

ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าพืชวงศ์ขิง

ปฐมาพร ปรีษากร^{*‡}, กัญจน์รัชต์ เศรษฐศุภพนา^{*}, นันทวรรณ เมฆา[†],
รินทร์ลภัส อรรถเกียรติไชย[†], ปณิตดา เทพอัศธร^{*}, อังคณา หิรัญสาลี^{*}

บทคัดย่อ

หลักการและวัตถุประสงค์ โรคผิวหนังจากเชื้อราเป็นการติดเชื้อของผิวหนังชั้นนอก มีสาเหตุหลักมาจากเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ และสามารถรักษาได้ด้วยยาต้านเชื้อรา นอกจากนี้ ยังพบว่าสมุนไพรไทยหลายชนิดมีการอ้างถึงสรรพคุณในการรักษาโรคผิวหนัง อย่างไรก็ตามสมุนไพรบางชนิดยังขาดงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่ชัดเจนมายืนยันประสิทธิผลในการรักษา การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดเหง้าพืชวงศ์ขิง ซึ่งสมุนไพรหลายชนิดในวงศ์นี้มีสรรพคุณในการรักษาโรคผิวหนัง

ระเบียบวิธีศึกษา ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราและฆ่าเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ คือ *Candida albicans* และเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ 3 ชนิด คือ *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* และ *Microsporum gypseum* ของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าพืชวงศ์ขิง จำนวน 15 ชนิด ด้วยวิธี broth microdilution assay

ผลการศึกษา จากสารสกัด 15 ชนิด ขมิ้นขาวป่าและไพลดำแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดีที่สุด โดยแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ *C. albicans* และเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ที่ทำการศึกษาที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) น้อยกว่า 50 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรตามลำดับ สมุนไพรทั้งสองชนิดแสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อรา (Minimum Fungicidal Concentration, MFC) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และฆ่าเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ที่ MFCs 3.13 - 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร

อภิปรายและสรุป เหง้าขมิ้นขาวป่าและไพลดำแสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อราได้ดีและสามารถฆ่าเชื้อราได้ ดังนั้นจึงน่าสนใจในการนำไปศึกษาสารออกฤทธิ์ และพัฒนาตำรายาต้านเชื้อราต่อไป

คำสำคัญ: ขมิ้นขาวป่า, ไพลดำ, ฤทธิ์ต้านเชื้อรา, ฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา, พืชวงศ์ขิง

^{*}สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี 11000

[†]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี 11000

[‡]ผู้รับผิดชอบบทความ: patamaporn.p@dmasc.mail.go.th

Received date 20/11/15 ■ Accepted date 03/06/16

ภูมิหลังและเหตุผล

โรคเชื้อราเป็นโรคที่พบได้บ่อยในประเทศเขตร้อนชื้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเชื้อราที่ผิวหนัง เช่น โรคกลาก เกลื้อน เชื้อราที่หนังศีรษะ เล็บ มือ เท้า ขาหนีบและบริเวณที่อับชื้น ส่วนมากเกิดจากเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์^[1-3] นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากเชื้อ *Candida albicans* ได้ด้วย^[2] โรคเชื้อราที่ผิวหนังสามารถรักษาให้หายขาดได้โดยการทายาต้านเชื้อรา แต่ต้องรักษาต่อเนื่องยาวนาน^[3,4] ปัญหาที่เกิดขึ้นในการรักษาคือการหยุดยาที่เร็วเกินไปเมื่อมีอาการแสดงดีขึ้นโดยที่ยังมีเชื้อหลงเหลืออยู่ ทำให้มีโอกาสกลับมาเป็นซ้ำ และต้องกลับมาใช้ยาต้านเชื้อราอีก ปัจจุบันยารักษาเชื้อราที่ใช้ต้องนำเข้าผลิตภัณฑ์ยาและตัวยาลำคัญสำหรับการผลิตจากต่างประเทศ ในขณะที่การรักษาตามวิธีพื้นบ้านดั้งเดิมของไทยโดยใช้สมุนไพรเช่น ใบฝรั่ง ใบชุมเห็ดเทศ ขิง และข่า มาทาบริเวณรอยโรคก็สามารถรักษาได้^[5] แต่ยังคงมีข้อจำกัดด้านความสะดวกในการนำไปใช้ ซึ่งสมุนไพรเหล่านี้โดยเฉพาะพืชในวงศ์ขิงหลายชนิดมีการอ้างถึงสรรพคุณในการรักษาโรคผิวหนังและบางชนิดมีรายงานผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วย เช่น น้ำมันสกัดและสารสกัดขิงมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจากอาหารและแบคทีเรียที่ทำลายฟัน^[6,7] น้ำมันสกัดจากเหง้าข่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์ และเชื้อราก่อโรคที่ผิวหนังบางชนิด^[8] น้ำมันสกัดจากเหง้าขมิ้นชันแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด^[9,10] และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ผิวหนังได้ทั้งการศึกษาในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง^[11]

