ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบจากย่านางต่อเชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ และเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสในช่องปาก

นางสาวพิมพ์บุษร์ พรหมศรี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT FROM *TILIACORA TRIANDRA* (COLEBR.) DIELS AGAINST CARIOGENIC STREPTOCOCCI AND ORAL OPPORTUNISTIC PATHOGENS

Miss Pimbuch Promsri

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pediatric Dentistry
Department of Pediatric Dentistry
Faculty of Dentistry
Chulalongkorn University
Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบจากย่านางต่อเชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ และเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสในช่องปาก
โดย	นางสาวพิมพ์บุษร์ พรหมศรี
สาขาวิชา	ทันตกรรมสำหรับเด็ก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์พิเศษ ทันตแพทย์หญิง ชุติมา ไตรรัตน์วรกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.พนิดา ธัญญศรีสังข์

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.สุชิต พูลทอง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.ทิพวรรณ ธราภิวัฒนานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์พิเศษ ทันตแพทย์หญิง ชุติมา ไตรรัตน์วรกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.พนิดา ธัญญศรีสังข์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ร้อยตำรวจเอกหญิง เภสัชกรหญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล)

พิมพ์บุษร์ พรหมศรี : ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบจากย่านางต่อเชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ และเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสในช่องปาก (ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT FROM *TILIACORA TRIANDRA* (COLEBR.) DIELS AGAINST CARIOGENIC STREPTOCOCCI AND ORAL OPPORTUNISTIC PATHOGENS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. พิเศษ ทพญ. ชุติมา ไตรรัตน์วรกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ทพญ. ดร.พนิดา ธัญญศรีสังข์, 55 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบจากรากย่านางต่อเชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ และเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสในช่องปาก สารสกัดหยาบจากรากย่านางนี้ได้มาจากการสกัดด้วยเอทานอล และละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพทำโดยวิธีแพร่สารละลายในวุ้น ตามด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่นเพื่อทดสอบหาความเข้มข้นต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อ และประเมินระยะเวลาที่สารสกัดใช้ในการทำลายเชื้อด้วยวิธีไทม์คิล พบโซนยับยั้งขนาดเท่ากับ 12.67±1.15 7.67±1.52 และ 10.67±1.15 มิลลิเมตร ต่อเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส สายพันธุ์ OMZ 176 สเตร็ปโตคอกคัส แซงกวินิส สายพันธุ์ ATCC 10556 และสเตร็ปโตคอกคัส กอร์โดไน สายพันธุ์ DMST 2060 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบโซนยับยั้งขนาดเท่ากับ 10.00±1.00 และ 8.00±1.53 มิลลิเมตร ต่อเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส สายพันธุ์ ATCC 750 และแคนดิดา พาราไซโลสิส สายพันธุ์ ATCC 90018 ตามลำดับ ส่วนการทดสอบด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่นพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านเชื้อที่ใช้ทดสอบเกือบทุกสายพันธุ์ โดยเฉพาะเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส และเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส โดยสารสกัดที่ความเข้มข้นสองเท่าของความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อสามารถทำลายเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัสได้ทั้งหมดภายในเวลา 7 ชั่วโมง แต่ที่ความเข้มข้นหนึ่งเท่าของความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อไม่สามารถทำลายเชื้อสายพันธุ์นี้ได้ทั้งหมดภายใน 10 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นทั้งหนึ่งเท่าและสองเท่าของความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อสามารถทำลายเชื้อสายพันธุ์นี้ได้ทั้งหมดภายในเวลา 10 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบจากรากย่านางมีฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุและเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสในช่องปาก โดยเฉพาะเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส แบคทีเรียก่อโรคฟันผุ และเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่พบในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ซึ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพที่จะพัฒนาสารสกัดนี้ให้เป็นส่วนผสมที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพในวานิช หรือยาป้ายในช่องปาก

ภาควิชา	ทันตกรรมสำหรับเด็ก	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	ทันตกรรมสำหรับเด็ก	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5775817932 : MAJOR PEDIATRIC DENTISTRY

KEYWORDS:

PIMBUCH PROMSRI: ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT FROM *TILIACORA TRIANDRA* (COLEBR.) DIELS AGAINST CARIOGENIC STREPTOCOCCI AND ORAL OPPORTUNISTIC PATHOGENS. ADVISOR: PROF. CHUTIMA TRAIRATVORAKUL, D.D.S., M.S., CO-ADVISOR: ASST. PROF. PANIDA THANYASRISUNG, D.D.S., Ph.D., 55 pp.

This study aimed to investigate the antimicrobial activity of crude extract from *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels root against cariogenic streptococci and oral opportunistic pathogens. The crude extract was prepared by ethanol extraction and dissolved in 20% ethanol. To determine the antimicrobial activity and the minimum bactericidal and fungicidal concentrations (MBC and MFC), an agar well diffusion method followed by a broth microdilution method was used . The time kill analysis was performed to evaluate a duration that the crude extract requires for destroying microorganisms. Zones of inhibition were 12.67±1.15, 7.67±1.52 and 10.67±1.15 mm. against *S. sobrinus* OMZ 176, *S. sanguinis* ATCC 10556 and *S. gordonii* DMST 2060, respectively. In addition, zones of inhibition were 10.00±1.00 and 8.00±1.53mm. against *C. tropicalis* ATCC 750 and *C. parapsilosis* ATCC 90018 , respectively. With the broth microdilution method, the extract had antimicrobial activity against most of the tested microorganism especially *S. sobrinus* and *C. tropicalis* . The 2xMBC of the extract could destroy all *S. sobrinus* within 7 hours but 1xMBC couldn't destroy all this strain within 10 hours. For *C. tropicalis* , both 1xMFC and 2xMFC of the extract could destroy all this strain within 10 and 8 hours. This study showed that the crude extract from*Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels root had antimicrobial activities against cariogenic streptococci and oral opportunistic pathogen especially cariogenic bacteria *S. sobrinus* and *C. tropicalis* which is an opportunistic pathogens found in immunocompromised host. These finding indicates the potential to develop the extract as an antimicrobial ingredient in varnish or oral paste products.

Department:	Pediatric Dentistry	Student's Signature .....
Field of Study:	Pediatric Dentistry	Advisor's Signature .....
Academic Year:	2016	Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์พิเศษ ทันตแพทย์หญิงชุติมา ไตรรัตน์วรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.พนิดา ธัญญศรีสังข์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้มีส่วนสำคัญให้คำแนะนำ อบรมสั่งสอน คอยดูแลและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุลวงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ รวี เถียรไพศาล ภาควิชาโอษฐ์วิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ร.ต.อ.หญิง ภญ. ดร. สุชาดา สุขหร่อง อาจารย์ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาเกี่ยวกับวิธีการสกัดและการแยกสารเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ ทำให้งานวิจัยนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะมาปรับปรุงและแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ นางสาววรกร วิวัชรากรกุล เจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ นางสาววันเพ็ญ ชินเฮง และเจ้าหน้าที่ภาคจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่อำนวยความสะดวก ให้คำแนะนำ รวมถึงเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้

และสุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่ชายทั้ง 2 คนของผู้ทำวิจัย ที่คอยดูแลและเป็นกำลังใจตลอดในการทำวิจัยครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญรูปภาพ 1

สารบัญตาราง 2

บทที่ 1 ที่มาและความสำคัญ 1

ที่มาและความสำคัญ 1

คำถามการวิจัย 4

วัตถุประสงค์ของการศึกษา 4

สมมติฐานของการวิจัย 4

รูปแบบการวิจัย 5

กรอบแนวคิดการวิจัย 5

ขอบเขตของการวิจัย 5

ข้อจำกัดการวิจัย 6

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6

บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม 7

เชื้อจุลชีพในช่องปาก 7

โรคฟันผุในเด็กปฐมวัย 10

โรคติดเชื้อราในช่องปาก 12

คลอเฮกซิดีน 13

ย่านาง 14

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 16
เชื้อจุลชีพที่ใช้ในการวิจัย 16
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย 16
วิธีการดำเนินการวิจัย 18
1. การเตรียมสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง 18
2. การเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง 18
3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 18
4. การเตรียมเชื้อจุลชีพ 19
5. การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง 20
5.1 การทดสอบด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น (Agar well diffusion) 20
5.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา 21
5.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการทำลายเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา 22
5.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในช่องปาก โดยวิธีไทม์คิล (Time kill analysis) 23
6. การวิเคราะห์ข้อมูล 23
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย 24
1. การเตรียมสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง 24
2. การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง 24
2.1 การทดสอบด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น (Agar well diffusion) 24
2.2 การทดสอบด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น (Broth microdilution) 26

Chulalongkorn University

หน้า

2.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางโดยวิธีไทม์คิล (Time kill analysis) 28
บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย 31
วิจารณ์ผลการวิจัย 31
สรุปผลการวิจัย 35
รายการอ้างอิง 37
ภาคผนวก 45
ภาคผนวก ก 46
ภาคผนวก ข 47
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 55

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 การเตรียมสารสำหรับทดสอบใน 96 well plate..... 22

รูปที่ 2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางโดยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น..... 25

รูปที่ 3 ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางโดยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น..... 26

รูปที่ 4 ฤทธิ์ทำลายเชื้อ *S. sobrinus* OMZ 176 ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อหน่วยเวลา ที่ความเข้มข้น 1xMBC และ 2xMBC ด้วยวิธีไทม์คิล..... 29

รูปที่ 5 ฤทธิ์ทำลายเชื้อ *C. tropicalis* ATCC 750 ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อหน่วยเวลา ที่ความเข้มข้น 1xMFC และ 2xMFC ด้วยวิธีไทม์คิล..... 30

รูปที่ 6 สูตรโครงสร้างอัลคาลอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ tiliacorinine, tiliacorine และ nor-tiliacorinine A จากส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากรากย่านาง..... 35

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) โดยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น 27

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการทำลายเชื้อรา (MFC) โดยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น 28

ตารางที่ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อเชื้อแบคทีเรีย 46

ตารางที่ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อเชื้อรา 46

ตารางที่ 5 จำนวนเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ที่เพาะในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 (กลุ่มควบคุม) ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง 47

ตารางที่ 6 จำนวนเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ที่เพาะในสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่ม 1xMBC) ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง 48

ตารางที่ 7 จำนวนเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ที่เพาะในสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางความเข้มข้น 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่ม 2xMBC) ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง 49

ตารางที่ 8 จำนวนเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ในหน่วย logCFU/ml ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง 50

ตารางที่ 9 จำนวนเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ที่เพาะในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 (กลุ่มควบคุม) ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง 51

ตารางที่ 10 จำนวนเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ที่เพาะในสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง ความเข้มข้น 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่ม 1xMFC) ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง 52

ตารางที่ 11 จำนวนเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ซึ่งเพาะในสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่ม 2xMFC) ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง 53

ตารางที่ 12 จำนวนเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ในหน่วย logCFU/ml ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง 54

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
ที่มาและความสำคัญ

ที่มาและความสำคัญ

ในช่องปากของคนเราสามารถพบเชื้อจุลชีพได้หลายชนิดไม่ว่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อรา โดยเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคในช่องปาก สำหรับในเด็กพบว่าโรคฟันผุเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยและมีผลกระทบต่อสุขภาพโดยรวมของเด็ก โดยจะส่งผลถึงคุณภาพชีวิตของเด็กด้วย พบว่าในเด็กปฐมวัยหากมีฟันผุจะมีน้ำหนักและส่วนสูงต่ำกว่าเด็กที่ไม่มีฟันผุ เนื่องจากการเกิดฟันผุทำให้เกิดความเจ็บปวดและมีการติดเชื้อของฟัน เด็กจะรับประทานอาหารได้น้อยลง รบกวนการนอนหลับ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเด็ก[1] และพบว่าภายหลังจากการบูรณะฟัน เด็กมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น[2] จากการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติครั้งที่ 7 ในปี พ.ศ.2555[3] พบว่าในเด็กอายุ 3 ปี ซึ่งเป็นวัยที่มีฟันน้ำนมขึ้นครบในช่องปาก มีความชุกในการเกิดโรคฟันผุ สูงถึงร้อยละ 51.8 และมีค่าเฉลี่ยฟันผุ ถอน อุด 2.7 ซี่ต่อคน สถานการณ์และการกระจายของโรคฟันผุในเด็กอายุ 5 ปีเป็นไปในรูปแบบเดียวกันกับในเด็กอายุ 3 ปี แต่อัตราการเกิดโรคฟันผุสูงกว่าชัดเจนมากแค่เพียงช่วงเวลา 2 ปีที่ต่างกัน กลับพบอัตราการเกิดโรคฟันผุสูงถึงร้อยละ 78.5 มีค่าเฉลี่ยฟันผุ ถอน อุด 4.4 ซี่ต่อคน

สาเหตุของการเกิดโรคฟันผุเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน หนึ่งในปัจจัยเหล่านั้นคือเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อแบคทีเรียจะใช้น้ำตาลในการสร้างกรด เกิดการละลายของเคลือบฟัน พบว่าเชื้อในกลุ่มสเตร็ปโตคอกไค (Streptococci) เป็นเชื้อซึ่งพบได้บ่อยที่สุดในช่องปาก และกลุ่มเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแรก (pioneer หรือ early colonizers) ที่เริ่มต้นเข้ามาเกาะกลุ่มบริเวณผิวเคลือบฟันซึ่งมีแผ่นคราบน้ำลาย (pellicle) เคลือบอยู่ก็มักจะเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มสเตร็ปโตคอกไคด้วยเช่นกัน ได้แก่ สเตร็ปโตคอกคัส แซงกวินิส (*Streptococcus sanguinis*) สเตร็ปโตคอกคัส กอร์โดไน (*Streptococcus gordonii*) สเตร็ปโตคอกคัส ออรัลลิส (*Streptococcus oralis*) และสเตร็ปโตคอกคัส ไมติส (*Streptococcus mitis*)[4]

จากการศึกษาเชื้อแบคทีเรียในช่องปากพบว่าเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส แซงกวินิส (*S. sanguinis*) มีความสามารถในการสร้างเอกซ์ทราพอลิแซ็กคาไรด์ (extracellular polysaccharide) จากน้ำตาล

เกาะบนผิวฟันและเปรียบเสมือนสะพานให้เชื้อจุลชีพชนิดอื่นมาเกาะเกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ ก่อให้เกิดโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบตามมา[5] โดยนอกจากเชื้อเหล่านี้จะมายึดเกาะที่บริเวณผิวฟันแล้วทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์ ยังพบว่าเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส แซงกวินิส (*S. sanguinis*) สเตร็ปโตคอกคัส กอร์โดไน (*S. gordonii*) สเตร็ปโตคอกคัส ไมติส (*S. mitis*) และสเตร็ปโตคอกคัส ออรัลลิส (*S. oralis*) มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเยื่อบุหัวใจอักเสบจากการติดเชื้อ (infective endocarditis) โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ได้รับการใส่ลิ้นหัวใจเทียม (prosthetic valve)[6] และพบได้บ่อยว่าเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ไมติส (*S. mitis*) และสเตร็ปโตคอกคัส ออรัลลิส (*S. oralis*) เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ได้แก่ ผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ หรือผู้ป่วยมะเร็ง[7]

