The Sci J of Phetchaburi Rajabhat University.
2020.17(1) : 33-44

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านการเกิดไบโอฟิล์ม และต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรจีนต่อเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก

Antibacterial, Anti-biofilm and Antioxidant Activities of Chinese Herb Extracts Against Oral Cavity Bacteria

ดรุณรัตน์ สบายใจ [1] อำพร บุญเอก[1] ศรมน สุทิน[1] อรภา ศิลมัฐ[2] รุ่งรัตน์ นิลธเสน[1] และ วรพรรณี เผ่าทองศุข*[1]

Darunrat Sabayjai[1], Amphon Bun-ek[1], Soramon Sutin[1], Orapa Sinlamuth[2], Rungrat Nintasen[1] and Worrapannee Powtongsook[1]

[1]*คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ประเทศไทย 10540*

[2]*คณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ประเทศไทย 10540*

[1]*Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakarn, Thailand, 10540*

[2]*Faculty of Chinese medicine, Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakarn, Thailand, 10540*

***Corresponding author; E-mail:** Worrapannee2000@gmail.com

Received: 19 March 2020 /Revised: 30 April 2020 / Accepted: 29 May 2020

บทคัดย่อ

แบคทีเรียสกุล *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุ และพบได้ทั่วไปในช่องปากมนุษย์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสมุนไพรจีนต่อแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก โดยทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรจีนสามชนิดได้แก่ จื่อฉ่าว จินอิ๋นฮวา และกันเฉ่า ต่อแบคทีเรียสองชนิดได้แก่ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus salivarius* ผลการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบของจื่อฉ่าวมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* และ *S. salivarius* ได้ดีที่สุด จึงนำมาทำการทดสอบในขั้นต่อไป ประกอบด้วยฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านการเกิดไบโอฟิล์ม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าการออกฤทธิ์ของจื่อฉ่าวต่อเชื้อทั้งสองชนิดมีค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 0.049 และ 0.098 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจื่อฉ่าวสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้น 0.012 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ *S. mutans* และที่ความเข้มข้น 1.563 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ *S. salivarius* ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าสารสกัดหยาบจื่อฉ่าวมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยมีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน BHT (Butylated hydroxyltoluene) ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรจีนจื่อฉ่าว มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ใช้ต้านเชื้อในช่องปาก

คำสำคัญ : สารสกัดหยาบจากสมุนไพรจีน สารต้านอนุมูลอิสระ MIC MBC ไบโอฟิล์ม

Abstract

Streptococcus is a typical bacterium found in human oral cavity and associated with tooth decay disease. The objective of this study was to evaluate the efficiency of Chinese herbs against oral cavity disease bacteria. Antimicrobial activities of three Chinese herbs zicao (*Lithospermum erythrorhizon*), jinyinhua (*Lonicera japonica*) and gancao (*Glycyrrhiza uralensis*) were evaluated against two oral cavity bacteria *S. mutans* and *S. salivarius*. Results from agar well diffusion revealed that crude extract of zicao had the highest activity among those three herbs. Hence, antimicrobial, antibiofilm and antioxidant activities were further examined with zicao. As a result, antimicrobial activity of zicao against *S. mutans* and *S. salvarius* was exhibited by the MIC and MBC of 0.049 and 0.098 mg/ml, respectively. Zicao also provided 80% inhibition of biofilm at 0.012 mg/ml for *S. mutans* and 1.563 mg/ml for *S. salivarius*. Antioxidant activity test using DPPH radical scavenging assay showed that zicao had a good antioxidant activity with an IC_{50} value close to the standard BHT (Butylated hydroxyl toluene). Results obtained from this research could be applied for oral cavity disease prevention using Chinese herb zicao.

