การพัฒนาเจลสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์เพื่อป้องกันฟันผุ

วิทยานิพนธ์

ของ

ณลิตา ไพบูลย์

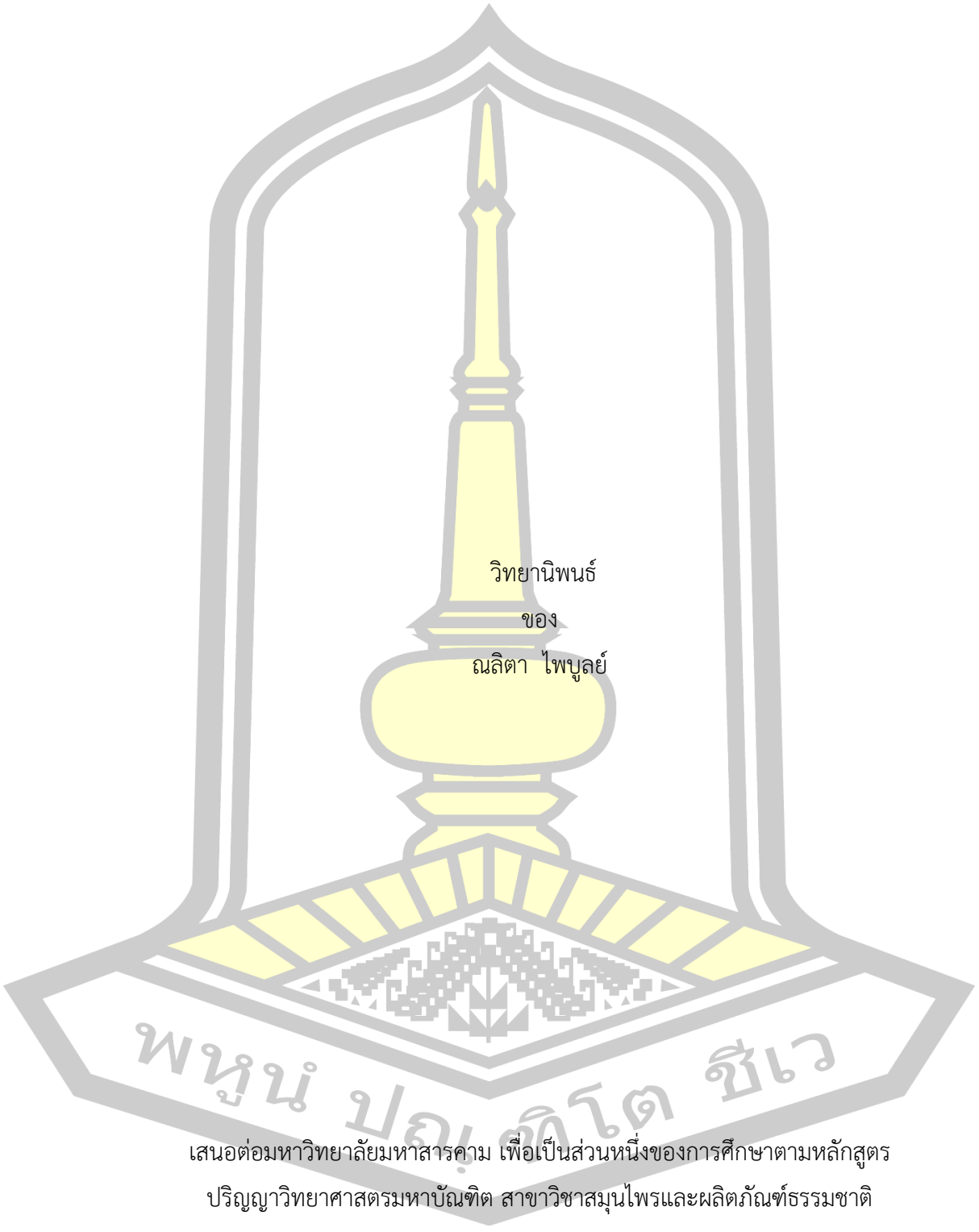
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

เมษายน 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การพัฒนาเจลสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์เพื่อป้องกันฟันผุ



วิทยานิพนธ์

ของ

ณลิตา ไพบูลย์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

เมษายน 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Development of Herbal Gel with Anti-cariogenic Activity Against *Streptococcus mutans*

Nalita Phaibun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (Medicinal Plants and Natural Products)

April 2019

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวณลิตา ไพบูลย์ แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผศ. ดร. เมธิน ผดุงกิจ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผศ. ดร. สกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ์)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. คัทลียา เมฆจรัสกุล)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ศ. ดร. สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ผศ. ดร. ชนัตถา พลอยเลื่อมแสง)
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

.....
(ผศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

ชื่อเรื่อง การพัฒนาเจลสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์เพื่อป้องกันฟันผุ

ผู้วิจัย ณลิตา ไพบูลย์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** สมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2562

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคฟันผุ ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อในช่องปากที่เป็นปัญหาหลักทางทันตสาธารณสุขพบได้ทุกกลุ่มประชากร นอกจากการใช้ฟลูออไรด์เพื่อเสริมสร้างความแข็งแรงของฟันในการป้องกันฟันผุแล้ว การใช้สมุนไพรเพื่อยับยั้งเชื้อก่อฟันผุ จัดเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการป้องกันฟันผุ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อและการต้านคุณสมบัติก่อฟันผุของเชื้อ *S. mutans* ของสารสกัดเอทานอลของใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลูซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในตำรับน้ำยาบ้วนปากเพื่อป้องกันฟันผุตามภูมิปัญญาพื้นบ้าน และนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรป้องกันฟันผุที่มีความคงตัว โดยสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาคือสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ด้วยวิธี broth dilution ทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสมุนไพรด้วยวิธี checkerboard dilution การทดสอบฤทธิ์ต้านคุณสมบัติก่อฟันผุของเชื้อ *S. mutans* จากการทดสอบการยึดเกาะบนพื้นผิว การสร้างไบโอฟิล์ม และการผลิตกรดของเชื้อแบคทีเรีย นำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพร ประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์ทางกายภาพและทางเคมี ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ของตำรับผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรด้วยวิธี agar well diffusion ผลการศึกษาพบว่าสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ที่ใช้ในการศึกษามีสารพฤกษเคมีได้แก่ quercetin, glycyrrhizic acid และ eugenol เป็นองค์ประกอบตามลำดับ สารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* (MIC) เท่ากับ 1.562, 0.195 และ 1.562 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. mutans* (MBC) ของสารสกัดรากชะเอมเทศเท่ากับ 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดใบฝรั่งและดอกกานพลูมีค่า MBC มากกว่า 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และผลของการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสมุนไพรแต่ละคู่ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ พบว่ามีการเสริมฤทธิ์กัน จากการทดสอบฤทธิ์ต้านคุณสมบัติก่อฟันผุ

ของเชื้อ *S. mutans* พบว่าสารสกัดสมุนไพรทุกชนิดที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC มีฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะบนพื้นผิว ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่เวลา 6, 12, 20 และ 24 ชั่วโมง และยับยั้งการผลิตกรดของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านเชื้อ และฤทธิ์ต้านคุณสมบัติก่อฟันผุของสารสกัดใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลูต่อเชื้อ *S. mutans* ทำให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรมีศักยภาพในการป้องกันฟันผุที่เกิดจากเชื้อ *S. mutans* จึงนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพร โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรชนิดละ 1MIC ได้ผลิตภัณฑ์เจลสมุนไพรที่พัฒนาได้มีความคงตัว และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเจลที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันฟันผุที่ใช้ในทางคลินิกหรือในเชิงพาณิชย์ได้ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : คุณสมบัติก่อฟันผุ, สเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์, ฝรั่ง, ชะเอมเทศ, กานพลู

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

TITLE Development of Herbal Gel with Anti-cariogenic Activity Against *Streptococcus mutans*

AUTHOR Nalita Phaibun

ADVISORS Assistant Professor Sakulrat Rattanakiat , Ph.D.

DEGREE Master of Science **MAJOR** Medicinal Plants and Natural Products

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2019

ABSTRACT

Streptococcus mutans is a major causative pathogen of dental caries (tooth decay), which is a leading oral infection causing crucial problems in dental public heath worldwide. In addition to fluorides uses in order to strengthen the tooth, an application of medicinal plants with anti-cariogenic activity is an interesting alternative for a prevention of dental caries. This study aimed to investigate the antimicrobial activity against *S. mutans* and anticariogenic properties of the ethanolic extracts of guava leaves (*Psidium guajava*), licorices (*Glycyrrhiza glabra*) and cloves (*Syzygium aromaticum*). These medicinal plants have been used traditionally as the ingredients in the herbal mouthwash for a prevention of dental caries. Furthermore, this study also aimed to developed of herbal gel products for prevention of dental caries. The 95% ethanolic extracts of guava leaves, licorices and cloves were prepared and their phytochemical contents were analyzed by using thin layer chromatography. Antibacterial activity of the extracts against *S. mutans* were conducted according to broth dilution methods. Screening synergy test using checkerboard dilution assay was further performed. The effects of the extracts against cariogenic properties of *S. mutans*, which are surface adhesion, biofilm formation and acid production were also investigated. Then, development of herbal gel and assessment of the stability of physical and chemical appearance of herbal gel were proceeded. Antibacterial activity of the extracts against *S. mutans* were conducted according to agar well diffusion assay. The result indicated that the

phytochemicals detected in the ethanolic extracts of guava leaves, licorices and cloves were quercetin, glycyrhizic acid and eugenol, respectively. The three extracts possessed anti-bacterial activity against *S. mutans* with the minimum inhibitory concentration (MICs) of 1.562, 0.195 and 1.562 mg/mL, respectively. The minimum bactericidal concentration (MBCs) of licorice extract was 3.12 mg/mL and extracts of guava leaves and cloves were more than 12.50 mg/mL. The results of the combined extracts showed synergistic effect. The extracts at which the concentrations tested (at lower than MIC) significantly inhibited cariogenic properties of *S. mutans*, surface adhesions, biofilm formation (at 6, 12, 20 and 24-hour) and acid production. The developed herbal gel is stable and possessed anti-bacterial activity against *S. mutans*. Therefore, this anti-caries product can potentially be developed as a product to clinical or commercial purposes in the future.

Keyword : cariogenic properties, Streptococcus mutans, Psidium guajava, Glycyrrhiza glabra, Syzygium aromaticum

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนอุดหนุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เมธิน ผดุงกิจ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คัทลียา เมฆจรัสกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์และครบถ้วนยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวิตรา พูลบุตร ซึ่งได้ให้คำแนะนำ ถ่ายทอดความรู้และสนับสนุนให้กำลังใจมาโดยตลอด ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา ไทรชมภู ซึ่งได้ให้ความอนุเคราะห์ระบุลักษณะ และชนิดของพืชที่ใช้ในการทำวิจัย อาจารย์ ดร.วันวิสาข์ คุณะวัฒนกุล ซึ่งให้คำแนะนำด้านการพัฒนาตำรับเจลทาฟันสมุนไพร

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่สนับสนุนทุนวิจัย เจ้าหน้าที่คณะเภสัชศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยในด้านวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ในการทำงานวิจัย รวมไปถึงเพื่อนร่วมหลักสูตรสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัวไพบูลย์ และญาติพี่น้อง ผู้เป็นแรงบันดาลใจ รวมร่วมไปถึงผู้มีอุปการคุณทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจที่สำคัญในการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์

และสุดท้ายนี้ผู้วิจัยคุณค่า และประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณแก่บิดา มารดา ผู้มีอุปการคุณทุกท่าน ตลอดจนบูรพาจารย์ผู้มีประสาทวิชา ดูแลเอาใจใส่ ให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตั้งแต่เยาว์วัยจนถึงปัจจุบัน

ณลิตา ไพบูลย์

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฏ

สารบัญภาพประกอบ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 หลักการและเหตุผล 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย 3

1.4 ความสำคัญของการวิจัย 3

1.5 ขอบเขตของการวิจัย 4

1.6 กรอบแนวคิดงานวิจัย 7

1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ 8

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 8

บทที่ 2 ปริทัศน์เอกสารข้อมูล 9

2.1 โรคฟันผุ 9

2.2 สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย 14

2.3 ตำรับเจลทาฟัน 22

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 27

3.1 เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 27

3.2 สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย 28
3.3 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร (จิตรลดา วรรณโชติ, 2558) 28
3.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย 29
3.5 การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) Densitometry (สุรพงค์ รัตนะ และคณะ 2560) 29
3.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ด้วยวิธี broth dilution 30
3.7 การทดสอบประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดสมุนไพรเมื่อใช้ร่วมเป็นคู่ ด้วยวิธี checkerboard dilution (Moody, 2004) 31
3.8 การศึกษากลไกในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *S. mutans* ด้วย sucrose-dependent adherence assay และ sucrose-independent adherence assay (Prabu et al., 2005) 32
3.9 การศึกษากลไกในการยับยั้งการเกิด biofilm ของเชื้อ *S. mutans* ด้วย Biofilm formation assay (Caiazza et al., 2007) 32
3.10 การศึกษาผลของสารสกัดที่ต้องการทดสอบ ต่อการลดลงของ pH ใน bacterial suspension หลังจากที่ใส่น้ำตาลกลูโคส (Yang et al., 2016) 33
3.11 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลทาฟันป้องกันฟันผุ (ภทรพรรณ อุณาภาค และ สิริรัตน์ ราษฎร์ดุษดี, 2549) 34
3.12 การประเมินคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เจลทาฟัน 35
3.13 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ด้วยวิธี Agar well diffusion (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) 36
3.14 การวิเคราะห์ข้อมูล 36
บทที่ 4 ผลการวิจัย 38
4.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร 39
4.2 การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) / Densitometry 39
4.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ด้วยวิธี broth dilution 42

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดสมุนไพรเมื่อใช้ร่วมเป็นคู่ ด้วยวิธี checkerboard dilution 43
4.5 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *S. mutans* ด้วย sucrose-dependent adherence assay และ sucrose-independent adherence assay 44
4.6 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการสร้าง biofilm ของเชื้อ *S. mutans* ด้วย Biofilm formation assay 46
4.7 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans* 47
4.8 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุ 49
4.9 การประเมินคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพร 51
4.10 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ของตำรับผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรด้วยวิธี Agar well diffusion 52
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 53
5.1 สรุปผล 53
5.2 อภิปรายผล 54
5.3 ข้อเสนอแนะ 59
บรรณานุกรม 61
ประวัติผู้เขียน 69

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 สรุปการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหรือสารสำคัญในสมุนไพรฝรั่ง ชะเอมเทศ กานพลูต่อเชื้อก่อโรคหรือกลไกการก่อโรคของเชื้อในช่องปาก 19

ตาราง 2 ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้ในการวิจัย 30

ตาราง 3 ปริมาตรสารที่เติมในหลอดที่ 1-12 ในการทดลองหาค่า MIC 30

ตาราง 4 ส่วนประกอบ ปริมาณ และหน้าที่ในตำรับ 35

ตาราง 5 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดสมุนไพร 39

ตาราง 6 ค่า Rf เมื่อตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดสมุนไพร (n=5) 39

ตาราง 7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ได้ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. mutans* (MBC) 42

ตาราง 8 ค่า FIC index ของสารสกัดใบฝรั่ง และสารสกัดดอกกานพลู 43

ตาราง 9 ค่า FIC index ของสารสกัดใบฝรั่ง และสารสกัดรากชะเอมเทศ 43

ตาราง 10 ค่า FIC index ของสารสกัดดอกกานพลู และสารสกัดรากชะเอมเทศ 44

ตาราง 11 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *S. mutans* ได้ 50% ของฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (IC_{50}) 45

ตาราง 12 ผลสารสกัดสมุนไพรต่อการลดลงของ pH ใน bacterial suspension หลังจากที่ใส่น้ำตาลกลูโคส 47

ตาราง 13 ส่วนประกอบ ปริมาณ และหน้าที่ในตำรับ 50

ตาราง 14 ผลการทดสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ก่อนและหลัง freeze-thaw cycling (n=3) 51

สารบัญภาพประกอบ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย 7

ภาพประกอบ 2 กระบวนการสูญเสีย และคืนกลับของแร่ธาตุที่ผิวฟัน 11

ภาพประกอบ 3 กลไกการก่อโรคฟันผุของเชื้อ *S. mutans* 12

ภาพประกอบ 4 โครงสร้างทางเคมีของ A. Tannin และ B. Quercertin 16

ภาพประกอบ 5 โครงสร้างทางเคมีของ A. Glycyrrhizin และ B. Glabridin 17

ภาพประกอบ 6 โครงสร้างทางเคมีของสาร Eugenol 18

ภาพประกอบ 7 TLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและสารสกัดสมุนไพรเมื่อตรวจสอบที่ความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร และที่ 366 นาโนเมตร 40

ภาพประกอบ 8 เดนซิโตแกรมที่ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 41

ภาพประกอบ 9 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการยึดเกาะบนพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* 45

ภาพประกอบ 10 ผลของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* 46

ภาพประกอบ 11 ผลของสารสกัดสมุนไพร 49

ภาพประกอบ 12 ลักษณะทางกายภาพของตำรับเจลทาฟันสมุนไพรป้องกันฟันผุ 50

ภาพประกอบ 13 ลักษณะ zone of inhibition จากการทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ S. mutans ด้วยวิธี Agar well diffusion 52

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

บทที่ 1
บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

ในปัจจุบันโรคฟันผุ (tooth decay, dental caries) เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งของไทย โดยจากการสำรวจคุณภาพช่องปากของคนไทยเมื่อปี พ.ศ.2550 พบว่าเด็กอายุ 3 ขวบ ประมาณ 66% เริ่มมีฟันน้ำนมผุ เมื่ออายุประมาณ 5-6 ขวบ พบฟันผุมากขึ้นเป็น 82% และในช่วงวัยรุ่นแม้จะมีจำนวนผู้ที่เป็นโรคฟันผุจะลดน้อยลง แต่ในวัยทำงานที่มีอายุในช่วง 30 ปีขึ้นไป พบว่าประมาณ 86% มีปัญหาฟันผุ ปัญหาเรื่องฟันโยก โรคเหงือกร่น ซึ่งเฉลี่ยแล้วสูญเสียฟันไปถึง 4 ซี่ต่อคน และย่างเข้าวัยชราหรือเมื่ออายุ 60 ปีขึ้นไป 90% พบว่ามีการสูญเสียฟัน เฉลี่ยประมาณ 14 ซี่ต่อคน (สุรเกียรติ อาชานานุภาพ, 2553) ฟันผุเป็นโรคติดเชื้อ โดยเชื้อสามารถเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรต เช่น แป้ง และน้ำตาลในอาหารที่ตกค้างบนฟัน หรือคราบจุลินทรีย์ให้เป็นกรดที่สามารถสลายแร่ธาตุซึ่งเป็นโครงสร้างของฟันทำให้ฟันผุกร่อน ถือเป็นกระบวนการเริ่มต้นของโรคฟันผุ แม้ในช่องปากจะมีจุลินทรีย์อยู่หลายชนิด แต่เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคฟันผุในมนุษย์ (ชุติมา ไตรรัตน์วรกุล, 2554) มีการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดเพื่อกำจัดเชื้อนี้ เช่น chlorhexidine penicillin ampicillin tetracycline erythromycin และ vancomycin แม้พบว่าสามารถป้องกันโรคฟันผุได้ แต่ยาเหล่านี้มีผลข้างเคียง เช่น การระคายเคืองเนื้อเยื่อในช่องปาก การรับรสผิดปกติ คลื่นไส้อาเจียน ฟันเปลี่ยนสี และการใช้สารเหล่านี้เกินจำเป็นอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเชื้อประจำถิ่นในช่องปากและในลำไส้และเกิดเชื้อดื้อยาได้ (สุภร ตันตินิรามัย, 2559) การศึกษาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อและมีความปลอดภัยในการใช้ในมนุษย์ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกสำหรับป้องกันฟันผุ จึงยังเป็นที่ต้องการ โดยเฉพาะในปัจจุบันการใช้ผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีสมุนไพรเป็นองค์ประกอบได้รับความนิยมเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก

ประเทศไทยมีสมุนไพรหลายชนิดที่ใช้ในการรักษาโรคทางช่องปาก ตามภูมิปัญญาท้องถิ่น โดยการนำสมุนไพรมาต้มกับน้ำใช้กลั้วช่องปาก หรือการนำสมุนไพรมาบดแล้วทาในช่องปาก เป็นต้น และในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาพบว่าสารสกัดสมุนไพรไทยหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อฟันผุ โดยเฉพาะเชื้อ *S. mutans* โดยผลการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าสารสกัดสมุนไพรได้แก่ ใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ ดอกกานพลู มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* (จิตรลดา วรรณโชติ, 2558) อย่างไรก็ตามยังคงขาดข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งคุณสมบัติก่อ

ฟันผุของแบคทีเรีย (cariogenic properties) ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีส่วนสำคัญยิ่งต่อการพัฒนากลยุทธ์ในการป้องกันฟันผุ

การรักษาสุขภาพช่องปากทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมใช้ได้แก่ การแปรงฟันด้วยยาสีฟัน การขัดฟัน และการใช้น้ำยาบ้วนปาก การใช้เจลทาฟันป้องกันฟันผุเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการป้องกันฟันผุที่น่าสนใจ โดยเจลเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของกึ่งแข็ง โปร่งใสคล้ายวุ้น มีความยืดหยุ่นสูง มีข้อดีที่แตกต่างจากวิธีอื่นคือ สามารถพกพาและใช้ในระหว่างวันได้สะดวกกว่าการแปรงฟัน และการใช้น้ำยาบ้วนปาก เหมาะกับทุกเพศทุกวัย โดยเฉพาะเด็กที่ยังแปรงฟันเองได้ไม่ดี หรือไม่ให้ความร่วมมือในการแปรงฟัน ผู้สูงอายุหรือผู้มีปัญหาในการแปรงฟันด้วยตัวเอง ลดปัญหาการสะสมสารฟลูออไรด์หรือสารอื่นที่อาจเป็นอันตรายจากการกลืนยาสีฟันหรือน้ำยาบ้วนปาก รูปแบบดังกล่าวยังไม่มีจำหน่ายอย่างแพร่หลายนัก โดยส่วนมากจะเป็นสินค้านำเข้าที่มีราคาแพง

ดังนั้นในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำสารสกัดสมุนไพรใบฝรั่ง ดอกกานพลู และรากชะเอมเทศ มาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเหล่านี้ ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* และกลไกการป้องกันฟันผุ จากนั้นจึงพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อป้องกันฟันผุ ในรูปแบบเจลทาฟัน ทั้งนี้หากต่อยอดผลิตภัณฑ์จนได้ออกสู่ท้องตลาดอย่างแพร่หลาย จะสามารถลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อจากการใช้ยาปฏิชีวนะเกินจำเป็น ผู้บริโภคมีทางเลือกผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพช่องปากเพิ่มขึ้น เพิ่มมูลค่าของทรัพยากรสมุนไพรที่มีอยู่ในประเทศ ลดการใช้และการนำเข้ายาแผนปัจจุบันจากต่างประเทศได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู

1.2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลูในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ในห้องปฏิบัติการ

1.2.3 เพื่อทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดจากใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู เมื่อใช้ร่วมกันเป็นคู่ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ในห้องปฏิบัติการ

1.2.4 เพื่อศึกษากลไกในการป้องกันฟันผุของสารสกัดจากใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู

1.2.5 เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับการป้องกันฟันผุ ในรูปแบบเจลทาฟัน รวมทั้งทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ทางเคมี และทางกายภาพ

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

1.3.1 สารสกัดจากใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลูมีองค์ประกอบทางพฤกษเคมีแตกต่างกัน

1.3.2 สารสกัดจากใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ได้แตกต่างกัน

1.3.3 สารสกัดจากใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู เมื่อใช้ร่วมกันเป็นคู่ จะมีการฤทธิ์เสริมหรือไม่เสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* แตกต่างกัน

1.3.4 สารสกัดจากใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถยับยั้งคุณสมบัติการก่อฟันผุ ได้แก่ ลดการยึดเกาะของเชื้อกับพื้นผิว ลดการก่อไบโอฟิล์ม และลดความเป็นกรดที่เชื้อสร้างขึ้นได้แตกต่างกัน

1.3.5 ได้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุในรูปแบบเจลทาฟัน ที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อได้ มีความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีดี

