อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2555C123

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* ที่เจริญแบบอิสระและไบโอฟิล์ม

Antimicrobial activity of Curcuma *longa* Linn. crude extract against *Enterococcus faecalis* planktonic and biofilm growth

ทันตแพทย์หญิง ดร.สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล

คณะทันตแพทยศาสตร์

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน ๒ - ส.ค. ๒๕๕๖
เลขทะเบียน 1.63517173
เลขเรียกหนังสือ ว๑ ส๑๒ ด๑๗๓๕ ๒๕๕๖

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* ที่เจริญแบบอิสระและไบโอฟิล์ม

Antimicrobial activity of Curcuma *longa* Linn. crude extract against *Enterococcus faecalis* planktonic and biofilm growth

ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* ที่เจริญแบบอิสระและไบโอฟิล์ม

Antimicrobial activity of Curcuma *longa* Linn. crude extract against *Enterococcus faecalis* planktonic and biofilm growth

พัชราภรณ์ ดีกัง นักศึกษาทันตแพทย์
ณัฐติกา กัดก้อน นักศึกษาทันตแพทย์
อุเทน ฟองวาริน นักศึกษาทันตแพทย์
สุทธิมาส หยวกหยง นักวิทยาศาสตร์
สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล อาจารย์ ดร.
ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

Corresponding Author:
สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล
อาจารย์ ดร. สาขาปริทันตวิทยา ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร 65000
Suttipalin Suwannakul
Lecturer Dr. Periodontal Section, Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand
E-mail: oomdent @hotmail.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ที่เจริญแบบอิสระและไบโอฟิล์มของสารสกัดหยาบขมิ้นชัน **วิธีการศึกษา:** สกัดขมิ้นชันด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ก่อนนำสารสกัดมาศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *E. faecalis* ขั้นต้นด้วยวิธี Agar disc diffusion assay และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (Minimal inhibitory concentration; MIC) และฆ่าเชื้อ (Minimal bactericidal concentration; MBC) ด้วยวิธี Broth dilution assay และศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระและไบโอฟิล์มเปรียบเทียบกับคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ปริมาณโดยปริมาตร (0.2% w/v) **ผลการศึกษา** สารสกัดหยาบขมิ้นชันมีฤทธิ์ต้าน *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระ โดยมีค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อเชื้อเท่ากับ 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนต มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.031 และ 0.063 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับสารสกัดหยาบขมิ้นชันยับยั้งการเจริญไปเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. faecalis* ได้ทั้งหมดที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารสกัดหยาบขมิ้นชันยังสามารถต้านเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มแล้วได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* ที่เป็นแบบไบโอฟิลม์แล้วเท่ากับ 37.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษานี้ยังไม่สามารถแสดงฤทธิ์กำจัดเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญเป็นไบโอฟิลม์แล้วได้ทั้งหมด **สรุป:** สารสกัดหยาบขมิ้นชันนั้นมีประสิทธิภาพในการ

ต้านเชื้อ *E. faecalis* ทั้งที่เจริญแบบอิสระและแบบไบโอฟิล์มได้ แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มนั้นสูงกว่าเชื้อที่เจริญแบบอิสระ

คำสำคัญ ขมิ้นชัน การเจริญแบบไบโอฟิล์ม *Enterococcus faecalis*

Abstract

The aim of this study was to determine the antibacterial activity of Curcuma *longa* Linn. Crude extract that against *Enterococcus faecalis* planktonic and biofilm. **Method** Crude extracts from Curcuma were extracted by 95% ethanol. The antibacterial activity against *Enterococcus faecalis* was carried out by agar disc diffusion assay and determined both MIC and MBC of crude extracts against *Enterococcus faecalis* planktonic and biofilm by broth dilution assay compared to chlorhexidine gluconate (0.2 % w/v). **Result** The MIC and MBC of the crude extracts against *Enterococcus faecalis* planktonic were 25 mg/ml and 50 mg/ml, respectively, whereas those of 0.2% chlorhexidine gluconate were 0.031 mg/ml and 0.063 mg/ml, respectively. The crude extract was able to totally inhibit growth of *Enterococcuc faecalis* biofilms at concentration of 300 mg/ml. In addition, the crude extracts inhibited *Enterococcus faecalis* established biofilm at the minimal concentration of 37.5 mg/ml, however the eradication of established *Enterococcus faecalis* biofilm was not seen at the highest concentration used in this study. **Conclusion** The crude

extracts have antibacterial activity against *Enterococcus faecalis* both planktonic and biofilm. However, the concentration that can inhibit *Enterococcus faecalis* biofilm is higher than planktonic forms.

Keywords : Curcuma *longa* Linn., Biofilm, *Enterococcus faecalis*

บทนำ

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของการรักษาคลองรากฟันที่ล้มเหลว เชื้อสามารถผ่านจากช่องปากไปยังระบบร่างกาย[1,2] โดยผ่านทางเนื้อเยื่อปลายรากฟันที่มีการติดเชื้อหรือทางเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มีการอักเสบได้[2] *E. faecalis* สัมพันธ์กับการติดเชื้อในกระแสโลหิต การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด โรคลิ้นหัวใจอักเสบซึ่งการติดเชื้อเหล่านี้ดังกล่าวเป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญในโรงพยาบาล[3] *E. faecalis* มีการเจริญทั้งแบบอิสระและแบบโอฟิล์มในคลองรากฟัน[4]โดยเชื้อที่มีการเจริญแบบไบโอฟิลม์นั้นพบว่าดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาปัจจุบันสูง[5]รวมทั้งยาและวัสดุที่ใช้อุดในการรักษาคลองรากฟัน ได้แก่ แคลเซียมไฮดรอกไซด์[6] โซเดียมไฮโปคลอไรต์[7]แท่งอุดกัตตาเปอร์ชา[4]เป็นต้น ส่งผลให้เกิดความล้มเหลวในการรักษาคลองรากฟันและปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาลแก้ไขยาก[3,5] ทำให้ต้องมีการใช้ยาในปริมาณที่สูงซึ่งอาจส่งผลข้างเคียงได้ง่ายต่อผู้ที่อาจแพ้ยา และใช้ยานำเข้าจากต่างประเทศซึ่งราคาแพง[3,4,5] ปัจจุบันจึงมีผู้วิจัยจำนวนหนึ่งที่ศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อ[8,9,10,11] สารสกัดที่ได้จากสมุนไพรนั้นมีผลข้างเคียงในการรักษาน้อยมากเมื่อเทียบ

