ว.วิทย. มข. 49(4) 343-350 (2564) KKU Sci. J. 49(4) 343-350 (2021)

# ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย และต้านการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดขมิ้นอ้อยต่อเชื้อ *Streptococcus mutans*

# Antioxidant Activity, Antibacterial and Anti-biofilm Formation of *Curcuma zedoaria* Extract Against *Streptococcus mutans*

สุรพล ป้อมพันธ์[1] พรรณิภา เจ๊กแตงพะเนาว์[2] ดารีนา ใจเสรี[1] รัชฎาวรรณ อรรคนิมาตย์[1]
จตุพร ประทุมเทศ และ ปราณี ศรีราช[1*]

[1]สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร จังหวัดสกลนคร 47160

[2]สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเฉลิมกาญจนา จังหวัดศรีสะเกษ 33000

Surapol Pompan[1], Phannipha Chekdaengphanao[2], Dareena Jaiseri[1], Ratchadawan Aukkanimart[1],
Jatuporn Prathumtet[1] and Pranee Sriraj[1*]

[1]Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan Sakon Nakhon Campus, Sakon Nakhon, 47160, Thailand

[2]Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Public Health, Chalermkarnchana University, Si Sa Ket, 33000 Thailand

[*]Corresponding Author, E-mail: srirajp11@gmail.com

Received: 26 July 2021 | Revised: 31 January 2022 | Accepted: 4 February 2022

## บทคัดย่อ

*Streptococcus mutans* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปาก ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคฟันผุ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของสารสกัดขมิ้นอ้อยต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ยับยั้งแบคทีเรีย และต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Streptococcus mutans* โดยทำการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม พบว่าขมิ้นอ้อยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม จากนั้นศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ DPPH ABTS และ FRAP พบว่าขมิ้นอ้อยมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 58.86 ± 1.98 22.69 ± 3.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 230.76 ± 0.25 มิลลิกรัมเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion พบว่า ขมิ้นอ้อยมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 10.46 ± 0.55 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และต้านการสร้างไบโอฟิล์ม ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดขมิ้นอ้อยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 100 และ 120 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดขมิ้นอ้อยสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นอ้อยต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียภายใต้กล้อง phase contrast microscope พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มจะลดลง งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดขมิ้นอ้อยมีประสิทธิภาพที่นำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ต้านเชื้อในช่องปากต่อไป

## ABSTRACT

*Streptococcus mutans* is a pathogenic oral bacterium that is the main cause of tooth decay. The objective of this research was evaluated the effect of *Curcuma zedoaria* extract on anti-oxidation, bacteria inhibition and resist the formation of biofilms. The quantitative study of total phenolic compounds and total flavonoid showed that *Curcuma zedoaria* contained total phenolic compounds and flavonoids. The antioxidant activity of DPPH, ABTS and FRAP assay was then studied. The result of antioxidant activity shown with $IC_{50}$ values of 58.86 ± 1.98, 22.69 ± 3.91 µg/ml and 230.76 ± 0.25 mg $FeSO_4$ equivalent/g extracts. Antibacterial activity by Disc diffusion method showed inhibition zone were 10.46 ± 0.55 mm at concentration 500 mg/mL. It was tested for antibacterial, bactericidal activity and resist biofilm formation. The results showed that the activity of *Curcuma zedoaria* extract had MIC and MBC values of 100 and 120 mg/ml and the extracts can inhibit biofilm formation. This was consistent with testing the effect of *Curcuma zedoaria* extract on bacterial biofilm formation under a phase contrast microscope. When the extract concentration increased, the amount of biofilm formation decreased. This research shows that *Curcuma* zedoaria extract is effective for further development as an oral antimicrobial product.