1.4 ความสำคัญของการวิจัย

แม้จะมีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ของสารสกัดใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู แล้ว แต่ยังไม่มีการทดสอบกลไกการยับยั้งคุณสมบัติการก่อฟันผุของเชื้อ *S. mutans* ในห้องปฏิบัติการ การทดสอบยืนยันฤทธิ์ต้านเชื้อ และกลไกการต้านฟันผุ ทำให้สามารถทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตั้งตำรับและวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อป้องกันฟันผุ จากสารสกัดสมุนไพรใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ในรูปแบบเจลทาฟัน นอกจากนี้การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดทำให้ได้แนวทางการพัฒนาการสกัดสารสำคัญ หรือการคัดเลือกสมุนไพรอื่น ๆ ที่อาจมีฤทธิ์เช่นกัน มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อยอดจากการศึกษาครั้งนี้ ผลของการศึกษานี้ หากได้ผลดีในหลอดทดลอง จะสามารถนำไปวิจัยทางคลินิก และใช้เป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกในการดูแลสุขภาพช่องปากต่อไป ซึ่งตามท้องตลาดผลิตภัณฑ์เจลยังไม่เป็นที่แพร่หลาย และผู้บริโภคมีความนิยมในการใช้ผลิตภัณฑ์ผสมสารจากธรรมชาติ ผลการศึกษาจะช่วยให้ผู้บริโภคมีความมั่นใจในการใช้ผลิตภัณฑ์ทางเลือกจากสมุนไพรที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพดีเหล่านี้นับเป็นโอกาสทางการตลาดของผลิตภัณฑ์เจลทาฟันจากสารสกัดสมุนไพรที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ และเมื่อผลิตภัณฑ์ออกสู่ตลาดอย่างแพร่หลายแล้ว จะช่วยในการเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทย ลดการนำเข้าสารเคมีจากต่างประเทศ ช่วยลดปัญหาการดื้อยา และมีส่วนช่วยลดปัญหาโรคฟันผุลงได้

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1.5.1 พืชที่ใช้ในการวิจัย

1.5.1.1 ใบฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.) เก็บตัวอย่างจากอำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา เก็บเมื่อเดือนกันยายน พ.ศ. 2559

1.5.1.2 รากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* Linn.) จากร้านจี่อันตึ้ง สามแพทย์ จังหวัดนครราชสีมา จัดซื้อในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2559

1.5.1.3 ดอกกานพลู (*Syzygium aromaticum* (Linn) Merr and Perry.) จากร้านทองอินทร์เภสัช จังหวัดมหาสารคาม จัดซื้อในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2559

สมุนไพรทั้ง 3 ชนิด สกัดด้วย 95% ethanol

1.5.2 การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ทำโดยวิธี thin-layer chromatography และ semiquantitative densitometry โดยใช้สารมาตรฐานคือ quercetin glycyrrhizic acid และ eugenol สำหรับสารสกัดจากใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ตามลำดับ

1.5.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. mutans* สายพันธุ์ DMST 18777

1.5.3.1 สารสกัดจากใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ทดสอบโดยวิธี broth macrodilution

ตัวแปรต้น: สารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.024 ถึง 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตัวแปรตาม: ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตโดยบันทึกเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

ตัวแปรควบคุม: สภาวะการบ่ม

1.5.3.2 ผลิตภัณฑ์เจลทาฟันจากสารสกัดใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion

ตัวแปรต้น: ผลิตภัณฑ์เจลทาฟันจากสารสกัดใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู

ตัวแปรตาม: ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตโดยบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส

ตัวแปรควบคุม: สภาวะการบ่ม

1.5.4 การทดสอบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสกัดสมุนไพร ทำโดย checkerboard assay

ตัวแปรต้น: ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ได้แก่ 1MIC, 1/2MIC, 1/4MIC และ 1/16MIC

ตัวแปรตาม: ความสามารถในการออกฤทธิ์เสริมกันของคู่สมุนไพร โดยดูผลได้จากการคำนวณหาค่า FICI ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5

ตัวแปรควบคุม: สภาวะการบ่ม

1.5.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งคุณสมบัติการก่อฟันผุ ได้แก่ ลดการยึดเกาะของเชื้อกับพื้นผิว ลดการก่อไบโอฟิล์ม และลดความเป็นกรดที่เชื้อสร้างขึ้น

1.5.5.1 การทดสอบฤทธิ์ลดการยึดเกาะของเชื้อกับพื้นผิวด้วย Sucrose-dependent adherence assay และ sucrose-independent adherence assay

ตัวแปรต้น: สารสกัดสมุนไพรแต่ละความเข้มข้น ได้แก่ สารสกัดใบฝรั่งความเข้มข้น 0.25, 0.37, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดรากชะเอมเทศ 0.025, 0.037, 0.05, 0.075 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดดอกกานพลู 0.25, 0.37, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตัวแปรตาม: ความสามารถลดการยึดเกาะบนพื้นผิว ดูผลจากการคำนวณหา % adherence

ตัวแปรควบคุม: สภาวะที่มีซูโครส และไม่มีซูโครส อุณหภูมิ และระยะเวลาการบ่ม

1.5.5.2 การทดสอบฤทธิ์ลดการก่อไบโอฟิล์มด้วย Biofilm formation assay

ตัวแปรต้น: สารสกัดสมุนไพรแต่ละความเข้มข้น ได้แก่ สารสกัดใบฝรั่งความเข้มข้น 0.25, 0.37, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดรากชะเอมเทศ 0.025, 0.037, 0.05, 0.075 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดดอกกานพลู 0.25, 0.37, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตัวแปรตาม: ความสามารถลดการก่อไบโอฟิล์ม ดูผลจากการคำนวณหาร้อยละการลดลงของไบโอฟิล์ม

ตัวแปรควบคุม: สภาวะการบ่ม

1.5.5.3 การทดสอบฤทธิ์ลดความเป็นกรดที่เชื้อสร้างขึ้นด้วย Glycolytic pH drop assay

ตัวแปรต้น: สารสกัดสมุนไพรแต่ละความเข้มข้น ได้แก่ สารสกัดใบฝรั่งความเข้มข้น 0.25, 0.37, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดรากชะเอมเทศ 0.025, 0.037, 0.05,

0.075 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดดอกกานพลู 0.25, 0.37, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตัวแปรตาม: ความสามารถลดความเป็นกรดที่เชื้อสร้างขึ้น ดูผลจากอัตราการลดลงของ pH

ตัวแปรควบคุม: สภาวะการบ่ม

1.5.6 การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลทาฟัน ทำโดยผ่านสภาวะเร่งคือ freeze-thaw cycling หัวข้อที่ทดสอบก่อนและหลังผ่านสภาวะเร่ง คือ ทางกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น รส การแยกชั้น ความหนืด ทางเคมี ได้แก่ ค่า pH และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ โดยวิธี agar well diffusion

ตัวแปรต้น: ผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพร

ตัวแปรตาม: ลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของผลิตภัณฑ์เจลทาฟัน และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ของผิตภัณฑ์เจลทาฟันซึ่งแสดงโดยดูผลจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส

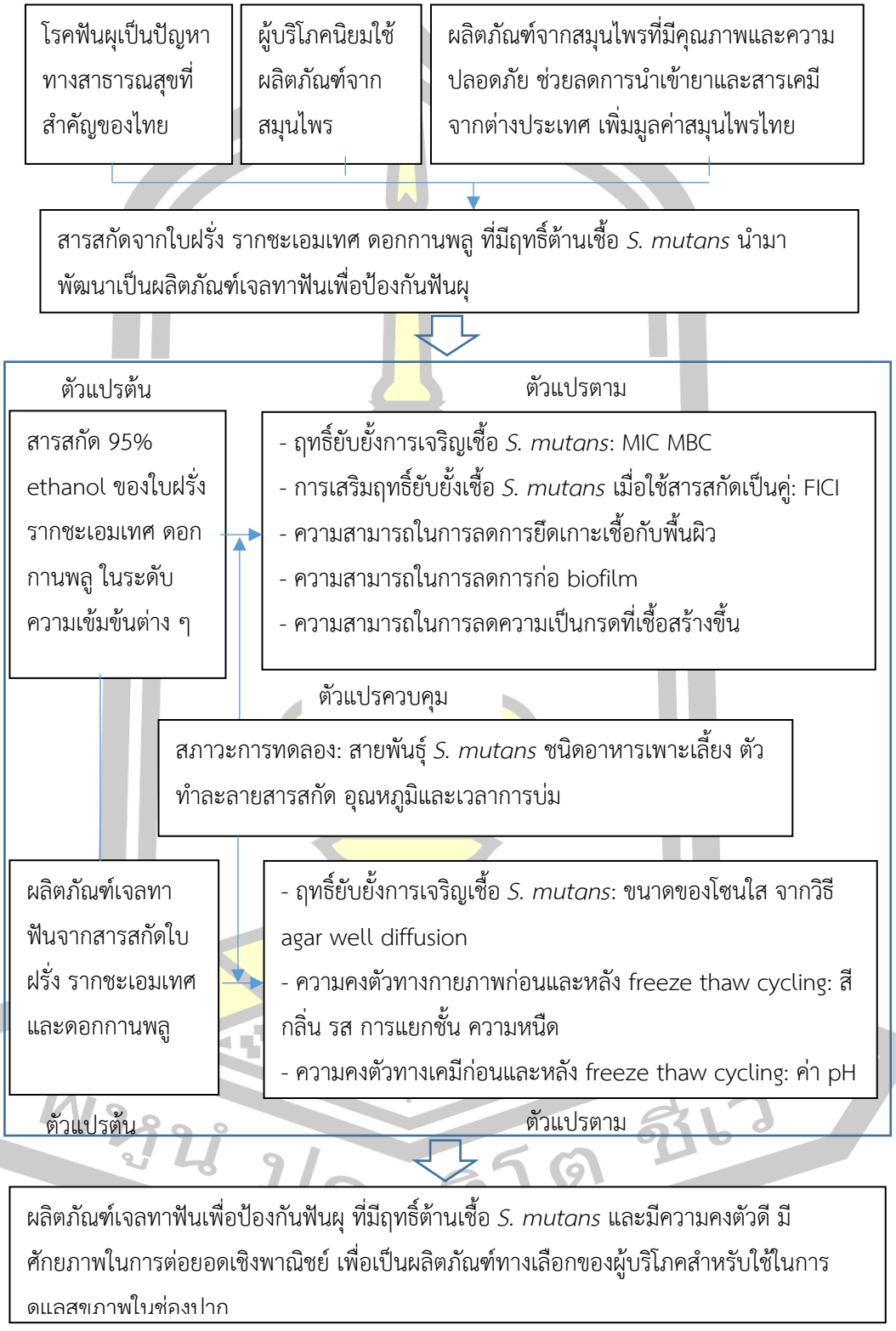
ตัวแปรควบคุม: สภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 รอบ

1.5.8 ระยะเวลาในการวิจัย คือ เดือนสิงหาคม 2559 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2561

1.5.9 สถานที่วิจัยคือ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

1.6 กรอบแนวคิดงานวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ

เจลทาฟัน (Tooth gel) หมายถึง ยาเตรียมในรูปแบบกึ่งแข็ง สารสำคัญที่ประกอบด้วยสารสกัดของสมุนไพรใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู จะกระจายตัวอยู่ในของเหลวที่มีสารก่อเจลอยู่ เมื่อใช้ทาฟันแล้วไม่ต้องล้างหรือบ้วนออก

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) คือ ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยเมื่อใช้วิธี broth dilution จะสังเกตได้จากหลอดทดลองไม่ขุ่นจากการเจริญของจุลินทรีย์

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) คือ ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ฆ่าเชื้อได้ โดยเมื่อนำเชื้อในหลอดทดลองที่ใสหรือไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์มาเพาะลงบนอาหารแข็ง แล้วไม่พบการเจริญเติบโตโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น

Sucrose-dependent adherence assay และ sucrose-independent adherence assay คือ วิธีทดสอบความสามารถในการลดการยึดเกาะเชื้อกับพื้นผิวที่สภาวะที่มี ซูโครส และสภาวะที่ไม่มี ซูโครส

Biofilm formation assay คือ วิธีการทดสอบความสามารถในการลดการก่อ biofilm ที่ช่วงเวลา 6, 12, 20 และ 24 ชั่วโมง

Glycolytic pH drop assay คือ วิธีการทดสอบความสามารถในการความเป็นกรดที่เชื้อสร้างขึ้น เป็นระยะเวลา 60 นาที

Freeze – Thaw Cycling คือ การทดสอบความคงตัวของตำรับเจล โดยสลับอุณหภูมิที่ต่างกันทันที โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1 รอบ

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 ทราบกลไกการป้องกันฟันผุ ของสารสกัดสมุนไพรใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ป้องกันฟันผุ

1.7.2 ได้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุ ที่มีความคงตัวสามารถนำไปใช้ทางคลินิกและพัฒนาในเชิงพาณิชย์ได้ต่อไป

บทที่ 2
ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

การศึกษาเรื่องการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์เพื่อป้องกันฟันผุ เกี่ยวข้องกับข้อมูลและงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยสรุปสาระสำคัญตามหัวข้อดังต่อไปนี้

2.1 โรคฟันผุ

2.2 สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย

2.3 ตำรับเจลทาฟัน

2.1 โรคฟันผุ

โรคฟันผุ (Dental caries) คือสภาวะฟันที่มีการสูญเสียสารเคลือบฟัน และเนื้อฟัน ทำให้ผิวของฟันเกิดหลุม โพรง เป็นปัญหาสุขภาพช่องปากที่สำคัญ ที่พบได้ในประชากรทุกวัย โดยพบมากในวัยเด็ก แต่ใน วัยรุ่น และวัยทำงานมีปัจจัยเสี่ยงของฟันผุ คือพฤติกรรมการบริโภคขนมหวาน และการดื่มเครื่องดื่มที่มีน้ำตาล และน้ำอัดลม ส่วนในผู้สูงอายุมีปัจจัยเสี่ยงจากการความแข็งแรงของกล้ามเนื้อมือที่ลดลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการแปรงฟันเพื่อทำความสะอาดช่องปากลดลง ซึ่งฟันที่ผุแล้วไม่อาจกลับมาเป็นสภาพฟันปกติได้ แต่สามารถยับยั้งไม่ให้การผุลุกลามได้ ฟันที่ผุส่วนใหญ่จะเป็นฟันที่ผุสะสมมา และพบการผุบริเวณรากฟันเพิ่มขึ้น โดยมีแนวโน้มของจานวนค่าเฉลี่ยของเด็กที่มีฟันผุเพิ่มขึ้นตามปีที่สำรวจ โดยข้อมูลจากรายงานการสำรวจในปี พ.ศ. 2532, 2537, 2544 และ 2550 พบว่า เด็กในวัยดังกล่าวมีความชุกในการเกิดฟันผุเป็นร้อยละ 82.8, 85.3, 87.5 และ 80.6 ตามลำดับ และในครั้งล่าสุด พ.ศ.2551 ถึง 2555 พบว่า ในช่วงอายุ 5 ปี เด็กมีโรคฟันผุสูงถึงร้อยละ 78.5 และมีค่าเฉลี่ยฟันผุ ถอน อุด เท่ากับ 4.4 ซี่ต่อคน (กองทันตสาธารณสุข, 2551) ซึ่งปัญหาฟันผุในกลุ่มเด็กมีปัญหาสูงอย่างน่าเป็นห่วง ซึ่งผลกระทบจากการเกิดฟันผุนอกจากส่งผลทาให้เกิดกลิ่นปาก อาการเสียวและปวดฟัน ยังส่งผลกระทบต่อการพัฒนาด้านสติปัญญา บุคลิกภาพ และปัญหาทางโภชนาการตามมา (Woodward and Walker, 1994) นอกจากนี้แล้ว การเกิดฟันผุปริมาณมากในชุดฟันน้ำนมนั้นยังเป็นข้อบ่งชี้ที่สำคัญที่จะทำนายการเกิดฟันผุในชุดฟันแท้ในอนาคตได้อีกด้วย (Beltrán et al., 2006)

ดังนั้น การทราบสาเหตุของโรคฟันผุและปัจจัยที่เกี่ยวข้องจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องมีการศึกษาและให้ความสำคัญ โดยจากองค์ความรู้ในปัจจุบันทราบว่า โรคฟันผุนั้นเป็นโรคที่เกิดจากปัจจัยร่วมกัน ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดกรด (cariogenic bacteria) อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต

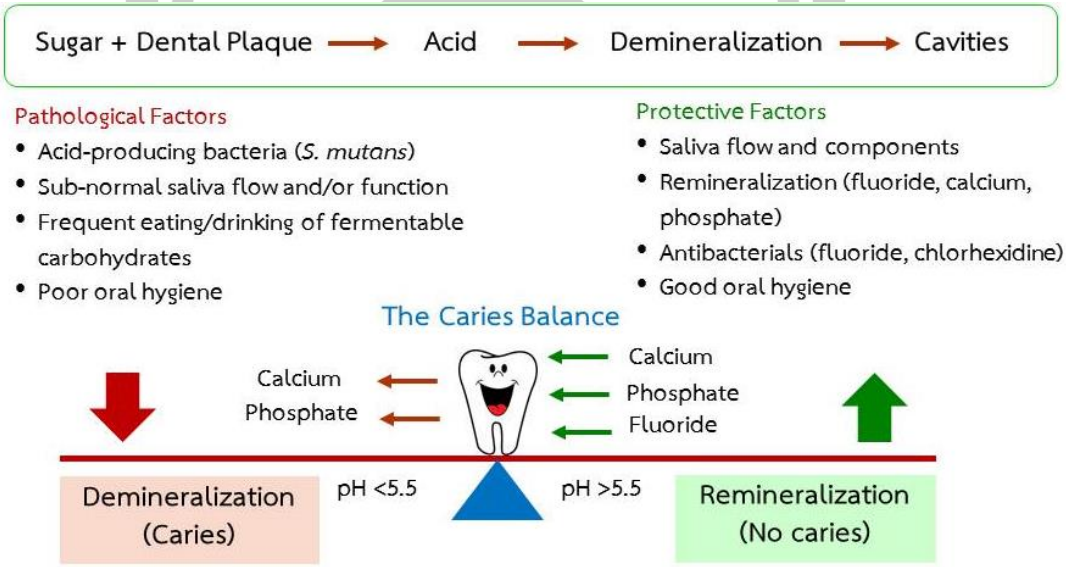
(fermentable carbohydrate) และ ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ฟัน และสภาพในช่องปากต่าง ๆ (ประทีป พันธุมวนิช และ จันทนา อึ้งชูศักดิ์, 2539) สำหรับปัจจัยด้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกรดและอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตมีงานวิจัยที่ศึกษาความสัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุมากมาย แต่สำหรับปัจจัยด้านกายภาพที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดฟันผุ ยังมีการศึกษาไม่มากนัก และมีหลายปัจจัยที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดฟันผุ เช่น ปัจจัยด้านน้ำหนักตัวของเด็ก ปัจจัยด้านเพศ ปัจจัยด้านลักษณะการสบฟัน และปัจจัยด้านนิสัยที่ผิดปกติทางช่องปาก

2.1.1 สาเหตุและกลไกการเกิดโรคฟันผุ

มีการศึกษาพบว่าโรคฟันผุมีการเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดด้วยกัน แต่แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคฟันผุคือแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (Hamada and Slade, 1980) กลไกการเกิดโรคฟันผุเกิดจากแบคทีเรียที่รวมกลุ่มกันอยู่บนผิวฟัน ย่อยสลายอาหารจำพวกแป้ง และน้ำตาล ทำให้เกิดกรด กรดจะทำปฏิกิริยากับแร่ธาตุที่อยู่ในฟัน ทำให้สูญเสียแร่ธาตุ จนสารเคลือบฟันและเนื้อฟันอ่อนตัวหลุดไป ทำให้ฟันเกิดเป็นรูผุ การเกิดกรด และการละลายเกลือแร่ออกจากฟันต้องเกิดภายใต้คราบจุลินทรีย์เสมอ ผิวฟันที่สะอาดไม่มีคราบจุลินทรีย์จะไม่เกิดฟันผุ (เมธินี คุปพิทยานันท์ และ สุพรรณี ศรีวิริยกุล, 2555) โดยกระบวนการการเกิดโรคฟันผุ เป็นผลของการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของผิวเคลือบฟันที่เสียสมดุล ซึ่งฟันแต่ละซี่จะมีการสูญเสีย และการคืนกลับของแร่ธาตุตลอดเวลา หากอยู่ในภาวะสมดุลจะไม่เกิดเป็นรูผุ แต่ถ้าสภาพความเป็นกรดเกิดขึ้นต่อเนื่องสมดุลจะเสียไป มีการสูญเสียแร่ธาตุมากกว่าการคืนกลับ จนเกิดรูผุในที่สุด สภาวะเสียสมดุลนี้พบได้บ่อยในบุคคลที่ชอบรับประทานจุบจิบ รับประทานอาหารที่มีรสหวาน หรือไม่ทำความสะอาดช่องปากหลังรับประทานอาหาร ทำให้มีแป้ง และน้ำตาลตกค้างในช่องปาก จุลินทรีย์จึงมีแป้ง และน้ำตาลมาใช้ในการผลิตกรดได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งโรคฟันผุเป็นโรคติดเชื้อโดยมีเชื้อก่อฟันผุเข้าทำปฏิกิริยากับคาร์โบไฮเดรท เป็นการเสียสมดุลของกระบวนการสูญเสีย และกลับคืนของแร่ธาตุที่ผิวฟัน โดย *S. mutans* จะเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรต ให้เป็นกรด เมื่อ pH ต่ำกว่า 5.5 ฟันจะสูญเสียแร่ธาตุไปทำให้ฟันผุกร่อน (demineralization) โดยมีปัจจัยการเกิดโรคฟันผุได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดได้ ปริมาณน้ำลายน้อย ความถี่ของการรับทานอาหารและเครื่องดื่มที่มีน้ำตาล สุขภาวะทางช่องปากที่ไม่ดี แต่เมื่อได้รับผลิตภัณฑ์ป้องกันฟันผุช่วยในการปรับระดับความเป็นกรดเมื่อ pH สูงกว่า 5.5 แร่ธาตุจะกลับคืนที่ผิวฟัน (remineralization) ทำให้ช่องปากกลับมาอยู่ในสภาวะสมดุลอีกครั้ง โดยปัจจัยการป้องกันโรคฟันผุ ได้แก่ การไหลของน้ำลาย และองค์ประกอบของน้ำลาย การเพิ่มแร่ธาตุให้กับฟัน การใช้สารต้านเชื้อแบคทีเรีย สุขภาวะช่องปากที่ดี ดังภาพประกอบ 1 (Ritter et al., 2015; pocketdentistry.com 2017)

เชื้อ *S. mutans* พบได้มากที่สุดในช่วงระยะเริ่มต้นของการเกิดคราบจุลินทรีย์ สามารถแปลงแปลงอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรดแลคติก (lactic acid) (Hamada and

Slade, 1980) ส่งผลให้เกิดการสลายแร่ธาตุของฟันและทำให้เกิดฟันผุในที่สุด เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ยังสามารถผลิตเอนไซม์ glucosyltransferase (GTFs) ซึ่งทำหน้าที่สร้าง intracellular polysaccharides และ extracellular polysaccharides จากน้ำตาล ซูโครส ซึ่ง polysaccharides หรือ glucan เหล่านี้ทำให้เชื้อแบคทีเรียเกาะจับกับผิวฟันได้ดีมากขึ้น (Woodward and Walker, 1994) ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียสามารถสามารถเพิ่มจำนวนและตั้งถิ่นฐาน (colonization) ที่บริเวณช่องปากได้เพิ่มมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ยังมีความสามารถในการทนกรด (aciduracity) จึงทำให้สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ความเป็นกรดในบริเวณช่องปาก ความสามารถในการทนกรดของเชื้อแบคทีเรียเกิดจากการทำงานของโปรตีน F-ATPase ซึ่งเป็น pump บริเวณ cell membrane ของเชื้อแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ควบคุมสมดุล pH ของเชื้อแบคทีเรีย (Hamada and Slade, 1980) คุณสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้ของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้แบคทีเรีย *S. mutans* มีความสามารถในการก่อให้เกิดฟันผุ (cariogenic properties) ดังนั้นนอกเหนือจากฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแล้ว การยับยั้ง cariogenic properties อื่น ๆ ของเชื้อแบคทีเรียก็จัดเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมและยับยั้งการเกิดฟันผุจากเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* เช่นเดียวกัน (Matsumura et al., 2003)



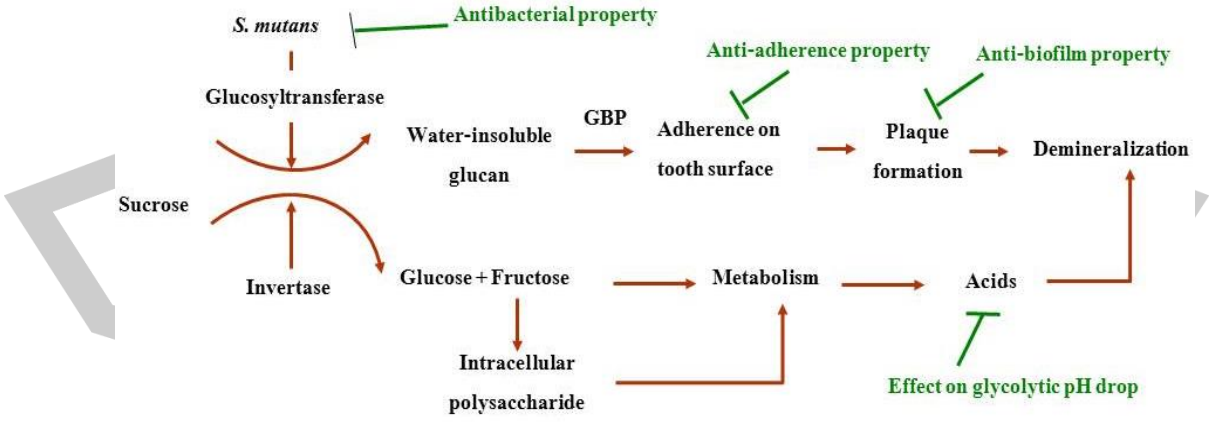
ภาพประกอบ 2 กระบวนการสูญเสีย และคืนกลับของแร่ธาตุที่ผิวฟัน
(ดัดแปลงจาก Ritter et al., 2015; pocketdentistry.com 2017)