กับยารักษาโรคที่สังเคราะห์ขึ้นจากสารเคมี[10] สารสกัดหยาบ (crude extract) ของพืชบางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดีกว่าสารสกัดบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบในตัวยา[8,11] จึงทำให้ทิศทางการวิจัยในปัจจุบันหันกลับมาสนใจพัฒนายาจากพืชสมุนไพรในรูปของสารสกัดหยาบมากขึ้น[8,9,11] ขมิ้นชัน (Tumeric) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Curcuma *longa* Linn. มีสารสำคัญคือเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) และ น้ำมันหอมระเหย[12] ขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ได้หลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* (*E. coli*), *Helicobacter pyroli* (*H. pyroli*), *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), *Lactobacillu splantarum* (*L. splantarum*), *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus albus* (*S. albus*), *Streptococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Streptococcus pyogene* (*S. pyogene*) เป็นต้น[11,12,13,14] รวมทั้งแบคทีเรียตัวสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบ ได้แก่ *Streptococcous mutans*[15,16] และ *Porphyromonas gingivalis*[17] เป็นต้น และฤทธิ์ในการต้านเชื้อราหลายชนิดรวมทั้งเชื้อรา *Candida albicans*[18] และมีคุณสมบัติทางการชีวภาพที่ดีหลายประการ เช่น มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็นต้น[11,19] และมีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ทดลองต่ำ[19,20] แต่ยังไม่มีรายงานฤทธิ์ของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อเชื้อ *E. faecalis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบว่าสัมพันธ์กับการติดเชื้อซ้ำในคลองรากฟัน[1,6,7] และการเป็นกลับซ้ำของโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง[20,21] การศึกษาสารสมุนไพรจากธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นการทดสอบสารทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญแบบอิสระในหลอดทดลอง[8,9,10,11,13] และมีเพียงการศึกษาไม่มากที่มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการต้านการเกิดไบโอฟิลม์หรือการ

กำจัดจุลชีพที่เจริญแบบไบโอฟิลม์[15,23,24] ในความเป็นจริงแบคทีเรียที่ก่อโรคในร่างกาย โดยเฉพาะในช่องปากนั้นเป็นแบคทีเรียที่อาศัยกันโดยยึดเกาะกับผิวสัมผัส หรือยึดเกาะระหว่างกันเป็นแบบไบโอฟิลม์[15, 23, 24] ซึ่งการเจริญแบบไบโอฟิลม์นั้นทำให้แบคทีเรียมีความสามารถในการมีชีวิตรอดสูง มีโอกาสในการก่อโรคและสามารถต้านยาปฏิชีวนะได้มากขึ้น[25] วิธีการรักษาในปัจจุบันจึงหันมาให้ความสำคัญกับการพัฒนาสารที่มีความสามารถต้านการเกิดเป็นไบโอฟิลม์[26,27,28] และปัจจุบันมีการศึกษาสารที่มาจากธรรมชาติมากขึ้นเนื่องจากเหตุผลเรื่องความปลอดภัยและการพัฒนาการดื้อยาของเชื้อเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะหรือสารสังเคราะห์ทางเคมี[11,26,27,28,29] ในทางทันตกรรมก็มีการนำสารสมุนไพรบางชนิดมาทดลองใช้เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคเช่นกัน[30,31,32] ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพจากสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญทั้งแบบอิสระและแบบไบโอฟิล์ม เพื่อเป็นนำข้อมูลพื้นฐานที่ได้ไปประยุกต์ใช้ต่อไปโดยเป็นการนำเอาสมุนไพรท้องถิ่นมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อให้เกิดประโยชน์ในการรักษาทางด้านทันตกรรม

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมสารสกัดหยาบจากขมิ้นชันนำผงขมิ้นชันมาทำการสกัดโดยด้วยวิธีการสกัดเย็น (Maceration) ใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ทำการสกัดในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดปากขวดให้สนิทแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 90 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

เพื่อแยกส่วนกากและส่วนเหลว นำส่วนเหลวที่สกัดได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยระบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้สารสกัดหยาบเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำมาทดสอบ

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ *E. faecalis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 29212 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด Brain-Heart Infusion Broth (BHI broth) ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการศึกษา เชื้อที่บ่มแล้วมาปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland standard เบอร์ 0.5 ให้ได้ค่าดูดกลืนแสงประมาณ 0.08-0.1 ซึ่งมีปริมาณเทียบเท่าเชื้อ 10^8 โคโลนีต่อ 1 มิลลิลิตร (colony forming units /milliliter; CFU/ml) ก่อนนำมาปรับใช้ในการทดลองต่อไป

การจำลองเชื้อแบบไบโอฟิล์ม ถาดหลุมชนิด 24 หลุม (24-well microtiterplates) ถูกนำมาใช้ในการดัดแปลงในการจำลองไบโอฟิล์ม โดยใส่อาหารเหลวในแต่ละหลุม ของถาดหลุมชนิด 24 หลุม ในปริมาณที่เท่ากัน จากนั้นเติมเชื้อ *E. faecalis* เริ่มต้นลงไปในปริมาณตั้งต้น 10^5 CFU/ml ด้วยปริมาตรเท่ากัน ทำการเจือจางเชื้อแบบ 2 เท่า (2 folds dilutions) และนำไปบ่มเลี้ยงในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากผ่านการบ่มเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 24 ชั่วโมงจะเห็นเชื้อเจริญเป็นแผ่นบางๆสีขาวขุ่นจับตัวกันที่บริเวณก้นของถาดหลุม จากนั้นอาหารเหลวดูดทิ้งไป เชื้อที่ไม่มีการยึดเกาะกับถาดหลุมหรือยึดเกาะอย่างหลวมๆ ก็จะถูกกำจัดออกโดยการล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 รอบแล้วดูดทิ้ง คว่ำถาดหลุมลงบน

