

ผลของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *Candida albicans*: การศึกษาเบื้องต้น

พรรณีภา ศิริเพิ่มพูล*, ศิริลักษณ์ เบ้านอก

Received: November 12, 2016

Revised: December 16, 2016

Accepted: December 21, 2016

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida* ที่อยู่ในรูปของเซลล์อิสระได้แต่ยังทราบไม่มากนักเกี่ยวกับผลของน้ำมันชนิดนี้ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Candida albicans* รายงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *Candida albicans* ATCC90028 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน และเชื้ออีกสองสายพันธุ์คือ *C. albicans* No.2 และ *C. albicans* No.4 ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย โดยทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า MIC (0.5xMIC; 0.015%, ปริมาตร/ปริมาตร) 1xMIC, 2xMIC และ 4xMIC ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อโดยวิธีการย้อมด้วยสี crystal violet พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้สามารถรบกวนการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้ตั้งแต่ระยะแรก โดยผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเป็นแบบขึ้นกับความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาสัมผัสสาร และสายพันธุ์ของเชื้อ อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ไม่สามารถยับยั้งการเกาะติดและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหยตะไคร้, *Candida albicans*, ไบโอฟิล์ม



Effects of lemongrass essential oil on biofilm formation of *Candida albicans*: preliminary study

Punnipa Siripermpool*, Sililuk Baonok

Abstract

Specific anti-*Candida* activity against planktonic forms of lemongrass essential oil is well established nowadays. However, limited information is known about the effect of this oil on biofilm formation of *Candida albicans*. The aim of this study was to investigate the effect of lemongrass essential oil on biofilm formation of one reference and two clinical strains of *Candida albicans* namely *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* No.2 and *C. albicans* No.4. The effect of sub-MICs of the oil (0.5xMIC; 0.015%,v/v), 1xMIC, 2xMIC and 4xMIC on the ability of *Candida* to form biofilm at 2, 4 and 24 hrs was determined by crystal violet assay. The results showed that lemongrass essential oil was able to interfere biofilm formation starting from the initial phase. The effect of the oil on initial cell attachment and biofilm eradication revealed in dose, exposure time and strain dependent manner. However, complete inhibition of cell attachment and biofilm eradication were not achieved.

Key words: Lemongrass essential oil, *Candida albicans*, Biofilm

บทนำ

Candida albicans เป็นเชื้อก่อโรคประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในช่องปากและในลำไส้ของมนุษย์สามารถทำให้เกิดอาการโรคได้หลายแบบนับตั้งแต่การติดเชื้อเฉพาะที่บริเวณผิวหนังจนกระทั่งถึงการติดเชื้อแบบกระจายทั่วร่างกายเชื้อนี้จัดเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อราที่พบได้บ่อยที่สุดในมนุษย์⁽¹⁾ ในปัจจุบันพบว่าการก่อโรคของ *C. albicans* เกี่ยวข้องกับการเจริญเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อ⁽²⁻⁴⁾ การสร้างไบโอฟิล์มจัดเป็นปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคนิหนึ่งของการติดเชื้อราเนื่องจากเซลล์ที่อยู่ภายในชั้นของไบโอฟิล์ม (Sessile cells) มีความทนทานต่อยาต้านเชื้อราชนิดต่างๆ เช่น amphotericin B, fluconazole, itraconazole และ ketoconazole มากกว่าเซลล์อิสระ (Planktonic cells)⁽⁵⁾ น้ำมันหอมระเหยเป็นสารธรรมชาติได้มาจากพืชที่มีกลิ่นหอมและมีรายงานวิจัยว่าน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียและต้านเชื้อรา รวมทั้งน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเซลล์อิสระของ *C. albicans* ด้วย⁽⁶⁻¹⁰⁾ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในระยะต่างๆ ของ *C. albicans* เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการนำน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์สำหรับรักษาการติดเชื้อ *C. albicans* โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อที่บริเวณเยื่อเมือกและการติดเชื้อแบบกระจายทั่วร่างกายที่สัมพันธ์กับการสร้างไบโอฟิล์ม

วัสดุและวิธีการ

1. เชื้อทดสอบ

C. albicans ATCC 90028 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุขนนทบุรี) และ *C. albicans* No.2, *C. albicans* No.4 เป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้ดี (หน่วยจุลชีววิทยาคลินิกโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

