



การต้านเชื้อจุลินทรีย์และการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา  
ต่อเชื้อก่อโรคในช่องปาก

Antimicrobial Activity and Antibiofilm of *Artocarpus lakoocha* Extract  
Against Oral Pathogens

สุกัลยา เสนาพงศ์  
Sukunlaya Senapong

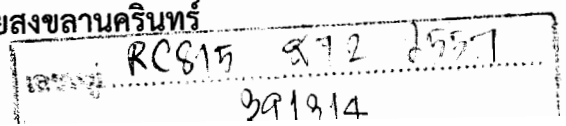
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการสุขภาพช่องปากประยุกต์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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



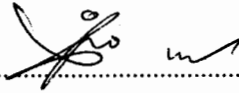
ชื่อวิทยานิพนธ์ การต้านเชื้อจุลชีพและการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส  
ลาคุซา ต่อเชื้อก่อโรคในช่องปาก  
ผู้เขียน นางสาวสุกัลยา เสนาพงศ์  
สาขาวิชา วิทยาการสุขภาพช่องปากประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก



(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เกียรติไพศาล)

คณะกรรมการสอบ




.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

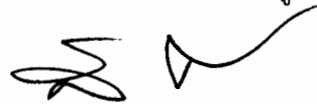


(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินดาพร ภูมิพัฒนางษ์)

(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เกียรติไพศาล)



.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินดาพร ภูมิพัฒนางษ์)

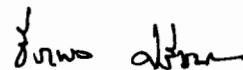


.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สนั่น ศุภธีรสกุล)



.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฉัตรชัย วัฒนากิริมย์สกุล)


บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการสุขภาพช่องปากประยุกต์



.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

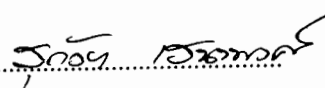
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลงานมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความ  
ขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....  .....

(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เกียรติไพศาล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....  .....

(นางสาวสุกัลยา เสนาพงศ์)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....*สุวิมล เสนาพงศ์*.....

(นางสาวสุกัญญา เสนาพงศ์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การต้านเชื้อจุลชีพและการต้านการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ต่อเชื้อก่อโรคในช่องปาก
ผู้เขียน	นางสาวสุกัลยา เสนาพงศ์
สาขาวิชา	วิทยาการสุขภาพช่องปากประยุกต์
ปีการศึกษา	2556

### บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ และต้านไบโอฟิล์มของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ต่อเชื้อก่อโรคในช่องปาก โดยใช้รูปแบบการทดสอบในหลอดทดลอง การทดสอบที่ใช้การศึกษาได้แก่ การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยดูจากขนาดของโซนการยับยั้งโดยวิธี Agar well diffusion method การหาปริมาณของสารต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) และหาปริมาณของสารต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MLC) ด้วยวิธี Broth dilution method ซึ่งอ้างอิงวิธีตามมาตรฐาน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) จากนั้นประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดระหว่างความเข้มข้นต่อเวลาที่ใช้ในการฆ่าหรือยับยั้งเชื้อ โดยการทดสอบ Time kill assay และศึกษาประสิทธิภาพการต้านเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มโดยใช้วิธี 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide (MTT) assay จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดมีความไวต่อสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา สังเกตได้จากโซนใสของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งนี้สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อ *Candida* spp. โดยช่วงของความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากการศึกษาก่อนหน้าของห้องปฏิบัติการอยู่ระหว่าง 0.10 ถึง 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วงความเข้มข้นของการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) อยู่ระหว่าง 0.10 ถึง 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า MIC ของเชื้อ *Candida* spp. อยู่ระหว่าง 0.05 ถึง 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นในการฆ่าเชื้อรา (MFC) อยู่ระหว่าง 0.10 ถึง 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดและระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา มีฤทธิ์ต้านเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม โดยสามารถป้องกันการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อและยังกำจัดเชื้อที่อยู่ในรูปของไบโอฟิล์มได้ จากผลการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นว่าสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา เป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคในช่องปากได้ อาจนำไปใช้สำหรับการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในช่องปากที่มีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปาก ซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคฟันผุ โรคปริทันต์อักเสบและ/หรือโรคเชื้อราในช่องปาก

Thesis Title	Antimicrobial Activity and Antibiofilm of <i>Artocarpus lakoocha</i> Extract Against Oral Pathogens
Author	Miss Sukunlaya Senapong
Major Program	Applied Oral Health Sciences
Academic Year	2013

### ABSTRACT

This study aimed to investigate the antimicrobial and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract against oral pathogens by in vitro study. Antimicrobial activity of *A. lakoocha* extract was performed using an agar well diffusion method. Minimum inhibition concentration (MIC) and minimal lethal concentration (MLC) were assessed using a microdilution method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). A time kill assay was also determined. Antibiofilm activity was investigated using a 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide (MTT) assay. It was shown that all tested strains were susceptible to *A. lakoocha* extract with variable degrees of inhibition zones. The extract was found to be effective against both bacteria and *Candida* species. Previous study showed MIC ranging of bacteria from 0.10 to 0.39 mg/ml and minimum fungicidal concentration (MBC) from 0.10 to 3.12 mg/ml. In this study result showed that *Candida* spp. MIC ranged from 0.05 to 3.12 mg/ml and minimum fungicidal concentration (MFC) ranged from 0.10 to 25 mg/ml. The killing activity depended on the time and concentrations of the extract. *A. lakoocha* extract acts as a potent antibiofilm agent with dual actions, preventing biofilm formation and eradication the existing biofilm. Results suggest that *A. lakoocha* extract is a potential source of natural anti-oral pathogenic bacterial agent, which may be useful for prevention or treatment of oral infectious diseases caused by certain oral pathogens associated to dental caries, periodontal diseases and/or candidiasis.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องด้วยได้รับความช่วยเหลือและสนับสนุนจากหน่วยงานรวมทั้งบุคคลหลายฝ่ายด้วยกัน ในโอกาสนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. รวี เกียรติไพศาล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ อีกทั้งยังแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ จนข้าพเจ้าสามารถทำงานวิจัยครั้งนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล ทวีชัยสุภพงษ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สนั่น ศุภธีรสกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และแก้ไขข้อบกพร่อง ในการเขียนวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่คอยอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ทั้งในด้านวิชาการ และด้านคุณธรรมจริยธรรม

ขอขอบพระคุณผู้ให้ทุนการศึกษาต่างๆที่ได้รับตลอดการเรียนวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตครั้งนี้ ซึ่งได้แก่ ทุนบัณฑิตศึกษาภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ และทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษาส่วนต่างสำหรับหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาการสุขภาพช่องปากประยุกต์

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรของภาควิชาโณษฐวิทยาและภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ แนะนำแนวทางในการปฏิบัติ และอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ นักศึกษาปริญญาเอกและโทในห้องปฏิบัติการภาควิชาโณษฐวิทยาทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางในการปฏิบัติงาน คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจเวลาที่เหน็ดเหนื่อยท้อแท้ตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สุดท้ายขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคนที่คอยให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ	(11)
เอกสารรับรองการอนุญาตให้แนบบทความตีพิมพ์และบทความในการประชุมวิชาการ ลงในวิทยานิพนธ์	(12)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	9
วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดสอบ	10
วิธีทดสอบ	12
ผลการทดสอบ	23
บทวิจารณ์	31
สรุป	33
บรรณานุกรม	34
ภาคผนวก	40
ก บทความวิจัยที่ส่งตีพิมพ์ในวารสาร Tropical Journal of Pharmaceutical Research	41
ข บทความวิจัยที่ส่งตีพิมพ์ในวารสาร Songklanakarin Journal of Science and Technology	49
ค บทความวิจัยที่นำเสนอในงานประชุมวิชาการ	57
ง การเตรียม 0.5 McFarland Standard	63
จ การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี	64
ประวัติผู้เขียน	67



## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงฤทธิ์ของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคในช่องปากเบื้องต้น	4
2	แสดงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของเชื้อที่ทดสอบแต่ละชนิด	11
3	แสดงฤทธิ์ของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ในการยับยั้งเชื้อเชื้อ <i>Candida</i> spp.	24

## รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของ oxyresveratrol	6
2	แสดงวิธีทดสอบหาปริมาณของสารต่ำสุดที่ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และหาปริมาณของสารต่ำสุดที่ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์	15
3	แสดงสีที่ได้จากการทดสอบ MTT assay ของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา	22
4	แสดงโซนของการยับยั้ง โดยวิธี Agar well diffusion assay	25
5	แสดงผลของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ในการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี Time-kill curves assay	26
6	แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดในลักษณะทางกายภาพของเชื้อจุลินทรีย์	27
7	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ที่ความเข้มข้นต่างๆและความเข้มข้นคลอเฮ็กซิดีน 0.1 กรัมเปอร์เซ็นต์ ต่อเชื้อจุลินทรีย์	29
8	แสดงเปอร์เซ็นต์การกำจัดไบโอฟิล์มของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ที่ความเข้มข้นต่างๆ และความเข้มข้นคลอเฮ็กซิดีน 0.1 กรัม เปอร์เซ็นต์ ต่อเชื้อจุลินทรีย์	30

## รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ

1. Teanpaisan R, Senapong S and Puripattanavong J. *In vitro* antimicrobial and antibiofilm activity of *Artocarpus Lakoocha* (Moraceae) extract against some oral pathogens. *Trop J Pharm Res* 2014; 13(7): 1149-1155.
2. Senapong S, Puripattanavong J and Teanpaisan R. Anticandidal and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract. *Songklanakarin J Sci Technol* 2014; 36 (4): 451-457.
3. Senapong S, Puripattanavong J, Teanpaisan R. Antifungal and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract against *Candida* spp. Proceedings of 11th Dental Faculty Consortium of Thailand Academic Meeting and Research Presentation (DFCT2013); 2013. May 7-9; Chonburi, Thailand. p. 138-141.

เอกสารรับรองการอนุญาตให้แนบบทความตีพิมพ์และบทความในการประชุมวิชาการลงใน  
วิทยานิพนธ์

# TJPR

## Tropical Journal of Pharmaceutical Research Official Online Journal of Pharmacotherapy Group (Gruppe Pharmacotherapie)

<sup>c/o</sup> Faculty of Pharmacy, University of Benin, Benin City, Nigeria  
Tel: +234-805-5263622 Email: editor@tjpr.org URL: <http://www.tjpr.org>

### Permission to Reproduce Published Article

**Purpose of request:** Reproduce published article in University thesis report  
**Request made by:** Sukunlaya Senapong

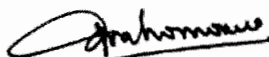
#### Article Information

**Article type:** Original Article  
**Title:** *In vitro* Antimicrobial and Antibiofilm Activity of *Artocarpus Lakoocha* (Moraceae) Extract against Some Oral Pathogens  
**Author(s):** Rawee Teanpaisan<sup>1\*</sup>, Sukunlaya Senapong<sup>1</sup> and Jindaporn Puripattanavong<sup>2</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  
\*For correspondence: Email: rawee.t@psu.ac.th; Tel: +66 74 429878; Fax: +66 74 212922  
**Volume/issue:** 13 no 7 (July)  
**Year:** 2014  
**Pages:** 1149-1155  
**DOI:** <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v13i7.20>

**Permission status:**  Approved  Not approved  
**Condition:**  Single use  Multiple use

#### Authorised signature

Editor, Trop J Pharm Res



Prof Patrick O Erah  
Department of Clinical Pharmacy & Pharmacy Practice  
University of Benin, Benin City  
Email: [patrick.erah@uniben.edu](mailto:patrick.erah@uniben.edu)  
Tel: +234 805 526 3622



**AGREEMENT IN RELATION TO REPRODUCE  
AN ARTICLE FOR SONGKLANAKARIN JOURNAL  
OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (SJST)**

This is an agreement between Songklanakarin Journal of Science and Technology (Publisher) and Miss. Sukunlaya Senapong (Author). The publisher grants you a permission to reproduce an article published in SJST for your academic purpose as mentioned below.

**Publisher contact**

Songklanakarin Journal of Science and Technology,  
Research and Development Office, Prince of Songkla University,  
Hat Yai, Songkhla, 90110 Thailand.

**Author contact**

Address: Common Oral Diseases and Epidemiology Research Center,  
Department of Stomatology, Faculty of Dentistry  
Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand  
Phone: +66 7428 7582 Fax: +66 7421 2922  
Email: fonsukunlaya@gmail.com

**Author status**

I am the sole author of the article.

I am one author on behalf of all co-author of the article.

**Authorized Article to Reproduce**

Issue Date: August 26, 2014  
Manuscript Type: Original Article  
Title: Anticandidal and antibiofilm activity of Artocarpus lakoocha extract  
Author (s): Sukunlaya Senapong, Jindaporn Puripattanavong, and Rawee Teanpaisan  
Volume: 36  
No.: 4 (Jul. – Aug.)  
Year: 2014  
Start Page: 451  
End Page: 457  
Number of pages: 7  
Type of Use: Reuse / Reprint in a thesis  
Portion: Full Article  
Format: Print and Electronic

.....



หนังสือรับรองฉบับนี้ให้ไว้เพื่อรับรองว่า นางสาวสุกัญญา เสนาพงศ์ ได้นำเสนอผลงานเรื่อง Antifungal and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract against *Candida* spp. ในการประชุมวิชาการองค์กรผู้บริหารคณะทันตแพทยศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 11 (The 11<sup>th</sup> Dental Faculty Consortium of Thailand Academic Meeting and Research Presentation – DFCT 2013) ระหว่างวันที่ 7 – 9 พฤษภาคม พ.ศ. 2556 ณ โรงแรม พูลแมน พัทยา จังหวัดชลบุรี จัดโดย องค์กรผู้บริหารคณะทันตแพทยศาสตร์แห่งประเทศไทย และ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และได้รับอนุญาตให้แนบผลงานในวิทยานิพนธ์

ออก ณ วันที่ 4 พฤศจิกายน 2556

(ศาสตราจารย์ทันตแพทย์ ดร. สิทธิชัย ชุนทองแก้ว)  
คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

โรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่พบได้บ่อยในช่องปาก โดยโรคฟันผุเกิดจากการสูญเสียแร่ธาตุ (Remineralization) จนทำบริเวณผิวเคลือบฟัน (Enamel) หรือส่วนเนื้อฟันชั้นใน (Dentin) ถูกทำลายก่อให้เกิดร่องฟันลึก รุ หรืออาจลามไปถึงบริเวณรากฟัน (Pulp) ส่วนโรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะรอบๆ ตัวฟัน เช่น เหงือก เนื้อเยื่อปริทันต์ (เนื้อเยื่อส่วนที่ยึดรากฟัน) และคลองรากฟัน เป็นต้น สาเหตุของโรคฟันผุและโรคปริทันต์ส่วนมากเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของโรคฟันผุที่สำคัญได้แก่เชื้อ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* ส่วนแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของโรคปริทันต์อักเสบได้แก่เชื้อ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* และ *Tannerella forsythia*<sup>1,2</sup> เป็นต้น นอกจากนี้ที่กล่าวข้างต้นแล้วการติดเชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic Infections-OIs) ก็เป็นอีกหนึ่งปัญหาที่พบเจอได้บ่อยๆ และมีอุบัติการณ์ที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ได้แก่ โรคราในปาก (Candidiasis) ส่วนมากมักพบในผู้ป่วยโรคเอดส์ ผู้ติดเชื้อเอชไอวี หรือผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเป็นหลัก ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วย<sup>3</sup> และอาจพบได้ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยเบาหวาน หรือผู้ที่ได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน เชื้อที่เป็นสาเหตุหลักของโรคราในช่องปากได้แก่ เชื้อราในกลุ่ม *Candida* spp. ซึ่งปกติเชื้อชนิดนี้จะพบได้ทั่วไปในร่างกายมนุษย์บริเวณผิวหนัง ทางเดินหายใจ ทางเดินอาหารและระบบสืบพันธุ์ สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อได้บ่อยคือ *Candida albicans* แต่ก็มีพบ *Candida* สายพันธุ์อื่นๆ (non-*C. albicans*) ได้ประปราย เช่น เชื้อ *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* และ *C. krusei*<sup>4</sup> ซึ่งปัจจุบันมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะเชื้อ *C. dubliniensis* และ *C. glabrata* จะพบเจอได้บ่อยขึ้นในผู้ป่วยโรค Candidiasis<sup>5</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราในกลุ่ม non-*C. albicans* ยังมีอุบัติการณ์การติดต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะเชื้อ *C. glabrata* และ *C. krusei* มีอัตราการติดต่อยาฟลูโคนาโซล (fluconazole) อย่างเห็นได้ชัด<sup>6, 7</sup> อาการโดยทั่วไปของผู้ป่วยที่เป็นโรคราในช่องปาก ผู้ป่วยจะปรากฏเยื่อขาวๆ หรือเหลืองอ่อนบริเวณลิ้น กระพุ้งแก้ม เรียกว่า ซาง ทำให้ผู้ป่วยรู้สึกไม่สบายบริเวณช่องปากและลำคอ อาจมีอาการอักเสบร่วมด้วย บางครั้งเชื้อ *Candida* spp. จะรุกรานไปสู่อวัยวะภายในซึ่งอาจเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตได้

สารที่ใช้ในการรักษาและป้องกันโรคในช่องปาก ได้แก่ คลอเฮกซิดีน (chlorhexidine; CHX) ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์ตั้งแต่ พ.ศ. 2497<sup>8</sup> คลอเฮกซิดีนมีประจุบวก มีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียแกรมลบและไวรัสบางชนิดมีฤทธิ์ปานกลาง (ยกเว้นเชื้อวัณโรคจะฤทธิ์น้อย) และจะมีผลเล็กน้อยต่อเชื้อรา (ยกเว้นได้ผลดีต่อ *Candida*) ในการออกฤทธิ์คลอเฮกซิดีนจะไปทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งมีประจุลบที่ความเข้มข้นต่ำสารจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต โดยไปรบกวนการผ่านเข้าออกของสารที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการรั่วของสาร และหากใช้ความเข้มข้นสูงขึ้นสารจะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยสารจะเข้าไปภายในเซลล์ของเชื้อและตกตะกอนสารต่างๆ ในไซโตพลาสซึมทำให้เซลล์ตาย<sup>9, 10</sup> ในทางปฏิบัตินิยมใช้คลอเฮกซิดีนในการฆ่าเชื้อในช่องปากและเตรียมการผ่าตัด โดยความเข้มข้นที่ใช้ในทางทันตกรรม คือ 0.2 และ 1.2 กรัมเปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นที่ใช้เป็นน้ำยาบ้วนปากในการทำ mouth care คือ 0.12 กรัมเปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่าคลอเฮกซิดีนจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ดี แต่ก็มีข้อเสีย คือ อาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อเหงือกและเนื้อเยื่อในช่องปาก มีรสขม และหากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานอาจทำให้การเปลี่ยนสีของลิ้นและฟันได้<sup>11, 12</sup>

สารอีกชนิดที่นิยมใช้ในการปกป้องโรคฟันผุได้แก่ฟลูออไรด์ (Sodium fluoride; NaF) เป็นสารที่มีประจุลบ ฟลูออไรด์จะทำปฏิกิริยากับแคลเซียม (Calcium) โดยเปลี่ยนผลึกของเคลือบฟันไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite) ไปเป็นฟลูออโรอะพาไทต์ (Fluoroapatite) และไฮดรอกซีฟลูออโรอะพาไทต์ (Hydroxyfluoroapatite) ซึ่งมีความเสถียรต่อการกัดกร่อนของกรด นอกจากนี้ยังเป็นตัวส่งเสริมให้เกิดการสะสมแร่ธาตุกลับคืนมา (Remineralization) และยับยั้งการละลายตัวของแร่ธาตุ (Demineralization) ของตัวฟัน จากการศึกษาผลเสียและผลข้างเคียงของการใช้ฟลูออไรด์พบว่า การใช้ฟลูออไรด์อาจทำให้เกิดได้ทั้งผลข้างเคียงชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของฟลูออไรด์และระยะเวลาที่ได้รับ โดยปัญหาที่พบมากที่สุด ในช่องปาก คือ เด็นทอล ฟลูออโรซิส (dental fluorosis) หรือฟันตกกระ ภัยที่มีความเสี่ยงค่อนข้างสูงคือ ภัยเด็ก ดังนั้นการใช้ฟลูออไรด์ในเด็กจึงเป็นสิ่งที่ต้องระมัดระวังเป็นอย่างยิ่ง

นอกจากที่กล่าวมาแล้วการใช้ยาปฏิชีวนะยังเป็นอีกทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อในช่องปาก เช่น กานามายซิน (Kanamycin) แวนโคมายซิน (Vancomycin) เอ็มโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) เป็นต้น แต่การใช้ยาปฏิชีวนะโดยไม่เลือกหรือใช้เป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดการปรับตัวของเชื้อจุลินทรีย์จนเกิดการดื้อต่อยาได้ หรืออาจส่งผลให้เชื้อที่มีอยู่เดิมหรือเชื้อประจำถิ่นลดจำนวนลงทำให้เชื้อดื้อยาและเชื้อฉวยโอกาสสามารถเข้ามาแทนที่และเมื่อมีปริมาณที่มากก็สามารถทำให้เกิดโรคในช่องปากได้ เช่น การติดเชื้อ *Candida albicans* ในผู้ป่วยที่ใช้ยาเตตราซัยคลินเป็นเวลานาน<sup>13</sup> การศึกษาและพัฒนาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค เพื่อใช้แทนสารเคมีและยา



ปฏิกิริยาจะเป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์ มีหลายๆ การศึกษาพบว่าสารประกอบในสารสมุนไพรมีฤทธิ์ในการต้านความเจ็บป่วย รวมถึงใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อได้เป็นอย่างดี ประกอบกับในปัจจุบันเชื้อจุลินทรีย์มีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น และน่าจะมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นด้วย หลายการศึกษาพบว่าสารหลายๆ ชนิดในสมุนไพรมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา ดังนั้นความพยายามในการหาสมุนไพรมือช่วยลดอันตรายจากผลข้างเคียงของสารเคมีและยาปฏิชีวนะ และใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตตัวยาชนิดใหม่จึงเป็นที่สนใจมากยิ่งขึ้น

อาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) หรือมะหาดเป็นไม้ยืนต้นอยู่ในวงศ์ Moraceae มีต้นกำเนิดมาจากทวีปเอเชียใต้ พบขึ้นตามป่าดงดิบถึงป่าเบญจพรรณชื้น ลำต้นมีขนาดกลางถึงใหญ่ สูงประมาณ 15-25 เมตร เป็นไม้ผลัดใบ เปลือกนอกสีเทาถึงน้ำตาลปนดำแตกเป็นสะเก็ดเล็กๆ ถ้าสับเปลือกจะมียางสีขาวหรือขาวปนเหลืองซีมออกมา ในประเทศไทยพบบริเวณภาคตะวันออกเฉียงใต้ ภาคตะวันตกเฉียงใต้ และภาคใต้ ซึ่งสูงจากระดับน้ำทะเล 100 ถึง 400 เมตร<sup>14</sup> ชื่อที่เป็นเครื่องยาของมะหาดเรียกว่า “ปวกหาด” เตรียมได้จากการนำเอาแก่นหรือเปลือกไม้มะหาดสับเป็นชิ้นเล็กๆ ต้มคั้นกับน้ำจนเกิดฟอง ช้อนฟองใส่ในผ้าขาวบาง ทำให้สะเด็ดน้ำ แล้วนำมาตากให้แห้งจะได้ผงสีน้ำตาลจับกันเป็นก้อน จากนั้นนำไปย่างไฟจนเหลืองเรียกก่อนที่ได้นี้ว่า “ปวกหาด”<sup>15</sup>

