



ผลการต้านจุลชีพของสมุนไพรไทยในวงศ์ Lamiaceae, Piperaceae และ Zingiberaceae  
ต่อเชื้อก่อโรคในช่องปาก

Antimicrobial Effect of Thai Medical Herbs in Lamiaceae, Piperaceae and  
Zingiberaceae Against Oral Pathogens

ปจรรย์ ขาวสุด

Pajaree Kawsud

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการสุขภาพช่องปากประยุกต์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Science in Applied Oral Health Sciences

Prince of Songkla University

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลการต้านจุลชีพของสมุนไพรไทยในวงศ์ Lamiaceae, Piperaceae และ Zingiberaceae ต่อเชื้อก่อโรคในช่องปาก

ผู้เขียน นางสาวปาจรีย์ ขาวสุด

สาขาวิชา วิทยาการสุขภาพช่องปากประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. รวี เกียรติไพศาล)

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล ทวีชัยสุภพงษ์)

.....กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ถ้ามี)

(รองศาสตราจารย์ ดร. สนั่น สุภธีรสกุล)

.....

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นัตริชัย วัฒนากิรมย์สกุล)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. รวี เกียรติไพศาล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการ  
สุขภาพช่องปากประยุกต์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ศาสตราจารย์ ดร. รวี เกียรติไพศาล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวปาจรีย์ ขาวสุด)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวปาจริย์ ขาวสุด)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลการต้านจุลชีพของสมุนไพรไทยในวงศ์ Lamiaceae, Piperaceae และ Zingiberaceae ต่อเชื้อก่อโรคในช่องปาก
ผู้เขียน	นางสาวปาจริย์ ขาวสุด
สาขาวิชา	วิทยาการสุขภาพช่องปากประยุกต์
ปีการศึกษา	2556

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์การต้านไบโอฟิล์ม และการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สามารถออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมากที่สุดต่อเชื้อก่อโรคในช่องปาก โดยสารสกัดสมุนไพร 12 ชนิดที่ใช้ศึกษาประกอบด้วย ข่า (*Alpinia galanga*), ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*), ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*), พลู่ (*Piper betle*), ดีปลี (*Piper chaba*), พริกไทย (*Piper nigrum*), ซ้าพลู่ (*Piper sarmentosum*), สะระแหน่ (*Mentha cordifolia*), แมงลัก (*Ocimum africanum*), โหระพา (*Ocimum basilicum*), กะเพรา (*Ocimum sanctum*) และขิง (*Zingiber officinale*) การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อในขั้นต้นใช้วิธี agar well diffusion method, Minimal inhibition concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC) และ time kill assay การศึกษาฤทธิ์การต้านไบโอฟิล์มใช้วิธี 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide (MTT) assay และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใช้วิธี thin layer chromatography (TLC) fingerprinting, TLC-bioautography, gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) และ high performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อคัดเลือกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อในขั้นต้น ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อในขั้นต้นพบว่า สารสกัดจากใบพลู่สามารถต้านเชื้อที่ใช้ศึกษาได้ทุกชนิด โดยใช้ความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อที่ต่ำที่สุดอยู่ในช่วง 1.04 ถึง 4.17 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นในการฆ่าเชื้อที่ต่ำที่สุดอยู่ในช่วง 1.56 ถึง 8.33 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งความสามารถในการฆ่าเชื้อของสารสกัดจากใบพลู่ขึ้นกับความเข้มข้นและระยะเวลาในการใช้สารสกัด ผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม  $\geq 90\%$  ของสารสกัดจากใบพลู่ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ใช้ความเข้มข้น  $1.56 \pm 0.11$ ,  $0.39 \pm 0.65$  และ  $3.13 \pm 0.15$  มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ ผลการกำจัดไบโอฟิล์ม  $\geq 90\%$  ของสารสกัดจากใบพลู่ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ใช้ความเข้มข้น  $6.25 \pm$

0.58,  $3.13 \pm 0.28$  และ  $12.50 \pm 0.69$  มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบพลูพบว่า สาร 4-chromanol มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ ดังนั้นสารสกัดจากใบพลูมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ดี ซึ่งมีแนวโน้มที่สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในช่องปากได้

<b>Thesis Title</b>	Antimicrobial Effect of Thai Medical Herbs in Lamiaceae, Piperaceae and Zingiberaceae Against Oral Pathogens
<b>Author</b>	Miss Pajaree Kawsud
<b>Major Program</b>	Applied Oral Health Sciences
<b>Academic Year</b>	2013

### ABSTRACT

The aim of study was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of the ethanolic extracts of 12 herbs. The phytochemical profile of the most effective extract was also investigated. Herb extracts included *Alpinia galanga*, *Curcuma longa*, *Curcuma zedoaria*, *Piper betle*, *Piper chaba*, *Piper nigrum*, *Piper sarmentosum*, *Mentha cordifolia*, *Ocimum africanum*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum sanctum* and *Zingiber officinale*. The antimicrobial activity was performed by measuring the inhibition zones using agar well diffusion method. Minimal inhibition concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) were assessed using microdilution method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and a time kill assay was also determined. Antibiofilm activity was investigated using 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide (MTT) assay. Thin layer chromatography (TLC), fingerprinting TLC-bioautography, gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) and high performance liquid chromatography (HPLC) were used to determine the active compound of antibacterial. In the results, *P. betle* showed a good antimicrobial activity against all tested strains with MICs ranged from 1.04 to 4.17 mg/ml, and MBCs ranged from 1.56 to 8.33 mg/ml. The killing activity depended on time and concentrations of extract. The amount of *P. betle* extract required to inhibit  $\geq 90$  % biofilm formation of *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384 and *Candida albicans* ATCC 90028 were  $1.56 \pm 0.11$ ,  $0.39 \pm 0.65$  and  $3.13 \pm 0.15$  mg/ml and to remove  $\geq 90$  % biofilm growth were  $6.25 \pm 0.58$ ,  $3.13 \pm 0.28$  and  $12.50 \pm 0.69$  mg/ml, respectively. The major compound was 4-chromanol, which responded for the antimicrobial activity of *P. betle* extract. It was demonstrated that the extract of *P. betle* possess 4-chromanol with good antimicrobial properties that may be used for treatment of oral infectious diseases.

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(9)
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(11)
รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ	(12)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	16
วิธีการดำเนินงานวิจัย	17
ผลการดำเนินงานวิจัย	25
วิจารณ์ผลการวิจัย	30
สรุปผลการวิจัย	35
บรรณานุกรม	36
ภาคผนวก	43
ก บททความวิจัยที่ส่งตีพิมพ์	44
ข บททความวิจัยที่นำเสนอในงานประชุมวิชาการ	65
ค บททความวิจัยฉบับร่าง	70
ประวัติผู้เขียน	96



## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สรุปผลรายงานการศึกษาการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสมุนไพรในวงศ์ Lamiaceae, Piperaceae และ Zingiberaceae ทั้ง 12 ชนิด	14
2	การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด	18
3	แสดงสารสกัดสมุนไพร, ส่วนที่ใช้ในการทดสอบของสารสกัดและความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	26
4	ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบพลูด้วย GC-MS	29

## รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างสาร 4-chromanol	33
2	โครงสร้างสาร eugenol	33

## บทนำ

### บทนำต้นเรื่อง

โรคติดเชื้อในช่องปากที่สำคัญ ได้แก่ โรคฟันผุ และโรคปริทันต์อักเสบ ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากแบคทีเรียในช่องปากที่อาศัยอยู่ในคราบจุลินทรีย์ หรือไบโอฟิล์ม (biofilm)<sup>1-3</sup> ในการรักษานั้นอาจต้องให้ยาปฏิชีวนะ เป็นเหตุทำให้ประเทศชาติเสียงบประมาณเป็นจำนวนมากในแต่ละปี และบางครั้งเชื้ออาจคือต่อยาปฏิชีวนะ<sup>2,3</sup> ดังนั้นการหาแนวทางใหม่ ๆ ในการรักษาโรคติดเชื้อในช่องปากจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง การนำเอาสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคในช่องปากอาจเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากที่ผ่านมาได้มีการนำมาสุมไพร่พื้นบ้านมาใช้ในการรักษาโรคในช่องปากอย่างมีประสิทธิภาพ แม้จะยังขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ในการสนับสนุนประสิทธิภาพของสมุนไพรเหล่านั้นก็ตาม

ในงานวิจัยนี้ศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรไทยพื้นบ้านที่พบบ่อย 3 วงศ์ คือ สมุนไพรในวงศ์ Lamiaceae เช่น กะเพรา แมงลัก สะระแหน่ และ โหระพา เป็นต้น สมุนไพรในวงศ์ Piperaceae เช่น ช้าพลู ดิปลี พริกไทย และพลู เป็นต้น และ สมุนไพรในวงศ์ Zingiberaceae เช่น ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ข่า และขิง เป็นต้น โดยการศึกษาในครั้งนี้จะศึกษาถึงฤทธิ์การต้านเชื้อก่อโรคในช่องปากของสารสกัดจากสมุนไพรในวงศ์ Lamiaceae, Piperaceae และ Zingiberaceae

## การตรวจเอกสาร

### 1. สมุนไพรวงศ์ Lamiaceae

สมุนไพรที่นำมาศึกษา ได้แก่

#### 1.1 กะเพรา *Ocimum sanctum* L.<sup>4</sup>

##### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก สูง 30-90 เซนติเมตร ทั้งต้นมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ลำต้นเป็นรูปสี่เหลี่ยม มีกิ่งก้านมาก และมีขนปกคลุม ใบมีกลิ่นฉุน เป็นเดี่ยวเรียงตรงข้ามเป็นคู่ ๆ ลักษณะใบเป็นรูปรี หรือรีแกมขอบขนาน ปลายใบแหลม หรือมน ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย โคนใบแหลม หรือมน ตามเส้นใบมีขน ดอกออกเป็นช่อที่ปลายกิ่ง ใบประดับมีลักษณะเป็นรูปไข่ ปลายแหลมขอบมีขน ดอกติดรอบแกนช่อเป็นระยะ ๆ กลีบดอกมีลักษณะกลีบบานวกกลับไปทางด้านหลัง กลีบล่างยาวกว่า กลีบบน มีหยักรูปหอก 4 หยัก ผลแห้ง มีขนาดเล็ก ๆ 4 ผลอยู่รวมกัน มีลักษณะเป็นรูปรี กะเพรมี 3 พันธุ์ คือ กะเพราแดง กะเพราขาว และกะเพราลูกผสมระหว่างกะเพราแดงและกะเพราขาว ใบและกิ่งก้านของกะเพราขาวมีสีเขียวอ่อน ส่วนใบและกิ่งก้านของกะเพราแดงมีสีเขียวแกมม่วงแดง<sup>4,5</sup>

##### สรรพคุณตามแผนไทย

ใบ (รสเผ็ดร้อน) ช่วยในการขับลม แก้ปวดท้อง แก้ลมตานชาง ขับผายลม แก้จุกเสียด ทาผิวหนังแก้กลากเกลื้อน<sup>6</sup>

ต้น (รสเผ็ดร้อน) แก้ท้องขึ้น อืด เพื่อ จุกเสียด แก้พิษตานชาง<sup>6</sup>

##### สารสำคัญ

ใบ เมื่อนำมากลั่นด้วยไอน้ำ ได้น้ำมันหอมระเหย 0.7 % ซึ่งประกอบด้วย methyl eugenol, caryophyllene, methyl chavicol, *d*-pinene,  $\beta$ -pinene, camphene, sabinene, limonene, 1,8-cineol, *r*-terpinene, terpinolene, *D*-cubebene,  $\rho$ -cymene, copaene, linalool, iso-caryophyllene,  $\beta$ -elemene, caryophyllene, borneol และ *d*-salinene เป็นต้น<sup>6-8</sup>

##### รายงานทางวิทยาศาสตร์

- ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย: น้ำมันจากเมล็ดกะเพรา (fixed oil) สามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus pumilus* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*<sup>7-10</sup>
- ฤทธิ์ต้านเชื้อรา: สารสกัดด้วยน้ำสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Candida albicans* ด้วยวิธี agar diffusion ได้ Inhibition zone ที่กว้าง<sup>7-9</sup>

3. ฤทธิ์อื่น ๆ: ฤทธิ์ลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร<sup>11</sup> ฤทธิ์ต้านการอักเสบ แก้ปวด และฤทธิ์ลดไข้<sup>12, 13</sup> ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด<sup>14</sup> และฤทธิ์สมานแผล<sup>15</sup>

## 1.2 แมงลัก *Ocimum africanum* Lour.<sup>4</sup>

### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก ลำต้นตั้งตรง แตกกิ่งก้านมาก มีกลิ่นหอม สูง 30-120 เซนติเมตร ลำต้นและกิ่งก้านเป็นสี่เหลี่ยมสีเขียวแกมสีเหลือง เมื่อลำต้นยังอ่อนอยู่มีขนสีขาวหนาแน่น ใบเดี่ยวออกเรียงตรงข้ามกัน มีลักษณะใบเป็นรูปหอกถึงรูปวงรี กว้าง 1.5-2.5 เซนติเมตร ยาว 3.5-5.5 เซนติเมตร โคนใบมีลักษณะเป็นรูปลิ้น ปลายใบแหลม ขอบใบหยักเล็กน้อยแบบฟันเลื่อย ตามขอบใบและเส้นใบมีขนละเอียด ก้านใบยาวได้ถึง 2.5 เซนติเมตร ดอกช่อยาวได้ถึง 10-30 เซนติเมตร ประกอบด้วยช่อย่อยแบบกระจุก ๆ ละ 3 ดอก ช่อละ 2 กระจุก ใบประดับเป็นรูปวงรีแกมใบหอก ยาว 2-3 มิลลิเมตร มีขน ก้านดอกย่อยแนบไปกับแกนช่อดอก ยาว 2 มิลลิเมตร กลีบดอกมีสีขาว เชื่อมติดกันเป็นหลอด ปลายแยกเป็น 2 ปาก ยาว 4-6 มิลลิเมตร เกสรเพศผู้ 4 อัน ยาว 2 อัน สั้น 2 อัน เกสรเพศเมียมีออวูล 4 อัน รังไข่เว้าเป็น 4 พู ผลแห้งประกอบด้วยผลย่อย 4 ผล มีกลีบเลี้ยงหุ้มอยู่ ผลย่อยมีทรงเป็นรูปไข่ สีดำ กว้าง 1 มิลลิเมตร ยาว 1.25 มิลลิเมตร<sup>4, 5</sup>

### สรรพคุณตามแผนไทย

เมล็ด (รสหอมร้อน) แชน้ำให้พองเต็มที่ (รสหวานเย็น) รับประทานช่วยเร่งการขับถ่าย ระบายอุจจาระ แก้บิด<sup>6</sup>

ใบ (รสหอมร้อน) ขับลมในลำไส้ แก้พิษตานซาง แก้โรคลำไส้พิการ<sup>6</sup>

### สารสำคัญ

น้ำมันหอมระเหย 98.0–99.7 % ของต้นแมงลัก พบว่ามีสาร linalool เป็นส่วนประกอบหลัก พบได้ 56.7-60.6 % นอกจากนี้ยังพบสาร *epi-α*-cadinol (8.6-11.4 %), *α*-bergamotene (7.4-9.2 %), *γ*-cadinene (3.3-5.4 %), germacrene D (1.1-3.3 %) และ camphor (1.1-3.1 %) เป็นต้น<sup>16</sup>

### รายงานทางวิทยาศาสตร์

- 1.ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย: มีรายงานพบว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*<sup>17</sup> และ *S. aureus*<sup>18</sup> เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Shigella flexineri*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* และ *Proteus mirabilis*<sup>18</sup>
- 2.ฤทธิ์ต้านเชื้อรา: น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. albicans*<sup>17</sup>
- 3.ฤทธิ์อื่น ๆ: ฤทธิ์การรักษาอาการท้องผูก<sup>19-21</sup> ฤทธิ์ต้านการอักเสบ<sup>22</sup>

### 1.3 สระระแห่ *Mentha cordifolia* Opiz ex Fresen<sup>4</sup>

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก มีกลิ่นหอม สูง 10-30 เซนติเมตร ลำต้นมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยม ตั้งตรง ใบเดี่ยว ออกเรียงตรงข้ามกัน ใบมีลักษณะเป็นรูปขอบขนานแกมรูปไข่หรือรูปคล้ายโล่ กว้าง 0.5-4.5 เซนติเมตร ยาว 0.75-7.5 เซนติเมตร โคนใบเป็นรูปลิ้นกว้างกลม ตัดหรือหัวใจขึ้น ปลายใบกลม กว้างหรือมน ขอบใบหยักซี่ฟันแกมฟันเลื่อย เนื้อใบหยักย่น ดอกช่อกระจุกออกที่ซอกใบ ดอกย่อยจำนวนมากเรียงตัวหนาแน่น ดอกมีสีม่วงอ่อน กลีบเลี้ยง 5 กลีบเชื่อมติดกันเป็นรูปประฆัง ปลายแยกเป็น 2 ปลายตื้น ๆ กลีบดอกเชื่อม 4 กลีบติดกันปลายแยกเป็น 2 ปาก ขนาดไม่เท่ากัน เกสรเพศผู้ 4 อัน ผลแห้งมีลักษณะเป็นรูปกระสวย ผิวเกลี้ยงเป็นมัน มักจะเป็นมัน<sup>4,5</sup>

#### สรรพคุณตามแผนไทย

ใบ (รสหอมร้อน) แก้ปวดท้อง ขับลมในกระเพาะอาหารและลำไส้ แก้อักเสบคแน่น เพื่อ ขับเหงื่อ แก้อาการเกร็งของกล้ามเนื้อ ทา หรือพอกแก้ปวดบวม ผื่นคัน<sup>6</sup>

#### สารสำคัญ

ทั้งต้นสระระแห่พบสาร cadinene, carvone,  $\rho$ -cymene, limonene,  $\gamma$ -menthol, menthone, neral, ocimene, piperitone,  $\alpha$ -pinene, piperitol, *trans*-carveol, *trans*-carvyl acetate, coumarin, methyl acetate, dihydrocarvone และ  $\beta$ -pinene เป็นต้น<sup>23, 24</sup>

### รายงานทางวิทยาศาสตร์

- 1.ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย: มีรายงานพบว่าสารสกัดจากต้นสระระแห่สามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* ในหนูได้<sup>24, 25</sup>
- 2.ฤทธิ์อื่น ๆ: ฤทธิ์ลดความดันโลหิต<sup>26</sup> ฤทธิ์ต้านการอักเสบ<sup>27</sup>

#### 1.4 โหระพา *Ocimum basilicum* L.<sup>4</sup>

##### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก สูงถึง 1 เมตร ทุกส่วนมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ใบเดี่ยว ออกเรียงตรงข้ามกัน ลักษณะใบเป็นรูปไข่ รูปวงรี หรือรูปไข่แกมวงรี กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 4-6 เซนติเมตร ปลายใบแหลม โคนใบสอบ ขอบใบเรียบหรือหยักฟันเลื่อยห่าง ๆ ผิวใบเกลี้ยงหรือมีขน ก้านใบยาว 1-3 เซนติเมตร ดอกช่อฉัตรออกที่ปลายยอด ยาว 5-25 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นรูประฆัง ปลายแยกเป็นสองปาก กลีบดอกมีสี่ขาว เชื่อมติดกันเป็นหลอด ปลายแยกเป็น 2 ปาก ปากบนมี 4 กลีบ ปากล่าง 1 กลีบยาวกว่าปากบน มีขนสีขาว ผลรูปวงรี ยาวประมาณ 1.5 มิลลิเมตร<sup>4,5</sup>

##### สรรพคุณตามแผนไทย

ใบ (รสเผ็ดปร่าขมหอม) แก้ท้องขึ้นอืดเฟ้อ ช่วยย่อยอาหาร ขับลมในลำไส้ ขับเสมหะ แก้ลมวิงเวียน<sup>6</sup>

ทั้งต้น (รสเผ็ดปร่าขมหอม) แก้หลอดลมอักเสบ แก้พิษตานซาง แก้ใจ แก้พิษฝี<sup>6</sup>

##### สารสำคัญ

ใบ พบสาร alanine, caffeic acid, eriodictyol, eugenol, myrcene, rutin, quercetin,  $\beta$ -sitosterol, thymo ส่วน ลำต้น พบ สาร 1,8-cineol, anethole, apigenin,  $\alpha$ -terpineol, camphor, caryophyllene, citral, citronellol, geranial, geraniol, menthol, methyl eugenol, limonene, luteolin,  $\rho$ -cymene,  $\alpha$ -thujone, rosmarinic-acid, safrole และพบสาร acetic acid, nerolidol ในน้ำมันหอมระเหย เป็นต้น<sup>28,29</sup>

##### รายงานทางวิทยาศาสตร์

- 1.ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย: มีรายงานพบว่าสารในน้ำมันหอมระเหย มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* และ *Bacillus subtilis* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *Pasteurella multocida*<sup>29-32</sup>
- 2.ฤทธิ์ต้านเชื้อรา: สารสกัดด้วย hexane และ methanol มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger* และ *C. albicans*<sup>32</sup>
- 3.ฤทธิ์อื่น ๆ: ฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ<sup>29,32</sup>

## 2. สมุนไพรวงศ์ Piperaceae

สมุนไพรที่นำมาศึกษา ได้แก่

### 2.1 ช้าพลู *Piper sarmentosum* Roxb.<sup>4</sup>

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก ลำต้นทอดคดลานไปตามพื้นดิน สูง 30-80 เซนติเมตร ลำต้นสีเขียว มีไหลงอกเป็นต้นใหม่ มีรากงอกออกตามข้อ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับกัน แผ่นใบบาง ผิวใบเรียบสีเขียวเข้มเป็นมัน ใบมีลักษณะเป็นรูปหัวใจ กว้าง 5-10 เซนติเมตร ยาว 7-15 เซนติเมตร ปลายใบแหลม โคนใบเว้า ดอกออกเป็นช่อที่ซอกใบ มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก ดอกเล็กสีขาวอัดแน่นอยู่บนแกนช่อดอก ดอกแยกเพศ ผลเป็นผลสด ลักษณะกลม อัดแน่นอยู่บนแกน<sup>4,5</sup>

#### สรรพคุณตามแผนไทย

ใบ (รสเผ็ดร้อน) ช่วยในการเจริญอาหาร ขับเสมหะ ทำให้เลือดลมชาน<sup>6</sup>

#### สารสำคัญ

ใบ พบ สาร alkaloids, amind, carotenes, flavoniods, lignans, phenylpropanoids, phenolics, ascorbic acid, tannins, vitamin C, vitamin E และ xanthophylls เป็นต้น<sup>33</sup>

#### รายงานทางวิทยาศาสตร์

- 1.ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย: มีรายงานการศึกษาพบว่าสารสกัดด้วยสาร ethanol จากใบช้าพลูมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อในช่องปากได้ 4 ชนิด คือ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. mutans*, *Lactobacillus* spp. เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*<sup>34</sup>
- 2.ฤทธิ์ต้านเชื้อรา: สารสกัดด้วยสาร ethanol จากใบช้าพลูมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา ได้แก่ *C. albicans* และ *A. niger*<sup>33</sup>
- 3.ฤทธิ์อื่น ๆ: ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย<sup>33</sup>

### 2.2 ดีปลี *Piper chaba* Hunter<sup>4</sup>

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้เถา ไม่มีขนตามลำต้น เมื่อลำต้นแห้งจะมีลักษณะเป็นลายละเอียด ใบเป็นใบเดี่ยว ออกสลับกัน มีลักษณะรูปรีแกมขอบขนาน ปลายใบเรียวแหลม โคนใบเบี้ยว มันคล้ายหนัง เส้นใบออกจากโคนใบ 3-5 เส้น ตอนบนของเส้นใบออกแบบขนนก ดอกออกตรงข้ามใบ เป็นดอกช่อชนิดดอกย่อย ไม่มีก้าน ช่อดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่บนละต้น ผลอัดกันแน่นเป็นช่อ<sup>4,5</sup>