กระดาษซับแห้งเป็นเวลา 15นาที ก่อนนำไปใช้ในการทดลองคุณสมบัติการต้านเชื้อของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระของสารสกัดหยาบขมิ้นชัน โดยใช้วิธีดิฟฟิวชั่น **(diffusion method)**ในการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับคลอเฮกซิดีนกลูคลอเนตที่เป็นสารละลายมาตรฐานซึ่งเป็นตัวควบคุมบวกและสารโพลิเอธลีนไกลคอลที่เป็นตัวทำละลายซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ โดยนำไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อมาจุ่มเชื้อที่ได้เตรียมไว้ แล้วนำมาป้ายถี่ๆลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่ว จากนั้นนำมาทดสอบโดยหยดสารทดสอบต่างๆที่ปริมาตร15 ไมโครลิตรลงบนแผ่นดิสก์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วแผ่นดิสก์นำมาวางลงบนผิวหน้าอาหารแล้วกดเบาๆ เพื่อติดแนบกับผิวหน้าอาหาร หลังจากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยใช้เวอร์-เนียร์คาลิปเปอร์ (Vernier caliper) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น สารทดสอบที่มีบริเวณใสมากกว่า 6 มิลลิเมตร ถือว่ามีฤทธิ์ต้านจุลชีพและอ่านผลอีกครั้งที่เวลา 48 ชั่วโมงทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้งและ**ใช้วิธีไดลูชั่น (dilution method)** ในการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ **(Minimal inhibitory concentration; MIC)** และฆ่าเชื้อ **(Minimal bactericidal concentration; MBC)** ของสารสกัดหยาบขมิ้นชันเปรียบเทียบกับคลอเฮกซิดีนกลูคลอเนต โดยทำการทดลอง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองที่เป็นสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรทำการเจือจางแบบ

2 เท่า จนได้ความเข้มข้นทั้งหมด 13 ความเข้มข้น กลุ่มควบคุมบวก คลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตที่ความเข้มข้นตั้งต้นร้อยละ 0.2 ปริมาณต่อปริมาตร และกลุ่มควบคุมลบโพลีเอธิลีนไกลคอลที่ความเข้มข้นตั้งต้นร้อยละ 60 ปริมาณต่อปริมาตร ทำการเจือจางแบบ 2 เท่าเช่นกัน เติมเชื้อที่เตรียมไว้ลงไปในทุกหลอดในปริมาณที่เท่ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง เมื่อบ่มเชื้อจนครบ 24ชั่วโมงแล้วให้สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีเชื้อเจริญอยู่หรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่นอ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC บันทึกหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละหลอดไปหยอดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วอ่านผลโดยการสังเกตการเจริญของแบคทีเรียบนจานเพาะเชื้อโดยจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่เพาะจากหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นของสารละลายต่ำที่สุดและไม่พบโคโลนีของเชื้อเกิดขึ้น จะเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้จึงจะเป็นค่า MBC ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งตลอดขั้นตอนการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. faecalis* (Developmental biofilm formation inhibition assay) โดยทำการเจือจางสารสกัดหยาบจากขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยวิธีการเจือจางแบบ 2 เท่า ใน ถาดหลุมชนิด 24 หลุม เพื่อเป็นกลุ่มทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* แบบไบโอฟิล์ม เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพียงอย่างเดียว และกลุ่มควบคุมบวกซึ่งเป็นคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ0.2 ปริมาณต่อปริมาตร(0.2 % w/v) ใส่เชื้อลงไปด้วยปริมาณเริ่มต้นที่เท่ากัน (10^5CFU/ml) และนำไปบ่มเลี้ยงในในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากผ่านการบ่มเลี้ยงเชื้อไป 24 ชั่วโมงแล้ว อาหารเหลวจะถูกดูดทิ้งไปและเชื้อที่ไม่มีการยึดเกาะกับถาดหลุมจะถูกกำจัดออกโดยการล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 รอบจากนั้นดูดทิ้ง แล้วใส่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ปริมาตร 400 ไมโครลิตรในทุกหลุม เชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มที่อยู่ที่ก้นของถาดหลุมในแต่ละหลุมถูกขูดออกโดยห่วงเขี่ยเชื้อโลหะ (metal loop) จากนั้นเจือจางสารละลาย 10 เท่า จากนั้นนำสารละลายจากแต่ละหลุมที่ได้เลี้ยงบนจานเพาะเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วอ่านผลโดยนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งตลอดขั้นตอนการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม (Biofilm eradication assay)

เชื้อ *E. faecalis* ที่ได้มีการจำลองการเจริญไบโอฟิลม์แล้ว ในถาดหลุม 24 หลุมดังอธิบายข้างต้นถูกนำมาใช้ในการศึกษาในขั้นตอนนี้ สารสกัดหยาบขมิ้นชันถูกเตรียมให้มีความเข้มข้นต่างๆ กันโดยนำมาเจือจางกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวให้มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบขมิ้นชันเป็น 300, 200, 150, 100, 75, และ 37.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุมที่มีคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และ 0.12 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก และกลุ่มควบคุมลบซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพียงอย่างเดียว นำสารที่เตรียมข้างต้นใส่ลงในถาดหลุมที่มีเชื้อได้จำลองเป็นแบบไบโอฟิล์มแล้วในปริมาณที่เท่ากัน และนำไปบ่มเลี้ยงในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากผ่านการบ่มเลี้ยงเชื้อไป 24 ชั่วโมงแล้ว แล้วใส่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ปริมาตร 400

ไมโครลิตรในทุกหลุม เชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มที่อยู่ที่ก้นของถาดหลุมในแต่ละหลุมถูกขูดออกโดยห่วงเขี่ยเชื้อโลหะ จากนั้นเจือจางสารละลาย 10 เท่า จากนั้นนำสารละลายจากแต่ละหลุมที่ได้เลี้ยงบนจานเพาะเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผลโดยนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งตลอดขั้นตอนการทดลอง

การแปลผลทางสถิติ

ความไวของเชื้อต่อสารสกัดหยาบขมิ้นชัน อธิบายด้วยขนาดด้วยค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระและแบบไบโอฟิลม์อธิบายด้วยค่า MIC และ MBC ความสามารถในการยับยั้งการเจริญแบบไบโอฟิลม์และความสามารถในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญเป็นแบบไบโอฟิลม์แล้วแสดงด้วยค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเชื้อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้สถิติความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และ Post Hoc Tests (Tukey HSD) ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS version 17.0 ในการวิเคราะห์ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 ($P<0.05$)