กลไกการก่อโรคฟันผุของเชื้อ *S. mutans* มีหลายปัจจัยดังภาพประกอบ 2 โดยปัจจัยหลักในการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่ผิวฟันมีปัจจัยหลัก 3 ประการ ดังนี้

2.1.1.1 Sucrose-independent adhesion เป็นการยึดเกาะโดยใช้โปรตีน antigen I/II โปรตีนชนิดนี้พบได้ในเชื้อ streptococci มีความสามารถในการยึดเกาะกับโปรตีนต่าง ๆ ในน้ำลาย จนทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์ (Petersen et al., 2002) และมีรายงานพบว่าเชื้อ *S. mutans* สายพันธุ์กลายพันธุ์ P1 ที่ไม่สามารถสร้างโปรตีนจะมี hydroxyapatite ที่เคลือบน้ำลายได้ลดลง การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า หากเชื้อขาดโปรตีน เชื้อจะยึดเกาะกับโปรตีนในน้ำลายที่เคลือบผิวฟันลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการขาดโปรตีน P1 จะทำให้การสร้างคราบจุลินทรีย์ในหลอดทดลองผิดไป ซึ่งอาจมีผลให้การก่อโรคเปลี่ยนไป (Lee et al., 1989)

2.1.1.2 Sucrose-dependent adhesion เป็นการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *S. mutans* เป็นแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ glucosyltransferase (GTF) จากการใช้น้ำตาล ซูโครส เพื่อการสังเคราะห์ glucan โดยการย่อยสลาย ซูโครส เป็น glucose และ fructose และ glucose เชื่อมต่อกันเป็น polymer ของ glucan ซึ่งใน *S. mutans* มียีนชนิดที่ควบคุมการสร้าง glucan ซึ่ง glucan มีความสำคัญในการทำให้เชื้อ *S. mutans* ยึดเกาะและตั้งถิ่นฐานบนผิวฟันได้ รวมทั้งเป็นตัวกลางให้แบคทีเรียชนิดอื่นมาเกาะติด และรวมตัวกันที่ผิวฟันด้วย จึงก่อให้เกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ ที่ยากต่อการกำจัดออก (Bowen and Koo, 2011)

2.1.1.3 Glucan binding protein (GBP) เป็นโปรตีนที่ยึดเกาะอยู่กับ glucan ซึ่ง *S. mutans* มีโปรตีนนี้ 3 ชนิดคือ GBP A, GBP B และ GBP D โปรตีนเหล่านี้มีความสำคัญในการสร้างคราบจุลินทรีย์ และมีส่วนในการก่อโรคฟันผุ (Lynch et al., 2031)



ภาพประกอบ 3 กลไกการก่อโรคฟันผุของเชื้อ *S. mutans*

ดัดแปลงจาก (Barker, 2010)

2.1.2 การป้องกันโรคฟันผุ

2.1.2.1 การเคลือบร่องฟันที่ตำแหน่งที่เกิดการผุได้ง่าย ซึ่งเป็นบริเวณที่ทำความสะอาดได้ยาก จึงมีการนำวัสดุที่เป็นพลาสติกมาเคลือบร่องฟัน มีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับผิวฟัน ป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ (ชุติมา ไตรรัตน์วรกุล, 2554)

2.1.2.2 ฟลูออไรด์ (fluoride) เป็นเกลือของฟลูออรีน (F_2) มีประจุไฟฟ้าเป็นลบ พบได้ในแหล่งแร่ ดิน อาหาร น้ำดื่ม เป็นสารสำคัญที่นำมาใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์สำหรับป้องกันฟันผุ และเสริมสร้างกระดูก และฟัน เช่น ยาสีฟัน อาหารเสริม แต่หากได้รับมากเกินไปจะมีพิษต่อร่างกาย เช่น ฟันตกกระ กระดูกแข็งด้าน และเป็นเส้นใย เป็นต้น ฟลูออไรด์มีความจำเป็นในการสร้างระบบกระดูก และฟัน ทำหน้าที่สำคัญในการเพิ่มขนาดของผลึกพาไทต์ และลดค่าการละลายของผลึกทำให้กระดูก และฟันแข็งแรง ช่วยป้องกันโรคฟันผุได้ ฟลูออไรด์มักจะถูกเติมลงไปในน้ำดื่มเพื่อช่วยป้องกันฟันผุ ในช่วงยุค 1930 นักวิจัยพบว่า ผู้ที่ดื่มน้ำที่ผสมฟลูออไรด์ตามธรรมชาติมาโดยตลอดจะมีฟันผุน้อยกว่าผู้ที่อยู่ในบริเวณที่ไม่มีน้ำที่มีฟลูออไรด์ตามธรรมชาติถึง 2-3 เท่า งานวิจัยหลังจากนั้นเป็นต้นมา ก็ได้ยืนยันอีกว่าเมื่อมีการเติมฟลูออไรด์ลงในน้ำประปา ฟันผุก็จะลดน้อยลง American Dental Association องค์การอนามัยโลก และ American Medical Association ก็ต่างยืนยันและสนับสนุนการเติมฟลูออไรด์ในน้ำประปาเนื่องจากผลในการลดฟันผุ (Islam et al., 2007)

2.1.2.3 สารให้ความหวานที่ใช้แทนน้ำตาล นักวิทยาศาสตร์เรียกว่า สารให้ความหวานเทียม (artificial sweetening agent) ซึ่งเป็นสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาทางวิทยาศาสตร์ และมีคุณสมบัติให้รสหวานคล้ายน้ำตาล สามารถนำมาใช้แทนน้ำตาลได้ การกินของหวานหรือน้ำตาลในปริมาณมาก ๆ ก็คือ การเกิดฟันผุ เนื่องจากแบคทีเรียในช่องปากสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดชนิดหนึ่งเรียกว่า กรดแลกติก (lactic acid) ซึ่งจะทำให้เคลือบฟันผุกร่อนและเกิดอาการฟันผุได้ในที่สุด จากปัญหาดังกล่าวที่เกิดตามมากับการชอบกินของหวาน คนทั่วไปก็ยังชอบกินของหวานจึงไม่ละทิ้งความพยายามที่จะหาสารที่ให้รสหวานชนิดอื่นมาทดแทนน้ำตาลเพื่อที่จะลดปริมาณแคลอรีทั้งหมดของของหวานให้ต่ำลง และยังสามารถใช้ในกรณีของผู้ป่วยโรคเบาหวานซึ่งไม่อาจกินน้ำตาลในปริมาณมากได้ นอกจากนี้แล้ว สารให้รสหวานบางชนิดยังไม่ทำให้เกิดฟันผุอีกด้วย (สถาบันวิจัยโภชนาการ, 2532)

2.1.2.4 ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย ยานี้เป็นยาที่อาจพิจารณาเลือกใช้ในกรณีที่คาดว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรียที่ฟัน หรือในรายที่มีอาการเหงือกบวม เป็นหนองร่วมด้วย ยาที่นิยมใช้ต้านแบคทีเรียทางทันตกรรม คือ อะม็อกซีซิลลิน ซึ่งเป็นชนิดเดียวกันกับยารักษาการ ติดเชื้อในลำคอ (แก้เจ็บคอ) ซึ่งในผู้ใหญ่ ควรใช้ในขนาด 500 มิลลิกรัม/แคปซูล ครั้งละ 1 เม็ด (หรือชนิดแคปซูล ขนาด 250 มิลลิกรัม จำนวน 2 เม็ด) วันละ 3 ครั้ง หลังอาหาร เช้า กลางวัน เย็น และควรใช้ติดต่อกัน 5-7 วัน หรือเหงือกหายบวมแล้ว 3 วัน เนื่องจากยานี้เป็นยาในกลุ่มเพนิซิลลินที่มีอุบัติการณ์ของการแพ้ยาได้

บ่อยเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย ในการใช้ยานี้จึงควรแน่ใจว่า ผู้ใช้ยาไม่เคยแพ้ยาหรือยาอื่น ๆ ในกลุ่มเพนิซิลลินมาก่อน ถ้าผู้ป่วยมีประวัติการแพ้ยากลุ่มเพนิซิลลิน จะเลือกใช้ยากลุ่มอื่นที่ได้ผลดีทัดเทียมกัน เช่น อีริโทรไมซิน (erythromycin) หรือ ร็อกซีโทรไมซิน (roxythromycin) เป็นต้น ยาทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็นยากลุ่มเดียวกันที่ให้ผลในการ รักษาใกล้เคียงกัน แต่ร็อกซีโทรไมซินมีข้อดีในขนาดของยาที่ใช้และจำนวนครั้งในหนึ่งวันที่น้อยกว่า คือให้กินเพียงวันละ 1-2 ครั้ง ก็เพียงพอในการรักษา ในขณะที่ยาอีริโทรไมซินต้องใช้วันละ 3-4 ครั้ง จึงจะเพียงพอในการรักษา การใช้ยาร็อกซีโทรไมซินรักษาการอักเสบ มีวิธีการ ใช้ยาให้เลือก 2 แบบ โดยแบบแรกให้กินวันละ 2 ครั้ง โดยใช้ครั้งละ 1 เม็ด ในขนาด 150 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง ก่อนอาหาร เช้า เย็น ส่วนอีกแบบหนึ่งให้วันละครั้ง โดยใช้ครั้งละ 300 มิลลิกรัม ก่อนอาหารเมื่อใดก็ได้ ซึ่งในขนาด 300 มิลลิกรัมนี้ อาจใช้ยาตัวนี้ในขนาด 150 มิลลิกรัม 2 เม็ด วันละครั้งเดียว หรือใช้ยานี้ในขนาด 300 มิลลิกรัม/เม็ด วันละเม็ดเดียวครั้งเดียวก็ได้ผล เท่าเทียมกัน แต่การให้วันละครั้งจะสะดวกในการใช้มากกว่าวันละ 2 ครั้ง ส่วนในกรณีที่ต้องการใช้ยาอีริโทรไมซิน ซึ่งปกติ ใน 1 เม็ด จะประกอบด้วยตัวยา 250 มิลลิกรัม ซึ่งควรใช้ครั้งละ 2 เม็ด วันละ 3-4 ครั้ง หลังอาหาร เช้า กลางวัน เย็น และก่อนนอน และควรใช้ยาทั้งสองชนิดหลังนี้ติดต่อกันนาน 5-7 วัน หรือเหงือกหายบวมแล้ว 3 วัน ในบางครั้งการที่ปวดฟันและเหงือกบวม อาจมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe bacteria) ซึ่งจะต้องใช้ยาต้านจุลชีพ ชื่อเมโทรนิดาโซล (metronidazole) ซึ่งเป็นยาที่ได้ผลดี ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ โดยควรใช้ในขนาดเม็ดละ 200-250 มิลลิกรัม ครั้งละ 1 เม็ด วันละ - ครั้ง หลังอาหารทันที เช้า กลางวัน เย็น ควรใช้ยานี้ติดต่อจน ครบเช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ (วิรัตน์ ทองรอด, 2548)

2.1.2.5 การใช้สมุนไพรบรรเทาอาการปวดฟัน คือ กานพลู หรือน้ำมันกานพลู ที่มีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่และฆ่าเชื้อซึ่งได้ผลดี มีการนำไปผลิตในหลายรูปแบบที่เกี่ยวข้องกับการดูแลรักษาฟัน เช่น ยาอุดฟัน ยาสีฟัน เป็นต้น รวมถึงยาแก้ท้องเสีย ซึ่งมีกานพลูเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ จากประสบการณ์ของผู้เขียน พบว่า ประชาชนที่ใช้น้ำมันกานพลูหรือยาที่มีส่วนผสมของกานพลูได้ผลดีในการดูแลรักษาความคงทนของฟัน บรรเทาอาการปวดฟันได้อย่างดี ถ้ามีการใช้อย่างถูกต้อง (วิรัตน์ ทองรอด, 2548)

พหุปณฺฑิโต ชีเว

2.2 สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย

2.2.1 ฝรั่ง

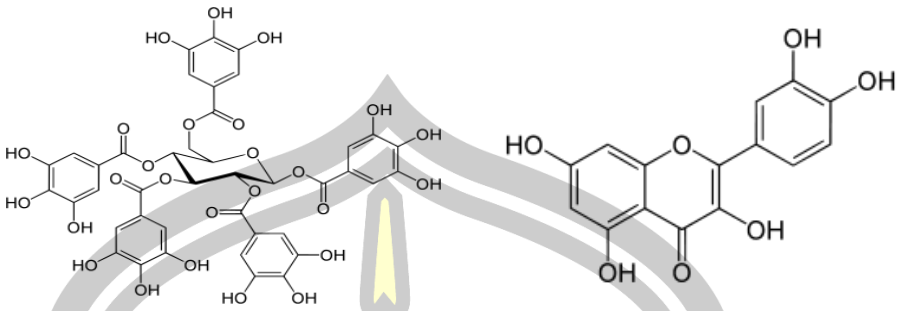
ฝรั่งมีชื่อวิทยาศาตร์คือ *Psidium guajava* L. อยู่ในวงศ์ Myrtaceae ชื่อสามัญคือ Guava ชื่ออื่น ๆ เช่น สุราษฎร์ธานีเรียกจุ่มโป่ ปัตตานีเรียกชมพู่ เชียงใหม่เรียกมะก้วย ทางภาคเหนือเรียกมะก้วยกาหรือมะมั่น แม่ฮ่องสอนเรียกมะกา ตากเรียกมะจีน ภาคใต้เรียกยามูหรือย่าหมู นครพนม

เรียกสีดา จีนแต้จิ๋วเรียกปั๊กเกี้ย ฝรั่งเป็นพืชที่มีจุดกำเนิดอยู่ในอเมริกากลางและหมู่เกาะอินดีสต์ตะวันตก หลักฐานทางโบราณคดีในเปรูชี้ให้เห็นว่า มีฝรั่งมาตั้งแต่ 800 ปีก่อนคริสตกาล พ่อค้าชาวสเปนและโปรตุเกสเป็นผู้นำผลไม้ชนิดนี้ไปยังถิ่นต่าง ๆทั่วโลก เข้ามาถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เมื่อราวคริสต์ศตวรรษที่ 17 ส่วนในประเทศไทย คาดว่าเข้ามาในสมัยสมเด็จพระนารายณ์มหาราช

มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คือ เป็นไม้ต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ขนาดกลาง สูง 3-5 เมตร ผิวเปลือกต้นเรียบเกลี้ยง กิ่งอ่อนเป็นสี่เหลี่ยม ใบ หนา หยาบ ใต้ท้องใบเป็นริ้ว เห็นเส้นใบชัดเจน ขนขึ้นนวลบาง ใบยาวประมาณ 10 ซม. กว้างประมาณ 6 ซม. ดอกช่อ ช่อหนึ่งมีดอกย่อย 3 - 5 ดอก ดอกเล็ก สีขาวอมเขียวอ่อน กลีบเลี้ยงแข็ง ผล รูปทรงกลม รูปไข่ หรือรูปรี ผิว เกลี้ยง สีเขียว เนื้อในขาว รสหวาน กรอบ ผลสุกสีเหลือง- เขียว มีเมล็ดเล็ก ๆ แข็งอยู่ภายใน

ฝรั่งมีสารแทนนินอยู่มาก สารนี้มีฤทธิ์ฝาดสมานน้ำมันหอมระเหยในใบฝรั่ง สารแทนนินในฝรั่งยังยับยั้งการลุกลามของเชื้อโรค ช่วยสมานท้องและลำไส้ โดยช่วยลดอาการอักเสบของกระเพาะลำไส้ และช่วยลดอาการคลื่นไส้อาเจียน และยังช่วยอาการเกร็งตัวของลำไส้ ทำให้อาการปวดท้องบรรเทาลงได้ แก้ปวดเบ่ง ใบใช้ แก้ท้องเสีย ท้องร่วง เป็นยาห้ามเลือด ใส่แผลสด ใช้ใบ 2-3 ใบเคี้ยวๆ ระงับกลิ่นปาก แก้ฝี เป็นยาล้างแผล ดูดหนองและถอนพิษบาดแผล แก้เหงือกบวม แก้พิษเรื้อรัง แก้ปวดเนื่องจากเล็บขบ แก้แพ้ยุง ส่วนของผลอ่อนใช้ แก้ท้องเสีย ท้องร่วง ท้องเดิน ระงับกลิ่นปาก แก้บิดมูกเลือด มีไวตามินซีมาก เป็นกันหรือแก้โรคเลือดออกตามไรฟันบำรุงเหงือกและฟัน บำรุงผิวพรรณ ส่วนของผลสุกมีสารเพ็กตินอยู่มาก ใช้รับประทานเป็นยาระบายได้ ส่วนรากใช้แก้น้ำเหลืองเสีย เป็นฝี แผลพุพอง แก้เลือดกำเดาไหล (เต็ม สมิตินันทน์, 2544)

มีการศึกษาเกี่ยวกับสารสำคัญในใบฝรั่ง พบว่ามีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่มเทอร์ปีนเป็นส่วนใหญ่ quercetin alpha-pinene beta-pinene ดังภาพประกอบ 3 และพบสารกลุ่มแทนนินมากในเปลือก และผลของฝรั่ง (Gutirrez et al., 2008) และยังมีการศึกษาด้านการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบฝรั่งด้วยน้ำและ methanol พบว่าสารสกัดใบฝรั่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis, S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* ได้ (Abdelrahim et al., 2002) และสารสกัดใบฝรั่งที่สกัดด้วยน้ำ พบว่าสารสกัดใบฝรั่งมีความสามารถในการลดการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียได้ (Razak and Rahim, 2003) ดังแสดงในตาราง 1



A. Tannin B. Quercetin

ภาพประกอบ 4 โครงสร้างทางเคมีของ A. Tannin และ B. Quercertin

2.2.2 ชะเอมเทศ

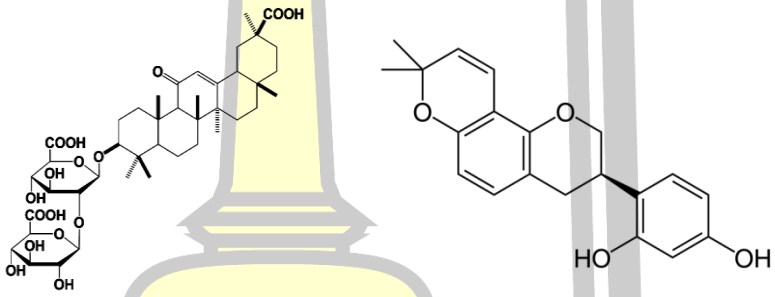
ชะเอมเทศมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Glycyrrhiza glabra* Linn. อยู่ในวงศ์ Leguminosae ชื่อสามัญคือ Licorice มาจากภาษากรีกแปลว่า รากหวาน ชื่ออื่น ๆ เช่น กำเช่า, กำเช้า (จีน-แต้จิ๋ว), กันเฉ่า (จีนกลาง) และ ชะเอมจีน เป็นต้น ชะเอมเทศเป็นพรรณไม้ที่มีอายุนานหลายปี

มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คือ เป็นไม้พุ่มล้มลุกที่มีอายุนานหลายปี มีลำต้นสูงประมาณ 1-2 เมตร ลำต้นและก้านใบมีขนปกคลุม บางครั้งหยาบ ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกออกเรียงสลับกัน มีใบย่อยประมาณ 9-17 ใบ ใบเป็นสีเขียวอมเหลือง ส่วนก้านใบย่อยจะสั้นมาก ใบเป็นรูปขอบขนานถึงรูปไข่แกมรูปรี ปลายทู่ ช่อดอกยืดยาว ดอกออกเป็นช่อเรียงหลวมๆ มีต่อม กลีบดอกเป็นสีน้ำเงินอ่อนถึงสีม่วง มีความยาวได้ถึง 12 มิลลิเมตร ส่วนก้านดอกสั้นมาก ผลมีลักษณะเป็นฝักแบนคล้ายถั่ว รูปขอบขนาน มีลักษณะตรงและมีความยาวได้ถึง 3 เซนติเมตร ผิวภายนอกมีลักษณะเรียบเกลี้ยงหรือมีขนแข็ง ฝักอ่อนจะมีสีเขียวเมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแตกออกเมล็ดมีลักษณะกลมสีน้ำตาลแก่

ชะเอมเทศได้รับการขนานนามในประเทศจีนว่าเป็นยอดสมุนไพรที่ช่วยขจัดพิษ ซึ่งการรับประทานเป็นประจำในปริมาณน้อย ๆ จะช่วยกำจัดพิษที่สะสมในร่างกายให้ลดลงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพิษที่สะสมในเลือดและตับ และเมื่อเทียบกับสมุนไพรชนิดอื่นแล้วชะเอมเทศนั้นจะมีรสชาติที่อ่อนนุ่มและไม่มีผลข้างเคียง จึงเป็นที่นิยมนำมาช่วยขจัดสารพิษมากกว่าสมุนไพรชนิดอื่น และชะเอมเทศยังมีชื่อเสียงในด้านเป็นยาขับเสมหะ นำมาทำเป็นน้ำชาแก้อาการไอและอาการเจ็บระคายคอ และนิยมนำมาใช้เพื่อช่วยลดอาการอักเสบต่าง ๆ (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2556) ส่วนรากใช้ บำรุงปอด ขับเลือดที่เน่าในท้อง รักษาพิษยาหรือพืชพิษต่าง ๆ รักษาอาการเบื่ออาหาร อ่อนเพลีย ตรากตรำทำงานหนัก ปวดท้อง ไอเป็นไข้ สงบประสาท รักษาอาการเจ็บคอ รักษาแผลเรื้อรัง รักษาระบบการย่อยอาหารไม่ดี หรืออาหารเป็นพิษ และรักษากำเดาให้เป็นปกติ ส่วนของเปลือกต้นใช้ ยาบำรุงกำลัง ช่วยให้คลื่นเหียนอาเจียน ส่วนของใบใช้ ช่วยให้เสมหะแห้ง ยารักษาดีพิการ ส่วนของดอกใช้ รักษาอาการ

คัน และรักษาพิษฝีดาษ ส่วนของผลใช้ ยาบำรุงกำลัง บรรเทาอาการคอแห้ง ทำให้ชุ่มชื้น (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และ นงลักษณ์ เรืองวิเศษ, 2551)

มีการศึกษาเกี่ยวกับสารสำคัญในรากชะเอมเทศ พบว่าในรากชะเอมเทศมีสารสำคัญคือ glycyrrhizin glabridin ที่พบมากในรากชะเอมเทศ (Saxena, 2005) ดังภาพประกอบ 4 พบว่าสารสกัดรากชะเอมเทศที่สกัดด้วย ethanol มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans E. faecalis* และ *A. viscosus* ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Sedighinia et al., 2012) และยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสาร glabridin ในรากชะเอมเทศ พบว่า glabridin สามารถยั้บยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus S. epidermidis S. mutans B. subtilis* และ *E. faecalis* ได้ มีค่า MIC เท่ากับ 3.9 7.5 7.5 15.6 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร ตามลำดับ (Gupta et al., 2008) ดังแสดงในตาราง 1



A.Glycyrrhizin B. Glabridin

ภาพประกอบ 5 โครงสร้างทางเคมีของ A. Glycyrrhizin และ B. Glabridin

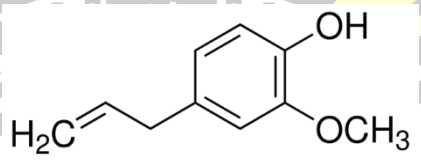
2.2.3 กานพลู

กานพลูมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry อยู่ในวงศ์ Myrtaceae ชื่อสามัญคือ Clove เป็นไม้ยืนต้น สูง 5 - 10 เมตร ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปวงรีหรือรูปใบหอก กว้าง 2.5 - 4 ซม. ยาว 6 - 10 ซม. ขอบเป็นคลื่น ใบอ่อนสีแดงหรือน้ำตาลแดง เนื้อใบบางค่อนข้างเหนียว ผิวมัน ดอกช่อ ออกที่ซอกใบ กลีบดอกสีขาวและร่วงง่าย กลีบเลี้ยงและฐานดอกสีแดงหนาแข็ง ผลเป็นผลสด รูปไข่

มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คือ เป็นไม้ต้น ขนาดกลาง เปลือกเรียบ สีน้ำตาลอ่อน ใบเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้าม รูปขอบขนาน แกมไข่กลับ ปลายแหลม โคนสอบเป็นรูปลิ่ม แผ่นใบมันเป็นเงาด้านล่างมีต่อมน้ำมันหนาแน่น ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด กลีบเลี้ยงสีเขียวอมเหลือง มีสีแดงกระจาย เชื่อมติดกันเป็นรูปท่อ ปลายแยกเป็นแฉกรูปสามเหลี่ยมแกมรูปไข่ 4 กลีบ กลีบดอกสีขาวร่วงง่าย เกสรตัวผู้จำนวนมาก ผลสดรูปไข่กลับแกมรูปรี สีแดงเข้ม