ห้องปฏิบัติการภาควิชาโษษุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคในช่องปากพบว่าสารสกัดจากต้นอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปากได้ดังตารางที่ 1 ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ให้ละเอียดยิ่งขึ้นจึงเป็นที่น่าสนใจอย่างมาก เพื่อเป็นหนึ่งในตัวเลือกที่จะนำมาใช้แทนสารเคมีหรือยาปฏิชีวนะและต่อยอดการศึกษาเดิมที่มีอยู่ ซึ่งอาจลดผลข้างเคียงหรือเพิ่มประสิทธิภาพของสารที่ใช้อยู่เดิมได้

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคในช่องปากเบื้องต้น

สารพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์	โซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
		MIC	MBC
<b>เชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวก</b>			
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	30.5±0.00	0.10±0.00	0.20±0.00
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	16.0±0.35	0.39±0.00	1.56±0.00
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	18.2±0.00	0.39±0.00	3.12±0.00
<i>L. fermentum</i> ATCC 14931	17.7±0.35	0.39±0.00	0.78±0.00
<i>L. salivarius</i> ATCC 11741	15.0±1.41	0.10±0.05	0.78±0.00
<b>เชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ</b>			
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	21.0±1.41	0.10±0.05	0.10±0.00
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	30.5±0.70	0.20±0.05	0.20±0.00
<i>P. nigrescens</i> ATCC 25261	25.5±0.70	0.39±0.00	0.39±0.00
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	30.7±0.35	0.10±0.00	0.20±0.00
<i>T. forsythia</i> ATCC 43037	29.0±0.00	0.10±0.00	0.20±0.00
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384	29.5±2.12	0.10±0.00	0.20±0.00

ที่มา: ข้อมูลจากห้องปฏิบัติการของภาควิชาโอบุสสุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

#### การทบทวนวรรณกรรม

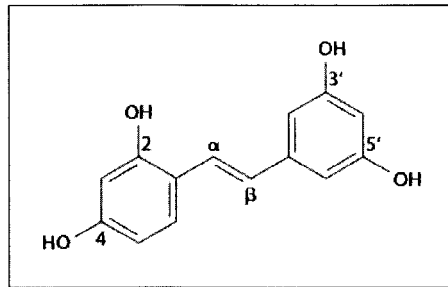
อาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา เป็นพืชสมุนไพรที่พบทั่วไปในประเทศไทย มีการนำส่วนต่างๆ ของต้นอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา มาใช้ประโยชน์ในหลายๆด้านทั้งการก่อสร้าง การเลี้ยงสัตว์ หรือทางยาพื้นบ้าน เช่น ปวดทนต์ได้ถูกนำมาใช้เป็นยาในการถ่ายพยาธิไส้เดือน พยาธิตัวตืด แก้ก้องอืดเพื้อ แก้กะษัย แก้กืออาหาร แก้กะษายน้ำ แก้กือในท้อง แก้กปวด แก้กลม ขับโลหิต แก้กือสวะระกะปรืดระปรอย หรือนำมวงมาละลายกับน้ำทาแก้กือผื่นคัน ซึ่งได้มีการศึกษายืนยันแล้วว่าสารสกัดจากแก่นต้นอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา มีฤทธิ์ต่อพยาธิใบไม้<sup>16</sup> และพยาธิตัวตืด<sup>17</sup> ปริมาณที่เหมาะสมในการรักษาพยาธิตัวตืด คือ 3 กรัม ถึงแม้จะมีอาการคลื่นไส้บ้าง แต่กือเพียงเล็กน้อยอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ทั้งนี้ ในต้นอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา จะมีสารธรรมชาติหลากหลายกลุ่ม หลายชนิด และมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันออกไป เช่น กลุ่มสารฟลโวนอยด์ (flavonoids) กลุ่มสารสติลบินอยด์ (stilbenoids) กลุ่มสารไตรเทอร์พินอยด์ และ กลุ่มสเตียรอยด์ (triterpenoids and steroids) เป็นต้น แต่

สารประกอบหลักมีปริมาณที่สูงและสำคัญที่สุดในแก่นของต้นอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา คือ oxyresveratrol (2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารสตีลบินอยด์<sup>18</sup> โครงสร้างโมเลกุลแสดงดังในรูปที่ 1 สารชนิดนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญมากมาย โดยในการศึกษาฤทธิ์ของ oxyresveratrol พบว่ามีคุณสมบัติเป็น antioxidants โดยสารจะมีฤทธิ์ปานกลางในการต้าน superoxide anion radical, free radical, singlet oxygen และสามารถยับยั้ง lipid oxidation ในสมองของหนูและไมโครโซม (microsome) ของหนูได้<sup>19, 20</sup> นอกจากนี้สาร oxyresveratrol ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการสร้างสารเม็ดสีดำหรือน้ำตาลในผิวหนังและเส้นผม<sup>21-23</sup> และจากการวิจัยนี้เองนักวิทยาศาสตร์หลายท่านจึงเน้นความสนใจไปในด้านเครื่องสำอางช่วยให้ผิวขาว ซึ่งพบว่าสาร oxyresveratrol จากสกัดของแก่นต้นอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา มีฤทธิ์ช่วยให้ผิวขาวขึ้นได้จริง<sup>23</sup> และยังมีการศึกษาฤทธิ์ของ oxyresveratrol ในด้านการต้านเชื้อไวรัสพบว่าสารมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัสเริม (herpes simplex virus; HSV)<sup>24, 25</sup>, เชื้อไวรัสอีสุกอีใส-งูสวัด (varicella-zoster virus; VZV)<sup>26</sup>, เชื้อไวรัสเอชไอวี (human immunodeficiency virus type 1; HIV-1/LAI)<sup>24</sup> ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของต้นอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา พบว่าสารสกัดจากแก่นที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. aureus* และ *Mycobacterium smegmatis*<sup>27</sup> สารสกัดของรากมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ได้<sup>28</sup> และสารสกัดจากเปลือกมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonii* และเชื้อ *Escherichia coli*<sup>29</sup> ทั้งนี้ยังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida* spp. ของสาร oxyresveratrol และสกัดจากต้นอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา

ทางด้านความเป็นพิษพบว่าสาร oxyresveratrol ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ microglial N-9 cell ยกเว้นหากเซลล์ถูกกระตุ้นอย่างสูงซึ่งเป็นสถานะให้เกิดการเสื่อมที่ระบบประสาท และจากการศึกษานี้สรุปได้ว่าสาร oxyresveratrol ไม่มีพิษต่อเซลล์ปกติและจะมีฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเซลล์ที่ถูกกระตุ้นอย่างมากเท่านั้น ทั้งนี้สารอาจมีฤทธิ์ในการปกป้องหรือยับยั้งการตายของเซลล์คนหรือสัตว์ได้ด้วย<sup>30</sup> ในปี ค.ศ. 2004 Andrabi และคณะ<sup>31</sup> ได้ศึกษาฤทธิ์ของสาร oxyresveratrol ในการยับยั้งการเกิด apoptosis ของเซลล์ประสาทสมองที่มีภาวะเส้นเลือดตีบตัน (cerebral ischemia) พบว่าสาร oxyresveratrol ไม่มีผลกระทบต่อระบบประสาทของสัตว์ที่ไม่มีภาวะ ischemia และยังช่วยลดการตายของเซลล์ประสาทได้อีกด้วย โดยขนาดที่เหมาะสมในการใช้คือ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เช่นเดียวกับ Ban และคณะ<sup>32</sup> พบว่าสาร oxyresveratrol ป้องกันการตายของเซลล์ประสาทได้ จากการทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา พบว่าสารสกัดไม่ได้ทำให้เกิดการระคายเคืองและอาการแพ้ที่ผิวหนัง<sup>33</sup> นอกจากนี้ได้มีการศึกษาพบว่าสาร oxyresveratrol มีฤทธิ์ชะลอการเกิดแผลที่ผิวหนังและในช่องปากของสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อ HSV ได้<sup>34</sup>

๒๕

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากต้นอาร์โศคาร์ปัส ลาคูชา นั้นมีประโยชน์มากมายหลาย ๆ ด้าน จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาประสิทธิภาพเพิ่มเติม เพื่อผลิตสารที่มีประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์และอุตสาหกรรม การคัดเลือกสมุนไพรมาศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ส่วนมากจะเน้นคัดเลือกสมุนไพรต้านเชื้อที่สนใจ ซึ่งการทดสอบหาประสิทธิภาพของสารสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น การทดสอบคุณภาพของสารเบื้องต้นโดยวัดจากความไวของเชื้อต่อสารที่ทดสอบ จากโชนการยับยั้งที่เกิดจากการแพร่กระจายของสารทดสอบในอาหารเชื้อชนิดแข็ง, การทดสอบทำโดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (minimal inhibitory concentration; MIC) และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ 99.9 เปอร์เซ็นต์ (Minimal lethal concentration; MLC) หรือค่า MBC (minimal bactericidal concentration) กรณีที่เป็นเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรียหรือค่า MFC (minimal fungicidal concentration) กรณีที่เชื้อทดสอบเป็นเชื้อรา การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารทดสอบกับระยะเวลาที่ใช้ในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อโดยการทดสอบ Time-kill curves assay การศึกษาต่างๆ เหล่านี้ล้วนมีประโยชน์สำหรับใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของสารทั้งสิ้น



รูปที่ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของ oxyresveratrol<sup>35</sup>

สถาบันสุขภาพแห่งชาติของประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่าโรคที่เกิดจากการติดเชื้อกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ เกี่ยวข้องกับเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในรูปไบโอฟิล์ม<sup>36</sup> ไบโอฟิล์ม (biofilm) หมายถึง การสะสมตัวของกลุ่มจุลินทรีย์หรือชุมชนจุลินทรีย์ที่หลากหลายชนิดที่มีการเกาะกลุ่มอยู่บนพื้นผิวใดพื้นผิวหนึ่ง โครงสร้างของไบโอฟิล์มจะเป็นระบบเปิด สามารถพบได้ทั้งเชื้อที่มีชีวิตและเชื้อที่ตายแล้ว กระจายอยู่ในไบโอฟิล์ม เชื้อที่มีชีวิตส่วนใหญ่จะอยู่ตรงกลางของไบโอฟิล์มบริเวณช่องว่าง (voids) และช่องเชื่อมต่อ (channel) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอาหารมากกว่าบริเวณอื่นๆ ด้วยเหตุนี้เองจึงเกิดความแตกต่างของสภาวะแวดล้อมภายในไบโอฟิล์มขึ้น สภาวะแวดล้อมที่ต่างกันอย่างนี้ทำให้ภายในของไบโอฟิล์มมีชนิดของจุลินทรีย์ที่ต่างกันอย่างด้วย ปัจจุบันการศึกษาเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มมีเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยจากหลายๆ การศึกษาพบว่าเชื้อที่อยู่ในสภาวะไบโอฟิล์มมีความสามารถในการต่อต้านสาร

ด้านจุลินทรีย์ได้มากกว่าเชื้อที่อยู่ในสภาวะอิสระในสารละลายที่เรียกว่า แพลงโทนิค (planktonic) และไบโอฟิล์มของเชื้อยังสามารถยับยั้งการเข้า-ออกของสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการรักษาและยังสามารถป้องกันเซลล์ของเชื้อจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันได้<sup>37-40</sup> ทั้งนี้โรคในช่องปากก็เช่นกัน สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อที่อยู่รวมกันเป็นคราบจุลินทรีย์หรือไบโอฟิล์ม<sup>41, 42</sup> มีงานวิจัยพบว่าเชื้อ *S. sobrinus* ในช่องปาก เมื่ออยู่ในสภาวะไบโอฟิล์มต้องใช้คลอเฮกซิดีนและเอมีนฟลูออไรด์ในการกำจัดสูงกว่าในสภาวะแพลงโทนิคเซลล์ ถึง 300 และ 75 เท่าตามลำดับ<sup>43</sup> นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียที่กล่าวข้างต้นแล้วยังพบว่าเชื้อราในกลุ่ม *Candida* spp. ในสภาวะที่เป็นไบโอฟิล์มนั้น เชื้อจะมีความสามารถในการต่อต้านสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน<sup>44-46</sup> ดังนั้นไบโอฟิล์มของเชื้อจึงเป็นปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญสำหรับการรักษาตามโรงพยาบาลต่างๆทั่วโลก ทั้งการดื้อยาที่รักษาและการก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของวัสดุและอุปกรณ์การแพทย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ท่อให้อาหาร ท่อหายใจ รากฟันเทียม สายสวน และอุปกรณ์เฝ้ามืดตามทางการแพทย์ต่างๆ เป็นต้น การต่อต้านสารต้านจุลินทรีย์ในสภาวะไบโอฟิล์มนั้นยังมีปัจจัยอีกหลากหลายชนิด อันได้แก่ ชนิดของสารที่ใช้ในการรักษา ชนิดของเชื้อ เวลาที่ใช้ อายุของไบโอฟิล์มและความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ในไบโอฟิล์มนั้นๆ โดยมีความเป็นไปได้ว่า เชื้อในไบโอฟิล์มได้มีการรับหรือแลกเปลี่ยนยีนต่างๆ ตลอดเวลา

เพื่อไม่ให้เกิดปัญหาดังกล่าวการป้องกันการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อหรือการกำจัดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มจึงเป็นอีกทางเลือกในการแก้ไขปัญหาการดื้อยาที่อาจเกิดขึ้น การกำจัดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของสารมากกว่าการยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อค่อนข้างมาก สอดคล้องกับการศึกษาของ Filoche และคณะ<sup>47</sup> ที่ศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ ได้แก่ cinnamon oil, manuka oil, *Leptospermum morrisonii* oil, tea-tree oil, arnica oil, eucalyptus oil และ grapefruit oil มาใช้ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* และ *Lactobacillus plantarum* พบว่าหากต้องการทำลายเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มจำเป็นต้องใช้สารที่ความเข้มข้นมากกว่าการกำจัดการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อหลายเท่าตัว เช่นเดียวกับการศึกษาของ Song และคณะ<sup>48</sup> ที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากรากของ *Polygonum cuspidatum* ในการยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มและการกำจัดไบโอฟิล์มของเชื้อในกลุ่ม Mutans Streptococci การศึกษาเชื้อที่อยู่ในสภาวะไบโอฟิล์มจึงมีความสำคัญอย่างมาก เพราะเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มมีผลต่อประสิทธิภาพของยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ นอกจากนี้ที่กล่าวข้างต้นแล้วการออกฤทธิ์ของสารต่อเชื้อจุลินทรีย์ยังเป็นสิ่งที่ควรศึกษาให้ละเอียดยิ่งขึ้น ซึ่งการออกฤทธิ์ของสารมีหลายประเภทด้วยกัน หากแบ่งตามฤทธิ์ต่อเชื้อจะแบ่งได้ 2 ประเภท คือ ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต (Bacteriostatic) และยาที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (Bactericidal)

สารที่ออกฤทธิ์เป็น Bacteriostatic หมายถึง สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ มักมีกลไกการออกฤทธิ์ในกระบวนการสร้างโปรตีน หากเพิ่มความเข้มข้นยามากขึ้นสารเหล่านี้ อาจออกฤทธิ์ฆ่าหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ ส่วนสารที่ออกฤทธิ์เป็น Bactericidal หมายถึง สารที่มีฤทธิ์ฆ่าหรือทำลายเชื้อโดยตรง มักมีกลไกการออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์

#### ผนังเซลล์ (Cell wall)<sup>49</sup>

ผนังเซลล์ (cell wall) เป็นองค์ประกอบที่อยู่นอกสุดของเซลล์จุลินทรีย์ช่วยห่อหุ้มเซลล์ให้แข็งแรงและทำหน้าที่ป้องกันสิ่งที่อยู่ในเซลล์ (เซลล์ของมนุษย์จะไม่มีผนังเซลล์) ในเชื้อแบคทีเรียลักษณะของผนังเซลล์จะมีเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกจะมีผนังเซลล์ค่อนข้างหนากว่าแบคทีเรียแกรมลบประมาณ 10 เท่า ทำให้แบคทีเรียแกรมลบมีพันธะเพปไทด์ที่เชื่อมระหว่างเส้นของเพปทิโดไกลแคนน้อยกว่าและไม่มีพันธะ teichoic acid ซึ่งเชื่อมกับเพปทิโดไกลแคนที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์ ส่งผลให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีความแข็งแรงน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบจะมีชั้นไขมันที่มีโปรตีนห่อหุ้มเพื่อป้องกันเซลล์อีกชั้น เรียกว่า ลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มี ส่วนผนังเซลล์ของเห็ด รา หรือ ยีสต์จะเป็นสารพวกไคติน (chitin) ซึ่งมีความแข็งแรงมาก

#### เยื่อหุ้มเซลล์ (Cytoplasmic membrane)<sup>49</sup>

เซลล์เมมเบรนหรือเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เป็นส่วนที่อยู่ถัดจากผนังเซลล์เข้ามา โดยมีความหนาประมาณ 7-8 นาโนเมตร มีโครงสร้างเป็น lipid bilayer และโปรตีน ทำหน้าที่ห่อหุ้มไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ส่งผลให้เซลล์สามารถคงรูปอยู่ได้ เซลล์เมมเบรนจะเป็นส่วนที่ป้องกันเซลล์จากการเข้าออกของสารต่างๆ หากเกิดการเสียหาย อาจส่งผลให้สารต่างๆ สามารถเข้าไปทำลายเซลล์ได้ หรือสารภายในเซลล์เกิดการรั่วไหลออกด้านนอกทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตายได้

ปัจจุบันการศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพร เพื่อใช้ผลิตสารใหม่ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แทนการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเดิม หรือเพิ่มประสิทธิภาพของสารและลดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการใช้สารนั้นๆ เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ แต่การศึกษาสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปากยังมีจำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับเชื้อก่อโรคบริเวณอื่นๆ จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษา

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของการยับยั้งหรือการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ต่อเชื้อก่อโรคในช่องปากในสภาวะแพลงโทนิกเซลล์
2. ศึกษาผลของการยับยั้งหรือการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ต่อเชื้อก่อโรคในช่องปากในสภาวะไบโอฟิล์ม

## วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดสอบ

### วัสดุอุปกรณ์

#### การเตรียมสมุนไพร

สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ซึ่งใช้ในการศึกษานี้ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยซื้อเป็นก้อนปวดขาดจากร้านขายยาสมุนไพรในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย ช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2548 สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ที่ใช้ทดสอบได้มีการควบคุมปริมาณของสาร oxyresveratrol (2, 4, 3', 5' - tetrahydroxystilbene) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่อยู่ในปวกขาด โดยเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ที่ใช้ในการศึกษานี้กำหนดให้มีปริมาณของสาร oxyresveratrol มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้การทดสอบปริมาณสาร oxyresveratrol ในสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ทดสอบโดยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในกรณีที่ยังไม่มีการใช้งาน สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซาจะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ในการทดสอบแต่ละครั้งต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง โดยละลายใน 10 เปอร์เซ็นต์ DMSO ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารทดสอบเท่ากับ 10 กรัม เปอร์เซ็นต์

#### สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

จากการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกตัวแทนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปากชนิดต่างๆ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อรา โดยสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดดังรายละเอียดในตารางที่ 2

#### การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop ถ่ายโคโลนีของเชื้อ 3-5 โคโลนี ใส่ในขวดปราศจากเชื้อซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว จากนั้นนำไปปั่นในตู้ปั่นเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง



ตารางที่ 2 แสดงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของเชื้อที่ทดสอบแต่ละชนิด

แบคทีเรียและเชื้อรา	อาหารเลี้ยงเชื้อ	สภาวะที่เพาะเลี้ยง
<b>เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก:</b>	BHI broth	aerobic incubator
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	BA agar	37°C, 24-48 ชั่วโมง
<b>เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ:</b>	BHI broth	anaerobic incubator
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384	BHA agar	(80% N <sub>2</sub> , 10% CO <sub>2</sub> , 10% H <sub>2</sub> ) 37°C, 24-48 ชั่วโมง
<b>เชื้อรา:</b>	SDB broth	aerobic incubator
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	SDA agar	37°C, 24-48 ชั่วโมง
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		
<i>Candida dubliniensis</i> MYA-577		
<i>Candida dubliniensis</i> MYA-646		
<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032		
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030		
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135		
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258		
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029		
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750		
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803		

## วิธีทดสอบ

### 1. การทดสอบเชื้อในสภาวะ Planktonic cell

#### 1.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราเบื้องต้นโดยดูจากขนาดของโซนการยับยั้งโดยวิธี Agar well diffusion method ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>50</sup>

การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เติมลงไปในการแข็งที่เจาะไว้ โดยสารจะแพร่จากจุดที่เติมสารในหลุมไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วทิศทางไม่เฉพาะที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยง โดยระยะทางที่สารแพร่ออกไปนี้ความเข้มข้นของสารก็จะลดลงทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสารในเนื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อที่โดยยับยั้งก็จะมีอาการเจริญเติบโตเกิดเป็นโซนใส (inhibition zone) ส่วนเชื้อที่สัมผัสกับสารที่ความเข้มข้นที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ก็จะเพิ่มจำนวนขึ้นจนเห็นเป็นขอบของโซนใส เนื่องจากการทดสอบกับแบคทีเรียในช่องปากภาควิชาโอบุสสุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ได้ทำการทดสอบไว้แล้ว การศึกษานี้จึงทดสอบเพิ่มเติมเฉพาะเชื้อรา

#### การเตรียมสารทดสอบ

สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา เตรียมเป็นสารละลาย 10 กรัม เปอร์เซ็นต์ โดยทำการละลายด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ DMSO และปรับปริมาตรด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

คลอเฮกซิดีน ละลายด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำและปรับปริมาณความเข้มข้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 กรัม เปอร์เซ็นต์

#### การเตรียมเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ในสภาวะที่เพาะเลี้ยงดังตารางที่ 2 เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปริมาณของเชื้อที่ทดสอบอยู่ในช่วง  $10^5$ - $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

