังขึ้นกับ Isolate ของเชื้ออีกด้วย (Hazen, 1989)

C. albicans ที่กำลังงอก Hyphae สามารถเกาะติดกับเนื้อเยื่อของโฮสต์ได้ดีกว่าเชื้อที่อยู่ในรูปของยีสต์ (Rotrosen, Calderone, Edwards, 1986) โดยพบว่า *C. albicans* ที่อยู่ในระยะ Hyphae นั้นมี Receptor สำหรับ Complement conversion product (C3d และ iC3b) เมื่อเติม Monoclonal antibody เพื่อปิด Receptor นี้แล้ว จะทำให้เกิดขบวนการ Phagocytosis ได้ดีขึ้น แสดงให้เห็นว่า Receptor เหล่านี้ส่งเสริมความสามารถในการก่อโรคของเชื้อโดยยับยั้งขบวนการ Phagocytosis (Heidenreich, Dierich, 1985)

นอกจากนี้ยังพบว่า *C. albicans* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์ในหลอดทดลองลดลง ก็จะทำให้ความสามารถในการก่อโรคในสัตว์ทดลองลดลงด้วยเช่นกัน (Calderone & Brawn, 1991) ในทางกลับกันหากเชื้อมีความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อและสร้าง Extracellular proteinase เพิ่มขึ้นเชื้อก็จะสามารถทำให้หนูทดลองตายได้มากขึ้นด้วย และพบว่า เชื้อที่เกาะติดเซลล์ได้ดีมักจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ Proteinase มากและมีความสามารถในการก่อโรคได้ดีด้วย (Ghannoum & Asu-Elteen, 1986)

3. Proteinase

กิจกรรมของเอนไซม์ Proteinase มีส่วนเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรคของ *C. albicans* และยังพบเอนไซม์นี้ได้ในเชื้อ *C. tropicalis* และ *C. parapsilosis* ด้วยแต่จะไม่พบเอนไซม์ชนิดนี้ใน *Candida* spp. อื่นๆที่มีความสามารถในการก่อโรคน้อยกว่า เอนไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็น Carboxyl proteinase สามารถย่อย Secretory IgA ซึ่งเป็น Immunoglobulin ที่พบได้มากบริเวณเซลล์เยื่อบุผิว Proteinase บางชนิดของเชื้อมีคุณสมบัติในการย่อยสลายเคราตินและคอลลาเจนได้ (มี Keratinolytic และ Collagenolytic activity) เอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่ 2 อย่างที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรคดังนี้คือ 1.) แสดงบทบาทหรือฤทธิ์ในการย่อยสลายโปรตีนที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการบุกรุกเนื้อเยื่อ และ 2.) การที่เชื้อสร้างเอนไซม์ได้ อาจจะเกี่ยวข้องหรือสัมพันธ์กับความสามารถในการ Colonize บนเนื้อเยื่อของโฮสต์

จากการศึกษาความสามารถในการก่อโรคบนเยื่อ Chorioallantoic membrane ของ *C. albicans* ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ Proteinase ต่างกัน พบว่า Proteinase ที่เชื้อสร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์มีบทบาทสำคัญต่อการบุกรุกเยื่อดังกล่าว (Shimizu, Kondoh, Tanaka, 1987)

ส่วนบทบาทของ Proteinase ต่อการเกาะติดกับเซลล์นั้นพบว่า Pepstatin ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ Proteinase ไม่สามารถยับยั้งการเกาะติดของเชื้อได้ แต่สามารถป้องกันการเกิดโพรง (Cavitation) ซึ่งเป็นเป็นผลเนื่องมาจากการที่เซลล์ถูกบุกรุกได้ (Ray & Payne, 1988)

ในปัจจุบันมีรายงานว่าพบ Secretory aspartate proteinase ในน้ำจากช่องคลอดของผู้ติดเชื้อ และมีรายงานการศึกษาหลายๆ ฉบับแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญและเป็น Virulence factor ของการติดเชื้อราในช่องคลอด (De Bernardis, *et al.*, 1990)

ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกของ Proteinase ในการส่งเสริมให้เชื้อเกิดการเกาะติดเซลล์ แต่มีการตั้งสมมุติฐานว่าอาจเกิดจากการที่เอนไซม์ตัดหรือย่อยบางส่วนของเซลล์ที่ติดกับ Receptor บนผิวเซลล์อยู่ไว้ออกไป ทำให้ Host cell receptor เผยออก เซลล์ของเชื้อจึงเกาะติดได้ (Beachey, 1981)

4. ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ (Strain differentiation)

C.albicans แบ่งเป็น 2 Serotype คือ Serotype A และ B โดยอาศัยหลักการเกาะกลุ่มของตัวเซลล์กับแอนติบอดี มีบางการศึกษารายงานว่า Serotype B มีความรุนแรงในการก่อโรคมมากกว่า serotype A แต่บางรายงานพบว่าไม่มีความแตกต่างของความรุนแรงในการก่อโรคระหว่าง 2 Serotype ดังกล่าว (Hasenclever, Mitchell, 1961)

2. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับขิง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Zingiber officinale* Roscoe

ชื่อสามัญ : ขิง (Ginger)

ชื่ออื่น : ขิงแกลง ขิงแดง ขิงเผือก

วงศ์ : Zingiberaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน สีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในสีเหลืองนวล มีกลิ่นเฉพาะ จะแทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นมาเหนือพื้นดินสูงได้ถึง 90 เซนติเมตร ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ รูปขอบขนาน แกมรูปใบหอก กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 15-20 เซนติเมตร ขอบใบเรียบ แผ่นใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ใบประดับเรียงเวียนสลับสีเขียวอ่อน ดอก ออกเป็นช่อแทงออกจากเหง้าใต้ดิน กลีบดอกสีเหลือง แกมเขียว (Kawai, 1994)

สารออกฤทธิ์สำคัญ

สารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่น้ำมันหอมระเหย ซึ่งพบว่ามีอยู่ประมาณ 1-3% ของน้ำหนักพืช ปริมาณความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญนั้นพบว่ามีแตกต่างกันออกไปตามแหล่งเพาะปลูก แต่สารออกฤทธิ์สำคัญที่อยู่ในส่วนของน้ำมันหอมระเหยซึ่งได้แก่สารที่เรียกว่า Sesquiterpenes : bisapolene , zingiberene และ zingiberol (Connel D) องค์ประกอบเหล่านี้มีฤทธิ์ชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น สาร Gingerols มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวด ลดไข้ ช่วยให้อ่อนหลับ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง (Mascolo & Jain, 1989)

การใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

ขิงจัดเป็นพืชที่มีกลิ่นหอม มีฤทธิ์ขับลม กระตุ้นการเคลื่อนไหวของลำไส้ ลดการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ ช่วยย่อยอาหาร ลดอาการปวดกระเพาะอาหาร ช่วยให้เจริญอาหาร ขยายหลอดเลือด ขับเสมหะ ขยายหลอดลมและบรรเทาอาการปวด มีการศึกษาพบว่าขิงมีผลต่อเอนไซม์ในลำไส้ และช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ Lipase, Disaccharidases, Sucrase และ Maltase นอกจากนี้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่นอีกเช่นช่วยบรรเทาอาการปวดข้อในโรครูมาตอยด์ (Kiuchi, et al., 1992)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง Cytokine ของระบบภูมิคุ้มกันที่เป็นต้นเหตุของการอักเสบ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์กระตุ้นการไหลเวียนเลือด เนื่องจากในขิงมีสาร Gingerols ที่ออกฤทธิ์ด้านการอักเสบได้ดี มีข้อมูลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการบริโภคขิงสดและขิงที่ผ่านการปรุงด้วยความร้อน ในอาหารประจำวันนั้นสามารถช่วยบรรเทาอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้ออันเนื่องมาจากการบาดเจ็บจากการออกกำลังกายได้ (Ojewole, 2006)

ขิงเป็นพืชที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศจีน และในวงการแพทย์ทางเลือกทั่วโลกเพื่อช่วยบรรเทาอาการปวดจากข้ออักเสบ รูมาติซึม และแก้อาการคลื่นไส้ เป็นต้น โดยพบว่าสารสกัดเมทานอลจากเหง้าขิงสามารถลดการอักเสบ บรรเทาปวดลดไข้ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ และยังช่วยลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด (Srivastava & Mustafa, 1989) ยับยั้งการปล่อยสาร Prostaglandin จาก Monocytes (Mascolo & Jain, 1989) ขิงจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอย่างแรงมีคุณสมบัติทั้งช่วยบรรเทาฤทธิ์และป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระได้สามารถใช้ประโยชน์เพื่อการรักษาโรคได้อย่างปลอดภัย เนื่องจากมีผลข้างเคียงน้อยมากหรือแทบไม่มีเลย แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมให้มากขึ้นทั้งในสัตว์และมนุษย์เกี่ยวกับจลนศาสตร์ของขิงและองค์ประกอบของมัน รวมทั้งผลเสียที่อาจเกิดขึ้นหากบริโภคติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน (Al-Amin & Zainab, 2006)

ฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด

ขิงช่วยป้องกันโรคหัวใจได้หลายชนิด โดยช่วยลดการแข็งตัวของเลือดจึงช่วยป้องกัน Thrombosis และเนื้อตายจากการขาดเลือดไปเลี้ยงได้ ช่วยละลายลิ่มเลือดที่อุดตันบริเวณปลายหลอดเลือดทำให้ความดันเลือดลดลง นอกจากนี้ยังช่วยลดระดับ Cholesterol จึงส่งผลดีต่อระบบหัวใจโดยตรง (Akoachere, et al., 2002)

ฤทธิ์ต่อเกร็ดเลือด

สารสกัดน้ำจากขิงมีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือดที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย ADP, Epinephrine, Collagen และ Arachidonic acid ในหลอดทดลองได้ ซึ่งแสดงฤทธิ์โดยยับยั้งการสังเคราะห์ Thromboxane และยังพบการสังเคราะห์ Prostacyclin ในหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนู rat ด้วย ส่วนฤทธิ์ยับยั้งเกร็ดเลือดของสาร 6-gingerol นั้นส่วนใหญ่เกิดจากการยับยั้งการสังเคราะห์ Thromboxane (Guh, 1995)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การที่ขิงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้นสามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคหลายๆ ชนิด ได้ รวมทั้งช่วยชะลอความชราด้วย ในบรรดาพืชทั้งหลายที่ใช้เป็นอาหารได้กว่า 120 ชนิดนั้น พบว่าขิงถูกจัดเป็นหนึ่งในพืช 5 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ซึ่งรวมถึง เบอร์รี่ วอลนัท เมล็ดทานตะวันและผลทับทิม จากการทดลองในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองพบว่าขิงยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ และยังมีผู้รายงานไว้ว่าขิงยังส่งเสริมให้ร่างกายสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้อีกด้วย (Srivastava & Mustafa, 1989)

ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

การให้เคมีบำบัดเพื่อรักษามะเร็งนั้นมักมีผลข้างเคียงเช่น ผื่นและอาเจียน การรับประทานขิงจะสามารถช่วยลดการอาเจียนจากการได้รับเคมีบำบัดลงได้ นอกจากนี้ยังมีข้อมูลการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าขิงยังช่วยป้องกันมะเร็งได้อีกด้วย (Platel *et al.*, 1995)

ฤทธิ์ด้านการอักเสบ

ตามที่กล่าวมาแล้วว่าสารที่เป็นองค์ประกอบของขิงยับยั้งเมตาบอลิซึมของ Arachidonic acid และการสังเคราะห์ Prostaglandin จึงช่วยลดอาการอักเสบได้ สารที่เป็นองค์ประกอบชนิดหนึ่งคือ (6)-shogaol (พบได้ในขิงที่เก็บแห้งแล้ว แต่แทบไม่พบเลยในขิงสด) รบกวนกระบวนการทำให้เกิดการอักเสบ โดยพบว่ามันยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenases และป้องกันการปลดปล่อยสาร Prostaglandin ในหนู Rat และในกระต่าย ขิงอาจจะยับยั้งการสังเคราะห์ Prostaglandin ได้ดีกว่าสาร Indomethacin (Shen, *et al.*, 2003)

ความเป็นพิษ

กล่าวโดยทั่วไปได้ว่าซิงค์ไม่มีความเป็นพิษ ค่า LD50 ในสัตว์ทดลองมากกว่า 5 กรัม/น้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม ข้อมูลการทดลองทางห้องปฏิบัติการพบว่าสารประกอบที่แยกได้จากซิงค์มีคุณสมบัติทั้งก่อมะเร็งและต้านมะเร็งได้ แทบไม่พบผลข้างเคียงจากการใช้เลย ดังนั้นจึงใช้เป็นเครื่องเทศและอาหารได้อย่างปลอดภัย (Chen, *et al.*, 2007)

ข้อห้ามใช้

ในบางประเทศเช่น ประเทศเยอรมนี ห้ามใช้ซิงค์ในหญิงตั้งครรภ์ แต่ในประเทศอื่นไม่พบข้อห้ามใช้นี้ และไม่พบรายงานว่ามีผลข้างเคียงเมื่อใช้กับหญิงตั้งครรภ์อีกด้วยแต่กลับพบว่าสารสกัดจากซิงค์ช่วยบรรเทาอาการคลื่นไส้ อาเจียนจากการแพ้ท้องได้อีกด้วย

3. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

Agarwal, Lal & Pruthi (2008) ได้ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 30 ชนิด ต่อไบโอฟิล์มของ *C. albicans* ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยและเป็นเชื้อชนิดที่ไวต่อยา Fluconazole (4µg/mg) ผลการทดลองพบว่ามือน้ำมันหอมระเหยจากพืชจำนวน 18 ชนิดสามารถยับยั้ง *C. albicans* ได้เมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion และเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่มีประสิทธิภาพดีนี้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อ ผลการทดลองพบว่ามือน้ำมันหอมระเหยจากพืช 4 ชนิด คือน้ำมันยูคาลิปตัส เปปเปอร์มินต์ น้ำมันขิง และน้ำมันกานพลู สามารถลดปริมาณไบโอฟิล์มลงไปได้ 80.87%, 74.16%, 40.46% และ 28.57% ตามลำดับ