กานพลูเป็นยารักษาอาการทางระบบไหลเวียนโลหิต (แก้ลม) โดยปรากฏอยู่ในตำรับยาหลายชนิด ได้แก่ ยาหอมเทพจิตร ยาหอมนวโกฐ ซึ่งจะมีส่วนประกอบของกานพลูร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่น ๆ อยู่ด้วย มีสรรพคุณช่วยแก้ลม วิงเวียน อาการหน้ามืดตาลาย ใจสั่น คลื่นไส้อาเจียน และยังมีการใช้กานพลูเป็นยารักษากลุ่มอาการทางระบบอาหาร ซึ่งประกอบไปด้วย ยาธาตุบรรจบ ยาประสะกานพลู ซึ่งจะช่วยแก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อ จุกเสียด อาหารไม่ย่อย เป็นต้น ในตำรายาไทย ดอก รสเผ็ด กระจายเสมหะ แก้เสมหะเหนียว แก้เลือดออกตามไรฟัน แก้ปวดฟัน ดับกลิ่นปาก แก้หืด เป็นยาทำให้ร้อนเมื่อถูกผิวหนังทำให้ชา เป็นยาปฏิชีวนะ แก้ปวดฟัน แก้รำมะนาด แก้ปวดท้อง มวนในลำไส้ แก้ลม แก้เหน็บชา แก้พิษโลหิต พิษน้ำเหลือง ขับน้ำคาวปลา ทำอุจจาระให้ปกติ แก้ธาตุทั้ง 4 พิการ แก้ปวดท้อง แก้ท้องอืด อาหารไม่ย่อย คลื่นไส้อาเจียน แก้จุกเสียด แก้ท้องเสีย ขับผายลม กดลมให้ลงสู่เบื้องต่ำ แก้สะอึก แก้ซางต่าง ๆ ขับระดู น้ำมันกานพลู (clove oil) เป็นยาชาเฉพาะที่ แก้ปวดฟัน โดยใช้สำสีชุบนำมาอุดที่ฟัน ระงับการกระตุก ตะคริว ขับผายลม แก้ปวดท้อง แก้ท้องอืด ผสมยากลั้วคอ แต่งกลิ่นอาหาร แต่งกลิ่นสบู่ ยาสีฟัน ดับกลิ่นปาก ดับกลิ่นเหล้า ไล่ยุง (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และ นงลักษณ์ เรืองวิเศษ, 2551)

การศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบของสารสำคัญในดอกกานพลูประกอบด้วย eugenol เป็นองค์ประกอบหลักของดอกกานพลู (Bankar et al., 2011) ดังภาพประกอบ 5 ในการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของดอกกานพลู พบว่าสารสกัดดอกกานพลูที่สกัดด้วย methanol พบว่าสารสกัดดอกกานพลูสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* พบว่าสารสกัดดอกกานพลูมีความสามารถลดการยึดเกาะ และการสร้าง glucan ของเชื้อ *S. mutans* ได้ (Rahim and Khan, 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดดอกกานพลูด้วยน้ำ พบว่าสารสกัดดอกกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus E. coli* และ *S. pullorum* ได้ (Saeed and Tariq, 2008) ดังแสดงในตาราง 1



Eugenol

ภาพประกอบ 6 โครงสร้างทางเคมีของสาร Eugenol

ตาราง 1 สรุปการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหรือสารสำคัญในสมุนไพรฝรั่ง ชะเอมเทศ กานพลูต่อเชื้อก่อโรคหรือกลไกการก่อโรคของเชื้อในช่องปาก

ส่วนที่ใช้	การทดสอบฤทธิ์	ผลการทดสอบ	อ้างอิง
ใบฝรั่ง			
สารสกัดหยาบด้วยน้ำ	ฤทธิ์ต้านการยึดเกาะก่อนเกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ของเชื้อ *S. mitis, S. sanguinis* and *Actinomyces* sp.	มีฤทธิ์ต้านการยึดเกาะของเชื้อ (ไม่ได้ระบุความเข้มข้นสารสกัด)	(Razak and Rahim, 2003)
สารสกัดหยาบด้วยเมทานอล (Methanol)	ฤทธิ์ต้านการยึดเกาะในสภาวะที่มีน้ำตาล	ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (sub-MIC) สามารถยับยั้งการยึดเกาะเท่ากับ 84.27 ± 1.14%	(Prabu, et al., 2005)
สารสกัดหยาบด้วยเอทานอล (Ethanol)	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans*	มีค่า MIC เท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	(Braga et al., 2014)
สารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน (Hexane)	โซนของการยับยั้งเชื้อ *S. mutans*	ที่ 2.5 มิลลิกรัมต่อแผ่น เท่ากับ 12 มิลลิเมตร ที่ 5 มิลลิกรัมต่อแผ่น เท่ากับ 12 มิลลิเมตร	(Jebashree et al., 2011)
สารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตด (Ethyl acetate)	โซนของการยับยั้งเชื้อ *S. mutans*	ที่ 2.5 มิลลิกรัมต่อแผ่น เท่ากับ 18 มิลลิเมตร ที่ 5 มิลลิกรัมต่อแผ่น เท่ากับ 20 มิลลิเมตร	
สารสกัดหยาบด้วย Ethanol	โซนของการยับยั้งเชื้อ *S. mutans*	ที่ 2.5 มิลลิกรัมต่อแผ่น เท่ากับ 11 มิลลิเมตร ที่ 5 มิลลิกรัมต่อแผ่น เท่ากับ 12 มิลลิเมตร	

ตาราง 1 (ต่อ)

ส่วนที่ใช้	การทดสอบฤทธิ์	ผลการทดสอบ	อ้างอิง
สารสกัดหยาบด้วย Methanol	โซนของการยับยั้งเชื้อ *S. mutans*	ที่ 2.5 มิลลิกรัมต่อแผ่น เท่ากับ 12 มิลลิเมตร ที่ 5 มิลลิกรัมต่อแผ่น เท่ากับ 14 มิลลิเมตร	(Jebashree et al., 2011)
สารเควอซิทิน (Quercetin)	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans*	มีค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า MBC เท่ากับ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	(Shu et al., 2011)
รากชะเอมเทศ			
สารสกัดหยาบด้วย ethanol	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans*	มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	(Sedighinia et al., 2012)
	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. sanguis*	มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	
	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *A. viscosus*	มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	
สารสกัดหยาบด้วย ethanol	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans*	มีค่า MIC <12.5 mg/ml มีค่า MBC เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	(Chaiya et al., 2013)

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

ตาราง 1 (ต่อ)

ส่วนที่ใช้	การทดสอบฤทธิ์	ผลการทดสอบ	อ้างอิง
สารสกัดหยาบด้วยน้ำ	โซนของการยับยั้งเชื้อ *S. mutans*	22.8±0.27 มิลลิเมตร (ไม่ได้ระบุความเข้มข้นสารสกัด)	(Ajagannanavar et al., 2014)
สารสกัดหยาบด้วยน้ำ	โซนของการยับยั้งเชื้อ *S. mutans*	22.8±0.27 มิลลิเมตร (ไม่ได้ระบุความเข้มข้นสารสกัด)	
สารสกัดหยาบด้วย ethanol	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans*	มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	(Geetha, and Anitha, 2012)
สารสกัดหยาบด้วย ethanol	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. sanguis*	มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	(Geetha, and Anitha, 2012)
สารกลาบริดิน (Glabridin)	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans*	มีค่า MIC เท่ากับ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	(Gupta et al., 2008)
ดอกกานพลู			
สารสกัดหยาบด้วยน้ำ	ฤทธิ์ต้านการยึดเกาะก่อนเกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ของเชื้อ *S. mitis, S. sanguinis* and *Actinomyces* sp	มีฤทธิ์ต้านการยึดเกาะของเชื้อ (ไม่ได้ระบุความเข้มข้นสารสกัด)	(Razak and Rahim, 2003)
สารสกัดหยาบด้วยน้ำ	ประสิทธิภาพคุณสมบัติการเหนี่ยวนำให้เกิดฟันผุของเชื้อ *S. mutans*	ที่ความเข้มข้น 5-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลดคุณสมบัติเหนี่ยวนำการเกิดฟันผุ	(Rahim and Khan, 2006)
สารสกัดหยาบด้วย methanol			

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

ตาราง 1 (ต่อ)

ส่วนที่ใช้	การทดสอบฤทธิ์	ผลการทดสอบ	อ้างอิง
สารสกัดหยาบด้วยน้ำ	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans*	มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 250 – 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	(Galvão et al., 2012)
สารสกัดหยาบด้วย ethanol	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans*	มีค่า MIC <12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่า MBC เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	(Chaiya et al., 2013)
สารยูจินอล (Eugenol)	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans*	มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า MBC เท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	(Moon et al., 2011)
สารยูจินอล (Eugenol)	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans*	มีค่า MIC เท่ากับ 0.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	(Mohd et al., 2014)
สารยูจินอล (Eugenol)	ผลของการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans*	Eugenol ที่ความเข้มข้น 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (sub-MIC) มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ	(Mohd et al., 2014)
สารยูจินอล (Eugenol)	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans*	มีค่า MIC เท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	(Braga et al., 2014)

2.3 ตำรับเจลทาฟัน

เจลเป็นรูปแบบยาเตรียมชนิดหนึ่งมีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ 1) เจลวัตภาคเดียว ประกอบด้วยอนุภาคที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่กระจายอยู่ในเนื้อเจลอย่างสม่ำเสมอ เป็นเนื้อเดียวไม่แยกชั้น 2) เจลสองวัตภาค ประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็กกระจายตัวอยู่ในเนื้อเจล มีความคงตัวไม่ดีนัก แต่สามารถกระจายตัวใหม่ได้ และเมื่อตั้งทิ้งไว้จะมีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว แต่ถ้าเพิ่มพลังงาน หรือมีการเขย่าจะกลายเป็นของเหลว ก่อนนำไปใช้จึงต้องเขย่าให้เป็นของเหลวเพื่อให้เนื้อเจลมีความสม่ำเสมอ (ปลื้มจิตต์ โรจนพันธุ์ และคณะ 2537)

เจลทาฟัน (tooth gel) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะคล้ายยาสีฟัน มีลักษณะเป็นกึ่งของแข็ง มีการแต่งกลิ่นรสให้น่ารับประทานสามารถใช้งานได้ง่ายและสะดวก โดยการป้ายเจลลงบนฟันและทิ้งไว้โดยไม่ได้ล้างออก เหมาะสำหรับผู้ป่วยทุกเพศทุกวัย แต่ในเด็กที่ยังแปรงฟันเองไม่ได้หรือแปลงฟันได้ไม่สะอาดทั่วถึง การใช้เจลทาฟันจึงอาจเป็นทางเลือกที่ดีอีกวิธีหนึ่ง มีการศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ในช่องปากรูปแบบเจลโดยคณะวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดร่วมกับเอนไซม์ปาเปน พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ในหลอดทดลอง (Juntavee et al., 2014) ปัจจุบัน เจลทาฟันที่พบในท้องตลาดประกอบด้วยสารสำคัญคือ casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate (CCP-ACP) ใช้สำหรับการคืนกลับแร่ธาตุ (remineralization) ให้แก่ฟัน

การไหลของเจลมีการไหลแบบ pseudoplastic rheogram คือเมื่อมีการกวนหรือเขย่าความหนืดจะลดลง ทำให้ไหลได้ดีขึ้น และเทได้สะดวกขึ้น ซึ่งในสารละลายของ polymer มักมีการไหลแบบ pseudoplastic เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานเจลไม่ควรเปลี่ยนความหนืดมากแม้อุณหภูมิเปลี่ยนแปลง และควรนำออกมาจากหลอดได้สะดวก ไม่เปลี่ยนเป็นของเหลว (Martin et al., 1993)

2.3.1 ส่วนประกอบในตำรับเจล

2.3.1.1 สารก่อเจล (gelling agent) เป็นสารที่ทำให้เกิดความหนืดของเจล สารที่นิยมใช้ส่วนมากจะมีลักษณะเป็นคอลลอยด์ที่ชอบน้ำ อาจใช้เป็นสารแขวนตะกอน หรือสารก่ออิมัลชั่นที่ใช้ทางเภสัชกรรม ความหนืดของเจลอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความต้องการของผู้ผลิต สารก่อเจลที่นิยมใช้มีหลายชนิด เช่น

2.3.1.1.1 คอลลอยด์ที่ได้จากธรรมชาติ เช่น

Acacia อยู่ในรูปเกลือ calcium เกลือ magnesium และเกลือ potassium ไม่ละลายใน alcohol, ether และน้ำมัน ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ได้ง่าย

Agar ละลายในน้ำร้อนจะพองตัวขึ้นมีลักษณะคล้ายวุ้น มีประจุเป็นลบ จะตกตะกอนใน titanic acid และ alcohol

Sodium alginate ได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล ไม่ละลายใน alcohol, chloroform และ ether เป็นประจุลบ เนื้อเจลที่ได้จะใสเป็นเนื้อเดียวกัน

Tragacanth ประกอบด้วยส่วนที่ละลายน้ำ 30-40% และส่วนที่พองตัวเป็นเจลแต่ไม่ละลายน้ำอีก 60-70% มีประจุลบ เนื้อเจลมีเชื้อแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ง่าย ความหนืดไม่คงที่

2.3.1.1.2 คอลลอยด์กึ่งสังเคราะห์ เป็นอนุพันธ์ของเซลล์ลูโลส เป็นที่นิยมใช้ ทำให้เกิดเจลที่มีความหนืดคงที่ เนื้อเจลมีความใส สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ เช่น

Carboxymethyl cellulose (CMC) เป็นพอลิเมอร์ของชนิดที่มีประจุลบ และละลายได้ดีในน้ำร้อน และพองตัวได้ดีในน้ำเย็น ไม่ละลายในน้ำมันและตัวทำละลายอินทรีย์ ให้เนื้อเจลที่มีความใส มีความคงตัวที่ช่วง pH กว้าง จึงเลือกสารก่อเจลชนดนี้ในการทำตำรับเจลทาฟัน

Hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) เป็นสารไม่มีประจุ ละลายได้ในน้ำเย็น แต่ไม่ละลายใน alcohol, chloroform และ ether มีความหนืดสูง

Methylcellulose (MC) เป็นสารไม่มีประจุ ละลายค่อนข้างยาก แต่สามารถละลายได้ดีในน้ำร้อน ทำให้เนื้อเจลหดตัว และไม่เข้ากันกับชั้นน้ำ

2.3.1.1.3 คอลลอยด์สังเคราะห์ เช่น

Carbomer ละลายในน้ำ alcohol และ glycerine มีความหนืดต่ำ มีสภาวะเป็นกรด ทำให้เป็นกลางด้วยเบสให้มีค่า pH ในช่วง 6-11 จะได้ความหนืดสูงที่สุด

Poloxamers ละลายได้ในน้ำ และ alcohol ไม่ละลายใน ether

Polyvinyl alcohol ละลายได้ในน้ำ แต่ละลายได้เล็กน้อยใน ethanol ไม่ละลายในสารประกอบอินทรีย์

Povidone ละลายได้ในน้ำ alcohol, chloroform และ isopropyl alcohol ไม่ละลายใน acetone และ ether (มานี เหลืองธนะอนัน, 2546)

2.3.1.2 สารให้ความชุ่มชื้น (humectant) เจลมีองค์ประกอบของน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ทำให้ระเหยได้ง่าย แก้ไขด้วยการเติมสารให้ความชุ่มชื้น จะทำหน้าที่ช่วยให้ส่วนประกอบของเจลทาฟันกลมกลืน ทำให้เนื้อเจลทาฟันไม่แข็งตัวเมื่อเจอกับอากาศภายนอกหลอด นอกจากนี้สารให้ความชื้นมักจะให้ความหวานแก่เจลทาฟันแต่ไม่เป็นสาเหตุของการเกิดฟันผุ สารให้ความชุ่มชื้นที่นิยมใช้ ได้แก่ Glycerin, Sorbitol หรือ Propylene glycol เป็นต้น (พิมพร ศรีฉัตราภิมุข, 2549)

2.3.1.3 สารเพิ่มความหนืด (thickening agent) ใช้เพื่อเพิ่มความหนืด และความคงตัวให้กับผลิตภัณฑ์ สารเพิ่มความหนืดที่ใช้โดยทั่วไป Carboxymethyl cellulose (CMC) sodium CMC จะคงสภาพที่ pH 5.5-9.5 ทนต่อ electrolyte และ calcium ion จึงนิยมใช้ แต่ต้องระวังในสูตรที่มีสาร antibacterial ซึ่งมีประจุบวกจะเข้ากันไม่ได้ และ cellulose ether สารกลุ่มนี้ไม่มีประจุ ทนต่อ pH ในช่วงกว้าง ทนต่อโลหะ จึงใช้ในสูตรที่มีสารฆ่าเชื้อประจุบวกได้ methylcellulose (MC) ละลายดีในน้ำเย็น เข้ากันกับ glycerin hydroxyethyl cellulose ไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการ ละลายเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลง แต่กระจายตัวช้าทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดฟอง สารนี้มีการยึดเกาะสูงจึงยังคงนิยมใช้ (Raymond et al., 2003)

2.3.1.4 สารฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial agents) เป็นสารที่ใส่เพิ่มเข้าไปในเจลทาฟัน เพื่อช่วยลดจำนวนแบคทีเรียในช่องปาก นอกจากนั้นสมุนไพรหลายชนิดทั้งในรูปของสมุนไพรแห้งบดเป็นผง และสารสกัดสมุนไพรก็มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และรักษาโรคในช่องปากได้ดี

เช่น ใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ ดอกกานพลู เป็นต้น (บุปผา ไตรโรจน์ และ พวงทอง ผูกฤตยาคามี, 2539)

2.3.1.5 สารปรุงแต่งกลิ่นและรส (flavors) สารปรุงแต่งกลิ่นแต่งรส เพื่อทำให้เจลทาฟันน่าใช้ยิ่งขึ้น ใช้แล้วรู้สึกสดชื่น รสที่นิยมใช้กันทั่วไปก็คือ เมนทอล เปเปอร์มินท์ สเปียร์มินท์ เป็นต้น เจลทาฟันจากธรรมชาติจะใช้สารสกัดจากสมุนไพร ซึ่งมีมากมายหลายชนิดซึ่งนอกจากจะช่วยเพิ่มกลิ่น และรสแล้ว สมุนไพรหลายตัวยังเพิ่มคุณสมบัติรักษาโรคในช่องปากได้อีกด้วย เช่น ใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ ดอกกานพลู เป็นต้น (บุปผา ไตรโรจน์ และ พวงทอง ผูกฤตยาคามี, 2539)

2.3.1.6 สารกันเสีย (preservatives) เนื่องจากเจลเป็นตำรับที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งเป็นตัวช่วยทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ง่าย จึงจำเป็นต้องเติมสารกันเสีย เป็นสารที่เติมในเจลทาฟัน เพื่อป้องกันการบูดเสีย เพราะในเจลทาฟันมีการแต่งกลิ่น แต่งรส สารกันเสียต้องได้รับการอนุญาตทั้งชนิดและปริมาณที่ใส่ สารกันเสียที่สำนักงานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกำหนด Methyl paraben ใส่ได้ไม่เกินร้อยละ 0.25 โดยน้ำหนัก Propyl paraben ใส่ได้ไม่เกินร้อยละ 0.25 โดยน้ำหนัก เป็นต้น การใช้สารกันเสียในเจลควรเข้ากันได้ดีกับตัวสารก่อเจล เช่น

Benzalkonium chloride 0.01% ใช้เป็นสารกันเสียใน methylcellulose และ carboxymethyl cellulose

Chlorhexidine acetate 0.02% ใช้เป็นสารกันเสียใน polyvinyl alcohol

Chlorocresol 0.1-0.2% และ Benzoic acid 0.2% ใช้เป็นสารกันเสียใน alginate

Methyl paraben 0.1-0.2% และ Propyl paraben 0.02-0.05% สามารถใช้เดี่ยวหรือใช้ร่วมกันเพื่อเป็นสารกันเสียในสารก่อเจล tragacanth, sodium alginate, hydroxypropyl methyl cellulose และ carbomer (ณรงค์ คุณาภิบาล, 2536)

2.3.2 หลักการเตรียมตำรับเจล

2.3.2.1 การเตรียมเจลเบส ค่อยเทผงพอลิเมอร์ผสมให้เข้ากับน้ำ แต่หากเทผงพอลิเมอร์ลงในน้ำหมดครั้งเดียว จะทำให้ผงพอลิเมอร์ด้านนอกสัมผัสกับน้ำก่อน และจะเกิดการพองตัวทันที ผงพอลิเมอร์ภายในจะไม่เปียกน้ำ ทำให้เกิดเป็นก้อนไม่เข้ากัน ควรเทครั้งละไม่มาก ในการเตรียมอาจใช้สารช่วยกระจายตัวผสมเข้าไปเพื่อช่วยกระจายผงพอลิเมอร์ก่อนจะเติมลงในน้ำ แล้วผสมให้พอลิเมอร์ละลายจนพองตัว และควรระวังการเกิดฟองอากาศในเนื้อเจลเบส ซึ่งมีผลต่อการคงตัวของตำรับ

2.3.2.2 การผสมตัวยาสำคัญ หรือสารสกัดสมุนไพรเข้ากับเจลเบส สามารถแบ่งได้ตามปริมาณของตัวยา และการละลายน้ำของตัวยา

2.3.2.2.1 ตัวยาหรือสารสกัดสมุนไพรปริมาณน้อย ละลายน้ำได้ง่าย และเปียกง่าย ขณะที่เตรียมเจลเบสที่ยังพองตัวไม่เต็มที่ สามารถผสมกับตัวยาได้ทันที หรือเตรียมเจลเบสให้พองตัว

เต็มที่ แล้วนำตัวยาละลายน้ำเล็กน้อย แล้วจึงผสมกับเจลเบส ผสมให้ตัวยากระจายตัว และเข้ากันจนเป็นเนื้อเดียว

2.3.2.2.2 ตัวยาหรือสารสกัดสมุนไพรปริมาณน้อย ละลายน้ำง่าย แต่เปียกยาก ก่อนผสมเข้ากับเจลเบส ต้องเตรียมสารละลายตัวยา อาจมีสารเพิ่มการกระจายตัวเข้ามาช่วยในการละลายตัวยา แล้วจึงนำตัวยาผสมกับเจลเบสที่ยังพองตัวไม่สมบูรณ์ผสมให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียว หากผสมกับเจลเบสที่พองตัวสมบูรณ์อาจทำให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ยาก

2.3.2.2.3 ตัวยาหรือสารสกัดสมุนไพรปริมาณมาก ละลายน้ำง่าย และเปียกง่าย ก่อนผสมเข้ากับเจลเบส ทำเช่นเดียวกันกับการเตรียมตัวยาน้อย แต่เปียกยาก เพราะถึงแม้ตัวยาจะละลายง่าย แต่มีปริมาณมาก จึงต้องละลายตัวยาก่อน แล้วจึงนำตัวยาผสมกับเจลเบสที่ยังพองตัวไม่สมบูรณ์ ผสมให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียว

2.3.2.2.4 ตัวยาหรือสารสกัดสมุนไพรละลายน้ำยาก หรือไม่ละลายน้ำ จำเป็นต้องหาตัวทำละลายที่เหมาะสมกับตัวยา แล้วละลายตัวยาในตัวทำละลาย จึงผสมเข้ากับเจลเบสที่ยังพองตัวไม่สมบูรณ์ ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน (โชคชัย วงส์สินทรัพย์ และคณะ 2552)

2.3.3 การประเมินคุณภาพของเจล

2.3.3.1 ลักษณะทั่วไปของเจล ประเมินจาก รส กลิ่น สี ตะกอน และการวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)

2.3.3.2 ความคงตัวของตำรับด้วยการทดสอบในสภาวะเร่ง โดยเก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน จากนั้นนำมาประเมินลักษณะทั่วไปของเจล เมื่อทดสอบความคงตัวของตำรับ จากนั้นสังเกตการแยกชั้นของตำรับ การเปลี่ยนแปลงของรส กลิ่น สี ตะกอน และค่า pH สามารถทำหลายการทดสอบเพื่อการยืนยันความคงตัวของตำรับเจลทาฟันได้ ซึ่งวิธีการทดสอบความคงตัวของตำรับมีหลายวิธี เช่น

1. เก็บที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 เดือน
2. เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-18 เดือน
3. เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน
4. ผ่าน freeze thaw cycle โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สลับกันจำนวน 6-8 รอบ
5. ผ่านการปั่นเหวี่ยงประมาณ 2,000-3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง
6. ผ่านการเขย่าประมาณ 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Streptococcus mutans* กลไกต่าง ๆ ในการต้านการก่อฟันผุของสารสกัดสมุนไพรใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ในห้องปฏิบัติการ และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลทาฟันป้องกันฟันผุ พร้อมทั้งศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น หัวข้อในการดำเนินการวิจัย ดังนี้