ผลการทดลอง

การทดสอบความไว (Susceptibility test) ของเชื้อ *E. faecalis* ต่อสารสกัดหยาบขมิ้นชัน เพื่อศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากขมิ้นชันต่อเชื้อ *E. faecalis* ด้วยวิธี diffusion methodพบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ความเข้มข้นที่ทดสอบทั้งหมดไม่แสดงค่าโซนยับยั้งเช่นเดียวกับกับโพลีเอธิลีนไกลคอล ซึ่งเป็น

กลุ่มควบคุมลบ ในขณะที่คลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวกแสดงค่าโซนยับยั้งโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 21.33 ± 0.75 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระ (Antimicrobial activity test) ด้วยวิธี broth dilution method เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันมีค่า MIC เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 50มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่โพลีเอธิลีนไกลคอลซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมลบ มีค่า MIC เท่ากับ 300มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 600 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนต (0.2 % w/v) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก มีค่า MIC เท่ากับ 0.031 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 0.063 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

การทดสอบฤทธิ์ในยับยั้งการเจริญเป็นแบบไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. faecalis* (*E.faecalis* biofilm formation inhibitory effect) พบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และ 0.12 ปริมาณโดยปริมาตร (0.2 % w/v และ 0.12 % w/v) สามารถยับยั้งการเจริญเป็นแบบไบโอฟิล์มของเชื้อ *E.faecalis* ได้ทั้งหมด ในขณะที่สารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 200 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งได้บางส่วน โดยพบว่ายังมีจำนวนของเชื้อ *E.faecalis*

ที่สามารถเจริญแบบไบโอฟิล์มได้บ้าง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวกพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 1)

การทดสอบความสามารถในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม (*E.faecalis* biofilm eradication ability) พบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. faecalis*ที่เจริญในแบบจำลองแบบไบโอฟิล์มแล้ว ได้เช่นเดียวกับคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตโดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E.faecalis* (MIC) ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มแล้วได้ มีค่าเท่ากับ 37.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และ 0.12 ปริมาณโดยปริมาตร (0.2%w/v และ 0.12% w/v) ก็พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อนึ่งการทดลองนี้ไม่พบว่าทั้งสารสกัดหยาบจากขมิ้นชันและคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการกำจัดเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิลม์ได้ทั้งหมด (Minimal biofilm eradication concentration; MBEC) (รูปที่ 2)

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้เป็นการศึกษากับเชื้อ *E. faecalis* ทั้งที่มีการเจริญแบบอิสระและแบบไบโอฟิลม์โดยพบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ*E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระจากการทดสอบโดยวิธีการ broth dilution assay โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้เป็นการนำสารโพลีเอธิลีนไกลคอลมาเป็นตัวทำละลายของสารสกัดหยาบขมิ้นชันเนื่องจากขมิ้นชันไม่

สามารถละลายในน้ำได้[19,29] สารละลายขมิ้นชันในโพลีเอธิลีนไกลคอลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นสารละลายที่มีความหนืดค่อนข้างสูงและทำให้การซึมผ่านแผ่นดิสก์และการแพร่ของสารผ่านเจลในจานเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นไปได้ยากดังนั้นการแสดงผลของสารสกัดขมิ้นชันจึงถูกจำกัดด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงไม่เห็นโซนยับยั้งเกิดขึ้นกับสารทดสอบที่ความเข้มข้นใด ๆรวมทั้งในโพลีเอธิลีนไกลคอลด้วย แต่อย่างไรก็ดีขมิ้นชันยังสามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. faecalis* ได้จากการศึกษาด้วยวิธี broth dilution method งานวิจัยหลายการศึกษาที่ให้เหตุผลของการใช้วิธี broth dilution method ในการแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากเหตุผลของข้อจำกัดของตัวทำละลายและความสามารถในการแพร่ผ่านของยาดังกล่าวและวิธี disc diffusion โดยทั่วไปใช้ในการศึกษาแบบเบื้องต้น[23,24,26,27,28] งานวิจัยนี้นำสารโพลีเอธิลีนไกลคอลที่มีรายงานการใช้กว้างขวางในอุตสาหกรรมการผลิตยา เครื่องสำอาง และอาหาร และมีความปลอดภัยสูง[29,33,34] และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าไม่มีผลต่อเชื้อ *E. faecalis* เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นที่น้อยกว่าร้อยละ 35 ปริมาณโดยปริมาตร เนื่องจากเหตุผลที่ต้องการพัฒนาต่อไปในการผลิต ผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรมเพราะสารไดเมทิลซัลเฟตที่หลายงานวิจัยใช้ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆนั้น มีความเป็นพิษต่อเซลล์ร่างกายและส่งผลต่อการฆ่าแบคทีเรียหากใช้ในปริมาณที่สูงเช่นกัน[34,35] นอกจากนั้นแล้วงานวิจัยล่าสุดยังแสดงให้เห็นผลของสารโพลีเอธิลีนไกลคอลต่อการเสริมฤทธิ์การต้านเชื้อของสารขมิ้นชันเมื่อทดสอบแบบการฉายแสง[34] ผลจากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าเหง้าขมิ้นชันมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพได้[11,12,13,14,15,16,17,36,37] ค่า MIC ที่แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อ

แบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากขมิ้นชันยังพบความแตกต่างกันโดยขึ้นกับแหล่งที่มาของขมิ้นชันและวิธีการสกัดของขมิ้นชัน[36,37,38]แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวใช้เป็นตัวทำละลายซึ่งต่างจากงานวิจัยครั้งนี้ และแหล่งที่มาของขมิ้นชันและวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน[37, 38] เมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC และ MBC สารของสกัดหยาบจากขมิ้นชันและคลอเฮกซิดีนกลูโคลเนตที่เป็นกลุ่มควบคุมบวกมีค่า เท่ากับ 0.031 และ 0.063 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับพบว่ายังมีประสิทธิภาพที่ไม่ดีเท่าคลอเฮกซิดีนกลูโคลเนตเนื่องจากต้องใช้สารสกัดหยาบความเข้มข้นที่สูงกว่าคลอเฮกซิดีนกลูโคลเนตหลายเท่าจึงจะสามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อได้ผลการศึกษานี้ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) ได้ โดยมีค่า MIC และ MBC ที่ 0.078 และ 0.156 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตมีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 0.0025 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. sanguinis* น้อยกว่าคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตเช่นกัน[18] ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบขมิ้นชันและคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตต่อเชื้อ *E. faecalis* มีค่าสูงกว่าเชื้อ *S. sanguinis* แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. faecalis* มีความดื้อต่อยามากกว่าเชื้อ *S.sanguinis* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานเชื้อกลุ่ม *Enterococcus* มีคุณสมบัติดื้อยาต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดโดยเฉพาะกลุ่ม cephalosporins โดยมีระดับค่า MIC ต่อยา penicillin สูงกว่าเชื้อ *Streptococci* ถึง 10-100 เท่า[5] และพบว่าเชื้อ *E. faecalis* มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นในลำไส้[39] ผลจากการศึกษานี้พบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ความเข้มข้นเท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