### สรรพคุณตามแผนไทย

ผล (รสเผ็ดร้อนขม) แก้หืด แก้ไอ ขับลมในลำไส้ แก้ลมวิงเวียน แก้หลอดลมอักเสบ แก้โรคนอนไม่หลับ แก้คุณทะราด แก้ท้องร่วง ขับพยาธิ แก้ปวดกล้ามเนื้อ รักษาอาการอักเสบ<sup>6</sup>

### สารสำคัญ

ในผลคือปีลี พบ alkaloids กลุ่ม piperidine เช่น piplatine, piperine, piperanine, piperlonguminine, dehydropiperlonguminine, retrofractamide B, guineensine, N-isobutyl-(2E, 4E)-octadecadienamide, N-isobutyl-(2E, 4E, 14Z)-eicosatrienamide และ Methyl piperate, piperchabamides A-D เป็นต้น<sup>35</sup>

### รายงานทางวิทยาศาสตร์

- 1.ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย: มีรายงานพบว่าสารสกัดด้วย petroleum ether, acetone and ethanol ของดีปีลี มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Streptococcus faecalis* และ *Streptococcus pyogenes* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *Salmonella paratyphi*<sup>36</sup>
- 2.ฤทธิ์ต้านเชื้อรา: สารสกัดด้วย acetone ของดอก (ผล) ดีปีลี สามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา ได้แก่ *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium solani* และ *Rhizoctonia solani*<sup>37</sup>
- 3.ฤทธิ์อื่น ๆ: ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร<sup>35</sup>

## 2.3 พริกไทย *Piper nigrum* L.<sup>4</sup>

### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้เถาเนื้อแข็ง เลื้อยเกาะ งอกรากที่ข้อ ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปวงรี โคนใบมนหรือรูปหัวใจ ปลายใบแหลม กว้าง 5-14 เซนติเมตร ยาว 13-18 เซนติเมตร ดอกช่อเชิงลดออกที่ซอกใบ ไม่มีก้านใบเลี้ยงและกลีบดอก ใบประดับรูปขอบขนานแกมรูปดาบ ผลสดรูปทรงกลม เมื่อสุกจะมีสีแดง<sup>4,5</sup>

### สรรพคุณตามแผนไทย

ผลพริกไทย (รสเผ็ดร้อน) แก้ลมแน่นในท้อง แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้มุตกิด แก้เสมหะเพื่อง แก้มอัมพฤกษ์<sup>6</sup>

## สารสำคัญ

ในผลพริกไทยมี alkaloids กลุ่ม piperidine เช่น piperine, piperidine, piperitine, piperylene, piperolein A, piperolein B และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอื่น ๆ เช่น 2*E*,4*E*,8*Z*-*N*-isobutyleicosatrienamamide; pellitorine; trachyone; pergumidiene; isopiperolein B; pergumidiene; trachyone 3, 4-dihydroxyphenyl ethanol glucoside; 3 และ 4-dihydroxy-6-(*N*-ethylamino benzamide B) เป็นต้น<sup>38, 39</sup>

## รายงานทางวิทยาศาสตร์

- 1.ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย: พบว่าสารสกัดจากผลพริกไทยมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis*, *Bacillus sphaericus* และ *S. aureus* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Klebsiella aerogenes*, *Chromobacterium violaceum*, *E. coli* และ *P. aeruginosa*<sup>38, 40</sup>
- 2.ฤทธิ์ต้านเชื้อรา: พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ด และใบของพริกไทยสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา ได้แก่ *C. albicans* และ *A. niger*<sup>40</sup>
- 3.ฤทธิ์อื่น ๆ: ฤทธิ์ป้องกันการเป็นพิษต่อตับ<sup>41</sup>

## 2.4 พลู่ *Piper betle* L.<sup>4</sup>

### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้เถาเนื้อแข็ง รากงอกตรงบริเวณข้อสำหรับเลื้อยเกาะ ใบเดี่ยวเรียงสลับกัน ใบมีลักษณะเป็นรูปหัวใจ กว้าง 4-10 เซนติเมตร ยาว 10-15 เซนติเมตร ปลายใบแหลม มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ดอกช่อเชิงหลอด อัดแน่นเป็นกระจุกเป็นรูปทรงกระบอกยาว สีขาว ยาว 5-15 เซนติเมตร ไม่มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอก ไม่ค่อยติดผล<sup>4, 5</sup>

### สรรพคุณตามแผนไทย

ใบ (รสเผ็ดเมา) แก้ปวดฟัน แก้รำมะนาด แก้ปากเหม็น ขับลมในลำไส้ แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้ปวดท้อง แก้ท้องเสีย แก้กลาก แก้ น้ำกัดเท้า แก้คัน แก้ลมพิษ แก้การอักเสบของเนื้อเยื่อจมูก และคอ<sup>6</sup>

## สารสำคัญ

น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารกลุ่ม terpenes เช่น 1,8-cineole, cadinene, camphene, caryophyllene, limonene, pinene, chavicol, allyl pyrocatechol, carvacrol, safrole, eugenol, และ phenols เช่น chavibetol<sup>42</sup> เป็นส่วนใหญ่

## รายงานทางวิทยาศาสตร์

### 1. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย:

- พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากใบพลูมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. mutans*<sup>43</sup>
- พบว่าน้ำมันหอมระเหยสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis*, *S. pyrogenes* และ *S. aureus* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *P. aeruginosa*<sup>43, 44</sup>

### 2. ฤทธิ์ต้านเชื้อรา: มีรายงานพบว่าสารสกัดด้วยน้ำและ methanol จากใบพลูสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. albicans* และ *Malassezia pachydermatis*<sup>45</sup>

### 3. ฤทธิ์อื่น ๆ: ฤทธิ์ต่อการหดเกร็งของทางเดินอาหาร ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร<sup>42</sup>

### 3. สมุนไพรวงศ์ Zingiberaceae

สมุนไพรที่นำมาศึกษา ได้แก่

#### 3.1 ขมิ้นชัน *Curcuma longa* L.<sup>4</sup>

##### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน เนื้อในสีเหลืองอมส้ม มีกลิ่นหอม ใบออกเป็นรัศมีติดผิวดิน รูปหอกแกมขอบขนาน ดอกออกเป็นช่อ ใบประดับสีเขียวอ่อนหรือสีขาว รูปหอกเรียงซ้อนกัน ใบประดับ 1 ใบมี 2 ดอก ใบประดับย่อยรูปขอบขนาน ด้านนอกของใบประดับมีขน กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นรูปท่อ มีขน กลีบดอกสีขาว โคนเชื่อมติดกันเป็นท่อยาวปลายแยกเป็น 3 ส่วน เกสรเพศผู้มีลักษณะคล้ายกลีบดอก มีขนอับเรณูอยู่ที่ปลายเกสร ท่อเกสรเพศเมียมีขนาดเล็ก ยาว ยอดเกสรเพศเมียมีลักษณะเป็นรูปปากแตร ผิวเกลี้ยง รังไข่มี 3 ช่อง แต่ละช่องมีไข่อ่อน 2 ใบ<sup>4,5</sup>

##### สรรพคุณตามแผนไทย

เหง้า (รสฝาดหวานเย็น) แก้เสมหะและโลหิต ขับผายลม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้อาหารไม่ย่อย รักษาแผลในกระเพาะอาหาร แก้ท้องร่วง แก้บิด แก้โรคผิวหนัง แก้ท้องร่วง สมานแผล แก้ผื่นคัน<sup>6</sup>

##### สารสำคัญ

เหง้า ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย 3-4 % , สารสีเหลืองเป็นสารจำพวก diferuloyl methane มีชื่อว่า curcumin, monodeamethoxy curcumin และ didesmethoxy curcumin ใน น้ำมันหอมระเหยมีสาร *p*-tolymethyl carbinol ซึ่งมีฤทธิ์ขับน้ำดี<sup>6</sup>

##### รายงานทางวิทยาศาสตร์

1. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย: พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *Enterococcus faecalis* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* และ *Proteus vulgaris*<sup>46, 47</sup>
2. ฤทธิ์ต้านเชื้อรา: น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา ได้แก่ *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* และ *Epidermophyton floccosum*<sup>48, 49</sup>
3. ฤทธิ์อื่น ๆ: ฤทธิ์ขับลม ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ<sup>5</sup>

### 3.2 ขมิ้นอ้อย *Curcuma zedoaria* (Berg) Roscoe<sup>4</sup>

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พืชล้มลุก เหง้าจะลอยขึ้นมาเหนือพื้นดินในขณะที่ถึงหน้าแล้ง ใบแห้งลงหัว ทำให้บางครั้งเรียกว่าขมิ้นหัวขึ้น เนื้อในเหง้าสีอ่อนกว่าขมิ้นชัน<sup>4,5</sup>

#### สรรพคุณตามแผนไทย

เหง้า (รสฝาดหวานเย็น) สมานลำไส้ แก้เลือดลมไหลเวียนไม่สะดวก แก้อักเสบ แก้ก้อนเนื้อก้อนตัว ขับปัสสาวะ แก้พิษโลหิต<sup>6</sup>

#### สารสำคัญ

เหง้า มีน้ำมันหอมระเหย และ curcumin<sup>6</sup>

#### รายงานทางวิทยาศาสตร์

- 1.ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย: มีรายงานการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเหง้าของขมิ้นอ้อยสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ 6 ชนิด คือ เชื้อแบคทีเรียสีแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *Micrococcus luteus* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli*, *Proteus mirabilis* และ *Klebsiella pneumoniae*<sup>50</sup>
- 2.ฤทธิ์ต้านเชื้อรา: สารสกัดจากเหง้าของขมิ้นอ้อยสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา ได้แก่ *C. albicans* และ *A. niger*<sup>50</sup>
- 3.ฤทธิ์อื่น ๆ: ฤทธิ์รักษาโรคท้องร่วง ฤทธิ์รักษาโรคมะเร็ง<sup>51</sup>

### 3.3 ข่า *Alpinia galanga* (L.) Willd.<sup>4</sup>

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พืชล้มลุก เหง้ามีข้อหรือปล้องเห็นได้ชัด เหง้าสีน้ำตาลอมแสด ใบเดี่ยว เรียงสลับกัน แผ่นใบรูปหอกปลายแหลม รูปรี ขอบขนาน ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ โคนใบแหลม เกือบทั้งใบมีขนเล็กน้อย กาบใบหุ้มต้น ดอกออกเป็นช่อ ก้านช่อเกลี้ยง แกนกลางช่อมีขน ดอกขนาดเล็ก ใบประดับรูปไข่ กลีบเลี้ยงสีขาวอมเขียว มีขนโคนเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นหยักมน ๆ กลีบดอกมีโคนเชื่อมติดกันเป็นหลอดสั้น ๆ ปลายแยกเป็น 3 กลีบ มีกลีบบนหนึ่งกลีบ กลีบล่างสองกลีบ บริเวณโคนกลีบดอกชั้นในมีเกสรเพศผู้เทียมเล็ก ๆ 2 อัน เกสรเพศผู้ 1 อัน รูปโค้ง ก้านเกสรแบน อับเรณูยาวประมาณ 6-7 มิลลิเมตร รังไข่ 1 อัน ลักษณะกลมภายในแบ่งเป็น 3 ช่อง มีไข่อ่อนช่องละ 1-2 หน่วย ผลรูปกลมหรือรี สีแดงอมส้ม แก่จัดสีดำ ภายในมี 2-3 เมล็ด<sup>4,5</sup>

### สรรพคุณตามแผนไทย

เหง้า (รสเผ็ดร้อนขม) แก้ปวดท้อง จุกเสียดแน่น ขับลมให้กระจาย แก้บิด แก้พิษ แก้ตกโลหิต แก้ฟกบวม แก้กลากเกลื้อน<sup>6</sup>

### สารสำคัญ

เหง้าแก่ มีน้ำมันหอมระเหยประมาณ 0.04 % ประกอบด้วย methyl-cinnamate 48%, cineol 20-30 % ที่เหลือเป็นการบูร และ *d-pinene*<sup>6</sup>

### รายงานทางวิทยาศาสตร์

- 1.ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย: สารสกัดด้วย methanol, acetone และ diethyl ether จากเหง้าข่ามีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *Streptococcus epidermis* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* และ *S. typhimurium*<sup>52</sup>
- 2.ฤทธิ์ต้านเชื้อรา: พบว่าอนุพันธ์กลุ่มไคเทอร์ปีนจากเหง้าข่ามีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. albicans* โดยมีกลไกออกฤทธิ์ผ่านการย่อยโปรตีนโพลีฟอสเฟตของเชื้อ<sup>53</sup>
- 3.ฤทธิ์อื่นๆ: ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร<sup>5</sup>

### 3.4 ขิง *Zingiber officinale* Roscoe<sup>4</sup>

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พืชล้มลุก มีเหง้าใต้ดินขึ้นเป็นกอ ทางเหนือใหม่ออกทางด้านข้าง เหง้าหรือลำต้นแท้มีลักษณะเป็นข้อ ๆ เนื้อในสีขาวหรือเหลืองอ่อน ปลายสุดของข้อจะเป็นยอดหรือต้นเทียม สูงพ้นพื้นดินขึ้นมา 50-100 เซนติเมตร ลำต้นเทียมมีกาบหรือโคนใบหุ้มใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับกันเป็นสองแถว ใบรูปหอกแกมรี ๆ หลังใบห่อหุ้มเป็นรูปรางน้ำ ปลายใบสอบเรียวแหลม โคนใบสอบแคบและจะเป็นกาบหุ้มลำต้นเทียม ตรงช่วงต่อระหว่างกาบกับตัวใบจะหักโค้งเป็นข้อคอก ดอกสีขาว ออกเป็นช่อรูปเห็ดหรือกระบองซึ่งแทงขึ้นมาจากเหง้า ทุก ๆ ดอกมีกาบสีเขียวปนแดงรูปโค้ง ๆ ห่อรองรับกลีบดอกและกลีบเลี้ยงมีอย่างละ 3 กลีบ อู่มน้ำและหลอดรวงไว้ โคนกลีบดอกมีวนห่อ ส่วนปลายกลีบผายกว้างออก เกสรผู้มี 6 อัน ผลกลมแข็งโต<sup>4,5</sup>

### สรรพคุณตามแผนไทย

เหง้า (รสหวานเผ็ดร้อน) ช่วยขับลม แก้ท้องอืด จุกเสียด แน่นเฟ้อ คลื่นไส้ อาเจียน แก้หอบไอ ขับเสมหะ<sup>6</sup>

## สารสำคัญ

เหง้าแก่ มีสารจำพวก oleo-resin ประกอบด้วย aromatic ketone, zingerone และ shogaol ซึ่งเป็นสารที่ทำให้มีรสเผ็ดกลิ่นหอม นำมากลั่นได้น้ำมันหอมระเหย 1-3 %, แป้ง มากกว่า 50 % ในน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วย sesquiterpene, bisabolene, zingiberene และ zingiberol<sup>6</sup>

## รายงานทางวิทยาศาสตร์

- 1.ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย: มีรายงานพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าจึงสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *P. aeruginosa*<sup>54</sup>
- 2.ฤทธิ์ต้านเชื้อรา: มีรายงานการศึกษาโปรตีนที่สกัดจากเหง้าจึงพบว่ามีคุณสมบัติต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา ได้แก่ *Botrytis cinerea*, *F.oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola* และ *Physalospora piricola*<sup>55</sup>
- 3.ฤทธิ์อื่นๆ: ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านแผลในกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ต้านการอักเสบ<sup>5</sup>

ตารางที่ 1 สรุปผลรายงานการศึกษาการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสมุนไพรในวงศ์  
Lamiaceae, Piperaceae และ Zingiberaceae ทั้ง 12 ชนิด

สมุนไพร	เชื้อแบคทีเรีย		เชื้อรา	ในช่องปาก		
				เชื้อแบคทีเรีย		เชื้อรา
	แกรมบวก	แกรมลบ		แกรมบวก	แกรมลบ	
<b>วงศ์ Lamiaceae:</b>						
1. กะเพรา	- <i>S. aureus</i> - <i>B. pumilus</i>	- <i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>			<i>C. albicans</i>
2. แมงลัก	- <i>S. aureus</i> - <i>B. subtilis</i>	- <i>E. coli</i> - <i>P. multocida</i>	- <i>A. niger</i> - <i>M. mucedo</i> - <i>F. Solani</i> - <i>B. theobromae</i> - <i>R. solani</i>			
3. โหระพา	<i>S. aureus</i>	- <i>E. coli</i> - <i>S. enteritidis</i>	- <i>A. niger</i> - <i>M. mucedo</i> - <i>F. solani</i> - <i>B. theobromae</i> - <i>R. solani</i>			
4. สะระแหน่	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>				
<b>วงศ์ Piperaceae:</b>						
5. ข่าพลู	- <i>S. mutans</i> - <i>Lactobacillus</i> spp.	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>C. albicans</i>	- <i>S. mutans</i> - <i>Lactobacillus</i> spp.	<i>A. actinomycete</i> <i>mcomitans</i>	<i>C. albicans</i>
6. คีปาลี	- <i>S. aureus</i> - <i>S. lutea</i>	- <i>E. coli</i> - <i>P. aeruginosa</i>	- <i>A. niger</i> - <i>A. fumigatus</i> - <i>A. tamari</i> - <i>P. chrysogenum</i>			
7. พริกไทย	- <i>B. subtilis</i> , - <i>B. sphaericus</i> - <i>S. aureus</i>	- <i>K. aerogenes</i> - <i>C. violaceum</i> - <i>P. aeruginosa</i>	- <i>C. albicans</i> - <i>Trichoderma</i> spp. - <i>A. niger</i> - <i>Penicillium</i> spp.			<i>C. albicans</i>
8. พลู	- <i>S. aureus</i> - <i>S. epidermidis</i> - <i>S. mutans</i> - <i>S. pyrogenes</i>	- <i>E. coli</i> - <i>P. aeruginosa</i>	- <i>C. albicans</i> - <i>M. pachydermatis</i>	<i>S. mutans</i>		



## ตารางที่ 1 (ต่อ)

สมุนไพร	เชื้อแบคทีเรีย		เชื้อรา	ในช่องปาก		
				เชื้อแบคทีเรีย		เชื้อรา
	แกรมบวก	แกรมลบ		แกรมบวก	แกรมลบ	
<b>วงศ์ Zingiberaceae:</b>						
9. ขมิ้นชัน	- <i>S. aureus</i>	- <i>P. aeruginosa</i>	- <i>C. neoformans</i>	<i>E. faecalis</i>		
	- <i>S. epidermidis</i>	- <i>S. typhimurium</i>	- <i>A. fumigates</i>			
		- <i>P. vulgaris</i>	- <i>M. gypseum</i>			
	- <i>E. faecalis</i>		- <i>T. mentagrophytes</i>			
			- <i>T. rubrum</i>			
			- <i>E. floccosum</i>			
10. ขมิ้นอ้อย	- <i>B. subtilis</i>	- <i>E. coli</i>	- <i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>		
	- <i>S. aureus</i>	- <i>P. mirabilis</i>	- <i>A. niger</i>			
	- <i>M. luteus</i>	- <i>K. pneumonia</i>				
11. ข่า	- <i>B. subtilis</i>	- <i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	
	- <i>S. aureus</i>	- <i>P. aeruginosa</i>				
	- <i>S. epidermis</i>	- <i>E. aerogene</i>				
	- <i>E. faecalis</i>	- <i>E. cloacae</i>				
		- <i>K. pneumoniae</i>				
		<i>S. typhimurium</i>				
12. จิง	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	- <i>B. cinera</i>	<i>C. albicans</i>		
			- <i>F. oxysporum</i>			
			- <i>M. arachidicola</i>			
			- <i>P. piricola</i>			
			- <i>C. albicans</i>			
			- <i>Trichoderma spp.</i>			
			- <i>A. niger</i>			
			- <i>Penicillium spp.</i>			

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการต้านเชื้อของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในวงศ์ Lamiaceae, Piperaceae และ Zingiberaceae ต่อเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในช่องปากในสภาวะแพลงโทนิค
2. เพื่อศึกษาการต้านเชื้อของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในวงศ์ Lamiaceae, Piperaceae และ Zingiberaceae ต่อเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในช่องปากในสภาวะไบโอฟิล์ม
3. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพที่ดี

## วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 1. การสกัดสารจากสมุนไพร

สมุนไพรที่ศึกษามีทั้งหมด 3 วงศ์ 12 ชนิด โดยซื้อจากตลาดสด ได้แก่ สมุนไพรในวงศ์ Lamiaceae เช่น กะเพรา แมงลัก สะระแหน่ และ โหระพา เป็นต้น สมุนไพรในวงศ์ Piperaceae เช่น ข่าพลู ดีปลี พริกไทย และพลู เป็นต้น และ สมุนไพรในวงศ์ Zingiberaceae เช่น ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย (จากร้านขายยาสมุนไพรในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา) ข่า และขิง เป็นต้น (ตารางที่ 1) โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกสมุนไพร ดังนี้

- สมุนไพรที่คัดเลือกต้องเป็นสมุนไพรไทยพื้นบ้านที่พบบ่อย
- สมุนไพรที่คัดเลือกมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา
- เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณรักษาโรคระบบทางเดินอาหาร
- เป็นสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นอาหารและเครื่องเทศ

นำสมุนไพรมาล้างให้สะอาด สะเด็ดน้ำแห้งแล้วนำมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำสมุนไพรไปอบที่อุณหภูมิ 40-50 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ในตัวทำละลาย 95% ethanol ที่เตรียมไว้ ให้ท่วมสมุนไพร เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำมารอง เอาส่วนที่เป็นสารละลายที่ได้ไประเหย ethanol ออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 °C จะได้ในส่วนของสารสกัดหยาบ และเอาส่วนของกากไปแช่ในตัวทำละลาย ethanol อีกครั้ง ทำเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง รวมสารสกัดทั้งหมดเก็บในภาชนะปิดสนิท กันแสง และรักษาในอุณหภูมิ -20 °C สารสกัดสมุนไพรที่นำไปใช้ทดสอบจะต้องเตรียมเป็นสารละลาย 10 กรัม % (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) โดยทำการละลายด้วย 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถทนได้ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

### 2. วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งภายใต้สภาวะอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม (ตารางที่ 2) จากนั้นใช้ loop และเชื้อที่เป็น โคโลนีเดี่ยว จำนวน 3-5 โคโลนี นำมาใส่ในขวด sterile ขนาด 20 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อภายใต้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับเชื้อนั้น ๆ จากนั้นปรับปริมาณเชื้อให้ได้เชื้อเท่ากับ  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml โดยเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ใช้ทดสอบในการศึกษามีดังนี้

2.1 คัดเลือกตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ 4 ชนิด คือ *S. mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478, *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931 และ *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741

2.2 คัดเลือกตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์อักเสบ 2 ชนิด คือ *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 และ *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586

2.3 คัดเลือกตัวแทนของเชื้อราที่พบบ่อยในช่องปาก 1 ชนิด คือ *C. albicans* ATCC 90028

ตารางที่ 2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด ดังนี้

เชื้อจุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	สภาวะที่เพาะเลี้ยง
<b>เชื้อแบคทีเรีย แกรมลบ:</b>		
- <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Brain heart infusion	anaerobic incubator
- <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	(broth), Brain heart agar เติม 5 % (v/v) blood, 2 % (v/v) hemin	(80 % N <sub>2</sub> , 10 % CO <sub>2</sub> , 10 % H <sub>2</sub> ) 37 °C, 24-48 ชั่วโมง
<b>เชื้อแบคทีเรีย แกรมบวก:</b>		
- <i>Streptococcus mutans</i>	Brain heart infusion	aerobic incubator (candle
- <i>Streptococcus sobrinus</i>	(broth), Blood agar (agar)	jar) 37 °C, 24-48 ชั่วโมง
- <i>Lactobacillus fermentum</i>	de Man Rogosa and Sharpe	anaerobic incubator
- <i>Lactobacillus salivarius</i>	(MRS)	(80 % N <sub>2</sub> , 10 % CO <sub>2</sub> , 10 % H <sub>2</sub> ) 37 °C, 24-48 ชั่วโมง
<b>เชื้อรา:</b>		
- <i>Candida</i> spp.	Sabouraud dextrose broth, Sabouraud dextrose agar	aerobic incubator 37 °C, 24-48 ชั่วโมง