เป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่าเชื้อในกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอกไค (Mutans streptococci) มีความสัมพันธ์กับการเกิดฟันผุ โดยชนิดที่พบได้บ่อยที่สุด คือ เชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) และสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*Streptococcus sobrinus*) ดังเห็นได้จากการศึกษาในเด็กปฐมวัยที่พบว่าในเด็กที่มีฟันผุ จะมีเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) สูงกว่าเด็กที่ไม่มีฟันผุ[8] ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกับอีกการศึกษาที่พบว่าในเด็กที่ไม่มีฟันผุ มีความชุกของเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) ต่ำ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ของเด็กก่อนวัยเรียน พบว่าเด็กที่ตรวจพบเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) และสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) ในคราบจุลินทรีย์ มีโอกาสเกิดฟันผุสูงกว่าเด็กที่พบเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) เพียงชนิดเดียว[9, 10] จากการศึกษาด้วยวิธีทางโมเลกุลยังพบเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่สัมพันธ์กับการเกิดฟันผุ ได้แก่ สเตร็ปโตคอกคัส ซาไลวาเรียส (*Streptococcus salivarius*) สเตร็ปโตคอกคัส พาราแซงกวินิส (*Streptococcus parasanguinis*) ไบฟิโดแบคทีเรียม (*Bifidobacterium* spp.) เวลโลเนลลา (*Veillonella* spp.) แลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus* spp.) แอกทิโนไมซิส (*Actinomyces* spp.) รวมถึงเชื้อแคนดิดา (*Candida* spp.)[11] มีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเด็กที่มีฟันผุ และไม่มีฟันผุ พบว่าเด็กที่มีฟันผุจะพบเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*) สูงกว่าเด็กที่ไม่มีฟันผุ โดยพบว่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์มีศักยภาพในการสร้างกรดได้สูงและสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (biofilm formation) อันเป็นผลจากการรับประทานอาหารจำพวกน้ำตาล และยังมีหลักฐานอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) สามารถก่อให้เกิดฟันผุได้[12]

นอกจากเกี่ยวข้องกับการเกิดฟันผุแล้วเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) ยังเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคเชื้อราในช่องปากอีกด้วย (oral thrush or oropharyngeal candidiasis) อาการแสดงจะเห็นเป็นฝ้าขาว (white patches) คล้ายคราบนม บริเวณด้านบนของลิ้นและเยื่อเมือกด้านในกระพุ้งแก้ม หลังจากขูดฝ้าขาวอาจจะพบเนื้อเยื่อสีแดงและพบเลือดออกได้ ซึ่งเป็นโรคที่พบได้บ่อยในเด็ก โดยเฉพาะในวัยทารก[13] และในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยมะเร็ง รวมถึงผู้ป่วยโรคเอดส์ มีรายงานการเกิดโรคติดเชื้อราในช่องปากของผู้ป่วยมะเร็งทั้งในเด็ก และวัยรุ่นพบว่าสูงถึงร้อยละ 69.35% ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการติดเชื้อทางระบบ และเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้[14] โดยนอกจากเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) แล้ว ยังพบเชื้อราชนิดอื่นที่มีความสำคัญในการก่อโรคในช่องปาก ซึ่งได้แก่ แคนดิดา ทรอปิคาลิส (*Candida tropicalis*) แคนดิดา พาราไซโลสิส (*Candida parapsilosis*) แคนดิดา ครูซิไอ (*Candida krusei*) แคนดิดา กลาบราตา (*Candida glabrata*) แคนดิดา ดับลิเนียนสิส (*Candida dubliniensis*) และแคนดิดา กิลเลียร์มอนดิไอ (*Candida guilliermondii*) ซึ่งเชื้อเหล่านี้สามารถพบได้ทั่วไปในช่องปาก แต่จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำและสามารถทำให้เกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้[14]

การป้องกันฟันผุ สามารถทำได้หลายวิธี ไม่ว่าจะเป็นวิธีทางกล ซึ่งได้แก่การแปรงฟันอย่างถูกวิธี ร่วมกับการใช้ไหมขัดฟันทำความสะอาดซอกฟันในการกำจัดแผ่นคราบจุลินทรีย์ (dental plaque) ซึ่งนำไปสู่การหยุดและชะลอการเกิดฟันผุในระยะเริ่มแรก นอกจากวิธีทางกลแล้วในปัจจุบันการใช้สารต้านจุลชีพ (antimicrobial agents) เพื่อลดปริมาณเชื้อที่เป็นสาเหตุของ โรคฟันผุและการเกิดโรคปริทันต์ก็เป็นที่นิยมกันมากเช่นกัน สารเคมีที่ใช้กันบ่อย ได้แก่ คลอเฮกซิดีน (chlorhexidine)[15] และโพวิโดน ไอโอดีน ความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% povidone-iodine)[16] เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามสารต้านจุลชีพเหล่านี้ก็ยังมีข้อด้อย ได้แก่ ทำให้ฟันติดสี เป็นพิษต่อเซลล์ยึดปริทันต์ (human periodontal cell) ยับยั้งการสร้างโปรตีน ส่งผลกระทบต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และเนื้อเยื่อที่มีชีวิต นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดอาการแพ้ได้[17, 18] ดังนั้นการศึกษาหาสารต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพดีขึ้น ผลข้างเคียงลดลงจึงยังเป็นที่ต้องการ

ปัจจุบันการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของพืชสมุนไพรมีมากขึ้น โดยย่านางเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจ และนำมาใช้เป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ ย่านางมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels อยู่ในวงศ์ Menispermaceae รากของย่านางเป็นหนึ่งในส่วนประกอบของตำรับยาเบญจโลกวิเชียร หรือยาห้าราก[19] สรรพคุณของรากย่านางมีฤทธิ์ในการลด

ไข้ และบรรเทาอาการปวด[20] และจากการทดสอบด้านความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง เมื่อฉีดสารสกัดด้วยน้ำของใบย่านางในหนูไม่พบความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) และความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง (subchronic toxicity)[21] นอกจากนี้การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของย่านาง พบว่ารากย่านางสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต หรือทำลายเชื้อจุลชีพก่อโรคได้หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) บาซิลลัส ซีเรียส (*Bacillus cereus*) เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) [22] และไมโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส (*Mycobacterium tuberculosis*) เป็นต้น[23, 24] และเชื้อรา[23] รวมถึงเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*)[25] ซึ่งจากคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโต หรือทำลายเชื้อจุลชีพนี้ จึงนำมาซึ่งแนวคิดที่จะนำสารสกัดจากรากย่านางมาศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพต่อเชื้อที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดคราบจุลินทรีย์ โรคฟันผุ และเชื้อแคนดิดาที่พบได้ในช่องปาก

คำถามการวิจัย

สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ (cariogenic streptococci) และเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสในช่องปาก (oral opportunistic pathogens) ได้หรือไม่

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อเชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ (cariogenic streptococci) และเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสในช่องปาก (oral opportunistic pathogens)

สมมติฐานของการวิจัย

สมมติฐานหลัก (H_0) : สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางไม่สามารถยับยั้งหรือทำลาย

- เชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ (cariogenic streptococci)
- เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสในช่องปาก (oral opportunistic pathogens)

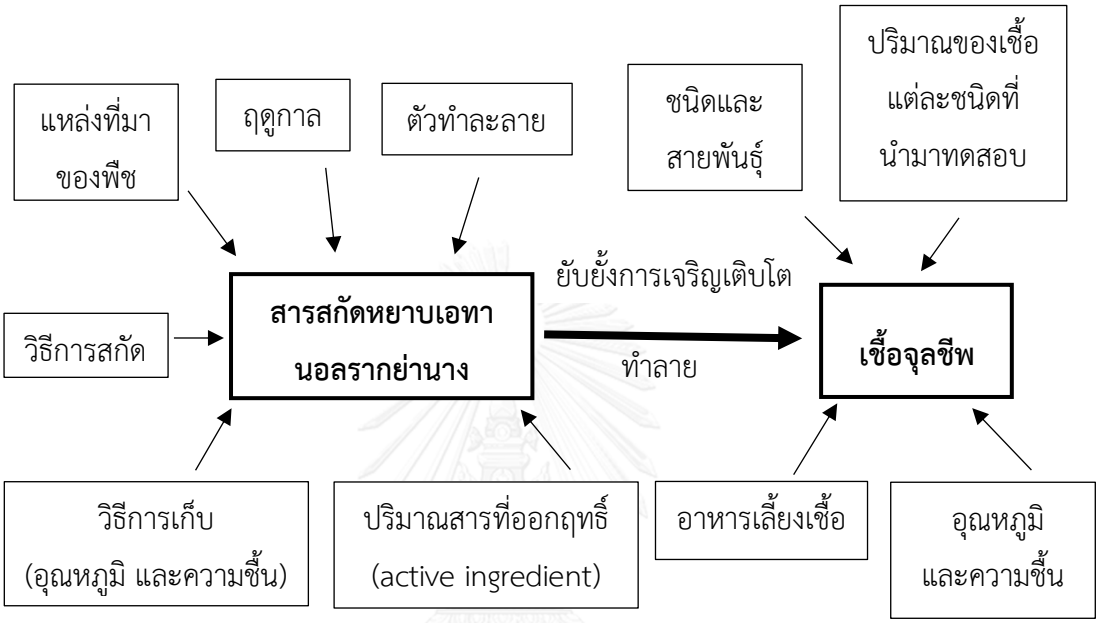
สมมติฐานรอง (H_a) : สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางสามารถยับยั้ง หรือทำลาย

- เชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ (cariogenic streptococci)
- เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสในช่องปาก (oral opportunistic pathogens)

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (Laboratory experimental research)

กรอบแนวคิดการวิจัย



ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ (Cariogenic streptococci) และเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสในช่องปาก (Oral opportunistic pathogens) โดยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น (Agar well diffusion) ดูการเกิดโซนยับยั้ง (Zone of inhibition) เมื่อพบว่าเกิดโซนยับยั้ง จึงทำการศึกษาต่อโดยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น (Broth microdilution) เพื่อหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่สามารถยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibitory concentration; MIC), ทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration; MBC) และทำลายเชื้อรา (Minimal fungicidal concentration, MFC) หลังจากนั้นจึงทำการทดสอบด้วยวิธีไทม์คิล (Time kill analysis) เพื่อหาระยะเวลาที่สั้นที่สุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการทำลายเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้

ข้อจำกัดการวิจัย

1. สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ ได้จากการสกัดจากผงรากย่านางเพียงแหล่งเดียว และนำไปทดสอบโดยกำหนดค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ แต่ไม่ได้มีการกำหนดปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบนั้น ดังนั้นฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพอาจจะเหมือนหรือแตกต่าง กับสารสกัดหยาบที่ได้จากแหล่งอื่น หรือจากการสกัดครั้งอื่นได้ถึงแม้จะใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากัน
2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการศึกษานี้เป็นการทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เชื้อชนิดเดียว (single species) และเป็นเชื้อที่อยู่ในลักษณะล่องลอยเป็นอิสระ (planktonic cells) ซึ่งแตกต่างจากสภาวะจริงในช่องปาก ดังนั้นผลการศึกษาจึงไม่สะท้อนสภาวะจริงในช่องปากได้อย่างสมบูรณ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นแนวทางในการพัฒนาสารสกัดจากรากย่านาง เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรคในช่องปากต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

เชื้อจุลชีพในช่องปาก

แรกเริ่มช่องปากของเด็กในวัยทารกจะปราศจากเชื้อจนกระทั่งเวลาผ่านไปประมาณ 6 ชั่วโมง พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลชีพในช่องปากอย่างรวดเร็ว โดยสามารถพบเชื้อจุลชีพได้หลายชนิด (มากกว่า 750 ชนิด) อยู่รวมกันเป็นชุมชน กลุ่มเชื้อจุลชีพที่พบได้บ่อยในช่องปาก ได้แก่ เชื้อสเตร็ปโตคอกไค ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีลักษณะรูปร่างกลม สามารถจำแนกโดยการเปรียบเทียบลำดับของยีน อาร์-อาร์เอ็นเอ ชนิด 16S (16S rRNA) แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแองจิโนซัส (Anginosus group) กลุ่มไมติส (Mitis group) กลุ่มมิวแทนส์ (Mutans group) กลุ่มซาไลวาเรียส (Salivarius group) กลุ่มแซงกวินิส (Sanguinis) และกลุ่มโบวิส (Bovis group)[26] เมื่อเชื้อจุลชีพเหล่านี้ไปเกาะกลุ่มหรือตั้งถิ่นฐานบริเวณผิวฟัน เหงือก และลิ้น จะก่อให้เกิดเป็นไบโอฟิล์ม[27]

กระบวนการเกิดไบโอฟิล์มเกิดจากกลุ่มเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแรกที่ทำหน้าที่ในการเริ่มต้นเข้ามาเกาะกลุ่มบริเวณผิวเคลือบฟันซึ่งมีแผ่นคราบน้ำลายเคลือบอยู่ มักจะเป็นกลุ่มสเตร็ปโตคอกไค ซึ่งได้แก่ สเตร็ปโตคอกคัส แซงกวินิส (*S. sanguinis*) สเตร็ปโตคอกคัส ไมติส (*S. mitis*) สเตร็ปโตคอกคัส กอร์โดไน (*S. gordonii*) และสเตร็ปโตคอกคัส ออรัลลิส (*S. oralis*) พบว่าภายหลังจากการเกิดไบโอฟิล์ม 1 วัน สามารถตรวจพบปริมาณของเชื้อสเตร็ปโตคอกไคได้สูงถึงร้อยละ 40.8[28] นอกจากนี้ยังพบเชื้อแอกทิโนไมซิส (*Actinomyces* spp.) เวลโลเนลลา (*Veillonella* spp.) และไนซีเรีย (*Neisseria* spp.) บริเวณผิวฟันที่เพิ่งได้รับการทำความสะอาดมาใหม่ ๆ ซึ่งจัดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่เข้ามาตั้งถิ่นฐานเป็นกลุ่มแรก ๆ เช่นกัน[29, 30] เชื้อสเตร็ปโตคอกคัส แซงกวินิส (*S. sanguinis*) มีความสามารถในการสร้างเอกซ์ทราพอลิแซ็กคาไรด์จากน้ำตาลซูโครสซึ่งก็คือ กลูแคน ชนิดที่ไม่ละลายน้ำ สำหรับใช้ในการยึดเกาะบนผิวฟัน และเปรียบเสมือนสะพานให้เชื้อจุลชีพชนิดอื่นมาเกาะ เกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ ก่อให้เกิดโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบตามมา[5] มีรายงานพบว่าเชื้อในกลุ่มสเตร็ปโตคอกไค ได้แก่ สเตร็ปโตคอกคัส แซงกวินิส (*S. sanguinis*) สเตร็ปโตคอกคัส กอร์โดไน (*S. gordonii*) สเตร็ปโตคอกคัส ไมติส (*S. mitis*) และสเตร็ปโตคอกคัส ออรัลลิส (*S. oralis*) มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเยื่อบุหัวใจอักเสบจากการติดเชื้อโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ได้รับการใส่ลิ้นหัวใจเทียม[6] ซึ่งพบว่าสเตร็ปโตคอกคัส แซงกวินิส (*S. sanguinis*) พบได้บ่อยที่สุดว่าเป็นสาเหตุ