Agarwal, Lal & Pruthi (2010) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 30 ชนิด ต่อเชื้อ *Candida albicans* ที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยเจือจางน้ำมันหอมระเหยจากพืชให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.03% ถึง 3% (v/v) และหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC) โดยใช้วิธี Agar dilution และ Macrobroth dilution assays พบว่าน้ำมันยูคาลิปตัสและน้ำมันสาระแนมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *C. albicans* โดยมีค่า MFC เท่ากับ 0.12% และ 0.15% (v /v) ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยขิงให้ขนาดของ Inhibition zone 26 มิลลิเมตร ค่า MIC เท่ากับ 3% และค่า MFC เท่ากับ 3% โดยมีประสิทธิภาพดีเป็นลำดับที่ 14 จากพืชทั้งหมด 30 ชนิด

Mickiene, Ragazinskiene & Bakutis (2011) ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 2 ชนิดคือ *Mentha arvensis* L. และ *Zingiber officinale* R. ในการยับยั้งเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, และ *Candida albicans* ด้วยวิธี Broth dilution assay ผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 2 ชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อลงไปได้ โดยน้ำมันหอมระเหยขิงเข้มข้น 50% สามารถหยุดการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบได้ทุกชนิด

Takahashi, Inouye and Abe (2011) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากขิงอ่อน ขิงแก่ และขิงแห้ง ในการยับยั้งการสร้างสายราของ *C. albicans* ผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากขิงโดยเฉพาะจากส่วน Seed และขิงแห้งมีประสิทธิภาพดีกว่าสาร Oleoresins ที่สกัดด้วย Ethanol และดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชในวงศ์เดียวกัน โดยค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหย

จากซิงอ่อน ซิงแก่ และ Seed มีค่าเท่ากับ 400 µg/ml ส่วนค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยจากซิงแห้งเท่ากับ 200 µg/ml

Mohd, Ahmad & Iqbal (2012) ศึกษาประสิทธิภาพของสารธรรมชาติจากพืช 4 ชนิด ได้แก่ Cinnamaldehyde, Citral, Eugenol, Geranol ในการยับยั้ง *C.albicans* ในสถานะที่เป็นไบโอฟิล์ม ผลการทดลองพบว่าทั้ง *C.albicans* ชนิดที่ได้จากผู้ป่วยและเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดีและไบโอฟิล์มมีความทนทานต่อยาต้านเชื้อราเพิ่มขึ้นถึง $\geq 1,024$ เท่า และทนทานต่อฤทธิ์ของสาร Cinnamaldehyde และ Geranol ได้เพิ่มขึ้น 2 เท่า แต่ความทนทานต่อ Eugenol ไม่เปลี่ยนแปลง

พรานิภา ศิริเพิ่มพูล (2556) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากซิงต่อ Planktonic cell และไบโอฟิล์มของเชื้อ *Candida albicans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 12 isolates และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยจากซิงที่สามารถยับยั้งเชื้อและที่ฆ่าเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC ; Minimum Fungicidal Concentration, MFC) โดยวิธี Microbroth dilution assay และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ (Minimum biofilms eradication concentration; MBEC) โดยการย้อมสี Crystal violet นอกจากนี้ยังทดสอบจลนศาสตร์การออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี Time kill assay ผลการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากซิงสามารถยับยั้งการเจริญของ Planktonic cell ได้โดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.3% และ 0.3-0.6% (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ ส่วน Sessile cell ในไบโอฟิล์มถูกยับยั้งได้โดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.6-5.0% และ 2.5-5.0% (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ น้ำมันหอมระเหยจึงความเข้มข้นในช่วง 0.3-5.0% (ปริมาตร/ปริมาตร) สามารถกำจัดคราบไบโอฟิล์มของเชื้อให้ลดลงได้ 62%-84% และจลนศาสตร์การออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากซิงเป็นแบบยับยั้งเชื้อ

บทที่3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. น้ำมันหอมระเหยจากขิง (TCF[®] Specific gravity 0.875)
2. สมุนไพรได้แก่ ใบกระเพราแดง ใบตำหม่อน ใบสวาด ขมิ้นอ้อย สะเฒเทศบดละเอียด ผลมะขามป้อมบดละเอียด และบัวเค็ม
3. น้ำผึ้ง
4. เชื้อทดสอบ
 - 4.1. *Candida albicans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 12 Isolates (โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)
 - 4.2. *C. albicans* ATCC 90028 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี)
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 4.1 Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco[®])
 - 4.2 Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (Difco[®])
 - 4.3 RPMI 1640 with L-Glutamine and 0.165 M MOPS without Sodium Bicarbonate (BioWhittaker[®])
6. 96-well Microtiter plate (Cell star[®])
7. Phosphate buffer saline (PBS)
8. Crystal violet
9. Standard McFarland เบอร์ 0.5
10. Microtiterplate ELISA reader (SPECTOSTAR NANO[®])

วิธีการทดลอง

1. การตั้งตำรับลูกอมสมุนไพร

สมุนไพรพื้นฐานสำหรับใช้เป็นส่วนผสมของลูกอมจึงประกอบด้วย

ใบกระเพราแดง	กรัม
ใบตาทม่อน	กรัม
ใบสวาด	กรัม
ขมิ้นอ้อย	กรัม
สารส้ม	กรัม
ชะเอมเทศบดละเอียด	กรัม
ผลมะขามป้อมบดละเอียด	กรัม
บ๊วยเค็ม	กรัม

นำผงสมุนไพรแห้งผสมกับน้ำผึ้ง และน้ำมันหอมระเหยจึงให้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันหอมระเหยจึงเท่ากับ % (v/v) แล้วจึงนำลูกอมซึ่งได้นี้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งไบโอฟิล์มของ *C. albicans* ตามลำดับขั้นตอนต่อไปนี้คือ

- 1) การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของลูกอมซึ่งก่อนอบแห้งต่อ Planktonic cell ของ *C. albicans* ATCC 90028 โดยวิธี Microdilution assay : การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นหลังเตรียมเป็นลูกอม
- 2) การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของลูกอมซึ่งหลังอบแห้งต่อ Planktonic cell ของ *C. albicans* ATCC 90028 โดยวิธี Microdilution assay: การทดสอบประสิทธิภาพหลังเตรียมเป็นลูกอม

- 3) การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของลูกอมซิงหลังอบแห้งต่อ Biofilm ของ *C. albicans* ATCC 90028 โดยวิธี Microdilution assay: การทดสอบประสิทธิภาพหลังเตรียมเป็นลูกอม
- 4) การหาค่า Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC) ของลูกอมซิงหลังอบแห้งต่อ Biofilm ของ *C. albicans* โดยวิธี Microdilution assay