## การทดสอบ

ใช้ปากคีบ (forceps) วางแท่งเหล็กเส้นที่มีผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อจากนั้นอุ่นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งปริมาณ 20 มิลลิลิตร ให้ละลาย ร้อนอุณหภูมิประมาณ 35-40°C แล้วใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบลงไป ในอาหารที่อุ่นแล้ว ผสมเชื้อและอาหารให้เข้ากันจากนั้นเทลงในจานอาหารปราศจากเชื้อที่เตรียมไว้ เมื่ออาหารแข็งตัวใช้ปากคีบ (forceps) ถอดแท่งเหล็กออก จากนั้นใส่สารที่ต้องการทดสอบลงไปในแต่ละหลุม หลุมละ 90 ไมโครลิตร แล้วนำจานอาหารไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อตามสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการอ่านผล โดยวัดจากขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้นหน่วยเป็นมิลลิเมตร (ขอบโซนที่วัดต้องเป็นโซนที่ชัด ถ้ามีเชื้อขึ้นบ้าง ให้ถือว่าบริเวณนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้) การทดสอบนี้ใช้สมุนไพรรักษาความเข้มข้น 10 กรัม เปอร์เซ็นต์ สารคลอเฮกซิดีน 0.1 กรัม เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุมบวก และใช้สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ DMSO เป็นชุดควบคุมลบ ในการทดสอบจะสอบทั้งหมด 3 ครั้ง

### 1.2 การทดสอบหาปริมาณของสารต่ำสุดที่ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) และหาปริมาณของสารต่ำสุดที่ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MLC) ด้วยวิธี Broth dilution method ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI<sup>50</sup>

การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีสารที่ต้องการทดสอบผสมอยู่ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน จากนั้นสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นว่าสามารถเจริญเติบโตได้หรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับหลุมทดลองที่มีเชื้อแต่ไม่มีสารทดสอบ (ชุดควบคุมลบ) และหลุมทดลองที่มีสารที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุมบวก) หากเชื้อถูกยับยั้งการเจริญเติบโตหลุมอาหารนั้นก็ใส ส่วนหลุมที่มีความเข้มข้นที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้เชื้อก็จะโตขึ้นทำให้อาหารในหลุมขุ่น การอ่านผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อหลุมที่มีความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งเชื้อได้เป็นค่า MIC ส่วนค่า MFC จะเป็นค่าในหลุมที่มีปริมาณของสารต่ำสุดที่ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา 99.9 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดสอบ Broth dilution method นี้สามารถทำได้ทั้ง macro broth dilution method และ micro broth dilution method แต่ในที่นี้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี micro broth dilution method เพื่อประหยัดปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบ และเนื่องจากการทดสอบกับแบคทีเรียในช่องปาก ภาควิชาโอบุสสุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้ทำการทดสอบไว้แล้ว การศึกษานี้จึงทดสอบเพิ่มเติมเฉพาะเชื้อรา

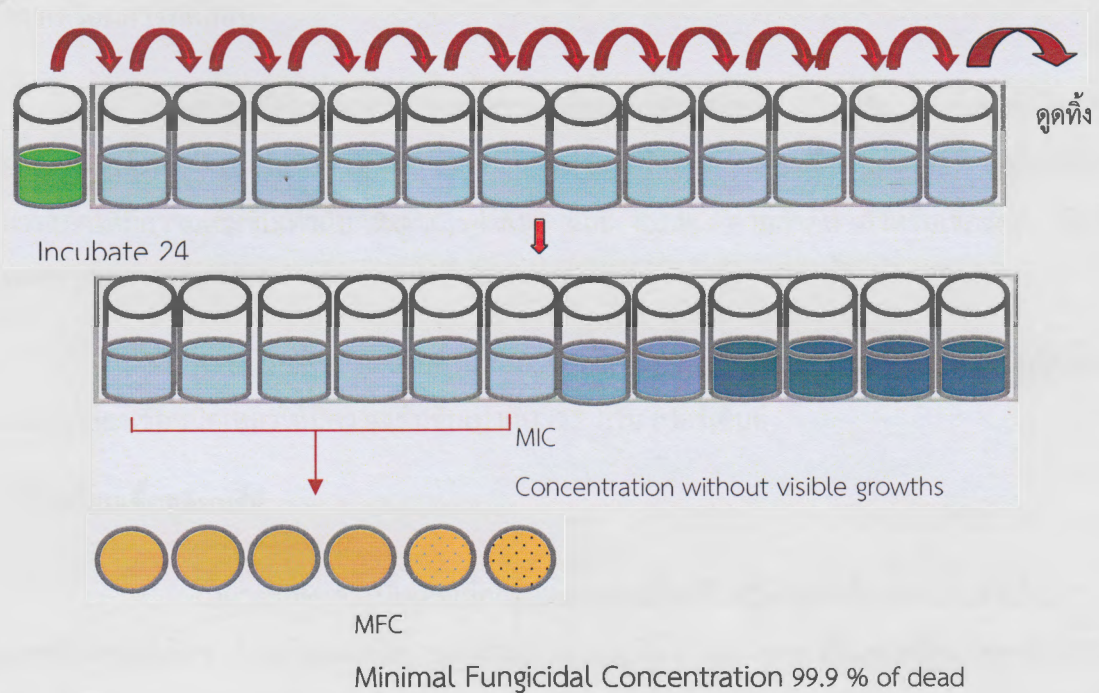
## การเตรียมเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อราที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงดังแสดงในตารางที่ 2 เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปรับปริมาณให้ได้ประมาณ  $10^3$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

## การทดสอบ

การเจือจางสารสกัดแบบลดลงครึ่งละ 2 เท่า (two-fold serial dilution) โดยใช้สารสกัดอาร์โพรคาร์ปัส ลาคูซา 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 100 ไมโครลิตร ในภาชนะพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (round-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate) จากนั้นเติมเชื้อราที่เตรียมไว้หลุมละ 100 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดอาร์โพรคาร์ปัส ลาคูซา อยู่ในช่วง 0.01-25.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับหลอดชุดควบคุมที่เป็นลบ (negative control) ให้เติมแบคทีเรียโดยที่ไม่มีสารที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เพื่อยืนยันว่า เชื้อสามารถเจริญในอาหารนั้นๆ ส่วนชุดควบคุมที่เป็นบวก (positive control) ใช้สารละลายคลอเฮ็กซิดีน 0.1 กรัม เปอร์เซ็นต์ หลุมที่มีอาหารแต่ไม่มีเชื้อใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อน (contamination) นำเชื้อไปอบที่อุณหภูมิประมาณ  $37^{\circ}\text{C}$  นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดตรวจความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยสังเกตจากการความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับหลุมทดสอบในชุดควบคุม หากอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นแสดงว่าเชื้อยังมีการเจริญเติบโต หากใสแสดงว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ รายงานความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) โดยความเข้มข้นของสารสกัดหลุมแรกที่ใสหรือความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ จะรายงานเป็นค่า MIC

การหาปริมาณของสารต่ำสุดที่ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราได้ 99.9 เปอร์เซ็นต์ โดยดูดสารละลายในหลุมที่ใสทั้งหมดจากการทดสอบข้างต้นไปเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงชนิดแข็ง จากนั้นบ่มในสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง การรายงานค่า MFC โดยให้ความเข้มข้นของสารหลุมแรกที่ไม่มีพบโคโลนีของเชื้อขึ้นรายงานเป็นค่า MFC



รูปที่ 2 แสดงวิธีทดสอบหาปริมาณของสารต่ำสุดที่ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และหาปริมาณของสารต่ำสุดที่ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

### 1.3 การทดสอบหาผลของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราต่อหน่วยเวลาด้วยวิธี Time-kill curves assay

หลักการ Time-kill curves assay เป็นการวัดประสิทธิภาพของสารจากการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของสารต่อหน่วยเวลา หลังจากการบ่มเพาะเชื้อกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและสารทดสอบ โดยนำตัวอย่างจากการทดสอบ ณ ช่วงเวลาต่างๆ มาวิเคราะห์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด (log CFU/ml) กับช่วงเวลา เรียกกราฟนี้ว่า “inhibition curve” หรือ “killing curve”

## การเตรียมสารทดสอบ

สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา เตรียมเป็นสารละลาย 10 กรัม เปอร์เซ็นต์ โดยทำการละลายด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ DMSO และปรับปริมาตรด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว จากนั้นเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2xMIC, 4xMIC และ 8xMIC ตามลำดับ สำหรับเชื้อแต่ละชนิดที่ทดสอบ

คลอเฮกซิดีน ละลายด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำและปรับปริมาณความเข้มข้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัม เปอร์เซ็นต์

## การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ในการศึกษครั้งนี้ได้คัดเลือกตัวแทนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปากทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยตัวแทนเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. mutans* ตัวแทนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *A. actinomycetemcomitans* และตัวแทนเชื้อรา คือ *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 และ *C. dubliniensis* MYA-577 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ใช้สภาวะเพาะเลี้ยงดังตารางที่ 2 เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นปรับปริมาณเชื้อที่ทดสอบให้มีความการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น OD<sub>600nm</sub> เท่ากับ 0.02 (ประมาณ 10<sup>6</sup> เซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

## การทดสอบ

ผสมเชื้อที่ปรับปริมาตรแล้ว 5 มิลลิลิตร กับสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ที่เตรียมไว้ 5 มิลลิลิตร ในขวดปราศจากเชื้อขนาด 20 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ที่ทดสอบเท่ากับ 1xMIC 2xMIC และ 4xMIC ตามลำดับ คลอเฮกซิดีน 0.1 กรัม เปอร์เซ็นต์เป็นชุดควบคุมบวก และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ไม่มีสารเป็นชุดควบคุมลบ) บ่มเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบดังตารางที่ 2 จากนั้นเก็บตัวอย่างเวลาที่ 0, 30 นาที 2, 4, 6, 8, 10, 12, และ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 100 ไมโครมิลลิลิตร เจือจางแบบลดทอนครั้งละ 10 เท่า (serial 10-fold dilution) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 และนำเชื้อในแต่ละความเข้มข้นที่เจือจางแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง แล้วนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิดเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น ทำการทดสอบ 3 ครั้ง คำนวณค่าของเชื้อที่นับได้ในหน่วย log CFU/ml ผลที่ได้นำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนเชื้อ log CFU/ml

#### 1.4 การศึกษาผลของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ต่อลักษณะทางกายภาพของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy; SEM) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ เพื่อพิจารณาความเสียหายของโครงสร้างผนังเซลล์หรือโครงสร้างต่างๆของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ และศึกษาลักษณะของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เมื่อเชื้อจุลินทรีย์ถูกทดสอบโดยสารทดสอบ หลักการวิธีนี้ คือ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะยิงลำแสงอิเล็กตรอนซึ่งมีขนาดเล็กมากวิ่งไปที่วัตถุแบบส่องกราดไปบนผิวของวัตถุทำให้ได้ภาพที่มีลักษณะเป็น 3 มิติ

##### การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกตัวแทนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปากทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยตัวแทนเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. mutans* ตัวแทนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *A. actinomycetemcomitans* และตัวแทนเชื้อรา คือ *C. albicans* ATCC 90028 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ใช้สภาวะเพาะเลี้ยงดังตารางที่ 2 เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นปรับปริมาณเชื้อที่ทดสอบให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  $OD_{600nm}$  เท่ากับ 0.02 (ประมาณ  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

##### การเตรียมสารทดสอบ

สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา เตรียมเป็นสารละลาย 10 กรัม เเปอร์เซ็นต์ โดยทำการละลายด้วย 10 เเปอร์เซ็นต์ DMSO และปรับปริมาตรด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว จากนั้นเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ  $2 \times MIC$  ของเชื้อแต่ละชนิดที่ทดสอบ

##### การทดสอบ

ผสมเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เตรียมข้างต้นกับสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา 5 มิลลิลิตร ในขวดปราศจากเชื้อขนาด 20 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซาสุดท้ายเท่ากับค่า MIC และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ไม่มีสารสกัดเป็นชุดควบคุม) บ่มเชื้อด้วยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบตามตารางที่ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์และล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงที่อัตราความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ตรึงโดยนำตะกอนป้ายบนสไลด์ที่เคลือบด้วยโลหะหนัก แล้วแช่สไลด์เชื้อใน 2.5 เเปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde ที่มี 0.1 โมลาร์ cacodylate buffer ที่  $4^{\circ}C$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อ



ครบเวลาล้างใน 0.1 โมลาร์ ละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ 4°C จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำการดิ่งน้ำออกด้วย ethyl alcohol (70, 80, 90, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ตามลำดับ) จากนั้นนำไปทำแห้ง ณ จุดวิกฤต ด้วยเครื่อง Critical point drying และติดตัวอย่างบนแท่งวางตัวอย่าง จากนั้นนำไปฉายด้วยทองคำ แล้วจึงนำไปศึกษาลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

## 2. การทดสอบเชื้อในสภาวะ Biofilm

### 2.1 การทดสอบผลของสารสกัดอาร์โศคาร์ปัส ลาคูชา ในการยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ (Inhibition of biofilm formation) โดยวิธี MTT assay<sup>51-54</sup>

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบการยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการทดสอบจะใส่สารที่ต้องการทดสอบลงไปพร้อมกับเชื้อที่ต้องการศึกษา เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารในการยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งทดสอบโดยวิธี MTT assay หลักการของวิธีนี้ คือ สาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) จะไปทำปฏิกิริยากับสารเมตาบอลิซึมที่ผลิตจากเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต โดยการกระทำของเอนไซม์ dehydrogenase เช่น NADH และ NADPH เปลี่ยนสีเหลืองของสาร tetrazolium MTT เป็นตะกอนสีม่วงของสาร formazan จากนั้นวัดปริมาณตะกอน formazan ที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ค่าที่ได้จากการทดสอบนี้จะแปรผันตามปริมาณของเชื้อที่มีชีวิตในสภาวะไบโอฟิล์ม

#### การเตรียมสารทดสอบ

สารสกัดอาร์โศคาร์ปัส ลาคูชา เตรียมเป็นสารละลาย 10 กรัม เปอร์เซ็นต์ โดยทำการละลายด้วย 20 เปอร์เซ็นต์ DMSO และปรับปริมาตรด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวหรือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

คลอโรฟอร์มิน ละลายด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำและปรับปริมาณความเข้มข้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

สารละลายสาร MTT ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อ



## การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกตัวแทนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปากทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยตัวแทนเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. mutans* ตัวแทนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *A. actinomycetemcomitans* และตัวแทนเชื้อรา คือ *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 และ *C. dubliniensis* MYA-577 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ใช้สภาวะเพาะเลี้ยงดังตารางที่ 2 เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นปรับปริมาณเชื้อที่ทดสอบให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  $OD_{600nm}$  เท่ากับ 0.02 (ประมาณ  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

## การทดสอบ

การเจือจางสารสกัดแบบลดลงครึ่งละ 2 เท่า (two-fold serial dilution) โดยใช้สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ของ mucin 100 ไมโครลิตร ในถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ก้นแบนชนิด 96 หลุม (flat-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate) จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ปรับปริมาณแล้วลงไป 100 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา อยู่ในช่วง 0.02-25.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับหลุมชุดควบคุมที่เป็นลบ (negative control หรือ non-treated control) ให้เติมเชื้อจุลินทรีย์โดยที่ไม่มีสารที่ฆ่าเชื้อ เพื่อยืนยันว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารนั้นๆ ส่วนชุดควบคุมที่เป็นบวก (positive control) ใช้สารละลายคลอเฮกซิดีน 0.1 กรัม เปอร์เซ็นต์ หลุมที่มีอาหารแต่ไม่มีเชื้อใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อน (contamination) และหลุมที่มีอาหารกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแบลนด์ของวิธีทดสอบ (blank control) จากนั้นบ่มเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดล้างเซลล์ที่อยู่ในสภาวะแพลงโทนิค เซลล์ทิ้งด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0

## การทดสอบ MTT assay

ใส่สาร MTT 100 ไมโครลิตร ในถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ก้นแบนชนิด 96 หลุม ที่ทดสอบข้างต้น บ่มที่  $37^{\circ}C$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมงในที่มืด เมื่อครบเวลาดูดสารละลายทิ้ง จากนั้นล้างสีตะกอนด้วย 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO 100 ไมโครลิตร บ่มที่  $37^{\circ}C$  เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลาย 90 ไมโครลิตร ใส่ในถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ก้นแบนชนิด 96 หลุมอันใหม่ วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Elisa plate reader ที่ความยาวคลื่น  $570_{nm}$  ค่าที่วัดได้จะเป็นปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตในไบโอฟิล์ม เนื่องจากสารสมุนไพรรักษาที่ทดสอบในครั้งนี้ให้สี ดังนั้นค่าที่ได้จากการทดสอบจึงต้องนำไป

ลบกับแปลงค์ของวิธีทดสอบที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน แล้วนำค่าที่ได้คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการ  
ฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์จากสูตร

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

โดยความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มได้ 50 เปอร์เซ็นต์  
และ 90 เปอร์เซ็นต์ รายงานเป็นค่า MBIC<sub>50</sub> and MBIC<sub>90</sub> (minimum biofilm inhibition  
concentration) ทำการทดสอบ 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ

## 2.2 การทดสอบผลของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ในการกำจัดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม (Eradication of biofilm formation) โดยวิธี MTT assay<sup>53, 54</sup>

การทดสอบนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์สารทดสอบในการกำจัดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม  
โดยวิธี MTT assay ซึ่งหลักการและวิธีการทดสอบจะคล้ายกับการศึกษาการยับยั้งการฟอร์มตัวเป็น  
ไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ แต่จะต่างกันที่การทดสอบนี้ได้ใส่สารที่ต้องการทดสอบหลังจากที่เชื้ออยู่  
ในสภาวะไบโอฟิล์ม 24 ชั่วโมงแล้ว

### การเตรียมสารทดสอบ

สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา เตรียมเป็นสารละลาย 10 กรัม เปอร์เซ็นต์ โดยทำ  
การละลายด้วย 20 เปอร์เซ็นต์ DMSO และปรับปริมาตรด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวหรือ  
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

คลอเฮกซิดีนละลายด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำและปรับปริมาณความเข้มข้นด้วย  
อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

สารละลายสาร MTT ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน  
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อ

## การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกตัวแทนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปากทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยตัวแทนเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. mutans* ตัวแทนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *A. actinomycetemcomitans* และตัวแทนเชื้อรา คือ *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 และ *C. dubliniensis* MYA-577 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ใช้สภาวะเพาะเลี้ยงดังตารางที่ 2 เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นปรับปริมาณเชื้อที่ทดสอบให้มีความการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น OD<sub>600nm</sub> เท่ากับ 0.02 (ประมาณ 10<sup>6</sup> เซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

## การทดสอบ

สร้างแบบจำลองไบโอฟิล์ม ที่ 24 ชั่วโมง โดยใส่เชื้อที่ปรับปริมาณแล้วลงในภาชนะพลาสติกเลี้ยงเซลล์ก้นแบนชนิด 96 หลุม (flat-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและเติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ mucin ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในสภาวะเหมาะสมของแต่ละเชื้อตามตารางที่ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดล้างเซลล์ที่อยู่ในสภาวะแพลงโทนิคเซลล์ทิ้งด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 จำนวน 2 ครั้ง ใส่สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ที่การเจือจางสารสกัดแบบลดครึ่งละ 2 เท่า (two-fold serial dilution) 200 ไมโครลิตรไปในภาชนะพลาสติกเลี้ยงเซลล์ก้นแบนชนิด 96 หลุมที่มีไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง (ความเข้มข้นของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา อยู่ในช่วง 0.02-25.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละชนิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดล้างเซลล์ที่อยู่ในสภาวะแพลงโทนิคเซลล์ทิ้งด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0

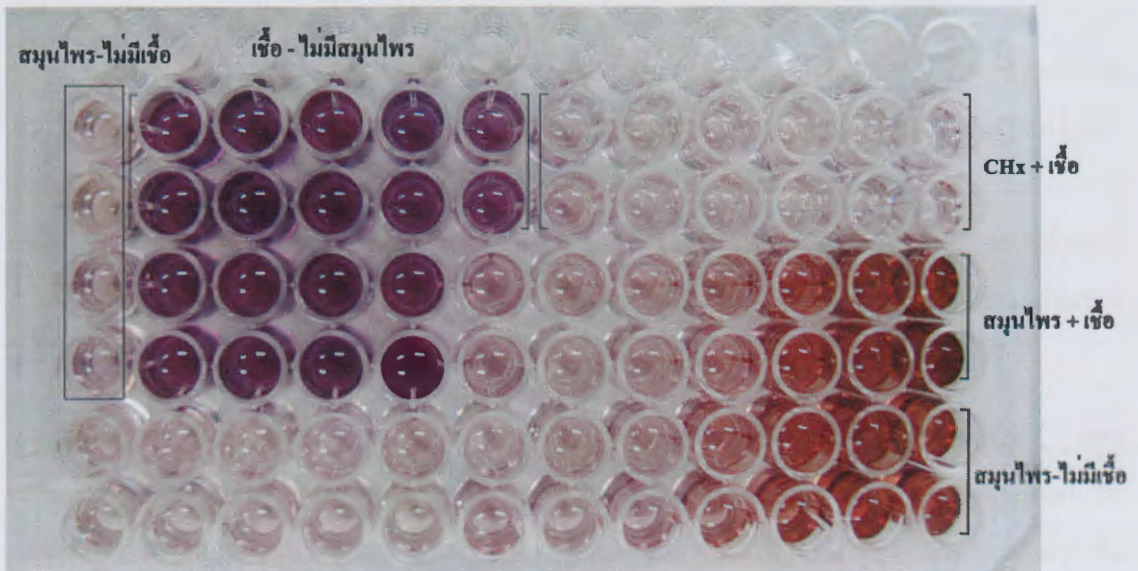
## การทดสอบ MTT assay

ใส่สาร MTT 100 ไมโครลิตร ในภาชนะพลาสติกเลี้ยงเซลล์ก้นแบนชนิด 96 หลุมที่ทดสอบข้างต้น บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงในที่มืด เมื่อครบเวลาดูดสารละลายทิ้ง จากนั้นล้างสีตะกอนด้วย 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลาย 90 ไมโครลิตร ใส่ในภาชนะพลาสติกเลี้ยงเซลล์ก้นแบนชนิด 96 หลุมอันใหม่ วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Elisa plate reader ที่ความยาวคลื่น 570<sub>nm</sub> ค่าที่วัดได้จะเป็นปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตในไบโอฟิล์ม เนื่องจากสารสมุนไพรที่ใช้ทดสอบในครั้งนี้ให้สี ดังนั้นค่าที่ได้จากการทดสอบจึงต้องนำไปลบกับแบลนด์ของวิธีทดสอบที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน แล้วนำค่าที่ได้คำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มจากสูตร



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

โดยความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถกำจัดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์ รายงานเป็นค่า MBEC<sub>50</sub> and MBEC<sub>90</sub> (minimum biofilm eradication concentration) ทำการทดสอบ 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ



รูปที่ 3 แสดงสีที่ได้จากการทดสอบ MTT assay ของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา

### 3. การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาผลของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ต่อเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะแพลงโท-นิกเซลล์วิเคราะห์ข้อมูลในเชิงพรรณนา โดยใช้ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการผลการทดสอบ 3 ครั้ง สำหรับผลของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ต่อเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะไบโอฟิล์มใช้การวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Mann-Whitney U test เปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดระหว่างชุดทดสอบที่ใส่สารสกัดกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัด (ชุดควบคุมลบ) ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

## ผลการทดสอบ

### วัตถุประสงค์ข้อที่ 1

ศึกษาผลของการยับยั้งหรือการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ต่อเชื้อก่อโรคในช่องปากในสภาวะแผลงโทนิกเซลล์

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี agar-well diffusion พบว่าสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และเมื่อทดสอบหาความเข้มข้นสารต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (MIC) พบว่าความเข้มข้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราอยู่ในช่วง 0.05 ถึง 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณของสารต่ำสุดที่ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราได้ 99.9 เปอร์เซ็นต์ (MFC) ความเข้มข้นที่ใช้ในการฆ่าเชื้อของสารอยู่ในช่วง 0.10 ถึง 25.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3)

ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อต่อหน่วยเวลาของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา พบว่ามีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดและระยะเวลาในการทดสอบทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้แก่ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบตามลำดับ ส่วนเชื้อราที่นำมาทดสอบได้แก่เชื้อ *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 และ *C. dubliniensis* MYA-577 โดยความเข้มข้นที่ 2×MIC และ 4×MIC สามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ฆ่าได้ที่เวลา 12 และ 8 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* ฆ่าได้ที่เวลา 8 และ 6 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *Candida* spp. ทุกตัวฆ่าได้ที่เวลา 8 และ 6 ชั่วโมง (รูปที่ 5) ในความเข้มข้นที่ 1×MIC สารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแต่ไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ ส่วน 0.1 กรัม เปอร์เซ็นต์ คลอเฮกซิดีน (positive control) สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดได้ภายในเวลา 30 นาที

ผลของการศึกษาสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ต่อลักษณะทางกายภาพของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning Electron microscopy) โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละชนิด (MIC) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (10 เปอร์เซ็นต์ DMSO) พบว่าลักษณะเซลล์แบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบที่ทดสอบด้วยสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา มีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ลักษณะเซลล์ที่ปรากฏมีการเหี่ยวตัวของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจะแสดงการเหี่ยวอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนเชื้อราลักษณะที่ปรากฏไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวของ

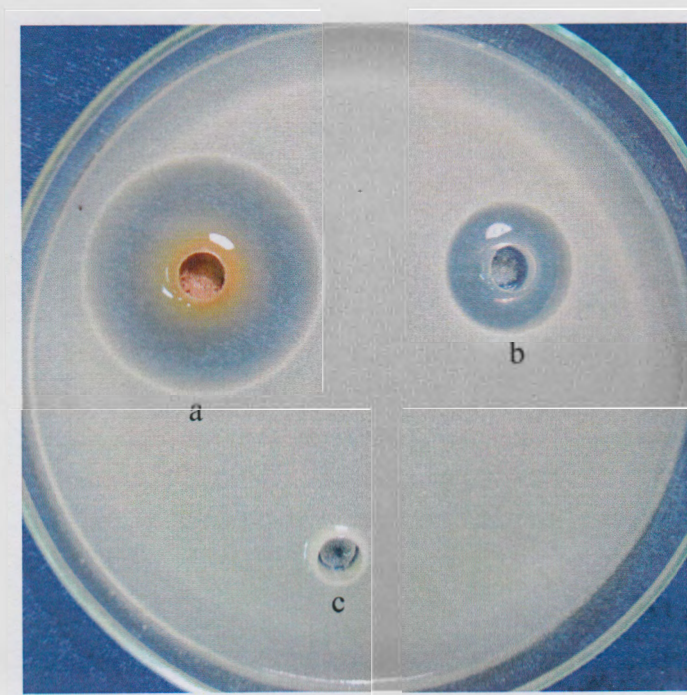
เชื้อจุลินทรีย์พบว่า ในเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะรูปร่างที่ยืดยาวขึ้นจากเดิม และได้มีการเกาะกลุ่มของเชื้อเกิดขึ้น (aggregation) ดังได้แสดงในรูปที่ 6

ตารางที่ 3 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ในการยับยั้งเชื้อเชื้อ *Candida* spp.

สายพันธุ์ของเชื้อ <i>Candida</i> spp.	ขนาดโซนการยับยั้ง (หน่วยมิลลิเมตร)	ความเข้มข้นของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา (หน่วย มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
		MIC <sup>a</sup>	MFC <sup>b</sup>
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	20 ±0.13	0.78	1.56
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	15 ±0.14	1.56	3.12
<i>C. dubliniensis</i> MYA-577	15 ±0.21	0.78	1.56
<i>C. dubliniensis</i> MYA-646	20 ±0.15	0.78	1.56
<i>C. glabrata</i> ATCC 66032	20 ±0.13	1.56	25.00
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	18 ±0.06	1.56	12.50
<i>C. krusei</i> ATCC 34135	13 ±0.06	3.12	25.00
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	14 ±0.10	3.12	25.00
<i>C. tropicalis</i> ATCC 66029	28 ±0.05	0.05	0.10
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	19 ±0.15	0.78	12.50
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	20 ±0.06	0.78	25.00

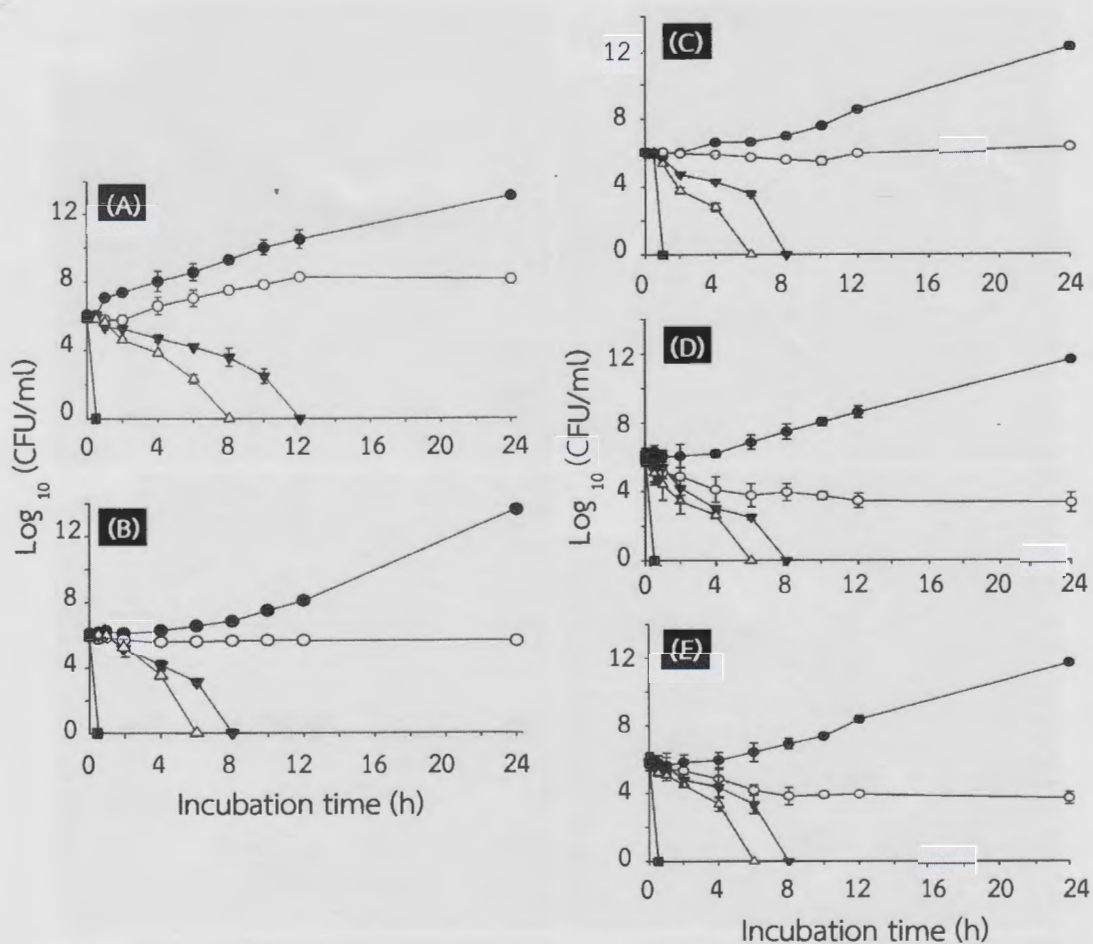
<sup>a</sup> MIC: ความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

<sup>b</sup> MFC: ความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราได้ 99.9 เปอร์เซ็นต์



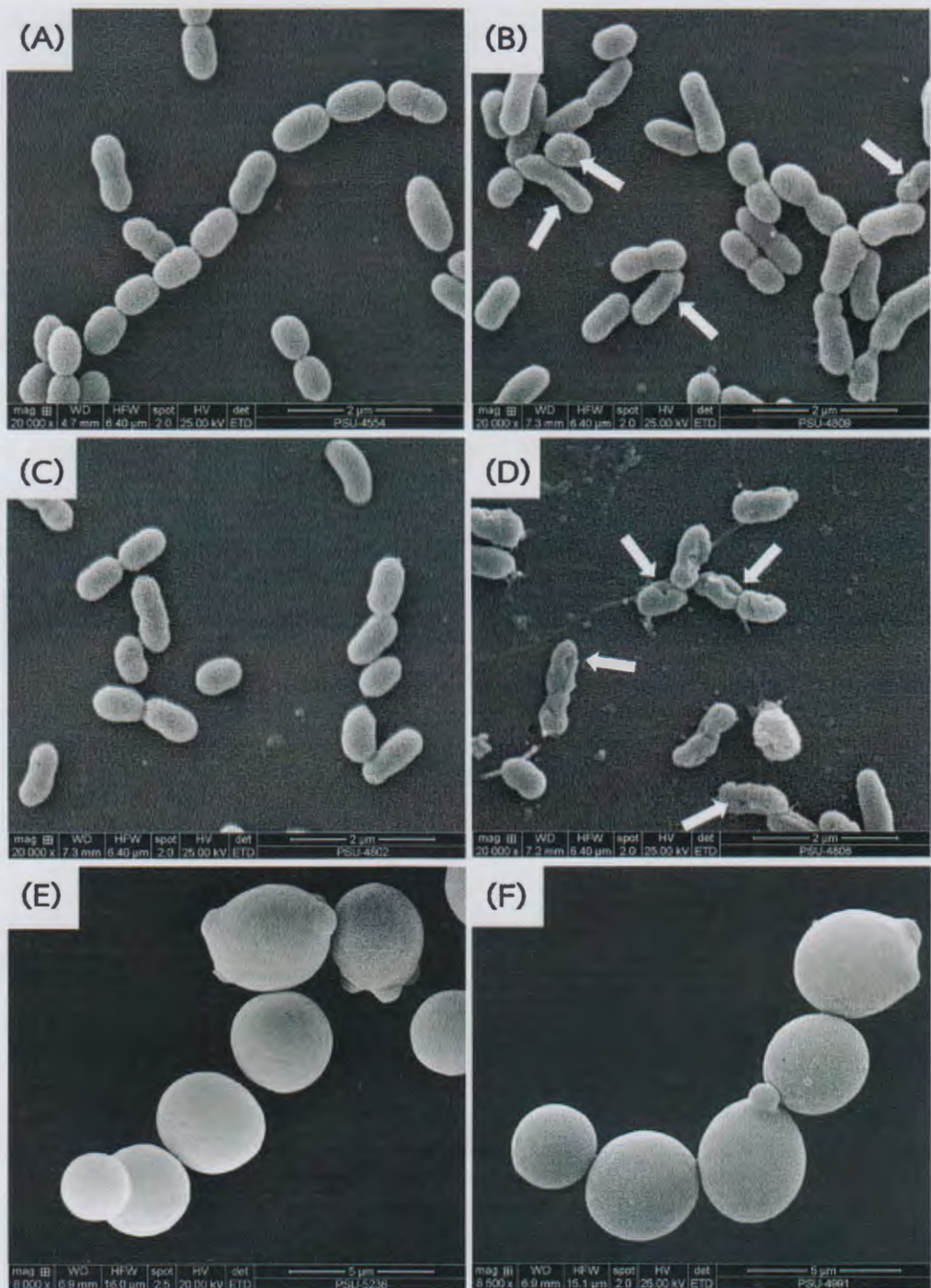
รูปที่ 4 แสดงโซนของการยับยั้ง (a) สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคู ชา 10 กรัม เปอร์เซ็นต์, (b) คลอเฮ็กซิดีน 0.1 กรัม เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุมบวก) และ (c) DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุมลบ) ต่อเชื้อ *C. tropicalis* ATCC 66029 โดยวิธี Agar well diffusion assay





รูปที่ 5 แสดงผลของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ในการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ เชื้อ *S. mutans* (A) แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *A. actinomycetemcomitans* (B) และเชื้อรา ได้แก่ เชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 (C), *C. tropicalis* ATCC 66029 (D) และเชื้อ *C. dubliniensis* MYA-577 (E) ตามลำดับ ที่ช่วงเวลาต่างๆ เมื่อบ่มด้วยสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซาที่ความเข้มข้น 0x MIC (—●—), 1x MIC (—○—), 2x MIC (—▼—) 4x MIC (—△—) และคลอเฮกซิดีน 0.1 กรัม เปอร์เซ็นต์ (—■—) โดยวิธี Time-kill curves assay





รูปที่ 6 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดในลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ เชื้อ *S. mutans* (รูปบน) แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *A. actinomycetemcomitans* (รูปกลาง) และเชื้อรา ได้แก่ เชื้อ *C. albicans* (รูปล่าง) ที่บ่มด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (รูป A, C และ E) และสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคุซา ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC ของเชื้อแต่ละชนิด (รูป B, D และ F)

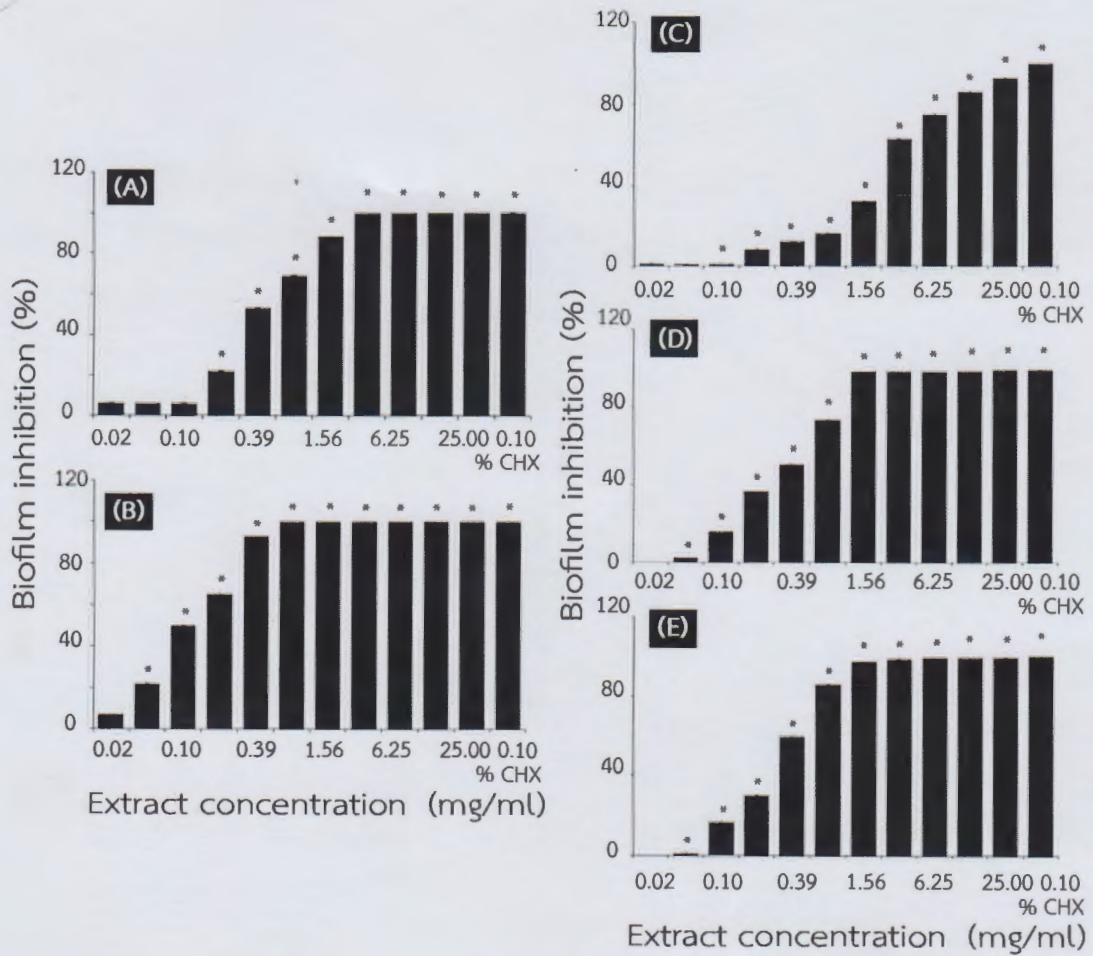
## วัตถุประสงค์ข้อที่ 2

ศึกษาผลของการยับยั้งหรือการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ต่อเชื้อก่อโรคในช่องปากในสภาวะไบโอฟิล์ม

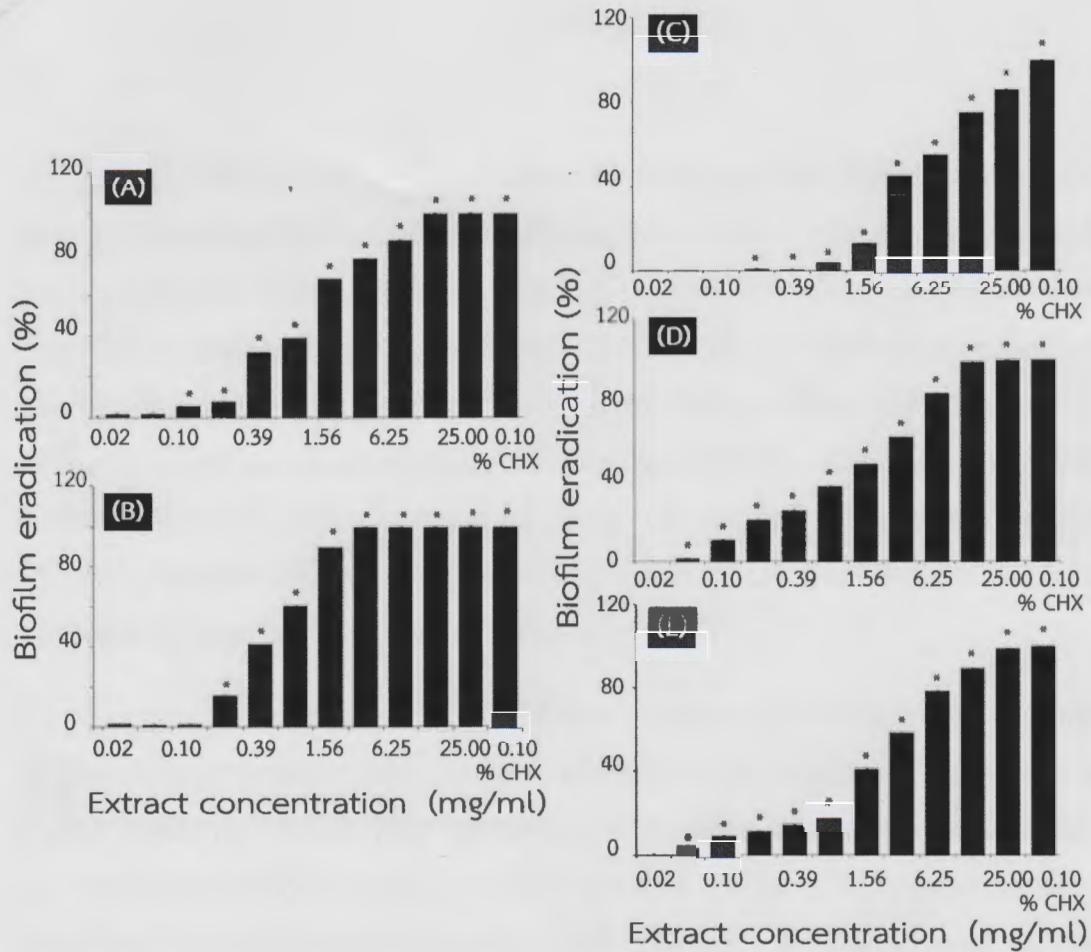
ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ในการยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มต่อเชื้อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ คือ  $0.39 \pm 0.11$  และ  $0.10 \pm 0.09$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มมากกว่าหรือเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ คือ  $3.12 \pm 0.02$  และ  $0.39 \pm 0.10$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *Candida* spp. (*C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 และ *C. dubliniensis* MYA-577) ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ที่  $3.13 \pm 0.23$ ,  $0.39 \pm 0.12$  และ  $0.39 \pm 0.18$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มมากกว่าหรือเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ อยู่ที่  $25.00 \pm 0.18$ ,  $1.56 \pm 0.05$  และ  $1.56 \pm 0.29$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 7)

ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ในการกำจัดไบโอฟิล์มต่อเชื้อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ คือ  $1.56 \pm 0.13$  และ  $0.78 \pm 0.12$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นที่สามารถกำจัดไบโอฟิล์มมากกว่าหรือเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ คือ  $6.25 \pm 0.34$  และ  $3.12 \pm 0.18$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *Candida* spp. (*C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 และ *C. dubliniensis* MYA-577) ความเข้มข้นที่สามารถกำจัดไบโอฟิล์มมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ที่  $6.25 \pm 0.20$ ,  $3.12 \pm 0.13$  และ  $3.12 \pm 0.23$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นที่สามารถกำจัดไบโอฟิล์มมากกว่าหรือเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ อยู่ที่มากกว่า 25.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร,  $12.50 \pm 0.20$  และ  $25.00 \pm 0.26$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 8) ส่วนในชุดควบคุมบวก (0.1 กรัม เปอร์เซ็นต์ คลอเฮกซิดีน) สามารถยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มและกำจัดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มของเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ 100 เปอร์เซ็นต์





รูปที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคุซา ที่ความเข้มข้นต่างๆ และความเข้มข้นคลอเฮกซิดีน 0.1 กรัม เปอร์เซ็นต์ ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ เชื้อ *S. mutans* (A) แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *A. actinomycetemcomitans* (B) และเชื้อรา ได้แก่ เชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 (C), *C. tropicalis* ATCC 66029 (D) และเชื้อ *C. dubliniensis* MYA-577 (E) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัด (ชุดควบคุมลบ); \* ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$



รูปที่ 8 แสดงเปอร์เซ็นต์การกำจัดไบโอฟิล์มของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา ที่ความเข้มข้นต่างๆ และความเข้มข้นคลอเฮกซิดีน 0.1 กรัม เปอร์เซ็นต์ ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ เชื้อ *S. mutans* (A) แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *A. actinomycetemcomitans* (B) และเชื้อรา ได้แก่ เชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 (C), *C. tropicalis* ATCC 66029 (D) และเชื้อ *C. dubliniensis* MYA-577 (E) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัด (ชุดควบคุมลบ); \* ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

