ว กรมวิทย พ 2567; 66 (1): 18-33

ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของสารสกัดเอทานอลขมิ้นชัน

สุวรรณดี ทรัพย์เจริญ และ ณัฐชา ด้วงรัก
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง อำเภอเมือง ตรัง 92000

บทคัดย่อ เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพเป็นภัยคุกคามที่สำคัญส่งผลกระทบในวงกว้างทั้งต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อมในระดับประเทศและระดับโลก การใช้สารสกัดสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่อาจช่วยลดการใช้ยาต้านจุลชีพได้ ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L. วงศ์ Zingiberaceae) มีสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านอักเสบ รักษาความผิดปกติในทางเดินอาหาร การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์หลอดทดลองของสารสกัดหยาบเอทานอลขมิ้นชัน 3 พันธุ์ปลูก ได้แก่ แดงสยาม ตรัง 1 และตรัง 84-2 ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของคน 6 ชนิด ได้แก่ *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Bacillus cereus*, pathogenic *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* จำนวน 40 สายพันธุ์ (isolate) ผลพบว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี broth microdilution สารสกัดหยาบเอทานอลขมิ้นชันทั้ง 3 พันธุ์ปลูก มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Vibrio* spp., *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ได้ โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ที่ร้อยละ 90 (minimal inhibitory concentration at 90%, MIC_{90}) ของสารสกัดมีค่าเท่ากับ 1-10, 3.3-5.2 และ 3.2-7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1 ยับยั้งเชื้ออหิวาต์ (*Vibrio cholerae*) ได้ดีที่สุด ที่ค่า MIC_{90} เท่ากับ 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามสารสกัดขมิ้นชันทั้งหมดที่ค่าความเข้มข้น 25-1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp., *Shigella* spp. และ pathogenic *Escherichia coli* ข้อมูลจากการศึกษานี้จึงเป็นประโยชน์ในการพัฒนาขมิ้นชันให้เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรต่อไป

คำสำคัญ: ขมิ้นชัน, ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

Corresponding author: E-mail: suwandee.s@dmsc.mail.go.th
Received: 21 May 2023 *Revised: 8 January 2024* *Accepted: 22 January 2024*

บทนำ

โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันและอาหารเป็นพิษมักพบอุบัติการณ์สูงในทุกปี เนื่องด้วยมีอัตราการป่วยสูง จึงเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุข[1,2] สาเหตุของโรคอาจเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส ปรสิต หรืออาจเกิดจากการได้รับสารพิษได้ เช่น สารพิษจากเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์หรือสารพิษจากสาหร่ายบางชนิด เป็นต้น[2,3] จากการศึกษาผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในปี พ.ศ. 2559 พบว่า เชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยมีอาการอุจจาระร่วงประมาณร้อยละ 79.2[4] เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Edwardsiella tarda*, *Bacillus cereus*, pathogenic *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*[3,5] นอกจากนี้ยังมีเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้อากาศในการเจริญเติบโต (anaerobic bacteria) บางสปีชีส์ที่สามารถทำให้เกิดโรคนี้ได้เช่นกัน เมื่อผู้ป่วยรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารหรือสารพิษที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ผู้ป่วยจะมีอาการปวดท้อง ถ่ายเหลว คลื่นไส้ อาเจียน บางรายถ่ายเป็นมูกเลือดได้ แพทย์จะให้การรักษาตามอาการ รวมทั้งให้สารน้ำและเกลือแร่ทดแทน ผู้ป่วยส่วนใหญ่นิยมซื้อยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพจากร้านขายยามารับประทานเอง และอาจรับประทานไม่ถูกต้อง ไม่ครบถ้วน หรือเกินความจำเป็น ส่งผลให้อัตราการดื้อยาของเชื้อมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น[6]

ปัจจุบันปัญหาเชื้อดื้อยาเป็นภัยคุกคามที่สำคัญ ส่งผลกระทบในวงกว้างต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ทั้งในระดับประเทศและระดับโลก[7] ประเทศไทยมีแนวปฏิบัติเพื่อตอบโต้กับเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ โดยจัดทำแผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560–2564 ขึ้น มีเป้าประสงค์ 5 ข้อ คือ 1) การป่วยจากเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพลดลง ร้อยละ 50 2) ปริมาณการใช้ยาต้านจุลชีพสำหรับมนุษย์ลดลง ร้อยละ 20 3) ปริมาณการใช้ยาต้านจุลชีพสำหรับสัตว์ลดลง ร้อยละ 30 4) ประชาชนมีความรู้เรื่องเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพและตระหนักในการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสมเพิ่มขึ้น ร้อยละ 20 และ 5) ระบบจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพมีสมรรถนะตามเกณฑ์สากล ไม่ต่ำกว่าระดับ 4 การใช้สารสกัดสมุนไพรจากธรรมชาติเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถช่วยลดปริมาณการใช้ยาต้านจุลชีพสำหรับมนุษย์ลงได้ สมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย แก้อาการท้องเสีย เช่น ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)[8] ฟ้าทะลายโจร[9] ตามบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2566 ยาขมิ้นชันมีข้อบ่งใช้เพื่อบรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่นจุกเสียด[10] จากองค์ความรู้ด้านการแพทย์แผนโบราณของอินเดีย Ayurveda, Siddha และ Unani medicine พบว่าขมิ้นชันมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ช่วยสมานแผล ต้านอักเสบ ช่วยย่อยอาหาร และต้านมะเร็งได้[8] ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่มีความน่าสนใจในทางการแพทย์อย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งแถบทวีปเอเชีย ในประเทศมาเลเซีย[8,11,12] ขมิ้นชันเป็นพืชสมุนไพรที่ปลูกอย่างแพร่หลายในภาคใต้ของประเทศ นำมาใช้เป็นอาหาร เครื่องสำอาง และยา ในประเทศไทยขมิ้นชันที่ได้รับการขึ้นทะเบียนโดยกรมวิชาการเกษตร ปัจจุบันมีจำนวน 5 พันธุ์ปลูก ได้แก่ ขมิ้นชันทับปุด (พังงา) ขมิ้นชันตาขุน (สุราษฎร์ธานี) ขมิ้นชันแดงสยาม ขมิ้นชันส้มปรารถนา และขมิ้นชันเหลืองนนทรี รวมทั้งพันธุ์ที่ผ่านการรับรองจำนวน 2 พันธุ์ปลูก ได้แก่ ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1 และขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 84–2[13] ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้จากขมิ้นชัน ประกอบด้วยสาร 2 กลุ่มหลัก คือ น้ำมันหอมระเหยและสารเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids)[14] สารเคอร์คูมินอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีเคอร์คูมิน (curcumin) เป็นสารสำคัญ ในปริมาณมากที่สุดร้อยละ 70–75 และให้สีเหลืองส้ม การสกัดสารเคอร์คูมินนิยมใช้เอทานอล[12] ขณะที่เคอร์คูมินอยด์ประกอบด้วย เคอร์คูมินและอนุพันธ์ของเคอร์คูมิน 2 ชนิด ได้แก่ demethoxy-curcumin พบได้ร้อยละ 15–20 และ bisdemethoxy-curcumin พบได้ร้อยละ 3[15] โดยมีเคอร์คูมินเป็นส่วนประกอบหลัก จากการศึกษาของทิวาพร พรหมรัตน์