Keywords: Crude Chinese Herbs Extracted, Antioxidant, Biofilm

บทนำ

แบคทีเรียสกุล *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุและพบได้ทั่วไปในช่องปากมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. mutans* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของโรคฟันผุในมนุษย์ คุณสมบัติที่สำคัญในการก่อโรคคือความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มที่ผิวฟัน เรียกว่าคราบพลัค (Dental plaque) นอกจากนี้แบคทีเรียมีเอนไซม์กลูโคซิลทรานส์เฟอร์เรส (glucosyltransferases) โปรตีนที่จับกับกลูแคน (glucan-binding proteins) หลายชนิด โปรตีนแอนติเจน ซี (protein antigen C) ที่ผิวเซลล์ และโปรตีนที่จับกับคอลลาเจน (Collagen-binding protein) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีส่วนร่วมก่อให้เกิดคราบพลัคและชักนำให้เกิดโรคฟันผุ นอกจากนี้แบคทีเรียยังใช้ระบบควอรัมเซนซิงเป็นการสื่อสารของแบคทีเรีย (quorum-sensing) เพื่อตอบสนองต่อความเครียดในสิ่งแวดล้อมโดยควบคุมการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม [1] ส่วนเชื้อ *S. salivarius* เป็นหนึ่งในเชื้อที่พบเป็นชนิดแรก ๆ ในช่องปาก และลำไส้ของมนุษย์ตั้งแต่แรกเกิด และยังคงอยู่แบบถาวรต่อไป [2] แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *S. salivarius* นั้นจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อฉวยโอกาสกับผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือผู้ที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ ก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด รวมทั้งเกิดการติดเชื้อในระหว่างการทำฟันได้ [3] ดังนั้นการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ในช่องปากสามารถป้องกัน

การเกิดฟันผุ และช่วยป้องกันการติดเชื้อชนิดรุนแรงในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เนื่องมาจากการแพทย์แผนจีนให้ความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรค และบรรเทาอาการ มีการใช้ตำรับยาจีนที่ใช้สมุนไพรจีนเพื่อการรักษาฟื้นฟู และเสริมภูมิต้านทานของร่างกายโดยอาศัยการปรับสมดุลในร่างกาย เช่นจื่อฉ่าว (*Lithospermum erythrorhizon*) มีรายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [4] ต้านการอักเสบ [5] ต้านแบคทีเรีย [6] ต้านเชื้อรา [7] และ ต้านเชื้อไวรัส [8] จินอิ๋นฮวาหรือดอกสายน้ำผึ้ง (*Lonicera japonica*) ในทางการแพทย์แผนจีนได้นำส่วนของใบและดอกมาใช้เป็นยาจีนแผนโบราณเพื่อรักษาโรคหลายชนิด เช่น เป็นไข้ปวดศีรษะ ติดเชื้อทางเดินหายใจ โรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ โรคไขข้ออักเสบ และโรคเบาหวาน[9] และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [10] กันเฉ่า (*Glycyrrhiza glabra*) มีรายงานฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยสาร glycyrrhizic acid มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ และการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม [11] สารต้านจุลินทรีย์หลายชนิดถูกนำมาใช้ในการต่อต้านการเกิดคราบพลัค เช่น คลอเฮกซิดีน สารลดแรงตึงผิวประจุบวกในกลุ่ม quaternary ammonium compounds หรือสารที่มีรายงานวิจัยพบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าสารเดิม เช่น โลหะอนุภาคนาโน (Metal nanoparticles) [12] คลอเฮกซิดีนเป็นสารเคมีมาตรฐานในการปฏิบัติทางทันตกรรม แต่การใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีคลอเฮกซิดีนอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานอาจทำให้เกิดคราบบนฟัน ลิ้น และเหงือก เกิดการรับรสชาติที่เปลี่ยนไป เกิดภาวะปากแห้ง เป็นต้น ดังนั้นจึงไม่เหมาะกับการใช้เป็นประจำต่อเนื่อง [13] ดังนั้นสารชีวภาพที่มีความปลอดภัยเช่น สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านการเกิดไบโอฟิล์ม และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นทางเลือกที่ดี และมีความเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในช่องปาก ป้องกันการเกิดโรคในช่องปากเพื่อใช้ทดแทนยาหรือสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาจากกระบวนการทางเคมี ดังนั้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรจีนสามชนิดที่ดีที่สุดต่อการยับยั้งการเจริญและการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพรจีน

นำสมุนไพรจีนส่วนก้านและใบของจื่อฉ่าว ส่วนดอกของจินอิ๋นฮวา และส่วนรากของกันเฉ่า ที่ซื้อจากร้านขายสมุนไพรจีนร้านแสงธรรมเภสัช หั่นและปั่นให้ละเอียด นำมาชั่ง 300 กรัม แช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อัตราส่วนสมุนไพรจีนต่อเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 1:6 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วกรองหยาบด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นกรองละเอียดด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำไปประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งเยือกแข็ง (Freeze dryer) ชั่งสารที่ได้ เพื่อคำนวณร้อยละของน้ำหนักสารสกัดหยาบ (% yield) เก็บใส่ในขวดสีชาและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพรจีนด้วยวิธี Agar well diffusion

ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรจีน จื่อฉ่าว จินอิ๋นฮวา และกันเฉ่า ด้วยวิธี Agar well diffusion ตามวิธีของ [14] โดยเตรียมเชื้อทดสอบ *S. mutans* ATCC 25175 และ *S. salivarius*

ATCC 7073 ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.15±0.005 (ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) นำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวอาหารเพาะเชื้อ Brain Heart Infusion Agar (BHA) รอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง เจาะวุ้นให้เป็นหลุมด้วย cork borer เบอร์ 2 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) หยดสารสกัดสมุนไพรจีนที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO (dimethyl sulfoxide) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมทดสอบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก และใช้ DMSO (Dimethyl sulfoxide) เป็นชุดควบคุมผลลบ รอจนสารทดสอบซึมเข้าเนื้อวุ้นไปจนหมด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (Vernier caliper) วัดขนาดโซนใสหรือบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นทั้ง 3 ด้าน แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย

3. การทดสอบการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) ของสารสกัดจื่อฉ่าว

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) ของสารสกัดจื่อฉ่าว ดัดแปลงตามวิธี [14] โดยปิเปตต์อาหารเพาะเชื้อ Brain Heart Infusion Broth (BHI broth) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท แบบ 96 หลุม ทำการเจือจางสารสกัดจนมีความเข้มข้น 0.195-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตต์เชื้อทดสอบความเข้มข้นประมาณ 10^6 CFU/ml ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทุกหลุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก และใช้เชื้อทดสอบเป็นชุดควบคุมผลลบ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate reader อ่านค่าและคำนวณผลความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้คือ ค่า MIC จากนั้นหาค่า MBC โดยใช้ลูปแตะเชื้อจากหลุมทดสอบทุกความเข้มข้นมา streak ลงบนอาหารเพาะเชื้อ BHI agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลอง โดยความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ คือ ไม่มีโคโลนีของเชื้อปรากฏขึ้น บันทึกเป็นค่า MBC

4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจื่อฉ่าวต่อการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm) ของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Crystal violet staining for biofilm assay

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจื่อฉ่าวต่อการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ด้วยวิธี crystal violet staining for biofilm assay ดัดแปลงตามวิธีของ [15] โดยปิเปตต์อาหาร SBHI (Brain heart infusion ที่มีการเติม sucrose) ลงในไมโครเพลท แบบ 96 หลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เจือจางสารสกัดจนมีความเข้มข้น 0.006-6.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมเชื้อที่ต้องการทดสอบ 10^6 CFU/ml ลงไป 50 ไมโครลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส

ใน candle jar เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำ reverse osmosis (RO) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เขย่าไมโครเพลท เพื่อนำแบคทีเรียที่ไม่มีการเกาะติดออก นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 45 นาที จากนั้นเติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ crystal violet ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 20 นาที ล้างออกด้วยน้ำ RO 3 ครั้ง ทำการชะสีออกจากไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย (เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ 25 เปอร์เซ็นต์) เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ถ่ายสารละลาย 100 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทใหม่ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ค่าที่วัดได้นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (% inhibition) ตามสมการ

$$\frac{((\text{"A570" ของชุดควบคุม} - \text{"A570" ของชุดทดสอบ}))}{(\text{"A570" ของชุดควบคุม}) \times 100}$$

5. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจื่อฉ่าวต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจื่อฉ่าวต่อการสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดัดแปลงตามวิธีของ [15] ทำการสร้างไบโอฟิล์มในไมโครเพลทแบบ 96 หลุมแบบก้นแบน (96 well microplate) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำ RO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เขย่าไมโครเพลท แบบ 96 หลุม เพื่อนำแบคทีเรียที่ไม่มีการเกาะติดออก นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 45 นาที หลังจากนั้น เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ crystal violet 30 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำ RO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 1 ครั้ง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาส่องดูไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า บันทึกภาพไบโอฟิล์มเพื่อนำมาเปรียบเทียบผลของสารสกัดสมุนไพรจีนจื่อฉ่าวต่อความหนาแน่นของไบโอฟิล์ม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจื่อฉ่าว 0.006 -6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6. ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ของสารสกัดจื่อฉ่าว ด้วยวิธีการ DPPH radical scavenging assay

นำสารสกัดจื่อฉ่าวมาทดสอบโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assay ตามวิธีของ[16] เตรียมสารละลายดีพีพีเอช (DPPH· reagent) โดยชั่ง DPPH 0.004 กรัม ละลายในเอทานอล 100 มิลลิลิตร ทำการทดสอบสารสกัด ที่ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นประกอบไปด้วย หลอดอ้างอิง 1 หลอด หลอดควบคุม 3 หลอด หลอดอ้างอิงของสารสกัด 1 หลอด และหลอดทดสอบสารสกัด 3 หลอด เติมสารละลาย DPPH ลงไปในสารทดสอบแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อใช้ ในการหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ถ้าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้สีม่วงของอนุมูลอิสระ (DPPH) จางลงจนกลายเป็นสีเหลืองอ่อนหรือไม่มีสี นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นที่ยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (% inhibition) ที่ 50% โดยเปรียบเทียบกับสารต้าน

อนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT (Butylated hydroxyl toluene) และคำนวณหาค่า (IC_{50}) ดังสูตรคำนวณ

% inhibition = {(C-(S-BS))/C} x 100

เมื่อ C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม

S คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

BS คือ ค่าการดูดกลืนแสงอ้างอิงของสารสกัดที่มีสีที่ใช้ในการทดสอบ มีไว้เพื่อหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

ค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ถ้าสารสกัดมีค่า IC_{50} น้อยกว่าสารมาตรฐาน BHT แสดงว่ามีความสามารถต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยใช้วิธีวิเคราะห์ค่าทางสถิติ Newman Keuls Multiple Comparison test ด้วยใช้โปรแกรม GraphPad Prism โดยค่า p-value < 0.05 แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารจากสมุนไพรจีน

จากการนำสมุนไพรจีนทั้งสามชนิดมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณร้อยละของน้ำหนักแห้ง (% Yield) ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรจีนจื่อฉ่าว กันเฉ่า และจินอิ๋นฮวา เท่ากับ 1.342, 10.32 และ 13.27 ตามลำดับ

2. ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรจีนด้วยวิธี Agar well diffusion

ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรจีน 3 ชนิด ที่สกัดในชั้นเอทานอล ละลายด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้เชื้อทดสอบ 2 ชนิด ได้แก่ *S. mutans* และ *S. salivarius* ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยพบว่าสารสกัดหยาบจื่อฉ่าวออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในช่องปากทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบจินอิ๋นฮวาและกันเฉ่า ตามลำดับ (Table 1)

