

คุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันต่อการต้านการเจริญและการสร้างเมลานินของ*นีโอส์ิตา*
ลิเดียม ไดมิดีเยอตุม ที่ทำให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาการวิจัยและการจัดการด้านสุขภาพ ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2566

Effect of Turmeric oil on antifungus and melanogenesis in *Neoscytalidium dimidiatum* causing onychomycosis



A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Health Research and Management

Department of Preventive and Social Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2023

หัวข้อวิทยานิพนธ์	คุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันต่อการต้านการเจริญและการสร้างเมลานินของ <i>นีโอสปีทาลิเดียม ไดมิดิเยอ</i> <i>ตุ้ม</i> ที่ทำให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ
โดย	นางสาวกัญญานัฐ ครองบุญ
สาขาวิชา	การวิจัยและการจัดการด้านสุขภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นพ.พรชัย สิทธิศรัณย์กุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.อริยา จินตามพร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

.....	คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉันทชาย สิทธิพันธุ์)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตร วงศ์ลำซำ)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร. นพ.พรชัย สิทธิศรัณย์กุล)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.อริยา จินตามพร)	
.....	กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สรินยา เสงพะพรหม)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สิริดา ยิ่งฉิม)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.มณฑกา ธีรชัยสกุล)	

กัญญาณัฐ ครอบงูญ : คุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันต่อการต้านการเจริญ และการสร้างเมลานินของ*นีโอสปีทาลิเดียม ไดมิดิเดียม* ที่ทำให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ. (Effect of Turmeric oil on antifungus and melanogenesis in *Neoscytalidium dimidiatum* causing onychomycosis) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. ดร. นพ.พรชัย สิทธิ ศรัณย์กุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร.อริยา จินตามพร

นีโอสปีทาลิเดียม ไดมิดิเดียม (*N. dimidiatum*) เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ และที่เท้า ตัวเชื้อสามารถสร้างเมลานินซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้โรครมีความรุนแรง จึงนำมาสู่วัตถุประสงค์ของการศึกษาที่ต้องการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน (TEO) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและการสร้างเมลานิน โดยทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการด้วยเชื้อ *นีโอสปีทาลิเดียม ไดมิดิเดียม* จำนวน 10 ตัวอย่าง ทดสอบการยับยั้งการเจริญเชื้อใน 7 วัน โดย 2-20% TEO ด้วยวิธี agar dilution method และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างเมลานิน ด้วยการเปรียบเทียบปริมาณเมลานินก่อนและหลังสัมผัส 4% และ10% TEO โดยเมลานินถูกจับอย่างจำเพาะด้วย melanin-specific monoclonal antibody (MAb) 8D6 จากนั้นวัดค่า immunofluorescence intensity (IF) โดยใช้ กล้องจุลทรรศน์อิมมูโนฟลูออเรสเซนส์กำลังขยาย 1,000 เท่า จากการศึกษาพบว่า 20% TEO สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *นีโอสปีทาลิเดียม ไดมิดิเดียม* ได้อย่างมีนัยสำคัญ และผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย immunofluorescence intensity ในเชื้อที่สัมผัส 4% และ10% TEO (1.592 ($p=0.001$) และ 1.705 ($p=0.003$) พบว่ามีค่า IF ที่ต่ำกว่าเชื้อที่ไม่ได้สัมผัส TEO (7.575) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่า TEO มีประสิทธิภาพที่นำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อจาก *นีโอสปีทาลิเดียม ไดมิดิเดียม* แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษากลไกการทำงานของ TEO ในการเป็นยาต้านเชื้อราว่าสามารถนำมาใช้ในร่างกายเพื่อรักษาการติดเชื้อเหล่านี้ได้หรือไม่

สาขาวิชา	การวิจัยและการจัดการด้าน สุขภาพ	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2566	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6271010730 : MAJOR HEALTH RESEARCH AND MANAGEMENT

KEYWORD: Turmeric essential oil Fungistatic Melanogenesis Onychomycosis
Neoscytalidium dimidiatum

Kunyanat Krongboon : Effect of Turmeric oil on antifungus and melanogenesis in *Neoscytalidium dimidiatum* causing onychomycosis .

Advisor: Prof. Pornchai Sithisarankul, Ph.D. M.D. Co-advisor: Assoc. Prof. Ariya Chindamporn, Ph.D.

Neoscytalidium dimidiatum, a cause of onychomycosis and tinea pedis, produces melanin, a virulence factor. This study aimed to establish fungistatic properties and melanogenesis prevention of *Curcuma longa* (turmeric) essential oil (TEO) against *N.dimidiatum* in vitro. Testing involved 10 clinical isolates of *N.dimidiatum*. TEO concentrations in this study varied from 2% to 20%. Sensitivity testing involved agar dilution over 7 days to find the minimal inhibitory dilution. Melanogenesis inhibition was assessed by comparing melanin levels in untreated and 4% or 10% TEO treated isolates. Melanin was detected using MAb 8D6, measuring immunofluorescence intensity (IF) at 1,000x magnification with an immunofluorescent microscope. The TEO concentration significantly inhibiting *N.dimidiatum* growth was the 20% solution. The 4% and 10% TEO preparation treated isolates of *N.dimidiatum* gave significantly lower (1.592 ($p=0.001$) and 1.705 ($p=0.003$)) mean IF than the untreated isolate (7.575). In summary, 20% TEO significantly inhibited *N.dimidiatum* growth and both 4% and 10% TEO samples inhibited melanogenesis. We conclude that TEO has therapeutic potential for use against infections caused by *N.dimidiatum*. Further studies are needed to determine what the antifungal mechanism is and if it can be used *in vivo* to treat these infections.

Field of Study: Health Research and
Management

Student's Signature

Academic Year: 2023

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณาเป็นอย่างยิ่งของ ศ.ดร.นพ.พรชัย สิริศิริมย์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รวมทั้ง รศ.ดร.อริยา จินตามพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณท่านอาจารย์เป็นอย่างสูง ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตร วงศ์ลำช้า ซึ่งกรุณาสละเวลามาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สรันยา เสงพะพรหม รองศาสตราจารย์ ดร.สิริดา ยงฉิม และดร.มณฑกา อีร์ชัยสกุล ซึ่งกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้กรุณาให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับผู้วิจัยในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ดร.นวพร วรศิลป์ชัย ดร.พัชรินทร์ ธรรมสิทธิ์ และนางสาวศิริพร จองแก ซึ่งได้กรุณาให้คำแนะนำซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับผู้วิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณท่านเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณครูบาอาจารย์ ซึ่งประสิทธิ์ประสาทวิชาให้แก่ผู้วิจัย บิดา มารดาและครอบครัวที่เป็นกำลังใจ ตลอดจนทุกท่านซึ่งให้การช่วยเหลือสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ ซึ่งถือว่าทุกท่านเป็นส่วนหนึ่งในความสำเร็จของผู้วิจัยในครั้งนี้ หากวิทยานิพนธ์มีความผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขอน้อมรับไว้เพื่อนำไปแก้ไขและพัฒนาต่อไปในอนาคต

กัญญาณัฐ ครอบบุญ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป	1
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
คำถามงานวิจัย (Research Question).....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)	2
วัตถุประสงค์ทั่วไป	2
การศึกษาระยะที่ 1	2
การศึกษาระยะที่ 2	2
กรอบแนวคิด (Conceptual Framework).....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption).....	4
คำสำคัญ (Key words)	4
คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่จะใช้ในการวิจัย (Operational Definition).....	4
ข้อพิจารณาทางจริยธรรม (Ethical Consideration).....	5

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและการนำไปประยุกต์ใช้ (Expected Benefit and Application).....	5
บทที่ 2	6
ทบทวนวรรณกรรม	6
โรคติดเชื้อราที่เล็บ (Onychomycosis).....	6
ชนิดของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ (Causative Organism)	8
การรักษาโรค Onychomycosis (Treatment).....	9
บทบาทการก่อโรคของเมลานินในเชื้อรา (Pathogenic Roles for Fungal Melanins).....	9
เมลานินคืออะไร (Definition of Melanin).....	10
ความรุนแรงของเมลานินในการทำให้เกิดโรค (Relation of Fungal Melanin to Virulence)...13	
การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราสายพันธุ์ที่มีเมลานินและไม่มีเมลานินในการก่อโรค (Correlation Studies)	13
การศึกษาเชื้อราที่มีภาวะพร่องเมลานิน (Studies of Mel- Fungal Mutants)	13
การศึกษาเกี่ยวกับการรักษาด้วยยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเมลานิน (Anti-Melanin Drug Treatment Study).....	13
บทบาทของเมลานินในการเจาะเซลล์ (Role of Melanin in Penetration of Cells)	14
การศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดขมิ้นชันที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญ การสร้างเมลานินของเชื้อรา และความ เป็นพิษต่อร่างกาย (Effect of <i>curcuma longa</i> L. extracts on antifungal, melanogenesis in fungus and toxicity)	15
การศึกษาเกี่ยวกับผลของการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องในเชื้อรา (Effects of Successive subculturing)	20
บทที่ 3	21
ระเบียบวิธีวิจัย	21
รูปแบบการวิจัย (Research Design)	21
ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology).....	21

ขั้นตอนก่อนการศึกษาทดลอง (การเตรียมตัวอย่าง).....	22
ขั้นตอนการเลือกกลุ่มตัวอย่าง	22
ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างขุยเล็บ.....	22
ขั้นตอนการเพาะเชื้อราจากขุยเล็บ	22
ขั้นตอนการวินิจฉัยชนิดของเชื้อด้วยวิธี ITS-PCR (Molecular Technique)	23
ขั้นตอนการศึกษา	23
การศึกษาระยะที่ 1.....	23
ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM)	23
ขั้นตอนทดสอบการต้านเจริญของเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM) โดยการหาค่า MIC สำหรับยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole	24
ตามมาตรฐาน CLSI M-38A.....	24
การศึกษาระยะที่ 2.....	24
ขั้นตอนการเตรียม Turmeric essential oil (Commercial Use) และการควบคุมคุณภาพ (ผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด).....	24
ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงและ Subculture เชื้อ <i>N. dimidiatum</i>	25
ขั้นตอนการศึกษาเปอร์เซ็นต์ Turmeric essential oil และการยับยั้งการเจริญต่อยา Itraconazole ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8	25
ขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติการต้านเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> ของ Itraconazole	26
ขั้นตอนทดสอบการยับยั้งการสร้างเมลานิน (Anti-melanogenesis) ในเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> ที่ได้รับการสัมผัส Turmeric essential oil และ Itraconazole.....	27
ตัวแปรในการวิจัย.....	27
การรวบรวมข้อมูล และการวิเคราะห์ข้อมูล (Data Collection and Data Analysis).....	28

บทที่ 4	29
ผลการศึกษา	29
การศึกษาระยะที่ 1.....	29
ผลการศึกษา MIC และ ของเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM) ที่ก่อให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ สำหรับยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole (ตอบวัตถุประสงค์เฉพาะข้อที่ 1)	29
การศึกษาระยะที่ 2.....	52
ผลการเจริญของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> clinical isolates ที่สัมผัสกับ 2, 3, 4, 5, 10 และ 20% Turmeric essential oil ที่เวลา 2 และ 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 (ตอบวัตถุประสงค์เฉพาะข้อที่ 2)	52
ผลการต้านการเจริญของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> clinical isolates ต่อยา Itraconazole ความเข้มข้น 8, 16, 32 µg /ml และ 10 µg ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ด้วยวิธี Agar diffusion (ตอบวัตถุประสงค์เฉพาะข้อที่ 3).....	60
ผลความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญของเชื้อ และปริมาณเมลานินของ <i>N. dimidiatum</i> ต่อ Turmeric essential oil และ Itraconazole	76
(ตอบวัตถุประสงค์เฉพาะข้อที่ 6-7).....	76
บทที่ 5	80
อภิปรายผลการศึกษา.....	80
ภาคผนวก.....	85
The ethics committee of the Institute of Dermatology certificate.....	85
The ethics committee of the Institute of Dermatology certificate (ต่อ)	86
Specification Turmeric essential oil	87
Library Search Report of Turmeric essential oil ด้วยเทคนิควิเคราะห์ High Performance Liquid Chromatography/Gas Chromatography (HPLC/GC)	88

บรรณานุกรม	92
ประวัติผู้เขียน	100



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดเข้มข้นที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญ และการสร้างเมลานินของเชื้อรา	17
ตารางที่ 2 ผลการศึกษา Minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Amphotericin B (AMP B), Ketoconazole (KCZ), Itraconazole (ITR), Terbinafine HCL (TER) และ Griseofulvin (GF) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes จำนวน 25 isolates	29
ตารางที่ 3 ผลการศึกษา Minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Amphotericin B (AMP B), Ketoconazole (KCZ), Itraconazole (ITR), Terbinafine HCL (TER) และ Griseofulvin (GF) ในเชื้อราชนิด Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 25 isolates	32
ตารางที่ 4 ผลการควบคุมคุณภาพยา Amphotericin B (AMP B), Ketoconazole (KCZ), Itraconazole (ITR), Terbinafine HCL (TER) และ Griseofulvin (GF) ด้วยเชื้อควบคุมคุณภาพตามมาตรฐาน CLSI M 61	34
ตารางที่ 5 ผลการศึกษากระจายตัวของค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) สำหรับยา Amphotericin B (AMP B) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates	36
ตารางที่ 6 ผลการศึกษากระจายตัวของค่า Minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Amphotericin B (AMP B)	37
ตารางที่ 7 ผลการศึกษากระจายตัวของค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) สำหรับยา Ketoconazole (KCZ) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates	39
ตารางที่ 8 ผลการศึกษากระจายตัวของค่า Minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Ketoconazole (KCZ) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates	40

ตารางที่ 9 ผลการศึกษากระจายตัวของค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) Itraconazole (ITR) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates	42
ตารางที่ 10 ผลการศึกษากระจายตัวของค่า Minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Itraconazole ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates	43
ตารางที่ 11 ผลการศึกษากระจายตัวของค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) สำหรับยา Terbinafine HCL (TER) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates.....	45
ตารางที่ 12 ผลการศึกษากระจายตัวของค่า Minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Terbinafine HCL (TER) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates.....	46
ตารางที่ 13 ผลการศึกษากระจายตัวของค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) สำหรับยา Griseofulvin ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates	48
ตารางที่ 14 ผลการศึกษากระจายตัวของค่า Minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Griseofulvin ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates	49
ตารางที่ 15 การแสดงผลพิษและฐานนิยมของค่า MIC และ MFC ของยา amphotericin B, ketoconazole, itraconazole, terbinafine HCL และ griseofulvin และการกระจายตัวของค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ต่อเชื้อรา 50 ตัวอย่างจากผู้ป่วย ณ สถาบันโรคผิวหนัง	50
ตารางที่ 16 ผลการเจริญของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> clinical isolates ที่สัมผัสกับ 2% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8	52
ตารางที่ 17 ผลการเจริญของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> clinical isolates ที่สัมผัสกับ 3% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8	53
ตารางที่ 18 ผลการเจริญของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> clinical isolates ที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8	54

ตารางที่ 19 ผลการเจริญของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> clinical isolates ที่สัมผัสกับ 5% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8	55
ตารางที่ 20 ผลการเจริญของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> clinical isolates ที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8	56
ตารางที่ 21 ผลการเจริญของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> clinical isolates ที่สัมผัสกับ 20% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8	57
ตารางที่ 22 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> clinical isolates (n=10) ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ที่สัมผัสกับ 2, 3, 4, 5, 10, 20% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน.....	58
ตารางที่ 23 ผลการ Subculture ต่อการเจริญของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> clinical isolates (n=10) ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ที่สัมผัสกับ 2, 3, 4, 5, 10, 20% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน	59
ตารางที่ 24 ผลการยับยั้งการเจริญ (inhibition Zone : mm) ของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> ต่อ 8 µg /ml Itraconazole ที่เวลา 2 วัน	60
ตารางที่ 25 ผลการยับยั้งการเจริญ (Inhibition Zone : mm) ของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> ต่อ 16 µg /ml Itraconazole ที่เวลา 2 วัน	61
ตารางที่ 26 ผลการยับยั้งการเจริญ (Inhibition Zone : mm) ของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> ต่อ 32 µg /ml Itraconazole ที่เวลา 2 วัน	62
ตารางที่ 27 ผลการยับยั้งการเจริญ (Inhibition Zone : mm) ของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> ต่อ 10 µg Itraconazole ที่เวลา 2 วัน	63
ตารางที่ 28 ค่าเฉลี่ยผลการต้านการเจริญ (inhibition Zone : mm) ของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> ต่อ ยา Itraconazole ความเข้มข้น 8, 16, 32 µg /ml และ 10 µg ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8	64
ตารางที่ 29 ผลการควบคุมคุณภาพการย้อมเมลานินบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อราด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAbs 8D6 เชื้อ <i>N. dimidiatum</i> และ <i>N. hyalinum</i>	65
ตารางที่ 30 ค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (fluorescence intensity) จากการย้อมเมลานินบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อราชนิด <i>N. dimidiatum</i> แต่ละ Strain ด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAbs 8D6	

ในเชื้อราที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg itraconazole เปรียบเทียบกับเชื้อราตั้งต้น (Untreated).....	67
ตารางที่ 31 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (fluorescence intensity) จากการย้อมเมลานินบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อราชนิด <i>N. dimidiatum</i> (n=10) ด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAb 8D6 ในเชื้อราที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg itraconazole กับเชื้อราตั้งต้น (Untreated).....	70
ตารางที่ 32 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (fluorescence intensity) จากการย้อมเมลานินบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อราชนิด <i>N. dimidiatum</i> (n=50) ด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAb 8D6 ในเชื้อราที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg itraconazole กับเชื้อราตั้งต้น (Untreated).....	75
ตารางที่ 33 ผลความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญของเชื้อกับการสร้างเมลานินของ <i>N. dimidiatum</i> ที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil.....	76
ตารางที่ 34 ผลความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญของเชื้อกับการสร้างเมลานินของ <i>N. dimidiatum</i> ที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil.....	77
ตารางที่ 35 ผลความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญของเชื้อกับการสร้างเมลานินของ <i>N. dimidiatum</i> ที่สัมผัสกับ 10 µg Itraconazole	78

สารบัญรูป

รูปที่ 1 ลักษณะทางคลินิกในรูปแบบต่างๆ ของ Onychomycosis ^(1, 22) ซึ่งประกอบด้วย Distal subungual onychomycosis (A), Proximal subungual onychomycosis (B), White superficial onychomycosis (C), Endonyx onychomycosis (D), Total dystrophic onychomycosis (E) และ Mixed pattern onychomycosis (F).....	7
รูปที่ 2 ความชุกของโรค Onychomycosis ในประเทศไทยจากการสำรวจทางระบาดวิทยาของผู้ป่วย	8
รูปที่ 3 โครงสร้างและส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา (The fungal cell wall structure) ⁽²⁵⁾	10
รูปที่ 4 ชนิดของเมลานินในเชื้อราแต่ละชนิด (Melanin and melanin biosynthesis of selected fungi).....	11
รูปที่ 5 กระบวนการสร้างเมลานินในผนังเซลล์ของเชื้อรา (melanin synthesis pathways) ⁽²⁹⁾	12
รูปที่ 6 เป้าหมายการรักษาของยารักษาโรคเชื้อรา (Antifungal Target).....	15
รูปที่ 7 รูปร่างสายราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (A. <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> B. <i>Neoscytalidium hyalinum</i>) และ 8D6 โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะกับเมลานิน (Melanin-specific Mab 8D6) ที่จับกับเมลานินบนผนังเซลล์เชื้อราแสดงผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบเรืองแสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (C. <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (Reference control) D. <i>Neoscytalidium hyalinum</i> (Negative control))	65
รูปที่ 8 ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ <i>N. dimidiatum</i> (macroscopic morphology) บ่มเป็นเวลา 7 วัน (A. เชื้อที่ไม่ได้สัมผัสกับ Turmeric essential oil B. เชื้อที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil C. เชื้อที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil D. เชื้อที่สัมผัสกับ 10 µg itraconazole) รูปร่างสายราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (<i>N. dimidiatum</i> microscopic morphology) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (E. เชื้อที่ไม่ได้สัมผัสกับ Turmeric essential oil F. เชื้อที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil G. เชื้อที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil H. เชื้อที่สัมผัสกับ 10 µg Itraconazole) 8D6 โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะกับเมลานิน (Melanin-specific MAb 8D6) ที่จับกับเมลานินบนผนังเซลล์เชื้อราแสดงผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบเรืองแสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (I. เชื้อที่ไม่ได้สัมผัสกับ Turmeric essential oil J. เชื้อที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil K. เชื้อที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil L.	

เชื้อที่สัมผัสกับ 10 μg itraconazole) Scale bar = 5 μm MAb, monoclonal antibody, TEO =
Turmeric essential oil.....66



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เล็บ (Nail) เป็นอวัยวะปกคลุมร่างกายชนิดหนึ่งที่พบอยู่บริเวณปลายนิ้วมือและนิ้วเท้า มีหน้าที่ป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับนิ้วส่วนปลาย ทำให้นิ้วมือสามารถหยิบจับสิ่งของขนาดเล็กได้ดีขึ้น และช่วยในการรับความรู้สึก ในขณะที่เล็บนิ้วเท้าช่วยในการเคลื่อนไหวของเท้า ความผิดปกติของเล็บสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ ส่วนใหญ่ (>50%) เกิดจากการติดเชื้อราที่เล็บ (Fungal nail infection) ซึ่งเรียกว่า Onychomycosis⁽¹⁾ การติดเชื้อมักมีอาการไม่รุนแรง แต่หากเล็บมีการหนาตัวมากขึ้นและผิดรูปร่าง อาจมีอาการปวดในขณะที่หยิบจับสิ่งของหรือในขณะที่เดิน และเป็นที่น่าอับอาย ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย นอกจากนี้เล็บที่ติดเชื้อยังเป็นแหล่งรังโรคที่เชื้อราลุกลามไปยังบริเวณต่างๆ ได้อีกด้วย^(2, 3)

เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรค Onychomycosis สามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่ม Dermatophytes (DMP) ได้แก่ เชื้อในกลุ่ม *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. และ *Epidermophyton* spp. และกลุ่ม Non-dermatophytes (NDM) ที่พบได้บ่อยคือ *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp. และ *Neoscytalidium dimidiatum* รวมถึง yeast โดยเฉพาะ *Candida* spp.⁽⁴⁻⁷⁾ ความชุกของ Onychomycosis และเชื้อราที่เป็นสาเหตุมีความแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค จากการศึกษาในประเทศไทยเมื่อปี ค.ศ. 2001 พบความชุกของ Onychomycosis ในกลุ่มประชากรที่ศึกษาอยู่ที่ประมาณ 6.0% (119/2,000 ราย) ในจำนวนดังกล่าวเกิดจากการติดเชื้อราในกลุ่ม Non-dermatophyte (NDM) (> 50%) รองลงมาเป็นเชื้อ Dermatophyte (DMP) และ *Candida* spp. ทั้งนี้ พบเป็น *N. dimidiatum* มากที่สุด⁽⁸⁾

N. dimidiatum จัดเป็นราดำชนิดหนึ่ง (Dematiaceous Fungi) ซึ่งรงควัตถุสีดำนั้นเกิดจากการสร้างเมลานินขึ้น (melanin production)⁽⁸⁾ เมลานินเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เชื้อรานั้นก่อโรค⁽⁹⁾ และทำหน้าที่ปกป้องเชื้อราจากสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง⁽¹⁰⁾ เห็นได้จากการที่เชื้อราที่มีการสร้างเมลานินนั้นสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูง รังสี ultraviolet, gamma และ X-rays ได้มากกว่าเชื้อราที่ไม่มีการสร้างเม็ดสีเมลานิน⁽¹¹⁻¹³⁾ อีกทั้งเมลานินยังมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เชื้อราตัวยาย ซึ่งแสดงให้เห็นได้จาก *N. dimidiatum* ที่มีการสร้างเมลานินนั้นคือตัวยายที่ใช้รักษามากกว่าเชื้อราชนิด *Neoscytalidium hyalinum* ที่ไม่มีการสร้างเมลานิน⁽¹⁴⁾ อนึ่ง Itraconazole เป็นยาที่ใช้รักษา *N. dimidiatum* ในปัจจุบันเป็นยาที่มีฤทธิ์กว้างซึ่งมีเป้าหมายของยาอยู่ที่การไปยับยั้งการสร้าง ergosterol ที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของเชื้อรา⁽¹⁵⁾ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *N. dimidiatum* นั้นยังคงคือตัวยายที่ใช้ในการรักษา^(16, 17)

ในปัจจุบันได้มีการนำขมิ้นชันมาใช้ทางการแพทย์โดยเริ่มจากการใช้น้ำมันหอมระเหย (essential oil) มาใช้เป็นยาขับลม และรักษาโรคเชื้อรา (antifungal) ซึ่งองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน (Turmeric essential oil) ประกอบด้วย turmerone, atlantone และ zingiberone และใช้ curcuminoids ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการอักเสบ^(18, 19) นอกจากนี้สารสกัด curcumin ยังมีคุณสมบัติ Antibacterial, Antiviral และ Tyrosinase

inhibitor ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการสร้างเมลานินอีกด้วย รวมทั้งมีการศึกษาพบว่าสาร curcumin มีคุณสมบัติเสริมฤทธิ์ (Synergistic activity) กับยาที่ใช้รักษาเชื้อราประเภท azole และประเภท polyene ซึ่งสามารถช่วยลดความเข้มข้นของยา (MIC) ที่ใช้รักษาเชื้อราลงได้ถึง 10-35 เท่า⁽²⁰⁾ ดังนั้น การศึกษาถึงฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน (Turmeric essential oil) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและลดการสร้างเมลานินของเชื้อ *N. dimidiatum* จึงมีความสำคัญและมีประโยชน์ต่อการรักษาการติดเชื้อ *N. dimidiatum* และอาจจะทำให้ได้ยาที่มีเป้าหมายของยาที่มีความจำเพาะต่อเชื้อชนิดนี้ต่อไป

คำถามงานวิจัย (Research Question)

1. ความเข้มข้นต่ำสุดของยา (MIC) ต่อเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM) ที่ก่อให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ สำหรับยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole เป็นอย่างไร
2. Turmeric essential oil มีผลต่อการต้านการเจริญและมีฤทธิ์ต้านการสร้างเมลานินใน *N. dimidiatum* ที่ทำให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บหรือไม่
3. การ Subculture มีผลต่อการสร้างเมลานิน และความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการต้านการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* หรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

วัตถุประสงค์ทั่วไป

การศึกษาระยะที่ 1

- เพื่อศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของยา (MIC) ของเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM) ที่ก่อให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ สำหรับยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole

การศึกษาระยะที่ 2

- เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลการสร้างเมลานินที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0 และการต้านการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ที่สัมผัสกับ Turmeric essential oil และ Itraconazole

วัตถุประสงค์เฉพาะ

การศึกษาระยะที่ 1 :

1. เพื่อศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของยา (MIC) ของเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM) ที่ก่อให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ สำหรับยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole

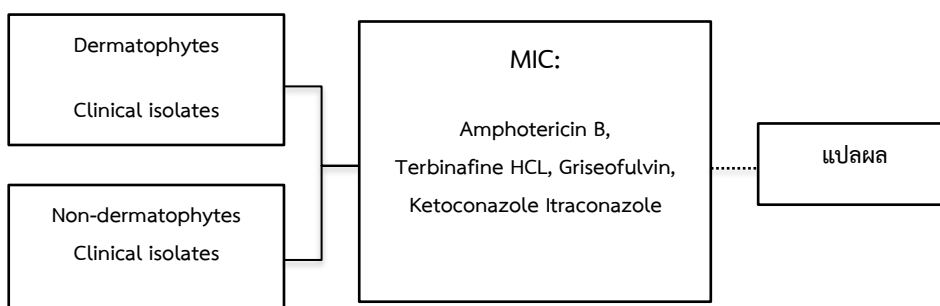
การศึกษาระยะที่ 2 :

1. เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ Turmeric essential oil ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8
2. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของยา Itraconazole ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8
3. เพื่อศึกษาผลการสร้างเมลานินของ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0 ต่อ Turmeric essential oil
4. เพื่อศึกษาผลการสร้างเมลานินของ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0 ต่อยา Itraconazole
5. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น และปริมาณเมลานิน ของ *N. dimidiatum* ต่อ Turmeric essential oil
6. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่ำสุดของยา (MIC) และปริมาณเมลานิน ของ *N. dimidiatum* ต่อ Itraconazole

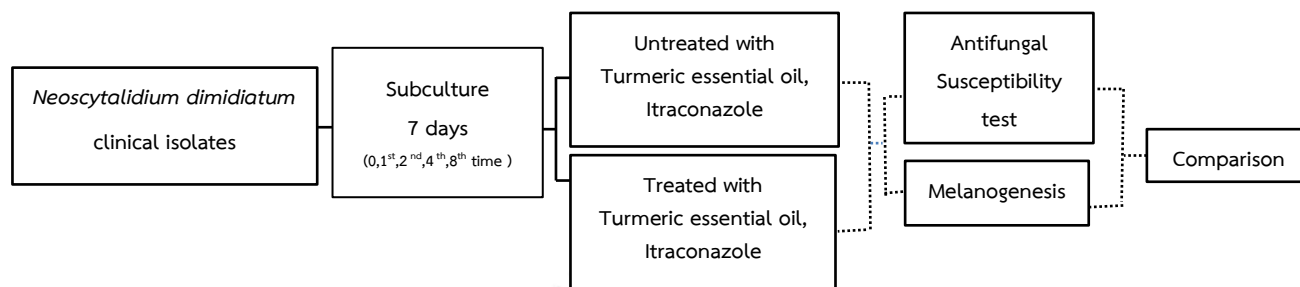
กรอบแนวคิด (Conceptual Framework)

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษา ดังนี้

การศึกษาระยะที่ 1 : การศึกษา MIC ของเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM) ที่ก่อให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ สำหรับยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole



การศึกษาระยะที่ 2 : ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการสร้างเมลานินและความเข้มข้นต่ำสุดของยา (MIC) ของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ต่อ Turmeric essential oil และยาปัจจุบันที่ใช้รักษา ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8



ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างเชื้อราชนิด DMP, NDM, *N. dimidiatum* จากสถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์

คำสำคัญ (Key words)

น้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน, การต้านการเจริญ, การยับยั้งการสร้างเมลานิน, โรคเชื้อราที่เล็บ, นีโอสกีทาลิเดียม ไดมิดิเดียม