3.1 เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ จานเพาะเลี้ยงเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร, กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1, กระบอกตวง, กรวยกรอง, ช้อนตักสาร, แท่งแก้วคนสาร, แท่งแก้วสามเหลี่ยม, บีกเกอร์, ขวดรูปชมพู่, ปิเปต, หลอดทดลอง, loop, Micropipette และ Pipette tip, ตะเกียงแอลกอฮอล, ขวดแก้ว, เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius LE 2445, Germany), เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Sartorius LE 2445, Germany), Vortex mixture (Biosan, Thailand), Microplate reader (*SPECTROstar Nano*, Germany), Rotary evaporator (Buchi V700, Switzerland), Autocave (Sanyo MSL-3780, Japan), Hot air oven (Contherm Thermotec 2000, Australia), Incubator with 5% CO_2 (Thermo Fisher Scientific, U.S.A)

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ Ethanol (RCI Labscan, Thailand), Dimethyl sulfoxide; DMSO (Carlo Erba reagent, France), Brain Heart Infusion; BHI (Becton Dickinson and company, France), Sodium hydroxide; NaOH (Carlo Erba reagent, France), Chlorhexidine (Maharat Nakhon Ratchasima Hospital, Thailand), Potassium chloride; KCl (Carlo Erba reagent, France), Magnesium chloride; $MgCl_2$ (RCI Labscan, Thailand), Formalin (Carlo Erba reagent, France), Sodium acetate (RCI Labscan, Thailand), Crystal violet (Loba Chemie, India), Potassium hydroxide; KOH (Carlo Erba reagent, France), Sucrose (RCI Labscan, Thailand)

3.1.3 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ *Streptococcus mutans* DMST 18777 (Department of Medical Sciences, Thailand)

3.2 สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 ฝรั่ง ส่วนที่ใช้ ใบเพสลาด แหล่งที่มา อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา เก็บเมื่อเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 ยืนยันชนิดของพืชโดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา ไทรชมภู นักพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.2.1 ชะเอมเทศ ส่วนที่ใช้ ราก แหล่งที่มา ร้านทองอินทร์เภสัช จังหวัดมหาสารคาม ยืนยันชนิดของพืชโดยผู้มีใบประกอบโรคศิลปะทางเภสัชกรรมแผนไทย

3.2.1 กานพลู ส่วนที่ใช้ ดอก แหล่งที่มา ร้านจี่อันตั้ง สามแพทย์ จังหวัดนครราชสีมา ยืนยันชนิดของพืชของพืชโดยผู้มีใบประกอบโรคศิลปะทางเภสัชกรรมแผนไทย

3.3 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร (จิตรลดา วรรณโชติ, 2558)

3.3.1 ใบฝรั่ง ทำการเก็บเฉพาะส่วนใบสด นำมาล้างทำความสะอาด แล้วนำตากให้แห้ง 1 คืน ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสมุนไพรมาบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบด

3.3.2 รากชะเอมเทศ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสมุนไพรมาบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบด

3.3.3 ดอกกานพลู นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสมุนไพรมาบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบด

3.3.4 ชั่งสมุนไพรที่บดแล้วแต่ละชนิดอย่างละ 400 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่มีฝาปิดชนิดละขวด เติม 95% ethanol โดยใช้อัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลายเป็น 1:10 หมักไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นกรองตัวอย่างสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

3.3.5 นำสารสกัดที่ได้ไประเหยด้วย rotary evaporator และเก็บสารสกัดที่ได้ในภาชนะที่ป้องกันแสง และความชื้นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.6 ในการเตรียมสารสกัดที่จะใช้ในการวิจัย จะละลายสารสกัดในตัวทำละลายที่เหมาะสมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายโดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v) เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ร้อยละผลผลิต = (น้ำหนักหลังสกัด/น้ำหนักผงสมุนไพร) × 100

3.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

S. mutans เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ในตู้อบเชื้อที่มี 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง เจือจางเชื้อแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI และปรับปริมาณเชื้อด้วยการวัดความขุ่นให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.08-0.1 ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer

3.5 การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) Densitometry (สุรพงค์ รัตนะ และคณะ 2560)

3.5.1 ในการศึกษานี้ใช้วัฏภาคคงที่ (stationary phase) คือ silica gel GF254 ขนาด 10x10 เซนติเมตร (แผ่น TLC) และเตรียมระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) จากการนำตัวทำละลายมาผสมกันในอัตราส่วนดังตาราง 2 ลงในแทงค์ TLC หรือภาชนะแก้ว ปิดฝาทิ้งไว้ให้อิ่มตัว

3.5.2 เตรียมสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดด้วยการนำมาละลายด้วย 95% ethanol ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งเป็นสารที่พบมากในใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ได้แก่ quercetin glycyrrhizic acid และ eugenol ตามลำดับ โดยนำมาละลายด้วย 95% ethanol ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาจุดอย่างต่อเนื่องลงบนแผ่น TLC ขนาด 10x10 เซนติเมตร ปริมาณชนิดละ 2 ไมโครลิตร ความยาวแถบ 6 มิลลิเมตร แล้วนำไปวางในแทงค์ TLC ที่เตรียมระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ไว้ เมื่อระบบวัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนที่ได้ระยะทาง 8 เซนติเมตร จึงนำออกมารอให้แห้ง และนำไปตรวจสอบการดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลต และสเปคตรัม ด้วยเครื่อง densitometor

3.5.3 การสร้างสมการเส้นตรงจากสารมาตรฐานเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารพฤกษเคมี นำสารมาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ quercetin glycyrrhizic acid และ eugenol ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาจุดอย่างต่อเนื่อง สารลงบนแผ่น TLC ขนาด 10x10 เซนติเมตร ในปริมาณ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ไมโครลิตร แล้วนำไปวางในแทงค์ TLC ที่เตรียมระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ไว้ เมื่อระบบวัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนที่ได้ระยะทาง 8 เซนติเมตร จึงนำออกมารอให้แห้ง และนำไปตรวจสอบการดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลต และสเปคตรัม ด้วยเครื่อง densitometor และนำข้อมูลมาจัดทำกราฟมาตรฐานเพื่อสร้างสมการเส้นตรง $y = ax+b$ เมื่อได้ค่า R^2 แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณสารพฤกษเคมีที่มีในสารสกัดสมุนไพรชนิดนั้น

ตาราง 2 ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีและอัตราส่วน (% v/v)	อัตราส่วน
toluene : ethyl acetate : methanol : formic acid	3:4:1:1

3.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ด้วยวิธี broth dilution

3.6.1 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) (Moody, 2004)

3.6.1.1. ทำการเจือจางสารสกัดแบบสองเท่าลำดับส่วน โดยให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 12.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยมี10% DMSO ใน BHI broth เป็นตัวทำละลายในหลอดเริ่มต้น และ BHI borth เป็นตัวทำละลายในหลอดถัดมาเป็นต้นไป

3.6.1.2. เพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหาร BHI broth ปรับปริมาณเชื้อ โดยให้มีความขุ่นเท่ากับ สารละลาย McFarland Standard No. 0.5

3.6.1.3. เติมสารลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดตามตารางที่ 3 โดยหลอดที่ 11 คือ หลอด solvent control ประกอบด้วยเชื้อ *S. mutans* ตัวทำละลาย คือ 10% DMSO และ อาหารเลี้ยงเชื้อBHI และหลอดที่ 12 คือ sterility control ประกอบด้วยสารสกัดสมุนไพร และ อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI และ positive control ที่ใช้คือ chlorhexidine

ตาราง 3 ปริมาตรสารที่เติมในหลอดที่ 1-12 ในการทดลองหาค่า MIC

หลอดที่	ปริมาตรที่เติม (มิลลิลิตร)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
สารสกัด	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-	-
BHI broth	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0
เชื้อที่ทดสอบ	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-

3.6.1.4. นำไปเข้าตู้อบเลี้ยงเชื้อ 5% CO_2 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 อ่านผลการเกิดความขุ่นของเชื้อในหลอดทดลองด้วยตาเปล่าเทียบกับหลอดควบคุม (หลอดที่ 11 และ 12) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

3.6.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อ *S. mutans* (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) (Moody, 2004)

การหาค่า MBC โดยดูดสารตัวอย่างจากหลอดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI โดยดูดสารปริมาตร 100 ไมโครลิตร ด้วยวิธี spread plate ตัวอย่างจะถูกกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย spreader จากนั้นนำไปเข้าตู้อบเลี้ยงเชื้อ 5% CO_2 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากสารสกัดจากสมุนไพรสามารถฆ่าเชื้อได้ จะไม่พบโคโลนีของ *S. mutans* ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ปรากฏความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อได้คือค่า MBC

3.7 การทดสอบประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดสมุนไพรเมื่อใช้ร่วมเป็นคู่ ด้วยวิธี checkerboard dilution (Moody, 2004)

3.7.1 เจือจางสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นแต่ละชนิดเป็น MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC และ 1/16 MIC โดยมี 10% DMSO เป็นตัวทำละลาย โดยใช้อัตราส่วนที่เท่ากันผสมในแต่ละความเข้มข้น

3.7.2 เติมเชื้อ *S. mutans* ที่มีความขุ่นเท่ากับ สารละลาย McFarland Standard No. 0.5

3.7.3 นำไปเข้าตู้อบเลี้ยงเชื้อ 5% CO_2 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลจากการเกิดความขุ่นของเชื้อในหลอดทดลองเทียบกับหลอดควบคุม ผลคือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้

3.7.4 ประเมินประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดสมุนไพรด้วยดัชนีชี้วัดคือ fractional inhibitory concentration index (FIC index)

ดังสูตร ค่า FIC index = FIC(A) + FIC(B)

= [A]/MIC (A) + [B]/MIC (B)

เมื่อ [A] คือ ค่า MIC ของสาร A ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

[B] คือ ค่า MIC ของสาร B ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

MIC (A) คือ ค่า MIC ของสาร A

MIC (B) คือ ค่า MIC ของสาร B

การแปลผล FIC index คือ ≤ 0.5 = เสริมฤทธิ์กัน (synergy)

0.5 ถึง 4.0 = ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifference)

> 4.0 = ฤทธิ์ต้านกัน (antagonism)

3.8 การศึกษากลไกในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *S. mutans* ด้วย sucrose-dependent adherence assay และ sucrose-independent adherence assay (Prabu et al., 2005)

3.8.1 เพาะเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ปริมาณ 8 มิลลิลิตร ซึ่งมีหรือไม่มี 5% ซูโครส เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้สภาวะคล้ายช่องปากของมนุษย์ในระหว่างที่รับประทานอาหาร และไม่ได้รับประทานอาหาร พร้อมกับเติมสารสกัดที่ต้องการศึกษาที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ตู้อบเลี้ยงเชื้อ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้หลอดทดลองเอียงทำมุม 30 องศา

3.8.2 หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เทเซลล์แบคทีเรียที่ลอยในมีเดียออกจากหลอดทดลอง

3.8.3 ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยมีเดียครั้งละ 1 มิลลิลิตร จนครบ 3 มิลลิลิลตร และทำให้เซลล์แบคทีเรียที่เกาะกับหลอดทดลองหลุดออกโดยการเติม 0.5 โมลาร์ sodium hydroxide 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer

3.8.4 จากนั้นวัดปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่เกาะกับหลอดทดลองจากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดที่เพาะลงในหลอดทดลองเมื่อเริ่มต้นการวิจัย

ดังสูตร % adherence = (OD_{600} of adhered cell/ OD_{600} of total cell) × 100

เมื่อ OD_{600} of adhered cell คือค่าการดูดคลื่นแสงของเซลล์ที่ยึดเกาะกับหลอดทดลอง

OD_{600} of total cell คือ ค่าการดูดคลื่นแสงของเซลล์ทั้งหมด

3.9 การศึกษากลไกในการยับยั้งการเกิด biofilm ของเชื้อ *S. mutans* ด้วย Biofilm formation assay (Caiazza et al., 2007)

3.9.1 เพาะเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ที่มี 5% ซูโครส และสารสกัดที่ต้องการทดสอบความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ปริมาณ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ตู้อบเลี้ยงเชื้อ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.9.2 เทเอามีเดีย และเซลล์ที่ไม่เกาะติดกับไมโครเพลทออก แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำ 200 ไมโครลิตร แล้วเทออก

3.9.3 ทำการฟิกเซลล์แบคทีเรียที่เกาะอยู่ในหลุมของไมโครเพลทที่เกิดเป็นไบโอฟิล์มด้วย formalin และ 2% sodium acetate 300 ไมโครลิตร แล้วเทออก

3.9.4 จากนั้นย้อมสีด้วย 0.1% crystal violet ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.9.5 ล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 95% ethanol ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เพื่อนำสีที่เกาะจับกับแบคทีเรียออกมา

3.9.6 นำไมโครเพลทไปเขย่า 10 นาที เพื่อให้สีหลุดออกจากเซลล์แบคทีเรียให้สมบูรณ์

3.9.7 วัดปริมาณไบโอฟิล์มจากค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตร

3.9.8 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ต้องศึกษาในเวลาต่าง ๆ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดที่ต้องการศึกษาในเวลาต่าง ๆ คือ 6, 12, 20 และ 24 ชั่วโมง ผลที่ได้เป็นค่าร้อยละที่ลดลงของ biofilm ที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นหลังจากเติมสารสกัด ได้จากการคำนวณ ร้อยละการลดลงของ biofilm = (OD_{600} ของ vehicle – OD_{600} ของสารสกัด)/OD_{600} ของ vehicle × 100

เมื่อ OD_{600} ของ vehicle คือค่าการดูดคลื่นแสงของ vehicle

OD_{600} ของสารสกัด คือค่าการดูดคลื่นแสงของสารสกัด

3.10 การศึกษาผลของสารสกัดที่ต้องการทดสอบ ต่อการลดลงของ pH ใน bacterial suspension หลังจากที่ใส่น้ำตาลกลูโคส (Yang et al., 2016)

3.10.1 ล้าง cell suspension ของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ประกอบด้วยโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

3.10.2 จากนั้น suspend เชื้อแบคทีเรียปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในบัฟเฟอร์ปริมาณ 8 มิลลิลิตร ที่มีสารสกัดที่ต้องการศึกษาที่ต่ำกว่าความเข้มข้นของ MIC หรือ vehicle control ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

3.10.3 ปรับ pH ของ cell suspension ให้ได้ที่ 7.2-7.4 โดยใช้ 0.2 โมลาร์ potassium hydroxide

3.10.4 เติมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นทำการวัด pH ของ cell suspension ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นเวลา 60 นาที

3.10.5 คำนวณอัตราการลดลงของ pH ในช่วงเริ่มต้นโดยการใช้ค่า pH ในช่วง ที่กราฟเป็นเส้นตรง (ในนาทีที่ 0-10 หลังจากที่ใส่กลูโคส) อัตราการลดลงของ pH นี้แสดงถึงความสามารถในการผลิตกรดของแบคทีเรีย *S. mutans*

3.11 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลทาฟันป้องกันฟันผุ (ภทรพรรณ อุณาภาค และ สิริรัตน์ ราษฎร์ดุษดี, 2549)

3.11.1 นำสารก่อเจล Carboxymethyl cellulose (CMC) มาโปรยลงในน้ำปริมาณ 3/4 ของน้ำทั้งตำรับ แล้วทำให้ CMC กระจายตัวในน้ำจนเข้ากันเป็นเนื้อเดียว

3.11.2 จากนั้นนำ CMC ที่ยังไม่พองตัวเต็มที่ มาผสมกับ Glycerin และ Sorbitol แล้วผสมจนเป็นเนื้อเจลใสเป็นเนื้อเดียวกัน

3.11.3 จากนั้นละลาย Sodium saccharin และ Sodium benzoate ในน้ำเล็กน้อย แล้วจึงนำมาผสมให้เข้ากันกับ CMC จนเป็นเนื้อเดียวกัน

3.11.4 เมื่อเนื้อเจลเริ่มพองตัวแล้วจึงเติม สารสกัดสมุนไพรที่ละลายด้วย Peppermint oil และ ethanol ปริมาณเล็กน้อย ละลายจนไม่มีตะกอนของสารสกัดสมุนไพรโดยมีความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรไม่น้อยกว่า 1 เท่าของค่า MIC เนื่องสารสกัดสมุนไพรมีผลทดสอบพบว่ามีการเสริมฤทธิ์กันของสมุนไพร (จิตรลดา วรรณโชติ, 2558) ผสมให้เข้ากันกับเนื้อเจลจนเป็นเนื้อเดียวกัน

3.11.5 เมื่อผสมกันจะเกิดเป็นเนื้อเจลเหนียว เนื้อเจลพองตัวเต็มที่ แล้วบรรจุลงในภาชนะหลอดพลาสติกทึบแสง 3.11.6 ส่วนประกอบ และปริมาณในตำรับเจลทาฟันสมุนไพรดังแสดงในตาราง 4 อาจมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณส่วนประกอบปริมาณของ glycerin อยู่ในช่วง 10.0-40.0 กรัม sorbitol อยู่ในช่วง 10.0-20.0 กรัม และ carboxymethyl cellulose (CMC) อยู่ในช่วง 2.5-7.5 กรัม เพื่อความคงตัวของตำรับเจลทาฟัน

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

ตาราง 4 ส่วนประกอบ ปริมาณ และหน้าที่ในตำรับ

ส่วนประกอบ	ปริมาณ	หน้าที่ในตำรับ
สารสกัดใบฝรั่ง	0.156 กรัม (1MIC)	สารสำคัญ
สารสกัดรากชะเอมเทศ	0.019 กรัม (1MIC)	สารสำคัญ
สารสกัดกานพลู	0.156 กรัม (1MIC)	สารสำคัญ
Glycerin	10.0 - 40.0 กรัม	สารเพิ่มความชื้นแก่ตำรับ, สารช่วยละลาย
70 % Sorbitol	10.0 – 20.0 กรัม	สารเพิ่มความชื้นแก่ตำรับ, สารแต่งรส
Carboxymethyl cellulose (CMC)	2.5 -7.5 กรัม	สารก่อเนื้อเจล
Peppermint oil	0.25 มิลลิลิตร	สารแต่งกลิ่น
95 % Ethanol	0.25 มิลลิลิตร	ตัวทำละลาย
Sodium benzoate	0.1 กรัม	สารกันเสีย
Sodium saccharin	0.1 กรัม	สารแต่งรส
สี fast green FCF	0.2 มิลลิลิตร	สารแต่งสี
Water q.s. to	100 กรัม	น้ำกระสายยา

ดัดแปลงจาก (ภทรพรรณ อุณาภาค และ สิริรัตน์ ราษฎร์ดุษดี, 2549)

3.12 การประเมินคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เจลทาฟัน

3.12.1 การทดสอบความเป็นกรด และด่างของตำรับ วัดค่าความเป็นกรด และด่างของตำรับด้วย pH meter

3.12.2 ความหนืด วัดความหนืดของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ โดยใช้เครื่องวัดความหนืด Brookfield viscometer มีหน่วยเป็น cP (mPa.s)

3.12.3 วัดการไหลของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ โดยใช้เครื่องวัดการไหล Rotameter มีหน่อยเป็น m/s

3.12.4 ความคงตัว นำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้บรรจุลงภาชนะ นำไปทดสอบความคงตัวโดยวิธี freeze-thawed ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คิดเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบทั้งหมด 6 รอบ ทุก ๆ 1 รอบ ทดสอบ

ลักษณะทางกายภาพ ด้วยลักษณะของ สี กลิ่น รส ความใส การแยกชั้น และค่าความหนืด จากการหดตัวของเนื้อเจล เนื่องจากของเหลวบางส่วนไหลออกมาจากเนื้อเจล (syneresis) และทดสอบลักษณะทางเคมีด้วยค่าความเป็นกรด เป็นด่าง

3.13 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ด้วยวิธี Agar well diffusion (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012)

3.13.1 ใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มเชื้อ *S. mutans* ที่เตรียมไว้ นำมาเกลี่ยบนอาหาร BHI ชนิดแข็งทิ้งไว้ให้แห้ง

3.13.2 จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตร แล้วหยดเจลทาฟันปริมาณ 100 ไมโครลิตร

3.13.3 นำเข้าตู้อบเลี้ยงเชื้อ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลจากเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans*

3.14 การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติพื้นฐานที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และการทดสอบกลไกต้านการก่อฟันผุ คือ ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลคือ one-way analysis of variance (ANOVA) โดยเปรียบเทียบกลุ่มสมุนไพร 3 กลุ่ม คือ ใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และ ดอกกานพลูและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ค่าความหนืด และค่าการไหลระหว่างกลุ่มตำรับเจลสมุนไพร และกลุ่มเจลเบส โดยสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลคือ student t-test

3.14.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ด้วยการทดสอบหาค่า MIC หน่วย มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สถิติที่ใช้คือ ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.14.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ด้วยการทดสอบหาค่า MBC หน่วย มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สถิติที่ใช้คือ ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.14.3 การศึกษากลไกการก่อฟันผุจากเชื้อ *S. mutans* ด้วย sucrose-dependent adherence assay และ sucrose-independent adherence assay สถิติที่ใช้คือ ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.14.4 การศึกษากลไกการก่อฟันผุจากเชื้อ *S. mutans* ด้วย Biofilm formation assay สถิติที่ใช้คือ ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.14.5 การศึกษากลไกการก่อฟันผุจากเชื้อ *S. mutans* ด้วย ผลของสารสกัดที่ต้องการทดสอบ ต่อการลดลงของ pH ใน bacterial suspension สถิติที่ใช้คือ ค่าเฉลี่ย ความถี่ และเปอร์เซ็นการเปลี่ยนแปลงของค่า pH

3.14.6 การทดสอบความคงตัวของตำรับเจลทาฟันสมุนไพรด้วยการทดสอบความเป็นกรดเป็นด่าง ความหนืด และการไหล สถิติที่ใช้คือ สถิติเชิงพรรณนา

บทที่ 4
ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) และกลไกยับยั้งคุณสมบัติก่อฟันผุของเชื้อ *S. mutans* ในห้องปฏิบัติการ และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรสมุนไพรป้องกันฟันผุ โดยผู้วิจัยได้นำเสนอการวิจัยตามลำดับ ดังนี้

4.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

4.2 การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) Densitometry

4.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ด้วยวิธี broth dilution

4.3.1 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

4.3.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อ *S. mutans* (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดสมุนไพรเมื่อใช้ร่วมเป็นคู่ ด้วยวิธี checkerboard dilution

4.5 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *S. mutans* ด้วย sucrose-dependent adherence assay และ sucrose-independent adherence assay

4.6 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการสร้าง biofilm ของเชื้อ *S. mutans* ด้วย Biofilm formation assay

4.7 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans*

4.8 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรสมุนไพรป้องกันฟันผุ

4.9 การประเมินคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพร

4.10 การทดสอบฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ด้วยวิธี Agar well diffusion

4.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

สารสกัดเอทานอลของสมุนไพรแต่ละชนิดมีลักษณะข้นหนืดและมีสีตามชนิดของสมุนไพร ร้อยละของผลผลิตที่ได้ของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด แสดงดังตาราง 5

ตาราง 5 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดสมุนไพร

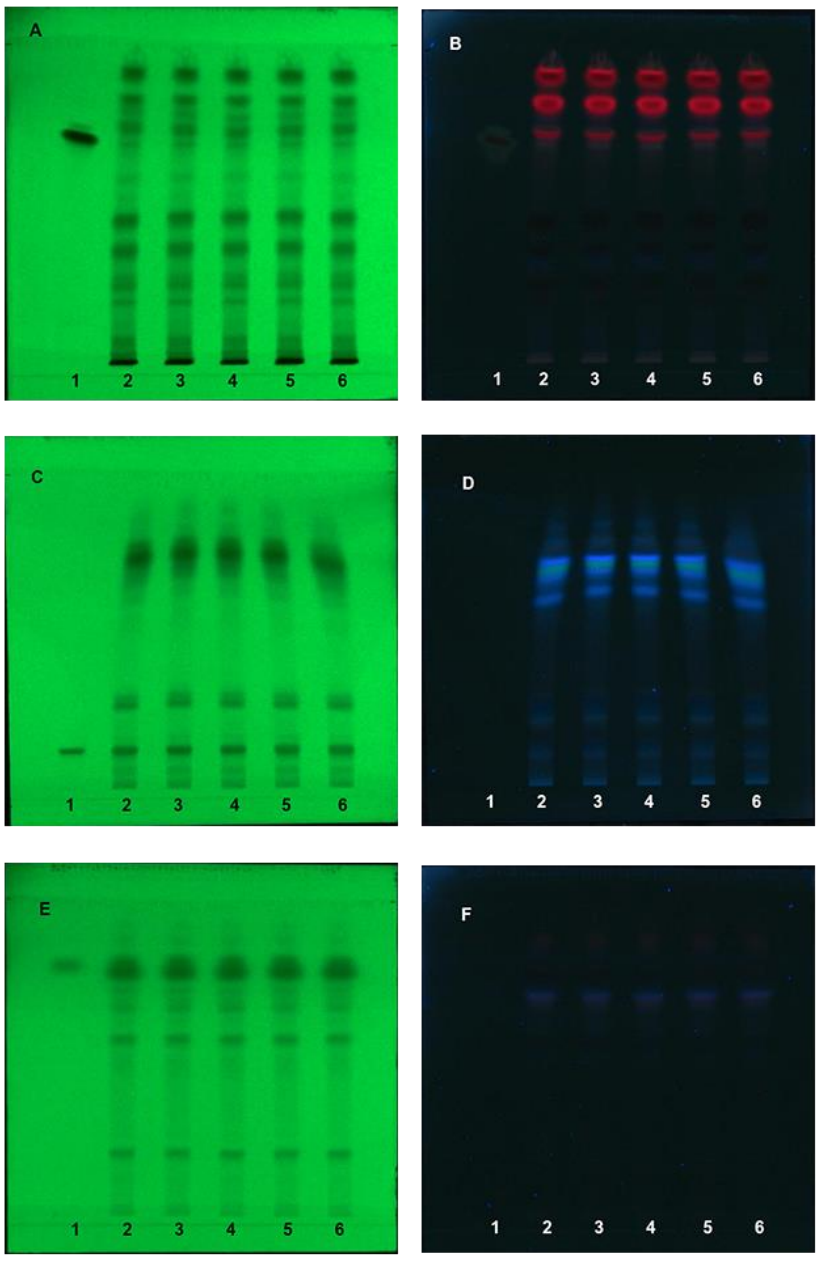
สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	ลักษณะสารสกัด	ร้อยละผลผลิต (%w/w)
ฝรั่ง	ใบ	สารสีเขียวเข้มข้นหนืด	29.3
ชะเอมเทศ	ราก	สารสีน้ำตาลเหลืองอ่อนข้นหนืด	11.6
กานพลู	ดอก	สารสีน้ำตาลข้นหนืด	29.0