2. การทดสอบประสิทธิภาพของลูกอมซิง

2.1 การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของลูกอมซิงก่อนอบแห้งต่อ Planktonic cell โดยวิธี Microdilution assay (NCCLS, 1997)

- 2.1.1 เจือจางลูกอมซิงก่อนอบแห้งแบบ Serial twofold dilution ด้วย RPMI1640 ใน 96-well microtiter plate ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1.2%-0.03% (ปริมาตร/ปริมาตร) หลุม Diluents control เติมตัวทำลายน้ำมันหอมระเหยแทน
- 2.1.2 เติมเชื้อทดสอบที่มีจำนวนเชื้อประมาณ $1-5 \times 10^3$ CFU/มิลลิลิตร ลงไปทุกหลุม ยกเว้นหลุม Negative control ไม่ต้องเติมเชื้อ
- 2.1.3 บ่ม Microtiter plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วอ่านค่า MIC
- 2.1.4 สุ่มสารละลายจากทุกหลุมทดสอบที่เห็นว่าใสมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA
- 2.1.5 บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง
- 2.1.6 อ่านค่า MFC โดย MFC หมายถึงความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของลูกอมซิงที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA)
- 2.1.7 ชุดควบคุมการทดสอบ ทดสอบ *C. albicans* ATCC 90028 กับยา Fluconazole ในช่วงความเข้มข้น 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 และ 0.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1-2.1.6

2.2 การหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของลูกอมชิงหลั่งอบแห้งต่อ

Planktonic cell โดยวิธี Microdilution assay (NCCLS, 1997)

นำลูกอมชิงที่เตรียมได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่า Planktonic cell ของเชื้อ *C. albicans* ด้วยวิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 2.1

2.3 การหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของลูกอมชิงหลั่งอบแห้งต่อไบโอฟิล์มของ *Candida albicans*

2.3.1 เลี้ยงเชื้อให้สร้างไบโอฟิล์มใน 96-well microtiter plate

2.3.2 เติมสารละลายลูกอมชิงหลั่งอบแห้งที่เจือจางแบบ Serial twofold dilution ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 4.8% -0.3% (ปริมาตร/ปริมาตร)

2.3.3 ชุดควบคุมแต่ละเชื้อประกอบด้วย

Positive control ได้แก่หลุมทดสอบที่มีไบโอฟิล์มของเชื้อ

(ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย)

Diluents control ได้แก่หลุมทดสอบที่มีไบโอฟิล์มของเชื้อ + ตัวทำละลาย

(ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย)

Negative control ได้แก่หลุมทดสอบที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่มีไบโอฟิล์ม

2.3.4 บ่ม Microtiter plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง อ่านค่า MIC จากหลุมทดสอบที่เห็นว่าสารละลายใส

2.4 การหาค่า Minimum Fungicidal Concentration (MFC)ของลูกอมชิงหลั่งอบแห้งต่อไบโอฟิล์มของ *Candida albicans*

2.4.1 สุ่มสารละลายจากทุกหลุมทดสอบที่เห็นว่าใสเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร SDA

2.4.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.4.3 อ่านผลค่า MFC ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของที่น้อยที่สุดของสารที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ (ไม่พบการเจริญของ *Candida* บน SDA)

2.5 การหาค่า Minimum Eradication Biofilms Concentration (MEBC)

ย้อมหลุมทดสอบในข้อ 2.3 ด้วยสี Crystal violet ด้วยวิธีการดังนี้

1. ล้างหลุมทดสอบที่มีไบโอฟิล์มด้วย 0.01 M PBS pH 7.0 2 ครั้ง
2. เติม Absolute methanol ทิ้งไว้ 10 นาที
3. ย้อมด้วย 1 % Crystal violet นาน 20 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiterplate ELISA reader

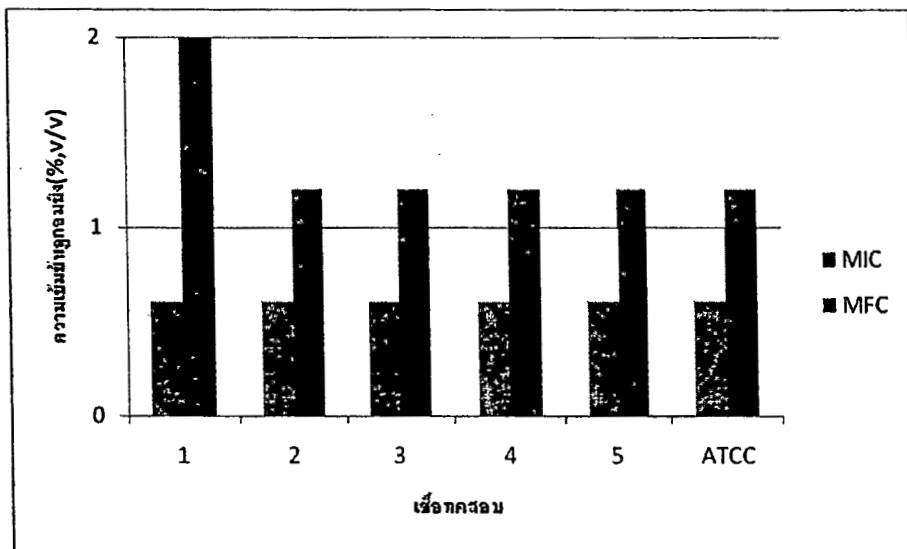
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal

Concentration (MFC) ของลูกอมขิงก่อนอบแห้งต่อ Planktonic cell ของ *C. albicans* โดยวิธี Microdilution assay

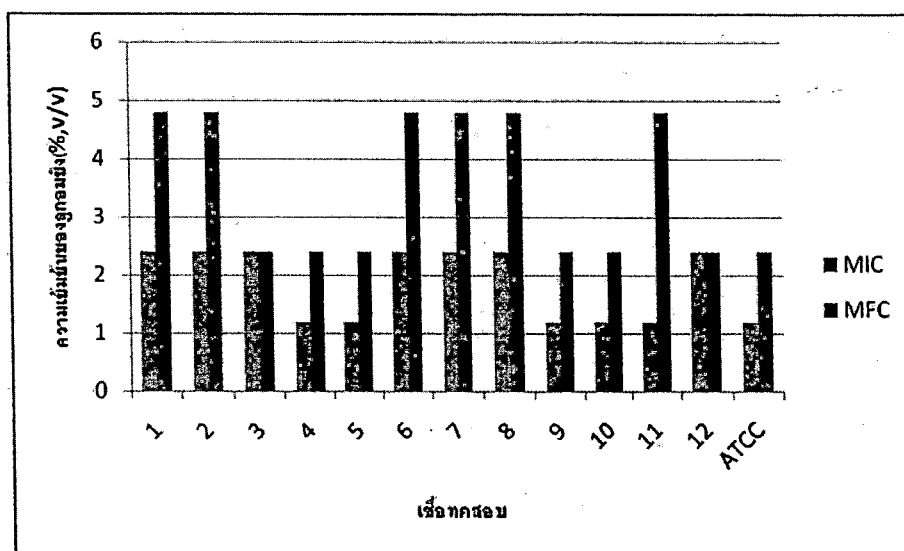
เมื่อนำสมุนไพรแต่ละชนิดที่แห้งสนิทมาบดให้เป็นผงละเอียด ผสมกับน้ำผึ้งและน้ำมันหอมระเหยขิง โดยความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันหอมระเหยขิงเท่ากับ 16 % (v/v) ได้เป็นลูกอมขิง แล้วนำลูกอมขิงที่ยังไม่ผ่านขบวนการอบแห้งมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ Planktonic cells ของ *C. albicans* No.1-No.5 และ *C. albicans* ATCC 90028 พบว่าลูกอมขิงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้ โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) เท่ากับ 0.6% (v/v) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MFC) เท่ากับหรือมากกว่า 1.2% (v/v) (ภาพที่1)



