

ผลของน้ำมันหอมระเหยขิงต่อ planktonic cells และไบโอฟิล์มของ *Candida albicans*

พรรณิกา ศิริเพิ่มพูล*

Received: August 28, 2013

Revised & Accepted: October 10, 2013

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยขิงต่อ planktonic cell และไบโอฟิล์มของเชื้อ *Candida albicans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 12 isolates และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยขิงที่สามารถยับยั้งเชื้อและทำลายเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC; Minimum Fungicidal Concentration, MFC) โดยวิธี Microbroth dilution assay และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ (Minimum Biofilm Eradication Concentration; MBEC) โดยการย้อมสี Crystal violet ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยขิงสามารถยับยั้งการเจริญของ 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 น้ำมันหอมระเหยขิงความเข้มข้นในช่วง 0.3 %-5.0 % (ปริมาตร/ปริมาตร) สามารถกำจัดคราบไบโอฟิล์มของเชื้อให้ลดลงได้ร้อยละ 62-84

คำสำคัญ: ไบโอฟิล์ม, น้ำมันหอมระเหยขิง, ฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์ม



Effect of essential oil from *Zingiber officinale* on planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*

Punnipa Siripermpool *

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of essential oil from *Zingiber officinale* (ginger oil) against 12 clinical isolates of *C. albicans* and a type strain, *C. albicans* ATCC 90028, in both planktonic cell and biofilm. Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (MFC) and minimum eradication biofilm concentration (MEBC) of ginger oils were evaluated by broth microdilution and crystal violet staining assay. The results from broth microdilution assay revealed that the MIC and MFC of ginger oil on planktonic cell were 0.3 % (v/v) and 0.3 %-0.6 % (v/v), respectively. Moreover, MIC and MFC of ginger oil on sessile cells in biofilm were 0.6 %-5.0 % (v/v), and 2.5 %-5.0 % (v/v), respectively. Employing crystal violet staining assay for biofilm eradication study, the result showed that 0.3 %-5.0 % (v/v) of ginger oil could eradicate 62 %-84 % of mature biofilm.

Keywords: Biofilm, Ginger oil, Anti-biofilm activity

Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi

*Corresponding author: (e-mail: punnipa@buu.ac.th)

บทนำ

Candida albicans เป็นเชื้อราก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญในมนุษย์ สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อทั้งที่จำกัดอยู่บริเวณพื้นผิวของร่างกาย (superficial infection) และที่ติดเชื้อทั่วร่างกาย (systemic infection) โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีปัจจัยนำโรคอยู่ก่อนแล้ว เช่นในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ และผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัด⁽¹⁾ การรักษาการติดเชื้อ *C. albicans* ทำได้โดยการให้ยาต้านเชื้อรากลุ่ม Azole เช่น Fluconazole แต่ก็มีผลข้างเคียงจากการใช้ยา เช่น ปวดศีรษะ มึนงง ถ่ายเหลว อาเจียน และประสาทรับรสเปลี่ยนไป เป็นต้น นอกจากนี้การรักษาให้ได้ผลดีจำเป็นต้องให้ยาต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน ทำให้ผู้ป่วยจำนวนหนึ่งมักละยาไปก่อนซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เชื้อพัฒนาการดื้อยาแบบค่อยเป็นค่อยไป⁽²⁾ ดังมีรายงานเชื้อดื้อยาคณิดนี้เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน⁽³⁻⁶⁾ นอกจากนี้ปัจจัยดังกล่าวมาแล้ว *C. albicans* ยังสามารถสร้างไบโอฟิล์มซึ่งประกอบไปด้วยสารโพลีเมอร์ต่างๆ มาห่อหุ้มเซลล์ไว้ ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน⁽⁷⁾ ส่งผลให้ Sessile cell ที่อยู่ภายในมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม สารเคมี ยาต้านจุลชีพ รวมทั้งกลไกป้องกันตนเองของมนุษย์มากกว่าเชื้อที่อยู่ในสภาพปกติหรือ planktonic cell ด้วย⁽⁸⁻⁹⁾ ดังนั้นการรักษาโรคติดเชื้อราจึงยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทางการแพทย์ การแสวงหาสารจากธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันหอมระเหย จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจ ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นพืชสมุนไพรของไทยในการยับยั้งการเจริญของ Planktonic cell และไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans*