Turmeric essential oil, Fungistatic, Melanogenesis, Onychomycosis, *N. dimidiatum*

คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่จะใช้ในการวิจัย (Operational Definition)

โรคเชื้อราที่เล็บ (Onychomycosis) คือ เป็นโรคติดเชื้อราที่เล็บซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดความผิดปกติของเล็บ

น้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน (Turmeric essential oil) คือ น้ำมันหอมระเหยจากรากของขมิ้นชันที่ได้มาจากการกลั่นด้วยไอน้ำ

การสร้างเมลานิน (Melanogenesis) คือ การสร้างเม็ดสีที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจากขบวนการ oxidative polymerization ของสารประกอบ phenolic ซึ่งเมลานินที่อยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อราโดยส่วนใหญ่มีอยู่ 2 ชนิด คือ DHN-melanin และ DOPA-melanin

การต้านการเจริญของเชื้อ (Growth inhibition) คือ คุณสมบัติที่วัดได้จากค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยาที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC) และเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ Turmeric essential oil ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้

Subculture คือการเก็บรักษาเชื้อราในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการนำเชื้อมาเลี้ยงในหลอดอาหาร เมื่อเชื้อเจริญสูงสุดและเข้าสู่ระยะที่จะตายลง ต้องทำการถ่ายเชื้อไปสู่หลอดอาหารใหม่ ซึ่งระยะเวลาในการถ่ายเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาพในการเก็บรักษา

ข้อพิจารณาทางจริยธรรม (Ethical Consideration)

การวิจัยครั้งนี้ถูกนำเสนอผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ ก่อนที่จะสามารถดำเนินการได้ โดยการวิจัยนี้ต้องได้รับการอนุมัติจากผู้อำนวยการสถาบันโรคผิวหนังในการเข้าถึงสิ่งส่งตรวจที่เก็บจากผู้ป่วยที่มารับการรักษา ณ สถาบันโรคผิวหนัง ซึ่งเป็นการได้รับการเก็บสิ่งส่งตรวจตามมาตรฐานการรักษาโรคและไม่ได้มีการขอเก็บสิ่งส่งตรวจเพิ่มเติม โดยงานวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์ปัญหาทางจริยธรรมที่เกี่ยวข้องตามหลักจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ ดังนี้

หลักการให้ความเคารพในบุคคล (Respect for Person) การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยในหลอดทดลอง โดยข้อมูลส่วนตัวและข้อมูลในการวิจัยของผู้ป่วยที่ผู้วิจัยนำเข้ามาทำการวิจัยจะถูกเก็บเป็นความลับ การวิเคราะห์ผลและรายงานผลการวิจัยจะนำเสนอในภาพรวมเป็นไปเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการเท่านั้น และจะไม่กระทบต่อผู้ป่วย โดยผู้วิจัยไม่ทราบว่าจะต้องนำผลมาจากผู้ป่วยท่านใด

หลักแห่งผลประโยชน์ (Beneficence) การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยในหลอดทดลอง ผู้ป่วยจะไม่ได้รับประโยชน์โดยตรงใดๆจากการเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ แต่ผลการวิจัยจะก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อส่วนรวม

หลักแห่งความยุติธรรม (Justice) การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยในหลอดทดลอง ในการดำเนินโครงการนี้ เชื่อที่เป็นกลุ่มเป้าหมายและผ่านเกณฑ์การคัดเลือกจะได้รับเลือกเข้าโครงการฯ เท่ากัน ไม่มีผลประโยชน์ขัดกันในการดำเนินงานวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและการนำไปประยุกต์ใช้ (Expected Benefit and Application)

1. ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับความเข้มข้นของยา (MIC) ของเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM) ที่ก่อให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ สำหรับยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole

2. ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำอย่างต่อเนื่องต่อความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และปริมาณการสร้างเมลานินของ *N. dimidiatum* ที่ทำให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ

3. ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับคุณสมบัติของ Turmeric essential oil ในการต้านการเจริญของเชื้อรา และต้านการสร้างเม็ดสีเมลานินใน *N. dimidiatum* ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ ซึ่งในอนาคตน้ำมันหอมระเหยเข้มข้นจะมีประโยชน์ในการใช้รักษาโรคเชื้อราที่เกิดจากเชื้อราชนิด *N. dimidiatum* อีกทั้งเมลานินอาจจะนำมาใช้เป็นเป้าหมายเฉพาะกับยาที่ใช้ในการรักษาโรคเชื้อราที่เกิดจาก *N. dimidiatum* และเกิดจากราคาชนิดอื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

4. ได้รับความรู้เพื่อนำไปใช้ศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับระบาดวิทยาของเชื้อดื้อยาในแง่ของการกระจายตัวของชนิดของเชื้อ และปัจจัยกำหนดในเรื่องของยีนส์ดื้อยาในอนาคต ซึ่งสามารถนำองค์ความรู้จากการวิจัยนำมาควบคุมและจัดการปัญหาด้านสุขภาพ ทำให้ผู้ป่วยโรคเชื้อราที่เล็บมีทางเลือกใหม่ในการรักษา อันสามารถนำไปต่อยอดขยายผลในด้านการผลิตยาทาที่ใช้ในการรักษาด้วยน้ำมันหอมระเหยเข้มข้นต่อไป

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

โรคติดเชื้อราที่เล็บ (Onychomycosis)

Onychomycosis เป็นโรคติดเชื้อราที่เล็บซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดความผิดปกติของเล็บ อับติการณ์การติดเชื้อดังกล่าวทั่วโลกอยู่ที่ 10-30% และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น^(4, 5, 7) นอกจากนี้ Onychomycosis มักพบที่เล็บเท้าได้บ่อยกว่าเล็บมือ⁽²¹⁾ โดยลักษณะทางคลินิกของเล็บจากโรค Onychomycosis สามารถจำแนกตามพยาธิกำเนิดและบริเวณติดเชื้อได้ ดังนี้^(9, 10)

Distal subungual onychomycosis (DLSO) เป็นการติดเชื้อราที่บริเวณปลายและด้านข้างของเล็บซึ่งส่งผลกระทบต่อ Nail plate, Nail bed และ Hyponychium ทำให้เล็บมีความหนาและผิดรูป (Dystrophic) และทำให้สีเล็บเปลี่ยนเป็นสีขาวเหลืองหรือสีน้ำตาล โดยส่วนใหญ่พบว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อราที่ผิวหนังบริเวณเท้ามาก่อนแล้ว ทั้งนี้ DLSO เป็นลักษณะทางคลินิกที่พบได้บ่อยมากที่สุด

Proximal subungual onychomycosis (PSO) เป็นการติดเชื้อราที่เล็บบริเวณ proximal nail folds ทำให้เล็บบริเวณดังกล่าวเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น

Endonyx onychomycosis (EO) เป็นการติดเชื้อราที่เล็บตรงบริเวณแผ่นเล็บ แต่ไม่มีการแยกของแผ่นเล็บออกจาก Nail bed (Onycholysis) หรือไม่มีการหนาขึ้นของเล็บ (Hyperkeratosis)

White superficial onychomycosis (WSO) เป็นการติดเชื้อราตรงบริเวณผิวหนังของแผ่นเล็บ ทำให้แผ่นเล็บเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น มักพบว่าเกิดจากการติดเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes* ทั้งนี้ ลักษณะการติดเชื้อราดังกล่าวนี้พบได้ไม่บ่อยนัก

Total dystrophic onychomycosis (TDO) เป็นการติดเชื้อราที่เล็บถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ ส่งผลทำให้เล็บหนาตัวขึ้นและทำให้เล็บมีรูปร่างที่ผิดปกติไป โดยพบว่าเกิดจากการติดเชื้อ *Trichophyton rubrum* มากที่สุด

Mixed pattern onychomycosis (MPO) เป็นการติดเชื้อราที่แผ่นเล็บมีความผิดปกติในหลายรูปแบบแตกต่างกันได้ โดยปกติพบลักษณะของการติดเชื้อแบบ PSO ร่วมกับ SO หรือ DLSO กับ SO ส่วนใหญ่ใช้การรักษาแบบยากิน (Oral therapy)

Secondary onychomycosis เป็นการติดเชื้อแทรกซ้อนในเล็บที่มีความผิดปกติอยู่เดิมจากสาเหตุอื่น โดยส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นกับเล็บที่มีภาวะ Traumatic nail dystrophy และ Psoriasis แม้ว่าการติดเชื้อดังกล่าวมักมีอาการไม่รุนแรง แต่หากเล็บมีการหนาตัวมากขึ้นและผิดรูปร่าง อาจมีอาการปวดในขณะที่หยิบจับสิ่งของหรือในขณะที่เดิน ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตและจิตใจของผู้ป่วย นอกจากนี้ เล็บที่ติดเชื้อรายังเป็นแหล่งรังโรคที่เชื้อราลุกลามไปยังบริเวณต่างๆ ได้อีกด้วย^(3, 11)

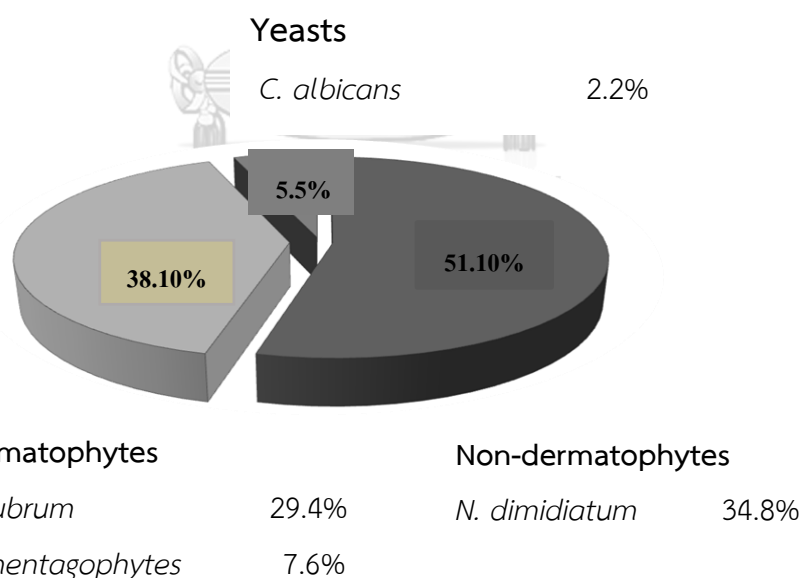


รูปที่ 1 ลักษณะทางคลินิกในรูปแบบต่างๆ ของ Onychomycosis^(1, 22) ซึ่งประกอบด้วย Distal subungual onychomycosis (A), Proximal subungual onychomycosis (B), White superficial onychomycosis (C), Endonyx onychomycosis (D), Total dystrophic onychomycosis (E) และ Mixed pattern onychomycosis (F)

ชนิดของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ (Causative Organism)

เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรค Onychomycosis สามารถแบ่งออกได้เป็น กลุ่ม Dermatophytes (DMP) ซึ่งเป็นเชื้อใน *Trichophyton* spp., *Epidermophyton* spp. และกลุ่ม Non-dermatophytes (NDM) ที่พบได้บ่อยคือ *S. brevicaulis*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp. และ *N. dimidiatum* รวมถึง Yeast โดยเฉพาะ *Candida* spp.^(4, 5, 7)

ความชุกของโรค Onychomycosis ในประเทศแถบตะวันตกมักเกิดจากการติดเชื้อในกลุ่ม DMP โดยเฉพาะ *Trichophyton rubrum* และ *Trichophyton mentagrophytes* แต่ในประเทศเขตร้อน มักพบเป็นเชื้อในกลุ่ม NDM โดยมักเกิดจากเชื้อราชนิด *S. brevicaulis*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* และ *Acremonium* spp. ทั้งนี้ ความชุกของ Onychomycosis ที่เกิดจาก NDM มีแนวโน้มสูงมากขึ้นทั่วโลก⁽¹²⁾ สำหรับความชุกในประเทศไทย ในปี ค.ศ. 1995 พบว่า 39% ของโรคติดเชื้อราในผิวหนังและเล็บมีสาเหตุจากเชื้อ *N. dimidiatum* และเกิดจากเชื้อกลุ่ม DMP เพียง 5%⁽¹³⁾ ต่อมาในปี ค.ศ. 2004 พบความชุกการติดเชื้อราที่เล็บจากเชื้อราในกลุ่ม NDM อยู่ที่ 51.1% โดยมีสาเหตุมาจากเชื้อ *N. dimidiatum* มากที่สุด (34.8%)⁽⁸⁾ ในปี ค.ศ. 2015 พบการติดเชื้อราในเล็บจากเชื้อราชนิด *N. dimidiatum* คิดเป็น 17.3%⁽²³⁾ และในปี ค.ศ. 2015 จากการศึกษาผลการตรวจเชื้อราในตัวอย่างเล็บ ณ สถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ ผู้วิจัยพบว่า ความชุกของตัวอย่างเล็บที่มีความผิดปกติเกิดจาก Onychomycosis คิดเป็น 26.4 % ในจำนวนดังกล่าว 29.5% ตรวจพบเชื้อกลุ่ม DMP และ 57.9% พบเป็น NDM ทั้งนี้พบเป็น *N. dimidiatum* มากที่สุด (45.3%)



รูปที่ 2 ความชุกของโรค Onychomycosis ในประเทศไทยจากการสำรวจทางระบาดวิทยาของผู้ป่วย 10,000 ราย⁽⁸⁾

การรักษาโรค Onychomycosis (Treatment)

Onychomycosis เป็นโรคเรื้อรังที่ต้องใช้ระยะเวลารักษานาน โดยการรักษามีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดเชื้อราให้หมดไปจากเล็บและทำให้เล็บกลับมาเป็นปกติ ดังนั้น การรักษาหลักที่ใช้ในปัจจุบันมีอยู่ 3 วิธี คือการใช้ยาต้านเชื้อราแบบทา (Topical therapy) แบบรับประทาน (Oral therapy) และการรักษาแบบผสมผสาน (Combination therapy)⁽¹⁴⁾

การรักษาด้วยยาต้านเชื้อราแบบทา (Topical therapy) การใช้ยารักษาเฉพาะที่จะใช้สำหรับผู้ป่วย Onychomycosis ที่บริเวณ Matrix ไม่ได้รับผลกระทบ ซึ่ง Matrix เป็นบริเวณที่อยู่ลึกตรงปลายนิ้วติดกับกระดูกนิ้วมือ ทำหน้าที่สร้าง Keratin ขึ้นมาให้เป็นแผ่นเล็บ และงอกออกไปทางปลายและเล็บมีความผิดปกติน้อยกว่า 50% รวมทั้งเหมาะกับผู้ป่วยที่ไม่พบการเกิด Melanonychia นอกจากนี้การรักษาดังกล่าวยังเหมาะกับผู้ป่วยที่ไม่ต้องการรักษาโดยการกินยา หรือผู้ป่วยที่มีปัญหาในการกลืน ผลข้างเคียงในการรักษาด้วยยาทาเฉพาะมีน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ยาทาน แต่หากมีผลข้างเคียงจะเป็นเฉพาะบริเวณที่ใช้ยาเท่านั้น การใช้ยาทาเฉพาะที่นั้นยาจะซึมเข้าไปสู่แผ่นเล็บได้รวดเร็วกว่าการกินยา การใช้ยาทาเฉพาะที่เหมาะสมสำหรับการรักษาที่ต้องใช้ระยะเวลานานอีกทั้งถ้าใช้ร่วมกับการทานยาจะทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาได้ผลดีมากยิ่งขึ้น ยาทาเฉพาะที่ที่ใช้กันในปัจจุบัน เช่น Imidazoles (tioconazole, bifonazole/urea), Ciclopirox และ Amorolfine

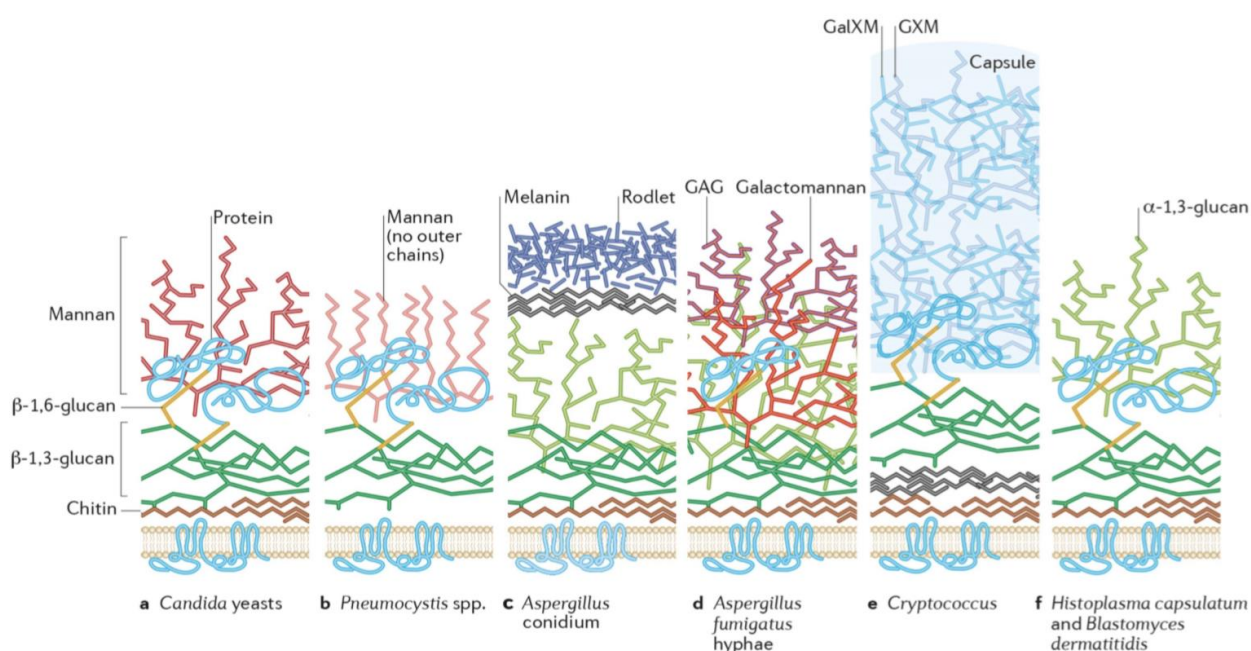
การรักษาด้วยยาต้านเชื้อราแบบรับประทาน (Oral therapy) การใช้ยาในการรักษาจะใช้สำหรับผู้ป่วย Onychomycosis ที่บริเวณ Matrix ได้รับผลกระทบและเล็บมีความผิดปกติเกินกว่า 50% รวมทั้งไม่สามารถใช้ยาทาเฉพาะที่ได้เนื่องจากยาไม่สามารถซึมเข้าสู่แผ่นเล็บได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการรักษาด้วยยาคินนั้นนับว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาดีกว่าการใช้ยาทาเฉพาะที่ แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ยาคินในการรักษานั้นมีข้อจำกัดในเรื่องของราคายาที่แพง รวมทั้งยาคินมีผลข้างเคียงในการรักษาค่อนข้างสูง และสามารถเกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างยาอื่นได้อีกด้วย ดังนั้นการเลือกการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวจึงต้องคำนึงถึงในหลายๆ ปัจจัยก่อนการตัดสินใจในการรักษา ยาต้านเชื้อราแบบรับประทานที่ใช้กันในปัจจุบัน เช่น Griseofulvin, Ketoconazole, Terbinafine, Itraconazole และ Fluconazole

การรักษาแบบผสมผสาน (Combination therapy) การใช้การรักษาแบบผสมผสานคือการใช้ยาคินต้านเชื้อรา ร่วมกับการใช้ยาทาต้านเชื้อรา ในการรักษาจะใช้สำหรับผู้ป่วยโรค Onychomycosis ที่เล็บมีความผิดปกติเกินกว่า 50% ซึ่งจะมีความผิดปกติที่บริเวณ Matrix หรือไม่ได้ ซึ่งมักจะใช้ในกรณีที่มีการรักษาด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งไม่ประสบความสำเร็จ นอกจากวิธีการรักษาข้างต้นแล้วยังมีวิธีการรักษาด้วยวิธีอื่นๆ อีกเช่น การถอดเล็บ (Remove nail) และการใช้ Lasers เป็นต้น ซึ่งนับเป็นตัวช่วยในการรักษา Onychomycosis ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น⁽²⁴⁾ โดยมีการกำหนดแนวทางในการรักษา Onychomycosis ที่เหมาะสมกับอาการทางคลินิก

บทบาทการก่อโรคของเมลานินในเชื้อรา (Pathogenic Roles for Fungal Melanins)

ผนังเซลล์ของเชื้อรา (Cell wall) เป็นโครงสร้างที่มีความเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอจำเป็นต่อการอยู่รอดของเซลล์ มีความสำคัญต่อการพัฒนารูปร่างและการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา ผนังเซลล์ไม่เพียงเป็นชั้นห่อหุ้มภายนอกแต่ยังเป็นส่วนประกอบที่มีอิทธิพลอย่างมากต่อความสัมพันธ์ของเชื้อราในการ

อยู่ในสิ่งแวดล้อม และเป็นส่วนที่ควบคุมการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมและความเครียดที่ได้รับของเชื้อรา ผนังเซลล์ของเชื้อราโดยส่วนมากมีส่วนประกอบด้านในผนังเซลล์ประกอบไปด้วย Chitin และ β -(1,3) glucan เชื่อมต่อกันเป็นตาข่ายล้อมรอบเซลล์ไว้ โดยที่ β -(1,3) glucan β -(1,6) glucan จะเชื่อมกับโปรตีน และ polysaccharides ชนิดอื่น เช่น α -(1,3) glucan ซึ่งแตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของเชื้อรา อีกทั้งผนังเซลล์ด้านในจะมีสปอร์ และส่วนประกอบที่มีสีดำที่เรียกว่า เมลานิน (Melanin)⁽²⁵⁾ ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 โครงสร้างและส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา (The fungal cell wall structure)⁽²⁵⁾

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมลานินคืออะไร (Definition of Melanin)

เมลานิน (Melanin) เป็นเม็ดสีที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากซึ่งเกิดจากขบวนการ oxidative polymerization ของสารประกอบ phenolic⁽²⁶⁾ สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกอาณาจักร มีบทบาทที่สำคัญต่อการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต เช่นเดียวกับในจุลชีพ โดยส่วนใหญ่เมลานินมีหลายสี คือ สีดำ สีน้ำตาล สีแดง และสีเหลือง แต่อย่างไรก็ตามทั้งหมดมีคุณสมบัติคล้ายกันคือ ต้านทานต่อการย่อยของกรดที่มีความเข้มข้นสูง มีรูปร่างที่ไม่แน่นอน ไม่ชอบน้ำ มีน้ำหนักโมเลกุลมากและเป็นประจุลบ เมลานินนั้นมียูอยู่หลายชนิดและมีกระบวนการสร้างที่แตกต่างกัน ชนิดของเมลานินประกอบด้วย 1) eumelanin มีสีน้ำตาลดำ 2) pheomelanin มีสีเหลืองแดง 3) pyomelanin มีสีน้ำตาลสว่าง 4) 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN) melanin มีสีน้ำตาลดำ 5) 3,4 dihydroxyphenylamine (DOPA) melanins มีสีน้ำตาลดำ เมลานินที่อยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อราโดยส่วนใหญ่มีอยู่ 2 ชนิด คือ DHN-melanin และ DOPA-melanin ซึ่งเชื้อราชนิด *N. dimidiatum* พบว่ามีการสร้างเมลานินชนิด DHN-melanin⁽²⁶⁻²⁸⁾ แต่มีบางการศึกษาพบว่าเชื้อราบางชนิดสามารถสร้างเมลานินชนิด

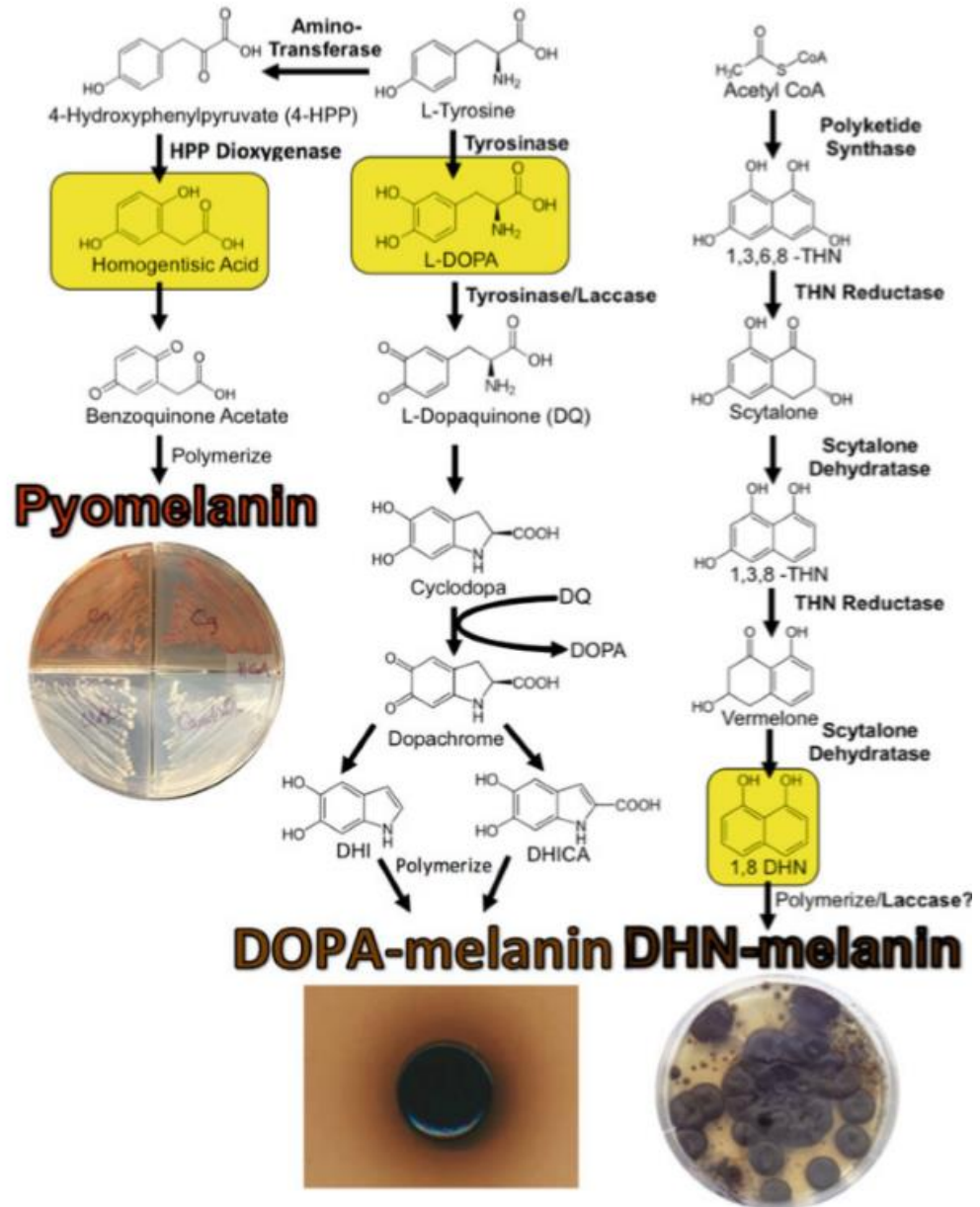
pyomelanin มีสีน้ำตาลสว่าง และสามารถละลายน้ำได้ซึ่งแตกต่างจาก DHN-melanin และ (DOPA)-melanin⁽²⁹⁾ ดังแสดงในรูปที่ 4

Species	Fungal form	Melanin type	Enzymes and pathways	References
<i>Aspergillus flavus</i>	Conidia	DOPA	Tyrosinase	Inamdar et al. (2014), Pal et al. (2014)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Conidia	DOPA, DHN, Pyo	Laccase, PKS (<i>alb1</i> , <i>arp1</i> , <i>arp2</i>), TDP (<i>hhpD</i> , <i>hmgA</i>)	Schmaler-Ripcke et al. (2009), Tsai et al. (1999), Youngchim et al. (2004)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Conidia	DOPA	Tyrosinase, Laccase	Bull (1970a, b), Bull and Carter (1973), Gonçalves et al. (2012), Kurtz and Champe (1982)
<i>Aspergillus niger</i>	Conidia	DOPA, DHN	Unknown, PKS (<i>albA</i> , <i>aygA</i>)	Chiang et al. (2011), Pal et al. (2014)
<i>Candida albicans</i>	Yeast	DOPA	Unknown/Laccase	Morris-Jones et al. (2005)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Yeast	DOPA, Pyo	Laccase (<i>CNLAC1</i> , <i>CNLAC2</i>)	Frases et al. (2007), Shaw and Kapica (1972), Williamson (1994)
<i>Cryptococcus gattii</i>	Yeast	DOPA	Laccase	Chan and Tay (2010)
<i>Exophiala (Wangiella) dermatitidis</i>	Yeast Hyphae	DOPA, DHN DHN	Laccase; PKS (<i>WdPKS1</i>) PKS (<i>WdPKS1</i>)	Dixon et al. (1992), Geis, et al. (1984), Feng et al. (2001), Paolo et al. (2006), Wheeler et al. (2008)
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Conidia Hyphae	DHN DHN	PKS PKS	Cunha et al. (2005)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Yeast Conidia	DOPA, Pyo DOPA, DHN	Laccase, TDP PKS? Laccase?	Almeida-Paes et al. (2018), Nosanchuk et al. (2002)
<i>Lomentospora prolificans</i>	Conidia	DHN	PKS (<i>PKS1</i> , <i>4HNR</i> , <i>SCD1</i>)	Al-Laacy et al. (2016)
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Yeast Conidia	DOPA DHN?	Laccase PKS?	Gómez et al. (2001)
<i>Sporothrix schenckii</i>	Yeast Conidia Hyphae	DOPA, Pyo DHN, DOPA, Pyo DOPA, Pyo	Laccase, TDP PKS, Laccase, TDP Laccase, TDP	Almeida-Paes et al. (2009), Almeida-Paes et al. (2012), Morris-Jones et al. (2003), Teixeira et al. (2010)
<i>Talaromyces (Penicillium) marneffei</i>	Yeast Conidia/ Hyphae	DOPA, DHN, Pyo DHN	Laccase, PKS (<i>alb1</i> , <i>arp1</i> , <i>arp2</i>), TDP (<i>hpdA</i> , <i>hmgR</i>) PKS (<i>alb1</i> , <i>arp1</i> , <i>arp2</i>)	Boyce et al. (2015), Kaewmalakul et al. (2014), Liu et al. (2014), Youngchim et al. (2005), Woo et al. (2010)