ด้วยพืชในวงศ์ขิงเป็นแหล่งของเครื่องเทศและสมุนไพรที่มีความหลากหลายสูง สามารถหาได้ง่าย

ในทุกภาคของประเทศไทย และมีสรรพคุณที่โดดเด่นในการต้านจุลินทรีย์ จึงน่าสนใจสำหรับนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคที่ผิวหนัง เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการนำสมุนไพรมาพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อราสำหรับเป็นทางเลือกทดแทนการใช้ยาแผนปัจจุบันที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราทั้งเชื้อชนิดยีสต์และเชื้อรา กลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าพืชวงศ์ขิงจำนวน 15 ชนิด ด้วยวิธี broth microdilution assay และได้ทำการทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อราของสารสกัดดังกล่าว เหง้าพืชทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาเป็นสมุนไพรวงศ์ขิงที่พบบ่อยสำหรับใช้รักษาโรคหรือเป็นอาหารในประเทศไทย

ระเบียบวิธีศึกษา

ตัวอย่างสมุนไพร

เหง้าของกระเทียม (*Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe) ขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) เปราะหอม (*Kaempferia galanga* L.) ไพล (*Zingiber montanum* (J.König) Link ex A. Dietr.) ว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) และว่านนางคำ (*Curcuma aromatica* Salisb.) ชื่อจากจังหวัดราชบุรี ในปี 2556 กระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker) และขมิ้นดำ (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) ชื่อจากจังหวัดนนทบุรี ในปี 2557 กระชาย (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf) ข่า (*Alpinia galangal* (L.) Willd.) ขมิ้นขาว (*Curcuma mangga* Valetton & Zijp) ขมิ้นขาวป่า (*Curcuma amada* Roxb.) และไพลดำ (*Zingiber ottensii* Valetton)

เก็บจากจังหวัดราชบุรีระหว่างปี 2556 - 2557 เก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงเพื่องานวิจัยไว้ที่สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กรุงเทพฯ

การเตรียมสารสกัดเอทานอลจากเหง้าสมุนไพร

ส่วนของเหง้าสมุนไพรสดถูกหั่นให้มีขนาดเล็กและผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำสมุนไพรแห้งประมาณ 10 - 20 กรัม มาหมักด้วยเอทานอลเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 คืน ในอัตราส่วน 1 กรัมของสมุนไพรแห้งต่อเอทานอล 20 มิลลิลิตร โดยทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำสารสกัดเอทานอลมาระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำสารสกัดหยาบที่ได้มาเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา โดยละลายสารสกัดหยาบด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบ

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อราที่ใช้ศึกษาได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประกอบด้วย เชื้อยีสต์ 1 ชนิด คือ *Candida albicans* DMST 5815 และเชื้อราแบบมีเส้นใยกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ 3 ชนิด คือ *Trichophyton rubrum* DMST 30263, *Trichophyton mentagrophytes* DMST 19735, และ *Microsporum gypseum* DMST 21146 โดยทำการเพาะเลี้ยงบน sabouraud dextrose agar slants และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารใหม่อย่างน้อยทุก 2 สัปดาห์ เตรียมเชื้อสำหรับการทดสอบโดยเจือจางเชื้อแต่ละชนิดใน