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. น้ำมันหอมระเหยของความเข้มข้น 100 % (TCFF[®], ความถ่วงจำเพาะ 0.875)
2. เชื้อทดสอบได้แก่ *C. albicans* จำนวน 12 isolates ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ *C. albicans* ATCC 90028 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี)
3. ยาต้านเชื้อรา ได้แก่ Fluconazole (BIOLAB[®])
4. การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration

(MFC) ของ Planktonic cell โดยวิธี Microdilution assay⁽¹⁰⁾ ทำการทดสอบโดยเจือจางน้ำมันหอมระเหยเชิงปริมาตร 100 ไมโครลิตรแบบ serial twofold dilution ด้วย RPMI1640 ผสม L-glutamine และ 0.165M morpholinepropane sulfonic acid (MOPS) (BioWhittaker[®]) ใน 96-well microtiter plate (Cell star[®]) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5%-0.15% (ปริมาตร/ปริมาตร) และเตรียมหลุม diluents control ซึ่งประกอบด้วย RPMI1640 กับตัวทำละลายน้ำมันหอมระเหย และหลุม negative control ซึ่งประกอบด้วย RPMI1640 จากนั้นเติมเชื้อ *C. albicans* ที่มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ $1-5 \times 10^3$ CFU/มิลลิลิตร ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร (ยกเว้นหลุม negative control เติม RPMI1640 แทน) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ Aerobic นาน 24 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยซึ่งที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ และทดสอบเชื้อควบคุมคือ *C. albicans* ATCC 90028 กับยา Fluconazole ในช่วงความเข้มข้น 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 และ 0.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน หลังจากอ่านค่า MIC แล้วสุ่มสารละลายจากทุกหลุมทดสอบที่เห็นว่าใสมาเพาะลงบน SDA (Difco[®]) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของน้ำมันหอมระเหยหรือของยา Fluconazole ที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MFC) ซึ่งคือค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของน้ำมันหอมระเหยหรือของยาในหลุมทดสอบที่ไม่พบการเจริญของเชื้อเมื่อสุ่มสารจากหลุมมาเพาะลงบน SDA (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ)

5. การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของน้ำมันหอมระเหยซึ่งต่อไบโอฟิล์มของ *Candida albicans*

เลี้ยงเชื้อ *C. albicans* ปริมาณเริ่มต้น 1.5×10^6 CFU/มิลลิลิตร ในอาหาร RPMI 1640 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน 96-well microtiter plate (Cell star[®]) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นล้าง 2 ครั้งด้วย 0.01 M PBS pH 7.0 เพื่อกำจัดเซลล์แขวนลอย แล้วจึงเติมน้ำมันหอมระเหยซึ่งเจือจางแบบ serial twofold dilution ความเข้มข้นตั้งแต่ 5.0% -0.02% (ปริมาตร/ปริมาตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร หลุม diluents control เติมตัวทำละลายน้ำมัน 100 ไมโครลิตร และเติมอาหาร

RPMI 1640 ลงในหลุม negative control ซึ่งไม่มีไบโอฟิล์มของเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งไบโอฟิล์มได้ หลังจากนั้นสัณสารละลายจากทุกหลุมทดสอบที่เห็นว่าใสหาค่า MFC ด้วยวิธีการดังกล่าวมาแล้ว (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ)

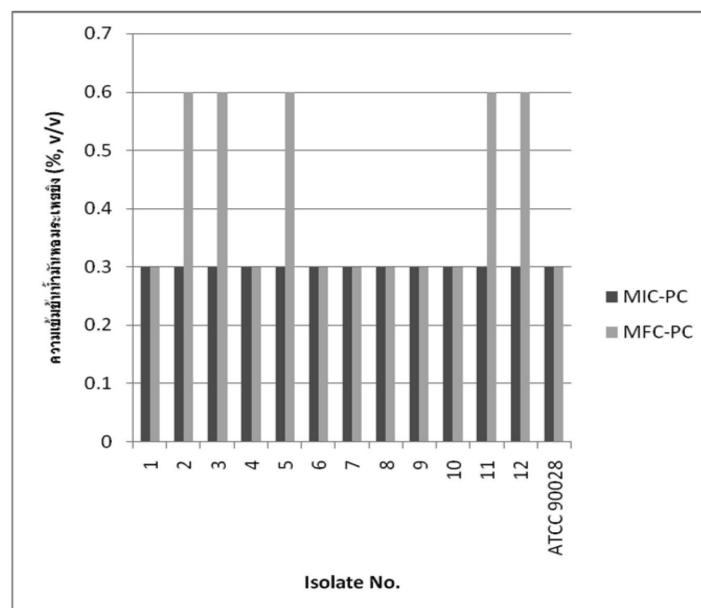
6. การหาค่า Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC) ของน้ำมันหอมระเหยขิง