### 3. การทดสอบการต้านเชื้อก่อโรคในช่องปากด้วยสารสกัดจากสมุนไพรไทยในวงศ์ Lamiaceae, Piperaceae และ Zingiberaceae ในสถานะแพลงโทนิค (สถานะที่เชื้ออยู่อย่างอิสระในสารละลาย)

#### 3.1 การทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราของสารสกัดสมุนไพรขึ้นต้นด้วยวิธี agar-well diffusion

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่มีวุ้นเป็นส่วนผสม และปราศจากเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรนำไปต้ม จากนั้นรอกให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50 °C เติมเชื้อที่ต้องการทดสอบที่ความขุ่น 0.5 McFarland จากข้อ 2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว เทอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีวงแหวนโลหะขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตรวางอยู่ รอนจนอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นและแข็งตัว ถอดวงแหวนโลหะออก จะปรากฏหลุมสำหรับเติมสารที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อผสมอยู่ เติมสารที่ต้องการทดสอบและตัวอย่างควบคุม คือ 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) ผสมน้ำกลั่นในสัดส่วนเดียวกับที่ใช้ละลายสารทดสอบ (negative control) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเชื้อด้วยสถานะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบนั้น ทำการทดสอบสารสกัดละ 3 ชั่วโมงในรูบวมของสาร (inhibition zone) ที่ทดสอบ แสดงว่าสารนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่ใช้ทดสอบ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วยไม้บรรทัด (Vernier caliper)

#### 3.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา

ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ หรือค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราสามารถทดสอบได้ด้วยวิธี broth micro dilution assay ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราแบบเหลว เติม 100 ไมโครลิตร ลงใน ถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (round-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate) และเติมสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจาง (two fold dilution) จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:2, 1:4, 1:8, ... ลดลงไปตามลำดับ จากนั้นเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบที่มีความขุ่น 0.5 McFarland ลงในหลุมสารละลายที่เตรียมไว้แล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเชื้อด้วยสถานะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบนั้น หากพบการขุ่นแสดงว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา หลุมที่ใสแสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อรา ซึ่งความเข้มข้นของ

หลุมแรกที่ไม่มีการขุ่น หรือระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด จะรายงานเป็นค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบ

### 3.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา หรือค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

ทำการทดสอบโดยการนำสารสกัดสมุนไพรในแต่ละหลุมของ microtiter plate ข้างต้นตามข้อ 3.2 ไปเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมวุ้น บ่มเชื้อด้วยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบนั้น

\*\*\* ในการทดสอบตามข้อ 3.2 และ 3.3 ต้องมีหลุม positive control (หลุมที่มีเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ) และ negative control (หลุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ) ทำการทดสอบ 3 ครั้ง หลุมแรกที่ไม่พบโคโลนีเชื้อขึ้นรายงานเป็นค่า MBC ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบ

### 3.4 การทดสอบหาผลของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราต่อหน่วยเวลา

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของสารสกัดในขั้นต้น พบว่าสารสกัดจากใบพลูสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราได้ดี ดังนั้นจึงถูกใช้ในการทดสอบนี้ด้วยวิธี time-kill curves assay<sup>56</sup> โดยเริ่มจากการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบปรับความขุ่นที่ OD<sub>600 nm</sub> เท่ากับ 0.02 (ประมาณ 10<sup>6</sup> CFU/ml) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ และเติมสารสกัดจากใบพลูให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1, 2 และ 4 เท่าของ MIC ของเชื้อที่ใช้ทดสอบแต่ละชนิด บ่มเชื้อด้วยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 30 นาที, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 100 ไมโครลิตร นำมาเจือจางแบบ serial 10-fold dilution ด้วย 0.1 โมลาร์ PBS pH 7.0 และนำเชื้อในแต่ละความเข้มข้นมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ก่อนจะนำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสม หลังจากนั้นจึงนำมานับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เกิดขึ้น ใช้ Chlorhexidine ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็น positive control และมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ไม่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพรเป็น negative control ทำการทดสอบ 3 ครั้ง คำนวณค่าของเชื้อที่นับได้ในหน่วย log CFU/ml และเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนเชื้อ (log CFU/ml)

#### 4. การทดสอบการต้านเชื้อก่อโรคในช่องปากด้วยสารสกัดจากไบโพลู ในสถานะไบโอฟิล์ม (สถานะที่เชื้อมีการยึดเกาะกลุ่มกันบนพื้นผิว)

##### 4.1 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (สถานะที่เชื้อมีการยึดเกาะกลุ่มกันบนพื้นผิว) ของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

ทำการทดสอบด้วยวิธี MTT reduction assay<sup>57</sup> ซึ่งเป็นการทดสอบหาเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยเชื้อที่มีชีวิตจะมีกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน และกระบวนการนี้จะสามารถเปลี่ยนผลึกสาร tetrazolium ในสาร MTT ให้กลายเป็นสารสีม่วง formazan ที่ไม่ละลายน้ำได้

ทดสอบโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อราแบบเหลวที่มีการเติม 1% mucin เติม 100 ไมโครลิตร ลงในภาชนะพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม แบบก้นแบน (flat-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate) และเติมสารสกัดจากไบโพลู ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่ดีในการทดลองขั้นต้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจาง (two fold dilution) จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:2, 1:4, 1:8, ... ลดลงไปตามลำดับ จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบปรับความขุ่นที่ OD<sub>600 nm</sub> เท่ากับ 0.02 (ประมาณ 10<sup>6</sup> CFU/ml) ลงในหลุมสารละลายที่เตรียมไว้แล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเชื้อด้วยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบนั้นเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วจึงค่อย ๆ เทสารละลายทิ้ง แล้วล้าง microtiter plate ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ phosphate-buffered saline (PBS) ที่มี pH 7.0 จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมสาร 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid (MTT solution) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดูดสารละลายทิ้ง และเติมสาร 100 % dimethylsulfoxide (DMSO) 100 ไมโครลิตร จากนั้นจึงดูดสารละลายทั้งหมดไปใส่ในภาชนะพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม แบบก้นแบน (flat-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate) อันใหม่ และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Elisa plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (Optical Density : OD<sub>570 nm</sub>)

ค่าที่วัดได้จะเป็นปริมาณเชื้อในไบโอฟิล์มที่รอดชีวิต ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันตามปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต ซึ่งสาร MTT จะทำปฏิกิริยากับสารเมตาบอไลต์ที่ผลิตจากเซลล์ของเชื้อที่มีชีวิต ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ dehydrogenase เช่น NADH และ NADPH จะทำให้สารสีเหลืองของ MTT ตกผลึกกลายเป็นสารสีม่วงของ formazan จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการเติมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (positive control) และมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพรในแต่ละความเข้มข้นเป็น blank control ทำให้ทราบได้ว่าที่ความเข้มข้นเท่าใดที่สารมีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ คำนวณผลการทดลองด้วยสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (A_{570} \text{ of the test} / A_{570} \text{ of non-treated control}) \times 100\%].$$

โดยความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ 50 % และ 90 % รายงานเป็นค่า MBIC<sub>50</sub> and MBIC<sub>90</sub> (minimum biofilm inhibition concentration) ทำการทดสอบ 3 ครั้ง

#### 4.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดสมุนไพรในการทำลายไบโอฟิล์ม (สถานะที่เชื้อมีการยึดเกาะกลุ่มกันบนพื้นผิว) ของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา

สร้างแบบจำลองไบโอฟิล์ม (biofilm model) ของเชื้อ *S. mutans*, *A. actinomycetemcomitans* และ *C. albicans* ในถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมแบบก้นแบน (flat-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate) ซึ่งในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อดังกล่าวต้องใช้เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบปรับความขุ่นที่ OD<sub>600 nm</sub> เท่ากับ 0.02 (ประมาณ 10<sup>6</sup> CFU/ml) เพราะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีการเติม 1% mucin จากนั้นนำไปบ่มที่สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงค่อย ๆ เติสารละลายและเชื้อในสภาวะแพลงทอนที่ไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์มในการยึดเกาะกับผนังของ microtiter plate ได้ทั้ง ทำการล้างเซลล์ที่หลุดออกจากไบโอฟิล์มด้วย PBS pH 7.0 จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมสาร phosphate-buffered saline (PBS) ที่มีสารสกัดจากใบพลูที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 200 ไมโครลิตรลงในหลุม บ่มที่สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด นาน 18-24 ชั่วโมง วัดค่าความสามารถในการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อด้วยวิธี MTT reduction assay<sup>57</sup> ดังกล่าวข้างต้น โดยวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Elisa plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (Optical Density : OD<sub>570 nm</sub>) นำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการเติมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (positive control) และมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพรในแต่ละความเข้มข้นเป็น blank control ทำให้ทราบได้ว่าที่ความเข้มข้นเท่าใดที่สารมีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ คำนวณผลการทดลองด้วยสูตร

$$\% \text{ Eradication} = [1 - (A_{570} \text{ of the test} / A_{570} \text{ of non-treated control}) \times 100\%]$$

โดยความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถกำจัดไบโอฟิล์มได้ 50 % และ 90 % รายงานเป็นค่า MBEC<sub>50</sub> and MBEC<sub>90</sub> (minimum biofilm eradication concentration) ทำการทดสอบ 3 ครั้ง



## 5. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารสกัดจากใบพลูที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อที่ดี

### 5.1 การทดสอบแยกสารองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบพลูด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) และการทดสอบหาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราของสารองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบพลูด้วยวิธี TLC-bioautography

การแยกสารองค์ประกอบ ใช้สารสกัดจากใบพลู (100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) สารมาตรฐาน eugenol (5 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ใน 95 % ethanol) และ 4-chromanol (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน 95 % ethanol) ปริมาตร 5 ไมโครลิตรแต้ม (spotting) ลงบนแผ่น TLC ที่เคลือบด้วย alumina silica gel GF<sub>254</sub> (stationary phase) ขนาด 8 x 2 เซนติเมตร โดยแต้มให้ห่างจากปลายด้านล่างขึ้นมาประมาณ 1 เซนติเมตร นำแผ่นดังกล่าวไปจุ่มลงในภาชนะแก้วแบบปิดที่มีตัวทำละลายใส่ไว้เพียงเล็กน้อยในระดับที่ตัวทำละลายสูงไม่เกินจุดที่แต้มสารตัวอย่าง ตัวทำละลายหรือวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้คือ toluene : ethyl acetate ในอัตราส่วน 90 : 10 คอยสังเกตรอยเปียกของตัวทำละลายที่ซึมขึ้นด้านบนของแผ่น TLC ขอบของรอยเปียกของตัวทำละลายนี้เรียกว่า solvent front เมื่อสารมาเกือบถึงปลายด้านบนของแผ่น (ห่างจากปลายด้านบนของแผ่นลงมา 0.5 เซนติเมตร) ก็ให้รีบเอาแผ่น TLC ออก ทิ้งให้ตัวทำละลายแห้งก่อนนำไปพ่นสเปรย์ด้วย 20 % (w/v) ของสาร phosphomolybdic acid ใน ethanol และนำไปอังความร้อนที่ 105 °C เป็นเวลา 5 นาที คำนวณค่า R<sub>f</sub> (relative front values) ซึ่งเป็นอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่เทียบกับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่<sup>58</sup> หรือสูตร

$$R_f = \text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่} / \text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}$$

ส่วน TLC-bioautography ใช้วิธี agar overlay โดยการวางแผ่น TLC ข้างขึ้น (ไม่ต้องพ่นสเปรย์) ลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้นเป็นส่วนผสมเป็นฐาน (6 มิลลิลิตร) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่มีวุ้นเป็นส่วนผสม และปราศจากเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตรนำไปต้ม จากนั้นรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50 °C เติมน้ำที่ที่ต้องการทดสอบที่ความขุ่น 0.5 McFarland ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว บ่มเชื้อด้วยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบนั้น หากพบวงใสรอบจุดของสาร (inhibition zone) แสดงว่าสารนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อราที่ใช้ทดสอบ<sup>59</sup>

## 5.2 การตรวจวิเคราะห์สารองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากใบพลูด้วยวิธี GC-MS analysis

ตรวจสอบหาสารองค์ประกอบทางเคมีสารสกัดจากใบพลู 100 ไมโครลิตรด้วยเครื่อง gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS, Trace GC Ultra, USA) เครื่องจะทำการตรวจวิเคราะห์โดยแยกสารโดยการบรรจุใน column ชนิด silica capillary (TR-5MS, 0.25 มิลลิเมตร x 30 มิลลิเมตร, ความหนาของแผ่นฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร) อุณหภูมิที่ใช้ตั้งไว้ที่ 70 °C นาน 2 นาที เพิ่มขึ้นจนถึง 250 °C สูงสุดที่ 305 °C ในอัตราส่วน 10 °C ต่อ นาที และคงที่นาน 5 นาที ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นตัวฉีด (อัตราส่วน 10: 1) ใช้ Helium (บริสุทธิ์ 99 %) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที โดยใช้แก๊สเป็นตัวพา (carrier)

สำหรับ MS operation parameter ใช้ electron ionization mode (EI), ion source 70 eV; ion source temperature 250 °C Mass spectra ที่ได้อยู่ในช่วง 35 ถึง 500 amu อัตราการสแกน 2 วินาที การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดโดยใช้ Mass spectra เปรียบเทียบกับ Wiley 9 mass spectral library สามารถคำนวณหาปริมาณสารจาก GC peak areas<sup>60</sup>

## 5.3 การตรวจวิเคราะห์สารองค์ประกอบสารสำคัญทางเคมีในสารสกัดจากใบพลูด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC)

วิเคราะห์สารองค์ประกอบที่สำคัญในสกัดจากใบพลูด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC; Agilent® 1100 series, Palo Alto, CA) โดยวิเคราะห์แบบ isocratic ใช้ injection value loop ที่ 20 ไมโครลิตร และจับสัญญาณด้วย UV-detector สภาวะในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ในอัตราส่วนของ เมทานอล : น้ำ (70 : 30) อัตราการไหล (flow rate) ที่ 0.7 มิลลิลิตร/นาที เวลาในการวิเคราะห์ที่ 20 นาที และใช้คอลัมน์ Apollo C18 (ขนาด 250 มิลลิเมตร x 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร particle size (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL) สารมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ eugenol และ 4-chromanol<sup>61</sup>

## 6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลในเชิงพรรณนา โดยใช้ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการคำนวณข้อมูลที่ได้ในการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

## ผลการดำเนินงานวิจัย

### วัตถุประสงค์ข้อที่ 1

เพื่อศึกษาการต้านเชื้อของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในวงศ์ Lamiaceae, Piperaceae และ Zingiberaceae ต่อเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในช่องปากในสภาวะแผลงโทนิค

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลชีพในชั้นดินของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 12 ชนิดด้วยวิธี agar-well diffusion พบว่าสารสกัดจากใบพลู และสารสกัดจากเหง้าขมิ้นอ้อยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. albicans* ATCC 90028 (ตารางที่ 3 และ ตารางที่ 1 ของภาคผนวก ก และ ข) ในขณะที่การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในชั้นดิน พบว่ามีเพียงสารสกัดจากใบพลูเท่านั้นที่มีฤทธิ์ที่ดีต่อการยับยั้งเชื้อที่ใช้ทดสอบทุกชนิด (ตารางที่ 3 และ ตารางที่ 1 ของภาคผนวก ข และ ค) อีกทั้งยังพบว่าสมุนไพรในวงศ์ Lamiaceae ไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้

ค่า MIC ของสารสกัดจากใบพลูต่อเชื้อราที่ใช้ทดสอบอยู่ในช่วง 1.56 ถึง 3.13 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่า MIC ของสารสกัดจากเหง้าขมิ้นอ้อยต่อเชื้อราที่ใช้ทดสอบอยู่ในช่วง 1.56 ถึง 8.33 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC ของสารสกัดจากใบพลูต่อเชื้อราอยู่ในช่วง 3.13 ถึง 8.33 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ค่า MBC ของสารสกัดจากเหง้าขมิ้นอ้อยต่อเชื้อรามากกว่า 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 2 ของภาคผนวก ก) ส่วนค่า MIC ของสารสกัดจากใบพลูต่อเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วง 1.04 ถึง 4.17 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC ของสารสกัดจากใบพลูต่อเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วง 1.56 ถึง 8.33 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพต่อหน่วยเวลาของสารสกัดจากใบพลู โดยความเข้มข้นที่ 1×MIC, 2×MIC และ 4×MIC สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 ได้ที่เวลา 8, 2 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 1 ของภาคผนวก ก) ความเข้มข้นที่ 1×MIC, 2×MIC และ 4×MIC สามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ได้ที่เวลา 12, 8 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ และสามารถยับยั้งเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 ได้ที่เวลา 6, 2 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 1 ของภาคผนวก ค) ส่วน 0.1 % CHX (positive control) สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ภายใน 30 นาที

ตารางที่ 3 แสดงสารสกัดสมุนไพร, ส่วนที่ใช้ในการทดสอบของสารสกัด และความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

สารสกัดสมุนไพร	ส่วนที่ใช้	ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ <sup>๑</sup>						
		Lf	Ls	Ss	Sm	Aa	Fn	Ca
<b>วงศ์ Lamiaceae:</b>								
กะเพรา	ทั้งต้น	-	n.d.	-	-	-	-	-
แมงลัก	ทั้งต้น	-	n.d.	-	-	-	-	-
สะระแหน่	ใบ	-	n.d.	-	-	-	-	-
โหระพา	ทั้งต้น	-	n.d.	-	-	-	-	-
<b>วงศ์ Piperaceae:</b>								
ข้าวพุลู	ใบ	-	-	-	-	-	++	+
ดีปลี	ผล	-	-	-	-	-	+	+
พริกไทย	ผล	-	-	-	-	-	+	-
พลู	ใบ	++	++	+++	+++	++	+++	+++
<b>วงศ์ Zingiberaceae:</b>								
ขมิ้นชัน	เหง้า	-	-	-	+	-	++	+
ขมิ้นอ้อย	เหง้า	-	-	-	+	-	++	++
ข่า	เหง้า	-	-	-	+	++	++	+
จิง	เหง้า	-	-	+	-	-	++	+

+ , 0 < zone < 10 มิลลิเมตร; ++ , 10 มิลลิเมตร ≤ zone < 20 มิลลิเมตร; +++ , 20 มิลลิเมตร ≤ zone; -, ไม่ปรากฏ inhibition zone

<sup>๑</sup> เชื้อแบคทีเรีย: Lf – *L. fermentum* ATCC 14931; Ls – *L. salivarius* ATCC 11741; Ss – *S. sobrinus* ATCC 33478; Sm – *S. mutans* ATCC 25175; Aa – *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384; Fn – *F. nucleatum* ATCC 25586; CA – *C. albicans*, n.d. – not determined

## วัตถุประสงค์ข้อที่ 2

เพื่อศึกษาการต้านเชื้อของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในวงศ์ Lamiaceae, Piperaceae และ Zingiberaceae ต่อเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในช่องปากในสภาวะไบโอฟิล์ม

ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากใบพลูในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม  $\geq 50\%$  และ  $\geq 90\%$  (MBIC<sub>50</sub> และ MBIC<sub>90</sub>) ต่อเชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 อยู่ที่  $0.78 \pm 0.31$  และ  $3.13 \pm 0.15$  มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 2 ของภาคผนวก ก) ต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 อยู่ที่  $0.39 \pm 0.20$  และ  $1.56 \pm 0.11$  มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 อยู่ที่  $0.10 \pm 0.03$  และ  $0.39 \pm 0.65$  มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 2 ของภาคผนวก ก)

ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากใบพลูในการกำจัดไบโอฟิล์ม  $\geq 50\%$  และ  $\geq 90\%$  (MBEC<sub>50</sub> และ MBEC<sub>90</sub>) ต่อเชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 อยู่ที่  $1.56 \pm 0.44$  และ  $12.5 \pm 0.69$  มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 2 ของภาคผนวก ก) ต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 อยู่ที่  $0.78 \pm 0.11$  และ  $6.25 \pm 0.58$  มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 อยู่ที่  $0.78 \pm 0.34$  และ  $3.13 \pm 0.28$  มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3 ของภาคผนวก ก) ซึ่ง 0.1% CHX สามารถยับยั้งและกำจัดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ 100%

### วัตถุประสงค์ข้อที่ 3

เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อที่ดี

ผลการแยกสารองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบพลูดัวยวิธี TLC ดังรูปที่ 3B ของภาคผนวก ก และรูปที่ 5a ของภาคผนวก ข ซึ่งพบว่าตำแหน่งสารขนาดใหญ่ที่มีค่า  $R_f = 0.38$  เทียบค่า  $R_f$  ได้ในตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐาน 4-chromanol ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 (รูปที่ 3C ของภาคผนวก ก) เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. mutans* ATCC 25175 (รูปที่ 5b ของภาคผนวก ค) และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 (ไม่สามารถถ่ายรูปรูปที่ชัดเจนได้) โดยการทดสอบด้วยวิธี TLC-bioautography และตำแหน่งสารที่มีค่า  $R_f = 0.74$  ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า มีตำแหน่งค่า  $R_f$  ในตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐาน eugenol ซึ่งพบที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ด้วยวิธี TLC-bioautography

ผลการตรวจวิเคราะห์สารองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากใบพลูดัวยวิธี GC-MS analysis ดังตารางที่ 4 และรูปที่ 3A ของภาคผนวก ก เมื่อเทียบกับ Wiley 9 mass spectral library พบว่าในสารสกัดจากใบพลูมีสารองค์ประกอบทางเคมีที่มีปริมาณมาก 2 สาร คือ สาร 4-chromanol (62.33 %) และสาร eugenol (17.10 %)

ผลการตรวจวิเคราะห์สารองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากใบพลูดัวยวิธี HPLC ดังรูปที่ 4 ของภาคผนวก ค เมื่อเทียบกับ peak ของสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดจากใบพลูมี 2 peaks ใหญ่ที่สามารถแยกได้ peak ที่ 1 คือ สาร 4-chromanol แยกที่เวลา  $5.654 \pm 0.04$  นาที และ peak ที่ 2 คือ สาร eugenol แยกที่เวลา  $7.966 \pm 0.09$  นาที

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบพลูด้วย GC-MS

เวลา (min)	ชื่อทางเคมีของสาร	สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล	ปริมาณ (%)
4.61	1,8-Cineole	$C_{10}H_{18}O$	154	0.24
7.51	Chavicol	$C_9H_{10}O$	134	0.82
9.10	Eugenol	$C_{10}H_{12}O_2$	164	17.10
10.45	4-Chromanol	$C_9H_{10}O_2$	150	62.33
10.94	$\delta$ -Cadinene	$C_{15}H_{24}$	204	1.16
12.26	4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene	$C_{13}H_{14}O_4$	234	0.13
15.92	Stearic acid	$C_{18}H_{36}O_2$	284	0.59
17.06	Phytol	$C_{20}H_{40}O$	296	0.75
17.94	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	278	1.30
25.21	$\alpha$ -Tocopherol- $\beta$ -D-mannoside	$C_{35}H_{60}O_7$	592	0.57
27.52	$\beta$ -Sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	414	1.50