4.2 การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) / Densitometry

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมีด้วยเทคนิค TLC เพื่อหาปริมาณสารพฤกษเคมีหลักของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด แสดงในภาพประกอบ 7 และภาพประกอบ 8 โดยเปรียบเทียบลักษณะโครมาโตแกรมของสารสกัดสมุนไพร ใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู กับสารมาตรฐานคือ quercetin glycyrrhizic acid และ eugenol ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมีที่พบในสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด แสดงดังตาราง 6

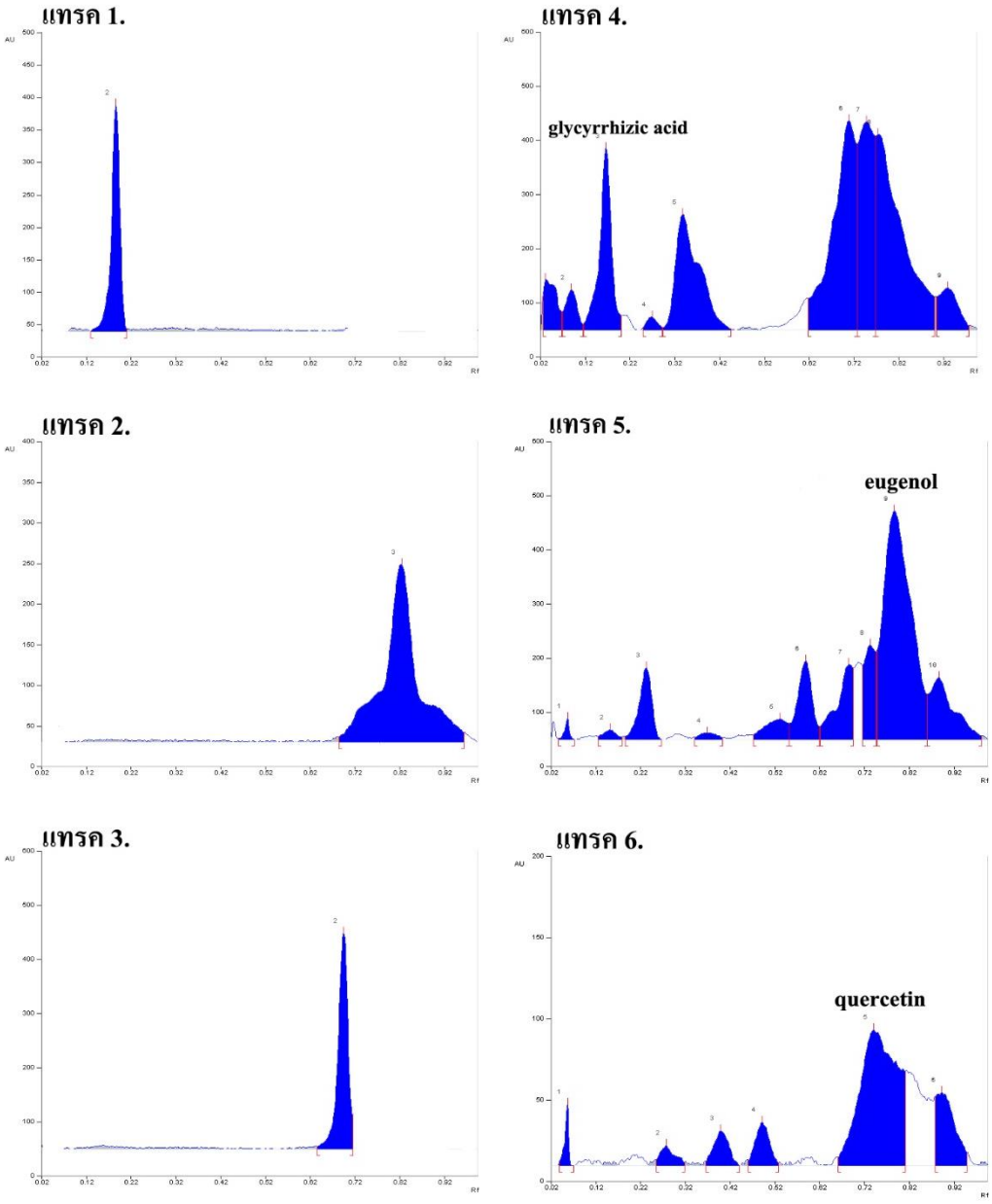
ตาราง 6 ค่า Rf เมื่อตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดสมุนไพร (n=5)

สารมาตรฐาน		สารสกัดสมุนไพร		
ชนิดของสารมาตรฐาน	ค่า Rf	ชนิดของสมุนไพร	ค่า Rf	ปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัด % (w/w)
Quercetin	0.65	ใบฝรั่ง	0.62	0.42
Glycyrrhizic acid	0.12	รากชะเอมเทศ	0.10	0.81
Eugenol	0.75	ดอกกานพลู	0.74	0.31



(A = Quercetin (1) และสารสกัดใบฝรั่ง (2-6) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร B = Quercetin (1) และสารสกัดใบฝรั่ง (2-6) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร C = Glycyrrhizic acid (1) และสารสกัดรากชะเอมเทศ (2-6) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร D = Glycyrrhizic acid (1) และสารสกัดรากชะเอมเทศ (2-6) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร E = Eugenol (1) และสารสกัดดอกกานพลู (2-6) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร F = Eugenol (1) และสารสกัดดอกกานพลู (2-6) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) (n=5)

ภาพประกอบ 7 TLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและสารสกัดสมุนไพรเมื่อตรวจสอบที่ความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร และที่ 366 นาโนเมตร



แทรคที่: 1 Glycyrrhizic acid, แทรคที่: 2 Eugenol, แทรคที่: 3 Quercetin, แทรคที่: 4 รากชะเอมเทศ, แทรคที่: 5 ดอกกานพลู, แทรคที่: 6 ใบฝรั่ง

ภาพประกอบ 8 เดนซิโตแกรมที่ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

4.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ด้วยวิธี broth dilution

4.3.1 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

สารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ได้ โดยมีค่า MIC แสดงดังตาราง 6 พบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* คือสารสกัดรากชะเอมเทศ ขณะที่สารสกัดใบฝรั่งและสารสกัดดอกกานพลูมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* ที่เท่ากัน

4.3.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สารสกัดสามารถฆ่า *S. mutans* (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. mutans* คือสารสกัดรากชะเอมเทศ โดยมีค่า MBC แสดงดังตาราง 6 ขณะที่ไม่พบฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. mutans* สารสกัดสมุนไพรอีก 2 ชนิดเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 12.50 mg/mL โดย chlorhexidine ซึ่งเป็น positive control มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อ *S. mutans* ได้ โดยมีค่า MIC และ MBC แสดงดังตาราง 7

ตาราง 7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ได้ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. mutans* (MBC)

สารสกัดสมุนไพร	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	MIC	MBC
ฝรั่ง	1.56	> 12.50
ชะเอมเทศ	0.19	3.12
กานพลู	1.56	> 12.50
chlorhexidine	< 0.15	< 0.15

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดสมุนไพรเมื่อใช้ร่วมเป็นคู่ ด้วยวิธี checkerboard dilution

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี checkerboard dilution จากการเจือจางสารสกัดจากใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลูแบบสองเท่าลำดับส่วนที่ระดับความเข้มข้นแต่ละชนิดตั้งแต่ MIC 1/2×MIC 1/4×MIC และ 1/16×MIC โดยใช้อัตราส่วนที่เท่ากันผสมในแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* พบว่าค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 คู่ มีค่า MIC ลดลง คือสารสกัดสมุนไพนออกฤทธิ์เสริมกันที่ความเข้มข้น 1/4MIC และความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 1/4MIC โดยดูผลค่า Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) ที่มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 ดังแสดงในตาราง 8, 9 และ 10 เพราะฉะนั้นสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 คู่ออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* และเมื่อใช้ในการตั้งตำรับ สารสกัดชนิดละ 1MIC ไม่มีการออกฤทธิ์ต้านกัน

ตาราง 8 ค่า FIC index ของสารสกัดใบฝรั่ง และสารสกัดดอกกานพลู

ความเข้มข้น (mg/ml)		สารสกัดใบฝรั่ง			
		1 MIC	1/2 MIC	1/4 MIC	1/16 MIC
สารสกัดดอกกานพลู	1 MIC	2	1.5	1.25	1.0625
	1/2 MIC	1.5	1	0.75	0.5625
	1/4 MIC	1.25	0.75	0.5	0.3125
	1/16 MIC	1.0625	0.5625	0.3125	0.125

ตาราง 9 ค่า FIC index ของสารสกัดใบฝรั่ง และสารสกัดรากชะเอมเทศ

ความเข้มข้น (mg/ml)		สารสกัดใบฝรั่ง			
		1 MIC	1/2 MIC	1/4 MIC	1/16 MIC
สารสกัดรากชะเอมเทศ	1 MIC	2	1.5	1.25	1.0625
	1/2 MIC	1.5	1	0.75	0.5625
	1/4 MIC	1.25	0.75	0.5	0.3125
	1/16 MIC	1.0621	0.5621	0.3121	0.1246

ตาราง 10 ค่า FIC index ของสารสกัดดอกกานพลู และสารสกัดรากชะเอมเทศ

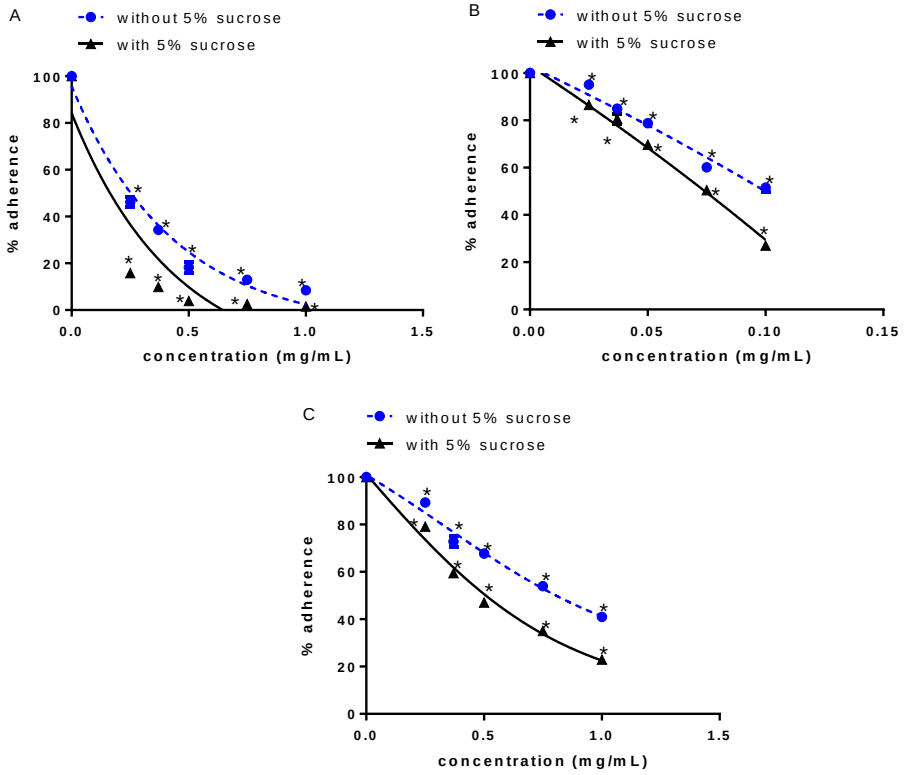
ความเข้มข้น (mg/ml)		สารสกัดดอกกานพลู			
		1 MIC	1/2 MIC	1/4 MIC	1/16 MIC
สารสกัดรากชะเอมเทศ	1 MIC	2	1.5	1.25	1.0625
	1/2 MIC	1.5	1	0.75	0.5625
	1/4 MIC	1.25	0.75	0.5	0.3125
	1/16 MIC	1.0621	0.5621	0.3121	0.1246

4.5 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *S. mutans* ด้วย sucrose-dependent adherence assay และ sucrose-independent adherence assay

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *S. mutans* โดยใช้สารสกัดสมุนไพรใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MIC (จากข้อ 4.3) ในสภาวะที่แตกต่างกันคือ สภาวะที่มีซูโครส (5% w/v) และสภาวะที่ไม่มีซูโครส พบว่าสารสกัดใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลูทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะบนพื้นผิวของเชื้อ *S. mutans* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$, n=3) (ภาพประกอบ 9) โดยสารสกัดสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *S. mutans* ในสภาวะที่มีซูโครส (sucrose-dependent adherence) ได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มีน้ำตาลซูโครส (sucrose-independent adherence) ซึ่งฤทธิ์ต้านการยึดเกาะบนพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรียแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *S. mutans* ได้ 50% ของฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (IC_{50}) แสดงดังตาราง 11 สารสกัดใบฝรั่งมีฤทธิ์ต้านการยึดเกาะบนพื้นผิวได้ดีที่สุด โดยสารสกัดใบฝรั่งที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีผลทำให้การยึดเกาะบนพื้นผิวของแบคทีเรียแบบอาศัยน้ำตาลซูโครส และแบบไม่อาศัยน้ำตาลซูโครส เหลือเพียงร้อยละ 1.50±0.24 และ 8.43±0.13 ตามลำดับ

ตาราง 11 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *S. mutans* ได้ 50% ของฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (IC_{50})

สารสกัดสมุนไพร	IC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	without 5% sucrose	with 5% sucrose
สารสกัดใบฝรั่ง	4.56×10^{-2}	3.66×10^{-2}
สารสกัดรากชะเอมเทศ	4.25×10^{-2}	7.42×10^{-2}
สารสกัดดอกกานพลู	0.44	0.36

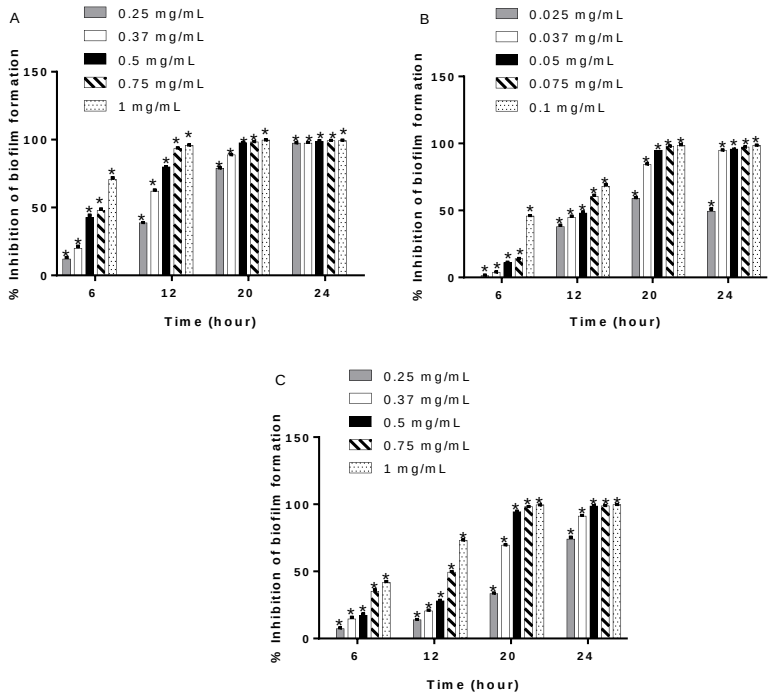


(A = สารสกัดใบฝรั่ง, B = สารสกัดรากชะเอมเทศ, C = สารสกัดดอกกานพลู) *$p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (n=4) ทดสอบด้วยสถิติ One-way ANOVA และ Bonferroni post-hoc test

ภาพประกอบ 9 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการยึดเกาะบนพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans*

4.6 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการสร้าง biofilm ของเชื้อ *S. mutans* ด้วย Biofilm formation assay

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกิด biofilm ของเชื้อ *S. mutans* โดยใช้ สารสกัดใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC (จากข้อ 4.3) สารสกัดสมุนไพรทุกชนิดในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่เวลา 6, 12, 20 และ 24 ชั่วโมง ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังภาพประกอบ 10 โดยฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่เวลา 6, 12 และ 20 ชั่วโมง ของสารสกัดขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ อย่างไรก็ตามที่เวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดในทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่ใกล้เคียงกัน โดย ณ เวลา 24 ชั่วโมงสารสกัดใบฝรั่ง (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รากชะเอมเทศ (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และดอกกานพลู (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้สูงสุดที่ร้อยละการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเท่ากับ 99.34±0.11, 98.53±0.08 และ 99.63±0.08 ตามลำดับ



(A = สารสกัดใบฝรั่ง, B = สารสกัดรากชะเอมเทศ, C = สารสกัดดอกกานพลู) *$p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (n=4) ทดสอบด้วยสถิติ One-way ANOVA และ Bonferroni post-hoc test

ภาพประกอบ 10 ผลของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans*

4.7 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans*

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans* โดยใช้สารสกัดสมุนไพรใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MIC (จากข้อ 4.3) ในช่วงเวลาที่ 0 – 10 นาทีซึ่งเป็นช่วงเวลาที่แสดงความสามารถในการสร้างกรดของเชื้อได้ดีที่สุด พบว่าสารสกัดใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลูที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ มีฤทธิ์ทำให้การสร้างกรดของเชื้อลดลง โดยที่อัตราการลดลงของ pH มีค่าต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตาราง 12 ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ โดยสารสกัดดอกกานพลูที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดของแบคทีเรียได้ดีที่สุด คือมีอัตราการลดลงของ pH เหลือเพียง 0.0378±0.0036 หน่วยต่อนาที และพบว่าอัตราการสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans* จะลดลงเมื่อใช้สารสกัดในความเข้มข้นที่สูงขึ้น ดังแสดงในภาพประกอบ 11

ตาราง 12 ผลสารสกัดสมุนไพรต่อการลดลงของ pH ใน bacterial suspension หลังจากที่ใส่น้ำตาลกลูโคส

สารสกัดสมุนไพร	ความเข้มข้นสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	Initiate rate of pH drop (pH ต่อนาที) (mean±SD)
สารสกัดใบฝรั่ง	0	0.2443±0.001
	0.25	0.1358±0.0063*
	0.37	0.1443±0.0028*
	0.5	0.1445±0.0034*
	0.75	0.1245±0.0006*
	1	0.0453±0.0025*

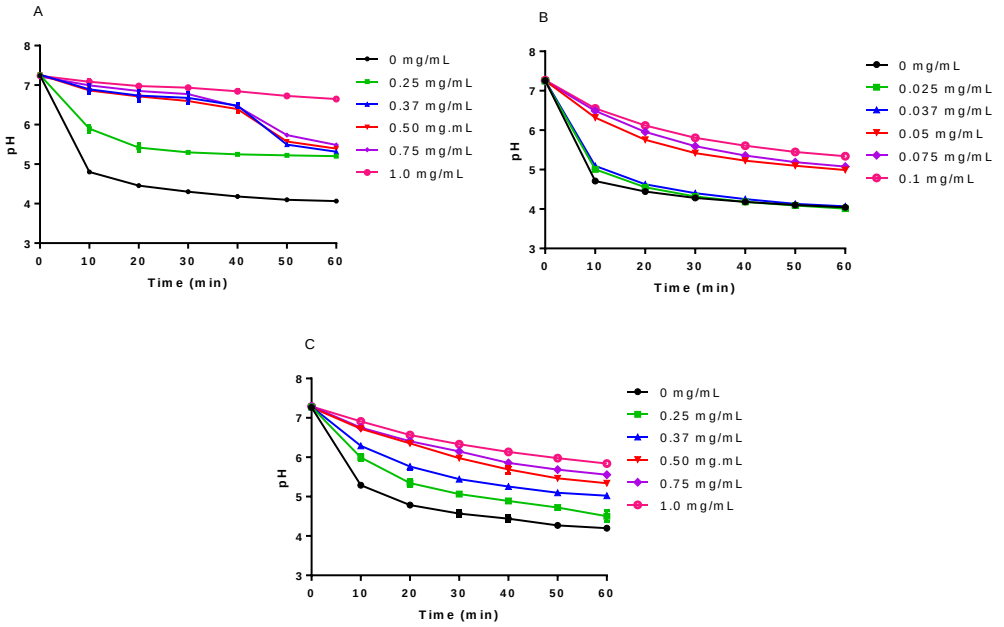
*= แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทดสอบด้วยสถิติ One-way ANOVA และ Bonferroni post-hoc test, คำนวณจากช่วงนาทีที่ 0 ถึง 10

ตาราง 12 (ต่อ)

สารสกัดสมุนไพร	ความเข้มข้นสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	Initiate rate of pH drop (pH ต่อนาที) (mean±SD)
สารสกัดรากชะเอมเทศ	0	0.2545±0.0019
	0.025	0.2235±0.0013*
	0.037	0.2165±0.0013*
	0.05	0.094±0.0008*
	0.075	0.0755±0.0013*
	0.1	0.07175±0.0015*
สารสกัดดอกกานพลู	0	0.1975±0.0041
	0.25	0.128±0.0082*
	0.37	0.099±0.0060*
	0.5	0.054±0.0022*
	0.75	0.05425±0.0046*
	1	0.03775±0.0036*

*= แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทดสอบด้วยสถิติ One-way ANOVA และ Bonferroni post-hoc test, คำนวณจากช่วงนาทีที่ 0 ถึง 10

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว



(A = สารสกัดใบฝรั่ง, B = สารสกัดรากชะเอมเทศ, C = สารสกัดดอกกานพลู) ต่อการลดลงของ pH ในนาทีที่ 0 - นาทีที่ 10 ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* (n=4)

ภาพประกอบ 11 ผลของสารสกัดสมุนไพร

4.8 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุ

การตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุ ได้เลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรจากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร ใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ในการต้านการเจริญ และยับยั้งคุณสมบัติก่อฟันผุของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* (ข้อ 4.3-4.7) โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ MIC คือ 1.56, 0.19 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตาราง 6) เนื่องจากการทดลองหาค่า MIC, MBC และการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรพบว่าชะเอมเทศให้ค่า MIC ต่ำสุดคือ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดใบฝรั่งเสริมฤทธิ์กับสารสกัดจากดอกกานพลู ดังนั้นจึงได้คัดเลือกนำสารสกัดจากสมุนไพรใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู มาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรป้องกันฟันผุ โดยต้องการใช้ปริมาณของสารสกัดความเข้มข้น 1MIC ในการเตรียมตำรับ จากการตั้งตำรับโดยใช้ส่วนประกอบต่าง ๆ ดังแสดงดังตาราง 13 พบว่าตำรับเจลทาฟันสมุนไพรมีลักษณะเป็นเจลหนืด ไม่มีตะกอน มีสีเขียวมะกอก มีกลิ่นและรสเปปเปอร์มิ้นท์ เนื่องจากมีการแต่งสีด้วยสี fast green FCF แต่งกลิ่นและรสด้วย peppermint oil ซึ่งมีความคงตัวทางกายภาพ และทางเคมีดี ดังภาพประกอบ 12

ตาราง 13 ส่วนประกอบ ปริมาณ และหน้าที่ในตำรับ

ส่วนประกอบ	ปริมาณ	หน้าที่ในตำรับ
สารสกัดใบฝรั่ง	0.156 กรัม (1MIC)	สารสำคัญ
สารสกัดรากชะเอมเทศ	0.019 กรัม (1MIC)	สารสำคัญ
สารสกัดกานพลู	0.156 กรัม (1MIC)	สารสำคัญ
Glycerin	36 กรัม	สารเพิ่มความชื้นแก่ตำรับ, สารช่วยละลาย
70 % Sorbitol	10.0 กรัม	สารเพิ่มความชื้นแก่ตำรับ, สารแต่งรส
Carboxymethyl cellulose (CMC)	2.5 กรัม	สารก่อเนื้อเจล
Peppermint oil	0.25 มิลลิลิตร	สารแต่งกลิ่น
95 % Ethanol	0.25 มิลลิลิตร	ตัวทำละลาย
Sodium benzoate	0.1 กรัม	สารกันเสีย
Sodium saccharin	0.1 กรัม	สารแต่งรส
สี fast green FCF	0.2 มิลลิลิตร	สารแต่งสี
Water q.s. to	100 กรัม	น้ำกระสายยา