## บทวิจารณ์

ที่ผ่านมาการค้นหายาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่จากพืชเป็นที่ได้รับความน่าสนใจอย่างกว้างขวาง ซึ่งในอดีตเมื่อมนุษย์ไม่สบายหรือเกิดการเจ็บป่วยจากการติดเชื้อ พืชและยาสมุนไพรถูกนำมาใช้เพื่อการรักษาอาการหรือโรคนั้นๆ โรคฟันผุ โรคปริทันต์หรือแม้กระทั่งโรคที่เกิดจากการติดเชื้อฉวยโอกาส เช่นโรคราในปาก (Candidiasis) ก็เกิดขึ้นเมื่อเชื้อจุลินทรีย์พื้นเมืองหรือเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นเกิดการเสียสมดุลลง โดยเชื้อมีการลดจำนวนลงหรือเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดปัญหาของโรคส่วนมากมาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในรูปของไบโอฟิล์ม (biofilm) และด้วยความซับซ้อนของโครงสร้างไบโอฟิล์มนี้เองส่งผลให้เชื้อมีคุณสมบัติในการต่อต้านยาที่ใช้ในการรักษาปัจจุบัน ทำให้จำเป็นต้องใช้ตัวยามีฤทธิ์รุนแรงขึ้นในการรักษาเชื้อที่ตื้อย่านั้นๆ ส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่ม และอาจได้รับผลอันไม่พึงประสงค์ของยานั้นด้วย<sup>37, 55, 56</sup>

ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในช่องปากได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบและเชื้อราในสภาวะแพลงโทนิคเซลล์ และสภาวะไบโอฟิล์ม โดยสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา จะมีฤทธิ์ดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รองลงมาคือแบคทีเรียแกรมบวก และเชื้อรา ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความแตกต่างของโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยในเชื้อแบคทีเรียลักษณะของโครงสร้างผนังเซลล์จะมีเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นส่วนประกอบหลัก โดยโครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบจะมีความแข็งแรงน้อยกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนผนังเซลล์ของเห็ด รา หรือ ยีสต์ จะเป็นสารพวกไคติน (chitin) ซึ่งมีความแข็งแรงมาก สังเกตได้จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ผลการทดสอบจะเห็นว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจะแสดงการเหี่ยวอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนเชื้อราลักษณะที่ปรากฏไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม ในลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวของเชื้อได้มีความแตกต่างไปจากเดิม สังเกตได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยปกติเชื้อ *S. mutans* จะมีรูปร่างกลม การเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ เมื่อทดสอบกับสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซาแล้ว พบว่าลักษณะรูปร่างของเซลล์มีการยืดยาวขึ้น การเรียงตัวจะเป็นสายสั้นลง และเชื้อได้มีการเกาะกลุ่มของเชื้อเกิดขึ้น (aggregation) ทั้งนี้เป็นเพราะสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซาอาจมีผลต่อการแบ่งเซลล์ของเชื้อทำให้เซลล์ใหม่ที่ได้อาจมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติ เชื้อได้มีการปรับตัวให้มีชีวิตรอด โดยการอยู่รวมตัวกันเป็นกลุ่ม (aggregation) เพื่อปกป้องเซลล์ของมันจากการถูกทำลายโดยสารที่ทดสอบ

โครงสร้างของผนังเซลล์อาจมีผลต่อการเข้า-ออกของสารสกัด แต่กลไกการออกฤทธิ์ที่แน่นอนของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนในการทดลองนี้ มีการศึกษาก่อนหน้าที่ศึกษาฤทธิ์ของสาร resveratrol ต่อเชื้อ *Botrytis cinerea* หรือราสีเทา ซึ่งเป็นเชื้อราชนิดหนึ่งซึ่งก่อให้เกิดโรคในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ในการศึกษาพบว่าสาร resveratrol มีผลต่อการทำงานของ membrane proteins ซึ่งเป็นตัวควบคุมการผ่านเข้า-ออกของสารต่างๆ ของจุลินทรีย์ โดยไปรบกวนการทำงานของ เซลล์ mitochondrial และ nuclear membranes<sup>57</sup> นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ต่อเชื้อ *Fasciola gigantica* ซึ่งเป็นพยาธิในตับซึ่งก่อให้เกิดโรค fasciolosis พบว่ามีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงส่งผลให้ปฏิกิริยา oxidative phosphorylation ใน mitochondrial เกิดการเสียหาย<sup>58</sup> ทั้งนี้สารสำคัญที่เป็นประกอบหลักของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา คือ oxyresveratrol ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับกลุ่มฟีนอลฮาโลเจน (halogenated phenol) ของยา เช่นยา nitroxylin ดังนั้นการออกฤทธิ์ของสารจึงอาจมีความคล้ายคลึงกัน คือสารจะไปมีผลต่อปฏิกิริยา oxidative phosphorylation ทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้น้อยลง แต่ยังคงมีการขนส่งอิเล็คตรอน ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) พลังงานที่เกิดขึ้นไม่นำไปสร้าง ATP แต่เปลี่ยนเป็นพลังงานความร้อน นอกจากนี้ยังส่งผลให้  $\text{Na}^+$  และน้ำไหลเข้าสู่เซลล์ทำให้เซลล์เกิดการบวมสังเกตได้จากการศึกษาการรักษาพยาธิใบไม้ตับ (*Fasciola hepatica*) ด้วยยา nitroxylin<sup>59, 60</sup>

เมื่อเปรียบเทียบผลการต้านเชื้อในสภาวะແพลงโทนิคเซลล์และสภาวะไบโอฟิล์มของเชื้อ จุลินทรีย์พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซา ที่สูงขึ้นประมาณ 4-8 เท่า ในการต้านเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม นอกจากนี้ความเข้มข้นที่ใช้ในการกำจัดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มก็ยังมีค่าสูงกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มหลายเท่าตัว จากผลของการยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ในการทดสอบนี้ มีข้อสังเกตว่าที่ค่าความเข้มข้นของสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซาที่ MBC ยังคงมีเชื้อที่มีชีวิตรอด โดยเชื้อสามารถฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มได้ และให้ค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการฟอร์มตัวที่น้อยทั้งของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ทั้งที่การทดสอบนี้ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์กับสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซาพร้อมกันเช่นเดียวกับในการทดสอบ MBC ผลที่เป็นเช่นนี้อาจเพราะในการทดสอบการยับยั้งการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มได้ใช้สภาพพลาสติกเลี้ยงเซลล์กันแบนชนิด 96 หลุม และได้เพิ่มสาร mucin ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ลงไปในการเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ทดสอบ บวกกับระยะเวลาในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยสารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูซาไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ในทันทีที่ทดสอบ สังเกตได้จากการทดสอบ Time-kill curves assay ทำให้เชื้อบางส่วนสามารถฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มได้ ด้วยเหตุนี้เองอาจสรุปได้ว่าหากเชื้อมีความสามารถในการฟอร์มตัวเป็นไบโอฟิล์มที่ดีจะส่งผลให้เชื้อมีการดื้อยามากขึ้นและเป็นเหตุให้มีอุบัติการณ์การพบเชื้อเหล่านี้ได้บ่อยขึ้นในผู้ป่วยโรคติดเชื้อ

## สรุป

สารสกัดอาร์โทคาร์ปัส ลาคูชา เป็นสารสกัดซึ่งได้มาจากธรรมชาติมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในช่องปาก ซึ่งสารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าเชื้อรา โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดแกรมบวกเมื่อใช้สารที่ปริมาณเท่ากัน ทั้งนี้ให้ผลเช่นเดียวกับการทดสอบการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มและการกำจัดเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์ม โดยประสิทธิภาพของสารจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ในการรักษา ในอนาคตควรมีการศึกษาความเป็นพิษกับเยื่อบุบริเวณช่องปากให้ละเอียดยิ่งขึ้น เพื่อเป็นอีกทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อในช่องปาก

## บรรณานุกรม

1. Loesche W. Dental caries and periodontitis: contrasting two infections that have medical implications. *Infect Dis Clin Nth Am* 2007; 21: 471-502.
2. Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzaki J, Miura K, *et al.* Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sorbrinus* in pre-school children. *J Med Microbiol* 2005; 54: 66-5.
3. Vazquez JA. Options for the management of mucosal candidiasis patients with AIDS and HIV infection. *Pharmacother* 1999; 19: 76-87.
4. Moran GP, Sullivan DJ and Coleman DC. Emergence of non-Candida albicans Candida species as pathogens. In: Calderone RA, editors. *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington, DC; 2002. p. 33-53.
5. Sullivan D, Bennett D, Henman M, Harwood P, Flint S, Mulcahy F, Shanley D, Coleman D. Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2124-22133.
6. Warnock DW, Burke J, Cope NJ, Johnson EM, Von Fraunhofer NA, Williams EW. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Lancet* 1988; 2: 1310.
7. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *New Eng J Med* 1991; 325: 1274-1277.
8. Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL and Swain G. 1:6-Di-4' chlorophenyldiguanido hexane (hibitane). Laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol Chemother* 1954; 9(2): 192-196.
9. Ellner PD and Neu HC. Antiseptic and disinfectants. In Fathman E, editors. *Human pharmacology*, 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1997. p. 769.
10. Matthijs S and Adriaens PA. Chlorhexidine varnish: a review. *J clin Periodontal* 2002; 29: 1-8.



11. Hiom SJ, Furr JR, Russel AD and Dickinson JR. Effects of chlorhexidine diacetate on *Candida albicans*, *C. glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Bacteriol* 1992; 72: 35–40.
12. Giuliana G, Pizzo' G, Milici ME, Musotto GC and Giangreco R. *In vitro* antifungal properties of mouth rinses containing antimicrobial agents. *J Periodontol* 1997; 68: 729–733.
13. Carlsson P. On the epidemiology of *Streptococcus mutans* (dissertation). Malmo: University of Lunds, 1988.
14. Gardner S, Sidisunthor P, Anusarnsunthorn V. A Field Guide to Forest Trees of Northern Thailand. Kobfai Publishing Project, Bangkok. 2000; p. 451.
15. Saralamp P, Chuakul W, Temsiririrkkul R and Clayton T. Medicinal Plants in Thailand. Amarin Printing and Publishing Public Co., Ltd., Bangkok. 1996; p. 1: 41.
16. Wongsawad C, Wongsawad P, Luangphai P and Kumchoo K. *In vitro* effects of aqueous extract from *Artocarpus takoocha* Roxb on tegumental surface of *Haplorchis taichui*. *J Trop Med Public Health* 2005; 36 (Suppl 4): 112-116.
17. Charoenlarp P, Radomyos P and Harinasuta T. Treatment of taeniasis with Puag-Haad: a crude extract of *Artocarpus lakoocha* wood. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1981; 12(4): 568–570.
18. Mongolsuk S, Robertson A and Towers R. 2,4,3',5'-Tetrahydroxystilbene from *Artocarpus lakoocha*. *J Chem Soc* 1957; 1: 2231-2233.
19. Jin W, Na M, An R, Lee H, Bae K and Kang SS. Antioxidant compounds from twig of *Morus alba*. L. *Nat Prod Sci* 2002, 8(4):129-132.
20. Chung KO, Kim BY, Lee MH, Kim YR, Chung HY, Park JH, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. *J Pharm Pharmacol* 2003, 55(12): 1695-1700.
21. Kim YM, Yun J, Lee CK, Lee H, Min KR and Kim Y. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J Biol Chem* 2002 3; 277(18): 16340-16344.

22. Masuda T, Yamashita D, Takeda Y and Yonemori S. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 197–201.
23. Tengamnuay P, Pengrungruangwong K, Pheansri I and Likhitwitayawuid K. *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the in vitro anti-tyrosinase and in vivo skin whitening activities. *Int J Cosmet Sci* 2006; 28(4): 269-276.
24. Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Benchanak K, Lipipun V, Mathew J and Schinazi RF. Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. *Nat Prod Res* 2005a; 19(2): 177-182.
25. Jensen MM, Wright DN and Robison RA. Microbiology for the Health Sciences. Prentice Hall, International Inc., London. 1977.
26. Sasivimolphan P, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Takemoto M, Pramyothin P, Hattori M, et al. Inhibitory activity of oxyresveratrol on wild-type and drug-resistant varicella-zoster virus replication in vitro. *Antiviral Res* 2009; 84(1): 95-7.
27. Pongpan A, Chumsri P and Taworasate T. The antimicrobial activity of some Thai medicinal plants. *Mahidol Univ J Pharm Sci* 1982; 9: 88.
28. Puntumchai A, Kittakoop P, Rajviroongit S, Vimuttipong S, Likhitwitayawuid K and Thebtaranonth Y. Lakoochins A and B, New Antimycobacterial Stilbene Derivatives from *Artocarpus lakoocha*. *J Nat Prod* 2004; 67: 485-486.
29. Pandey A and Bhatnagar SP. Preliminary Phytochemical screening and antimicrobial studies on *Artocarpus lakoocha* Roxb. *Anc Sci Life* 2009; 28: 21-4.
30. Lorenz P, Roychowdhury S and Engelmann M, et al. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: Effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide* 2003; 9(2): 64-76.
31. Andrabi SA, Spina MG and Lorenz P, et al. Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain Res* 2004; 1017: 98-107

32. Ban JY, Jeon SY, Nguyen TT, Bae K, Song KS and Seong YH. Neuroprotective effect of oxyresveratrol from *Smilacis chiniae* rhizome on amyloid beta protein (25–35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 2419–2424.
33. Lee KT, Lee KS, Jeong JH, Jo BK, Heo MY and Kim HP. Inhibitory effects of *Ramulus mori* extracts on melanogenesis. *J Cosmet Sci* 2003; 54(2): 133-42.
34. Chuanasa T, Phromjai J, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Suzuki M, Pramyothin P, Hattori M and Shiraki K. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral Research* 2008; 80(1): 62–70
35. Maneechai S, Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Palanuvej C, Ruangrunsi N and Sirisa-Ard P. Quantitative analysis of oxyresveratrol content in *Artocarpus lakoocha* and 'Puag-Haad'. *Med Princ Pract* 2009; 18(3): 223-227.
36. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 999-1007.
37. O'Toole G, Kaplan HB and Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000. 54, 49–79.
38. Kojic EM and Darouiche RO. Candida infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 255–267.
39. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK and Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 2002; 70: 878–888.
40. Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y and Ichikawa T. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. *J Dent* 2012; 40: 686–692.
41. Nield-Gehrig JS. Dental Plaque Biofilms. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
42. Stambaugh RV, Dragoo M, Smith DM and Carsali L. The limits of subgingival scaling. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1981; 1(5): 30-41.

43. Shani S, Frienman M and Steinber D. The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sorbrinus* and glucosyltransferase in biofilm. *Caries Res* 2000; 34: 260-267.
44. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5: 608-611.
45. Baillie GS and Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida albicans* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemothe* 2000; 46: 397-403.
46. Chandra J, Mukherjee PK, Hoyer LL and Ghannoum MA. *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. *Mycoses* 2012; 55: 46-57.
47. Filoche SK, Soma K and Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol* 2005 Aug; 20(4):221-225.
48. Song JH, Yang TC, Chang KW, Han SK, Yi HK, Jeon JG. *In vitro* effects of a fraction separated from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, in suspension and biofilms, and biofilm formation of mutans streptococci. *J Ethnopharmacol* 2007; 112(3): 419-425.
49. อัมพวัน อภิสริยะกุล. ยาด้านจุลชีพ. เกษัชวิทยา สำหรับนักศึกษาทันตแพทยศาสตร์. ภาควิชา เกษัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, มิถุนายน 2538 หน้า 101-117.
50. NCCLS. Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard-Second Edition. NCCLS document M27-A2, NCCLS, Wayne, PA 2002.
51. 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  $\mu\text{g/ml}$  (VA2-MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38(1): 46-51.
52. 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: 224-231.

53. Brambilla E, Gagliani M, Ionescu A, Fadini L and Garcia-Godoy F. The influence of light-curing time on the bacterial colonization of resin composite surfaces. *Dent Mater* 2009; 25: 1067–1072.
54. Wu WS, Chen CC, Chuang YC, Su BA, Chiu YH, Hsu HJ, et al. Efficacy of combination oral antimicrobial agents against biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Immunol Infect* 2013; 46: 89-95.
55. Klepser ME. Antifungal resistance among *Candida* species. *Pharmacother* 2001; 21: 124S–132S.
56. Khan ZU, Chandy R and Metwali KE. *Candida albicans* strain carriage in patients and nursing staff of an intensive care unit: a study of morphotypes and resistotypes. *Mycoses* 2003; 46: 476–486.
57. Adrian M and Jeandet P. Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia* 2012; 83(8): 1345–1350.
58. Saowakon N, Tansatit T, Wanichanon C, Chanakul W, Reutrakul V and Sobhon P. *Fasciola gigantica*: anthelmintic effect of the aqueous extract of *Artocarpus lakoocha*. *Exp Parasitol* 2009; 122(4): 289–98.
59. Fairweather I, Holmes SD and Threadgold LT. *Fasciola hepatica*: motility responses to fasciolicides *in vitro*. *Exp Parasitol* 1984; 57: 209–244.
60. McKinstry B, Fairweather I, Brennan GP and Forbes AB. *Fasciola hepatica*: Tegumental surface alterations following treatment *in vivo* and *in vitro* with nitroxylnil (Trodat). *Parasitol Res* 2003; 91: 251–263.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

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

Teanpaisan R, Senapong S and Puripattanavong J. *In vitro* antimicrobial and antibiofilm activity of *Artocarpus Lakoocha* (Moraceae) extract against some oral pathogens. *Trop J Pharm Res* 2014; 13(7): 1149-1155.

## Original Research Article

**In vitro Antimicrobial and Antibiofilm Activity of *Artocarpus Lakoocha* (Moraceae) Extract against Some Oral Pathogens**Rawee Teanpaisan<sup>1\*</sup>, Sukunlaya Senapong<sup>1</sup> and Jindaporn Puripattanavong<sup>2</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

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

Received: 24 April 2014

Revised accepted: 19 June 2014

**Abstract****Purpose:** To evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of *A. lakoocha* extract against oral pathogens by an *in vitro* method.**Methods:** The dried powder of the aqueous extract of *A. lakoocha* was purchased from a Thai traditional drug store. Representative strains of oral pathogens (*Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Lactobacillus fermentum* ATCC 14921, *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33284, *Porphyrromonas gingivalis* ATCC 33277, *Pseudella infernalis* ATCC 25611, *Pseudella nigrescens* ATCC 25261, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25180 and *Tannerella forsythia* ATCC 43037) were tested for minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) using a microdilution technique, as well as by a time kill assay. Antibiofilm activity was investigated by a 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide (MTT) assay.**Results:** All tested strains were susceptible to *A. lakoocha* extract with variable degrees of antimicrobial inhibition. The extract was effective against both Gram-negative bacteria (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyrromonas gingivalis*) and Gram-positive bacteria (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*), with MIC ranging from 0.10 – 0.39 mg/ml and MBC from 0.10 – 3.12 mg/ml. Killing activity depended on time and concentrations of the extract. The extract acted as a potent antibiofilm agent with dual actions, preventing biofilm formation and also eradicating the existing biofilm.**Conclusion:** *A. lakoocha* extract possesses compounds with good antimicrobial properties that may be used for oral infectious diseases caused by certain oral pathogens associated with dental caries and/or periodontal diseases. For the application, *A. lakoocha* extract may be incorporated in mouthwash or toothpaste.**Keywords:** *Artocarpus lakoocha*, Antimicrobial, Biofilm, Dental caries, Periodontal diseases, Time-kill assay

Tropical Journal of Pharmaceutical Research is indexed by Science Citation Index (SciSearch), Scopus, International Pharmaceutical Abstract, Chemical Abstracts, Embase, Index Copernicus, EBSCO, African Index Medicus, JournalSeek, Journal Citation Reports/Science Citation, Directory of Open Access Journals (DOAJ), African Journal Online, Bioline International, Open-J-Gate and Pharmacy Abstracts

**INTRODUCTION**

Antimicrobial properties have been derived from a wide range of plant extracts. Natural products are sources of chemical compounds that can be

used as antimicrobial agents. *Artocarpus lakoocha* Roxb (Moraceae) is a traditional herbal medicine, which is commonly found in tropical areas such as India and Thailand. The oxyresveratrol, 2, 4, 3', 5'-tetrahydroxystilbene,



is the major constituent of aqueous extract of *Artocarpus lakoocha* which has been revealed as a natural anthelmintic [1] and anti-herpes simplex virus (HSV) both *in vitro* and *in vivo* studies [2,3]. It has also been reported to show *in vitro* anti-varicella zoster virus activity [4,5]. Another study has suggested that oxyresveratrol was neuroprotective and inhibited apoptotic cell death in transient ischemia in a rat model [6]. *A. lakoocha* extract has a potential application as a novel skin whitening agent in cosmetic preparations [7], due to its potent tyrosinase inhibitory [8] and antioxidant activities [9].

Oral diseases, including dental caries and periodontal diseases, are commonly caused by a wide range of microorganisms associated with oral biofilm or dental plaque [10,11]. Recently study reported that oxyresveratrol exhibited antibacterial activities against periodontal pathogens, *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* [12]. Our previous study indicated that *A. lakoocha* extract may be a useful antimicrobial medication for endodontic treatment, due to its ability to inhibit growth of *Enterococcus faecalis* [13]. However, information of the antibacterial property of *A. lakoocha* extract against oral pathogens is still limited.

This study is aimed at investigating the antimicrobial and antibiofilm activities of *A. lakoocha* extract against oral pathogens as well as the potential health benefits of the extract.

## EXPERIMENTAL

### Preparation of *A. lakoocha* extract

The dried powder of the aqueous extract of *A. lakoocha* was purchased from a Thai traditional drug store at Chiang Mai province, Thailand, in January 2005. Oxyresveratrol, a major compound of *A. lakoocha* extract, was verified to be > 95 % purity using a high performance liquid chromatography by Dr Jindaporn Puripattanavong, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University. The extract was stored at -20 °C and a voucher specimen (no. SKP117011201) was deposited at the herbarium of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Thailand. A 10 % (w/v) stock solution of *A. lakoocha* extract was prepared in 10 % v/v dimethyl sulfoxide (DMSO) for use in this study.

### Bacterial strains and growth conditions

A total of 11 species were employed in the study including five (5) Gram positive cariogenic bacteria (*S. mutans* ATCC 25175, *S. sobrinus* ATCC 33478, *E. faecalis* ATCC 19433, *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931, and *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741) and six (6) Gram negative periodontopathogenic bacteria (*A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *P. gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Prevotella nigrescens* ATCC 25261, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 and *Tanarella forsythia* ATCC 43037).

Organisms were maintained on either brain heart infusion agar (BHA) with 5 % (v/v) blood for facultative bacteria and supplemented with a 0.5 % (w/v) yeast extract, haemin and vitamin K 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.