Table 1. Antibacterial properties of ethanol Chinese herb extracts against oral cavity bacteria using agar well diffusion method

Chinese herb	Zone of growth inhibition (mm ± SD)	
	S. mutans	*S. salivarius*
Zicao	31.13 ± 0.70[c]	20.84 ± 0.51[c]
Jinyinhua	16.80 ± 0.30[b]	16.14 ± 0.53[b]
Gancao	10.16 ± 0.45[a]	10.60 ± 0.72[a]
Ampicillin	12.17 ± 0.06	11.37 ± 0.25
DMSO	-	-

(-) indicates for no inhibitory effect, experiment with 3 replicates, difference superscript letters in each column indicate significant difference (P<0.05)

3. ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารสกัดจื่อฉ่าวที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) **และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย** (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)

จากผลการทดสอบ agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบของจื่อฉ่าวมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. mutans* และ *S. salivarius* ได้ดีที่สุดจึงนำมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ด้วยวิธี Modified broth microdilution เพื่อหาค่า MIC และ MBC ผลการทดสอบพบว่าค่า MIC และ MBC ของเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีค่าเท่ากัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.049 และ 0.098 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจื่อฉ่าวต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm) **ของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี** crystal violet staining for biofilm assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ยั้งการสร้างไบโอฟิล์มพบว่าสารสกัดจื่อฉ่าว สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ได้ดีกว่าเชื้อ *S. salivarius* ภายในเวลา 4 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของสารสกัดจื่อฉ่าวที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่าร้อยละ 50 ($MBIC_{50}$) ต่อเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีค่าน้อยกว่า 0.006 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า MBC_{80} มีค่าเท่ากับ 0.012 และ 1.563 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ของสารสกัดจากจื่อฉ่าวที่ความเข้มข้น 0.006-6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Figure 1)

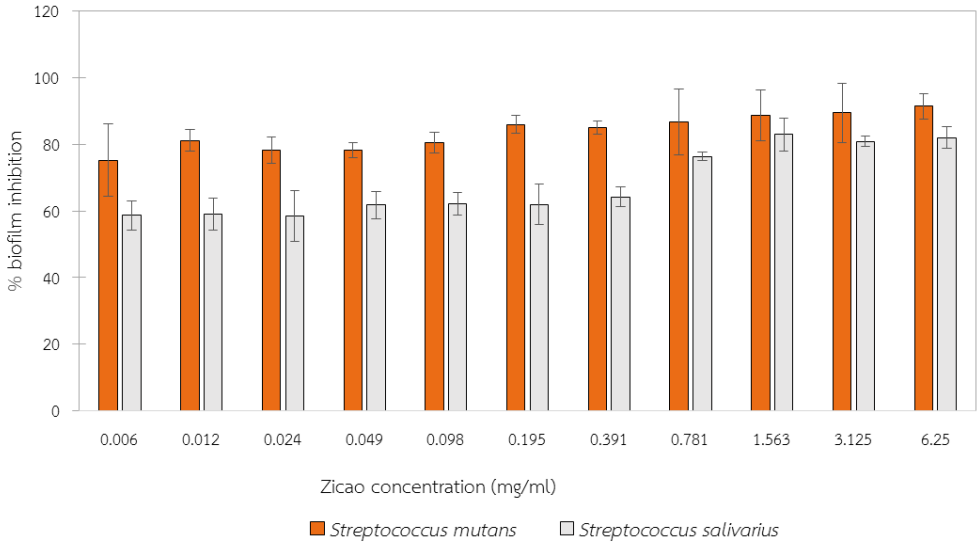
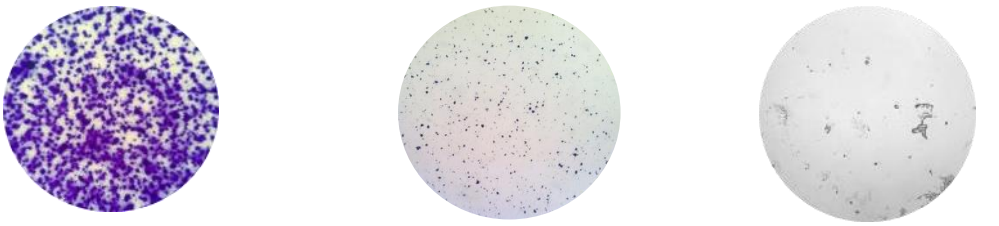