หลังสัณตัวอย่างจากหลุมทดสอบเพื่อหาค่า MFC แล้วดูสารละลายทั้งหมดในหลุมทั้ง ล้าง 2 ครั้งด้วย 0.01 M PBS pH 7.0 แล้วตริงด้วย Absolute methanol นาน 10 นาที ย้อมด้วย 1% Crystal violet นาน 20 นาที ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.01 M PBS pH 7.0 แล้วจึงเติม 33 % Acetic acid ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง microtiterplate ELISA reader (SPECTOSTAR NANO®)

ผลการศึกษา

1. ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของ planktonic cell

เมื่อนำ planktonic cells ของ *C. albicans* ทั้ง 12 isolates รวมทั้งสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 มาหาค่า MIC และ MFC ของน้ำมันหอมระเหยขิงด้วยวิธี broth microdilution พบว่า Planktonic cell ของ *C. albicans* ทุก isolate มีค่า MIC เท่ากันคือเท่ากับ 0.3 % (ปริมาตร/ปริมาตร) และมีค่า MFC แตกต่างกันอยู่ในช่วง 0.3 %-0.6 % (ปริมาตร/ปริมาตร) โดยเชื้อ 62 % มีค่า MFC เท่ากับค่า MIC คือ 0.3 % (ปริมาตร/ปริมาตร) และเชื้อ 38% มีค่า MFC มากกว่าค่า MIC หนึ่งระดับความเจือจาง (หรือเท่ากับ 0.6 %; ปริมาตร/ปริมาตร) (รูปที่ 1) ส่วนเชื้อควบคุม *C. albicans* ATCC 90028 นั้นเมื่อทดสอบกับยา Fluconazole พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

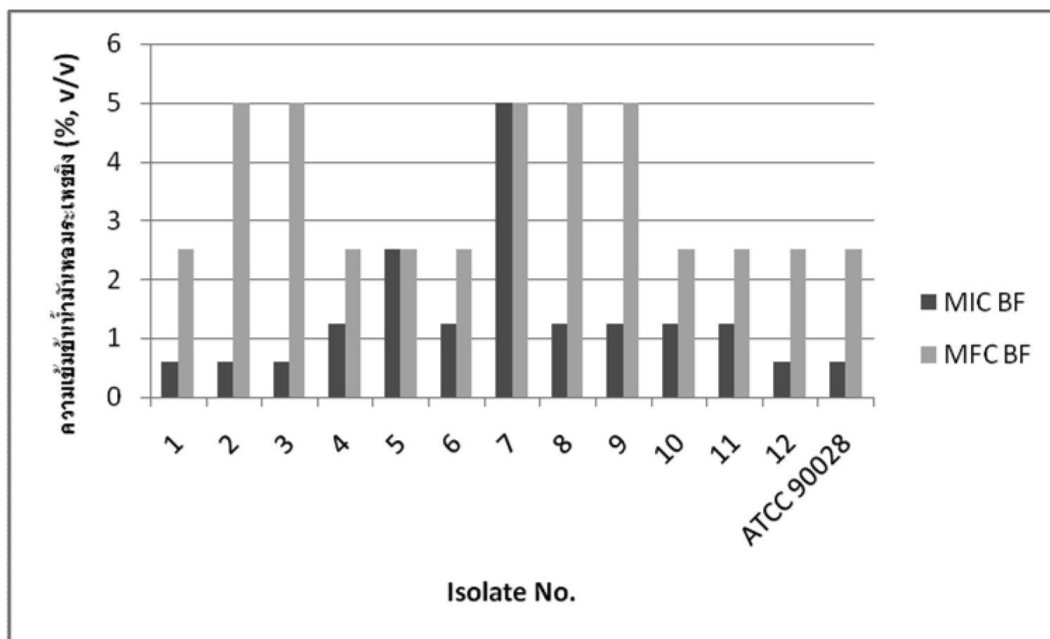


รูปที่ 1 ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum fungicidal concentration (MFC) ของน้ำมันหอมระเหยขิงต่อ Planktonic cell (PC) ของ *C. albicans* (ATCC 90028 = *C. albicans* ATCC 90028)