**คำสำคัญ:** ขมิ้นอ้อย ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย สเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์

**Keywords:** *Curcuma zedoaria*, Antioxidant, Antibacterial, *Streptococcus mutans*


## บทนำ

โรคฟันผุเป็นโรคในช่องปากที่สำคัญ และพบบ่อยที่สุดในประเทศไทยพบอุบัติการณ์การเกิดโรคในประชากรทุกกลุ่มอายุ ฟันผุอาจเกิดขึ้นจากหลาย ๆ สาเหตุร่วมกัน ได้แก่ ฟัน น้ำลาย แผ่นคราบน้ำลาย อาหารประเภทแป้งจำพวกน้ำตาล เช่น ซูโครส กลูโครส และฟรุกโตส เป็นต้น รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคฟันผุ โดยเฉพาะในเด็กและวัยรุ่น ได้แก่ *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในช่องปากของมนุษย์โดยเฉพาะที่ผิวฟัน เชื้อนี้สามารถสร้าง extracellular polysaccharide (EPS) จากการใช้น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการเกิดคราบจุลินทรีย์ หรือไบโอฟิล์ม (Biofilm) นอกจากนี้ *Streptococcus mutans* สามารถย่อยสลายอาหารประเภทน้ำตาลทำให้เกิดกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ทำให้เกิดการย่อยสลายอาหารโดยเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เกิดกระบวนการละลายแร่ธาตุ (demineralization) ออกจากผิวฟันจนเกิดเป็นรอยผุตามมา (Loesche, 1986)

การป้องกันฟันผุมีหลายวิธี เช่น การใช้ fluoride การใช้น้ำตาลเทียม การใช้สารป้องกันการก่อคราบจุลินทรีย์ในปัจจุบันพบว่าเชื้อก่อโรคในช่องปากหลายชนิดมีรายงานการดื้อยาของเชื้อก่อโรคในช่องปากเพิ่มขึ้น (Bidault et al., 2007) และยังมีผลข้างเคียงจากการใช้ยา จึงมีการคิดค้นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ใช้ในการรักษาโรคในช่องปาก (Palombo, 2011) จึงได้มีการพัฒนายาสมุนไพร จากการศึกษาพบว่ามีการใช้พืชสมุนไพรรักษาโรคมาเป็นเวลานาน เนื่องจากสมุนไพรมีสารสำคัญในการออกฤทธิ์หลายชนิด ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้มีการนำสมุนไพรขมิ้นอ้อย มาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ซึ่งมีรายงานว่าขมิ้นอ้อยมีสารสำคัญกลุ่ม curcuminoids curcumin flavonoids และมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ (Bugno et al., 2007) ต้านอนุมูลอิสระ (Mau et al., 2003) ต้านการอักเสบ (Tangyuenyongwatana and Gritsanapan, 2014) ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Rahmatullah et al., 2012) จากสรรพคุณสมุนไพรที่กล่าวมา ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของสารสกัดขมิ้นอ้อยต่อการยับยั้ง และต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ เพื่อส่งเสริมผลิตภัณฑ์ และเวชภัณฑ์สำหรับการต้านเชื้อก่อโรคในช่องปากในคลินิกต่อไปในอนาคต

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### 1. ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดสมุนไพร

นำขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*) มาจากเขตพื้นที่จังหวัดอุดรธานี ล้างทำความสะอาดสมุนไพร แล้วอบสมุนไพรให้แห้ง และนำสมุนไพรไปบดให้ละเอียด จากนั้นนำสมุนไพรมาผสม

ให้เข้ากันในอัตราส่วน 1:2 โดยใช้ 95% เอทานอล เป็นตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:2 คือ สมุนไพร 1 ส่วน และเอทานอล 2 ส่วนจากนั้นเทลงถังปิดฝาถังให้มิดชิด หมักทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมากรองหยาบด้วยผ้าขาวบาง แล้วทำการกรองละเอียดผ่านกระดาษกรอง ทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary vacuum evaporator ที่ความดัน 60-250 mbar ความเร็วรอบ 60 rpm ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดที่แห้งสนิท นำสารสกัดบรรจุขวดแก้วทึบแสง เก็บไว้ในตู้แช่สารที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

**2. เชื้อแบคทีเรีย**

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Streptococcus mutans* (ATCC 25175T) เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar (BHI Agar) และ Brain Heart Infusion Broth ในสภาวะไม่มีออกซิเจน (Anaerobic Jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี $CO_2$ 5% นาน 48 ชั่วโมง

**3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content)**

โดยใช้วิธี Foloin-Ciocalteu assay นำสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงใน 96-Well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสาร Foloin-Ciocalteu regent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 7.5% Sodium carbonate ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader และนำมาคำนวณปริมาณ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก จากกราฟมาตรฐานของ gallic acid (Sigma Aldrich, St.Louis, Mo, USA) ในหน่วยของ มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (Nobosse et al., 2017)