### Antibacterial assays

#### Agar diffusion test

The broth culture of each tested strain (approximately 10<sup>7</sup> cfu/ml) was mixed thoroughly with the sterile BHA (20 ml) and then poured into a plate with 6-mm diameter metal cups. The metal cups were removed after the medium has set, and then in the wells were added 100 µl of 10 % *A. lakoocha* extract, while 10 % DMSO was used as the control. The plate was incubated in appropriate conditions according to microorganisms tested at 37 °C for 24 h. Antimicrobial activity was evaluated by measuring inhibition zone diameters; the experiments were conducted in triplicate.

#### Minimal inhibitory and minimal bactericidal concentration

The minimal inhibitory concentration (MIC) of *A. lakoocha* extract against each tested strain was determined using the Clinical and Laboratory Standards Institute-(CLSI) recommended broth microdilution assay as modified Briefly, two fold serial dilutions of *A. lakoocha* extract were prepared with brain heart infusion broth (BHI) at a total volume of 100 µl per well in the 96-well plates. The final concentrations of *A. lakoocha* extract ranged from 25-0.01 mg/ml. The microtiter plate wells were inoculated with 100 µl of 0.5 McFarland for each tested strain per well. After overnight incubation at 37 °C appropriate conditions, absorbance was measured at 600 nm using a microtiter plate reader (Expert Plus UV; ASYS Hitech GmbH Eugendorf, Austria) to

assess the cell growth. The negative control consisted of BHI broth and bacterial cell suspension without the agent, and the blank control contained only the medium. The MIC end-point was defined as the lowest concentration of the test agent that completely inhibited growth or produced at least 90 % reduction of absorbance in comparison with the negative control. All experiments were performed in triplicate and the average values were reported as MIC.

The minimal bactericidal concentration (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 24 - 48 h at 37 °C in appropriate conditions.

#### Time kill assay

Bactericidal activity of *A. lakoocha* extract was examined using a time kill assay. Growing cultures (10<sup>6</sup> cfu/ml) of each representative strain, Gram positive (*S. mutans* ATCC 25175) and Gram negative bacteria (*A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384), were added to appropriate medium and exposed to 1 $\times$ , 2 $\times$  and 4 $\times$  the MIC of *A. lakoocha* extract. Samples were taken for colony counts at 0, 30 min, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h. The viable counts were determined after appropriate incubation and each experiment was performed in triplicate. Chlorhexidine diacetate monohydrate (CHX, 0.1 %) and extract free medium were used as the positive and negative controls, respectively.

#### Antibiofilm assay

##### Inhibition of biofilm formation

The effect of *A. lakoocha* extract on biofilm formation of each representative strain, *S. mutans* ATCC 25175 and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384, was examined using the modified microdilution method of Tang *et al* [14]. Briefly, two-fold serial diluted concentrations from 25 to 0.01 mg/ml of *A. lakoocha* extract were made in a flat-bottom 96-well microtiter plate. The CHX (0.1 %), phosphate buffered saline and the medium alone were used as positive, non-treated and blank controls, respectively. An equal volume of the tested strains (1  $\times$  10<sup>6</sup> cfu/ml) was added and mixed with the agents, except in the well with medium alone (the blank control). Following incubation at 37 °C for 24 h, supernatants were discarded and washed three times with phosphate buffered saline. Biofilm formation was quantified using a 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,

5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide (MTT) assay. 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. The OD values indicated a number of surviving microorganisms in the biofilm. Percentage inhibition was calculated using an equation [1 - (A570 of the test/A570 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.

##### Eradication of biofilm formation

The antimicrobial activity of *A. lakoocha* extract in the biofilm was also examined using the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) assay. Briefly, 200  $\mu$ l (10<sup>6</sup> cfu/ml) of each representative strain, *S. mutans* ATCC 25175 and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384, was inoculated into each well of the flat-bottom 96-well microtiter plate and incubated for 24 h in appropriate conditions at 37 °C. After biofilm formation, the medium was then blotted out and the well carefully washed three times with sterile phosphate buffered saline in order to remove non-adherent cells. *A. lakoocha* extract was then added to the biofilms in two-fold dilutions serially from 25 to 0.01 mg/ml and incubated for 24 h in appropriate conditions at 37 °C. At the end-point of the treatment of the biofilms with *A. lakoocha* extract, the adherent bacteria were washed three times with sterile phosphate buffered saline. The numbers of surviving bacteria were determined by a MTT assay. The MBEC value was defined as the concentrations that showed 50 % and 90 % inhibition of biofilm formation on the biofilm. And 0.1 % CHX, phosphate buffered saline and the medium alone were used as the positive, non-treated and blank controls, respectively. The percentage eradication was calculated using an equation [1 - (A570 of the test/A570 of non-treated control)]  $\times$  100.

##### Scanning electron microscopy

A scanning electron microscopy (SEM) was performed to examine the morphology changes of each representative strain in *S. mutans* ATCC 25175 and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 after treatment with 10 % DMSO or 0.1 mg/ml *A. lakoocha* extract as the control and treated sample, respectively. After 8 h incubation at 37 °C in an appropriate condition, the bacterial pellet was collected and washed twice with phosphate buffered saline with pH 7 by centrifugation at 1000 rpm at 4 °C for 5 min. The bacterial pellet was fixed overnight in 2.5 %

glutaraldehyde and 0.1 M cacodylate buffer at cool temperature, and then dehydrated in a graded series of ethanol solutions for 30 min. The samples were subsequently dried by a critical point drying method and coated with gold. The microbial morphology was observed with a field emission SEM.

### Statistical analysis

Data were expressed as mean and standard deviation (S.D.) by computational analysis from triplicate independent experiments.

## RESULTS

*A. lakoocha* extract was evaluated for antimicrobial potential against oral pathogens by an agar diffusion assay, the results of which are shown in Table 1. All tested strains were susceptible to *A. lakoocha* extract with variable degrees of inhibition zones. The extract was found effective against both Gram positive bacteria and Gram negative bacteria. The solvent control, 10 % DMSO, did not affect microorganism growth. The MIC and MBC of *A. lakoocha* extract as evaluated by a microdilution assay are shown in Table 1. The most susceptible strains were *S. mutans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *T. forsythia* with MIC of approximately 0.1 mg/ml and MBC 0.2 mg/ml.

Time-kill curves were performed for 2 representative oral pathogens (*S. mutans* and *A. actinomycetemcomitans*); the killing activity depended on time and concentrations of *A. lakoocha* extract. Generally, 1× MIC could reduce the number of the CFU by approximately 50 %, although complete sterility was not achieved. At 4× MIC and 2× MIC, *S. mutans* was

killed after 8 and 12 h, while *A. actinomycetemcomitans* was killed after 6 and 8 h, respectively (Figure 1). The killing of the positive control (CHX) was observed within 30 min.

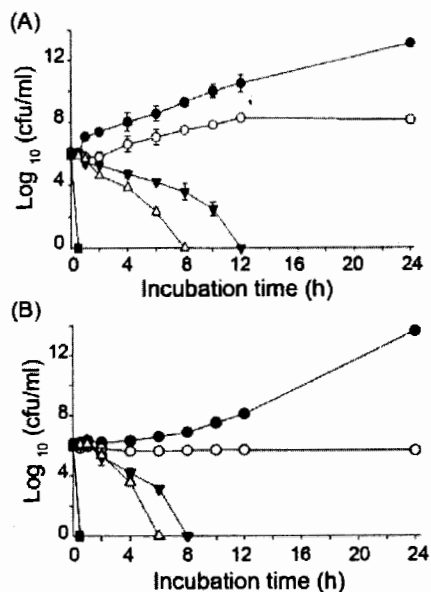
The concentrations of *A. lakoocha* extract required to inhibit of the ≥ 50 % biofilm formation (MBIC<sub>50</sub>) of *S. mutans* and *A. actinomycetemcomitans* were 0.39 ± 0.11 and 0.10 ± 0.09 mg/ml, and for ≥ 90 % inhibition of biofilm growth (MBIC<sub>90</sub>) were 3.12 ± 0.02 and 0.39 ± 0.10 mg/ml, respectively (Figure 2A). The eradication of the biofilm formation of *S. mutans* and *A. actinomycetemcomitans* by *A. lakoocha* extract at various concentrations and with 0.1 % CHX is demonstrated in Figure 2B. The concentrations of *A. lakoocha* extract to eradicate of the ≥ 50 % biofilm formation (MBEC<sub>50</sub>) of *S. mutans* and *A. actinomycetemcomitans* were 1.56 ± 0.13 and 0.78 ± 0.12 mg/ml, and for ≥ 90 % of the eradication of biofilm growth (MBEC<sub>90</sub>) were 6.25 ± 0.34 and 3.12 ± 0.18 mg/ml, respectively.

In Figure 3, the change in morphology of *S. mutans* and *A. actinomycetemcomitans* was observed using SEM after treating 0.1 mg/ml of *A. lakoocha* extract in comparison with the control (10 % DMSO). Bacterial cells of *S. mutans* and *A. actinomycetemcomitans* in control groups showed a regular, smooth surface as shown in Figure 3A and C, respectively. It revealed that the bacterial cells after treatment with *A. lakoocha* extract lost their original shape showing a distorted, irregular cell wall structure, which was clearly observed in *A. actinomycetemcomitans* (Figure 3D).

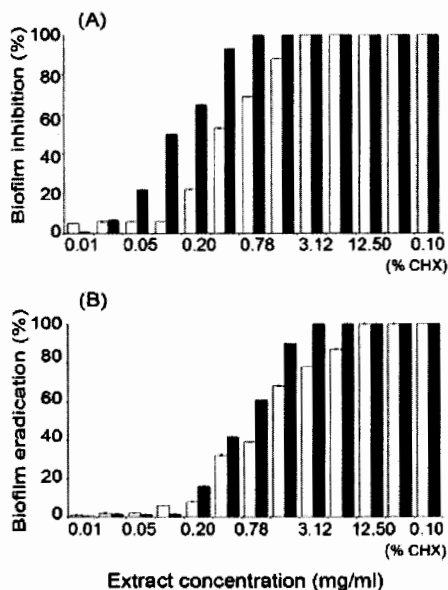
**Table 1:** Inhibition zone, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *A. lakoocha* extract against oral pathogens (mean ± SD, n = 3)

Bacteria strain	Inhibition zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<b>Gram positive bacteria</b>			
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	30.5±0.00	0.10±0.00	0.20±0.00
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	16.0±0.35	0.39±0.00	1.56±0.00
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	18.2±0.00	0.39±0.00	3.12±0.00
<i>L. fermentum</i> ATCC 14931	17.7±0.35	0.39±0.00	0.78±0.00
<i>L. salivarius</i> ATCC 11741	15.0±1.41	0.10±0.05	0.78±0.00
<b>Gram negative bacteria</b>			
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	21.0±1.41	0.10±0.05	0.10±0.00
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	30.5±0.70	0.20±0.05	0.20±0.00
<i>P. nigrescens</i> ATCC 25261	25.5±0.70	0.39±0.00	0.39±0.00
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	30.7±0.35	0.10±0.00	0.20±0.00
<i>T. forsythia</i> ATCC 43037	29.0±0.00	0.10±0.00	0.20±0.00
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384	29.5±2.12	0.10±0.00	0.20±0.00

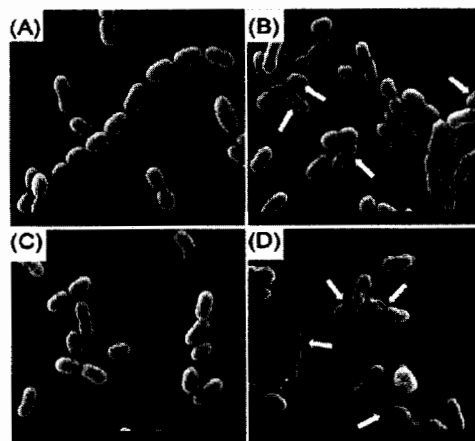
ATCC = American Type Culture Collection



**Figure 1:** Time-kill curves of *A. lakoocha* extract against *S. mutans* (A) and *A. actinomycetemcomitans* (B). Bacteria stains were incubated with 0x MIC (●), 1x MIC (○), 2x MIC (▼) and 4x MIC (△); 0.1 % (w/v) CHX (■) over time; CFU = colony forming units



**Figure 2:** Inhibition of biofilm formation (A) and eradication of biofilm formation (B) of *S. mutans* (□) and *A. actinomycetemcomitans* (■) by *A. lakoocha* extract at various concentrations and with 0.1 % (w/v) CHX (positive control); error bars denote standard deviation (n = 6)



**Figure 3:** Scanning electron microscope images of *S. mutans* (top) and *A. actinomycetemcomitans* (below) cells, in the control (BHI broth) (A and C), in the presence of *A. lakoocha* extract (B and D)

## DISCUSSION

The search for novel antimicrobial agents from plants has been of great interest in the last few decades. Throughout human history, infectious diseases are known to have been treated with compounds derived from plants and herbal remedies.

Results of the present study clearly demonstrated that *A. lakoocha* extract revealed good antibacterial agent activity against both cariogenic bacteria (e.g. *S. mutans*, *S. sobrinus*) and periodontopathogens including *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. forsythia* and *A. actinomycetemcomitans*. Gram-negative bacteria were generally found to be more susceptible than Gram-positive bacteria. Our results are in agreement with Phoolcharoen *et al* [12] who demonstrated the antimicrobial activity of *A. lakoocha* extract against periodontopathogens Gram-negative bacteria. However, cariogenic bacteria were not susceptible to *A. lakoocha* extract in that study [12]. This may be due to the different strains used in that study; however, no details of the strains were given. Besides, the *in vitro* antimicrobial activity of *A. lakoocha* extract against oral pathogen planktonic cells, the antibiofilm activity of *A. lakoocha* extract was also assessed in this study. Experiments comparing biofilms of oral strains with broth cultures have demonstrated that higher concentrations of *A. lakoocha* extract are required to significantly inhibit existing biofilm cells. This is an expected result since bacteria in the biofilm are strongly protected and less

susceptible to antimicrobial agents than in planktonic form. It was shown that *A. lakoocha* extract was able to eradicate oral biofilm in a dose and time dependent manner. Our results indicate that *A. lakoocha* extract acts as a potent antibiofilm agent that has dual actions preventing biofilm formation and eradication of existing biofilm.

Oral infections are commonly caused by imbalance of microorganisms in dental plaque or biofilm. Pathologies such as dental caries or periodontitis arise when an imbalance of microorganisms occurs in the biofilm resulting in a decrease of the indigenous bacteria and in favour of pathogenic strains. An effective approach for controlling dental plaque is to prevent formation of biofilm or to remove biofilm by using antimicrobial or chemical agents [15]. The use of CHX solution, a commercial antimicrobial agent, for clinical application is limited due to its bitter taste and staining of the tooth surface [16]. Thus, it is reasonable to develop alternative antiplaque agents from natural sources that exhibit few or no side-effects. It was found that *A. lakoocha* extract has an efficacy for the prevention of plaque-related diseases such as dental caries and periodontitis. Although the MIC and MBC of *A. lakoocha* extract obtained were higher than for CHX, the extract exhibited a better antimicrobial activity than other herb extract such as garlic [17], *Polygonum cuspidatum* root [18], *Coco cravo* [19] and *Rhei Rhizoma* [20] with MICs against *S. mutans* of 71.4, 1 - 2, 4 and > 5 mg/ml, respectively.

The exact mechanism of action exerted by oxyresveratrol, the major constituent of *A. lakoocha* extract, has not been previously reported. SEM images in this study indicated that oxyresveratrol might have effect on the cell wall integrity of bacterial cells. Exposure of *S. mutans* and *A. actinomycetemcomitans* to *A. lakoocha* extract revealed an irregular cell wall structure. All the results above indicated that *A. actinomycetemcomitans* is more sensitive to *A. lakoocha* extract than *S. mutans*. This may be due to Gram positive bacteria contained in the thicker peptidoglycan layer than Gram negative bacteria.

## CONCLUSION

This study suggests that *A. lakoocha* extract possesses compounds with potential antimicrobial properties that may be useful for treatment of oral infectious diseases caused by certain oral pathogens. However, since this study was conducted on artificial biofilm *in vitro*, the

actual effects of *A. lakoocha* extract on dental plaque would need to be evaluated clinically.

## ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (no. DEN5405475).

## REFERENCES

- Charoenlarp P, Radomyos P, Harinasuta T. Treatment of taeniasis with Puag-Haad: a crude extract of *Artocarpus lakoocha* wood. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1981; 12(4): 568-570.
- Likhitwitayawuid K, Sritulatai B, Benchanak K, Lipipun V, Mathew J, Schinazi RF. Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. *Nat Prod Res* 2005; 19(2): 177-182.
- Chuanasa T, Phromjai J, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Suzuki M, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral Res* 2008; 80(1): 62-70.
- Docherty JJ, Sweet TJ, Bailey E, Faith SA, Booth T. Resveratrol inhibition of varicella-zoster virus replication *in vitro*. *Antiviral Res* 2006; 72(3): 171-177.
- Sasivimolphan P, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Takemoto M, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Inhibitory activity of oxyresveratrol on wild-type and drug-resistant varicella-zoster virus replication *in vitro*. *Antiviral Res* 2009; 84(1): 95-97.
- Andrabi SA, Spina MG, Lorenz P, Ebmeyer U, Wolf G, Horn TFW. Oxyresveratrol (trans-2, 3, 4, 5-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain Res* 2004; 1017(1-2): 98-107.
- Tengamnuay P, Pengrungruangwong K, Pheansri I, Likhitwitayawuid K. *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the *in vitro* anti-tyrosinase and *in vivo* skin whitening activities. *Int J Cosmet Sci* 2006; 28(4): 269-276.
- Kim YM, Yun J, Lee CK, Lee H, Min KR, Kim Y. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J Biol Chem* 2002; 277(18): 16340-16344.
- Singhatong S, Leelarungrayub D, Chaiyasut C. Antioxidant and toxicity activities of *Artocarpus lakoocha* Roxb. heartwood extract. *J Med Plants Res* 2010; 4(10): 947-953.

10. Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am* 2010; 54(3): 441-454.
11. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilm: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002; 28(1): 12-55.
12. Phoolcharoen W, Sooampon S, Sritularak B, Likhitwitayawuid K, Kuvatanasuchati J, Pavasant P. Anti-periodontal pathogen and anti-inflammatory activities of oxyresveratrol. *Nat Prod Commun* 2013; 8(5): 613-616.
13. Teanpaisan R, Ruangkiatkul P, Thammasilboon K, Puripattanavong J, Faroongsang D. Effectiveness of *Artocarpus lakoocha* extract, poloxamer 407, on *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Investig Clin Dent* 2013; 4(4): 219-224.
14. 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.
15. Marsh PD. Contemporary perspective on plaque control. *Br Dent J*. 2012; 212(12): 601-606.
16. Flotra L, Gjermo P, Rølla G, Waerhaug J. Side effect of chlorhexidine mouth washes. *Eur J Oral Sci* 1971; 79(2): 119-125.
17. Bakri IM, Douglas CWI. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol* 2005; 50(7): 645-651.
18. Song JH, Kim SK, Chang KW, Han SK, Yi HK, Jeon JG. In vitro inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factor of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Arch Oral Biol* 2006; 51(12): 1131-1140.
19. Alviano WS, Alviano DS, Diniz CG, Antoniolli AR, Alviano CS, Farias LM, Carvalho MA, Souza MM, Bolognese AM. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Arch Oral Biol* 2008; 53(6): 545-552.
20. Yim NH, Jung YP, Cho WK, Kim T, Kim A, Im M, Ma JY. Screening of aqueous extracts of medicinal herbs for antimicrobial activity against oral bacteria. *Interg Med Res* 2013; 2(1): 18-24.

## ภาคผนวก ข

บทความวิจัยที่ส่งตีพิมพ์ในวารสาร Songklanakarin Journal of Science and Technology, Research and Development Office (RDO), Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

Senapong S, Puripattanavong J and Teanpaisan R. Anticandidal and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract. *Songklanakarin J Sci Technol* 2014; 36 (4): 451-457.



Original Article

## Anticandidal and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract

Sukunlaya Senapong<sup>1</sup>, Jindaporn Puripattanavong<sup>2</sup>, and Rawee Teanpaisan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Common Oral Diseases and Epidemiology Research Center, 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, Songkhla, 90112 Thailand.

Received 10 October 2013; Accepted 21 March 2014

### Abstract

This study aimed to investigate the anticandidal and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract against various *Candida*. Anticandidal activity of *A. lakoocha* extract was determined using an agar well diffusion method. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were assessed using a method of the Clinical and Laboratory Standards Institute. A time kill assay was also performed. Antibiofilm activity was investigated using a 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide (MTT) assay. The extract was found to be effective against all tested *Candida* strains with MIC ranging from 0.05 to 3.12 mg/ml and MFC ranging from 0.10 to 25 mg/ml. The killing activity depended on the time and concentrations of the extract. *A. lakoocha* extract acts as a potent antibiofilm agent with dual actions, preventing and eradicating the biofilm. Results suggest that *A. lakoocha* extract is a potential source of natural anticandidal agent, which may be useful for prevention or treatment of candidiasis.

**Keywords:** *Artocarpus lakoocha*, *Candida*, anticandidal activity, antibiofilm activity

### 1. Introduction

There has been a significant increase in incidence of infections caused by *Candida* spp. (candidiasis), mainly due to the rise of the AIDS epidemic, an increasingly aged population, higher numbers of immunocompromised patients, the more widespread use of indwelling medical devices, and the use of broad spectrum antifungal drugs. *Candida albicans* is the main cause of candidiasis, however, non-*C. albicans* (NCAC) species such as *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei* are now frequently reported as human pathogens (Moran *et al.*, 2002).

The pathogenesis of candidiasis is facilitated by a number of factors including the ability to adhere to medical devices and/or host cells and to form biofilms. Biofilm

formation is an important virulence factor for a number of *Candida* species, as it confers significant resistance to antifungal therapy by limiting the penetration of substances through the matrix and protecting cells from host immune responses (O'Toole *et al.*, 2000; Kojic and Darouiche, 2004; Kuhn *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2012). It has been demonstrated that biofilms formed by *C. albicans* and/or NCAC strains have been associated with higher morbidity and mortality rates compared with strains unable to form biofilms (Kumamoto, 2002).

*Artocarpus lakoocha* extract has been reported to contain antibacterial activity against a wide range of bacteria including *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei* and *Escherichia coli* (Pandey *et al.*, 2009; Puntumchai *et al.*, 2004). *A. lakoocha* is a valuable tropical tree species belonging to the Moraceae family; commonly found in tropical areas such as India and Thailand. The major constituent of *A. lakoocha* bark extract is oxyresveratrol,

\* Corresponding author.