และวลัยรัตน์ จันทรปานนท์ เปรียบเทียบวิธีการสกัดสารจากขมิ้นชันเพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าการสกัดด้วยเอทานอล 95% เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด[16] จากการจำแนกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดขมิ้นชัน (turmeric extract) โดยการสกัดด้วยเมทานอล (methanol) และไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) จากนั้นตรวจด้วยวิธี LC-ESI-Q-TOF-MS พบสารสำคัญ 4 ชนิด ได้แก่ curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin และ turmerone ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ[8]

อาการทางคลินิกของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน คือถ่ายอุจจาระเหลวอย่างน้อย 3 ครั้ง ใน 24 ชั่วโมง หรือถ่ายเป็นมูกเลือดอย่างน้อย 1 ครั้ง อาจร่วมกับอาเจียนหรือขาดน้ำ จากรายงานการเฝ้าระวังโรค กรมควบคุมโรคประจำปี พ.ศ. 2562 ประเทศไทย มีผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน 1,078,923 ราย อัตราป่วย 1,622.77 ต่อประชากรแสนคน เสียชีวิต 9 ราย อัตราป่วยตายร้อยละ 0.0008[17] แนวปฏิบัติการรักษาโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันมี 3 ประการ คือ การป้องกันและรักษาภาวะขาดน้ำ การป้องกันภาวะทุพโภชนาการโดยการให้อาหารระหว่างมีอาการอุจจาระร่วงและหลังจากหายแล้ว และการให้ยาต้านจุลชีพและยาต้านอุจจาระร่วง โรคอุจจาระร่วงส่วนใหญ่หายเองได้หากมีการป้องกันและรักษาภาวะขาดน้ำและได้รับสารอาหารที่เหมาะสม องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้ยาต้านจุลชีพในผู้ป่วยอุจจาระร่วงที่มีสาเหตุจากการติดเชื้ออหิวาต์และ *Shigella* ส่วนเชื้อ *Salmonella* ถ้าเป็นเด็กเล็กหรือเด็กที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องต้องให้ยาปฏิชีวนะเข้าหลอดเลือดเพื่อกำจัดการติดเชื้อนอกระบบทางเดินอาหาร[18-20] ในประเทศไทยมีการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคเป็นระยะเวลานาน แต่ยังมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนค่อนข้างน้อย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากขมิ้นชัน 3 ชนิดพันธุ์ปลูก ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของคนในหลอดทดลอง จำนวน 40 สายพันธุ์ (isolate) ได้แก่ *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Bacillus cereus*, pathogenic *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องเขย่าสาร GFL 3017 (GFL, Germany), เครื่อง Sonication (Elma S100lt, Germany), เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) (Buchi, Germany), เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม Mettler toledo XPE205 (Mettler toledo, Switzerland), เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (Agilent Technologies, USA), Biological Safety Cabinets (NUAIRE, USA), ตู้อบเพาะเชื้อ 35±2 องศาเซลเซียส (Memmert, Germany), เครื่องวัดความขุ่น DEN-1B (Biosan, Latvia), microtiter plate (NUNC, Denmark), Auto pipette (eppendorf, Germany), ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Hitachi, Thailand), ตู้อบอุณหภูมิ 50±2 องศาเซลเซียส (Memmert, Germany), กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดรูกรอง 11 ไมโครเมตร (GE Healthcare Life Sciences, China), เครื่องบดไฟฟ้า (Bosmall, Thailand) และแร่งเบอร์ 40 (Endecotts, France)

สารมาตรฐานและสารเคมี

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (ความบริสุทธิ์ ≥ 99.9%), เอทานอล 95% (Merck, Germany), น้ำเกลือปราศจากเชื้อ (Clinical Diagnostics, Thailand), สารละลายมาตรฐาน Curcumin 30 mg Reference Standard (USP, India), อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Blood agar (Oxoid, Thermofisher, USA), อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hinton broth (MHB) (Thermo Scientific, USA), อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid, Thermofisher, USA), McFarland Equivalence Turbidity Standard 0.5 (remel, United Kingdom) และแผ่นยาแอมพิซิลิน ขนาด 10 ไมโครกรัม (Oxoid, Thermofisher, USA)

ตัวอย่าง

การศึกษาเลือกขมิ้นชันจากแหล่งปลูกในพื้นที่จังหวัดตรังและจังหวัดใกล้เคียง ซึ่งมีการพัฒนาพันธุ์ปลูก

(cultivars) โดยเกษตรกรในพื้นที่ภายใต้การควบคุมดูแลของศูนย์วิจัยพืชสวนตรังให้มีปริมาณสารสำคัญสูงและเหมาะสมกับพื้นที่ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ ขมิ้นชันพันธุ์แดงสยาม ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1 และขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 84-2

ขมิ้นชันพันธุ์แดงสยาม เนื้อในเหง้ามีสีส้มอมแดง กลิ่นฉุนมาก มีสารสำคัญเคอร์คูมินอยด์เฉลี่ยร้อยละ 9.60-12.50 ลำต้นสูงประมาณ 60 เซนติเมตร เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 8-12 เดือน[21]

ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1 เนื้อในเหง้ามีสีเหลืองส้ม มีสารสำคัญเคอร์คูมินอยด์เฉลี่ยร้อยละ 10.62 น้ำมันหอมระเหยเฉลี่ยร้อยละ 7.99 ลำต้นสูง 55-100 เซนติเมตร เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 8-11 เดือน[22]

ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 84-2 เนื้อในเหง้ามีสีส้มแกมแดง มีสารสำคัญเคอร์คูมินอยด์เฉลี่ยร้อยละ 11.04 น้ำมันหอมระเหยเฉลี่ยร้อยละ 7.78 ลำต้นสูง 90-110 เซนติเมตร เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 11 เดือน[23]

การเตรียมตัวอย่างขมิ้นชัน: นำเหง้าของขมิ้นชันพันธุ์แดงสยาม ตรัง 1 และตรัง 84-2 จากแหล่งปลูกในพื้นที่จังหวัดตรังและจังหวัดใกล้เคียง ล้างน้ำให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตากให้แห้ง เป็นเวลา 3 วัน นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบดด้วยเครื่องบดไฟฟ้าผ่านแร่งเบอร์ 40 จนเป็นผง

การเตรียมสารสกัดจากขมิ้นชัน: การศึกษานี้ใช้วิธีการสกัดด้วยการหมักในตัวทำละลาย (maceration) ชั่งผงขมิ้นชัน 100 กรัม ห่อด้วยผ้าขาวบางมัดให้แน่น หมักด้วยเอทานอล 95% ปริมาณ 150 มิลลิลิตร (ให้ท่วมผงขมิ้น) ในขวดแก้วปิดฝาให้สนิท เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ในแต่ละวันเขย่าให้ผงขมิ้นชันกับตัวทำละลายเข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร GFL 3017 เป็นเวลา 30 นาที และใช้เครื่อง Sonication เป็นเวลา 30 นาที จนครบ 5 วัน แยกส่วนที่เป็นของเหลวออกจากกากด้วยการกรอง โดยนำกากมาหมักซ้ำอีกครั้งด้วยเอทานอล 95% ปริมาณ 150 มิลลิลิตร ทำซ้ำเช่นเดิมจนครบ 5 วัน นำสารสกัดที่กรองได้ออกจากกากมารวมกัน โดยเทเก็บไว้ในขวดสำหรับระเหยรวมกับส่วนที่ได้จากรอบแรก จากนั้นจึงนำมาระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้สารสกัดหยาบสีน้ำตาลเข้ม มีลักษณะเหนียวข้น นำสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ได้มาเตรียมเป็นสารละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) เพื่อใช้ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยชั่งสารสกัดหยาบด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม Mettler toledo XPE205 และละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดรูกรอง 11 ไมโครเมตร และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส[24]