**4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content)**

การตรวจวัดปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ นำสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงใน 96-Well plate ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 130 ไมโครลิตร เติม 5% Sodium nitrite ($NaNo_2$) ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่มืด 5 นาที เติมสาร Sodium hydroxide (NaOH) (ความเข้มข้น 1 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader และนำมาคำนวณปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ จากกราฟมาตรฐานของ Quercetin โดยรายงานค่าในหน่วย มิลลิกรัมเควอซิตินต่อกรัมสารสกัด (Nobosse et al., 2017)

**5. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1 - picrylhydrazyl scavenging capacity (DPPH assay)**

เป็นวิธีในการวัดความสามารถในการเป็นสารขจัดอนุมูลอิสระ DPPH เติมสารมาตรฐาน Trolox และสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงใน 96- Well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่ทึบแสง ทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (%Radical Scavenging) ดังสมการ (Turapra et al., 2016)

%Radical Scavenging = [ 1- (Sample - Blank) / DPPH] x100

Sample = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกับ DPPH

Blank = ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล

DPPH = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH กับเอทานอล

**6. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical - scavenging assay (ABTS assay)**

เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant capacity) ขั้นแรกเตรียมสารละลาย ABTS โดยชั่งสาร ABTS 3.6 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และเติมสาร Potassium persulfate 0.67 มิลลิกรัม บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นละลายสาร ABTS ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมสารมาตรฐาน Trolox และสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติมสารสะลาย ABTS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปอ่านผลด้วยเครื่อง Microplate reader ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% Radical Scavenging) (Turapra et al., 2016)

%Radical Scavenging = [ 1- (Sample - Blank) / ABTS ] x100

Sample = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกับ ABTS

Blank = ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล

ABTS = ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS กับเอทานอล

**7. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)**

การตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์และติดตามการเปลี่ยนแปลง สีของสารประกอบเชิงซ้อน ($Fe^{3+}$-TPTZ) ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ ($Fe^{2+}$-TPTZ) สารเกิดขึ้นคือความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่แสดงผลในรูป FRAP เทียบกับกราฟมาตรฐานของ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ เตรียมสาร $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เตรียม Acetate buffer ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ (pH. 3.6) เตรียมสาร 2,4,6-tripyridyl- striazine (TPTZ) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เตรียมสาร Iron (III) chloride ($FeCl_3$) นำสารที่ได้กล่าวมาข้างต้น มาผสมกันในอัตราส่วน 10 : 1 : 1 นำสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมลงใน 96-well plate เติมสารสะลาย FRAP ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 4 นาที ในที่มืดนำไปอ่านผลด้วยเครื่อง Microplate reader (593 นาโนเมตร) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ รายงานค่าเป็น มิลลิกรัมเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด (Turapra et al., 2016)

**8. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion method**

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคือ *Streptococcus mutans* (ATCC 25175T) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้นกระจายเชื้อให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ และวางแผ่น Paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่มีการเติมสมุนไพรปริมาณ 20 ไมโครลิตร โดยใช้ 0.12% Chlorhexidine เป็น Positive control วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% $CO_2$ นาน 48 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสที่เกิดขึ้น แล้วทำการบันทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร

**9. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC)**

ในการทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ใช้วิธี Micro dilution นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเป็นลำดับจะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.95-500 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน Negative control คือใส่เฉพาะเชื้อแบคทีเรีย Positive control คือหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% $CO_2$ นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นให้ตรวจสอบหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรือสังเกตอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC รายงานหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Andrews, 2001)

**10. ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal bactericidal concentration, MBC)**

ทำการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) โดย spread plate บนอาหารเลี้ยง Brain Heart Infusion Agar โดยใช้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% $CO_2$ นาน 48 ชั่วโมง และบันทึกผลการทดลองค่า MBC โดยบันทึกค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ คือไม่มีโคโลนีของเชื้อของอาหาร Brain Heart Infusion agar (BHI Agar) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลอง รายงานหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Andrews, 2001)

**11. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm) ของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Crystal violet staining for biofilm assay**

เติมอาหาร BHI (Brain heart infusion ที่มี sucrose) ลงใน 96 well plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมเชื้อที่ต้องการทดสอบ $3x10^6$ CFU/ml ลงไป ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/2, 1/4, 1/8 และ 1/16 ของค่า MIC ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อณุหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% $CO_2$ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เพื่อนำแบคทีเรียที่ไม่มีการเกาะติดออก แล้วนำไปอบให้แห้ง เติม 0.1 % crystal violet ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 20 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เพื่อล้างสีส่วนเกินออก ทำการล้างสีออกจากไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย (70% เอทานอล: 5% กรดอะซิติก: 25% น้ำ) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลาย ปริมาตร 100

ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate ใหม่ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำค่าที่วัดได้นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (% inhibition) ตามสมการ (Sabayja et al., 2020)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{A Control} - \text{B Test}) \times 100}{\text{A Control}}$$

**12. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียภายใต้กล้อง phase contrast microscope**

เติมอาหาร BHI (Brain heart infusion ที่มี sucrose ลงใน 96 well plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมเชื้อที่ต้องการทดสอบ $5x10^6$ CFU/ml ลงไป 50 ไมโครลิตร เติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/2, 1/4, 1/8 และ 1/16 ของค่า MIC ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อณุหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% $CO_2$ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เพื่อนำแบคทีเรียที่ไม่มีการเกาะติดออก แล้วนำไปอบให้แห้ง เติม 0.1 % crystal violet ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 20 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง บ่มไว้ให้แห้ง จากนั้นนำมาส่องดูไบโอฟิล์มด้วยกล้อง phase contrast microscope กำลังขยาย 10X บันทึกภาพไบโอฟิล์ม และทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Sabayja et al., 2020)

**13. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

จากการศึกษาครั้งนี้ใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูลค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) และเปรียบความแตกต่างของแต่ละกลุ่มการทดสอบโดยใช้ One - way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่าง โดยใช้โปรแกรม SPSS 19.0 ที่นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

## ผลการวิจัย

**1. ผลปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมด**

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดขมิ้นอ้อย ถูกยับยั้งโดยการวัดสีของอะลูมิเนียมไนเตรต และการวัดสีของโฟลินอลแสดงในตารางที่ 1 งานวิจัยครั้งนี้พบว่า ขมิ้นอ้อยมีปริมาณฟีนอลิกมีค่าเท่ากับ 157.17 ± 3.11 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และฟลาโวนอยด์มีค่าเท่ากับ 1,192.66 ± 2.08 มิลลิกรัมเควอซิตินต่อกรัมสารสกัด

**ตารางที่ 1** ปริมาณสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ของสารสกัดขมิ้นอ้อย

| ปริมาณสารฟีนอลิก (มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) | ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมเควอซิติน ต่อกรัมสารสกัด) |
|---|---|
| 157.17 ± 3.11 | 1,192.66 ± 2.08 |

**2. ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดขมิ้นอ้อย**

การทดสอบทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH พบว่า ขมิ้นอ้อยสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระโดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 58.86 ± 1.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐาน Trolox มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ19.38 ± 1.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าต่างจากสารมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับวิธี ABTS พบว่า มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 22.69 ± 3.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐาน Trolox มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ18.33 ± 1.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี Ferric reducing antioxidant power พบว่าขมิ้นอ้อยมีความสามารถรีดิวซ์เฟอริก หรือให้อิเล็กตรอนจาก $Fe^{3+}$ เป็น $Fe^{2+}$ มีค่าเท่ากับ 230.76 ± 0.25 มิลลิกรัมเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด ดังตารางที่ 2

**3. ผลทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion และผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง และสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MIC, MBC)**

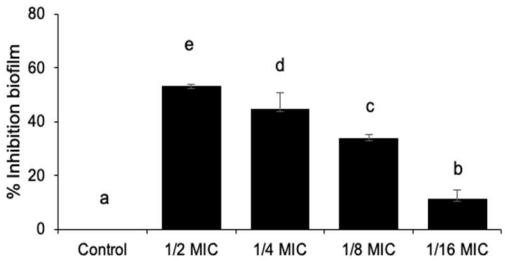
ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดขมิ้นอ้อย ละลายด้วยตัวทำละลาย 10% DMSO ให้มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดขมิ้นอ้อยออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 10.46 ± 0.55 มิลลิเมตร และสารมาตรฐาน 0.12% Chlorhexidine มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 19.06 ± 0.05 มิลลิเมตร ซึ่งขมิ้นอ้อยมีค่าแตกต่างจาก positive control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และผลการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยวิธี Micro dilution ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดขมิ้นอ้อยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 100 และ 120 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