ของการเกิดโรคเยื่อบุหัวใจอักเสบจากการติดเชื้อ[31] สำหรับเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ไมติส (*S. mitis*) และสเตร็ปโตคอกคัส ออรัลลิส (*S. oralis*) พบได้บ่อยว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ได้แก่ ผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ หรือผู้ป่วยมะเร็ง เป็นต้น[7] โดยมีรายงานว่าผู้ป่วยที่มีการปลูกถ่ายไขกระดูก พบว่า สเตร็ปโตคอกคัส ไมติส (*S. mitis*) สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดได้โดยสัมพันธ์กับการพบเนื้อเยื่อเมือกอักเสบรุนแรง (severe mucositis)[32]

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่า เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดฟันผุ คือเชื้อในกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอกไค (Mutans streptococci) โดยเฉพาะเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) และสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) พบได้บ่อยว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคฟันผุ[5] ซึ่งจากการศึกษาทางชีวเคมี และทางชีวโมเลกุล พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดฟันผุ จะมีคุณสมบัติ[33] ดังนี้

- สามารถเปลี่ยนอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต เป็นกรดได้อย่างรวดเร็ว (acidogenicity)
- มีความสามารถในการทนต่อกรด (aciduric)
- มีความสามารถในการสร้างเอกซ์ทราพอลิแซ็กคาไรด์ คือ สามารถสร้างกลูแคนชนิดที่ไม่ละลายน้ำ
- สามารถสะสมอินทราพอลิแซ็กคาไรด์ (intracellular polysaccharide) เพื่อนำมาใช้ผลิตกรดเมื่อขาดสารอาหารภายนอก

จากการติดตามผลระยะยาวในเด็กไทยตั้งแต่แรกเกิดจนถึงอายุ 24 เดือน สามารถพบเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอกไคได้ตั้งแต่อายุ 3-24 เดือน และจะพบปริมาณเชื้อสูงในช่วงอายุ 18-24 เดือน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดฟันผุ โดยจากการศึกษาดังกล่าวสามารถพบว่าเกิดฟันผุได้เร็วที่สุดหลังจากฟันซี่แรกขึ้นเมื่ออายุประมาณ 8 เดือน[34, 35] นอกจากนี้ยังมีรายงานในเด็กอายุ 17 เดือน ที่ตรวจพบเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอกไคในคราบจุลินทรีย์และน้ำลาย สามารถตรวจพบฟันผุได้ครั้งแรกเมื่ออายุประมาณ 22 เดือน[36] จากการศึกษาคราบจุลินทรีย์และน้ำลายของเด็กที่เป็นโรคฟันผุปฐมวัย พบว่ามีจำนวนสเตร็ปโตคอกคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) ปริมาณสูงโดยพบประมาณร้อยละ 30-40 ของคราบจุลินทรีย์ และร้อยละ 10 ในน้ำลาย โดยปริมาณของเชื้อจะเพิ่มสูงขึ้นตามอายุ และสัมพันธ์กับจำนวนของรอยผุในช่องปาก[34] ซึ่งไปในทิศทางเดียวกับอีกการศึกษาหนึ่ง โดยพบว่าเด็กที่เป็นโรคฟันผุปฐมวัยอย่างรุนแรง (severe early childhood caries) มีปริมาณเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) และเชื้อในกลุ่มสเตร็ปโตคอกไคชนิดอื่น ๆ ค่อนข้างสูง[37] และพบว่าร้อยละ 83.3 ของเด็กที่เป็นโรคฟันผุปฐมวัยระดับรุนแรงจะสามารถตรวจพบเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส มิวแทนส์

(*S. mutans*) และสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) ทั้งในน้ำลายและในคราบจุลินทรีย์สูงกว่าเด็กที่ไม่มีฟันผุ[38] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเชื้อแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ของเด็กก่อนวัยเรียน พบว่าเด็กที่พบเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) และสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) ในคราบจุลินทรีย์ มีโอกาสเกิดฟันผุสูงกว่าเด็กที่พบเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) เพียงชนิดเดียว แต่จากการศึกษาด้วยวิธีทางโมเลกุลพบว่านอกจากเชื้อในกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอกไค ยังพบเชื้อเวลโลเนลลา (*Veillonella* spp.) แอกทิโนไมซิส (*Actinomyces* spp.) ไบฟิโดแบคทีเรีย (*Bifidobacterium* spp.) แลคโตบาซิลลัส เฟอร์เมนตัม (*L. fermentum*) และเชื้อแคนดิดา (*Candida* spp.) ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุในเด็กปฐมวัยเช่นกัน[11, 39] โดยในรอยผุระยะเริ่มแรกตลอดจนถึงรอยโรคขาวขุ่น สามารถพบเชื้อแอกทิโนไมซิส และกลุ่มที่ไม่ใช่มิวแทนส์ สเตร็ปโตคอกไคในระดับที่สูงกว่าระยะอื่นๆ[40] สำหรับรอยผุในชั้นเนื้อฟันและบริเวณรอยโรคขาวขุ่น จะพบปริมาณเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซาไลวาเรียส (*S. salivarius*) และสเตร็ปโตคอกคัส พาราแซงกวินิส (*S. parasanguinis*) ได้ในปริมาณสูง[40] นอกจากนี้บริเวณรอยผุลึกในชั้นเนื้อฟัน พบว่า ปริมาณเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) สูง โดยเฉพาะในชุดฟันน้ำนม ซึ่งเชื้อเหล่านี้สามารถที่จะผลิตกรดซึ่งเป็นสาเหตุของโรคฟันผุ[40] โดยเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซาไลวาเรียส (*S. salivarius*) สามารถพบในช่องปากของเด็กทารกตั้งแต่อายุ 1 วัน โดยเฉพาะบริเวณด้านบนของลิ้น (dorsum of tongue) และสามารถพบได้ในน้ำลาย แต่จะไม่พบบริเวณผิวฟัน[41]

นอกจากเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากแล้ว ยังสามารถพบเชื้อราได้เช่นกัน เชื้อราที่พบได้บ่อยในช่องปาก คือ เชื้อแคนดิดา ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถพบได้ทั่วร่างกาย มีมากกว่า 150 ชนิด ชนิดที่พบในช่องปาก และมีความสำคัญในการก่อโรค ได้แก่ แคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) แคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) แคนดิดา พาราไซโลสิส (*C. parapsilosis*) แคนดิดา ครูซิไอ (*C. krusei*) แคนดิดา กลาบราตา (*C. glabrata*) แคนดิดา ดับลิเนียนสิส (*C. dubliniensis*) และแคนดิดา กิลเลียร์มอนดิไอ (*C. guilliermondii*)[42]

เชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) สามารถพบได้เป็นปกติโดยไม่ก่อให้เกิดโรค และพบได้ในเด็กโดยในเด็กวัยทารกที่อายุน้อยกว่า 1 ปีที่มีสุขภาพดีสามารถพบเชื้อแคนดิดา ประมาณร้อยละ 45-65[43] ซึ่งแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) เป็นเชื้อที่พบมากที่สุด ถึงแม้ว่าเชื้อแคนดิดาจะเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในช่องปาก แต่จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ มีการสำรวจเปรียบเทียบปริมาณของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) ระหว่างคนที่มีสุขภาพดี

(healthy people) และผู้ป่วยที่นอนโรงพยาบาล (hospital patients) จะพบว่าผู้ป่วยที่นอนโรงพยาบาลจะมีปริมาณเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) ที่สูงกว่าคนที่มีสุขภาพดี[42] โดยคนที่มีสุขภาพดีสามารถพบเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) ได้ประมาณร้อยละ 31-55 ขณะที่ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อจะพบเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) สูงถึงร้อยละ 70-80 สำหรับเชื้อแคนดิดา กลาบราตา (*C. glabrata*) และแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) จะพบเพียงร้อยละ 5 ถึง 8 เท่านั้น[44] นอกจากนี้ยังพบว่าเด็กที่มีฟันผุสามารถตรวจพบเชื้อราได้ โดยเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) เป็นเชื้อที่พบมากที่สุด ตามด้วยเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) และเชื้อแคนดิดา ครูซิไอ (*C. krusei*) [45] จากการศึกษาเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุ มีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเด็กที่มีฟันผุ และไม่มีฟันผุ พบว่าเด็กที่มีฟันผุจะพบเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) สูงกว่าเด็กที่ไม่มีฟันผุ โดยพบว่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) มีศักยภาพในการสร้างกรดได้สูงและสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้โดยไปยึดเกาะกับผิวฟัน และมีรายงานว่าเชื้อราแคนดิดา สามารถไปเกาะกลุ่มกับเชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตคอกคัสที่พบได้ในช่องปาก[12]

นอกจากเกี่ยวข้องกับการเกิดฟันผุแล้วเชื้อแคนดิดา ยังเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อราในช่องปากอีกด้วยซึ่งสามารถพบได้บ่อยในเด็ก ผู้สูงอายุ และผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ โดยเชื้อที่พบได้บ่อยว่าเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อราในช่องปาก ได้แก่ แคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) พบได้สูงถึงร้อยละ 69.35 รองลงมาได้แก่ แคนดิดา พาราไซโลสิส (*C. parapsilosis*) พบร้อยละ 14.89 แคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) พบร้อยละ 12.77 แคนดิดา ครูซิไอ (*C. krusei*) พบร้อยละ 4.26 แคนดิดา กลาบราตา (*C. glabrata*) พบร้อยละ 2.13[14] และแคนดิดา ดับลิเนียนสิส (*C. dubliniensis*) ซึ่งสามารถตรวจพบในผู้ป่วยโรคเอดส์ที่มีการติดเชื้อราในช่องปาก[46] และมีรายงานพบว่าเชื้อแคนดิดา ครูซิไอ (*C. krusei*) แคนดิดา กลาบราตา (*C. glabrata*) แคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) และแคนดิดา ดับลิเนียนสิส (*C. dubliniensis*) สามารถเกิดการดื้อต่อยาต้านเชื้อราได้อีกด้วย[14]

โรคฟันผุในเด็กปฐมวัย

โรคฟันผุ เป็นโรคที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะในเด็กมักจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังจากฟันขึ้น จากผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 7 พ.ศ. 2555 พบว่าเด็กไทยอายุ 3 ปีมีอัตราการ

เกิดฟันผุร้อยละ 51.8 โดยมีฟันผุเฉลี่ยประมาณ 2.7 ซี่ต่อคน และในเด็กอายุ 5 ปี พบว่าสถานการณ์และการกระจายของโรคเป็นไปในรูปแบบเดียวกันกับที่พบเด็กอายุ 3 ปี แต่อัตราการเกิดโรคฟันผุสูงขึ้นอย่างชัดเจนภายในระยะเวลาเพียง 2 ปี โดยพบอัตราการเกิดโรคฟันผุในเด็กอายุ 5 ปีสูงถึงร้อยละ 78.5 และมีค่าเฉลี่ยฟันผุ ถอน อุด อยู่ที่ 4.4 ซี่ต่อคน[3] จากผลการสำรวจจะเห็นได้ว่าโรคฟันผุในเด็กปฐมวัยยังคงเป็นปัญหาทางทันตสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย

การเกิดโรคฟันผุในเด็กปฐมวัยส่งผลกระทบต่อสุขภาพโดยรวม และคุณภาพชีวิตของเด็ก พบว่าฟันผุที่ไม่ได้รับการรักษาจะทำให้เกิดการติดเชื้อของฟัน ซึ่งเป็นสาเหตุของความเจ็บปวด และความรู้สึกไม่สบาย ทำให้เด็กรับประทานอาหารได้น้อยลง ส่งผลให้น้ำหนักตัวลดลง นำไปสู่การขาดสารอาหารได้ หากปล่อยทิ้งไว้นาน ก็จะมีโอกาสทำให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงจนต้องเข้าโรงพยาบาล และเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้[1]

จากการศึกษาของ Acs และคณะ[47] แสดงให้เห็นว่าในเด็กอายุ 3 ปี ที่มีฟันผุ และมีฟันผุทะลุโพรงประสาทฟันอย่างน้อย 1 ซี่ จะมีน้ำหนักน้อยกว่าเด็กที่ไม่มีฟันผุ ประมาณ 1 กิโลกรัม และเด็กที่มีน้ำหนักน้อยกว่าร้อยละ 80 ของน้ำหนักปกติ พบว่าเป็นเด็กที่มีฟันผุสูงถึงร้อยละ 7.1 ในขณะที่เด็กที่ไม่มีฟันผุ พบเพียงร้อยละ 0.7 ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาในประเทศตุรกี[48] ที่แสดงให้เห็นว่าเด็กที่มีฟันผุ จะมีน้ำหนัก และส่วนสูงต่ำกว่าเด็กที่ไม่มีฟันผุอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนี้เด็กที่มีฟันผุมาก หรืออยู่ในระดับที่รุนแรง ทำให้มีการสูญเสียฟันไปก่อนกำหนด จะส่งผลกระทบต่อการบดเคี้ยว ฟันแท้อาจไม่มีที่ขึ้น หรือฟันแท้ขึ้นซ้อนเก[48] ในเด็กที่มีการสูญเสียฟันหน้าน้ำนมบนตั้งแต่อายุน้อย ๆ จะมีผลต่อพัฒนาการทางการพูด ความสวยงาม และความเชื่อมั่นในตนเองของเด็กด้วย[49] นอกจากนี้ยังพบว่าเด็กที่มีฟันผุสูง มีความเสี่ยงของการเข้ารับการรักษาแบบฉุกเฉิน และต้องนอนโรงพยาบาลบ่อย ทำให้ต้องลาโรงเรียน หรือขาดเรียนบ่อย ๆ ส่งผลให้ความสามารถในการเรียนรู้ลดลง[50-52] โดยผลของการเกิดฟันผุ ไม่เพียงส่งผลต่อพัฒนาการของการเรียนรู้ของเด็กเท่านั้น แต่ยังส่งผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจของผู้ปกครองอีกด้วย เนื่องจากการรักษาทางทันตกรรมจะมีความซับซ้อนมากกว่าปกติ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาค่อนข้างสูง ซึ่งค่ารักษาที่เพิ่มมากขึ้นนี้ ก็เป็นอุปสรรคสำคัญที่ทำให้ผู้ปกครองส่วนหนึ่งไม่สามารถพาเด็กมารับการรักษาได้จนเสร็จสมบูรณ์ ทำให้โรคยังคงมีการดำเนินต่อไปและมีความรุนแรงมากขึ้น[53]