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์จากผงขมิ้นชัน: วิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ด้วยวิธี Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectrophotometry ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia, THP 2021)[25] โดยสร้างกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเคอร์คูมินอยด์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร จากสารละลายมาตรฐาน curcumin 30 mg reference standard ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชันทั้ง 3 พันธุ์ เตรียมสารละลายตัวอย่างด้วยการชั่งผงขมิ้นชันปริมาณ 300 มิลลิกรัม ในขวด erlenmeyer flask เติมเมทานอลปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดขวดให้สนิท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปิเปตสารละลายส่วนใส ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในขวด volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในขวด volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร อีกครั้งและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer จากนั้นคำนวณปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในสารละลายตัวอย่างขมิ้นชันโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวณร้อยละของน้ำหนักผงขมิ้นชัน (%w/w)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย: นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารและน้ำของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขและศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน

ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ได้แก่ *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ pathogenic *Escherichia coli* จำนวน 40 สายพันธุ์ (isolate) เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเชื้อที่เจริญแล้วมาปรับความขุ่นในน้ำเกลือปราศจากเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland Standard เท่ากับเชื้อแบคทีเรียประมาณ 1.5×10^{8} CFU/mL โดยมีเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานในการทดสอบควบคู่ไปกับเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารและน้ำ ได้แก่ *Salmonella ser.* Typhimurium ATCC 13311, *Shigella sonnei* ATCC 11060, *Vibrio cholerae* O1, Classical, Ogawa ATCC 14035, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 รายละเอียดชนิดและ isolate ของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 1

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย: การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี disk diffusion อ้างอิงตามคู่มือที่จัดทำโดยสถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ใน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ฉบับ M100 32nd Edition ปี 2022)[26] โดยนำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อและป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hinton agar (MHA) ถี่ ๆ ให้ได้ 3 ระนาบ จากนั้นนำแผ่นกระดาษกรอง Whatman Grade AA DISCS ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่หยดด้วยสารสกัดหยาบขมิ้นชันความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรแผ่นละ 25 ไมโครลิตร วางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีการที่ดัดแปลงจากบทความของพรชัย สินเจริญโภไคย และคณะ[27] โดยใช้ยาแอมพิซิลิน ขนาด 10 ไมโครกรัม ทดสอบกับเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 เป็นตัวควบคุมคุณภาพระบบในแต่ละรอบการทดสอบ ควรมีเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone อยู่ระหว่าง 15–22 มิลลิเมตร อ้างอิงตามคู่มือที่จัดทำโดยสถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (CLSI) ฉบับ M100 32nd Edition ปี 2022 และ DMSO (ความบริสุทธิ์ ≥ 99.9%) เป็นตัวควบคุมลบของเชื้อที่ทำการทดสอบ ผลการทดสอบไม่ควรมี inhibition zone ใด ๆ (DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดหยาบขมิ้นชันไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง และวัดผลการยับยั้งเชื้อโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง (inhibition zone) เป็นหน่วยมิลลิเมตร ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 2 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ย นำเชื้อกลุ่มที่มี inhibition zone มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี broth microdilution ซึ่งดัดแปลงจากบทความของพรเทพ เต็มรังสี[28] โดยนำสารสกัดหยาบขมิ้นชันมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hinton broth (MHB) ให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 2 เท่า (two-fold serial dilution) จำนวน 10 ความเข้มข้น ตั้งแต่ความเข้มข้น 64–0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน microtiter plate หลุมที่ 1–10 เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland Standard และเจือจางใน MHB ในอัตราส่วน 1:200 ดูดสารละลายเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงใน microtiter plate ที่มีสารสกัดหยาบขมิ้นชัน ใช้ MHB และ DMSO เป็นตัวควบคุมลบ และใช้เชื้อแต่ละชนิดผสม MHB เป็นตัวควบคุมการเจริญของเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูจากหลุมสุดท้ายที่ไม่มีการตกตะกอนหรือความขุ่นเกิดขึ้น บันทึกค่า MIC ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 2 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ย การควบคุมคุณภาพการเจริญของเชื้อ 1 หลุมทดสอบ (MHB+เชื้อ) ผลการทดสอบแต่ละหลุมต้องมีความขุ่นหรือเชื้อตกตะกอนเป็นเม็ดกระดุม การควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB 1 หลุมทดสอบต่อเพลต และ DMSO 1 หลุมทดสอบ

ผลการทดสอบ MHB และ DMSO ต้องใส ไม่มีการเจริญของเชื้อหรือไม่พบเชื้อตกตะกอนเป็นเม็ดกระดุม

การวิเคราะห์ข้อมูล: ข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ผลหาค่าเปอร์เซ็นไทล์ (percentile) ของค่า MIC ที่ตำแหน่ง 50 และ 90 (MIC_{50} และ MIC_{90}) ของกลุ่มประชากรหลากหลาย isolate จากเชื้อสปีชีส์เดียวกันต่อสารสกัดหยาบขมิ้นชันแต่ละพันธุ์เพื่อเป็นค่ากลาง ดังนั้นค่า MIC_{50} หรือ MIC_{90} ของแต่ละ isolate บ่งชี้ว่าร้อยละ 50 และ 90 ของ isolate ดังกล่าว มีค่า MIC ต่ำกว่าหรือเท่ากับค่ากลางนั้น ๆ ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ชนิดและ isolate ของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

ชื่อเชื้อ	DMST No.	Lab No.
Salmonella ser. Enteritidis	15676	–
Salmonella ser. Agona	10638	–
Salmonella ser. Weltevreden	15677	–
Salmonella ser. Typhimurium ATCC 13311	562	–
Shigella flexneri	7767	–
Shigella sonnei ATCC 11060	561	–
Vibrio cholerae O1, Classical, Ogawa ATCC 14035	4278	–
Vibrio cholerae O139	9701	–
Vibrio cholerae non O1/nonO139	2873	–
Vibrio cholerae non O1/nonO139	–	66005174001
Vibrio parahaemolyticus	5665	–
Vibrio parahaemolyticus	15285	–
Vibrio parahaemolyticus	30368	–
Vibrio parahaemolyticus	30665	–
Vibrio alginolyticus	33638	–
Vibrio alginolyticus	14800	–
Vibrio alginolyticus	31366	–
Vibrio alginolyticus	33579	–
Vibrio alginolyticus	30666	–
Bacillus cereus ATCC 11778	5040	–
Bacillus cereus	6229	–
Bacillus cereus	12126	–
Bacillus cereus	12127	–
Bacillus cereus	16007	–
Bacillus cereus	–	65117944005
Bacillus cereus	–	66005284001
Staphylococcus aureus ATCC 9144	2933	–
Staphylococcus aureus ATCC 25923	8840	–
Staphylococcus aureus	–	65082656001
Staphylococcus aureus	–	65033532007
Escherichia coli ATCC 25922	4212	–
pathogenic *Escherichia coli* (ETEC)	26450	–
pathogenic *Escherichia coli* (EIEC)	30544	–
pathogenic *Escherichia coli* (EIEC)	30545	–