Abbreviations DOPA melanin (DOPA), DHN Melanin (DHN), Pyomelanin (Pyo), Polyketide Synthase Pathway (PKS), Tyrosine Degradation Pathway (TDP)

รูปที่ 4 ชนิดของเมลานินในเชื้อราแต่ละชนิด (Melanin and melanin biosynthesis of selected fungi)

องค์ความรู้เรื่องโครงสร้างของเมลานินในปัจจุบันมีค่อนข้างจำกัดเนื่องจากขาดเทคโนโลยีในการวิเคราะห์ที่เหมาะสม ซึ่งองค์ความรู้เกี่ยวกับเมลานินในปัจจุบันได้มาจากการศึกษากระบวนการเกิด Metabolism ของเมลานิน⁽²⁵⁾ ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 กระบวนการสร้างเมลานินในผนังเซลล์ของเชื้อรา (melanin synthesis pathways)⁽²⁹⁾

ความรุนแรงของเมลานินในการทำให้เกิดโรค (Relation of Fungal Melanin to Virulence)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราสายพันธุ์ที่มีเมลานินและไม่มีเมลานินในการก่อโรค (Correlation Studies)

เชื้อราที่มีคุณสมบัติก่อให้เกิดโรคไม่ได้มีความสามารถในการสร้างเมลานิน (Melanotic) ได้ทุกชนิด แต่ถึงกระนั้นเชื้อราที่มีความสามารถในการก่อโรคโดยส่วนใหญ่มีศักยภาพในการผลิตเมลานิน ซึ่งเชื้อราเหล่านี้ถูกเรียกว่า รามีสี (dematiaceous, phaeohyphomycetous Fungi)⁽³⁰⁾ มีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *Basidiobolus* spp. ชนิดที่สามารถสร้างเมลานินและไม่สร้างเมลานินในหลายการศึกษา พบว่าเมลานินมีความสัมพันธ์กับการก่อโรคในมนุษย์⁽³¹⁾ เช่นเดียวกับผลการศึกษาในเชื้อ *Cryptococcus* spp. พบว่าเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์ได้บ่อยมากที่สุด ซึ่งเป็นผลมาจากการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ที่ระบุว่าเมลานินก่อให้เกิดพยาธิสภาพในโรค cryptococcosis⁽³²⁾

การศึกษาเชื้อราที่มีภาวะพร่องเมลานิน (Studies of Mel- Fungal Mutants)

การเกิดการกลายพันธุ์ของเมลานินของเชื้อราที่ทำให้เกิดภาวะพร่องเมลานินที่เกิดขึ้นเองธรรมชาติหรือเกิดจากแสง UV ของเชื้อ *C. neoformans* ทำให้ความรุนแรงของการก่อโรคลดลง⁽³²⁾ เช่นเดียวกับผลการศึกษาภาวะพร่องเมลานินจากการกลายพันธุ์ของเชื้อ *Wangiella dermatitidis* พบว่าความรุนแรงของเชื้อในการก่อโรคลดลงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ซึ่งเห็นได้จากการที่เชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมสามารถฆ่าหนูให้ตายได้ภายใน 3 วันในขณะที่หนูที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ที่มีภาวะพร่องเมลานินยังมีชีวิตอยู่ได้ตลอดระยะเวลา 21 วันของการศึกษา⁽³³⁾ การเกิดการกลายพันธุ์ของเมลานินของเชื้อราจากการได้รับ scytalone ซึ่งเป็นสารตัวกลางของ pentaketide pathway ซึ่งเป็นขบวนการสร้างเมลานิน พบว่าเชื้อราทำให้เกิดความรุนแรงในการก่อโรคมกกว่าสายพันธุ์ที่ได้รับ tricyclazole ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานินพบว่ามี ความรุนแรงน้อยกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ได้รับสารดังกล่าว⁽³⁴⁾ จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการเกิดการติดเชื้อของเชื้อดูเหมือนจะขึ้นกับระดับการสร้างเมลานินของเชื้อรา ดังจะเห็นได้จากอีกการศึกษาหนึ่งที่ระบุว่า การกลายพันธุ์ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ที่ทำให้เกิดภาวะที่ไม่มีการสร้างเมลานิน (UV-induced albino mutants) พบว่ามีความรุนแรงในการก่อโรคลดลงอีกด้วย⁽³⁵⁾

การศึกษาเกี่ยวกับการรักษาด้วยยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเมลานิน (Anti-Melanin Drug Treatment Study)

มีการศึกษาพบว่า glyphosate เป็นสารที่สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานินของเชื้อรา *C. neoformans* ในหนูทดลองซึ่งสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตจากโรค cryptococcosis ได้ แต่ผลของการรักษาด้วยยาดังกล่าวยังไม่มีความชัดเจนอย่างมีนัยสำคัญ ถึงอย่างไรก็ตามยาดังกล่าวสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ aromatic compounds ซึ่งรวมไปถึงสารตั้งต้นในการสร้างเมลานินของเชื้อรา⁽³⁶⁾ แต่ในขณะที่ *C. neoformans* สามารถสร้างเมลานินได้จาก catecholamines ที่ได้มาจาก

ภายนอก⁽³⁷⁾ ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลของการรักษาไม่ได้เกิดจากกระบวนการการยับยั้งการสร้างเมลานิน แต่เกิดจากการยับยั้งการสังเคราะห์ aromatic compounds ที่จำเป็นเช่นเดียวกับที่พบในการศึกษาในพืช⁽³⁸⁾

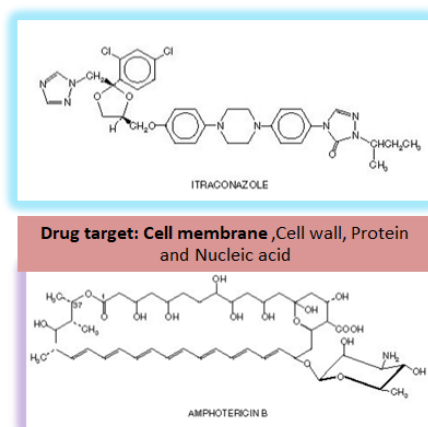
บทบาทของเมลานินในการเจาะเซลล์ (Role of Melanin in Penetration of Cells)

การเจาะผนังเซลล์พืชของเชื้อราเกิดจาก appressorium ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดพิเศษที่งอกมาจากสปอร์ของเชื้อราที่ก่อให้เกิดการสร้างแรงดันบนผนังเซลล์ของพืชจนทำให้เกิดรูขึ้น⁽³⁹⁾ มีการศึกษาพบว่า DHN-melanin ถือเป็นส่วนประกอบจำเป็นอย่างยิ่งต่อการทำงานของ appressorium ของเชื้อราชนิด *Magnaporthe grisea* ที่ก่อโรค Rice blast แต่ไม่มีความสำคัญสำหรับเชื้อราชนิด *Alternaria alternata* ซึ่งเห็นได้จาก appressorium ของเชื้อราดังกล่าวโดยปกติแล้วพบว่าไม่มีการสร้างเม็ดสี⁽⁴⁰⁾ อีกทั้งมีการศึกษา appressorium ในเชื้อราชนิด *M. grisea* ที่เกิดการกลายพันธุ์จนทำให้ไม่สามารถสร้างเม็ดสีได้นั้น พบว่า appressorium เกิดความผิดปกติในการแทรกตัวและรูปร่างจนไม่สามารถสร้างแรงดันที่สูงขึ้นได้⁽⁴¹⁾ นอกจากนั้นเมลานินยังช่วยลดรูพรุนที่ผนังของเซลล์ appressorium อีกด้วย⁽⁴²⁾ สารประกอบที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ DHN-melanin อาทิเช่น tricyclazole, phthalide และ pyroquilon ถูกใช้เพื่อยับยั้งเชื้อราไม่ให้เจาะเซลล์พืช (antipenetrant) ซึ่งสารดังกล่าวไม่ได้มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อราที่ก่อโรค แต่มันทำให้เชื้อราไม่สามารถสร้างเมลานินได้ส่งผลทำให้เซลล์ appressorium เกิดความผิดปกติจนไม่สามารถเจาะผนังเซลล์ของพืชและก่อให้เกิดโรคได้ อีกทั้งสาร tricyclazole ยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินในเชื้อราที่มีสี (phaeohyphomycetes) ที่ก่อโรคในมนุษย์ได้หลายชนิดอีกด้วย⁽⁴³⁾ ยังไม่มีการศึกษาที่ระบุว่าเซลล์ appressorium จะมีบทบาทในการก่อโรคในสัตว์ แต่ถึงอย่างไรเซลล์ดังกล่าวถือว่าเป็นโมเดลที่จะอธิบายบทบาทของเมลานินในการก่อโรคที่น่าสนใจ และมีข้อสังเกตว่าเมลานินจะมีบทบาทในการเจาะเซลล์ของสัตว์หรือไม่ ซึ่งจากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ *W. dermatitidis* โดยผลการศึกษาพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีการสร้างเมลานินมีการเจริญได้เร็วกว่าสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างเมลานินได้ อีกทั้งเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมจะเจริญได้ช้าลงเมื่อได้รับสาร tricyclazole ที่ไปยับยั้งการสร้างเมลานิน แต่อย่างไรก็ตามเชื้อราดังกล่าวกลับมาเจริญได้ดีอีกครั้งเมื่อได้รับสาร scytalone ที่ช่วยทำให้เชื้อราสามารถกลับมาสร้างเมลานินได้อีก⁽⁴⁴⁾

ในปี ค.ศ. 2019 Chongkae S และคณะ⁽⁴⁵⁾ ได้ทำการศึกษาวิจัยเพื่อแสดงให้เห็นถึงการผลิตเมลานินใน conidia และ hyphae ของเชื้อรา saprophyte, เชื้อราดำ (dematiaceous fungi) และเชื้อราสีอ่อน (hyaline fungus) โดย Melanin-specific monoclonal antibody 8D6 จะไปเกาะเมลานินที่ผนังเซลล์เชื้อรา แสดงการเรืองแสงของเชื้อราที่ถูก Melanin-specific monoclonal antibody 8D6 จับอย่างจำเพาะกับเมลานินที่ผนังเซลล์ของเชื้อราชนิด *Fusarium falciforme*, *A. fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Curvularia lunata*, *Exserohilum rostratum* และ *Fonsecaea pedrosoi* จากผลการศึกษานี้ยังสนับสนุนสมมติฐานที่ว่าเมลานินเป็นตัวที่ช่วยให้เชื้อราสามารถอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง และทำให้มีคุณสมบัติในการก่อโรคอีกด้วย

ผนังเซลล์ของเชื้อราเป็นเป้าหมายหลักที่ใช้ในการออกแบบยาเพื่อใช้รักษา อาทิ การผลิตให้ยามีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการสร้าง chitin (chitin synthase inhibitors) เช่น ยา Nikkomycins

และpolyoxins แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาใช้ในการรักษายากไม่มีประสิทธิภาพมากนัก⁽⁴⁶⁾ นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการพัฒนายาให้สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ β -(1,3) glucan เช่น Echinocandins ซึ่งเป็นยาที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการรักษา แต่เนื่องจากยาชนิดนี้ไม่สามารถละลายน้ำได้จึงต้องใช้ยานี้ด้วยการฉีดเข้าเส้นเลือดดำ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาว่า β -(1,3) glucan สามารถเกิดการกลายพันธุ์ได้^(47, 48) อีกทั้งมีการศึกษาพบว่าเมลานินเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เชื้อราต้านก่อโรค⁽⁹⁾ และทำหน้าที่ปกป้องเชื้อราจากสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง⁽¹⁰⁾ อันจะเห็นได้จากการที่เชื้อราที่มีการสร้างเมลานินนั้นสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่รุนแรง รังสีชนิดต่างๆ ได้แก่ Ultraviolet, gamma และ X-rays ได้มากกว่าเชื้อราที่ไม่มีการสร้างเม็ดสีเมลานิน^(11, 12, 43) อีกทั้ง เมลานินยังมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เชื้อราดื้อยา



The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. New York: McGraw-Hill, 1996; pp 1175-1191.

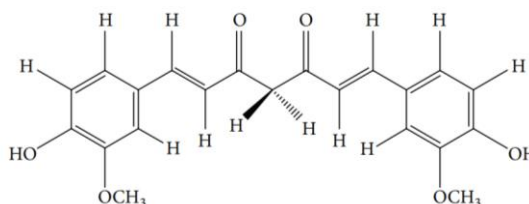
รูปที่ 6 เป้าหมายการรักษาของยารักษาโรคเชื้อรา (Antifungal Target)

N. dimidiatum จัดเป็นราดำชนิดหนึ่ง (Dematiaceous Fungi) ซึ่งเม็ดสีดำนั้นเกิดจากเชื้อราที่มีการสร้างเมลานินขึ้น (melanin production) ซึ่งแสดงให้เห็นได้จาก *N. dimidiatum* ที่มีการสร้างเมลานินนั้นคือต่อยาที่ใช้รักษามากกว่าเชื้อราชนิด *N. hyalinum* ที่ไม่มีการสร้างเมลานิน⁽¹⁴⁾ อนึ่ง Itraconazole เป็นยาที่ใช้รักษา *N. dimidiatum* ในปัจจุบันเป็นยาที่มีฤทธิ์กว้างซึ่งมีเป้าหมายของยาอยู่ที่การลดการสร้าง Cell membrane ของเชื้อรา⁽¹⁵⁾ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *N. dimidiatum* นั้นยังคงคือต่อยาที่ใช้ในการรักษา^(16, 17)

การศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดขมิ้นชันที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญ การสร้างเมลานินของเชื้อรา และความเป็นพิษต่อร่างกาย (Effect of *curcuma longa* L. extracts on antifungal, melanogenesis in fungus and toxicity)

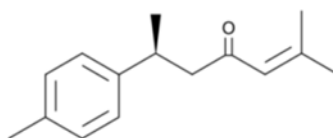
ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและปลูกในพื้นที่เขตร้อน⁽⁴⁹⁾ ถูกใช้สำหรับการรักษาโรคผิวหนัง ผื่น คัน เกาฬอนและกลาก ขมิ้นเป็นสมุนไพรยืนต้นที่มีเหง้าทรงรูปไข่ มีความหนา และเปลือกภายในมีสีส้ม ปลูกง่ายและพบกระจายได้ทั่วไปในประเทศไทย ประเทศในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนอื่นๆ อีกทั้งขมิ้นยังมีชื่อเสียงในฐานะเครื่องเทศและสารให้สี (coloring agent)⁽⁵⁰⁾ อีกด้วย

ขมิ้นชันมีสารประกอบที่เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญอยู่ 2 กลุ่ม คือ สารเคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids) เป็นสารสีเหลืองส้มที่พบมากจากเหง้าของขมิ้นชัน⁽⁵¹⁾ สารเคอร์คิวมินอยด์ส่วนใหญ่ที่พบมี 3 ชนิด คือ เคอร์คิวมิน (Curcumin) พบมากที่สุด (76 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (Demethoxy curcumin) และ บีสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (Bis-desmethoxy curcumin) (16.2% และ 3.8%)⁽⁵²⁾



สารประกอบหลักในกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ : Curcumin⁽⁵³⁾

สารออกฤทธิ์อีกกลุ่ม คือน้ำมันหอมระเหย (essential oil) มีสีเหลืองอ่อน โดย ส่วนใหญ่พบที่ราก (root) 4.3% รองลงมาคือ เหง้า (rhizome) 3.8% ใบ (leaf) 1.3% และ ดอก (flower) 0.3% ซึ่งสารออกฤทธิ์ที่พบมากจากเหง้าและรากคือ ar-turmerone (31%และ 46.8%)⁽⁵⁴⁾



สารประกอบหลักในน้ำมันระเหยขมิ้นชัน : ar-turmerone⁽⁵⁴⁾

การนำขมิ้นชันมาใช้ทางการแพทย์เริ่มจากการใช้น้ำมันหอมระเหย (essential oil) มาใช้เป็นยาขับลม และรักษาโรคเชื้อรา (antifungal) และใช้ curcuminoids ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการอักเสบ ซึ่งองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน (Turmeric essential oil) ประกอบด้วย turmerone, atlantone, and zingiberone^(18, 19) อีกทั้งน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับความเป็นพิษที่เกิดจากสารสำคัญที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน^(55, 56) ตรงกับการศึกษาจากแบบจำลองทางคอมพิวเตอร์เพื่อทำนายความเป็นสารก่อมะเร็งของสาร ar-turmerone พบว่าไม่มีความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ ไม่เป็นสารที่ทำให้เกิดมะเร็ง รวมทั้งมีผลข้างเคียงที่น้อยมากต่อดับ⁽⁵⁷⁾ แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาว่าน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง และระบบทางเดินหายใจได้⁽⁵⁸⁾ ผลการศึกษาต่างๆสนับสนุนการจัด

หมวด น้ำมันหอมระเหยจากรากขมิ้นชัน เป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) ซึ่งได้รับการยอมรับจาก FDA

ตารางที่ 1 การศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดขมิ้นชันที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญ และการสร้างเมลานินของเชื้อรา

ผู้ศึกษา (ค.ศ.)	วัตถุประสงค์	วัสดุและวิธีการ	การวัดผลลัพธ์	ผลการศึกษา
A. Apisariyakul, N. Vanittanakom และ D. Buddhasukh (1995) ⁽¹⁸⁾	เพื่อทดสอบคุณสมบัติต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน	ทำการทดสอบคุณสมบัติต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันในเชื้อราชนิด DMP จำนวน 15 ชนิด ราก่อโรคอื่นอีก 5 ชนิด และยีสต์ จำนวน 6 ชนิด	ทำการวัดความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้	พบว่า 1. Turmeric essential oil ที่เจือจาง (dilution) 1:40 ถึง 1:320 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิด DMP ได้ทั้งหมด 2. สาร curcumin ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิด DMP ทั้ง 15 ชนิดนี้ได้ 3. Turmeric essential oil ที่เจือจาง (dilution) 1:40 ถึง 1:80 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิด Mold ได้ทั้งหมด 4. Turmeric essential oil และสารสกัด curcumin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ทั้งหมด 6 ชนิดที่ทำการทดสอบ
Wuthi-udomlert M, Grisanapan W, Luanratana O, Caichompoo W. (2000) ⁽⁵⁹⁾	เพื่อทดสอบคุณสมบัติต้านเชื้อราชนิด dermatophyte ของเหง้าขมิ้น ที่กลั่นด้วยน้ำร้อน และกลั่นด้วยไอน้ำ (น้ำมันหอมระเหย)	ทำการทดสอบคุณสมบัติต้านเชื้อราของสารสกัด crude curcuminoid และยา Ketoconazole ด้วยวิธี disc diffusion method	ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางพื้นที่ใสรอบ disc ยา บนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อดูคุณสมบัติการต้านเชื้อราของสารสกัด crude curcuminoid และ Ketoconazole	พบว่า 1. Turmeric essential oil มีคุณสมบัติต้านเชื้อราได้คล้ายคลึงกับ Ketoconazole 200 mg/ml 2. ความเข้มข้นของ Turmeric essential oil ใน freshly distilled และน้ำมันหอมระเหยอายุ 18 เดือน ปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการ

				เจริญของเชื้อราชนิด dermatophyte ได้มีค่าเท่ากับ 7.8 และ 7.2 mg/ml ตามลำดับ
Moghadamto usi SZ และ คณะ (2014) ⁽⁵³⁾	เพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติ Antibacterial, Antiviral และ Antifungal ของสาร Curcumin	Review Article เกี่ยวกับคุณสมบัติ Antibacterial, Antiviral และ Antifungal ของสาร Curcumin	วิเคราะห์และวิจารณ์ผลการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติ Antibacterial, Antiviral และ Antifungal ของสาร Curcumin	พบว่า 1. สาร curcumin มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อราทั้งชนิด Yeast, DMP 2. น้ำมันระเหยจากขมิ้นชัน (Turmeric essential oil) มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราดำชนิด <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Exophiala jeanselmei</i> , <i>F.pedrosoi</i> , และ <i>Scedosporium apiospermum</i> โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 114.9, 459.6, 459.6, และ 114.9 µg/mL ตามลำดับ 3. สาร curcumin มีคุณสมบัติเสริมฤทธิ์ (synergistic activity) กับยาที่ใช้รักษาเชื้อราประเภท azole ทั้งหมด 5 ชนิด ประกอบด้วย voriconazole, itraconazole, ketoconazole, miconazole, fluconazole และประเภท polyene ทั้งหมด 2 ชนิด amphotericin B, และ nystatin ซึ่งสามารถช่วยลดความเข้มข้นของยา (MIC) ที่ใช้รักษาเชื้อรา

Kusumawati I และคณะ (2018) ⁽²⁰⁾	เพื่อศึกษาคุณสมบัติ antiaging ของ น้ำมันที่ใช้ในสูตร บำรุงผิวแบบดั้งเดิม	แสดงคุณสมบัติ antiaging ของสาร curcuminoid โดยใช้การทดสอบ tyrosinase inhibitor และ collagenase inhibitor.	วัดความเข้มข้นของสาร curcuminoid ที่สามารถยับยั้ง เอนไซม์ tyrosinase และ เอนไซม์ collagenase ได้ 50% (IC50)	พบว่า 1. สาร curcuminoid มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase และเอนไซม์ collagenase ได้ 50% (IC50) ที่ความเข้มข้น 59.65 ± 1.19 µg/mL และ 140.33 ± 2.01 µg/mL ตามลำดับ
Park SY, Jin ML, Kim YH, Kim Y, Lee SJ. (2011) ⁽⁶⁰⁾	เพื่อแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติการยับยั้งการสร้างเมลานิน (anti-melanogenic) ของสาร ar-turmerone ใน melanoma cells	แสดงการยับยั้งการสร้างเมลานิน (anti-melanogenic) ของสาร ar-turmerone ใน melanoma cells	วัดการยับยั้งการ แสดงออกของ โปรตีนที่มีหน้าที่สำคัญใน กระบวนการสร้างเมลานิน	พบว่า 1. ar-turmerone สามารถยับยั้งการ แสดงออกของ เอนไซม์ tyrosinase ใน melanoma cells ซึ่งทำให้มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างเมลานิน 2. ar-turmerone มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างเมลานิน มากกว่าสาร curcumin
Biswas R และคณะ (2016) ⁽⁶¹⁾	เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารเตรียมสูตร อุบัน (เครื่องสำอางดั้งเดิมของอินเดีย) ด้วยการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี และศึกษาคุณสมบัติ antioxidant, sun protection factor (SPF) และ anti-tyrosinase	ทำการทดสอบสูตร อุบัน 4 สูตร (UF1 ถึง UF4) ด้านเคมีกายภาพ และทดสอบคุณสมบัติ antioxidant, sun protection factor (SPF) และ anti-tyrosinase	วัดผลการด้านเคมีกายภาพ ประกอบด้วย PH การไหล และการคงสภาพและวัด antioxidant, sun protection factor (SPF) และ anti-tyrosinase	พบว่า 1. จากการวัด RP-HPLC สูตร อุบัน (UF1) ที่มีส่วนผสมของ curcumin และ ascorbic acid 1.6% และ 2.1% w/w พบว่ามีคุณสมบัติ anti-tyrosinase ที่สูงมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาเกี่ยวกับผลของการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องในเชื้อรา (Effects of Successive subculturing)

การเสื่อมสภาพของเชื้อราเป็นลักษณะทั่วไปที่พบในเชื้อราส่วนใหญ่ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำบนอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของยีนส์ที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะทางกายภาพที่แสดงให้เห็นภายนอกของเชื้อรา (phenotypic degeneration) และลดทอนศักยภาพของเชื้อในการก่อโรคให้น้อยลง (virulence attenuation) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำบนอาหารเลี้ยงเชื้อยังส่งผลต่อการสร้างเม็ดสี การเจริญ รูปร่าง การสร้างสปอร์ เปลี่ยนแปลงสารที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม การสร้างส่วนของเชื้อราที่มีความหลากหลาย (variant sectors) ⁽⁶²⁾ ดังการศึกษาของ Tao-Ho Chang และคณะในปี 2020 ที่พบว่า การเสื่อมสภาพของ *Fusarium oxysporum* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพืช (watermelon Fusarium wilt) ถูกกระตุ้นให้เกิดเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำอย่างต่อเนื่องจากสายราที่มีอายุมาก พบว่าอัตราการเปลี่ยนรูปร่างของเชื้อรา (Transformation rate) ที่ผ่านการ subculture ในครั้งที่ 10 มีค่าเท่ากับ 60% ซึ่งแตกต่างจากการ subculture ในครั้งที่ 1 ที่มีค่าเท่ากับ 10% อีกทั้งยังส่งผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อที่ลดลงซึ่งสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช (cell wall-degrading enzymes; cellulase, pectinase, and xylanase) พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่กลายเป็นพันธุ์จากการถูกเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำมีค่าเอนไซม์ cellulase และ xylanase เข้าใกล้ค่า 0 ค่าเอนไซม์ pectinase มีค่าลดลงเกือบ 4 เท่าของสายพันธุ์ดั้งเดิม และการแสดงออกของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับศักยภาพของเชื้อในการก่อโรคที่ลดลง อย่างมีนัยสำคัญ⁽⁶³⁾

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Study)

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

การศึกษาระยะที่ 1 : การศึกษา MIC ของเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM) ที่ก่อให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ สำหรับยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole

ประชากรกลุ่มเป้าหมาย (Target population) ประชากรเป้าหมาย (target population) ได้แก่ เชื้อราในกลุ่ม DMP และ NDM จากผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำกัน ตัวอย่างถูกเก็บไว้ในช่วงเดือน มกราคม พ.ศ. 2561 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2565 ประกอบด้วย เชื้อรา 17 ตัวอย่างจากผู้ป่วยโรค tinea corporis/cruris, 6 ตัวอย่างจากผู้ป่วยโรค tinea pedis, และ 27 ตัวอย่างจากผู้ป่วยโรค onychomycosis ที่มารับการรักษาที่สถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์

ประชากรกลุ่มตัวอย่าง (Sample population) เชื้อราในกลุ่ม DMP และ NDM clinical isolates

ขนาดกลุ่มตัวอย่าง (Sample size) ทดสอบเชื้อราในกลุ่ม DMP และ NDM clinical isolates จำนวนกลุ่มละ 25 ตัวอย่าง รวมทั้งหมดเป็น 50 ตัวอย่าง

การศึกษาระยะที่ 2 : ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการสร้างเมลานินและการต้านการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ต่อ Turmeric essential oil และยาปัจจุบันที่ใช้รักษา ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8

ประชากรกลุ่มเป้าหมาย (Target population) ประชากรเป้าหมาย (Target population) ได้แก่ เชื้อ *N. dimidiatum* (เชื้อที่มีการสร้างเมลานิน) จากผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำกัน ตัวอย่างถูกเก็บไว้ในช่วงเดือน มกราคม พ.ศ. 2561 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2565 ประกอบด้วย ได้มาจากผู้ป่วยโรค onychomycosis ที่มารับการรักษาที่สถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์

ประชากรกลุ่มตัวอย่าง (Sample population) เชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates (เชื้อที่มีการสร้างเมลานิน)

ขนาดกลุ่มตัวอย่าง (Sample size) ทดสอบเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates จำนวน 10 ตัวอย่าง ทำการ Subculture ตัวอย่างละ 5 ครั้ง รวมทั้งหมดเป็น 50 ตัวอย่าง

สถานที่ทำการวิจัย : งานราวิทยา สถาบันโรคผิวหนัง , ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ขั้นตอนก่อนการศึกษาทดลอง (การเตรียมตัวอย่าง)

ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนต่อไปนี้ (ผู้วิจัยเป็นผู้ทำการศึกษาเอง)

1. ขั้นตอนการเลือกกลุ่มตัวอย่าง
2. ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างขุยเล็บ
3. ขั้นตอนการเพาะเชื้อราจากขุยเล็บ
4. ขั้นตอนการวินิจฉัยชนิดของเชื้อด้วยวิธี ITS-PCR (Molecular technique)

ขั้นตอนการเลือกกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษาระยะที่ 1 : ใช้เชื้อราในกลุ่ม DMP และNDM จาก สถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ เพื่อนำมาใช้ในขั้นตอนการศึกษาทดลอง โดยเชื้อราจำนวน 50 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำกัน ตัวอย่างถูกเก็บไว้ในช่วงเดือน มกราคม พ.ศ. 2561 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2565 ประกอบด้วย เชื้อรา 17 ตัวอย่างจากผู้ป่วยโรค tinea corporis/cruris, 6 ตัวอย่างจากผู้ป่วยโรค tinea pedis, และ 27 ตัวอย่างจากผู้ป่วยโรค onychomycosis ที่มารับการรักษาที่สถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์

การศึกษาระยะที่ 2 : ใช้เชื้อราชนิด *N. dimidiatum* จาก สถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ เพื่อนำมาใช้ในขั้นตอนการศึกษาทดลอง โดยเชื้อราจำนวน 25 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำกัน ตัวอย่างถูกเก็บไว้ในช่วงเดือน มกราคม พ.ศ. 2561 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2565 ประกอบด้วย ได้มาจากผู้ป่วยโรค onychomycosis

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างขุยเล็บ

ทำความสะอาดบริเวณเล็บที่มีความผิดปกติด้วย 70% Ethanol จากนั้นขูดขุยเล็บด้วย Sterile surgical blade no.15 ให้ได้ปริมาณอย่างน้อย 10 mg จากนั้นทำการผสมขุยเล็บให้เข้ากันด้วย Cover slip ห่อขุยเล็บที่ใส่ไว้ในสไลด์แก้วประกบด้วยกระดาษห่อ Sterile เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อนำไปทำการเพาะเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนการเพาะเชื้อราจากขุยเล็บ

ทำการเพาะเชื้อ โดยนำขุยเล็บมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabourauds dextrose agar (SDA) with chloramphenicol and cycloheximide 1 ขวด และ ชนิด SDA with chloramphenicol 3 ขวดจากนั้น บ่มไว้ที่ 27 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และทำการสังเกตการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 4 วัน จนครบ 4 สัปดาห์ หากมีการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อทำการวินิจฉัยชนิดของเชื้อโดยทำการสังเกตลักษณะของโคโลนี (Macroscopic examination) และทำการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination) โดยผู้วิจัยใช้

เทคนิค Scotch tape preparation หรือ Tease slide technique ในการเตรียมและย้อมตัวอย่างเชื้อด้วย Lactophenol cotton blue และปิดด้วย Cover slip เพื่อดูลักษณะของสายราและ Conidia ที่สำคัญเพื่อระบุชนิดของเชื้อรา