Figure.1 Inhibition of *S. mutans* and *S. salivarious* biofilm by Zicao at 0.06 to 6.25 mg/ml. Different superscript letters indicate significant difference (P<0.05)

5. ผลของสารสกัดจื่อฉ่าวต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มจะลดลง ภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. mutans* นั้นมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีกว่าเชื้อ *S. salivarius* อย่างเห็นได้ชัด สารสกัดจื่อฉ่าวมีฤทธิ์ในการต้านการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีภายในเวลา 24 ชั่วโมง (Figure 2 and Figure 3)



(a) (b) (c)

Figure.2 Biofilm inhibition of *S. mutans* by Zicao extracts as observed under light microscope with 100x objective lens; a, b, c represent control, 0.006 mg/ml and 6.25 mg/ml of Zicao extracts, respectively.

(a) (b) (c)

Figure.3 Biofilm inhibition of *S. salivarus* by Zicao extracts as observed under light microscope with 100x objective lens; a, b, c represent control without Zicao, 0.006 mg/ml and 6.25 mg/ml of Zicao extracts, respectively.

6. ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging assay

จากผลการทดลองที่รายงานเป็นค่า IC_{50} แสดงถึงความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระให้ลดลงร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดจื่อฉ่าวกับสารมาตรฐาน BHT พบว่ามีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงดัง Table 2

Table 2. Inhibition of free radicals and IC_{50} of Zicao extracts in comparison with standard BHT

Sample	IC_{50} ± SD* (mg/mL)
Zicao	0.046 ± 0.001
BHT	0.034 ± 0.0005

อภิปรายผลและสรุป

จื่อฉ่าวเป็นสมุนไพรดั้งเดิมของประเทศจีนมีรายงานวิจัยถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายชนิดรวมถึงความต้านทานต่อ human immunodeficiency virus (HIV) type 1 โดยสารที่สกัดได้จากส่วนรากคือ shikonin เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านการเกิดเนื้องอก และยังช่วยทำให้แผลหายเร็วขึ้น [17] ในส่วนของก้าน และใบ ยังไม่พบรายงาน ผลการวิจัยนี้พบว่าสารสกัดจื่อฉ่าวด้วยเอทานอลส่วนของก้านและใบมีฤทธิ์ทั้งต้านสารอนุมูลอิสระ ต้านแบคทีเรีย และต้านการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียในช่องปาก เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* และ *S. salivarius* ของสารสกัดจื่อฉ่าวกับสารสกัดกานพลูที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่า สารสกัดจื่อฉ่าวออกฤทธิ์ต้านเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีกว่าโดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 0.049 และ 0.098 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดกานพลูมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. mutans* เท่ากับ 12.5 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อ *S. salivarius* เท่ากับ 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ [18] ในทำนองเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. mutans* เท่ากับ 1.56 และ 3.17 ตามลำดับ [19] ค่า MIC และ MBC ที่ต่ำกว่าของสารสกัดจื่อฉ่าวแสดงถึงฤทธิ์ต้านเชื้อในช่องปากทั้งสองชนิดได้ดีกว่าสารสกัดสมุนไพรไทยทั้ง 2 ชนิด นอกจากฤทธิ์การต้านเชื้อแล้ว สารสกัดจื่อฉ่าวยังแสดงการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีโดยอาจเป็นผลจากการที่สารสกัดจื่อฉ่าวไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์กลูโคซิลทรานส์เฟอร์เรส (Glucotransferase) มีผลให้เกิดการสร้างกลูแคนน้อยลง เชื้อจึงเกาะติดได้น้อยลง หรือสารสกัดอาจไปยับยั้งโปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์ (Glucan-binding proteins) ทำให้เชื้อมาจับกับกลูแคนได้น้อยไบโอฟิล์มจึงไม่สามารถก่อตัวให้หนาขึ้นได้ รวมถึงสารสกัดอาจมีผลต่อโปรตีนแอนติเจน ซี (Protein antigen C) ที่ผิวเซลล์ และ โปรตีนที่จับกับคอลลาเจน (Collagen-binding protein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีส่วนที่ทำให้เกิดคราบพลัคที่ผิวฟัน และก่อให้เกิดโรคฟันผุ