0.85% sodium chloride (NaCl) เพื่อให้มีความหนาแน่นของเชื้อ $1 - 5 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีความขุ่นเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 McFarland standard สำหรับเชื้อยีสต์และ 1 McFarland standard สำหรับเชื้อราแบบมีเส้นใย จากนั้นเจือจางเชื้ออีกครั้งด้วยอาหาร RPMI-MOPS (RPMI 1640 medium, without sodium bicarbonate ที่มีส่วนประกอบของ 2 mM L-glutamine และ 165 mM morpholinepropanesulfonic acid (MOPS)) ในอัตราส่วน 1:500 และ 1:50 ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยวิธี Broth microdilution assay

การทดสอบใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการตาม National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) guideline^[12,13] โดยเตรียมสารสกัดสมุนไพรสำหรับทดสอบในอาหาร RPMI-MOPS ให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ต้องการศึกษา เตรียมเป็น two-fold serial dilution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใน 96-well culture plate ชนิด flat bottom สำหรับการทดสอบเชื้อยีสต์และใช้ plate ชนิด U-shape wells สำหรับการทดสอบเชื้อราแบบมีเส้นใย ทำการทดสอบตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดซ้ำ 2 ครั้ง ใช้ ketoconazole เป็น positive control และใช้ DMSO เป็น negative control ใส่เชื้อที่เตรียมไว้สำหรับการทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม บ่มเพาะเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับเชื้อยีสต์ และ 96 - 120 ชั่วโมงสำหรับเชื้อราแบบมีเส้นใย หลังจากครบกำหนดการบ่มเลี้ยง อ่านผลการทดสอบโดยดูความ

ขุนเป็นตัวอย่างชี้การเจริญของเชื้อรา ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ตัดสินจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อราในหลุม

การทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราสามารถนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อรา (Minimum Fungicidal Concentration, MFC) ได้โดยนำอาหารเพาะเลี้ยงจากหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อมา spread ลงบนอาหาร sabouraud dextrose agar นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สำหรับเชื้อยีสต์ และ 4 - 7 วัน สำหรับเชื้อราแบบมีเส้นใย สังเกตการเจริญของเชื้อราบนอาหาร ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราตัดสินจากความเข้มข้นที่ไม่พบการเจริญของเชื้อราบนอาหารเพาะเลี้ยง

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดสมุนไพรต่อหน่วยเวลา

การศึกษา time - kill curve ของสารต้านเชื้อราทำโดยเตรียมสารสกัดสมุนไพรและ ketoconazole ในอาหาร RPMI-MOPS ให้มีความเข้มข้นของสารเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ต้องการศึกษา คือ MIC และ MFC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมเชื้อ *C. albicans* ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland standard แล้วเจือจางเชื้อที่ได้ด้วย RPMI-MOPS ในอัตราส่วน 1 : 500 ผสมเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารต้านเชื้อราที่เตรียมไว้ ใช้ DMSO เป็น negative control แล้วบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3,

6, 9, 12, 15, 18, 21, และ 24 นำตัวอย่างเพาะเลี้ยงที่เก็บได้มาทำการเจือจางแล้ว spread ลงบนอาหาร sabouraud dextrose agar บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนของเชื้อที่เหลืออยู่