ขั้นตอนการวินิจฉัยชนิดของเชื้อด้วยวิธี ITS-PCR (Molecular Technique)

ทำการสกัดดีเอ็นเอเชื้อราปริมาณ 2 mg ด้วยชุด kit (GenUp gDNA extraction kit) เก็บรักษา DNA ไว้ที่ -20°C จนกว่านำมาใช้ในกระบวนการ ITS1 PCR โดยปฏิกิริยา ITS1 Polymerase chain reaction (ITS1 PCR) ทำการตรวจหาเชื้อราด้วย ITS1 PCR ตามกระบวนการของ White และคณะ⁽⁶⁴⁾ โดยใช้ Universal primer ที่จำเพาะต่อ Fungal ITS1 region ที่ประกอบด้วย ITS-1 forward (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) และ ITS-2 reverse primer (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') นำ PCR product ไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ต่อไป จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปแยกใน 2% agarose gel ใน 0.5X Tris-borate-EDTA (TBE) ด้วยวิธี gel electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้น ย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium bromide (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) นาน 5 นาที หลังจากนั้น สังเกตภายใต้แสง Ultraviolet ด้วยเครื่อง Syngene G Box Gel documentation system (Syngene, Frederick, MD) และเปรียบเทียบขนาดของแถบ DNA กับ Low molecular weight DNA ladder (New England Biolabs, England) และนำ ITS1 DNA ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequence) (3500 Genetic analyzer, Applied Biosystemstm, USA) จากนั้น ทำการเปรียบเทียบ DNA sequence กับฐานข้อมูล GENBANK ด้วย BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และระบุชนิดเชื้อได้จากเชื้อราในฐานข้อมูลที่มี ITS1 DNA sequence คล้ายกันโดยมีค่า similarity ไม่น้อยกว่า 95%⁽⁶⁵⁾

ขั้นตอนการศึกษา

ประกอบด้วยการศึกษา 2 ระยะ ดังนี้

การศึกษาระยะที่ 1 CHULALONGKORN UNIVERSITY

การศึกษา MIC ของเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM) ที่ก่อให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ สำหรับยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนต่อไปนี้

ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM)

ทำการเลี้ยงเชื้อ DMP ประกอบไปด้วย *T. rubrum*, *T. mentagophyte*, *Trichophyton interdigitale*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosus* และ NDM ประกอบไปด้วย *N. dimidiatum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนมีอายุ 1 สัปดาห์ และทำการวินิจฉัยชนิดของเชื้อด้วยวิธี ITS-PCR เพื่อเตรียมเชื้อสำหรับนำไปทำการทดสอบการต้านเจริญของเชื้อ DMP และ NDM โดยการหาค่า MIC และ MFC สำหรับยา

Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole โดย 1 เชื้อจะทำการทดสอบ 3 ครั้ง

ขั้นตอนทดสอบการต้านเจริญของเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM) โดยการหาค่า MIC สำหรับยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole ตามมาตรฐาน CLSI M-38A

1. เตรียมเชื้อที่ต้องการทำการทดสอบ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อระหว่าง 4×10^4 ถึง 5×10^4 CFU/ml⁽⁶⁶⁾
2. เตรียมความเข้มข้นของยา ในหลุม microtiter plate โดยยา Amphotericin B, Ketoconazole ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.03 ถึง 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ยา Itraconazole และ Terbinafine HCL ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.001 ถึง 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ยา Griseofulvin ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.125 ถึง 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$)
3. ทำการเติมเชื้อราที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ลงไป microtiter plate ในปริมาตร 100 μl
4. นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. ทำการสังเกตการเจริญของเชื้อโดยการสังเกตความขุ่นเทียบกับหลุมควบคุม (Growth control) อ่านค่าจุดสุดท้ายที่ยับยั้งการเจริญที่ MIC ที่ยับยั้งเชื้อได้ 100%
6. ทำการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MFC) ด้วยการนำตัวอย่างจากหลุมที่ไม่มี การเจริญของเชื้อทุกหลุมมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด potato dextrose agar (PDA) จากนั้นทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 7 วัน และอ่านผลที่ความเข้มข้นของยาน้อยที่สุดที่ไม่มีเชื้อเจริญ
7. ทำการควบคุมคุณภาพ โดยใช้เชื้อ *A. fumigatus* ATCC MYA-3626, *T. interdigitale* ATCC MYA-4439, *C. Krusei* ATCC 6258 เป็นเชื้ออ้างอิง (Reference isolate)

การศึกษาระยะที่ 2

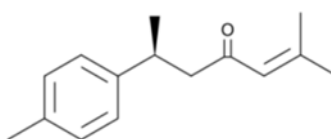
ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการสร้างเมลานินของเชื้อที่ได้รับ Subculture ครั้งที่ 0 และการต้านการเจริญของเชื้อที่ได้รับ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ต่อเชื้อ *N. dimidiatum* ที่สัมผัสกับ Turmeric essential oil และยา Itraconazole ประกอบด้วยขั้นตอนต่อไปนี้

ขั้นตอนการเตรียม Turmeric essential oil (Commercial Use) และการควบคุม

คุณภาพ (ผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด)

น้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน (Commercial Use) ได้มาจากการสกัดด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation) จากรากของขมิ้นชัน 100% ปลูกที่จังหวัดกาญจนบุรี และ จังหวัดตาก

ลักษณะเป็นของเหลวใส มีสีเหลืองไปจนถึงสีเหลืองมะนาว กลุ่มสารหลักที่พบในน้ำมันระเหยเข้มข้น ประกอบไปด้วยสารจำพวก ar-turmerone ต้องเก็บในที่แห้ง ไม่โดนแสง อุณหภูมิระหว่าง 20-25 องศาเซลเซียส และปิดภาชนะให้แน่น จะมีอายุการเก็บรักษา (Shelf life) 24 เดือนหลังจากวันผลิต ซึ่งจะมีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยเข้มข้นด้วยเทคนิควิเคราะห์ High Performance Liquid Chromatography/Gas Chromatography (HPLC/GC) เพื่อให้สัดส่วนสารประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการศึกษาไม่มีความแตกต่างกัน โดย 100% Turmeric essential oil มีปริมาณ turmerone เท่ากับ 42.7% (Lot number. ES190001)



สารประกอบหลัก : ar-turmerone

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงและ Subculture เชื้อ *N. dimidiatum*

ทำการเลี้ยงเชื้อ *N. dimidiatum* ซึ่งได้รับการวินิจฉัยชนิดของเชื้อด้วยวิธี ITS-PCR บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDA ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนมีอายุ 1 สัปดาห์ จากนั้นนำเชื้อดังกล่าวมาทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร (Subculture) จนได้เชื้อจากการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 เพื่อเตรียมเป็นเชื้อสำหรับนำไปทำการทดสอบคุณสมบัติน้ำมันระเหยเข้มข้นต่อการต้านการเจริญของเชื้อและการสร้างเมลานินต่อไป

ขั้นตอนทดสอบการต้านการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum*

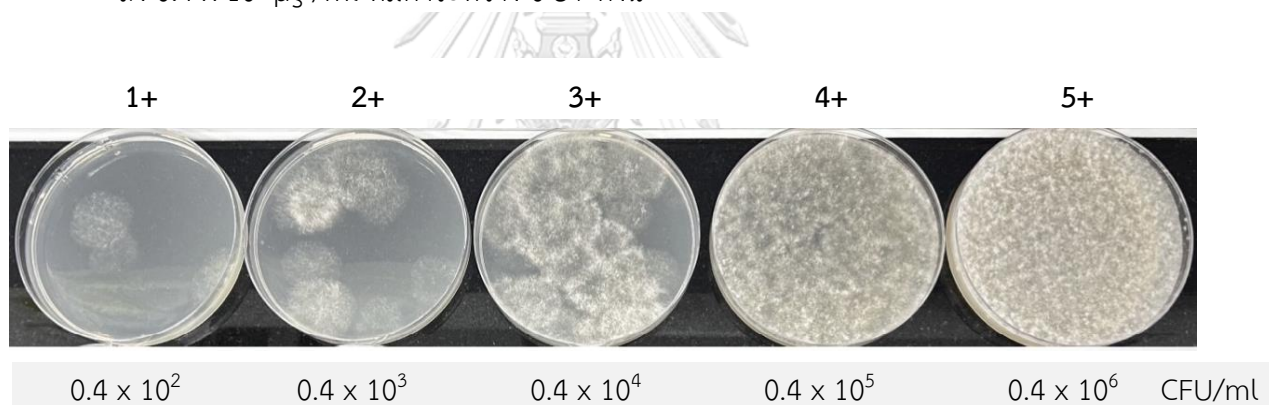
โดยการหาเปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหยเข้มข้นที่มีผลต่อการต้านการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้น Muller Hinton agar (MHA) ที่ผสมกับ Turmeric essential oil ที่มีความเข้มข้น 2, 3, 4, 5, 10 และ 20% และทำการทดสอบการต้านการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อยา Itraconazole ด้วยวิธี Agar well Diffusion⁽⁶⁶⁾

ขั้นตอนการศึกษาเปอร์เซ็นต์ Turmeric essential oil และการยับยั้งการเจริญต่อยา Itraconazole ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8

ทำการทดสอบคุณสมบัติการต้านเชื้อราของ Turmeric essential oil โดยการหาเปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหยเข้มข้นที่มีผลต่อการต้านการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* ที่

ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนอาหารรุ้น MHA ที่ผสมกับ Turmeric essential oil ที่มีความเข้มข้น โดย 1 เชื้อจะทำการทดสอบ 3 ครั้ง ดังนี้

1. เตรียมเชื้อในส่วน conidia ให้มีความเข้มข้นของเชื้อ 0.4×10^6 ถึง 5×10^6 CFU/ml
2. เตรียมเปอร์เซ็นต์ Turmeric essential oil ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2, 3, 4, 5, 10 และ 20%
3. ทำการเติมเชื้อราที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ด้วยการ ใช้ Sterile swab ลงเชื้อในงานด้วยการ Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 0, 2, 3, 4, 5, 10, 20% Turmeric essential oil MHA
4. ทำการควบคุมคุณภาพด้วยการเลี้ยงเชื้อบน 20% Turmeric essential oil MHA เป็น Negative control และใช้ MHA เป็น Positive control
5. นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
6. ทำการสังเกตการณ์เจริญของเชื้อที่ระยะเวลา 7 วัน โดยการสังเกตเทียบกับ Grading Criteria ที่ได้จากการเตรียมปริมาณเชื้อ *N. dimidiatum* ให้อยู่ระหว่างค่า 0.4×10^2 ถึง 0.4×10^6 $\mu\text{g/ml}$ ที่มีค่าระหว่าง 0-5+ ดังนี้



CHULALONGKORN UNIVERSITY

การทดสอบคุณสมบัติการต้านเชื้อ ติดเชื้อ *N. dimidiatum* ในปัจจุบันด้วยการหาค่า inhibition zone ด้วยวิธี Agar well Diffusion ⁽⁶⁶⁾ ดังนี้

1. เตรียมเชื้อในส่วน conidia ให้มีความเข้มข้นของเชื้อ 10^6 CFU/ml
2. ทำการเติมเชื้อราที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ด้วยการ ใช้ Sterile swab ลงเชื้อในงานด้วยการ Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA และเจาะรูขนาด 8 mm จำนวน 4 หลุม ต่อ 1 จาน
3. เตรียมยา Itraconazole ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 8, 16, 32 $\mu\text{g/ml}$ และ 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ และใส่ในหลุมปริมาตร 100 μL
4. นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. ทำการสังเกตการณ์เจริญของเชื้อโดยการวัดขนาด Inhibition zone (mm)

6. ทำการควบคุมคุณภาพ โดยใช้เชื้อ *A. fumigatus* ATCC MYA-3626 เป็นเชื้อควบคุมคุณภาพ

ขั้นตอนทดสอบการยับยั้งการสร้างเมลานิน (Anti-melanogenesis) ในเชื้อ

***N. dimidiatum* ที่ได้รับการสัมผัส Turmeric essential oil และ Itraconazole**

นำ *N. dimidiatum* ในส่วน hyphae และ arthroconidia ที่เจริญในขั้นตอนทดสอบการต้านเจริญของเชื้อที่สัมผัส 0, 4, 10 % Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole มาทำการทดสอบหาปริมาณเมลานิน ดังนี้

วิธี Melanin-specific MAb 8D6 Immunofluorescence :IF เพื่อหาปริมาณของเมลานิน (ปรับจาก Chongkae S et al,2019)⁽⁶⁷⁾ ดังนี้

เตรียม Slide culture ของเชื้อ *N. dimidiatum* ที่สัมผัส 0, 4, 10 % Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 0, 4, 10% Turmeric essential oil MHA และ MHA ตามลำดับ ให้มีอายุ 14 วัน จากนั้นนำมาล้างด้วย 95% ethanol เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยการล้างด้วย PBS 3 รอบ จากนั้นทำการย่อยผนังเซลล์ด้วยการเติม Novozymes (cell wall-lysing enzymes from *Trichoderma harzianum*; Sigma-Aldrich) ที่มีความเข้มข้น 10 mg/ml ที่มีส่วนผสมของ 1.0 M sorbitol และ 0.1 M sodium citrate (pH 5.5) ลงบนสไลด์และทำการบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วยการล้างด้วย PBS 3 รอบ จากนั้นย้อมด้วย 20 µg /ml MAb 8D6 บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยการล้างด้วย PBS 3 รอบ และย้อมด้วย 1:500 dilution of Alexa Fluor-488-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin M (IgM) antibody (Molecular Probes) ตามด้วยการล้างด้วย PBS 3 รอบ จากนั้นหยด PBS และปิดด้วย Coverslips นำสไลด์ที่ย้อมเสร็จไปวัดปริมาณ Fluorescence intensity (IF) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ Nikon ECLIPSE 50 I โดย 1 เชื้อจะทำการวัด IF จำนวน 10 ครั้งโดยการสุ่มวัด ทำการควบคุมคุณภาพโดยใช้เชื้อ *N. dimidiatum* เป็น reference control และใช้เชื้อ *N. hyalinum* เป็น Negative control

ตัวแปรในการวิจัย

- **ตัวแปรต้น (Independent variable) ได้แก่**

การศึกษาระยะที่ 1 : เชื้อ Dermatophytes และ Non-dermatophytes clinical isolates

การศึกษาระยะที่ 2 : เชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates

- **ตัวแปรตาม (Dependent variable)**

การศึกษาระยะที่ 1 : ค่า MIC ของยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole

การศึกษาระยะที่ 2 : ค่าเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยเข้มข้น และความเข้มข้นของ Itraconazole ที่ส่งผลต่อการต้านการเจริญและปริมาณเมลานินของเชื้อราที่สัมผัส 0, 4%, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg/100 µL Itraconazole

การรวบรวมข้อมูล และการวิเคราะห์ข้อมูล (Data Collection and Data Analysis)

1. วิเคราะห์ผลค่า MIC และ MFC ด้วยสถิติ Descriptive Statistics รายงานผลในรูปของ Range และ Mode
2. วิเคราะห์ผลการเจริญของเชื้อและผลการสร้างเมลานิน: โดยคำนวณปริมาณการเจริญของเชื้อ และปริมาณเมลานิน ด้วยสถิติ Descriptive Statistics รายงานผลในรูปของ Mean และ SD และทำการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ Turmeric essential oil โดยการหาผลต่างของปริมาณของเชื้อตั้งต้นและปริมาณเชื้อหลังจากเพาะเชื้อ 7 วัน นำมาหารด้วยปริมาณของเชื้อตั้งต้นและคูณด้วย 100
3. วิเคราะห์เปรียบเทียบค่าการเจริญของเชื้อรา และผลของการสร้างเมลานินของเชื้อที่สัมผัส น้ำมันหอมระเหยหรือ Itraconazole (Treated) กับเชื้อที่ไม่ได้สัมผัสน้ำมันหอมระเหยหรือ Itraconazole (Untreated) ด้วยสถิติ Inferential Statistics โดยใช้สถิติ paired t-test
4. วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและปริมาณเมลานินของเชื้อที่สัมผัสกับน้ำมันหอมระเหยหรือ Itraconazole ด้วยสถิติ Inferential Statistics โดยใช้สถิติ Spearman sign rank test

บทที่ 4 ผลการศึกษา

การศึกษาระยะที่ 1

: ผลการศึกษา MIC ของเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM) ที่ก่อให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ สำหรับยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole (ตอบวัตถุประสงค์เฉพาะข้อที่ 1)

ผลการศึกษา MIC และ ของเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM) ที่ก่อให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ สำหรับยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole (ตอบวัตถุประสงค์เฉพาะข้อที่ 1)

ตารางที่ 2 ผลการศึกษา Minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Amphotericin B (AMP B), Ketoconazole (KCZ), Itraconazole (ITR), Terbinafine HCL (TER) และ Griseofulvin (GF) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes จำนวน 25 isolates

Dermatophytes (n=25)	AMP B (µg/ml)		ITR (µg/ml)		KCZ (µg/ml)		TER (µg/ml)		GF (µg/ml)	
	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%
<i>T. interdigitale 01</i>	4	4	0.125	4	0.25	16	16	>16	1	8
<i>T. interdigitale 02</i>	0.25	1	0.5	8	2	4	0.015	0.03	2	2
<i>T. interdigitale 03</i>	2	2	1	8	1	8	0.25	0.25	4	4
<i>T. interdigitale 04</i>	2	2	1	2	1	>16	0.015	0.015	2	2
<i>T. interdigitale 05</i>	1	1	0.5	1	0.5	0.5	0.12	0.12	2	2
<i>T. mentagrophytes 01</i>	1	4	0.5	2	1	16	0.125	0.25	4	16
<i>T. mentagrophytes 02</i>	2	4	0.5	4	1	4	0.5	0.5	4	8

ตารางที่ 2 (ต่อ) ผลการศึกษา Minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Amphotericin B (AMP B), Ketoconazole (KCZ), Itraconazole (ITR), Terbinafine HCL (TER) และ Griseofulvin (GF) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes จำนวน 25 isolates

Dermatophytes (n=25)	AMP B (µg/ml)		ITR (µg/ml)		KCZ (µg/ml)		TER (µg/ml)		GF (µg/ml)	
	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%
<i>T. mentagrophytes 03</i>	4	4	0.5	8	0.06	16	0.0313	8	2	2
<i>T. mentagrophytes 04</i>	4	4	4	4	4	>16	0.0625	8	4	8
<i>T. mentagrophytes 05</i>	0.5	0.5	0.25	0.25	0.06	0.06	2	2	2	2
<i>T. mentagrophytes 06</i>	1	1	0.125	0.125	0.5	0.5	0.125	0.125	0.25	0.25
<i>T. mentagrophytes 07</i>	1	1	0.25	0.25	1	1	0.125	0.125	4	4
<i>T. mentagrophytes 08</i>	0.5	0.5	0.06	0.06	0.25	0.25	0.12	0.12	4	4
<i>T. mentagrophytes 09</i>	0.5	0.5	0.01	0.01	0.5	0.5	0.03	0.06	0.12	1
<i>T. mentagrophytes 10</i>	1	1	0.25	0.25	1	2	16	16	2	2
<i>T. mentagrophytes 11</i>	0.5	0.5	0.12	0.12	0.5	0.5	16	16	8	8
<i>T. mentagrophytes 12</i>	0.5	0.5	0.007	2	0.03	1	0.03	0.06	0.06	0.06
<i>T. rubrum 01</i>	2	2	1	2	8	16	0.06	0.06	2	2
<i>T. rubrum 02</i>	0.5	0.5	0.25	1	0.12	>16	0.01	0.01	0.25	0.5
<i>T. rubrum 03</i>	1	1	0.125	0.125	0.5	0.5	0.01	0.01	2	2
<i>T. rubrum 04</i>	1	1	1	1	1	1	0.01	0.01	2	2
<i>T. rubrum 05</i>	1	1	0.5	0.5	0.5	16	0.01	0.01	2	2
<i>T. rubrum 06</i>	1	1	0.5	1	0.5	8	0.01	0.01	2	2
<i>M. canis 01</i>	4	4	0.5	0.5	4	4	0.06	0.06	2	2
<i>E. floccosum 01</i>	1	1	0.125	0.125	0.0625	0.0625	0.03	0.03	1	1

สถิติ Mode; $\mu\text{g/ml}$: micrograms per milliliters

ผลการศึกษา MIC สำหรับยา AMP B, KCZ, ITR, TER และGF ในเชื้อราชนิด DMP จำนวนชนิดละ 25 ตัวอย่างจากผู้ป่วย ณ สถาบันโรคผิวหนัง ประเทศไทย พบว่าเชื้อในกลุ่ม DMP ให้ผลช่วง MIC ของ ยา AMP B, KCZ, ITR, TER และGF เท่ากับ 0.25-4, 0.03-8, 0.007-4, 0.015-16 และ 0.06-8 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และเชื้อในกลุ่ม NDM ให้ผลช่วง MIC ของ ยา AMP B, KCZ, ITR, TER และGF เท่ากับ 0.03->16, 0.125->16, 0.25->16, 0.03->16 และ16->64 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเชื้อในกลุ่ม NDM ให้ผลช่วง MIC ของ ยา AMP B, KCZ, ITR, TER และGF มากกว่ากลุ่ม DMP

ผลการศึกษา MFC สำหรับยา AMP B, KCZ, ITR, TER และGF ในเชื้อราชนิด DMP จำนวนชนิดละ 25 ตัวอย่างจากผู้ป่วย ณ สถาบันโรคผิวหนัง ประเทศไทย พบว่าเชื้อในกลุ่ม DMP ให้ผลช่วง MFC ของ ยา AMP B, KCZ, ITR, TER และGF เท่ากับ 0.5-4, 0.03->16, 0.015-8, 0.015->16 และ0.06-16 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และเชื้อในกลุ่ม NDM ให้ผลช่วง MFC ของ ยา AMP B, KCZ, ITR, TER และGF เท่ากับ 0.03->16, 0.125->16, 0.25->16, 0.03->16 และ16->64 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเชื้อในกลุ่ม NDM ให้ผลช่วง MFC ของ ยา AMP B, KCZ, ITR, TER และGF มากกว่ากลุ่ม DMP

ตารางที่ 3 ผลการศึกษา Minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Amphotericin B (AMP B), Ketoconazole (KCZ), Itraconazole (ITR), Terbinafine HCL (TER) และ Griseofulvin (GF) ในเชื้อราชนิด Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 25 isolates

Non-dermatophytes (n=25)	AMP B ($\mu\text{g/ml}$)		ITR ($\mu\text{g/ml}$)		KCZ ($\mu\text{g/ml}$)		TER ($\mu\text{g/ml}$)		GF ($\mu\text{g/ml}$)	
	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%
<i>N. dimidiatum 01</i>	8	8	>16	>16	>16	>16	0.5	8	>64	>64
<i>N. dimidiatum 02</i>	0.5	4	>16	>16	>16	>16	0.5	4	>64	>64
<i>N. dimidiatum 03</i>	4	4	>16	>16	>16	>16	1	1	>64	>64
<i>N. dimidiatum 04</i>	1	1	>16	>16	>16	>16	2	1	>64	>64
<i>N. dimidiatum 05</i>	0.12	8	>16	>16	>16	>16	0.5	2	>64	>64
<i>N. dimidiatum 06</i>	4	8	>16	>16	>16	>16	4	4	>64	>64
<i>N. dimidiatum 07</i>	0.25	0.5	>16	>16	>16	>16	1	2	>64	>64
<i>N. dimidiatum 08</i>	4	8	0.25	0.25	0.125	0.125	4	4	>64	>64
<i>N. dimidiatum 09</i>	4	4	>16	>16	>16	>16	1	2	>64	>64
<i>N. dimidiatum 10</i>	>16	>16	>16	>16	>16	>16	0.25	2	>64	>64
<i>N. dimidiatum 11</i>	0.03	0.03	>16	>16	>16	>16	0.03	0.03	>64	>64
<i>N. dimidiatum 12</i>	4	4	>16	>16	>16	>16	1	1	>64	>64
<i>N. dimidiatum 13</i>	0.03	0.03	>16	>16	>16	>16	1	1	>64	>64
<i>N. dimidiatum 14</i>	0.125	0.25	>16	>16	>16	>16	2	4	>64	>64
<i>N. dimidiatum 15</i>	0.25	2	>16	>16	8	8	1	4	64	64
<i>N. dimidiatum 16</i>	2	4	>16	>16	>16	>16	2	4	>64	>64
<i>N. dimidiatum 17</i>	0.06	0.25	>16	>16	8	8	0.25	0.25	16	16
<i>N. dimidiatum 18</i>	2	2	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>64	>64

ตารางที่ 3 (ต่อ) ผลการศึกษา Minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Amphotericin B (AMP B), Ketoconazole (KCZ), Itraconazole (ITR), Terbinafine HCL (TER) และ Griseofulvin (GF) ในเชื้อราชนิด Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 25 isolates

Non-dermatophytes (n=25)	AMP B ($\mu\text{g/ml}$)		ITR ($\mu\text{g/ml}$)		KCZ ($\mu\text{g/ml}$)		TER ($\mu\text{g/ml}$)		GF ($\mu\text{g/ml}$)	
	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%	MIC 100%	MFC 100%
<i>N. dimidiatum</i> 19	2	2	>16	>16	>16	>16	0.25	0.25	>64	>64
<i>N. dimidiatum</i> 20	0.25	0.5	>16	>16	>16	>16	2	4	32	>64
<i>N. dimidiatum</i> 21	0.5	0.5	>16	>16	>16	>16	2	4	>64	>64
<i>N. dimidiatum</i> 22	0.5	1	>16	>16	>16	>16	2	4	>64	>64
<i>N. dimidiatum</i> 23	0.25	0.5	0.25	0.5	0.125	0.2	2	4	>64	>64
<i>N. dimidiatum</i> 24	0.25	0.5	0.25	0.5	0.125	0.2	2	4	>64	>64
<i>N. dimidiatum</i> 25	0.12	0.12	>16	>16	>16	>16	2	2	>64	>64

สถิติ Mode; $\mu\text{g/ml}$: micrograms per milliliters

ผลการศึกษา MFC สำหรับยา AMP B, KCZ, ITR, TER และ GF ในเชื้อราชนิด DMP จำนวนชนิดละ 25 ตัวอย่างจากผู้ป่วย ณ สถาบันโรคผิวหนัง ประเทศไทย พบว่าเชื้อในกลุ่ม DMP ให้ผลช่วง MFC ของ ยา AMP B, KCZ, ITR, TER และ GF เท่ากับ 0.5-4, 0.03->16, 0.015-8, 0.015->16 และ 0.06-16 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และเชื้อในกลุ่ม NDM ให้ผลช่วง MFC ของ ยา AMP B, KCZ, ITR, TER และ GF เท่ากับ 0.03->16, 0.125->16, 0.25->16, 0.03->16 และ 16->64 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเชื้อในกลุ่ม NDM ให้ผลช่วง MFC ของ ยา AMP B, KCZ, ITR, TER และ GF มากกว่ากลุ่ม DMP

ตารางที่ 4 ผลการควบคุมคุณภาพ Amphotericin B (AMP B), Ketoconazole (KCZ), Itraconazole (ITR), Terbinafine HCL (TER) และ Griseofulvin (GF) ด้วยวิธีควบคุมคุณภาพตามมาตรฐาน CLSI M 61

Reference Strain	Antifungal	CLSI M 61	MIC Reference (µg/ml)											
			MIC Range (µg/ml)											
<i>T. interdigitale</i> ATCC MYA-4439	Griseofulvin	0.12 - 0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
			<i>T. interdigitale</i> ATCC MYA-4439	Terbinafine HCL	0.002 - 0.008	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	Ketoconazole	0.125 - 1	0.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
			<i>A. fumigatus</i> ATCC MYA-3626	Amphotericin B	0.5 - 4	1	2	2	1	4	1	2	4	4
<i>A. fumigatus</i> ATCC MYA-3626	Itraconazole	0.25 - 2	0.25	0.5	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.25	

สถิติ Mode; µg/ml: micrograms per milliliters

ผลการควบคุมคุณภาพยา AMP B, KCZ, ITR, TER และGF ด้วยเชื้อควบคุมคุณภาพตามมาตรฐาน CLSI M 61 ประกอบด้วยเชื้อ *A. fumigatus* ATCC MYA-3626 ให้ผล MIC ยา AMP B ในช่วง 0.5 – 4 µg/ml และยา ITR ให้ผล MIC ในช่วง 0.25 – 2 µg/ml, เชื้อ *C. krusei* ATCC 6258 ให้ผล MIC ยา KCZ ในช่วง 0.125 – 1 µg/ml และเชื้อ *T. interdigitale* ATCC MYA-4439 ให้ผล MIC ยา TER ในช่วง 0.002 – 0.008 µg/ml และยา GF ให้ผล MIC ในช่วง 0.12 – 0.5 µg/ml ซึ่งพบว่ายาทุกชนิดให้ค่าในช่วงที่มาตรฐานกำหนดทั้งหมด (ตารางที่ 4)



ตารางที่ 5 ผลการศึกษากระจายตัวของค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) สำหรับยา Amphotericin B (AMP B) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates

Amphotericin B (n=50)	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)													
		0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16			
Dermatophytes (n=25)	0.25-4				1	6	11	4	3						
<i>T. interdigitale</i> (n=5)	0.25-4				1		1	2	1						
<i>T. mentagrophytes</i> (n=12)	0.5-4					5	4	1	2						
<i>T. rubrum</i> (n=6)	0.5-2					1	4	1							
<i>E. floccosum</i> (n=1)	1								1						
<i>M. canis</i> (n=1)	1														1
Non-dermatophytes (n=25)	0.003->16	2	1	3	5	3	1	3	5	1	1				
<i>N. dimidiatum</i> (n=25)	0.003->16	2	1	3	5	3	1	3	5	1	1				

สถิติ Mode; $\mu\text{g/ml}$: micrograms per milliliters

ตารางที่ 6 ผลการศึกษากระจายตัวของค่า Minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Amphotericin B (AMP B) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes (µg/ml) จำนวน 50 isolates

Amphotericin B (n=50)	MFC range (µg/ml)	MIC (µg/ml)														
		0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16				
Dermatophytes (n=25)	0.5-4				6	10	3	5								
<i>T. interdigitale</i> (n=5)	1-4						2	2	1							
<i>T. mentagrophytes</i> (n=12)	0.5-4				5	3	4									
<i>T. rubrum</i> (n=6)	0.5-2				1	4	1									
<i>E. floccosum</i> (n=1)	1						1									
<i>M. canis</i> (n=1)	4														1	
Non-dermatophytes (n=25)	0.003->16	2	1	3	5	3	1	3	5	1	1					
<i>N. dimidiatum</i> (n=25)	0.003->16	2	1	3	5	3	1	3	5	1	1					