**4. ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นอ้อยในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย**

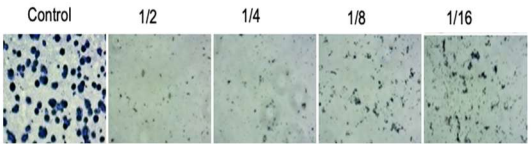
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดขมิ้นอ้อยที่ความเข้มข้น 1/2 - 1/8 ของค่า MIC พบว่าขมิ้นอ้อย สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$ <0.05) ดังรูปที่ 1

**5. ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นอ้อยต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียภายใต้กล้อง phase contrast microscope**

ผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลดลง ปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มจะเพิ่มขึ้น ภาพถ่ายใต้กล้อง phase contrast microscope แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. mutans* นั้นมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม ดังรูปที่ 2




**รูปที่ 1** ฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นอ้อยในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย (หมายเหตุ : a, b, c, d ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$ <0.05))




**รูปที่ 2** ฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นอ้อยต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียภายใต้กล้อง phase contrast microscope กำลังขยาย 10x

**ตารางที่ 2** ฤทธิ์การต้านอนุมูอิสระของสารสกัดขมิ้นอ้อย และสารมาตรฐาน Trolox

| สารตัวอย่าง | DPPH assay ($IC_{50}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ABTS assay ($IC_{50}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | FRAP assay (มิลลิกรัมเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด) |
|---|---|---|---|
| ขมิ้นอ้อย | 58.86 ± 1.98 | 22.69 ± 3.91 | 230.76 ± 0.25 |
| Trolox | 19.38 ± 1.01 | 18.33 ± 1.76 | |

## วิจารณ์ผลการวิจัย

สมุนไพรขมิ้นอ้อยในตำรับยาไทย มีสรรพคุณแก้ท้องอืดท้องเฟ้อ จุดเสียด ขับลม แก้ฟกช้ำ เคล็ดบวม เจริญอาหาร บำรุงธาตุ และมีรายงานก่อนหน้านี้ พบว่า ขมิ้นอ้อย มีสารสำคัญที่หลากหลาย ได้แก่ เคอร์คูมิน, คูมาริน และ เคอร์คูมินอยด์ เป็นต้น รวมทั้งสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโว-นอยด์รวม จากสารสกัดขมิ้นอ้อยจากการศึกษาพบว่าขมิ้นอ้อยมีปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์รวม (Azahar, 2017; Sandrasari et al., 2019) จากการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดขมิ้นอ้อย ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสารสกัดขมิ้นอ้อย มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา ได้ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์อนุมูลอิสระจากสารสกัดขมิ้นอ้อยโดยทำการศึกษาฤทธิ์อนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH พบว่า สารสกัดขมิ้นอ้อยมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง (Himaja et al., 2010; Sandrasari et al., 2019; Mau et al., 2003; Rahman et al., 2014) ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าสารสกัดขมิ้นอ้อยสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีรายงานก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลชีพที่พบในช่องปาก โดยเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์บ้วนปากในท้องตลาด 5 ชนิด ทำการศึกษาในหลอดทดลอง โดยใช้สารสกัดเอทานอล 70% ของเหง้าขมิ้นอ้อย พบว่าประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพของสารสกัดขมิ้นอ้อย มีประสิทธิภาพคล้ายคลึงกับน้ำยาบ้วนปาก (Bugno et al., 2007, Sabayjai et al., 2020)

และสารสกัดขมิ้นอ้อยสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดสูงขึ้นปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มจะลดลงสังเกตจากภาพถ่ายใต้กล้อง phase contrast microscope ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าสารเคอร์คูมิน สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม และความหนาของไบโอฟิล์ม นอกจากนี้ Curcumin ยังลดการผลิตโพลีแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ และไปยับยั้งการทำงานเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม โดยสามารถยับยั้งการแสดงออกของ spaP และ srtA ด้วยค่า $IC_{50}$ ที่ 500 μM (Li et al., 2018) นอกจากนี้พบว่าสารในกลุ่ม Flavonoid มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Burt, 2004; Jose and Thomas, 2014) ดังนั้นสารสกัดจากขมิ้นอ้อยสามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร ในการรักษาโรคในช่องปากได้

## สรุปผลการวิจัย

สารสกัดขมิ้นอ้อย มีสารเคอร์คูมิน ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิก มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปาก (*S. mutans*) และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ดังนั้นสารสกัดจากขมิ้นอ้อย สามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร ในการรักษาโรคในช่องปากได้

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ที่อนุเคราะห์ให้ความสะดวกในการใช้เครื่องมือในการวิจัย ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปราณี ศรีราช ที่ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือระหว่างดำเนินการวิจัยในการทำวิจัยครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

## เอกสารอ้างอิง

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of antimicrobial Chemotherapy 48(1): 5-16.