2. ค่า MIC และ MFC ของน้ำมันหอมระเหยขิงต่อไบโอฟิล์มของ *C. albicans*

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. albicans* ทั้ง 12 isolates รวมทั้ง *C. albicans* ATCC 90028 ให้สร้างไบโอฟิล์มในอาหาร RPMI 1640 เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยขิงความเข้มข้นต่างๆ พบว่าน้ำมันหอม

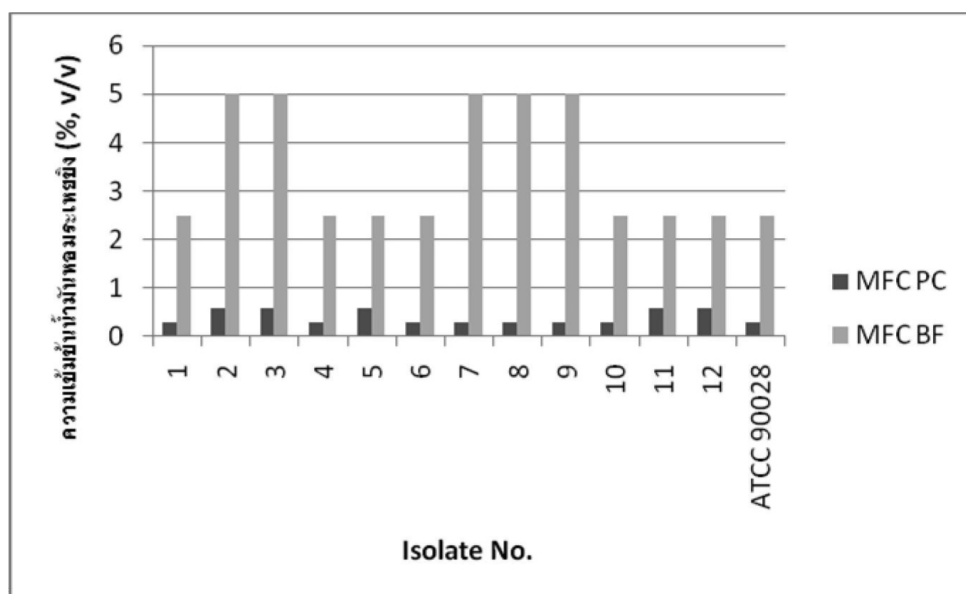
ระเหยขิงความเข้มข้นต่ำสุดในช่วง 0.6 %-5.0 % (ปริมาตร/ปริมาตร) สามารถยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อได้ และต้องใช้น้ำมันหอมระเหยขิงความเข้มข้นต่ำสุดช่วงตั้งแต่ 2.5 % - 5.0 % (ปริมาตร/ปริมาตร) จึงสามารถฆ่าหรือทำลายไบโอฟิล์มได้ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum fungicidal concentration (MFC) ของน้ำมันหอมระเหยขิงต่อไบโอฟิล์ม(BF) ของ *C. albicans* (ATCC 90028 = *C. albicans* ATCC 90028)

เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่า MIC และ MFC ของไบโอฟิล์มแต่ละเชื้อพบว่าไบโอฟิล์มของเชื้อร้อยละ 15 มีค่า MFC เท่ากับค่า MIC และไบโอฟิล์มของเชื้ออีกร้อยละ 31, 39 และ 15 มีค่า MFC มากกว่าค่า MIC 2, 4 และ 8 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่า MFC ของ planktonic cell กับค่า MFC ของไบโอฟิล์มเชื้อ isolate