โรคติดเชื้อราในช่องปาก

โรคติดเชื้อราในช่องปาก (Oral thrush or oropharyngeal candidiasis) เป็นโรคที่พบได้บ่อย อาการแสดงจะเห็นเป็นฝ้าขาวคล้ายคราบนม บริเวณด้านบนของลิ้น เยื่อเมือกด้านในกระพุ้งแก้ม หรือริมฝีปาก เพดานอ่อนและเพดานแข็ง หลังจากขูดฝ้าขาวอาจจะพบเนื้อเยื่อสีแดงและพบเลือดออกได้ ร้อยละ 90 ของผู้ป่วยจะไม่มีอาการปวด หรือเจ็บ โรคติดเชื้อราในช่องปากมักพบได้บ่อยในเด็ก ผู้สูงอายุ และในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยมะเร็ง รวมถึงผู้ป่วยโรคเอดส์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีปัจจัยต่างๆ ที่ส่งเสริมการเกิดโรคติดเชื้อรา[54] ได้แก่ ภาวะเบาหวาน การใช้ยาที่มีผลต่อการไหลของน้ำลาย การรักษามะเร็งด้วยรังสี หรือเคมีบำบัด ภาวะทุพโภชนาการ การได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน เป็นต้น

จากการศึกษาของ Russel และคณะ[55] พบว่าร้อยละ 82 ของเด็กวัยทารก ในช่วงอายุ 1 เดือนจะเป็นช่วงที่มีการตั้งถิ่นฐานของเชื้อแคนดิดาสูงสุด และจะน้อยลงเมื่อมีอายุมากขึ้น และเมื่อสำรวจพบว่าเด็กทารกอายุ 8 สัปดาห์ ถึง 18 เดือนจะพบเด็กที่เป็นพาหะของเชื้อแคนดิดาสูงถึงร้อยละ 40 – 54 แต่ในเด็กที่อายุมากขึ้นจะพบเพียงร้อยละ 3 - 36[44] ในเด็กทารกที่พบเชื้อแคนดิดาในช่องปาก จะมีความเสี่ยงของการเกิดโรคติดเชื้อราในช่องปากได้ โดยพบได้ประมาณร้อยละ 10-14 ของเด็กที่เป็นพาหะเชื้อรา[55] และยังพบว่าในเด็กทารก มีโอกาสเกิดการติดเชื้อราในช่องปากชนิดเฉียบพลันได้ เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของเด็กวัยทารกยังไม่พัฒนาเต็มที่[56]

มีรายงานการเกิดโรคติดเชื้อราในช่องปากของผู้ป่วยมะเร็งทั้งในเด็กและวัยรุ่น พบสูงถึงร้อยละ 69.35 ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการติดเชื้อทางระบบ และเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ โดยพบว่าผู้ป่วยเด็กที่เป็นมะเร็งที่มีอายุระหว่าง 7-12 ปี จะมีอุบัติการณ์ (incidence) การเกิดโรคติดเชื้อราในช่องปากสูง เนื่องจากอยู่ในระยะชุดฟันผสม และการมีแผ่นคราบน้ำลายซึ่งเป็นประโยชน์กับเชื้อแคนดิดาในการยึดเกาะกับผิวเยื่อบุ (epithelial surface) รวมถึงผู้ป่วยเด็กเหล่านี้มีสภาวะทางกายภาพอาจส่งผลให้การดูแลสุขอนามัยช่องปากได้ไม่ดี[14]

สำหรับผู้ป่วยโรคเอดส์มีรายงานโรคติดเชื้อราในช่องปากสูงถึงร้อยละ 70 ซึ่งนอกจากเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) ยังพบว่าเชื้อแคนดิดา กลาบราตา (*C. glabrata*) ก็เป็นสาเหตุรองลงมาที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อราในช่องปาก ซึ่งพบได้บ่อยที่สุดบริเวณด้านบนของลิ้น นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ที่บริเวณแก้ม เพดานอ่อน และริมฝีปาก[14, 57]

คลอเฮกซิดีน

คลอเฮกซิดีน เป็นสารต้านจุลชีพที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับในทางทันตกรรม สำหรับใช้ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ในรูปแบบของน้ำยาบ้วนปาก โดยคลอเฮกซิดีนเป็นสารที่มีประจุบวก (cationic agent) จัดอยู่ในกลุ่มบิสไบกัวไนด์ (bisbiguanide) มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียหลายกลุ่มทั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงยีสต์ โดยคลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นต่ำ จะมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (bacteriostatic effect) ในขณะที่ความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ (bacteriocidal effect) โดยทำให้เกิดการตกตะกอน หรือเกิดการแข็งตัวของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) นอกจากนี้ยังพบว่าคลอเฮกซิดีนมีคุณสมบัติในการลดการยึดเกาะเชื้อแบคทีเรียบนผิวฟันได้[58] จากการศึกษาของ Loe และ Schiott[59] พบว่าหลังจากบ้วนปากด้วยคลอเฮกซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เวลา 1 นาที วันละ 2 ครั้ง สามารถการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์บริเวณผิวฟันได้ และไม่ทำให้เกิดเหงือกอักเสบ ซึ่งเกิดจากการที่คลอเฮกซิดีนสามารถไปจับกับผิวเคลือบฟัน หรือแผ่นคราบน้ำลาย มีผลไปขัดขวางการเกาะของแบคทีเรียบนผิวฟัน[60]

กลไกการออกฤทธิ์กับเชื้อแบคทีเรียของคลอเฮกซิดีน[61] เกิดจากประจุบวกของคลอเฮกซิดีนไปจับกับประจุลบบริเวณผิวเซลล์ของแบคทีเรียและถูกดูดซึมเข้าไปในเซลล์ โดยคลอเฮกซิดีนจะไปจับกับฟอสโฟลิปิด (phospholipids) บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (inner cell membrane) ทำให้กลไกควบคุมการซึมผ่านเข้าและออกของสารเปลี่ยนแปลงไป และมีการรั่วซึมขององค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เป็นการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ แต่เมื่อใช้คลอเฮกซิดีนที่มีความเข้มข้นสูง คลอเฮกซิดีนจะออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยทำให้เกิดการตกตะกอนของไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่สามารถผันกลับได้

ถึงแม้ว่าคลอเฮกซิดีน จะเป็นสารต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพได้ดี แต่ก็ยังมีข้อด้อยหลายประการ ซึ่งได้แก่ รสชาติไม่ดี โดยคลอเฮกซิดีนมีรสชาติขม การติดสีที่ตัวฟันจะเกิดคราบสีเหลืองหรือน้ำตาลเกิดขึ้นบนตัวฟันหลังจากการใช้งาน 2-3 วัน พบมากเมื่อใช้คลอเฮกซิดีนที่มีความเข้มข้นสูง การรับรสเปลี่ยนไป การหลุดลอกของเยื่อบุช่องปาก และการเกิดอาการปวดแสบปวดร้อน

ย่านาง

ย่านางเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้เป็นอาหารและยามาตั้งแต่สมัยโบราณ ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae และมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นย่านางเป็นไม้เลื้อย มักจะเกาะเกี่ยวกับไม้ยืนต้นอื่น ใบเป็นใบเดี่ยว รูปร่างคล้ายรูปไข่ หรือรูปไข่ขอบขนานปลายใบเรียว ฐานใบมน มีขนาดใบยาว 5-10 เซนติเมตร กว้าง 2-4 เซนติเมตร สำหรับภาคใต้ของไทยใบย่านางค่อนข้างเรียวยาว และแหลม มีสีเขียวเข้ม มีดอกขนาดเล็กสีเหลือง ผลย่านางมีรูปร่างกลมเล็กมีสีเขียว เมื่อผลแก่กลายเป็นสีเหลืองอมแดง หรือสีแดงสดและกลายเป็นสีดำ มีเมล็ดแข็งรูปเกือกม้า รากมีขนาดใหญ่ โดยย่านางเป็นต้นไม้ที่มีความทนทานปลูกง่าย พบในแหล่งธรรมชาติ ในป่าทั่วไปที่มีความชุ่มชื้น เช่นบริเวณป่าผสมพลัดใบ ป่าดงดิบและป่าโปร่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งภาคอื่นก็มีกระจายทั่วไป ซึ่งในแต่ละภาคจะมีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น ภาคกลางเรียก เถาย่านาง เถาหญ้านาง เถาวัลย์เขียว หญ้าภคินี ภาคเหนือเรียก จ้อยนาง จอยนาง ผักจอยภาค ภาคใต้เรียก ย่านนาง ยานนางขันยอ ยาดนางวันยอ ภาคอีสานเกือบทุกจังหวัด เรียกย่านาง เครือย่านาง ปู่เจ้าเขาเขียว เถาเขียวเครือเขางาม[62-64]

ย่านางมีสรรพคุณในการลดไข้ โดยรากย่านางเป็นหนึ่งในส่วนประกอบของตำรับยาเบญจโลกวิเชียร หรือ ยาห้ารากซึ่งประกอบไปด้วยรากคนทา รากเท้ายายม่อม รากชิงชี่ รากมะเดื่อชุมพร และรากย่านาง[19] สรรพคุณของย่านางนอกจากมีฤทธิ์ในการลดไข้แล้ว พบว่าย่านางมีคุณสมบัติช่วยฟื้นฟูความจำ และสมองที่สูญเสียจากการติดสุรา[65] มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็งอีกด้วย[66] จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบและรากย่านาง พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของใบย่านางมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด[67]

สำหรับฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพของย่านาง พบว่าย่านางสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต หรือทำลายเชื้อจุลชีพก่อโรคได้หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา รวมทั้งเชื้อโปรโตซัว โดยในอดีตมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียของรากย่านาง พบว่าสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลของรากย่านางมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรีย โดยเมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรากย่านาง จะพบอัลคาลอยด์ในส่วนที่ละลายน้ำ (water-soluble portion) และส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble portion) ซึ่งเป็นอัลคาลอยด์ในกลุ่ม bisbenzylisoquinolone สามารถแยกและพิสูจน์ทางโครงสร้างทางเคมี พบสารอัลคาลอยด์ในรากย่านาง ดังนี้ tiliacorinine, tiliacorine และ nor-tiliacorinine A

โดย tiliacorinine และ tiliacorine เป็นอัลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาเลเรีย [25, 68] และพบว่าอัลคาลอยด์ในกลุ่ม bisbenzylisoquinolone จากรากย่านางมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา[24]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมี และประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันระเหยในใบย่านาง[22] โดยใช้วิธีการกลั่นพร้อมสกัด (simultaneous distillation /extraction, SDE) พบว่าใบย่านางมีองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยทั้งหมด 19 ชนิด โดยองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ ได้แก่ isophytol, n-hexadecanoid acid, linoleic acid, beta-ionone, alpha-ionone และ linalool และเมื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธีการ disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยในใบย่านางมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส (*S. aureus*) บาซิลลัส ซีเรียส (*B. cereus*) เอสเชอริเชีย โคไล (*E. coli*) และซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.) โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อเหล่านี้ (MIC) คือ 6.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดย่านางด้วยเอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 95 พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส (*S. aureus*)[69] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของชุตินันท์และคณะ[70] โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวในตำรับยาเบญจโลกวิเชียร หรือยาห้าราก[23] พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพได้ครอบคลุมมากที่สุด และพบว่าสารสกัดของรากย่านางทั้งการสกัดด้วยเอทานอลและด้วยน้ำเป็นเพียงชนิดเดียวเท่านั้นจากตำรับยาเบญจโลกวิเชียรที่มีผลในการต้านเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*)

เนื่องจากย่านางเป็นพืชที่ใช้เป็นอาหารมากันมานาน มีรายงานด้านความปลอดภัย ซึ่งการทดสอบความปลอดภัยของย่านางในสัตว์ทดลอง โดยฉีดสารสกัดด้วยน้ำของใบย่านางในหนูปริมาณ 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วสังเกตอาการเป็นระยะเวลา 14 วัน เพื่อทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน และฉีดสารสกัดด้วยน้ำของใบย่านางในหนูด้วยปริมาณ 300, 600 และ 1,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 90 วัน เพื่อทดสอบเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง ผลจากการทดสอบไม่พบความเป็นพิษเฉียบพลันและความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง[21]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อจุลชีพที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย

- เชื้อสเตร็ปโตคอกคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC 25175
- เชื้อสเตร็ปโตค็อคคัส ซอบรินัส สายพันธุ์ OMZ 176
- เชื้อสเตร็ปโตคอกคัส แซงกวินิส สายพันธุ์ ATCC 10556
- เชื้อสเตร็ปโตคอกคัส กอร์โดไน สายพันธุ์ DMST 2060
- เชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซาไลวาเรียส สายพันธุ์ ATCC 7073T

เชื้อรา

- เชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ สายพันธุ์ ATCC 90028
- เชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส สายพันธุ์ ATCC 750
- เชื้อแคนดิดา พาราไซโลสิส สายพันธุ์ ATCC 90018
- เชื้อแคนดิดา ครูซิไอ สายพันธุ์ ATCC 6258
- เชื้อแคนดิดา กลาบราตา สายพันธุ์ ATCC 2001
- เชื้อแคนดิดา ดับลิเนียนสิส สายพันธุ์ NCPF 3949

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุและสาร

1. สารที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ มีดังนี้
   ก. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น (Brain Heart Infusion broth)
   ข. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น (Brain Heart Infusion agar)
   ค. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซาโบโรด์ เด็กซ์โทรส (Sabouraud dextrose broth)
   ง. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นซาโบโรด์ เด็กซ์โทรส (Sabouraud dextrose agar)

2. น้ำยาบ้วนปากคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ผลิตโดยคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. ผงรากย่านาง
4. สารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95
5. แอบโซลูทเอทานอล (absolute ethanol)
6. น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

อุปกรณ์

1. ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Microflow advanced bio safety cabinet class II)
2. ตู้อบเลี้ยงเชื้อที่บรรยากาศประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร
4. กระดาษกรองมาตรฐาน (whatman filter paper no.1)
5. หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
6. หลอดทดลอง (test tube)
7. เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator)
8. เครื่องชั่งน้ำหนัก
9. เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า
10. เพลทให้ความร้อนและกวนด้วยแม่เหล็ก (IKAMAG, Germany)
11. ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ จานเลี้ยงเชื้อ เข็มรูปห่วง ตะเกียงแอลกอฮอล์
12. เครื่องเขย่า
13. คิวเวตต์ (Cuvette)
14. ออโต้ปิเปต (Auto-pipette) ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
15. ปลายปิเปต (Pipette tip) ขนาด 10, 200, 1000 ไมโครลิตร
16. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง

สกัดสารจากรากย่านางด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

ผงรากย่านางที่ใช้ในการวิจัยนี้ซื้อจากร้านสมุนไพรท่าพระจันทร์ กรุงเทพมหานคร ซึ่งได้รับการพิสูจน์จากรองศาสตราจารย์ ร.ต.อ. หญิง เภสัชกรหญิง ดร. สุชาดา สุขหร่อง ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นนำผงรากย่านาง 1 กิโลกรัม มาแช่ในเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่เตรียมไว้ โดยแช่จนท่วม ปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน นำมากรองด้วยกระดาษกรองมาตรฐาน (whatman filter paper no.1) เอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลาย สำหรับส่วนผงที่เหลือนำมาแช่ต่อในเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 อีกครั้ง ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ในแต่ละครั้งมารวมกัน และนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารด้วยความดันต่ำ (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส จะได้ในส่วนของสารสกัดหยาบ (crude extract) นำสารสกัดหยาบทั้งหมดเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท โดยสารสกัดหยาบที่ได้จะถูกเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดสอบต่อไป

2. การเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง

เตรียมสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20

วิธีการ ชั่งสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง 50 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมแอบโซลูทเอทานอล (absolute ethanol) 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 800 ไมโครลิตร จะได้สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น

สำหรับเชื้อรา ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดซาโบโรด์ เด็กซ์โทรส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น และซาโบโรด์ เด็กซ์โทรสตามคำแนะนำของบริษัท แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้เครื่องนึ่งอบไอน้ำ ภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น นำไปเทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ให้ได้ความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร (ปริมาณ 20 มิลลิลิตร) รอจนแห้ง หากยังไม่ได้ใช้นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำมาใช้ต้องวางจานเพาะเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในอุณหภูมิห้อง และรอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีผิวหน้าที่แห้ง

ในการทดสอบด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นจะถูกเตรียมโดยนำ metal cup ที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาวางบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยวาง 3 ตำแหน่งระยะห่างเท่าๆ กัน จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมไว้แล้วสำหรับทดสอบ (โดยการเพาะไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ประมาณ $9x10^8$ และ $7x10^7$ CFU/ml ตามลำดับ) 500 ไมโครลิตร ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นที่หลอมเหลวไว้แล้ว และอุ่นพอสัมผัสได้ (ประมาณ 50 องศาเซลเซียส) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ให้มีความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร (ปริมาณ 20 มิลลิลิตร) รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้วจึงดึง metal cup ออก เกิดเป็นหลุมสำหรับใส่สารที่ต้องการทดสอบ นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้นี้ไปทดสอบทันที

4. การเตรียมเชื้อจุลชีพ

เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) สายพันธุ์ ATCC 25175 สเตร็ปโตค็อคคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 สเตร็ปโตคอกคัส แซงกวินิส (*S. sanguinis*) สายพันธุ์ ATCC 10556 สเตร็ปโตคอกคัส กอร์โดไน (*S. gordonii*) สายพันธุ์ DMST 2060 และสเตร็ปโตคอกคัส ซาไลวาเรียส (*S. salivarius*) สายพันธุ์ ATCC 7073T ถูกนำมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่นชนิดวุ้น โดยอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เชื้อรา ได้แก่ แคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) สายพันธุ์ ATCC 90028 แคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 แคนดิดา พาราไซโลสิส (*C. parapsilosis*) สายพันธุ์ ATCC 90018 แคนดิดา ครูซิไอ (*C. krusei*) สายพันธุ์ ATCC 6258 แคนดิดา กลาบราตา (*C. glabrata*) สายพันธุ์ ATCC 2001 และแคนดิดา ดับลิเนียนสิส (*C. dubliniensis*) สายพันธุ์ NCPF 3949 ถูก

เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อซาโบโรด์ เด็กซ์โทรสชนิดวุ้น โดยอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

หลังจากนั้นทำการถ่ายโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา 1 โคโลนี มาเพาะต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่นชนิดเหลว และซาโบโรด์ เด็กซ์โทรสชนิดเหลว ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

โดยการทดสอบด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น จะใช้เชื้อที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อจุลชีพ รวมทั้งการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธีไทม์คิลจะใช้เชื้อที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความขุ่นให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 จากนั้นนำมาเพาะต่อจนกระทั่งถึงระยะ log (log phase) ซึ่งก่อนการทดลองจะปรับเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับค่าความขุ่นมาตรฐาน 0.5 แม็คฟาแลนด์ (McFarland standard) หรือมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 (ปริมาณเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ประมาณ 1.5×10^8 และ 4×10^6 CFU/ml ตามลำดับ)

5. การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง

5.1 การทดสอบด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น (Agar well diffusion)

การทดสอบด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น ทดสอบตาม Teanpaisan และคณะ[71, 72] โดยใช้ปิเปตดูดสารที่ต้องการทดสอบชนิดละปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาปล่อยในหลุมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ตามที่กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งสารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง น้ำยาบ้วนปากคลอเฮกซิดีนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นตัวควบคุมบวก และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นตัวควบคุมลบ หลังจากนั้นจึงนำไปอบในตู้อบเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเชื้อแบคทีเรียจะอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ส่วนเชื้อราจะอบในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบเชื้อละ 3 ครั้ง หากพบวงใสรอบหลุมของสารที่ทดสอบ (Zone of inhibition) แสดงว่าสารนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อราที่ใช้ทดสอบ อ่านค่าความกว้างของโซนยับยั้งที่เกิดขึ้น โดยการวัดเส้น

ผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งในหน่วยมิลลิเมตร (รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมใส่สารทดสอบเท่ากับ 6 มิลลิเมตร)

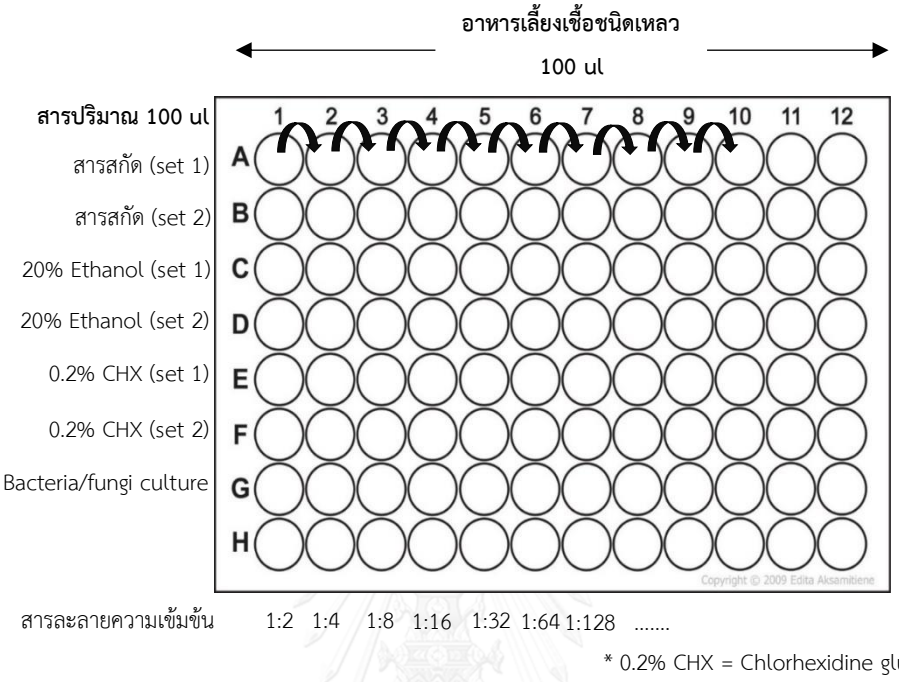
5.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา คือ Minimum inhibitory concentration, MIC สามารถทำการทดสอบได้ด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น โดยทดสอบตาม Teanpaisan และคณะ[73] ซึ่งอ้างอิงวิธีมาตรฐานของ CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [74, 75]

ก่อนการทดลองจะปรับเชื้อในระยะ log ให้มีความขุ่นเท่ากับค่าความขุ่นมาตรฐาน 0.5 แม็คฟาแลนด์ หรือมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่นชนิดเหลว และสำหรับเชื้อราจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซาโบโรด์ เด็กซ์โทรสชนิดเหลว โดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวลงในทุกหลุมของถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96 well plate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารสกัดที่เตรียมไว้สำหรับทดสอบ (สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20) 100 ไมโครลิตรในหลุมแรก ทำการเจือจางทีละ 2 เท่า (2- fold serial dilution) จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 ลดลงไปตามลำดับ (รูปที่ 1) ดังนั้นสารสกัดที่ใช้ทดสอบจะมีความเขมขนสุดท้ายเริ่มตั้งแต่ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางลงไปที่ละ 2 เท่าจนถึง 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นดูดเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเตรียมไว้สำหรับใช้ทดสอบ ใส่ลงไปในหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งสุดท้ายจะมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในแต่ละหลุม เท่ากับ 7.5×10^6 และ 2×10^6 CFU/ml ตามลำดับ แล้วนำไปอบในตู้อบเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเชื้อแบคทีเรียอบในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ส่วนเชื้อราอบในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตความขุ่นของเชื้อ หากพบความขุ่นแสดงว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา หลุมที่ใสแสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หรือค่า MIC ได้จากหลุมทดสอบแรกที่ไม่ขุ่น ทำการทดลองนี้

ซ้ำกัน 3 ครั้ง แล้วรายงานผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราเป็นค่าเฉลี่ย



รูปที่ 1 การเตรียมสารสำหรับทดสอบใน 96 well plate

5.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการทำลายเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

จากการหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา นำมาสู่การหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการทำลายเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ สำหรับเชื้อแบคทีเรียค่าที่ได้ คือ Minimum bactericidal concentration, MBC และสำหรับเชื้อรา ค่าที่ได้คือ Minimum fungicidal concentration, MFC โดยดูดสารละลายผสมแบคทีเรียทุกหลุมที่ใส (หลุมที่อ่านค่า MIC ได้จนถึงหลุมที่มีความเข้มข้นของสารสกัดสูงสุด) หลุมละ 5 ไมโครลิตร มาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นที่เตรียมไว้ แล้วนำไปอบในตู้อบเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยเชื้อแบคทีเรียอบในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ส่วนเชื้อราอบในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการทดลองนี้ 3 ซ้ำ อ่านค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุด

ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการทำลายเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ (MBC และ MFC) โดยเป็นหลุมแรกที่ไม่มีโคโลนีของเชื้อขึ้น

5.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในช่องปาก โดยวิธีไทม์คิล (Time kill analysis)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อจุลชีพ นำมาสู่การหาระยะเวลาในการทำลายเชื้อจุลชีพในช่องปาก โดยทดสอบตาม Teanpaisan และคณะ[73] ซึ่งอ้างอิงวิธีมาตรฐานของ CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [74, 75] โดยก่อนการทดลองจะปรับเชื้อในระยะ log ให้มีความขุ่นเท่ากับค่าความขุ่นมาตรฐาน 0.5 แม็คฟาแลนด์ หรือมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1

นำเชื้อซึ่งเตรียมไว้สำหรับทดสอบไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge MX-305) โดยใช้แรงเหวี่ยงสัมพัทธ์ 15000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงเทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวทิ้งเหลือเฉพาะส่วนของเชื้อที่ตกตะกอนบริเวณก้นหลอดทดลอง แล้วจึงเติมสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1xMBC/1xMFC และ 2xMBC/2xMFC ของเชื้อที่ใช้ทดสอบแต่ละชนิด นำไปอบที่ตู้อบเลี้ยงเชื้อที่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบ หลังจากนั้นทำการเก็บผลการทดลองที่ 0, 30 นาที, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง โดยดูดสารออกมา 100 ไมโครลิตร มาเจือจางความเข้มข้นทีละ 10 เท่า (10-fold serial dilution) แล้วนำเชื้อในแต่ละความเข้มข้นมาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น แล้วนำไปอบในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีเอทานอลร้อยละ 20 เป็นหลอดควบคุมลบ จากนั้นนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่มีชีวิตรอด โดยคำนวณค่าของเชื้อที่นับได้ในหน่วย log CFU/ml และเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อและเวลา ทำการทดลองนี้ซ้ำกัน 3 ครั้ง

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) โดยใช้ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) จากการคำนวณข้อมูลที่ได้ในการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

บทที่ 4
ผลการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง

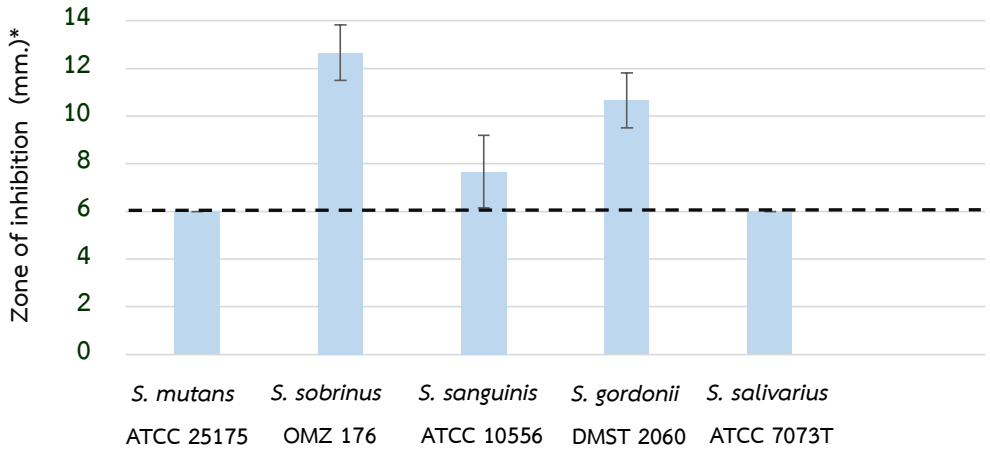
การเตรียมสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางโดยวิธีการสกัดด้วยเอทานอล ทำโดยนำผงรากย่านาง 1 กิโลกรัม มาแช่ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยแช่จนท่วมแล้วปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองมาตรฐาน (Whatman filter paper no.1) เอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลาย สำหรับส่วนผงที่เหลือนำมาแช่ต่อในเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 อีกครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ในแต่ละครั้งมารวมกัน และนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารด้วยความดันต่ำ ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่มีลักษณะเหนียวหนืด และมีสีน้ำตาลเข้ม คิดเป็นผลผลิตร้อยละ (% yield) 2.28 หลังจากได้สารสกัดแล้วก็จะนำสารสกัดนั้นมาละลายในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 20 โดยความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้ คือ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง

2.1 การทดสอบด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น (Agar well diffusion)

เชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางมีฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 สเตร็ปโตคอกคัส แซงกวินิส (*S. sanguinis*) สายพันธุ์ ATCC 10556 และสเตร็ปโตคอกคัส กอร์โดไน *(S. gordonii)* สายพันธุ์ DMST 2060 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 12.67±1.15, 7.67±1.52 และ 10.67±1.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมใส่สารทดสอบเท่ากับ 6 มิลลิเมตร) ในขณะที่เชื้อสเตร็ปโตคอกคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) สายพันธุ์ ATCC 25175 และสเตร็ปโตคอกคัส ซาไลวาเรียส (*S. salivarius*) สายพันธุ์ ATCC 7073T ไม่แสดงลักษณะของโซนยับยั้ง แต่พบลักษณะเป็นวงสีน้ำตาลขุ่น ๆ รอบหลุมทดสอบ (แสดงดังรูปที่ 2)

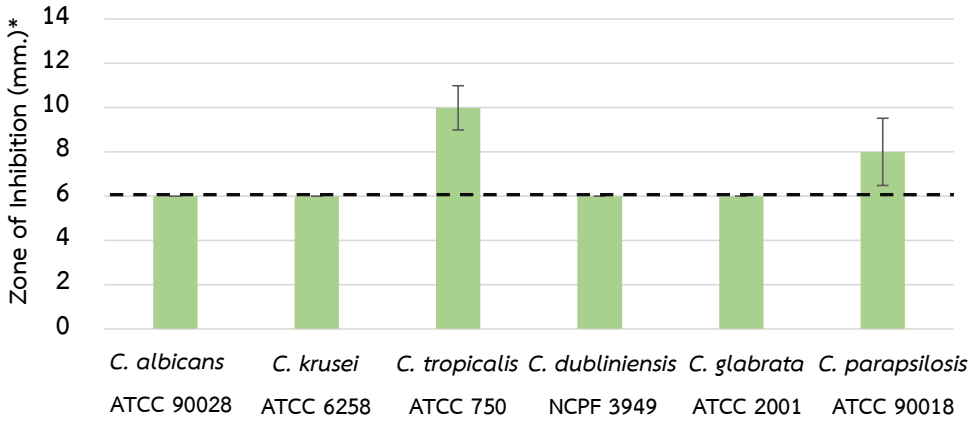


*รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมใส่สารทดสอบเท่ากับ 6 mm.