2. น้ำมันหอมระเหยตะไคร้

TCFF®, ความถ่วงจำเพาะ 0.8826

3. การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อ Planktonic cells ของ *Candida albicans* โดยวิธี Microbroth dilution assay⁽¹¹⁾

ทำการทดสอบโดยเจือจางน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ปริมาตร 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 0.5%-0.0075% (ปริมาตร/ปริมาตร) แต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และเตรียมหลุม diluents control ซึ่งประกอบด้วย RPMI1640 กับตัวทำละลายน้ำมันหอมระเหย (1% DMSO) และหลุม negative control ซึ่งประกอบด้วย RPMI1640 จากนั้นเติมเชื้อ *C. albicans* ที่มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ $1-5 \times 10^3$ CFU/มิลลิลิตร ลงไปทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร (ยกเว้นหลุม negative control เติม RPMI1640 แทน) นำ microtiter plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ aerobically นาน 24 ชั่วโมงอ่านค่า MIC จากความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (อาหารในหลุมทดสอบใส) และทดสอบชุดควบคุมคุณภาพการทดสอบคือ *C. albicans* ATCC 90028 กับยา fluconazole ในช่วงความเข้มข้น 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 และ 0.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน

4. การเลี้ยงเชื้อให้สร้างไบโอฟิล์ม

เติมเซลล์แขวนลอยของ *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* No. 2 และ *C. albicans* No.4 ปริมาณ 1×10^6 CFU/ml ในอาหาร RPMI 1640 (BioWhittaker®) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุมของ 96-well microtiter plate (Cell star®) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสตามระยะเวลาต่างๆ

5. การหาปริมาณไบโอฟิล์มโดยวิธี Crystal violet assay⁽¹²⁾

ล้างไบโอฟิล์ม 3 ครั้งด้วย 0.01M PBS ตีด้วย absolute methanol นาน 10 นาทีด้วย 1% crystal violet นาน 20 นาทีก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง microtiter plate ELISA reader (SPECTOSTAR NANO[®])

6. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในระยะต่างๆ ของเชื้อ

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 สภาวะคือสภาวะที่ไม่มีน้ำมันหอมระเหยตะไคร้โดยเติมเซลล์แขวนลอยของ *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* No. 2 และ *C. albicans* No. 4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและตัวทำละลายของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลุม microtiter plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2, 4 และ 24 ชั่วโมงแล้วล้าง 3 ครั้งด้วย PBS pH 7.0 ก่อนนำไปย้อมไบโอฟิล์มด้วยวิธี crystal violet assay⁽¹¹⁾ ส่วนสภาวะที่มีน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ทำโดยเติมเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 50 ไมโครลิตรรวมกับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ความเข้มข้น 0x, 0.5x, 1x, 2x และ 4x MIC ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2, 4 และ 24 ชั่วโมงแล้วย้อมไบโอฟิล์มตามวิธีดังกล่าวมาแล้ว (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ)

ผลการศึกษา

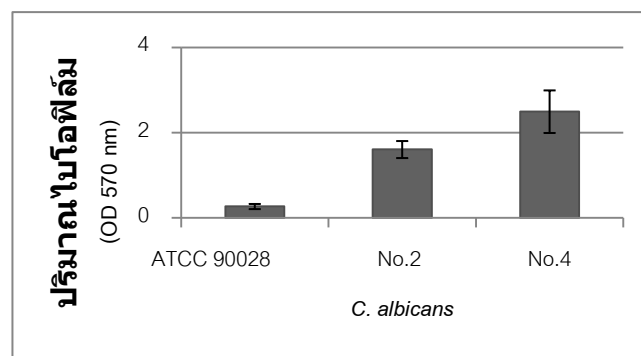
1. ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อ Planktonic cells ของ *Candida albicans*

ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อ 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 อยู่ในช่วงที่ถูกต้องตามมาตรฐานการ

ทดสอบของ NCCLS⁽¹⁰⁾ ซึ่งกำหนดไว้ว่าค่า MIC fluconazole ของเชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 อยู่ในช่วง 0.25-1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อ Planktonic cells ของ *C. albicans* พบว่า Planktonic cells ของ *C. albicans* ทั้งสาม isolates มีค่า MIC เท่ากันคือ 0.03 % (ปริมาตร/ปริมาตร)

2. การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ

เมื่อนำเชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 และ *C. albicans* No. 2, *C. albicans* No. 4 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยมาเลี้ยงให้สร้างไบโอฟิล์มในอาหาร RPMI1640 นาน 24 ชั่วโมงใน 96-well microtiter plate รูปที่ 1 พบว่าเชื้อทั้งสามสายพันธุ์สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้โดยเชื้อ *C. albicans* No.4 สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่สุด รองลงมาเป็น *C. albicans* No. 2 และ *C. albicans* ATCC 90028 ตามลำดับ

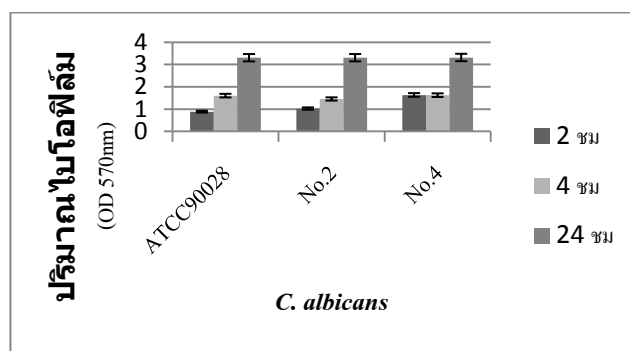


รูปที่ 1 ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของ *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* No. 2 และ *C. albicans* No. 4 ในอาหาร RPMI1640 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3. ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อในระยะต่างๆ

จากการนำน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* No.2 และ *C. albicans* No.4 พบว่าในสภาวะปกติที่เติมตัวทำละลายแทนน้ำมันหอมระเหยนั้นเชื้อทั้งสามสายพันธุ์สามารถเกาะติดพื้นผิว microtiter plate และสร้างไบโอฟิล์มได้

เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นกล่าวคือใน เวลา 2 ชั่วโมงเซลล์สามารถเกาะติดพื้นผิวและสร้างไบโอฟิล์มได้ปริมาณ 26.63, 30.85 และ 49.40% (ตามลำดับ) และเพิ่มเป็น 48.32, 43.91 และ 49.06% (ตามลำดับ) ภายในเวลา 4 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับปริมาณไบโอฟิล์มที่ 24 ชั่วโมงแสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ปริมาณการสร้างไบโอฟิล์ม (OD570 nm) ของเชื้อ *C. albicans* เมื่อเลี้ยงในอาหาร RPMI1640 สภาวะที่เติม ตัวทำละลายน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาต่าง ๆ นาน 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การลดลงของไบโอฟิล์ม *C. albicans* ทั้งสามสายพันธุ์หลังบ่มรวมกับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกันนาน 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้		ระยะเวลาบ่ม (ชั่วโมง)	เปอร์เซ็นต์การลดลงของไบโอฟิล์ม*		
(%, ปริมาตร/ปริมาตร)			<i>C. albicans</i> ATCC90028	<i>C. albicans</i> No. 2	<i>C. albicans</i> No. 4
0.5x MIC (0.015)		2	63.46 ± 2.17 ^{pqr}	38.85 ± 1.63 ^t	60.72 ± 4.8 ^{qr}
		4	69.75 ± 1.47 ^{mnp}	58.63 ± 1.76 ^r	70.91 ± 3.61 ^{mno}
		24	71.02 ± 4.50 ^{mno}	82.36 ± 1.27 ^{efghij}	79.07 ± 5.25 ^{ghijkl}
1x MIC (0.03)		2	64.05 ± 3.0 ^{opqr}	48.31 ± 1.80 ^s	65.94 ± 3.09 ^{nopq}
		4	72.25 ± 1.97 ^{klmn}	71.86 ± 2.57 ^{lmn}	80.69 ± 1.79 ^{fghij}
		24	76.69 ± 2.53 ^{ijklm}	93.34 ± 1.47 ^{abcd}	83.00 ± 5.10 ^{efghij}
2x MIC (0.06)		2	68.15 ± 5.79 ^{nop}	71.36 ± 2.47 ^{mn}	79.00 ± 1.09 ^{ijkl}
		4	81.0 ± 1.34 ^{fghij}	84.63 ± 1.73 ^{efghi}	87.63 ± 1.36 ^{bcdef}
		24	86.76 ± 1.75 ^{cdef}	96.22 ± 1.16 ^a	93.68 ± 1.38 ^{abc}
4x MIC (0.12)		2	69.54 ± 4.82 ^{nop}	69.59 ± 3.5 ^{nop}	79.31 ± 1.30 ^{hijk}
		4	81.81 ± 1.17 ^{fghij}	86.49 ± 1.49 ^{defg}	89.66 ± 1.69 ^{abcde}
		24	86.76 ± 1.75 ^{defgh}	96.56 ± 1.38 ^a	94.17 ± 1.43 ^{ab}