ตารางที่ 1 ชนิดและ isolate ของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ (ต่อ)

ชื่อเชื้อ	DMST No.	Lab No.
pathogenic *Escherichia coli* (EPEC)	30546	-
pathogenic *Escherichia coli* (EPEC)	30547	-
pathogenic *Escherichia coli* (EAEC)	68994	-
pathogenic *Escherichia coli* (EAEC)	68995	-
pathogenic *Escherichia coli* (STEC)	30537	-
pathogenic *Escherichia coli* (STEC)	30538	-

หมายเหตุ: - DMST No. (Department of Medical Sciences Thailand number) หมายถึง isolate เชื้อจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
- Lab No. (Laboratory number) หมายถึง isolate เชื้อจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง

ผล

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์คำนวณเป็นเคอร์คูมินด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเคอร์คูมิน (แกน x) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (แกน y) จากขมิ้นชันทั้ง 3 พันธุ์ปลูก ได้แก่ แดงสยาม ตรัง 1 และตรัง 84-2 มีค่าเท่ากับ 5.8 ± 0.7, 7.0 ± 1.1 และ 7.9 ± 1.4 %w/w ตามลำดับ

ผลการคัดกรองเบื้องต้นของสารสกัดหยาบขมิ้นชันด้วยเอทานอลต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารด้วยวิธี disk diffusion พบว่ามีเชื้อ 3 ชนิด ไม่พบ inhibition zone รอบแผ่นกระดาษกรองชุบสารสกัดหยาบขมิ้นชัน ได้แก่ *Salmonella* spp., *Shigella* spp. และ pathogenic *Escherichia coli* และมีเชื้อ 5 ชนิด พบ inhibition zone รอบแผ่นกระดาษกรองชุบสารสกัดหยาบขมิ้นชัน ได้แก่ *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ดังแสดงในตารางที่ 2

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบขมิ้นชันด้วยวิธี broth microdilution ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดหยาบขมิ้นชันสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของคน พบว่าขมิ้นชันพันธุ์แดงสยาม ตรัง 1 และตรัง 84-2 สามารถยับยั้งเชื้ออหิวาต์ (*Vibrio cholerae*) ได้ที่ช่วงความเข้มข้นเฉลี่ย 0.5-8, 0.5-4 และ 0.375-16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ร้อยละ 90 (MIC_{90}) มีค่าเท่ากับ 6.4, 3.2 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ที่ช่วงความเข้มข้นเฉลี่ย 1-3, 1-4 และ 0.25-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า MIC_{90} มีค่าเท่ากับ 2.6, 2.8 และ 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ได้ที่ช่วงความเข้มข้นเฉลี่ย 1-2, 0.5-1 และ 0.375-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับค่า MIC_{90} มีค่าเท่ากับ 2, 1 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *Bacillus cereus* สารสกัดหยาบขมิ้นชันพันธุ์แดงสยาม ตรัง 1 และตรัง 84-2 สามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ช่วงความเข้มข้นเฉลี่ย 1-8, 1-4 และ 0.5-4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า MIC_{90} มีค่าเท่ากับ 5.2, 3.3 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ที่ช่วงความเข้มข้นเฉลี่ย 0.5-8, 0.375-4 และ 0.25-12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า MIC_{90} มีค่าเท่ากับ 5.2, 3.2 และ 7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลการคัดกรองเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของคน 8 ชนิด ด้วยสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ด้วยวิธี disk diffusion

เชื้อแบคทีเรีย	จำนวน (Isolate)	ค่าเฉลี่ย Inhibition zone ของสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (มิลลิเมตร±SD)																	
		ขมิ้นชันพันธุ์แดงสยาม ความเข้มข้น (mg/mL)						ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1 ความเข้มข้น (mg/mL)						ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 84–2 ความเข้มข้น (mg/mL)					
		25	50	100	200	500	1,000	25	50	100	200	500	1,000	25	50	100	200	500	1,000
Vibrio cholerae	4	7.6±0.4	7.8±0.6	8.0±0.7	8.4±0.4	9.1±0.5	9.5±0.9	7.5±0.6	7.6±0.5	7.9±0.6	8.3±0.9	8.5±0.7	9.0±0.9	7.3±0.5	7.4±0.5	7.6±0.8	7.9±1.0	7.9±1.0	7.9±1.0
Vibrio parahaemolyticus	4	7.8±0.5	8.0±0.5	8.4±0.7	9.2±0.6	9.6±0.9	10.3±1.2	8.5±1.0	8.5±1.0	8.9±1.4	9.1±1.9	9.8±1.6	9.8±1.6	8.5±1.0	8.9±0.9	9.4±1.3	9.6±1.7	9.9±1.7	10.0±1.5
Vibrio alginolyticus	5	8.1±0.7	8.5±0.9	8.9±0.7	9.0±0.7	9.8±0.4	10.1±0.7	8.4±0.5	8.7±1.0	9.0±0.8	9.3±1.2	10.3±0.7	10.6±1.1	8.4±1.3	8.4±1.3	8.7±1.7	9.2±2.2	9.8±1.8	10.4±1.8
Bacillus cereus	7	7.5±0.5	7.7±0.5	7.9±0.6	8.4±0.7	8.6±0.8	8.5±0.8	7.9±0.9	7.9±0.8	8.0±0.8	8.8±0.8	9.3±1.1	9.3±1.1	7.7±0.5	7.9±0.7	8.0±0.6	8.4±0.6	8.8±0.7	8.8±0.7
Staphylococcus aureus	4	7.4±0.6	7.6±0.7	7.6±0.7	7.8±0.6	8.3±1.1	8.8±1.1	7.1±0.6	7.4±0.7	7.4±0.7	8.0±0.7	8.6±1.1	9.0±0.7	7.4±0.6	7.6±0.7	7.5±0.7	7.6±0.8	8.4±1.1	8.6±1.4
Salmonella spp.	4	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Shigella spp.	2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
pathogenic *Escherichia coli*	10	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

หมายเหตุ: - NI (Non-Inhibition zone) หมายถึง ไม่พบ inhibition zone รอบแผ่นกระดาษกรองชุบสารสกัดหยาบขมิ้นชัน

หมายเหตุ: - ยาแอมพิซิลิน ขนาด 10 ไมโครกรัม ทดสอบกับเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone อยู่ระหว่าง 15–22 มิลลิเมตร เป็นตัวควบคุมคุณภาพระบบในแต่ละรอบการทดสอบ

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ด้วยวิธี broth microdilution