รูปที่ 2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางโดยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น

เชื้อรา

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้นพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางมีฤทธิ์ต้านเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 และแคนดิดา พาราไซโลสิส (*C. parapsilosis*) สายพันธุ์ ATCC 90018 โดยแสดงโซนยับยั้งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 10.00±1.00 และ 8.00±1.53 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมใส่สารทดสอบเท่ากับ 6 มิลลิเมตร) ในขณะที่เชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) สายพันธุ์ ATCC 90028 แคนดิดา ครูซีไอ (*C. krusei*) สายพันธุ์ ATCC 6258 แคนดิดา กราบาตา (*C. glabrata*) สายพันธุ์ ATCC 2001 และแคนดิดา ดับลิเนียนสิส (*C. dubliniensis*) สายพันธุ์ NCPF 3949 ไม่พบโซนยับยั้ง แต่พบลักษณะเป็นวงสีน้ำตาลขุ่น ๆ รอบหลุมทดสอบ (แสดงดังรูปที่ 3)



*รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมใส่สารทดสอบเท่ากับ 6 mm.

รูปที่ 3 ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางโดยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น

2.2 การทดสอบด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น (Broth microdilution)

เชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น พบว่าไม่สามารถอ่านค่า MIC ได้ เนื่องจากสารสกัดที่ใช้ทดสอบมีลักษณะขุ่นทำให้แยกจากหลุมที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ยาก สำหรับค่า MBC ของสารสกัดหยาบรากย่านางต่อเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบอยู่ในช่วงระหว่าง 6.25 ถึงมากกว่า 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบนี้ (แสดงดังตารางที่ 1) โดยพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางมีฤทธิ์ทำลายเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย MBC เท่ากับ 8.33±3.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) โดยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย MBC mean ± SD * (mg/ml)
S. mutans ATCC 25175	>12.5
***S. sobrinus* OMZ 176**	**8.33±3.60**
S. sanguinis ATCC 10556	>12.5
S. gordonii DMST 2060	>12.5
S. salivarius ATCC 7073T	>12.5

* ทำซ้ำ 3 ครั้ง

เชื้อรา

สำหรับการทดสอบหาค่า MIC และ MFC ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อเชื้อราด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น พบว่าไม่สามารถอ่านค่า MIC ได้เช่นเดียวกันกับเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากสารสกัดที่ใช้ทดสอบมีลักษณะขุ่นและมีตกตะกอนบริเวณก้นหลุม ทำให้แยกจากหลุมที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ยาก สำหรับค่า MFC ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อเชื้อราที่ใช้ทดสอบ อยู่ในช่วงระหว่าง 1.56 ถึงมากกว่า 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบนี้ (แสดงดังตารางที่ 2) โดยพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางมีฤทธิ์ทำลายเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย MFC เท่ากับ 2.61±0.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการทำลายเชื้อรา (MFC) โดยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น

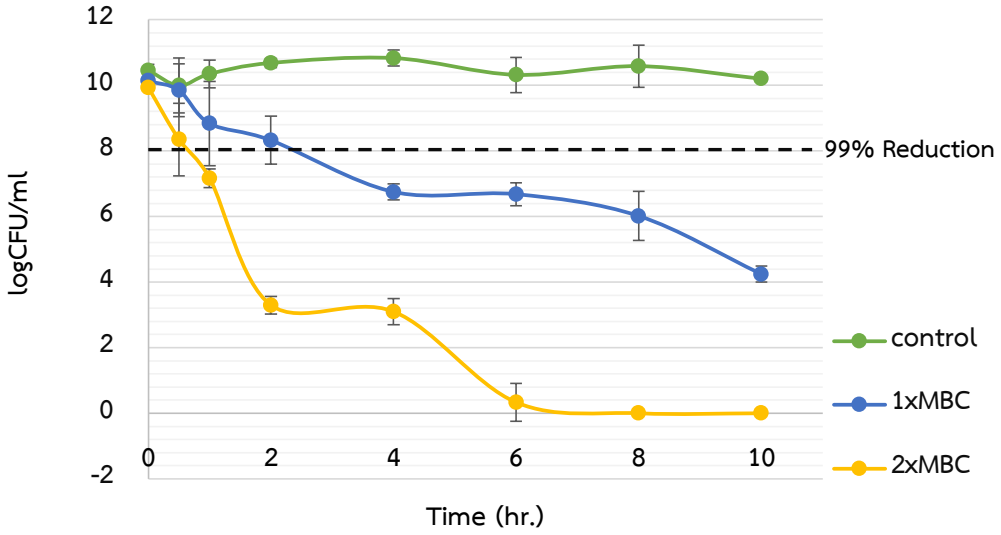
เชื้อราที่ใช้ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย MFC mean ± SD * (mg/ml)
C. albicans ATCC 90028	12.50±0.00
C. krusei ATCC 6258	>12.50
***C. tropicalis* ATCC 750**	**2.61±0.88**
C. dubliniensis NCPF 3949	6.25±0.00
C. glabrata ATCC 2001	8.33±3.60
C. parapsilosis ATCC 90018	12.50±0.00

* ทำซ้ำ 3 ครั้ง

2.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางโดยวิธีไทม์คิล (Time kill analysis)

เชื้อแบคทีเรีย

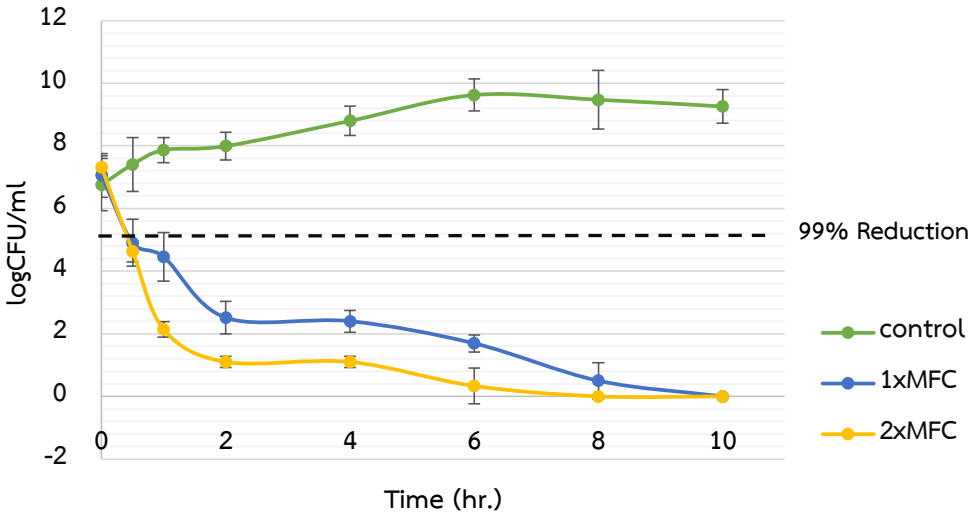
จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีแพร่สารละลายในวุ้น และบรอทไมโครไดลูชั่นพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ย MBC เท่ากับ 8.33±3.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกเชื้อนี้มาทำการทดสอบด้วยวิธีไทม์คิล และเนื่องจากผลการทดลอง 2 ใน 3 ครั้ง ด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น พบว่ามีค่าเท่ากับ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงให้ 1xMBC และ 2xMBC เท่ากับ 6.25 และ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่ความเข้มข้น 2xMBC สามารถทำลายเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ได้ทั้งหมดภายในเวลา 7 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้น 1xMBC ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางไม่สามารถทำลายเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ได้ทั้งหมดภายในเวลา 10 ชั่วโมง โดยสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่ความเข้มข้น 1xMBC และ 2xMBC สามารถทำลายเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ได้ร้อยละ 99 ภายใน 3 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ (แสดงดังรูปที่ 4)



รูปที่ 4 ฤทธิ์ทำลายเชื้อ *S. sobrinus* OMZ 176 ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อหน่วยเวลา ที่ความเข้มข้น 1xMBC และ 2xMBC ด้วยวิธีไทม์คิล

เชื้อรา

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยวิธีแพร่สารละลายในวุ้นและบรอทไมโครไดลูชั่น พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ย MFC เท่ากับ 2.61±0.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกเชื้อนี้มาทำการทดสอบด้วยวิธีไทม์คิล และจากผลการทดลอง 2 ใน 3 ครั้งด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น พบค่า MFC เท่ากับ 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงให้ 1xMFC และ 2xMFC เท่ากับ 3.12 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการทดสอบพบว่า สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่ความเข้มข้น 1xMFC และ 2xMFC สามารถทำลายเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ได้ทั้งหมดภายในเวลา 10 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่ความเข้มข้น 1xMFC และ 2xMFC สามารถทำลายเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ได้ร้อยละ 99 ในเวลาใกล้เคียงกันคือประมาณ 30 นาที (แสดงดังรูปที่ 5)



รูปที่ 5 ฤทธิ์ทำลายเชื้อ *C. tropicalis* ATCC 750 ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อหน่วยเวลา ที่ความเข้มข้น 1xMFC และ 2xMFC ด้วยวิธีไทม์คิล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

วิจารณ์ผลการวิจัย

โรคฟันผุ (dental caries) และโรคติดเชื้อราในช่องปาก (Oral candidiasis) เป็นโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อยในเด็ก และมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในช่องปาก สำหรับการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในช่องปาก สามารถทำได้ด้วยวิธีทางกล ได้แก่ การเช็ดทำความสะอาดช่องปากในเด็กทารก การแปรงฟันอย่างถูกวิธีร่วมกับการใช้ไหมขัดฟัน เป็นต้น นอกจากวิธีทางกลแล้วยังมีการนำสารต้านจุลชีพมาใช้เพื่อลดเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคอีกด้วย โดยคลอเฮกซิดีน (chlorhexidine) [15] เป็นสารต้านจุลชีพที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย และเป็นที่ยอมรับทางทันตกรรม ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปแบบของน้ำยาบ้วนปาก ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพได้ดี แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่าเมื่อใช้คลอเฮกซิดีนเป็นระยะเวลานานจะเกิดผลข้างเคียง ได้แก่ การติดสีที่ตัวฟัน การรับรสเปลี่ยนไปในผู้ป่วยบางราย เนื่องจากคลอเฮกซิดีนมีรสชาติที่ไม่ดี เกิดการหลุดลอกของเยื่อบุช่องปาก และอาการปวดแสบปวดร้อน นอกจากนี้ยังมีการใช้ยาต้านเชื้อรา ได้แก่ นิสเตติน (Nystatin) โคลไตรมาโซล (Clotrimazole) และฟลูโคนาโซล (Fluconazole) มาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อราในช่องปากเด็ก [76-79] ถึงแม้ว่ายาต้านเชื้อราเหล่านี้จะให้ผลการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพแต่พบว่าเมื่อใช้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน อาจทำให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยา และส่งผลให้เกิดการติดเชื้อซ้ำได้ [79] ดังนั้นการศึกษาค้นคว้า และพัฒนาสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพดีขึ้น และมีผลข้างเคียงลดลงจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งพืชสมุนไพรก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากคุณสมบัติที่ใช้ในการรักษาโรค และมีผลข้างเคียงน้อย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นในการพัฒนาสมุนไพรไทย เพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในช่องปาก โดยวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อเชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ และเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสในช่องปาก โดยเป็นการศึกษาแรกของสารสกัดหยาบรากย่านางในการต้านเชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่พบได้ในช่องปาก วิธีการสกัดรากย่านางที่เลือกใช้เป็นวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากเอทานอลจัดว่าเป็นตัวทำละลายที่ดี เป็นที่นิยม หาง่าย และราคาถูก

สำหรับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่ใช้สำหรับทดสอบในการศึกษานี้เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่เตรียมได้ โดยไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายได้อีก เนื่องจากเอทานอลที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 20 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบได้ จึงจัดเป็นข้อจำกัดนึงของการศึกษานี้

จากการศึกษานำร่องโดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบและรากย่านาง พบว่าเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น และบรอทไมโครไดลูชั่น สารสกัดหยาบเอทานอลจากใบย่านางไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ ในขณะที่สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ176 สเตร็ปโตคอกคัส แซงกวินิส (*S. sanguinis*) สายพันธุ์ ATCC 10556 สเตร็ปโตคอกคัส กอร์โดไน *(S. gordonii)* และเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ สายพันธุ์ ATCC 90028 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ และเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสในช่องปากต่อไป

สำหรับการทดสอบด้วยวิธีแพร่สารละลายในวุ้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) สายพันธุ์ ATCC 90028 ไม่แสดงลักษณะของโซนยับยั้ง โดยให้ผลขัดแย้งกับการศึกษาก่อนหน้าโดย Nuaeissara และคณะ [(23)] ซึ่งได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบรากย่านางที่ได้จากการสกัด 2 วิธี คือ การสกัดด้วยน้ำ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวทำละลาย และการสกัดด้วยเอทานอล โดยใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) เป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลของรากย่านางมีฤทธิ์ต้านเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) สายพันธุ์ ATCC 10231 โดยมีขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 10.8±0.3 และ 15.7±1.2 มิลลิเมตรตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารต่างกัน ความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาใช้ทดสอบไม่เท่ากัน รวมถึงสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบเป็นคนละสายพันธุ์กัน นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งเพาะปลูกของสมุนไพร ช่วงระยะเวลาของการเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษาสมุนไพรก่อนการสกัด ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อองค์ประกอบของสารสกัด

การศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางมีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราต่างกัน ซึ่งจากการทดสอบด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่นและไทม์คิล พบว่าเชื้อ