ภาพที่ 1 ค่า MIC และ MFC ของลูกอมขิงก่อนอบแห้งต่อ Planktonic cell ของ *C. albicans*

2. ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของลูกอมขิงหลังอบแห้งต่อ Planktonic cell ของ *Candida albicans*

เมื่อนำลูกอมขิงมาอบให้แห้งแล้วนำมาเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นตั้งแต่ 2.4%-0.07% แล้วทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง Planktonic cell ของเชื้อ *C. albicans* จำนวน 12 isolates รวมทั้ง *C. albicans* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 90028 พบว่าสารละลายลูกอมขิงความเข้มข้นต่ำสุดในช่วง 1.2-2.4% (ปริมาตร/ปริมาตร) สามารถยับยั้ง Planktonic cell ของเชื้อได้ และความเข้มข้นต่ำสุดในช่วงที่ทำลาย Planktonic cell ของเชื้อได้มีค่าเท่ากับ 2.4%→2.4% ดังนั้นค่า MIC ของสารละลายลูกอมขิงหลังอบแห้งจึงมีค่าเท่ากับ 1.2-2.4% (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่วนค่า MFC อยู่ในช่วง 2.4%→2.4% (ภาพที่2)

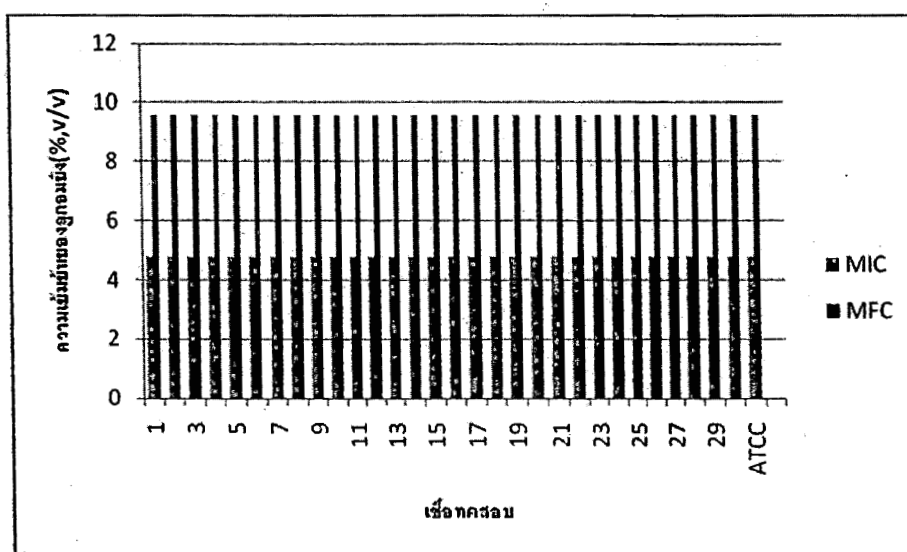


ภาพที่ 2 ค่า MIC และ MFC ของลูกอมขิงหลังอบแห้งต่อ Planktonic cell ของ *C. albicans*

3. ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของลูกอมขิงหลังอบแห้งต่อ Biofilm ของ *C. albicans* ATCC 90028 โดยวิธี

Microdilution assay

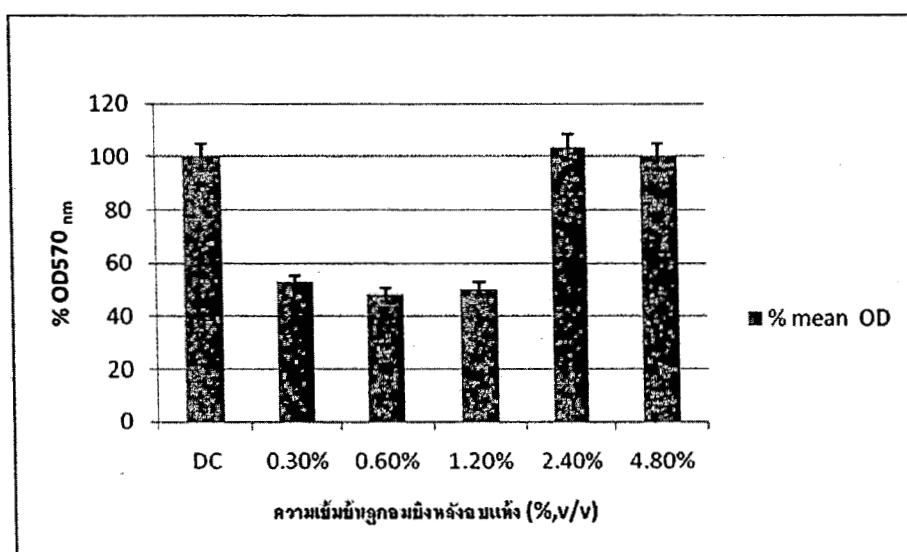
เมื่อนำสารละลายลูกอมขิงหลังอบแห้งที่เจือจางแบบ Serial twofold dilution ความเข้มข้นในช่วงตั้งแต่ 4.8% -0.3% (ปริมาตร/ปริมาตร) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง Biofilm อายุ 24 ชั่วโมงของเชื้อ *C. albicans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 30 isolates รวมทั้ง *C. albicans* ATCC 90028 ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าสารละลายลูกอมขิงหลังอบแห้งความเข้มข้น 4.8% (ปริมาตร/ปริมาตร) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่อยู่ภายใน Biofilm ได้ แสดงว่าค่า MIC ของสารละลายลูกอมขิงหลังอบแห้งต่อ Biofilm ของ *C. albicans* มีค่าเท่ากับ 4.8% (ปริมาตร/ปริมาตร) และต้องใช้สารละลายลูกอมขิงความเข้มข้นมากกว่า 4.8% (ปริมาตร/ปริมาตร) จึงจะสามารถฆ่าเชื้อที่อยู่ภายใน Biofilm ได้ แสดงว่าค่า MFC ของสารละลายลูกอมขิงหลังอบแห้งต่อ Biofilm ของ *C. albicans* มีค่ามากกว่า 4.8% (ปริมาตร/ปริมาตร) (ภาพที่3)