เชื้อแบคทีเรีย	จำนวน (Isolate)	ชนิดพันธุ์ปลูกของสารสกัดหยาบขมิ้นชัน								
		ขมิ้นชัน พันธุ์แดงสยาม			ขมิ้นชัน พันธุ์ตรัง 1			ขมิ้นชัน พันธุ์ตรัง 84–2		
		Mean* (mg/mL)	**MIC_{50}** (mg/mL)	**MIC_{90}** (mg/mL)	**Mean*** (mg/mL)	**MIC_{50}** (mg/mL)	**MIC_{90}** (mg/mL)	**Mean*** (mg/mL)	**MIC_{50}** (mg/mL)	**MIC_{90}** (mg/mL
Vibrio cholerae	4	1, 0.5, 4, 8	2.5	6.4	0.5, 1, 2, 4	1.5	3.2	0.375, 0.5, 1, 16	0.75	10
Vibrio parahaemolyticus	4	3, 1, 2, 2	2	2.6	4, 1, 1, 1	1	2.8	2, 0.25, 0.25, 0.25	0.25	1.3
Vibrio alginolyticus	5	2, 2, 2, 1, 1	2	2	1, 1, 1, 0.5, 1	1	1	1, 1, 0.75, 0.5, 0.375	0.75	1
Bacillus cereus	7	1, 1, 1.5, 2, 2, 8, 4	2	5.2	1, 2, 1, 1, 1, 4, 3	1	3.3	0.5, 1, 0.5, 0.5, 0.5, 4, 4	0.5	4
Staphylococcus aureus	4	1, 1, 8, 0.5	1	5.2	2, 2, 4, 0.375	2	3.2	1, 0.5, 12, 0.25	0.625	7.5

หมายเหตุ: * Mean ได้จากการคำนวณค่าเฉลี่ยของ MIC (mg/mL) จากผลการทดสอบ 2 ซ้ำ ของเชื้อแต่ละ isolate

MIC_{50} คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ที่ร้อยละ 50

MIC_{90} คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ที่ร้อยละ 90

วิจารณ์

การทดสอบนี้ใช้เหง้าของขมิ้นชันมาสกัดโดยวิธีการหมักด้วยเอทานอล 95% จากการศึกษาผลของการสกัดขมิ้นชันด้วยเอทานอล 95% ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสารจากพืชสมุนไพร เนื่องจากแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัดได้ง่ายและสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในการสกัด ซึ่งจากผลการศึกษาของพรเทพ เต็มรังสี, 2554 รายงานว่าการสกัดขมิ้นชันด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ให้ผลผลิต (%yield) มากกว่าการสกัดด้วยวิธีการต้ม[28] และจากการทดสอบของธิดา ไชยวังศรี, 2555 พบว่าวิธีการหมักขมิ้นชันด้วยเอทานอล 95% ให้ผลการทดสอบ %yield ดีกว่าการสกัดด้วยน้ำ ซึ่งการสกัดขมิ้นชันด้วยเอทานอล 95% และน้ำสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. Group D โดยมี inhibition zone เท่ากับ 13.3, 8.0 และ 10.0, 0 มิลลิเมตร ตามลำดับ[29]

การศึกษานี้วิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์จากผงขมิ้นชันด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย[25] นอกจากนี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC)[30] ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์และอนุพันธ์ของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์แต่ละชนิด แม้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงแต่ห้องปฏิบัติการบางแห่งอาจไม่มีเครื่องมือนี้ เนื่องจากต้นทุนสูงและยังไม่เป็นวิธีมาตรฐานในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย

วิธี disk diffusion เป็นวิธีที่ใช้สำหรับทดสอบคัดกรองเบื้องต้น เนื่องจากมีหลายปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อ inhibition zone เช่น อัตราการแพร่ของสารสกัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัด เป็นต้น จึงควรมีการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับปัจจัยเหล่านี้เพิ่มเติมต่อไป เนื่องจากเกณฑ์ที่ใช้อ้างอิงการแปลผลยังไม่ชัดเจน การศึกษานี้จึงนำเชื้อที่มี inhibition zone มาทดสอบต่อ ซึ่งเชื้อที่มี inhibition zone เกิดขึ้นรอบแผ่นกระดาษกรองถือว่าสารสกัดขมิ้นชันมีผลบวกของการแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดนั้นได้ในเบื้องต้น

การทดสอบนี้ให้ผล inhibition zone แคบกว่าการศึกษาอื่น ในขณะที่ใช้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเท่ากัน (1.5×10^8 CFU/mL) อาจเนื่องจากปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารสกัดที่มีไม่เท่ากัน[31] ขึ้นอยู่กับวิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งที่แตกต่างกันระหว่าง disk diffusion และ agar well diffusion ซึ่งวิธี disk diffusion มีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณสารสกัดที่ซึมซับบนแผ่นกระดาษกรองได้น้อยกว่า และวิธี agar well diffusion เป็นการเจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง แม้ว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมจะมีขนาด 6 มิลลิเมตร เท่ากับขนาดแผ่นกระดาษกรอง แต่สามารถเติมสารละลายลงในหลุมได้ในปริมาณที่มากกว่า ส่งผลให้ปริมาณสารสกัดที่ใช้ทดสอบแตกต่างกัน โดยวิธี agar well diffusion มีปริมาณสารสกัดมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อชนิดเดียวกัน การศึกษานี้ใช้วิธี disk diffusion ด้วยการสารสกัดหยาบขมิ้นชันความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นกระดาษกรองปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งปริมาณสารสกัดเท่ากับ 5 มิลลิกรัม ค่าเฉลี่ย inhibition zone ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ต่อสารสกัดหยาบขมิ้นชันพันธุ์แดงสยาม ตรัง 1 และตรัง 84-2 เท่ากับ 8, 8.5 และ 8 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์ และคณะ, 2559 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เช่นกัน ด้วยวิธี agar well diffusion โดยเตรียมสารสกัดหยาบขมิ้นชันความเข้มข้น 256 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและเติมสารสกัดขมิ้นชัน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งปริมาณสารสกัดเท่ากับ 12.8 มิลลิกรัม พบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันยับยั้งเชื้อได้มีค่าเฉลี่ย inhibition zone เท่ากับ 12 มิลลิเมตร[9]

ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นที่ใช้วิธี disk diffusion ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่สอดคล้องกัน การศึกษาของพรเทพ เต็มรังสี, 2554 ใช้สารสกัดหยาบขมิ้นชันความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นกระดาษกรองปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งปริมาณสารสกัดเท่ากับ 10 มิลลิกรัม ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเหง้าขมิ้นชันมีฤทธิ์ต้านเชื้อ

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* โดยมีค่าเฉลี่ย inhibition zone เท่ากับ 8.56 มิลลิเมตร[28] และการศึกษาของนุศวดี พจนานุกิจ และสมใจ ขจรชีพ-พันธุ์งาม, 2553 ให้ผลที่สอดคล้องกัน สารสกัดหยาบขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ทุกความเข้มข้น (300, 200 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)[31]

การทดสอบคัดกรองเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากขมิ้นชันทั้งพันธุ์แดงสยาม ตรัง 1 และตรัง 84-2 ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ต่อเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disk diffusion พบว่ามีเพียงเชื้อบางชนิดที่มี inhibition zone รอบแผ่นกระดาษกรองชุบสารสกัดหยาบขมิ้นชัน ซึ่งอาจมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp., *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ได้ โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าว (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน พบค่าอยู่ที่ 0.25, 0.5 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้สารสกัดขมิ้นชันทั้ง 3 พันธุ์ปลูกพบว่าไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่ม *Salmonella* spp., *Shigella* spp. และ pathogenic *Escherichia coli* ที่ค่าความเข้มข้นระหว่าง 25-1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อาจเนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยสารหลัก คือ เพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ขณะที่โครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อนกว่าประกอบด้วย เยื่อหุ้มชั้นนอก (ประมาณร้อยละ 80) และเพปทิโดไกลแคน (ประมาณร้อยละ 20)[9] ผลการยับยั้งเชื้อที่ได้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ พรชัย สินเจริญโภไคย และคณะ, 2552 ซึ่งทดสอบผลการยับยั้งของสารสกัดหยาบขมิ้นชันต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในคนและสัตว์บางชนิด พบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจำนวน 11 ชนิด คือ *Vibrio harveyi, Vibrio cholerae, Vibrio alginolyticus, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus, Aeromonas hydrophila, Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis* และ *Edwardsiella tarda* มีค่า MIC ในช่วง 3.91-125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร[27] ดังนั้นสารสกัดหยาบขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในคนได้บางชนิด การศึกษานี้ให้ผลสอดคล้องกับพรเทพ เต็มรังสี, 2554 ซึ่งทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี disk diffusion พบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันเดี่ยวไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*[28] และให้ผลที่สอดคล้องกันกับ วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์ และคณะ, 2559 ซึ่งทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ของสารสกัดหยาบขมิ้นชันด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันไม่ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* โดยไม่พบ inhibition zone ใด ๆ[9] อีกทั้งยังให้ผลที่สอดคล้องกับการทดสอบของธิดา ไชยวังศรี, 2555 โดยทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าขมิ้นชันสกัดหยาบด้วยเอทานอล 95% สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ มีค่าเฉลี่ย inhibition zone เท่ากับ 13.3±2.2 มิลลิเมตร แต่ให้ผลไม่สอดคล้องกับการทดสอบเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. Group D ซึ่งพบว่าสารสกัดขมิ้นชันสามารถยับยั้งเชื้อได้ มีค่าเฉลี่ย inhibition zone เท่ากับ 7.5±0.6 และ 8.0±0.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าขมิ้นชันสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดี มี inhibition zone กว้าง และสามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. ได้เช่นกัน แต่มี inhibition zone ค่อนข้างแคบ[29]

สำหรับการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของขมิ้นชันสกัดหยาบของพรเทพ เต็มรังษี, 2554 ทดสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ค่า MIC อยู่ในช่วง 2.5-5 และมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ[28] รวมถึงวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์ และคณะ, 2559 ทดสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ซึ่งรายงานค่า MIC ที่ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร[9]

จากอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยาที่เพิ่มสูงขึ้นงานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นในเรื่องการรักษาโรค คณะนักวิจัยจึงเริ่มมีการสำรวจเพื่อประเมินและค้นหาสารทางเลือกอื่นซึ่งอาจเป็นสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพได้ ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจโดย

มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ จากการศึกษาของ Cheng AL. et al, 2001 ที่ให้ผู้ป่วยมะเร็งรับประทานเคอร์คูมินปริมาณสูงถึง 8 กรัมต่อวัน แต่ไม่พบผลข้างเคียงหรือการเป็นพิษต่อผู้ป่วย[32] จากตารางที่ 3 แสดงค่า MIC_{90} ของขมิ้นชันพันธุ์แดงสยาม ตรัง 1 และตรัง 84-2 ที่ยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. เท่ากับ 2-6.4, 1-3.2 และ 1-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีค่าการยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 5.2, 3.3, 4 และ 5.2, 3.2, 7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1 มีฤทธิ์ดีที่สุดต่อเชื้ออหิวาต์ (*Vibrio cholerae*) เนื่องจากมีค่า MIC_{90} ระดับต่ำที่สุดที่ 3.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ในการศึกษานี้สารสกัดขมิ้นชันไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp., *Shigella* spp. และ pathogenic *Escherichia coli* ได้ ซึ่งไม่สอดคล้องกับ Dai C. et al, 2022 ที่พบว่าเคอร์คูมินสามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ได้[33] อาจเนื่องจากชนิดของสารสกัดขมิ้นชันที่นำมาใช้ทดสอบ โดยการศึกษาของ Tyagi P. et al, 2015 ใช้สารเคอร์คูมินบริสุทธิ์สำเร็จรูป (ความบริสุทธิ์ ≥ 97%) ผลการศึกษาพบว่าเคอร์คูมินสามารถทำลายเชื้อได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น เชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μM แตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ซึ่งไม่สามารถยับยั้งได้ เนื่องจากใช้สารสกัดหยาบขมิ้นชันในการทดสอบ ซึ่งอาจมีเคอร์คูมินในปริมาณแตกต่างกัน[34] นอกจากนี้สารประกอบอื่นในขมิ้นชันที่นอกเหนือจากเคอร์คูมินอาจมีผลต่อการทดสอบ เช่น น้ำมันขมิ้นชัน (turmeric oil) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ[35] Sanchez-Villamil JI. et al, 2019 รายงานว่าพืชที่มีสารประกอบโพลีฟีนอลจะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งขมิ้นชันมีโครงสร้างของสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลเช่นกัน[36] การศึกษาของ Taguri T. et al, 2004 กล่าวถึงพืชที่มีโพลีฟีนอลสูงให้ผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio* spp. ได้ดีกว่า *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli*[37] ซึ่งสนับสนุนการศึกษาครั้งนี้ที่สารสกัดหยาบขมิ้นชันไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli* รวมถึง *Shigella* spp. ได้ อีกปัจจัยหนึ่ง คือ ชนิดของขมิ้นชันที่แตกต่างกันจะมีสัดส่วนของสารประกอบในขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกัน โดยขมิ้นชันทั้ง 3 พันธุ์ปลูก ที่นำมาศึกษานี้มีปริมาณสารสำคัญเคอร์คูมินอยด์แตกต่างกันและอาจมีสารประกอบชนิดอื่นในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ทำให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของขมิ้นชันทั้ง 3 พันธุ์ปลูกแตกต่างกัน ชูชีวิน กาญจน-ถาวรวิบูล และคณะ, 2564 ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในเหง้าขมิ้นชันพันธุ์แดงสยามที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดลพบุรี จำนวน 22 ตัวอย่าง จาก 4 อำเภอ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบปริมาณเคอร์คูมินอยด์ร้อยละ 4.10-10.35 โดยน้ำหนัก เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเคอร์คูมินอยด์ของผงขมิ้นชันพันธุ์แดงสยามในการศึกษานี้มีค่าเคอร์คูมินอยด์เท่ากับร้อยละ 5.8±0.7 โดยน้ำหนักเท่านั้น[30] การศึกษานี้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญเคอร์คูมินอยด์เท่านั้น ซึ่งไม่ได้วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบชนิดอื่น ๆ

สารเคอร์คูมินมีกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ดังนี้ 1) เคอร์คูมินรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเคอร์คูมินจะทำลายระบบการซึมผ่านและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์ตาย ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* 2) เคอร์คูมินยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยยับยั้งระบบการสื่อสารของเชื้อ (quarum sensing system) ทำให้เชื้อเกาะติดกับผิวเซลล์และการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* 3) เคอร์คูมินยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ โดยยับยั้ง Filament temperature-sensitive protein Z (FtsZ) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความจำเป็นในการแบ่งเซลล์ ได้แก่ เชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* และ 4) เคอร์คูมินกระตุ้นให้เกิดความเครียดภายในเซลล์ทำให้เซลล์ตาย ได้แก่ เชื้อ *Salmonella ser.* Typhimurium

