



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของตำรับยาแผนไทยที่ใช้ในภาคใต้ต่อปัจจัยการก่อโรคฟันผุในเชื้อแบคทีเรีย

Streptococcus mutans

Effect of herbal formulas used in Southern Thailand on cariogenic
property of *Streptococcus mutans*

คณะนักวิจัย

ดร. สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ คณะการแพทย์แผนไทย

ผศ.ดร. นันทิยา จ้อยชะรัต คณะการแพทย์แผนไทย

ผศ.ดร. ศศิธร ชูศรี คณะการแพทย์แผนไทย

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2557 รหัสโครงการ TTM570392S

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำนักวิจัยและพัฒนา ขอขอบคุณ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ คณะการแพทย์แผนไทย ที่เอื้อเพื่อความสะดวกในการทำวิจัย
ครั้งนี้ และขอขอบคุณนางสาวสินีนานฎ สันพิณิจ นักศึกษาปริญญาโท คณะการแพทย์แผนไทย

สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ

ชื่องานวิจัย	ผลของตำรับยาแผนไทยที่ใช้ในภาคใต้ต่อปัจจัยการก่อโรคฟันผุในเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus mutans</i>
หัวหน้าโครงการวิจัย	ดร. สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ คณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ได้นำตำรับยาแผนไทยพื้นบ้านที่ใช้ในโรคฟันผุจำนวน 35 ตำรับ ที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างและทำลายไบโอฟิล์ม ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดของเชื้อ *Streptococcus mutans* และฤทธิ์ยับยั้งระบบ quorum-sensing (QS) จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion (2 mg/disc) พบสารสกัดจำนวน 11 ตำรับ มี inhibition zone ต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 8-15 mm สารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับ THF-DC 12 มี inhibition zone กว้างที่สุดเท่ากับ 15.0 mm จากนั้นทดสอบด้วยวิธี broth microdilution พบตำรับที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดคือ THF-DC 04 และ THF-DC 23 (minimum inhibitory concentration; MIC = 125 µg/mL) จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง ไบโอฟิล์มและฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* NPRC 007 ด้วยวิธี crystal violet staining พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากตำรับ THF-DC 10 ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่สุด (89.27%) และสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับ THF-DC 10 ที่ความเข้มข้น 250 µg/mL สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้สูงสุด (66.14%) โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ จากการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของ biofilm ที่สร้างโดยเชื้อ *S. mutans* NPRC 007 ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบกับสารสกัดด้วยน้ำจากตำรับ THF-DC 10 ที่ความเข้มข้น 250 และ 500 µg/mL พบว่าเชื้อสร้างสาร extracellular polymeric substances ได้น้อยลง และความหนาแน่นของ biofilm ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control (1% DMSO) จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดจากเชื้อ *S. mutans* NPRC 001 ด้วยวิธี glycolytic pH-drop พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับ THF-DC 02 ที่ความเข้มข้น 500 และ 1,000 µg/mL มีค่า pH drop/min เท่ากับ 0.031 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มควบคุม 1% DMSO (pH drop/min เท่ากับ 0.075) โดยไม่มีผลลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งระบบ QS ของเชื้อ *Chromobacterium violaceum* DMST 21761 ด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่ามี 11 สารสกัดที่มี QS inhibition zone โดยค่า QS inhibition zone อยู่ระหว่าง 10-24 mm ซึ่งสารสกัดที่มี QS inhibition zone กว้างที่สุดคือ สารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับ THF-DC 12 (24 mm) ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง violacein ของเชื้อ *C. violaceum* DMST 21761 ด้วยวิธี flask incubation assay พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับ THF-DC 29, THF-DC 12 และสกัดด้วยน้ำจากตำรับ THF-DC 20 ที่ความเข้มข้น 7.81-250 µg/mL สามารถยับยั้งการสร้าง violacein ของเชื้อ *C. violaceum* DMST 21761 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ 1%

DMSO (negative control) โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ สารสกัดจากตำรับยาที่สามารถยับยั้งการสร้าง violacein ได้ดีที่สุดคือ สารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับ THF-DC 29 ที่ความเข้มข้น 250 µg/mL สามารถยับยั้งการสร้าง violacein ได้ 92.84% โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากตำรับยาแต่ละตำรับมีฤทธิ์ยับยั้งปัจจัยการก่อโรคของเชื้อ *S. mutans* ได้แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าตำรับยาสมุนไพรที่ใช้ในโรคฟันผุแต่ละตำรับมีกลไกยับยั้งการเกิดโรคฟันผุที่แตกต่างกัน