แบคทีเรียแสดงค่า MBC สูงกว่าค่า MFC ของเชื้อราและเวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียก็นานกว่าเชื้อรา โดยกลไกของสารสกัดรากย่านางในการต้านเชื้อจุลชีพยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของ berberine ซึ่งเป็นอัลคาลอยด์ในกลุ่ม isoquinoline เช่นเดียวกับอัลคาลอยด์ที่พบในรากย่านาง พบว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ berberine ในการต้านเชื้อราเกิดจากการยับยั้งเอนไซม์สเตอรอล 24 เมทิลทรานสเฟอเรส (sterol 24-methyl transferase) และ ไคตินซินเทส (chitin synthase) โดยเอนไซม์ทั้ง 2 นี้มีความสำคัญในกระบวนการสร้างเออร์โกสเตอรอล (ergosterol) และไคติน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และผนังเซลล์ของเชื้อรา [80] สำหรับเชื้อแบคทีเรีย เชื่อว่า berberine จะไปยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส (topoisomerase) ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการทำหน้าที่ตัดและเชื่อมสายดีเอ็นเอ (DNA) หรือไปยับยั้งกระบวนการถอดรหัส (transcription) และแปลรหัส (translation) ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมีผลกับการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเชื้อแบคทีเรีย [81] จากกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างกันนี้ อาจเป็นปัจจัยนึงซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดต่างกัน

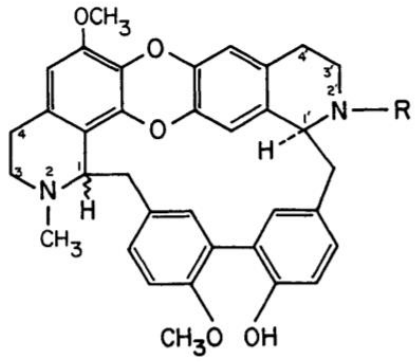
จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าผลการทดสอบด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้นและบรอทไมโครไดลูชั่นของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดไม่ไปในทางเดียวกัน มีทั้งจากวิธีการแพร่ในวุ้นให้ผลในลักษณะดีกว่าในบรอทไมโครไดลูชั่น เช่นในกรณีของเชื้อแคนดิดา พาราไซโลสิส (*C. parapsilosis*) สายพันธุ์ ATCC 90018 ซึ่งแสดงโซนยับยั้งชัดเจนเมื่อทดสอบด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่นพบว่ามีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อสูงกว่าเชื้อราบางชนิดที่ไม่แสดงลักษณะโซนยับยั้ง ในทางกลับกันก็มีที่พบว่าวิธีบรอทไมโครไดลูชั่นให้ผลในลักษณะดีกว่าวิธีการแพร่ในวุ้น เช่น เชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซาไลวาเรียส (*S. salivarius*) สายพันธุ์ ATCC 7073T เชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans*) สายพันธุ์ ATCC 90028 เชื้อแคนดิดา กราบาตา (*C. glabrata*) สายพันธุ์ ATCC 2001 และเชื้อแคนดิดา ดับลิเนียนสิส (*C. dubliniensis*) สายพันธุ์ NCPF 3949 เมื่อทดสอบด้วยวิธีแพร่สารละลายในวุ้นจะไม่แสดงลักษณะของโซนยับยั้ง แต่เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่นพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อเหล่านี้ เหตุที่ทั้งสองวิธีให้ผลไม่สอดคล้องกันอาจจะเนื่องมาจากว่าวิธีการแพร่สารละลายในวุ้นเป็นการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรเบื้องต้น อาศัยการแพร่ของสารสกัดลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นซึ่งมีเชื้อเจริญอยู่ หากสารที่ทดสอบนั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ จะเกิดโซนยับยั้งขึ้นโดย

เห็นเป็นวงใสรอบหลุมทดสอบ [82] แต่อย่างไรก็ตามลักษณะของโซนยับยั้งอาจไม่ชัดเจน หรือแสดงขอบเขตที่ไม่แน่นอน ผลที่ได้ก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร ความสามารถในการละลายหรือซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสมุนไพร อัตราการเจริญและปริมาณของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ เป็นต้น สำหรับวิธีบรอทไมโครไดลูชั่นเป็นการทดสอบเชิงปริมาณ สามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ทำลายเชื้อได้โดยการเจือจางสารที่ทดสอบลดลงทีละ 2 เท่า โดยวิธีนี้เชื้อจะสัมผัสกับสารที่ทดสอบโดยตรง [82, 83] นอกจากเหตุผลข้างต้นแล้ว การศึกษานี้ปริมาณเชื้อและวิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 2 วิธีก็แตกต่างกัน เนื่องจากวิธีการแพร่สารละลายในวุ้นต้องการเชื้อในปริมาณที่มากเพียงพอเพื่อให้เชื้อขึ้นเต็มพื้นที่ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงใช้เชื้อที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาทดสอบ ในขณะที่วิธีบรอทไมโคไดลูชั่นใช้เชื้อในระยะ log และนำมาปรับความขุ่นให้เท่ากับค่าความขุ่นมาตรฐาน 0.5 แม็คฟาแลนด์

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางโดยวิธีไทม์คิล พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่ความเข้มข้นที่ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) ซึ่งเป็นเชื้อที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุในเด็กสายพันธุ์หนึ่ง [9] ได้ร้อยละ 99 ภายใน 3 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าใช้เวลาน้อยลงเหลือเพียง 1 ชั่วโมง ยิ่งไปกว่านั้นสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่ความเข้มข้นที่ 3.12 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่พบได้บ่อยในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ [84, 85] ได้ร้อยละ 99 ภายในเวลา 30 นาที ด้วยระยะเวลาที่ใช้ในการลดจำนวนเชื้อนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของวานิชที่ยึดติดกับผิวฟันได้ดี และนาน หรือในรูปแบบของยาป้ายในช่องปาก

จากหลายงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบของย่านางไม่ว่าจะเป็นส่วนใบ หรือรากมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพได้หลายชนิด [23-25, 68] มีรายงานเกี่ยวกับสารสำคัญในการออกฤทธิ์ของสารสกัดรากย่านาง โดย Dechatiwonse และคณะ[68] ทำการศึกษาพบอัลคาลอยด์ในสารสกัดด้วยเมทานอลของรากย่านาง ได้แก่ อัลคาลอยด์ในส่วนที่ละลายน้ำ และส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นอัลคาลอยด์ในกลุ่ม bisbenzylisoquinolone เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย (*P. falciparum*) พบว่ามีเพียงอัลคาลอยด์ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย และจากส่วนที่

ไม่ละลายน้ำ แยกได้อัลคาลอยด์ 5 ชนิด ได้แก่ tiliacorinine, tiliacorine, nor-tiliacorinine A (ดังรูปที่ 6) และอัลคาลอยด์ที่ไม่ทราบสูตรโครงสร้างอีก 2 ชนิด



รูปที่ 6 สูตรโครงสร้างอัลคาลอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ tiliacorinine, tiliacorine และ nor-tiliacorinine A จากส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากรากย่านาง

ด้วยเป้าหมายที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรมที่มีส่วนผสมจากสารสกัดจากรากย่านางซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อก่อโรคในช่องปากได้นั้น การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบรากย่านางต่อเชื้อในช่องปากที่แยกได้จากช่องปากผู้ป่วย (clinical isolate) การสกัดให้ได้สารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ และทดสอบประสิทธิภาพของสารสำคัญนั้นในการกำจัดเชื้อก่อโรคในช่องปาก รวมถึงการทดสอบความเป็นพิษของสารมีความสำคัญที่ยังต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

Chulalongkorn University

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางในครั้งนี้ พบว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้นและบรอทไมโครไดลูชั่น สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ทดสอบเกือบทั้งหมด โดยเฉพาะเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ได้ดีที่สุด มีค่าเฉลี่ย MBC เท่ากับ 8.33±3.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีไทม์คิล พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่ความเข้มข้น 2xMBC สามารถทำลายเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ได้ทั้งหมดภายในเวลา 7 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้น 1xMBC ไม่สามารถทำลายเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ได้ทั้งหมดภายในเวลา 10 ชั่วโมง การทดสอบ

ต่อเชื้อราก็ให้ผลในลักษณะเดียวกัน คือมีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อแคนดิดาที่ทดสอบเกือบทุกสายพันธุ์และพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย MFC เท่ากับ 2.61±0.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธีไทม์คิล พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางที่ความเข้มข้น 1xMFC และ 2xMFC สามารถทำลายเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ได้ทั้งหมดภายในเวลา 10 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อสเตร็ปโตคอกไคที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ และเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสในช่องปาก โดยเฉพาะเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุในเด็ก และเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่พบได้ในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

1. Sheiham A. Dental caries affects body weight, growth and quality of life in pre-school children. Br Dent J. 2006;201(10):625-6.

2. Acharya S, Tandon S. The effect of early childhood caries on the quality of life of children and their parents. Contemp Clin Dent. 2011;2(2):98-101.

3. กระทรวงสาธารณสุข กรมอนามัย. รายงานผลการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากระดับประเทศ ครั้งที่ 7 พ.ศ. 2551. นนทบุรี: สำนักงานกิจการ โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2556.

4. Seow WK. Biological mechanisms of early childhood caries. Community Dent Oral Epidemiol. 1998;26(1 Suppl):8-27.

5. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J Bacteriol. 1993;175(11):3247-52.

6. Isaksson J, Rasmussen M, Nilson B, Stadler LS, Kurland S, Olaison L, et al. Comparison of species identification of endocarditis associated viridans streptococci using rnpB genotyping and 2 MALDI-TOF systems. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015;81(4):240-5.

7. Beighton D, Carr AD, Oppenheim BA. Identification of viridans streptococci associated with bacteraemia in neutropenic cancer patients. J Med Microbiol. 1994;40(3):202-4.

8. van Houte J, Gibbs G, Butera C. Oral flora of children with "nursing bottle caries". J Dent Res. 1982;61(2):382-5.

9. Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, et al. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. J Med Microbiol. 2002;51(5):443-7.

10. Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, et al. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. J Med Microbiol. 2005;54(Pt 7):661-5.

11. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. J Clin Microbiol. 2002;40(3):1001-9.

12. Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. Arch Oral Biol. 2004;49(10):789-98.

13. Jain A, Jain S, Rawat S. Emerging fungal infections among children: A review on its clinical manifestations, diagnosis, and prevention. J Pharm Bioallied Sci. 2010;2(4):314-20.

14. Gonzalez Gravina H, Gonzalez de Moran E, Zambrano O, Lozano Chourio M, Rodriguez de Valero S, Robertis S, et al. Oral Candidiasis in children and adolescents with cancer. Identification of Candida spp. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2007;12(6):E419-23.

15. Cousido MC, Tomas Carmona I, Garcia-Caballero L, Limeres J, Alvarez M, Diz P. In vivo substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. Clin Oral Investig. 2010;14(4):397-402.

16. Simratvir M, Singh N, Chopra S, Thomas AM. Efficacy of 10% Povidone Iodine in children affected with early childhood caries: an in vivo study. J Clin Pediatr Dent. 2010;34(3):233-8.

17. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001;92(4):446-50.

18. Pemberton MN, Gibson J. Chlorhexidine and hypersensitivity reactions in dentistry. Br Dent J. 2012;213(11):547-50.

19. มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์แผนไทยเดิม อายุรเวทวิทยาลัย (ชีวกโกมารภัจจ์). ตำราการแพทย์แผนไทยเดิม(แพทย์ศาสตร์สงเคราะห์). กรุงเทพฯ: สามเจริญพานิช; 2535.

20. Jongchanapong. A, Singharachai. C, Palanuvei. C, Ruangrungsi. N, Towiwat. P. Antipyretic and antinociceptive effects of Ben-cha-lo-ka-wi-chian remedy. J Health Res. 2010;24(1):7.

21. Sireeratawong S, Lertprasertsuke N, Srisawat U, Thuppia A, Ngamjariyawat A, Suwanlikhid N, et al. Acute and subchronic toxicity study of the water extract from *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels in rat. Songklanakarin jornal of science and technology. 2008;30(5):611-9.

22. Naibaho N.M, Laohankunjit N, Kerdchoechuen O. Volatile composition and antibacterial activity of essential oil from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. Agricultural Sci J. 2012;43(2):529-32.

23. Nuaeissara S, Kondo S, Itharat A. Antimicrobial activity of the extracts from Benchalokawichian remedy and its components. J Med Assoc Thai. 2011;94 Suppl 7:S172-7.

24. Sureram S, Senadeera SP, Hongmanee P, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P. Antimycobacterial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Tiliacora triandra* against multidrug-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis. Bioorg Med Chem Lett. 2012;22(8):2902-5.

25. Pavanand. K, Webster. HK, Yongvanitchit. k, Dechatiwongse. T. Antimalarial activity of *Tiliacora triandra* Diels against Plasmodium falciparum in vitro. Phytotherapy research. 1989;3(5):3.

26. Doern CD, Burnham CA. It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. J Clin Microbiol. 2010;48(11):3829-35.

27. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. Caries Res. 2004;38(3):204-11.

28. Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, et al. The in vivo dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslund*ii, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. J Med Microbiol. 2007;56(Pt 5):681-7.

29. Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. Scand J Dent Res. 1987;95(5):369-80.

30. Palmer RJ, Jr., Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. J Bacteriol. 2003;185(11):3400-9.

31. Mylonakis E, Calderwood SB. Infective endocarditis in adults. N Engl J Med. 2001;345(18):1318-30.

32. Classen DC, Burke JP, Ford CD, Evershed S, Aloia MR, Wilfahrt JK, et al. *Streptococcus mitis* sepsis in bone marrow transplant patients receiving oral antimicrobial prophylaxis. Am J Med. 1990;89(4):441-6.

33. Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. Dent Clin North Am. 2010;54(3):441-54.

34. Teanpaisan R, Thitasomakul S, Piwat S, Thearmontree A, Pithpornchaiyakul W, Chankanka O. Longitudinal study of the presence of mutans streptococci and lactobacilli in relation to dental caries development in 3-24 month old Thai children. Int Dent J. 2007;57(6):445-51.

35. Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. J Dent Res. 1993;72(1):37-45.

36. Seki M, Karakama F, Terajima T, Ichikawa Y, Ozaki T, Yoshida S, et al. Evaluation of mutans streptococci in plaque and saliva: correlation with caries development in preschool children. J Dent. 2003;31(4):283-90.

37. Ge Y, Caufield PW, Fisch GS, Li Y. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization correlated with caries experience in children. Caries Res. 2008;42(6):444-8.

38. Ma C, Chen F, Zhang Y, Sun X, Tong P, Si Y, et al. Comparison of oral microbial profiles between children with severe early childhood caries and caries-free children using the human oral microbe identification microarray. PLOS ONE. 2015;10(3):e0122075.

39. Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. J Clin Microbiol. 2005;43(2):843-9.

40. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. J Clin Microbiol. 2008;46(4):1407-17.

41. Zinner DD, Jablon JM. Cariogenic streptococci in infants. Arch Oral Biol. 1969;14(12):1429-31.

42. Odds FC. Candida and candidosis. 2nd ed. London: Bailli'ere Tindall; 1988.

43. Berdicevsky I, Ben-Aryeh H, Szargel R, Gutman D. Oral Candida in children. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1984;57(1):37-40.

44. Odds FC. Ecology and epidemiology of candidiasis. In Candida and candidosis. Baltimore: University Park Press, Md.; 1998.