เชื้อ *E. faecalis* ไม่ให้เกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ทั้งหมดได้เช่นเดียวกับคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนต แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเกิดเป็นไบโอฟิลม์ได้เช่นเดียวกับคลอเฮกซิดีนกลูโคเนต (รูปที่ 1) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากขมิ้นชันที่ต้านเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มแล้วนั้น พบว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่มีการเกิดเป็นไบโอฟิลม์แล้วได้โดยมีค่าความ MIC เท่ากับ 37.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 2) แต่เนื่องจากการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นสูงสุดในการทดลองเป็น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจึงไม่สามารถแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการกำจัดเชื้อทั้งหมด (Minimal biofilm eradication concentration, MBEC) ได้เช่นเดียวกันกับคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ปริมาณโดยปริมาตรโดยยังคงมีปริมาณเชื้อที่สามารถเจริญต่อได้หลังจากการสัมผัสกับสารทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในทั้ง 2 กลุ่มทดสอบ หากมีการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารทดสอบอาจแสดงผลการกำจัดเชื้อทั้งหมดได้ แต่อย่างไรก็ดีประสิทธิภาพของคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตก็ยังดีกว่าสารสกัดเนื่องจากมีปริมาณเชื้อที่เหลือน้อยกว่า ผลจากการศึกษาที่อภิปรายข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการต้านเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มแล้วนั้น จะใช้ปริมาณความเข้มข้นของขมิ้นชันสูงกว่าการยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* ที่พัฒนาไปเป็นแบบไบโอฟิล์ม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสารสกัดข่าลิง (*Alpinia conchigera Griff.*) ที่แสดงค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มแล้ว เท่ากับ 125 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็น 2.5 เท่าของค่า MBC ของเชื้อที่เจริญแบบอิสระ[27] อาจอธิบายได้ว่าลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญเป็นแบบไบโอฟิล์ม ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านของสาร

เข้าไปในเชื้อลดน้อยลง และอัตราเมแทบอลิซึมและการเติบโตของเชื้อแบบไบโอฟิล์มจะต่ำกว่าปกติ ทำให้การออกฤทธิ์ของสารลดลงอีกด้วย[25,26,27,28] การศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่มักเป็นการศึกษากับเชื้อแบคทีเรียที่มีการเจริญแบบอิสระ แต่ในสภาวะในช่องปากนั้นแบคทีเรียจะอยู่อาศัยกันแบบไบโอฟิลม์ และมีแบคทีเรียหลายชนิดอาศัยร่วมกัน โดยจะยึดเกาะกับผิวฟัน รากฟัน เนื้อเยื่อบุผิวในช่องปาก[23,27]เป็นต้น รวมทั้งภายในท่อเนื้อฟัน เช่นภายในคลองรากฟัน[1,32] การอยู่ร่วมกันแบบไบโอฟิลม์นี้จะทำให้เชื้อมีความต้านทานต่อยาหรือสารต้านเชื้อมากขึ้น[1,6,7,8] เชื้อ *E.facecalis* ที่มีการจำลองการเจริญแบบไบโอฟิลม์ในการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าจะยังไม่ใกล้เคียงกับสภาวะจริงในช่องปากแต่ผลจากการศึกษาก็แสดงให้เห็นว่ามีความสามารถในการต้านการยับยั้งและหรือฆ่าเชื้อของสารสกัดหยาบขมิ้นชันและคลอเฮกซิดีนกลูคลอเนตได้มากกว่าที่เจริญแบบอิสระซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาเบื้องต้นนี้น่าจะนำไปปรับขนาดยาหรือผลิตภัณฑ์ที่ใช้ต่อไปได้ใกล้เคียงมากกว่าผลการศึกษาแบบอิสระ[23,24,27] เป็นที่ทราบกันว่าคลอเฮกซิดีนกลูโคลเนตนั้นมีกลไกการออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียและทำให้เซลล์แตกเกิดการรั่วไหลของสารเคมีภายในทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด[40,41] แต่เนื่องจากการต้านเชื้อ *E. faecalis* ที่จำลองแบบไบโอฟิลม์ของสารสกัดหยาบจากขมิ้นชันเป็นการศึกษาครั้งแรก กลไกการยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* ที่เป็นแบบไบโอฟิลม์จึงยังไม่สามารถอธิบายได้สันนิษฐานอ้างอิงจากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงกลไกการยับยั้งเชื้อแกรมลบ เช่น *E. coli* และ *B. subtilis* โดยสารสกัดบริสุทธิ์จากขมิ้นชันมีผลทำลายโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียตรงตำแหน่งโดเมน FTHZ ส่งผลให้แบคทีเรียดังกล่าวตายเนื่องจากเกิดการรั่วไหลสารภายในเซลล์ ซึ่งสารสกัดหยาบจาก