## วิจารณ์ผลการวิจัย

เชื้อจุลชีพที่เจริญเติบโตบนผิวเคลือบฟัน และบริเวณร่องเหงือกเป็นสาเหตุในการก่อโรคติดเชื้อในช่องปากที่สำคัญ ได้แก่ โรคฟันผุ และโรคปริทันต์อักเสบ ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากแบคทีเรียในช่องปากที่อาศัยอยู่ในคราบจุลินทรีย์ หรือไบโอฟิล์ม (biofilm)<sup>1-3</sup> โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม pioneer ที่ทำหน้าที่เริ่มต้นในกระบวนการก่อรูปไบโอฟิล์ม เช่น *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis* และ *S. sanguis* เป็นต้น<sup>3, 62</sup> ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเข้ายึดเกาะบนผิวเคลือบฟันที่มีคราบน้ำลาย (pellicle formation) เคลือบอยู่ และเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมบนผิวเคลือบฟัน ทำให้ออกซิเจนบนผิวฟัน หรือร่องเหงือกลดลง เกิดการรีดิวซ์เหมาะแก่การเจริญเติบโตสำหรับเชื้อแบคทีเรียแอนแอโรบส์ เช่น *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* และ *Porphyromonas gingivalis* เป็นต้น มีผลให้เกิดความซับซ้อนของชุมชนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตเต็มที่ ซึ่งชุมชนแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถที่จะหลุดออกจากไบโอฟิล์มกลับมาอยู่ในรูปของแพลงก์ตอนิก (planktonic) ในน้ำลาย และก่อรูปเป็นไบโอฟิล์มในตำแหน่งอื่นได้ใหม่อีกครั้ง ด้วยสาเหตุของโครงสร้างที่ซับซ้อนจึงทำให้เชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มมีคุณสมบัติในการต่อต้าน และภูมิคุ้มกันของร่างกายมากกว่าเชื้อในสภาวะแพลงก์ตอนิก<sup>3, 62, 63</sup>

การรักษาโรคติดเชื้อในช่องปากทางคลินิกนั้นนิยมใช้คลอเฮกซิดีน 0.12 % (chlorhexidine gluconate, CHX) เป็นน้ำยาบ้วนปากสำหรับต้านเชื้อจุลชีพ แต่อย่างไรก็ตามได้มีรายงานพบว่า เมื่อใช้คลอเฮกซิดีนในระยะเวลานานจะมีผลข้างเคียง เช่น การรับรสจะเสียไปในผู้ใช้บางคน เนื่องจากคลอเฮกซิดีนมีรสชาติไม่ดี (ฝืด ขม) มีการหลุดลอกของเยื่อช่องปาก เกิดอาการปวดแสบปวดร้อน เกิดการติดสีที่ตัวฟัน และเนื้อเยื่อในช่องปาก<sup>64, 65</sup> นอกจากนี้ในการรักษาบางครั้งอาจต้องใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นเหตุทำให้ประเทศชาติเสียงบประมาณเป็นจำนวนมากในแต่ละปี และเชื้ออาจต่อต้านยาปฏิชีวนะ ดังนั้นการหาแนวทางใหม่ ๆ ในการรักษาโรคติดเชื้อในช่องปากจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง การใช้สมุนไพรในการบำบัดโรคก็เป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากที่ผ่านมาได้มีการนำมาสุมไพร่พื้นบ้านมาใช้ในการรักษาโรคในช่องปากอย่างมีประสิทธิภาพ ถึงแม้จะยังขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ในการสนับสนุนประสิทธิภาพของสมุนไพรเหล่านั้นก็ตาม

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า สารสกัดจากใบพลูสามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งในสภาวะแพลงก์ตอนิก และสภาวะไบโอฟิล์ม พลูเป็นสมุนไพรในวงศ์ Piperaceae ซึ่งการแพทย์พื้นบ้านในหลาย ๆ ประเทศ โดยเฉพาะประเทศในทวีปเอเชียฝั่งตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย ประเทศมาเลเซีย และประเทศอินเดีย เป็นต้น ได้ใช้ใบพลูรักษาโรคที่หลากหลาย โดยจากรายงานก่อนหน้านี้นี้เกี่ยวกับเภสัชวิทยาของพลู พบว่าพลูมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น *P.*



*aeruginosa* และ *E. coli* เป็นต้น มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา และยีสต์ เช่น *C. albicans*, *Aspergillus flavus* เป็นต้น และฤทธิ์อื่นๆ เช่น การต้านการอักเสบ ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ต่อการหดเกร็งของทางเดินอาหาร เป็นต้น<sup>42, 44, 66</sup>

ผลการต้านเชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 (ตัวแทนของเชื้อราที่ก่อโรค) ในช่องปากด้วยสารสกัดสมุนไพร 12 ชนิดในขั้นต้น พบว่ามีสารสกัดจากใบพลู และสารสกัดจากเหง้าขมิ้นอ้อยสามารถยับยั้งเชื้อในสถานะแพลงทอนิกที่ใช้ในการทดสอบได้ดี แต่ทั้งนี้เมื่อนำสารสกัดทั้ง 2 ชนิดนี้มาทดสอบหาค่า MIC และค่า MFC พบว่าสารสกัดจากใบพลูมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่ใช้ทดสอบทั้ง 11 ชนิดได้ด้วยความเข้มข้นที่ต่ำกว่าสารสกัดจากเหง้าขมิ้นอ้อย (ภาคผนวก ก) ในขณะที่ผลการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเป็นตัวแทนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคฟันผุ และโรคปริทันต์อักเสบด้วยสารสกัดสมุนไพร 12 ชนิด พบว่ามีเพียงสารสกัดจากใบพลูเท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้ทุกชนิด (ภาคผนวก ข) ซึ่งค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราของสารสกัดจากใบพลูอยู่ในช่วง 1.04 ถึง 4.17 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ของสารสกัดจากใบพลูอยู่ในช่วง 1.56 ถึง 8.33 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

อีกทั้งจากผลการทดสอบจะสังเกตได้ว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อสารสกัดจากใบพลูมากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดสามารถผ่านผนังเซลล์ชั้นนอก (inner membrane) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกั้นสารต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เข้าไปภายในเซลล์ได้ อีกทั้งผนังหุ้มเซลล์ชั้นในสุด (inner layer) ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นของ peptidoglycan ที่บางกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก<sup>3</sup> จึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากใบพลูมีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดี และจากการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพในขั้นต้น ยังพบอีกว่าสมุนไพรไทยในวงศ์ Lamiaceae ไม่สามารถต้านเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้ โดยมีความเป็นไปได้ว่าสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้ออาจเป็นสารน้ำมันหอมระเหย ซึ่งถูกระเหยออกไปในขั้นตอนของสกัด สารสกัดของสมุนไพรในวงศ์นี้จึงไม่สามารถแสดงค่าการยับยั้งเชื้อได้

นอกจากนี้ในการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพต่อหน่วยเวลา พบว่าฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพลูต่อการฆ่าเชื้อจุลชีพขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ใช้ และความเข้มข้นของสารสกัด ซึ่งความเข้มข้นที่ 3.13 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถฆ่าเชื้อรา *C. albicans* ATCC 90028 (ตัวแทนของเชื้อรา) และเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 (ตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก) ได้ภายในเวลา 8 ชั่วโมง ขณะที่เชื้อ *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 (ตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ) ใช้ระยะเวลาในการฆ่าเพียง 2 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นเดียวกัน

Deshpande และ Kadam<sup>66</sup> ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ด้วยสารสกัดจากใบพลูที่สกัดด้วย ethanol (MIC = 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสกัดด้วยน้ำ (MIC = 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แต่ไม่มีข้อมูลของการต้านเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม และสารองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารสกัดจากใบพลู ซึ่งผลการศึกษานี้พบว่าค่า MIC ของสารสกัดจากใบพลู (MIC = 1.56 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ต่ำกว่าค่า MIC ของสารสกัดจากใบพลูที่สกัดด้วย ethanol และสกัดด้วยน้ำในการศึกษาของ Deshpande และ Kadam<sup>66</sup> (ภาคผนวก ข) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Himratul-Aznita และคณะ<sup>67</sup> ซึ่งศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพลูที่สกัดด้วยน้ำต่อการยับยั้งเชื้อรา 7 ชนิด ประกอบด้วย *C. albicans* ATCC 14053, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. krusei* ATCC 14243, *C. lusitaniae* ATCC 64125, *C. parapsilosis* ATCC 22019 และ *C. dubliniensis* ATCC MYA-2975 โดยพบว่าสารสกัดจากใบพลูที่สกัดด้วย ethanol ของการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นในการยับยั้ง (MIC) และฆ่า (MFC) เชื้อรา *C. glabrata* ATCC 90030 และ *C. tropicalis* ATCC 13803 ที่ต่ำกว่าสารสกัดด้วยน้ำในการศึกษาของ Himratul-Aznita และคณะ<sup>67</sup>

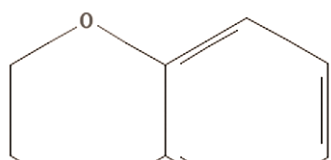
จากรายงานในขั้นต้นจึงสามารถที่จะระบุได้ว่าความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย อาทิ แหล่งเพาะปลูกของสมุนไพร ช่วงระยะเวลาการเก็บเกี่ยว วิธีการสกัด เป็นต้น อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสาร โดยจากการศึกษาทั้งสองนี้พบว่าตัวทำละลาย ethanol มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อที่ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารมีอีกหลายชนิด เช่น chloroform, methanol, acetone เป็นต้น โดยตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความสามารถในการสกัดแยกสารได้ไม่เหมือนกัน จึงต้องศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดที่สกัดตัวทำละลายอื่น ๆ เพิ่มเติมในภายภาคหน้า ทั้งนี้การศึกษาของ Deshpande และ Kadam<sup>66</sup> และการศึกษาของ Himratul-Aznita และคณะ<sup>67</sup> ยังขาดการทดสอบเกี่ยวกับฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง และกำจัดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม รวมทั้งการทดสอบหาสารองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดจากใบพลู

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาผลการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะแพลงโทนิค สารสกัดจากใบพลูแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติการต้านเชื้อรา และแบคทีเรียได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม และการวิเคราะห์หาสารองค์ประกอบทางเคมี จึงใช้สารสกัดจากใบพลูในการทดสอบ

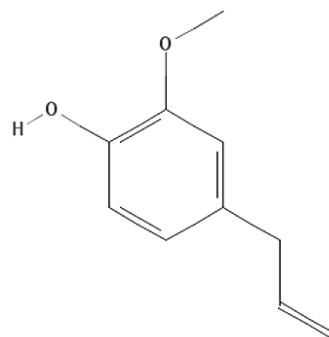
การศึกษานี้ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพลูต่อการต้านเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม ทั้ง *C. albicans* ATCC 90028 (ตัวแทนของเชื้อรา) เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. mutans* ATCC 25175 (ตัวแทนของเชื้อก่อโรคฟันผุ) และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *A.*

*actinomycetemcomitans* ATCC 33384 (ตัวแทนของเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบ) โดยพบว่าสารสกัดจากไบพลูสามารถที่จะยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม และสามารถกำจัดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มที่อายุ 1 วันได้ ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ในการกำจัดไบโอฟิล์ม (MBEC<sub>90</sub>) มีค่าสูงกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (MBIC<sub>90</sub>) ประมาณ 4 ถึง 6 เท่า ซึ่งในการยับยั้งการสร้าง และกำจัดเชื้อราในสภาวะไบโอฟิล์มนั้นจะต้องใช้สารสกัดจากไบพลูที่มีความเข้มข้นสูงกว่าการยับยั้ง และกำจัดเชื้อแบคทีเรียในสภาวะแพลงโทนิคประมาณ 2 ถึง 4 เท่า โดยค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากไบพลูที่ใช้ในการกำจัดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม (MBEC<sub>90</sub>) ได้อย่างครอบคลุมทั้งเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียนั้นต้องใช้ความเข้มข้นที่ประมาณ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อย่างไรก็ตามสารสกัดจากไบพลูแสดงความสามารถในการยับยั้ง และกำจัดเชื้อจุลชีพในสภาวะไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากเชื้อจุลชีพในสภาวะไบโอฟิล์มมีคุณสมบัติในการป้องกันตัวเองจากสารภายนอก และคือต่อสารต้านเชื้อจุลชีพมากกว่าเชื้อในสภาวะแพลงโทนิค<sup>68</sup> ดังนั้นในการศึกษานี้สามารถระบุได้ว่าสารสกัดจากไบพลูมีคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพในสภาวะไบโอฟิล์มที่ดี โดยสามารถที่จะป้องกันการสร้างไบโอฟิล์ม และการกำจัดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม

ส่วนผลการศึกษาในการแยกสารองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากไบพลูด้วยวิธี TLC fingerprinting, GC-MS analysis, HPLC และการหาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจากสารองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากไบพลูด้วยวิธี TLC-bioautography พบว่าสาร 4-chromanol เป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียทั้งสองแกรม เนื่องจากพบว่ารอบวงของสารนั้นมี inhibition zone ในขณะที่สาร eugenol ไม่พบ inhibition zone ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากปริมาณที่น้อยของสาร จึงไม่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อได้ในการศึกษาครั้งนี้ แต่ทั้งนี้มียางานฤทธิ์การต้านเชื้อของสาร eugenol ในรายงานก่อน ๆ<sup>69-71</sup>



รูปที่ 1 โครงสร้างของสาร 4-chromanol<sup>72</sup>



รูปที่ 2 โครงสร้างของสาร eugenol<sup>73</sup>

การศึกษาแยกสารองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบพลูในอดีต ไม่พบว่า สาร 4-chromanol เป็นองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบพลู<sup>42, 44, 74, 75</sup> ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจาก library ที่ใช้อ้างอิงสารองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จาก GC-MS analysis แตกต่างกัน จึงทำให้ได้ผลการวิเคราะห์สารที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามผลการศึกษา<sup>66</sup> ได้สนับสนุนผลการศึกษาของ Deshpande และ Kadam<sup>66</sup> ซึ่งพบว่าสารสกัดจากใบพลูที่สกัดด้วย ethanol มีสาร 4-chromanol เป็นองค์ประกอบ แต่มีความแตกต่างกันในปริมาณสัดส่วนของสารที่ได้พบ โดยการศึกษา<sup>66</sup> ได้พบสาร 4-chromanol เป็นองค์ประกอบหลัก (62.33 %) ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าการศึกษาของ Deshpande และ Kadam<sup>66</sup> โดยอาจจะมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น สภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะปลูก ทั้งภูมิประเทศและภูมิอากาศ ระยะเวลาในการเพาะปลูกและเก็บเกี่ยวสมุนไพร และการเก็บรักษาสมุนไพรก่อนการสกัด เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการพบสารองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย และสารสกัดจากสมุนไพรที่มาจากแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกัน ให้ปริมาณของสารองค์ประกอบทางเคมีที่พบเหมือนกันมีปริมาณสัดส่วนความแตกต่างกันด้วย อีกทั้งการศึกษาของ Deshpande และ Kadam<sup>66</sup> ได้ทดสอบเพียงการแยกสารองค์ประกอบทางเคมี มิได้ทดสอบถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสารองค์ประกอบแต่ละชนิด จึงมีความเป็นไปได้ว่า สาร 4-chromanol อาจจะนำมาใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปากในกายภาคหน้าได้

## สรุปผลการวิจัย

การศึกษาผลการต้านจุลชีพของสมุนไพรไทยในวงศ์ Lamiaceae, Piperaceae และ Zingiberaceae ต่อเชื้อก่อโรคในช่องปาก พบว่าสารสกัดจากใบพลู (วงศ์ Piperaceae) สามารถต้านเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นตัวแทนของเชื้อก่อโรคในช่องปากได้ทั้งในสภาวะແພລงโทนิค และสภาวะไบโอฟิล์ม ในขณะที่สมุนไพรในวงศ์ Lamiaceae ไม่สามารถแสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบได้ อาจเป็นผลมาจากสารองค์ประกอบทางเคมีในสมุนไพรของวงศ์นี้ส่วนใหญ่เป็นสารน้ำมันหอมระเหย จึงทำให้ไม่สามารถต้านเชื้อจุลชีพได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะนำเอาสารสกัดจากใบพลูมาใช้ในการทดสอบ โดยพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการต้านเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียต้องใช้ในระดับความเข้มข้น 12.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จึงสามารถที่จะต้านเชื้อได้ในทั้งสองสภาวะได้อย่างครอบคลุม และจากการศึกษาสารองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบพลู พบว่าสาร 4-chromanol ซึ่งเป็นสารที่มีปริมาณมากสุดในสารสกัดจากใบพลู (62.33 %) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียได้ด้วยวิธี TLC-bioautography อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของการวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาฤทธิ์ขั้นต้นในการต้านเชื้อของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อตัวแทนซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในช่องปากเท่านั้น ยังมีได้ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อก่อโรคในช่องปากทางคลินิก ฉะนั้นการศึกษาในอนาคตควรจะทำการศึกษาทดสอบถึงฤทธิ์ และกลไกการต้านเชื้อก่อโรคในช่องปากของสารสกัดจากใบพลู และสาร 4-chromanol โดยละเอียด รวมทั้งศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่แตกต่างกันด้วย ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ตัวทำละลายชนิดอื่นสามารถใช้ในการสกัดสาร ได้ดีกว่าตัวทำละลาย ethanol ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้

### บรรณานุกรม

1. Liljemark WF and Bloomquist C. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996; 7(2): 180-198.
2. จินตกร คุ้มสนสุชาติ. จุลชีววิทยาช่องปากและที่มีของโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และโรคในช่องปาก. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2542 หน้า 1-4.
3. รวี เกียรติไพศาล. แบคทีเรียและโรคติดเชื้อที่พบบ่อยในช่องปาก. สงขลา: ไอคิว มีเดีย; 2552.
4. หน่วยบริการฐานข้อมูลสมุนไพร สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร Medplant. กรุงเทพมหานคร [อัปเดตเมื่อ 4 มิถุนายน 2557; เข้าถึงเมื่อ 12 มิถุนายน 2557]. เข้าถึงจาก : <http://www.medplant.mahidol.ac.th/index.asp>.
5. ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ และศูนย์สมุนไพรทักษิณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2551.
6. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. สารานุกรมสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์; 2550.
7. Pattanayak P, Behera P, Das D and Panda SK. *Ocimum sanctum* Linn. A reservoir plant for therapeutic applications: An overview. *Pharmacogn Rev* 2010; 4(7): 95-105.
8. Rahman S, Islam R, Kamruzzaman M, Alam K and Jamal AHM. *Ocimum sanctum* L.: A review of phytochemical and pharmacological profile. *Am J Drug Discov Dev* 2011; 1-15.
9. Geeta R, Vasudevan DM, Kedlaya R, Deepa S and Ballal M. Activity of *Ocimum sanctum* (the traditional Indian medicinal plant) against the enteric pathogens. *Indian J Med Sci* 2001; 55(8): 434-438.
10. Singh S, Malhotra M and Majumdar DK. Antibacterial activity of *Ocimum sanctum* L. fixed oil. *Indian J Exp Biol* 2005; 43(9): 835-837.
11. Dharmani P, Kuchibhotla VK, Maurya R, Srivastava S, Sharma S and Palit G. Evaluation of anti-ulcerogenic and ulcer-healing properties of *Ocimum sanctum* Linn. *J Ethnopharmacol* 2004; 93(2-3): 197-206.
12. Godhwani S, Godhwani JL and Vyas DS. *Ocimum sanctum*: An experimental study evaluating its anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity in animal. *J Ethnopharmacol* 1987; 21(2): 153-163.

13. Singh S, Majumdar DK and Rehan HMS. Evaluation of anti-inflammatory potential of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holy basil) and its possible mechanism of action. *J Ethnopharmacol* 1996; 54(1): 19-26.
14. Agrawal P, Rai V and Singh RB. Randomized placebo-controlled, single blind trial of holy basil leaves in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1996; 34(9): 406-409.
15. Shetty S, Udupa S, Udupa L and Somayaji N. Wound healing activity of *Ocimum sanctum* Linn with supportive role of antioxidant enzymes. *Indian J Physiol Pharmacol* 2006; 50(2): 163-168.
16. Pisutthanan N and Pisutthanan S. Variability of essential oil constituents of *Ocimum africanum*. *Naresuan University Journal* 2009; 17(3): 269-274.
17. Thaweboon S and Thaweboon B. In vitro antimicrobial activity of *Ocimum americanum* L. essential oil against oral microorganisms. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40(5): 1025-1033.
18. Nakamura CV, Ueda-Nakamura T, Bando E, Melo AF, Cortez DA and Dias FBP. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94(5): 675-678.
19. Taesotikul W, Smitasiri Y and Pootakham K. Studies of hairy basil seeds as bulk laxative II: Laxative activity and toxicity studied. The 4<sup>th</sup> Princess Chulabhorn International Science Congress Chemicals in the 21<sup>th</sup> century; 1999 Nov 28- Dec 2; Bangkok, Thailand; 1999.
20. Sriratanaban A, Poshyachinda M, Tankeyoon M and Ratanavararak M. *Ocimum americanum* Linn. study of its laxative properties. *Chula Med J* 1992; 36(3): 201-206.
21. Muangman V, Siripraiwan S, Ratanaolarn K, Rojanaphanthu P and Shaipanich C. A clinical trial of *Ocimum canum* Sims seeds as a bulk laxative in elderly post-operative patients. *Ramathibodi Med J* 1985; 8(4): 154-158.
22. Yamada AN, Grespan R, Yamada ÁT, Silva EL, Silva-Filho SE, Damião MJ, et al. Anti-inflammatory activity of *Ocimum americanum* L. essential oil in experimental model of zymosan-induced arthritis. *Am J Chin Med*. 2013; 41(4): 913-926.
23. นันทวัน บุญยะประภัสร์และ อรณัฐ โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน เล่ม 4. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ประชาชน; 2539 หน้า 565-566.

24. Punopas K. The study of antibacterial activity of some medicinal plants in Lamiaceae family [dissertation]. Nakhon Ratchasima: Suranaree University of Technology; 2002.
25. อัญชัญ ชุณหะหิรัณย์และ อติศักดิ์ เอกโสภาวรรณ. การประเมินสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ของของเหลวที่ได้จากใบสะระแหน่: Evaluation of the Antimicrobial Activity of the Extract from Saranae Leaf (*Mentha cordifolia* Opiz). กรุงเทพมหานคร; 2545.
26. Pakdeechote P, achaney P, Berkban W, Kukongviriyapan U, Kukongviriyapan V, Khrisanapant W, et al. Vascular and antioxidant effects of an aqueous *Mentha cordifolia* extract in experimental *N(G)*-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. *Z Naturforsch C*. 2014; 69(1-2): 35-45.
27. Tuntupopipat S, Muangnoi C and Failla ML. Anti-inflammatory activities of extracts of Thai spices and herbs with lipopolysaccharide-activated raw 264.6 murine macrophages. *J Med Food* 2009; 12(6): 1213-1220.
28. นันทวัน บุญยะประภัศรและ อรรณูช โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน เล่ม 5. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ประชาชน; 2539: หน้า 282-291.
29. Bilal A, Jahan N, Ahmed A, Bilal SN, Habib S and Hajra S. Phytochemical and pharmacokogical studies on *Ocimum basilicum* Linn-A Review. *Int J Cur Res Rev* 2012; 4(23): 73-83.
30. Hussain AI, Anwar F, Hussain Sherazi ST and Przybylski R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem* 2008; 108(3): 986-995.
31. Moghaddam AMD, Shayegh J, Mikaili P and Sharaf JD. Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria. *J Med Plants Res* 2011; 5(15): 3453-3456.
32. Issazadeh K, Pahlaviani RMK, Massiha A, Bidarigh S, Giahi M and Muradov PZ. Analysis of the phytochemical contents and anti-microbial activity of *Ocimum basilicum* L. *Int J Molecular Clin Microbiol* 2012; 2(1): 141-147.
33. Seyyedani A, Yahya F, Kamarolzaman MF, Suhaili Z, Mohd-Desa MN, Hussain MK, et al. Review on the ethnomedicinal, phytochemical properties of *Piper sarmentosum*: scientific justification of its traditional use. *Int J Genuine Traditional Med* 2013; 3(3): 1-32.