หมายเหตุ * ตัวอักษร a-t ที่แตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากตารางที่ 1 ซึ่งเป็นผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การลดลงของไบโอฟิล์ม *C. albicans* ทั้งสามสายพันธุ์หลังบ่มรวมกับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน พบว่าเมื่อบ่มเชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 ซึ่งเป็นเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยรวมกับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ความเข้มข้นที่ต่างกันคือ 0.5x MIC, 1x MIC, 2x MIC และ 4x MIC เป็นเวลา 2 ชั่วโมงนั้น น้ำมันหอมระเหยตะไคร้สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อในระยะแรกเริ่มนี้ได้เท่ากับ 63-69% ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ANOVA, $p < 0.05$) แต่เชื้อ *C. albicans* No.2 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้ใหม่จากผู้ป่วยและสร้างไบโอฟิล์มได้นั้น น้ำมันหอมระเหยตะไคร้สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มได้เพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0.5x MIC ถึง 2x MIC และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ไปอีกเป็น 4x MIC พบว่าสามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มในระยะแรกนี้ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้น 2x MIC (ตารางที่ 1) ส่วนเชื้อ *C. albicans* No. 4 นั้น น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ความเข้มข้น 0.5x และ 1x MIC สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มในระยะแรกได้ 60-65% ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเป็น 2x MIC พบว่าสามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มได้เพิ่มขึ้นเป็น 79 เปอร์เซ็นต์ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลของน้ำมันที่ระดับความเข้มข้น 0.5x และ 1x MIC แต่ไม่แตกต่างจากผลของน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 4 xMIC

เมื่อบ่มน้ำมันหอมระเหยตะไคร้รวมกับเชื้อทดสอบต่อไปจนครบเวลา 4 ชั่วโมงพบว่าน้ำมันหอมระเหยสามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร โดยปริมาณไบโอฟิล์มของ *C. albicans* No.2 และ *C. albicans* No.4 ลดลงมากขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่ที่ระดับความเข้มข้น 0.5x MIC จนถึง 2x MIC แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยต่อไปเป็น 4x MIC การ

ลดลงของไบโอฟิล์มไม่แตกต่างจากการรับสัมผัสน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 2x MIC ส่วน *C. albicans* ATCC 40028 นั้นการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจาก 0.5x MIC เป็น 1x MIC สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเป็น 2x MIC พบว่าสามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA, $p < 0.05$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยต่อไปเป็น 4x MIC ความสามารถในการลดการสร้างไบโอฟิล์มไม่แตกต่างจากที่ระดับความเข้มข้น 2x MIC

เมื่อติดตามผลการลดลงของไบโอฟิล์มต่อไปจนครบเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจาก 0.5x MIC จนถึง 1x MIC สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มของ *C. albicans* ATCC90028 และ *C. albicans* No.4 ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเป็น 2x MIC สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.5x MIC และ 1x MIC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA, $p < 0.05$) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยต่อไปเป็น 4x MIC พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยไม่แตกต่างจากที่ระดับความเข้มข้น 2x MIC ส่วนผลการทดสอบกับเชื้อ และ *C. albicans* No.2 นั้นพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจาก 0.5x MIC เป็น 1x MIC นั้นสามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA, $p < 0.05$) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยต่อไปเป็น 2x MIC และ 4x MIC ประสิทธิภาพการยับยั้งเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการรับสัมผัสน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้น 1x MIC

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ทั้งสามสายพันธุ์ในอาหาร RPMI 1640 นาน 24 ชั่วโมงเมื่อย้อมไบโอฟิล์มด้วยสี crystal