และ *Escherichia coli*[33] จากการศึกษาของ แสงอุษา ประดิษฐศิลป์ และพรรนิภา ศิริเพิ่มพูล, 2554 แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมินอยด์นั้นเป็นแบบ dose-dependent คือ การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของเคอร์คูมินอยด์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสาร และพบว่าเคอร์คูมินอยด์สามารถทำให้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* เปลี่ยนแปลงรูปร่างจากท่อนโค้งเป็นรูปร่างกลมและซากเซลล์อย่างรวดเร็ว[15] ซึ่งมีหลายการศึกษาอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมินในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย การศึกษาของ Rai D. et al, 2008 พบว่าเคอร์คูมินจับกับ FtsZ และลดการรวมกลุ่มของโปรโตฟิลาเมนท์ (protofilaments) ของ *Bacillus subtilis* ในหลอดทดลอง ทำให้ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียได้[38] การศึกษาของ Mun SH. et al, 2014 พบว่าเคอร์คูมินสามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่ม MRSA และ MSSA ได้โดยกระตุ้นให้เกิดการจับกันระหว่าง ATPase inhibitor และ detergent เกิดเป็นสารประกอบ ATP-binding cassette (ABC) transporter ส่งผลกระทบต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียได้[39] และอีกหนึ่งกลไกการออกฤทธิ์ คือ เคอร์คูมินจับกับเปบทิโดไกลแคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้[12]

การศึกษานี้ ใช้เชื้อ *Aeromonas* spp. และ *Plesiomonas shigelloides* ที่เก็บรักษาในคลังตัวอย่าง แล้วนำมาเพาะเลี้ยงใหม่เชื้อไม่เจริญเติบโต ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ทดสอบได้ และมีเชื้อบาง isolate ที่นำมาทดสอบให้ค่า MIC แตกต่างจากเชื้อชนิดเดียวกันมาก ดังนั้นควรเพิ่มจำนวนเชื้อแต่ละชนิดไม่น้อยกว่า 30 isolates ในการทดสอบเพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ครอบคลุมและชัดเจนมากยิ่งขึ้น และควรเพิ่มเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยเพื่อให้ตรงกับประโยชน์ในการใช้ทดแทนยาต้านจุลชีพ รวมถึงควรใช้ยาต้านจุลชีพเป็นสารควบคุมบวก เพื่อควบคุมคุณภาพระบบการทดสอบในวิธี broth microdilution ด้วยในการศึกษาครั้งต่อไป

สรุป

สารสกัดหยาบจากขมิ้นชันทั้งพันธุ์แดงสยาม ตรัง 1 และตรัง 84-2 ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี broth microdilution สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp., *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ได้ โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าว (MIC_{90}) เท่ากับ 1-10, 3.3-5.2 และ 3.2-7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1 สามารถยับยั้งเชื้ออหิวาต์ (*Vibrio cholerae*) ได้ดีที่สุดที่ MIC_{90} เท่ากับ 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าค่า MIC_{90} เท่ากับ 3.3 และ 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขมิ้นชันทั้ง 3 พันธุ์ปลูก ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp., *Shigella* spp. และ pathogenic *Escherichia coli* ได้ ที่ค่าความเข้มข้นระหว่าง 25-1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนายาสมุนไพรจากสารสกัดหยาบขมิ้นชันเพื่อไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (สกสว.) ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย และขอบคุณศูนย์วิจัยพืชสวนตรังที่ให้ความอนุเคราะห์ผงขมิ้นชันเพื่อนำมาใช้ทดสอบ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Pruksananonda P, Athirakul K, Worawattanakul M, Varavithya W, Pisithpun A, Kitayaporn D, et al. Diarrhea among children admitted to a private tertiary-care hospital, Bangkok, Thailand: a case series. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2008; 39(3): 434-42.

2. ถนอมพงษ์ เสถียรลัคนา, เฉลิมศรี ภุมมางกูร, พุทธรัตน์ ขันอาษา. ข้อแนะนำในการรักษาโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันสำหรับเภสัชกรชุมชน. ว เภสัชศาสตร์อีสาน 2561; 14(4): 1-17.
3. เสาวนิตย์ บุณพัฒนศักดิ์, กมลรัตน์ ศิริโยธา. แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษในเขตสุขภาพที่ 2 และจังหวัดพิจิตร ระหว่าง ปีงบประมาณ 2556-2560. ว วิชาการป้องกันควบคุมโรค สคร.2 พิษณุโลก 2562; 6(1): 1-15.
4. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. รายงานการศึกษาความชุกและการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคในผู้ป่วยโรคท้องร่วงเฉียบพลันที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 9 พ.ย. 2565]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://nih.dmsc.moph.go.th/research/showimgdetil.php?id=654
5. อรุณ บ่างตระกูลนนท์, นพรัตน์ หมานริม, ภิรมย์ ทับทิมเทศ, ชุมพจต์ อมาตยกุล, สุมาลี บุญมา. การศึกษาหาเชื้อโรคอุจจาระร่วงในผู้ป่วยแรกรับโรงพยาบาลศรีธัญญา. ว วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2539; 5(1): 55-64.
6. กีรติญา เอี่ยมถาวร, ยิ่งมณี ตระกูลพัว. การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโพรพอลิส นมผึ้ง และฟ้าทะลายโจร. ใน: การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานระดับชาติ The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012. วันที่ 11-12 กุมภาพันธ์ 2555. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2555. หน้า 112-119.
7. Wall S. Prevention of antibiotic resistance - an epidemiological scoping review to identify research categories and knowledge gaps. Glob Health Action 2019; 12: 1756191. (27 pages).
8. Czernicka L, Grzegorczyk A, Marzec Z, Antosiewicz B, Malm A, Kukula-Koch W. Antimicrobial potential of single metabolites of Curcuma longa assessed in the total extract by thin-laer chromatography-based bioautography and image analysis. Int J Mol Sci 2019; 20(4): 898. (12 pages).
9. วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, พัชรี กัมมารเจษฎากุล, อิสยา จันทร์วิทยานุชิต. ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922. วารสาร มฉก. วิชาการ 2559; 19(38): 35-48.
10. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติด้านสมุนไพร พ.ศ. 2566. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 140 ตอนพิเศษ 130 ง (วันที่ 2 มิถุนายน 2566). หน้า 45.
11. Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: a review of its' effects on human health. Foods 2017; 6(10): 92. (11 pages).
12. Teow SY, Liew K, Ali SA, Khoo AS, Peh SC. Antibacterial action of curcumin against Staphylococcus aureus: a brief review. J Trop Med 2016; 2016: 2853045. (10 pages).
13. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. เอกสารทางวิชาการ ขมิ้นชัน *Curcuma longa* L. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 3 มี.ค. 2566]; [64 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.doa.go.th/hort/wp-content/uploads/2023/02/เอกสารวิชาการ-ขมิ้นชัน-กลุ่มวิชาการ-สวส-1.pdf.
14. ชัชวาลย์ ช่างทำ. คุณประโยชน์และฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายของสมุนไพรขมิ้นชัน. ว วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ 2558; 1(2): 94-109.
15. แสงอุษา ประดิษฐศิลป์, พรรนิภา ศิริเพิ่มพูล. ผลของเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชันต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและจำนวนของเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร. ว วิทยาศาสตร์บูรพา 2554; 16(2): 75-82.
16. ทิวาพร พรหมรัตน์, วลัยรัตน์ จันทรปานนท์. การศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากขมิ้นชันและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. วันที่ 30 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ 2549. กรุงเทพฯ; 2549. หน้า 250-257.
17. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำปี 2562. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 23 พ.ย. 2566]; [802 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://ddc.moph.go.th/uploads/publish/1129820210620030431.pdf.
18. วันดี วราวิทย์, จิราศรี วัชรดุลย์, ประพันธ์ อ่านเปรื่อง, พรพิมล พัวประดิษฐ์, ยง ภู่วรวรรณ, บุษบา วิวัฒน์เวคิน, และคณะ. แนวปฏิบัติการรักษาโรคอุจจาระร่วง