45. de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. Arch Oral Biol. 2006;51(11):1024-8.

46. Kirkpatrick WR, Revankar SG, McAtee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, et al. Detection of Candida dubliniensis in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROM agar candida screening and susceptibility testing of isolates. J Clin Microbiol. 1998;36(10):3007-12.

47. Acs G, Lodolini G, Kaminsky S, Cisneros GJ. Effect of nursing caries on body weight in a pediatric population. Pediatr Dent. 1992;14(5):302-5.

48. Ayhan H, Suskan E, Yildirim S. The effect of nursing or rampant caries on height, body weight and head circumference. J Clin Pediatr Dent. 1996;20(3):209-12.

49. Davies GN. Early childhood caries--a synopsis. Community Dent Oral Epidemiol. 1998;26(1 Suppl):106-16.

50. Reisine ST. The impact of dental conditions on social functioning and the quality of life. Annu Rev Public Health. 1988;9:1-19.

51. Reisine ST. Dental health and public policy: the social impact of dental disease. Am J Public Health. 1985;75(1):27-30.

52. Gift HC, Reisine ST, Larach DC. The social impact of dental problems and visits. Am J Public Health. 1992;82(12):1663-8.

53. Tinanoff N, O'Sullivan DM. Early childhood caries: overview and recent findings. Pediatr Dent. 1997;19(1):12-6.

54. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral Candida: clearance, colonization, or candidiasis? J Dent Res. 1995;74(5):1152-61.

55. Russell C, Lay KM. Natural history of Candida species and yeasts in the oral cavities of infants. Arch Oral Biol. 1973;18(8):957-62.

56. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microbiol. 2011;3.

57. Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of Candida albicans in man. Arch Oral Biol. 1980;25(1):1-10.

58. Yankell SL, Moreno OM, Saffir AJ, Lowary RL, Gold W. Effects of chlorhexidine and four antimicrobial compounds on plaque, gingivitis, and staining in beagle dogs. J Dent Res. 1982;61(9):1089-93.

59. Loe H, Schiott CR. The effect of mouth rinses and topical applicatiori of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. J periodont Res. 1970;5:5.

60. Schiott CR, Loe H, Jensen SB, Kilian M, Davies RM, Glavind K. The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. J Periodontal Res. 1970;5(2):84-9.

61. Jones CR. Chlorhexidine: is it still the gold standard? Periodontology 2000. 1997;15:7.

62. ใจเพชร มีทรัพย์. ย่านาง สมุนไพรมหัศจรรย์. กรุงเทพฯ: ธีระการพิมพ์; 2556.

63. วลัย ชูธรรมธัช. ตรีผลา...ย่านาง สมุนไพรสะกดโรคร้าย ครอบจักรวาล. กรุงเทพฯ: ปัญญาชน; 2556.

64. singharachai C, Palanuvej C, Kiyohara H, Yamada h, Ruangrungsi N. Pharmacognostic specification of five root species in thai traditional medicine remedy : Ben-cha-lo-ka-wi-chain. Pharmacognosy journal. 2011;3(21):11.

65. *Tiliacora triandra*, an Anti-Intoxication Plant, Improves Memory Impairment, Neurodegeneration, Cholinergic Function, and Oxidative Stress in Hippocampus of Ethanol Dependence Rats [Internet]. Hindawi Publishing Corporation 2015 [cited 10 may 2016]. Available from: http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/918426/.

66. Kaewpiboon C, Winayanuwattikun P, Yongvanich T, Phuwapraisirisan P, Assavalapsakul W. Effect of three fatty acids from the leaf extract of *Tiliacora triandra* on P-glycoprotein function in multidrug-resistant A549RT-eto cell line. Pharmacogn Mag. 2014;10(Suppl 3):S549-56.

67. Katisart T, Rattana S, editors. Anti-oxidant activity of root and leaf extract from *Tiliacora triandra* Diels. The 11th Mahasarakham university research conference; 2558; Mahasarakham.

68. dechatiwongse. T, Chavalittumrong. P, Nutakul. W. Isolation of the In Vitro Antimalarial Principles from *Tiliacora triandra* Diels. Bull DeptMed Sci. 1987;29(1):6.

69. Phongmanee S, Sanampol G. The extraction of medicinal herbs for inhibit food pathogen. Agricultural Sci J. 2007;38(6):4.

70. Prasitpuriprecha C, Damkliang A, Surintha P, Deelum W. Immunomodulating, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Northeastern Thai Edible Plant and Medicinal Plant Extracts. IJPS. 2009;5(2):9.

71. Teanpaisan R, Ruangkiatkul P, Thammasitboon K, Puripattanavong J, Faroongsarng D. Effectiveness of *Artocarpus lakoocha* extract, poloxamer 407, on Enterococcus faecalis in vitro. J Investig Clin Dent. 2013;4(4):219-24.

72. Balouirin M, Sadiki M, Koraichilbnsouda. S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 2016;6:9.

73. Teanpaisan R, Senapong S, Puripattanavong J. *In vitro* Antimicrobial and antibiofilm activity of *Artocarpus Lakoocha* (Moraceae) extract against some oral pathogen. Trop J Pharm Res. 2014;13(7):6.

74. Clinical and laboratoty standards institute. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. M26-A. 1999;19(18):50.

75. Clinical and laboratoty standards institute. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline. M27-A2. 2008;28.

76. Epstein JB, Gorsky M, Caldwell J. Fluconazole mouthrinses for oral candidiasis in postirradiation, transplant, and other patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;93(6):671-5.

77. The American Academy of Pediatric Dentistry. Useful Medications for Oral Conditions. Pediatr Dent. 2016;38(6):443-50.

78. Barkvoll P, Attramadal A. Effect of nystatin and chlorhexidine digluconate on Candida albicans. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1989;67(3):279-81.

79. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. Am J Med. 2012;125(1 Suppl):S3-13.

80. Vollekova A, Kost'alova D, Kettmann V, Toth J. Antifungal activity of *Mahonia aquifolium* extract and its major protoberberine alkaloids. Phytother Res. 2003;17(7):834-7.

81. Vollekova A, Kostalova D, Sochorova R. Isoquinoline alkaloids from *Mahonia aquifolium* stem bark are active against *Malassezia* spp. Folia Microbiol (Praha). 2001;46(2):107-11.

82. รวี เถียรไพศาล. แบคทีเรียและโรคติดเชื้อที่พบบ่อยในช่องปาก. สงขลา: ไอคิว มีเดีย; 2552.

83. อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์. การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ. แบคทีเรียทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2551.

84. Chai LY, Denning DW, Warn P. *Candida tropicalis* in human disease. Crit Rev Microbiol. 2010;36(4):282-98.

85. Roilides E, Farmaki E, Evdoridou J, Francesconi A, Kasai M, Filioti J, et al. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. J Clin Microbiol. 2003;41(2):735-41.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อเชื้อแบคทีเรีย

Bacteria	Zones of inhibition mean±SD* (mm.)
S. mutans ATCC 25175	6.00 ± 0.00
S. sobrinus OMZ 176	12.67 ± 1.15
S. sanguinis ATCC 10556	7.67 ± 1.53
S. gordonii DMST 2060	10.67 ± 1.15
S. salivarius ATCC 7073T	6.00 ± 0.00

* รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมใส่สารทดสอบเท่ากับ 6 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางต่อเชื้อรา

Fungi	Zones of inhibition mean±SD* (mm.)
C. albicans ATCC 90028	6.00 ± 0.00
C. krusei ATCC 6258	6.00 ± 0.00
C. tropicalis ATCC 750	10.00 ± 1.00
C. dubliniensis NCPF 3949	6.00 ± 0.00
C. glabrata ATCC 2001	6.00 ± 0.00
C. parapsilosis ATCC 90018	8.00 ± 1.53

* รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมใส่สารทดสอบเท่ากับ 6 มิลลิเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 5 จำนวนเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ที่เพาะในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 (กลุ่มควบคุม) ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง

เวลา (hr.)	จำนวนเชื้อ *S. sobrinus* OMZ 176 (CFU/ml) กลุ่มควบคุม		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0	2.12×10^{10}	4.72×10^{10}	2.31×10^{10}
0.5	4.36×10^{10}	1.98×10^{10}	1.10×10^{9}
1	3.97×10^{10}	3.83×10^{10}	7.20×10^{9}
2	4.54×10^{10}	6.81×10^{10}	3.60×10^{10}
4	4.49×10^{10}	5.39×10^{10}	1.29×10^{11}
6	8.70×10^{10}	1.08×10^{10}	1.02×10^{10}
8	1.63×10^{11}	4.10×10^{10}	8.50×10^{9}
10	1.02×10^{10}	2.22×10^{10}	1.76×10^{10}
24	$>10^{7}$	$>10^{7}$	$>10^{7}$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 6 จำนวนเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ที่เพาะในสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่ม 1xMBC) ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง

เวลา (hr.)	**จำนวนเชื้อ *S. sobrinus* OMZ 176 (CFU/ml) กลุ่ม 1xMBC**		
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**
0	7.35×10^{9}	1.34×10^{10}	2.59×10^{10}
0.5	2.67×10^{9}	2.16×10^{9}	6.01×10^{10}
1	8.15×10^{7}	1.96×10^{8}	2.01×10^{10}
2	4.90×10^{7}	1.43×10^{8}	1.33×10^{9}
4	4.81×10^{6}	3.50×10^{6}	1.06×10^{7}
6	3.48×10^{6}	2.64×10^{6}	1.20×10^{7}
8	6.40×10^{5}	2.50×10^{5}	7.00×10^{6}
10	9.70×10^{3}	1.86×10^{4}	3.00×10^{4}
24	$<10^{1}$	$<10^{1}$	$<10^{1}$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 7 จำนวนเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ที่เพาะในสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านางความเข้มข้น 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่ม 2xMBC) ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง

เวลา (hr.)	**จำนวนเชื้อ *S. sobrinus* OMZ 176 (CFU/ml) กลุ่ม 2xMBC**		
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**
0	7.15×10^{9}	8.75×10^{9}	1.01×10^{10}
0.5	3.90×10^{9}	2.96×10^{7}	9.80×10^{7}
1	2.55×10^{7}	1.76×10^{7}	7.10×10^{6}
2	3.80×10^{3}	1.89×10^{3}	1.10×10^{3}
4	9.00×10^{2}	6.20×10^{2}	3.60×10^{3}
6	$<10^{1}$	$<10^{1}$	1.00×10^{1}
8	$<10^{1}$	$<10^{1}$	$<10^{1}$
10	$<10^{1}$	$<10^{1}$	$<10^{1}$
24	$<10^{1}$	$<10^{1}$	$<10^{1}$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 8 จำนวนเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส ซอบรินัส (*S. sobrinus*) สายพันธุ์ OMZ 176 ในหน่วย logCFU/ml ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง

เวลา (hr.)	**จำนวนเชื้อ *S. sobrinus* OMZ 176 mean±SD* (logCFU/ml)**		
	control	**1xMBC**	**2xMBC**
0	10.45±0.19	10.14±0.27	9.93±0.08
0.5	10.00±0.84	9.85±0.81	8.35±1.10
1	10.35±0.42	8.84±1.29	7.17±0.29
2	10.68±0.14	8.32±0.73	3.30±0.27
4	10.83±0.24	6.75±0.25	3.10±0.40
6	10.32±0.53	6.68±0.35	0.33±0.58
8	10.58±0.64	6.02±0.75	<1
10	10.20±0.07	4.24±0.25	<1
24	>7	<1	<1

* ทำซ้ำ 3 ครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 9 จำนวนเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ที่เพาะในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 (กลุ่มควบคุม) ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง

เวลา (hr.)	**จำนวนเชื้อ *C. tropicalis* ATCC 750 (CFU/ml) กลุ่มควบคุม**		
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**
0	4.10×10^{6}	4.50×10^{7}	1.01×10^{6}
0.5	4.80×10^{6}	2.30×10^{8}	1.50×10^{7}
1	2.96×10^{7}	7.00×10^{7}	1.90×10^{8}
2	5.70×10^{7}	3.10×10^{8}	5.00×10^{7}
4	3.20×10^{8}	3.48×10^{8}	2.17×10^{9}
6	1.49×10^{9}	3.36×10^{9}	1.48×10^{10}
8	2.50×10^{8}	1.18×10^{10}	8.80×10^{9}
10	2.00×10^{9}	5.90×10^{9}	5.00×10^{8}
24	3.14×10^{9}	4.90×10^{9}	1.02×10^{9}

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 10 จำนวนเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ที่เพาะในสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง ความเข้มข้น 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่ม 1xMFC) ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง

เวลา (hr.)	**จำนวนเชื้อ *C. tropicalis* ATCC 750 (CFU/ml) กลุ่ม 1xMFC**		
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**
0	2.46×10^6	6.00×10^7	1.00×10^7
0.5	2.81×10^4	6.00×10^5	3.10×10^4
1	5.90×10^3	2.00×10^5	2.00×10^4
2	2.40×10^2	1.20×10^3	1.20×10^2
4	4.00×10^2	1.00×10^2	4.00×10^2
6	1.00×10^2	3.00×10^1	4.00×10^1
8	$<10^1$	1.00×10^1	$<10^1$
10	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$
24	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 11 จำนวนเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ซึ่งเพาะในสารสกัดหยาบเอทานอลจากรากย่านาง ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่ม 2xMFC) ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง

เวลา (hr.)	**จำนวนเชื้อ *C. tropicalis* ATCC 750 (CFU/ml) กลุ่ม 2xMFC**		
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**
0	1.41×10^5	1.10×10^7	5.00×10^7
0.5	2.70×10^4	2.80×10^4	1.00×10^5
1	2.70×10^2	1.00×10^2	1.00×10^2
2	2.00×10^1	1.00×10^1	1.00×10^1
4	2.00×10^1	1.00×10^1	1.00×10^1
6	1.00×10^1	$<10^1$	$<10^1$
8	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$
10	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$
24	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 12 จำนวนเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (*C. tropicalis*) สายพันธุ์ ATCC 750 ในหน่วย logCFU/ml ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง

เวลา (hr.)	**จำนวนเชื้อ *C. tropicalis* ATCC 750 mean±SD* (logCFU/ml)**		
	control	**1xMFC**	**2xMFC**
0	6.76±0.83	7.06±0.70	7.32±0.35
0.5	7.41±0.86	4.91±0.76	4.63±0.32
1	7.87±0.40	4.46±0.78	2.14±0.25
2	7.99±0.44	2.51±0.51	1.10±0.17
4	8.79±0.46	2.40±0.34	1.10±0.17
6	9.62±0.51	1.69±0.27	0.33±0.58
8	9.47±0.93	0.33±0.58	<1
10	9.26±0.54	<1	<1
24	9.40±0.35	<1	<1

* ทำซ้ำ 3 ครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพิมพ์บุษร์ พรหมศรี เกิดวันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2530 ที่จังหวัดนนทบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีทันตแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 เข้ารับราชการเป็นทันตแพทย์ระดับปฏิบัติการ โรงพยาบาลเชียรใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2557 ปัจจุบันศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University