34. Taweechaisupapong S, Singhara S, Lertsatitthanakorn P and Khunkitti W. Antimicrobial effects of *Boesenbergia pandurata* and *Piper sarmentosum* leaf extracts on planktonic cells and biofilm of oral pathogens. ***Pak J Pharm Sci*** 2010; 23(2): 224-231.
35. Morika T, Matsuda H, Yamagushi I, Pongpiriyadacha Y and Yoshikawa M. New amides and gastroprotective constituents from the fruit of *Piper chaba*. ***Planta Med*** 2004; 70(2): 152-159.
36. Sindhu S, Manorama S and Alfamol PM. Priliminary phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Piper longum* L. (Piperaceae). ***Mintage J Pharmaceutical & Medical Sciences*** 2013; 2(1): 21-23.
37. Rahman A, Al-Reza SM and Kang SC. Antifungal activity of essential oil and extracts of *Piper chaba* Hunter against phytopathogenic fungi. ***J Am Oil Chem Soc*** 2011; 88(4): 573-579.
38. Reddy SV, Srinivas PV, Praveen B, Kishore KH, Raju BC, Murthy US, et al. Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. ***Phytomedicine*** 2004; 11(7-8): 697-700.
39. Singh G, Marimuthu P, Catalan C and Delampasona MP. Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. ***J Sci Food Agr*** 2004; 84(14): 1878-1884.
40. Ertürk Ö. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. ***Biologia*** 2006; 61(3): 275-278.
41. Koul IB and Kapil A. Evaluation of the liver protective potential of piperine, an active principle of black and long peppers. ***Planta Med*** 1993; 59(5): 413-417.
42. Nagori K, Singh MK, Alexander A, Kumar T, Dewangan D, Badwaik H, et al. *Piper betle*: A review on its ethnobotany, phytochemistry, pharmacological profile and profiling by new hyphenated technique DART-MS (Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry). ***J Pharmacy Res*** 2011; 4(9): 2991-2997.
43. Nalina T and Rahim Z. The crude aqueous extract of *Piper betle* L. and its antibacterial effect towards. ***Am J Biochem Biotechnol*** 2007; 3(1): 10-15.
44. Arambewela L, Kumaratunga KGA and Dias K. Studies on *Piper betle* of Sri-lanka. ***J Natl Sci Found*** 2005; 33(2): 133-139.
45. Chiung-Lin HC. The antimicrobial activity, mosquito larvicidal activity, antioxidant property and tyrosinase inhibition of *Piper betle*. ***J Chin Chem Soc*** 2009; 56(3): 653-658.

46. Singh R, Chandra R, Bose M and Luthra PM. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract of pathogenic bacteria. *Curr Sci* 2002; 83(6): 737-740.
47. Allawi SS, Auda JM, Hameed HQ and Ali TI. The effect of *Curcuma longa* (Turmeric) rhizomes extracts on pathogenic bacteria In comparison with standard antibiotics. *J Biotechnol Res Center* 2009; 3(1): 15-20.
48. Apisariyakul A, Vanittanakom N and Buddhasukh D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *J Ethnopharmacol* 1995; 49(3): 163-169.
49. Wuthi-udomlert M, Grisanapan W, Luanratana O and Caichompoo W. Antifungal activity of *Curcuma longa* grown in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31(1): 178-182.
50. Wilson B, Abraham G, Manju VS, Mathew M, Vimala B, Sundaresan S, et al. Antimicrobial activity of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma malabarica* tubers. *J Ethnopharmacol* 2005; 99(1): 147-151.
51. Lobo R, Prabhu KS, Shirwaikar A and Shirwaikar A. *Curcuma zedoaria* Rosc. (white turmeric): a review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61(1): 13-21.
52. Rao K, Ch B, Narasu LM and Giri A. Antibacterial activity of *Alpinia galanga* (L) Willd crude extracts. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 162(3): 871-884.
53. Haraguchi H, Kuwata Y, Inada K, Shingu K, Miyahara K, Nagao M, et al. Antifungal activity from *Alpinia galanga* and the competition for incorporation of unsaturated fatty acids in cell growth. *Planta Med* 1996; 62(4): 308-313.
54. Sasidharan I and Menon AN. Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh & dry ginger oils (*Zingiber officinale* ROSCOE). *Int J Curr Pharma Res* 2010; 2(4): 40-43.
55. Wang H and Ng TB. An antifungal protein from ginger rhizomes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336(1): 100-104.
56. Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH and Pfaller MA. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(6): 1392-1395.

57. Tang HJ, Chen CC, Ko WC, Yu WL, Chiang SR and Chuang YC. In vitro efficacy of antimicrobial agents against high-inoculum or biofilm embedded methicillin-resistant *S. aureus* with vancomycin minimal inhibitory concentrations equal to 2 µg/ml (VA2-MRSA). ***Int J Antimicrob Agents*** 2011; 38(1): 46-51.
58. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. Thai Herbal Pharmacopoeia volume II. Office of Notional Buddhism Press: Bangkok; 2007. p. 63-70.
59. Rahalison L, Hamburger MO, Hostettmann K, Hostettmann K, Monod M and Frenk E. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. ***Phytochem Anal*** 1991; 2(5): 199-208.
60. Annegowda HV, Tan PY, Mordi MN, Ramanathan S, Hamdan MR, Sulaiman MH, et al. TLC–bioautography-guided isolation, HPTLC and GC–MS-assisted analysis of bioactives of *Piper betle* leaf extract obtained from various extraction techniques: in vitro evaluation of phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities. ***Food Anal Methods*** 2013; 6(3): 715-726.
61. Singtongratana N, Vadhanasin S and Singkhonrat J. Hydroxychavicol and Eugenol Profiling of Betel Leaves from *Piper betle* L. Obtained by Liquid-Liquid Extraction and Supercritical Fluid Extraction. ***Kasetsart Journal (Natural Science)***. 2013; 47(4): 614-623.
62. Nishihara T and Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. ***Periodontology 2000*** 2004; 36: 14-26.
63. Nield-Gehrig JS. Dental Plaque Biofilms. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
64. Flötra L, Gjerme P, Rölla G and Waerhaug J. Side effect of chlorhexidine mouthwashes. ***Eur J Oral Sci*** 1971; 79(2): 119-125.
65. Addy M and Moran J. Mechanisms of stain formation on teeth, in particular associated with metal ions and antiseptics. ***Adv Dent Res*** 1995; 9(4): 450-456.
66. Deshpande SN and Kadam DG. GCMS analysis and antibacterial activity of *Piper betle* (Linn) leaves against *Stroptococcus mutans*. ***Asian J Pharm Clin Res*** 2013; 6(5): 99-101.
67. Himratul-Aznita WH, Mohd-Al-Faisal N and Fathilah AR. Determination of the percentage inhibition of diameter growth (PIDG) of *Piper betle* crude aqueous extract against oral *Candida* species. ***J Med Plants Res*** 2011; 5(6): 878-884.

68. Donlan R.M and Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2): 167-193.
69. Ali SM, Khan AA, Ahmed I, Musaddiq M, Ahmed KS, Polasa H, et al. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005; 4: 20.
70. Oliveira PF, Mendes JM and Oliveira LE. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. *Med Mycol* 2013; 51(5): 507-513.
71. Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R and Pandian SK. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J Ethnopharmacol* 2010; 130(1): 107-115.
72. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> [website on the Internet]. US: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine [updated 2009 Oct 28; cited 2014 Sep 7]. Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=92890>.
73. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> [website on the Internet]. US: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine [updated 2009 Oct 28; cited 2014 Sep 7]. Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3314>.
74. Pradhan D, Suri KA, Pradhan DK and Biswasroy P. Golden Heart of the nature: *Piper bettle* L. *J Pharmacogn Phytochem* 2013; 1(6): 147-167.
75. Prakash B, Shukla R, Singh P, Kumar A, Mishra PK and Dubey NK. Efficacy of chemically characterized *Piper bettle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *Int J Food Microbiol* 2010; 142(1-2): 114-119.

ภาคผนวก

### ภาคผนวก ก

บทความวิจัยที่ส่งตีพิมพ์ในวารสาร Tropical Journal of Pharmaceutical Research,  
Pharmacotherapy Group, Faculty of Pharmacy, University of Benin, Benin City, Nigeria.

Kawsud P, Puripattanavong J and Teanpaisan R. Screening for anticandidal and  
antibiofilm activity of herbs in Thailand. *Trop J Pharm Res*. In press 2014.

## **Screening for Anticandidal and Antibiofilm Activity of Herbs in Thailand**

Pajaree Kawsud<sup>1</sup>, Jindaporn Puripattanavong<sup>2</sup> and Rawee Teanpaisan<sup>1\*</sup>

*<sup>1</sup>Common Oral Diseases and Epidemiology Research Center and the Department of Stomatology, Faculty of Dentistry,*

*<sup>2</sup>Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, 90112, Thailand*

***Running title:*** *Anticandida and antibiofilm of some herbal extracts*

***\*For correspondence***

***Email:*** *rawee.t@psu.ac.th; Tel:* +66 74 429878; ***Fax:*** +66 74 212922

## ABSTRACT

**Purpose:** *To evaluate the anticandidal activity of the ethanol extracts of 12 herbs from Thailand.*

**Methods:** *The herbs studied were Alpinia galanga, Curcuma longa, Curcuma zedoaria, Mentha cordifolia, Ocimum africanum, Ocimum basilicum, Ocimum sanctum, Piper betle, Piper chaba, Piper nigrum, Piper sarmentosum and Zingiber officinale. Various Candida spp. were examined for minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) using microdilution method; time-kill assay was also used to assess the plants. Antibiofilm activity was investigated using a 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide (MTT assay). Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis, thin layer chromatography (TLC) fingerprinting and TLC-bioautography were used to determine the active anticandidal compound.*

**Results:** *All tested herbs, except extracts of P. nigrum and Limiaceae family, showed different inhibited zone against Candida albicans ATCC 90028. P. betle revealed the strongest anticandidal activity against all tested strains with MIC ranging from 1.56 to 3.13 mg/ml, and MFC from 3.13 to 8.33 mg/ml. Killing activity depended on time and concentrations of the extract. The concentration of P. betle extract required to inhibit  $\geq 90\%$  biofilm formation of C. albicans ATCC 90028 was  $3.13 \pm 0.15$  mg/ml, while that to remove  $\geq 90\%$  biofilm growth was  $12.50 \pm 0.69$  mg/ml. The result of GC-MS chromatogram showed the major compound of P. betle extract as the 4-chromanol, which responded for the anticandidal activity*



**Conclusion:** *P. betle* extract contains 4-chromanol which is a good anticandidal agent that could be used for the treatment of oral infectious diseases caused by certain *Candida* spp.

**Keywords:** *Piper betle*, 4-Chromanol, Anticandida, Biofilm, Candidiasis

## INTRODUCTION

The genus *Candida* contains more than 150 species, however, only a limited number of these species regularly cause diseases in humans [1]. *Candida* species belong to the normal microbiota of human mucosal surfaces including the oral cavity. There has been a significant increase in incidence of oral candidiasis due to higher numbers of immunocompromised patients, the use of dental devices and the use of broad spectrum antifungal drugs. *Candida albicans* is the main cause of oral candidiasis, however, non-*C. albicans* (NCAC) species such as *Candida glabrata*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis* are now frequently reported as human pathogens [2].

The pathogenesis of oral candidiasis is facilitated by a number of factors including the ability to adhere to medical devices and/or host cells, and to form biofilm. Biofilm formation is an important virulence factor for a number of *Candida* species as it confers significant resistance to antifungal therapy by limiting their penetration through the matrix and protecting cells from host immune responses [3]. It has been demonstrated that biofilms formed by *C. albicans* and/or NCAC strains have been associated with high morbidity and mortality rates [4].

Chlorhexidine (CHX) has been used as an adjunctive therapeutic option for topical use owing to its broad-spectrum antimicrobial efficacy in oral candidiasis. However, it has been known to have side effects with prolonged use [5,6].

Natural products have increasingly received attentions due to their antimicrobial activity against a wide range of human pathogens. Few studies

have reported anticandidal activity from various herbs [7,8]. In addition, the information on their active compounds is scarce. The aim of this study was to evaluate of the ethanolic extracts of 12 herbs, which are traditionally used in Thai folk medicine against various *Candida* spp. The phytochemical profile of the most effective extract was also investigated.

## **EXPERIMENTAL**

### **Preparation of medicinal herb extracts**

Twelve herbs included in this study were purchased from the local market, and their details are shown in Table 1. The herbs were identified by Dr. Supreeya Yuenyongsawad; Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand, where voucher specimens (Table 1) were deposited in the herbarium. The dried plants were macerated with ethanol for 3 days and then filtered through Whatman no. 4 filter paper. The filtrate, each case, was concentrated using a rotary evaporator at 40 °C and kept at -20 °C. A 10 % (w/v) stock solution in 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) of each extract was used in this study.

### ***Candida* strains and growth conditions**

A total of eleven *Candida* spp. were tested, and the details of strains used shown in Table 2. In this study, all tested strains were cultured on Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) or Sabouraud Dextrose broth (SDB; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) at 37 °C for 24 h.

## **Antifungal assay**

### ***Agar diffusion test***

A 100  $\mu$ l of inoculum ( $10^7$  cfu/ml) was mixed with 20 ml of warm SDA, and poured into the plate with a 6 mm diameter metal cup. After solidifying the SDA, the metal cups were removed and the well filled with 100  $\mu$ l of each extract. A 10 % DMSO was included as control. Inhibitory activity was determined by measuring the diameter of the inhibited zone. All tests were performed in triplicates.

### ***Broth microdilution test***

Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were determined using the broth microdilution method of the Clinical and Laboratory Standards Institute [9]. Each extract was subjected to a two-fold serial dilutions in the SDB to obtain concentrations from 0.02 mg/ml to 25 mg/ml at a total volume of 100  $\mu$ l per well in 96-well plate, and 100  $\mu$ l of each tested strain ( $1 \times 10^3$  cfu/ml) was added. The medium as well as 0.1 % CHX and 10 % DMSO were used as blank, positive control and non-treated control, respectively.

MIC was defined as the lowest concentration of the extract that showed no detectable growth. MFC was defined as the lowest concentration of wells that did not grow when 10  $\mu$ l of the well contents was plated on agar. All experiments were repeated thrice in duplicates.

### **Time-kill assay**

As the screening of extracts revealed that *P. betle* extract gave the strongest anticandidal activity, it was used for the time-kill assay [10]. Growing culture

( $10^6$  cfu/ml) of representative *C. albicans* ATCC 90028 was added to SDB and exposed to 1, 2 and 4 × the MIC of extract, and extract free medium was used as growth control. Samples were removed for colony counts at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, and 24 h. The viable counts were determined using the serial dilution method after incubation. The procedure was repeated in triplicate, and the  $\log_{10}$  cfu/ml was plotted against time. A 0.1 % CHX was used as positive control. All assays were carried out in triplicates.

### **Antibiofilm assay**

#### ***Inhibition of biofilm formation***

The effect of *P. betle* extract on biofilm formation of representative *C. albicans* ATCC 90028 was examined using the modified microdilution method [11]. Two-fold serial dilutions of extract and a cell suspension of the tested strain were prepared as described in the MIC assay. A 0.1 % CHX was used as the positive control. The phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.0 and the medium alone were used as the non-treated and blank controls, respectively. After overnight incubation, supernatants were discarded and washed 3 times with PBS. Biofilm formation was quantified using a 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide (MTT; *Sigma-Aldrich*, St Louis, MO, USA) assay. The numbers of surviving *Candida* were determined by measuring their ability to reduce the yellow tetrazolium salt to a purple formazan product at OD 570 nm. Percentage inhibition was calculated by an equation  $[1 - (A_{570} \text{ of the test} / A_{570} \text{ of non-treated control}) \times 100]$ . The biofilm inhibition concentration (MBIC<sub>50</sub> and MBIC<sub>90</sub>) was defined as the

concentrations that showed 50 % and 90 % inhibition of biofilm formation. All experiments were repeated thrice in duplicates [11].

### ***Eradication of biofilm formation***

The eradication of biofilm was also examined using minimum biofilm eradication concentration (MBEC) assay. A 200  $\mu$ l ( $10^3$  cfu/ml) aliquot of *C. albicans* ATCC 90028 was inoculated into 96-well plates to form biofilm overnight. The biofilm was washed 3 times with PBS. The biofilm was exposed to a 200  $\mu$ l of various concentrations of extract ranged from 0.02 mg/ml to 25 mg/ml. The numbers of surviving *Candida* were determined using MTT assay at OD 570 nm. Percentage eradication was calculated by an equation  $[1 - (A_{570} \text{ of the test} / A_{570} \text{ of non-treated control}) \times 100]$ . MBEC value was defined as the concentrations that showed 50 and 90 % eradication of biofilm formation. The medium alone, 0.1 % CHX and PBS were used as the blank control, positive and non-treated, respectively. All experiments were repeated thrice in duplicate [11].

### **GC-MS analysis of phytoconstituents in *P. betle* extract**

One microliter of *P. betle* extract was investigated for its phytoconstituents using gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS, Trace GC Ultra, USA), the TR-5MS capillary column (0.25mm  $\times$  30m  $\times$  0.25 $\mu$ m film thickness) was used for the separation of various phytoconstituents. The GC conditions were: injection temperature, 250  $^{\circ}$ C; column temperature, isothermal at 70  $^{\circ}$ C for 2 min, then programmed to 305  $^{\circ}$ C at 10  $^{\circ}$ C/min and held at this temperature for 5 min. Helium gas with a flow rate of 1.0 ml/min was used as a carrier gas. The effluent of the GC column was introduced directly into the

source of MS and spectra obtained in the electron ionization mode with 70 eV ionization energy, the sector mass analyzer was set to scan between 35-500 amu for 2 s. The identification of individual unknown compound is based on comparing its retention time relative to those of the known components by matching spectral peaks available with Wiley 9 Mass Spectral Library [12].

### **Thin layer chromatography (TLC) fingerprinting of *P. betle* and TLC-bioautography assisted separation of anticandidal**

For TLC-fingerprinting study, *P. betle* extract (100 mg) and pure eugenol (5  $\mu$ l) were prepared in 1 ml of 95 % ethanol. A 10  $\mu$ l of each sample was applied onto the alumina silica gel GF<sub>254</sub> TLC-plate, and was run through a series of solvent systems using a mixture of 90 volumes of toluene and 10 volume of ethyl acetate as the mobile phase. The plates were dried in the air, and were stained with a 20 % (w/v) of phosphomolybdic acid in ethanol [13].

TLC-bioautography was performed using agar overlay method. TLC-plates were placed on plate contained 6 ml of SDA, and 10 ml of top agar with 100  $\mu$ l of inoculum ( $10^7$  cfu/ml) was covered on TLC plate. After overnight incubation, the inhibited zone was observed as clear zone. The relative front values ( $R_f$ ) was calculated as:  $R_f = \text{distance travelled by solute} / \text{distance travelled by solvent}$  [14].

### **Statistical analysis**

The data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) by using Microsoft Excel 2007 12.0.6611.1000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) from the three experiments with duplicate independent experiments. The graph of

time-kill analysis is plotted using SigmaPlot Version 11.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

## RESULTS

Anticandidal activity of 12 herbs against *C. albicans* was shown in Table 1. These extracts showed different inhibited zone against *C. albicans* ATCC 90028. The diameter of inhibited zone for all the extracts ranged from 1 to 20 mm, except *P. nigrum* and extracts of Lamiaceae did not show any inhibitory zone. Two herbs *P. betle* and *C. zedoaria*, revealed the good anticandidal activity, and were further examined for their MIC and MFC against 11 *Candida* strains. *P. betle* exhibited a better anticandidal activity than *C. zedoaria* against all tested strains with the MICs ranged from 1.56 to 3.13 mg/ml and MFCs ranged from 3.13 to 8.33 mg/ml, respectively (Table 2).

Time kill assay of *P. betle* extract was performed for *C. albicans* ATCC 90028, it was depended on time and concentrations of extract. At 1 × MIC, 2 × MIC and 4 × MIC, the strain was killed after 8, 2 and 1 h, respectively. The killing of 0.1 % CHX was observed within 30 min (Figure 1).

The concentrations of *P. betle* extract required to inhibit ≥ 50 % and ≥ 90 % biofilm formation of *C. albicans* ATCC 90028 were  $0.78 \pm 0.31$  mg/ml and  $3.13 \pm 0.15$  mg/ml, respectively. The concentrations of *P. betle* extract to remove of ≥ 50 % and ≥ 90 % biofilm formation were  $1.56 \pm 0.44$  mg/ml and  $12.5 \pm 0.69$  mg/ml, respectively. CHX could completely inhibit or remove biofilm formation (Figure 2).

The GC-MS analysis of *P. betle* extract showed 2 major chemical components of 4-chromanol (62.33 %) and eugenol (17.10 %), which their retention times



were 10.46 and 9.11, respectively (Figure 3A). It was demonstrated that there were several bands of components appeared on the TLC-plate (Figure 3B), and one major band with  $R_f$  at 0.38 gave the large inhibited clear zone against tested *Candida* in TLC-bioautography assay (Figure 3C). Another minor band with  $R_f$  at 0.74 matched to the standard eugenol did not show any inhibited zone.

**Table 1:** Plants and susceptibility of *Candida albicans* ATCC 90028

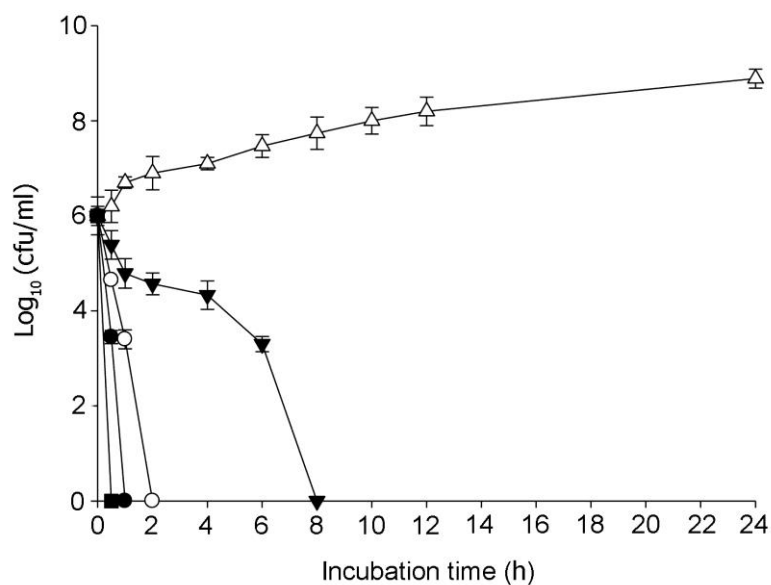
Family	Scientific name	Voucher specimen no.	Used part	Anticandidal activity
Lamiaceae	<i>Mentha cordifolia</i> Opiz.	SKP 095130301	Leaf	-
	<i>Ocimum basilicum</i> L.	SKP 095150201	Aerial parts	-
	<i>Ocimum africanum</i> Lour.	SKP 095150101	Aerial parts	-
	<i>Ocimum sanctum</i> L.	SKP 095151901	Aerial parts	-
Piperaceae	<i>Piper betle</i> L.	SKP 146160201	Leaf	+ + +
	<i>Piper chaba</i> Hunter	SKP 146160301	Fruit	+
	<i>Piper nigrum</i> L.	SKP 146161401	Fruit	-
	<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	SKP 146161906	Leaf	+
Zingiberaceae	<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.	SKP 206010701	Rhizome	+
	<i>Curcuma longa</i> L.	SKP 206031201	Rhizome	+
	<i>Curcuma zedoaria</i> Roscoe	SKP 206032601	Rhizome	+ +
	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	SKP 206261501	Rhizomes	+

+,  $0 < \text{zone} < 10 \text{ mm}$ ; + +,  $10 \text{ mm} \leq \text{zone} < 20 \text{ mm}$ ; + + +,  $20 \text{ mm} \leq \text{zone}$ ; -, absence of inhibition zone

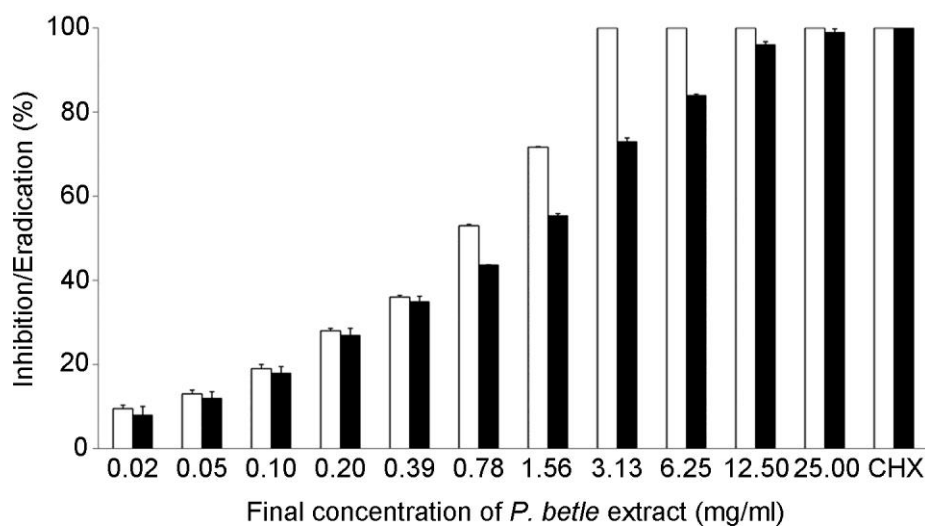
**Table 2:** MIC and MFC of tested extracts against *Candida* spp.