Email address: rawee.t@psu.ac.th



(2, 4, 3,5'-tetrahydroxystilbene), which has also been reported to possess *in vitro* anti-virus activity (anti-herpes simplex virus (HSV), anti-varicella zoster virus) (Chuanasa *et al.*, 2008; Docherty *et al.*, 2006; Likhitwitayawuid *et al.*, 2005; Sasivimolphan *et al.*, 2009; Sritulaluk *et al.*, 1998). Another study suggested that oxyresveratrol was neuro-protective and inhibited apoptotic cell death in transient ischemia in a rat model (Andrabi *et al.*, 2004). Due to its reported potent tyrosinase inhibitory and antioxidant activities (Sritulaluk *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002), the material has potential application as a novel skin whitening agent in cosmetic preparations (Tengamnuay *et al.*, 2006). Most studies have reported its antiviral and antibacterial activities; however, data regarding the antifungal capability of *A. lakoocha* extract has been limited.

The aim of this study was to investigate the anti-candidal and antibiofilm activity of *A. lakoocha* extract against various *Candida* spp. via an *in vitro* study.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Preparation of *A. lakoocha* stem bark extract

The extract of *A. lakoocha* was obtained by boiling small pieces of stem bark in water. After removing the remaining wood fragments and other insoluble residues, the aqueous extract was dried to give a yellow-brown powder for use in this study. The content of oxyresveratrol in the dried extract was determined to be >80% (w/w) by using high performance liquid chromatography. A 10% (w/v) stock solution of *A. lakoocha* extract was prepared in 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck) for use in this study.

### 2.2 *Candida* strains and growth conditions

The tested *Candida* strains included *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida dubliniensis* MYA-577, *Candida dubliniensis* MYA-646, *Candida glabrata* ATCC 66032, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida krusei* ATCC 34135, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* ATCC 66029, *Candida tropicalis* ATCC 750, and *Candida tropicalis* ATCC 13803. All strains were cultured on Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Difco Laboratories, Detroit, Michigan) aerobically at 37°C for 24 h.

### 2.3 Anticandidal assay

#### 2.3.1 Agar well diffusion assay

The broth culture of each tested strain (approximately  $10^7$  CFU/ml) was mixed thoroughly with the sterile SDA (20 ml), and then poured into a plate with 6-mm diameter metal cups. The metal cups were removed after the medium set, and then the wells were added with 100  $\mu$ l of 10% *A. lakoocha* extract, while 10% (w/v) DMSO was used as the negative

control and 0.1% (w/v) CHX was used as the positive control. Plates were incubated at 37°C for 24 h. The antifungal activity was evaluated by measuring inhibition zone diameters in millimeters. Duplicates were maintained and the experiment was repeated thrice.

#### 2.3.2 Broth microdilution assay

The minimal inhibitory concentration (MIC) of *A. lakoocha* extract against each tested strain was determined by broth microdilution method (NCCLS, 2002). Briefly, two-fold serial dilutions of *A. lakoocha* extract were prepared with SDB at a total volume of 100  $\mu$ l per well in 96-well microtiter plates. The final concentrations of *A. lakoocha* extract ranged from 0.02 to 25.00 mg/ml. The microtiter plate wells were inoculated with 100  $\mu$ l of each tested strain at the final concentration of  $1 \times 10^3$  CFU/ml, and incubated at 37°C for 24 h. The negative control consisted of SDB broth and *Candida* suspension without the agent, and the blank control contained only the medium. The MIC was defined as the lowest concentration of the test agent that completely inhibited growth in comparison with the negative control. All experiments were performed in triplicate.

The minimal fungicidal concentration (MFC) was defined as the lowest concentration in a well that did not allow visible growth when 10  $\mu$ l of the well content was plated on agar and grown for 24 h at 37°C.

### 2.4 Killing kinetics assay

Candidal activity of *A. lakoocha* extract was studied using a time-kill kinetic method. Growing cultures ( $10^6$  CFU/ml) of each representative strain, *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 and *C. dubliniensis* MYA-577 were added to SDB and were exposed to 1 $\times$ , 2 $\times$  and 4 $\times$  the MIC of *A. lakoocha* extract. Samples were taken for colony counts at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h. The viable counts were determined using the serial dilution method after incubation at 37°C for 24 h. Each experiment was performed three times to confirm the results. Chlorhexidine (CHX, 0.1% (w/v)) and extract free were used as the positive and negative controls, respectively.

### 2.5 Antibiofilm assay

#### 2.5.1 Inhibition of biofilm formation

The effect of *A. lakoocha* extract on biofilm formation of each representative strain, *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 and *C. dubliniensis* MYA-577 was examined using the modified microdilution method (Tawe-chaisupapong *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013). Briefly, two-fold serial diluted concentrations (0.02-25.0 mg/ml) of *A. lakoocha* extract were made in a flat-bottom 96-well microtiter plate. The CHX (0.1%, w/v), PBS and the medium alone were used as the positive, non-treated and blank controls, respectively.

An equal volume of the tested strains ( $1 \times 10^6$  CFU/ml) was added and mixed with the agent, except in the well with medium alone (the blank control). Following incubation at 37°C for 24 h, 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) assay. After washing, 100 µl PBS with 0.5% (w/v) MTT (Sigma-Aldrich, USA) solution was added and allowed to incubate for 3 h at 37°C. The MTT solution was replaced with 100 µl DMSO and allowed to incubate for 15 min at room temperature. The number of surviving cells was 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 *Candida* in the biofilm. Percentage inhibition was calculated using this equation:  $[1 - (A_{570} \text{ of the test} / A_{570} \text{ of the non-treated control})] \times 100\%$ . The biofilm inhibitory concentrations (MBIC<sub>50</sub> and MBIC<sub>90</sub>) were defined as the concentrations that showed 50% and 90% inhibition of biofilm formation. All experiments were performed in triplicate.

### 2.5.2 Eradication of biofilm formation

The antimicrobial activity of *A. lakoocha* extract in the biofilm was also examined using the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) assay (Brambilla *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2013). Briefly, 200 µl ( $10^6$  CFU/ml) of each representative strain, *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 and *C. dubliniensis* MYA-577 was inoculated into each well of the flat-bottom 96-well microtiter plate and incubated for 24 h at 37°C. After biofilm formation, the medium was then blotted out and the well carefully washed three times with sterile PBS in order to remove non-adherent cells. *A. lakoocha* extract was then added to the biofilms in

two-fold serial dilutions (0.02-25 mg/ml) and incubated for 24 h at 37°C. At the end-point of the treatment of the biofilms with *A. lakoocha* extract, the adherent *Candida* was washed three times with sterile PBS. The numbers of surviving *Candida* were determined by a MTT assay. The MBEC value was defined as the concentrations that showed 50% and 90% eradication of *Candida* in the biofilm. The 0.1% (w/v) CHX, PBS and the medium alone were used as the positive, non-treated and blank controls, respectively. The experiments were performed in triplicate.

### 2.6 Statistical analysis

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

### 3. Results

The anticandidal activity of *A. lakoocha* extract was evaluated using an agar well diffusion assay, which demonstrated that all tested strains were susceptible to *A. lakoocha* extract with variable degrees of inhibition zones (Table 1). An example of an inhibition zone of *A. lakoocha* extract is shown in Figure 1; the vehicle control (10% DMSO) did not affect *Candida* growth. The MIC and MFC of *A. lakoocha* extract as evaluated by a microdilution assay are shown in Table 1. *A. lakoocha* extract exhibited anticandidal activity against most tested *Candida* strains with MICs ranging from 0.05 to 3.12 mg/ml and MFCs ranging from 0.10 to 25.00 mg/ml (Table 1).

Table 1. Antimicrobial activity of *A. lakoocha* extract against *Candida* spp.

Stains of <i>Candida</i> spp.	Inhibition zone (mm) Mean ± SD	Concentration of <i>A. lakoocha</i> extract (mg/ml)	
		MIC <sup>a</sup>	MFC <sup>b</sup>
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	20±0.13	0.78	1.56
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	15±0.14	1.56	3.12
<i>C. dubliniensis</i> MYA-577	15±0.21	0.78	1.56
<i>C. dubliniensis</i> MYA-646	20±0.15	0.78	1.56
<i>C. glabrata</i> ATCC 66032	20±0.13	1.56	25.00
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	18±0.06	1.56	12.50
<i>C. krusei</i> ATCC 34135	13±0.06	3.12	25.00
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	14±0.10	3.12	25.00
<i>C. tropicalis</i> ATCC 66029	28±0.05	0.05	0.10
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	19±0.15	0.78	12.50
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	20±0.06	0.78	25.00

<sup>a</sup> MIC – Minimum Inhibitory Concentration

<sup>b</sup> MFC – Minimum Fungicidal Concentration

Time kill curves were performed for 3 representative *Candida* spp. (*C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 and *C. dubliniensis* MYA-577); the killing activity depended on time and concentrations of *A. lakoocha* extract. Generally, 1× MIC could reduce the number of CFU by approximately 50% after 10 h of incubation; however, complete sterility was not achieved. At 4× MIC and 2× MIC, all strains were killed after 6 and 8 h, respectively (Figure 2). Killing by the positive control (CHX) was observed within 30 min.

The concentrations of *A. lakoocha* extract required to inhibit ≥50% biofilm formation (MBIC<sub>50</sub>) of *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 and *C. dubliniensis* MYA-577 were 3.13±0.23, 0.39±0.12 and 0.39±0.18 mg/ml, respectively, and for ≥90% inhibition of biofilm growth (MBIC<sub>90</sub>) the concentrations were 25.00±0.18, 1.56±0.05, and 1.56±0.29 mg/ml, respectively. At the concentration of *A. lakoocha* extract > 0.10 mg/ml, there was a statistically significant inhibition of biofilm growth of all tested strains compared to non-treated control (Figure 3). The amount of *A. lakoocha* extract required to eradicate ≥50% biofilm growth (MBEC<sub>50</sub>) of *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 and *C. dubliniensis* MYA-577 were 6.25±0.20, 3.12±0.13 and 3.12±0.23 mg/ml, respectively, and for ≥90% of the eradication of biofilm growth (MBEC<sub>90</sub>) the amounts were > 25.00, 12.50±0.20 and 25.00±0.26 mg/ml, respectively. At the concentration of *A. lakoocha* extract > 0.20 mg/ml, there was a statistically significant eradication of biofilm growth of all tested strains compared to non-treated control (Figure 4).

#### 4. Discussion

*Candida* species are the most common fungal pathogens in humans and are the causative agents at various locations in the body, giving rise to severe morbidity in millions of individuals worldwide (Calderone and Fonzi, 2001; Ruhnke, 2002). In the oral cavity, *C. albicans* is the organism that most frequently causes a range of mucosal infections including oral candidiasis e.g. oropharyngeal candidiasis, angular cheilitis, oral thrush and denture stomatitis (Richardson and Warnock, 1997; Ruhnke, 2002), NCAC have also been found dramatically in oral candidal infection. The most common treatment



Figure 1. Agar well diffusion assay of 0.1% (w/v) *A. lakoocha* extract against *C. tropicalis* ATCC 66029 (a) showing by inhibition clear zone, 0.1 g% (w/v) CHX served as positive control (b) and 10% (v/v) DMSO (c) served as negative control.

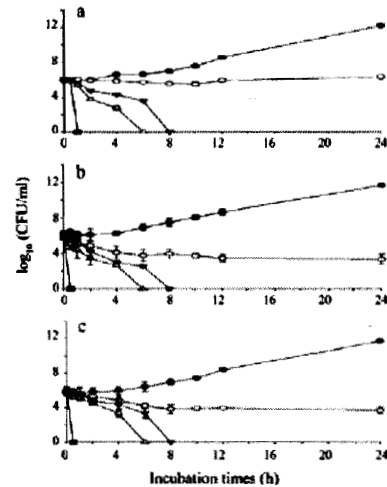


Figure 2. Time kill curves of *A. lakoocha* extract against of *C. albicans* ATCC 90028 (a), *C. tropicalis* ATCC 66029 (b) and *C. dubliniensis* MYA-577 (c). Bacteria stains were incubated with 0× MIC (●), 1× MIC (○), 2× MIC (▼) and 4× MIC (▲); 0.1% (w/v) CHX (■) over time. CFU, Colony Forming Units.

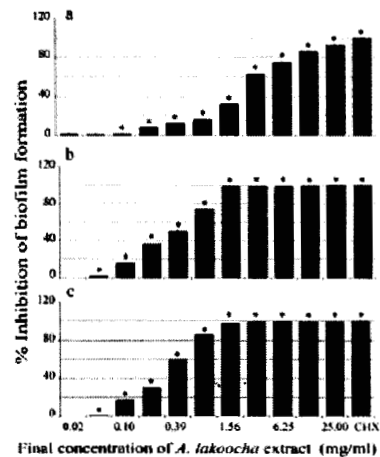


Figure 3. Inhibition of biofilm formation of *C. albicans* ATCC 90028 (a), *C. tropicalis* ATCC 66029 (b) and *C. dubliniensis* MYA-577 (c) by *A. lakoocha* extract at various concentrations and with 0.1% (w/v) CHX (the positive control) is demonstrated. Error bars indicate standard deviations; n=6. \*, differences (compared to the blank control) were considered statistically significant at P<0.05.

is the use of antifungal agents such as azoles (isavuconazole, itraconazole, miconazole and ketoconazole) and polyenes (amphotericin B and nystatin). However, those who use such agents are often faced with several problems including the

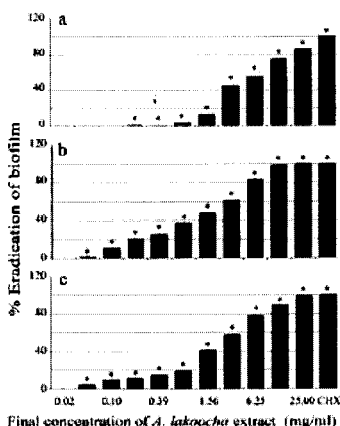


Figure 4. Eradication of biofilm formation of *C. albicans* ATCC 90028 (a), *C. tropicalis* ATCC 66029 (b) and *C. dubliniensis* MYA-577 (c) by *A. lakoocha* extract at various concentrations and with 0.1% (w/v) CHX (the control) is demonstrated. Error bars indicate standard deviations; n=6. \*, differences (compared to the blank control) were considered statistically significant at P<0.05.

limited number of effective antifungal agents, their high toxicity and cost, the recurrence of the infection, and increasing emergence of antifungal resistance (Klepser, 2001; Khan *et al.*, 2003). 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 over long-term use including unpleasant taste and disturbance in taste sensation, brown discoloration of the dorsum of the tongue, and desquamative lesions of oral mucosa (Hiom *et al.*, 1992; Giuliana *et al.*, 1997).

Many studies have demonstrated that traditional herbs possess anticandidal activity against *Candida* spp. (Boroujeni *et al.*, 2012; Rukayadi *et al.*, 2006; Yigit *et al.*, 2009). In the present study, it was found that *A. lakoocha* extract has a good antifungal activity against *Candida* strains. *A. lakoocha* has previously been reported to have antiviral and antibacterial properties, and this study is the first to reveal the anticandidal activity of *A. lakoocha*.

In addition, *A. lakoocha* extract has shown antibiofilm activity. Biofilms of *C. albicans* and NCACs are associated with high incidence of hospital morbidity and mortality (Nett and Andes, 2006; O'Toole *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2010) due to the increased use of medical devices such as lens, implants and dentures. Such biomaterials facilitate *Candida* strains to colonize and form biofilms leading to the development of resistance to antifungal agents, e.g. amphotericin B, micronazole, ketoconazole and fluconazole (Chandra *et al.*, 2001; Kuriyama *et al.*, 2005). Experiments comparing biofilms of *Candida* with broth cultures have demonstrated that higher concentrations of *A. lakoocha* extract are

required to significantly inhibit existing biofilm cells. This is an expected result since *Candida* in the biofilm is strongly protected and less susceptible to antifungal agents than *Candida* in planktonic form (Baillie and Douglas, 2000; Chandra *et al.*, 2012). It was shown that *A. lakoocha* extract was able to remove *Candida* in a dose- and time- dependent manner. Our results indicate that *A. lakoocha* extract acts as a potent antibiofilm agent that has dual actions preventing biofilm formation and removing existing biofilms.

The exact mechanism of action exerted by *A. lakoocha* extract on *Candida* is still unclear. Among previous studies, one study of interaction of resveratrol with *Botrytis cinerea*, a gray mold that infects grapevines, showed that the proposed mode of action involved an interference with the functionality of membrane proteins, especially those of the mitochondria. The interaction leads to an immediate decrease in oxygen uptake by the fungal cells. At the ultra-structural level, mitochondrial and nuclear membranes are affected first, followed by a complete disorganization of organelles and disruption of the cell membrane. Another study of the effect of *A. lakoocha* extract in *Fasciola gigantica*, a liver fluke that causes fasciolosis, implied that *A. lakoocha* contains a very high content of oxyresveratrol that could cause tegument changes by affecting the oxidative phosphorylation in mitochondria. It has been explained that oxyresveratrol (the major constituent of this crude extract has similar chemical structure to the halogenated phenol group of drugs, such as nitroxylin) could act via a similar mechanism. It was reported that nitroxylin acts as an uncoupler of oxidative phosphorylation (Fairweather *et al.*, 1984; McKinstry *et al.*, 2003). As a result, the decreased production of ATP would affect the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump, leading to the influx of Na<sup>+</sup> and water, and consequently the swelling of the syncytium as observed in the study of *F. hepatica* treated with nitroxylin (McKinstry *et al.*, 2003).

In conclusion, the current study supports the traditional advantages of the studied plant, and suggests that the stem bark *A. lakoocha* extract is a potential source as a natural antifungal agent. It possesses compounds with good antifungal properties that may be used for oral infectious diseases caused by certain *Candida* spp. After this screening experiment, further work should be performed to describe the antifungal activities in more detail as well as their activity *in vivo*.

#### Acknowledgments

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

#### References

- Andrabi, S.A., Spina, M.G., Lorenz, P., Ebmeyer, U., Wolf, G. and Horn, T.F. 2004. Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-

- tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain Research*. 1017, 98-107.
- Baillie, G.S. and Douglas, L.J. 2000. Matrix polymers of *Candida albicans* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46, 397-403.
- Boroujeni, H.A.R., Pirbalouti, A.G., Hamed, B., Abdizadeh, R. and Malekpoor, F. 2012. Anti-*Candida* activity of ethanolic extracts of Iranian endemic medicinal herbs against *Candida albicans*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6, 2448-2452.
- Brambilla, E., Gagliani, M., Ionescu, A., Fadini, L. and Garcia-Godoy F. 2009. The influence of light-curing time on the bacterial colonization of resin composite surfaces. *Dental Materials*. 25(9), 1067-1072.
- Calderone, R.A., Fonzi, W.A. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 9, 327-335.
- Chandra, J., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., Ghannoum, M.A. 2012. *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. *Mycoses*. 55, 46-57.
- Chandra, J., Mukherjee, P.K., Leidich, S.D., Faddoul, F.F., Hoyer, L.L., Douglas, L.J., *et al.* 2001. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *Journal of Dental Research*. 80, 903-908.
- Chuanasa, T., Phromjai, J., Lipipun, V., Likhitwitayawuid, K., Suzuki, M., Pramyothin, P., Hattori, M. and Shiraki, K. 2008. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral Research*. 80(1), 62-70.
- Docherty, J.J., Sweet, T.J., Bailey, E. and Faith, S.A. 2006. Booth T. Resveratrol inhibition of varicella-zoster virus replication *in vitro*. *Antiviral Research*. 72, 171-177.
- Fairweather, I., Holmes, S.D. and Threadgold, L.T. 1984. *Fasciola hepatica*: motility responses to fasciolicides *in vitro*. *Experimental Parasitology*. 57, 209-244.
- Giuliana, G., Pizzo, G., Milici, M. E., Musotto, G. C. and Giangreco, R. 1997. *In vitro* antifungal properties of mouth rinses containing antimicrobial agents. *Journal of Periodontology*. 68, 729-733.
- Hiom, S.J., Furr, J.R., Russel, A.D. and Dickinson, J.R. 1992. Effects of chlorhexidine diacetate on *Candida albicans*, *C. glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Bacteriology*. 72, 35-40.
- Kim, Y.M., Yun, J., Lee, C.K., Lee, H., Min, K.R. and Kim, Y. 2002. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 16340-16344.
- Khan, Z.U., Chandy, R. and Metwali, K.E. 2003. *Candida albicans* strain carriage in patients and nursing staff of an intensive care unit: a study of morphotypes and resistotypes. *Mycoses*. 46, 476-486.
- Klepser, M.E. 2001. Antifungal resistance among *Candida* species. *Pharmacotherapy*. 21, 124S-132S.
- Kojic, E.M. and Darouiche, R.O. 2004. *Candida* infections of medical devices. *Clinical Microbiology Reviews*. 17, 255-267.
- Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee, P.K. and Ghannoum, M.A. 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity*. 70, 878-888.
- Kumamoto, C. A. 2002. *Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*. 5, 608-611.
- Kuriyama, T., Williams, D.W., Bagg, J., Coulter, W.A., Ready, D. and Lewis, M.A. 2005. *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiology and Immunology*. 20, 349-353.
- Li, J., Hirota, K., Goto, T., Yumoto, H., Miyake, Y. and Ichikawa, T. 2012. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. *Journal of Dentistry*. 40, 686-692.
- Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B., Benchanak, K., Lipipun, V., Mathew, J. and Schimazi, R.F. 2005. Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. *Natural Product Research*. 19, 177-182.
- McKinstry, B., Fairweather, I., Brennan, G.P. and Forbes, A.B. 2003. *Fasciola hepatica*: Tegumental surface alterations following treatment *in vivo* and *in vitro* with nitroxylin (Trodax). *Parasitology Research*. 91, 251-263.
- Moran, G.P., Sullivan, D.J. and Coleman, D.C. 2002. Emergence of non-*Candida albicans* *Candida* species as pathogens. In: Calderone RA, editors. *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington, DC, U.S.A., pp. 33-53.
- NCCLS. 2002. Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard-Second Edition. NCCLS document M27-A2, NCCLS, Wayne, Pennsylvania, U.S.A.
- Nett, J. and Andes, D. 2006. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology*. 9, 340-345.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*. 54, 49-79.
- Pandey, A. and Bhatnagar, S.P. 2009. Preliminary Phytochemical screening and antimicrobial studies on *Artocarpus lakoocha* Roxb. *Ancient Science of Life*. 28, 21-24.
- Puntumchai, A., Kittakoop, P., Rajviroongit, S., Vimuttipong, S., Likhitwitayawuid, K. and Thebtaranonth, Y. 2004. Lakoochins A and B, New Antimycobacterial Stilbene Derivatives from *Artocarpus lakoocha*. *Journal of Natural Products*. 67, 485-486.
- Richardson, W.D. and Warnock, D.W. 1997. Superficial candidosis. In: *Fungal Infection: Diagnosis and*

- Management, 2 nd ed, Blackwell Science, London, UK, pp.78-93.
- Ruhnke, M. 2002. Skin and mucous membrane infections. In: Calderone, R.A. (Ed.), *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington, DC, U.S.A., pp. 307-325.
- Rukayadi, Y., Yong, D. and Hwang J.K. 2006. *In vitro* anticandidal activity of xanthorrhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57, 1231-1234.
- Sasivimolphan, P., Lipipun, V., Likhitwitayawuid, K., Takemoto, M., Pramyothin, P., Hattori, M., *et al.* 2009. Inhibitory activity of oxyresveratrol on wild-type and drug-resistant varicella-zoster virus replication *in vitro*. *Antiviral Research*. 84, 95-97.
- Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. 2010. *In vitro* biolm activity of non-*Candida albicans* *Candida* Species. *Current Microbiology*. 61, 534-540.
- Sritulaluk, B., De-Eknamkul, W. and Likhitwitayawuid, K. 1998. Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus lakoocha*. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 22, 149-155.
- Taweechaisupapong, S., Singhara, S., Lertsatitthanakorn, P., Khunkitti, W., 2010. Antimicrobial effects of *Boesenbergia pandurata* and *Piper sarmentosum* leaf extracts on planktonic cells and biofilm of oral pathogens. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 23, 224-231.
- Tengamnuay, P., Pengrungruangwong, K., Pheansri, I. and Likhitwitayawuid, K. 2006. *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the *in vitro* anti-tyrosinase and *in vivo* skin whitening activities. *International Journal of Cosmetic Science*. 28, 269-276.
- Wu, W.S., Chen, C.C., Chuang, Y.C., Su, B.A., Chiu, Y.H., Hsu, H.J., Ko, W.C. and Tang, H.J. 2013. Efficacy of combination oral antimicrobial agents against biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 46, 89-95.
- Yigit, D., Yigit, N. and Ozgen, U. 2009. An investigation on the anticandidal activity of some traditional medicinal plants in Turkey. *Mycoses*. 52, 135-140.