Project Title Effect of herbal formulas used in Southern Thailand on cariogenic property of *Streptococcus mutans*

Principle Investigator Dr. Surasak Limsuwan
Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University

ABSTRACT

The anti-*Streptococcus mutans* activity, the effect on biofilm formation and biofilm eradication, the inhibitory effect on acid production, and anti-quorum-sensing (QS) system of ethanol and water extracts of the 35 Thai herbal formulas traditionally used for dental caries (THF-DC) were evaluated. The results revealed that 11 THF-DC extracts exhibited zones of inhibition ranging from of 8-15 mm against *S. mutans* ATCC 25175. The ethanol extract from THF-DC 12 displayed the largest zone of inhibition (15 mm). Both THF-DC 04 and THF-DC 23 ethanol extracts demonstrated antibacterial activity with the lowest minimum inhibitory concentration (MIC) value of 125 µg/mL. The biofilm inhibition percentage obtained from water extract of THF-DC 10 was 89.27% at concentration 500 µg/mL and the biofilm eradication percentage obtained from ethanol extract of THF-DC 10 was 66.14% at concentration 250 µg/mL, without affecting the bacterial growth. Scanning electron microscopy examination demonstrated that the architectures of the biofilms formed by *S. mutans* NPRC 007 were altered when treated with the water extract of THF-DC 10 at concentration 250 and 500 µg/mL. The extracellular polymeric substances produced by *S. mutans* NPRC 007 treated with this extract were less than the control (1% DMSO) and the density of biofilm was reduced obviously. By glycolytic pH-drop assay, the rates of the pH drop/min of *S. mutans* NPRC 001 cells treated with THF-DC 02 at concentrations of 500 and 1,000 µg/mL were 0.031, which lower than the pH drop/min of negative control (0.075), without affecting the cell viability. The anti-QS activity of the THF-DC extracts was evaluated using *Chromobacterium violaceum* DMST 21761 as a biosensor strain. Quorum-sensing inhibition was observed in the 11 formula extracts, the zone of QS inhibition ranging from 10-24 mm. The ethanol extract from THF-DC 12 displayed the largest zone of QS inhibition (24 mm). The inhibition of violacein production by the THF-DC extracts in *C. violaceum* DMST 21761 was evaluated by flask incubation assay. The ethanol extracts of THF-DC 29, THF-DC 12, and water extract of THF-DC 20 at concentration 7.81-250 µg/mL showed a significant reduction of violacein production in *C. violaceum*. The ethanol extract of

THF-DC 29 at concentration 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produced the highest inhibition activity by 92.84%, without affecting the bacterial growth.

The scientific evidence from this study supported the therapeutic effects of the Thai herbal formulas that traditionally used for dental caries as alternative treatment.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(7)
รายการตาราง	(8)
รายการภาพประกอบ	(9)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	32
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	33
วัสดุ	33
อุปกรณ์	34
วิธีการ	35
3. ผลการทดลอง	42
4. วิจัยาณ์	94
5. สรุป	103
เอกสารอ้างอิง	104
ภาคผนวก	127

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Antibacterial activity against two strains of <i>Streptococcus mutans</i> of 35 Thai herbal formulas used against dental caries (THF-DC) by disc diffusion and broth microdilution methods.	21
2	Effect of medicinal plants on cariogenic property of <i>Streptococcus mutans</i> .	27
3	Percentage yield of ethanol and water extracts of 35 Thai herbal formulas used for dental caries (THF-DC).	42
4	Antibacterial activity of 35 Thai herbal formulas used for dental caries (THF-DC) against <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 by agar disc diffusion method (2 mg/disc).	46
5	The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of the ethanol and water extracts of 35 Thai herbal formulas used for dental caries against <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 by broth microdilution method.	51
6	Inhibitory effect of water extracts of 35 Thai herbal formulas used for dental caries (THF-DC) on biofilm formation by <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 007 (without affecting the bacterial growth).	57
7	Inhibitory effect of ethanol extracts of 35 Thai herbal formulas used for dental caries (THF-DC) on biofilm formation by <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 007 (without affecting the bacterial growth).	64
8	Eradication of the mature biofilm formed by <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 007 after treatment with 35 Thai herbal formulas used for dental caries (THF-DC) ethanol and water extracts (250 µg/mL).	73
9	Effect of water and ethanol extracts (250 µg/mL) of 35 Thai herbal formulas used for dental caries (THF-DC) on acid production by <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 001 using final pH assay.	81
10	Anti-quorum sensing activity of water and ethanol extracts of 35 Thai herbal formulas used for dental caries (THF-DC) by agar disc diffusion assay.	88