สถิติ Mode; µg/ml: micrograms per milliliters

ค่า MIC ของยา AMP B ในเชื้อกลุ่ม DMP มีช่วงอยู่ระหว่าง 0.25 - 4 $\mu\text{g/ml}$ โดยเชื้อ *T. interdigitale* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.25 - 4 $\mu\text{g/ml}$, *T. mentagrophytes* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.5 - 4 $\mu\text{g/ml}$ และ *T. rubrum* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.5 - 2 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MFC ของยา AMP B ในเชื้อกลุ่ม DMP มีค่าอยู่ระหว่าง 0.5 - 4 $\mu\text{g/ml}$ โดยเชื้อ *T. interdigitale* มีค่าอยู่ระหว่าง 1 - 4 $\mu\text{g/ml}$, *T. mentagrophytes* และ *T. rubrum* มีค่าเท่ากับค่า MIC สำหรับเชื้อในกลุ่ม NDM ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อ *N. dimidiatum* จำนวน 25 เชื้อ ให้ค่า MIC และ MFC สำหรับยา AMP B อยู่ระหว่าง 0.03 ถึง >16 $\mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ 5, 6) ซึ่งพบว่าเชื้อแต่ละชนิดในกลุ่ม DMP และ NDM ให้ช่วงค่า MIC และ MFC ที่ใกล้เคียงกัน และให้ Mode ของค่า MIC และ MFC ที่เท่ากัน ซึ่งสรุปได้ว่ายา AMP B สามารถฆ่าเชื้อในกลุ่ม DMP และ NDM ได้



ตารางที่ 7 ผลการศึกษาการกระจายตัวของค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) สำหรับยา Ketoconazole (KCZ) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates

Ketoconazole (n=50)	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)													
		0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16			
Dermatophytes (n=25)	0.125-8	1	3	1	2	4	6	1	2	1					
<i>T. interdigitale</i> (n=5)	0.25-2				1	1	2	1							
<i>T. mentagrophytes</i> (n=12)	0.03-4	1	2		1	3	4	1							
<i>T. rubrum</i> (n=6)	0.125-8			1	3	1									
<i>E. floccosum</i> (n=1)	0.06		1												
<i>M. canis</i> (n=1)	4									1					
Non-dermatophytes (n=25)	0.125->16			3					2		2				20
<i>N. dimidiatum</i> (n=25)	0.125->16			3							2				20

สถิติ Mode; $\mu\text{g/ml}$: micrograms per milliliters

ตารางที่ 8 ผลการศึกษากระจายตัวของค่า Minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Ketoconazole (KCZ) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes จำนวน 50 isolates

Ketoconazole (n=50)	MFC range (µg/ml)	MFC (µg/ml)									
		0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16
Dermatophytes (n=25)	0.03->16										
<i>T. interdigitale</i> (n=5)	0.03->16	1					1	1	1	1	1
<i>T. mentagrophytes</i> (n=12)	0.06->16		1		1	3	2	1	1	2	1
<i>T. rubrum</i> (n=6)	0.5->16				1	1	1			1	2
<i>E. floccosum</i> (n=1)	0.06		1								
<i>M. canis</i> (n=1)	4									1	
Non-dermatophytes (n=25)	0.125->16										
<i>N. dimidiatum</i> (n=25)	0.125->16			1	2			2		2	20
				1	2			2		2	20

สถิติ Mode; µg/ml: micrograms per milliliters

ค่า MIC ของยา KCZ ในเชื้อกลุ่ม DMP มีช่วงอยู่ระหว่าง 0.03 - 8 $\mu\text{g/ml}$ โดยเชื้อ *T. interdigitale* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.25 - 2 $\mu\text{g/ml}$, *T. mentagrophytes* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.03 - 4 $\mu\text{g/ml}$ และ *T. rubrum* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.125 - 8 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MFC ของยา AMP B ในเชื้อกลุ่ม DMP มีค่าอยู่ระหว่าง 0.03 - >16 $\mu\text{g/ml}$ โดยเชื้อ *T. interdigitale* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.03 - >16 $\mu\text{g/ml}$, *T. mentagrophytes* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.06 - >16 $\mu\text{g/ml}$ และ *T. rubrum* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.5 - >16 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับเชื้อในกลุ่ม NDM ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อ *N. dimidiatum* จำนวน 25 เชื้อ ให้ค่า MIC และ MFC สำหรับยา KCZ อยู่ระหว่าง 0.125 ถึง >16 $\mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ 7, 8) พบว่าเชื้อแต่ละชนิดในกลุ่ม DMP ให้ช่วงค่า MFC มากกว่าค่า MIC ในขณะที่เชื้อในกลุ่ม NDM ให้ช่วงค่า MIC เท่ากับ MFC ซึ่งเป็นค่าที่สูงมากกว่าในกลุ่ม DMP สรุปได้ว่ายา KCZ สามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่ม DMP และ NDM ได้ แต่ต้องใช้ความเข้มข้นของยาที่สูงมากในการฆ่าเชื้อราทั้งสองกลุ่ม



ตารางที่ 10 ผลการศึกษาการกระจายตัวของค่า Minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Itraconazole ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates

Itraconazole (n=50)	MFC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)														
		0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16			
Dermatophytes (n=25)	0.015-8	2		1	3	3	2	4	4	3	3					
<i>T. interdigitale</i> (n=5)	1-8							1	1	1	2					
<i>T. mentagrophytes</i> (n=12)	0.015-8	1		1	2	3		2	2	2	1					
<i>T. rubrum</i> (n=6)	0.125-2						1	1	3	1						
<i>E. floccosum</i> (n=1)	0.015	1														
<i>M. canis</i> (n=1)	0.5								1							
Non-dermatophytes (n=25)	0.25->16								1	2						
<i>N. dimidiatum</i> (n=25)	0.25->16								1	2						

สถิติ Mode: $\mu\text{g/ml}$: micrograms per milliliters

ค่า MIC ของยา ITR ในเชื้อกลุ่ม DMP มีช่วงอยู่ระหว่าง 0.007 - 4 $\mu\text{g/ml}$ โดยเชื้อ *T. interdigitale* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.125 - 1 $\mu\text{g/ml}$, *T. mentagrophytes* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.007 - 4 $\mu\text{g/ml}$ และ *T. rubrum* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.125 - 1 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MFC ของยา ITR มีค่าอยู่ระหว่าง 0.015 - 8 $\mu\text{g/ml}$ โดยเชื้อ *T. interdigitale* มีค่าอยู่ระหว่าง 1 - 8 $\mu\text{g/ml}$, *T. mentagrophytes* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.015 - 8 $\mu\text{g/ml}$ และ *T. rubrum* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.125 - 2 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับเชื้อในกลุ่ม NDM ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อ *N. dimidiatum* จำนวน 25 เชื้อ ให้ค่า MIC และ MFC สำหรับยา ITR อยู่ระหว่าง 0.125 ถึง >16 $\mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ 9, 10) ซึ่งพบว่า เชื้อแต่ละชนิดในกลุ่ม DMP ให้ช่วงค่า MFC มากกว่าค่า MIC เป็น 2 เท่า และเชื้อ *T. mentagrophytes* ให้ค่า MIC และ MFC มากที่สุดในกลุ่ม ในขณะที่เชื้อในกลุ่ม NDM ให้ช่วงค่า MIC เท่ากับ MFC ซึ่งเป็นค่าที่สูงมากกว่าในกลุ่ม DMP ซึ่งสรุปได้ว่ายา ITR สามารถยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อราในกลุ่ม DMP ได้ แต่เชื้อราในกลุ่ม NDM ต้องใช้ความเข้มข้นของยาที่สูงมากในการฆ่าเชื้อราในกลุ่มนี้



ตารางที่ 12 ผลการศึกษาระยะยาวของค่า Minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยา Terbinafine HCL (TER) ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates

Terbinafine HCL (n=50)	MFC range ($\mu\text{g/ml}$)	MFC ($\mu\text{g/ml}$)											
		0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16
Dermatophytes (n=25)		7	2	3	4	2	1	1	2	1	2	2	1
<i>T. interdigitale</i> (n=5)	0.015->16	1	1	1	1	1							1
<i>T. mentagrophytes</i> (n=12)	0.06-8		2	3	1	1	1	1	2	2			
<i>T. rubrum</i> (n=6)	0.015-0.06	5	1										
<i>E. floccosum</i> (n=1)	0.03	1											
<i>M. canis</i> (n=1)	0.015	1											
Non-dermatophytes (n=25)	0.03->16	1				2	5	5	11	1			1
<i>N. dimidiatum</i> (n=25)	0.03->16	1			2	4	5	11	1				1

สถิติ Mode; $\mu\text{g/ml}$: micrograms per milliliters

ค่า MIC ของยา TER ในเชื้อกลุ่ม DMP มีช่วงอยู่ระหว่าง 0.007 - 4 $\mu\text{g/ml}$ โดยเชื้อ *T. interdigitale* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.015 - 16 $\mu\text{g/ml}$ โดยเชื้อ *T. interdigitale* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.015 - 16 $\mu\text{g/ml}$, *T. mentagrophytes* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.03 - 16 $\mu\text{g/ml}$ และ *T. rubrum* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.015 - 0.06 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MFC ของยา TER ของเชื้อ *T. interdigitale* และ *T. rubrum* มีค่าเท่ากับ MIC, *T. mentagrophytes* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.06 - 8 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งพบว่าเชื้อแต่ละชนิดในกลุ่ม DMP ให้ช่วงค่า MIC และ MFC ที่ใกล้เคียงกัน และให้ Mode ของค่า MIC และ MFC ที่เท่ากัน คือเท่ากับ 0.015 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับเชื้อในกลุ่ม NDM ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อ *N. dimidiatum* จำนวน 25 เชื้อ ให้ค่า MIC และ MFC สำหรับยา TER อยู่ระหว่าง 0.03 ถึง >16 $\mu\text{g/ml}$ ให้ Mode ของค่า MIC และ MFC เท่ากับ 2 และ 4 $\mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ 11, 12) ซึ่งสรุปได้ว่ายา TER สามารถฆ่าเชื้อในกลุ่ม DMP ได้ ในขณะที่เชื้อในกลุ่ม NDM ต้องใช้ความเข้มข้นของยาในการฆ่าเชื้อเป็น 2 เท่าของค่า MIC



ตารางที่ 13 ผลการศึกษาระยะจ่ายตัวของค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) สำหรับยา Griseofulvin ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates

Griseofulvin (n=50)	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)												
		0.03	0.06	0.125	0.2	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64
Dermatophytes (n=25)	0.06-8	1	1	2	2	12	6	1						
<i>T. interdigitale</i> (n=5)	1-4				1	3	1							
<i>T. mentagrophytes</i> (n=12)	0.06-8	1	1	1	3	5	1							
<i>T. rubrum</i> (n=6)	0.25-2			1	5									
<i>E. floccosum</i> (n=1)	1					1								
<i>M. canis</i> (n=1)	2									1				
Non-dermatophytes (n=25)	16->64									1	1	23		
<i>N. dimidiatum</i> (n=25)	16->64									1	1	23		

สถิติ Mode; $\mu\text{g/ml}$: micrograms per milliliters

ตารางที่ 14 ผลการศึกษาการกระจายตัวของค่า Minimal fungicidal concentration (MFC) สำหรับยยา Griseofulvin ในเชื้อราชนิด Dermatophytes และ Non-dermatophytes ($\mu\text{g/ml}$) จำนวน 50 isolates

Griseofulvin (n=50)	MFC range ($\mu\text{g/ml}$)	MFC ($\mu\text{g/ml}$)													
		0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
Dermatophytes (n=25)	0.06-16	1		1	1	2	13	3	4	1					
<i>T. interdigitale</i> (n=5)	2-8					3	1	1							
<i>T. mentagrophytes</i> (n=12)	0.06-16	1		1		3	2	3	1						
<i>T. rubrum</i> (n=6)	0.5-2					1	5								
<i>E. floccosum</i> (n=1)	1					1									
<i>M. canis</i> (n=1)	2						2								
Non-dermatophytes(n=25)	16->64							1	1	1	1	1	24		
<i>N. dimidiatum</i> (n=25)	16->64									1	1	1	23		

สถิติ Mode; $\mu\text{g/ml}$: micrograms per milliliters

ค่า MIC ของยา GF ในเชื้อกลุ่ม DMP มีช่วงอยู่ระหว่าง 0.06 - 8 µg/ml โดยเชื้อ *T. interdigitale* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 1 - 4 µg/ml, *T. mentagrophytes* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.06 - 8 µg/ml และ *T. rubrum* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.25 - 2 µg/ml และค่า MFC ของยา GF ในเชื้อกลุ่ม DMP มีค่าอยู่ระหว่าง 0.06 - 16 µg/ml โดยเชื้อ *T. interdigitale* มีค่าอยู่ระหว่าง 2 - 8 µg/ml, *T. mentagrophytes* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.06 - 16 µg/ml และ *T. rubrum* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.5 - 2 µg/ml และให้ Mode ของค่า MIC และ MFC ที่เท่ากันเท่ากับ 2 µg/ml สำหรับเชื้อในกลุ่ม NDM ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อ *N. dimidiatum* จำนวน 25 เชื้อ ให้ค่า MIC และ MFC สำหรับยา GF อยู่ระหว่าง 16 - >64 µg/ml (ตารางที่ 13, 14) พบว่าเชื้อแต่ละชนิดในกลุ่ม DMP ให้ช่วงค่า MIC และ MFC ที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่เชื้อในกลุ่ม NDM ให้ช่วงค่า MIC เท่ากับ MFC ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าในกลุ่ม DMP ซึ่งสรุปได้ว่ายา GF สามารถฆ่าเชื้อในกลุ่ม DMP ได้ แต่เชื้อราในกลุ่ม NDM ต้องใช้ความเข้มข้นของยาที่สูงมากในการฆ่าเชื้อราในกลุ่มนี้

ตารางที่ 15 การแสดงผลพิสัยและฐานนิยมของค่า MIC และ MFC ของยา amphotericin B, ketoconazole, itraconazole, terbinafine HCL และ griseofulvin และการกระจายตัวของค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ต่อเชื้อรา 50 ตัวอย่างจากผู้ป่วย ณ สถาบันโรคผิวหนัง

Genus/species of fungus (n=50)	Antifungal Concentration (µg/mL)					
	AMP B	KCZ	ITR	TER	GF	
Dermatophytes (n=25)	MIC range	0.25-4	0.03-8	0.007-4	0.015-16	0.06-8
	MIC mode	1	0.5, 1	0.5	0.015	2
	MFC range	0.5-4	0.03->16	0.015-8	0.015->16	0.06-16
	MFC mode	1	16	1, 2	0.015	2
<i>T. interdigitale</i> (n=5)	MIC range	0.25-4	0.25-2	0.125-1	0.015-16	1-4
	MIC mode	2	1	0.5, 1	0.015	2
	MFC range	1-4	0.03->16	1-8	0.015->16	2-8
	MFC mode	1, 2	0.03, 4, 8, 16, >16	8	0.015, 0.03, 0.125, 0.25, >16	2

<i>T. mentagrophytes</i> (n=12)	MIC range	0.5-4	0.03-4	0.007-4	0.03-16	0.06-8
	MIC mode	0.5	1	0.25, 0.5	0.125	4
	MFC range	0.5-4	0.06->16	0.015-8	0.06-8	0.06-16
	MFC mode	0.5	0.5	0.25	0.125	2, 8
<i>T. rubrum</i> (n=6)	MIC range	0.5-2	0.125-8	0.125-1	0.015-0.06	0.25-2
	MIC mode	1	0.5	0.5, 1	0.015	2
	MFC range	0.5-2	0.5->16	0.125-2	0.015-0.06	0.5-2
	MFC mode	1	16	1	0.015	2
<i>E. floccosum</i> (n=1)	MIC range	1	0.06	0.125	0.03	1
	MIC mode	1	0.06	0.125	0.03	1
	MFC range	1	0.06	0.125	0.03	1
	MFC mode	1	0.06	0.125	0.03	1
<i>M. canis</i> (n=1)	MIC range	4	4	0.5	0.06	2
	MIC mode	4	4	0.5	0.06	2
	MFC range	4	4	0.5	0.06	2
	MFC mode	4	4	0.5	0.06	2
Non-dermatophytes (n=25)	MIC range	0.03->16	0.125->16	0.25->16	0.03->16	16->64
	MIC mode	0.25, 4	>16	>16	2	>64
	MFC range	0.03->16	0.125->16	0.25->16	0.03->16	16->64
	MFC mode	0.25, 4	>16	>16	4	>64
<i>N. dimidiatum</i> (n=25)	MIC range	0.03->16	0.125->16	0.25->16	0.03->16	16->64
	MIC mode	0.25, 4	>16	>16	2	>64
	MFC range	0.03->16	0.125->16	0.25->16	0.03->16	16->64
	MFC mode	0.25, 4	>16	>16	4	>64

สถิติ Mode: Amphotericin B (AMP B), Ketoconazole (KCZ), Itraconazole (ITR), Terbinafine HCL (TER), Griseofulvin (GF), µg/ml: micrograms per milliliters

ค่าฐานนิยมของค่า MIC และ MFC ของยา AMP B, KCZ, ITR, TER และ GF (ตารางที่ 15) แสดงให้เห็นว่า ยา terbinafine HCL ให้ค่า MIC และ MFC ในกลุ่ม DMP และ NDM น้อยที่สุด

การศึกษาระยะที่ 2

: ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการสร้างเมลานินของเชื้อที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0 และการต้านการเจริญของเชื้อที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ในเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ Turmeric essential oil และ Itraconazole

(ตอบวัตถุประสงค์เฉพาะข้อที่ 2-7)

ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 2, 3, 4, 5, 10 และ 20% Turmeric essential oil ที่เวลา 2 และ 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 (ตอบวัตถุประสงค์เฉพาะข้อที่ 2)

ตารางที่ 16 ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 2% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8

2% Turmeric essential oil	Growth at 7 days (CFU/ml)				
	Subculture ครั้งที่ 0	Subculture ครั้งที่ 1	Subculture ครั้งที่ 2	Subculture ครั้งที่ 4	Subculture ครั้งที่ 8
NDM 01	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^4$	$0.4 \times 10^2 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$
NDM 04	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^2 $\pm 2.08 \times 10^3$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^3$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$
NDM 07	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^4 $\pm 2.29 \times 10^4$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$
NDM 09	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^3$	0.4×10^5 $\pm 2.29 \times 10^5$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$
NDM 11	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$
NDM 21	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^3$
NDM 24	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^6 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^3$
NDM 27	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^4$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$
NDM 39	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	0.4×10^5 $\pm 2.08 \times 10^4$
NDM 40	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^6 \pm 0$	0.4×10^3	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^4

			$\pm 2.08 \times 10^3$		$\pm 2.08 \times 10^4$
Mean	0.4×10^5	0.4×10^5	0.4×10^4	0.4×10^4	0.4×10^5
	$\pm 1.74 \times 10^4$	$\pm 1.17 \times 10^5$	$\pm 1.23 \times 10^5$	$\pm 1.91 \times 10^4$	$\pm 1.86 \times 10^4$

สถิติ Mean \pm SD, CFU/ml: colony forming unit per milliliters

ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 2% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ซึ่งพบว่าการเจริญของเชื้อเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกันในทุกการ Subculture อยู่ระหว่าง 0.4×10^4 - 0.4×10^5 CFU/ml โดยเฉลี่ยในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 8 ให้ผลการเจริญเติบโต 0.4×10^5 CFU/ml และครั้งที่ 2, 4 ให้ผลการเจริญเติบโต 0.4×10^4 CFU/ml (ตารางที่ 16) โดยผลการเจริญของเชื้อจากการ Subculture ครั้งที่ 0 ไม่แตกต่างกับ Subculture ครั้งที่ 8 โดยค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตแต่ละ Strain ได้มาจากการวัด 3 ครั้ง ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 17 ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 3% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8

3% Turmeric essential oil	Growth at 7 days (CFU/ml)				
	Subculture ครั้งที่ 0	Subculture ครั้งที่ 1	Subculture ครั้งที่ 2	Subculture ครั้งที่ 4	Subculture ครั้งที่ 8
NDM 01	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	0.4×10^3 $\pm 2.31 \times 10^3$	$0.4 \times 10^2 \pm 0$	$0.4 \times 10^2 \pm 0$
NDM 04	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^2 $\pm 2.29 \times 10^3$	0.4×10^4 $\pm 2.31 \times 10^4$	0.4×10^4 $\pm 2.31 \times 10^4$
NDM 07	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^5 $\pm 2.08 \times 10^4$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$
NDM 09	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^6 \pm 0$	0.4×10^3 $\pm 2.29 \times 10^3$	0.4×10^4 $\pm 2.31 \times 10^4$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$
NDM 11	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^3$
NDM 21	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^3 $\pm 2.08 \times 10^3$
NDM 24	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^6 $\pm 2.08 \times 10^5$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^3$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$
NDM 27	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^4 $\pm 2.20 \times 10^4$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^3$

NDM 39	0.4×10^5	0.4×10^3	0.4×10^3	0.4×10^5	0.4×10^3
	$\pm 2.08 \times 10^4$	$\pm 2.31 \times 10^3$	$\pm 2.08 \times 10^2$	$\pm 2.08 \times 10^4$	$\pm 2.20 \times 10^3$
NDM 40	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^2	0.4×10^3	0.4×10^3
			$\pm 2.31 \times 10^1$	$\pm 2.08 \times 10^2$	$\pm 2.31 \times 10^3$
Mean	0.4×10^5	0.4×10^5	0.4×10^4	0.4×10^4	0.4×10^4
	$\pm 1.86 \times 10^4$	$\pm 1.18 \times 10^5$	$\pm 1.24 \times 10^5$	$\pm 1.98 \times 10^4$	$\pm 1.20 \times 10^4$

สถิติ Mean \pm SD, CFU/ml: colony forming unit per milliliters

ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 3% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน โดยเฉลี่ยในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ให้ผลการ Subculture ครั้งที่ 0, 1 ให้ผลการเจริญเติบโต 0.4×10^5 CFU/ml และครั้งที่ 2, 4, 8 ให้ผลการเจริญเติบโต 0.4×10^4 CFU/ml (ตารางที่ 17) ซึ่งพบว่าการเจริญของเชื้อเฉลี่ยในทุกการ Subculture ระหว่าง 0.4×10^4 - 0.4×10^5 CFU/ml โดยที่การ Subculture ครั้งที่ 0, 1 ให้ผลการเจริญที่มากกว่า การ Subculture ครั้งที่ 2, 4, 8 อย่างไม่มีโดยค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตแต่ละ Strain ได้มาจากการวัด 3 ครั้ง ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 18 ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8

4% Turmeric essential oil	Growth at 7 days (CFU/ml)				
	Subculture ครั้งที่ 0	Subculture ครั้งที่ 1	Subculture ครั้งที่ 2	Subculture ครั้งที่ 4	Subculture ครั้งที่ 8
NDM 01	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	0.4×10^2 $\pm 2.31 \times 10^2$	$0.4 \times 10^2 \pm 0$	0
NDM 04	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^2 \pm 0$	0.4×10^2 $\pm 2.20 \times 10^2$	0.4×10^5 $\pm 2.08 \times 10^4$
NDM 07	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^5 $\pm 2.08 \times 10^4$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^3$
NDM 09	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^6 \pm 0$	0.4×10^2 $\pm 0.23 \times 10^2$	0.4×10^3 $\pm 2.08 \times 10^3$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$
NDM 11	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^3 $\pm 2.08 \times 10^2$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$
NDM 21	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^3 \pm 0$
NDM 24	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^5 $\pm 2.08 \times 10^5$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^3$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$

NDM 27	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^4 $\pm 2.31 \times 10^4$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^4$	0.4×10^5 $\pm 2.31 \times 10^4$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$
NDM 39	0.4×10^5 $\pm 2.08 \times 10^4$	0.4×10^3 $\pm 2.29 \times 10^3$	$0.4 \times 10^2 \pm 0$	0.4×10^2 $\pm 2.31 \times 10^2$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$
NDM 40	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^2 \pm 0$	0.4×10^2 $\pm 2.31 \times 10^2$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^4$
Mean	0.4×10^5 $\pm 1.90 \times 10^4$	0.4×10^5 $\pm 1.19 \times 10^5$	0.4×10^3 $\pm 1.88 \times 10^4$	0.4×10^3 $\pm 1.65 \times 10^4$	0.4×10^4 $\pm 1.57 \times 10^4$

สถิติ Mean \pm SD, CFU/ml: colony forming unit per milliliters

ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน โดยเฉลี่ยในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ให้ผลการ Subculture ครั้งที่ 2, 4 ให้ผลการเจริญเติบโต 0.4×10^3 CFU/ml การ Subculture ครั้งที่ 8 ให้ผลการเจริญเติบโต 0.4×10^4 CFU/ml และการ Subculture ครั้งที่ 0, 1 ให้ผลการเจริญเติบโต 0.4×10^5 CFU/ml (ตารางที่ 18) ซึ่งพบว่ามีผลการเจริญของเชื้อเฉลี่ยทุกการ Subculture ระหว่าง 0.4×10^3 - 0.4×10^5 CFU/ml โดยผลการเจริญของเชื้อจากการ Subculture ครั้งที่ 0 ให้ผลการเจริญที่มากกว่า การ Subculture ครั้งที่ 8 อย่างไม่มีนัยสำคัญ โดยค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตแต่ละ Strain ได้มาจากการวัด 3 ครั้ง ซึ่งพบว่าค่าที่ได้สอดคล้องกัน

ตารางที่ 19 ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 5% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8

5% Turmeric essential oil	Growth at 7 days (CFU/ml)				
	Subculture ครั้งที่ 0	Subculture ครั้งที่ 1	Subculture ครั้งที่ 2	Subculture ครั้งที่ 4	Subculture ครั้งที่ 8
NDM 01	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	0 $\pm 0.23 \times 10^2$	$0.4 \times 10^2 \pm 0$	0
NDM 04	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^3 \pm 0$	$0.4 \times 10^3 \pm 0$	0	0.4×10^2 $\pm 0.23 \times 10^2$
NDM 07	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	0 $\pm 0.23 \times 10^2$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^2 $\pm 0.23 \times 10^2$
NDM 09	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0 $\pm 0.23 \times 10^2$	0	0	$0.4 \times 10^5 \pm 0$
NDM 11	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^3$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^3 $\pm 2.08 \times 10^3$	0.4×10^2 $\pm 2.08 \times 10^2$

NDM 21	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^3$	$0.4 \times 10^3 \pm 0$	0	0.4×10^3 $\pm 2.08 \times 10^3$
NDM 24	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^2 $\pm 0.23 \times 10^2$
NDM 27	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0.4×10^3 $\pm 2.29 \times 10^3$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^4$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$
NDM 39	0.4×10^3 $\pm 2.08 \times 10^3$	0	0	0	0.4×10^3 $\pm 2.08 \times 10^2$
NDM 40	$0.4 \times 10^3 \pm 0$	$0.4 \times 10^5 \pm 0$	0 $\pm 0.23 \times 10^2$	0.4×10^2 $\pm 2.31 \times 10^2$	$0.4 \times 10^3 \pm 0$
Mean	0.4×10^4 $\pm 1.98 \times 10^4$	0.4×10^3 $\pm 1.63 \times 10^4$	0.4×10^3 $\pm 1.90 \times 10^4$	0.4×10^3 $\pm 1.93 \times 10^4$	0.4×10^3 $\pm 1.29 \times 10^3$

สถิติ Mean \pm SD, CFU/ml: colony forming unit per milliliters

ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 5% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน โดยเฉลี่ยในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ให้ผลการ Subculture ครั้งที่ 1, 2, 4, 8 ให้ผลการเจริญเติบโต 0.4×10^3 CFU/ml และการ Subculture ครั้งที่ 0 ให้ผลการเจริญเติบโต 0.4×10^4 CFU/ml (ตารางที่ 19) ซึ่งพบว่าการเจริญของเชื้อเฉลี่ยทุกการ Subculture ระหว่าง 0.4×10^3 - 0.4×10^4 CFU/ml โดยผลการเจริญของเชื้อจากการ Subculture ครั้งที่ 0 ให้ผลการเจริญที่มากกว่า การ Subculture ครั้งที่ 8 อย่างไม่น่าสำคัญ โดยค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตแต่ละ Strain ได้มาจากการวัด 3 ครั้ง ซึ่งพบว่าค่าที่ได้สอดคล้องกัน

ตารางที่ 20 ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8

10% Turmeric essential oil	Growth at 7 days (CFU/ml)				
	Subculture ครั้งที่ 0	Subculture ครั้งที่ 1	Subculture ครั้งที่ 2	Subculture ครั้งที่ 4	Subculture ครั้งที่ 8
NDM 01	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	0.4×10^3 $\pm 2.29 \times 10^3$	0	0	0
NDM 04	0	0	0.4×10^2 $\pm 2.31 \times 10^2$	0	0
NDM 07	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	0	0	0	0

NDM 09	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	0	0	0	0
NDM 11	$0.4 \times 10^3 \pm 0$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	0	0	0
NDM 21	0	$0.4 \times 10^3 \pm 0$	0.4×10^2 $\pm 0.02 \times 10^2$	0	0
NDM 24	$0.4 \times 10^3 \pm 0$	0.4×10^4 $\pm 2.08 \times 10^3$	0	0	0
NDM 27	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	0.4×10^3 $\pm 2.29 \times 10^3$	0	0.4×10^3 $\pm 2.29 \times 10^3$	0
NDM 39	0.4×10^3 $\pm 2.29 \times 10^3$	0	0	0	0
NDM 40	0.4×10^3 $\pm 2.08 \times 10^3$	$0.4 \times 10^4 \pm 0$	0	0	0
Mean	0.4×10^3 $\pm 1.93 \times 10^3$	0.4×10^3 $\pm 1.86 \times 10^3$	0 $\pm 0.16 \times 10^2$	0 $\pm 1.26 \times 10^2$	0

สถิติ Mean \pm SD, CFU/ml: colony forming unit per milliliters

ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วันโดยเฉลี่ยในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ให้ผลการ Subculture ครั้งที่ 0, 1 ให้ผลการเจริญเติบโต 0.4×10^3 CFU/ml การ Subculture ครั้งที่ 2, 4, 8 ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ (ตารางที่ 20) ซึ่งพบว่าการเจริญของเชื้อเฉลี่ยทุกการ Subculture ระหว่าง $0 - 0.4 \times 10^3$ CFU/ml โดยผลการเจริญของเชื้อจากการ Subculture ครั้งที่ 0 และ 1 ให้ผลการเจริญของเชื้อมากที่สุด และเชื้อถูกยับยั้งการเจริญเติบโตที่ การ Subculture ครั้งที่ 2, 4, 8 อย่างไม่มีนัยสำคัญ โดยค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตแต่ละ Strain ได้มาจากการวัด 3 ครั้ง ซึ่งพบว่าค่าที่ได้สอดคล้องกัน