ภาพที่ 3 ค่า MIC และ MFC ของลูกอมขิงหลังอบแห้งต่อไบโอฟิล์มของ *C. albicans*

4. ค่า Minimum Eradication Biofilms Concentration (MEBC)

หลังการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของสารละลายลูกอมซิงหลังอบแห้งต่อไบโอฟิล์มของ *C. albicans* แล้วจึงย้อมหลุมทดสอบเพื่อหาประสิทธิภาพของสารละลายลูกอมซิงในการกำจัดคราบ Biofilms ที่เหลืออยู่ภายในหลุมทดสอบ ผลการทดลองพบว่าสารละลายลูกอมซิงที่ความเข้มข้น 0.3%-1.2% (ปริมาตร/ปริมาตร) สามารถลดคราบ Biofilms ลงไปได้ประมาณ 48%-52% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายลูกอมซิงเป็น 2.4% และ 4.8% (ปริมาตร/ปริมาตร) ไม่สามารถลดปริมาณไบโอฟิล์มลงไปได้เลย (ภาพที่4)



ภาพที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรจากการย้อมไบโอฟิล์มของ *C. albicans* ที่เหลือหลังบ่มรวมกับสารละลายลูกอมซิงความเข้มข้นต่างๆ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131
บพที่5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาของเราก่อนหน้านี้ (พรณิภา ศิริเพิ่มพูล, 2556) พบว่าน้ำมันหอมระเหยขิงมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง Planktonic cell และไบโอฟิล์มของเชื้อ *C.albicans* ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อราในช่องปาก โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัด และผู้ที่ติดเชื้อ HIV ที่มีระดับ CD₄ ต่ำ ดังนั้นจึงมุ่งที่จะผลิตลูกอมสมุนไพรโดยการเติมน้ำมันหอมระเหยขิงลงไปเพื่อส่งเสริมให้เกิดสุขอนามัยที่ดีภายในช่องปาก โดยเกิดการทำลายเชื้อและทำลายไบโอฟิล์มของ *C.albicans* เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวผู้วิจัยจึงตั้งตำรับลูกอมขิงและนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อและไบโอฟิล์มของเชื้อ *C.albicans* เบื้องต้นในหลอดทดลอง

ภายหลังตั้งตำรับและผลิตลูกอมขิงแล้ว เพื่อทดสอบความคงอยู่ของประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยขิงในการยับยั้ง Planktonic cell และไบโอฟิล์มของ *C.albicans* จึงได้นำลูกอมสมุนไพรที่เตรียมได้ โดยยังไม่ผ่านกระบวนการอบแห้ง มาเตรียมเป็นสารละลายและทดสอบความสามารถในการยับยั้ง Planktonic cell ของ *C.albicans* โดยหาค่า MIC และ MFC กับ *C.albicans* ATCC 90028 ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐาน และ *C.albicans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยอีก 5 isolates แล้วพบว่าสารละลายลูกอมขิงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้ โดยมีค่า MIC = 0.6 % และ MFC $\geq$ 1.2 % แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยขิงเมื่อนำมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ลูกอมแล้ว ยังคงมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *C.albicans* เนื่องจากการศึกษาของเราก่อนหน้านี้พรณิภา ศิริเพิ่มพูล (2556) พบว่าค่า MIC และ MFC ของน้ำมันหอมระเหยขิงต่อเชื้อ *C.albicans* ในหลอดทดลองมีค่าเท่ากับ 0.3% และ 0.3-0.6% (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ และแสดงว่าผงสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นองค์ประกอบพื้นฐานของตำรับลูกอมนั้น ไม่มีการต้านฤทธิ์หรือลบล้างฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยขิง จึงดำเนินการทดลองในลำดับต่อไป โดยนำลูกอมขิงที่เตรียมได้และมีฤทธิ์ต่อ *C.albicans* นั้น มาผ่านกระบวนการอบจนแห้งสนิทที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเตรียมเป็นสารละลายและทดสอบหาค่า MIC และ MFC ต่อ Planktonic cell ของ *C.albicans* ที่แยกได้จากผู้ป่วย 12 isolates และ *C.albicans* ATCC 90028 พบว่าสารละลายลูกอมขิงที่อบแห้งแล้วยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง Planktonic cell ของเชื้อทดสอบได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.2-2.4% และสามารถทำลายเชื้อทดสอบได้ด้วยระดับความเข้มข้น

บพ. 321

พ 263 W

1757

ด. 4

354991

ต่ำสุดเท่ากับหรือมากกว่า 2.4 % แสดงให้เห็นว่าขบวนการอบลูกอมซิงให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นั้นทำให้ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยลดลงบ้างแต่ไม่มากนัก เนื่องจากค่า MIC ของสารละลายลูกอมซิง ที่ผ่านการอบแห้งแล้วมากกว่าค่า MIC ของลูกอมซิงก่อนอบแห้งเพียง 1 ระดับการเจือจางแบบสองเท่าเท่านั้น

จากนั้นจึงนำสารละลายลูกอมซิงหลังอบแห้งซึ่งผ่านการทดสอบแล้วว่ามีความคงสภาพในการทำลาย Planktonic cell มาทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไบโอฟิล์มของ *C.albicans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 30 isolates รวมทั้งเชื้อมาตรฐาน *C.albicans* ATCC 90028 และพบว่าสารละลายลูกอมซิงอบแห้งสามารถยับยั้งไบโอฟิล์มได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 4.8% และหากต้องการทำลายเซลล์ภายในไบโอฟิล์มนั้น จะต้องใช้ความเข้มข้นของลูกอมซิงมากกว่า 4.8% เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของพรณิภา (2556) ก่อนหน้านี้พบว่าน้ำมันหอมระเหยซิงความเข้มข้นต่ำสุดของสารเท่ากับ 0.6%-5.0% สามารถยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อได้ดีและความเข้มข้นต่ำสุดในช่วง 2.5%-5.0% จึงจะสามารถทำลายไบโอฟิล์มของ *C. albicans* ได้แล้ว แสดงให้เห็นว่าลูกอมซิงที่อบแห้งแล้วยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายไบโอฟิล์มได้ดีเมื่อเทียบกับประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยซิงเมื่อทดสอบในรูปของสารบริสุทธิ์

เมื่อผ่านการทดสอบแล้วว่าสารละลายลูกอมซิงมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ภายในไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ได้จริงแล้ว ได้ทำการศึกษาต่อไปเพื่อหาประสิทธิภาพในการทำลายคราบไบโอฟิล์มที่เชื้อ *C. albicans* สร้างไว้แล้วอายุ 24 ชั่วโมง และพบว่าสารละลายลูกอมซิง ณ ระดับความเข้มข้น 0.3%-1.2% สามารถกำจัดหรือทำลายคราบไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างไว้แล้วประมาณ 48%-53% แสดงให้เห็นว่าลูกอมซิงที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยซิง ณ ระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้นั้นสามารถทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อได้ถึงประมาณ 50% แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายลูกอมซิงเป็น 2.4% และ 4.8% ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้นั้น ไม่มีผลในการลดคราบไบโอฟิล์ม แสดงว่าประสิทธิภาพของลูกอมซิงที่แท้จริงนั้นเกิดจากความสามารถของลูกอมในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อที่อยู่ภายในไบโอฟิล์ม แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการกำจัดคราบไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างไว้ก่อนแล้วได้อย่างสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