Azahar, N. F., Abd Gani, S. S. and Mokhtar, N. F. M. (2017). Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions of *Curcuma Zedoaria* leaves using response surface methodology. Chemistry Central Journal 11(1): 1-10.

Bidault, P., Chandad, F. and Grenier, D. (2007). Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology. Journal of the Canadian Dental Association 73(8): 721-725.

Bugno, A., Nicoletti, M. A., Almodóvar, A. A., Pereira, T. C. and Auricchio, M.T. (2007). Antimicrobial efficacy of *Curcuma zedoaria* extract as assessed by linear regression compared with commercial mouthrinses. Brazilian Journal of Microbiology 38: 440-445.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology 94(3): 223-253.

Himaja, M., Anand, R., Ramana, M. V., Anand, M. and Karigar, A. (2010). Phytochemical screening and antioxidant activity of rhizome part of *Curcuma zedoaria*. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy 1(2): 414-417.

Jose, S. and Thomas, T. D. (2014). Comparative phytochemical and anti-bacterial studies of two indigenous medicinal plants *Curcuma caesia* Roxb. and *Curcuma aeruginosa* Roxb. International Journal of Green Pharmacy 8(1): 65-71.

Li, B., Li, X., Lin, H. and Zhou, Y. (2018). Curcumin as a promising antibacterial agent: effects on metabolism and biofilm formation in *S. mutans*. BioMed research international 3: 1-11.

Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiological reviews 50(4): 353-380.

Mau, J. L., Lai, E. Y., Wang, N. P., Chen, C. C., Chang, C. H. and Chyau, C. C. (2003). Composition and antioxidant activity of the essential oil from *Curcuma zedoaria*. Food Chemistry 82(4): 583-591.

Nobosse, P., Fombang, E. N. and Mbofung, C. M. F. (2017). The effect of steam blanching and drying method on nutrients, phytochemicals and antioxidant activity of Moringa (*Moringa oleifera* L.) leaves. American Journal of Food Science and Technology 5(2): 53-60.

Palombo, E. A. (2011). Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. Evidence-based complementary and Alternative Medicine 1-11.

Rahman, A., Afroz, M., Islam, R., Islam, K. D., Hossain, M. A. and Na, M. (2014). In vitro antioxidant potential of the

essential oil and leaf extracts of *Curcuma zedoaria* Rosc. Journal of Applied Pharmaceutical Science 4(2): 107-111.

Rahmatullah, M., Azam, M. N. K., Pramanik, S., Sania, S. R. and Jahan, R. (2012). Antihyperglycemic activity evaluation of rhizomes of *Curcuma zedoaria* Christm. roscoe and fruits of *Sonneratia caseolaris*. L. Engl. International Journal of PharmTech Research 4(1): 125-129.

Sabayjai, D., Bun-ek, A., Sutin, S., Sinlamuth, O., Nintasen, R. and Powtongsook, W. (2020) Antibacterial, Anti-biofilm and Antioxidant Activities of Chinese Herb Extracts Against Oral Cavity Bacteria. The Sci of Phetchaburi Rajabhat University 17(1): 33-44.

Sandrasari, D. A., Sabariman, M. and Azni, I. N. (2019). Determination of potential level of Indonesian rhizomes as an antioxidant based on phenolic compound and antioxidant activity. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 383(1): 12-17.

Tangyuenyongwatana, P. and Gritsanapan, W. (2014). Prasaplai: An essential Thai traditional formulation for primary dysmenorrhea treatment. CELLMED 4(2): 10.1-10.8.

Turapra, B., Boonyarat, C., Chulikhit, Y. and Daodee, S. (2016). Determination of Active Constituents and Antioxidative Activity In: *Citrus maxima* (Burm.) Merr. Isan Journal of Pharmaceutical Sciences 11(5): 80-91.

❑❑❑❑❑