ผลการศึกษา

การสกัดเหง้าของสมุนไพรวงศ์ขิงที่มีการใช้และจำหน่ายทั่วไปจำนวน 15 ชนิด ด้วยเอทานอล ได้ปริมาณสารสกัดที่คำนวณจากน้ำหนักแห้งของเหง้าสมุนไพรดังนี้ (% yields, w/w) กระชาย (4.97%) กระชายดำ (2.77%) กระทือ (14.58%) ขมิ้นขาว (1.71%) ขมิ้นขาวป่า (4.35) ขมิ้นชัน (10.09%) ขมิ้นดำ (3.51%) ขมิ้นอ้อย (11.71%) ข่า (11.05%) ขิง (4.06%) เปราะหอม (3.61%) ไพล (10.45%) ไพลดำ (4.06%) ว่านชักมดลูก (9.65%) และว่านนางคำ (8.20%) และเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยวิธี broth microdilution assay ในช่วงความเข้มข้น 1.56 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากเหง้าสมุนไพร 7 ชนิด คือ ขมิ้นขาวป่า ขมิ้นชัน ขมิ้นดำ ขมิ้นอ้อย ไพลดำ ว่านชักมดลูก และว่านนางคำ แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อเชื้อกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบที่ MICs และ MFCs ระหว่าง 12.50 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นสารสกัดจากเหง้าสมุนไพร 2 ชนิด คือ ขมิ้นขาวป่าและไพลดำ (รูปที่ 1) ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดีต่อเชื้อราที่ใช้ทดสอบทั้ง 4 ชนิด โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* ที่ MICs 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และแสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา *C. albicans* ที่ MFCs 100



รูปที่ 1 ก) ต้น ดอก และเหง้าของขมิ้นขาวป่า ข) ต้น ดอก และเหง้าของโพลดำ

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ด้านเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ คือ *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, และ *M. gypseum* ที่ MICs และ MFCs 3.13 - 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 1

การศึกษาผลของสารสกัดเหง้าขมิ้นขาวป่าและโพลดำต่อการเจริญของเชื้อ *C. albicans* โดยทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อหน่วยเวลาเพื่อแสดง time - kill curve ของสารสกัดสมุนไพรเปรียบเทียบกับ ketoconazole พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากสมุนไพรทั้งสองชนิดที่ MICs และ MFCs แสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา (fungicidal activity) ต่อเชื้อ *C. albicans* โดยสามารถฆ่าเชื้อราได้ตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการทดสอบ และความเข้มข้นของสารสกัดจากสมุนไพรที่ MFCs สามารถฆ่าเชื้อราได้หมดภายใน 2 ชั่วโมง ในขณะที่ ketoconazole ที่ MIC แสดงเพียงฤทธิ์

ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (fungistatic activity) เท่านั้น (รูปที่ 2)

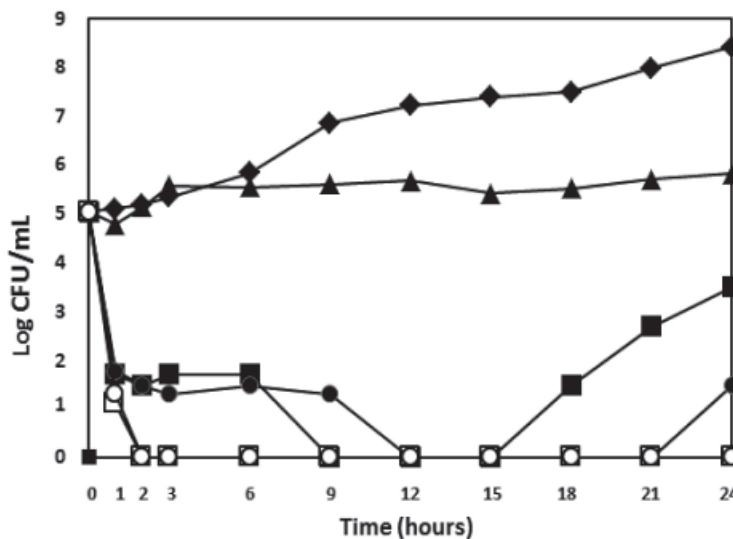
อภิปรายผล

สมุนไพรในวงศ์ขิงเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนชื้น มีการนำมาใช้ประโยชน์ที่หลากหลายทั้งเป็นไม้ประดับ อาหาร เครื่องเทศ และสมุนไพรสำหรับรักษาโรค ในประเทศไทยมีการนำพืชวงศ์ขิงมาใช้เพื่อเป็นอาหารและเป็นยารักษาโรคมาอย่างยาวนาน^[14] สารสกัดจากเหง้าพืชวงศ์ขิงหลายชนิด มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลายรวมถึงฤทธิ์ในการต้านจุลชีพด้วย^[15-17] อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการนำสมุนไพรวงศ์ขิงที่พบในประเทศไทยมาศึกษาฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเชื้อราซึ่งเป็นสาเหตุในการก่อโรคผิวหนังจากเชื้อรามาก่อน ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ดังกล่าว โดยได้