- พรรณีภา ศรีเพิ่มพูล. (2556). ผลของน้ำมันหอมระเหยขิงต่อ planktonic cells และไบโอฟิล์มของ *Candida albicans*. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด, 25 (3), 264-272.
- Agarwal, V., Lal, P., & Pruthi, V. (2008). Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. *Mycopathologia*, 165, 13-19.
- ✓ Agarwal, V., Lal, P., & Pruthi, V. (2010). Effect of plant oil on *Candia albicans*. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 5, 447-451.
- Ahmad Khan, M., & Ahmad, I. (2012). Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 140, 416-423.
- Akoachere, J. F., Ndip, R. N., & Chenwi, E. B. (2002). Antibacterial effect of *Zingiber officinale* and *Garcinia kola* on respiratory tract pathogens. *East African Medical Journal*, 79, 588-592.
- Al-Amin, & Zainab, M. (2006). Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of ginger (*Zingiber officinale*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *British Journal of Nutrition*, 96, 660-666.
- Barasch, A., Safford, M. M., Depakute, M. I., & Fine, D.H. (2004). Efficacy of chlorhexidine gluconate rinse for treatment and prevention of oral candidiasis in HIV-infected children :a pilot study. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Oral Endodontics*, 97, 204 – 207.
- Beachey, E. H. (1981). Bacterial adherence: adhesion-receptor interaction mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *The Journal of Infectious Diseases*, 143, 325-345.

- Brown, M. R. W., & Gilbert, P. (1993). Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *The Journal of Applied Bacteriology*, 74, 87S-97S.
- Calderone, R. A., & Brawn, P. C. (1991). Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiology Review*, 55, 1-20.
- De Bernardis, F., Agatensi, L., Ross, I. K. *et al.*, (1990). Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 161(6), 1276-1283.
- Ghannoum, M., & Asu-Elteen, K. (1968). Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 24, 407-413.
- Giuliana, G., Pizzo, G., Milici, M.E., & Giangreco, R. (1999). In vitro activities of antimicrobial agent against *Candida* species. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Oral Endodontics*, 87, 44 – 49.
- Guh, J. H. (1995). Antiplatelet effect of gingerol isolated from *Zingiber officinale*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 47, 329-332.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews*, 2, 95-108.
- Hasenclever, H. F., & Mitchell, W. O. (1961). Antigenic studies of *Candida*. I. observation of two groups of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 82, 570-573.
- Hazen, K. C. (1989). Participation of yeast cell surface Hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. *Infection and Immunity*, 57, 1894-1900.

- Heidenreich, F., & Dierich, M. P. (1985). *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b. *Infection and Immunity*, 50, 598-600.
- Jain, N., Kohli, R., Cook, E., Gialanella, P., Chang, T., & Fries, B.C. (2007). Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Applied and Environmental Microbiology* 73(6),1679 – 1703.
- Kawai, T. (1994). Anti-emetic principles of *Magnolia obovata* Bark and *Zingiber officinale* rhizome. *Planta Medica*, 60(1), 17-20.
- Kiuchi, F., Iwakami, S., Shibuya, M., Hanaoka, F., & Sankawa, U. (1992). Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40, 387-391.
- MacDonald, F., & Odds, F. C. (1980). Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. *Journal of Medical Microbiology*, 13, 423-435.
- Mascolo, R., & Jain, S. C. (1989). Ethnopharmacologic investigation of ginger (*Zingiber officinale*). *Journal of Ethnopharmacology*, 27, 29-40.
- Meyer, B. (2003). Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51, 249-253.
- Mickiene, R., Ragazinskiene, O., & Bakutis, B. (2011). Antimicrobial activity of *Mentha arvensis* L. and *Zingiber officinale* R. essential oils. *Biologija*, 57(2), 92-97.
- Miller, T.F., Kelley, I.I., Jabra, M.A., Depaolo, L.G., Baqui, A.A., & Falker, W.A. (2001). In vitro studies of the efficacy of antimicrobial against-fungi. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Oral Endodontics*, 91, 663-670.

- National Committee for Clinical and Laboratory Standards. (1997). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, vol. 17, no. 9. Approved standard M27-A. National Committee for Clinical and Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- Ojewole, J. (2006). Analgesic, anti-inflammatory and hypoglycaemic effects of ethanol extract of *Zingiber officinale* (Roscoe) rhizomes (*Zingiberaceae*) in mice and rats. *Phytotherapy Research*, 20, 764-772.
- Platel, K. & Srinivasan, K. (1995). Influence of common dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 47, 55-59.
- Pozzatti, p., Scheid, L. A., Spader, T. B., Atayde, M. L., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2008). In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, 54 (11): 950-956.
- Ryan, K. J., & Ray, C. G. Sherris medical microbiology, 5th ed. 2010. New York; McGraw-Hill Medical.
- Ray, T. L., & Payne, C. D. (1988). Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine Candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. *Infection and Immunity*, 56, 1942-1949.
- Rotrosen, D., Calderone, R. A. & Edwards, J. E. Jr. (1986). Adherence of *Candida* species to host tissues and plastic surfaces. *Review of Infectious Diseases*, 8, 73-85.
- Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D., & Bilk, J. (2003). *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 2404-2412.

- Sasidharan, I., & Menon, A. N. (2010). Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh & dry ginger oils (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2(4), 40-43.
- Sharma, A. M., & Yadav, S. (2008). Biofilms: Microbe and disease. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12, 526-530.
- Shen, C. L., Hong, K. J. & Kim, S. W. (2003). Effect of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) on decreasing the production of inflammatory mediators in sow osteoarthrotic cartilage explants. *Journal of Medicinal Food*, 6, 323-328.
- Shimizu, K., Kondoh, Y., & Tanaka, K. (1987). Proteinase production and pathogenicity of *Candida albicans*. I. Invasion into chorioallantoic membrane by *C. albicans* strains of different proteinase activity. *Microbiology and Immunology*, 31, 1045-1060.
- Srivastava, K. C., & Mustafa, T. (1989). Ginger (*Zingiber officinale*) and rheumatic disorders. *Medical Hypotheses*, 29, 25-28.
- Takahashi, M., Inouye, S., & Abe, S. (2011). Anti-*Candida* and radical scavenging activities of essential oils and oleoresins of *Zingiber officinale* Roscoe and essential oils of other plants belonging to the family *Zingiberaceae*. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 5(5), 238-245.
- Vianna, M.E., Gomes, B. P. F., Berder, V.B., Zaia, A.A., Feraz, C.R., & Souzafilho, F.J. (2004). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Oral Endodontics*, 97, 79-84.