ภาพประกอบ 12 ลักษณะทางกายภาพของตำรับเจลทาฟันสมุนไพรป้องกันฟันผุ

4.9 การประเมินคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพร

เมื่อนำผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรป้องกันฟันผุมาทดสอบความคงตัวด้วยวิธี freeze-thaw cycling เป็นเวลา 6 รอบ พบว่าหลังจากการทดสอบ freeze-thaw cycling ตำรับเจลทาฟันสมุนไพรมีความหนืดลดลง แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพอื่น ๆ ได้แก่ สี กลิ่น รส และไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่า pH เช่นเดียวกัน ดังแสดงในตาราง 14

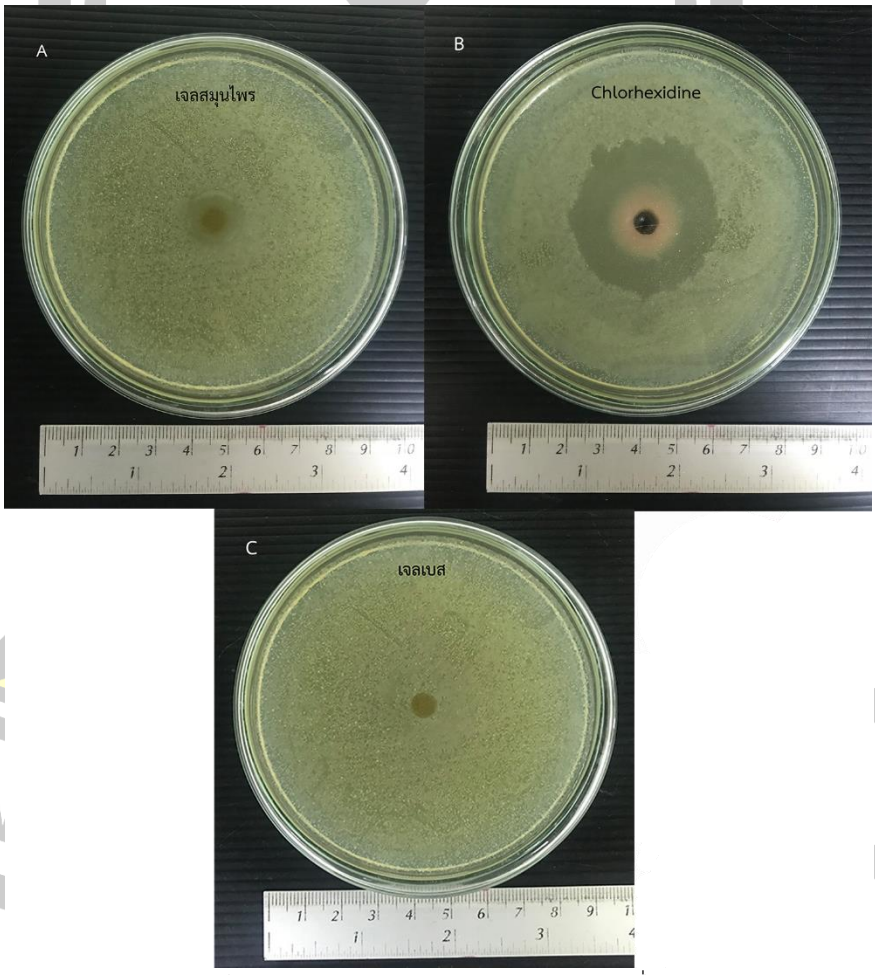
ตาราง 14 ผลการทดสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ก่อนและหลัง freeze-thaw cycling (n=3)

การทดสอบ	เจลเบส		ตำรับผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพร freeze-thaw cycling	
	ก่อน freeze-thaw cycling	หลัง freeze-thaw cycling	ก่อน freeze-thaw cycling	หลัง freeze-thaw cycling
ทางกายภาพ: สี กลิ่น รส การแยกชั้น ความหนืด (cP)	สีเขียวอ่อน กลิ่นเปปเปอร์มิ้นท์ รสเปปเปอร์มิ้นท์ ไม่แยกชั้น 23264.67 ± 4.16	สีเขียวอ่อน กลิ่นเปปเปอร์มิ้นท์ รสเปปเปอร์มิ้นท์ ไม่แยกชั้น 23243.00 ± 3.61	สีเขียวมะกอก กลิ่นเปปเปอร์มิ้นท์ รสเปปเปอร์มิ้นท์ ไม่แยกชั้น 23142.67 ± 2.52*	สีเขียวมะกอก กลิ่นเปปเปอร์มิ้นท์ รสเปปเปอร์มิ้นท์ ไม่แยกชั้น 23101.67 ± 3.79*
ทางเคมี: (ค่า pH)	7.00 ± 0.02	7.00 ± 0.02	7.00 ± 0.01	7.00 ± 0.02
zone of inhibition[a] (cm) ด้วยวิธี Agar well diffusion	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.1 ± 0.20*	0.97 ± 0.06*
zone of inhibition[a] (cm) ของ chlorhexidine ด้วยวิธี Agar well diffusion	3.86 ± 0.21		3.73 ± 0.25	

*$p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเจลเบสที่ไม่ได้รับสารสกัด (n=3) ทดสอบด้วยสถิติ independent t-test, [a] = ขนาดของโซนใสเมื่อหักลบจากขนาดของ agar well แล้ว

4.10 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ของตำรับผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรด้วยวิธี Agar well diffusion

เมื่อนำผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพร มาทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยหลังจากการทดสอบ freeze-thaw cycling พบว่าผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรสามารถยังยั้งเชื้อ *S. mutans* มีโซนการยับยั้งเชื้อ 1.57 เซนติเมตร โดยมี chlorhexidine เป็น positive control ดังภาพประกอบ 13 ทั้งนี้ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* ในสารเติมแต่งในส่วนประกอบในตำรับ และไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* ในเจลเบสที่ไม่ใส่สารสกัดสมุนไพร ดังแสดงในตาราง 13



(A = ตำรับผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพร, B = chlorhexidine, C = เจลเบสที่ไม่มีสารสกัด)

ภาพประกอบ 13 ลักษณะ zone of inhibition จากการทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ S. mutans ด้วยวิธี Agar well diffusion

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาการพัฒนาเจลสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* เพื่อป้องกันฟันผุ ผู้วิจัยได้นำเสนอการสรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะการศึกษา ดังนี้

5.1 สรุปผล

เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคฟันผุ การใช้สมุนไพรเพื่อยับยั้งเชื้อก่อฟันผุ จัดเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันฟันผุ ผู้วิจัยสนใจการพัฒนาผลิตภัณฑ์ป้องกันฟันผุจากสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ผลการทดสอบหาสารพฤกษเคมี พบสารพฤกษเคมีได้แก่ quercetin, glycyrrhizic acid และ eugenol พบในปริมาณ 0.42%, 0.81%, และ 0.31% (w/w) ตามลำดับ ซึ่งเป็นองค์ประกอบในสารสกัดเอทานอลความเข้มข้น 95% ของใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกการพลู ตามลำดับ สารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.562, 0.195 และ 1.562 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดรากชะเอมเทศมีฤทธิ์ดีที่สุด และสารสกัดรากชะเอมเทศมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยมีค่า MBC เท่ากับ 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่พบค่า MBC ในสารสกัดใบฝรั่งและดอกกานพลูที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบคู่สมุนไพรที่เสริมฤทธิ์กัน ด้วยวิธี checkerboard dilution ได้แก่ 1. ใบฝรั่งและดอกกานพลู 2. ใบฝรั่งและรากชะเอมเทศ และคู่ที่ 3. ดอกกานพลูและรากชะเอมเทศ พบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 คู่ ออกฤทธิ์เสริมกันที่ความเข้มข้นของแต่ละสารสกัดเท่ากับ 1/4 MIC อีกทั้งสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ยังมีสามารถยับยั้งคุณสมบัติก่อฟันผุของเชื้อ *S. mutans* ได้แก่ การยึดเกาะบนพื้นผิว การสร้างไบโอฟิล์ม และการสร้างกรดได้ โดยพบว่าสารสกัดสมุนไพรทุกชนิดที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC มีฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะบนพื้นผิวทั้งชนิดที่อาศัยและไม่อาศัยน้ำตาล ซูโครส ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่เวลา 6, 12, 20 และ 24 ชั่วโมง และยับยั้งการผลิตกรดของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยฤทธิ์ต้านการยึดเกาะบนพื้นผิวแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด สารสกัดใบฝรั่ง มีฤทธิ์ลดการยึดเกาะบนพื้นผิวทั้งแบบอาศัยน้ำตาล ซูโครส และแบบไม่อาศัยน้ำตาล ซูโครสได้ดีที่สุด และสารสกัดทุกชนิดทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดสารสกัดดอกกานพลูมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดของแบคทีเรียได้ดีที่สุด ซึ่งผลการวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์

เพื่อการป้องกันฟันผุ จากการที่สารสกัดสามารถยับยั้งคุณสมบัติก่อฟันผุได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ทำให้สามารถใช้ปริมาณของสารสกัดในตำรับผลิตภัณฑ์ไม่สูงมาก นั้นคือใช้ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดเท่ากับ 1MIC ในการพัฒนาตำรับเจลทาฟัน เพื่อลดปัญหาความไม่เข้ากันของสารในตำรับ รวมทั้งลดผลของสี กลิ่นของสารสกัดต่อผลิตภัณฑ์ลงได้ โดยยังมีประสิทธิภาพในการต้านฟันผุได้ และได้ผลิตภัณฑ์เจลทาฟันที่ได้มีความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีดี รวมไปถึงผลิตภัณฑ์เจลทาฟันนี้ยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ได้ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาการวิจัยทางคลินิกและในเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต

5.2 อภิปรายผล

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาเจลสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* เพื่อป้องกันฟันผุ ในขั้นต้นเป็นการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีหลักบางชนิดของสารสกัด 95% เอทานอลของสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ตรวจพบสาร quercetin เป็นสารพฤกษเคมีหลักในสารสกัดใบฝรั่ง ในปริมาณ 0.43% ผลการวิเคราะห์ปริมาณของ quercetin ที่พบในการศึกษานี้ใกล้กับผลการศึกษาของ Sohafy et al. (2009) ซึ่งพบ quercetin ในสารสกัดใบฝรั่งประมาณ 0.39% สาร quercetin เป็น flavonoids ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อฟันผุหลายชนิด รวมทั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* (Geoghegan et al., 2010; Shu et al., 2011) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด 95% เอทานอลของรากชะเอมเทศในการศึกษานี้พบสาร glycyrrhizic acid (GA) เป็นสารพฤกษเคมีหลักในปริมาณ 0.81% และการศึกษาครั้งนี้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของ GA ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Tian et al., (2008) ที่รายงานว่าพบ GA ในสารสกัด เอทานอล ของรากชะเอมเทศในประมาณ 0.86% และสารพฤกษเคมีหลักที่พบในดอกกานพลูคือ eugenol จากการศึกษาของ Guan et al., (2006) พบ eugenol ในสารสกัดเอทานอลของดอกกานพลูประมาณ 58.77% ซึ่งผลดังกล่าวแตกต่างจากผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบปริมาณ eugenol เพียง 0.31% ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิดจากวิธีการสกัด แหล่งที่มา และการเก็บรักษาพืชสมุนไพรที่แตกต่างกัน ปัจจัยที่ทำให้ปริมาณ eugenol ลดลง เช่น การเก็บสมุนไพรไว้นาน การใช้ความร้อนระหว่างเตรียมสารสกัด การเลือกใช้ตัวทำละลายและวิธีการสกัดที่ไม่สามารถสกัดน้ำมันหรือสารขั้วน้อยออกมาได้มาก เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yun et al. (2010) ได้วิเคราะห์ปริมาณของสาร eugenol ในสารสกัดดอกกานพลูในแต่ละประเทศด้วยวิธี HPLC พบว่าปริมาณของสาร eugenol ในสารสกัดดอกกานพลูในแต่ละประเทศมีความแตกต่างกัน และเป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาของ Pothitirat and Gritsanapan (2005) ที่วิเคราะห์ปริมาณของสาร curcumin ในสารสกัดขมิ้นที่พบในประเทศไทย 15 แหล่ง ด้วยวิธี TLC-Densitometry พบว่าสาร

สกัดขมิ้นในแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย มีสาร curcumin ที่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้นการศึกษาข้างต้นทำให้ทราบว่าแหล่งที่ปลูก ลักษณะภูมิประเทศมีส่วนทำให้สารสกัดสมุนไพรมีปริมาณสารของสารสำคัญแตกต่างกันได้

สารสกัดสมุนไพรที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันฟันผุจาก *S. mutans* นอกจากฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ ควรมีฤทธิ์ต้านกลไกการก่อฟันผุของเชื้อด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดลองเพื่อหาค่า MIC MBC และกลไกต้านการก่อฟันผุของเชื้อ *S. mutans* 3 กลไก ได้แก่ 1. ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อด้วย sucrose-dependent adherence assay และ sucrose-independent adherence assay 2. ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการสร้าง biofilm ของเชื้อด้วย biofilm formation assay และ 3. ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการสร้างกรดของเชื้อด้วย glycolytic pH drop assay

ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของสารสกัดเอทานอลความเข้มข้น 95% ของใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู และพบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยสารสกัดใบฝรั่งให้ค่า MIC เท่ากับ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของจิตรลดา วรรณโชติ (2558) และยังมีความใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Berto (2014) ที่รายงานค่า MIC ของสารสกัดเอทานอลของใบฝรั่งที่ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ Braga et al. (2014)รายงานค่า MIC ของสารสกัดเอทานอลของใบฝรั่งที่ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในการศึกษาของ Shu et al. (2011) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ของสาร quercetin รายงานค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยค่า MIC ของ quercetin สูงกว่าค่า MIC ของสารสกัดในการศึกษานี้ แสดงว่าอาจมีสารพฤกษเคมีชนิดอื่นในสารสกัดใบฝรั่งที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ได้

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ของสารสกัดรากชะเอมเทศ Sedighinia et al. (2012) รายงานค่า MIC และ MBC ของสารสกัด เอทานอล ของรากชะเอมเทศที่ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนการศึกษาของ Chaiya et al. (2013) พบค่า MIC และ MBC ของสารสกัดเอทานอลของรากชะเอมเทศที่ น้อยกว่า 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลดังกล่าวแตกต่างจากผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าสารสกัดเอทานอลของรากชะเอมเทศมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.195 และ 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อดีที่สุดจากทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ความแตกต่างจากการศึกษาอื่นอาจเกิดจากวิธีการสกัดและแหล่งที่มาของพืชสมุนไพรที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถส่งต่อปริมาณของสารพฤกษเคมีสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย หรือสายพันธุ์เชื้อที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามค่า MBC ที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีความใกล้เคียงกับการศึกษาของ Geetha, and Anitha (2012) ที่รายงานค่า MBC ของสารสกัดเอทานอลของรากชะเอมเทศที่ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ค่า MIC ของสารสกัดเอทานอลความเข้มข้น 95% ของดอกกานพลูในการศึกษาครั้งนี้เท่ากับ 1.526 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ยังไม่พบค่า MBC เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ จิตรลดา วรรณโชติ (2558) ค่า MIC ที่พบนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Chaiya et al., (2013) และ (Mirpour et al.(2015) ซึ่งรายงานค่า MIC ที่สูงกว่าคือ น้อยกว่า 12.5 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามทั้ง 2 การศึกษาดังกล่าวได้รายงานค่า MBC ที่ค่อนข้างสูงคือ 50 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปได้ที่จะสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ ทั้งนี้พบว่าสาร eugenol ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของดอกกานพลูมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบ โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 100 และ 200 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Moon et al., 2011)

ผลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดในฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลูมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* นอกจากสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวจะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* แล้วสารสกัดใบฝรั่งยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Hui and Gow, 2007) สารสกัดรากชะเอมเทศมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และ นงลักษณ์ เรืองวิเศษ, 2551) และสารสกัดดอกกานพลูยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และ นงลักษณ์ เรืองวิเศษ, 2551) เป็นต้น โดยฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวอาจช่วยส่งเสริมสุขภาพในช่องปากได้ ค่า MIC ที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ในการกำหนดความเข้มข้นของการศึกษาการยับยั้งคุณสมบัติก่อฟันผุของเชื้อ *S. mutans* รวมทั้งการพัฒนาสูตรตำรับต่อไป

เนื่องจากการพัฒนาผลิตภัณฑ์ป้องกันฟันผุในการศึกษานี้เป็นสารสกัดสมุนไพรผสม 3 ชนิด การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสมุนไพรจึงมีความน่าสนใจ โดยหากสมุนไพรสามารถเสริมฤทธิ์กันได้จะมีผลให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นในการยับยั้งเชื้อ หรือมีประสิทธิภาพดีเท่าเดิมโดยสามารถลดความเข้มข้นของสมุนไพรลง ซึ่งส่งผลดีต่อการพัฒนาตำรับ เช่น ลดปัญหาการไม่คงตัวของตำรับ การเกิดสีกลิ่นที่ไม่น่าใช้ การเกิดผลไม่พึงประสงค์ของสารสกัดความเข้มข้นสูง เป็นต้น อีกทั้งยังสามารถลดการเกิดเชื้อดื้อยาได้ (Eliopoulos and Moellering, 1996) และเป็นการยืนยันว่าความเข้มข้นที่ใช้ในตำรับในการศึกษานี้ไม่มีการต้านฤทธิ์กัน

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อเมื่อใช้สารสกัด 2 ชนิดผสมกันในครั้งนี้พบว่าสารสกัดผสมใบฝรั่งและดอกกานพลู สารสกัดผสมใบฝรั่งและรากชะเอมเทศ สารสกัดผสมดอกกานพลูและรากชะเอมเทศ ที่ความเข้มข้นชนิดละ 1/16 และ 1/4MIC ออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของจิตรลดา วรรณโชติ (2558) ที่พบว่าสารสกัดสารสกัดดอกกานพลูและใบฝรั่งมีการออกฤทธิ์เสริมกันในการต้านเชื้อ *S. mutans* อาจเป็นเพราะในสารสกัดสมุนไพรมีองค์ประกอบของสารหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยมีเป้าหมายหรือกลไกต่างกัน ตัวอย่างเช่น สาร eugenol มีฤทธิ์เพิ่มความสามารถในการแพร่ผ่าน

(permeability) ของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ (Shuxu et al., 2013) ทำให้สารชนิดอื่นที่ต้องออกฤทธิ์ภายในเซลล์ สามารถผ่านเข้าไปยังเป้าหมายภายในเซลล์ได้มากขึ้น เป็นต้น

ในการศึกษากลไกต้านการก่อฟันผุของเชื้อ *S. mutans* 3 กลไก ของสารสกัดใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC พบว่า ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะ การสร้างไบโอฟิล์ม และการสร้างกรดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

มีรายงานว่าสาร quercetin ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสารสกัดใบฝรั่ง คาดว่าออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของเซลล์เมมเบรนและ extracellular proteins ของเชื้อแบคทีเรีย (Ouyang et al., 2016) นอกจากนี้มีรายงานพบว่า quercetin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มและคุณสมบัติก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ได้ (Ouyang et al., 2016) นอกจาก quercetin แล้วสารกลุ่ม flavonoids อีกชนิดที่พบได้ในฝรั่งและมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้คือ guaijaverin โดยพบว่า guaijaverin มีฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* บนผิวฟันได้ จากการลดคุณสมบัติ hydrophobicity ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ guaijaverin ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตกรดและยับยั้งการยึดเกาะบนพื้นผิว (ทั้งแบบ sucrose-dependent และแบบ sucrose-independent) ของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้เช่นกัน (Prabu et al., 2005) จึงอาจเป็นไปได้ว่าสาร guaijaverin เป็นสารพฤกษเคมีชนิดหนึ่งในสารสกัด เอทานอลของใบฝรั่งที่มีบทบาทยับยั้งคุณสมบัติก่อฟันผุของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ในการศึกษาครั้งนี้

มีรายงานว่า glycyrrhizic acid (GA) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ตรวจพบในรากชะเอมเทศ ที่ความเข้มข้น 0.5-1% มีฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะบนพื้นผิวและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้เกือบทั้งหมด (Segal et al., 1985) ดังนั้นจึงคาดว่า GA เป็นสารพฤกษเคมีสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านคุณสมบัติก่อฟันผุของสารสกัดเอทานอลของรากชะเอมเทศ อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Ahn et al. (2012) และ Ahn et al. (2014) ได้รายงานถึงฤทธิ์ของสารสกัดรากชะเอมเทศที่ไม่มี GA (deglycyrrhizinated licorice extract) ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ที่แยกจากผู้ป่วยโรคฟันผุ ดังนั้นฤทธิ์ในการต้านฟันผุของสารสกัดรากชะเอมเทศจึงอาจเกี่ยวข้องกับสารพฤกษเคมีอื่นด้วยนอกเหนือจาก GA นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าสาร glabridin ซึ่งสกัดจากรากชะเอมเทศก็มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Gupta et al., 2008)

ในสารสกัดดอกกานพลูพบสาร eugenol และมีรายงานว่าน้ำมันดอกกานพลู (0.001-0.01%) และ eugenol (0.002 และ 0.005%) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้ โดยพบว่า eugenol มีผลไปกดการแสดงออกของยีนที่จำเป็นต่อการสร้างไบโอฟิล์มและการยึดเกาะบนพื้นของแบคทีเรีย (Kim et al., 2016) สารสกัดดอกกานพลูที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะ การสร้างไบโอฟิล์ม และการสร้างกรดได้

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rahim and Khan (2006) ที่พบว่าสารสกัดน้ำและสารสกัดเมทานอล ของดอกกานพลูที่ความเข้มข้น 5-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งคุณสมบัติก่อฟันผุของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้ คือฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะบนพื้นผิว และการสังเคราะห์ glucan ของเชื้อ *S. mutans* ได้ นอกจากสารสกัดดอกกานพลูแล้ว น้ำมันดอกกานพลู (clove oil) ก็มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้เช่นกัน (Moon et al., 2011) ดังนั้นจึงคาดว่า eugenol เป็นสารพฤกษเคมีหลักที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและต้านคุณสมบัติก่อฟันผุของสารสกัดเอทานอลของดอกกานพลูในการศึกษาครั้งนี้ เพราะฉะนั้นจากการศึกษางานวิจัยทำให้ทราบว่าฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ และฤทธิ์ต้านคุณสมบัติก่อฟันผุของเชื้อนั้นอาจมาจากสารพฤกษเคมีหลายชนิดที่เป็นส่วนประกอบของสารสกัดสมุนไพรจึงเลือกใช้เป็นสารสกัดหยาบของสมุนไพรในการตั้งตำรับ และจากการศึกษาผลของสารสกัดใบฝรั่ง รากชะเอมเทศ และดอกกานพลู มีประสิทธิภาพในการฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* และฤทธิ์ต้านคุณสมบัติก่อฟันผุของเชื้อ *S. mutans* ได้ นอกจากนั้นยังมีผลของการเสริมฤทธิ์กันของสมุนไพรดังกล่าว จึงเหมาะสมที่สามารถนำไปตั้งตำรับเจลทาฟันสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันฟันผุ

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยเลือกพัฒนาตำรับเจลทาฟัน เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถใช้ในช่องปาก ที่สามารถปลดปล่อยตัวยาและออกฤทธิ์ได้เป็นเวลานานในบริเวณที่ต้องการ (อัญชนา ลุนพรม, 2547) โดยตำรับเจลทาฟันสมุนไพรที่พัฒนาได้ มีลักษณะเป็นเจลใส เนื้อเดียวกันไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน มีกลิ่นและรสเปปเปอร์มิ้นท์ มีสีเขียวจากใบฝรั่งและสารแต่งสี มีความคงตัวของตำรับทางกายภาพ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับเจลที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร และเมื่อผ่านกระบวนการ freeze thaw cycle เป็นเวลา 12 วัน พบว่าลักษณะทางกายภาพของเจลทาฟันสมุนไพรมีความคงตัวไม่เปลี่ยนแปลง และทางเคมีทดสอบค่า pH พบว่าไม่เปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าตำรับเจลทาฟันสมุนไพรมีความคงตัวสูง