เฉียบพลัน. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 23 พ.ย. 2566]; [18 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://platform.who.int/docs/default-source/mca-documents/policy-documents/guideline/THA-CH-23-02-GUIDELINE-2001-tha-Guidelines-for-treatment-of-Acute-diarrhea.pdf.

19. World Health Organization. WHO recommendations on the management of diarrhoea and pneumonia in HIV-infected infants and children: integrated management of childhood illness (IMCI). Geneva: WHO; 2010.
20. World Health Organization. The treatment of diarrhoea: a manual for physicians and other senior health workers. 4th ed. Geneva: WHO; 2005.
21. วิเชียร กีรตินิจกาล, สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง, นันทวรรณ ฉิมพลี, โสภิตา ชิดชื่นเชย, ชัยมงคล ตะนะสอน, วัฒนา อาจวิชัย, และคณะ. ขมิ้นชันพันธุ์ แดงสยาม. [ออนไลน์]. 2558; [สืบค้น 9 พ.ย. 2565]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://kukr.lib.ku.ac.th/kukr_es/index.php?/BKN/search_detail/result/318043.
22. กรมวิชาการเกษตร. ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1. [ออนไลน์]. 2553; [สืบค้น 9 พ.ย. 2565]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.doa.go.th/share/docs/cultivarhort/suggestcv/turmerictrang1.pdf.
23. กรมวิชาการเกษตร. ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 84-2. [ออนไลน์]. 2553; [สืบค้น 9 พ.ย. 2565]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.doa.go.th/share/docs/cultivarhort/suggestcv/turmerictrang84-2.pdf.
24. Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. Chin Med 2018; 13: 20. (26 pages).
25. Khamin chan. In: Department of Medical Sciences. Thai herbal pharmacopoeia 2021 volume 1. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2018. p. 177-185.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100--Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 32nd ed. USA: CLSI; 2022.
27. พรชัย สินเจริญโภไคย, องอาจ เลาหวินิจ, พัชรี สุนทรนันท์, งามผ่อง คงคาทิพย์, สุริยัน สุทธิประภา, บุญส่ง คงคาทิพย์. ผลการยับยั้งของสารสกัดขมิ้นชัน (Curcuma longa Linn.) ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในคนและสัตว์บางชนิด. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. วันที่ 28-20 มีนาคม 2552. กรุงเทพฯ; 2552. หน้า 244-53.
28. พรเทพ เต็มรังสี. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อที่แยกได้จากแผลติดเชื้อ [วิทยานิพนธ์]. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, คณะแพทยศาสตร์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2554. หน้า 31-62.
29. ธิดา ไชยวังศรี. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ. ว นเรศวรพะเยา 2555; 5(3): 334-42.
30. ชูชีวิน กาญจนถาวรวิบูล, เชาวลิต มณฑล, หทัยรัตน์ อุไรรงค์. ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในเหง้าขมิ้นชันที่ปลูกด้วยระบบเกษตรอินทรีย์ในพื้นที่จังหวัดลพบุรี. ใน: การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564. วันที่ 30 เมษายน 2564. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรังสิต; 2564. หน้า 14-25.
31. นุศวดี พจนานุกิจ, สมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม. เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุดขมิ้นชันและใบบัวบก. ว มหาวิทยาลัยนเรศวร 2553; 18(1): 1-9.
32. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. Anticancer Res 2001; 21: 2895-2900.
33. Dai C, Lin J, Li H, Shen Z, Wang Y, Velkov T, et al. The natural product curcumin as an antibacterial agent: current achievements and problems. Antioxidants 2022; 11(3): 459. (21 pages).
34. Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. PLoS One 2015; 10(3): e0121313. (15 pages).
35. Murali N, Kumar-Phillips GS, Rath NC, Marcy J, Slavik MF. Effect of marinating chicken meat with lemon, green tea and turmeric against

foodborne bacterial pathogens. Int J Poult Sci 2012; 11(5): 326-32.

36. Sanchez-Villamil JI, Navarro-Garcia F, Castillo-Romero A, Gutierrez-Gutierrez F, Tapia D, Tapia-Pastrana G. Curcumin blocks cytotoxicity of enteroaggregative and enteropathogenic *Escherichia coli* by blocking Pet and EspC proteolytic release from bacterial outer membrane. Front Cell Infect Microbiol 2019; 9: 334. (13 pages).

37. Taguri T, Tanaka T, Kouno I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. Biol Pharm Bull 2004; 27(12): 1965-9.

38. Rai D, Singh JK, Roy N, Panda D. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. Biochem J 2008; 410: 147-55

39. Mun SH, Kim SB, Kong R, Choi JG, Kim YC, Shin DW, et al. Curcumin reverse methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Molecules 2014; 19(11): 18283-95.

Antimicrobial Activity of Turmeric Ethanolic Extract against Enteropathogenic Bacteria

Suwandee Sapcharoen and Natthacha Duangrak
Regional Medical Sciences Center 12/1 Trang, Muang District, Trang 92000, Thailand

ABSTRACT Antimicrobial resistance bacteria is a major threat that widely impacts humans, animals, and environments at both national and global levels. The use of herbal drugs is an alternative approach to reduce the use of antibiotics in humans. Since Turmeric (*Curcuma longa* L., Family Zingiberaceae) contains curcuminoids as the main compounds, it has been reported for various pharmacological activities such as antibacterial, anti-inflammatory and gastrointestinal disorder treatment. Therefore, the turmeric ethanolic crude extracts from 3 cultivars, Daeng Siam, Trang 1 and Trang 84-2, were selected to study for antimicrobial activities against 40 strains of human enteropathogenic bacterial isolated from food and water, and also reference strains, which were *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Bacillus cereus*, pathogenic *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. The extracts from all these 3 cultivars showed growth inhibitory activities on *Vibrio* spp., *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* using the broth microdilution method, with the minimum inhibitory concentrations (MIC_{90}) at 1-10, 3.3-5.2 and 3.2-7.5 mg/mL, respectively. While Trang 1 cultivar revealed the highest inhibitory effect on *Vibrio cholerae* at MIC_{90} 3.2 mg/mL. However, all extracts at the concentrations of 25-1,000 mg/mL did not show antimicrobial activities against *Salmonella* spp., *Shigella* spp. and pathogenic *Escherichia* coli. This study information will be useful for further developing of herbal products from turmeric.

Keywords: *Curcuma longa* L., Antimicrobial, Enteropathogenic bacteria