นอกจากนี้จื่อฉ่าวเป็นสมุนไพรจีนที่เต็มไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ โดยสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) เป็นสารที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง โดยให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไป และหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อได้ สารต้านอนุมูลอิสระจึงมีความสำคัญที่จะช่วยต้านการอักเสบของเหงือกที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคฟันผุ มีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดจื่อฉ่าว ประกอบด้วยสารประกอบ 7 ชนิด ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระคือ deoxyshikonin, b,b-dimethylacrylshikonin, isobutylshikonin, shikonin,

5,8-dihydroxy-2-(1-methoxy-4-methyl-3-pentenyl)-1,4-naphthalenedione, b-sitosterol และเอสเทอร์ของกรดคาเฟอิค อีก 2 ชนิด [20] ที่ช่วยลดขนาดการอักเสบ [5]

จากผลการวิจัยทำให้ทราบว่าสามารถใช้สารสกัดจื่อฉ่าวในการควบคุมการเกิดคราบพลัคที่เกิดมาจากแบคทีเรียในช่องปากเพื่อป้องกันโรคเหงือกอักเสบ โรคฟันผุ และการเกิดกลิ่นปากได้ รวมถึงป้องการติดเชื้อชนิดรุนแรงในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำที่มีสาเหตุลุกลามมาจากเชื้อในช่องปาก ซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนสารเคมี เช่นคลอเฮกซิดีนซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้กันมานานในน้ำยาบ้วนปากซึ่งเป็นสารเคมีมาตรฐานในการปฏิบัติทางทันตกรรมแต่ยังมียังมีข้อด้อยบางประการที่ไม่เหมาะสมที่จะใช้ต่อเนื่องเป็นประจำ ดังนั้นสารสกัดจากสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการป้องกันการเกิดการติดเชื้อในช่องปาก และการเกิดโรคฟันผุ โดยเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยมากกว่าการใช้สารเคมีเมื่อใช้อย่างต่อเนื่อง และงานวิจัยนี้ยังเป็นการคัดกรองสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่สามารถนำมาใช้เป็นยาได้อีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

สารสกัดด้วยเอทานอลของสมุนไพรจีนจื่อฉ่าวมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านแบคทีเรีย และต้านการเกิดไบโอฟิล์ม ดั้งนั้นควรศึกษาถึงสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ และนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร เช่น ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปากเพื่อป้องกันโรคฟันผุ และป้องกันการติดเชื้อในช่องปากที่อาจลุกลามได้