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	This diagram represents each step of oral biofilm formation. (A) Pellicle formation. (B) Initial adhesion. (C) Maturation. (D) Dispersion. Bacteria disperse from the biofilm surface and spread to colonize a new site.	5
2	Biofilm structure. The basic structure of a biofilm is composed of the surface in which bacterial clusters are formed, channels of water through which water can flow, and streamers created by milk fluid flow.	6
3	Visualisation of multispecies oral biofilm using confocal microscopy. Staining was performed with Live/Dead BacLight bacterial viability kit. Live and dead cells are visualised in green and red, respectively.	7
4	Scanning electron micrographs of <i>Streptococcus mutans</i> 6715 attached to SHA crystals (a) in the absence of sucrose and (b) in the presence of 1% sucrose.	11
5	Schematic diagram of proposed model of <i>Streptococcus mutans</i> adherence which illustrates the cell surface protein-salivary pellicle attachment phase and the glucan-mediated cell-cell accumulation phase.	12
6	Acid tolerance mechanisms utilized by <i>Streptococcus mutans</i> . 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.	14
7	Quorum sensing at low and high cell density.	17
8	Mechanism of action of the quorum sensing system in Gram-negative bacteria.	18
9	Mechanism of action of the quorum sensing in Gram-positive bacteria.	18
10	Inhibition of quorum sensing in Gram-negative bacteria by various mechanisms.	20

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
11	Screening for biofilm formation by <i>Streptococcus mutans</i> (NPRC 001-010) using crystal violet staining.	55
12	Inhibitory effect of THF-DC 10 (water extract) on biofilm formation by <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 007.	69
13	Inhibitory effect of chlorhexidine on biofilm formation by <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 007.	69
14	Cycle of biofilm formation by <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 007.	71
15	Eradication of the mature biofilm formed by <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 007 after treatment with THF-DC 10 ethanol extract.	75
16	Eradication of the mature biofilm formed by <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 007 after treatment with THF-DC 09 ethanol extract.	75
17	Eradication of the mature biofilm formed by <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 007 after treatment with chlorhexidine.	76
18	Scanning electron micrographs of <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 007 biofilm formation on glass surfaces.	77
19	Acid production by <i>Streptococcus mutans</i> isolates (NPRC 001-010) using final pH assay.	80
20	Effect of ethanol extract of THF-DC 02 on acid production by <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 001 using glycolytic pH-drop assay.	83
21	Effect of ethanol extract of THF-DC 02 on the cell viability of <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 001.	83
22	Effect of ethanol extract of THF-DC 04 on acid production by <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 001 using glycolytic pH-drop assay.	84
23	Effect of ethanol extract of THF-DC 04 on the cell viability of <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 001.	84
24	Effect of chlorhexidine (1 and 2 µg/mL) on the cell viability of <i>Streptococcus mutans</i> NPRC 001.	85
25	Inhibition of violacein production in <i>Chromobacterium violaceum</i> DMST 21761 of Thai herbal formulas (250 µg/mL) used for dental caries (THF-DC) by flask incubation assay.	91

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
26	Inhibition of violacein production in <i>Chromobacterium violaceum</i> DMST 21761 of Thai herbal formulas used for dental caries (THF-DC) by flask incubation assay.	92
27	Effect of Thai herbal formulas used for dental caries (THF-DC) on the growth of <i>Chromobacterium violaceum</i> DMST 21761.	92
28	Inhibition of violacein production in <i>Chromobacterium violaceum</i> DMST 21761 of catechin (positive control) by flask incubation assay.	93
29	Effect of catechin (positive control) on the growth of <i>Chromobacterium violaceum</i> DMST 21761.	93

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

AHL	=	acylhomoserine lactones
CFU	=	colony forming unit
°C	=	degree celsius
THF-DC	=	Thai herbal formulas used for dental caries
μL	=	microliter
μg	=	microgram
mL	=	milliliter
mm	=	millimeters
mM	=	millimolar
OD	=	optical density
rpm	=	revolutions per minute
SEM	=	scanning electron microscope
nm	=	nanometers
%	=	percentage