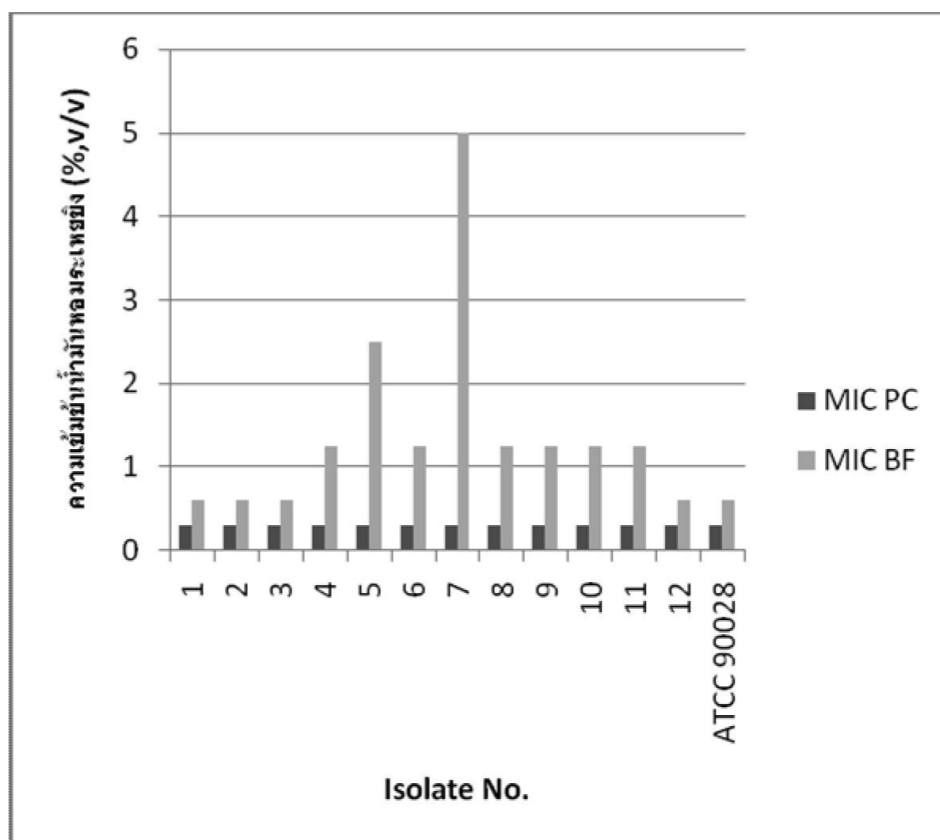
เดียวกันพบว่าไบโอฟิล์มของ *C. albicans* ทุก isolate มีค่า MFC มากกว่า planktonic cell ของเชื้อเดียวกันเฉลี่ยตั้งแต่ 4-17 เท่า (รูปที่ 3) แสดงว่าเมื่อ *C. albicans* เจริญอยู่ในระยะไบโอฟิล์มมีความทนทานต่อการถูกทำลายด้วยน้ำมันหอมระเหยขิงมากกว่า planktonic cell 4-17 เท่า



รูปที่ 3 ค่า Minimum fungicidal concentration (MFC) ของน้ำมันหอมระเหยขิงต่อ planktonic cell (PC) และไบโอฟิล์ม (BF) ของ *C. albicans* (ATCC 90028 = *C. albicans* ATCC 90028)

ส่วนความทนทานของไบโอฟิล์มในการถูกยับยั้งการเจริญด้วยน้ำมันหอมระเหยจึงเมื่อเทียบกับ planktonic cell ของเชื้อเดียวกันพบว่าไบโอฟิล์มของเชื้อทุก isolate ทนทาน

ต่อน้ำมันหอมระเหยจึงมากกว่า planktonic cell ของเชื้อเดียวกันโดยมีค่า MIC มากกว่าค่า MIC ของ planktonic cell เฉลี่ยตั้งแต่ 2-17 เท่า (รูปที่ 4)