ขมิ้นชันจากการศึกษาครั้งนี้ ก็อาจจะมีผลที่ตำแหน่งโครงสร้างเดียวกัน[42] เช่นเดียวกับแบคทีเรียดังกล่าวก็เป็นได้และผลการศึกษาแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *S. aureus* พบว่าสารสกัดจากสมุนไพร *Alpinia galanga Linn.* มีผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ เช่นกัน[43] การศึกษาเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *H. pyroli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้เช่นเดียวกับ *E. faecalis* พบว่าสารสกัดขมิ้นชันส่งผลต่อการลดลงของการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pyroli* เช่นเดียวกัน แต่การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาโดยการย้อมสีแบคทีเรียไบโอฟิลม์ด้วย cystal violet และวัดค่าการดูดกลืนแสงร่วมกับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด[44] ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของผู้วิจัย ซึ่งทำการศึกษาการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียบนแบบจำลองไบโอฟิล์ม (ถาดหลุม 24 หลุม) ผู้วิจัย *H. pyroli* อธิบายเหตุผลของการลดลงแบบไบโอฟิล์มว่าเกิดจากความสามารถในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียของสารสกัดขมิ้นชันซึ่งแสดงผลจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราดที่ผิวเซลล์[44] นอกจากนั้นเหตุผลอื่นที่พอจะอธิบาย ได้แก่ สารสกัดขมิ้นชันอาจมีผลต่อปัจจัยที่ส่งเสริมการเกิดเป็นไบโอฟิล์มของ *E. faecalis* เช่น เอนไซม์เจลลาติเนส (gelatinase enzyme)[45] โปรตีนที่ผิวเซลล์ enterococcal surface protein (esp)[46] ซึ่งยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป เป็นที่ทราบกันดีว่าคลอเฮกซิดีนกลูคลอเนตที่นำมาใช้เป็นน้ำยาบ้วนปากและสารฉีดล้างในคลองรากฟันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ในช่องปากได้หลายชนิด[1,6,7,31,32] แต่คลอเฮกซิดีนกลูคลอเนตก็มีผลข้างเคียงมากมาย เช่น การติดสี กลิ่น รส ที่ไม่น่าพึงพอใจ และยังไม่มีการศึกษาผลข้างเคียงและความปลอดภัยในระยะยาว[31,32,41] ขมิ้นชันซึ่งเป็นสมุนไพรไทยพื้นบ้าน หาได้ง่าย และมีราคาถูก และ

เป็นสารจากธรรมชาติที่มีผลข้างเคียงน้อย และมีข้อดีทางการแพทย์หลายประการ[8,11,12,30] น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาพัฒนาทางทันตกรรมต่อไปอนาคต โดยอาจนำมาใช้ส่วนผสมของยารักษาคลองรากฟัน หรือ ยาฉีดล้างคลองรากฟัน เป็นต้น

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเบื้องนี้ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *E. faecalis* ทั้งที่เจริญแบบอิสระและแบบไบโอฟิลม์ได้ โดยมีค่า MIC และ MBC เมื่อทดสอบกับเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระเท่ากับ 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญไปเป็นแบบไบโอฟิลม์ของเชื้อ *E. faecalis* ได้ทั้งหมดที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MICที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* ที่เป็นแบบไบโอฟิลม์แล้วได้เท่ากับ 37.5มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสารสกัดหยาบขมิ้นชันและคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระและแบบไบโอฟิลม์ พบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันมีฤทธิ์น้อยกว่าคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตและต้านเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มได้น้อยกว่าที่เจริญแบบอิสระประมาณ 1.5 เท่า ผลจากการศึกษานี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของขมิ้นชันที่มีผลต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญทั้งสองแบบซึ่งน่าจะได้นำไปพัฒนาและทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อการนำมาพัฒนาต่อยอดความรู้เพื่อนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในทางทันตกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยนเรศวร และคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *J Endod* 2011; 37: 363-366.
2. Ito HO. Infective endocarditis and dental procedures: evidence, pathogenesis, and prevention. *J Med Invest* 2006; 53:189-198.
3. Cunha BA, Mickail N, Eisenstein L. *E. faecalis* vancomycin-sensitive enterococcal bacteremia unresponsive to a vancomycin tolerant strain successfully treated with high-dose daptomycin. *Heart Lung* 2007; 36: 456-461.
4. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated rootcanals. *J Endod* 2002; 28: 689-693.
5. Marothi YA, Agnihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance - An overview. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23: 214-219.
6. Siqueira JF Jr, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996; 22: 674-676.
7. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 142-149.
8. Supanpan P, Wuttipanchai W, Nimrat S. Efficiency of some commercial herb extracts and fresh herb extracts on inhibition of *Staphylococcus aureus* growth. *Thai J Toxicology* 2010; 25: 15-28. (in Thai)
9. Vaijayanthimala J, Anandi C, Udhaya V, Pugalendi KV. Anticandidal activity of certain south indian medicinal plants. *Phytother Res* 2000; 14: 207-209.
10. Mahady GB, Pendland SL, Stoia A, Hamill FA, Fabricant D, Dietz BM, Chadwick LR. In *vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytother Res* 2005; 19: 988-991.

11. Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat Prod Rep* 2010; 27: 238–254.
12. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from *in vitro*, animal and human studies. *Br J Nutr* 2010; 103: 1545-1557.
13. Farnsworth NR, Bunyapraphatsara N. Thai medicinal plants (recommended for primary health care system), 1st ed. Prachachon Press Bangkok . Thailand 1992: 130-142.
14. Wongseri V, Siripong P. Antibacterial activity of curcuminoid compounds from *Curcuma Zedoaria Roscoe* rhizome. *J Thai Cancer* 1995; 21: 17-24.
15. Lee KH, Kim BS, Keum KS, Yu HH, Kim YH, Chang BS, Ra JY, et al. Essential oil of *Curcuma longa* inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation. *J Food Sci* 2011; 76: 226–230.
16. Song J, Choi B, Jin EJ, Yoon Y, Choi KH. Curcumin suppresses *Streptococcus mutans* adherence to human tooth surfaces and extracellular matrix proteins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31:1347-1352.
17. Hwang JK, Shim JS, Pyun YR. Antibacterial activity of xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza* against oral pathogens. *Fitoterapia* 2000; 71: 321-323.
18. Apisariyakul A, Vanittanakom N, Buddhasukh D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*). *J Ethnophamacol* 1995; 49: 163-169.
19. Cikrikci S, Mozioglu E, Yilmaz H. Biological activity of curcuminoids isolated from *Curcuma longa*. *Rec Nat Prod* 2008; 2:19-24.
20. Shankar TN, Shantha NV, Ramesh HP, Murthy IA, Murthy VS. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guineapigs and monkeys. *Indian J Exp Biol* 1980; 18: 73-75.
21. Balaei-Gajan E, Shirmohammadi A, Abashov R, Agazadeh M, Faramarzie M. Detection of *enterococcus faecalis* in subgingival biofilm of patients with chronic refractory periodontitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15: 667-670.
22. Sun J, Sundsfjord A, Song X. *Enterococcus faecalis* from patients with chronic periodontitis: virulence and antimicrobial resistance traits and determinants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 267-272.
23. Cardoso Sá N, Cavalcante TT, Araújo AX, dos Santos HS, Albuquerque MR, Bandeira PN, da Cunha RM, Cavada BS, Teixeira EH. Antimicrobial and antibiofilm action of *Casbane Diterpene* from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. *Arch Oral Biol* 2012; 57: 550-555.