violet และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรพบว่าเชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้แตกต่างกันไปโดยเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยคือ *C. albicans* No.4 และ *C. albicans* No.2 สร้างไบโอฟิล์มได้ดีกว่า *C. albicans* ATCC 90028 การสร้างไบโอฟิล์มของ *C. albicans* เป็นขบวนการที่ประกอบด้วยหลายขั้นตอน เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนแรกหรือที่เรียกว่า cell-surface adhesion เริ่มเมื่อเซลล์ยีสต์เกาะติดกับพื้นผิว จากนั้นจึงเจริญเพิ่มจำนวนยึดเกาะกับเซลล์ข้างเคียงที่ยึดเกาะกับพื้นผิวอยู่ก่อนแล้ว เกิดเป็นหย่อมขนาดเล็กของเซลล์ (microcolony) จึงเรียกระยะนี้ว่า “cell-cell cohesion” จากนั้นเซลล์ยีสต์จึงเจริญอย่างรวดเร็ว สร้างสายรา (hyphae) พร้อมกับสร้างและปล่อยสารโพลิเมอร์ออกมาห่อหุ้มเซลล์ไว้ ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างสามมิติที่ซับซ้อน⁽¹³⁾ ส่วนสาเหตุที่ทำให้ยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้สร้างไบโอฟิล์มได้แตกต่างกัน ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบเดียวกัน อาจเนื่องมาจากความสามารถในการเจริญเป็นเส้นใย (hyphae) ของยีสต์แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน ดังรายงานการศึกษาของ Baillie & Douglas⁽¹⁴⁾ ซึ่งพบว่า *C. albicans* ทั้งชนิดที่กลายพันธุ์ไปเป็นแบบที่ไม่สามารถสร้างเส้นใยและแบบที่สร้างได้เฉพาะเส้นใยเท่านั้น ยังสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ แต่ลักษณะไบโอฟิล์มต่างกันกล่าวคือไบโอฟิล์มของยีสต์ที่กลายพันธุ์ไปเป็นแบบที่ไม่สามารถสร้างเส้นใยนั้นมีลักษณะบางกว่า ประกอบไปด้วยชั้นล่างที่มีเซลล์ยีสต์อัดแน่นอยู่เท่านั้น แต่ไบโอฟิล์มของยีสต์ที่สร้างได้เฉพาะเส้นใยเท่านั้นมีความหนามากกว่าประกอบด้วยเส้นใยราซ้อนทับกันอย่างหนาแน่น โดยไม่มีชั้นยีสต์ด้านล่าง

ในการหาปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของ *C. albicans* ทั้งสามสายพันธุ์ในอาหาร RPMI1640 ที่เติมตัวทำละลาย ของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (1%DMSO) พบว่าเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ยังคงสามารถในการเกาะติด เจริญ และสร้างไบโอฟิล์มได้และดีกว่าการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เติมตัวทำละลายน้ำมัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก DMSO ช่วยเพิ่ม plasma membrane fluidity ของเชื้อทดสอบ ทำให้

สารอาหารเข้าถึงเซลล์ของเชื้อทดสอบได้มากขึ้น จึงทำให้เชื้อเจริญและสร้างไบโอฟิล์มได้ดีกว่า

ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ในการรบกวนการสร้างไบโอฟิล์มของ *C. albicans* แต่ละ สายพันธุ์นั้นพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของ Planktonic cells ของเชื้อทุกสายพันธุ์ได้มีค่าเท่ากันคือเท่ากับ 0.03% (ปริมาตร/ปริมาตร) และเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0.5x, 1x, 2x และ 4x MIC เติมลงในอาหารเหลวและบ่มรวมกับเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาดังกล่าวคือ 2, 4 และ 24 ชั่วโมง แล้วตรวจดูปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มโดยการย้อมด้วยสี crystal violet เมื่อนำผลจากการศึกษามาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปัจจัยทั้งสามซึ่งได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย สายพันธุ์เชื้อทดสอบ และระยะเวลาสัมผัสสารต่างมีอิทธิพลร่วมกัน (interaction) ต่อเปอร์เซ็นต์การลดลงของไบโอฟิล์มที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และเมื่อทำการทดสอบหาความแตกต่างระหว่างปัจจัยด้วยวิธี Tukey test พบว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 4x MIC บ่มรวมกับเชื้อ *C. albicans* No.2 นาน 24 ชั่วโมง หรือการใช้น้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 2x MIC บ่มรวมกับเชื้อ *C. albicans* No.2 นาน 24 ชั่วโมง นั้นสามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่สุดที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อเทียบกับอิทธิพลร่วมรูปแบบอื่น ๆ

น้ำมันหอมระเหยตะไคร้เป็นสารอินทรีย์ที่ได้มาจากตะไคร้แกง (*Cymbopogon citrates* (DC) Stapf) ประกอบด้วยสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งราและแบคทีเรีย ได้แก่ Geranial (Cital A) และ Neral (Cital A) ในปริมาณที่ต่างกันตั้งแต่ 40.7-75.4%⁽¹⁵⁻¹⁶⁾ ทั้งสาร cital และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่างมีฤทธิ์ที่คล้ายกันต่อเชื้อรา จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของ Khan et al⁽¹⁷⁾ พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้แกงออกฤทธิ์รบกวนความสมบูรณ์รูป (integrity) ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มของ *C. albicans*