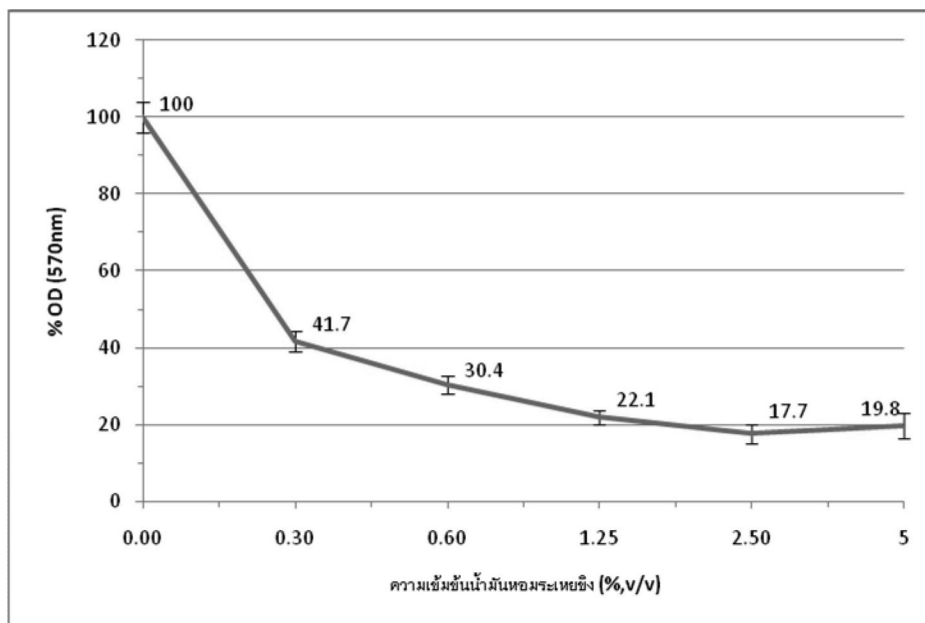


รูปที่ 4 ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยจึงต่อ Planktonic cell (PC) และไบโอฟิล์ม(BF) ของ *C. albicans* (ATCC 90028 = *C. albicans* ATCC 90028)

3. ค่า Minimum Eradication Biofilms Concentration (MEBC)

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. albicans* ทั้ง 12 isolates รวมทั้งเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 90028 ให้สร้างไบโอฟิล์มในอาหาร RPMI 1640 เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วเติมน้ำมันหอมระเหยจึงความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปแล้วบ่มไว้ 24 ชั่วโมงเพื่อให้ให้น้ำมันหอมระเหยกำจัด sessile cell ที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มและสารโพลิเมอร์ต่างๆ ที่เชื้อสร้างขึ้น จากนั้นย้อมไบโอฟิล์มที่เหลือด้วยสี crystal violet ผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยจึงสามารถกำจัดไบโอฟิล์มของเชื้อได้ โดยทำให้ปริมาณไบโอฟิล์มลดลงไป 62 %-84 % เมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นต่าง ๆ กันในช่วงตั้งแต่ 0.3 %-5.0 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ (รูปที่ 5)

ฟิล์มและสารโพลิเมอร์ต่างๆ ที่เชื้อสร้างขึ้น จากนั้นย้อมไบโอฟิล์มที่เหลือด้วยสี crystal violet ผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยจึงสามารถกำจัดไบโอฟิล์มของเชื้อได้ โดยทำให้ปริมาณไบโอฟิล์มลดลงไป 62 %-84 % เมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นต่าง ๆ กันในช่วงตั้งแต่ 0.3 %-5.0 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรจากการย้อมไบโอฟิล์มของ *C. albicans* ที่เหลือหลังบ่มรวมกับน้ำมันหอมระเหยขิงความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 24 ชั่วโมง

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยขิงต่อ Planktonic cell ของ *C. albicans* ครั้งนี้ควบคุมคุณภาพโดยทดสอบเชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 กับยา Fluconazole และพบว่า *C. albicans* ATCC 90028 มีค่า MIC ของยา Fluconazole เท่ากับ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อยู่ในช่วงที่ถูกต้องตามมาตรฐานการทดสอบของ NCCLS⁽¹⁰⁾ ซึ่งกำหนดไว้ว่าค่า MIC Fluconazole ของเชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 อยู่ในช่วง 0.25-1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยขิงต่อ Planktonic cell ของ *C. albicans* พบว่า planktonic cells ของ *C. albicans* ทุก isolate มีค่า MIC เท่ากัน คือ 0.3 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งมากกว่าค่า MIC ที่รายงานโดย Takahashi และคณะ⁽¹¹⁾ ซึ่งรายงานไว้ว่าค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยขิงต่อ planktonic cells ของ *C. albicans* อยู่ในช่วง 200-400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สาเหตุของความแตกต่างนี้อาจเป็นเพราะองค์ประกอบของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยแตกต่างกันตามประเภทของวัตถุดิบที่นำมาใช้สกัด ดังรายงานการศึกษาของ Sasidharan และ Menon⁽¹²⁾ ซึ่งศึกษาโดยนำเหง้าขิงสดและเหง้าขิงแห้งซึ่งได้จากการนำเหง้าสดอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง มาสกัดด้วยการใช้อ้น้ำ (hydrodistillation) และมือน้ำมันหอมระเหย