24. Chusri S, Sompetch K, Mukdee S, Jansrisewangwong S, Srichai T, Maneenoon K, LimsuwanS, et al. Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by traditional thai herbal recipes used for wound treatment. *Evidence-Based and Compl Alt Med* 2012; 2012: 1- 8.

25. Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: An emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57: 677–701.

26. Na HS, Cha MH, Oh DR, Cho CW, Rhee JH, Kim YR. Protective mechanism of curcumin *against Vibrio vulnificus* infection. *Immunol Med Microbiol* 2011; 63: 355-362.

27. Janreung S, Alai S, Srilakorn W,Pengkumsri N. Antimicrobial effect of *Alpinia Conchigera* rhizome extracts on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Thai Pharm Health Sci J* 2010; 5: 279-286. (in Thai)

28. Rukayadi Y, Han S, Yong D, Hwang JK. In *vitro* antibacterial activity of panduratin A against enterococci clinical isolates. *Biol Pharm Bull* 2010; 3:1489-1493.

29. Piyawong S, Mesad S, Buakum P, Pruankum P, Haohan T, Suwannakul S. Antimicrobial activity against *Streptoocccus Sanuguinis* of *Curcuma longa Linn.* crude extract. *Thailand J health promot and environment health 2013*; 36: 65-74. (in Thai)

30. Rastogi P, Anand V, Gulati M, Lal N, Dixit J, Singhal R. A review of curcumin in reference to its use in oral diseases. *AAM* 2012; 1: 140-143.

31. Suhag A, Dixit J, Dhan P: Role of curcumin as a subgingival irrigant: a pilot study. *Perio* 2007; 4: 115-121.

32. Vinothkumar TS, Rubin MI, Balaji L, Kandaswamy D. In *vitro* evaluation of five different herbal extracts as an antimicrobial endodontic irrigant using real time quantitative polymerase chain reaction. *J Conserv Dent* 2013; 16: 167-170.

33. Henning T. Polyethylene glycols (PEGs) and the pharmaceutical industry. *Fine, Specialty and Performance chemicals* 2002; 1: 57-59.

34. Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Photokilling of bacteria by curcumin in selected polyethylene glycol 400 (PEG 400) preparations. Studies on curcumin and curcuminoids, XLI. *Pharmazie* 2010; 65: 600-606.

35. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1600-1603.

36. Essawi T, Srour M. Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000; 70: 343-349.

37. Gul N, Mujahid TY, Jehan N, Ahmad S. Studies on the antibacterial effect of different fractions of *Curcuma longa* against unrinary tract isolates. *Pakistan J Bio Sci* 2004; 7: 2055-2060.

38. Mehvish S, Betty D, Murli K. Antimicrobial activity of three different rhizomes of *Curcuma longa* and *Curcuma aromatica* on uropathogens of diabetic patients. *Int J Pharmacy and Pharmaceutical Sci* 2011; 3: 273-279.

39. Jazayeri S, Mustafa S, Manap MY, Ali AM, Ismail A, Faujan, NH, Shaari, MY. Survival of bifidobacteria and other selected intestinal bacteria in TPY medium supplemented with curcumin as assessed in vitro. *Int J Probiotics Prebiotics* 2009; 4: 15-22.

40. Maillard JY. Bacterial target sites for biocide action. *J Appl Microbiol* 2002; 92 Suppl: 16S-27S.

41. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In *vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001; 34: 424-8.

42. Kaur S, Modi NH, Panda D, Roy N. Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ--a structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. *Eur J Med Chem*. 2010; 45:4209-4214.

43. Oonmetta-aree J, Suzuki T, Gasaluck P, Eumkeb G Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga Linn.*) on *Staphylococcus aureus*. *LWT* 2006; 39: 1214–1220.

44. Pattiyathanee P, Vilaichone RK, and Chaichanawongsaroj N. Effect of curcumin on *Helicobacter pylori* biofilm formation. *Afr J Biotechnol* 2009; 8: 5106-5115.

45. Wang L, Dong M, Zheng J, Song Q, Yin W, Li J, Niu W .Relationship of biofilm formation and *gelE* gene expressionin *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *J Endod* 2011; 37: 631-636.

46. Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, Baldassarri L. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcusfaecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 256: 145–150.

QR
๘๒
ร๗๘
ส๗๒๕
๒๕๕๖

สำนักหอสมุด
๒ - ส.ค. ๒๕๕๖
1.6351773

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของค่าโซนยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. faecalis* ของสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของค่าโซนยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. faecalis* ของสารโพลีเอทาลีนไกลคอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาณโดยปริมาตร (60% w/v) และคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตความที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ปริมาณโดยปริมาตร (0.2% w/v)

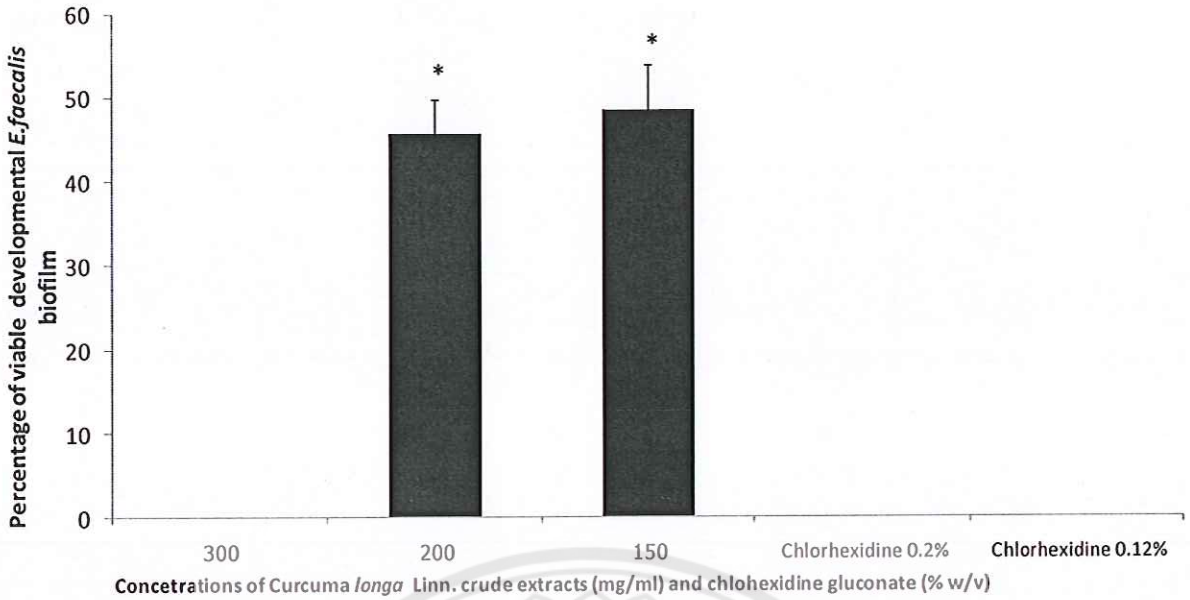
Table 1 The average of inhibition zone of *Curcuma longa Linn.* crude extract compared to those of polyethelene glycol (60% w/v) and chlorhexidine gluconate (0.2% w/v)