ส่งผลให้ผิวเซลล์เหี่ยวและตายไปในที่สุด ส่วน citral นั้น ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อราเนื่องจากมีความสามารถในการจับกับ tryptophan ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ราเกิดเป็น สารประกอบที่มีสมบัติในการถ่ายเทประจุจากเซลล์รา ทำให้ ราตายในที่สุด⁽¹⁸⁾ อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ใช้ ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถลดเปอร์เซ็นต์การสร้างไบโอ फिल्मของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์แม้ใช้ที่ระดับ ความเข้มข้น 4x MIC ระยะเวลาบ่มนาน 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอม ระเหยตะไคร้สามารถลดการสร้างไบโอ फिल्मของ *C. albicans* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* No.2 และ *C. albicans* No.4 ได้ดี ตั้งแต่ขั้นตอนแรกของการเกาะติดของเชื้อกับพื้นผิววัสดุ โดยสายพันธุ์ของเชื้อ ระยะเวลาสัมผัสสาร และความเข้มข้น ของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีอิทธิพลร่วมกันในการลดการ สร้างไบโอ फिल्मของ *C. albicans* โดยน้ำมันหอมระเหยที่ ระดับความเข้มข้น 1x MIC (0.03% ปริมาตร/ปริมาตร) สามารถลดการสร้างไบโอ फिल्मได้ 64-93% แตกต่างกัน ตามสายพันธุ์ของเชื้อ และระยะเวลาในการบ่ม ดังนั้นน้ำมัน หอมระเหยจากตะไคร้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ และมีศักยภาพสำหรับการพัฒนาเป็นสารหรือยารักษาโรค ติดเชื้อ *C. albicans* ที่สัมพันธ์กับการสร้างไบโอ फिल्म

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคุณธรรารัตน์ โนจิตร นักวิทยาศาสตร์ ห้องปฏิบัติการกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์สถิติ

เอกสารอ้างอิง

- Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. Am J Med 1991; 16: 72S-75S.
- Douglas LJ. Candida biofilms and their role in infection. Trends in Microbiol 2003; 100: 30-6.

- Ramage G, Saville DO, Lopez-Ribot JL. Candida biofilm: an update. Eukaryotic Cell 2005; 4: 633-38.
- Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical Candida isolates and its association with virulence. Microbes Infect 2009; 11: 753-61.
- Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake YH. Biofilm lifestyle of Candida: a minireview. Oral Dis 2008; 14: 582-90.
- da Silva CB, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EES. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against Candida spp. Braz J Infect Dis 2008; 12: 63-66.
- Rosato A, Vitali C, Gallo D, Balenzano L, Mallamaci R. The inhibition of Candida species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. Phytomedicine 2008; 15: 635-38.
- Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of the clove essential oil from Syzygium aromaticum on Candida, Aspergillus and dermatophyte species. J Med Microbiol 2009; 58: 1454-62.
- Tyagi AK, Malik A. In situ SEM, TEM and AFM studies of the antimicrobial activity of lemon grass oil in liquid and vapour phase against Candida albicans. Micron 2010; 41: 797-805.
- Ahmad Khan MS, Ahmad I. Biofilm inhibition by Cymbopogon citratus and Syzygium aromaticum essential oils in the strains of Candida albicans. J Ethnopharmacol 2012; 140: 416-26.
- 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.
12. Abdi-Ali A, Mohammadi-Mehr M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents 2006; 27: 196-200.
 13. Soll DR. Candida biofilms: is adhesion sexy? Curr Biol 2008; 18: R717-R720.
 14. Baillie GS and Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 397-403.
 15. Barbosa LCA, Pereira UA, Martinazzo AP, MalthaCRA, Teixeira RR, de Castro Melo E. Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf samples. Molecules 2008; 13: 1864-74.
 16. Tyagi AK, Malik A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. BMC Complement Altern Med 2010; 10: 65.
 17. Khan MSA and Ahmad I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. J Ethnopharmacol 2012; 140: 416-23.
 18. Kurita N, Miyaji M, Kurane R and Takahara Y. Antifungal activity of components of essential oils. Agric Biol Chem 1981; 45: 945-52.