ผู้วิจัยเลือกเจลเบสโดยมีส่วนประกอบหลักคือ carboxymethyl cellulose (CMC) เป็นสารก่อเนื้อเจล ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพอลิเมอร์สามารถละลายได้ดีในน้ำร้อน และพอตัวได้ดีในน้ำเย็น ให้เนื้อเจลที่มีความใส มีความคงตัวที่ช่วง pH กว้าง สามารถรับประทานได้ ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษ (มานี เหลืองธนะอนันต์, 2546) glycerin และ sorbitol เป็นสารเพิ่มความชุ่มชื้นในตำรับและช่วยการละลาย โดยทั่วไปเจลมีองค์ประกอบของน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ทำให้ระเหยได้ง่าย แก้ไขได้ด้วยการเติมสารเพิ่มความชุ่มชื้น ทำหน้าที่ช่วยให้ส่วนประกอบของเจลทาฟันกลมกลืน ทำให้เนื้อเจลทาฟันไม่แข็งตัวเมื่อสัมผัสกับอากาศภายนอกหลอด นอกจากนี้ sorbitol ให้ความหวานแก่เจลทาฟันแต่ไม่เป็นสาเหตุของการเกิดฟันผุ สามารถรับประทานได้ ไม่มีพิษ (พิมพร ศรีฉัตราภิมุข, 2549) sodium benzoate เป็นสารกันเสีย เนื่องจากเจลเป็นตำรับที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งเป็นตัวช่วยทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ง่าย จึงจำเป็นต้องเติมสารกันเสีย เป็นสารที่เติมในเจลทาฟัน เพื่อป้องกัน

การบูดเสีย และเป็นสารกันเสียที่เข้ากันได้ดีกับตัวสารก่อเจล (ณรงค์ คุณาภิบาล, 2536) sodium saccharin และ Peppermint oil เป็นสารแต่งรสในตำรับ ทำให้เจลทาฟันสมุนไพรน่าใช้ยิ่งขึ้น ใช้แล้วรู้สึกสดชื่น สามารถเข้ากันได้ดีกับตำรับเจลทาฟันสมุนไพร สามารถรับประทานได้ ไม่มีพิษ (บุปผา ไตรโรจน์ และ พวงทอง ผูกฤตยาคามี, 2539) เพราะฉะนั้นส่วนประกอบหลักดังกล่าวจึงเหมาะสมในการนำมาตั้งตำรับเจลทาฟันสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุ และในการศึกษานี้มีการทดสอบในหลอดทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ของตำรับ ด้วยวิธี agar well diffusion เปรียบเทียบขนาดของโซนการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ของเจลทาฟันสมุนไพรกับเจลที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร พบว่าเจลทาฟันสมุนไพรที่พัฒนาขึ้นมีขนาดของโซนการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* กว้างกว่าเจลที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทำให้เห็นว่าเจลทาฟันสมุนไพรมีการปลดปล่อยตัวยาในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* เพื่อป้องกันฟันผุ

ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุในรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย เช่น น้ำยาบ้วนปาก แผ่นฟิล์มอมในปาก เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อฟันผุได้เช่นเดียวกัน (จิตรลดา วรรณโชติ, 2558 และ มัทธนี อนันตพงษ์ และ อัญชลี ชุติไพจิตร, 2544) ถึงแม้ว่าเจลทาฟันสมุนไพรไม่สามารถทดแทนการใช้ยาสีฟันในการแปรงฟัน รวมไปถึงการใช้ไหมขัดฟันได้ แต่ช่วยเสริมประสิทธิภาพการแปรงฟันเพื่อป้องกันฟันผุให้มากขึ้น สามารถป้องกันฟันผุเบื้องต้นได้ เนื่องจากเนื้อเจลมีความหนืดสามารถยึดเกาะกับผิวฟันได้ในระยะหนึ่งจึงยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ ความสะดวกในการใช้ เนื่องจากไม่ต้องบ้วนปากหลังจากใช้ผลิตภัณฑ์ สามารถใช้ได้ในระหว่างวัน ใช้ได้ในเด็กที่ยังแปรงฟันเองได้ไม่ทั่วถึง รวมไปถึงในผู้สูงอายุที่มีปัญหากล้ามเนื้อข้อมือที่แปรงฟันเองได้ไม่ดี และหากมีการพัฒนาต่อควรมีการศึกษาความคงตัวในระยะยาว ความคงตัวทางเคมีของสารพฤกษเคมีในสารสกัดสมุนไพร เพื่อนำไปกำหนดอายุของผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรต่อไปในอนาคต รวมทั้งการทดลองทางคลินิกต่อไป

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัย หากมีการศึกษาเพื่อพัฒนาไปสู่ขั้นการผลิตในระดับอุตสาหกรรม หรือในเชิงพาณิชย์ ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะ ดังต่อไปนี้

5.3.1 ควรมีการศึกษาระยะเวลาการออกฤทธิ์ของเจลทาฟันสมุนไพร เพื่อเป็นข้อมูลในการกำหนดวิธีใช้

5.3.2 ควรมีการศึกษาความคงตัวของเจลทาฟันในระยะยาว เพื่อกำหนดอายุของการใช้เจลทาฟัน

5.3.3 ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของเจลทาฟันสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อในช่องปากชนิดอื่น และการทดสอบหาประสิทธิภาพการต้านเชื้อของเจลทาฟันในกลุ่มอาสาสมัคร และศึกษาประสิทธิภาพของเจลทาฟันสมุนไพรกับโรคอื่น ๆ ในช่องปาก

5.3.4 ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ป้องกันฟันผุรูปแบบอื่น

5.3.5 หากมีการพัฒนาในด้านอุตสาหกรรม ควรศึกษาในด้านของต้นทุนของส่วนประกอบในการทำผลิตภัณฑ์เจลทาฟันสมุนไพรให้คุ้มค่าและมีประสิทธิภาพ

5.3.6 ควรมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในตำรับเจลทาฟัน

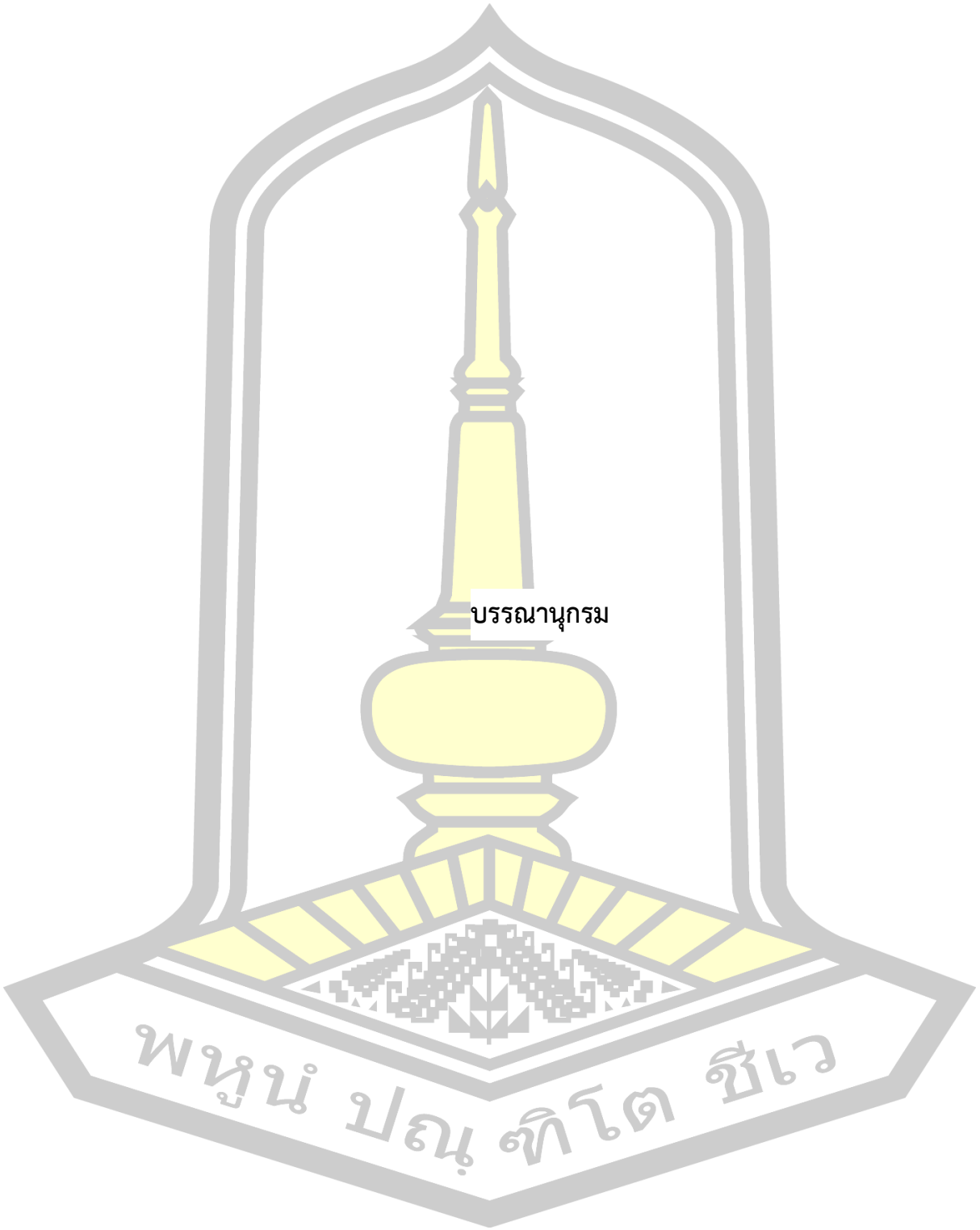
5.3.7 ควรศึกษาการพัฒนาตำรับเจลทาฟันโดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดต่ำกว่า MIC ตามผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์

5.3.8 ควรมีการทดสอบผลิตภัณฑ์เจลทาฟันกับเชื้อ normal flora เพื่อศึกษาว่าผลิตภัณฑ์นี้มีผลกับ normal flora หรือไม่

5.3.9 ควรมีการทดสอบยืนยันการอยู่รอดของเชื้อหลังจากทดสอบคุณสมบัติก่อฟันผุ เพื่อให้ทราบว่าผลการทดสอบที่ได้ไม่ได้เกิดจากสารสกัดทำให้เชื้อตาย

5.3.10 ควรหาสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่สามารถแยกสารพฤกษเคมีในสารสกัดสมุนไพรให้ชัดเจน และควรใช้สภาวะวัฏภาคเคลื่อนที่ของสารสกัดสมุดไพรชนิดละสภาวะ

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธรณสุข. (2551). *รายงานผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 7*. กรุงเทพฯ: สำนักงานกิจการโรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

จิตรลดา วรรณโชติ. (2558). การพัฒนาและประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ชุติมา ไตรรัตน์วรกุล. (2554). *ทันตกรรมป้องกันในเด็กและวัยรุ่น* (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: เบสท์ บุ๊คส์ออนไลน์.

โชคชัย วงส์สินทรัพย์, สุระรอง ชินวงศ์และ ภูมิริดา เวียนทอง. (2552). *การเลือกใช้เภสัชภัณฑ์*. เชียงใหม่: โรงพิมพ์พุยูเนี่ยน.

ณรงค์ คุณาภิบาล. (2536). *วัตถุกันเสียที่ใช้ในเครื่องสำอาง*. กรุงเทพฯ: กองควบคุมเครื่องสำอาง กระทรวงสาธารณสุข.

เต็ม สมิตินันทน์. (2544). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และ นงลักษณ์ เรืองวิเศษ. (2551). *คุณภาพเครื่องยาไทย จากงานวิจัยสู่การพัฒนาอย่างยั่งยืน*. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

บุปผา ไตรโรจน์ และ พวงทอง ผูกฤตยาคามี. (2539). *สมุนไพรในช่องปาก*. กรุงเทพฯ: กองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธรณสุข.

ประทีป พันธุมวนิช และ จันทนา อึ้งชูศักดิ์. (2539). *Cariology และระบาดวิทยา รายงานการประชุม Preventive Dentistry in Community Care*. กรุงเทพฯ: กองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธรณสุข.

ปลื้มจิตต์ โรจนพันธุ์, พรรณวิสา กฤษฎาพงษ์, วราภรณ์ จรรยาประเสริฐและ กอบธัม สถิรกุล. (2537). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์เจล: ตำรับยาทางผิวหนังและเครื่องสำอาง*. กรุงเทพฯ: ประยูรวงศ์พรินท์ติ้ง.

พิมพร ศรีฉัตราภิมุข. (2549). *เครื่องสำอางเพื่อความสะอาด*. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม.

ภทรพรรณ อุณาภาค และ สิริรัตน์ ราษฎร์ดุษดี. (2549). *การพัฒนาตำรับยาสีฟันสมุนไพร*. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

มัทธนี อนันตพงษ์ และ อัญชลี ชุติไพจิตร. (2544). *แผ่นฟิล์มระงับกลิ่นปากชนิดละลายเร็ว*. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

มานี เหลืองธนะอนัน. (2546). *การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีพอลิเมอร์เพื่อพัฒนาตำรับยาเตรียมและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ*. นครปฐม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

เมธินี คุปพิทยานันท์ และ สุพรรณี ศรีวิริยกุล. (2555). *การสร้างเสริมสุขภาพช่องปาก ประตู...สู่สุขภาพที่ดีในทุกช่วงวัยของชีวิต*. กรุงเทพฯ: สำนักงานกิจการโรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

วิรัตน์ ทองรอด. (2548). *นิตยสารหมอชาวบ้าน: ยาแก้ปวดฟัน* (ฉบับที่ 312). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยมหิดล.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2556). *ตำราเครื่องยาไทยสวน 20 ปีสมุนไพร (สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ)*. กรุงเทพฯ: ศิลป์สยามบรรจุภัณฑ์และการพิมพ์.

สถาบันวิจัยโภชนาการ. (2532). นิตยสารหมอชาวบ้าน: มารู้จักน้ำตาลเทียมกันเถอะ (ฉบับที่ 121). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุภร ตันตินิรามัย. (2559). สาเหตุ การรักษาและการป้องกันโรคฟันผุในเด็กปฐมวัย (ECC). *วารสารศูนย์การศึกษาแพทยศาสตร์คลินิก โรงพยาบาลพระปกเกล้า*, *33*(2), 167–175.

สุรเกียรติ อาชานานุภาพ. (2553). ปวดฟัน ฟันผุ (Dental caries/Tooth decay). ใน *หนังสือตำราการตรวจรักษาโรคทั่วไป 2* (pp. 563–564). กรุงเทพฯ.

สุรพงค์ รัตนะ, บรรลือ สังข์ทองและ ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร. (2560). การแยกกรดไกลเซอไรซิคและกรดกอลลิคในสารสกัดยาธาตุอบเชยด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง-เดนสิโตเมทรีและการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีไบโอออโทกราฟี. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน*, *13*(พิเศษ), 60-71.

อัญชนา ลุนพรม. (2547). การพัฒนาตำรับเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยเพื่อใช้ร่วมกับการรักษาโรคปริทันต์อักเสบและทดสอบความปลอดภัยทางคลินิก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Abdelrahim SI, Almagboul AZ, Omer MEA, and Elegami A. (2002). Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. *Fitoterapia*, *73*(7–8), 713–715.

Ahn SJ, Cho EJ, Kim HJ, Park SN, Lim YK, and Kook J. (2012). The antimicrobial effects of deglycyrrhizinated licorice root extract on *Streptococcus mutans* UA159 in both planktonic and biofilm cultures. *Anaerobe*, *18*(6), 590–560.

Ahn SJ, Song YD, Mah SJ, Cho EJ, and Kook J. (2014). Determination of optimal concentration of deglycyrrhizinated licorice root extract for preventing dental caries using a bacterial model system. *Journal of Dairy Science*, *9*(1), 214–220.

Ajagannanavar SL, Battur H, Shamarao S, Sivakumar V, Patil PU, and Shanavas P. (2014). Effect of Aqueous and Alcoholic Licorice (*Glycyrrhiza Glabra*) root extract against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* in comparison to chlorhexidine: An in vitro Study. *Journal of International Oral Health*, *6*(4), 29–34.

Bankar R, Kumar A, and Puri S. (2011). Phytochemical constituent of *Syzygium aromaticum* L. *International Journal of Current Research*, *3*(7), 215–217.

Barker M. (2010). Dental Caries Prevention by Camellia sinensis. Retrieved April 23, 2017, from https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Dental_Caries_ Prevention_ by_Camellia_sinensis%0A

Beltrán-Valladares P, Cocom-Tum H, Casanova-Rosado JF, Vallejos-Sánchez AA, M.-, and Solís CE, and Maupomé G. (2006). Caries prevalence and some associated factors in 6-9- year-old schoolchildren in Campeche, Mexico. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, *17*(1), 25–33.

Berto LA. (2014). *Antimicrobial activity of plants from brazilian cerrado against Streptococcus mutans*. Ph.D thesis. Piracicaba Dental School of the University of Campinas.

Bowen WH, and Koo H. (2011). Biology of *Streptococcus mutans*-deriverd glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Research*, *45*(1), 69–86.

Braga TV, Dores RGR, Ramos CS, Evangelista FCG, Tinoco LMS, Varotti FP, Carvalho MGC, and Sabino A. (2014). Antioxidant, antibacterial and antitumor activity of ethanolic extract of the *Psidium guajava* leaves. *American Journal of Plant Sciences*, *5*(1), 3492–3500.

Caiazza NC, Merritt JH, Brothers KM, and O'Toole G. (2007). Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*, *189*(1), 3603–3612.

Chaiya A, Saraya S, Chuakul W, and Temsiririrkkul R. (2013). Screening for dental caries: preventive activities of medicinal plants against *Streptococcus mutans*. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, *40*(1), 9–17.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. *CLSI Wayne PA*, *32*(1), 1.

Eliopoulos GM and Moellering RC. (1996). *Antimicrobial combinations. In: Antibiotics in laboratory medicine* (4th ed). Baltimore (MD): William and Wilkins.

Galvão LCC, Furletti VF, Bersan SMF, Cunha MG, Ruiz ALTG, Carvalho JE, Sartoratto A, Rehder VLG, Figueira GM, and Duarte M. (2012). Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *12*(1), 1–12.

Geetha RV, and Anitha R. (2012). In vitro evaluation of antibacterial activity of ethanolic root extract of *Glycyrrhiza glabra* on oral microbes. *International Journal of Drug Development and Research*, *4*(4), 11–165.

Geoghegan F, Wong RW, and Rabie A. (2010). Inhibitory effect of quercetin on periodontal pathogens in vitro. *Phytotherapy Research*, *24*(6), 817–880.

Guan W, Li S, Yan R, Tang S, Quan C. (2006). Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry*, *101*(2007), 1558–1564.

Gupta VK, Fatima A, and Faridi U. (2008). Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, *116*(2), 377–380.

Gutirrez RP, Mitchell S, and Solis R. (2008). *Psidium guajava* a review of its traditional uses phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, *117*(1), 1–27.

Hamada S and Slade HD. (1980). Biology immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Clinical Microbiology Reviews*, *44*(2), 331–384.

Hui YC and Gow CY. (2007). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chemistry*, *101*(2), 686–694.

Islam B, Khan SN, and Khan A. (2007). Dental caries: from infection to prevemtion. *Medical Science Monitor*, *13*(1), 196–203.

Jebashree HS, Kingsley SJ, Sathish ES, and Devapriya D. (2011). Antimicrobial activity of few medicinal plants against clinically isolated human cariogenic pathogens-An in vitro study. *International Scholarly Research Network*, *2011*(1), 1–6.

Juntavee A, Peerapattana J, Ratanathongkam A, Nualkaew N, Chatchiwiwattana S, and Treesuwan P. (2014). The antibacterial effects of Apacaries gel on *Streptococcus mutans*: an in vitro study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *7*(2), 77–81.

Kim YG, Lee JH, Kim SI, Park JG, and Lee J. (2016). Essential oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7. *Scientific Reports*, *6*(1), 1–11.

Lee SF, Progulske FA, Erdos Gw, Piacentini DA, Ayakawa GY, Crowley PJ, and Bleiweis A. (1989). Construction and characterization of isogenic mutants of *Streptococcus mutans* deficient in major surface protein antigen P1 (I/II). *Infection and Immunity*, *57*(1), 3306–3313.

Lynch DJ, Michalek SM, Zhu M, Drake D, Qian F, and Banas J. (2031). Cariogenicity of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein deletion mutants. *Oral Health and Dental Management Journal*, *12*(4), 191–199.

Martin A, Bustamante P, and Chun A. (1993). *Physical pharmacy* (4th ed). Philadelphia: Lea and Febiger.

Matsumura M, Izumi T, Matsumoto M, Fujiwara T, and Ooshima T. (2003). The role of glucan-binding proteins in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiology and Immunology*, *47*(1), 213–215.

Mirpour M, Siahmazgi ZG, and Kiasaraie M. (2015). Antibacterial activity of clove, gall nut methanolic and ethanolic extracts on *Streptococcus mutans* PTCC 1683 and *Streptococcus salivarius* PTCC 1448. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, *5*(1), 7–10.

Mohd A, Kunal S, Praveen KV, and Asad U. (2014). Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in *Streptococcus mutans*: An approach to inhibit biofilms. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *2*(4), 286–292.

Moody J. (2004). Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Isenber HD, editor. In *Clinical microbiology procedures handbook* (pp. 1–23). Washington DC: American Society for Microbiology Press.

Moon SE, Kim HY, and Cha J. (2011). Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of Oral Biology*, *56*(9), 907–916.

Ouyang J, Sun F, Feng W, Sun Y, Qiu X, Xiong L, et al. (2016). Quercetin is an effective inhibitor of quorum sensing, biofilm formation and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, *120*(4), 966–974.

Petersen FC, Assev S, Mei HC, Busscher HJ, and Scheie A. (2002). Functional variation of the antigen I/II surface protein in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*. *Infection and Immunity*, *70*(1), 249–256.

Pothitirat, W., and Gritsanapan, W. (2005). Quantitative analysis of curcumin , demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin in the crude curcuminoid extract from *Curcuma longa* in Thailand by TLC- Densitometry. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, *32*(1-2), 23–30.

Prabu GR, Gnanamani A, and Sadulla S. (2005). Guaijaverin – a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(2), 487–495.

Rahim ZHA, and Khan H. (2006). Comparative studies on the effect of crude aqueous (CA) and solvent (CM) extracts of clove on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. *Journal of Oral Sciences*, *48*(3), 117–123.

Raymond CR, Paul JS, and Paul J. (2003). Handbook of Pharmaceutical Excipients (vol 4). Washington DC: Pharmaceutical Press.

Razak FA, and Rahim Z. (2003). The anti-adherence effect of Piper betle and *Psidium guajava* extracts on the adhesion of early settlers in dental plaque to salivacoated glass surfaces. *Journal of Oral Sciences*, *45*(4), 201–206.

Ritter AV, Eidson RS, and Donovan TE. (2015). Dental Caries: Etiology, Clinical Characteristics, Risk Assessment, and Management. Retrieved April 23, 2017, from http://pocketdentistry.com/2-dental-caries-etiology-clinical-characteristics-risk-assessment-and-management.%0A

Saeed S, and Tariq P. (2008). In vitro antibacterial activity of clove against gram negative bacteria. *Pakistan Journal of Botany*, *40*(5), 2157–2160.

Saxena S. (2005). *Glycyrrhiza glabra*: Medicine over the millennium. *Natural Product Radiance*, *4*(5), 358–367.

Sedighinia F, Afshar AS, Soleimanpour S, zarif R, Asili J, and Ghazvini K. (2012). Antibacterial activity of *Glycyrrhiza glabra* against oral pathogens: an in vitro study. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, *2*(2), 118–124.

Segal R, Pisanty S, Wormser R, Azaz E, and Sela M. (1985). Anticariogenic activity of licorice and glycyrrhizine I: Inhibition of in vitro plaque formation by *Streptococcus mutans*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *74*(1), 79–81.

Shu Y, Liu Y, Li L, Feng J, Lou BY, Zhou XD, and Wu H. (2011). Antibacterial activity of quercetin on oral infectious pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, *5*(30), 5358–5367.

Shuxu J, Li Y, and Xue C. (2013). The effect of eugenol on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans* and dental caries development in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *5*(1), 1667–1670.

Sohafy SM, Metwalli AM, Harraz FM, and Omar A. (2009). Quantification of flavonoids of *Psidium guajava* L. preparations by Planar Chromatography (HPTLC). *Pharmacognosy Magazine*, *5*(17), 61–66.

Tian M, Yan H, and Row K. (2008). Extraction of Glycyrrhizic Acid and Glabridin from Licorice. *International Journal of Molecular Sciences*, *9*(4), 571–577.

Woodward M, and Walker A. (1994). Sugar consumption and dental caries: Evidence from 90 countries. *British Dental Journal*, *176*(1), 297–302.

Yang Y, Liu S, He Y, Chen Z, and Li M. (2016). Effect of LongZhang Gargle on biofilm formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* in vitro. *BioMed Research International*, *2016*(1), 1–8.

Yun SM, Lee MH, Lee KJ, Ku HO, Son SW, J. Y. (2010). Quantitative analysis of eugenol in clove extract by a validated HPLC method. *The Journal of AOAC International*, *93*(6), 1806–1810.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวณลิตา ไพบูลย์
วันเกิด	วันที่ 22 มีนาคม พ.ศ. 2535
สถานที่เกิด	อำเภอเมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 60/106 หมู่ 10 ตำบลโพธิ์กลาง อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา รหัสไปรษณีย์ 30000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2553 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสุรนารีวิทยา ตำบลในเมือง เมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา พ.ศ. 2557 ปริญญาวิทยาศสาตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2562 ปริญญาวิทยาศสาตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว