



ฤทธิ์การยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อ *Streptococcus mutans* จากสารสกัดใบกระทู

Inhibitory Effects of *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.

on Biofilm Formation of *Streptococcus mutans*

ศิริลักษณ์ หอมละเอียด

Sirilux Homlaead

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Microbiology

Prince of Songkla University

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์การยับยั้งไปโอฟิล์มของเชื้อ *Streptococcus mutans* จากสารสกัดใบ
กระทุ
ผู้เขียน นางสาวศิริลักษณ์ หอมละเอียด
สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย)

.....ประธานกรรมการ
(ดร.สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ทพญ. วิภาวี นิตยานันตะ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจน์ย์ ศรีมาโนชญ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

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

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ศุภยงค์ วรวิศิษฏ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวศิริลักษณ์ หอมละเอียด)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์การยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> จากสารสกัดใบกระทู
ผู้เขียน	นางสาวศิริลักษณ์ หอมละเอียด
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2557

บทคัดย่อ

Streptococcus mutans เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการก่อโรคฟันผุในมนุษย์ โรคฟันผุพบได้บ่อยในเด็กโดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา จึงทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีป้องกันและผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ ปลอดภัย ราคาไม่แพง การใช้ผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง จากวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากกระทู (*Rhodomyrtus tomentosa*) มีฤทธิ์ดีในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากกระทูในการต้านเชื้อ *S. mutans* และการมีผลต่อคุณสมบัติการก่อโรคของเชื้อ *S. mutans* ที่แยกได้จากน้ำลายของผู้ป่วยโรคฟันผุ จากการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี disk diffusion พบว่า 80% ของเชื้อ *S. mutans* (n=10) ไวต่อสารสกัดด้วยเอทานอล และ 90% ไวต่อสารสกัดด้วยอะซิโตน เมื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) และการฆ่าเชื้อได้ (MBC) พบว่าสารสกัดด้วยอะซิโตนให้ค่า MIC และ MBC อยู่ระหว่าง 16-256 $\mu\text{g/ml}$ ขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลให้ค่า MIC และ MBC อยู่ระหว่าง 32->1,024 $\mu\text{g/ml}$ จากการศึกษา time-kill พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลและอะซิโตนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 4MIC สามารถลดเชื้อลงได้อย่างน้อย 90% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง จากการศึกษาผลของสารสกัดต่อ biofilm ของเชื้อ พบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากับ sub-MIC (1-8 $\mu\text{g/ml}$) สารสกัดด้วยอะซิโตนสามารถยับยั้งการสร้าง biofilm ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยผลการยับยั้งจะขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด ส่วนการศึกษาผลของสารสกัดต่อ biofilm ที่พัฒนาเต็มที่แล้วพบว่า หลังจากเติมสารสกัดด้วยอะซิโตนลงไป ใน biofilm สารสกัดสามารถลดการมีชีวิตรอดของเชื้อภายใน biofilm ได้ โดยความสามารถในการลดการมีชีวิตรอดของเชื้อภายใน biofilm ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด เมื่อศึกษา biofilm ที่พัฒนาเต็มที่แล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าสารสกัดด้วยอะซิโตนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 64MIC สามารถทำลายแผ่น biofilm ที่พัฒนาเต็มที่ได้ นอกจากนี้สารสกัดด้วยอะซิโตนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 128 $\mu\text{g/ml}$ ยังสามารถลดการสร้างกรดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ สารสกัดจากกระทูจึงน่าจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ควบคุมการสร้างคราบจุลินทรีย์และป้องกันการเกิดโรคฟันผุ

Thesis Title Inhibitory effects of *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. on biofilm formation of *Streptococcus mutans*

Author Miss Sirilux Homlaead

Major Programme Microbiology

Academic Year 2014

ABSTRACT

Streptococcus mutans is the main pathogen responsible for the development of dental caries in humans, especially for young people in developing countries. There is a global need for alternative preventions and products for dental caries that are safe, economical and effective. *Rhodomyrtus tomentosa* extracts showed strong antibacterial activity on Gram-positive bacteria. Therefore, this study evaluated the effects of extracts from *R. tomentosa* leaf on bacterial viability and the virulence factors of *S. mutans* isolated from oral cavity. Preliminary screening for antibacterial activity of the extracts was performed by paper disk agar diffusion method. The diameter of inhibition zones indicated that 80% and 90% of *S. mutans* isolates (n=10) were susceptible to ethanol and acetone extracts, respectively. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) was determined by broth microdilution method. The MIC and MBC of the acetone extract were 16-256 µg/ml while those of the ethanol extracts ranged from 32 to >1,024 µg/ml. The result from time-kill study indicated that the ethanol and acetone extracts at a concentration of 4MIC could reduce the bacterial number by 90% within 24 h. At sub-MIC levels (1-8 µg/ml), the acetone extract significantly inhibited the biofilm formation by *S. mutans*. The inhibitory effect was concentration-dependent. The ability of acetone extract to kill mature biofilms was assessed. The viability of 24 h *S. mutans* biofilm was decreased after treatment with the acetone extract. The ability to kill mature biofilm occurred in a dose-dependent manner. Scanning electron microscopy clearly confirmed that treatment with acetone extract at 64MIC could destroyed the organism in the established biofilm. In addition, the acetone extract at a concentration of 128 µg/ml significantly reduced the acid production by *S. mutans*. These result suggests that the extract of *R. tomentosa* might be useful for the control of dental plaque formation and subsequent dental caries development.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(13)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	17
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
วัสดุ	18
อุปกรณ์	19
วิธีการทดลอง	21
3. ผลการวิจัย	27
4. วิจัย	46
5. สรุป	52
รายการเอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	66
ประวัติผู้เขียน	73

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	Inhibitory effects of <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> leaf extract on <i>Streptococcus mutans</i> isolates (n=10) by agar disc diffusion method.	28
2.	The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of the extract from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> against clinical isolates of <i>Streptococcus mutans</i> (n=10).	29
3.	Adherence of <i>Streptococcus mutans</i> isolates (n=10) in the microtiter plate by crystal violet staining of potential biofilms and measuring absorbance at 590 nm.	36
4.	Effects of sub-inhibitory concentrations of acetone extract from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> and chlorhexidine on the growth of <i>Streptococcus mutans</i> at 24h. The bacterial growth was quantified by measuring absorbance at 600 nm. The results showed a significant difference between the tests and the control (*P < 0.05).	38
5.	Effects of sub-inhibitory concentrations of acetone extract from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> and chlorhexidine on the biofilm formation by <i>Streptococcus mutans</i> at 24 h. The biofilm formation was quantified by crystal violet staining and measuring absorbance at 590 nm. The results showed a significant difference between the tests and the control (*P < 0.05).	39
6.	Effects of acetone extract from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> (MIC=16-64 µg/ml) and chlorhexidine (MIC=0.25-0.5 µg/ml) on 24 h old biofilm of <i>Streptococcus mutans</i> (n=10). The biofilm was quantified by rezasurin and measuring absorbance at 570 and 600 nm. The results showed a significant difference between the tests and the control (*P < 0.05).	41
7.	Acid production by <i>Streptococcus mutans</i> isolates (NPRC 801-810) after 24 h.	43

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 growing on tryptic soy agar (a) and blood agar (b).	3
2. Dental caries levels (Decayed, Missing and Filled Teeth (DMFT) index among 12-year-olds worldwide, December 2004.	5
3. Changing levels of dental caries experience (Decayed, Missing and Filled Teeth (DMFT) index) among 12-year olds in developed and developing countries.	5
4. Revised model of Gtf-glucan-mediated bacterial adherence and cariogenic biofilm development.	7
5. (a–c) Cariogenic biofilm formation (d) If biofilm remains on tooth surfaces with frequent consumption of high-carbohydrate diet (especially sucrose), the amount of EPS and extent of acidification of the matrix will be increased. Such conditions cause biochemical, ecological and structural changes favoring the survival and dominance of highly acid stress-tolerant organisms in cohesive and firmly attached biofilms. The low-pH environment at the tooth-biofilm interface results in enhanced demineralization of enamel.	8
6. (a-c) This model explain the rapid accumulation of cariogenic plaque in the presence of sucrose (and starch hydrolysates), even if the initial <i>S. mutans</i> population is numerically low. (d) Such conditions elicit biochemical, ecological, and structural changes that favor the survival and dominance of highly acid-stress-tolerant organisms in these cohesive and firmly attached biofilms. The low-pH environment at the tooth-biofilm interface promotes demineralization of enamel.	9

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
<p>7. Acid tolerance mechanisms utilized by <i>Streptococcus mutans</i></p> <p>Roman numerals denote the particular aspect of acid tolerance each component is involved in: (i) the protection and repair of macromolecules; (ii) alterations of metabolic pathways; (iii) secondary metabolism; (iv) cell density, biofilm formation and regulatory systems; and (v) intracellular pH homeostasis. AP: Apurinic-aprimidinic; LGL: Lactoylglutathione lyase; pHi: Intracellular pH; pHo: External pH; RR: Response regulator.</p>	10
8. <i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	13
9. Structure of rhodomyrtone	15
10. Structure of Rhodomyrtosone A-D	15
<p>11. Time-kill curves of <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 801 after treatment with ethanol extract, MIC= 128 µg/ml (a), acetone extract, MIC = 32 µg/ml (b), from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i>, and chlorhexidine, MIC = 0.5 µg/ml (c). 1/2MIC (◆), MIC (▲), 2MIC (●), 4MIC (■), and control (□).</p>	31
<p>12. Time-kill curves of <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 803 after treatment with ethanol extract, MIC= 32 µg/ml (a), acetone extract, MIC = 16 µg/ml (b), from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i>, and chlorhexidine, MIC = 0.5 µg/ml (c). 1/2MIC (◆), MIC (▲), 2MIC (●), 4MIC (■), and control (□).</p>	32
<p>13. Time-kill curves of <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 806 after treatment with ethanol extract, MIC= 64 µg/ml (a), acetone extract, MIC = 16 µg/ml (b), from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i>, and chlorhexidine, MIC = 0.5 µg/ml (c). 1/2MIC (◆), MIC (▲), 2MIC (●), 4MIC (■), and control (□).</p>	33
<p>14. Time-kill curves of <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 810 after treatment with ethanol extract, MIC= 64 µg/ml (a), acetone extract, MIC = 16 µg/ml (b), from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i>, and chlorhexidine, MIC = 0.5 µg/ml (c). 1/2MIC (◆), MIC (▲), 2MIC (●), 4MIC (■), and control (□).</p>	34

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
15. Time-kill curves of <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 after treatment with ethanol extract, MIC= 64 µg/ml (a), acetone extract, MIC = 32 µg/ml (b), from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> , and chlorhexidine, MIC = 0.5 µg/ml (c). 1/2MIC (◆), MIC (▲), 2MIC (●), 4MIC (■), and control (□).	35
16. Screening for biofilm formation of <i>Streptococcus mutans</i> isolates (NPRC 801-810) to 96-well microtiter plate by crystal violet staining of potential biofilms and measuring absorbance at 590 nm.	36
17. Scanning electron micrographs of <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 804 after treated with antibacterial agents. (a, b) control; (c, d) 24 h biofilm treated with acetone extract from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> ; (e, f) 24 h biofilm treated with chlorhexidine.	42
18. Effects of acetone extract from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> (a) and chlorhexidine (b) on acid production by <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 801 for 30 min incubation. MIC (■), 2MIC (▲), 4MIC (●), 8MIC (◆), and control (□). The results showed a significant difference between the tests and the control (* <i>P</i> < 0.05).	44
19. Effects of acetone extract from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> (a) and chlorhexidine (b) on acid production by <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 for 30 min incubation. MIC (■), 2MIC (▲), 4MIC (●), 8MIC (◆), and control (□). The results showed a significant difference between the tests and the control (* <i>P</i> < 0.05).	45
20. Effects of acetone extract from <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> and chlorhexidine on the number of viable <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 801 (a) and <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 (b) cells after after incubation time 0 min (□) and 30 min (■).	46

บทที่ 1

บทนำ

บทนำตั้งเรื่อง

Streptococcus mutans เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้โดยทั่วไปในช่องปาก โดยเฉพาะที่ผิวฟัน และเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักในการทำให้เกิดโรคฟันผุ โดยเฉพาะในเด็กและวัยรุ่น เพราะเชื้อสามารถสร้าง extracellular polysaccharide (EPS) ได้ทั้งแบบละลายน้ำ (soluble) และไม่ละลายน้ำ (insoluble) จากการใช้น้ำตาล sucrose ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการก่อให้เกิดคราบจุลินทรีย์ (plaque formation) หรือ biofilm ที่ผิวฟัน นอกจากนี้ *S. mutans* ยังสามารถสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลและทนกรดได้ดี จึงทำให้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ กรดที่เชื้อสร้างขึ้นภายในช่องปากจะไปสลายผิวฟันเป็นผลให้เกิดฟันผุตามมา (Loesche, 2007)

การป้องกันการเกิดฟันผุสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้น้ำตาลเทียมทดแทนน้ำตาล sucrose การใช้ fluoride การใช้ sealants เคลือบหลุมร่องฟัน การใช้สารป้องกันการก่อคราบจุลินทรีย์ หรือ biofilm เช่น ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากที่มี chlorhexidine เป็นส่วนประกอบ แต่ในการป้องกันการเกิดโรคฟันผุนั้นต้องใช้ต้นทุนสูง ซึ่งจากรายงานพบว่า 10% ของรายจ่ายภายในประเทศเกี่ยวข้องกับการดูแลรักษาฟัน (Petersen, 2005) และในปัจจุบันพบว่าเชื้อก่อโรคในช่องปากหลายชนิดมีความสามารถในการดื้อยาเพิ่มขึ้น และยาปฏิชีวนะหลายชนิดเริ่มใช้ไม่ได้ผล เช่น penicillin, erythromycin, tetracycline, cephalosporins และ metronidazole (Bidault, *et al.*, 2007) อีกทั้งยังมีผลข้างเคียงจากการใช้ยา เช่น อาการอาเจียน ท้องเสีย และมีคราบสีเกิดขึ้นที่ฟัน หลายประเทศจึงต้องหาผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการรักษาโรคในช่องปากที่มีความปลอดภัย ไม่มีผลข้างเคียง มีประสิทธิภาพดีในการรักษา และราคาถูก (Palombo, 2011) จากการศึกษาพบว่ามีการใช้พืชสมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคมานานในทั่วทุกมุมโลก โดยเฉพาะร้อยละ 80 ของประชากรในประเทศกำลังพัฒนาใช้พืชสมุนไพรในการดูแลสุขภาพ (Kim, 2005) การเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารจากธรรมชาติที่แยกได้จากพืชในการป้องกันโรคฟันผุจึงเป็นทางเลือกที่ดีแทนที่การใช้ยาหรือสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาจากกระบวนการทางเคมี (Prabu, *et al.*, 2006)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบกระทูเพื่อนำมาใช้เป็นสารควบคุมการเกิดคราบจุลินทรีย์และป้องกันการเกิดโรคฟันผุ โดยทดสอบกับเชื้อ *S. mutans* และศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อกลไกการก่อโรคของเชื้อ *S. mutans*

การตรวจเอกสาร

1. *Streptococcus mutans*

1.1 ลักษณะทั่วไป

S. mutans เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (Gram-positive cocci) ขนาด 0.5-0.75 μm เรียงตัวเป็นสายสั้นๆหรือสายยาวปานกลาง ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสภาวะเป็นกรดหรืออาหารแข็งเซลล์จะมีรูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ ขนาด 1.5-3.0 μm โดยเฉพาะเชื้อที่แยกได้จากช่องปากจะพบรูปร่างแบบนี้ได้บ่อย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile) เมื่อทดสอบ catalase ให้ผลลบ ถ้าเพาะเลี้ยงบนอาหาร blood agar (BA) และบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic) เป็นเวลา 2 วัน โคโลนีจะมีสีขาวหรือสีเทา รูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน (irregular) ขนาด 0.5-1.0 μm (Figure 1) บางครั้งโคโลนีจะค่อนข้างแข็ง มีแนวโน้มที่จะเกาะติดบนผิวอาหาร ไม่สลายเมื่อดูดแดง (alpha or non-hemolytic) แต่มีโอกาสบพบ beta-hemolytic บนอาหารที่มีส่วนผสมของ sucrose เช่น mitis salivarius agar (MSA) หรือ tryptone, yeast extract, cystine (TYC) agar ซึ่งโคโลนีจะมีรูปร่างขรุขระ กอทั้งทับกัน ขนาด 1.0 μm บ่อยครั้งจะพบโคโลนีมีลักษณะคล้ายเม็ดบีดส์, droplets หรือของเหลว ซึ่งเกิดจากเชื้อสร้าง extracellular polysaccharide หรือ glucan ที่ไม่สามารถละลายน้ำได้อยู่รอบๆโคโลนี แต่บางครั้งจะพบเป็นแบบเรียบๆ หรือเป็นเมือก (Sneath, *et al.*, 1986)

S. mutans ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีอากาศ หรือมี N_2+CO_2 หรือ CO_2 เป็นหลัก แต่จะเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ อุณหภูมิที่ทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีคือ 37°C และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 45°C และต่ำสุด 10°C (Sneath, *et al.*, 1986)

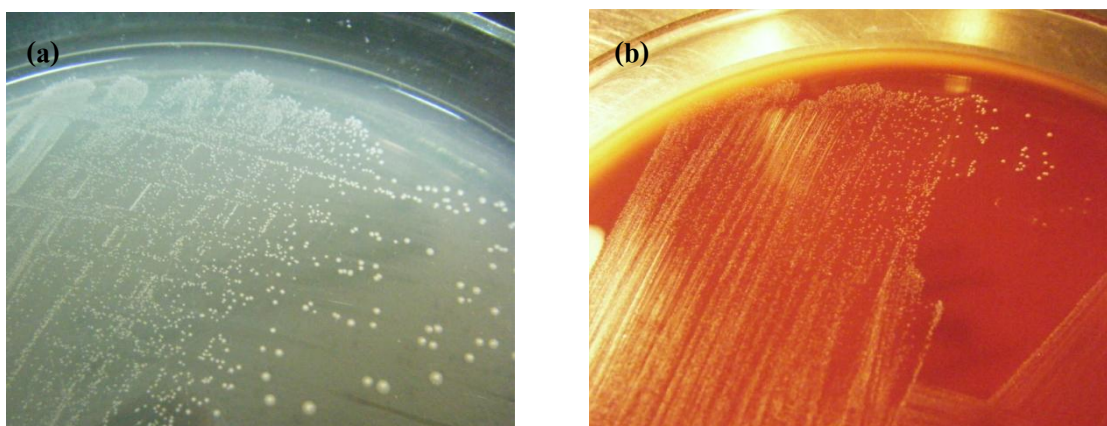


Figure 1: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 growing on tryptic soy agar (a) and blood agar (b)

1.2 ความสำคัญทางการแพทย์

จากงานวิจัยจำนวนมากพบว่าเชื้อ *S. mutans* มีบทบาทสำคัญในการเริ่มต้นทำให้เกิดโรคฟันผุ และสามารถแยกเชื้อชนิดนี้ได้บ่อยในผู้ป่วยที่มีฟันผุหรือรอยโรคฟันผุ และเมื่อให้สัตว์ทดลองกินน้ำตาล sucrose เป็นอาหาร พบว่าเชื้อสามารถเหนียวน้ำให้เกิดฟันผุในสัตว์ทดลอง ซึ่งเหตุผลเหล่านี้เป็นสิ่งยืนยันว่าเชื้อ *S. mutans* มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรคฟันผุที่ผิวฟันและรากฟัน (Takahashi & Nyvad, 2010)

2. โรคฟันผุ

โรคฟันผุเป็นโรคที่พบบ่อยในช่องปาก จัดเป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียประจำถิ่นในช่องปาก โรคฟันผุเกิดจากการทำลายเนื้อเยื่อของฟันเฉพาะที่ โดยเกิดการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralization) จากภาวะความเป็นกรดที่เกิดจากการย่อยสลายอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียบางชนิดในคราบจุลินทรีย์ (dental plaque) หรือ biofilm ได้แก่ mutans streptococci (*S. mutans* และ *S. sobrinus*) และ lactobacilli (Loesche, 2007)

ทางการแพทย์ใช้ดัชนีของฟันผุถอนอุด (DMF index: Decayed, Missing and Filled index) ในการบ่งชี้สถานะของโรคฟันผุ โดย D หมายถึงจำนวนฟันที่ผุ M หมายถึงจำนวนฟันที่ถูกถอนเนื่องจากฟันผุ และ F หมายถึงจำนวนฟันที่ถูกอุดเนื่องจากฟันผุ จากข้อมูลการสำรวจโรคฟันผุในประเทศต่างๆ ทั่วโลก องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้กำหนดเกณฑ์ของฟันผุถอนอุด (DMF scale) ของเด็กอายุ 12 ปี เพื่อจัดกลุ่มบุคคลตามความรุนแรงของโรคฟันผุ โดยถ้าค่า DMFT (Decayed, Missing and Filled Teeth) อยู่ในระหว่าง 0.0-1.1 หมายถึงภาวะฟันผุอยู่ในขั้นต่ำ หากอยู่ระหว่าง 2.78-4.4 แสดงว่าฟันผุอยู่ในขั้นปานกลาง และหากค่า DMFT เท่ากับหรือมากกว่า 6.6 ถือว่าภาวะฟันผุอยู่ในขั้นสูง ซึ่งภาวะของโรคฟันผุของแต่ละประเทศแสดงดังรูป (Figure 2) จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลกพบว่าร้อยละ 68 ของประเทศเหล่านั้น มีค่า DMFT น้อยกว่า 3 แสดงว่าภาวะฟันผุของเด็กอายุ 12 ปี ในประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทยจัดอยู่ในขั้นต่ำถึงปานกลาง ซึ่งความชุกของโรคฟันผุจะเพิ่มขึ้นมากในประเทศกำลังพัฒนาหรือประเทศอุตสาหกรรมดังแสดงใน Figure 3 (Petersen, 2005)

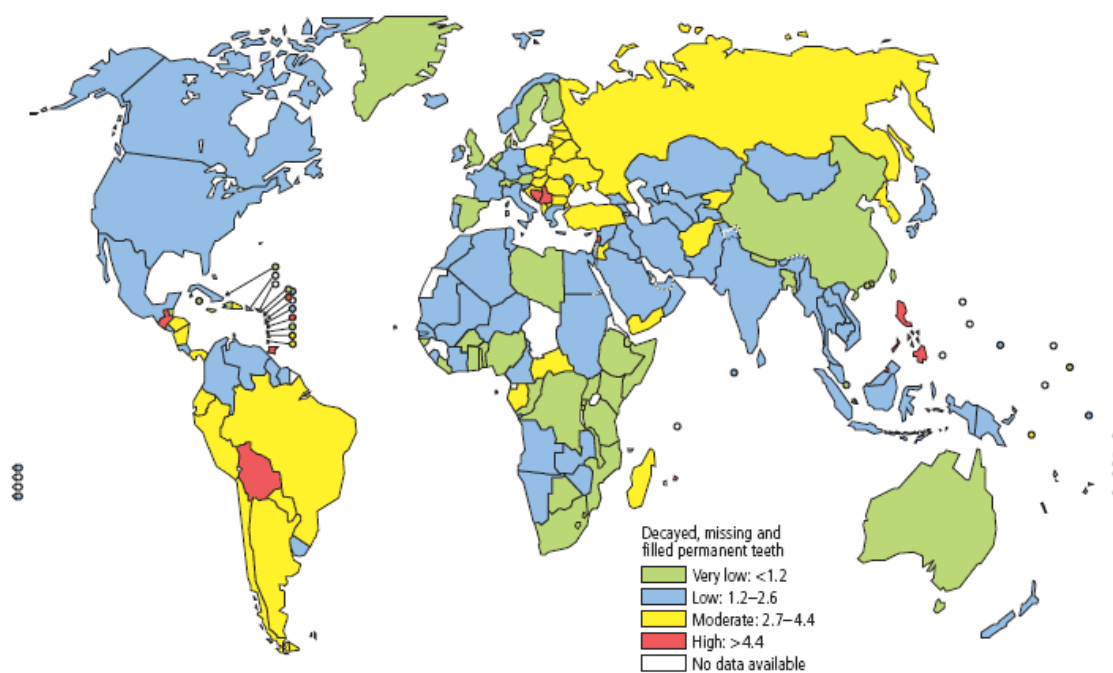


Figure 2: Dental caries levels (Decayed, Missing and Filled Teeth (DMFT) index among 12-year-olds worldwide, December 2004 (Petersen, 2005).

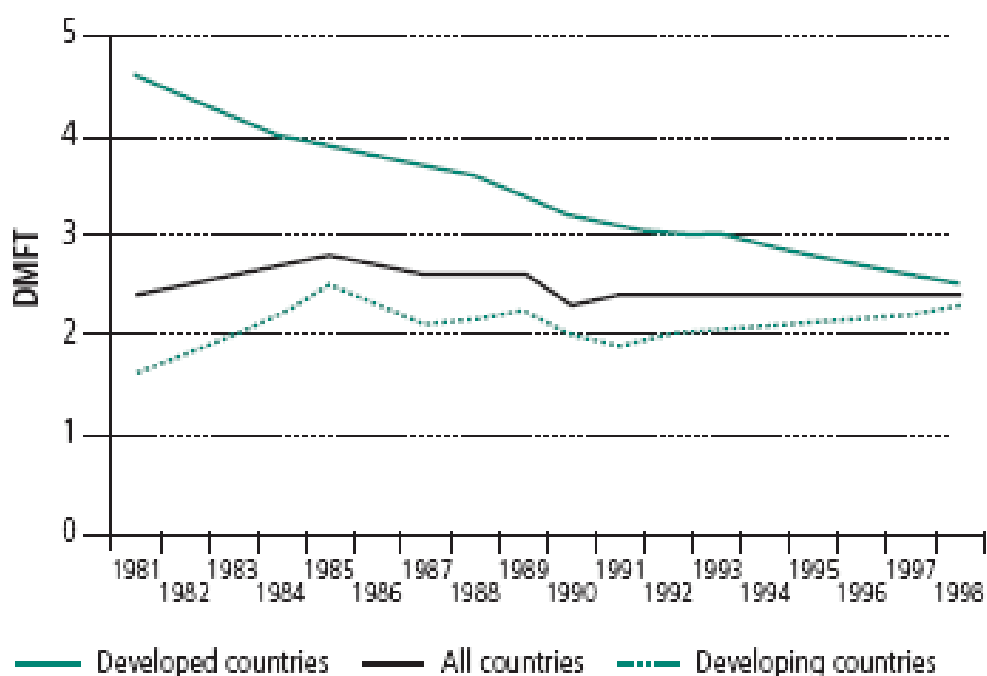


Figure 3: Changing levels of dental caries experience (Decayed, Missing and Filled Teeth (DMFT) index among 12-year olds in developed and developing countries (Petersen, 2005).

3. กลไกการก่อโรคฟันผุของเชื้อ *S. mutans*

3.1 Adhesion

ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ *S. mutans* เป็นปัจจัยหลักในการเกิดคราบจุลินทรีย์หรือ biofilm ที่ผิวฟันซึ่งจะเกิดฟันผุตามมา โดยจะขึ้นกับปัจจัยหลัก 3 ประการ ดังนี้

3.1.1 Sucrose-independent adhesion

เป็นการยึดเกาะโดยใช้โปรตีนที่เรียกว่า antigen I/II เป็นโปรตีนที่มีขนาด 185 กิโลดาลตัน โปรตีนชนิดนี้สามารถพบได้ในเชื้อ streptococci ที่อยู่ในช่องปากสายพันธุ์อื่นๆ ได้ด้วย (Ma, *et al.*, 1991) โดยมีชื่อเรียกต่างกันไป เช่น P1, Spa, P, Sr, Pac และ antigen B โปรตีนในกลุ่ม antigen I/II จะมีโครงสร้างบางส่วนที่เหมือนกัน แต่มีบางส่วนที่ต่างกัน จึงทำให้ความสามารถในการยึดเกาะกับโปรตีนต่างๆ ในน้ำลายแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของเชื้อ (Petersen, *et al.*, 2002) ส่วนสำคัญของโปรตีน antigen I/II ที่ใช้ยึดเกาะกับโปรตีนอื่นๆ ในน้ำลาย คือ alanine-rich และ proline-rich ซึ่งจะยึดเกาะกับเยื่อผิวหรือ pellicle ที่เป็นส่วนสำคัญในการเกิดคราบจุลินทรีย์ (Yu, *et al.*, 1997) และมีรายงานการศึกษาพบว่า เชื้อ *S. mutans* สายพันธุ์กลาย P1 ที่ไม่สามารถสร้างโปรตีน antigen I/II จะมีความสามารถในการยึดเกาะกับ hydroxyapatite ที่เคลือบน้ำลายได้ลดลง การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า หากเชื้อขาดโปรตีน antigen I/II เชื้อจะยึดเกาะกับโปรตีนในน้ำลายที่เคลือบบนผิว hydroxyapatite ซึ่งเป็นส่วนประกอบของฟันได้ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า การขาดโปรตีน P1 จะทำให้การสร้าง biofilm ในหลอดทดลองผิดไป ซึ่งอาจมีผลให้การก่อโรคเปลี่ยนไปเช่นกัน เช่น อาจจะไม่ก่อโรคเลยก็ได้ (Lee, *et al.*, 1989)

3.1.2 Sucrose-dependent adhesion

S. mutans เป็นแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ glucosyltransferase (GTF) จากการใช้น้ำตาล sucrose เพื่อการสังเคราะห์ glucan โดยการย่อยสลาย sucrose เป็น glucose และ fructose และ glucose เชื่อมต่อกันเป็น polymer ของ glucan ซึ่งใน *S. mutans* มียีน *gtf* 3 ชนิดที่ควบคุมการสร้าง glucan ได้แก่

1) *gtfB* โดยทั่วไปเรียกว่า *gtfI* ควบคุมการสังเคราะห์ glucan ชนิดที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble glucan) ที่มีโครงสร้างเป็นกิ่งก้านของ alpha-1,3 glycosidic

2) *gtfC* โดยทั่วไปเรียกว่า *gtfIS* ควบคุมการสังเคราะห์ glucan ทั้งชนิดที่ไม่ละลายน้ำและสามารถละลายน้ำ (soluble glucan) ได้ ส่วนมากเป็น glucan ที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงของ alpha-1,6 glycosidic

3) *gtfD* โดยทั่วไปเรียกว่า *gtfS* ควบคุมการสังเคราะห์ glucan ชนิดที่สามารถละลายน้ำได้ มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงของ alpha-1,6 glycosidic

glucan มีความสำคัญในการทำให้เชื้อ *S. mutans* ยึดเกาะและตั้งถิ่นฐาน (colonization) บนผิวฟันได้ รวมทั้งเป็นตัวกลางให้แบคทีเรียชนิดอื่นมาเกาะติดและรวมตัวกันที่ผิวฟันด้วย (Figure 4) จึงก่อให้เกิดเป็นคราบจุลินทรีย์หรือ biofilm ที่ยากต่อการกำจัดออก (Bowen & Koo, 2011)

3.1.3 Glucan binding protein (GBP)

เป็นโปรตีนที่ยึดเกาะอยู่กับ glucan ซึ่ง *S. mutans* มีโปรตีนนี้ 3 ชนิด คือ GBP A, GBP B และ GBP D โปรตีนเหล่านี้มีความสำคัญในการสร้าง biofilm ของเชื้อและมีส่วนในการก่อโรคฟันผุ (Banas & Vickerman, 2003, Matsumura, *et al.*, 2003)

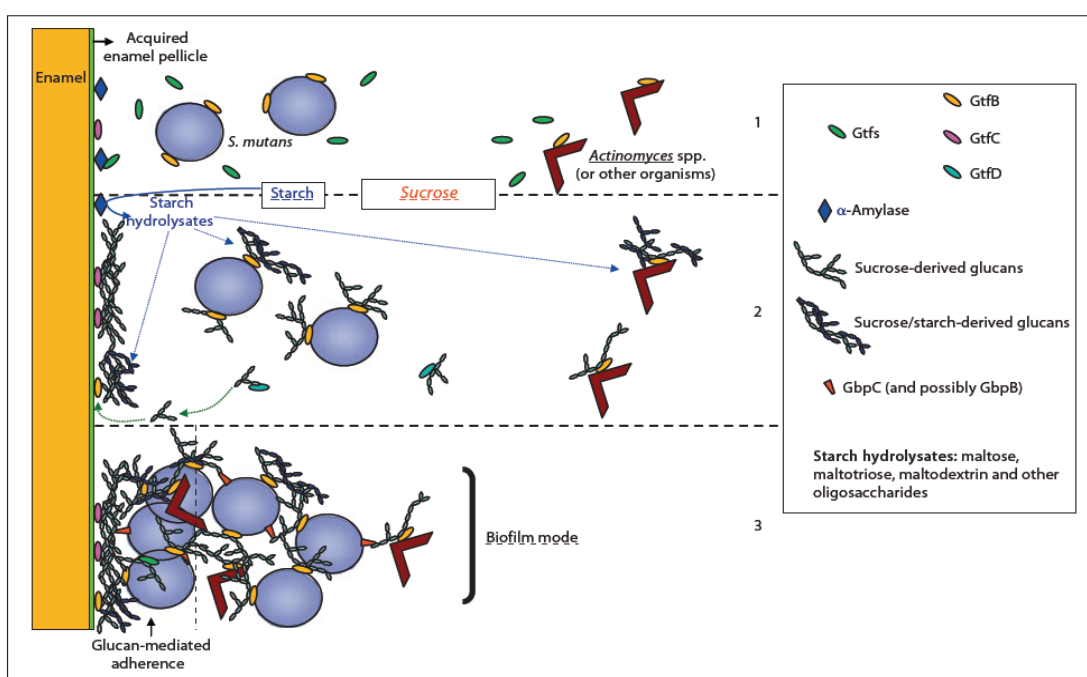


Figure 4: Revised model of Gtf-glucan-mediated bacterial adherence and cariogenic biofilm development (Bowen & Koo, 2011).

3.2 Acidogenicity

S. mutans มีความสามารถในการสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลโดยผ่านกระบวนการ glycolytic และการหมัก (fermentation) ได้กรดต่างๆ ได้แก่ lactic, formic, propionic, butyric และ acetic acid นอกจากนี้ยังได้เอทานอล ปริมาณกรดที่สร้างได้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสถานะในการเจริญเติบโต ในสถานะที่มี glucose จำนวนมากจะได้กรด lactic เป็นส่วนใหญ่ (Paes Leme, *et al.*, 2006) จากรายงานการศึกษาพบว่า *S. mutans* ที่มีเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ลดลงความสามารถในการก่อโรคฟันผุจะลดลง และหากขาดเอนไซม์ LDH อย่างสิ้นเชิง *S. mutans* ก็จะตายในที่สุด เพราะว่าในขั้นตอนการเปลี่ยนจาก pyruvate ไปเป็นกรด lactic และได้พลังงานออกมา จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ LDH การขาดเอนไซม์ชนิดนี้จึงมีผลต่อการสร้างกรดและการอยู่รอดของ

S. mutans ด้วย (Hillman, *et al.*, 1996) จึงมีรายงานการนำสายพันธุ์ของเชื้อที่ถูกทำให้ขาดเอนไซม์ LDH มาใช้รักษาและป้องกันโรคฟันผุ เพราะเชื้อไม่สามารถสร้างกรดไปสลายผิวฟันได้ การมีเชื้ออยู่ก็จะไม่เกิดฟันผุ (Hillman, 2002) *S. mutans* มีความสามารถในการสร้างกรดได้มากกว่า streptococci สายพันธุ์อื่นๆ ภายในช่องปาก เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างกรดได้มากในสภาวะที่ pH เป็นกลาง (pH 7) และยังคงความสามารถในการสร้างกรดได้ในสภาวะที่เป็นกรด (pH 5) ในขณะที่ streptococci สายพันธุ์อื่นๆ จะสร้างกรดได้ลดลง (de Soet, *et al.*, 2000) ดังนั้นการสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans* ในคราบจุลินทรีย์หรือ biofilm จะทำให้สภาวะแวดล้อมใน biofilm มีความเป็นกรดมาก จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมให้ตัวเชื้อเองและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่สร้างกรดและทนกรดได้เจริญเติบโตเพิ่มจำนวน (Figure 5) และหากสภาพความเป็นกรดใน biofilm มี pH ต่ำกว่า 5.5 จะทำให้เกิดกระบวนการสูญเสียแร่ธาตุและเกิดฟันผุตามมา (Loesche, 1986)

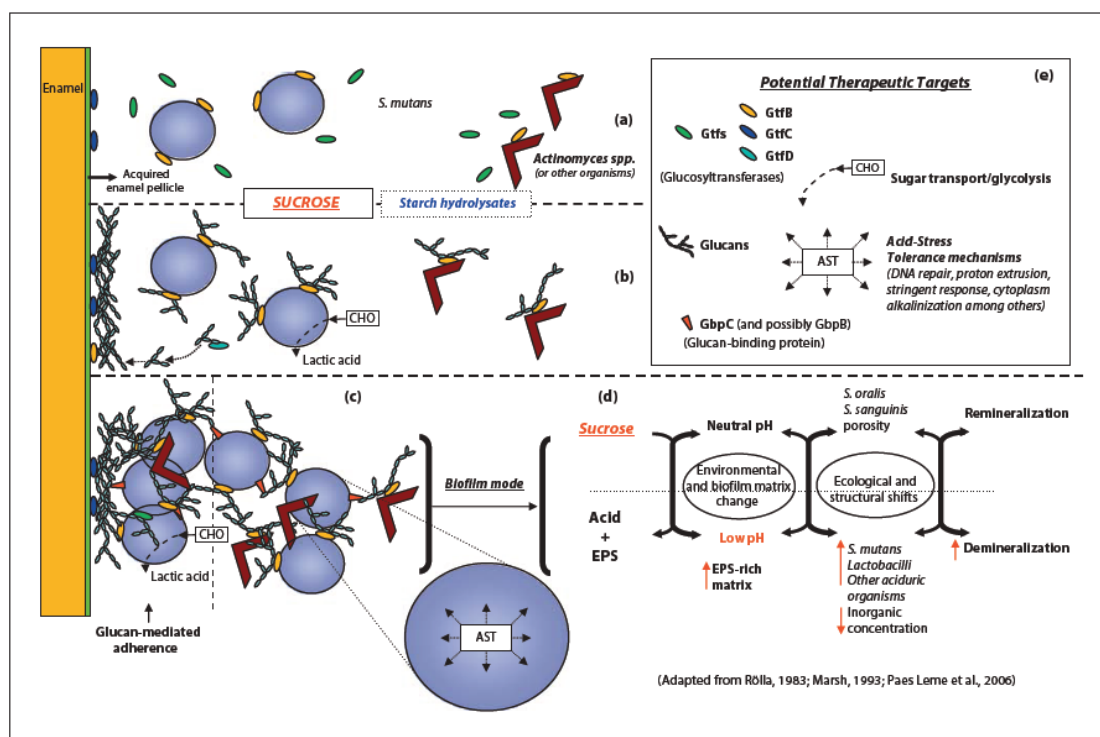


Figure 5 (a–c) Cariogenic biofilm formation (d) If biofilm remains on tooth surfaces with frequent consumption of high-carbohydrate diet (especially sucrose), the amount of EPS and extent of acidification of the matrix will be increased. Such conditions cause biochemical, ecological and structural changes favoring the survival and dominance of highly acid stress-tolerant organisms in cohesive and firmly attached biofilms. The low-pH environment at the tooth-biofilm interface results in enhanced demineralization of enamel (Jeon, *et al.*, 2011).

3.3 Aciduricity หรือ acid-tolerance

S. mutans มีความสามารถในการทนกรด จึงสามารถมีชีวิตรอดได้ใน biofilm แม้ว่าสภาพ pH ใน biofilm จะต่ำกว่า 4.0 (Figure 6) และแบคทีเรียที่สร้างกรดและทนกรดสายพันธุ์อื่นๆ ยังสามารถเจริญเติบโตได้ด้วย (Svensater, *et al.*, 1997, McNeill & Hamilton, 2003) โดยความสามารถในการทนกรดขึ้นกับกลไกต่างๆ ดังนี้

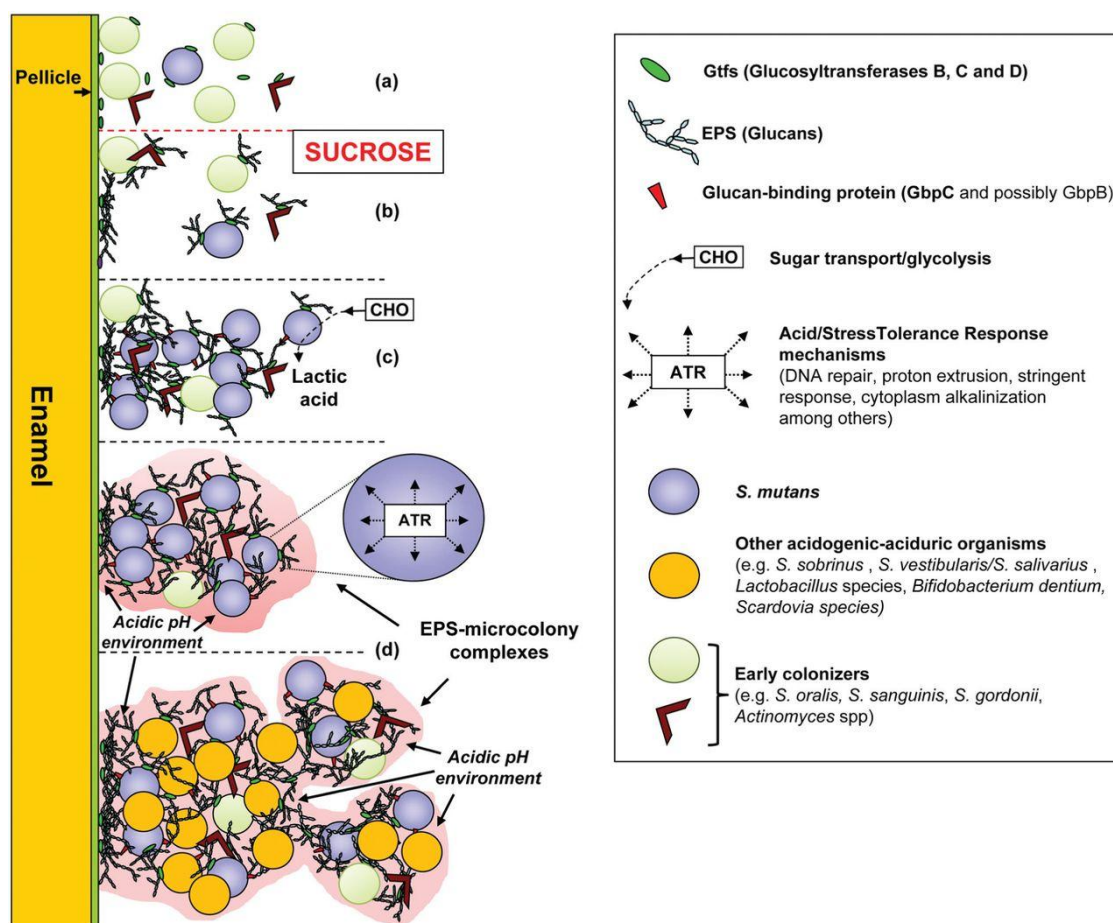


Figure 6: (a-c) This model explain the rapid accumulation of cariogenic plaque in the presence of sucrose (and starch hydrolysates), even if the initial *S. mutans* population is numerically low. (d) Such conditions elicit biochemical, ecological, and structural changes that favor the survival and dominance of highly acid-stress-tolerant organisms in these cohesive and firmly attached biofilms. The low-pH environment at the tooth-biofilm interface promotes demineralization of enamel (Koo, *et al.*, 2013).

3.3.1 การรักษาสภาพกรด-ด่างในเซลล์

S. mutans สามารถทนกรดได้โดยการขับกรดออกจากเซลล์ผ่านผนังเซลล์จากการใช้เอนไซม์ ATPase หรือ F-ATPase เนื่องจากกรดมีความเป็นพิษต่อการทำงานของเซลล์ ทำให้ความสามารถในการทนกรดขึ้นกับระดับเอนไซม์ F-ATPase ซึ่งมีความแตกต่างกันใน streptococci สายพันธุ์ต่างๆ ในช่องปาก (Bender, *et al.*, 1986) ถ้าระดับเอนไซม์ F-ATPase เพิ่มขึ้นจะทำให้สภาวะความเป็นกรดในเชื้อ *S. mutans* ลดต่ำลง pH เพิ่มขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มเซลล์เพื่อลดการนำเข้าของประจุบวกรวมทั้งขับสารที่เป็นกรดออกสู่ภายนอกเซลล์ (Figure 7) เชื้อจึงสามารถรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่างได้ (Matsui & Cvitkovitch, 2010)

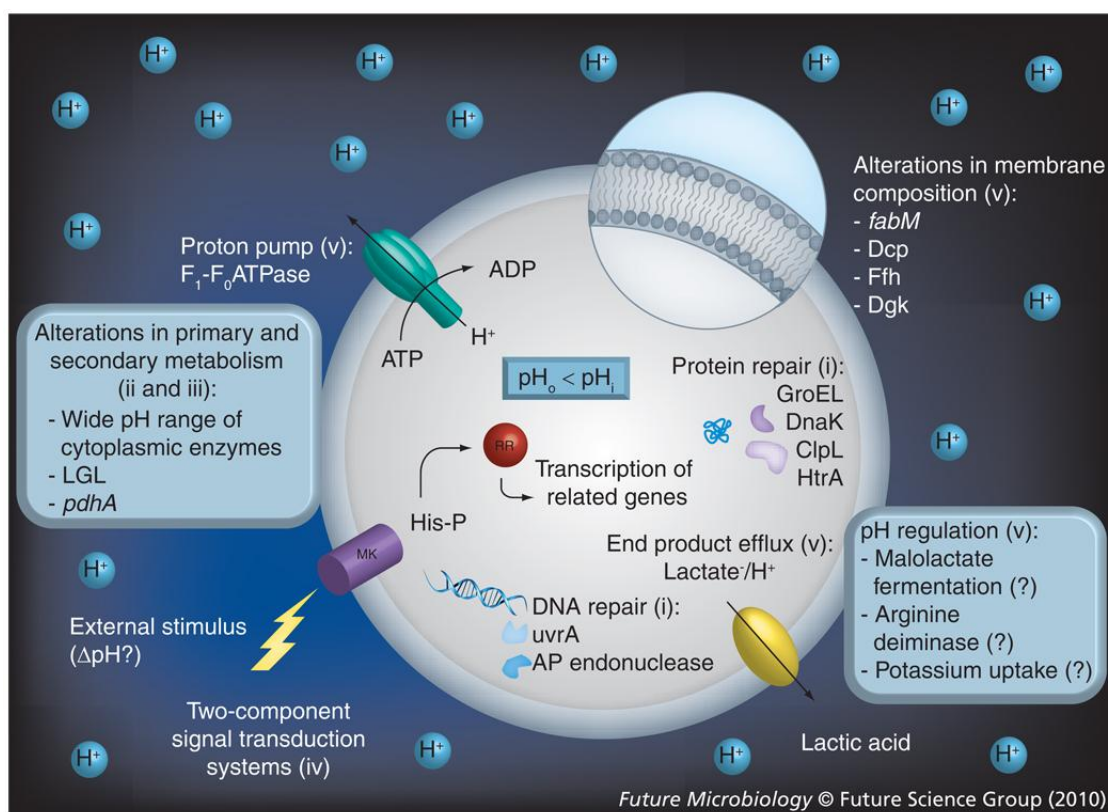


Figure 7: Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*

Roman numerals denote the particular aspect of acid tolerance each component is involved in: (i) the protection and repair of macromolecules; (ii) alterations of metabolic pathways; (iii) secondary metabolism; (iv) cell density, biofilm formation and regulatory systems; and (v) intracellular pH homeostasis. AP: Apurinic-apyrimidinic; LGL: Lactoylglutathione lyase; pH_i: Intracellular pH; pH_o: External pH; RR: Response regulator (Matsui & Cvitkovitch, 2010).

3.3.2 การเหนี่ยวนำการทำงานของ DNA และการสร้างโปรตีน

สภาวะความเป็นกรดมีผลในการเหนี่ยวนำการทำงานของยีนบางตัวและการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ การมีผลต่อเอนไซม์ที่ใช้สร้างกรด lipoteichoic และเอนไซม์เคลื่อนย้ายโปรตีน (protein translocation) เอนไซม์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการสร้างเชื้อหุ้มเซลล์ สภาวะความเป็นกรดจึงมีผลต่อโครงสร้างของเชื้อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Figure 7) เช่น ในสภาวะที่ค่า pH ลดลงต่ำกว่า 5.0 จะทำให้ลดประสิทธิภาพในการเพิ่มกลุ่ม D-alanine esters มีผลทำให้โครงสร้างเชื้อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป เกิดการเพิ่มการส่งออกประจุบวกมากขึ้น pH จึงลดต่ำลง (Hanna, *et al.*, 2001, Matsui & Cvitkovitch, 2010)

4. การป้องกันและควบคุมโรคฟันผุ

สารป้องกันโรคฟันผุส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสารเคมี ซึ่งเป็นสารที่ใช้ควบคุมคราบจุลินทรีย์บริเวณเนื้อเหงือก สารเหล่านี้เมื่อผสมลงไปผลิตภัณฑ์บางอย่างที่ใช้ป้องกันโรคในช่องปาก เช่น ในน้ำยาบ้วนปาก ถ้ามีในปริมาณที่สูงเกินไปพบว่าจะเป็นพิษต่อเซลล์ในช่องปากและเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งในช่องปากโดยเฉพาะน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของเอทานอล (Knoll-Kohler & Stiebel, 2002, Rodrigues, *et al.*, 2007, Lachenmeier, 2008, McCullough & Farah, 2008) ตัวอย่างสารเคมีที่ใช้ป้องกันโรคฟันผุ เช่น

1) Chlorhexidine จัดเป็นสารต้านคราบจุลินทรีย์และต้านเหงือกอักเสบที่มีมาตรฐานสูงสุด (Matthijs & Adriaens, 2002)

กลไก

chlorhexidine รวมตัวกับ mucin ในน้ำลายทำให้ลดการสร้างแผ่นคราบน้ำลาย และยับยั้งการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์โดยทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียรั่ว และส่วนประกอบของเซลล์ตกตะกอน (Fine, 1988) Chlorhexidine สามารถซึมผ่านคราบจุลินทรีย์หรือ biofilm ได้ดีกว่า Listerine[®] เนื่องจากสารจะจับกับเนื้อเยื่อในช่องปาก และจะปล่อยออกมาช้าๆ หลังจากบ้วนทิ้งทำให้เกิดผลการต้านแบคทีเรียยาวนานหลายชั่วโมงโดยไม่ทำให้เชื้อประจำถิ่น (oral flora) เปลี่ยนแปลง แต่สารนี้มีผลเสียคือ มีการติดสีที่ฟันและลิ้นจากการใช้น้ำยาบ้วนปาก chlorhexidine และมีอาการเจ็บที่เยื่อเมือกในช่องปาก (Netuschil, *et al.*, 1995)

2) Cetylpyridinium chloride (CPC)

กลไก

CPC มีฤทธิ์ในการยับยั้งคราบจุลินทรีย์ปานกลาง โดยสารจะซึมผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้มาก ลด metabolism ของเซลล์และเปลี่ยนแปลงการยึดเกาะของแบคทีเรียที่ผิวฟัน CPC มีคุณสมบัติคล้าย chlorhexidine ที่เป็นประจุบวกจึงจับกับเนื้อเยื่อในช่องปากได้ดี แม้ว่าในช่วงแรกจะมีการคงอยู่ในช่องปากได้ดีกว่าและมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียใกล้เคียงกับ chlorhexidine แต่จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่า chlorhexidine ในการยับยั้งคราบจุลินทรีย์และป้องกันเหงือกอักเสบ เนื่องจากสารนี้หลุดออกจากเนื้อเยื่อในช่องปากเร็ว และมีข้อเสียคือ ดิสตีที่ฟันและเสาร้อนที่เนื้อเยื่อในช่องปาก (Roberts & Addy, 1981)

3) Phenolic related essential oils- Listerine®

กลไก

Listerine® จะไปเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ และยับยั้งการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย ทำให้ช่วยในการลดคราบจุลินทรีย์และเหงือกอักเสบได้ Listerine® ที่นิยมใช้แพร่หลายจะประกอบด้วย thymol, eucalyptol, mentol และ methylsalicylate แต่มีข้อเสียคือ ทำให้รู้สึกเสาร้อนและขม เพราะ Listerine® มีแอลกอฮอล์สูงถึงร้อยละ 25 ซึ่งจะมีผลเสียต่อสุขภาพ (Gordon, *et al.*, 1983)

4) ฟลูออไรด์

กลไก

หากมีการใช้ฟลูออไรด์ระหว่างกระบวนการสร้างผิวเคลือบฟันของเด็ก ฟลูออไรด์จะแทนที่กลุ่มไฮโดรซิลเกิดการสร้างฟลูออโรอะพาไทต์ซึ่งละลายในกรดได้ยากกว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์ นอกจากนี้ฟลูออไรด์ช่วยในกระบวนการคืนแร่ธาตุ (remineralization) ของฟันผุระยะแรกในรอยผุซึ่งเกิดที่ผิวเคลือบฟันและเนื้อฟัน นอกจากนี้ฟลูออไรด์ยังขัดขวางการสร้างคราบจุลินทรีย์ โดยการขัดขวางกระบวนการต่างๆ ที่จุลินทรีย์ใช้ในการสร้างอาหารและคราบจุลินทรีย์ แต่ฟลูออไรด์มีข้อเสียคือ เกิดการตกกระที่ฟันถ้าดื่มน้ำที่มีฟลูออไรด์ปริมาณมาก ปัจจุบันจึงผสมอยู่ในรูปของยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก เพื่อป้องกันการตกกระ (Islam, *et al.*, 2007)

เนื่องจากโรคฟันผุเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญของเด็กนักเรียนในประเทศพัฒนาและกำลังพัฒนา โดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนาจะมีการดูแลรักษาสุขภาพช่องปากค่อนข้างต่ำ เพราะการถูกจำกัดด้านงบประมาณในการดูแลรักษา สถานที่รักษาและบุคลากรทางการแพทย์ไม่เพียงพอ หลายประเทศจึงต้องหาแนวทางการป้องกันและการรักษาโรคฟันผุที่มีประสิทธิภาพปลอดภัย และประหยัด ผลกระทบจากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการพัฒนามาใช้กับช่องปาก เพราะมีผลข้างเคียงกับผู้ใช้จ่ายเมื่อเทียบกับสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นมา มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษา

เกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชในการต้านแบคทีเรียก่อโรคฟันผุ เช่น ฤทธิ์ของสารสกัดจาก *Caesalpinia ferrea* (Sampaio, et al., 2009), *Allium sativum* (Bakri & Douglas, 2005) *Harungana madagascariensis* (Moulari, et al., 2006), *Helichrysum italicum* (Nostro, et al., 2004) และเมล็ดองุ่นแดง (Smullen, et al., 2007) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. mutans* นอกจากนี้สารสกัดจากพืชหลายชนิดยังมีฤทธิ์ต่อกลไกการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้ ได้แก่ มีฤทธิ์ลดการผลิตกรด ลดการสร้างเอนไซม์ GTF รวมทั้ง glucan ที่มีผลต่อการสร้างคราบจุลินทรีย์หรือ biofilm ของแบคทีเรีย เช่น สารสกัดจาก *Dryopteris crassirhizoma* (Ban, et al., 2012), *Aralia continentalis* (Lee, et al., 2011), *Polygonum cuspidatum* (Song, et al., 2006, Ban, et al., 2010), *Plectranthus barbatus*, *P. ecklonii* (Figueiredo, et al., 2010), *Rosmarinus officianalis*, *Salvia officianalis*, *Camellia sinensis* (Smullen, et al., 2012) และ *Vaccinium macrocarpon* (Yamanaka, et al., 2004)

5 กระทุง

กระทุงมีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์คือ *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk จัดอยู่ในวงศ์ Myrtaceae มีชื่อสามัญที่เรียกกันทั่วไป ได้แก่ ทุ พรวด กระทุง กาทู ง่าย ชวด ปุ๋ย มูติง และกามูติง ส่วนชื่อสามัญในภาษาอังกฤษที่เรียกกัน ได้แก่ downy myrtle, downy rose myrtle, rose myrtle, hill gooseberry, hill guava, isenbery bush และ ceylon hill

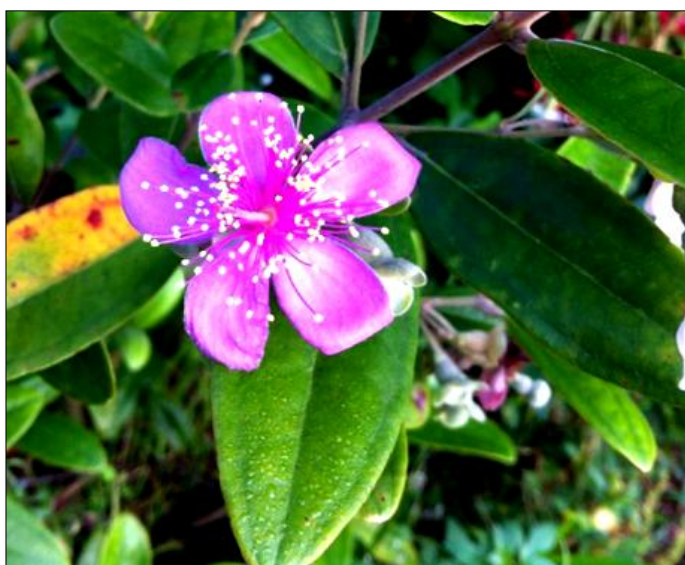


Figure 8: *Rhodomyrtus tomentosa*

5.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการกระจายพันธุ์

กระทุงเป็นไม้ป่าที่ขึ้นเองตามธรรมชาติและสามารถนำมาเพาะปลูกได้ เจริญเติบโตได้ดีในดินทราย มักจะขึ้นในเขตภูมิประเทศที่ติดทะเล เขตภูมิอากาศโซนร้อนถึงกึ่งโซนร้อน เป็นไม้พุ่มเขียวชอุ่มทั้งปี ความสูงประมาณ 2-3 m ใบเป็นใบเดี่ยวรูปไข่ปลายมน ยาว 5-8 cm กว้าง 1.5-4 cm หน้าใบเป็นมันสีเขียวเข้ม ส่วนหลังใบสีนวลมีขนละเอียดปกคลุม โดยมีเส้นใบขนสามเส้น ประกอบด้วยเส้นกลางใบ 1 เส้น และเส้นขอบใบ 2 เส้น ก้านใบยาวประมาณ 5 mm เป็นเหลี่ยมมีขน กระทุงมีดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อกระจุกซ้อนที่ง่ามใบหรือปลายกิ่ง ฐานรองดอกรูปถ้วย โคนกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นรูปกรวย ปลายแยก 5 แฉก ผิวมีขนนุ่มหนาแน่น กลีบดอก 5 กลีบ รูปรางค์ก่อนข้างกลม ขนาด 1.5-2 cm สีชมพู ด้านนอกมีขนสีขาว สีของดอกกระทุงเป็นสีชมพูกุหลาบ กลีบดอกชั้นเดียว มีสีชมพูอ่อนถึงแก่ในช่อเดียวกัน ขนาดดอกกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 cm ส่วนผลจะเป็นรูปกลมถึงเกือบกลม ขนาด 9-10 mm ผิวมีขนคล้ายกำมะหยี่ ผลอ่อนมีสีเขียวแล้วจะค่อยๆ สุกกลายเป็นสีแดงจนสุกจัดกลายเป็นสีม่วงอมดำ เนื้อผลสีชมพูแดง ภายในมีเมล็ดจำนวนมาก เมล็ดรูปไต สีน้ำตาลอ่อน ผลรับประทานได้ รสหวาน (กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2548) กระทุงเป็นไม้ท้องถิ่นทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งพบได้บ่อยบนดินทราย บริเวณชายฝั่งทะเลทั้งสองด้านทางใต้ของไทย และจังหวัดตราดในภาคตะวันออก ความเป็นกรดต่ำของดินอยู่ระหว่าง 4.0-10.0 ซึ่งเฉลี่ยคือ 5.8 (Winotai, *et al.*, 2005) พืชชนิดนี้สามารถทนความเค็มและกรีดน้ำแข็งได้ สามารถทนอุณหภูมิได้ถึง -7°C และยังสามารถปรับตัวกับไฟป่า อีกทั้งเจริญเติบโตได้ดีหลังจากเกิดไฟไหม้ป่า

การปลูก ขณะนี้ยังไม่มีการปลูกกระทุงเพื่อประโยชน์ทางการค้า มีเพียงการปลูกกระทุงไว้เพื่อเป็นการเก็บรวบรวมพันธุ์และตกแต่งสถานที่ ในมลรัฐฮาวายและฟลอริดาของประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศมาเลเซียกระทุงถือว่าเป็นวัชพืชหลักหรือร้ายแรง มีรายงานการสำรวจเบื้องต้นเกี่ยวกับสัตว์กินพืชต่อพืชชนิดนี้ตั้งแต่เดือนเมษายน 2001 ถึงเดือนพฤษภาคม 2002 เพื่อที่จะรวบรวมข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับการกระจาย, ลักษณะทางชีววิทยา และ การใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (Winotai, *et al.*, 2005)

ส่วนที่สามารถนำไปใช้เป็นยาตามตำรับยาแผนโบราณ ได้แก่ ผลใช้รักษาโรคบิดและโรคท้องร่วง ใบและรากต้มแก้ท้องร่วง ปวดท้อง และใช้หลังสตรีคลอดบุตร

2.2 สารประกอบที่แยกได้จากกระทุง

สารประกอบต่างๆที่แยกได้จากกระทุงเป็นสารในกลุ่ม triterpenoids และ steroids ได้แก่ lupeol, beta-amylin, beta-amyrnonol, betulin, friedelin, alpha-amyrin และ taraxerol (Hui, *et al.*, 1975) ส่วนสารในกลุ่ม triterpenoids มีสาร 2 ชนิด ได้แก่ hopenediol และ oleananolides (Hui & Li,

1976) นอกจากนี้สามารถแยกสารในกลุ่ม tannins ได้ด้วย คือ tomintosin และแยกสารกลุ่มนี้ได้จากใบและรากได้แก่ pedunculansin, casuariin และ castalagin (Liu, *et al.*, 1998) ใบของกระทุงสามารถแยกได้สาร flavones glycosides และ ellagitannin ส่วนสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตจากใบกระทุงสามารถแยกได้สาร rhodomyrton (Figure 9) (Dachriyanus, *et al.*, 2002) อีกทั้งยังแยกได้สาร Rhodomyrton A-D (Figure 10) ในสารสกัดด้วยอะซิโตน (Hiranrat & Mahabusarakam, 2008) และแยกได้สาร tomentosone A และ B จากสารสกัด CH_2Cl_2 ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม acylphloroglucinol (Hiranrat, *et al.*, 2012) สารประกอบในกลุ่ม flavonoids ที่สกัดจากผลของกระทุงได้แก่ galloocatechin gallate, querecin-pentoside, anthocyanins, carotenoids และ vitamin C และยังพบว่าสารสกัดจากผลกระทุงมีคุณสมบัติเป็น antioxidant ในผลของกระทุงมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 5.7% และไขมัน 5.1% (Huang, *et al.*, 2010)

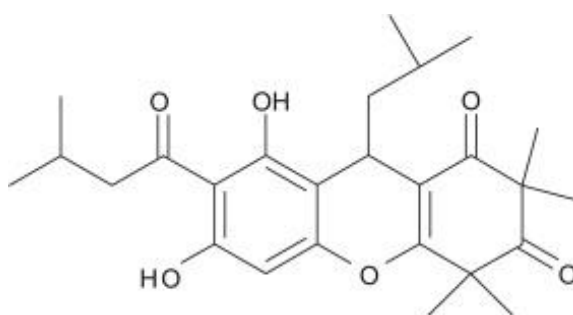


Figure 9: Structure of rhodomyrton (Dachriyanus, *et al.*, 2002)

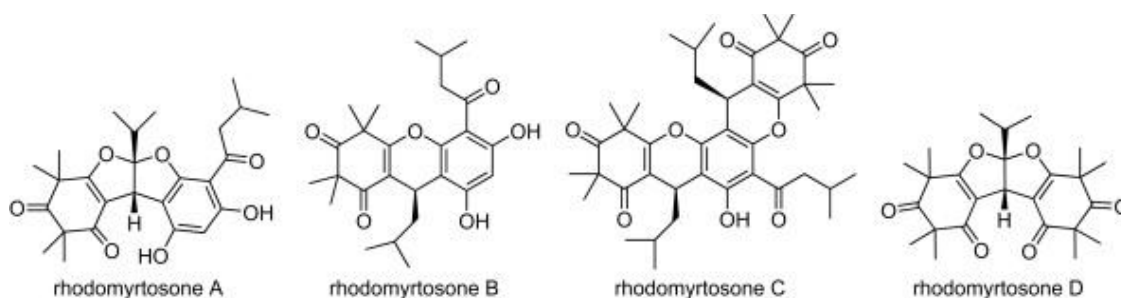


Figure 10: Structure of Rhodomyrton A-D (Hiranrat & Mahabusarakam, 2008)

2.3ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุงต่อแบคทีเรีย

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบกระทุงพบว่า สาร rhodomyrtone มีฤทธิ์ในการต้าน *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* (Dachriyanus, et al., 2002) สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุงมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Voravuthikunchai, et al., 2007) สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ staphylococci ที่แยกได้จากรอยสิ่ว โดยค่า minimal inhibitory concentration (MIC) อยู่ในช่วง 32-1,024 $\mu\text{g/ml}$ ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ต่อเชื้อ coagulase-positive staphylococci คือ 64 และ 512 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วนค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ต่อเชื้อ coagulase-negative staphylococci คือ 64 และ 256 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และผลการทดลอง time-kill พบว่าที่ 4MIC สามารถลดปริมาณเชื้อ staphylococci ลงได้ 3 log จากปริมาณเชื้อเริ่มต้นภายในเวลา 6-8 ชั่วโมง (Saising, et al., 2008) นอกจากนี้สารสกัดจากกระทุงยังมีฤทธิ์ยับยั้ง *Streptococcus agalactiae* ที่แยกได้จากปลาชนิด (Na-Phatthalung, et al., 2013) สารสกัดจากกระทุงสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในเชื้อ *S. pyogenes* ที่ความเข้มข้น 0.24-7.81 $\mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์เป็น antiquorum sensing ในเชื้อ *Chromobacterium violaceum* (Limsuwan & Voravuthikunchai, 2008) และมีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเชื้อ *S. pyogenes* ที่แยกได้จากผู้ติดเชื้อชนิดนี้ที่ทางเดินหายใจส่วนบน (Limsuwan & Voravuthikunchai, 2013) การศึกษาฤทธิ์ของ rhodomyrtone ที่แยกจากสารสกัดใบกระทุงพบว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ เช่น *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *S. epidermidis*, *S. gordonii*, *S. mutans*, *S. pneumonia*, *S. pyogenes* และ *S. salivareus* ซึ่งมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.39-0.78 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งดีกว่าเมื่อเทียบกับยา vancomycin ที่มีค่า MIC ที่ 1.25 $\mu\text{g/ml}$ (Limsuwan, et al., 2009) นอกจากนี้ rhodomyrtone ยังสามารถลดการสร้างสารพิษของเชื้อ *S. aureus* (Leejae, et al., 2013) และทำให้ความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อ epidemic methicillin-resistant *S. aureus* (EMRSA) และเชื้อ vancomycin-resistant enterococcal (VRE) ลดลง (Leejae, et al., 2013) การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุงต่อการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหารพบว่ามีค่า MIC และ minimal bactericidal concentration (MBC) อยู่ในช่วง 16-64 และ 32-256 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วนสาร rhodomyrtone มีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อนี้ที่ 0.5 และ 2-8 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (Voravuthikunchai, et al., 2010) สารสกัดด้วยเอทานอลจากกระทุงและ rhodomyrtone ยังมีฤทธิ์ต้าน *Propionibacterium acnes* โดย MIC₉₀ อยู่ที่ 32 และ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และใน

การศึกษา time-kill สารสกัดด้วยเอทานอลและ rhodomyrtone สามารถลดเชื้อนี้ลงได้ 99% ภายใน 72 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ (Saising & Voravuthikunchai, 2012) นอกจากนี้สารสกัดด้วยเมทานอลจากใบกระทูสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ซึ่งเป็นสารสื่อกลางในการเกิดการอักเสบได้ (Jeong, *et al.*, 2013) และการนำ rhodomyrtone ไป formulate ใน liposome พบว่ามีฤทธิ์ดีกว่า topical drugs ในการต้าน *S. aureus* และ *S. epidermidis* (Chorachoo, *et al.*, 2013)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทูในการต้านเชื้อก่อโรคฟันผุ *S. mutans*
2. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทูต่อกลไกการก่อโรคฟันผุของเชื้อ *S. mutans*

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. แบคทีเรีย

S. mutans NPRC 801-810 (แยกได้จากน้ำลาย)

S. mutans ATCC 25175

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

Blood Agar (BA)

Brain Heart Infusion Broth (BHI)

Mueller-Hinton Agar (MHA)

บริษัทผู้ผลิต

Merck

Merck

Difco

3. ยาปฏิชีวนะ

Ampicillin

Azithromycin

Clarithromycin

Clindamycin

Erythromycin

Imipenem

Penicillin

Penicillin G

Teicoplanin

Tetracycline

Vancomycin

บริษัทผู้ผลิต

Oxoid

Oxoid

Oxoid

Oxoid

Oxoid

Oxoid

Oxoid

Oxoid

Oxoid

Oxoid

Oxoid

4. สารเคมี และส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

	บริษัทผู้ผลิต
Absolute ethanol (C ₂ H ₅ OH)	Merck
Chlorhexidine	Sigma-Aldrich
Crystal violet	Sigma-Aldrich
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	RCI Labscan
Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Glucose	UNIVAR
Magnesium chloride (MgCl ₂)	Merck
Potassium chloride (KCl)	Merck
Potassium hydroxide (KOH)	Merck
Rezasurin	Sigma-Aldrich
Sodium chloride (NaCl)	Merck
Sodium dihydrogen phosphate (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Sodium hydroxide (NaOH)	Labscan
Sucrose	UNIVAR

อุปกรณ์

	บริษัทผู้ผลิต
Autoclave	Tomy
Balance	Sartorius
Beaker	Pyrex
Centrifuge	eppendorf
Centrifuge tube	Corning
Duran bottle	Duran
Eppendorf	eppendorf
Filter paper disc	Whatman
Hot air oven	Binder
Hot plate stirrer	Lab. Companion
Incubator	Thermo

Laminar air flow cabinet

Gelman

อุปกรณ์ (ต่อ)

บริษัทผู้ผลิต

Light microscope

Olympus

Micropipette

Eppendorf

Microplate reader

Bio-Tek

Microtiter plate 96 well

Nunc

Microtiter plate 6 well

Nunc

Multichannel micropipette

Finnpipette

Petri dish

Anumbra

pH meter

Sartorius

Refrigerator

Sanyo

Scanning electron microscope

Quanta

Spectrophotometer

Thermo

Test tube

Pyrex

Venier caliper

Whale

Vortex mixer

Vortex Genie 2

Water bath

Julabo

วิธีการทดลอง

1. เชื้อ *S. mutans*

ในการทดสอบใช้เชื้อ *S. mutans* ที่แยกได้จากน้ำลายจำนวน 10 สายพันธุ์ (NPRC 801-810) และ *S. mutans* ATCC 25175 ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐาน

2. สารสกัดจากไบโกระทุ

สารสกัดด้วยอะซิโตนและเอทานอลจากไบโกระทุได้ความอนุเคราะห์จากสถานวิจัยความเป็นเลิศด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) เก็บไว้ที่ -20°C

3. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากไบโกระทุต่อการต้านเชื้อ *S. mutans* โดยวิธี disc diffusion (CLSI, 2009)

3.1 การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร blood agar (BA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 นาน 24-48 ชั่วโมง เลือกรวม 3-5 colony เลี้ยงในอาหาร brain heart infusion broth (BHI) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 นาน 16-18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% normal saline solution (0.85% NSS) จะมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml

3.2 การเตรียมสารสกัด

ละลายสารสกัดใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 250 mg/ml หยดสารสกัด 10 μl ลงบนแผ่น disc ปราศจากเชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้ง จะได้สารสกัดความเข้มข้น 2.5 mg/disc

3.3 การทดสอบ

ใช้ cotton swab จุ่มเชื้อจากข้อ 3.1 นำมาเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหาร Mueller-Hinton agar ผสม 5% เลือด วางแผ่นยามาตรฐาน ได้แก่ penicillin, ampicillin, clindamycin, erythromycin, tetracycline, vancomycin, teicoplanin, imepenem, clariomycin และ azithromycin และแผ่นสารสกัด โดยแต่ละแผ่นห่างกันประมาณ 15-20 mm และห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 mm บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง

ใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *S. mutans* ATCC 25175 ทดสอบกับยาปฏิชีวนะเพื่อใช้เป็น control และแผ่น disc ที่มี DMSO เป็น negative control

3.4 การอ่านผล

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) โดยใช้ vernier caliper สำหรับการทดสอบกับแผ่นยามาตรฐานนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับตารางมาตรฐาน CLSI ซึ่งจะแสดงผล 3 ลักษณะ ดังนี้

Susceptible (S)	เชื้อมีความไวต่อยาที่ใช้ทดสอบ
Intermediate (I)	เชื้อมีความไวปานกลางต่อยาที่ใช้ทดสอบ
Resistant (R)	เชื้อคือยาที่ใช้ทดสอบ

4. การทดสอบหาค่า MIC และ MBC โดยวิธี broth microdilution (CLSI, 2009)

4.1 การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชืบนอาหาร BA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นาน 24-48 ชั่วโมง เลือกเชื้อมา 3-5 colony เลี้ยงในอาหาร BHI บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นาน 16-18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland no. 0.5 หลังจากนั้นนำไปเจือจางให้มีเชื้อประมาณ 1.0×10^6 CFU/ml ด้วย BHI broth

4.2 การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดจาก stock solution ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่า ของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ โดยการนำสารสกัดมาละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO ส่วนยา penicillin G และ chlorhexidine ละลายกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

4.3 การทดสอบหาค่า MIC

ทำการเจือจางสารสกัดแบบลำดับสองกับ 10% DMSO ให้มีความเข้มข้น 1,024-0.5 µg/ml ใน microtiter plate แบบ 96 หลุม ให้มีปริมาตรหลุมละ 20 µl จุด BHI broth ใส่หลุมละ 80 µl จุดเชื้อจากข้อ 4.1 ใส่ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 100 µl เขย่าให้เข้ากันบ่มที่สถานะเดียวกันนาน 24 ชั่วโมง

การอ่านผล บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด ที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเปลี่ยนสี resazurin (สีน้ำเงิน) เป็น resorufin (สีชมพู)

ในการทดสอบหาค่า MIC positive control จะเป็นยา penicillin G และ chlorhexidine ส่วน negative control จะเป็น 1% DMSO กับเชื้อแบคทีเรีย

4.4 การทดสอบหาค่า MBC

จุดเชื้อจากทุกหลุมที่ไม่เปลี่ยนสี resazurin จากการทดสอบหาค่า MIC มา 10 µl หยดลงบนอาหาร BA นำไปบ่มที่สถานะเดียวกัน

การอ่านผล บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด ที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MBC

หาค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ของสารสกัด, rhodomyrone, chlorhexidine และ penicillin G ซึ่ง MIC₅₀ คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 50% ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ และ MIC₉₀ คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 90% ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ

5. การทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อของสารสกัดจากใบกระทุงโดยวิธี Time-Kill Study (Lorian, 1991)

5.1 การเตรียมเชื้อ

เตรียมเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 4.1

5.2 การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ คือ 1/2MIC, MIC, 2MIC และ 4MIC

5.3 การทดสอบ

ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 500 μ l ใส่ในหลอดทดลองที่มี BHI broth อยู่ 2 ml เดิมเชื้อจากข้อ 5.1 ปริมาตร 2.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นับจำนวนโคโลนีที่เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง โดยเมื่อครบกำหนดเวลาจะดูมาเจือจางในอัตราส่วน 1:10 กับ 0.85% NSS ทำการ drop plate ลงบนอาหาร BA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นาน 24-48 ชั่วโมง และใช้ chlorhexidine เป็น positive control

5.4 การวิเคราะห์ผล

นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วง 5-25 โคโลนี เขียนกราฟระหว่าง log จำนวนโคโลนีกับเวลา

6. การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *S. mutans* ที่สร้าง biofilm (StepanoviĆ, et al., 2000, Merritt, et al., 2005)

6.1 การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร BA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นาน 24-48 ชั่วโมง เลือกเชื้อมา 3-5 colony เลี้ยงในอาหาร BHI ที่เติม 0.25% sucrose (SBHI) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland no. 0.5 หลังจากนั้นนำไปเจือจางให้มีเชื้อประมาณ 1.0×10^6 CFU/ml ด้วย SBHI broth

6.2 การทดสอบ

ดูดเชื้อจากข้อ 6.1 มา 100 μ l ใส่ลงใน 96- well microtiter plate ที่มี SBHI หลุมละ 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย 200 μ l phosphate buffer solution (PBS pH 7.2) 2 ครั้ง เขย่า microtiter plate เพื่อเอาแบคทีเรียที่ไม่มีการเกาะติดออก ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เติม 1% crystal violet 200 μ l ทิ้งไว้ 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำ 4 ครั้งและทิ้งไว้

8. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทูต่อเชื้อ *S. mutans* ที่อยู่ภายใน biofilm (Saising, *et al.*, 2011)

8.1 การเตรียมเชื้อ

เตรียมเชื้อเหมือนข้อ 6.1

8.2 การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดจาก stock solution เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ คือ MIC, 2MIC, 4MIC, 8MIC, 16MIC, 32MIC และ 64MIC

8.3 การทดสอบ

ดูดเชื้อจากข้อ 8.1 มา 100 μ l ใส่ลงใน microtiter plate ที่มี SBHI อยู่ 100 μ l บ่มที่สภาวะเดียวกัน นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้าง biofilm หลังจากครบกำหนดเวลาเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออกล้างด้วย PBS 2 ครั้ง เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อ 180 μ l และสารสกัดในแต่ละความเข้มข้นหลุมละ 20 μ l บ่มที่สภาวะเดียวกัน นาน 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง เติม SBHI หลุมละ 200 μ l และเติม 0.25% rezasurin หลุมละ 20 μ l นำไปบ่ม 1-2 ชั่วโมง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 570 nm และ 600 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมี 1% DMSO แทนสารสกัด และใช้ chlorhexidine เป็น positive control

8.4 การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดภายใน biofilm เมื่อทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับชุดควบคุม โดยใช้ one-way ANOVA ($P < 0.05$)

8.5 การดูลักษณะของเชื้อที่อยู่ภายใน biofilm บนผิวแก้วโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy: SEM)

การทดสอบ

ดูดเชื้อใส่ใน microtiter plate แบบ 6 หลุมที่มีแผ่นแก้วอยู่ในหลุม เพื่อให้เชื้อสร้าง biofilm บน แผ่นแก้ว เติมหาอาหาร SBHI นำไปบ่มที่สภาวะเดียวกันนาน 24 ชั่วโมง หลังจากบ่มล้างด้วย PBS 2 ครั้ง เติมสารสกัดแต่ละความเข้มข้นและเติมหาอาหารลงไป บ่มที่สภาวะเดียวกัน นาน 24 ชั่วโมง นำ disc มาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง fix ด้วย 2% glutaraldehyde ใน PBS นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และ post-fixed ใน 4% osmium tetroxide ใน PBS นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำตัวอย่างไปเอาน้ำออก (dehydrate) ด้วย ethanol ความเข้มข้นแตกต่างกัน (50–100 %) ติดบน aluminium ทำให้แห้ง และ coat ด้วยทองคำ จากนั้นนำตัวอย่างไปดูภายใต้กล้อง SEM

9. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทู้ต่อการสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans* (Song, et al., 2006)

9.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *S. mutans* ที่สร้างกรดมากที่สุด

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร BA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นาน 24-48 ชั่วโมง เลือกเชื้อมา 3-5 colony เลี้ยงในอาหาร SBHI บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่า pH ด้วย pH meter

9.2 การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร BA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นาน 24-48 ชั่วโมง เลือกเชื้อมา 3-5 colony เลี้ยงในอาหาร BHI บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นาน 12 ชั่วโมง (log phase) ทำการเก็บเซลล์ โดยการนำไปหมุนเหวี่ยง (4,000 x g นาน 5 นาที) นำเซลล์ที่ได้ล้างด้วย 2 mM salt solution ที่มี 150 mM potassium chloride (KCl) และ 5 mM magnesium chloride (MgCl₂) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 550 nm ให้มีค่า OD = 1.22

9.3 การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดจาก stock solution เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ คือ MIC, 2MIC, 4MIC และ 8MIC

9.4 การทดสอบ

นำเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 9.1 มา 1 ml ผสมกับสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาณ 1 ml และเติม 2% glucose 2 ml เติม 0.01 M potassium hydroxide (KOH) เพื่อปรับให้ pH เท่ากับ 7.2-7.4 ปฏิกิริยาจะเริ่มตั้งแต่มีการผสมสารสกัดและ glucose จึงติดตามการลดลงของกรด โดยใช้ pH meter ภายในช่วงเวลา 30 นาที และใช้ chlorhexidine เป็น positive control

9.4 การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ค่า pH ที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาเวลาเมื่อทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับชุดควบคุม โดยใช้ one-way ANOVA ($P < 0.05$)

9.5 การนับจำนวนเชื้อ

นับจำนวนเชื้อหลังจากเติมสารเพื่อดูว่าสารมีผลในการฆ่าเชื้อด้วยหรือไม่ โดยนับจำนวนโคโลนีที่เวลา 0 และ 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาจะดูมาเจือจางในอัตราส่วน 1:10 กับ 0.85% NSS ทำการ drop plate ลงบนอาหาร BA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นาน 24-48 ชั่วโมง และใช้ chlorhexidine เป็น positive control

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทู้ต่อการต้านเชื้อ *S. mutans* โดยวิธี disc diffusion

จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากใบกระทู้ในการต้านเชื้อ *S. mutans* (Table 1) พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลและอะซิโตนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ 80 % และ 90 % ตามลำดับ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ระหว่าง 7-14 mm และเมื่อทดสอบกับสายพันธุ์มาตรฐาน *S. mutans* ATCC 25175 ขนาดของ inhibition zone มีค่าเท่ากับ 11.6 และ 10 mm ตามลำดับ และจากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียพบว่า ทุกสายพันธุ์ไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ

Table 1: Inhibitory effects of *Rhodomyrtus tomentosa* leaf extract on *Streptococcus mutans* isolates (n=10) by agar disc diffusion method

Range of the zone of inhibition (mm)	Numbers of isolates (%)	
	Ethanol extract	Acetone extract
≤ 6	2 (20)	1 (10)
7-10	7 (70)	8 (80)
11-14	1 (10)	1 (10)

S. mutans ATCC 25175: Inhibition zone were 11.6 and 10.0 mm, respectively.

Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as negative control.

Diameter of paper disk is 6 mm.

100% of the isolates were susceptible to test antibiotics.

2. ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MBC โดยวิธี broth microdilution

จากการทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดจากใบกระทุง (Table 2) พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 32->1,024 $\mu\text{g/ml}$ และสารสกัดด้วยอะซิโตนให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 16-64 $\mu\text{g/ml}$ โดยสารสกัดด้วยเอทานอลมีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากับ 128 $\mu\text{g/ml}$ และ 1,024 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดด้วยอะซิโตน, chlorhexidine และยา penicillin G มีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากัน คือ 32 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.0156 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สำหรับ *S. mutans* ATCC 25175 ค่า MIC ของสารสกัดทั้งสองชนิด chlorhexidine และ penicillin G มีค่าเท่ากับ 64, 32, 0.5 และ 0.0156 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

Table 2: The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of the extract from *Rhodomyrtus tomentosa* against clinical isolates of *Streptococcus mutans* (n=10)

Antibacterial agents	Clinical isolates of <i>S. mutans</i>		MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MBC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC/MBC of <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ($\mu\text{g/ml}$)
	MIC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	MIC_{90} ($\mu\text{g/ml}$)			
	Ethanol extract	128	1,024	32->1,024	128->1,024
Acetone extract	32	32	16-64	32-256	32/64
Chlorhexidine	0.5	0.5	0.25-1	0.5-2	0.5/1
Penicillin G	0.0156	0.0156	0.0156-0.0156	0.0156-0.0312	0.0156-0.0156

MIC_{50} = Minimum Inhibitory Concentration required to inhibit the growth of 50% of organisms.

MIC_{90} = Minimum Inhibitory Concentration required to inhibit the growth of 90% of organisms.

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของสารสกัดจากไบโกระทุต่อเชื้อ *S. mutans* โดยวิธี Time-Kill Study

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากไบโกระทุต่อเชื้อ *S. mutans* จำนวน 4 สายพันธุ์ และ *S. mutans* ATCC 25175 โดยวิธี Time-kill study พบว่าสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 4MIC สามารถลดเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ (Figure 11a-14a) ลงได้อย่างน้อย 2 log เมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้นภายในเวลา 24 ชั่วโมง และให้ผลเช่นเดียวกันเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดด้วยอะซิโตนในสายพันธุ์ NPRC 806 และ NPRC 810 (Figure 3b และ 4b) ยกเว้นสายพันธุ์ NPRC 801 และ NPRC 803 (Figure 11b และ 12b) ที่ความเข้มข้น 2MIC และ 4MIC สารสกัดด้วยอะซิโตนสามารถลดเชื้อลงได้อย่างน้อย 2 log ภายในเวลา 20-24 ชั่วโมง ส่วน chlorhexidine ที่ความเข้มข้น 2MIC และ 4MIC สามารถลดเชื้อสายพันธุ์ NPRC 801, NPRC 803 และ NPRC 810 (Figure 11c, 12c และ 14c) ลงได้อย่างน้อย 2 log ภายใน 12 ชั่วโมง ยกเว้นสายพันธุ์ NPRC 806 chlorhexidine ที่ความเข้มข้นเดียวกันสามารถลดเชื้อลงได้อย่างน้อย 2 log ภายในเวลา 20-24 ชั่วโมง

ผลของสารสกัดจากไบโกระทุต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล (Figure 15a) ที่ความเข้มข้น 4MIC สามารถลดเชื้อลงได้อย่างน้อย 2 log ภายในเวลา 20-24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น ส่วนสารสกัดด้วยอะซิโตนที่ความเข้มข้น 2MIC และ 4MIC สามารถลดเชื้อลงได้อย่างน้อย 2 log ภายในเวลา 16-24 ชั่วโมง สำหรับ chlorhexidine ที่ความเข้มข้น 2MIC และ 4MIC สามารถลดเชื้อลงได้อย่างน้อย 2 log ภายในเวลา 16 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ

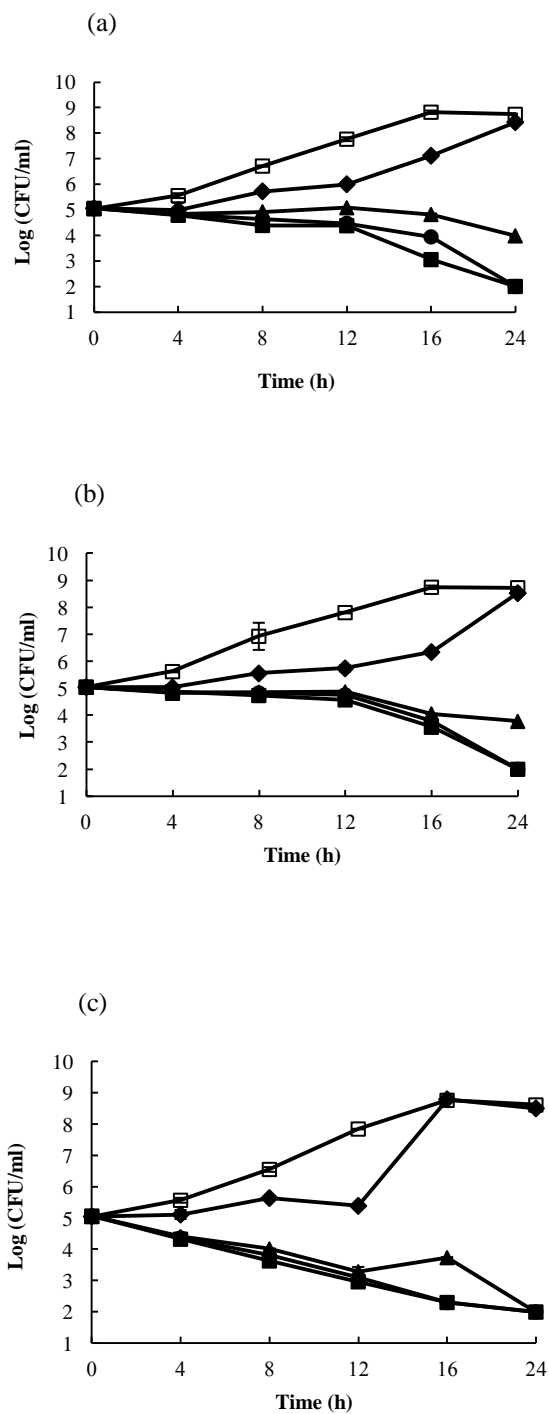


Figure 11: Time-kill curves of *Streptococcus mutans* NPRC 801 after treatment with ethanol extract, MIC = 128 $\mu\text{g/ml}$ (a), acetone extract, MIC = 32 $\mu\text{g/ml}$ (b), from *Rhodomyrtus tomentosa*, and chlorhexidine, MIC = 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (c). 1/2MIC (\blacklozenge), MIC (\blacktriangle), 2MIC (\bullet), 4MIC (\blacksquare), and control (\square).

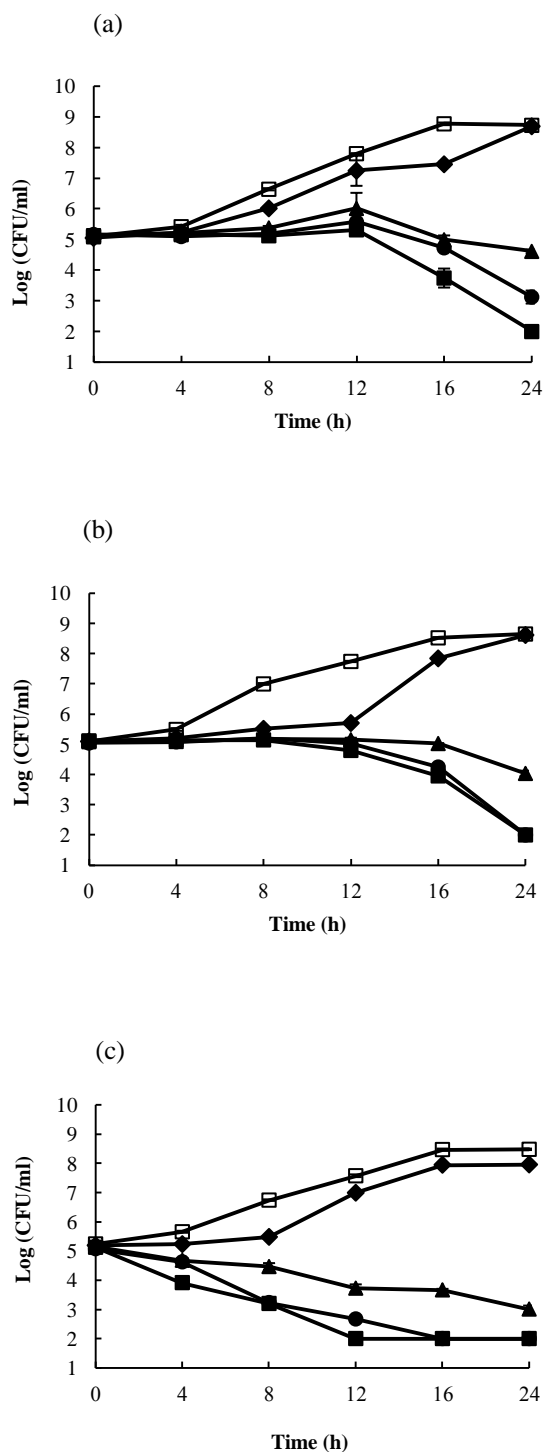


Figure 12: Time-kill curves of *Streptococcus mutans* NRC 803 after treatment with ethanol extract, MIC= 32 $\mu\text{g/ml}$ (a), acetone extract, MIC = 16 $\mu\text{g/ml}$ (b), from *Rhodomyrtus tomentosa*, and chlorhexidine, MIC = 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (c). 1/2MIC (\blacklozenge), MIC (\blacktriangle), 2MIC (\bullet), 4MIC (\blacksquare), and control (\square).

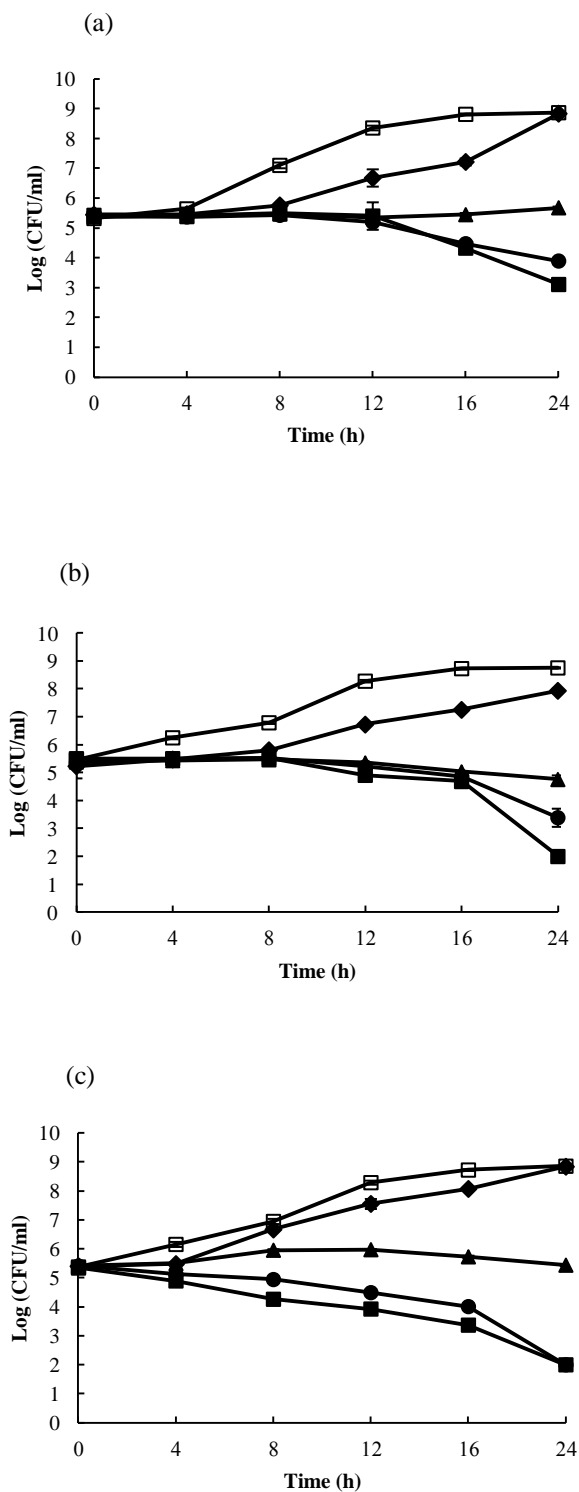


Figure 13: Time-kill curves of *Streptococcus mutans* NPRC 806 after treatment with ethanol extract, MIC= 64 $\mu\text{g/ml}$ (a), acetone extract, MIC = 16 $\mu\text{g/ml}$ (b), from *Rhodomyrtus tomentosa*, and chlorhexidine, MIC = 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (c). 1/2MIC (\blacklozenge), MIC (\blacktriangle), 2MIC (\bullet), 4MIC (\blacksquare), and control (\square).

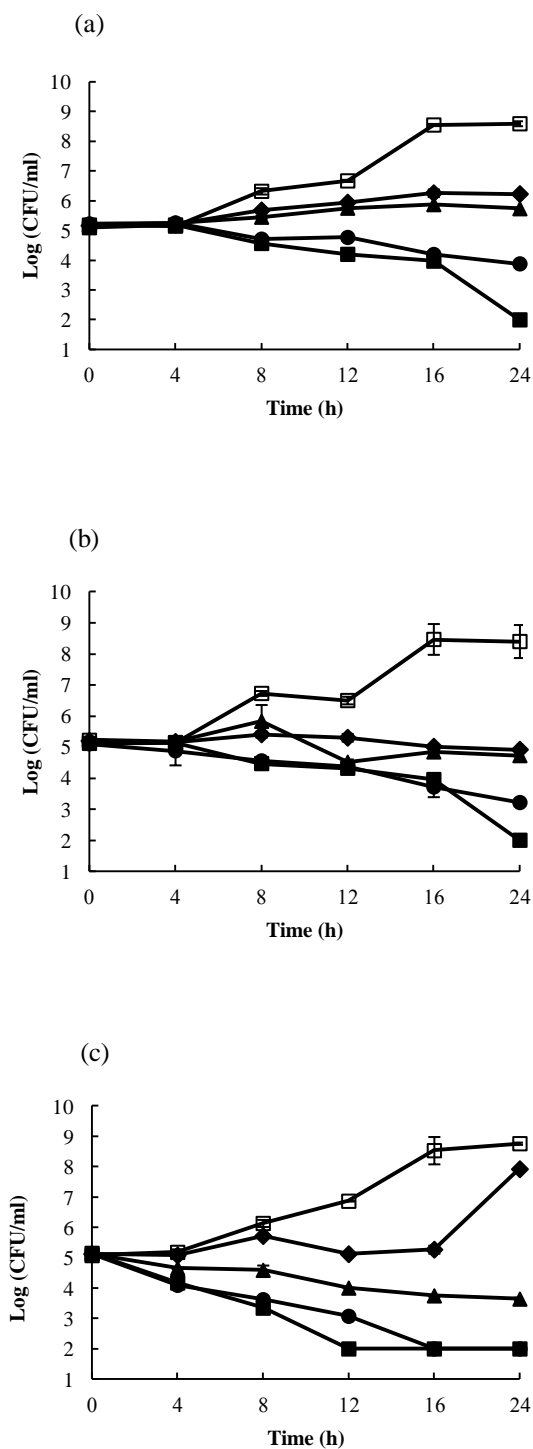


Figure 14: Time-kill curves of *Streptococcus mutans* NPRC 810 after treatment with ethanol extract, MIC= 64 $\mu\text{g/ml}$ (a), acetone extract, MIC = 16 $\mu\text{g/ml}$ (b), from *Rhodomyrtus tomentosa*, and chlorhexidine, MIC = 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (c). 1/2MIC (\blacklozenge), MIC (\blacktriangle), 2MIC (\bullet), 4MIC (\blacksquare), and control (\square).

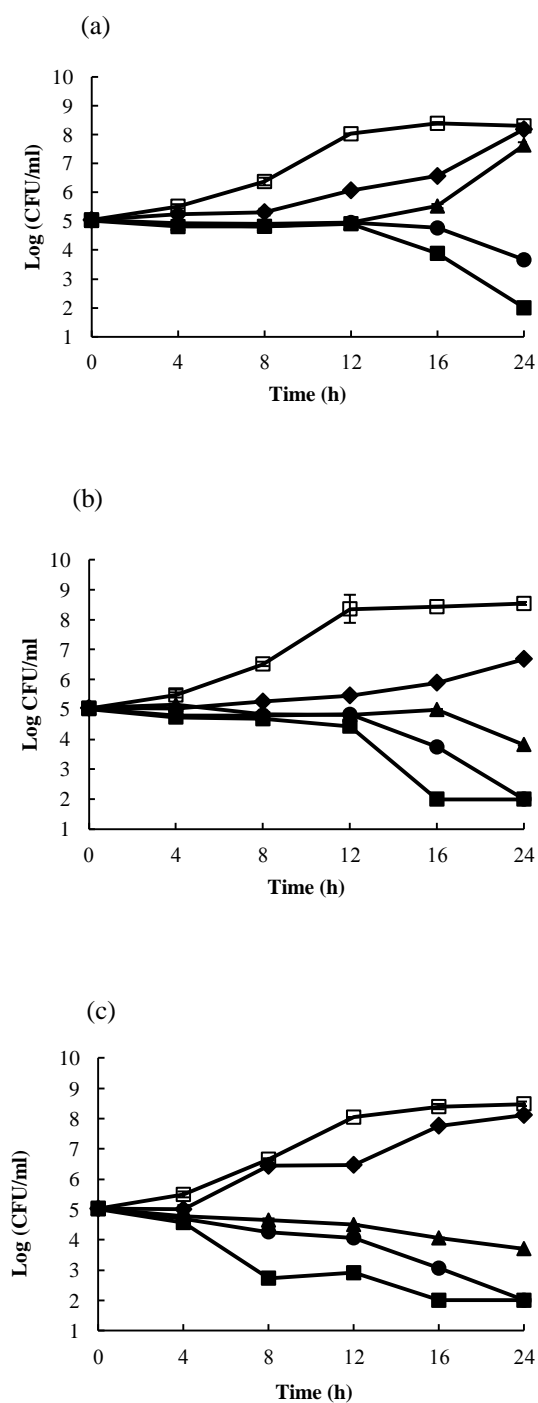


Figure 15: Time-kill curves of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 after treatment with ethanol extract, MIC = 64 µg/ml (a), acetone extract, MIC = 32 µg/ml (b), from *Rhodomyrtus tomentosa*, and chlorhexidine, MIC = 0.5 µg/ml (c). 1/2MIC (◆), MIC (▲), 2MIC (●), 4MIC (■), and control (□).

4. ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *S. mutans* ที่สร้าง biofilm

จากการทดสอบหาเชื้อที่สามารถสร้าง biofilm ได้ จากเชื้อ *S. mutans* จำนวน 10 สายพันธุ์ (Table 3) โดยแบ่งเชื้อเป็น 4 กลุ่มตามระดับการเกาะติด คือ ไม่มีการเกาะติด เกาะติดน้อย เกาะติดปานกลาง และเกาะติดมาก พบว่าทุกสายพันธุ์สร้าง biofilm อยู่ในระดับการเกาะติดมาก (100%) ส่วน *S. mutans* ATCC 25175 มีระดับการเกาะติดน้อย (Figure 16)

Table 3: Adherence of *Streptococcus mutans* isolates (n=10) in the microtiter plate by crystal violet staining of potential biofilms and measuring absorbance at 590 nm.

Classified	Isolates (%)
non-adherent	0 (0)
weakly adherent	0 (0)
moderately adherent	0 (0)
strongly adherent	10 (100%)

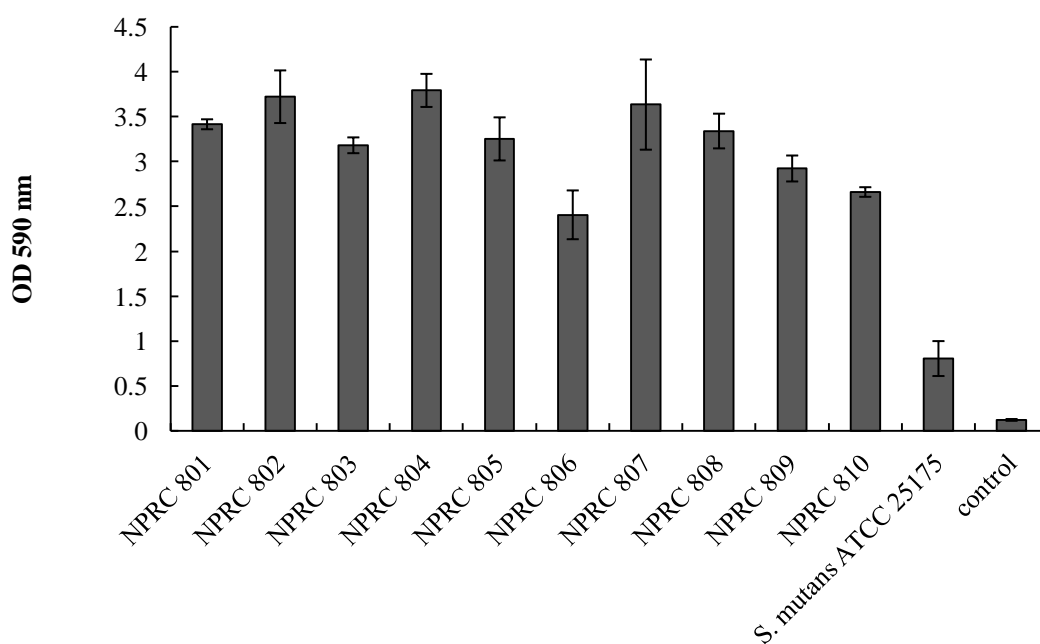


Figure 16: Screening for biofilm formation of *Streptococcus mutans* isolates (NPRC 801-810) to 96-well microtiter plate by crystal violet staining of potential biofilms and measuring absorbance at 590 nm.

5. ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทูต่อการสร้าง biofilm ของเชื้อ *S. mutans*

จากการคัดเลือกเชื้อ *S. mutans* ที่สามารถสร้าง biofilm ได้ พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถสร้าง biofilm ในระดับที่มีการเกาะติดสูง (strongly adherent) จึงนำทั้ง 10 สายพันธุ์ มาทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทูที่ความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC และ 1/16MIC ต่อการเจริญเติบโต (Table 4) และการสร้าง biofilm (Table 5)

จากการทดลองพบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/2MIC มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($P < 0.05$) จำนวน 9 สายพันธุ์ รวมทั้งสายพันธุ์มาตรฐาน *S. mutans* ATCC 25175 ยกเว้นสายพันธุ์ NPRC 808 ส่วนที่ความเข้มข้น 1/4MIC มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ 2 สายพันธุ์ คือ NPRC 801 และ NPRC 804 สำหรับ chlorhexidine ที่ความเข้มข้น 1/2MIC สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ NPRC 801, NPRC 802, NPRC 805 และ NPRC 807 รวมทั้งสายพันธุ์มาตรฐานด้วย ดังนั้นที่ความเข้มข้นที่มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ จะไม่ใช่ทดสอบดูผลการยับยั้งการสร้าง biofilm ของสารทั้ง 2 ชนิด

ผลการยับยั้งการสร้าง biofilm ของสารสกัดด้วยอะซิโตนจากใบกระทู พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการสร้าง biofilm อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุมได้ทุกสายพันธุ์รวมทั้งสายพันธุ์มาตรฐาน ในขณะที่เดียวกัน chlorhexidine สามารถยับยั้งการสร้าง biofilm ได้อย่างมีนัยสำคัญเพียง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ NPRC 801, NPRC 803, NPRC 805, NPRC 807 และ NPRC 810 รวมทั้งสายพันธุ์มาตรฐาน (Table 5)

Table 4: Effects of sub-inhibitory concentrations of acetone extract from *Rhodomyrtus tomentosa* and chlorhexidine on the growth of *Streptococcus mutans* at 24h. The bacterial growth was quantified by measuring absorbance at 600 nm. The results showed a significant difference between the tests and the control ($*P < 0.05$).

Isolates	Agents	Growth (%)			
		1/2MIC	1/4MIC	1/8MIC	1/16MIC
NPRC 801	A	51.7±7.0*	73.6±12.0*	87.1±13.2	106.0±7.1
	C	65.9±4.3*	81.9±2.7	84.4±4.4	87.3±4.2
NPRC 802	A	70.0±2.5*	93.2±11.2	90.8±8.9	98.1±7.3
	C	77.2±7.8*	87.6±13.7	86.3±11.9	90.9±9.3
NPRC 803	A	66.8±2.5*	90.7±11.8	93.2±3.5	96.8±0.9
	C	85.5±13.4	94.0±6.8	91.8±13.1	97.1±4.7
NPRC 804	A	67.9±5.6*	74.9±11.2*	93.1±11.1	105.8±5.6
	C	85.7±3.3	91.7±3.8	91.8±4.1	95.7±6.1
NPRC 805	A	57.9±9.4*	85.4±5.1	89.6±11.3	93.8±2.3
	C	75.7±6.0*	83.6±9.1	85.1±5.0	94.4±8.8
NPRC 806	A	47.4±10.9*	83.6±0.9	101.0±5.5	107.1±6.3
	C	87.5±9.0	85.2±10.1	90.5±4.8	93.5±4.9
NPRC 807	A	46.8±2.4*	81.4±11.3	91.9±9.1	105.2±4.7
	C	72.9±0.5*	89.4±4.2	86.4±5.4	89.2±9.4
NPRC 808	A	82.0±6.5	89.7±9.8	97.7±11.4	96.6±8.7
	C	91.4±12.7	93.4±7.1	91.7±10.3	103.0±4.8
NPRC 809	A	29.5±5.2*	85.6±10.1	93.3±13.8	100.1±3.7
	C	95.6±10.7	91.9±0.9	90.5±2.5	96.9±5.1
NPRC 810	A	36.8±1.4*	88.3±8.2	83.0±8.6	91.6±5.3
	C	94.2±3.7	97.1±9.2	95.2±8.2	104.6±6.6
ATCC 25175	A	65.5±7.9*	84.4±6.9	93.4±5.2	102.1±3.5
	C	45.9±2.9*	91.2±7.3	89.9±6.8	101.5±3.7

A, acetone extract; C, chlorhexidine

NPRC 802, 803, 806 and 810: MIC value=16 µg/ml

ATCC 25175, NPRC 801, 804, 807, 808 and 809: MIC value=32 µg/ml

NPRC 805: MIC value=64 µg/ml

Table 5: Effects of sub-inhibitory concentrations of acetone extract from *Rhodomyrtus tomentosa* and chlorhexidine on the biofilm formation by *Streptococcus mutans* at 24 h. The biofilm formation was quantified by crystal violet staining and measuring absorbance at 590 nm. The results showed a significant difference between the tests and the control ($*P < 0.05$).

Isolates	Agents	Biofilm formation (%)			
		1/2MIC	1/4MIC	1/8MIC	1/16MIC
NPRC 801	A	66.1±5.2*	75.6±11.5*	75.1±12.7*	89.9±10.4
	C	77.7±13.6*	75.8±5.4*	83.3±7.2	84.1±9.3
NPRC 802	A	69.6±2.5*	77.3±10.3*	77.9±8.1*	84.0±4.4
	C	78.2±8.4*	92.6±7.3	91.4±11.1	100.3±4.3
NPRC 803	A	70.4±1.8*	71.6±6.9*	86.4±5.8	86.4±2.0
	C	78.7±3.8*	81.6±9.8	81.5±12.6	87.9±5.0
NPRC 804	A	57.6±4.9*	72.1±2.6*	78.6±0.4*	83.6±2.4
	C	86.2±4.8	85.6±3.8	90.8±9.7	89.0±7.7
NPRC 805	A	65.8±8.8*	71.8±7.9*	77.8±2.1*	82.2±8.5
	C	74.1±8.0*	79.8±4.5*	83.9±4.3	84.1±6.5
NPRC 806	A	63.8±13.1*	73.2±7.7*	80.1±5.0*	82.0±2.3
	C	82.1±10.0	81.3±12.8	82.2±6.6	84.8±13.7
NPRC 807	A	58.8±10.7*	76.9±2.5*	83.0±2.9	85.6±5.2
	C	48.6±6.4*	76.4±0.5*	88.2±4.2	92.1±10.7
NPRC 808	A	61.1±10.3*	72.5±8.4*	83.2±5.8	89.0±1.5
	C	82.4±0.4	91.9±6.1	91.5±5.0	97.6±7.8
NPRC 809	A	20.3±5.7*	60.6±10.7*	76.8±4.4*	87.9±12.5
	C	84.8±9.2	86.1±3.5	87.4±5.1	91.1±1.8
NPRC 810	A	59.6±3.9*	70.3±8.5*	89.1±6.5	97.9±10.7
	C	71.3±7.1*	71.6±5.9*	71.7±5.2*	76.2±7.2*
ATCC 25175	A	29.9±0.1*	57.2±1.5*	66.7±2.2*	74.8±1.5*
	C	25.1±0.5*	39.2±3.0*	46.3±2.2*	47.8±2.9*

A, acetone extract; C, chlorhexidine

NPRC 802, 803, 806 and 810: MIC value=16 µg/ml

ATCC 25175, NPRC 801, 804, 807, 808 and 809: MICvalue-32 µg/ml

NPRC 805: MIC value-64 µg/ml

6. ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทูต่อ biofilm ของเชื้อ *S. mutans*

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยอะซิโตนจากใบกระทูต่อเชื้อ *S. mutans* ที่อยู่ภายใน biofilm อายุ 24 ชั่วโมง (Table 6) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น เชื้อที่อยู่ภายใน biofilm จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($P < 0.05$) โดยสารสกัดสามารถลดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อได้ทุกสายพันธุ์ รวมทั้งสายพันธุ์มาตรฐาน *S. mutans* ATCC 25175 และยังพบว่าสารสกัดทุกความเข้มข้น (MIC-64MIC) สามารถลดการรอดชีวิตของเชื้อได้ 8 สายพันธุ์ ยกเว้นสายพันธุ์ NPRC 807 และ NPRC 810 โดยเฉพาะสายพันธุ์ NPRC 807 มีเพียงความเข้มข้นที่ 32MIC และ 64MIC ที่เชื้อมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง ส่วน chlorhexidine ส่วนใหญ่มีเพียงความเข้มข้นที่ 64 MIC เท่านั้นที่มีผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญในทุกสายพันธุ์

6.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทูต่อ biofilm ของเชื้อ *S. mutans* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

โครงสร้าง biofilm ของเชื้อ *S. mutans* NPRC 804 อายุ 24 ชั่วโมง เมื่อถูกใส่สารสกัดด้วยอะซิโตนจากใบกระทู (Figure 17c, 17d) ที่ความเข้มข้น 64MIC สังเกตเห็นว่าปริมาณเชื้อลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Figure 17a, 17b) ซึ่งจะเห็นว่าในชุดควบคุมมีกัลดูแคนที่ทำให้เชื้อเกาะติดเป็นจำนวนมากและมีความหนา โดยกัลดูแคนจะถูกทำลายลงเมื่อ biofilm ถูกใส่ chlorhexidine (Figure 17e, 17f) และสารสกัด เป็นผลให้เชื้อที่เกาะติดอยู่หลุดออกไปด้วย

Table 6: Effects of acetone extract from *Rhodomyrtus tomentosa* (MIC=16-64 µg/ml) and chlorhexidine (MIC=0.25-0.5 µg/ml) on 24 h old biofilm of *Streptococcus mutans* (n=10). The biofilm was quantified by rezasurin and measuring absorbance at 570 and 600 nm. The results showed a significant difference between the tests and the control (* $P < 0.05$).

Isolates	Agents	viability (%)						
		MIC	2MIC	4MIC	8MIC	16MIC	32MIC	64MIC
NPRC 801	A	74.2±6.2*	73.0±11.9*	67.0±7.8*	54.6±12.8*	50.3±6.9*	40.2±3.9*	38.8±2.9*
	C	99.4±5.7	99.7±7.3	100.9±6.2	100.3±10.2	100.7±9.3	100.7±5.5	47.5±6.8*
NPRC 802	A	58.2±2.5*	50.0±5.7*	45.1±2.4*	42.6±2.5*	40.7±7.8*	41.2±6.4*	36.8±0.9*
	C	105.0±0.3	106.7±8.9	102.6±5.8	97.4±4.2	79.2±6.2*	78.9±7.7*	43.8±4.7*
NPRC 803	A	73.1±6.7*	63.9±2.7*	58.1±4.7*	59.0±5.3*	54.3±8.5*	55.1±8.4*	47.2±3.6*
	C	96.1±1.0	96.3±2.1	91.4±3.1	86.4±1.6	86.1±5.9	84.7±0.7	51.9±3.0*
NPRC 804	A	63.2±3.2*	58.1±6.6*	54.1±3.3*	47.3±8.1*	48.3±3.7*	46.3±7.9*	40.2±7.6*
	C	100.8±3.2	100.3±8.1	104.1±3.6	101.3±7.9	103.8±6.6	104.4±7.6	39.5±3.3*
NPRC 805	A	67.5±2.4*	68.5±4.4*	62.3±5.4*	64.3±5.2*	63.5±4.5*	60.4±4.2*	48.2±5.4*
	C	109.8±9.6	90.6±6.6	79.8±2.4*	70.5±2.5*	71.7±3.7*	55.1±10.5*	39.2±0.8*
NPRC 806	A	66.6±2.4*	65.4±2.4*	61.2±7.0*	63.2±0.5*	60.1±1.2*	61.6±2.1*	45.6±3.4*
	C	104.3±2.2	98.3±1.9	102.9±1.9	101.5±8.6	100.0±6.0	87.0±6.2	58.5±6.3*
NPRC 807	A	97.4±4.9	99.4±10.9	84.1±3.8	85.4±2.5	84.8±3.2	77.2±3.5*	78.6±7.2*
	C	104.2±7.2	94.5±1.7	89.0±20.1	90.5±14.9	83.7±7.9	82.5±8.1	34.2±1.1*
NPRC 808	A	58.6±3.4*	55.1±6.5*	51.1±4.0*	49.6±1.8*	42.3±0.4*	42.3±0.7*	45.8±3.5*
	C	102±6.1	94.2±6.3	99.3±6.1	90.0±12.1	89.5±6.0	78.1±5.8*	36.8±2.6*
NPRC 809	A	63.1±5.6*	66.1±13.6*	63.2±12.6*	55.6±1.1*	57.7±6.0*	49.9±4.7*	44.5±6.7*
	C	107.0±1.9	107.2±11.0	105.8±4.1	104.4±9.2	97.3±3.7	68.4±13.4*	35.9±9.0*
NPRC 810	A	83.2±2.5	76.4±4.9*	75.0±7.3*	61.2±4.8*	53.6±4.9*	51.9±10.3*	44.8±1.7*
	C	108.1±9.2	108.1±9.3	102.4±4.2	103.3±9.6	93.9±4.1	90.9±1.5	31.6±3.4*
ATCC 25175	A	81.0±29.7	81.0±14.3	80.5±2.4*	74.2±2.8*	58.3±2.5*	42.8±8.1*	38.3±2.1*
	C	108.5±4.0	105.0±9.4	81.5±1.8*	32.7±14.5*	27.9±9.6*	18.9±1.7*	19.7±3.9*

A, acetone extract; C, chlorhexidine

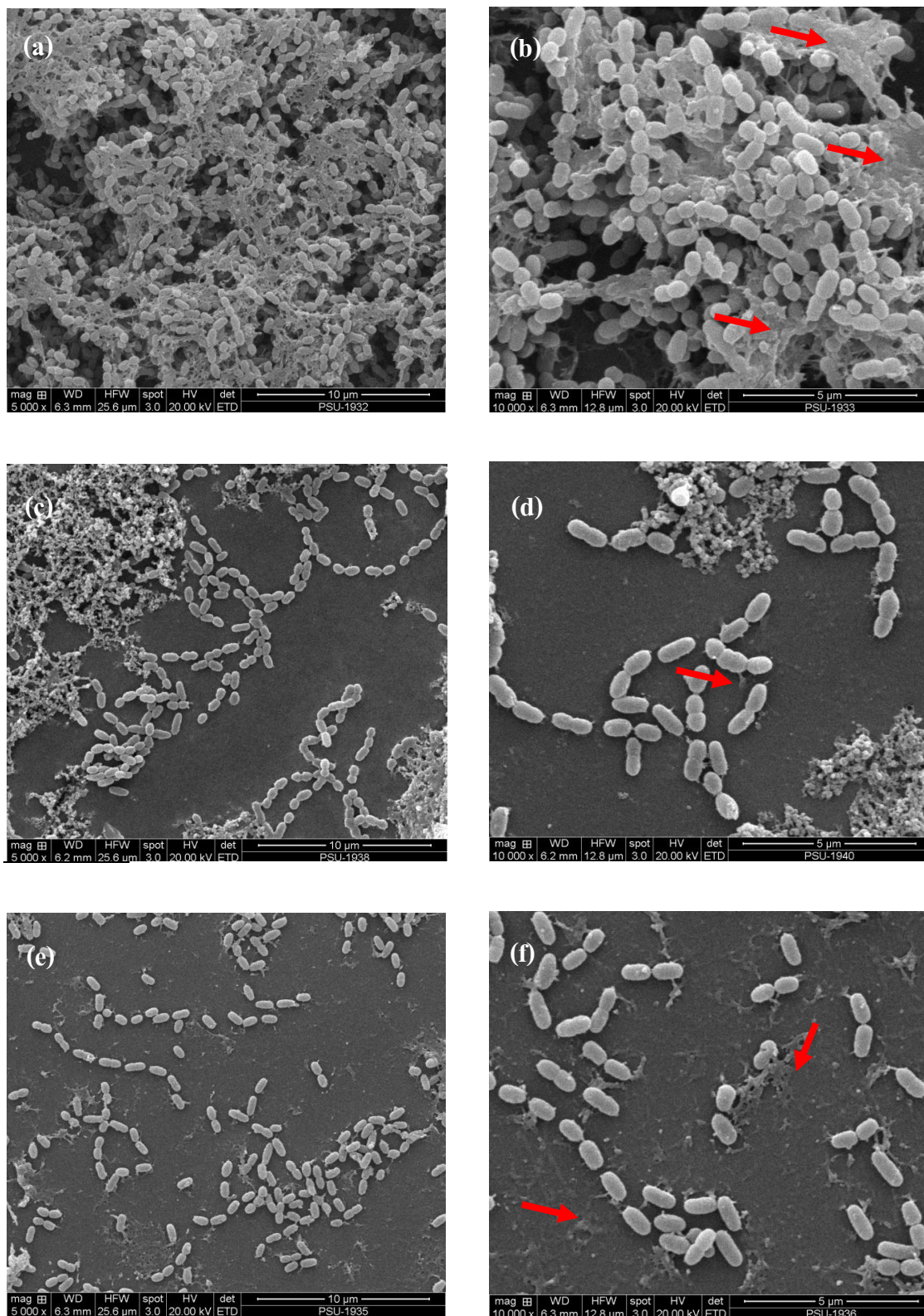


Figure 17: Scanning electron micrographs of *Streptococcus mutans* NPRC 804 after treated with antibacterial agents. (a, b) control; (c, d) 24 h biofilm treated with acetone extract from *Rhodomyrtus tomentosa*; (e, f) 24 h biofilm treated with chlorhexidine.

7. ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากไบโกระทุต่อการสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans*

จากการคัดเลือกเชื้อ *S. mutans* เพื่อหาสายพันธุ์ที่สร้างกรดได้มากที่สุด (Table 7) พบว่า ทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างกรดได้สูง แต่ *S. mutans* NPRC 801 มีค่า pH ต่ำสุด จึงถูกเลือกไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากไบโกระทุต่อการสร้างกรด

ผลการทดลองฤทธิ์ของสารสกัดด้วยอะซิโตนจากไบโกระทุต่อการสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans* NPRC 801 (Figure 18a) พบว่าที่ความเข้มข้น 4MIC และ 8MIC สารสกัดสามารถลดการสร้างกรดลงได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ส่วน chlorhexidine (Figure 18b) ที่ความเข้มข้น 8MIC สารสกัดสามารถลดการสร้างกรดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *S. mutans* ATCC 25175 (Figure 19) พบว่าได้ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน แต่เมื่อนำเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ (Figure 20) ที่ถูกเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 8MIC เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที พบว่าสารสกัดทำให้จำนวนเชื้อลดลง 1log เมื่อเทียบกับจำนวนเชื้อที่เวลา 0 นาที ดังนั้นที่ความเข้มข้น 4MIC เท่านั้นที่สารสกัดจากกระทุสามารถลดปริมาณการสร้างกรดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วน chlorhexidine ที่ความเข้มข้น 8MIC ไม่ทำให้จำนวนเชื้อลดลง

Table 7: Acid production by *Streptococcus mutans* isolates (NPRC 801-810)

after 24 h.

Isolates	pH
NPRC 801	3.71
NPRC 802	3.88
NPRC 803	3.94
NPRC 804	3.80
NPRC 805	3.97
NPRC 806	3.96
NPRC 807	3.91
NPRC 808	3.96
NPRC 809	3.85
NPRC 810	3.89
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	4.11

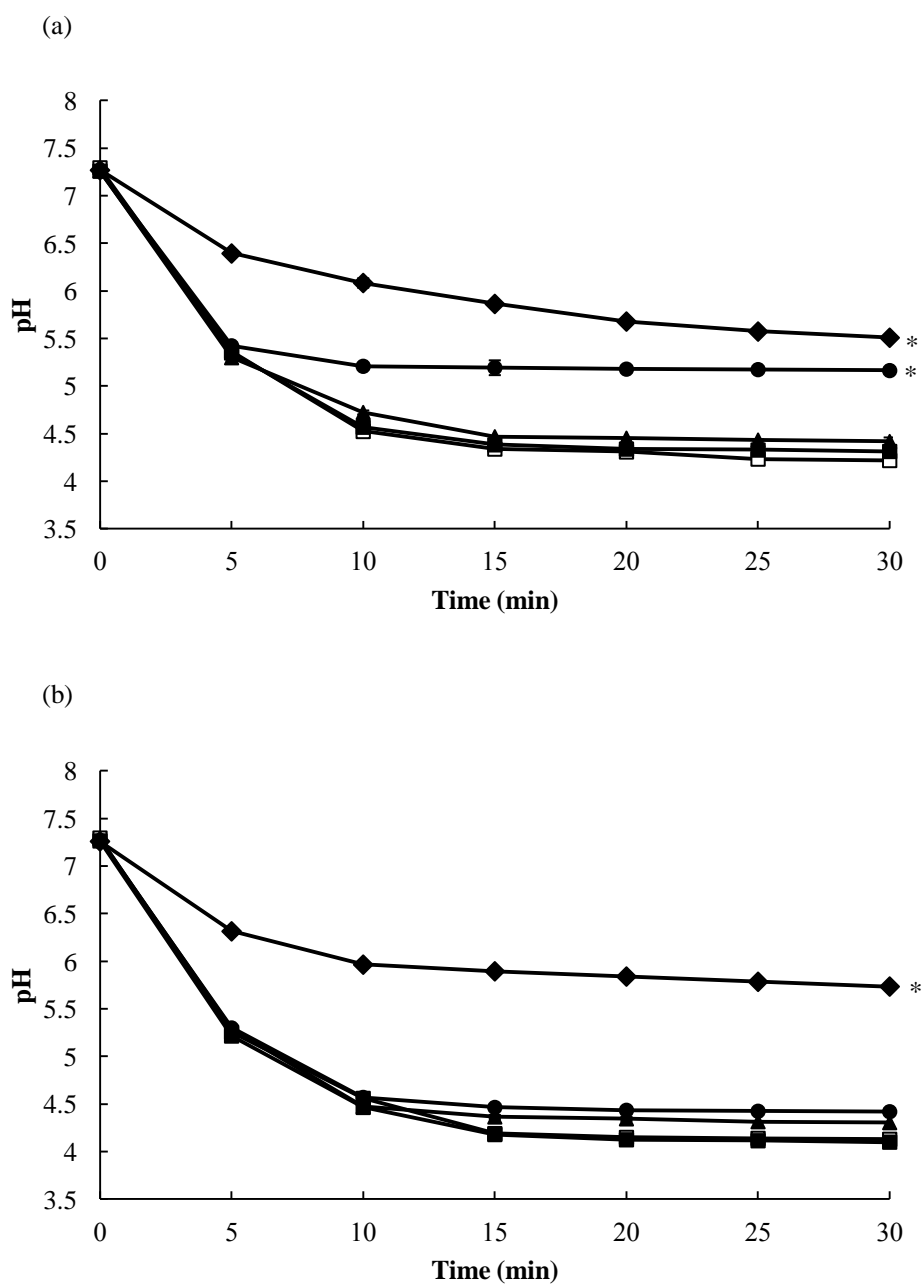


Figure 18: Effects of acetone extract from *Rhodomyrtus tomentosa* (a) and chlorhexidine (b) on acid production by *Streptococcus mutans* NPRC 801 for 30 min incubation. MIC (■), 2MIC (▲), 4MIC (●), 8MIC (◆), and control (□). The results showed a significant difference between the tests and the control (* $P < 0.05$).

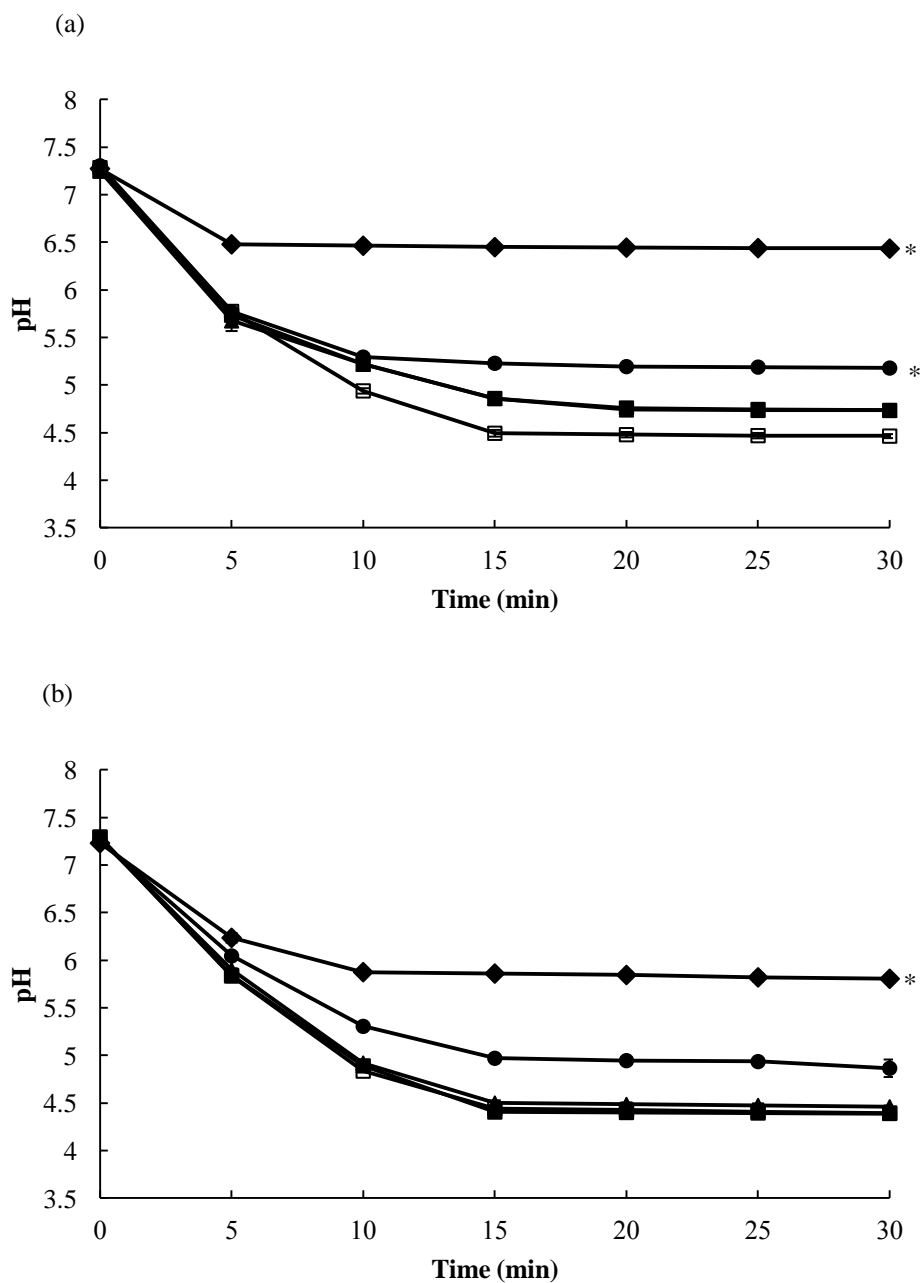


Figure 19: Effects of acetone extract from *Rhodomyrtus tomentosa* (a) and chlorhexidine (b) on acid production by *Streptococcus mutans* ATCC 25175 for 30 min incubation. MIC (■), 2MIC (▲), 4MIC (●), 8MIC (◆), and control (□). The results showed a significant difference between the tests and the control (* $P < 0.05$).

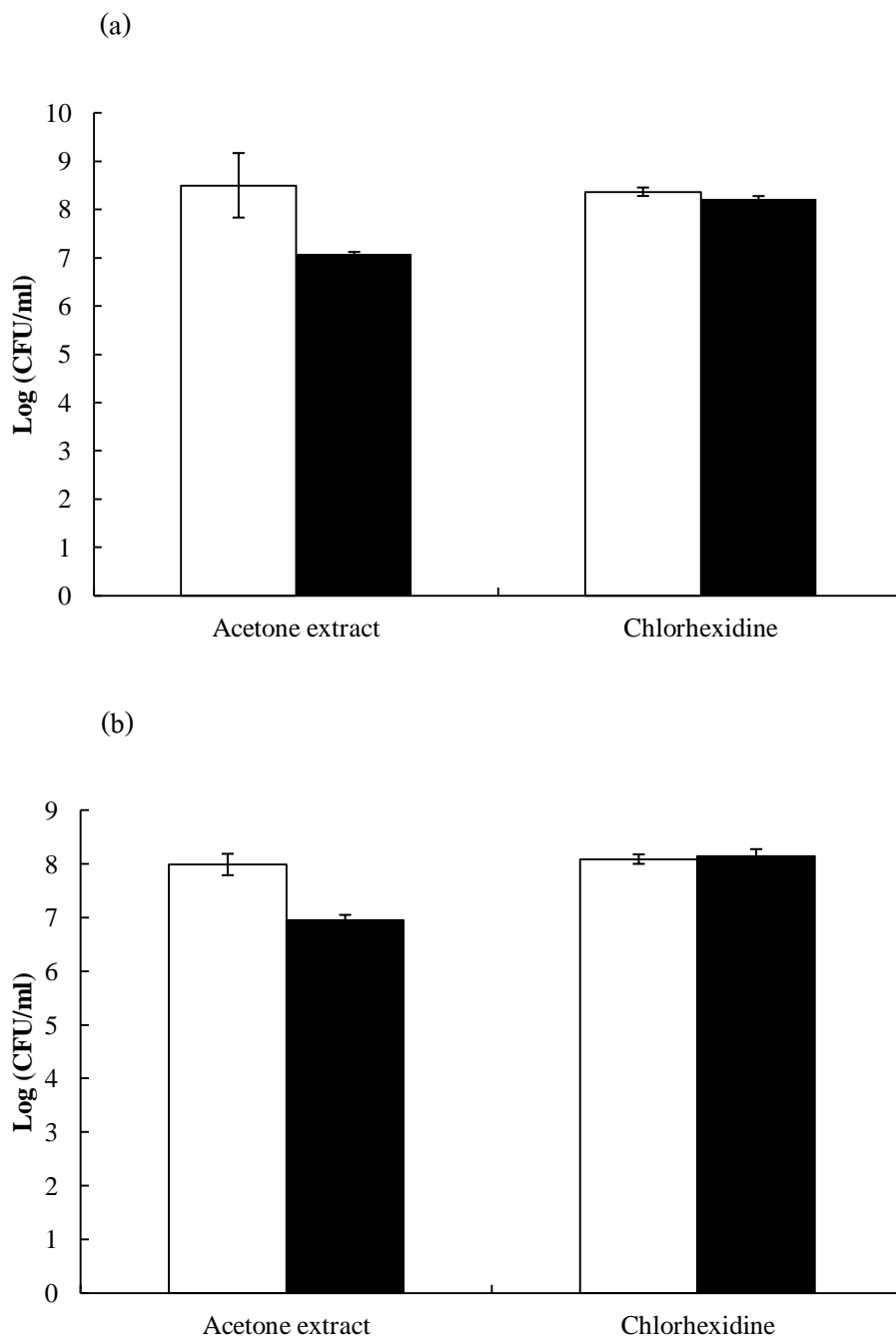


Figure 20: Effects of acetone extract from *Rhodomyrtus tomentosa* and chlorhexidine on the number of viable *Streptococcus mutans* NPRC 801 (a) and *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (b) cells after incubation time 0 min (□) and 30 min (■).

บทที่ 4

วิจารณ์

ช่องปากของมนุษย์เป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์มากกว่า 750 ชนิด ประมาณ 50% สามารถบ่งชี้ได้ว่าเป็นเชื้อชนิดใด โดยเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและก่อให้เกิดโรคในช่องปากได้ เช่น โรคปริทันต์ และโรคฟันผุ (Jenkinson & Lamont, 2005) โดยโรคฟันผุเป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังที่มีสาเหตุหลักมาจากแบคทีเรีย เชื้อแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรคคือ *S. mutans* (Ban, *et al.*, 2010) การป้องกันโรคฟันผุไม่นิยมใช้ยาปฏิชีวนะ เพราะยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ใช้รักษาโรคปริทันต์อักเสบซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมลบ (Roberts & Mullany, 2010) จากการทดสอบความไวของเชื้อ *S. mutans* ต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี disc diffusion พบว่า *S. mutans* ที่แยกได้จากน้ำลายในช่องปากมีความไวต่อยาทุกชนิด (Table 1) และเชื้อไม่ดื้อต่อยา penicillin G (Table 2) ที่ใช้เป็นชุดควบคุม โดยให้ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ เท่ากันคือ 0.0156 µg/ml ซึ่งค่า MIC breakpoint อยู่ที่ 0.12 µg/ml (CLSI, 2009) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ penicillin G ให้ค่า MIC m 0.031 µg/ml (Limsuwan, *et al.*, 2009) การที่เชื้อ *S. mutans* มีความไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิด เนื่องจากไม่มีการใช้ยาในการป้องกันและรักษาโรคฟันผุ แต่มีการใช้สารเคมี เช่น chlorhexidine และ fluoride ในการป้องกันโรคฟันผุ ดังนั้นจากการทดสอบจึงไม่พบเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

การป้องกันการเกิดโรคฟันผุทำได้โดยการควบคุมการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่ผิวฟัน สารเคมีที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากจึงเป็นที่นิยมในการนำมาป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ เช่น chlorhexidine (Sreenivasan & Gaffar, 2002) จากการศึกษาค้นพบว่า chlorhexidine ให้ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ต่เชื้อ *S. mutans* เท่ากันคือ 0.5 µg/ml (Table 2) ซึ่งเชื้อที่ทดสอบทั้งหมดไม่ดื้อต่อ chlorhexidine เพราะค่า MIC breakpoint ของ chlorhexidine ≤ 1 µg/ml (Jarvinen, *et al.*, 1993) แต่จากรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า chlorhexidine มีความเป็นพิษต่อเซลล์ถ้าใช้ในปริมาณมากหรือความเข้มข้นสูง และมีผลข้างเคียง เช่นการติดสีที่ฟัน รสชาติไม่ดีทำให้แสบปากขณะบ้วนปาก (Chang, *et al.*, 2001, Beaudouin, *et al.*, 2004) ปัจจุบันจึงมีการศึกษาสารสกัดจากพืชเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในช่องปากมากขึ้นเพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการต้านเชื้อ *S. mutans* และป้องกันการโรคฟันผุ เช่น น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดจากกระเทียม (Chavan, *et al.*, 2010) และสารสกัดจากพืชสมุนไพรอื่นๆ (Lauten, *et al.*, 2005, Carounanidy, *et al.*, 2007, Haffajee, *et al.*, 2008, Srikanth, *et al.*, 2008) มีรายงาน

การศึกษาพืชหลายชนิด พบว่า มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคฟันผุ เช่น สารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Piper cubeba* มีฤทธิ์ดีในการต้านเชื้อ *Streptococcus salivarius* และ *Streptococcus mitis* โดยให้ค่า MIC = 90-200 µg/ml (Silva, et al., 2007) สารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Aristolochia cymbifera* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* และ *Lactobacillus casei* ที่ MIC = 0.1-4.0 mg/ml (Alviano, et al., 2008) ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทูต่อเชื้อ *S. mutans* ที่แยกได้จากน้ำลายในช่องปากจำนวน 10 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทูให้ค่า MIC₅₀ ที่ 128 µg/ml แต่ให้ค่า MIC₉₀ ที่ 1,024 µg/ml ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดด้วยอะซิโตนที่ให้ค่า MIC อยู่ระหว่าง 16-64 µg/ml MBC อยู่ระหว่าง 32-256 µg/ml และให้ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ เท่ากันคือ 32 µg/ml (Table 2) จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ สารสกัดจากกระทูสามารถต้านเชื้อ *S. mutans* ได้ โดยให้ค่า MIC และ MBC เท่ากัน คือ 62.5 µg/ml ขณะที่ rhodomyrtone ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดใบกระทูพบว่า มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans*, *S. salivarius* และ *Streptococcus gordonii* โดยให้ค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.19-0.39 µg/ml ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าค่า MIC ของ chlorhexidine (Limsuwan, et al., 2009) สารสกัดจากกระทูจึงมีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. mutans* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา time-kill ที่พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* โดยสารสกัดด้วยอะซิโตนสามารถลดเชื้อลงได้อย่างน้อย 2 log ภายในเวลา 20-24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 2MIC และ 4MIC (Figure 11b-14b) ขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลสามารถลดเชื้อลงได้อย่างน้อย 2 log ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 4MIC (Figure 11a-14a) ซึ่งการศึกษา time-kill เป็นการดูปริมาณความเข้มข้นของสารในการฆ่าแบคทีเรียโดยขึ้นกับเวลาและปริมาณความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อก็จะสั้นลง เช่นเดียวกันกับการศึกษา time-kill ของเชื้อ *S. mutans* กับ *Dodonaea viscosa*, *Rheedia brasiliensis* และ *Glycyrrhiza* sp. (Almeida, et al., 2008, Ahn, et al., 2012, Naidoo, et al., 2012) ที่ฤทธิ์การฆ่าเชื้อขึ้นกับความเข้มข้นและเวลา โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้นทำให้เวลาที่ใช้ฆ่าเชื้อสั้นลงไปด้วย

ปัจจัยสำคัญในการก่อโรคฟันผุและโรคอื่นๆ ในช่องปากโดยเฉพาะโรคปริทันต์คือ การก่อคราบจุลินทรีย์ที่ผิวฟันและบริเวณเนื้อเยื่อของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะเป็นปัจจัยแรกที่จะนำไปสู่การเกิดโรคในช่องปาก (Marsh, 2006) มีรายงานการศึกษามากมายยืนยันว่า *S. mutans* เป็นแบคทีเรียชนิดแรกๆ ที่เริ่มสร้างคราบจุลินทรีย์ เนื่องจากเชื้อสร้างเอนไซม์ glucosyltransferase จากการใช้น้ำตาล sucrose เอนไซม์ชนิดนี้จะไปสังเคราะห์ glucan หรือ extracellular polysaccharide มายึดเกาะที่ผิวฟันทำให้ยากแก่การกำจัดออก (Bowen & Koo, 2011) glucan จึงเป็นตัวกลางให้แบคทีเรียชนิดอื่นมายึดเกาะรวมกันเกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ที่มีความหนาและมีจุลินทรีย์ที่หลากหลาย (Colby & Russell, 1997) การยับยั้งการเกาะติดหรือการยับยั้งการสร้าง biofilm จึงเป็นเหตุผลสำคัญในการ

ยับยั้งการเกิดโรคฟันผุ งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกเชื้อ *S. mutans* ที่สร้าง biofilm โดยดูที่ระดับการเกาะติดกับพื้นผิวของ 96-well microtiter plate พบว่าเชื้อสร้าง biofilm ในระดับการเกาะติดมากทุกสายพันธุ์ และจากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากกระทูต่อการสร้าง biofilm พบว่า สารสกัดด้วยอะซิโตนจากกระทูที่ความเข้มข้น sub-MIC สามารถยับยั้งการสร้าง biofilm ของเชื้อ *S. mutans* ได้อย่างมีนัยสำคัญในเชื้อทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรียฟันผุส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปที่การใช้สารสกัดจากพืชในการยับยั้งการเกาะติดและการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *S. mutans* ได้แก่ การใช้สารสกัดด้วยเมทานอลจากพืช *D. crassirhizoma* ที่ความเข้มข้น sub-MIC ในการยับยั้งการเกาะติดและการสร้างเอนไซม์ glucosyltransferase ทำให้สามารถลดการสร้าง glucan ชนิดที่ไม่ละลายน้ำลงได้อย่างมีนัยสำคัญ (Ban, *et al.*, 2012) Xu และคณะได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบชาต่อการสร้าง biofilm พบว่าที่ความเข้มข้น 15.6 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดสามารถยับยั้งการสร้าง biofilm ของเชื้อ *S. mutans* ได้อย่างน้อย 90% (Xu, *et al.*, 2011) ดังนั้นการป้องกันการยึดเกาะของแบคทีเรียกับพื้นผิวซึ่งเป็นระยะเริ่มแรกของการพัฒนา biofilm หรือป้องกันการสังเคราะห์ glucan โดยเอนไซม์ glucosyltransferase จะทำให้แบคทีเรียยึดเกาะพื้นผิวพื้นได้น้อยลง (Palombo, 2011) ส่งผลให้เกิด biofilm หรือ คราบจุลินทรีย์น้อยลงด้วย การยับยั้งการสร้าง biofilm ของสารสกัดจากกระทูอาจจะเป็นผลจากการที่สารสกัดไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์ glucosyltransferase จากการใช้น้ำตาล sucrose ที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อทำให้ glucan ที่สร้างมีปริมาณลดลง จำนวนเชื้อที่เกาะติดจึงลดน้อยลงหรือสารสกัดอาจจะไปยับยั้งการสร้างโปรตีนที่ยึดเกาะกับ glucan (GBPs) ทำให้เชื้อมายึดเกาะ glucan ได้น้อย biofilm จึงค่อนข้างบางไม่หนา อีกทั้งสารสกัดอาจจะไปยับยั้งการสร้าง antigen I/II ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนสำคัญในการก่อรูปเป็นคราบจุลินทรีย์ที่ผิวฟัน จึงทำให้การก่อ biofilm ที่พื้นผิว microtiter plate น้อยตามไปด้วย แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อการสร้าง biofilm ในช่องปากร่วมกันของเชื้อหลายสายพันธุ์พบว่ามีน้อยมากเมื่อเทียบกับการศึกษาในเชื้อชนิดเดียว (Yanti, *et al.*, 2009) เนื่องจากการศึกษา biofilm ของเชื้อหลายสายพันธุ์นั้นมีความเหมาะสมต่อการศึกษากับสารต้าน biofilm มากกว่าเมื่อต้องนำไปใช้รักษาโรคที่เกิดจากคราบจุลินทรีย์ ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ของ panduratin A ที่แยกได้จาก *Kaempferia pandurata* ต่อ biofilm ของเชื้อ *S. mutans*, *Streptococcus sanguis* และ *Actinomyces viscosus* ที่สร้าง biofilm ร่วมกัน เนื่องจากเชื้อทั้ง 3 ชนิด เป็นแบคทีเรียแรกเริ่มที่มีการเกาะติดที่ผิวฟัน พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ panduratin A เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการป้องกันการสร้าง biofilm ก็เพิ่มขึ้นด้วย โดยที่ความเข้มข้น 8 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการสร้าง biofilm ได้มากกว่า 50% ซึ่งให้ผลดีกว่า chlorhexidine ที่ความเข้มข้นเท่ากัน (Yanti, *et al.*, 2009)

เมื่อแบคทีเรียอยู่ในสภาวะ biofilm จะมีความสามารถในการต่อต้านสารต้านจุลินทรีย์มากกว่าสภาวะ planktonic เนื่องจากอาจจะมีการถ่ายโอนยีนคือยาระหว่างแบคทีเรียภายใน biofilm อาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน การทำหน้าที่ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป หากเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวกับเมแทบอลิซึม การเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียอาจลดลงทำให้ความไวต่อสารต้านจุลินทรีย์ลดลง (Li, *et al.*, 2002) และความหนาของ biofilm ยังช่วยป้องกันการผ่านของสารต้านจุลินทรีย์เข้าสู่ภายใน biofilm สารต้านจุลินทรีย์จึงมีผลต่อแบคทีเรียที่อยู่ภายนอก biofilm เท่านั้น หรือสารอาจถูกจับไว้โดยแบคทีเรียภายนอก biofilm ทำให้แบคทีเรียที่อยู่ภายในส่วนลึกของ biofilm ไม่ได้รับสารต้านจุลินทรีย์ (Gilbert, *et al.*, 1997) ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Streptococcus sobrinus* ในสภาวะ biofilm มีค่าการยับยั้งการเจริญของ chlorhexidine และเอมีนฟลูออไรด์สูงกว่าในสภาวะ planktonic ถึง 300 และ 75 เท่า ตามลำดับ (Shani, *et al.*, 2000) ในการกำจัด biofilm ของเชื้อ *Streptococcus sanguis* ต้องใช้ความเข้มข้นของ chlorhexidine มากกว่าค่า MIC ถึง 50 เท่า (Larsen & Fiehn, 1996) และ biofilm ที่มีอายุมาก (72 ชั่วโมง) จะต่อต้าน chlorhexidine ได้มากกว่า biofilm ที่มีอายุน้อย (24 ชั่วโมง) (Millward & Wilson, 1989) การศึกษาในเวลาต่อมาพบว่า chlorhexidine มีผลต่อ biofilm อายุ 24-48 ชั่วโมง เฉพาะผิวภายนอกของ biofilm เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากกระทุและ chlorhexidine ต่อ biofilm อายุ 24 ชั่วโมงของเชื้อ *S. mutans* ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น MIC-32MIC ของ chlorhexidine ไม่มีผลต่อ biofilm ของเชื้อและจำนวนเชื้อใน biofilm อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากความเข้มข้นที่ 64MIC เท่านั้นที่สามารถทำให้ปริมาณของ biofilm ที่ยึดเกาะพื้นผิวและจำนวนเชื้อลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งกราด จะเห็น glucan เกาะติดกับพื้นผิวบางลง ขณะที่ biofilm และเชื้อบางส่วนหลุดออกไป ซึ่งตรงกันข้ามกับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากกระทุที่มีผลต่อ biofilm ของเชื้อ *S. mutans* พบว่าสารสกัดสามารถลดปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อภายใน biofilm ลงได้อย่างมีนัยสำคัญในเชื้อทุกสายพันธุ์ โดยมี 8 สายพันธุ์ที่ทุกความเข้มข้นของสารสกัดสามารถลดปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อได้ สารสกัดจึงมีความสามารถในการผ่านเข้าไปเพื่อฆ่าเชื้อใน biofilm ได้ดี

เนื่องจากคราบจุลินทรีย์หรือ biofilm เป็นจุดเริ่มต้นในการนำไปสู่โรคฟันผุ แต่สิ่งสำคัญที่สุดคือ การสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans* ที่อยู่ใน biofilm ที่จะไปสลายผิวฟันและทำให้เกิดฟันผุ ในที่สุด (Marsh, 2009) การสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans* เกิดจากการเมแทบอลิซึมอาหารประเภทน้ำตาลไปเป็นกรดอินทรีย์ โดยเฉพาะกรดแลคติก ทำให้ pH ภายใน biofilm ลดต่ำลง โดย pH ที่ทำให้เกิดการสลายผิวฟันได้ คือ pH ที่ต่ำกว่า 5 (Takahashi & Nyvad, 2011) ขณะเดียวกันน้ำลายเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุม pH ในช่องปาก และมีอิทธิพลต่อแบคทีเรียในช่องปาก pH ในช่องปากมี

ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 6.75-7.25 หลังการรับประทานอาหาร pH ในช่องปากจะเป็นกรด แต่ในสภาวะที่มีปริทันต์อักเสบ น้ำลายจะมี pH เป็นด่าง ประมาณ 7.8 แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ตรวจพบในช่องปากสามารถเจริญเติบโตในสภาวะ pH เป็นกลาง อย่างไรก็ตามหากสภาวะ pH ในช่องปากเปลี่ยนแปลงไป ความสามารถในการดำรงชีวิตอยู่ของแบคทีเรียก็แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรานั้น ๆ เช่น แบคทีเรียกลุ่ม mutans streptococci จะเจริญได้ในสภาวะ pH ต่ำกว่า 5 และ *Porphyromonas gingivalis* เจริญได้ pH เป็นด่าง (Marsh, 2003) ซึ่งจากรายงานการศึกษาพบว่า มีพืชบางชนิดที่ pH 7.0 และ 5.5 ไม่ได้มีผลให้การออกฤทธิ์ของสารสกัดเปลี่ยนแปลงไป เช่น สารสกัดจาก garlic, cinnamon, yucca, anise, oregano, และ capsicum (Cardozo, et al., 2005) โดยปกติสภาวะในช่องปากมีค่า pH เป็นกลาง จึงไม่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดเมื่อนำไปใช้ในช่องปาก แม้ว่าสภาวะน้ำลายในช่องปากจะมีค่า pH เป็นกรดเนื่องจากเกิดฟันผุก็ตาม จากการทดลองฤทธิ์ของสารสกัดด้วยอะซิโตนจากกระทุ้ต่อการสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans* พบว่าที่ความเข้มข้น 4MIC สามารถลดการสร้างกรดลงได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม สารสกัดทำให้ pH ที่เชื้อสร้างได้สูงกว่า pH 5 ส่วนสาเหตุที่ทำให้ pH เพิ่มขึ้นนั้น อาจเนื่องมาจากสารสกัดไปมีผลต่อกระบวนการ glycolytic pathway ทำให้ปริมาณการสร้างกรดลดลง (Ban, et al., 2012) ค่า pH จึงเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดไม่ได้มีผลลดจำนวนแบคทีเรียในช่วงเริ่มต้น สารสกัดจากพืชที่มีรายงานผลต่อการลดการสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans* เช่น สารสกัดด้วยเมทานอลจาก *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* ทำให้การผลิตกรดของเชื้อที่อยู่ในสภาวะ planktonic ลดลงแต่ไม่มีผลต่อการสร้างกรดของ *S. mutans* ที่อยู่ในสภาวะ biofilm (Mrudula, et al., 2013) และสารสกัดจาก *Emblica officinalis* ที่มีฤทธิ์ทำให้การสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans* ลดลง (Sadaf, et al., 2012)

การเลือกใช้สารสกัดด้วยอะซิโตนจากใบกระทุ้ในการทดสอบการยับยั้งการสร้าง biofilm และการสร้างกรดของ เชื้อ *S. mutans* เนื่องจากสารสกัดด้วยอะซิโตนให้ค่า MIC ต่ำกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล และจากรายงานการศึกษาพบว่าอะซิโตนใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง เช่น น้ำยาล้างเล็บ และอาหารหลายชนิด เช่น อาหารแปรรูป เครื่องดื่ม ขนมอบ และขนมหวาน โดยการใช้อะซิโตนที่ความเข้มข้น 5-8 mg/l ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Miller & Bazzano, 1965) แม้ว่าอะซิโตนที่ระดับความเข้มข้นสูงมากจะส่งผลกระทบต่อดวงตาและอวัยวะอื่น ๆ เมื่อสูดดมหรือไปสัมผัส เช่น ถ้าสูดดมอะซิโตนที่ความเข้มข้น 1,000 ppm จะทำให้เกิดการ

ระคายเคืองต่อดวงตาและลำคอเป็นเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง จึงได้รับการยอมรับว่าอะซิโตนไม่ได้เป็นสารก่อมะเร็ง และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือก่อให้เกิดความกังวลว่ามีพิษเรื้อรังต่อระบบประสาท (Ruddick, 1972, Likhodii, *et al.*, 2003, Vujasinovic, *et al.*, 2007) ดังนั้นการนำสารสกัดด้วยอะซิโตนไปประยุกต์ใช้กับร่างกายมนุษย์จึงมีความปลอดภัยสูงและเป็นที่ยอมรับ

บทที่ 5

สรุป

1. สารสกัดด้วยอะซิโตนจากไบโกระทุที่ความเข้มข้น 16-64 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ในการยับยั้ง และที่ความเข้มข้น 32-256 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. mutans*
2. สารสกัดจากไบโกระทุที่ความเข้มข้น 4MIC สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. mutans* ลงได้อย่างน้อย 2 log ภายในเวลา 24 ชั่วโมง
3. *S. mutans* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำลายในช่องปากมีความสามารถในการสร้าง biofilm โดยดูจากระดับการยึดเกาะ จัดอยู่ในระดับการยึดเกาะมาก (strongly adherent)
4. สารสกัดด้วยอะซิโตนจากไบโกระทุที่ความเข้มข้น sub-MIC มีฤทธิ์ในการยับยั้งการยึดเกาะพื้นผิวหรือยับยั้งการสร้าง biofilm ของเชื้อ *S. mutans* ได้อย่างมีนัยสำคัญ
5. สารสกัดด้วยอะซิโตนจากไบโกระทุที่ความเข้มข้น MIC-64MIC มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* ภายใน biofilm อายุ 24 ชั่วโมง
6. สารสกัดด้วยอะซิโตนจากไบโกระทุที่ความเข้มข้น 4MIC สามารถลดการสร้างกรดลงได้อย่างมีนัยสำคัญในเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 และ *S. mutans* NPRC 801

รายการเอกสารอ้างอิง

- กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช (2548) คู่มือศึกษาพันธุ์พืชป่า. กองคุ้มครองพันธุ์สัตว์ป่า และพืชป่าตามอนุสัญญา ชุมนุมการเกษตรแห่งประเทศไทย เล่มที่ 2.
- Ahn SJ, Cho EJ, Kim HJ, Park SN, Lim YK & Kook JK (2012) The antimicrobial effects of deglycyrrhizinated licorice root extract on *Streptococcus mutans* UA159 in both planktonic and biofilm cultures. *Anaerobe* **18**: 590-596.
- Almeida LS, Murata RM, Yatsuda R, *et al.* (2008) Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine* **15**: 886-891.
- Alviano WS, Alviano DS, Diniz CG, *et al.* (2008) In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Arch Oral Biol* **53**: 545-552.
- Bakri IM & Douglas CW (2005) Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol* **50**: 645-651.
- Ban SH, Kim JE, Pandit S & Jeon JG (2012) Influences of *Dryopteris crassirhizoma* Extract on the Viability, Growth and Virulence Properties of *Streptococcus mutans*. *Molecules* **17**: 9231-9244.
- Ban SH, Kwon YR, Pandit S, Lee YS, Yi HK & Jeon JG (2010) Effects of a bio-assay guided fraction from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, acid production and glucosyltransferase of mutans streptococci. *Fitoterapia* **81**: 30-34.
- Banas JA & Vickerman MM (2003) Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med* **14**: 89-99.

- Beaudouin E, Kanny G, Morisset M, *et al.* (2004) Immediate hypersensitivity to chlorhexidine: literature review. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* **36**: 123-126.
- Bender GR, Sutton SV & Marquis RE (1986) Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect Immun* **53**: 331-338.
- Bidault P, Chandad F & Grenier D (2007) Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology. *J Can Dent Assoc* **73**: 721-725.
- Bowen WH & Koo H (2011) Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* **45**: 69-86.
- Cardozo PW, Calsamiglia S, Ferret A & Kamel C (2005) Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J Anim Sci* **83**: 2572-2579.
- Carounanidy U, Satyanarayanan R & Velmurugan A (2007) Use of an aqueous extract of *Terminalia chebula* as an anticaries agent: a clinical study. *Indian J Dent Res* **18**: 152-156.
- Chang YC, Huang FM, Tai KW & Chou MY (2001) The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **92**: 446-450.
- Chavan SD, Shetty NL & Kanuri M (2010) Comparative evaluation of garlic extract mouthwash and chlorhexidine mouthwash on salivary *Streptococcus mutans* count - an in vitro study. *Oral Health Prev Dent* **8**: 369-374.
- Chorachoo J, Amnuait T & Voravuthikunchai SP (2013) Liposomal Encapsulated Rhodomyltone: A Novel Antiacne Drug. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

- CLSI (2009) Reference Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. *Approved Standard. M100-S19* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute **29**: 1-156.
- Colby SM & Russell RR (1997) Sugar metabolism by mutans streptococci. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **26**: 80-88.
- Dachriyanus, Salni, Sargent MV, *et al.* (2002) Rhodomyrton, an antibiotic from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Australian Journal of Chemistry* **55**: 229-232.
- de Soet JJ, Nyvad B & Kilian M (2000) Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Res* **34**: 486-490.
- Figueiredo NL, de Aguiar SRMM, Falé PL, Ascensão L, Serralheiro MLM & Lino ARL (2010) The inhibitory effect of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii* leaves on the viability, glucosyltransferase activity and biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. **119**: 660- 668.
- Fine DH (1988) Mouthrinses as adjuncts for plaque and gingivitis management. A status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent* **1**: 259-263.
- Gilbert P, Das J & Foley I (1997) Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* **11**: 160-167.
- Gordon JM, Lamster IB & Seiger MC (1983) Efficacy of Listerine antiseptic in inhibiting the development of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* **12**: 697-704.
- Haffajee AD, Yaskell T & Socransky SS (2008) Antimicrobial effectiveness of an herbal mouthrinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouthrinse. *J Am Dent Assoc* **139**: 606-611.

- Hanna MN, Ferguson RJ, Li YH & Cvitkovitch DG (2001) *uvrA* is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **183**: 5964-5973.
- Hillman JD (2002) Genetically modified *Streptococcus mutans* for the prevention of dental caries. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**: 361-366.
- Hillman JD, Chen A & Snoep JL (1996) Genetic and physiological analysis of the lethal effect of L-(+)-lactate dehydrogenase deficiency in *Streptococcus mutans*: complementation by alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Infect Immun* **64**: 4319-4323.
- Hiranrat A & Mahabusarakam W (2008) New acylphloroglucinols from the leaves of *Rhodomyrtus tomentosa*. *Tetrahedron* **64**: 11193-11197.
- Hiranrat A, Mahabusarakam W, Carroll AR, Duffy S & Avery VM (2012) Tomentosones A and B, Hexacyclic Phloroglucinol Derivatives from the Thai Shrub *Rhodomyrtus tomentosa*. *Journal of Organic Chemistry* **77**: 680-683.
- Huang WY, Cai YZ, Corke H & Sun M (2010) Survey of antioxidant capacity and nutritional quality of selected edible and medicinal fruit plants in Hong Kong. *Journal of Food Composition and Analysis* **23**: 510-517.
- Hui WH & Li MM (1976) Two new triterpenoids from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Phytochemistry* **15**: 1741-1743.
- Hui WH, Li MM & Luk K (1975) Triterpenoids and steroids from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Phytochemistry* **14**: 833-834.
- Islam B, Khan SN & Khan AU (2007) Dental caries: from infection to prevention. *Med Sci Monit* **13**: 196-203.

- Jarvinen H, Tenovuo J & Huovinen P (1993) In vitro susceptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 1158-1159.
- Jenkinson HF & Lamont RJ (2005) Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol* **13**: 589-595.
- Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML & Koo H (2011) Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res* **45**: 243-263.
- Jeong D, Yang WS, Yang Y, *et al.* (2013) In vitro and in vivo anti-inflammatory effect of *Rhodymyrtus tomentosa* methanol extract. *Journal of Ethnopharmacology* **146**: 205-213.
- Kim HS (2005) Do not put too much value on conventional medicines. *J Ethnopharmacol* **100**: 37-39.
- Knoll-Kohler E & Stiebel J (2002) Amine fluoride gel affects the viability and the generation of superoxide anions in human polymorphonuclear leukocytes: an in vitro study. *European Journal of Oral Sciences* **110**: 296-301.
- Koo H, Falsetta ML & Klein MI (2013) The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res* **92**: 1065-1073.
- Lachenmeier D (2008) Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* **3**: 1-16.
- Larsen T & Fiehn NE (1996) Resistance of *Streptococcus sanguis* biofilms to antimicrobial agents. *APMIS* **104**: 280-284.

- Lauten JD, Boyd L, Hanson MB, Lillie D, Gullion C & Madden TE (2005) A clinical study: Melaleuca, Manuka, Calendula and green tea mouth rinse. *Phytother Res* **19**: 951-957.
- Lee DH, Seo BR, Kim HY, *et al.* (2011) Inhibitory effect of *Aralia continentalis* on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. *J Ethnopharmacol* **137**: 979-984.
- Lee SF, Progulsk-Fox A, Erdos GW, Piacentini DA, Ayakawa GY, Crowley PJ & Bleiweis AS (1989) Construction and characterization of isogenic mutants of *Streptococcus mutans* deficient in major surface protein antigen P1 (I/II). *Infect Immun* **57**: 3306-3313.
- Leejae S, Taylor PW & Voravuthikunchai SP (2013) Antibacterial mechanisms of rhodomyrtone against important hospital-acquired antibiotic-resistant pathogenic bacteria. *Journal of Medical Microbiology* **62**: 78-85.
- Leejae S, Hasap L & Voravuthikunchai SP (2013) Inhibition of staphyloxanthin biosynthesis in *Staphylococcus aureus* by rhodomyrtone, a novel antibiotic candidate. *Journal of Medical Microbiology* **62**: 421-428.
- Li YH, Tang N, Aspiras MB, Lau PC, Lee JH, Ellen RP & Cvitkovitch DG (2002) A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **184**: 2699-2708.
- Likhodii SS, Serbanescu I, Cortez MA, Murphy P, Snead OC, 3rd & Burnham WM (2003) Anticonvulsant properties of acetone, a brain ketone elevated by the ketogenic diet. *Ann Neurol* **54**: 219-226.
- Limsuwan S & Voravuthikunchai SP (2008) *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr., *Eleutherine americana* Merr. and *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. as antibiofilm producing and anti-quorum sensing in *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **53**: 429-436.

- Limsuwan S & Voravuthikunchai SP (2013) Anti-*Streptococcus pyogenes* Activity of Selected Medicinal Plant Extracts Used in Thai Traditional Medicine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **12**: 535-540.
- Limsuwan S, Trip EN, Kouwen T, *et al.* (2009) Rhodomyrtone: A new candidate as natural antibacterial drug from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Phytomedicine* **16**: 645-651.
- Liu Y, Hou A, Ji C & Wu Y (1998) Isolation and structure of hydrolysable tannins from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Natural Product Research and Development* **10**: 14-19.
- Loesche W (2007) Dental caries and periodontitis: contrasting two infections that have medical implications. *Infect Dis Clin North Am* **21**: 471-502.
- Loesche WJ (1986) Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* **50**: 353-380.
- Lorian V (1991) *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams & Wilkins.
- Ma JK, Kelly CG, Munro G, Whiley RA & Lehner T (1991) Conservation of the gene encoding streptococcal antigen I/II in oral streptococci. *Infect Immun* **59**: 2686-2694.
- Marsh PD (2003) Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* **149**: 279-294.
- Marsh PD (2006) Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health* **6**: 1-14.
- Marsh PD (2009) Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. *Compend Contin Educ Dent* **30**: 76-78.

- Matsui R & Cvitkovitch D (2010) Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol* **5**: 403-417.
- Matsumura M, Izumi T, Matsumoto M, Tsuji M, Fujiwara T & Ooshima T (2003) The role of glucan-binding proteins in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Immunol* **47**: 213-215.
- Matthijs S & Adriaens PA (2002) Chlorhexidine varnishes: a review. *J Clin Periodontol* **29**: 1-8.
- McCullough MJ & Farah CS (2008) The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. *Australian Dental Journal* **53**: 302-305.
- McNeill K & Hamilton IR (2003) Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* **221**: 25-30.
- Merritt JH, Kadouri DE & O'Toole GA (2005) Growing and Analyzing Static Biofilms. *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Miller ON & Bazzano G (1965) Propanediol metabolism and its relation to lactic acid metabolism. *Ann N Y Acad Sci* **119**: 957-973.
- Millward TA & Wilson M (1989) The effect of chlorhexidine on *Streptococcus sanguis* biofilms. *Microbios* **58**: 155-164.
- Moulari B, Lboutounne H, Chaumont JP, Guillaume Y, Millet J & Pellequer Y (2006) Potentiation of the bactericidal activity of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae) leaf extract against oral bacteria using poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: in vitro study. *Acta Odontol Scand* **64**: 153-158.

- Mrudula P, Roxanne N & Foluso JO (2013) Inhibitory Effect of *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* on the Virulence Properties of the Oral Pathogens *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **12**: 1-5.
- Na-Phatthalung P, Suanyuk N & Voravuthikunchai SP (2013) In vitro antimicrobial property of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. against *Streptococcus agalactiae* isolated from cultured tilapia. *International Journal of Antimicrobial Agents* **42**: 73-79.
- Naidoo R, Patel M, Gulube Z & Fenyvesi I (2012) Inhibitory activity of *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* extract against *Streptococcus mutans* and its biofilm. *J Ethnopharmacol* **144**: 171-174.
- Netuschil L, Weiger R, Preisler R & Brex M (1995) Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and listerine mouthrinses. *Eur J Oral Sci* **103**: 355-361.
- Nostro A, Cannatelli MA, Crisafi G, Musolino AD, Procopio F & Alonzo V (2004) Modifications of hydrophobicity, in vitro adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract. *Lett Appl Microbiol* **38**: 423-427.
- Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G & Cury JA (2006) The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res* **85**: 878-887.
- Palombo EA (2011) Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **1**: 1-15.
- Petersen FC, Assev S, van der Mei HC, Busscher HJ & Scheie AA (2002) Functional variation of the antigen I/II surface protein in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*. *Infect Immun* **70**: 249-256.

- Petersen PE (2005) The burden of oral disease: challenges to improving oral health in the 21st century. *Bulletin of the World Health Organization* **83**: 3-3.
- Prabu GR, Gnanamani A & Sadulla S (2006) Guaijaverin -- a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J Appl Microbiol* **101**: 487-495.
- Roberts AP & Mullany P (2010) Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* **8**: 1441-1450.
- Roberts WR & Addy M (1981) Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. *J Clin Periodontol* **8**: 295-310.
- Rodrigues F, Lehmann M, do Amaral VS, Reguly ML & de Andrade HHR (2007) Genotoxicity of three mouthwash products, Cepacol®, Periogard®, and Plax®, in the *Drosophila* wing-spot test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **48**: 644-649.
- Ruddick JA (1972) Toxicology, metabolism, and biochemistry of 1,2-propanediol. *Toxicol Appl Pharmacol* **21**: 102-111.
- Sadaf H, Mohd D, Mohd A, Kunal S, Praveen KV & U.K. A (2012) Efficacy of *E. officinalis* on the Cariogenic Properties of *Streptococcus mutans*: A Novel and Alternative Approach to Suppress Quorum-Sensing Mechanism. *Plos one* **7**: 1-12.
- Saising J & Voravuthikunchai SP (2012) Anti Propionibacterium acnes activity of rhodomyrtone, an effective compound from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaves. *Anaerobe* **18**: 400-404.

- Saising J, Ongsakul M & Voravuthikunchai SP (2011) *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. ethanol extract and rhodomyrtone: a potential strategy for the treatment of biofilm-forming staphylococci. *Journal of Medical Microbiology* **60**: 1793-1800.
- Saising J, Hiranrat A, Mahabusarakam W, Ongsakul M & Voravuthikunchai SP (2008) Rhodomyrtone from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) hassk. as a natural antibiotic for staphylococcal cutaneous infections. *Journal of Health Science* **54**: 589-595.
- Sampaio FC, Pereira Mdo S, Dias CS, Costa VC, Conde NC & Buzalaf MA (2009) In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *J Ethnopharmacol* **124**: 289-294.
- Shani S, Friedman M & Steinberg D (2000) The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms. *Caries Res* **34**: 260-267.
- Silva ML, Coimbra HS, Pereira AC, *et al.* (2007) Evaluation of piper cubeba extract, (-)-cubebin and its semi-synthetic derivatives against oral pathogens. *Phytother Res* **21**: 420-422.
- Smullen J, Finney M, Storey DM & Foster HA (2012) Prevention of artificial dental plaque formation in vitro by plant extracts. *J Appl Microbiol* **113**: 964-973.
- Smullen J, Koutsou GA, Foster HA, Zumbe A & Storey DM (2007) The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res* **41**: 342-349.
- Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME & Holt JG (1986) BERGEY'S MANUAL of systemic bacteriology. *Williams & Wilkins* **2**: 1054-1063.

- Song JH, Kim SK, Chang KW, Han SK, Yi HK & Jeon JG (2006) In vitro inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Archives of Oral Biology* **51**: 1131-1140.
- Sreenivasan P & Gaffar A (2002) Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol* **29**: 965-974.
- Srikanth RK, Shashikiran ND & Subba Reddy VV (2008) Chocolate mouth rinse: Effect on plaque accumulation and mutans streptococci counts when used by children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* **26**: 67-70.
- StepanoviĆ S, VukoviĆ D, DakiĆ I, SaviĆ B & ŠvabiĆ-VlahoviĆ M (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* **40**: 175-179.
- Svensater G, Larsson UB, Greif EC, Cvitkovitch DG & Hamilton IR (1997) Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* **12**: 266-273.
- Takahashi N & Nyvad B (2010) The Role of Bacteria in the Caries Process: Ecological Perspectives. *Journal of Dental Research* **90**: 294-303.
- Takahashi N & Nyvad B (2011) The Role of Bacteria in the Caries Process: Ecological Perspectives. *Journal of Dental Research* **90**: 294-303.
- Voravuthikunchai SP, Limsuwan S & Subhadhirasakul S (2007) Screening for medicinal plants with broad spectrum of antibacterial activity. *International Journal of Antimicrobial Agents* **29**: 599-569.

- Voravuthikunchai SP, Dolah S & Charernjiratrakul W (2010) Control of *Bacillus cereus* in Foods by *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. Leaf Extract and Its Purified Compound. *Journal of Food Protection* **73**: 1907-1912.
- Vujasinovic M, Kocar M, Kramer K, Bunc M & Brvar M (2007) Poisoning with 1-propanol and 2-propanol. *Hum Exp Toxicol* **26**: 975-978.
- Winotai A, Wright T & Goolsby JA (2005) Herbivores in Thailand on *Rhodomyrtus tomentosa* (Myrtaceae), an invasive weed in Florida. *Florida Entomologist* **88**: 104-105.
- Xu X, Zhou XD & Wu CD (2011) The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 1229-1236.
- Yamanaka A, Kimizuka R, Kato T & Okuda K (2004) Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral streptococci and biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol* **19**: 150-154.
- Yanti, Rukayadi Y, Lee KH & Hwang JK (2009) Activity of panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* Roxb. against multi-species oral biofilms in vitro. *J Oral Sci* **51**: 87-95.
- Yu H, Nakano Y, Yamashita Y, Oho T & Koga T (1997) Effects of antibodies against cell surface protein antigen PAc-glucosyltransferase fusion proteins on glucan synthesis and cell adhesion of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **65**: 2292-2298.

ภาคผนวก

Table 1: Inhibitory effects of *Rhodomyrtus tomentosa* leaf extracts and antibiotics on *Streptococcus mutans* isolates (n=10) by agar disc diffusion method

Isolates	Inhibition zone (mm)											
	P	AMP	IPM	DA	TE	AZM	CLR	E	VA	TEC	A*	E*
NPRC 801	31.2	41.1	48.4	31.7	36.7	29.1	35.0	34.2	22.1	22.0	8.0	8.1
NPRC 802	33.4	43.4	48.0	36.0	35.1	32.1	37.2	37.1	27.1	19.1	8.2	-
NPRC 803	42.7	40.0	48.6	33.7	36.0	31.1	34.0	35.1	25.1	19.2	7.2	9.6
NPRC 804	33.3	42.1	50.7	35.5	37.1	29.1	38.1	36.1	26.1	17.0	8.0	10.1
NPRC 805	30.0	45.7	51.6	38.0	39.2	34.1	38.2	38.1	28.0	22.1	8.0	10.2
NPRC 806	46.0	42.6	47.9	42.0	44.2	34.1	39.1	42.3	28.1	17.1	12.1	7.1
NPRC 807	34.5	44.2	49.5	34.6	39.5	32.0	37.1	37.1	25.1	19.0	10.1	8.1
NPRC 808	33.7	46.0	52.0	35.0	44.0	33.1	40.2	38.2	27.1	21.0	8.1	-
NPRC 809	30.0	42.0	47.2	31.2	32.0	31.1	37.2	36.2	24.2	19.2	7.2	12.0

Table 1: (Continued)

Isolates	Inhibition zone (mm)											
	P	AMP	IPM	DA	TE	AZM	CLR	E	VA	TEC	A*	E*
NPRC 810	34.0	44.9	44.8	33.8	37.1	33.1	38.8	36.1	24.0	20.1	-	9.5
<i>S. mutans</i>	40.0	38.6	49.5	34.8	33.2	30.1	38.0	36.1	24.1	17.1	9.0	11.1
ATCC												
25175												

P=Penicillin; AMP=Ampicillin; IMP=Imepenem; DA=Clindamycin; TE=Tetracycline; AZM=Azithromycin

CLR=Clariomycin; E=Erythromycin; VA=Vancomycin; TEC=Teicoplanin

A*=Acetone extract; E*=Ethanol extract

--No zone

Table 2 The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of the extract from *Rhodomyrtus tomentosa* against clinical Isolates of *Streptococcus mutans* (n=10)

Isolates	MIC/MBC ($\mu\text{g/ml}$)			
	Ethanol extract	Acetone extract	Chlorhexidine	PenicillinG
NPRC 801	128/512	32/64	0.5/0.5	0.0156/0.0156
NPRC 802	1,024/>1,024	16/32	0.5/0.5	0.0156/0.0156
NPRC 803	32/128	16/32	0.5/0.5	0.0156/0.0312
NPRC 804	128/1,024	32/32	0.5/1	0.0156/0.0156
NPRC 805	1,024/>1,024	64/256	0.25/0.5	0.0156/0.0156
NPRC 806	64/512	16/64	0.5/1	0.0156/0.0156
NPRC 807	1,024/>1,024	32/64	0.5/1	0.0156/0.0156
NPRC 808	>1,024/ND	32/256	0.5/2	0.0156/0.0312
NPRC 809	512/>1,024	32/64	0.5/0.5	0.0156/0.0156
NPRC 810	64/256	16/64	0.5/1	0.0156/0.0312
<i>S. mutans</i>	64/256	32/64	0.5/1	0.0156/0.0156
ATCC 25175				

ND=Not determined

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

Table 3: Zone diameter and minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive standards for *Streptococcus* spp. Viridans group.

Test/report group	Antimicrobial agent	Disk content	Zone diameter breakpoints			MIC Interpretive standard (µg/ml)		
			S	I	R	S	I	R
PENICILLINS								
A	Penicillin	-	-	-	-	≤ 0.12	0.25-2	≥ 4
A	Ampicillin	-	-	-	-	≤ 0.25	0.5-4	≥ 8
CEPHEMS (including cephalosporins I, II, III and IV)								
B	Cefepime	30 µg	≥ 24	22-23	≤ 21	≤ 1	2	≥ 4
B	Cefotaxime	30 µg	≥ 28	26-27	≤ 25	≤ 1	2	≥ 4
B	Ceftriaxone	30 µg	≥ 27	25-26	≤ 24	≤ 1	2	≥ 4
CARBAPENEMS								
O	Ertapenem	-	-	-	-	≤ 1	-	-
O	Meropenam	-	-	-	-	≤ 0.5	-	-

Table 3: (Continued)

Test/report group	Antimicrobial agent	Disk content	Zone diameter breakpoint (mm)			MIC Interpretive standard (µg/ml)		
			S	I	R	S	I	R
GLYCOPEPTIDES								
B	Vancomycin	30 µg	≥ 17	-	-	≤ 1	-	-
LIPOPEPTIDES								
O	Deptomycin	-	-	-	-	≤ 1	-	-
MACROLIDES								

C	Erythromycin	15 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 0.25	0.5	≥ 1
O	Azithromycin	15 µg	≥ 18	14-17	≤ 13	≤ 0.5	1	≥ 2
O	Clarithromycin	15 µg	≥ 21	17-20	≤ 16	≤ 0.25	0.5	≥ 1
O	Dirithromycin	15 µg	≥ 18	14-17	≤ 13	≤ 0.5	1	≥ 2
TETRACYCLINES								
O	Tetracycline	30 µg	≥ 23	19-22	≤ 18	≤ 2	4	≥ 8
FLUOROQUINOLONES								
O	Levofloxacin	5 µg	≥ 17	14-16	≤ 13	≤ 2	4	≥ 8
C	Ofloxacin	5 µg	≥ 16	13-15	≤ 12	≤ 2	4	≥ 8

Table 3: (Continued)

Test/report group	Antimicrobial agent	Disk content	Zone diameter breakpoint (mm)			MIC Interpretive standard (µg/ml)		
			S	I	R	S	I	R
FLUOROQUINOLONES								
O	Gatifloxacin	5 µg	≥ 21	18-20	≤ 17	≤ 1	2	≥ 4
O	Grepafloxacin	5 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 0.5	1	≥ 2
O	Trovafloxacin	10 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
PHENICOLS								
C	Chloramphenicol	30 µg	≥ 21	18-20	≤ 17	≤ 4	8	≥ 16
LINCOSAMIDES								
C	Clindamycin	2 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 0.25	0.5	≥ 1
STREPTOGRAMINS								
O	Quinupristin-dalfopristin	15 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
OXAZOLIDINONES								
C	Linezolid	30 µg	≥ 21	-		≤ 2	-	-