Strain	Concentration of extracts (mg/ml)			
	<i>Curcuma zedoaria</i>		<i>Piper betle</i>	
	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2.60±0.9	>25	3.13±0	4.17±1.8
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	2.60±0.9	>25	3.13±0	3.13±0
<i>Candida dubliniensis</i> MYA-577	2.60±0.9	25±0	2.60±0.9	4.17±1.8
<i>Candida dubliniensis</i> MYA-646	2.60±0.9	25±0	2.08±0.9	3.13±0
<i>Candida glabrata</i> ATTC 66032	6.25±0	>25	3.13±0	6.25±0
<i>Candida glabrata</i> ATTC 90030	6.25±0	>25	2.60±0.9	5.21±1.8
<i>Candida krusei</i> ATTC 6258	8.33±3.6	>25	3.13±0	8.33±3.6
<i>Candida krusei</i> ATTC 34135	8.33±3.6	>25	3.13±0	6.25±0
<i>Candida tropicalis</i> ATTC 750	2.60±0.9	>25	2.60±0.9	4.17±1.8
<i>Candida tropicalis</i> ATTC 13803	2.60±0.9	>25	2.08±0.9	3.13±0
<i>Candida tropicalis</i> ATTC 66029	1.56±0	25±0	1.56±0	4.17±1.8

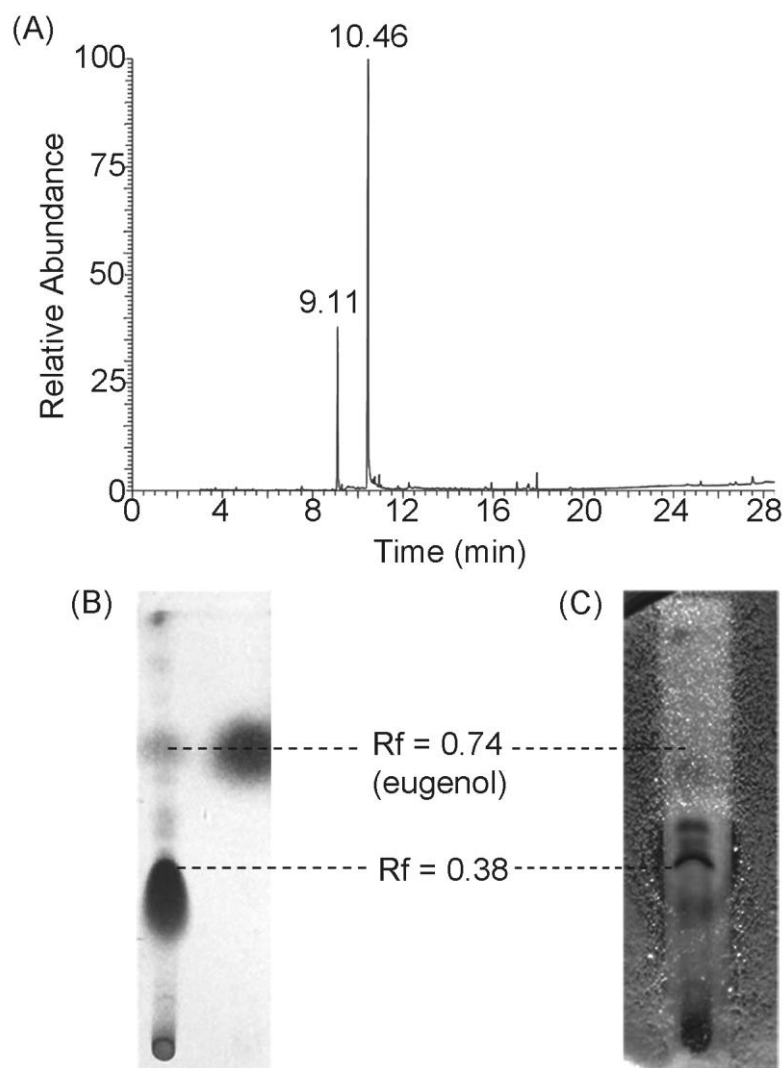
MIC – the minimum inhibitory concentration; MFC – the minimum fungicidal concentration; the values represent data obtained from three independent assays and where the appropriate mean ± S.D. is given.



**Figure 1:** Time-kill curves of *C. albicans* ATCC 90028 at different concentrations of *P. betle* extract: 0 x MIC ( $\Delta$ ), 1 x MIC ( $\blacktriangledown$ ), 2 x MIC ( $\circ$ ) and 4 x MIC ( $\bullet$ ); 0.1 % CHX ( $\blacksquare$ ). Each symbol indicated the mean  $\pm$  SD.



**Figure 2:** Inhibition ( $\square$ ) and eradication ( $\blacksquare$ ) of biofilm of *C. albicans* ATCC 90028 by *P. betle* extract at various concentrations; 0.1 % (w/v) CHX was used as control. Error bars indicate standard deviations; n = 6.



**Figure 3:** GC-MS chromatogram (A), TLC fingerprinting (B) and TLC-bioautography against *C. albicans* ATCC 90028 (C) of *P. betle* leaves extract

## DISCUSSION

*Candida* species are the most common fungal pathogens of humans and are the causative agents at various locations in the body, giving rise to severe morbidity in millions of individuals worldwide [15]. In oral cavity, *C. albicans* is the organism most frequently implicated in a range of oral candidiasis like oropharyngeal candidiasis, oral thrush and denture stomatitis [15], and NCAC

have been found dramatically in oral candidal infection. A topical use of CHX mouthwash is the most common antimicrobial substance to control oral candidiasis. However, CHX has been reported as having many unwanted effects including taste disturbance, desquamative lesions, and brown staining of the teeth and oral mucosa [5,6] and having limited use in the pregnant and the young children.

Medicinal herbs are widely employed in folk medicine, mainly in communities with low hygiene and poor and sanitation. Plants products are considered to have low side effects compared with synthetic ones. Some studies have demonstrated that herbs possess the anticandidal activity against various *Candida* strains [7,8]. In this study, 7 of 12 Thai herbs, *A. galanga*, *C. longa*, *C. zedoaria*, *P. betle*, *P. chaba*, *P. sarmentosum* and *Z. officinale* showed potential anticandidal activity against tested *C. albicans*. However, *P. nigrum* and plant extracts in family of Lamiaceae did not any activity possible because their major potent compounds are volatile oil which could have evaporated during preparation of extracts by a rotary evaporator. Among those plants tested, *P. betle* extract exhibited the strongest anticandidal activity against tested *Candida* species.

In addition, *P. betle* extract has shown an antibiofilm activity. Biofilm of *C. albicans* and NCAC are associated with high incidence of hospital morbidity and mortality [4] due to the increased use of medical devices such as lens, implants and dentures. Such biomaterials facilitate *Candida* strains to colonize and form biofilm leading to the development of fungal resistance to antifungal agents such as amphotericin B, ketoconazole and fluconazole [16].

Experiments comparing biofilm of *Candida* in this study have demonstrated that higher concentrations of MBEC<sub>90</sub> of *P. betle* extract (4 folds) than of MBIC<sub>90</sub> are required to significantly remove existing biofilm cells. This is an expected result since *Candida* in the biofilm is strongly protected and less susceptible to antifungal agents than in planktonic form [17]. It was shown that *P. betle* extract was able to remove *Candida* in the dose and time dependent manner. Our results indicated that *P. betle* extract acts as a potent antibiofilm agent that has dual actions of preventing biofilm formation and removing existing biofilm.

*P. betle* has been extensively used in traditional medicines in many countries. It was reported to have various pharmacological activities such as antifungal, antimicrobial, immunomodulatory and anti-inflammatory [18].

The antimicrobial activity has been previously shown to be a broad spectrum of both bacteriostatic and fungistatic effects against *C. albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus flavus* and *Escherichia coli* [19,20]. Some studies reported an anticandidal effect of *P. betle* on a wide range of *Candida* spp. [7,20]. Our results are in concordance with the study of Himratul-Aznita *et al* [20] who demonstrated the anticandidal activity of aqueous crude extract of *P. betle* leaves against 7 oral *Candida* species. However, there was no information of antibiofilm or active compounds mentioned in that study. The ethanol extract in this study revealed the lower MICs and MFCs of anticandidal activity compared to the aqueous extract [20]. This was also found in a study of the ethanol extract of *P. betle* leaves with

stronger antibacterial activity compared with aqueous extract [21]. It indicates that the ethanol may be the appropriate solvent for *P. betle* leaves extraction. The results of the GC-MS analysis, TLC fingerprinting and TLC-bioautography in the present study indicated that 4-chromanol could be the active compound responsible for the anticandidal activity. There were only 2 major peaks found in the GC-MS analysis, and the one with the lower peak matched to the eugenol by the TLC fingerprinting. Eugenol did not exhibit any anticandidal activity in TLC-bioautography assay. Therefore, the major band found on the TLC fingerprinting with  $R_f$  of 0.38 showing a large inhibited zone against *Candida* strain should be the highest peak of 4-chromanol found in GC-MS analysis.

A number of phytochemical constituents of *P. betle* extract have been documented in some studies [18,22]; however, 4-chromanol has not been reported. The finding of the phytochemical profile of *P. betle* extract in this study is in agreement with Deshpande and Kadam [21], in which the extract revealed the presence of 4-chromanol. However, the presence of 4-chromanol was a major component in this study (62.33 %), which was higher than earlier reported that was higher than their report. The finding of chemotypic variations in this study and others may be due to ecological and geographical conditions, age of herb and time of harvesting. The apparent variation in the chemical profile may influence their anticandidal activity.

## **CONCLUSION**

The current study supports the traditional advantages of the studied plant and suggests that the *P. betle* leaves extract is a potential source of natural



anticandidal agent. It possesses 4-chromanol with good anticandidal properties that may be used for oral infectious diseases caused by certain *Candida* spp. Further work should be performed to determine its mode of action as well as *in vivo* activity.

### ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (DEN5405475).

### REFERENCES

1. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1994; 5(2): 125-157.
2. Thompson GR 3rd, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandsen J, Redding SW, Patterson TF. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109(4): 488-495.
3. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* 2005; 4(4): 633-638.
4. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5(6): 608-611.
5. Addy M, Moran J. Mechanisms of stain formation on teeth, in particular associated with metal ions and antiseptics. *Adv Dent Res* 1995; 9(4): 450-456.
6. Flötra L, Gjeramo P, Rölla G, Waerhaug J. Side effect of chlorhexidine mouthwashes. *Scand J Dent Res* 1971; 79(2): 119-125.
7. Nazmul MHM, Salmah I, Syahid A, Mahmood AA. In-vitro screening of antifungal activity of plants in Malaysia. *Biomed Res* 2011; 22(1): 28-30.
8. Rukayadi Y, Shim JS, Hwang JK. Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity. *Mycoses* 2008; 51(4): 308-312.
9. [CLSI] Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution Antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A2. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2002.
10. Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH, Pfaller MA. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(6): 1392-1395.

11. Tang HJ, Chen CC, Ko WC, Yu WL, Chiang SR, Chuang YC. *In vitro* efficacy of antimicrobial agents against high-inoculum or biofilm embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with vancomycin minimal inhibitory concentrations equal to 2 µg/ml (VA2-MRSA). *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 38(1): 46-51.
12. Annegowda HV, Tan PY, Mordi MN, Ramanathan S, Hamdan MR, Sulaiman MH, Mansor SM. TLC–bioautography-guided isolation, HPTLC and GC–MS-assisted analysis of bioactives of *Piper betle* leaf extract obtained from various extraction techniques: *in vitro* evaluation of phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities. *Food Anal Methods* 2013; 6(3): 715-726.
13. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. *Thai Herbal Pharmacopoeia volume II*. Bangkok: Office of Notional Buddhism Press; 2007. p. 63-70.
14. Rahalison L, Hamburger MO, Hostettmann K, Hostettmann K, Monod M, Frenk E. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem Anal* 1991; 2(5): 199-208.
15. Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. *Curr Drug Targets* 2006; 7(4): 495-504.
16. Joly V, Bolard J, Yeni P. *In vitro* models for studying toxicity of antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36(9): 1799-1804.
17. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2): 167-193.
18. Nagori K, Singh MK, Alexander A, Kumar T, Dewangan D, Badwaik H, Tripathi DK. *Piper betle*: A review on its ethnobotany, phytochemistry, pharmacological profile and profiling by new hyphenated technique DART-MS (Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry). *J Pharmacy Res* 2011; 4(9): 2991-2997.
19. Chanudom L, Bhoopong P, Khwanchuea R, Tangpong J. Antioxidant and antimicrobial activities of aqueous & ethanol crude extract of 13 Thai traditional plants. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2014; 3(1): 549-558.
20. Himratul-Aznita WH, Mohd-Al-Faisal N, Fathilah AR. Determination of the percentage inhibition of diameter growth (PIDG) of *Piper betle* crude aqueous extract against oral *Candida* species. *J Med Plants Res* 2011; 5(6): 878-884.
21. Deshpande SN, Kadam DG. GCMS analysis and antibacterial activity of *Piper betle* (Linn) leaves against *Stroptococcus mutans*. *Asian J Pharm Clin Res* 2013; 6(5): 99-101.
22. Prakash B, Shukla R, Singh P, Kumar A, Mishra PK, Dubey NK. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *Int J Food Microbiol* 2010; 142(1-2): 114-119.

## ภาคผนวก ข

บทความวิจัยที่นำเสนอในงานประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัย ครั้งที่ 11 วันที่ 7-9 พฤษภาคม 2556 ณ โรงแรมพลูแมนพัทยา จังหวัดชลบุรี

Kawsud P, Puripattanavong J and Teanpaisan R. Antimicrobial activity of Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. Proceedings of 11th Dental Faculty Consortium of Thailand Academic Meeting and Research Presentation (DFCT 2013); 2013 May 7-9; Chonburi, Thailand. p. 124-126.

# 30<sup>th</sup> Anniversary D F C T

The Dental Faculty Consortium of Thailand



**Dental Faculty Consortium of Thailand Academic Meeting and Research Presentation (DFCT2013)**



**7-9 May, 2013**

Pullman Pattaya Hotel, Chonburi, Thailand

The Dental Faculty Consortium of Thailand  
Faculty of Dentistry, Thammasat University



## Antimicrobial activity of Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms

Pajaree Kawsud<sup>a</sup>, Jindaporn Puripattanavong<sup>b</sup>, Rawee Teanpaisan<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Hat-Yai, 90112, Thailand

<sup>b</sup>Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University

### Abstract

**Objectives:** The aim of this study was to explore the antimicrobial effect of crude ethanolic extracts of 12 Thai medicinal plants against 8 oral microorganisms in vitro study.

**Materials and Methods:** Twelve Thai medicinal plant extracts included *Alpinia galanga*, *Curcuma longa*, *Curcuma zedoaria*, *Piper betle*, *Piper chaba*, *Piper nigrum*, *Piper sarmentosum*, *Mentha cordifolia*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum basilicum* var. *pilosum*, *Ocimum sanctum*, and *Zingiber officinale* were prepared from aerial parts, fresh leaves, or rhizomes, and 10% (w/v) of each extract was examined for antimicrobial activity. The antimicrobial activity was performed by measuring the inhibition zones using agar well diffusion method. Minimum Inhibition Concentration (MIC), and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were assessed using microdilution method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The tested microorganisms were *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931, *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, and *Candida albicans* ATCC 90028.

**Results:** Of the 12 tested plant extracts, only *P. betle* showed a good antimicrobial activity against all tested strains. The leaf extract of *P. betle* exhibited the largest inhibition zone compared to the others. MICs ranged from 1.0 to 4.2 mg/ml, and MBCs ranged from 1.6 to 8.3 mg/ml.

**Conclusions:** It was demonstrated that the extract of *P. betle* possess compounds with good antimicrobial properties that may be used certain for oral infectious diseases. Further study will purify the antimicrobial compound of *P. betle*, and the mechanisms of antimicrobial activity will be investigated.

**Keywords:** Thai medicinal plant, *Piper betle*, antimicrobial, oral infectious diseases

### Introduction

The major oral infections are dental caries, and periodontitis which cause by the imbalance of bacteria in the dental plaque. For using of antibiotics, that cost a lot of money in each year, and sometime leading to the resistance of antibiotics. Therefore, seeking new approaches in the treatment of oral infection is necessary. The medicinal plants have been used in the treatment of oral diseases in the previous time; however, scientific evidence to support the effectiveness of these medicinal plants is limited.

The study of antimicrobial activity of medicinal plant extracts has been previously reported. *P. betle* has demonstrated the antimicrobial activity against *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, and *Actinomyces* sp. with the MIC value ranged from 2.16 to 4.69 mg/ml [1]. Antimicrobial activities were also found in the extracts of *Curcuma longa* [2], and *Curcuma zedoaria* [3], however, no details was provided.

The aim of this study was to determine crude ethanolic extracts of 12 medicinal plants for inhibitory effect on oral pathogens.

### Materials and Methods

#### Preparation of medicinal plant extracts

*P. betle* leaves were collected from a local farm, while the others were purchased from a local market. Dried plant materials (aerial parts, fruits, leaves, or rhizomes) were macerated with ethanol for 3 days, and then filtrated. Then the filtrates were dried using a rotary evaporator at 40°C, and kept at -20°C until used. A 10% (w/v) stock solution of medicinal plant extracts were prepared in 10% dimethylsulfoxide (DMSO, Merck) for using in this study.

#### Bacterial strains and growth conditions

A total of 8 species were included in the study. These were 5 gram positive bacteria; *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931, *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478, 2 gram negative bacteria; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, and 1 yeast; *Candida albicans* ATCC 90028.

Organisms were maintained on either brain heart infusion agar (BHA) with 5% (v/v) blood for facultative bacteria, and supplemented with yeast extract 0.5%, haemin (5 mg/l), and vitamin K (1 mg/ml) for anaerobic bacteria, or Sabouraud dextrose agar for fungus. The strains were grown under

aerobic, or anaerobic (H<sub>2</sub> 10%, CO<sub>2</sub> 10%, and N<sub>2</sub> 80%) conditions as appropriate.

#### Antimicrobial assay

##### Determination of inhibition zone diameter

Agar well-diffusion method [3] was used to determine the antimicrobial activity. One hundred microliters of inoculum, equivalent to 10<sup>7</sup> CFU/ml, was mixed with 20 ml of warm melted BHA, and poured into the plate with 6 mm diameter metal cup. After solidifying of BHA, the metal cups were removed, and the well was added with 100 µl of each plant extract. Stock solution of each plant extract was prepared at a concentration of 10% (w/v). A 0.1% CHX, and 10% DMSO were taken as a positive, and negative control, respectively. Plate was incubated in appropriate condition according to microorganisms tested at 37°C for 24 h. The test materials having antimicrobial activity inhibited the growth of the microorganisms, and a clear distinct zone of inhibition was visualized surrounding the well. The antimicrobial activity of the plant extracts was determined by measuring the diameter of zone of inhibition in millimeter. Duplicates were maintained, and the experiment was repeated thrice. Average zones of inhibition were reported.

##### Determination of antimicrobial activity

A minimum inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration of an antimicrobial that inhibits the growth of a microorganism after 18-24 h. The extracts that showed antibacterial activities were subjected to the serial broth dilution technique to determine their minimum inhibitory concentration using the method of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Briefly, the stock solutions of the extracts were subjected to two-fold serial dilution in the brain heart infusion broth (BHI) to obtain concentrations from 25

mg/ml to 0.024 mg/ml at a total volume of 100 µl per well in 96-well microtiter plates. The medium, 0.1% CHX, and 10% DMSO were used as the blank, positive, and non-treated controls. A 100 µl of bacterial cultures at a final concentration of 1×10<sup>8</sup> CFU/ml were added to the per well, and were incubated at 37°C in appropriate conditions.

MIC was determined by visual observation. The minimum concentration of the extracts that showed no detectable growth was taken as the minimum inhibitory concentration. All experiments were repeated thrice in duplicate.

A minimum bactericidal concentration (MBC) is the lowest concentration of an antimicrobial required to kill a microorganism. The MBC was determined by sub-culturing 10 µl of the test dilutions from MIC wells on to fresh agar plates. Plates were incubated at 37°C in appropriate conditions. The highest dilution that yielded no single bacterial colony on the plates was recorded as MBC.

##### Statistical analysis

Data were expressed as mean, and standard deviation (S.D.) by computational analysis from the thrice experiments in duplicate independent experiments.

#### Results and Discussion

Of 12 plant extracts tested, *P. betle* showed a good result of antimicrobial activity against all tested microorganisms (Table 1). An example of inhibition zone of *P. betle* is shown in Figure 1. Initially, leaves, and aerial parts of *P. betle* were prepared for testing, and leaves extract gave the better antimicrobial activity. Thus, leaves extract of *P. betle* was used throughout the study. It was demonstrated that *P. betle* extract gave the largest inhibition zones compared to the others (Table 1). With the MICs ranged from 1.0 to 4.2 mg/ml, and MBCs ranged from 1.6 to 8.3 mg/ml (Table 2).

Table 1. Inhibition zone of various medicinal plant extracts against oral microorganisms using agar diffusion

Plant extracts	Part tested	Microorganisms <sup>a</sup> / Zone of inhibition (in mm diameter)							
		<i>Ef</i>	<i>Lf</i>	<i>Ls</i>	<i>Ss</i>	<i>Sm</i>	<i>Aa</i>	<i>Fn</i>	<i>Ca</i>
<i>M. cordifolia</i>	aerial parts	11±0	n.d.	n.d.	0	0	n.d.	n.d.	0
<i>O. basilicum</i> var. <i>pilosum</i>	aerial parts	4.5±6.4	n.d.	n.d.	0	0	n.d.	n.d.	0
<i>O. basilicum</i>	aerial parts	4.5±6.4	n.d.	n.d.	0	0	n.d.	n.d.	0
<i>O. sanctum</i>	aerial parts	6.0±8.49	n.d.	n.d.	0	0	n.d.	n.d.	0
<i>P. betle</i>	leaves	15.3±0.6	14±1.4	17.0±3.5	21.5±3.5	21.0±3.6	14.5±4.9	21.0±5.7	21.6±1.2
<i>P. chaba</i>	fruits	9.5±13.4	0	0	0	0	0	6.0±8.5	3±5.2
<i>P. nigrum</i>	fruits	3.0±5.2	0	0	0	0	0	5.0±7.1	0
<i>P. sarmentosum</i>	leaves	3.0±5.2	0	0	0	0	0	14.5±6.4	10.7±1.5
<i>A. galangal</i>	rhizomes	0	0	0	0	6.3±10.9	16.5±6.4	15.0±7.1	9.7±1.5
<i>C. longa</i>	rhizomes	4.0±6.9	0	0	0	3.0±5.2	0	13.8±19.5	0
<i>C. zedoaria</i>	rhizomes	0	0	0	0	9.7±9.1	0	11.5±7.1	3.3±5.8
<i>Z. officinale</i>	rhizomes	14.0±12.2	0	0	3.0±5.2	0	0	17.3±7.4	3.0±5.2
0.1% CHX	-	10.0±0.2	n.d.	n.d.	13.3±0.2	19.3±0.2	25.8±0.2	23.8±0.5	18.0±0.4

<sup>a</sup>Microorganisms: *Ef* - *E. faecalis* ATCC 19433; *Lf* - *L. fermentum* ATCC 14931; *Ls* - *L. salivarius* ATCC 11741; *Ss* - *S. sobrinus* ATCC 33478; *Sm* - *S. mutans* ATCC 25175; *Aa* - *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384; *Fn* - *F. nucleatum* ATCC 25586; *Ca* - *C. albicans* ATCC90028, n.d. - not determined.