ตารางที่ 1 ค่า MICs และ MFCs ของสารสกัดสมุนไพรจากเหง้าของพืชวงศ์ขิงต่อเชื้อรา

ชื่อท้องถิ่น	ความเข้มข้นต่ำสุด ที่แสดงฤทธิ์ (µg/mL)	ชนิดของเชื้อรา			
		<i>C. albicans</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. gypseum</i>
กระชาย	MIC	-	100	50	100
	MFC	-	-	-	-
กระชายดำ	MIC	-	50	25	100
	MFC	-	-	100	-
กระเทียม	MIC	-	-	50	-
	MFC	-	-	-	-
ขมิ้นขาว	MIC	-	-	-	-
	MFC	-	-	-	-
ขมิ้นขาวป่า	MIC	25	3.13	3.13	3.13
	MFC	100	3.13	3.13	3.13
ขมิ้นชัน	MIC	-	12.50	12.50	50
	MFC	-	50	25	100
ขมิ้นดำ	MIC	-	12.50	12.50	12.50
	MFC	-	50	25	25
ขมิ้นอ้อย	MIC	-	25	25	50
	MFC	-	50	50	100
ข่า	MIC	-	-	-	-
	MFC	-	-	-	-
ขิง	MIC	-	-	100	-
	MFC	-	-	-	-
เปราะหอม	MIC	-	-	-	-
	MFC	-	-	-	-
ไพล	MIC	-	-	-	-
	MFC	-	-	-	-
ไพลดำ	MIC	50	6.25	3.13	3.13
	MFC	100	6.25	3.13	3.13
ว่านชักมดลูก	MIC	-	12.50	6.25	50
	MFC	-	50	12.50	50
ว่านนางคำ	MIC	-	25	25	50
	MFC	-	50	25	50
ketoconazole	MIC	100	0.31	1.56	1.25
	MFC	-	1.25	12.50	10

- : MIC or MFC > 100 µg/mL



รูปที่ 2 time-kill curves ของสารสกัดขมิ้นขาวป่าและโพลด้าต่อเชื้อ *C. albicans* เปรียบเทียบกับ ketoconazole โดยสัญลักษณ์ ◆ แทน control, ■ แทนความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นขาวป่าที่ MIC (25 µg/mL), □ แทนความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นขาวป่าที่ MFC (100 µg/mL), ● แทนความเข้มข้นของสารสกัดโพลด้าที่ MIC (50 µg/mL), ○ แทนความเข้มข้นของสารสกัดโพลด้าที่ MFC (100 µg/mL), และ ▲ แทนความเข้มข้นของ ketoconazole ที่ MIC (100 µg/mL)

คัดเลือกเหง้าของสมุนไพรในวงศ์นี้ที่มีใช้และจำหน่ายทั่วไปมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุในการก่อโรคที่ผิวหนัง โดยใช้เชื้อยีสต์ *C. albicans* และเชื้อราแบบมีเส้นใยกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ 3 ชนิด คือ *T. rubrum* เป็นตัวแทนของกลุ่มเชื้อราที่มักก่อโรคในคน (anthropophilic species), *T. mentagrophytes* เป็นตัวแทนของกลุ่มเชื้อราที่มักก่อโรคในสัตว์ (zoophilic species), และ *M. gypseum* เป็นตัวแทนของเชื้อราที่เจริญได้ดีในสิ่งแวดล้อม (geophilic species) และก่อโรคโดยการติดเชื้อที่รอยถลอกหรือบาดแผลบนผิวหนัง ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในประเทศเขตร้อนชื้น^[1]