ตารางที่ 21 ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 20% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8

20% Turmeric essential oil	Growth at 7 days (CFU/ml)				
	Subculture ครั้งที่ 0	Subculture ครั้งที่ 1	Subculture ครั้งที่ 2	Subculture ครั้งที่ 4	Subculture ครั้งที่ 8
NDM 01	0	0	0	0	0
		$\pm 0.23 \times 10^2$			
NDM 04	0	0	0	0	0
NDM 07	0	0	0	0	0
NDM 09	0	0	0	0	0

NDM 11	0	0	0	0	0
NDM 21	0	0	0	0	0
NDM 24	0	0	0	0	0
NDM 27	$0.4 \times 10^2 \pm 0$	0	0	0	0
			$\pm 2.31 \times 10^3$		
NDM 39	0	0	0	0	0
NDM 40	0	0	0	0	0
Mean	0	0	0	0	0
	$\pm 0.12 \times 10^2$		$\pm 0.12 \times 10^2$		

สถิติ Mean \pm SD, CFU/ml: colony forming unit per milliliters

ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 20% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน โดยเฉลี่ยในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 (ตารางที่ 21) ซึ่งพบว่าเชื้อถูกยับยั้งการเจริญเติบโตในทุกการ Subculture โดยค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตแต่ละ Strain ได้มาจากการวัด 3 ครั้ง ซึ่งพบว่าค่าที่ได้สอดคล้องกัน

ตารางที่ 22 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates (n=10) ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ที่สัมผัสกับ 2, 3, 4, 5, 10, 20% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน

% Turmeric essential oil	% Inhibition at 7 days				
	Subculture ครั้งที่ 0	Subculture ครั้งที่ 1	Subculture ครั้งที่ 2	Subculture ครั้งที่ 4	Subculture ครั้งที่ 8
2 %	0.001	0.001	0.01	0.01	0.001
3 %	0.001	0.001	0.01	0.01	0.01
4 %	0.001	0.001	0.1	0.1	0.01
5 %	0.01	0.1	0.1	0.1	0.1
10 %	0.1	0.1	100	100	100
20 %	100	100	100	100	100

ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates (n=10) ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ที่สัมผัสกับ 2, 3, 4, 5, 10, 20% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ได้รับการ Subculture ทั้งหมด 5 ครั้ง ที่สัมผัสกับ 2, 3, 4, 5% Turmeric essential oil ที่ใกล้เคียงกัน ให้ค่าอยู่ระหว่าง 0.001 -100% โดย Turmeric essential oil ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อที่ 0.001, 0.01, 0.1, 100% หมายถึง ปริมาณการเจริญของเชื้อหลังสัมผัสกับ Turmeric essential oil ได้ 99.999, 99.99, 99.9, 0 % จากเชื้อตั้งต้น ปริมาณ 100% แต่ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ได้รับการ Subculture 5 ครั้ง ที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil ให้ผลการยับยั้งที่มากที่สุดที่การ Subculture ครั้งที่ 2, 4, 8 ซึ่งแตกต่างอย่างมากกับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1 และเชื้อที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ที่สัมผัสกับ 20% Turmeric essential oil ทุกการ Subculture ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ 100% ทำให้พบว่า 20% Turmeric essential oil สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ได้รับการ subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ได้มากที่สุด (ตารางที่ 22) โดยค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตแต่ละ Strain ได้มาจากการวัด 3 ครั้ง ซึ่งพบว่าค่าที่ได้สอดคล้องกัน

ตารางที่ 23 ผลการ Subculture ต่อการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates (n=10) ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ที่สัมผัสกับ 2, 3, 4, 5, 10, 20% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน

% Turmeric essential oil	Growth at 7 days (CFU/ml)				
	Subculture ครั้งที่ 0	Subculture ครั้งที่ 1	Subculture ครั้งที่ 2	Subculture ครั้งที่ 4	Subculture ครั้งที่ 8
2 %	0.4×10^5 $\pm 1.74 \times 10^4$	0.4×10^5 $\pm 1.17 \times 10^5$	0.4×10^4 $\pm 1.23 \times 10^5$	0.4×10^4 $\pm 1.91 \times 10^4$	0.4×10^5 $\pm 1.86 \times 10^4$
3 %	0.4×10^5 $\pm 1.86 \times 10^4$	0.4×10^5 $\pm 1.18 \times 10^5$	0.4×10^4 $\pm 1.24 \times 10^5$	0.4×10^4 $\pm 1.98 \times 10^4$	0.4×10^4 $\pm 1.20 \times 10^4$
4 %	0.4×10^5 $\pm 1.90 \times 10^4$	0.4×10^5 $\pm 1.19 \times 10^5$	0.4×10^3 $\pm 1.88 \times 10^4$	0.4×10^3 $\pm 1.65 \times 10^4$	0.4×10^4 $\pm 1.57 \times 10^4$
5 %	0.4×10^4 $\pm 1.98 \times 10^4$	0.4×10^3 $\pm 1.63 \times 10^4$	0.4×10^3 $\pm 1.90 \times 10^4$	0.4×10^3 $\pm 1.93 \times 10^4$	0.4×10^3 $\pm 1.29 \times 10^3$
10 %	0.4×10^3	0.4×10^3	0	0	0

	$\pm 1.93 \times 10^3$	$\pm 1.86 \times 10^3$	$\pm 0.16 \times 10^2$	$\pm 1.26 \times 10^2$	
20 %	0 $\pm 0.12 \times 10^2$	0	0 $\pm 0.12 \times 10^2$	0	0

สถิติ Mean \pm SD, CFU/ml: colony forming unit

ผลการ Subculture ต่อการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates (n=10) ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ที่สัมผัสกับ 2, 3, 4, 5, 10, 20% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน ให้ผลการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates strain (n=10) ที่ใกล้เคียงกัน แต่ผลการเจริญของเชื้อที่ได้รับการ Subculture 5 ครั้ง ที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil ให้ผลการเจริญที่มากที่สุดที่การ Subculture ครั้งที่ 0, 1 ซึ่งแตกต่างอย่างมากกับการ Subculture ครั้งที่ 2, 4, 8 และเชื้อที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ที่สัมผัสกับ 20% Turmeric essential oil ทุกการ Subculture ไม่พบการเจริญของเชื้อ ทำให้พบว่า ผลการ Subculture ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates สัมผัสกับ 2, 3, 4, 5, 10, 20% Turmeric essential oil (ตารางที่ 23) โดยค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตแต่ละ Strain ได้มาจากการวัด 3 ครั้ง ซึ่งพบว่าค่าที่ได้สอดคล้องกัน

ผลการต้านการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ต่อยา Itraconazole ความเข้มข้น 8, 16, 32 μ g /ml และ 10 μ g ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ด้วยวิธี Agar diffusion (ตอบวัตถุประสงค์เฉพาะข้อที่ 3)

ตารางที่ 24 ผลการยับยั้งการเจริญ (inhibition Zone : mm) ของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อ 8 μ g /ml Itraconazole ที่เวลา 2 วัน

Itraconazole	8 μ g /ml Inhibition Zone at 2 days (mm)				
	Subculture ครั้งที่ 0	Subculture ครั้งที่ 1	Subculture ครั้งที่ 2	Subculture ครั้งที่ 4	Subculture ครั้งที่ 8
NDM 01	0	0	0	0	0
NDM 04	8	19	20	18	0
NDM 07	16	18	17	15	0
NDM 09	27	18	25	23	0
NDM 11	28	33	30	30	27
NDM 21	13	14	0	11	0

NDM 24	20	25	0	18	17
NDM 27	18	18	0	16	11
NDM 39	27	19	0	0	0
NDM 40	0	8	0	0	19
Mean	16±10.49	17±8.88	9±12.33	13±10.34	7±10.29

สถิติ Mean±SD, mm: millimeter

ผลการยับยั้งการเจริญ (Inhibition Zone) ของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อ 8 µg /ml Itraconazole ที่เวลา 2 วัน ให้ผลค่าเฉลี่ยของ inhibition Zone ของเชื้อที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 เท่ากับ 16, 17, 9, 13 และ 7 mm ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ผลการ Subculture ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates สัมผัสกับ 8 µg /ml Itraconazole (ตารางที่ 24) โดยค่าที่ได้มาจากค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต 3 ครั้ง ของเชื้อ 10 Strain ซึ่งพบว่าค่าที่ไม่สอดคล้องกันในการ Subculture ครั้งที่ 2 และ 8 อาจเกิดจากผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำ

ตารางที่ 25 ผลการยับยั้งการเจริญ (Inhibition Zone : mm) ของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อ 16 µg /ml Itraconazole ที่เวลา 2 วัน

16 µg /ml Itraconazole	Inhibition Zone at 2 days (mm)				
	Subculture ครั้งที่ 0	Subculture ครั้งที่ 1	Subculture ครั้งที่ 2	Subculture ครั้งที่ 4	Subculture ครั้งที่ 8
NDM 01	0	0	0	0	0
NDM 04	14	21	18	19	0
NDM 07	17	20	19	16	0
NDM 09	31	20	27	25	0
NDM 11	29	36	29	33	32
NDM 21	15	15	0	16	0
NDM 24	22	26	0	19	17
NDM 27	18	20	0	16	13
NDM 39	29	22	0	0	0
NDM 40	0	8	0	0	19
Mean	18±11.05	19±9.73	9±12.43	14±11.21	8±11.48

สถิติ Mean±SD, mm: millimeter

ผลการยับยั้งการเจริญ (inhibition Zone) ของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อ 16 µg /ml Itraconazole ที่เวลา 2 วัน ให้ผลค่าเฉลี่ยของ inhibition Zone ของเชื้อที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 เท่ากับ 18, 19, 9, 14 และ 8 mm ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ผลการ Subculture ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates สัมผัสกับ 16 µg /ml Itraconazole (ตารางที่ 25) โดยค่าที่ได้มาจากค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต 3 ครั้ง ของเชื้อ 10 Strain ซึ่งพบว่าค่าที่ไม่สอดคล้องกันในการ Subculture ครั้งที่ 2 และ 8 อาจเกิดจากผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำ

ตารางที่ 26 ผลการยับยั้งการเจริญ (Inhibition Zone : mm) ของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อ 32 µg /ml Itraconazole ที่เวลา 2 วัน

32 µg /ml Itraconazole	Inhibition Zone at 2 days (mm)				
	Subculture ครั้งที่ 0	Subculture ครั้งที่ 1	Subculture ครั้งที่ 2	Subculture ครั้งที่ 4	Subculture ครั้งที่ 8
NDM 01	0	0	0	0	0
NDM 04	13	21	20	19	0
NDM 07	18	22	19	17	0
NDM 09	31	20	30	27	0
NDM 11	31	37	31	35	31
NDM 21	15	16	0	17	0
NDM 24	22	27	0	20	18
NDM 27	19	22	0	17	12
NDM 39	30	23	0	0	14
NDM 40	0	8	0	0	21
Mean	18±11.45	20±10.08	10±13.42	15±11.89	10±11.28

สถิติ Mean±SD, mm: millimeter

ผลการยับยั้งการเจริญ (Inhibition Zone) ของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อ 32 µg /ml Itraconazole ที่เวลา 2 วัน ให้ผลค่าเฉลี่ยของ inhibition Zone ของเชื้อที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 เท่ากับ 18, 20, 10, 15 และ 10 mm ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ผลการ Subculture ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates สัมผัสกับ 32 µg /ml Itraconazole (ตารางที่ 26) โดยค่าที่ได้มาจากค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต 3 ครั้ง ของเชื้อ 10 Strain

ซึ่งพบว่าค่าที่ไม่สอดคล้องกันในการ Subculture ครั้งที่ 2 และ 8 อาจเกิดจากผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำ

ตารางที่ 27 ผลการยับยั้งการเจริญ (Inhibition Zone : mm) ของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อ 10 µg Itraconazole ที่เวลา 2 วัน

10 µg Itraconazole	Inhibition Zone at 2 days (mm)				
	Subculture ครั้งที่ 0	Subculture ครั้งที่ 1	Subculture ครั้งที่ 2	Subculture ครั้งที่ 4	Subculture ครั้งที่ 8
NDM 01	0	0	0	0	0
NDM 04	24	24	21	19	0
NDM 07	20	22	21	18	0
NDM 09	33	22	31	29	0
NDM 11	33	40	31	36	32
NDM 21	17	16	0	17	0
NDM 24	25	28	0	20	17
NDM 27	20	23	0	17	14
NDM 39	31	24	0	0	15
NDM 40	0	8	0	0	22
Mean	20±12.06	21±10.89	10±13.83	16±12.32	10±11.63

สถิติ Mean±SD, สถิติ Mean, mm: millimeter

ผลการยับยั้งการเจริญ (Inhibition Zone) ของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อ 10 µg Itraconazole ที่เวลา 2 วัน ให้ผลค่าเฉลี่ยของ inhibition Zone ของเชื้อที่การ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 เท่ากับ 20, 21, 10, 16 และ 10 mm ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ผลการ Subculture ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates สัมผัสกับ 10 µg Itraconazole (ตารางที่ 27) โดยค่าที่ได้มาจากค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต 3 ครั้ง ของเชื้อ 10 Strain ซึ่งพบว่าค่าที่ไม่สอดคล้องกันในการ Subculture ครั้งที่ 2 และ 8 อาจเกิดจากผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำ

ตารางที่ 28 ค่าเฉลี่ยผลการต้านการเจริญ (inhibition Zone : mm) ของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อยา Itraconazole ความเข้มข้น 8, 16, 32 $\mu\text{g/ml}$ และ 10 μg ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8

Itraconazole Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	inhibition Zone at 2 days (mm)				
	Subculture ครั้งที่ 0	Subculture ครั้งที่ 1	Subculture ครั้งที่ 2	Subculture ครั้งที่ 4	Subculture ครั้งที่ 8
8 $\mu\text{g/ml}$	16 \pm 10.49	17 \pm 8.88	9 \pm 12.33	13 \pm 10.34	7 \pm 10.29
16 $\mu\text{g/ml}$	18 \pm 11.05	19 \pm 9.73	9 \pm 12.43	14 \pm 11.21	8 \pm 11.48
32 $\mu\text{g/ml}$	18 \pm 11.45	20 \pm 10.08	10 \pm 13.42	15 \pm 11.89	10 \pm 11.28
10 μg	20 \pm 12.06	21 \pm 10.89	10 \pm 13.83	16 \pm 12.32	10 \pm 11.63

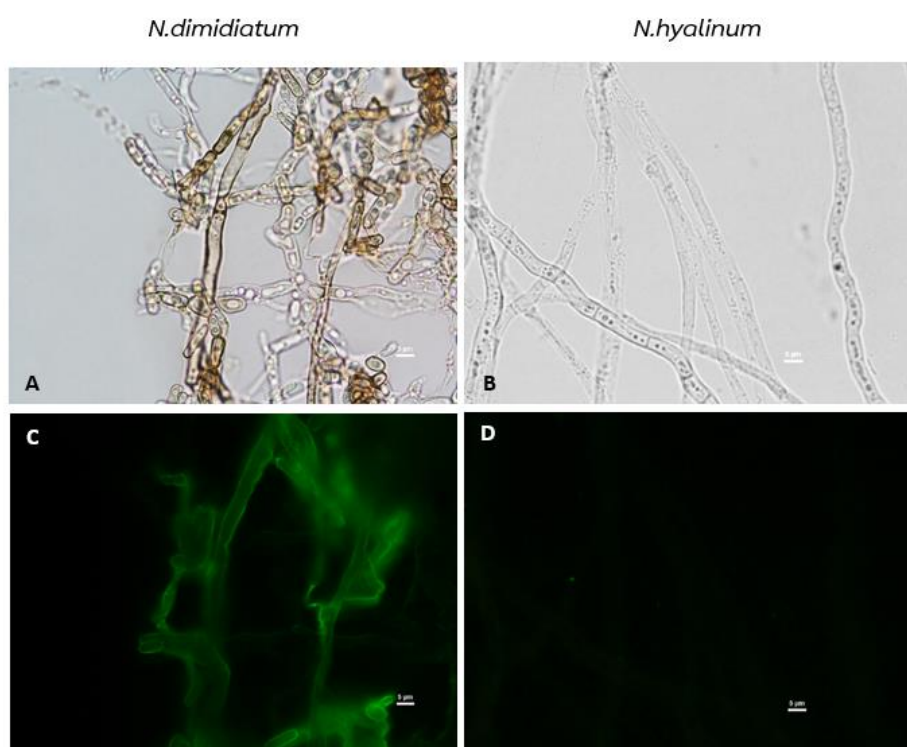
สถิติ Mean \pm SD, mm: millimeter

ค่าเฉลี่ยผลการต้านการเจริญ (inhibition Zone) ของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อ 10 μg Itraconazole ที่เวลา 2 วัน ให้ผลค่าเฉลี่ยของ inhibition Zone ของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อยา Itraconazole ความเข้มข้น 8, 16, 32 $\mu\text{g/ml}$ และ 10 μg ในเชื้อราที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 เท่ากับ (16, 17, 9, 13, 7 mm), (18, 19, 9, 14, 8 mm), (18, 20, 10, 15, 10 mm), (20, 21, 10, 16, 10 mm) ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ผลการ Subculture อาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates ที่สัมผัสกับ 8, 16, 32 $\mu\text{g/ml}$ และ 10 μg Itraconazole (ตารางที่ 28) เนื่องจากมีผลความไม่สอดคล้องกันในการ Subculture ครั้งที่ 2 และ 4 อย่างไม่มีนัยสำคัญ

ผลการสร้างเมลานินของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อ Turmeric essential oil และยาปัจจุบันที่ใช้รักษา (Itraconazole) (ตอบวัตถุประสงค์เฉพาะข้อที่ 4-5)

ตารางที่ 29 ผลการควบคุมคุณภาพการย้อมเมลานินบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อราด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAb 8D6 เชื้อ *N. dimidiatum* และ *N. hyalinum*

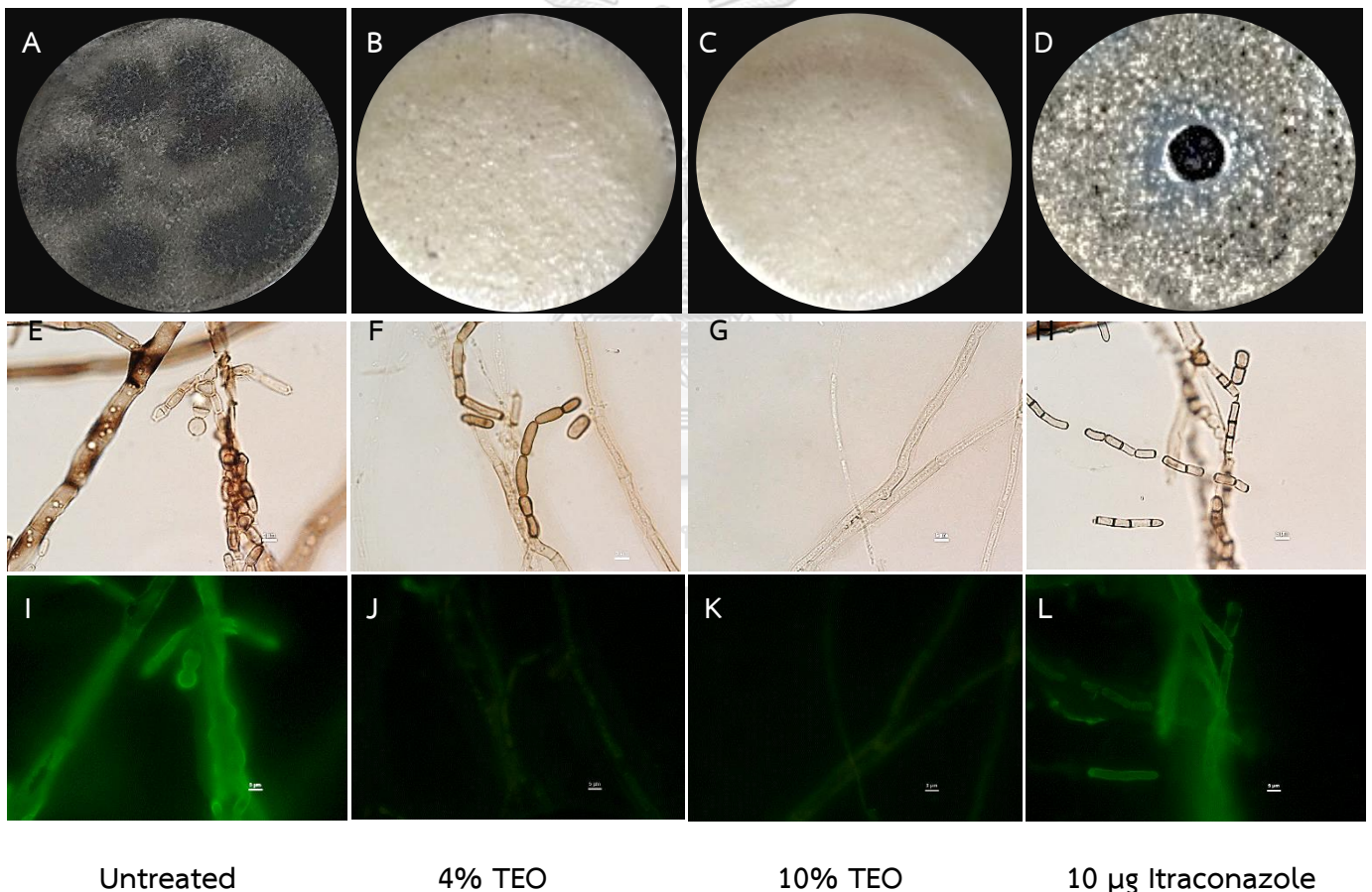
Quality Control	Organism name	Fluorescence Intensity (AU) Mean± SD
Reference Control	<i>N. dimidiatum</i> Untreated (n=50)	7.575 ± 2.914
Negative Control	<i>N. hyalinum</i> (n=10)	1.402 ± 1.559



รูปที่ 7 รูปร่างสายราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (A. *Neoscytalidium dimidiatum* B. *Neoscytalidium hyalinum*) และ 8D6 โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะกับเมลานิน (Melanin-specific Mab 8D6) ที่จับกับเมลานินบนผนังเซลล์เชื้อราแสดงผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบเรืองแสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (C. *Neoscytalidium dimidiatum* (Reference control) D. *Neoscytalidium hyalinum* (Negative control))

Scale bar = 5 μm, MAb: monoclonal antibody

ผลการควบคุมคุณภาพการย้อมเมลานินบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อราด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAb 8D6 ที่จำเพาะกับเมลานินที่ผนังเซลล์ของ เชื้อ Reference Control ชนิด *N. dimidiatum* (Untreated) (n=50) และ Negative Control ชนิด *N. hyalinum* (n=10) ให้ผล ค่าเฉลี่ยการเรืองแสงเฉลี่ย ในเชื้อ *N. dimidiatum* ตั้งต้น (Untreated) ที่ได้มาจากค่าเฉลี่ยการเรืองแสง 50 ครั้ง ของเชื้อ 5 Strain และเชื้อ *N. hyalinum* ที่ได้มาจากค่าเฉลี่ยการเรืองแสง 10 ครั้ง เท่ากับ 7.575 ± 2.914 และ 1.402 ± 1.559 AU ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเชื้อ Reference Control ชนิด *N. dimidiatum* ให้ค่าการเรืองแสงที่มากกว่า Negative Control ชนิด *N. hyalinum* (ตารางที่ 29, รูปที่ 7) แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAb 8D6 มีความจำเพาะกับเมลานินที่ผนังเซลล์เชื้อรา



รูปที่ 8 ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *N. dimidiatum* (macroscopic morphology) บ่มเป็นเวลา 7 วัน (A. เชื้อที่ไม่ได้สัมผัสกับ Turmeric essential oil B. เชื้อที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil C. เชื้อที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil D. เชื้อที่สัมผัสกับ 10 µg itraconazole) รูปร่างสายรกายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (*N. dimidiatum*

microscopic morphology) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (E. เชื้อที่ไม่ได้สัมผัสกับ Turmeric essential oil F. เชื้อที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil G. เชื้อที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil H. เชื้อที่สัมผัสกับ 10 μg Itraconazole) 8D6 โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะกับ เมลานิน (Melanin-specific MAb 8D6) ที่จับกับเมลานินบนผนังเซลล์เชื้อราแสดงผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบเรืองแสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (I. เชื้อที่ไม่ได้สัมผัสกับ Turmeric essential oil J. เชื้อที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil K. เชื้อที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil L. เชื้อที่สัมผัสกับ 10 μg itraconazole) Scale bar = 5 μm MAb, monoclonal antibody, TEO = Turmeric essential oil

ผลการทดสอบผลการสร้างเมลานินของเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อ Turmeric essential oil และ ยาปัจจุบันที่ใช้รักษา (Itraconazole) ที่ 4%, 10% Turmeric essential oil และ 10 μg Itraconazole พบว่า ค่า Immunofluorescence intensity ของเชื้อ *N. dimidiatum* ตั้งต้น (Untreated) และเชื้อที่สัมผัสกับ 4%, 10% Turmeric essential oil และ 10 μg Itraconazole (Treated) เท่ากับ 7.575, 5.983 ($p=0.001$), 5.867 ($p=0.003$) และ 6.417 ($p=0.101$) ตามลำดับ (ตารางที่ 30, รูปที่ 8) โดยสีของโคโลนี ของเชื้อ *N. dimidiatum* ตั้งต้น (Untreated) และเชื้อที่สัมผัส 10 μg Itraconazole (Treated) เป็นสีดำ และสีของโคโลนี ของเชื้อที่สัมผัสกับ 4%, 10% Turmeric essential oil เป็นสีขาว (รูปที่ 8)

ตารางที่ 30 ค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (fluorescence intensity) จากการย้อมเมลานินบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อราชนิด *N. dimidiatum* แต่ละ Strain ด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAb 8D6 ในเชื้อราที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil, 10% Turmeric essential oil และ 10 μg itraconazole เปรียบเทียบกับเชื้อราตั้งต้น (Untreated)

Organism name	Fluorescence Intensity (AU)			
	Untreated	4%TEO	10%TEO	10 ITR μg
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
All <i>N. dimidiatum</i> (n=50)	7.575 \pm 2.914	5.983 \pm 2.155	5.870 \pm 2.330	6.417 \pm 4.085
<i>N. dimidiatum</i> 01 (n=10)	8.752 \pm 2.849	6.510 \pm 3.433	6.278 \pm 3.306	7.5890 \pm 4.136
<i>N. dimidiatum</i> 07 (n=10)	7.360 \pm 3.204	7.025 \pm 1.819	7.359 \pm 0.670	5.917 \pm 4.694

<i>N. dimidiatum</i> 11 (n=10)	5.115± 1.776	4.612± 1.813	4.857± 0.390	4.666± 1.776
<i>N. dimidiatum</i> 27 (n=10)	9.149± 3.529	6.057± 0.895	5.828± 1.788	8.544± 4.820
<i>N. dimidiatum</i> 40 (n=10)	7.499± 1.078	5.711± 1.546	5.026± 3.198	5.368± 3.722

สถิติ Mean±SD, AU: arbitrary units; SD: standard deviation; TEO: turmeric essential oil; ITR: itraconazole; µg: micrograms; µl: microliter

ค่าเฉลี่ยการเรืองแสงแต่ละ Strain ได้มาจากค่าเฉลี่ยการเรืองแสง 10 ครั้ง (n=10) ซึ่งพบว่าค่าที่ได้สอดคล้องกัน ประกอบด้วย *N. dimidiatum* 01 (n=10): ในเชื้อ *N. dimidiatum* ตั้งต้น (Untreated) และเชื้อที่สัมผัสกับ 4%, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole (Treated) เท่ากับ 8.752 ± 2.849, 6.510 ± 3.433, 6.278 ± 3.306 และ 7.5890 ± 4.136 AU ตามลำดับ *N. dimidiatum* 07 (n=10): ในเชื้อ *N. dimidiatum* ตั้งต้น (Untreated) และเชื้อที่สัมผัสกับ 4%, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole (Treated) เท่ากับ 7.360 ± 3.204, 7.025 ± 1.819, 7.359 ± 0.670 และ 5.917 ± 4.694 AU ตามลำดับ *N. dimidiatum* 11 (n=10): ในเชื้อ *N. dimidiatum* ตั้งต้น (Untreated) และเชื้อที่สัมผัสกับ 4%, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole (Treated) เท่ากับ 5.115± 1.776, 4.612± 1.813, 4.857± 0.390 และ 4.666± 1.776 AU ตามลำดับ *N. dimidiatum* 27 (n=10): ในเชื้อ *N. dimidiatum* ตั้งต้น (Untreated) และเชื้อที่สัมผัสกับ 4%, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole (Treated) เท่ากับ 9.149± 3.529, 6.057± 0.895, 5.828± 1.788 และ 8.544± 4.820 AU ตามลำดับ *N. dimidiatum* 40 (n=10): ในเชื้อ *N. dimidiatum* ตั้งต้น (Untreated) และเชื้อที่สัมผัสกับ 4%, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole (Treated) เท่ากับ 7.499± 1.078, 5.711± 1.546, 5.026± 3.198 และ 5.368± 3.722 AU ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเชื้อทุก Strain ที่สัมผัสกับ 4%, 10% Turmeric essential oil ให้ผลค่าเฉลี่ยการเรืองแสงรวมน้อยกว่าเชื้อตั้งต้น (Untreated) (ตารางที่ 30)

ค่าเฉลี่ยการเรืองแสงรวม ได้มาจากค่าเฉลี่ยการเรืองแสง 50 ครั้ง ของเชื้อ 5 Strain (n=50) จากการย้อม เมลานินบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อราชนิด *N. dimidiatum* จำนวน 10 strain และในทุก Strain ทำการวัด 10 ครั้งด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAb 8D6 ในเชื้อ *N. dimidiatum* ตั้งต้น (Untreated) และเชื้อที่สัมผัสกับ 4%, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole (Treated) เท่ากับ 7.575 ± 2.914, 5.983 ± 2.155, 5.870 ± 2.330 และ 6.417

± 4.085 AU ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเชื้อที่สัมผัสกับ 4%, 10% Turmeric essential oil ให้ผลค่าเฉลี่ยการเรืองแสงรวมน้อยที่สุด (ตารางที่ 30)