Table 2. MIC (mg/ml), and MBC (mg/ml) of *P. betle* extracts against oral microorganisms

Microorganisms	MIC	MBC
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	5.2 ± 1.8	8.3 ± 3.6
<i>L. fermentum</i> ATCC 14931	4.2 ± 1.8	8.3 ± 3.6
<i>L. salivarius</i> ATCC 11741	4.2 ± 1.8	8.3 ± 3.6
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	1.6 ± 0	4.2 ± 1.8
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	1.6 ± 0	1.6 ± 0
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384	1.0 ± 0.5	2.6 ± 0.9
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	1.3 ± 0.5	2.6 ± 0.9
<i>C. albicans</i> ATCC90028	3.1 ± 0	3.1 ± 0

*P. betle* is known as "Plu", which is commonly used in Thai traditional medicine. *P. betle* extract has previously reported an antimicrobial effect on *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, and *Actinomyces* sp.[1]. In this study, it was found that *P. betle* leaves extract could inhibit the growth of various oral microorganisms. Moreover, it was observed that *P. betle* extract revealed a good antimicrobial agent against both cariogenic bacteria e.g. *S. mutans*, *S. sobrinus*, and periodontopathogens including *F. nucleatum*, and *A. actinomycetemcomitans*. Antifungus activity was also found in inhibition of *C. albicans*. Such findings indicate that *P. betle* leaves extract may be useful for prevention or treatment of oral infectious diseases.

### Conclusion

It was demonstrated that the extract of *P. betle* possess compounds with good antimicrobial properties that may be used for oral infectious diseases. Further study will purify the certain antimicrobial compound of *P. betle*, and the mechanisms of antimicrobial activity will be investigated.

### Acknowledgments

This work was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, office of the Higher Education Commission [DEN5405475].

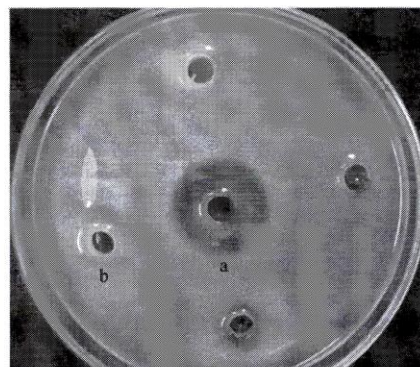


Figure 1 Antimicrobial activity of *P. betle* extract against *C. albicans* ATCC 90028 showing by a – inhibition clear zone, b – 10% DMSO served as control (no zone).

### References

- [1] Fathilah AR, and Rahim ZHA. The anti-adherence effect of Piper betle and Psidium guajava extracts on the adhesion of early settlers in dental plaque to saliva-coated glass surface. *J. Oral Sci.* 2003; 45: 201-206.
- [2] Arora RB, Basu N, Kapoor V, and Jain AP. Anti-inflammatory studies on *Curcuma longa* (Turmeric). *Indian J. Med Res* 1971; 59(8): 1289-95.
- [3] Wilson B, Abraham G, Manju VS, Mathew M, Vimala B, Sundaresan S, and Nambisan B. Antimicrobial activity of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma malabarica* tubers. *J. Ethnopharmacol* 2005; 99: 147-151.
- [4] Okeke MI, Iroegbu CU, Eze EN, Okoli AS, and Esimone CO. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerriensis* for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol* 2001; 78: 119-127.

### Address for correspondence

Tel: +66 74 429878; Fax: +66 74 212922  
e-mail: rawee.t@psu.ac.th (Rawee Teanpaisan).

### ภาคผนวก ค

บทความวิจัยนี้อยู่ในขั้นตอนของการจัดเตรียมต้นฉบับเพื่อส่งตีพิมพ์ผลงานเชิง  
วิชาการ

Kawsud P, Puripattavong J and Teanpaisan R. Screening for anticandidal and  
antibiofilm activity of herbs in Thailand. (Manuscript)



**Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms**

Pajaree Kawsud<sup>1</sup>, Jindaporn Puripattanavong<sup>2</sup> and Rawee Teanpaisan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Common Oral Diseases and Epidemiology Research Center, and the Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Hat-Yai, 90112, Thailand

<sup>2</sup>Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, 90112, Thailand

**Correspondence author:**

Rawee Teanpaisan,

Common Oral Diseases and Epidemiology Research Center, and the Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University,  
Hat-Yai, 90112, Thailand

Tel: +66 74 429878; Fax: +66 74 212922

E-mail: rawee.t@psu.ac.th.

**Abstract**

To evaluate the antibacterial activity of 12 ethanol Thai herb extracts against oral pathogens. They were examined for antibacterial activities using microdilution and time kill methods. Antibiofilm activity was also investigated using a 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide (MTT) assay. High performance liquid chromatography (HPLC), thin layer chromatography (TLC) fingerprinting and TLC-bioautography were used to determine the active antibacterial compounds. *Piper betle* revealed excellent antibacterial activity against all tested strains with minimal inhibitory concentration (MIC) ranging from 1.04 to 4.17 mg/ml and minimal bactericidal concentration (MBC) from 1.56 to 8.33 mg/ml. Killing activity depended on time and concentrations of the extract. *P. betle* extract had the ability to inhibit and remove biofilm. HPLC chromatograms showed the major compound of *P. betle* extract as 4-chromanol which responded for antibacterial activity. It was demonstrated that *P. betle* extract possesses 4-chromanol with good antibacterial properties that may be used for oral infectious diseases.

**Keywords:** antibacterial, antibiofilm, *Piper betle*, 4-chromanol, oral pathogens

## 1. Introduction

Herbal medicines are valuable and readily available resources for primary health care for thousands of years in the Indian Ayurvedic system of medicine and folklore medicine of Thailand. The bioactive compounds in herbal medicines are secondary metabolites which act as various pharmacological activities (Jesonbabu et al., 2012). They are used as the substances of modern drugs (Cragg and Newman, 2001; Bhanot et al., 2011) such as morphine from *Papaver somniferum* for pain treatment (Pace and Burke, 1996; Blakemore and White, 2002), colchicine from *Colchicum autumnale* for treatment in pericardial disease (Deftereos et al., 2013). A number of studies have reported antibacterial activity from various herbs (Rukayadi et al., 2013; Chanudom et al., 2014), however, scientific evidence to support their active compounds and their effectiveness for inhibitory bacteria and biofilm on oral pathogens is limited.

The imbalance of bacteria in the dental biofilm is cause in dental caries and periodontitis which are major oral infections (Liljemark and Bloomquist, 1996). It is co-aggregation of free-floating bacterial strains in the oral e.g. *Streptococcus* spp., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum* (Nishihara and Koseki, 2004) to become the complex structure. The treatments need to use high antimicrobial agent doses for removing the biofilm which have side effects (Nickel et al., 1985) for example taste disturbance, desquamative lesions, and brown staining of the teeth and oral mucosa from using chlorhexidine gluconate (CHX) in long term (Flötra et al., 1971; Addy and Moran, 1995).

Therefore, herbal medicines are the best alternative for being antibacterial agents since they are perceived to have the safety. The aim of study was to evaluate the antibacterial and antibiofilm activity of 12 ethanolic Thai herb extracts included

*Alpinia galanga*, *Curcuma longa*, *Curcuma zedoaria*, *Piper betle*, *Piper chaba*, *Piper nigrum*, *Piper sarmentosum*, *Mentha cordifolia*, *Ocimum africanum*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum sanctum* and *Zingiber officinale* and the active compounds of the most effective extract were also investigated.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Preparation of medicinal herb extracts**

Twelve herbs included in this study were purchased from the local market in the month of August 2012, and the details were shown in Table 1. All herbs were identified by Dr. Supreeya Yuenyongsawad; Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand, where the voucher specimens (Table 1) were deposited in the herbarium. Dried plants were macerated with ethanol for 3 days and then filtrated through Whatman No. 4 filter paper. Each filtrate was dried using a rotary evaporator at 40 °C and kept at -20 °C. A 10 % (w/v) stock solution in 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) of each extract was used in this study.

### **2.2 Bacteria strains and growth conditions**

A total of seven oral microorganisms were tested, and the details of strains used shown in Table 2. Microorganisms were maintained on either brain heart infusion agar (BHA; Difco Laboratories, Detroit, Michigan) with 5 % (v/v) blood for facultative bacteria, and supplemented with 0.5 % (w/v) yeast extract and haemin for anaerobic bacteria. The strains were grown under aerobic, or anaerobic (10 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> and 80 % N<sub>2</sub>) conditions as appropriate.

## **2.3 Antibacterial assay**

### *2.3.1 Agar diffusion test*

One hundred microliters of inoculum, equivalent to  $10^7$  CFU/ml, was mixed with 20 ml of warm melted BHA. The mixture was then poured into the plate with a 6 mm diameter metal cup. After solidifying the BHA, the metal cups were removed and the well was added with 100  $\mu$ l of each plant extract. The plate was incubated at 37 °C for 24 h. A 10 % DMSO were taken as a negative control. The antimicrobial activity of each plant extract was determined by measuring the diameter of the zone of the inhibition in millimeters. Duplicates were maintained and the experiment was repeated thrice.

### *2.3.2 Broth microdilution test*

Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were done as recommended instruction of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Briefly, 10 % stock solution of each extract was diluted in the brain heart infusion broth (BHI) in two-fold serial dilutions to obtain concentrations from 0.024 mg/ml to 25 mg/ml at a total volume of 100  $\mu$ l per well in 96-well microtiter plates. 100  $\mu$ l of each tested species culture at a final concentration of  $1 \times 10^6$  CFU/ml was added to each well and incubated at 37 °C in appropriate conditions. The medium, 0.1 % CHX and 10 % DMSO were used as the blank, positive and non-treated controls.

MIC was defined as the lowest concentration of the extract that produced a complete suppression of visible growth. MBC was defined as the lowest concentration of wells that did not allow visible growth when 10  $\mu$ l of the well contents was plated on agar

and grown at 37 °C in appropriate conditions. All experiments were repeated thrice in duplicate.

## **2.4 Time kill assay**

As the results of the screening of herb extracts revealed that *P. betle* extract gave the strongest antibacterial activity. Thus, *P. betle* extract was used for the time kill assay. Growing cultures ( $10^6$  CFU/ml) of representative strains, *S. mutans* ATCC 25175 and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 in BHI broth supplemented with the extract at concentrations equivalent to  $1 \times \text{MIC}$ ,  $2 \times \text{MIC}$  and  $4 \times \text{MIC}$  were incubated at 37 °C. Surviving bacteria were observed at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, and 24 h by culturing on agar plates. The procedure was repeated in triplicate, and the  $\log_{10}$  CFU/ml was plotted against time. A 0.1 % CHX and medium alone were used as positive and negative controls, respectively.

## **2.5 Antibiofilm assay**

### *2.5.1 Inhibition of biofilm formation*

The effect of *P. betle* extract on biofilm formation of each representative strain, *S. mutans* ATCC 25175 and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 was examined by using the modified microdilution method (Tang et al., 2011). Briefly, two-fold serial dilutions of *P. betle* extract were prepared, with final concentration ranged from 0.024 mg/ml to 25 mg/ml. A cell suspension of the tested strains was prepared as described in the MIC assay, and 100  $\mu\text{l}$  (final concentration  $1 \times 10^6$  CFU/ml) were inoculated in the wells of a 96-wells polystyrene tissue culture plate. A 0.1 % CHX was used as the positive controls. The phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.0 and the medium alone were used as the non-treated and blank controls, respectively. Following

incubation at 37 °C for 24 h, supernatants were discarded and washed 3 times with PBS. Biofilm formation was quantified by using a 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide (MTT) assay. After washing, 100 µl PBS at pH 7.0 with 0.5 % MTT (Sigma-Aldrich, USA) solution was added and allowed to incubate in the dark at 37°C for 3 hours. The MTT solution was replaced with 100 µl of DMSO and allowed to incubate for 15 minutes at the room temperature. The numbers of surviving bacteria were determined by measuring their ability to reduce the yellow tetrazolium salt to a purple formazan product at 570 nm. Higher OD values indicate an increased number of surviving microorganisms in the biofilm. Percentage inhibition was calculated by using the equation  $[1 - (A_{570} \text{ of the test} / A_{570} \text{ of non-treated control})]$ . The minimum biofilm inhibition concentration (MBIC) was defined as the lowest concentration that showed 50 % and 90 % inhibition of biofilm formation (MBIC<sub>50</sub> and MBIC<sub>90</sub>).

### 2.5.2 Eradication of biofilm formation

The antibacterial activity of *P. betle* extract in the biofilm was also examined using the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) assay. Briefly, a 200 µl in early log phase ( $10^6$  CFU/ml) of each representative strain, *S. mutans* ATCC 25175 and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 was inoculated into each well of 96 well polystyrene microtiter plates and incubated for 24 h at 37 °C for the development of a multilayer biofilm. The culture was then blotted out and the well carefully washed 3 times with sterile PBS in order to remove non-adherent cells (Tang et al., 2011). These biofilms were then exposed to a 200 µL of various concentrations of *P. betle* extract ranged from 0.024 mg/ml to 25 mg/ml, incubated at 37 °C in appropriate conditions. At the end point of the treatment of the biofilms with *P. betle* extract, the

adherent cells were washed 3 times with sterile PBS. The numbers of surviving culture were determined using MTT assay. The MBEC value was defined as the concentrations that showed 50 % and 90 % eradication of biofilm formation. And 0.1 % CHX, PBS and the medium alone were used as the positive, non-treated and blank controls, respectively.

### **2.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of *P. betle***

The amount of eugenol and 4-chromanol in the extract was analyzed by using high performance liquid chromatography (Agilent® 1100 series, Palo Alto, CA). The reverse column was Apollo C18, 250 mm x 4.6 mm, 5 µm particle size (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL). The mobile phases were methanol: water (70: 30 v/v), flow rate at 0.7 ml/min, UV Detector was set at 280 nm, injection volume was 20 µl. Firstly, the solutions, *P. betle* extract (1 mg), pure eugenol (5 µl) and 4-chromanol (0.5 mg) were prepared in 1 ml of 95 % ethanol. After that, these solutions were taken to analyze by HPLC to construct curve by using the Microsoft Excel software package (Excel 2007; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). These sample solutions was injected three times (Singtongratana et al., 2013).

### **2.7 Thin Layer Chromatography (TLC) fingerprinting of *P. betle* and TLC-bioautography assisted separation of antibacterial**

For TLC-fingerprinting study, *P. betle* extract (100 mg), pure eugenol (5 µl) and 4-chromanol (1 mg) were prepared in 1 ml of 95 % ethanol. A 10 µl of each sample was applied onto the alumina silica gel GF<sub>254</sub> TLC-plate, and was run through a series of solvent systems using a mixture of 90 volumes of toluene and 10 volume of ethyl acetate as the mobile phase. After removal of the plate, allow it to dry in air, spray the



plate with a 20 % (w/v) solution of phosphomolybdic acid in ethanol and heat at 105 °C for 5 minutes (Department of Medical Sciences, 2007).

TLC-bioautography was performed using agar overlay method. TLC-plates were placed on plate contained 6 ml of BHA, and 10 ml of top agar with 100 µl of *S. mutans* ATCC 25175 and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 inoculum ( $10^7$  CFU/ml) was covered on TLC plate. After overnight incubation, the inhibited zone was observed as clear zone. The relative front values ( $R_f$ ) was calculated as:  $R_f = \text{distance travelled by solute} / \text{distance travelled by solvent}$  (Rahalison et al., 2011).

### 2.8 Statistical analysis

Data were expressed as mean and standard deviation (SD) by computational analysis from the three experiments with duplicate independent experiments. For antibiofilm assay were analyzed statistically using Mann-Whitney U test. The differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

Of 12 tested herb extracts, *P. betle* showed a good result of antibacterial activity against all tested microorganisms (Table 1). *P. betle* revealed the good antibacterial activity, which were further examined for their MIC and MBC against 7 bacteria strains. The MIC of *P. betle* extract ranged from 1.04 to 4.17 mg/ml and MBC ranged from 1.56 to 8.33 mg/ml, respectively (Table 2).

Time kill assay of *P. betle* leaves extract against *S. mutans* ATCC 25175 and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 is demonstrated in Figure 1. It was depended on time and concentrations of *P. betle* leaves extract. Completed killing of *S. mutans* ATCC 25175 cells treated with  $1 \times \text{MIC}$ ,  $2 \times \text{MIC}$  and  $4 \times \text{MIC}$  of the extract

occurred within 12, 8 and 6 h, respectively. At  $1 \times \text{MIC}$ ,  $2 \times \text{MIC}$  and  $4 \times \text{MIC}$ , *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 was killed after 6, 2 and 1 h, respectively. The killing of positive control (0.1 % CHX) was observed within 30 min.

The inhibition and eradication of the biofilm formation of *S. mutans* ATCC 25175 and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 by *P. betle* leaves extract at various concentration and with 0.1 % CHX is also demonstrated in Figure 2 and Figure 3. The concentrations of *P. betle* extract required to inhibit for  $\geq 50$  % biofilm formation ( $\text{MBIC}_{50}$ ) of *S. mutans* ATCC 25175 and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 were  $0.39 \pm 0.20$  and  $0.10 \pm 0.03$  mg/ml, respectively and for  $\geq 90$  % of the inhibition of biofilm growth ( $\text{MBIC}_{90}$ ) were  $1.56 \pm 0.11$  and  $0.39 \pm 0.65$  mg/ml, respectively. At the concentrations of *P. betle* extract  $\geq 0.39$  mg/ml, there was a statistical significance of inhibition of biofilm growth of all tested strains compare to non-treated control (Figure 2). The concentrations of *P. betle* extract to eradicate for  $\geq 50$  % biofilm formation ( $\text{MBEC}_{50}$ ) of *S. mutans* ATCC 25175 and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 were  $0.78 \pm 0.11$  and  $0.78 \pm 0.34$  mg/ml, respectively and for  $\geq 90$  % of the removal of biofilm growth ( $\text{MBEC}_{90}$ ) were  $6.25 \pm 0.58$  and  $3.13 \pm 0.28$  mg/ml, respectively. At the concentrations of *P. betle* extract  $\geq 0.78$  mg/ml, there was a statistical significance of inhibition of biofilm growth of all tested strains compare to non-treated control (Figure 3). CHX could completely (100 %) inhibit or remove biofilm formation of all tested strains.

Typical chromatograms of the standards, *P. betle* extract and the mixture of *P. betle* extract and the standards are shown in Figure 4a, b and c, respectively. Peak 1 was identified as 4-chromanol with retention times of  $5.486 \pm 0.00$  min,  $5.654 \pm 0.04$  min

and  $5.610 \pm 0.00$  min, respectively. Peak 2 can be assigned to eugenol with retention times of  $7.853 \pm 0.01$  min,  $7.966 \pm 0.09$  min and  $7.757 \pm 0.01$  min, respectively.

Figure 5a exhibited the developed TLC plate of *P. betle* leaf extract that there were several bands of components appeared on the TLC-plate. One major band with  $R_f$  at 0.38 matched to the standard 4-chromanol gave the large inhibited clear zone against *S. mutans* ATCC 25175 in TLC-bioautography assay (Figure 5b), but this band gave mild inhibited clear zone against *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 which was not shown. Another minor band with  $R_f$  at 0.74 matched to the standard eugenol did not show any inhibited zone.

#### 4. Discussion

The present study clearly showed that 1 of 12 Thai herbs, *P. betle* leaf extract revealed a good antibacterial against both cariogenic bacteria e.g. *S. mutans* and *S. sobrinus*, and periodontopathogens including *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans*. *P. betle* (family Piperaceae) is known as “Phlu”, which has been extensively used in traditional herbal remedies in Thailand and many other countries in tropical Asia. It is reported for various pharmacological activities such as antimicrobial, immunomodulatory and anti-inflammatory (Nagori et al., 2011). The leaf of it has a significant antimicrobial activity against broad spectrum of micro-organisms such as *Streptococcus pyrogen*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* etc. (Pradhan et al., 2013). In the results, *P. betle* can optimize both the planktonic cells and the biofilm against tested strains.

Initially, pioneer bacteria species such as *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis* and *S. sangius* (Liljemark and Bloomquist, 1996; Seneviratne et al., 2011) manifold to form microcolonies which embed in a soft matrix consisting of extracellular

polysaccharides, degraded mammalian cells and component of the saliva, resulting in a biofilm. They develop to involve co-aggregations between other genus such as *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* and the primary colonizers ( Nishihara and Koseki, 2004; Seneviratne et al., 2011) . The biofilm exhibits the different properties compared with planktonic cells. According to previous studies, a biofilm can withstand the defensive act of the host and better resistance to antibiotics than planktonic cells (Nickel et al., 1985).

The mechanical removal of the dental biofilm is the most efficient procedure to prevent or limit bacteria adhesion and their subsequent growth on the tooth surface. CHX is a chemical-based antimicrobial agent which is used extensively in the mouthrinse to help maintain dental biofilm at a level compatible with oral health. However, it was reported on some local side effects when was used in long term including taste disturbance, desquamative lesions, and brown staining of the teeth and oral mucosa (Flötra et al., 1971; Addy and Moran, 1995). Thus, finding alternative agents to be used as adjuncts in oral healthcare regimens became a prime interest.

In result, *P. betle* leaf extract was more active against gram negative bacteria than gram positive bacteria due to the differences in their cell wall structures. Gram-negative bacteria have a unique outer membrane, a thinner layer of peptidoglycan, and a periplasmic space between the cell wall and the membrane. In the outer membrane, gram-negative bacteria have lipopolysaccharides (LPS), porin channels, and murein lipoprotein all of which gram-positive bacteria lack. It is possible that gram negative bacteria were susceptibility more than gram positive bacteria because of their cell wall structures (Silhavy et al., 2010). Similar results are also reported in *Citrus bergamia* (Mandalari et al., 2007) and *Woodfordia fruticosa* (Parekh and Chanda, 2006).

Our results are in concordance with the study of Deshpande and Kadam (2013) who demonstrated the finding of antibacterial activity of ethanol and aqueous crude extract of *P. betle* leaves against *S. mutans*. However, there was no information of antibiofilm or active compounds mentioned in that study. The ethanol extract in this study revealed the lower MIC of antibacterial activity compared to the aqueous extract (Deshpande and Kadam, 2013). It can be stated that ethanolic extracts were more potent than aqueous extract. There is possible explanation for the observed effects: the active compounds were soluble in organic solvents and basically not present in water extracts.

The antibiofilm activity experiments, comparing biofilm of tested strains have examined that MBEC<sub>90</sub> of *P. betle* extract were higher than of MBIC<sub>90</sub> (4-8 folds). *P. betle* is required to significantly move existing biofilm cells, since bacteria in the biofilm is strongly protected and less susceptible to antibacterial agents than in planktonic form (Donlan and Costerton, 2002). Our results indicated that *P. betle* extract acts as a potent antibiofilm agent that has dual actions preventing biofilm formation and removing of existing biofilm.