การศึกษาพบว่าเหง้าของสมุนไพรส่วนใหญ่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ที่ทำการศึกษานี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชสกุลขมิ้น (*Curcuma*) ได้แก่ ขมิ้นขาวป่า ขมิ้นชัน ขมิ้นดำ ขมิ้นอ้อย ว่านชักมดลูก

และว่านนางคำ แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ MICs และ MFCs 3.13 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นขมิ้นขาวป่า แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* ที่ MIC 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และฆ่าเชื้อราที่ MFC 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามจากพืชสกุลขมิ้น 7 ชนิดที่นำมาทดสอบพบว่าขมิ้นขาวไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ใช้ทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ผลการทดสอบพืชสกุลอื่นที่ทำการศึกษา เช่น สกุลขิง (*Zingiber*), สกุลเปราะ (*Kaempferia*), สกุลกระชาย (*Boesenbergia*), และสกุลข่า (*Alpinia*) พบว่าในพืชสกุลขิงที่ทำการศึกษานี้ 4 ชนิด (กระทือ ขิง ไพล และโพลด้า) สารสกัดจากเหง้าโพลด้าแสดงฤทธิ์ดีที่สุดเมื่อเทียบกับพืชสกุลเดียวกัน และมีความแรงของฤทธิ์ต้านเชื้อราใกล้เคียง

เคียงกับสารสกัดจากเหง้าขมิ้นขาวป่า ในขณะที่พืชชนิดอื่นในสกุลนี้มีฤทธิ์อ่อนกว่ามาก สำหรับพืชสกุลเปราะ (กระชายดำ และเปราะหอม) สกูลกระชาย และสกุลข่าที่ศึกษาก็แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ทำการทดสอบที่ระดับความแรงต่ำกว่าไพลดำ และพืชสกุลขมิ้นทั้ง 6 ชนิด (ขมิ้นขาวป่า ขมิ้นชัน ขมิ้นดำ ขมิ้นอ้อย ว่านชักมดลูก และว่านหางค่าง) เช่นกัน

ผลการทดสอบฤทธิ์ของเหง้าพืชวงศ์ขิงในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับผลการศึกษาพืชวงศ์นี้ที่มีรายงานมาก่อน พบว่ามีความสอดคล้องกัน เช่น การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในมนุษย์ของพืชวงศ์ขิงที่ใช้โดยชาวเคนยา เกาะบอร์เนียว ประเทศอินโดนีเซีย^[18] และการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันสกัดจากพืชวงศ์ขิงในประเทศมาเลเซีย^[19] ซึ่งทั้งสองการศึกษาพบว่าพืชในวงศ์นี้ส่วนใหญ่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา อย่างไรก็ตามไม่สามารถเปรียบเทียบระดับความแรงในการต้านเชื้อราของพืชจากผลการทดสอบของแต่ละการศึกษาได้ เนื่องจากมีวิธีการสกัด การทดสอบฤทธิ์ และชนิดของเชื้อราที่ใช้ศึกษาแตกต่างกัน

ในการศึกษานี้เหง้าของขมิ้นขาวป่าและไพลดำแสดงฤทธิ์ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ สำหรับขมิ้นขาวป่านั้นมีการนำไปใช้เป็นสมุนไพรเพื่อการรักษาโรคที่หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศอินเดียมีการนำไปใช้เพื่อแก้ไข้ ขับปัสสาวะ ขับเสมหะ แก้อักเสบ รักษาโรคผิวหนัง บาดแผลเปิด แก้ปวดท้อง และเป็นยาระบายเป็นต้น^[20,21] อย่างไรก็ตามการนำขมิ้นขาวป่ามาใช้เป็นสมุนไพรในประเทศไทยยังมีบันทึกข้อมูลที่ไม่ชัดเจน ในขณะที่ไพลดำมีการนำไปใช้เป็นสมุนไพรเพื่อการรักษาอาการเคล็ดขัดยอก ฟกช้ำ ขับประจำเดือน แก้บิด และสมานลำไส้^[22] สารสกัดสมุนไพรทั้งสอง

ชนิดเมื่อนำมาศึกษาผลของสารสกัดต่อการเจริญของเชื้อ *C. albicans* พบว่าสามารถฆ่าเชื้อได้ในขณะที่ ketoconazole ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อราที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน แสดงฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญของเชื้อแต่ไม่ฆ่าเชื้อรา จากการที่ทั้งเหง้าขมิ้นขาวป่าและไพลดำแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ผลดีใกล้เคียงกับยาต้านเชื้อราที่มีจำหน่ายอยู่ในปัจจุบันและยังสามารถฆ่าเชื้อราได้ด้วย ดังนั้นสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้ จึงอาจนำไปใช้ในการรักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อราได้

ข้อสรุป

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าพืชวงศ์ขิงในครั้งนี้ ผลการทดสอบที่ได้เป็นการยืนยันถึงสรรพคุณของสมุนไพรบางชนิดในการนำไปใช้รักษาโรคผิวหนังที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมุนไพรสกุลขมิ้นซึ่งส่วนใหญ่ให้ผลดีต่อการต้านเชื้อราก่อโรคที่ผิวหนัง ผลการศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนการนำสมุนไพรเหล่านี้ไปใช้สำหรับรักษาโรค เพื่อทดแทนการใช้ยาแผนปัจจุบันที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศได้นอกจากนี้ในการทดสอบพืชวงศ์ขิง 15 ชนิด เหง้าขมิ้นขาวป่าและไพลดำเป็นสมุนไพรที่ต้านเชื้อราได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสมุนไพรอื่นที่ทำการศึกษ ด้วยเหตุนี้สมุนไพรทั้ง 2 ชนิด จึงน่าสนใจสำหรับนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อแยกสารออกฤทธิ์ให้บริสุทธิ์ และนำไปพัฒนาเป็นตำรายาต้านเชื้อราจากสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อราในรูปแบบต่าง ๆ สำหรับใช้รักษาการติดเชื้อราที่ผิวหนังได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และฟิสิกส์-คณิตศาสตร์ ภาควิชาการเกษตร และสำนักงาน

หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจระบุชื่อชนิดพันธุ์พืช และเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงเพื่องานวิจัย และขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในการ ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Luplertlop N, Suwanmanee S. Dermatophytosis: from bench to bedside. J Trop Med Parasitol. 2003;36:75-87.
- Nenoff P, Krüger C, Schaller J, Ginter-Hanselmayer G, Schulte-Beerbunl R, Tietz HJ. Mycology- an update part 2: dermatomycoses: clinical picture and diagnostics. J Dtsch Dermatol Ges. 2014;12(9):749-77.
- Gupta AK, Ryder JE, Chow M, Cooper EA. Dermatophytosis; the management of fungal infections. Skinmed. 2005;4(5):305-10.
- Degreef HJ, DeDoncker PR. Current therapy of dermatophytosis. J Am Acad Dermatol. 1994;31:S25-30.
- สมุนไพรไทยเบส. สมุนไพรต้านเชื้อรา ปัญหาหัวใจ ยามฝนพำ. [ออนไลน์]. 2555. [12 สิงหาคม 2558]; ที่มา: <http://www.abhaiherb.com/knowledge/thaiherb/1366>
- Singh G, Kapoor IP, Singh P, de Heluani CS, de Lampasona MP, Catalan CA. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigation on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. Food Chem Toxicol. 2008;46(10):3295-302.
- Azizi A, Aghayan S, Zaker S, Shakeri M, Entezari N, Lawaf S. In vitro effect of *Zingiber officinale* extract on growth of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. Int J Dent. 2015;4. Doi: 10.1155/2015/489842. PubMed PMID: 26347778
- Chudiwal AK, Jain DP, Somani RS. *Alpenia galangal* Willd.- An overview on phyto-pharmacological properties. IJNPR. 2010;1(2):143-9.
- Singh R, Chandra R, Bose M, Luthra PM. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. Curr Sci. 2002;83(6):737-40.
- Wuthi-udomlert M, Grisanapan W, Luanratana O, Caichompoo W. Antifungal activity of *Curcuma longa* grown in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2000;31:178-82.
- Apisariyakul A, Vanittanakom N, Buddhasukh D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). J Ethnopharmacol. 1995;49(3):163-9.
- Polgar PE. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 2nd ed: NCCLS Document M27-A2; 2002. 31 p.
- The Clinical and Laboratory Standard Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. 2nd ed: CLSI Document M38-A2; 2008. 13 p.
- Siriruga P. Thai Zingiberaceae: species diversity and their uses. Pure Appl Chem. 1998;70(11):1-8.
- Norajit K, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O. Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils. Molecules. 2007;12(8):2047-60.
- Habsah M, Amran M, Mackeen MM, Lajis NH, Kikuzaki H, Nakatani N, et al. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. J Ethnopharmacol. 2000;72(3):403-10.
- Chen IN, Chang CC, NgCC, Wang CY, Shyu YT, Chang TL. Antioxidant and antimicrobial activity of Zingiberaceae plants in Taiwan. Plant Foods Hum Nutr. 2008;63:15-20.
- Ficker CE, Smith ML, Susiarti S, Leaman DJ, Irawati C, Arnason JT. Inhibition of human pathogenic fungi by member of Zingiberaceae used by the Kenyah (Indonesian Borneo). J Ethnopharmacol. 2003;85(2-3):289-93.
- Jantan IB, Yassin MSM, Chin CB, Chen LL, Sim NL. Antifungal activity of the essential oils of nine Zingiberaceae species. Pharm Biol. 2003;41(5):392-7.
- Policegoudra RS, Aradhya SM, Singh L. Mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.)- A promising spice for phytochemicals and biological activities. J Biosci. 2011;36:739-48.
- Jatoi SA, Kikuchi A, Gilani SA, Watanabe KN. Phytochemical, pharmacological and ethnobotanical studies in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb. : Zingiberaceae). Phytother Res. 2007;21:507-16.
- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. สยามโกษะชย พฤษภ: ภูมิปัญญาของชาติ. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง; 2539.

Abstract

Antifungal Activity of Ethanolic Extracts from the Rhizomes of Zingiberaceae Plants
Patamaporn Pruksakorn^{*,‡}, Kanjarat Settasupana^{*}, Nanthawan Mekha[†], Rinrapas Autthateinchai[†], Panadda Dhepakson^{*}, Angkana Herunsalee^{*}

^{*}Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand.

[†]National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand.

[‡]Corresponding author: patamaporn.p@dmsc.mail.go.th

Rationale and Objective: Dermatophytosis is a fungal infection of the skin caused by any of dermatophytes and can be treated with currently available antifungal medication. Moreover, the infection can be cured with medicinal plants topically applied on the infected area. In Thai folk medicine, many medicinal plants have been claimed to be effective for treating dermatitis. However, some of them still lack scientific data for supporting the effectiveness of treatment. The objective of this study was to investigate antifungal activities of ethanolic extracts from the rhizomes of plants in the Zingiberaceae family.

Methodology: The ethanolic rhizome extracts of 15 Zingiberaceae species were tested for antifungal activities against *Candida albicans* and three dermatophytes, i.e. *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum* using a broth microdilution assay.

Results: Amongst 15 extracts, the rhizomes of *Curcuma amada* Roxb. and *Zingiber ottensii* Valetton exhibited the most potent antifungal activities against both the yeast and dermatophytes with minimum inhibitory concentration (MIC) values of less than 50 and 6.25 µg/mL, respectively. They showed the minimum fungicidal concentration (MFC) values of 100 µg/mL to *C. albicans* and 3.13 - 6.25 µg/mL to *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, and *M. gypseum*.

Discussion and Conclusion: The rhizomes of *C. amada* and *Z. ottensii* showed potent antifungal activities and could kill all tested fungi. Therefore, both plants might be promising sources for the isolation of antifungal substances and the formulation of antifungal drugs.

Key words: *Curcuma amada* Roxb., *Zingiber ottensii* Valetton, antifungal, fungicidal, Zingiberaceae