เอกสารอ้างอิง

1. Matsumoto-Nakano, M. 2018. Role of S. mutans surface proteins for biofilm formation. *Japanese Dental Science Review*. 54: 22-29.
2. Hakalehto, E., Vilpponen S. T., Kinnunen, K., and Wright, A. 2011. Lactic acid bacteria enriched from human gastric biopsies. *ISRN Gastroenterol*. 2011: 1-4.
3. Tunkel, A. R. and Sepkowitz, K. A. 2002. Infections caused by viridans Streptococci in patients with neutropenia. *Clinical Infectious Diseases*. 34: 1524-1529.
4. Yingming, P., Ying, L., Hengshan, W., and Min, L. 2004. Antioxidant activities of several Chinese medicine herbs. *Food Chemistry*. 88: 347-350.
5. Chung, H. S., Kang, M., Cho, C., Park, S., Kim, H., Yoon, Y. S., Kang, J., Shin, M. K., Hong, M. C., Bae, H. 2005. Inhibition of lipopolysaccharide and interferon-gamma-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha by Lithospermi radix in mouse peritoneal macrophages. *Journal of Ethnopharmacol*. 102: 412-417.
6. Li, M., Xu, Z., Zhu, C. and Wang, J. 2012. Effect of different derivatives of shikonin from Lithospermum erythrorhizon against the pathogenic dental bacteria. *Current Pharmaceutical Analysis*. 8: 255-260.

7. Sasaki, K., Abe, H. and Yoshizaki, F. 2002. In vitro antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 25: 669-670.
8. Gao, H., Liu, L., Qu, Z. Y., Wei, F. X., Wang, S. Q., Chen, G., Qin, L., Jiang, F. Y., Wang, Y.C., Shang, L. and Gao, C. Y. 2011. Anti-adenovirus activities of shikonin, a component of Chinese herbal medicine in vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 34(2): 197-202.
9. Ko, H.C., Wei, B.L., Chiou, W.F. 2006. The effect of medicinal plants used in Chinese folk medicine on RANTES secretion by virus-infected human epithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 10: 205-210.
10. ดรุณรัตน์ สบายใจ อำพร บุญเอก ศรมน สุทิน อรภา ศลิมัฐ รุ่งรัตน์ นิลธเสน วรพรรณี เผ่าทองศุข. 2562. ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียต้านการเกิดไบโอฟิล์ม และต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด จินอิ๋นฮวา ต่อเชื้อในช่องปาก. *การประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน* ครั้งที่ 7 (น.983-990). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรังสิต.
11. Chakotiya, A. S., Tanwar, A., Narula, A. and Sharma, R. K. 2016. Alternative to antibiotics against Pseudomonas aeruginosa: Effects of Glycyrrhiza glabra on membrane permeability and inhibition of efflux activity and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa and its in vitro time-kill activity. *Microbial Pathogenesis*. 98: 98-105
12. Besinis, A., De Peralta, T. and Handy, R. D. 2014. The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on S. mutans using a suite of bioassays. *Nanotoxicology*. 8(1): 1-16.
13. Renuka, S. and Muralidharan, N. P. 2017. Comparison in benefits of herbal mouthwashes with chlorhexidine mouthwash: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 10(2): 3-7.
14. Balouiri, M., Sadiki, M. and Koraichi, S. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6: 71-79.
15. Lin, N. J., Keeler, C., Kraigsley, A. M., Ye, J. and Gibson, S. L. 2018. Effect of dental monomers and initiators on S. mutans oral biofilms. *Dental materials*. 34: 776-785.
16. Lu, M., Yuan, B., Zeng, M. and Chen, J. 2011. Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Research International*. 44: 530-536.
17. Chen, X., Yang, L., Zhang, N., Turpin, J. A., Buckheit, R. W., Osterling, C., Oppenheim, J. J. and Howard, O. M. Z. 2003. Shikonin, a component of Chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus

type 1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 9(47): 2810-2816.

18. Mirpour, M., Siahmazgi, Z. G. and Kiasaraie, M. S. 2015. Antibacterial activity of clove, gall nut methanolic and ethanolic extracts on S. mutans PTCC 1683 and S. salivarius PTCC 1448. *Journal of oral biology and research*. 1: 7-10.

19. Teanpaisan, R., Kawsud, P., Pahumunto, N. and Puripattanavong, J. 2017. Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 7: 172-177.

20. Han, J., Weng, X. and Bi, k. 2008. Antioxidants from a Chinese medicinal herb Lithospermum erythrorhizon. *Food Chemistry*. 106: 2-10.