Our previously study, it was found that the major constituents of *P. betle* leaf extract were 4-chromanol (62.33 %) and eugenol (17.10 %) in GC-MS analysis and the extract revealed good anticandidal activities but the anticandida of 4-chromanol with R<sub>f</sub> at 0.38 was not unclear in TLC fingerprinting and TLC-bioautography assay (Kawsud et al., 2014). In this study, the band with R<sub>f</sub> at 0.38 clearly acted as 4-chromanol following the results of TLC fingerprint and HPLC. It was found that 4-chromanol appeared the strong antibacterial activity by observed clear zone of the inhibition. Eugenol with R<sub>f</sub> at 0.74 did not exhibit

any antibacterial activity in TLC-bioautography assay. Therefore, *P. betle* leaf extract reveals good antibacterial activity with major compound, 4-chromanol.

## **5. Conclusions**

This study suggested that the extract of *P. betle* leaves is a potential source of natural antibacterial which possesses 4-chromanol. It was exhibited with good antibacterial properties that may be used for oral infectious diseases. Further study and the mechanisms of antibacterial activity of 4-chromanol should be investigated in more detail as well as their activity *in vivo*.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (DEN5405475).

## References

- Addy, M. and Moran, J. 1995. Mechanisms of stain formation on teeth, in particular associated with metal ions and antiseptics. *Advances in Dental Research*. 9(4), 450-456.
- Bhanot, A., Sharma, R. and Noolvi, M.N. 2011. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. *International Journal of Phytomedicine*. 3, 9-26.
- Blakemore, P.R. and White, J.D. 2002. Morphine, the Proteus of organic molecules. *Chemical Communications (Cambridge England)*. 7(11), 1159-1168.
- Chanudom, L., Bhoopong, P., Khwanchuea, R. and Tangpong, J. 2014. Antioxidant and antimicrobial activities of aqueous & ethanol crude extract of 13 Thai traditional plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(1), 549-558.
- Cragg, G.M. and Newman, D.J. 2001. Medicinals for the millennia: the historical record. *Annals New York Academy of Science*. 953, 3-25.
- Deftereos, S., Giannopoulos, G., Papoutsidakis, N., Panagopoulou, V., Kossyvakis, C., Raisakis, K., Cleman, M.W. and Stefanadis, C. 2013. Colchicine and the heart: pushing the envelope. *Journal of the American College of Cardiology*. 62(20), 1817-1825.
- Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. 2007. Thai Herbal Pharmacopoeia volume II, Office of Notional Buddhism Press, Bangkok, Thailand, pp. 63-70.
- Deshpande, S.N. and Kadam, D.G. 2013. GCMS analysis and antibacterial activity of *Piper betle* (Linn) leaves against *Stroptococcus mutans*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 6(5), 99-101.

- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(2), 167-193.
- Flötra, L., Gjermo, P., Rölla, G. and Waerhaug, J. 1971. Side effect of chlorhexidine mouthwashes. *European Journal of Oral Sciences*. 79(2), 119-125.
- Jesonbabu, J., Spandana, N. and Aruna, L.K. 2012. In vitro antimicrobial potentialities of chloroform extracts of ethanomedicinal plant against clinically isolated human pathogens. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(3), 624-626.
- Kawsud, P., Puripattavong, J. and Teanpaisan, R. 2014. Screening for anticandidal and antibiofilm activity of herbs in Thailand. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [In press 2014].
- Liljemark, W.F. and Bloomquist, C. 1996. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 7(2), 180-198.
- Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C.B., Gasson M.J. and Narbad, A. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*. 103(6), 2056-2064.
- Nagori, K., Singh, M.K., Alexander, A., Kumar, T., Dewangan, D., Badwaik, H. and Tripathi, D.K. 2011. *Piper betle*: A review on its ethnobotany, phytochemistry, pharmacological profile and profiling by new hyphenated technique DART-MS (Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry). *Journal of Pharmacy Research*. 4(9), 2991-2997.



- Nickel, J.C., Ruseskal, I., Wright, J.B. and Costerton, J.W. 1985. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 27(4), 619-624.
- Nishihara, T. and Koseki, T. 2004. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontology* 2000. 36, 14-26.
- Pace, S. and Burke, T.F. 1996. Intravenous morphine for early pain relief in patients with acute abdominal pain. *Academic Emergency Medicine*. 3(12), 1086-1092.
- Parekh, J. and Chanda, S. 2007. In vitro antibacterial activity of the crude methanol extract of *Woodfordia fruticosa* Kurz. flower (Lythraceae). *Brazilian Journal of Microbiology*. 38, 204-207.
- Pradhan, D., Suri, K.A., Pradhan, D.K. and Biswasroy, P. 2013. Golden Heart of the nature: *Piper bettle* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 1( 6) , 147-167.
- Rahalison, L., Hamburger, M.O., Hostettmann, K., Hostettmann, K., Monod, M. and Frenk, E. 1991. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis*. 2(5), 199-208.
- Rukayadi, Y., Lau, K.Y., Zainin, N.S., Zakaria, M. and Abas, F. 2013. Screening antimicrobial activity of tropical edible medicinal plant extracts against five standard microorganisms for natural food preservative. *International Food Research Journal*. 20(5), 2905-2910.
- Seneviratne, C.J., Zhang, C.F. and Samaranayake, L.P. 2011. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *The Chinese Journal of Dental Research*. 14(2), 87-94.

- Silhavy, T. J., Kahne, D. and Walker, S. 2010. The Bacterial Cell Envelope. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2(5), 1-16.
- Singtongratana, N., Vadhanasin, S. and Singkhonrat, J. 2013. Hydroxychavicol and Eugenol Profiling of Betel Leaves from *Piper betle* L. Obtained by Liquid-Liquid Extraction and Supercritical Fluid Extraction. Kasetsart Journal (Natural Science). 47(4), 614-623.
- Tang, H.J., Chen, C.C., Ko, W.C., Yu, W.L., Chiang, S.R. and Chuang, Y.C. 2011. In vitro efficacy of antimicrobial agents against high-inoculum or biofilm embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with vancomycin minimal inhibitory concentrations equal to 2 µg/ml (VA2-MRSA). International Journal of Antimicrobial Agents. 38(1), 46-51.

**Table 1.** Plants and susceptibility of oral microorganisms

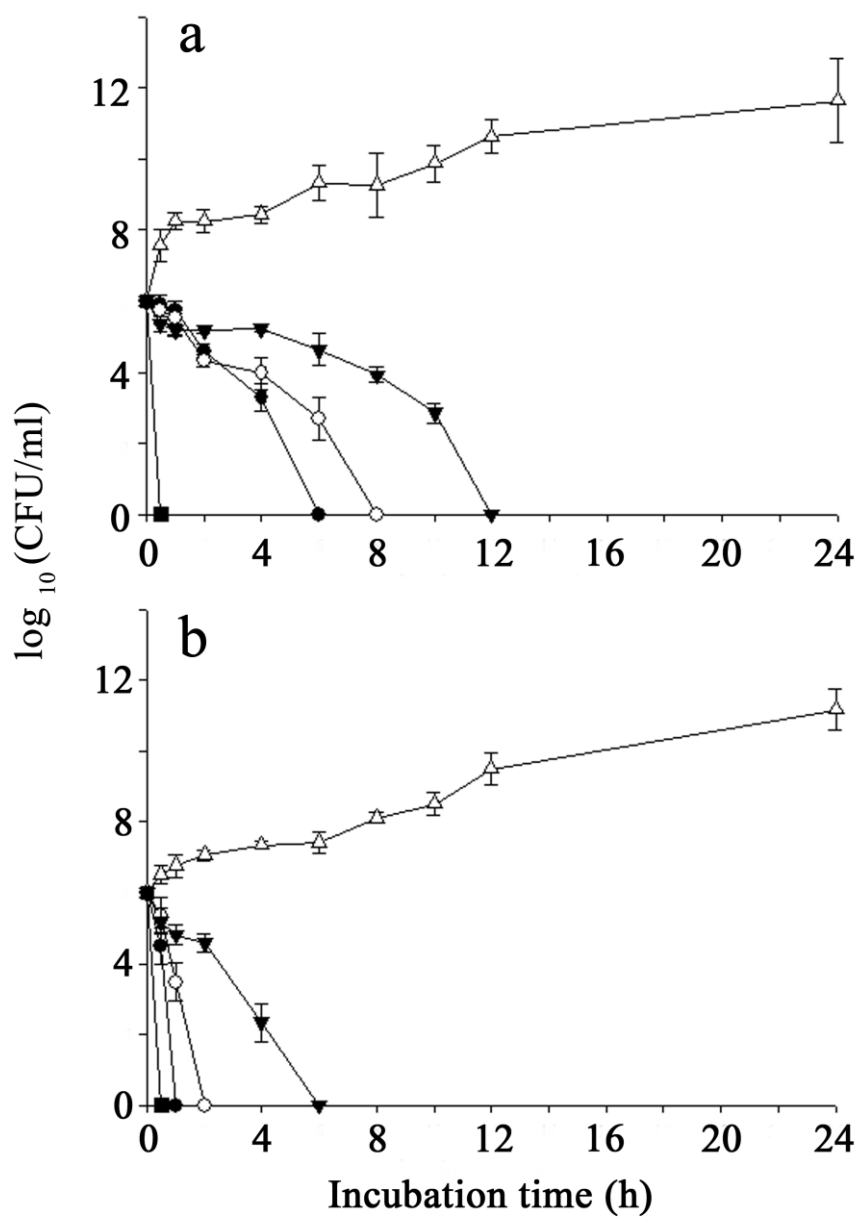
Scientific name	Voucher specimen no.	Used part	Antibacterial activity of microorganisms <sup>a</sup>					
			<i>Lf</i>	<i>Ls</i>	<i>Ss</i>	<i>Sm</i>	<i>Aa</i>	<i>Fn</i>
<b>Lamiaceae:</b>								
<i>Mentha cordifolia</i> Opiz.	SKP 095130301	Leaf	-	n.d.	-	-	-	-
<i>Ocimum africanum</i> L.	SKP 095150101	Aerial parts	-	n.d.	-	-	-	-
<i>Ocimum basilicum</i> Lour.	SKP 095150201	Aerial parts	-	n.d.	-	-	-	-
<i>Ocimum sanctum</i> L.	SKP 095151901	Aerial parts	-	n.d.	-	-	-	-
<b>Piperaceae:</b>								
<i>Piper betle</i> L.	SKP 146160201	Leaf	++	++	+++	+++	++	+++
<i>Piper chaba</i> Hunter	SKP 146160301	Fruit	-	-	-	-	-	+
<i>Piper nigrum</i> L.	SKP 146161401	Fruit	-	-	-	-	-	+
<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	SKP 146161906	Leaf	-	-	-	-	-	++
<b>Zingiberaceae:</b>								
<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.	SKP 206010701	Rhizome	-	-	-	+	++	++
<i>Curcuma longa</i> L.	SKP 206031201	Rhizome	-	-	-	+	-	++
<i>Curcuma zedoaria</i> Roscoe	SKP 206032601	Rhizome	-	-	-	+	-	++
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	SKP 206261501	Rhizome	-	-	+	-	-	++
+, 0 < zone < 10 mm; ++, 10 mm ≤ zone < 20 mm; + + +, 20 mm ≤ zone; -, absence of inhibition zone								
<sup>a</sup> microorganisms: <i>Lf</i> – <i>L. fermentum</i> ATCC 14931; <i>Ls</i> – <i>L. salivarius</i> ATCC 11741; <i>Ss</i> – <i>S. sobrinus</i> ATCC 33478; <i>Sm</i> – <i>S. mutans</i> ATCC 25175; <i>Aa</i> – <i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384; <i>Fn</i> – <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586, n.d. – not determined								

**Table 2.** MIC and MBC of *P. betle* extracts against oral microorganisms

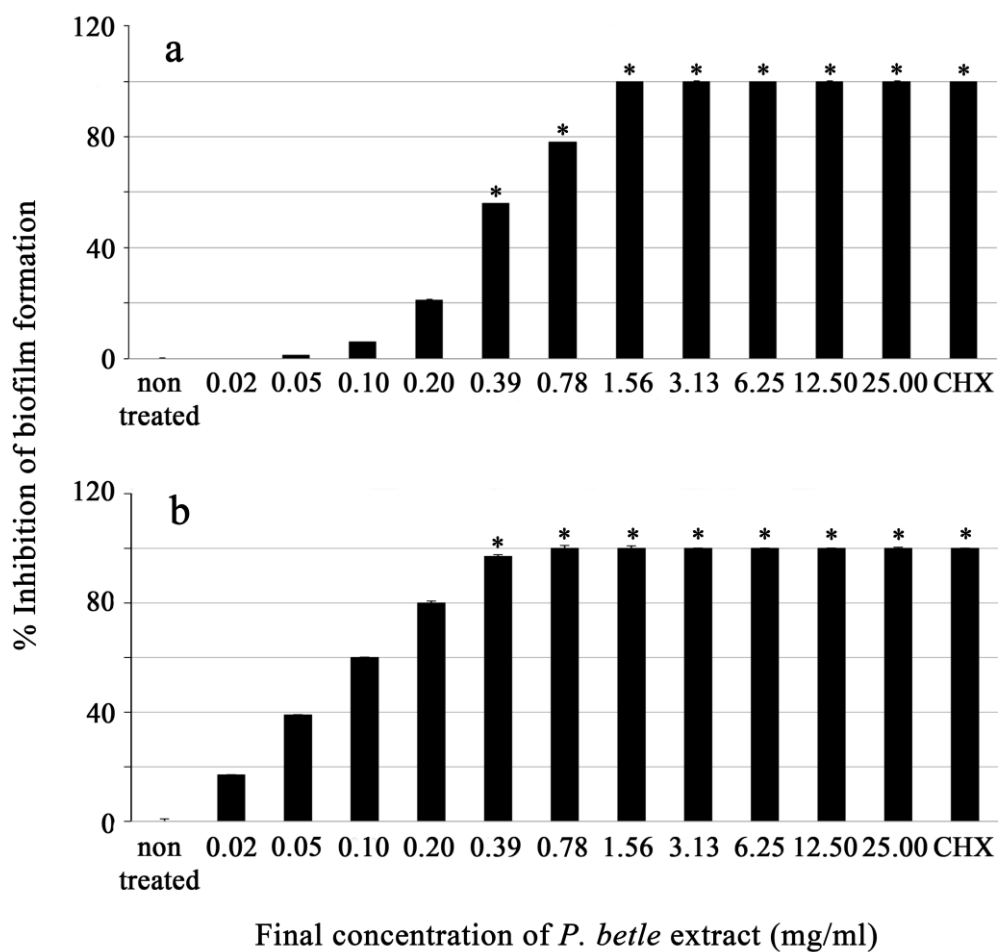
Microorganisms	Concentration of extract (mg/ml)	
	MIC	MBC
<b>Gram positive bacteria:</b>		
<i>L. fermentum</i> ATCC 14931	4.17 ± 1.80	8.33 ± 3.61
<i>L. salivarius</i> ATCC 11741	4.17 ± 1.80	8.33 ± 3.61
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	1.56 ± 0.00	4.17 ± 1.80
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	1.56 ± 0.00	1.56 ± 0.00
<b>Gram negative bacteria:</b>		
<i>A. actionmycetemcomitans</i> ATCC 33384	1.04 ± 0.45	2.08 ± 0.90
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	1.30 ± 0.45	2.08 ± 0.90

MIC – the minimum inhibitory concentration

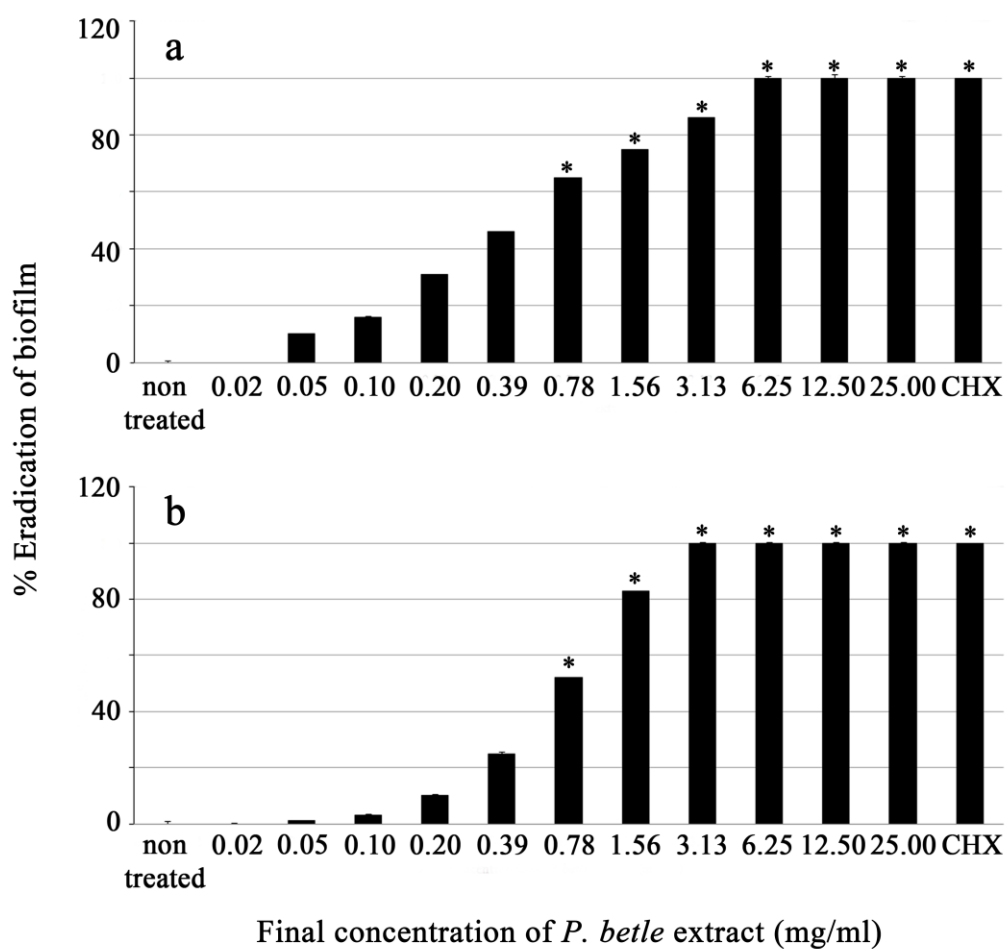
MBC – the minimum bactericidal concentration



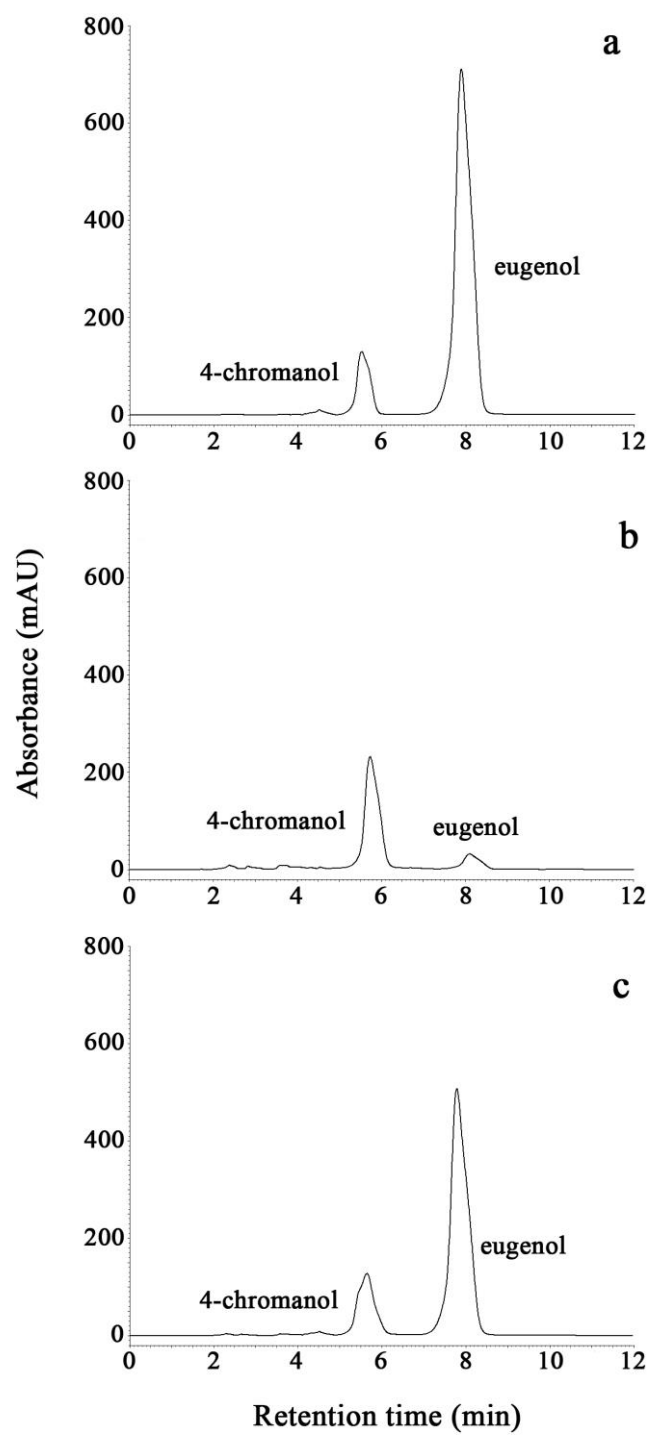
**Figure 1.** Time-kill curves of *S. mutans* ATCC 25175 (a) and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 (b) at different concentrations of *P. betle* extract: 0xMIC (△), 1xMIC (▼), 2xMIC (○) and 4xMIC (●); 0.1 % (w/v) CHX (■); CFU, Colony Forming Units



**Figure 2.** Inhibition of biofilm formation of *S. mutans* ATCC 25175 (a) and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 (b) by *P. betle* extract at various concentrations, 0.1 % (w/v) CHX was used as control. Error bars indicate standard deviations; n=6. \*, significant differences (compared to the non-treated control)  $P < 0.05$

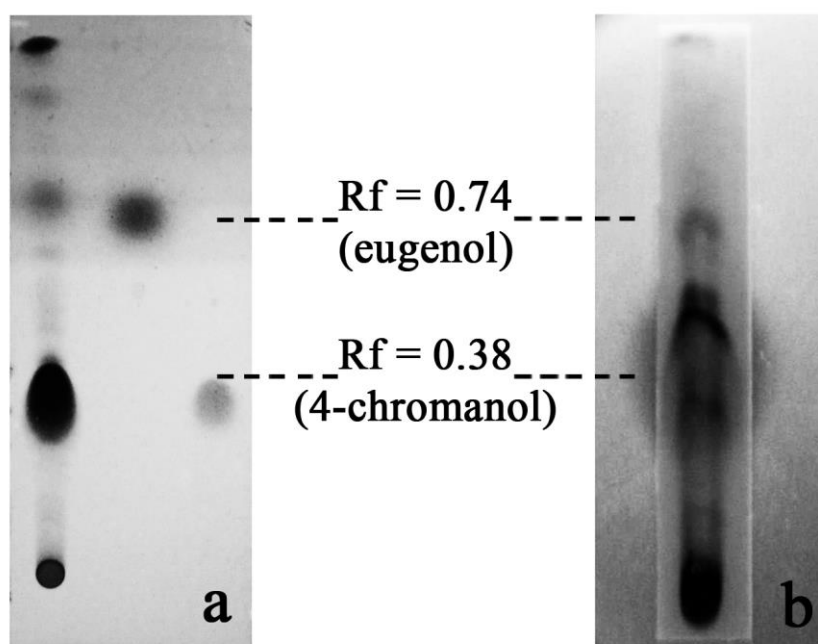


**Figure 3.** Eradication of biofilm formation of *S. mutans* ATCC 25175 (a) and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 (b) by *P. betle* extract at various concentrations, 0.1 % (w/v) CHX was used as control. Error bars indicate standard deviations; n=6. \*, significant differences (compared to the non-treated control)  $P < 0.05$



**Figure 4.** HPLC chromatograms of the standards; 4-chromanol and eugenol (a), *P. betle* leaf extract (b), and the mixture of the standards and *P. betle* extract (c)





**Figure 5.** TLC fingerprinting (a) and TLC-bioautography against *S. mutans* ATCC 25175 (b) of *P. betle* leaf extract