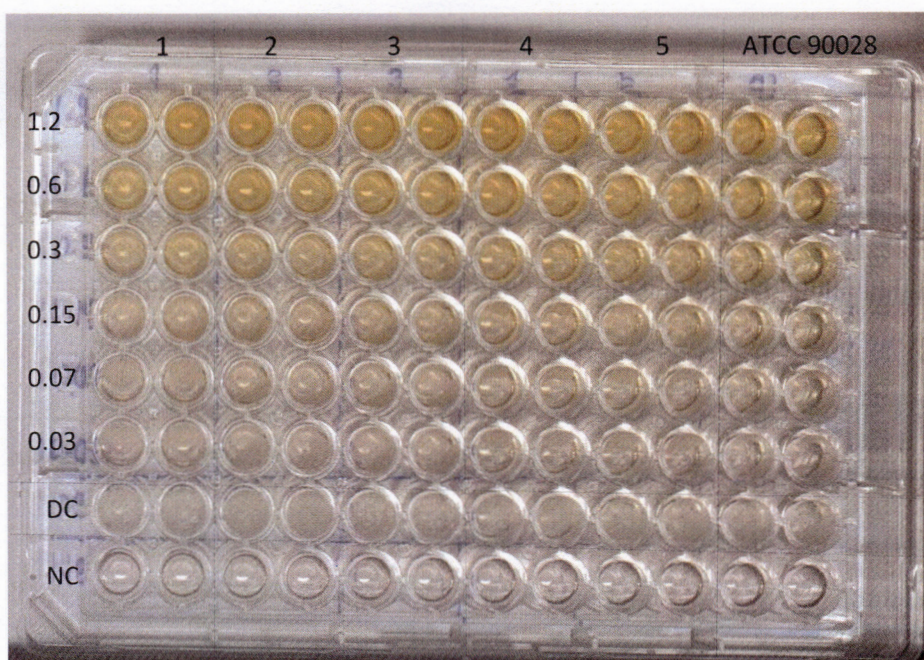
Zhang, Z., Elsohly, H. N., Jacob, M.R., Pasco, D. S., Walker, L. A., & Clark, A.M. (2002).

Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic protease from *Tovomita krukovi*. *Planta Medica*, 68, 49-54 .

ภาคผนวก ก
ภาพประกอบผลการทดสอบ

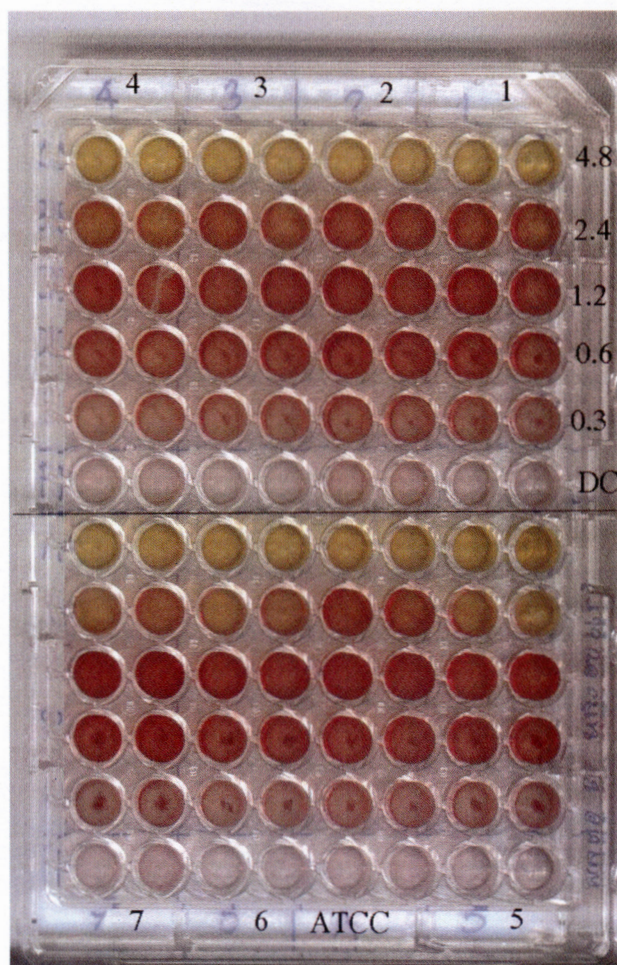


ภาพที่ 5 ผลิตภัณฑ์ลูกอมขิง (Ginger Lozenges)



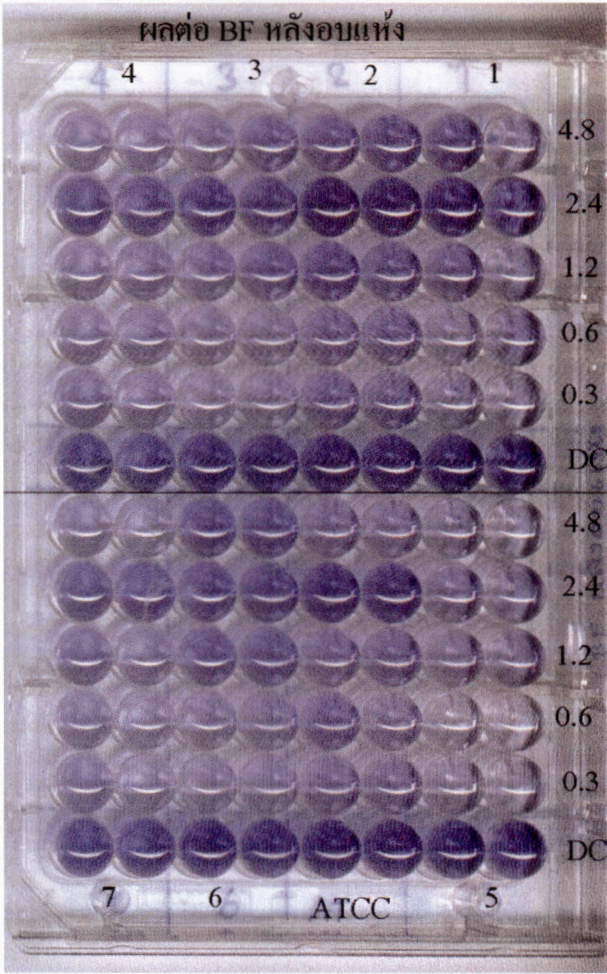
ภาพที่ 6 ผล MIC ของลูกอมขิงก่อนอบแห้งต่อ Planktonic cell ของ *C. albicans*

(ค่า MIC ของเชื้อทดสอบทุก isolates = 0.6%)



ภาพที่ 7 ผล MIC ของลูกอมขิงหลังอบแห้งต่อไบโอฟิล์มของ *C. albicans*

(ค่า MIC ของเชื้อทดสอบทุก isolates = 4.8%)



ภาพที่ 8 ผลการย่อยสลายไบโอฟิล์มของ *C. albicans* หลังได้รับสารละลายลูกอมซึ่งอบแห้งความเข้มข้นแตกต่างกัน