ตารางที่ 31 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (fluorescence intensity) จากการย้อมเมลาโนินบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อราชนิด *N. dimidiatum* (n=10) ด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAb 8D6 ในเชื้อราที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg itraconazole กับเชื้อราที่ตั้งต้น (Untreated)

Comparison of untreated against	Immunofluorescent intensity		Mean differences	SEM	95% CI for the difference	p-value
	Untreated, AU	Treated, AU				
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> 01 (n = 10)						
4% turmeric essential oil	8.752 ± 2.849	6.510 ± 3.433	2.242	0.901	-0.893-5.377	0.140
10% turmeric essential oil	8.752 ± 2.849	6.278 ± 3.306	2.474	1.587	-1.117-6.065	0.154
10 µg itraconazole	8.752 ± 2.849	7.5890 ± 4.136	1.163	1.525	-2.288-4.614	0.465
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> 07 (n = 10)						
4% turmeric essential oil	7.360 ± 3.204	7.025 ± 1.819	0.334	1.193	-2.365-3.033	0.786
10% turmeric essential oil	7.360 ± 3.204	7.359 ± 0.670	0.001	1.097	-2.482-2.484	0.999
10 µg itraconazole	7.360 ± 3.204	5.917 ± 4.694	1.443	1.817	-2.669-5.555	0.448

สถิติ Mean±SD; AU: arbitrary units; SD: standard deviation; µg: micrograms

ตารางที่ 31 (ต่อ) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (fluorescence intensity) จากการย้อมเมลา닌 บริเวณผนังเซลล์ของเชื้อราชนิด *N. dimidiatum* (n=10) ด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAb 8D6 ในเชื้อราที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg itraconazole กับเชื้อราตั้งต้น (Untreated)

Comparison of untreated against	Immunofluorescent intensity		Mean differences	SEM	95% CI for the difference	p-value
	Untreated, AU	Treated, AU				
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> 11 (n = 10)						
4% turmeric essential oil	5.115± 1.776	4.612± 1.813	0.503	0.553	-0.749-1.755	0.387
10% turmeric essential oil	5.115± 1.776	4.857± 0.390	0.258	0.546	-0.977-1.493	0.648
10 µg itraconazole	5.115± 1.776	4.666± 1.776	0.449	0.964	-1.733-2.631	0.653
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> 27 (n = 10)						
4% turmeric essential oil	9.149± 3.529	6.057± 0.895	3.092	1.192	0.394-5.789	0.029*
10% turmeric essential oil	9.149± 3.529	5.828± 1.788	3.321	1.193	0.620-6.021	0.021*
10 µg itraconazole	9.149± 3.529	8.544± 4.820	0.605	2.117	-4.185-5.395	0.782

สถิติ Mean±SD; AU: arbitrary units; SD: standard deviation; µg: micrograms

ตารางที่ 31 (ต่อ) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (fluorescence intensity) จากการย้อมเมลานิน บริเวณผนังเซลล์ของเชื้อราชนิด *N. dimidiatum* (n=10) ด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAb 8D6 ในเชื้อราที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg itraconazole กับเชื้อราที่ตั้งต้น (Untreated)

Comparison of untreated against	Immunofluorescent intensity		Mean differences	SEM	95% CI for the difference	p-value
	Untreated, AU	Treated, AU				
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> 40 (n = 10)						
4% turmeric essential oil	7.499± 1.078	5.711± 1.546	1.788	0.612	0.402-3.173	0.017*
10% turmeric essential oil	7.499± 1.078	5.026± 3.198	2.473	1.204	-0.252-5.198	0.070*
10 µg itraconazole	7.499± 1.078	5.368± 3.722	2.131	1.346	-0.916-5.178	0.148

สถิติ Mean±SD; AU: arbitrary units; SD: standard deviation; µg: micrograms

ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเรืองแสง แต่ละ Strain ทำการวัดแบบสุ่ม 10 ครั้ง (n=10) จากการย้อมเมลานินด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAb 8D6 บริเวณผนังเซลล์ของเชื้อ *N. dimidiatum* ตั้งต้น (Untreated) และเชื้อที่สัมผัสกับ 4%, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole (Treated) พบว่า

ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของ *N. dimidiatum* 01 (n=10) ที่สัมผัสกับ 4% และ 10% Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole (Treated) พบว่าให้ค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (Immunofluorescence intensity) เท่ากับ 6.510 ± 3.433 ($p=0.140$), 6.278 ± 3.306 ($p=0.154$), 7.5890 ± 4.136 ($p=0.465$) AU ตามลำดับ และมีค่าน้อยกว่าเชื้อตั้งต้น (Untreated) เท่ากับ 8.752 ± 2.849 AU แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 31)

ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของ *N. dimidiatum* 07 (n=10) ที่สัมผัสกับ 4% และ 10% Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole (Treated) พบว่าให้ค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (Immunofluorescence intensity) เท่ากับ 7.025 ± 1.819 ($p=0.786$), 7.359 ± 0.670 ($p=0.999$), 5.917 ± 4.694 ($p=0.448$) AU ตามลำดับ และมีค่าน้อยกว่าเชื้อตั้งต้น (Untreated) 8.752 ± 2.849 AU แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 31)

ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของ *N. dimidiatum* 11 (n=10) ที่สัมผัสกับ 4% และ 10% Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole (Treated) พบว่าให้ค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (Immunofluorescence intensity) เท่ากับ 4.612 ± 1.813 ($p=0.387$), 4.857 ± 0.390 ($p=0.648$), 4.666 ± 1.776 ($p=0.653$) AU ตามลำดับ และมีค่าน้อยกว่าเชื้อตั้งต้น (Untreated) 5.115 ± 1.776 AU แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 31)

ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของ *N. dimidiatum* 27 (n = 10) ที่สัมผัสกับ 4% และ 10% Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole (Treated) พบว่าให้ค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (Immunofluorescence intensity) เท่ากับ 6.057 ± 0.895 ($p=0.029$), 5.828 ± 1.788 ($p=0.021$), 8.544 ± 4.820 ($p=0.782$) AU ตามลำดับ และมีค่าน้อยกว่าเชื้อตั้งต้น (Untreated) 9.149 ± 3.529 AU โดยพบว่าผลต่างค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของเชื้อตั้งต้นกับเชื้อที่ สัมผัสกับ 4% และ 10% Turmeric essential oil (Treated) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าผลต่างค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของเชื้อตั้งต้น (Untreated) กับเชื้อที่ สัมผัสกับ 10 µg Itraconazole (Treated) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 31)

ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของ *N. dimidiatum* 40 (n=10) ที่สัมผัสกับ 4% และ 10% Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole (Treated) พบว่าให้ค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (Immunofluorescence intensity) เท่ากับ 5.711 ± 1.546 ($p=0.017$), 5.026 ± 3.198 ($p=0.070$), 5.368 ± 3.722 ($p=0.148$) AU ตามลำดับ และมีค่าน้อยกว่าเชื้อตั้งต้น (Untreated) 9.149 ± 3.529 AU

โดยพบว่าผลต่างค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของเชื้อตั้งต้นกับเชื้อที่ สัมผัสกับ 4% และ 10% Turmeric essential oil (Treated) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าผลต่างค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของเชื้อตั้งต้น (Untreated) กับเชื้อที่ สัมผัสกับ 10 μ g Itraconazole (Treated) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 31)



ตารางที่ 32 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (fluorescence intensity) จากการย้อมเมลานิน บริเวณผนังเซลล์ของเชื้อราชนิด *N. dimidiatum* (n=50) ด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAbs 8D6 ในเชื้อราที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg itraconazole กับเชื้อราตั้งต้น (Untreated)

Comparison of untreated against (n = 50)	Immunofluorescent intensity		Mean differences	SEM	95% CI for the difference	p-value
	Untreated, AU	Treated, AU				
4% turmeric essential oil	7.575 ± 2.914	5.983 ± 2.155	1.592	0.472	0.644-2.540	0.001*
10% turmeric essential oil	7.575 ± 2.914	5.870 ± 2.330	1.705	0.538	0.624-2.786	0.003*
10 µg itraconazole	7.575 ± 2.914	6.417 ± 4.085	1.158	0.693	0.234-2.550	0.101

สถิติ Mean±SD: AU: arbitrary units; SD: standard deviation; µg: micrograms; * Significant at $p < 0.05$

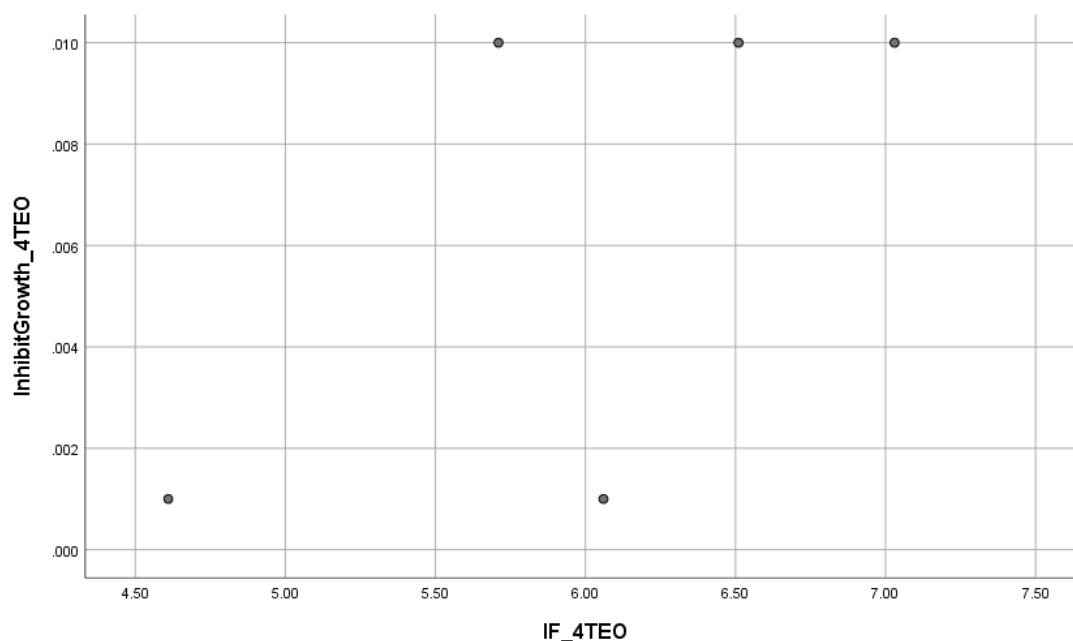
ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเรืองแสงรวม 5 Strain ทุก Strain ทำการวัดแบบสุ่มรวม 50 ครั้ง (n=50) จากการย้อมเมลานินด้วยแอนติบอดีชนิด Melanin-specific MAb 8D6 บริเวณผนังเซลล์ของเชื้อ *N. dimidiatum* ตั้งต้น (Untreated) และเชื้อที่สัมผัสกับ 4%, 10% Turmeric essential oil และ 10 µg Itraconazole (Treated) ให้ค่าเฉลี่ยการเรืองแสง (Immunofluorescence intensity) เท่ากับ 5.983 ± 2.155 ($p=0.001$), 5.870 ± 2.330 ($p=0.003$), 6.417 ± 4.085 ($p=0.101$) AU ตามลำดับ และมีค่าน้อยกว่าเชื้อตั้งต้น (Untreated) 7.575 ± 2.914 AU โดยพบว่าผลต่างค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของเชื้อตั้งต้นกับเชื้อที่ สัมผัสกับ 4% และ 10% Turmeric essential oil (Treated) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าผลต่างค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของเชื้อตั้งต้น (Untreated) กับเชื้อที่ สัมผัสกับ 10 µg Itraconazole (Treated) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งพบว่าเชื้อที่สัมผัสกับ 4%, 10% Turmeric essential oil ให้ค่าผลต่างค่าเฉลี่ยการเรืองแสงรวมน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อตั้งต้น (Untreated) (ตารางที่ 32)

ผลความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญของเชื้อ และปริมาณเมลานินของ *N. dimidiatum* ต่อ Turmeric essential oil และ Itraconazole
(ตอบวัตถุประสงค์เฉพาะข้อที่ 6-7)

ตารางที่ 33 ผลความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญของเชื้อกับการสร้างเมลานินของ *N. dimidiatum* ที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil

<i>N. dimidiatum</i> (n=5)	Growth Inhibit (%)	Immunofluorescence intensity (AU)	Correlation Coefficient (r) (n=5)	p-value
NDM01	0.01	6.51	0.577	0.308
NDM07	0.01	7.03		
NDM11	0.001	4.61		
NDM27	0.001	6.06		
NDM40	0.01	5.71		

สถิติ Spearman sign rank test

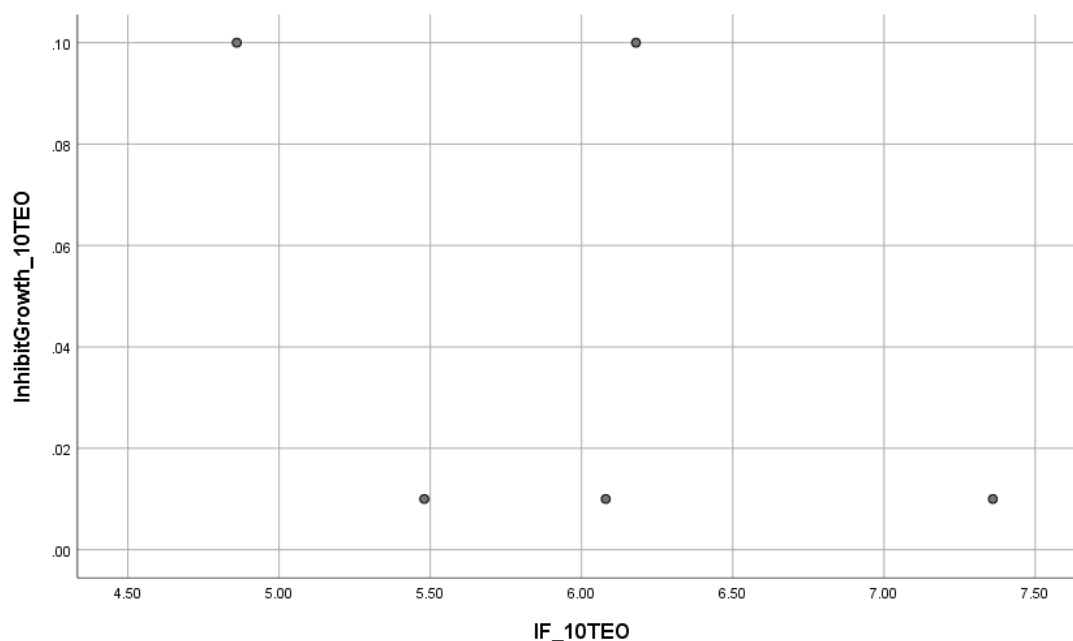


ผลความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญและปริมาณเมลานินของเชื้อ *N. dimidiatum* (n=5) ที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil (Treated) พบว่าให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.577 แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณเมลานินของเชื้อ *N. dimidiatum* ที่สัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil (ตารางที่ 33) โดยผลการยับยั้งเชื้อที่ 0.001 และ 0.01% หมายถึง ปริมาณการเจริญของเชื้อหลังสัมผัสกับ 4% Turmeric essential oil ได้ 99.999 และ 99.99% จากเชื้อตั้งต้นปริมาณ 100% ตามลำดับ

ตารางที่ 34 ผลความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญของเชื้อกับการสร้างเมลานินของ *N. dimidiatum* ที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil

<i>N. dimidiatum</i> (n=5)	Growth Inhibit (%)	Immunofluorescence intensity (AU)	Correlation Coefficient (r) (n=5)	p-value
NDM01	0.01	6.08	-0.289	0.638
NDM07	0.01	7.36		
NDM11	0.1	4.86		
NDM27	0.01	5.48		
NDM40	0.1	6.18		

สถิติ Spearman sign rank test

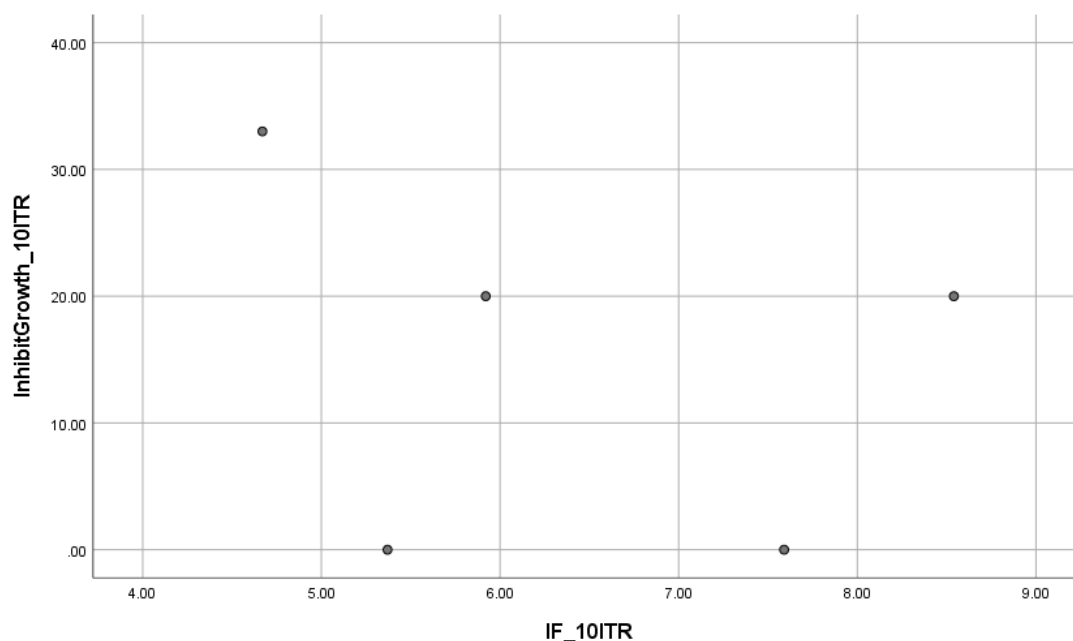


ผลความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญและปริมาณเมลานินของเชื้อ *N. dimidiatum* (n=5) ที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil (Treated) พบว่าให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ -0.289 แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณเมลานินของเชื้อ *N. dimidiatum* ที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil (ตารางที่ 34) โดยผลการยับยั้งเชื้อที่ 0.01 และ 0.1% หมายถึง ปริมาณการเจริญของเชื้อหลังสัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil ได้ 99.99 และ 99.90% จากเชื้อตั้งต้นปริมาณ 100% ตามลำดับ

ตารางที่ 35 ผลความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญของเชื้อกับการสร้างเมลานินของ *N. dimidiatum* ที่สัมผัสกับ 10 µg Itraconazole

<i>N. dimidiatum</i> (n=5)	Growth Inhibit (%)	Immunofluorescence intensity (AU)	Correlation Coefficient (r) (n=5)	p-value
NDM01	0	7.59	-0.316	0.604
NDM07	20	5.92		
NDM11	33	4.67		
NDM27	20	8.54		
NDM40	0	5.37		

สถิติ Spearman sign rank test



ผลความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญและปริมาณเมลานินของเชื้อ *N. dimidiatum* ($n=5$) ที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil (Treated) พบว่าให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ -0.316 แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณเมลานินของเชื้อ *N. dimidiatum* ที่สัมผัสกับ 10% Turmeric essential oil (ตารางที่ 35)

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษาระยะที่ 1: การศึกษา MIC ของเชื้อ Dermatophytes (DMP) และ Non-dermatophytes (NDM) ที่ก่อให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ สำหรับยา Amphotericin B, Terbinafine HCL, Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole

โรคติดเชื้อราที่ผิวหนังชั้นตื้น โดยเฉพาะโรคกลากนับว่าเป็นโรคที่พบได้บ่อยในสถาบันโรคผิวหนัง และปัจจุบันการดื้อต่อยาที่ใช้รักษามีสถานการณ์ที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรคเชื้อราที่เล็บ นับเป็นปัญหาที่ควรตระหนักถึงและให้ความสำคัญ⁽⁶⁷⁾ ดังแสดงให้เห็นจากผลการศึกษา⁽⁶⁷⁾ โดยให้ค่า MIC ของยา amphotericin B ของเชื้อกลุ่ม DMP และ NDM มีช่วงอยู่ระหว่าง 0.25-4 (modes: 1 µg/ml) และ 0.003-16 µg/ml (modes: 0.25, 4 µg/ml) ตามลำดับ ซึ่งมีความสอดคล้องกับ Yenisehirli และคณะ ที่ได้ทำการศึกษาในปี 2013 ได้ค่า MIC ของยา amphotericin B ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่ม DMP อยู่ในช่วงระหว่าง 0.03-2 µg/ml⁽⁶⁸⁾ แตกต่างจากการศึกษาในปี 2011 ของ Spinel-Ingroff และคณะ ได้ค่า MIC ของยา amphotericin B ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่ม NDM อยู่ในช่วงระหว่าง 0.5-2 µg/ml ซึ่งได้ค่าต่ำกว่าการศึกษานี้⁽⁶⁹⁾ จากผลการศึกษา⁽⁶⁹⁾ ทำให้เห็นว่าความแตกต่างกันของ Strain ของเชื้อในแต่ละภูมิภาค ทำให้ค่า MIC มีความแตกต่างกันซึ่งจากการศึกษานี้ให้ค่า MIC ของยา amphotericin B ในกลุ่ม NDM ที่สูงกว่าประเทศอื่น

ผลการศึกษา⁽⁶⁹⁾ ให้ค่า MIC ของยา terbinafine HCL ของเชื้อกลุ่ม DMP และ NDM มีช่วงอยู่ระหว่าง 0.015-16 (modes: 0.015-0.125 µg/ml) และ 0.03-16 µg/ml (modes: 1-2 µg/ml) ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการศึกษาคล้ายกับ Yenisehirli และคณะ ในปี 2013 ได้ค่า MIC ของยา terbinafine HCL ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่ม DMP อยู่ในช่วงระหว่าง 0.007-0.5 µg/ml⁽⁶⁸⁾ มีความคล้ายคลึงกับผลการศึกษาของ Mukherjee และคณะในปี 2003 พบว่าเชื้อกลุ่ม DMP ได้ค่า MIC ของยา terbinafine HCL \leq 0.25 µg/ml แต่แตกต่างกันสำหรับค่า MIC ของเชื้อ *T.rubrum* โดยได้ค่า \geq 0.5 µg/ml⁽⁷⁰⁾ ซึ่งให้ค่าที่สูงกว่าในการศึกษานี้ที่ให้ค่า MIC modes ของเชื้อ *T.rubrum* เท่ากับ 0.015 µg/ml รวมทั้งผลการศึกษาค่า MIC ของเชื้อ *N.dimidiatum* ที่ให้ค่า MIC modes เท่ากับ 2 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lacroix and de Chauvin ในปี 2008 ที่ได้ค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.06-2 µg/ml⁽²⁰⁾ ซึ่งนับว่าเชื้อรากลุ่ม DMP และ NDM ต้องการความเข้มข้นของยา TER ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในปริมาณที่ไม่มากขึ้น และสอดคล้องกับภูมิภาคอื่น

ผลการศึกษานี้ให้ค่า MIC ของยา griseofulvin ของเชื้อกลุ่ม DMP และNDM อยู่ในช่วงระหว่าง 0.06-8 และ 16->64 µg/ml ตามลำดับ โดยผลการศึกษาของ Yenisehirli และคณะในปี 2013 ที่ได้รายงานค่า MIC ของเชื้อ *T.rubrum* อยู่ระหว่าง 0.03-2 µg/ml มีความคล้ายคลึงกับการศึกษานี้ที่ให้ค่า MIC mode เท่ากับ 2 µg/ml แต่สำหรับเชื้อ *T.mentagophyte* ให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.03-16 µg/ml ซึ่งแตกต่างจากการศึกษานี้ที่ให้ค่าอยู่ช่วง 0.06-8 µg/ml⁽⁶⁸⁾ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Machouart และคณะในปี 2013 ที่รายงานว่าเชื้อ *N.dimidiatum* ต่อดื้อยา griseofulvin ซึ่งการศึกษานี้ให้ค่า MIC modes >64 µg/ml⁽⁷¹⁾ ซึ่งนับว่าเชื้อรากกลุ่ม NDM ต้องการความเข้มข้นของยา GF ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในปริมาณที่สูง และสอดคล้องกับภูมิภาคอื่น

ผลการศึกษานี้ให้ค่า MIC ของยา ketoconazole ของเชื้อกลุ่ม DMP และNDM อยู่ในช่วงระหว่าง 0.03-8 และ 0.125->16 µg/ml ตามลำดับ โดยในปี 2013 Yenisehirli และคณะ ได้รายงานค่า MIC ของเชื้อ *T. rubrum* อยู่ในช่วงระหว่าง 0.03 ถึง 1 µg/ml ซึ่งต่ำกว่าการศึกษานี้ที่ได้ผลอยู่ระหว่าง 0.125-8 µg/ml อีกทั้งได้รายงานผล MIC ของเชื้อ *T. mentagophyte* ซึ่งมีค่าเท่ากับการศึกษานี้ซึ่งเท่ากับ 0.03-4 µg/ml⁽⁶⁸⁾ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Machouart และคณะในปี 2013 ที่รายงานว่าเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อดื้อยา ketoconazole ซึ่งการศึกษานี้ให้ค่า MIC modes >64 µg/ml รวมทั้งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Machouart และคณะ ในปี 2013 ที่รายงานว่าเชื้อ *N. dimidiatum* ต่อดื้อยา ketoconazole ซึ่งการศึกษานี้ให้ค่า MIC modes >16 µg/ml⁽⁷¹⁾ ซึ่งนับว่าเชื้อรากกลุ่ม DMP และNDM ต้องการความเข้มข้นของยา KCZ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในปริมาณที่สูง และสอดคล้องกับภูมิภาคอื่น

ผลการศึกษานี้ให้ค่า MIC ของยา itraconazole ของเชื้อกลุ่ม DMP และNDM อยู่ในช่วงระหว่าง 0.007-4 และ 0.25->16 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yenisehirli และคณะในปี 2013 ที่ได้รายงานค่า MIC ของยา itraconazole ต่อเชื้อ *T.rubrum* อยู่ระหว่าง 0.03-1 µg/ml โดยการศึกษานี้ให้ค่าอยู่ระหว่าง 0.125-1 µg/ml แต่ให้ผลแตกต่างกันสำหรับเชื้อ *T.mentagophyte* ที่ให้ค่าอยู่ระหว่าง 0.03-0.5 µg/ml ซึ่งให้ค่าที่สูงกว่าการศึกษานี้ที่ให้ค่าระหว่าง 0.007-4 µg/ml⁽⁶⁸⁾ รวมทั้งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Machouart และคณะในปี 2013 ที่รายงานว่าเชื้อ *N.dimidiatum* ต่อดื้อยา itraconazole ซึ่งการศึกษานี้ให้ค่า MIC modes >16 µg/ml⁽⁷¹⁾ ซึ่งนับว่าเชื้อรากกลุ่ม NDM ต้องการความเข้มข้นของยา ITR ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในปริมาณที่สูง และสอดคล้องกับภูมิภาคอื่น

ผลการศึกษานี้ใช้วิธีการหาค่า MIC ด้วยมาตรฐาน CLSI M 38 ที่ความสอดคล้องกันในทุกการศึกษาที่นำมาเปรียบเทียบผล แต่มีความแตกต่างกันในเรื่อง Strain ของเชื้อราที่แตกต่างกันตามภูมิภาค ทำให้ค่า MIC ของเชื้อในแต่ละภูมิภาคมีความแตกต่างกัน รวมทั้งการดื้อยาของเชื้อราสามารถเกิดได้เองตามธรรมชาติ หรือพัฒนาให้เกิดขึ้นเมื่อได้รับการสัมผัสกับยาต้านเชื้อราอย่าง

ต่อเนื่องทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเชื้อราในด้านพันธุกรรม⁽⁷²⁾ อีกทั้งแหล่งที่มาของเชื้อของการศึกษานี้ได้มาจากผู้ป่วยที่มารักษาที่สถาบันโรคผิวหนังซึ่งเป็นสถานพยาบาลระดับตติยภูมิด้านโรคผิวหนังทำให้ได้ผู้ป่วยที่ผ่านการรักษามาจากที่อื่นแล้วไม่ได้ผล ส่งผลให้โอกาสที่จะพบผู้ป่วยติดเชื้อราที่ติดต่อการรักษาสูงกว่าสถานพยาบาลระดับปฐมภูมิและทุติยภูมิ ทำให้ค่า MIC ของยาจากการศึกษานี้มีค่าสูง

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อราในกลุ่ม NDM โดยเฉพาะเชื้อ *N. dimidiatum* ต้องการความเข้มข้นของยาด้านเชื้อรามากกว่าเชื้อราในกลุ่ม DMP อีกทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Ely และคณะในปี 2014 ที่รายงานว่าการใช้ยา terbinafine HCL ทั้งชนิดทาและทานเหมาะสมในการใช้รักษาหลักในโรคเชื้อราที่ศีรษะและที่เล็บซึ่งให้ผลการรักษาที่ดีและมีราคาที่ไม่สูงนัก⁽⁷³⁾ ดังนั้นยา terbinafine HCL อาจจะใช้เป็นยารักษาโรคติดเชื้อราที่มีสาเหตุจากเชื้อราในกลุ่ม DMP และNDM แต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างผลความไวของยาด้านเชื้อราทางห้องปฏิบัติการและผลลัพธ์ทางคลินิกควรมีการศึกษาเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการรักษาโรคเชื้อราต่อไป

อนึ่งผลจากการศึกษาในระยะที่ 1 พบว่ายาแผนปัจจุบันที่ใช้รักษาเชื้อรา *N. dimidiatum* ซึ่งเป็นเชื้อราในกลุ่ม NDM ต้องใช้ความเข้มข้นของยาที่ระดับสูงในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ จึงนำไปสู่การศึกษาในระยะที่ 2 เพื่อทดสอบคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญและยับยั้งการสร้างเมลานินซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งที่ทำให้เชื้อราก่อโรคเพื่อเป็นแนวทางการรักษาทางเลือกต่อไป

การศึกษาระยะที่ 2: ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการสร้างเมลานินกับเชื้อที่ได้รับ Subculture ครั้งที่ 0 และการต้านการเจริญของเชื้อ *N. dimidiatum* clinical isolates กับเชื้อที่ได้รับ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ต่อ Turmeric essential oil และยา Itraconazole