ที่ได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี gas chromatography และ GC-MS พบว่าในน้ำมันหอมระเหยทั้งสองกลุ่มนี้มีสาร zingiberene เป็นองค์ประกอบหลัก โดยน้ำมันหอมระเหยจากขิงสดมีสาร geranial เป็นองค์ประกอบสำคัญลำดับที่สอง (8.5 %) มีสารกลุ่ม oxygenated compounds มากกว่าน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากขิงแห้ง (29.2% เทียบกับ 14.4 %) แต่น้ำมันหอมระเหยจากขิงแห้งมีสารชนิดอื่น ได้แก่ Ar-curcumen (11%) β -bisabolene (7.2 %), Sesquiphellandrene (6.6%) และ δ -cadinene (3.5 %) แต่จากการศึกษาของ Takahashi และคณะ⁽¹¹⁾ ซึ่งศึกษาการกลั่นน้ำมันหอมระเหยด้วยไอน้ำจากขิงอ่อน ขิงแก่ และ seed ของขิงเปรียบเทียบกับขิงแห้งที่ได้จากการนำขิงสดมาผึ่งลมในที่ร่ม 1 สัปดาห์ และทำแห้งโดยการอบไอน้ำเดือด 2 ชั่วโมง พบความแตกต่างของสารสำคัญในขิงแต่ละประเภท กล่าวคือ สารหลักที่พบในขิงแก่และ seed ของขิง ได้แก่ citral (24.9 และ 46 % ตามลำดับ) ส่วนสารหลักในขิงอ่อน ได้แก่ geranyl acetate (45 %) สารสำคัญที่พบรองลงมาเป็นลำดับที่สองของขิงแก่และ seed ได้แก่ zingiberene ส่วนสารสำคัญลำดับที่สองของขิงอ่อน ได้แก่ citral และเมื่อนำขิงแห้งมาวิเคราะห์องค์ประกอบพบว่า ขิงที่ปล่อยให้แห้งเองมีองค์ประกอบหลักเป็น citral (70 %) แต่ขิงที่ทำให้แห้งโดยการอบด้วยไอน้ำเดือดนั้นเหลือปริมาณ citral เพียง 7.0% แต่

องค์ประกอบหลักที่พบในลำดับแรก ได้แก่ Ar-curcumene (18.1%), β - bisabolene (18.7%), zingiberene (10.3 %) และ geranyl acetate (7.6 %) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของสารสำคัญตามอายุของขิง และวิธีการสกัด และเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยขิงมาทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อ *C. albicans* TIMMI 1678 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากขิงอ่อนขิงแก่ และ Seed ของขิงมีค่า MIC เท่ากับ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ขิงแห้งมีค่า MIC 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าน้ำมันหอมระเหยขิงของผู้วิจัยในครั้งนี้ ซึ่งได้จากการนำขิงสดมาสกัดด้วยไอน้ำ (hydrodistillation) ประมาณ 6.5-13 เท่า แต่หากเปรียบเทียบการศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้กับการศึกษาของ Mickiene และคณะ⁽¹³⁾ พบว่าน้ำมันหอมระเหยขิงของผู้วิจัยในครั้งนี้มีประสิทธิภาพดีกว่าเนื่องจาก Mickiene และคณะ⁽¹³⁾ รายงานไว้ว่าต้องใช้น้ำมันหอมระเหยขิงเข้มข้นถึง 50 % จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้สมบูรณ์

เมื่อนำ *Candida albicans* มาเลี้ยงใน 96 well microtiter plate พบว่าเชื้อสามารถเกาะติดและก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มได้ดีบนพื้นผิวของ polystyrene ซึ่งเป็นวัสดุที่ใช้ทำ microtiter plate สามารถมองเห็นเป็นคราบสีขาวเกาะติดแน่นบนพื้นผิวของกันหลุมได้ชัดเจน และเมื่อนำไปย้อมด้วยสี Crystal violet ทำให้ได้ค่าความเข้มของสีแปรผันตามปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. albicans* ให้เจริญเป็นไบโอฟิล์มใน 96 well microtiter plate และทดสอบความไวต่อน้ำมันหอมระเหยพบว่าน้ำมันหอมระเหยขิงมีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลาย sessile cell ที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มได้โดยมีค่า MIC และ MFC อยู่ในช่วง 0.6 %-5.0 % (ปริมาตร/ปริมาตร) และ 2.5 %-5.0 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ การที่น้ำมันหอมระเหยขิงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลาย sessile cell ที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มได้ในระดับที่ต่างกันั้นนั้นอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในปริมาณที่ต่างกันั้นหรืออาจเนื่องมาจากเชื้ออยู่ในระยะการเจริญที่ต่างกันั้น โดยมีรายงานว่าเชื้อที่อยู่ในช่วงกำลังพัฒนาเป็นไบโอฟิล์ม มีความทนทานต่อสารประกอบหลักบางชนิดในน้ำมันหอมระเหยและทนยาต้านเชื้อรามากกว่าเชื้อที่อยู่ในสภาวะปกติ⁽¹⁴⁾