Substrates	average inhibition zone (mean±SD) (mm.)
Curcuma longa Linn. Crude extract (500 mg/ml)	0
Curcuma longa Linn. Crude extract (300 mg/ml)	0
Curcuma longa Linn. Crude extract (200 mg/ml)	0
Curcuma longa Linn. Crude extract (100 mg/ml)	0
Polyethelene glycol (60% w/v)	0
Chlorhexidine gluconate (0.2% w/v)	21.33 ±0.75

ตารางที่ 2 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญและการฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ของสารสกัดหยาบขมิ้นชันเปรียบเทียบผลกับกลุ่มควบคุมลบโพลีเอทาลีนไกลคอลและกลุ่มควบคุมบวกคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ปริมาณโดยปริมาตร (0.2% w/v)

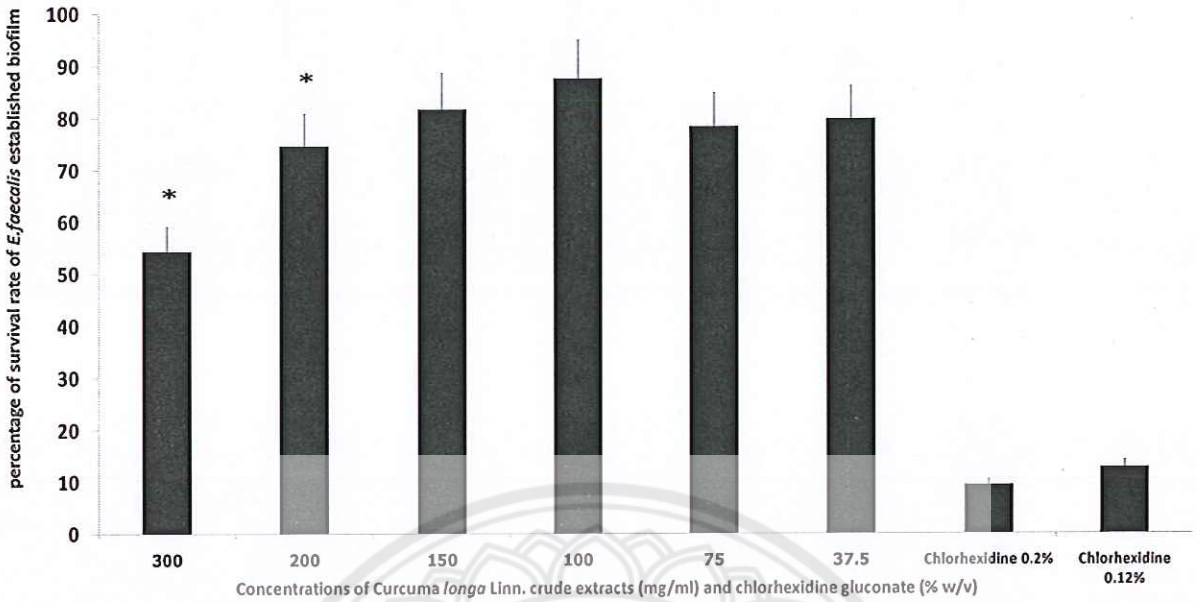
Table 2 The MIC and MBC of *Curcuma longa Linn.* Crude extractand compared to those of Polyethelene glycol (60%) and Chlorhexidine gluconate (0.2%) on *E.faecalis* ATCC-29212

Test agents	Antimicrobial activity	
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
Curcumin longa Linn. Crude extract	25	50
Polyethelene glycol	300	400
Chlorhexidine gluconate (0.2% w/v)	0.031	0.063



รูปที่ 1 กราฟแสดงร้อยละของจำนวนเชื้อ *E. faecalis* ที่มีชีวิตอยู่และสามารถเจริญเป็นแบบไบโอฟิล์มได้หลังทดสอบด้วยสารสกัดหยาบขมิ้นชันและคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนต ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในแบบจำลองถาดหลุม 24 ไมโครไตเตอร์เพลทเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (* แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดสอบกับคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตที่ $P< 0.05$)

Figure 1 Graph showed the percentage of viable developmental *E. faecalis* biofilm after tested with Curcuma *longa Linn.* Crude extract and Chlorhexidine gluconate at varied concentrations in 24-microtiters plate for 24 hours. (*represented as statistical difference comparing between tested groups and chlorhexidine groups, $P< 0.05$)



รูปที่ 2 กราฟแสดงร้อยละของจำนวนเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญเป็นแบบไบโอฟิลม์แล้วที่ได้จากแบบจำลองถาดหลุม 24 ไมโครไตเตอร์เพลท ที่มีรอดชีวิตหลังทดสอบด้วยสารสกัดหยาบขมิ้นชันและคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (* แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดสอบกับคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตที่ $P< 0.05$)

Figure 2 Graph showed the percentage of survival established *E. faecalis* biofilm numbers derived from 24-microtiters plate after tested with Curcuma *longa Linn*. Crude extract and Chlorhexidine gluconate at varied concentrations for 24 hours. (*represented as statistical difference comparing between tested groups and chlorhexidine groups, $P< 0.05$)

มหาวิทยาลัยนเรศวร