คุณสมบัติการยับยั้งและการฆ่าเชื้อของน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันคือทำให้เซลล์ของเชื้อรามีการเปลี่ยนแปลงทั้งโครงสร้างและส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ โปรตีน และส่วนประกอบนิวเคลียส⁽⁷⁴⁾ น้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองโดยการขัดขวางการเจริญของสายรา, การงอกของสปอร์, การสร้างสปอร์, และการผลิตอ์ฟลาทอกซิน นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันยังทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มสายรา และ conidiophores รวมทั้งควบคุมการแสดงออกของยีนที่ผลิตไมโคทอกซินในข้าวโพด, และขัดขวางการผลิตเออร์โกสเตอรอลในเซลล์ของเชื้อรา^(75, 76) อนึ่งการศึกษานี้เน้นศึกษาในเชื้อราชนิด NDM โดยเฉพาะ *N. dimidiatum* เนื่องจากเชื้อส่วนใหญ่มีการติดต่อยาด้านเชื้อราที่ใช้ในการรักษาประกอบด้วย griseofulvin, ketoconazole, fluconazole, itraconazole และ terbinafine⁽⁷¹⁾ อีกทั้งมีการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญของราดำชนิด *S. schenckii*,

E.janselmei, *F.pedrosoi* และ *S.apiospermum* โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 114.9, 459.6, 459.6, และ 114.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งไม่พบคุณสมบัตินี้ใน Curcumin⁽¹⁸⁾ นอกจากนี้ Curcumin และ น้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันมีผลต่อการยับยั้งเชื้อราชนิด *Fusarium solani* และ *Helminthosporium oryzae* ซึ่งแสดงผลการต้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพที่สุดต่อเชื้อ *F.solani* และ *H.oryzae* ด้วยค่า IC50 ที่เท่ากับ 19.73 และ 12.7 µg/ml ตามลำดับ⁽⁷⁷⁾ ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษานี้ที่พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันที่ 20% ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบสำคัญ turmerone ตามที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *N.dimidiatum* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Naveen Kumar และคณะในปี 2016 ที่พบว่า turmerones ในน้ำมันหอมระเหยจากรากขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) มีคุณสมบัติต้านเชื้อรา⁽⁷⁸⁾ โดยประกอบด้วย ar-turmerone, α-turmerone และ β-turmerone^(79, 80)

นอกจากนั้นจากการศึกษานี้พบว่าเชื้อ *N. dimidiatum* ที่สัมผัสกับ 4% และ 10% ของ น้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันมีการลดลงของการสร้างเมลานินซึ่งไม่พบคุณสมบัตินี้ในเชื้อที่สัมผัสกับ 10 µg itraconazole ผลลัพธ์เหล่านี้สอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพของสี colony ใน *N.dimidiatum* โดยสีของโคโลนีมีการลดลงของสีด่างจางมองเห็นเป็นสีขาวครีม โดยสามารถสังเกตเห็นได้ในเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันตั้งแต่ 2-20% ซึ่งน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันน่าจะไปยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานินของเชื้อรา *N.dimidiatum* ผ่าน DHN-melanin pathway⁽²⁶⁻²⁸⁾ แต่อย่างไรก็ตาม ผลความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญและปริมาณเมลานินของเชื้อ *N.dimidiatum* (n=5) ที่สัมผัสกับ 4% และ 10% Turmeric essential oil (Treated) แสดงให้เห็นว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญของเชื้อกับปริมาณเมลานิน ของเชื้อ *N.dimidiatum* ที่สัมผัสกับ 4% , 10% Turmeric essential oil เช่นเดียวกับเชื้อที่สัมผัสกับ 10 µg Itraconazole

นอกจากนั้นผลการ Subculture ต่อการเจริญของเชื้อ *N.dimidiatum* clinical isolates strain (n=10) ที่ได้รับการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ที่สัมผัสกับ 2, 3, 4, 5, 10, 20% Turmeric essential oil ที่เวลา 7 วัน และ 8, 16, 32 µg/ml, 10 µg ที่เวลา 2 วัน พบว่าการ Subculture ครั้งที่ 0, 1, 2, 4, 8 ในเชื้อที่สัมผัสกับ 2, 3, 4, 5% Turmeric essential oil และ 8, 16, 32 µg/ml, 10 µg ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Chang และคณะในปี 2020⁽⁶³⁾ ที่พบว่าการ Subculture ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ย้อยผนังเซลล์พีซที่ลดลงส่งผลให้ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อที่ลดลงและส่งผลให้อัตราการเปลี่ยนรูปร่างของเชื้อรา (Transformation rate) มากขึ้นด้วย


ข้อจำกัดของการศึกษานี้คือ ยังไม่มีการกำหนดวิธีมาตรฐานสำหรับการทดสอบความไวของเชื้อราต่อน้ำมันหอมระเหย (EOs) โดยวิธีการ micro-broth dilution method⁽⁸¹⁾ รวมทั้ง

คุณสมบัติความเป็นน้ำมันและการไม่ละลายในน้ำทำให้เกิดความยากในการสังเกตเพื่ออ่านผลการทดสอบซึ่งต้องได้รับการพัฒนาต่อไป⁽⁸²⁾ ทำให้การศึกษานี้ทำการศึกษาคูณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อของน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันด้วยการปรับใช้วิธี agar dilution ตามมาตรฐาน CLSI M07 guidelines⁽⁸³⁾

จุดแข็งของการศึกษานี้คือเป็นการศึกษาแรกๆ ที่ทำการประเมินคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อราและการผลิตเมลานินในห้องปฏิบัติการของน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ต่อเชื้อ *N.dimidiatum* ที่ก่อให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ ซึ่งในอนาคตอาจจะสามารถใช้น้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันมาใช้รักษาโรคที่เกิดจาก *N.dimidiatum* นอกจากนั้น เมลานินอาจจะถูกใช้เป็นเป้าหมายที่จำเพาะสำหรับยาที่ใช้รักษาโรคที่เกิดจาก *N.dimidiatum* และเชื้อราตัวชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงกล่าวได้ว่าน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันที่ 20% ซึ่งประกอบด้วย turmerone เป็นสารสำคัญออกฤทธิ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *N.dimidiatum* ได้ โดยเชื้อที่สัมผัสกับน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันที่ 4% และ 10% สามารถลดการสร้างเมลานินเมื่อเทียบกับเชื้อตั้งต้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสีของโคโลนีเชื้อรา โดยสามารถสรุปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและลดการสร้างเมลานินของเชื้อ *N.dimidiatum* แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งการสร้างเมลานินของน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน รวมทั้งการศึกษากลไกของเมลานินในการก่อโรคในมนุษย์มีความจำเป็นต้องศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจต่อไป

ภาคผนวก

The ethics committee of the Institute of Dermatology certificate



Study Protocol Approval

The Ethics Committee of the Institute of Dermatology, Bangkok, Thailand has approved the following to be carried out according to the protocol dated and/or amended as follows:

Study Title : Effect of Tumeric oil on antifungus and melanogenesis in Neoscytalidium dimidiatum causing onychomycosis.

Study Code : IRB/IEC 035/2564


Center : Institute of Dermatology, Bangkok, Thailand

Principal Investigator : Kunyarnut Krongboon


Protocol Date : 1 December 2021

This is to certify that Institute of Dermatology Ethics Committee is in full Compliance with International Guidelines for Human Research Protection such as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guidelines and The International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH – GCP)

Date of Approval : 13 September 2023

Chairperson of Ethics Committee:..........

(Signature)
Chinmanat Lekhavat, M.D.

Director of Institute of Dermatology:..........

(Signature)
Sakarn Bunnag, M.D.

The ethics committee of the Institute of Dermatology certificate (ต่อ)

Clinical trial ethics committee / IRB APPROVAL FORM	
TO: Kunyarnut Krongboon	
NAME OF ETHICS COMMITTEE/IRB: Ethics committee /IRB of the Institute of Dermatology, Bangkok, Thailand ADDRESS: Institute of Dermatology, 456 Rajavithi Road, Bangkok 10400, Thailand. Tel: (02) 354-5222 Fax: (02) 354-8042, (02) 354-8046	
PROTOCOL IRB/IEB code no. 035/2564 Effect of Tumeric oil on antifungus and melanogenesis in Neoscytalidium dimidiatum causing onychomycosis.	PROTOCOL DATE: 1 December 2021
PRINCIPAL INVESTIGATOR: ADDRESS: Institute of Dermatology, 456 Rajavithi Road, Bangkok 10400, Thailand.	SPONSOR: Institute of Dermatology
The following <input checked="" type="checkbox"/> have been Approve in connection with the above study to be conducted by the above investigator <input checked="" type="checkbox"/> Protocol (Date 1 December 2021) <input checked="" type="checkbox"/> Case Report Form (Date 1 December 2021) <input checked="" type="checkbox"/> Patient information sheet (Date 1 December 2021) <input checked="" type="checkbox"/> Informed Consent Form (Date 1 December 2021) <input type="checkbox"/> Questionnaire (Date) Date of Meeting: 29 August 2023 Date of Approval: 13 September 2023	
SIGNATURE <i>Chinmanat Lekhavat</i> Chinmanat Lekhavat, M.D. NAME OF ETHICS COMMITTEE/IRB CHAIRPERSON/DELEGATE	

Specification Turmeric essential oil



Thai-China Flavours and Fragrances Industry Co., Ltd.

บริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด

The Senses of Natural Co-Creation

SPECIFICATION

Product name	: Turmeric Oil
Product code	: 40021
Country of Origin	: Thailand
Product type	: Essential Oil 100%
INCI Name	: Curcuma longa (Turmeric) root Oil
CAS No.	: 84775-52-0
Production	: This essential oil is obtained by hydro-steam distillation of turmeric root (<i>Curcuma longa</i>)
Application	: Raw material for the production of foods, flavour, beverages, cosmetics and household products.
Colour and appearance	: Yellow to yellow-lemon and clear liquid
Odour	: Special herby note characteristic spicy turmeric odour
Specific gravity (20/20°C)	: 0.9160-0.9366
Refractive index (20°C)	: 1.5023-1.5138
Solubility Test (in 0.5 part of 90% ethyl alcohol)	: Clear liquid.
Storage	: Keep in cool, preferably at about 20- 25°C dry place and protect from light. Keep containers tightly sealed
Shelf life	: 24 Months quality should be checked visually & olfactory before each use and fully checked after the shelf life period

The document is computer generated and no signature is required.

In case of enquiry, please contact

Wasut Somsirikul
Quality Control Supervisor
40021/EFF151118

Office

59/85-89 Moo 2, Bangrak Pattana,
Bang Bua Thong, Nonthaburi 11110 THAILAND
Tel : +66 2952 5380-3 Fax : +66 2952 5385

59/85-89 หมู่ที่ 2 ตำบลบางบัวทอง
อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี 11110

Factory (Phra Nakhon Si Ayutthaya)

99 Moo 2, Lat Bua Luang-Maitra Road, Lat Bua Luang,
Phra Nakhon Si Ayutthaya 13230 THAILAND
Tel : +66 3537 9211, +66 3537 9501-2 Fax : +66 3537 9504-5

99 หมู่ที่ 2 ถนนสายบัวหลวง-มิตรไมตรี ตำบลบางบัวทอง
อำเภอพระนครศรีอยุธยา 13230

Factory (Chiang Rai)

222 Moo 1, San Sai, Mae Chan,
Chiang Rai 57110 THAILAND
Tel : +669 5698 3182

222 หมู่ที่ 1 ตำบลเมืองเก่า
อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 57110

www.tcff-thailand.com

Library Search Report of Turmeric essential oil ด้วยเทคนิควิเคราะห์ High Performance Liquid Chromatography/Gas Chromatography (HPLC/GC)

Data Path : C:\msdchem\1\data\TCFF\

Data File : 00901008.D

Acq On : 16 Feb 2021 2:27

Operator : K

Sample : Turmeric oil 2101-03

Misc :

ALS Vial : 9 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\NIST11.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex

Integration Events: ChemStation Integrator - autoint11.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1.	15.295	2.28	C:\Database\NIST11.L			
			.alpha.-Phellandrene	15726	000099-83-2	86
			Cyclopentene, 3-isopropenyl-5,5-di	15830	1000162-25-4	80
			methyl-			
			.alpha.-Phellandrene	15730	000099-83-2	78
2.	16.503	0.99	C:\Database\NIST11.L			
			Eucalyptol	26615	000470-82-6	96
			Eucalyptol	26624	000470-82-6	94
			Eucalyptol	26625	000470-82-6	90
3.	19.175	3.17	C:\Database\NIST11.L			

(+)-4-Carene 15688 029050-33-7 97
 Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methyl-4-methylidene)- 15864 000586-62-9 97
 Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methyl-4-methylidene)- 15862 000586-62-9 94

4. 34.555 1.28 C:\Database\NIST11.L

Caryophyllene 64272 000087-44-5 99
 Caryophyllene 64275 000087-44-5 98
 Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene- 64418 013877-93-5 94

5. 36.996 1.96 C:\Database\NIST11.L

Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl- 62806 000644-30-4 96
 Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl- 62808 000644-30-4 96
 Benzene, 1-methyl-4-(1,2,2-trimethylcyclopentyl)-, (R)- 62813 016982-00-6 76

6. 37.489 7.23 C:\Database\NIST11.L

1,3-Cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]- 64460 000495-60-3 96
 1,3-Cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]- 64457 000495-60-3 94
 trans-(2-Chlorovinyl)trimethylsilane 15046 1000139-55-2 53

7. 38.028 0.62 C:\Database\NIST11.L
 .beta.-Bisabolene 64317 000495-61-4 94
 (E)-.beta.-Famesene 64348 018794-84-8 87
 .beta.-Bisabolene 64331 000495-61-4 60
8. 38.696 6.31 C:\Database\NIST11.L
 Cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hex 64442 020307-83-9 95
 enyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-
 Cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hex 64447 020307-83-9 95
 enyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-
 .beta.-Bisabolene 64317 000495-61-4 49
9. 41.886 1.42 C:\Database\NIST11.L
 1,5-Dimethyl-2-pyrrolicarbonitrile 9347 056341-36-7 43
 Pyrazine, (1-methylethenyl)- 9344 038713-41-6 43
 Benzaldehyde, 4-methyl- 9389 000104-87-0 43
10. 42.087 0.62 C:\Database\NIST11.L
 1,3-Cyclopentadiene, 5,5-dimethyl- 2633 004125-18-2 38
 1,3,5-Heptatriene, (E,E)- 2615 017679-93-5 38
 Cyclopentane, 1,3-bis(methylene)- 2631 059219-48-6 38
11. 43.166 0.53 C:\Database\NIST11.L
 (R)-(+)-1-(p-Tolyl)ethylamine 15601 004187-38-6 59
 Cyanamide, N-(2-pyrimidinyl)- 9277 1000362-57-6 53
 Phthalan 9362 000496-14-0 49
12. 44.250 6.59 C:\Database\NIST11.L
 Ar-tumerone 74354 1000292-71-0 76
 1-Chloro-2-methyl-2-phenylpropane 36306 000515-40-2 18
 Aziridine, 2-methyl-2-(2,2,4-trime 98278 1000293-28-5 14

thyl-4-phenyl(pentyl)-

13. 44.404 51.52 C:\Database\NIST11.L

Tumerone	75878 180315-67-7 87
5-Amino-1-ethylpyrazole	6085 003528-58-3 27
Curlone	75877 087440-60-6 18

14. 45.616 15.47 C:\Database\NIST11.L

Curlone	75877 087440-60-6 64
Benzoic acid, 4-amino-, 4-acetoxy-	172295 1000273-73-5 40
2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidiny ester	
2-Amino-N-(4-nitrophenyl)-3-phenyl propanamide	131747 014235-17-7 38

FLAVOUR.M

Tue

Feb

16

07:37:44

2021

บรรณานุกรม

1. Welsh O, Vera-Cabrera L, Welsh E. Onychomycosis. Clinics in dermatology. 2010;28(2):151-9.
2. Szepietowski JC, Reich A, Garlowska E, Kulig M, Baran E. Factors influencing coexistence of toenail onychomycosis with tinea pedis and other dermatomycoses: a survey of 2761 patients. Archives of dermatology. 2006;142(10):1279-84.
3. Szepietowski JC, Reich A, Pacan P, Garlowska E, Baran E. Evaluation of quality of life in patients with toenail onychomycosis by Polish version of an international onychomycosis-specific questionnaire. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV. 2007;21(4):491-6.
4. Di Chiacchio N, Suarez MV, Madeira CL, Loureiro WR. An observational and descriptive study of the epidemiology of and therapeutic approach to onychomycosis in dermatology offices in Brazil. Anais brasileiros de dermatologia. 2013;88 Suppl 1:3-11.
5. Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, Konnikov N, Gupta AK, Summerbell R, et al. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. Journal of the American Academy of Dermatology. 2000;43(4):641-8.
6. Gupta AK, Drummond-Main C, Cooper EA, Brintnell W, Piraccini BM, Tosti A. Systematic review of nondermatophyte mold onychomycosis: diagnosis, clinical types, epidemiology, and treatment. Journal of the American Academy of Dermatology. 2012;66(3):494-502.
7. Kaur R, Kashyap B, Bhalla P. Onychomycosis--epidemiology, diagnosis and management. Indian journal of medical microbiology. 2008;26(2):108-16.
8. Ungpakorn R, Lohaprathan S, Reangchainam S. Prevalence of foot diseases in outpatients attending the Institute of Dermatology, Bangkok, Thailand. Clinical and experimental dermatology. 2004;29(1):87-90.
9. Nosanchuk JD, Rosas AL, Casadevall A. The antibody response to fungal melanin in mice. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 1998;160(12):6026-31.
10. Polak A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. Mycoses.

1990;33(5):215-24.

11. Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and functions of fungal melanins. Annual review of phytopathology. 1986;24(1):411-51.
12. Mirchink TG, Kashkina GB, Abaturon Iu D. [Resistance of fungi with different pigments to γ -radiation]. Mikrobiologiya. 1972;41(1):83-6.
13. Wheeler MH, Bell AA. Melanins and their importance in pathogenic fungi. Current topics in medical mycology. 1988:338-87.
14. Morris-Jones R, Youngchim S, Hextall JM, Gomez BL, Morris-Jones SD, Hay RJ, et al. *Scytalidium dimidiatum* causing recalcitrant subcutaneous lesions produces melanin. Journal of clinical microbiology. 2004;42(8):3789-94.
15. JE B. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. Goodman LS, Gilman A, Hardman JG, Limbird LE, editors. New York: McGraw-Hill; 1996.
16. Bueno JG, Martinez C, Zapata B, Sanclemente G, Gallego M, Mesa AC. In vitro activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. Clinical and experimental dermatology. 2010;35(6):658-63.
17. Elewski BE. Onychomycosis caused by *Scytalidium dimidiatum*. Journal of the American Academy of Dermatology. 1996;35(2 Pt 2):336-8.
18. Apisariyakul A, Vanittanakom N, Buddhasukh D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). Journal of ethnopharmacology. 1995;49(3):163-9.
19. Pothitirat W, Gritsanapan W. Variation of bioactive components in *Curcuma longa* in Thailand. Current Science. 2006;91.
20. Kusumawati I, Kurniawan KO, Rullyansyah S, Prijo TA, Widyowati R, Ekowati J, et al. Anti-aging properties of *Curcuma heyneana* Valetton & Zijp: A scientific approach to its use in Javanese tradition. Journal of ethnopharmacology. 2018;225:64-70.
21. Finch J, Arenas R, Baran R. Fungal melanonychia. Journal of the American Academy of Dermatology. 2012;66(5):830-41.
22. Hay RJ, Baran R. Onychomycosis: a proposed revision of the clinical classification. Journal of the American Academy of Dermatology. 2011;65(6):1219-27.
23. Bunyaratavej S, Prasertworonun N, Leeyaphan C, Chaiwanon O, Muanprasat C, Matthapan L. Distinct characteristics of *Scytalidium dimidiatum* and non-dermatophyte

onychomycosis as compared with dermatophyte onychomycosis. *The Journal of dermatology*. 2015;42(3):258-62.

24. Kusuma IW, Arung ET, Rosamah E, Purwatiningsih S, Kuspradini H, Syafrizal, et al. Antidermatophyte and antimelanogenesis compound from *Eleutherine americana* grown in Indonesia. *Journal of natural medicines*. 2010;64(2):223-6.

25. Gow NAR, Latge JP, Munro CA. *The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function*. *Microbiology spectrum*. 2017;5(3).

26. Nicolaus RA, Piattelli M, Fattorusso E. The structure of melanins and melanogenesis. IV. On some natural melanins. *Tetrahedron*. 1964;20(5):1163-72.

27. Taylor BE, Wheeler MH, Szaniszlo PJ. Evidence for Pentaketide Melanin Biosynthesis in Dematiaceous Human Pathogenic Fungi. *Mycologia*. 1987;79(2):320-2.

28. Wheeler MH. Comparisons of fungal melanin biosynthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*. 1983;81(1):29-36.

29. Rodrigues ML. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Casadevall A, editor. Switzerland: Springer Nature; 2019. 30 p.

30. Rippon JW. *Medical mycology*. 2nd ed. Eastbourne, UK W.B. Saunders Company; 1982. 842 p.

31. Cutler JE, Swatek FE. Pigment production by *Basidiobolus* in the presence of tyrosine. *Mycologia*. 1969;60(1):130-5.

32. Kwon-Chung KJ, Polachek I, Popkin TJ. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *Journal of bacteriology*. 1982;150(3):1414-21.

33. Dixon DM, Polak A, Szaniszlo PJ. Pathogenicity and virulence of wild-type and melanin-deficient *Wangiella dermatitidis*. *Journal of medical and veterinary mycology* : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology. 1987;25(2):97-106.

34. Bossche HV, Odds FC, Kerridge D. *Dimorphic Fungi in Biology and Medicine*. 1st ed. New York: Plenum Press; 1993.

35. Jahn B, Koch A, Schmidt A, Wanner G, Gehring H, Bhakdi S, et al. Isolation and

- characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infection and immunity*. 1997;65(12):5110-7.
36. Yoder OC, Turgeon BG. Molecular-genetic evaluation of fungal molecules for roles in pathogenesis to plants. *Journal of Genetics*. 1996;75(3):425.
37. Korth H, Pulverer G. Pigment formation for differentiating *Cryptococcus neoformans* from *Candida albicans*. *Applied microbiology*. 1971;21(3):541-2.
38. Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(4):708-17.
39. de Jong JC MB, Smirnoff N, Talbot NJ. Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature*. 1997;389:244-5.
40. Kimura N, Tsuge T. Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *Journal of bacteriology*. 1993;175(14):4427-35.
41. Howard R, Ferrari M. Role of melanin in appressorium function. *Experimental Mycology*. 1989;13:403-18.
42. Howard RJ, Ferrari MA, Roach DH, Money NP. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(24):11281-4.
43. Wheeler MH, Bell AA. Melanins and their importance in pathogenic fungi. *Curr Top Med Mycol*. 1988;2:338-87.
44. Brush L, Money NP. Invasive hyphal growth in *Wangiella dermatitidis* is induced by stab inoculation and shows dependence upon melanin biosynthesis. *Fungal genetics and biology : FG & B*. 1999;28(3):190-200.
45. Chongkae S, Nosanchuk JD, Pruksaphon K, Laliem A, Pornsuwan S, Youngchim S. Production of melanin pigments in saprophytic fungi in vitro and during infection. 2019;59(11):1092-104.
46. Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in microbiology*. 2003;11(6):272-9.
47. Fairlamb AH, Gow NA, Matthews KR, Waters AP. Drug resistance in eukaryotic microorganisms. 2016;1(7):16092.
48. Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*.

2007;10(3):121-30.

49. Smitinand Tem. Thai Plants Names. Bangkok: White Lotus; 2001.

50. Department of Medical Sciences MoPH. Thai Herbal Pharmacopoeia 2016: Department of Medical Sciences; 2016.

51. Chavalittumrong P, Jirawattanapong W. Variation of active constituent of *Curcuma domestica* rhizomes at difference ages. . Thai J Pharm Sci 1992;16:165-74.

52. Changtam C, de Koning HP, Ibrahim H, Sajid MS, Gould MK, Suksamrarn A. Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. European journal of medicinal chemistry. 2010;45(3):941-56.

53. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. Biomed Res Int. 2014;2014:186864.

54. Leela N, Tava A, Shafi P, John H, Chempakam B. Chempakam B. Chemical composition of essential oils turmeric (*Curcuma longa* L.). Acta Pharm 2002;52:137-41.

55. Dixit S, Awasthi P. Chemical Composition of *Curcuma Longa* Leaves and Rhizome Oil from the Plains of Northern India. Journal of Young Pharmacists. 2009;1:322.

56. Groh IAM, Rudakovski O, Gründken M, Schroeter A, Marko D, Esselen M. Methyleugenol and oxidative metabolites induce DNA damage and interact with human topoisomerases. Archives of Toxicology. 2016;90(11):2809-23.

57. Liju VB, Jeena K, Kuttan R. Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L). Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2013;53:52-61.

58. Bampidis V, Azimonti G, Bastos ML, Christensen H, Kos Durjava M, Kouba M, et al. Safety and efficacy of turmeric extract, turmeric oil, turmeric oleoresin and turmeric tincture from *Curcuma longa* L. rhizome when used as sensory additives in feed for all animal species. Efsa j. 2020;18(6):e06146.

59. Wuthi-udomlert M, Grisanapan W, Luanratana O, Caichompoo W. Antifungal activity of *Curcuma longa* grown in Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 2000;31 Suppl 1:178-82.

60. Park SY, Jin ML, Kim YH, Kim Y, Lee SJ. Aromatic-turmerone inhibits α -MSH and IBMX-induced melanogenesis by inactivating CREB and MITF signaling pathways. *Archives of dermatological research*. 2011;303(10):737-44.
61. Biswas R, Mukherjee PK, Kar A, Bahadur S, Harwansh RK, Biswas S, et al. Evaluation of Ubtan - A traditional indian skin care formulation. *Journal of ethnopharmacology*. 2016;192:283-91.
62. Ansari MA, Butt TM. Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf-life of entomopathogenic fungi. *Journal of applied microbiology*. 2011;110(6):1460-9.
63. Chang T-H, Lin Y-H, Wan Y-L, Chen K-S, Huang J-W, Chang P-FL. Degenerated Virulence and Irregular Development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* Induced by Successive Subculture. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(4):382.
64. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 38 - AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
65. Jang J-H, Lee JH, Ki C-S, Lee NY. Identification of clinical mold isolates by sequence analysis of the internal transcribed spacer region, ribosomal large-subunit D1/D2, and β -tubulin. *Ann Lab Med*. 2012;32(2):126-32.
66. สิริดา ยังฉิม. การทดสอบความไวของยาด้านเชื้อรา. 1st ed. กรุงเทพมหานคร: แดเน็กซ์ อินเทอร์เน็ตคอร์ปอเรชั่น; 2557.
67. Gupta AK, Renaud HJ, Quinlan EM, Shear NH, Piguet V. The Growing Problem of Antifungal Resistance in Onychomycosis and Other Superficial Mycoses. *Am J Clin Dermatol*. 2021;22(2):149-57.
68. Yenişehirli G, Tunçoğlu E, Yenişehirli A, Bulut Y. In vitro activities of antifungal drugs against dermatophytes isolated in Tokat, Turkey. *Int J Dermatol*. 2013;52(12):1557-60.
69. Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Ghannoum M, Johnson E, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):5150-4.

70. Mukherjee PK, Leidich SD, Isham N, Leitner I, Ryder NS, Ghannoum MA. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(1):82-6.
71. Machouart M, Menir P, Helenon R, Quist D, Desbois N. *Scytalidium* and scytalidiosis: what's new in 2012? *J Mycol Med*. 2013;23(1):40-6.
72. Gupta AK, Venkataraman M. Antifungal resistance in superficial mycoses. *J Dermatolog Treat*. 2022;33(4):1888-95.
73. Ely JW, Rosenfeld S, Seabury Stone M. Diagnosis and management of tinea infections. *American family physician*. 2014;90(10):702-10.
74. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Feo V. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2017;10(4).
75. Ferreira FD, Mossini SAG, Ferreira FMD, Arrotéia CC, da Costa CL, Nakamura CV, et al. The Inhibitory Effects of *Curcuma longa* L. Essential Oil and Curcumin on *Aspergillus flavus* Link Growth and Morphology. *The Scientific World Journal*. 2013;2013.
76. Hu Y, Zhang J, Kong W, Zhao G, Yang M. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. *Food Chem*. 2017;220:1-8.
77. H. Chowdhury TB, and S. Walia. In vitro screening of *Curcuma longa* L and its derivatives as antifungal agents against *Helminthosporium oryzae* and *Fusarium solani*. *Pesticide Research Journal*. 2008;20(1):6-9.
78. Naveen Kumar K, Venkataramana M, Allen JA, Chandranayaka S, Murali HS, Batra HV. Role of *Curcuma longa* L. essential oil in controlling the growth and zearalenone production of *Fusarium graminearum*. *LWT - Food Science and Technology*. 2016;69:522-8.
79. Pk A, Dixit SC. Chemical Composition of *Curcuma Longa* Leaves and Rhizome Oil from the Plains of Northern India. *Journal of Young Pharmacists*. 2009;1:322.
80. Zhang HA, Kitts DD. Turmeric and its bioactive constituents trigger cell signaling mechanisms that protect against diabetes and cardiovascular diseases. *Mol Cell Biochem*. 2021;476(10):3785-814.
81. Castilho AL, Caleffi-Ferracioli KR, Canezin PH, Dias Siqueira VL, de Lima Scodro RB, Cardoso RF. Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by

resazurin broth microdilution assay. J Microbiol Methods. 2015;111:119-21.

82. Romano CS, Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A.A. & Moreno, S. . Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. Food Chemistry. 2009;115(2):456-61.

83. CLSI. Clinical and Laboratory Standard M07-A Wayne, PA2018.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว กัญญานัฐ ครองบุญ
วัน เดือน ปี เกิด	9 ธันวาคม 2531
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2553 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2560 เทคนิคการแพทยศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ที่อยู่ปัจจุบัน	605/309 หมู่ 10 ต.นครสวรรค์ตก อ.เมือง จ.นครสวรรค์ 60000
ผลงานตีพิมพ์	- กัญญานัฐ ครองบุญ, ถวัลย์ ฤกษ์งาม, เอนก ภูทอง, จีระภา ดำรงโภค ภักดิ์, สมคิด อุบลวัฒน์, จิรัฐฐิกาญจน์ สุรินทร์,ธีระนา บุนนาค และประไพ พิศ เซาวลิต. การตรวจการติดเชื้อราในเล็บด้วยวิธีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ การเพาะเชื้อ และการวิเคราะห์ล าดับเบสโรโบโซมอลดีเอ็นเอ.วารสาร วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 27 ฉบับที่ 3: พฤษภาคม - มิถุนายน 2562; หน้า 449-511.
รางวัลที่ได้รับ	-