### ภาคผนวก ค

บทความวิจัยที่นำเสนอในงานประชุมองค์การบริหารคณะทันตแพทยศาสตร์แห่งประเทศไทย (อบทท) ครั้งที่ 11 ระหว่างวันที่ 7-9 พฤษภาคม 2556 ณ โรงแรมพลูแมนพัทยา จังหวัดชลบุรี

Senapong S, Puripattanavong J, Teanpaisan R. Antifungal and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract against *Candida* spp. Proceeding of the 11th Dental Faculty Consortium of Thailand Academic Meeting and Research Presentation (DFCT2013); 2013. May 7-9; Chonburi, Thailand. p. 138-141.

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

The Dental Faculty Consortium of Thailand



th

**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



**Antifungal and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract against *Candida* spp.**Sukunlaya Senupong<sup>a</sup>, Jindaporn Puripattanavong<sup>b</sup>, Rawee Teanpaisan<sup>a</sup><sup>a</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>b</sup> Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, 90112, Thailand**Abstract**

**Objectives:** The aim of this study was to investigate the antifungal and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract against various *Candida* spp. in vitro study.

**Methods:** The antifungal activity was performed by measuring the inhibition zones using agar-well diffusion method. Minimum Inhibition Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) were assessed using the microdilution method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Minimum biofilm eradication concentration (MBEC) was investigated using MTT assay.

**Results:** It has shown that *A. lakoocha* extract exhibited a good antifungal activity against most tested *Candida* strains. MICs ranged from 0.05 to 3.12 mg/ml and MFCs ranged from 0.10 to 25 mg/ml. The amount of *A. lakoocha* extract required to remove  $\geq 50\%$  biofilm formation (MBEC<sub>50</sub>) of *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 and *C. dubliniensis* MY4-577 were 6.25, 3.12 and 3.12 mg/ml respectively, and  $\geq 90\%$  of the removal of biofilm growth were 25.00, 12.50 and 25.00 mg/ml respectively.

**Conclusions:** *A. lakoocha* extract has an inhibitory effect on various *Candida* spp., which may be useful for prevention or treatment oral candidiasis. The mechanisms of antifungal activity will be further investigated.

**Keywords:** *Artocarpus lakoocha*, *Candida* spp., Antifungal activity, Antibiofilm activity

**Introduction**

*Artocarpus lakoocha* is a valuable tropical tree species belonging to the Moraceae family; it is a large deciduous tree reaching 30 meters in height. It is commonly found in tropical areas such as India and Thailand. The light brown powder is the product of an aqueous extract obtained by boiling *A. lakoocha* bark, followed by slow evaporation, then cooling. Consequently, the powder that floats on top is separated by straining. The major constituent of *A. lakoocha* bark extract is oxyresveratrol, trans-2, 4, 3', 5'-tetrahydroxystilbene, which has recently been reported to possess *in vitro* anti-herpes simplex virus (HSV) potential [1-2] and be able to inhibit replication of HSV-1 and HSV-2 from an *in vivo* study in mice [3]. It has also been suggested to show *in vitro* anti-varicella zoster virus activity [4-5]. For antibacterial activity, *A. lakoocha* was found to be able to inhibit *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei* and *Escherichia coli* [6-7]. Another study has suggested that oxyresveratrol was neuroprotective and inhibited apoptotic cell death in transient ischemia in a rat model [8]. Due to its reported potent tyrosinase inhibitory and antioxidant activities [1, 9], the material has potential application as a novel skin whitening agent in cosmetic preparations [10]. Most studies have reported its anti-viral and antibacterial activities; however, data regarding antifungal capability of *A. lakoocha* extract has been limited.

Among *Candida* spp., *Candida albicans* is the most commonly found in patients who received cancer chemotherapy, taken broad spectrum antimicrobial, HIV-infection and diabetes.

The aim of this study was to investigate the antifungal and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract against various *Candida* spp. in vitro study.



## Material and Methods

### Preparation of *A. lakoocha* stem bark extract

The extract of *A. lakoocha* was obtained by boiling small pieces of stem bark in water. After removing the remaining wood fragments and other insoluble residues, the aqueous extract was dried to give a yellow-brown powder for use in this study. The content of oxyresveratrol in the dried extract was determined to be 80% by w/w using high performance liquid chromatography (HPLC). A 10% (w/v) stock solution of *A. lakoocha* extract was prepared in 20% dimethylsulfoxide (DMSO, Merck) for use in this study.

### Fungal strains and growth conditions

The tested *Candida* spp. were *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 10231, *C. dubliniensis* MYA-577, *C. dubliniensis* MYA-646, *C. glabrata* ATCC 66032, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 34135, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 66029, *C. tropicalis* ATCC 750 and *C. tropicalis* ATCC 13803. All were cultured on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) under aerobic condition at 37°C for 24 h.

### Antifungal assay

**Determination of inhibition zone diameter:** Agar well diffusion method was used to determine the antifungal activity. One hundred microliters of inoculum, equivalent to  $10^7$  CFU/ml, was mixed with 20 ml of warm melted SDA and poured into the plate with 6 mm diameter metal cup. After solidifying of SDA, the metal cups were removed and the well was added with 100  $\mu$ l of *A. lakoocha* extract, 20% DMSO were taken as the negative control and 0.1% chlorhexidine (CHX) were the positive control. Plate was incubated at 37°C for 24 h. The antifungal activity was determined by measuring the diameter of zone of inhibition in millimeter. Duplicates were maintained and the experiment was repeated thrice.

**Determination of MIC and MFC:** Minimum Inhibition Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) were assessed using microdilution method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Briefly, the *A. lakoocha* extract was subjected to two-fold serial dilution in the Sabouraud Dextrose Broth (SDB) 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. A 100  $\mu$ l of each *Candida* culture at a final concentration of  $1 \times 10^7$  CFU/ml was added to the well and incubated at 37°C for 24 h. MIC was determined by visual observation for the first dilution with no fungal growth compared to positive control (media without stains). All experiments were repeated thrice in duplicate and the average values were reported as MIC.

A minimum fungicidal concentration (MFC) is the lowest concentration of an antifungal required to kill a microorganism. The MFC was determined by sub-culturing 10  $\mu$ l of the test dilutions from MIC tubes on to fresh agar plates. Plates were incubated at 37°C for 24 h. The highest dilution that yielded no single colony on the plates was recorded as MFC.

### Determination of Minimum biofilm eradication concentration (MBEC):

The antimicrobial activity of *A. lakoocha* extract in the biofilm was also examined using the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) assay [11-12]. Biofilm assays were performed with single-species biofilms of *Candida* spp. (*C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 and *C. dubliniensis* MYA-577). The final concentration of the inoculums ( $\sim 10^8$  CFU/ml) 200  $\mu$ l was inoculated into the wells of polystyrene, flat-bottom 96-well microtiter plates, incubated under aerobic conditions at 37°C for the development of a multilayer biofilm. After cultivation for 24 h, the wells were washed with 200  $\mu$ l of sterile phosphate buffered saline (PBS) to remove any unattached cell. These biofilms were then exposed to a 200  $\mu$ l of various concentrations of *A. lakoocha* extract ranged from 0.024 mg/ml to 25 mg/ml, incubated for up to 24 h in aerobic conditions at 37°C. After cultivation, the wells were vigorously washed with 200  $\mu$ l of PBS to remove non adherent cells. Briefly, 100  $\mu$ l of MTT solution (5 mg/ml in PBS) were placed in each well and incubated at 37°C, 3 h in a dark place. The MTT solution was replaced with 100  $\mu$ l dimethyl sulfoxide (DMSO), the plates were incubated for 15 min at room temperature. 90  $\mu$ l of suspension were taken from each well and optical density was measured with a microplate reader at 570 nm.

The MBEC value corresponds to the lowest dilution that prevents the regrowth of bacteria on the treated biofilm. MBEC<sub>50</sub> and MBEC<sub>90</sub> are the minimum concentrations that inhibit 50% and 90% of the isolates from forming on the biofilm compared to the 0.1% CHX. All experiments were performed at least in triplicate.

### 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

It has demonstrated that *A. lakoocha* extract exhibited a good antifungal activity against most tested *Candida* strains. MICs ranged from 0.05 to 3.12 mg/ml and MFCs ranged from 0.10 to 25 mg/ml (Table 1). An example of inhibition zone of *A. lakoocha* extract is shown in Figure 1.

The amount of *A. lakoocha* extract required to remove  $\geq 50\%$  biofilm formation (MBEC<sub>50</sub>) of *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 66029 and *C. dubliniensis* MYA-577 were 6.25, 3.12 and 3.12 mg/ml respectively, and  $\geq 90\%$  of the removal of biofilm growth were 25.00, 12.50 and 25.00 mg/ml respectively, the results are shown in Figure 2.

*A. lakoocha* has been traditionally used as a natural anthelmintic. It has previously reported an antiviral effect on HSV and varicella zoster [1-5]. An antibacterial effect on *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei* and *Escherichia coli* [6-7] has been reported. In this study, it was found that *A. lakoocha* extract could inhibit the growth of various *Candida* spp. in planktonic and biofilm forms.

*Candida* spp. is the most common cause of the oral candidiasis; especially in the long term denture wearers and HIV-infected patients. The widely topical agents for treatment of oral candidiasis are nystatin suspension and chlorhexidine



gluconate (CHX). Nystatin has the bitter taste, and it may cause nausea and vomiting when high dose used. CHX has been reported as having many unwanted effects when long term used including taste disturbance, desquamative lesion and brown staining of the teeth and oral mucosa. Thus, *A. lakoocha* extract may be an alternative choice for treatment of oral candidiasis.

Table 1- Antimicrobial activity of *A. lakoocha* extract against *Candida* spp.

Stains of <i>Candida</i> spp.	inhibition zone (mm) Mean $\pm$ SD	MIC <sup>a</sup>	MFC <sup>b</sup>
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	2.0 $\pm$ 0.13	0.78	1.56
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1.5 $\pm$ 0.14	1.56	3.12
<i>C. dubliniensis</i> MYA-577	1.5 $\pm$ 0.21	0.78	1.56
<i>C. dubliniensis</i> MYA-646	2.0 $\pm$ 0.15	0.78	1.56
<i>C. glabrata</i> ATCC 66032	2.0 $\pm$ 0.13	1.56	25.00
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	1.8 $\pm$ 0.06	1.56	12.50
<i>C. krusei</i> ATCC 34135	1.3 $\pm$ 0.06	3.12	25.00
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	1.4 $\pm$ 0.10	3.12	25.00
<i>C. tropicalis</i> ATCC 66029	2.8 $\pm$ 0.05	0.05	0.10
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	1.9 $\pm$ 0.15	0.78	12.50
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	2.0 $\pm$ 0.06	0.78	25.00

<sup>a</sup>MIC - Minimum Inhibitory Concentration (mg/ml)

<sup>b</sup>MFC - Minimum Fungicidal Concentration (mg/ml)

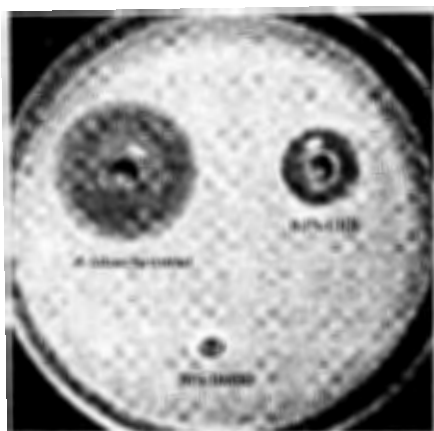


Figure 1 - An inhibition zone of antimicrobial effect of 10% *A. lakoocha* extract against *C. tropicalis* ATCC 66029

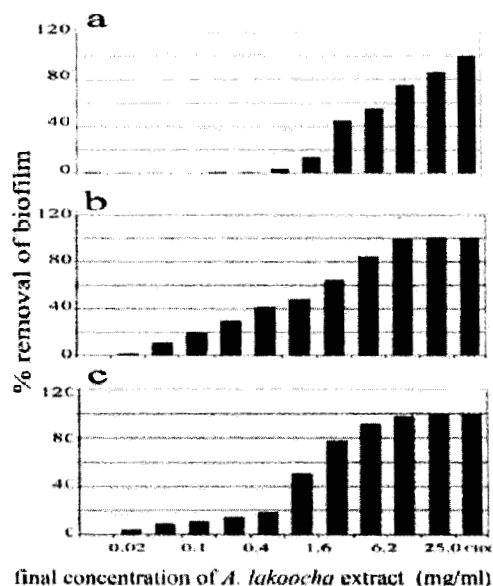


Figure 2 - Eradication of biofilm formation of *C. albicans* ATCC 90028 (a), *C. tropicalis* ATCC 66029 (b) and *C. dubliniensis* MYA-577 (c) by *A. lakoocha* extract at various concentrations and 0.1% CHX (control)

## Conclusions

It was demonstrated that *A. lakoocha* extract has an inhibitory effect on various *Candida* spp., which may be useful for prevention or treatment oral candidiasis. The mechanisms of antifungal activity will be further 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 (DENS405475)

## References

- [1] Sritulaluk B, De-Eknamkul W, Likhitwitayawuid K. Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus lakoocha*. Thai. J. Pharm. Sci. 1998; 22: 149-155.
- [2] Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Benchanak K, Lipipun V, Mathew J, Schinazi RF. Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. Nat Prod Res, 2005; 19: 177-82.
- [3] Chuanasa T, Phromjai J, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Suzuki M, Pranyothin P, Hattori M, Shiraki K. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. Antiviral Res. 2008; 80:62-70



- [4] Docherty JJ, Sweet TJ, Bailey E, Faith SA, Booth T. Resveratrol inhibition of varicella-zoster virus replication in vitro. *Antiviral Res.* 2006; 72: 171-177.
- [5] Sasivimolphan P, Lipipun V, Likhitwitayawud K, Takemoto M, Pranyothin P, Hatori M, et al. Inhibitory activity of oxyresveratrol on wild-type and drug-resistant varicella-zoster virus replication in vitro. *Antiviral Res.* 2009; 84: 95-7.
- [6] Puntumchai A, Kittakoop P, Rajvirongit S, Vinuttipong S, Likhitwitayawud K and Thebtaranonth Y, Laksoochins A and B. New Antimycobacterial Stilbene Derivatives from *Artocarpus lakoocha*. *J Nat Prod.* 2004; 67: 485-486.
- [7] Pandey A, Bhatnagar SP. Preliminary Phytochemical screening and antimicrobial studies on *Artocarpus lakoocha* Roxb. *Anc Sci Life.* 2009; 28: 21-4.
- [8] Andrabi SA, Spina MG, Lorenz P, Ebmeyer U, Wolf G, Horn TF. Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 2004; 1017: 98-107.
- [9] Kim YM, Yun J, Lee CK, Lee H, Min KR, Kim Y. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J Biol Chem.* 2002 3, 277: 16340-4.
- [10] Tengamnuay P, Pengrungruangwong K, Pheansa I, Likhitwitayawud K. *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the in vitro anti-tyrosinase and in vivo skin whitening activities. *Int J Cosmet Sci.* 2006; 28(4): 269-76.
- [11] Brambilla E, Gagliani M, Ionescu A, Fadini L, Garcia-Godoy F. The influence of light-curing time on the bacterial colonization of resin composite surfaces. *Dent Mater.* 2009; 25: 1067-72.
- [12] Wu W-S, et al. Efficacy of combination oral antimicrobial agents against biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Microbiol Immunol.* 2012, doi 10.1016/j.jmii.2012.03.009.

#### Address for correspondence

Rawee Teanpaisan, Tel: +66 74 429878; Fax: +66 74 212922.  
E-mail address: rawee.t@psu.ac.th

## ภาคผนวก ง

### การเตรียม 0.5 McFarland Standard

0.05 มิลลิลิตรของ 1.175 เปอร์เซ็นต์  $\text{BaCl}_2$  ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ผสมกับ 9.95 มิลลิลิตรของ 1 เปอร์เซ็นต์ sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียม McFarland Standard เบอร์ต่าง ๆ

McFarland standard No.	1.0% Barium chloride (ml)	1.0% Sulfuric acid (ml)	Approx. cell density ( $1 \times 10^8$ cfu/ml)
	0.05	9	1.5
1	0.10	9	3
2	0.20	9	6
3	0.30	9	9
4	0.40	9	12
5	0.50	9	15
6	0.60	9	18
7	0.70	9	21
8	0.80	9	24
9	0.90	9	27
10	1.00	9	30

ที่มา: An instrument for estimating the number of bacteria in suspension used for calculating the opsonic index and for vaccines. Joseph McFarland, M.D. JEMA. 1907; XLIX (14): 1176-1178.

## ภาคผนวก จ

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

#### 1. Sabouraud's dextrose agar (SDA; KEMMAR)

##### ส่วนประกอบต่อลิตร

Dextrose	40 กรัม
Casein	10 กรัม
Agar	15 กรัม

##### วิธีเตรียม (สำหรับ Sabouraud's dextrose agar commercial product)

1. ชั่งอาหารตามฉลากข้างกระป๋อง เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาณที่ต้องการเตรียม จากนั้นปรับพีเอชประมาณ  $5.6 \pm 0.2$
2. นำเข้า Autoclave ที่  $121^{\circ}\text{C}$  ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
3. จากนั้นรอให้เย็นที่ประมาณ  $45-50^{\circ}\text{C}$  เทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ รอให้อาหารแข็งตัวแล้วเก็บที่ตู้เย็น

\*\* ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

#### 2. Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar; Bacto)

##### ส่วนประกอบต่อลิตร

Calf Brain Infusion	7.7 กรัม
Beef Heart Infusion	9.8 กรัม
Proteose Peptone	10.0 กรัม
Dextrose	2.0 กรัม
Sodium Chloride	5.0 กรัม
Disodium Phosphate	2.5 กรัม
สารเพิ่มเติม Agar (Difco)	15 กรัม
Yeast Extract (Bacto)	5.0 กรัม

### วิธีเตรียม (สำหรับ Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar) commercial product)

1. ชั่งอาหารตามฉลากข้างกระป๋องในห้องปฏิบัติการใช้กระป๋องที่เป็นอาหารเหลวจึงต้องเติมวุ้น นอก จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาณที่ต้องการเตรียม ปรับพีเอชประมาณ  $7.4 \pm 0.2$
2. นำเข้า Autoclave ที่  $121^{\circ}\text{C}$  ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
3. จากนั้นรอให้เย็นที่ประมาณ  $45-50^{\circ}\text{C}$  เติม Sterile expired human blood ในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารที่เตรียมเข้าเบาๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน
4. เเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ รอให้อาหารแข็งตัวแล้วเก็บที่ตู้เย็น  
\*\* ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

### 3. Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth; Bacto)

#### ส่วนประกอบต่อลิตร

Calf Brain Infusion	7.7 กรัม
Beef Heart Infusion	9.8 กรัม
Protose Peptone	10.0 กรัม
Dextrose	2.0 กรัม
Sodium Chloride	5.0 กรัม
Disodium Phosphate	2.5 กรัม

### วิธีเตรียม (สำหรับ Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth) commercial product)

1. ชั่งอาหารตามฉลากข้างกระป๋องใส่ในขวดพลาเกลียว เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาณที่ต้องการเตรียม ปรับพีเอชประมาณ  $7.4 \pm 0.2$
2. นำเข้า Autoclave ที่  $121^{\circ}\text{C}$  ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
3. รอให้อาหารเย็นลงแล้วเก็บที่ตู้เย็น  
\*\* ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

### 4. Blood agar (BA; KEMMAR)

#### ส่วนประกอบต่อลิตร

Heart Infusion	10 กรัม
Meat Peptone	10 กรัม
Sodium chloride	5 กรัม
Agar	15 กรัม

### วิธีเตรียม (สำหรับ Blood agar base commercial product)

1. ชั่งอาหารตามฉลากข้างกระป๋อง เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาณที่ต้องการเตรียม จากนั้นปรับพีเอชประมาณ  $7.3 \pm 0.2$
2. นำเข้า Autoclave ที่  $118-121^{\circ}\text{C}$  ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
3. จากนั้นรอให้เย็นที่ประมาณ  $45-50^{\circ}\text{C}$  เติม Sterile expired human blood ในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารที่เตรียมเขย่าเบาๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน
4. เทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ รอให้อาหารแข็งตัวแล้วเก็บที่ตู้เย็น  
\*\* ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

### 5. Sabouraud's dextrose Broth (SDB Broth; Difco)

#### ส่วนประกอบต่อลิตร

Dextrose	20 กรัม
Casein	5 กรัม
Animal tissue	15 กรัม

### วิธีเตรียม (สำหรับ Sabouraud's dextrose Broth (SDB Broth) commercial product)

1. ชั่งอาหารตามฉลากข้างกระป๋องใส่ในขวดมาเกลียว เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาณที่ต้องการเตรียม ปรับพีเอชประมาณ  $5.6 \pm 0.2$
2. นำเข้า Autoclave ที่  $121^{\circ}\text{C}$  ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
3. รอให้อาหารเย็นลงแล้วเก็บที่ตู้เย็น  
\*\* ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

### 6. Phosphate buffer saline (PBS); พีเอช 7.0

#### ส่วนประกอบ

Sodium chloride	6	กรัม
Ortho-phosphoacetic acid	5	มิลลิลิตร

#### วิธีเตรียม

1. ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 750 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วย NaOH หรือ HCl ให้ได้ 7.0 จากนั้นนำเข้า Autoclave ที่  $121^{\circ}\text{C}$  ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
2. รอให้เย็นแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง





### การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานและการประชุมวิชาการ (ต่อ)

3. Senapong S, Puripattanavong J, Teanpaisan R. Antifungal and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract against *Candida* spp. Proceeding of the 11th Dental Faculty Consortium of Thailand Academic Meeting and Research Presentation (DFCT2013); 2013. May 7-9; Chonburi, Thailand. p. 138-141.