เมื่อเปรียบเทียบค่า MFC ของน้ำมันหอมระเหยขิงต่อเชื้อ *C. albicans* และพบว่าไบโอฟิล์มของเชื้อมีค่า MFC

มากกว่า planktonic cell ของเชื้อ isolates เดียวกันตั้งแต่ 4-17 เท่า แสดงว่าเมื่อ *C. albicans* เจริญอยู่ในระยะไบโอฟิล์มมีความทนทานต่อการถูกทำลายด้วยน้ำมันหอมระเหยขิงมากกว่า planktonic cell 4-17 เท่า และแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยขิงที่ใช้ในการศึกษานี้มีประสิทธิภาพในการทำลาย ไบโอฟิล์มได้ดีกว่า Fluconazole เนื่องจากมีรายงานว่าค่า MIC ของยา Fluconazole ต่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* เพิ่มขึ้นถึงเท่ากับหรือมากกว่า 1024 เท่า ของค่า MIC เมื่อทดสอบกับเชื้อที่อยู่ในสภาวะเซลล์แขวนลอย^(15,16)

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยขิงในการกำจัดคราบไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างไว้แล้วพบว่าน้ำมันหอมระเหยขิงสามารถกำจัดไบโอฟิล์มของเชื้อได้ โดยสามารถทำให้ปริมาณไบโอฟิล์มลดลง 62%-84% เมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยขิงในระดับความเข้มข้นที่ต่างกันั้นในช่วง 0.3 %-5.0 % (ปริมาตร/ปริมาตร)

จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า *C. albicans* ที่เจริญอยู่ในสภาวะไบโอฟิล์มสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำมันหอมระเหยขิงในระดับความเข้มข้น 0.6 %-5.0 % (ปริมาตร/ปริมาตร) และถูกทำลายได้ด้วยน้ำมันหอมระเหยขิงที่ความเข้มข้น 2.5 %-5.0 % (ปริมาตร/ปริมาตร) และน้ำมันหอมระเหยขิงในระดับที่สามารถยับยั้งและทำลาย Sessile cell ที่อยู่ในไบโอฟิล์มได้นั้นสามารถกำจัดคราบไบโอฟิล์มให้ลดลงไปได้ 62 %-84 % ตามลำดับ ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยขิงจึงอาจเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นสารยับยั้งหรือทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ในทางการแพทย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคุณอมร อุ่นเจริญ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อทดสอบ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยบูรพา (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2555

เอกสารอ้างอิง

1. Musial CE, Cockeril III FR, Robert GD. Fungal infections of the immunocompromised host: clinical and laboratory aspects. Clin

- Microbiol Rev 1988; 1: 349-64.
2. Franz R, Kelley SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhauser J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 3065-72.
3. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 40-79.
4. Sobel JD, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, Nyirjesy P, et al. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated *Candida* vaginitis: clinical implications. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 34-8.
5. Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. J Clin Microbiol 2005; 43: 2155-62.
6. Panizo MM, Reviakina V, Dolande M, Selgrad S. *Candida* spp. *in vitro* susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. Med Mycol 2009; 47: 137-43.
7. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol 2004; 2: 95-108.
8. Sharma AM, Yadav S. Biofilms: microbe and disease. Braz J Infect Dis 2008; 12: 526-30.
9. Brown MRW, Gilbert P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. J Appl Bacteriol 1993; 74: S87-S97.
10. National Committee for Clinical and Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, vol. 22, No. 15. Approved Standard M27-A2. National Committee for Clinical and Laboratory Standards, Villanova, Pa.
11. Takahashi M, Inouye S, Abe S. 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 Discov Ther 2011; 5: 238-45.
12. Sasidharan I, Menon AN. Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh & dry ginger oils (*Zingiber officinale* Roscoe). Int J Curr Pharm Res 2010; 2: 40-3.
13. Mickiene R, Ragazinskiene O, Bakutis B. Antimicrobial activity of *Mentha arvensis* L. and *Zingiber officinale* R. essential oils. Biologia 2011; 57: 92-7.
14. Khan MS, Ahmad I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. J Ethnopharmacol 2012; 140: 416-23.
15. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. J Antimicrob Chemother 2004; 53: 383-5.
16. Shinde RB, Chauhan NM, Raut J, Karuppayayil SM. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2012; 11: 27-33.